

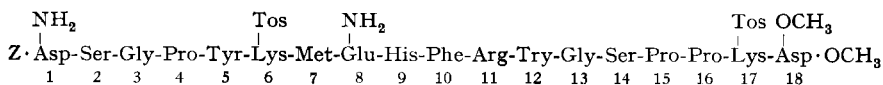
175. Synthese von Peptid-Zwischenprodukten für den Aufbau des β -Melanophoren-stimulierenden Hormons (β -MSH) des Rindes

I. Geschützte Peptidsequenzen 1-6 und 1-7

von B. Iselin und R. Schwyzer

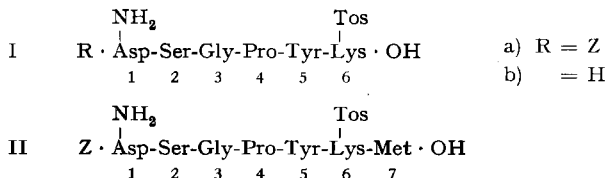
(30. V. 1962)

In einer vorläufigen Mitteilung¹⁾ haben wir über die Synthese und biologische Aktivität eines geschützten Octadecapeptids mit der Aminosäuresequenz des Rinder- β -Melanotropins²⁾ berichtet. Das Octadecapeptidderivat³⁾:



wurde aus drei geschützten Peptiden mit den Sequenzen 1-7, 8-13 und 14-18 aufgebaut. Als Synthese-Variante planten wir den Aufbau durch Verknüpfung von Peptidderivaten mit den Sequenzen 1-6, 7-13 und 14-18.




In der Zwischenzeit ist die Synthese der Peptid-Zwischenprodukte 8-13⁴⁾ und 7-13⁵⁾, deren Aminosäurefolge derjenigen der Sequenzen 5-10, resp. 4-10 des Adrenocorticotropins (ACTH) entspricht⁶⁾, ausführlich beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit wird über den Aufbau der geschützten Peptid-Sequenzen 1-6 (I) und 1-7 (II) berichtet.



Diese Peptidderivate wurden aus je zwei Bruchstücken aufgebaut, wobei Carbo-benzyloxy-L-asparaginyll-L-seryl-glycin (VIa) (Glycin am Carboxylende verunmöglicht

¹⁾ R. SCHWYZER, H. KAPPELER, B. ISELIN, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* **42**, 1702 (1959).

²⁾ I. I. GESCHWIND, C. H. LI & L. BARNAFI, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 1003, 6394 (1957).

³⁾ Die Abkürzungen der Aminosäurereste entsprechen weitgehend den Vorschlägen von E. BRAND & J. T. EDSALL, *Ann. Review Biochemistry* **17**, 223 (1947); weitere Abkürzungen: Z = Carbo-benzyloxy = -CH₂OCO-, MZ = *p*-(*p*'-Methoxyphenylazo)-carbo-benzyloxy = CH₃O--CH₂OCO-, Tos = Tosyl, BOC = *t*-Butyloxycarbonyl = (CH₃)₃COCO-, NB = *p*-Nitrobenzyl = -CH₂--NO₂. In den Reaktionsschemen sind kristalline Verbindungen durch eine stark ausgezogene Basislinie gekennzeichnet.

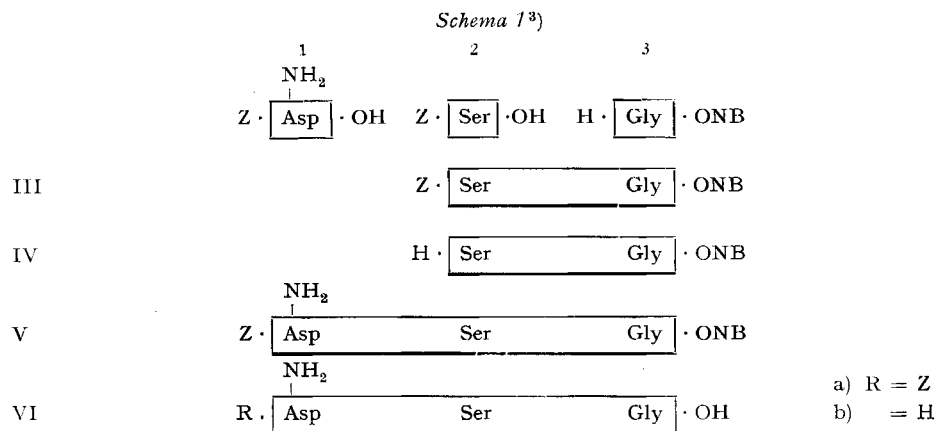
⁴⁾ H. KAPPELER, *Helv.* **44**, 476 (1961).

⁵⁾ H. KAPPELER & R. SCHWYZER, *Helv.* **43**, 1453 (1960).

⁶⁾ Zusammenfassungen siehe C. H. LI, *Advances Protein Chemistry* **12**, 288 (1957); J. I. HARRIS, *Brit. Med. Bull.* **16**, 189 (1960); R. SCHWYZER in «Protides of the Biological Fluids (Proceedings of the IXth Coll., Bruges, 1961)», Ed. H. Peeters, Elsevier, Amsterdam, 1962, p. 27; *Pharmacological Vol. 7* (1st Internat. Pharmacological Meeting, Stockholm, 1961), Pergamon Press, London, in press.

Racemisierungserscheinungen bei der Kondensation), mit L-Prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysin (X), resp. L-Prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-L-methionin (XV) kondensiert wurde.

Die Synthese des Tripeptidderivats VIa erfolgte durch stufenweisen Aufbau, ausgehend vom Carboxylende (Schema I). Durch Verwendung der *p*-Nitrobenzylestergruppe⁷⁾ zum Schutze der Carboxylfunktion des Glycins konnten alle Zwischenprodukte in kristalliner Form gefasst werden. Auch die Abspaltung der Carbobenzoxygruppe des geschützten Dipeptids III verlief ohne Veränderung der *p*-Nitrobenzylesterfunktion⁷⁾ durch Behandlung mit HBr, wobei sich Essigester als Lösungsmittel sehr bewährte, um die bei Decarbobenzoxylierungen in Eisessig oft auftretende Acetylierung des Serins⁸⁾ zu vermeiden.



Als Kondensationsmittel für die Synthese der Zwischenprodukte III und V wurde Dicyclohexyl-carbodiimid verwendet, wobei das geschützte Tripeptid V⁹⁾ allerdings nur in mässiger Ausbeute erhalten wurde, da wahrscheinlich die β -Amidgruppe des L-Asparagins unter dem Einfluss von Dicyclohexyl-carbodiimid teilweise zur β -Cyanogruppe dehydriert wird¹⁰⁾. Die Beobachtung, dass die Kondensation von β -Ethern der Asparaginsäure allgemein besser verläuft, als diejenige von Asparagin¹¹⁾ konnte im vorliegenden Falle bestätigt werden. So lieferte Carbobenzoxy-L-asparaginsäure- β -methylester¹²⁾ oder das entsprechende *p*-(*p*'-Methoxyphenylazo)-carbobenzoxy-Derivat¹³⁾ bei der Kondensation mit dem Dipeptidester IV die Tripeptidderivate

⁷⁾ a) R. SCHWYZER & P. SIEBER, *Helv.* **42**, 972 (1959); b) H. SCHWARZ & K. ARAKAWA, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 5691 (1959).

⁸⁾ a) K. OKAWA, *Bull. chem. Soc. Japan* **30**, 976 (1957); b) St. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **41**, 1852 (1958).

⁹⁾ R. F. FISCHER & R. R. WHEATSTONE, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 750 (1955) haben das entsprechende Äthylesterderivat, Z · Asp(NH₂)-Ser-Gly · OC₂H₅ über das mit Chlorkohlensäure-äthylester hergestellte gemischte Anhydrid in einer Ausbeute von 16% erhalten.

¹⁰⁾ P. G. KATSOYANNIS, D. T. GISH, G. P. HESS & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 2558 (1958); Ch. RESSLER & H. RATZKIN, *J. org. Chemistry* **26**, 3356 (1961).

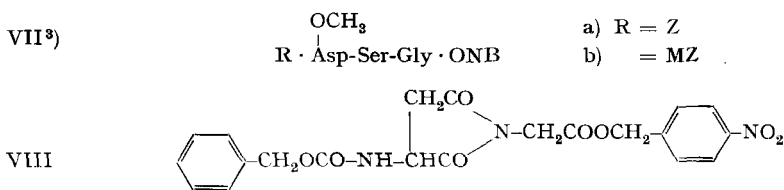
¹¹⁾ Siehe z. B. Übersicht in Tabellen 5 und 6 der Inauguraldissertation von E. SURBECK-WEGMANN, Universität Zürich, 1961.

¹²⁾ H. SCHWARZ, F. M. BUMPUS & I. H. PAGE, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 5697 (1957).

¹³⁾ R. SCHWYZER, P. SIEBER & K. ZATSKÓ, *Helv.* **41**, 491 (1958), und ^{7a)}.

VIIa und VIIb in beträchtlich besserer Ausbeute (73, resp. 74%), als sie bei der Synthese von V erzielt wurde (45%).

Während die Verseifung der Estergruppe in V ohne besondere Schwierigkeiten verlief, gelang die ursprünglich geplante selektive Verseifung der *p*-Nitrobenzylestergruppe in VIIa oder VIIb nicht, wahrscheinlich infolge der äusserst leichten Zyklisierung der β -Ester von Asparaginsäurepeptiden zu zyklischen Imiden¹⁴⁾. In einem Modellversuch konnte nach milder alkalischer Behandlung von Carbobenzoxy-L-aspartyl-(β -benzylester)-glycin-*p*-nitrobenzylester das zyklische Imid VIII gefasst werden.



Das zum Aufbau des Hexapeptidderivats Ia benötigte Bruchstück L-Prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysin (X, Schema 2) liess sich direkt aus dem entsprechenden Carbobenzoxyderivat¹⁵⁾ durch Hydrogenolyse gewinnen. Im Gegensatz dazu konnte das geschützte Tetrapeptid Carbobenzoxy-L-prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-L-methionin-methylester nur auf dem Umweg über das Methionin-sulfoxid-Derivat in das für die Synthese von II benötigte Bruchstück L-Prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-L-methionin (XV) übergeführt werden¹⁵⁾.

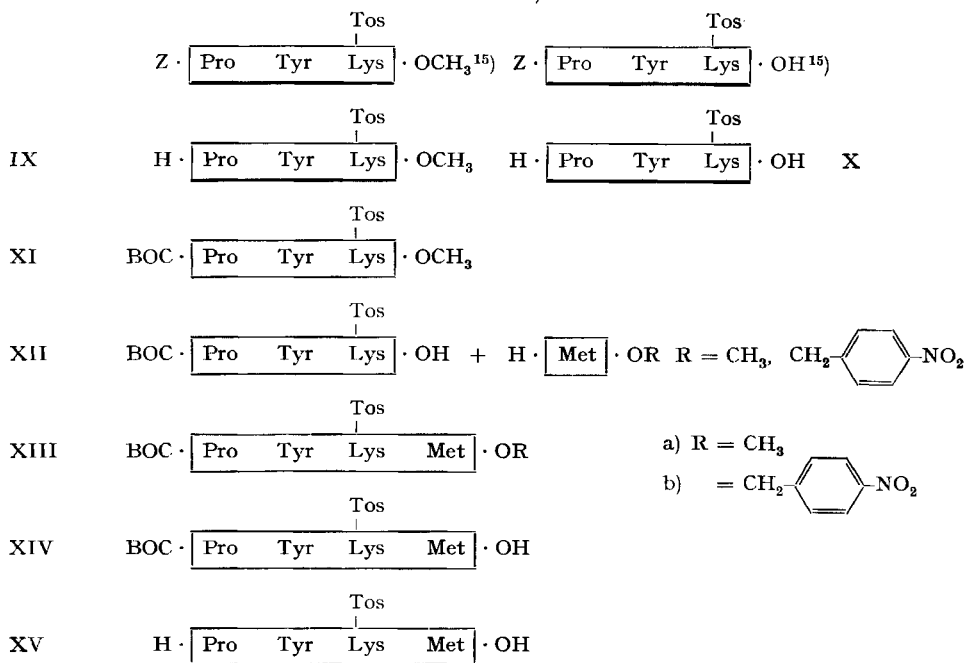
Eine Alternative zur Herstellung dieses Tetrapeptidderivats unter Ersatz der Carbobenzoxy- durch die *t*-Butyloxycarbonylgruppe auf der Stufe des Tripeptids ist in Schema 2 gezeigt. Der Ester IX wurde mittels *t*-Butyloxycarbonyl-*p*-nitrophenol¹⁶⁾ in den *t*-Butyloxycarbonyl-tripeptidester XI übergeführt, der zur Säure XII verseift und mit L-Methionin-methylester, resp. L-Methionin-*p*-nitrobenzylester umgesetzt wurde. Diese letztere Verbindung liess sich überraschenderweise durch direkte Decarbenzoxylierung von Carbobenzoxy-L-methionin-*p*-nitrobenzylester mittels HBr in einem unpolaren Lösungsmittel herstellen. Während sonst bei der Anwendung dieser Methode auf Methionin enthaltende Carbobenzoxyverbindungen ein schwer trennbares Gemisch von Methionin- und S-Benzyl-homocystein-Derivaten entsteht^{8b)}, konnte im vorliegenden Fall das gewünschte Reaktionsprodukt infolge seiner geringen Löslichkeit, die durch Verwendung von Essigester oder Äther als Reaktionsmedium noch weiter erniedrigt wurde, direkt in reiner Form isoliert werden.

Die *t*-Butyloxycarbonyl-tetrapeptidester XIIIa und b liessen sich nach Verseifung zu XIV und anschliessender Abspaltung der *t*-Butyloxycarbonylgruppe in das kri-

¹⁴⁾ A. R. BATTERSBY & J. C. ROBINSON, J. chem. Soc. 1955, 259; siehe auch E. SONDEIMER & R. W. HOLLEY, J. Amer. chem. Soc. 76, 2467 (1954); M. GOODMAN & G. W. KENNER, Advances Protein Chemistry 12, 497 (1957).

¹⁵⁾ B. ISELIN, Helv. 44, 61 (1961).

¹⁶⁾ G. W. ANDERSON & A. C. MCGREGOR, J. Amer. chem. Soc. 79, 6180 (1957). Zur Einführung des *t*-Butyloxycarbonylrests könnte voraussichtlich auch *t*-Butyloxycarbonylazid verwendet werden; vgl. R. SCHWYZER, P. SIEBER & H. KAPPELER, Helv. 42, 2622 (1959); B. ISELIN & R. SCHWYZER, Helv. 44, 169 (1961).

Schema 2⁸⁾

stalline L-Prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-L-methionin (XV) überführen, das sich als identisch mit dem auf anderem Wege¹⁵⁾ hergestellten Material erwies.

Zur Synthese der Hexa- und Heptapeptidderivate Ia und II wurde das Carbobenzoxy-tripeptid VIa mittels Isobutylchlorocarbonat in das gemischte Anhydrid übergeführt und mit einer Lösung der Triäthylammoniumsalze von X, resp. XV in Dimethylformamid umgesetzt. Die erhaltenen amorphen Produkte liessen sich durch Umfällen aus Alkohol reinigen, wobei das Hexapeptidderivat Ia direkt in papierchromatographisch reiner Form anfiel, während das geschützte Heptapeptid II erst nach Gegenstromverteilung diesen Reinheitsgrad aufwies.

Auffallenderweise ergab die Totalhydrolyse dieser Carbobenzoxyverbindungen mit 6N Salzsäure Anlass zum Auftreten von Umwandlungsprodukten des Tyrosins, eine Erscheinung, auf die in einer folgenden Arbeit¹⁷⁾ näher eingegangen werden soll.

Experimenteller Teil

Die angegebenen Smp. sind in einer Kapillare im Heizbad bestimmt und nicht korrigiert. Papierchromatographie: auf WHATMAN-Papier Nr. 3, absteigend in den Systemen: I = *t*-Amylalkohol (100 ml), Isopropanol (40 ml), Wasser (50 ml), Triäthylamin (0,8 ml), Diäthylbarbitursäure (1,8 g); II = *sec*-Butanol (70 ml), Isopropanol (10 ml), Wasser (40 ml), Monochloressigsäure (3 g); III = *sec*-Butanol (100 ml), Isopropanol (15 ml), Wasser (70 ml), Diäthylbarbitursäure-Na-Salz (0,5 g); IV = *sec*-Butanol (35 ml), Isopropanol (35 ml), Wasser (25 ml), Phosphatpuffer 1,5M, pH = 8 (10 ml); V = *t*-Amylalkohol (100 ml), Isopropanol (40 ml), Wasser (55 ml); VI = *n*-Butanol (40 ml), Wasser (50 ml), Essigsäure (10 ml). Anfärbung mit Ninhydrin, bei Anwesenheit von Tyrosin auch mit PAULY-Reagens.

¹⁷⁾ B. ISELIN, Helv. 45, 1510 (1962).

A. Sequenz H · Asp(NH₂)-Ser-Gl · OH

Glycin-p-nitrobenzylester. Veresterung von Carbobenzoxy-glycin mittels *p*-Nitrobenzylbromid in Gegenwart von Triäthylamin und anschließende Decarbenzoxylierung mittels Bromwasserstoff in Eisessig ergab das Glycin-*p*-nitrobenzylester-hydrobromid, Smp. 202–205° (aus Methanol), dessen Herstellung von SCHWARZ & ARAKAVA^{7b}) ausführlich beschrieben worden ist.

Zur Überführung in den freien Ester werden 58 g (0,2 Mol) des Hydrobromids in 100 ml Wasser gelöst, mit 300 ml Essigester überschichtet und bei 0° unter Umschütteln mit 50 ml kalter, gesättigter Kaliumcarbonatlösung versetzt. Die Essigesterphase wird abgetrennt und die wässrige Lösung, nach Absättigen mit festem Kaliumcarbonat, noch zweimal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterphasen werden getrocknet und ergeben nach vorsichtigem Eindampfen im Vakuum bei Zimmertemperatur 36,4 g (87%) Glycin-*p*-nitrobenzylester als kristallinen Rückstand vom Smp. 51–53°, der direkt weiter verarbeitet werden kann. Smp. unverändert nach zweimaligem Umkristallisieren aus viel Äther.

C₉H₁₀O₄N₂ (210,2) Ber. N 13,33% Gef. 13,35%.

Bei längerem Stehen zyklisiert sich der freie Ester zu Diketopiperazin.

Carbobenzoxy-L-seryl-glycin-p-nitrobenzylester (III). 12 g (0,05 Mol) Carbobenzoxy-L-serin¹⁸) und 10,5 g (0,05 Mol) frisch hergestellter Glycin-*p*-nitrobenzylester werden in 120 ml Methylchlorid gelöst und auf 0° gekühlt, wobei sich rasch ein salzartiger Komplex der beiden Reaktionspartner ausscheidet (diese Reaktion tritt in verstärktem Masse bei Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel auf, etwas langsamer in Dimethylformamid). Das Gemisch wird mit einer Lösung von 11,3 g (0,055 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid in 20 ml Methylchlorid versetzt und über Nacht bei 0° geschüttelt; dabei geht das Salz allmählich in Lösung und gleichzeitig scheidet sich ein Gemisch des Reaktionsproduktes und Dicyclohexyl-harnstoff aus, das nach Zugabe von 0,5 ml Eisessig (zur Zerstörung von überschüssigem Carbodiimid) abfiltriert und mit Methylchlorid gewaschen wird. Zur Abtrennung von Dicyclohexyl-harnstoff wird das Material mit 150 ml Tetrahydrofuran verrührt, der ungelöste Harnstoff abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Beim Versetzen des Rückstandes mit Essigester kristallisiert das Reaktionsprodukt und wird nach Stehen über Nacht bei 0° abfiltriert. Nach Umkristallisieren aus Äthanol werden 15,0 g (70%) reines Material vom Smp. 121–123° erhalten, $[\alpha]_D^{20} = -8,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,0$ in Eisessig), $+1,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,0$ in Tetrahydrofuran).

C₂₀H₂₁O₈N₃ (431,4) Ber. C 55,68 H 4,91 N 9,74% Gef. C 55,51 H 4,95 N 9,86%

Wird die Reaktion in Dimethylformamid ausgeführt, so entstehen als Nebenprodukt ca. 15% Carbobenzoxy-L-seryl-N,N'-dicyclohexylharnstoff vom Smp. 170–171° (aus Methanol), der sich nur schwer vom Hauptprodukt abtrennen lässt.

C₂₄H₃₅O₅N₃ (445,5) Ber. C 64,69 H 7,92 N 9,43% Gef. C 64,51 H 8,00 N 9,39%

Zur Prüfung der optischen Reinheit des Carbobenzoxy-L-seryl-glycin-*p*-nitrobenzylesters wurden 4,31 g (10 mMol) in Gegenwart von Palladiumkohle hydriert (Wasserstoff-Aufnahme: 5 Äquivalente). Das erhaltene L-Seryl-glycin (1,35 g entspr. 83%, nach Umkristallisieren aus 30-proz. Alkohol) vom Smp. 215–216° (Zers.) zeigte $[\alpha]_D^{25} = +31,6^\circ \pm 0,3^\circ$ ($c = 4,0$ in 1N HCl); Lit.¹⁹): $[\alpha]_D^{25} = +30,2^\circ$ ($c = 6$ in 1N HCl).

L-Seryl-glycin-p-nitrobenzylester (IV). 43,1 g (0,1 Mol) Carbobenzoxy-L-seryl-glycin-*p*-nitrobenzylester (III) werden in 100 ml trockenem Essigester suspendiert und mit 200 ml einer frisch bei 0° hergestellten 2N-Lösung von Bromwasserstoff in Essigester versetzt. Das Ausgangsmaterial geht beim Umschütteln rasch in Lösung und nach ca. 10 Min. beginnt die Abscheidung des kristallinen Reaktionsprodukts; nach 2 Std. wird das Lösungsmittel abdekantiert, das kristalline Material mit Essigester gewaschen, filtriert und im Vakuum getrocknet. Das rohe Esterhydrobromid, 30,0 g (79%), Smp. ca. 140–145°, ist für die nachfolgende Überführung in den freien Dipeptidester genügend rein. Nach Umkristallisieren aus Alkohol wird analysenreines Material vom Smp. 157–159° erhalten; $[\alpha]_D^{27} = +12^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,0$ in Wasser).

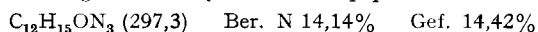
C₁₂H₁₅O₆N₃·HBr (378,2) Ber. N 11,11 Br 21,13% Gef. N 10,73 Br 21,22%

¹⁸) Hergestellt in Gegenwart von MgO nach E. BAER & J. MAURUKAS, J. biol. Chemistry 212, 25 (1955).

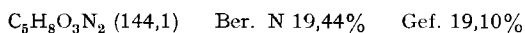
¹⁹) J. S. FRUTON, J. biol. Chemistry 146, 463 (1942).

Die Reaktion lässt sich auch mit Bromwasserstoff in Dioxan durchführen, doch kristallisiert dabei das Hydrobromid nicht aus der Reaktionslösung und ist dementsprechend schwieriger isolierbar; mit Bromwasserstoff in Eisessig oder Nitromethan entsteht nur öliges Material.

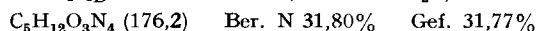
Zur Überführung in den freien Ester werden 29,0 g (0,077 Mol) Hydrobromid in 450 ml trockenem Chloroform suspendiert und bei 0° mit 40 ml einer 2,5*N*-Lösung von Ammoniak in Methanol (ca. 1,3 Äquivalent) versetzt. Beim Rühren des Gemisches bei 0° geht das Hydrobromid rasch in Lösung unter gleichzeitiger Ausscheidung von Ammoniumbromid. Nach 15 Min. wird filtriert, das Lösungsmittel im Vakuum bei Raumtemperatur abdestilliert und der kristalline Rückstand mit kaltem Essigester und Äther gewaschen. Der rohe Ester, 16,9 g (74%), Smp. ca. 85°, kann direkt für weitere Umsetzungen verwendet werden. Zweimaliges vorsichtiges Umkristallisieren aus Acetonitril ergibt den analysenreinen Dipeptidester vom Smp. 94–96°.



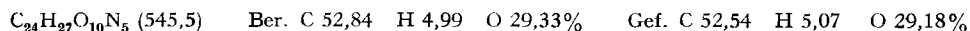
Bei längerem Stehen oder beim Erwärmen in Lösung geht der Ester in das zyklische *L*-Seryl-glycyl²⁰⁾ über; Smp. 213–215°.



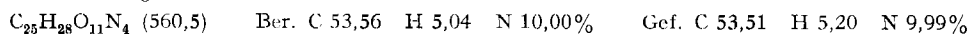
Der Umsatz des Esters mit überschüssigem Hydrazin in methanolischer Lösung (20 Std. bei 25°) liefert nach Eindampfen und Verrühren des Rückstands mit Alkohol das bisher nicht beschriebene *L*-Seryl-glycin-hydrazid (Ausbeute 85%); nach Umkristallisieren aus Dimethylformamid Smp. 140–141°; $[\alpha]_D^{25} = +8,8^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,6$ in H_2O).



Carbobenzoxy-L-asparaginyll-L-seryl-glycin-p-nitrobenzylester (V). 26,6 g (0,1 Mol) Carbobenzoxy-*L*-asparagin²¹⁾ und 19,3 g (0,065 Mol) frisch hergestellter *L*-Seryl-glycin-*p*-nitrobenzylester (IV) werden in 100 ml Dimethylformamid gelöst und unter Rühren bei –10° mit einer vorgekühlten Lösung von 20,6 g (0,1 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid in 200 ml Acetonitril versetzt. Das Reaktionsgemisch wird innert 10 Min. mit weiteren 300 ml kaltem Acetonitril versetzt und 1 Std. bei –10° und über Nacht bei 0° gerührt. Nach Zugabe von 0,5 ml Eisessig wird das ausgeschiedene Gemisch von amorphem Reaktionsprodukt und Dicyclohexyl-harnstoff abfiltriert, mit Dimethylformamid/Acetonitril 1:5, Acetonitril und Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Zur Abtrennung von eventuell noch vorhandenem Ausgangsmaterial wird das fein pulverisierte Gemisch mit 1*N* Salzsäure und darauf mit kalter 1*N* Natriumhydrogencarbonat-Lösung verrührt, filtriert und mit Wasser und kaltem Alkohol gewaschen. Das trockene Material wird mit 100 ml Dimethylformamid verrührt, der unlösliche Dicyclohexyl-harnstoff abfiltriert, mit Dimethylformamid gewaschen und das Filtrat im Vakuum auf ca. 50 ml eingeeengt. Bei Zugabe von 150 ml heissem Methanol kristallisiert die Substanz in feinen Nadeln, Smp. 209–211°; Ausbeute 15,8 g (45%); $[\alpha]_D^{25} = -12,2^\circ$ ($c = 2,4$ in Eisessig), $-1,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,0$ in Dimethylformamid). Zur Analyse wird nochmals aus Dimethylformamid-Methanol umkristallisiert: Smp. 210–212°.



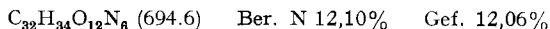
Carbobenzoxy-L-aspartyl(β-methylester)-L-seryl-glycin-p-nitrobenzylester (VIIa). Eine Lösung von 0,84 g (3 mMol) Carbobenzoxy *L*-asparaginsäure-β-methylester¹²⁾ und 0,90 g (3 mMol) *L*-Seryl-glycin-*p*-nitrobenzylester (IV) in 20 ml Acetonitril wird bei 0° mit 0,68 g (3,3 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt und über Nacht bei 0° stengelassen. Das ausgeschiedene Gemisch von Reaktionsprodukt und Dicyclohexyl-harnstoff wird abfiltriert, mit Acetonitril gewaschen und mehrmals mit Methylenchlorid extrahiert. Der unlösliche Dicyclohexyl-harnstoff wird abfiltriert und das Filtrat bei 0° mit 1*N* Salzsäure, 1*N* Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Bei Zugabe von Essigester scheidet sich das Tripeptidderivat in Form von Nadeln aus: 1,23 g (73%); Smp. 132–135°. Nach Umkristallisieren aus Essigester Smp. 136–137°; $[\alpha]_D^{25} = -5,9^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 3,2$ in $CHCl_3$), $-11,1^\circ \pm 0,3^\circ$ ($c = 4,0$ in Eisessig).



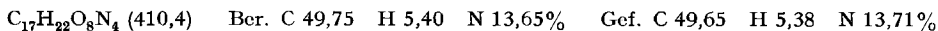
²⁰⁾ Vgl. DL-Seryl-glycyl: A. FISCHER & H. ROESNER, Liebigs Ann. Chem. 375, 199 (1910); E. AB-DERHALDEN & A. BAHN, Z. physiol. Chem. 234, 181 (1935).

²¹⁾ M. BERGMANN & L. ZERVAS, Ber. deutsch. chem. Ges. 65, 1192 (1932).

p-(*p*'-Methoxyphenylazo)-carboboxy-L-aspartyl(β -methylester)-L-seryl-glycin-*p*-nitrobenzylester (VIIb). Der Umsatz von (0,83 g 2 mMol) *p*-(*p*'-Methoxyphenylazo)-carboboxy-L-asparaginsäure- β -methylester¹³) mit 0,60 g (2 mMol) IV in 10 ml Methylenchlorid unter Verwendung von 0,45 g (2,2 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid ergibt nach der für das Dipeptidderivat III beschriebenen Aufarbeitung 1,19 g kristallines Material (aus Essigester) vom Smp. 142–145°. Nach Umkristallisieren aus Acetonitril: 1,02 g (74%); Smp. 149–151°.

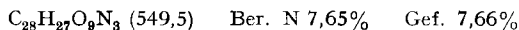


Carboboxy-L-asparaginyll-L-seryl-glycin (VIa). Eine Suspension von 8,2 g (15 mMol) Carboboxy-L-asparaginyll-L-seryl-glycin-*p*-nitrobenzylester (V) in 75 ml Dioxan wird unter Rühren innert 30 Min. tropfenweise mit 36 ml 0,5N Natronlauge versetzt (pH 11–11,2). Nach weiteren 15 Min. wird die klare Lösung mit 1N Salzsäure auf pH 7 gestellt und im Vakuum auf ca. 10 ml eingengt. Das ausgeschiedene kristalline Material wird durch Zugabe von 20 ml Wasser gelöst, die Lösung zur Entfernung von *p*-Nitrobenzylalkohol zweimal mit Essigester extrahiert und bei 40° mit 15 ml 2N Salzsäure angesäuert (bei Raumtemperatur fällt amorphes Material aus). Bei raschem Kühlen scheidet sich das Reaktionsprodukt in Form von verfilzten Nadeln aus, die nach 1 Std. bei 0° abfiltriert und mit kaltem Wasser neutral gewaschen werden: 5,0 g, Smp. 176–178°. Nach Umkristallisieren aus Wasser: 4,1 g (67%) vom Smp. 185–186°; $[\alpha]_D^{20} = -8,4^\circ$ ($c = 1,9$ in Eisessig).

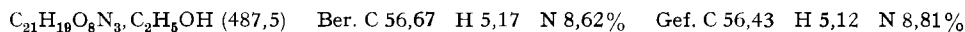


Versuche zur selektiven alkalischen Hydrolyse der *p*-Nitrobenzylestergruppe in den Estern VIIa und VIIb ergaben keine definierbaren Produkte.

Synthese und Verseifung von Carboboxy-L-aspartyl(β -benzylester)-glycin-*p*-nitrobenzylester. Eine Lösung von 3,22 g (9 mMol) Carboboxy-L-asparaginsäure- β -benzylester²²), 1,90 g (9 mMol) frisch hergestelltem Glycin-*p*-nitrobenzylester und 2,06 g (10 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid in 40 ml Methylenchlorid wird über Nacht bei 0° stehengelassen, von ausgeschiedenem Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, in üblicher Weise neutral gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der nach Verrühren mit Äther erhaltene kristalline Rückstand wird aus abs. Alkohol umkristallisiert: 4,18 g (85%); Smp. 107–108°; $[\alpha]_D^{20} = +4,2^\circ \pm 0,3^\circ$ ($c = 3,7$ in Chloroform).



In einem typischen Versuch zur selektiven Verseifung der Estergruppen wurden 1,65 g (3 mMol) des Dipeptidderivates in 50 ml Methanol suspendiert und unter Rühren innert 3 Std. tropfenweise mit 15 ml 0,2N Kaliumhydrogencarbonat-Lösung versetzt (pH 9,8–10,2). Nach weiterem Rühren während 1 Std. wurde die klare Lösung im Vakuum von Methanol befreit und die wässrige Lösung mit Essigester extrahiert. Der nach Eindampfen (im Vakuum) der getrockneten Essigester-Auszüge erhaltene Rückstand lieferte nach Extraktion mit Äther (Entfernung von *p*-Nitrobenzylalkohol) 0,30 g der kristallinen Succinimid-Verbindung VIII vom Smp. 91–93°. Das nach Umkristallisieren aus abs. Alkohol erhaltene Material vom Smp. 95–96° enthielt 1 Äquivalent Äthanol.



Eine Probe zeigte nach Abspaltung der Schutzgruppen durch Hydrogenolyse im IR.-Spektrum eine in mehrere Maxima aufgespaltene Bande bei 5,7–5,9 μ (ähnlich der Absorption von Succinimid in dieser Region), während die Amid-II-Bande bei 6,65 μ fehlte (keine sekundäre Amidbildung vorhanden).

Aus der eingeeengten ursprünglichen wässrigen Lösung schied sich beim Ansäuern kristallines Material ab, das nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Essigester bei 120–121° schmolz; dieser saure Anteil (Äquivalentgewicht ca. 350) liess sich jedoch nicht in analysenreiner Form gewinnen.

Bei Verseifungen mit der berechneten Menge Natronlauge (0,1N bis 1N) konnte kein Neutralprodukt VIII isoliert werden.

L-Asparaginyll-L-seryl-glycin (VIb). 820 mg (2 mMol) des Carboboxy-tripeptids VIa werden unter leichtem Erwärmen in 20 ml 60-proz. Methanol gelöst und in Gegenwart von 0,2 g Palladiumkohle (10-proz.) bei Zimmertemperatur und Normaldruck hydriert. Nach Aufnahme

²²) A. BERGER & E. KATCHALSKI, J. Amer. chem. Soc. 73, 4084 (1951).

der berechneten Menge Wasserstoff (gebildetes CO_2 in Natronlauge absorbiert) wird das ausgeschiedene Material nach Zugabe von 50 ml Wasser heiss gelöst, vom Katalysator abfiltriert und das Filtrat im Vakuum vollständig eingedampft. Der kristalline Rückstand liefert nach Lösen in Wasser und Zugabe der doppelten Menge Methanol 470 mg (85%) des Tripeptids in Form von feinen Nadeln vom Smp. 230–234° (nach Sintern bei ca. 220°); $[\alpha]_D^{25} = -12,7^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,95$ in Wasser), $-9,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 3,9$ in 0,1 N HCl); Rf-Werte in System I 0,10, II 0,27, III 0,21.

$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_6\text{N}_4$ (276,3) Ber. C 39,13 H 5,84 N 20,28% Gef. C 38,88 H 6,09 N 20,00%

B. Sequenzen H · Pro-Tyr-Lys(Tos) · OH und H · Pro-Tyr-Lys(Tos)-Met · OH

L-Prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysin-methylester (IX). 50 g (0,07 Mol) Carbobenzoxy-L-prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysin-methylester¹⁵) werden in 250 ml Methanol gelöst, mit 1 Äquivalent einer Lösung von Chlorwasserstoff in Methanol versetzt und in Gegenwart von 1,5 g Palladiumkohle (10-proz.) bei Zimmertemperatur und Normaldruck hydriert, wobei das gebildete Kohlendioxid in Natronlauge absorbiert wird. Nach Aufnahme der berechneten Menge Wasserstoff kommt die Hydrierung zum Stillstand. Die vom Katalysator abfiltrierte Lösung wird im Vakuum eingedampft und der teilweise kristalline Rückstand mit Essigester verrieben: 41,1 g; Smp. 176–178°. Zweimaliges Umkristallisieren aus Methanol liefert 37,0 g (87%) Tripeptidester-hydrochlorid vom Smp. 178–180° (bei raschem Aufheizen), bzw. 198–200° (bei langsamem Aufheizen); $[\alpha]_D^{26} = -19,4^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,2$ in Wasser); papierchromatographisch einheitlich (Rf-Werte in Syst. II 0,75, III 0,82).

$\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_7\text{N}_4\text{S}$, HCl (611,2) Ber. C 55,03 H 6,43 Cl 5,80% Gef. C 54,88 H 6,59 Cl 5,95%

Zur Überführung in den freien Ester werden 33,5 g (0,055 Mol) des Hydrochlorids in 350 ml Essigester suspendiert, mit 30 ml einer 2,5N-Lösung von Ammoniak in Methanol versetzt und 30 Min. bei Zimmertemperatur gerührt, wobei das Ausgangsmaterial vollständig in Lösung geht. Das ausgeschiedene Ammoniumchlorid wird abfiltriert, das Filtrat im Vakuum eingedampft und der Rückstand in 100 ml Essigester aufgenommen. Beim Stehen über Nacht bei 0° scheidet sich der Tripeptidester in kristalliner Form ab: 31,3 g (99%); Smp. 82–84°. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Essigester Smp. 85–87°; $[\alpha]_D^{26} = -15,8^\circ \pm 0,3^\circ$ ($c = 5,4$ in Alkohol); papierchromatographisch einheitlich (Rf-Werte in Syst. II und III wie Hydrochlorid).

$\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_7\text{N}_4\text{S}$ (574,7) Ber. C 58,52 H 6,66 S 5,58% Gef. C 58,39 H 6,87 S 5,43%

L-Prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysin (X). – a) Eine Lösung von 6,11 g (10 mMol) Ester-hydrochlorid IX in 40 ml 1N Natronlauge wird 1 Std. bei 0° stehengelassen und darauf mit 1N Salzsäure auf pH 5 gestellt. Das ausgeschiedene kristalline Material wird abfiltriert und mit Wasser und Alkohol gewaschen: 4,67 g (83%), Smp. 222–224°. Zur weiteren Reinigung wird die Substanz in 20 ml heissem Dimethylformamid gelöst, von wenig unlöslichem Material abfiltriert und mit 50 ml heissem Methanol versetzt, wobei sich das N^ε-Tosyl-tripeptid in Form von feinen Nadeln vom Smp. 224–226° abscheidet: 4,40 g (79%); $[\alpha]_D^{27} = -16,6^\circ$ ($c = 4,0$ in Dimethylformamid), $-36,4^\circ$ ($c = 2,7$ in 0,5N Kaliumhydrogencarbonat-Lösung); papierchromatographisch einheitlich: Rf-Werte in Syst. I 0,73, II 0,79, III 0,77.

$\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{O}_7\text{N}_4\text{S}$ Ber. C 57,84 H 6,47 N 9,99 S 5,72%
(560,7) Gef. „ 57,62 „ 6,26 „ 9,77 „ 5,55%

b) 3,47 g (5 mMol) Carbobenzoxy-L-prolyl-L-tyrosyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysin¹⁵) werden in 35 ml Methanol gelöst und in Gegenwart von 0,5 g Palladiumkohle (10-proz.) hydriert (gebildetes CO_2 in Natronlauge absorbiert). Nach Aufnahme der berechneten Menge Wasserstoff wird das ausgeschiedene Reaktionsprodukt durch Zugabe von 20 ml heissem Wasser gelöst, heiss vom Katalysator abfiltriert, das Filtrat im Vakuum eingedampft und der kristalline Rückstand mit Alkohol gewaschen: 1,90 g (68%), Smp. 219–222°. Nach Umkristallisieren aus Dimethylformamid-Methanol Smp. 222–224°; identisch mit dem nach Methode a) hergestellten Material.

t-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysin-methylester (XI). Eine Lösung von 31,3 g (54 mMol) des freien Esters IX in 60 ml trockenem Pyridin wird mit 13,1 g (55 mMol) *t*-Butyloxycarbonyl-*p*-nitrophenol¹⁶) versetzt und über Nacht bei 20° stehengelassen. Die Reaktionslösung wird darauf im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeengt, mit Essigester versetzt und unter Eiskühlung dreimal mit 2N Salzsäure, zweimal mit 1N Natriumhydrogencarbonat-Lösung und mit

Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand liefert nach mehrmaligem Verreiben mit Äther 35,5 g (98%) schwach gelblichen Schaum. Die Substanz ist papierchromatographisch (nach Hydrolyse zu X mit konz. Salzsäure, 60 Min. bei 40°) und in der Gegenstromverteilung nach CRAIG (30 Stufen im System Methanol-Wasser-Chloroform-Tetrachlor-kohlenstoff 8:2:5:5; $K = 0,72$) einheitlich.

t-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysin (XII). 34,0 g (50 mMol) des Esters XI werden bei ca. 10° in einem Gemisch von 50 ml Methanol und 150 ml 1 N Natronlauge gelöst. Das Reaktionsgemisch wird 1 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen, darauf mit 2 N Salzsäure auf pH 7 gestellt, im Vakuum von Methanol befreit, mit Essigester überschichtet und bei 0° unter Umschütteln mit 2 N Salzsäure angesäuert. Die abgetrennte Essigesterphase wird mit Wasser gewaschen und dreimal mit 0,5 N Kaliumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert. Nach Überschichten der vereinigten wässrigen Extrakte mit Essigester wird wiederum bei 0° mit 2 N Salzsäure schwach angesäuert (Kongo), die Essigesterlösung mit Wasser gewaschen (bis neutral), getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der als Rückstand erhaltene Schaum ergibt nach Verreiben mit Äther 32,2 g (96%) eines farblosen Pulvers, das papierchromatographisch einheitlich ist; Rf-Werte in Syst. I 0,71, III 0,84. Titration mit 0,1 N Natronlauge in Methanol ergibt das erwartete Äquivalentgewicht von 660.

Zur Analyse wird eine Probe in wenig Essigester bei 30° gelöst, auf 0° gekühlt, das ausgeschiedene Öl durch Abdekantieren von der überstehenden Lösung getrennt und mit Äther verrieben.

$C_{32}H_{44}O_9N_4S$ (660,8) Ber. C 58,16 H 6,71 N 4,85% Gef. C 57,90 H 6,98 N 4,93%

Carbobenzoxy-L-methionin-p-nitrobenzylester. Eine Lösung von 14,2 g (50 mMol) Carbobenzoxy-L-methionin²³) und 10,8 g (50 mMol) *p*-Nitrobenzylbromid in 100 ml Essigester wird mit 5,6 g (55 mMol) Triäthylamin versetzt und 5 Std. unter Rückfluss erhitzt. Nach Kühlen auf Zimmertemperatur wird das ausgeschiedene Triäthylamin-hydrobromid abfiltriert, das Filtrat bei 0° in üblicher Weise neutral gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Die Kristallisation des Rückstands aus Äther/Petroläther liefert 17,4 g (83%) kristallinen Ester vom Smp. 58–60°; nach Umkristallisieren aus Äther/Petroläther: 15,2 g (73%); Smp. 63–65°; $[\alpha]_D^{25} = -15,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,0$ in Aceton), $+2,5^\circ \pm 0,3^\circ$ ($c = 4,0$ in Chloroform).

$C_{20}H_{22}O_6N_2S$ (418,5) Ber. C 57,40 H 5,30 S 7,66% Gef. C 57,16 H 5,37 S 8,00%

L-Methionin-p-nitrobenzylester. 21 g (50 mMol) Carbobenzoxy-L-methionin-*p*-nitrobenzylester werden in 200 ml trockenem Äther suspendiert und mit 30 ml einer 5 N-Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig versetzt, wobei das Ausgangsmaterial sofort in Lösung geht. Nach ca. 15 Min. beginnt die Abscheidung eines Öls, das sich langsam (etwas rascher nach Animpfen) verfestigt. Nach 5 Std. wird die überstehende Lösung abdekantiert und das rohe Ester-hydrobromid mehrmals mit Äther verrieben und im Vakuum getrocknet: 10,75 g (59%); Smp. 148–149°; umkristallisiert aus Acetonitril: 9,68 g (53%); Smp. 149–151°; $[\alpha]_D^{25} = +4,1^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,0$ in Methanol); langsame Gelbfärbung beim Aufbewahren bei Zimmertemperatur.

$C_{12}H_{16}O_4N_2S$, HBr (365,3) Ber. C 39,46 H 4,69 Br 21,88% Gef. C 39,53 H 4,65 Br 22,21%

Die Decarbobenzoxylierung mit Bromwasserstoff in Essigester unter den für den Dipeptid-ester IV angegebenen Bedingungen liefert das Ester-hydrobromid in 43% Ausbeute; mit Bromwasserstoff in Eisessig oder Dioxan entsteht nur öliges Material.

Zur Überführung in den freien Ester werden 4,4 g (12 mMol) Hydrobromid in einem Gemisch von 15 ml Wasser und 50 ml Essigester gelöst und bei 0° mit 15 ml 2 N Kaliumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Die abgetrennte Essigesterphase wird zweimal mit Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der ölige Rückstand wird mit Petroläther gewaschen: 2,82 g (83%) gelbliches Öl, das direkt weiter umgesetzt wird.

t-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-L-methionin-methylester (XIII a). Eine Lösung von 33,0 g (50 mMol) *t*-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysin (XII) und 9,0 g (55 mMol) frisch hergestelltem *L*-Methionin-methylester²⁴) in 250 ml Acetonitril wird auf –10° gekühlt und mit 11,4 g (55 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt. Nach 15 Std. bei –5°

²³) M. BRENNER & R. W. PFISTER, *Helv.* **34**, 2085 (1951); K. HOFMANN, A. JÖHL, A. E. FURLENMEIER & H. KAPPELER, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 1636 (1957).

²⁴) M. BRENNER & W. HUBER, *Helv.* **36**, 1109 (1953).

und 24 Std. bei 0° wird 1 ml Eisessig zugegeben, der ausgeschiedene Dicyclohexyl-harnstoff abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen, unter Eiskühlung mit 1N Salzsäure, 0,5N Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet, im Vakuum eingedampft und das als Öl erhaltene Material mit Äther verrieben. Das gelbliche, amorphe Pulver (38,3 g, 95%) zeigt bei der papierchromatographischen Prüfung (nach Abspaltung der *t*-Butyloxycarbonyl- und der Estergruppe mit konz. Salzsäure, 1 Std. bei 40°) die Rf-Werte von XV und zusätzlich ca. 5–10% eines langsamer laufenden Nebenprodukts. Durch Gegenstromverteilung nach CRAIG (60 Stufen im System Methanol- Wasser- Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff 12:3:4:8; $K = 1,18$) wird keine weitere Reinigung erzielt.

Beim Umsatz von XII mit *L*-Methionin-*p*-nitrobenzylester unter den oben angegebenen Bedingungen wird der *t*-Butyloxycarbonyl-*L*-prolyl-*L*-tyrosyl-*N*^ε-tosyl-*L*-lysyl-*L*-methionin-*p*-nitrobenzylester (XIIIb) in 96-proz. Ausbeute als gelblicher Schaum erhalten, der einen dem obigen Methylester entsprechenden Reinheitsgrad aufweist.

t-Butyloxycarbonyl-*L*-prolyl-*L*-tyrosyl-*N*^ε-tosyl-*L*-lysyl-*L*-methionin (XIV). 20,1 g (25 mMol) des Esters XIIIa werden in 40 ml Methanol gelöst, bei ca. 10° mit 75 ml 1N Natronlauge versetzt und 45 Min. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach Aufarbeitung in der für das Tripeptid-derivat XII angegebenen Weise ergibt das als Schaum erhaltene Rohprodukt beim Verreiben mit Äther 15,4 g (78%) eines schwach gelblichen Pulvers, das direkt weiter verarbeitet wird. Äquivalentgewicht 824 (ber. 791); Rf-Werte in Syst. I 0,80, III 0,82.

Das gleiche Produkt entsteht bei der Verseifung des entsprechenden *p*-Nitrobenzylesters XIIIb (Ausbeute 83%).

L-Prolyl-*L*-tyrosyl-*N*^ε-tosyl-*L*-lysyl-*L*-methionin (XV). 15,0 g (19 mMol) XIV werden in 75 ml warmem Essigester gelöst, auf Zimmertemperatur gekühlt und unter Umschütteln in 300 ml einer 2,5N Lösung von Salzsäure in Essigester eingegossen. Nach 1 Min. beginnt die Abscheidung eines anfänglich öligen, dann kristallisierenden Materials, das nach 30 Min. abfiltriert und mit Essigester und Äther gewaschen wird. Das etwas hygroskopische Hydrochlorid (12,6 g) wird zur Überführung in das freie Tetrapeptid-Derivat in 40 ml Methanol gelöst und mit 8 ml einer 2,5N-Lösung von NH₃ in Methanol versetzt. Das ausgeschiedene kristalline Material wird abfiltriert, mehrmals mit heissem Methanol gewaschen und im Vakuum getrocknet: 8,9 g (67%); Smp. 223–226°; $[\alpha]_D^{26} = -42,0 \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$ in 0,5N KHCO₃-Lösung); Analyse und Rf-Werte: siehe ¹⁵); die Substanz enthält ca. 5% Methionin-sulfoxid-Derivat (Rf-Werte: siehe ¹⁵), das sich durch Umkristallisieren aus Dimethylformamid/Methanol nicht entfernen lässt.

Die Totalhydrolyse mit 6N Salzsäure (18 Std. bei 120°) ergibt Prolin, Tyrosin, Methionin, Lysin und Spuren von *N*^ε-Tosyl-lysin (bestimmt durch zweidimensionale Methode: Hochspannungselektrophorese bei pH 1,9, 50 V/cm, 75 Min., und Papierchromatographie im System VI.

C. Hexa- und Heptapeptidsequenzen I und II

Carbobenzoxy-L-asparaginyll-L-seryl-glycyl-L-prolyl-L-tyrosyl-N^ε*-tosyl-L-lysin (Ia)*. Eine Lösung von 3,10 g (7,5 mMol) Carbobenzoxy-*L*-asparaginyll-*L*-seryl-glycin (VIa) und 1,10 ml (8 mMol) Triäthylamin in 15 ml frisch destilliertem Dimethylformamid wird unter Feuchtigkeitsausschluss auf –10° gekühlt und unter Rühren innert 10 Min. tropfenweise mit einer Lösung von 1,05 g (7,5 mMol) Isobutylchlorocarbonat in 5 ml trockenem Tetrahydrofuran versetzt. Die Lösung wird weitere 10 Min. bei –10° und 20 Min. bei 20° gerührt und wieder auf 0° gekühlt; anschliessend wird unter Rühren innert 10 Min. tropfenweise eine Lösung von 4,20 g (7,5 mMol) *L*-Prolyl-*L*-tyrosyl-*N*^ε-tosyl-*L*-lysin (X) und 1,17 ml (8,5 mMol) Triäthylamin in 25 ml Dimethylformamid (Lösung hergestellt durch kurzes Erhitzen in verschlossenem Gefäss auf ca. 120° und rasches Kühlen auf Zimmertemperatur) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 Std. bei 0° und über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen und darauf bei 0,1 Torr und ca. 30° zum Sirup eingedampft. Bei Zugabe von 30 ml 1N Essigsäure scheidet sich ein zähes Öl aus, das mehrmals mit weiteren Mengen verdünnter Essigsäure und anschliessend mit Wasser gewaschen und im Vakuum bei Zimmertemperatur getrocknet wird. Zweimaliges Umfällen aus Alkohol ergibt 3,48 g (48%) eines amorphen Pulvers vom Smp. 138–143° (leichtes Sintern bei 133°); $[\alpha]_D^{26} = -31,9 \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,1$ in Dimethylformamid), $-38,9 \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$ in Eisessig). Die Substanz ist papierchromatographisch einheitlich, Rf-Werte in Syst. I 0,65, II 0,92, III 0,75, V 0,69. Bei der Gegenstromverteilung über 60 Stufen im System Methanol-0,1-proz. Essigsäure-Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff 3:1:3:1 entspricht die Gewichtskurve der theoretischen Verteilung mit $K = 1,22$.

Die Substanz enthält 1 Äquivalent Wasser, das sich durch Trocknung bei 0.05 Torr und 60° nicht entfernen lässt.

$C_{44}H_{56}O_{14}N_8S, H_2O$	Ber. C 54,42	H 6,02	N 11,54	S 3,30%
(971,1)	Gef. ,, 54,62	,, 6,26	,, 11,52	,, 3,30%

L-Asparaginyll-L-seryl-glycyl-L-prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysin (Ib). 0,34 g (0,35 mMol) der Carbobenzoxyverbindung Ia werden in 20 ml Methanol unter Erwärmen gelöst und in Gegenwart von 0,1 g Palladiumkohle (10-proz.) bei Zimmertemperatur und Normaldruck hydriert (Wasserstoff-Aufnahme 8,6 ml; ber. 7,8 ml), wobei sich das Reaktionsprodukt in fester Form abscheidet. Das Gemisch von Katalysator und Substanz wird abfiltriert, anschließend mit 10 ml heissem Wasser extrahiert und der filtrierte wässrige Extrakt im Vakuum vollständig eingedampft. Das als Rückstand erhaltene farblose Pulver (0,25 g) liefert nach zweimaligem Umfällen aus Dimethylformamid/Methanol 121 mg (42%) amorphes Material vom Smp. 198–201° (nach Sintern bei 194°); $[\alpha]_D^{25} = -67,9^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$ in Dimethylformamid); Rf-Werte in Syst. I 0,40, II 0,67, III 0,68, IV 0,67, V 0,47. Die Substanz ist leicht hygroskopisch; nach Trocknung während 6 Std. bei 60° und 0 05 Torr. enthält sie 1 Äquivalent Wasser.

$C_{36}H_{50}O_{12}N_8S, H_2O$	Ber. C 51,66	H 6,26	N 13,39	S 3,83%
(836,9)	Gef. ,, 51,50	,, 6,24	,, 13,50	,, 3,89%

Carbobenzoxy-L-asparaginyll-L-seryl-glycyl-L-prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-L-methionin (II). 3,10 g (7,5 mMol) Carbobenzoxy-L-asparaginyll-L-seryl-glycin (VIa) werden entsprechend der zur Herstellung des Hexapeptidderivats Ia angegebenen Methode in das gemischte Anhydrid übergeführt und mit einer Lösung von 5,20 g (7,5 mMol) L-Prolyl-L-tyrosyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-L-methionin (XV) und 1,23 ml (9 mMol) Triäthylamin in 75 ml Dimethylformamid umgesetzt. Das nach Abdampfen des Lösungsmittels und mehrmaligem Verreiben des öligen Rückstands mit 1N Essigsäure und Wasser bei 0° erhaltene pulverige Material wird abfiltriert, getrocknet und zweimal aus Methanol umgefällt: 2,65 g (31%) farblose amorphe Substanz vom Smp. 173–176° (nach Sintern bei 170°); Rf-Werte in Syst. I 0,72, II > 0,9, III 0,77, V 0,74 und zusätzlich ca. 5% einer langsamer laufenden Verbindung (wahrscheinlich Methionin-sulfoxid-Derivat). Weitere Reinigung durch Gegenstromverteilung über 60 Stufen im System Methanol-Wasser-Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff 3:1:3:1 ($K = 0,63$) und Umfällen der Spitzenfraktionen aus Methanol liefert papierchromatographisch einheitliche Substanz vom Smp. 179–183°; $[\alpha]_D^{25} = -31,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,1$ in Dimethylformamid), $-31,7^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,2$ in Eisessig). Das bei 0,05 Torr und 60° getrocknete Produkt enthält 1 Äquivalent Wasser.

$C_{49}H_{65}O_{15}N_9S_2, H_2O$	Ber. C 53,39	H 6,13	O 23,22	N 11,44	S 5,82%
(1102,3)	Gef. ,, 53,66	,, 6,21	,, 23,11	,, 11,43	,, 5,69%

Die Totalhydrolyse mit 6N Salzsäure (18 Std. bei 120°) ergibt die erwarteten Aminosäuren (Bestimmung wie bei Hydrolyse von XV), zusätzlich wenig N^ε-Tosyl-lysin und zwei neue Substanzen¹⁷⁾, wovon eine mit PAULY-Reagens und beide mit Ninhydrin anfärbbar sind.

Wir danken Herrn Dr. H. ZUBER für die Ausführung und Auswertung der Totalhydrolysen. Die analytischen Daten verdanken wir Herrn Dr. W. PADOWETZ und die Ausführung der Papierchromatogramme Herrn E. VON ARX.

SUMMARY

Protected peptides incorporating the amino acid residues 1–6 (I) and 1–7 (II) of beef MSH have been synthesized starting from intermediates comprising the sequences 1–3 (VIa), 4–6 (X) and 4–7 (XV) respectively.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel
Pharmazeutische Abteilung