

Synthese einiger der Eledoisinsequenz Lys—Asp—Ala—Phe¹⁾ analoger Tetrapeptide

Von H. NIEDRICH und E. LÖWE

Inhaltsübersicht

Durch schrittweisen Aufbau vom Carboxylende her wurden nach verschiedenen Synthese-Methoden, unter Verwendung der BOC- und Z-Schutzgruppen, Peptide der Struktur Lys—X—Y—Phe hergestellt. Die Verseifung der Ester erfolgte chymotryptisch.

Die Eledoisinsequenz Lys—Asp(NH₂)—Ala—Phe—Ile—Gly—Leu—Met—NH₂ hat nach LÜBKE²⁾ am Blutdruck des Kaninchens eine stärkere Wirksamkeit als Eledoisin selbst. Auch am Meerschweinchenileum wirkt es in geringeren Konzentrationen (10⁻¹⁰ g/ml) als Eledoisin³⁾.

Für die Synthese von Analogon dieser Sequenz mit Hydrazinosäuren⁴⁾ als Heterobestandteil wählten wir den Weg über die Verknüpfung zweier Tetrapeptide, ein Schema, wie es auch LÜBKE²⁾ benutzte.

Die Testung der Zwischenprodukte ergab auch für das freie Tetrapeptid Lys—Asp(NH₂)—Ala—Phe, allerdings erst in einer Konzentration von 10⁻⁶ g/ml, am MS-Ileum eine Kontraktion³⁾. Zur Ermittlung der für die Wirkung notwendigen Strukturmerkmale wurden Asp und Ala nacheinander durch Glycin und letztlich durch ϵ -Aminocapronsäure ersetzt, so daß Lysin und Phenylalanin an den Enden durch verschiedene Zwischenglieder verbunden sind (Tab. 1).

¹⁾ Benutzte Kurzformen vgl. auch „Peptide Symposium“ Oxford 1962 ed. by G. T. YOUNG, S. 261. Pergamon Press Oxford 1963. Für die L-Aminosäurereste stehen: ϵ -Acap = ϵ -Aminocaproyl-, Ala = Alanyl-, Asp = Asparagyl-, Gly = Glycyl-, Ile = Isoleucyl-, Leu = Leucyl-, Lys = Lysyl-, Met = Methionyl-, Phe = Phenylalanyl-, —ONP = p-Nitrophenylester, —OCP = 2,4,5-Trichlorphenylester, —OtBu = tert. Butylester, —OÄt = Äthylester, —OMe = Methylester, —NH₂ = Amid, Z— = Benzyloxycarbonyl-, BOC— = tert. Butyloxycarbonyl-, NPS— = o-Nitrophenylsulfenyl-, DMF = Dimethylformamid, THF = Tetrahydrofuran, DCCI = Dicyclohexylcarbodiimid.

²⁾ K. LÜBKE, R. HEMPEL u. E. SCHRÖDER, *Experientia* **21**, 84 (1965).

³⁾ G. STOPP, unveröffentlicht.

⁴⁾ H. NIEDRICH, *Chem. Ber.*, im Druck.

Tabelle 1

Lys-Asp-Ala-Phe(III)
Lys-Asp(NH ₂)-Ala-Phe(IV)
Lys-Gly-Ala-Phe(VI)
Lys-Gly-Gly-Phe(IX)
Lys-ε-Acap-Phe(XI)

Tabelle 2

R-Ala-Phe-R'	Ia	R = NPS, R' = OMe
	Ib	R = H · HCl, R' = OMe
R-Asp-Ala-Phe-R'	IIa	R = Z, R' = OMe, R'' = OtBu
	IIb	R = H, R' = OMe, R'' = OtBu
R''	IIc	R = Z, R' = OMe, R'' = NH ₂
	IId	R = BOC, R' = OMe, R'' = NH ₂
	IIe	R = H · HBr, R' = OMe, R'' = NH ₂
R-Lys-Asp-Ala-Phe-R'	IIIa	R = BOC, R' = OMe, R'' = OtBu
	IIIb	R = BOC, R' = OH, R'' = OtBu
R		
R-Lys-Asp-Ala-Phe-R'	IVa	R = BOC, R' = OMe
	IVb	R = BOC, R' = OH
R	IVc	R = Z, R' = OMe
NH ₂	IVd	R = Z, R' = OH
	Va	R = Z, R' = OMe
R-Gly-Ala-Phe-R'	Vb	R = H · HBr, R' = OMe
	VIa	R = BOC, R' = OMe
R-Lys-Gly-Ala-Phe-R'	VIb	R = BOC, R' = OH
R		
R-Gly-Phe-R'	VIIa	R = Z, R' = OMe
	VIIb	R = H · HBr, R' = OMe
	VIIIa	R = Z, R' = OMe
R-Gly-Gly-Phe-R'	VIIIb	R = H · HCl HBr, R' = OMe
	IXa	R = Z, R' = OMe
R-Lys-Gly-Gly-Phe-R'	IXb	R = Z, R' = OH
	IXc	R = H HCl, R' = OH
R		
R-ε-Acap-Phe-R'	Xa	R = Z, R' = OMe
	Xb	R = H · HBr, R' = OMe
	XIa	R = Z, R' = OMe
R-Lys-ε-Acap-Phe-R'	XIb	R = Z, R' = OH
	XIc	R = H · HCl, R' = OH
R		

Die Synthese erfolgte durch schrittweisen Aufbau vom Carboxylende her (Tab. 2).

Ala—Phe—OMe · HCl (**Ib**)⁵⁾ wurde aus NPS-Alanin-dicyclohexylammoniumsalz und PheOMe · HCl mittels DCCI und anschließende NPS-Abspaltung mit HCl/Äther erhalten. Anknüpfen von Z—Asp(OtBu) an **Ib** mit DCCI ergab den Ester **IIa**, der durch Hydrierung an Pd von der Z-Schutzgruppe befreit wurde. Umsetzung mit BOC—Lys(BOC)—ONP lieferte **IIIa**.

Z—Asp(NH₂) und BOC—Asp(NH₂) wurden nach der von M. ZAORAL⁶⁾ eingeführten Variante der Anhydrid-Synthese mit Ala—Phe—OMe zu **IIc** und **II d** verknüpft.

E. SANDRIN⁷⁾ hatte **IIc** nach der Nitrophenylester-Methode erhalten. Durch Umsetzung des **IIc** mit Z—Lys(Z)—ONP⁸⁾ bzw. BOC—Lys(BOC)—ONP konnten die Tetrapeptide **IVa** und **IVc** gewonnen werden.

Das Tetrapeptid **VIa**, das bei LÜBKE²⁾ ohne Angabe experimenteller Daten erwähnt ist, wurde aus **Ib** und Z—Glycin-2, 4, 5-trichlorphenylester, und weiter wie bei **IVa** beschrieben dargestellt.

Ebenso wurde Z—Lys(Z)—Gly—Gly—PheOMe (**IXa**) ausgehend von PheOMe · HCl mittels Z—Gly—OCP aufgebaut. Die Verseifung der Tetrapeptidester **IIIa**, **IVa**, **IVc**, **VIa** und **IXa** erfolgte chymotryptisch nach G. KLOSS⁹⁾.

Die BOC-Schutzgruppen wurden mit Trifluoressigsäure, Z— durch Hydrierung an Pd abgespalten und die Tetrapeptide nach Überprüfung der Einheitlichkeit durch Elektrophorese zur Testung gegeben.

Zur Gewinnung von **XIIa** setzten wir ε-Benzoylcarbonylamino-capronsäure¹⁰⁾ mit PheOMe nach verschiedenen Knüpfungsmethoden um. DCCI lieferte ein stark mit N-Acylharnstoff verunreinigtes Produkt, die Methode der gemischten Anhydride ergab 5% Ausbeute. Nach der Phosphorazomethode¹¹⁾ wurden dagegen 77% reines **Xa** erhalten. Die Verseifung von **XIIa** gelang nur bei Anwendung eines Äquivalentes NaOH. Überschuß NaOH führte zur Zersetzung, Anwendung vom Chymotrypsin war ohne Erfolg.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden auf dem Mikroheiztisch nach BOETIUS bestimmt und sind korrigiert.

⁵⁾ L. KÜBKE, E. SCHRÖDER, R. SCHMIECHEN u. H. GIBIAN, Liebigs Ann. Chem. **679**, 195 (1964).

⁶⁾ M. ZAORAL, Coll. Czech. Chem. Commun. **27**, 1273 (1962).

⁷⁾ ED. SANDRIN u. R. A. BOISSONNAS, Helv. Chim. Acta **46**, 1637 (1963).

⁸⁾ E. WÜNSCH, H.-G. HEIDRICH u. W. GRASSMANN, Chem. Ber. **97**, 1818 (1964).

⁹⁾ G. KLOSS u. E. SCHRÖDER, Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. **336**, 248 (1964).

¹⁰⁾ M. ROTHE u. F. W. KUNITZ, Liebigs Ann. Chem. **609**, 88 (1957).

¹¹⁾ W. GRASSMANN u. E. WÜNSCH, Chem. Ber. **91**, 449 (1958).

Die Analysenproben wurden bei 70 bis 100° und 0,5 Torr getrocknet. Die Reinheitsprüfung erfolgte nach Abspaltung der N-Schutzgruppen durch Papierelektrophorese in 7proz. Essigsäure und in Pyridinacetat-Puffer vom pH = 5,6. Unter „üblicher Aufarbeitung“ versteht man 1. Lösen in Essigester oder Chloroform, 2. Ausschütteln mit n HCl bzw. 5proz. Zitronensäurelösung bei BOC-Verbindungen, mit n KHCO₃-Lösung (bei der Entfernung von Nitrophenol oder Trichlorphenol viermal mit etwa 3n NH₃-Lösung) und mit Wasser, 3. Trocknen über Na₂SO₄ oder MgSO₄ und 4. Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer im Vakuum. Für die chymotryptischen Verseifungen wurde sowohl reines krist. Enzym der Fa. Boehringer als auch ein angereichertes Fermentpräparat benutzt.

o-Nitrophenylsulfenyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester (Ia)

12,7 g (30 mMol) NPS-Ala-dicyclohexylammoniumsalz¹²) und 6,3 g Phe—OMe · HCl werden in 150 cm³ gereinigtem Chloroform gerührt bis eine klare Lösung entstanden ist. Die Ausscheidung von Dicyclohexylammoniumchlorid beginnt alsbald. Nach 1 Stunde kühlt man auf 0° ab und gibt ungeachtet des ausgeschiedenen Niederschlages portionsweise 7,0 g DCCI dazu. Das Gemisch verbleibt noch 1 Stunde bei 0° und 16 Stunden bei Zimmertemperatur. Man gibt 1 cm³ 50proz. Essigsäure hinzu, saugt vom Niederschlag ab, wäscht mit Chloroform nach, schüttelt das Filtrat mit 80 cm³ Wasser, 100 cm³ eiskalter n H₂SO₄, sofort mit gesättigter KHCO₃-Lösung (50 cm³) und trocknet über Natriumsulfat. Der nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum verbleibende Rückstand wird mit Äther/Hexan kristallin gerieben. 11,6 g (95%), Schmp. 112–116°. Die Reinigung erfolgt aus Essigester durch portionsweise Zugabe von Hexan.

Feinausbeute: 10,1 g (83%), Schmp. 113–115°.

$[\alpha]_D^{20} = -12^\circ \pm 1^\circ$, c = 1 in DMF.

C₁₉H₂₁N₃O₅S (403,5) ber.: C 56,56; H 5,25; N 10,41;
gef.: C 56,65; H 5,30; N 10,57.

L-Alanyl-L-phenylalanin-methylester-hydrochlorid (Ib)

10,1 g (25 mMol) NPS—Ala—Phe—OMe werden in 100 cm³ Methanol gelöst, mit 20 cm³ etwa 4n HCl (75 mMol) in Äther 15 Minuten gerührt und schnell im Vakuum auf 50 cm³ eingengt (bis zur beginnenden Kristallausscheidung). Man gießt unter Rühren in 300 cm³ absoluten Äther ein und rührt noch 1 Stunde bei 0°. Die Reinigung erfolgt durch Lösen in Methanol und Ausfällen mit Äther.

Ausbeute: 6,0 g (85%), Schmp. 155–156°.

$[\alpha]_D^{20} = 4,2^\circ \pm 0,5^\circ$, c = 2 in Wasser.

C₁₃H₁₈N₂O₃ · HCl (286,8) ber.: Cl 12,38;
gef.: Cl 12,6.

Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl(β-tert.butylester)-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester (IIa)

5,2 g (10 mMol) Z-Asp(OtBu)-dicyclohexylammoniumsalz¹³) und 2,87 g **Ib** wurden in 70 cm³ gereinigtem DMF 30 Minuten gerührt, auf 0° abgekühlt und mit 2,2 g DCCI versetzt. Nach 1 Stunde bei 0° läßt man über Nacht bei Zimmertemperatur stehen, gibt

¹²) L. ZERVAS, D. BOROVS u. E. GAZIS, J. Amer. chem. Soc. **85**, 3660 (1963).

¹³) E. WÜNSCH u. A. ZWICK, Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. **328**, 235 (1962).

5 Tropfen Eisessig dazu und saugt nach 1 Stunde vom ausgeschiedenen DC-Harnstoff ab. Das Filtrat wird im Vakuum bei 60° vom Lösungsmittel befreit, und wie üblich aufgearbeitet. Es verbleibt ein Sirup, der beim Verreiben mit Äther kristallisiert.

Ausbeute: 4,0 g = 72%, Schmp. 115—119°.

$[\alpha]_D^{20} = -5,9^\circ \pm 0,5^\circ$, $c = 1$ in DMF.

$C_{29}H_{37}N_3O_8$ (555,6) ber.: C 62,69; H 6,71; N 7,56;
gef.: C 62,95; H 6,78; N 7,32.

L-Asparagyl(β -tert.butylester)-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester (IIb)

2,22 g (4 mMol) IIa gelöst in 80 cm³ Methanol wurden mit etwa 100 mg Palladiumschwarz 4 Stunden im Wasserstoffstrom mittels eines Vibromischers emulgiert. Nach Filtration über Kieselgur wird Methanol sofort im Vakuum bei 20° entfernt und der Rückstand mit Äther kristallin gerieben. (1,28 g, 76%, Schmp. 103—108°.) Zur Reinigung wird die Verbindung in 5 cm³ Äthanol gelöst, mit 40 cm³ Wasser versetzt, sofort vom ausgefallenen Niederschlag (135 mg, Schmp. 190—198°) abfiltriert und die Lösung im Vakuum bei 40° am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht. Der gelbliche Sirup wird mit Äther kristallin gerieben. Farblose Nadeln, 950 mg (56%), Schmp. 108—110°.

Im kristallinen Zustand ist die Substanz einige Wochen im Tiefkühlschrank unverändert haltbar.

$C_{21}H_{31}N_3O_6$ (421,5) ber.: C 59,84; H 7,41; N 9,97;
gef.: C 59,44; H 7,51; N 10,18.

N $^{\alpha}$,N $^{\epsilon}$ -Di-(tert.butylloxycarbonyl)-L-lysyl-L-asparagyl(β -tert.butylester)-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester (IIIa)

842 mg (2 mMol) IIb und 934 mg BOC—Lys(BOC)—ONP werden in 5 cm³ DMF gelöst und 3 Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die Lösung wird in 50 cm³ etwa 3 n Ammoniak-Lösung eingetropfelt, wobei das Rohprodukt ausfällt (1,45 g, Schmp. 95—110°). Man löst in 50 cm³ Essigester, arbeitet wie üblich auf und fällt durch Zugabe von 25 cm³ n-Heptan das Endprodukt aus. 1,07 g (73%).

Nach erneuter Umfällung aus Essigester/Heptan war der Schmp. 86—87°.

$[\alpha]_D^{20} = -19,8^\circ \pm 1^\circ$, $c = 1$ in DMF.

$C_{37}H_{59}N_5O_{11}$ (748,9) ber.: C 59,27; H 7,92; N 9,34;
gef.: C 59,62; H 8,06; N 9,17.

N $^{\alpha}$,N $^{\epsilon}$ -Di(tert.butylloxycarbonyl)-L-lysyl-L-asparagyl(β -tert.butylester)-L-alanyl-L-phenylalanin (IIIb) aus (IIIa)

durch chymotryptische Verseifung

Zu einer Lösung von 5 mg krist. Chymotrypsin 10 mg Ammoniumacetat und 5 cm³ DMF in 30 cm³ Wasser, tropft man langsam 500 mg (0,66 mMol) vorst. Ester, gelöst in 5 cm³ DMF. Am pH-Staten wird durch Zutitrieren von 0,2 n NaOH der pH auf 7 gehalten. Die Zugabe muß so erfolgen, daß es zu keiner Ausscheidung eines Niederschlages kommt! Nach etwa 2 Stunden ist die Reaktion beendet. Man stellt mit 0,1 n HCl den pH auf 5—6, entfernt im Vakuum bei 55° Wasser (wobei starkes Schäumen auftritt) und DMF, löst den Rückstand unter Zugabe von KHCO₃ bei pH = 8 in 20 cm³ Wasser auf und filtriert die trübe Lösung über eine 1 cm starke Schicht Kieselgur.

Beim Ansäuern der gekühlten Lösung mit *n* HCl auf pH = 2,5 fällt das Produkt kristallin aus.

Ausbeute: 380 mg = 77%. Nach Umfällen aus Essigester mit *n* Heptan war der Schmp. 126–128°.

$[\alpha]_D^{20} = -13,5^\circ \pm 1^\circ$, $c = 0,75$ in DMF.

$C_{36}H_{57}N_5O_{11}$ (735,9) ber.: C 58,77; H 7,79; N 9,52;
gef.: C 59,13; H 7,92; N 9,47.

Benzyloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester (IIc)

5,32 g (20 mMol) Z-Asp(NH₂) (fein gepulvert) werden bei starkem Rühren in 25 cm³ frisch gereinigten absol. trockenem Chloroform unter Zusatz von 2,49 g (2,99 cm³, 22 mMol) N-Äthylpiperidin und 1,76 g (22 mMol) Pyridin gelöst. Evtl. ist leichtes Erwärmen notwendig.

Bei -5 bis -10° tropft man 2,65 g (22 mMol) Pivaloylchlorid in 5 cm³ Chloroform hinzu (10 Minuten), spült mit 1 cm³ Chloroform nach, erwärmt 5 Minuten auf +5 bis +10° und kühlt schnell auf -20° ab. Eine klare Lösung von 5,7 g Ala-Phe-OMe · HCl (20 mMol) und 2,72 cm³ N-Äthylpiperidin in 20 cm³ Chloroform wird auf etwa -10° vorgekühlt und unter starkem Rühren in einem Guß zu dem Anhydrid gegeben. Die Kühlung ist so zu regulieren, daß die Temperatur 0° bis +10° beträgt.

Nach kurzer Zeit erstarrt die Mischung. Bei Beginn der Ausscheidung des gelartigen Niederschlages gießt man auf -20° gekühltes DMF hinzu, um die Mischung rührfähig zu erhalten. Es wird noch 30 Minuten bei 0° und 2 Stunden bei 20° gerührt und die Lösungsmittel im Vakuum zum größten Teil entfernt (60° Badtemperatur). Man gibt die Mischung in 150 cm³ *n* HCl und schüttelt kräftig. Der isolierte Niederschlag wird im Mörser mit gesättigter KHCO₃-Lösung (50 cm³) anschließend mit Wasser verrieben und im Exsikkator getrocknet. Rohausbeute: 55%, Schmp. 185–190°. Das Rohprodukt wird fein gepulvert aus Äthanol (700 cm³ pro 1 g) umkristallisiert. Die Mutterlauge wird auf 1/10 des Volumens eingeeengt und liefert weiteres IIc, insges. 4,45 g = 44%, Schmp. 219–221°, Lit. 7) 217°.

$[\alpha]_D^{20} = -15,6^\circ \pm 1^\circ$, $c = 1$ in DMF.

tert. Butyloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester (II d)

1,15 g (5 mMol) BOC-Asp(NH₂) wurden wie bei IIc mit 1,43 g Ib umgesetzt. Rohausbeute: 1,35 g. Nach Umkristallisation aus Essigester 1,11 g (48%), Schmp. 179–181°, [Lit. 176°?].

$[\alpha]_D^{20} = -20,2^\circ \pm 1^\circ$, $c = 2$ in DMF.

L-Asparaginyll-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester-hydrobromid (IIe)

2,5 g IIc (5 mMol) werden in 12 ml absolutem Eisessig gelöst, bei 20° mit 15 cm³ 4 *n* HBr/Eisessig versetzt, und 40 Minuten gerührt. Im Vakuum bei 45° wird auf 10 cm³ eingeeengt und mit absolutem Äther gefällt. Der Niederschlag wird mit frischem Äther kristallin gerieben. Reinigung erfolgt durch Lösen in wenig absolutem Methanol und vorsichtige Zugabe von Äther.

Ausbeute: 2,15 g (96%), Schmp. 150–152°.

$[\alpha]_D^{20} = -16,7^\circ \pm 1^\circ$, $c = 1$ in Wasser.

$C_{17}H_{24}N_4O_5 \cdot HBr$ (445,3) ber.: N 12,58;
gef.: N 12,63.

N^α, N^ε-Di-(tert.butylloxycarbonyl)-L-lysyl-L-asparaginyll-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester (IVa)

2,23 g **IIc** (5 mMol) werden unter Zusatz von 0,7 cm³ Triäthylamin in 15 cm³ DMF gelöst. Nach Zugabe von 2,34 g BOC—Lys(BOC)—ONP und 3 Tropfen Eisessig steht die Mischung 72 Stunden bei Zimmertemperatur. Vom Niederschlag wird abgesaugt, mit wenig DMF gewaschen und in ein Gemisch von 50 cm³ 4 n NH₃-Lösung und 50 cm³ Essigester eingetropfelt. Die Emulsion wird noch zweimal mit 4 n NH₃, 2 n Zitronensäure und Wasser ausgeschüttelt. Es wird abgesaugt, die Essigesterphase getrocknet und im Vakuum zur Trockene gebracht. Der Rückstand und der Niederschlag werden im Exsikkator getrocknet, in 5 cm³ DMF gelöst und in Äther eingetropfelt.

Ausbeute: etwa 75%, Schmp. beim schnellen Erhitzen 165°, beim langsamen Erhitzen 178—180°.

$[\alpha]_D^{20} = -18,4^\circ \pm 1^\circ$, $c = 1$ in DMF; $[\alpha]_D^{20} = -9,9^\circ \pm 1^\circ$, $c = 1$ in Eisessig.

C₃₃H₅₁N₆O₁₀ (691,8) ber.: C 57,29; H 7,53; N 12,15;
gef.: C 57,25; H 7,78; N 11,98.

N^α, N^ε Di-(tert.butylloxycarbonyl)-L-lysyl-L-asparaginyll-L-alanyl-L-phenylalanin (IVb)

690 mg (1 mMol) **IVa** in 5 cm³ DMF werden am pH-Stat in 15 Minuten zu einer Lösung von 10 mg rohem Chymotrypsin in (25 cm³ Wasser + 3 cm³ DMF) getropft, so daß die entstehende Trübung sofort in Lösung geht. Mit 0,2 n NaOH wird der pH auf 7 gehalten (Verbrauch insges. 4,9 cm³).

Nach 30—40 Minuten ist die Reaktion beendet. Man filtriert über Kieselgur klar und säuert mit HCl auf pH 2,5 an. Nach 1 Stunde Rühren ist der Niederschlag kristallisiert. 540 mg = 80%, Schmp. 189—190°. Reinigung kann durch Lösen in DMF und Fällen mit Äther erfolgen.

Nach Abspaltung der Schutzgruppen waren elektrophoretisch nur geringfügige Spuren von **IVa** nachweisbar (etwa 1%).

$[\alpha]_D^{20} = -11,1^\circ \pm 1^\circ$, $c = 1$ in DMF.

C₃₂H₄₉N₆O₁₀ (677,8) ber.: C 56,70; H 7,29; N 12,40;
gef.: C 56,53; H 7,42; N 12,46.

N^α, N^ε-Di-(benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-L-asparaginyll-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester (IVc)

2,2 g Asp(NH₂)—Ala—Phe—OMe · HBr werden unter Zusatz von 0,68 cm³ Triäthylamin und 3 Tropfen Eisessig in 25 cm³ reinem DMF gelöst. Nach 10 Minuten gibt man 2,6 g Z—Lys(Z)—ONP (5 mMol) hinzu, rührt noch 3 Stunden und läßt 48 Stunden stehen. Die erstarrte Masse wird mit 150 cm³ 3 n NH₃ 30 Minuten gerührt, abgesaugt und getrocknet. 3,4 g Schmp. 216—219°.

Zur Entfernung des restlichen Nitrophenols wird in DMF gelöst, mit Äther gefällt (verlustreich) und abgesaugt. Schmp. 217—221°. Der gelartige Niederschlag erlangt erst nach 2stündigem Rühren in Wasser einen absaugfähigen Zustand. Nach dem Trocknen über P₄O₁₀: 2,56 g (66%).

$[\alpha]_D^{20} = -14,5^\circ \pm 1^\circ$, $c = 1$ in DMF.

C₃₈H₄₆N₆O₁₀ (760,8) ber.: C 61,56; H 6,36; N 11,05;
gef.: C 61,48; H 6,77; N 10,58.

N^α,N^ε-Di-(benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-L-asparaginyll-L-alanyl-L-phenylalanin (IV d)

1 g IV c, in 10 cm³ DMF gelöst, läßt man unter Rühren langsam am pH-Stat zu 30 mg Rohchymotrypsin in 40 cm³ Wasser + 10 cm³ DMF tropfen. Da die Reaktion sehr langsam abläuft, wurde der pH auf 8,0 erhöht. Bei der Reaktion schied sich ein Gel aus. Nach 4–5 Stunden war die Reaktion beendet. Die Lösung wurde wie unter IV b aufgearbeitet. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet. 540 mg, Schmp. 193–198°.

Umfällung aus DMF mit 4–5facher Menge Wasser, Analysenprobe einmal aus Nitromethan: Schmp. 193–195°.

C₃₈H₄₆N₆O₁₀ (746,8) ber.: C 61,11; H 6,21; N 11,25;
gef.: C 60,56; H 6,44; N 11,14.

Das Produkt enthielt neben Ester noch geringfügige andere Verunreinigungen. Der Versuch einer alkalischen Verseifung von IV c war ergebnislos.

Benzyloxycarbonyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester (Va)

1,43 g (5 mMol) Ib, 1,38 cm³ Triäthylamin und danach 1,95 g Z-Glycin-2, 4, 5-trichlorphenylester [analog BODANSZKY¹⁴], 63,2% Ausbeute: Schmp. 99–105°] wurden in 50 cm³ Essigester gelöst und 3 Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das Reaktionsgemisch mit dem darin enthaltenen Niederschlag wird dreimal mit 20 cm³ 2 n Ammoniak in 25proz. NaCl-Lösung ausgeschüttelt (Na-Nitrophenolat fällt aus) und dann wie üblich aufgearbeitet.

Durch Zugabe von n-Hexan zu der nicht vollständig eingengten Essigesterlösung fällt das Produkt kristallin aus. Ausbeute: 1,46 g (66%), Schmp. 123–125°.

$[\alpha]_D^{20} = -10,1^\circ \pm 1^\circ$, c = 1 in DMF.

C₂₃H₂₇N₃O₆ (441,5) ber.: C 62,57; H 6,16; N 9,52;
gef.: C 62,61; H 6,29; N 9,38.

Glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester-hydrobromid (Vb)

1,33 g Va werden in 7 cm³ etwa 4 n HBr in Eisessig gelöst. Nach 40 Minuten bei Zimmertemperatur fällt man das Hydrobromid durch Zugabe von absolutem Äther. 1,14 g (98%), Schmp. 218–220°. Umfällen aus Methanol mit Äther bringt keine weitere Reinigung.

C₁₅H₂₁N₃O₄ · HBr (387,3) ber.: N 10,82;
gef.: N 10,81.

N^α,N^ε-Di-(tert.butylloxycarbonyl)-L-lysyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester (VIa)

580 mg (1,5 mMol) Vb, 0,21 cm³ Triäthylamin, 700 mg BOC-Lys(BOC)-ONP und 1 Tropfen Eisessig werden nacheinander in 2 cm³ DMF unter Rühren gelöst. Nach 3 Tagen bei Zimmertemperatur werden 5 cm³ Äther zugegeben und vom Triäthylaminhydrochlorid (230 mg) abgesaugt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels bei 60° im Vakuum wird in Essigester gelöst und wie üblich aufgearbeitet. Der nach Entfernen des Essigesters verbleibende Rückstand erstarrt beim Verreiben mit Äther zu einem voluminösen, feinkristallinen

¹⁴) M. BODANSZKY u. V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. 81, 5688 (1959).

Produkt. 810 mg (84%), Schmp. 121–126°. Nach Reinigung aus Essigester mit Äther war der Schmp. 126–128°.

$$[\alpha]_D^{20} = -12,9^\circ \pm 1^\circ, c = 0,85 \text{ in DMF.}$$

$$\begin{array}{ll} \text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_9 \text{ (635,7)} & \text{ber.: C 58,56; H 7,77; N 11,02;} \\ & \text{gef.: C 58,75; H 7,83; N 11,23.} \end{array}$$

N^α, N^ε-Di-(tert.butyloxycarbonyl)-L-lysyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin (VIb) vgl. auch IVb

635 mg (1 mMol) **VIa** in 3 cm³ DMF wurden bei pH = 7 in 20 Minuten zu 2 mg Chymotrypsin und 5 mg Ammoniumacetat in 15 cm³ Wasser getropft. Verbrauch an n NaOH: 0,93 cm³. Dauer 30 Minuten. Ausbeute: 530 mg (85%), Schmp. 100–105°. Die Analysenprobe wurde aus wenig Nitromethan umkristallisiert. Schmp. 101–104°.

$$[\alpha]_D^{20} = -4,3^\circ \pm 0,5^\circ, c = 1 \text{ in DMF.}$$

$$\begin{array}{ll} \text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_9 \text{ (621,7)} & \text{ber.: C 57,95; H 7,62; N 11,27;} \\ & \text{gef.: C 57,81; H 7,88; N 11,33.} \end{array}$$

Benzyloxycarbonyl-glycyl-L-phenylalanin-methylester (VIIa)

6,05 g (15,6 mMol) Z—Gly—OCP und 3,36 g Phe—OME · HCl werden unter Zugabe von 2,17 cm³ Triäthylamin in 80 cm³ DMF gelöst und 4 Tage bei Zimmertemperatur belassen. Das ausgefallene Triäthylamin-hydrochlorid wird abgesaugt und DMF am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Man arbeitet wie üblich auf. Es hinterbleibt ein braunefarbter Sirup, der direkt für die Darstellung von **VIIb** eingesetzt wird. 4,8 g (83,2%).

Glycyl-L-phenylalanin-methylester-hydrobromid (VIIb)

4,8 g (13 mMol) **VIIa** werden in 16 ml etwa 4 n HBr in Eisessig gelöst. Die Reaktionslösung wird 15 Minuten unter Rühren auf 40° erwärmt und anschließend noch 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Danach fällt man bei Zimmertemperatur das Hydrobromid durch Zugabe von absolutem Äther. 3,35 g (80,5%) farblose Kristalle vom Schmp. 175 bis 177° werden nach Umfällen aus Methanol mit Äther erhalten.

$$[\alpha]_D^{29} = +6,9^\circ \pm 1^\circ, c = 1 \text{ in DMF,}$$

$$[\alpha]_D^{20} = +11,1^\circ \pm 1^\circ, c = 1 \text{ in Methanol.}$$

$$\begin{array}{ll} \text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{HBr} \text{ (317,2)} & \text{ber.: C 45,44; H 5,40; N 8,83;} \\ & \text{gef.: C 45,30; H 5,50; N 8,88.} \end{array}$$

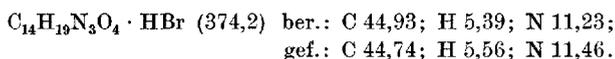
Benzyloxycarbonyl-glycyl-glycyl-phenylalanin-methylester (VIIIa)

5,4 g (13,9 mMol) Z—Gly—OCP und 4,4 g **VIIb** werden in 70 cm³ DMF gelöst. Nach Zugabe von 4 cm³ Triäthylamin läßt man den Ansatz 3 Tage bei Raumtemperatur stehen. Triäthylaminhydrochlorid wird abgesaugt. Den sirupösen Rückstand, der nach Entfernung von DMF im Vakuum erhalten wird, versetzt man mit 80 ml Essigester und arbeitet wie üblich auf. Zum Schluß schüttelt man noch mit gesättigter NaCl-Lösung durch. Es verbleibt ein Öl, das in wenig Äthanol aufgenommen wird und auf Zugabe von Hexan eine halbkristalline Fällung gibt. Der Niederschlag wird mehrmals aus Äthanol umgefällt und direkt zur nächsten Stufe eingesetzt. 3,55 g (59,5%), Schmp. 50–60°.

Glycyl-glycyl-L-phenylalanin-methylester-hydrobromid (VIIIb)

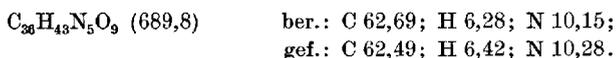
1 g (2,34 mMol) **VIIIa** werden wie bei **Vb** beschrieben mit 4 n HBr/Eisessig behandelt. Man erhält nach 2maligem Umlösen aus Methanol 0,7 g (80%) farblose hygroskopische Kristalle vom Schmp. 161–162,5°.

$$[\alpha]_D^{25} = -0,8^\circ, c = 1 \text{ in DMF.}$$

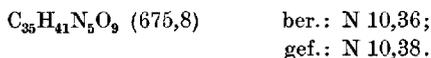
**N^α, N^ε-Di-(benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanin-methylester (IXa)**

800 mg (2,14 mMol) **VIIIb** und 1,145 g Z-Lys(Z)-ONP werden in 8 cm³ DMF gelöst. Nach Hinzufügen von 0,296 cm³ Triäthylamin wird die Lösung 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt und 3 Tage stehengelassen. Triäthylamin-hydrochlorid wird abgesaugt und die DMF-Lösung zu 45 cm³ 3 n NH₄OH getropft. Nach 30 Minuten können 1,45 g gelbliche, klebrige Kristalle abgesaugt werden. Das Rohprodukt wird wie üblich aufgearbeitet. Der sirupöse Rückstand wird in wenig Äthanol aufgenommen und mit absolutem Äther werden 850 mg (58%) farblose Kristalle vom Schmp. 108–110° gefällt. Die Umfällung aus Äthanol/Äther wurde 2mal wiederholt.

$$[\alpha]_D^{25} = -0,8^\circ, c = 1 \text{ in DMF.}$$

**N^α, N^ε-Di-(benzyloxycarbonyl)-L-lysyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanin (IXb), aus IXa durch chymotrypt. Verseifung**

689,8 mg (1 mMol) **IXa** werden wie unter **IVb** verseift. (Verbrauch: 4,4 ml 0,2 n NaOH.) Nach Stehen über Nacht im Kühlschrank ist **IXb** auskristallisiert. 480 mg (69%) Schmp. 125–128°. Die Reinigung erfolgte durch Umfällen aus Äthanol mit Äther.

**L-Lysyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanin-dihydrochlorid (IXc)**

480 mg (0,69 mMol) **IXb** in 25 cm³ absolutem Methanol werden unter Zusatz eines Äquivalentes HCl mit etwa 150 mg Pd-Mohr 5–7 Stunden im Wasserstoffstrom mittels eines Vibromischers emulgiert. Nach Filtration über Kieselgur wird das Methanol im Vakuum bei 30° entfernt, 250 mg (53%) leicht zerfließliche Kristalle vom Schmp. 32–35°. Die Elektrophorese zeigt einen kleinen Fleck (etwa 2,5%) des Tetrapeptidesters.

$$[\alpha]_D^{20} = +2,8^\circ, c = 0,5 \text{ in DMF.}$$

ε-Benzyloxycarbonylamino-caproyl-L-phenylalanin-methylester (Xa)

nach der Phosphorazomethode¹¹⁾

2,15 g (10 mMol) Phe-OMe · HCl werden in 40 cm³ absolutem Pyridin gelöst und auf –10° abgekühlt. Unter Rühren tropft man innerhalb 10–15 Minuten 0,437 cm³ PCl₃, gelöst in 10 cm³ absolutem Pyridin hinzu. Die Reaktionslösung bleibt 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen, und anschließend fügt man 2,65 g (10 mMol) Z-ε-Acap¹⁰⁾ hinzu und erhitzt auf dem siedenden Wasserbad für 3 Stunden (Feuchtigkeitsausschluß!). Nach dem

Erkalten wird die rötliche Lösung von wenig Poly-meta-phosphoriger Säure getrennt und das Pyridin im Vakuum bei 40–50° abdestilliert. Der gelbbraunlich gefärbte sirupöse Rückstand wird nach Zugabe von 30 cm³ H₂O dreimal mit je 50 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterextrakte werden wie üblich aufgearbeitet. Der kristallisierende Rückstand wird aus Essigester/Hexan umgefällt und liefert 3,3 g (77,5%) farblose Kristalle vom Schmp. 86–88°.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -4,0^{\circ}, c = 0,5 \text{ in Methanol.}$$

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -2,8^{\circ}, c = 0,5 \text{ in DMF.}$$

$$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5 \quad (426,5) \quad \text{ber.: C 67,58; H 7,09; N 6,57;} \\ \text{gef.: C 67,47; H 7,25; N 6,84.}$$

ϵ -Aminocaproyl-L-phenylalanin-methylester-hydrobromid (Xb)

1,7 g (4 mMol) **Xa** werden in 5 ml etwa 4 n HBr in Eisessig gelöst und unter Feuchtheitsausschluß 1 Stunde stehengelassen. Nach dem Abdestillieren von HBr und Eisessig im Vakuum und Umfällen aus Methanol mit Äther konnte keine Kristallisation herbeigeführt werden. 1,35 g (90%) bräunlich gefärbter Sirup fallen an, der in der nächsten Reaktionsstufe weiter umgesetzt wurde.

N^α,N^ε-Di-(benzyloxycarbonyl)-lysyl- ϵ -aminocaproyl-L-phenylalanin-methylester (XIa)

5 g (1,34 mMol) **Xb** und 7,15 g Z-Lys(Z)-ONP¹³) werden in 40 cm³ DMF gelöst. Danach fügt man 2 cm³ Triäthylamin und 3 Tropfen Eisessig hinzu und beläßt 3 Tage bei Raumtemperatur. Triäthylamin-hydrobromid wird abgesaugt, die Lösung auf 10 cm³ konzentriert und in 40 cm³ 3 n Ammoniak-Lösung eingetropft. Die schmierige Kristallmasse wird in Essigester aufgenommen und wie üblich aufgearbeitet. Der kristallisierte Rückstand wird aus Essigester/Hexan umgefällt. 4,2 g (55%) schwach gelbgefärbte Kristalle, Schmp. 114,5–117°.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -3,0, c = 1 \text{ in DMF.}$$

$$\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_8 \quad (688,8) \quad \text{ber.: C 66,26; H 7,02;} \\ \text{gef.: C 66,33; H 7,47.}$$

N^α,N^ε-Di-(benzyloxycarbonyl)-L-lysyl- ϵ -aminocaproyl-L-phenylalanin (XIb)

1,37 g (2 mMol) werden in 16 cm³ Methanol gelöst und über 17 Stunden mit der äquimolaren Menge 2 n NaOH bei Raumtemperatur unter Rühren verseift. Danach wird das Methanol bei 30° im Vakuum abdestilliert, der Rückstand mit destilliertem Wasser versetzt und mit n HCl angesäuert. Man extrahiert die salzsaure Lösung mit Essigester, übernimmt die Säure in n NaHCO₃-Lösung, säuert die n NaHCO₃-Lösung wiederum an und nimmt erneut in Essigester auf. Der Essigesterextrakt wird wie üblich weiterbehandelt. Nach Umkristallisieren aus Essigester erhält man 1,3 g (96%) farblose Kristalle vom Schmp. 139–142°.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +1,7^{\circ}, c = 0,5 \text{ in DMF.}$$

$$\text{C}_{37}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_9 \quad (674,8) \quad \text{ber.: C 65,86; H 6,87; N 8,30;} \\ \text{gef.: C 66,33; H 7,01; N 8,49.}$$

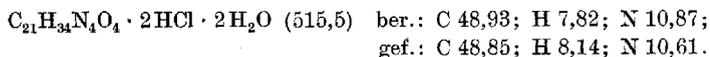
L-lysyl- ϵ -aminocaproyl-L-phenylalanin-dihydrochlorid (XIc)

674,8 mg (1 mMol) **XIb** werden wie bei **IXc** beschrieben hydriert. Beim Einrotieren zur Trockene verbleiben 420 mg (87,6%) farblose Kristalle, Schmp. 42–45°, die stark hygro-

skopisch sind. Das Elektropherogramm zeigt einen langsamer wandernden, unbedeutenden Fleck.

$$[\alpha_D^{20}] = +4,4^\circ, c = 0,5 \text{ in DMF.}$$

$$[\alpha_D^{20}] = +5,7^\circ, c = 0,5 \text{ in Methanol.}$$



Die Elementaranalysen wurden in unserem mikroanalytischen Labor durch Frau U. KRÄFT und Frau N. SMIRNOWA durchgeführt. Frl. B. GLAWE danken wir für technische Mitarbeit.

Berlin-Buch, Institut für Pharmakologie, Forschungsgemeinschaft der naturwiss., techn. und med. Institute der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin.

Bei der Redaktion eingegangen am 8. Dezember 1966.

Verantwortlich

für die Schriftleitung: Prof. Dr.-Ing. Dr. h. c. E. Leibnitz, 705 Leipzig, Permoserstraße 15; für den Anzeigenteil DEWAG-Werbung Leipzig, 701 Leipzig, Brühl 34-40, Ruf 29740. Z. Z. gilt Anzeigenpreisliste 4; Verlag Johann Ambrosius Barth, 701 Leipzig, Salomonstraße 18 B; Fernruf 27681 und 27682. Veröffentlicht unter der Lizenz-Nr. 1395 des Presseamtes beim Vorsitzenden des Ministerrates der DDR



Printed in Germany

Druck: Paul Dünnhaupt, Köthen (IV/5/1) L 95/67