

Zur Synthese von Human-Big-Gastrin I und seinem 32-Leucin-Analogen

3. Mitteilung^{1, 2}: Darstellung der allseits geschützten
Gesamtsequenzen

Gerhard Wendlberger*, **Luis Moroder**, **Allan Hallett**
und **Erich Wunsch**

Abteilung für Peptidchemie, Max-Planck-Institut für Biochemie,
D-8033 Martinsried bei München, Bundesrepublik Deutschland

(Eingegangen 4. April 1979. Angenommen 24. April 1979)

The Syntheses of Human-Big-Gastrin I and Its 32-Leucine-Analogue III. Preparation of the Fully Protected Tetratriacontapeptide Amides

The syntheses of the fully protected tetratriacontapeptide amide derivatives corresponding to the proposed primary structure of human-big-gastrin I and its 32-leucine analogue by three different routes are described. In addition, the synthesis of the N-terminal eicosapeptide derivative (sequence 1-20) is reported.

(*Keywords: Gastro intestinal hormones; Human-big-gastrin; Peptide synthesis*)

Einleitung

In den zwei vorausgehenden Mitteilungen² haben wir über die Synthese von sechs verknüpfungsfähigen Peptidfragmenten der Sequenzen 28—34, 23—27, 21—22, 15—20, 9—14 und 1—8 der vorgeschlagenen Primärstruktur des Human-Big-Gastrins I³ berichtet. In Weiterverfolgung unseres Syntheseplans sollen nunmehr die erstellten Teilsequenzen auf bestmöglichem Weg zu höheren Fragmenten und

Abkürzungen: Es werden hier die von der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature empfohlenen Abkürzungen für Aminosäuren und Schutzgruppen verwendet.

Andere Abkürzungen: *DCCD* = Dicyclohexylcarbodiimid; *HONSu* = *N*-Hydroxysuccinimid; *TFE* = Trifluoressigsäure; *HMPA* = Hexamethylphosphorsäuretrisamid; *DMF* = Dimethylformamid.

diese letztlich zur Gesamtsequenz des Human-Big-Gastrins I und seines 32-Leucin-Analogons vereinigt werden. Hierfür haben wir drei Synthesewege gewählt*.

Ergebnisse und Diskussion

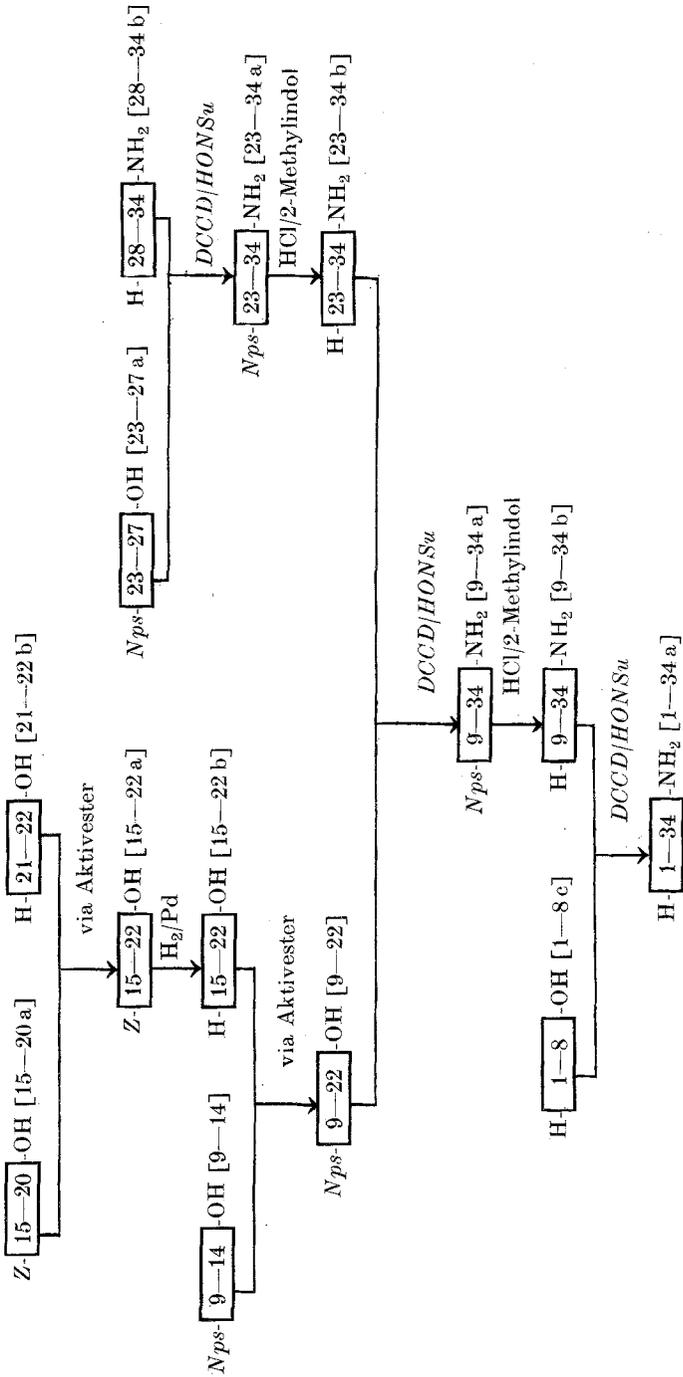
1. Darstellung der Gesamtsequenz 1—34

Weg A (Schema 1)

Die Verknüpfung des Heptapeptidamids H-Ala-Tyr(*But*)-Gly-Trp-Met-Asp(*OBu*^t)-Phe-NH₂ [28—34 b]^{2a} (Fragment I) mit *Nps*-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-OH [23—27 a]^{2a} (Fragment II) lieferte unter Anwendung des *Wünsch-Weygandschen* Carbodiimid/*N*-Hydroxysuccinimid-Verfahrens^{4,5} das allseits geschützte Dodecapeptidamid-Derivat [23—34 a] in hoher Ausbeute (88,6%). Die Entfernung der 2-Nitrophenylsulfenyl-Schutzgruppe aus dem tryptophan- und methioninhaltigen Peptid-Derivat erfolgte nach bewährter Methode⁶ mittels Chlorwasserstoff unter Zusatz eines 20molaren Überschusses an 2-Methylindol in Trifluorethanol und erbrachte das Dodecapeptidamid-Derivat H-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Ala-Tyr(*But*)-Gly-Trp-Met-Asp(*OBu*^t)-Phe-NH₂ [23—34 b] (Teilstück I—II) in Form seines Hydrochlorids in ausgezeichneter Ausbeute (95,5%) und hoher analytischer Reinheit. Gleichzeitig mit obigen Arbeiten wurde *Z*-Ser(*But*)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-OH [15—20 a]^{2a} (Fragment IV) nach dem *N*-Hydroxysuccinimid-Ester-Verfahren mit H-Trp-Leu-OH [21—22 b]⁷ (Fragment III) zum Octapeptid-Derivat [15—22 a] vereinigt. Die hydrogenolytische Abspaltung des Benzyloxycarbonyl-Restes führte zum H-Ser(*But*)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-OH [15—22 b], das mit dem *N*-Hydroxysuccinimid-Ester des Fragments V *Nps*-Ser(*But*)-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^t)-Pro-OH [9—14] — ohne dessen Isolierung und Charakterisierung — zum *Nps*-Ser(*But*)-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^t)-Pro-Ser(*But*)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-OH [9—22] (Teilstück III—V) mit einer Ausbeute von 89% kondensiert wurde. Die Fragmentkondensation der Teilstücke I—II [23—34 b] und III—V [9—22] mittels Dicyclohexylcarbodiimid/*N*-Hydroxysuccinimid⁴ ergab das *Nps*-Hexacosapeptidamid-Derivat [9—34 a], das nach Gelchromatographie-Reinigung an Sephadex LH-20 (Fließmittel Dimethylacetamid) in 67,5%iger Ausbeute rein erhalten werden konnte. Anschließende Entfernung der 2-Nitrophenylsulfenyl-Schutzgruppe (siehe oben) lieferte H-Ser(*But*)-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^t)-Pro-Ser(*But*)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-

* Über die Herstellung der freien Peptidsequenzen und deren Reindarstellung soll in einer folgenden Arbeit (4. Mitteilung) berichtet werden.

Schema 1. Gesamtsequenz I-34, Weg A



Trp-Leu-Glu(*OBu^t*)-Glu(*OBu^t*)-Glu(*OBu^t*)-Glu(*OBu^t*)-Glu(*OBu^t*)-Ala-Tyr(*Bu^t*)-Gly-Trp-Met-Asp(*OBu^t*)-Phe-NH₂ [9—34 b], isoliert in Form des Hydrochlorids. Dessen Kondensation mit <Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-His(*Adoc*)-Pro-OH [1—8 c] (Fragment VI) wiederum nach dem *Wünsch-Weygand-Verfahren*^{4,5} erbrachte schließlich das gewünschte <Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-His(*Adoc*)-Pro-Ser(*Bu^t*)-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu^t*)-Pro-Ser(*Bu^t*)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(*OBu^t*)-Glu(*OBu^t*)-Glu(*OBu^t*)-Glu(*OBu^t*)-Glu(*OBu^t*)-Ala-Tyr(*Bu^t*)-Gly-Trp-Met-Asp(*OBu^t*)-Phe-NH₂ [1—34 a], erhalten in 75%iger Ausbeute durch kurzzeitiges Digerieren mit Wasser und Methanol.

Weg B (Schema 2)

Das in ^{2a} beschriebene mittelständige Peptidfragment IV, d. i. Z-Ser(*Bu^t*)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-OH [15—20 a], wurde nach katalytischer Hydrierung zu [15—20 b] in das entsprechende 2-Nitrophenylsulfenyl-hexapeptid-Derivat [15—20 c] übergeführt. (Dieses diente als Schlüsselfragment für den Aufbau der Gesamtsequenz [1—34], auch für die als Weg C bezeichnete dritte Syntheseroute.)

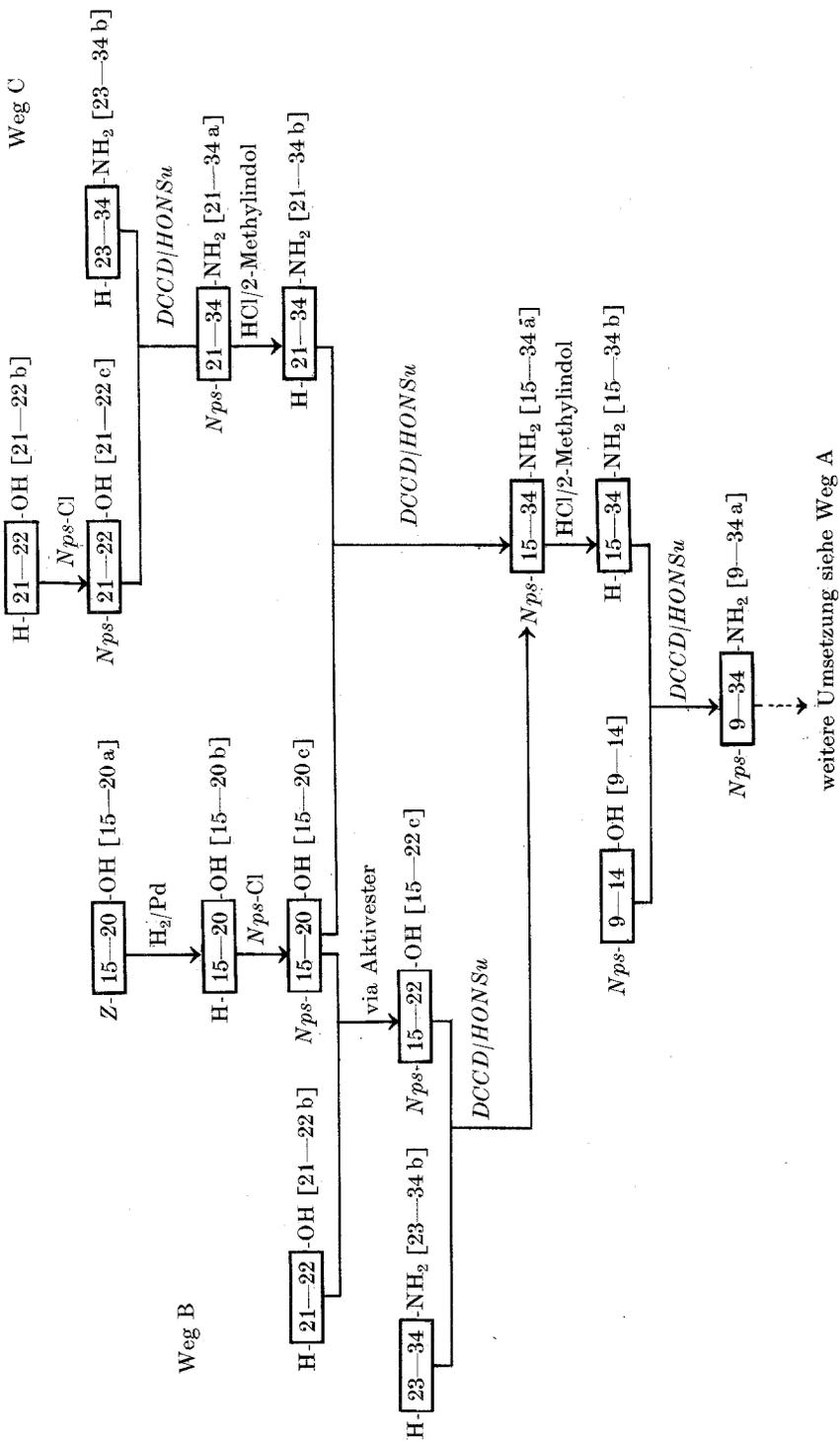
Das Hexapeptid-Derivat [15—20 c] wurde als *N*-Hydroxysuccinimid-Ester (Rohprodukt) mit dem Dipeptid H-Trp-Leu-OH [21—22 b]⁷ (Fragment III) in 87%iger Ausbeute zum *Nps*-Ser(*Bu^t*)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-OH [15—22 c] (Teilstück III—IV) kondensiert. Dessen Vereinigung mit der Teilsequenz [23—34 b] vermittels Dicyclohexylcarbodiimid/*N*-Hydroxysuccinimid⁴ führte zum gewünschten 2-Nitrophenylsulfenyl-Eicosapeptidamid-Derivat [15—34 a].

Die Spaltung der Sulfenamid-Bindung am [15—34 a] mit Chlorwasserstoff in Gegenwart von überschüssigem 2-Methylindol⁶ erbrachte in hoher Ausbeute H-Ser(*Bu^t*)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(*OBu^t*)-Glu(*OBu^t*)-Glu(*OBu^t*)-Glu(*OBu^t*)-Glu(*OBu^t*)-Ala-Tyr(*Bu^t*)-Gly-Trp-Met-Asp(*OBu^t*)-Phe-NH₂ [15—34 b], isoliert in Form seines Hydrochlorids. An dieses Teilstück I—IV wurde letztlich *Nps*-Ser(*Bu^t*)-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu^t*)-Pro-OH [9—14] (Fragment V) wiederum mittels Dicyclohexylcarbodiimid/*N*-Hydroxysuccinimid⁴ angebaut; nach üblicher Aufarbeitung wurde das gewünschte 2-Nitrophenylsulfenyl-Hexacosapeptidamid-Derivat [9—34 a] in der gleichen analytischen Reinheit wie das nach Weg A hergestellte Produkt erhalten (vgl. experimenteller Teil).

Weg C (Schema 2)

Durch 2-Nitrophenylsulfenylierung von H-Trp-Leu-OH [21—22 b]⁷ (Fragment III) wurde zunächst das „neue“ Fragment *Nps*-Trp-Leu-OH [21—22 c] erstellt. Dieses ließ sich mit der Teilsequenz H-Glu(*OBu^t*)-

Schema 2. Gesamtsequenz 1-34, Weg B und C



Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Ala-Tyr(*Bu*^t)-Gly-Trp-Met-Asp(*OBu*^t)-Phe-NH₂ nach bekanntem *Wünsch-Weygand*-Verfahren^{4,5} zum 2-Nitrophenylsulfenyl-Tetradecapeptidamid-Derivat [21—34 a] umsetzen. *N*⁹-Demaskierung von [21—34 a] mittels Chlorwasserstoff/2-Methylindol⁶ ergab das Hydrochlorid von H-Trp-Leu-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Ala-Tyr(*Bu*^t)-Gly-Trp-Met-Asp(*OBu*^t)-Phe-NH₂ [21—34 b], das anschließend mit *Nps*-Ser(*Bu*^t)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-OH [15—20 c] wiederum nach der Dicyclohexylcarbodiimid/*N*-Hydroxysuccinimid-Methode^{4,5} zum 2-Nitrophenylsulfenyl-Eicosapeptidamid-Derivat [15—34 a] kondensiert wurde. (Im chromatographischen Verhalten und in den analytischen Daten mit dem auf Weg B synthetisierten Produkt gut übereinstimmend.) Der weitere Aufbau zum 2-Nitrophenylsulfenyl-Hexacosapeptidamid-Derivat [9—34 a] folgte Weg B.

Die erfolgreiche Vereinigung der beiden nach Weg B oder C gewonnenen Hexacosapeptid-Derivate [9—34 b] mit Fragment VI zum allseits geschützten Tetratriacontapeptidamid-Derivat [1—34 a] erfolgte nach Weg A-Prozedur.

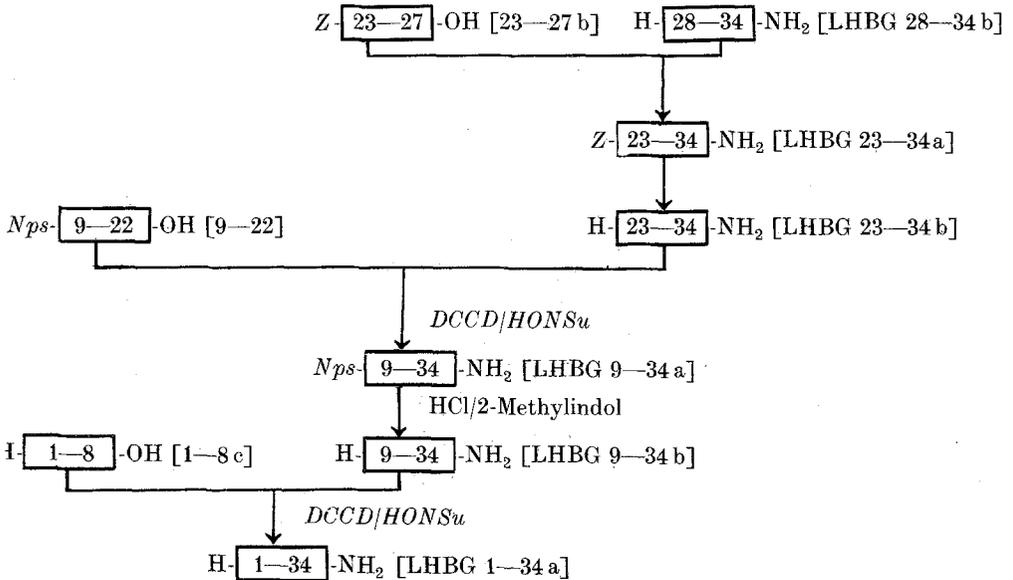
2. Darstellung der Gesamtsequenz 1—34 des [32-Leucin]-Analogons*

Als Ausgangsfragment für den Aufbau (Schema 3) dieses Analogons sollte das Dodecapeptidamid-Derivat Z-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Ala-Tyr(*Bu*^t)-Gly-Trp-Leu-Asp(*OBu*^t)-Phe-NH₂ [LHBG 23—34 a] dienen, das bei unserer [15-Leucin]-Human-Little-Gastrin-I-Synthese⁸ erstmals erstellt, jedoch nicht chromatographisch rein erhalten werden konnte. In Anlehnung an die kürzlich beschriebene [11-Leucin]-Human-Mini-Gastrin-Synthese⁹ konnte nun das Dodecapeptidamid-Derivat [LHBG 23—34 a] durch Fragmentkondensation von H-Ala-Tyr(*Bu*^t)-Gly-Trp-Leu-Asp(*OBu*^t)-Phe-NH₂ [LHBG 28—34 b]⁹ mit Z-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-OH [23—27 b]⁹ nach *Wünsch-Weygand*^{4,5} in guter Ausbeute (86%) und chromatographisch reiner Form erhalten werden. Katalytische Abspaltung des Z-Restes führte dann zum „amino-freien“ H-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Ala-Tyr(*Bu*^t)-Gly-Trp-Leu-Asp(*OBu*^t)-Phe-NH₂ [LHBG 23—34 b] (Ausbeute 95% d. Th.).

Eine Übertragung der eingeschlagenen Synthesestrategie für das Human-Big-Gastrin I (siehe oben) auf die Erstellung des 32-Leucin-Analogons war

* Die zur Erstellung des [32-Leucin]-Human-Big-Gastrins I synthetisierten Zwischenprodukte und Fragmente sind, soweit sie sich von der „natürlichen“ Sequenz unterscheiden, mit dem Symbol LHBG zur Kurzbezeichnung versehen; z. B. [LHBG 23—34 a] = Dodecapeptidamid-Derivat der Sequenz 23—34 des [32-Leucin]-Human-Big-Gastrins I.

Schema 3. Gesamtsequenz 1–34 des [32-Leucin]-Human-Big-Gastrins



jedoch nur teilweise von Erfolg gekrönt. Eine stufenweise Fragmentverknüpfung nach Weg B oder Weg C verlief schon im ersten Abschnitt, daß sind die Verknüpfungen von [15–22a], Teilstück III–IV, bzw. Z-Trp-Leu-OH⁷ mit [LHBG 23–34 b] Teilstück I–II, mit unbefriedigenden Ergebnissen. Hiermit bestätigte sich der frühere Befund, daß das Dodecapeptidamid-Derivat mit Kopfkomponenten vom Typ Dipeptid- oder Pentapeptid-Derivat mittels dem Dicyclohexylcarbodiimid/*N*-Hydroxysuccinimid-Verfahren sich relativ schwer umsetzen läßt. Bei der [15-Leucin]-Human-Little-Gastrin-Synthese⁸ war z. B. nur mit einem 4fachen Überschuß an Kopfkomponente <Glu-Gly-Pro-Trp-Leu-OH die Umsetzung zum Heptadecapeptidamid-Derivat erzielbar. Auch eine Verfahrensvariation unter Ersatz des *N*-Hydroxysuccinimids durch 1-Hydroxybenzotriazol¹⁰ führte bei gleichgroßem Überschuß an der wertvollen Kopfkomponente (Teilstück III–IV) nicht zum Erfolg; im Gegenteil, zu einer weiteren Komplikation. Ein enormer Racemisierungseintritt an der C-terminalen Verknüpfungsstelle (Leucin) war ein Begleiteffekt des 1-Hydroxybenzotriazol-Einsatzes (40% *D*-Leucin-Anteil im Säurehydrolysat, festgestellt mit *D*-Aminosäure-oxidase)¹¹. Diese Ergebnisse veranlaßten uns zu einer Untersuchung der beiden Verknüpfungsmethoden Dicyclohexylcarbodiimid/*N*-Hydroxysuccinimid bzw. Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol hinsichtlich Racemisierung, deren Ergebnisse anderswo beschrieben werden¹².

Ein Aufbau des [32-Leucin]-Human-Big-Gastrins I in Analogie zu Weg A der Human-Big-Gastrin I Synthese vorgenommen (siehe oben), verlief dagegen ohne Schwierigkeiten: Die Verknüpfung von *Nps*-

Ser(*Bu*^t)-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^t)-Pro-Ser-(*Bu*^t)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-OH [9—22] mit H-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Ala-Tyr(*Bu*^t)-Gly-Trp-Leu-Asp(*OBu*^t)-Phe-NH₂ [LHBG 23—34 b] führte zum chromatographisch und analytisch reinen Hexacosapeptidamid-Derivat [LHBG 9—34 a] in über 68%iger Ausbeute. Letztlich verlief auch die Abschlußstufe, die Aufkondensation des Fragments VI auf das *N*^z-desacylierte Hexacosapeptidamid-Derivat zum alleisits geschützten Tetratriacontapeptidamid wie erwartet [LHBG 1—34 a].

3. Darstellung der Sequenz 1—20

Das Hexapeptid-Derivat H-Ser(*Bu*^t)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-OH [15—20 b] (siehe Weg B) wurde mit dem *N*-Hydroxysuccinimid-Ester von Fragment V, *Nps*-Ser(*Bu*^t)-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^t)-Pro-OH [9—14] als Rohprodukt zum 2-Nitrophenylsulfenyl-Dodecapeptidamid-Derivat [9—20 a] in hoher Ausbeute (88%) verknüpft. Die übliche Spaltung der Sulfenamid-Bindung am [9—20 a] mit Chlorwasserstoff führte zum „aminofreien“ Dodecapeptid-Derivat [9—20 b]. Dieses wurde mit Fragment VI, das ist <Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-His(*Adoc*)-Pro-OH [1—8 c] nach der *N*-Hydroxysuccinimid-Ester-Methode zum geschützten Eicosapeptid-Derivat [1—20 a] aufgestockt.

Dank

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir für die Gewährung einer großzügigen Sachbeihilfe (Wu 20/11) wiederum zu hohem Dank verpflichtet.

Herrn *Stocker* sowie Frau *Konrad-Grandl* und Frau *Bader-Beurer* danken wir für die gute technische Mitarbeit, den Assistenten der analytischen Abteilung unter Leitung von Herrn Dr. *Thamm* für die Ausführung der Elementar- und Aminosäure-Analysen.

Experimenteller Teil

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte in offenen Kapillaren im Apparat nach Dr. *Totoli*. Die Drehwerte wurden im lichtelektrischen Polarisometer, Modell 241 MC der Firma Perkin-Elmer, ermittelt. Der chromatographische Reinheitstest der Zwischen- und Endprodukte wurde mittels Dünnschichtchromatographie auf DC-Fertigplatten, Kieselgel 60 der Fa. E. Merck, Darmstadt, vorgenommen. Die Aminosäureanalysen wurden nach saurer Hydrolyse mit 6*M*-HCl unter Thioglykolsäure-Zusatz für tryptophanhaltige Peptide¹³ am „Amino Acid Analyzer“ der Firma Beckmann Instruments (Beckmann 120 B bzw. Multichrom B), die Elementaranalysen mittels des „Elemental Analyzer“, Modell 240 der Firma Perkin-Elmer durchgeführt.

Weg A zur Erstellung der Gesamtsequenz [1—34] des Human-Big-Gastrins I

2-Nitrophenylsulfenyl-L-glutamyl(γ -tert-butylester)-L-glutamyl
(γ -tert-butylester)-L-glutamyl(γ -tert-butylester)-L-glutamyl
(γ -tert-butylester)-L-glutamyl(γ -tert-butylester)-L-alanyl-O-
tert-butyl-L-tyrosyl-glycyl-L-tryptophyl-L-methionyl-L-asparagyl
(β -tert-butylester)-L-phenylalaninamid [23—34 a]

Zu 5,7 g H-Ala-Tyr(*But*)-Gly-Trp-Met-Asp(O*But*)-Phe-NH₂·HCl [28—34 b]^{2a}, 0,77 ml Triethylamin, 6,58 g *Nps*-Glu(O*But*)-Glu(O*But*)-Glu(O*But*)-Glu(O*But*)-Glu(O*But*)-OH [23—27 a]^{2a} und 1,15 g *N*-Hydroxysuccinimid in 200 ml *DMF*/*HMPA* (3:1) gibt man bei -10°C 1,34 g *DCCD* und rührt 20 h bei 4°C. Nach weiterem dreitägigen Rühren bei Raumtemp. wird die Reaktionsmischung auf 60°C erwärmt und in 2000 ml heißen Essigester eingerührt. Der gebildete Niederschlag wird abfiltriert, mehrmals mit heißem Methanol und warmem Wasser digeriert und letztlich im Vak. getrocknet. $[\alpha]_D^{20}$: -19,42° (*c* = 1, in *HMPA*). Chromatographisch rein in Chloroform/Trifluorethanol (3:1); Ausb. 10,1 g (88,6% d. Th.).

C₁₀₂H₁₄₇N₁₅O₂₇S₂ (2079,5). Ber. C 58,91, H 7,12, N 10,10, S 3,08.
Gef. C 58,98, H 7,26, N 10,06, S 3,12.

| Aminosäureanalyse: | Asp | Glu | Gly | Ala | Met | Tyr | Phe |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Ber. | 1 | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Gef. | 1,01 | 5,06 | 0,97 | 0,98 | 1,02 | 1,00 | 1,00 |

L-Glutamyl(γ -tert-butylester)-L-glutamyl(γ -tert-butylester)-L-
glutamyl(γ -tert-butylester)-L-glutamyl(γ -tert-butylester)-L-
glutamyl(γ -tert-butylester)-L-alanyl-O-tert-butyl-L-tyrosyl-
glycyl-L-tryptophyl-L-methionyl-L-asparagyl(β -tert-butylester)-
L-phenylalaninamid-hydrochlorid [23—34 b]

Zu einer Lösung von 8,3 g *Nps*-Glu(O*But*)-Glu(O*But*)-Glu(O*But*)-Glu(O*But*)-Glu(O*But*)-Ala-Tyr(*But*)-Gly-Trp-Met-Asp(O*But*)-Phe-NH₂ [23—34 a] und 10,5 g 2-Methylindol in 300 ml Trifluorethanol tropft man bei 5°C innerhalb 30 min unter Rühren 2,85 ml (1,68 *N*) methanol. Chlorwasserstoff. Nach weiteren 5 h Rühren bei Raumtemp. wird das Trifluorethanol im Hochvak. weitgehend entfernt, der Rückstand mit Ether digeriert, abfiltriert und mehrmals mit Ether gewaschen. $[\alpha]_D^{20}$: -10,6° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -12,6° (*c* = 1, in *HMPA*). Chromatographisch rein in Chloroform/Trifluorethanol (3:1) und Chloroform/Trifluorethanol (3:2); Ausb. 7,5 g (95,5% d. Th.).

C₉₆H₁₄₄N₁₄O₂₅S·HCl (1962,8). Ber. C 58,75, H 7,45, N 9,99, S 1,63, Cl 1,80.
Gef. C 58,45, H 7,51, N 9,91, S 1,74, Cl 1,89.

| Aminosäureanalyse: | Asp | Glu | Gly | Ala | Met | Tyr | Phe |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Ber. | 1 | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Gef. | 1,02 | 5,02 | 1,00 | 1,00 | 0,98 | 1,00 | 0,98 |

Benzoyloxycarbonyl-O-tert-butyl-L-seryl-N^ε-tert-butylloxycarbonyl-
L-lysyl-N^ε-tert-butylloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutaminyl-glycyl-
prolyl-L-tryptophyl-L-leucin [15—22 a]

In eine auf 0°C gekühlte Lösung von 7,76 g Z-Ser(*But*)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-OH [15—20 a]^{2a} und 1,29 g *N*-Hydroxysuccinimid in 50 ml *DMF* gibt man bei 0°C 1,70 g *DCCD* und läßt 15 h bei 4°C rühren. Danach gießt man

das Reaktionsgemisch in 750 ml Ether, filtriert den gebildeten Niederschlag ab und wäscht mit Ether nach. Den erhaltenen Filterkuchen bringt man zusammen mit 2,86 g H-Trp-Leu-OH [21—22b]⁷ und 1,26 ml Triethylamin in 50 ml DMF in Lösung und rührt weitere 3 Tage bei Raumtemp. Anschließend wird das Reaktionsgemisch in eine wäßrige Lösung von 1,75 g Kaliumhydrogensulfat in 500 ml Wasser filtriert, der entstandene Niederschlag abgenutscht und aus DMF/Essigester sowie DMF/Methanol umgefällt. Schmp. 217—218°C; $[\alpha]_D^{20}$: —31,6° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —37,7° ($c = 1$, in DMF). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20); Ausb. 7,48 g (75% d. Th.).

$C_{66}H_{100}N_{12}O_{17}$ (1333,6). Ber. C 59,44, H 7,56, N 12,60.
Gef. C 59,39, H 7,52, N 12,63.

| | | | | | | |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|
| Aminosäureanalyse: | Lys | Ser | Glu | Pro | Gly | Leu |
| Ber. | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Gef. | 2,01 | 0,98 | 1,00 | 1,04 | 1,00 | 0,99 |

O-tert-Butyl-L-seryl-N^ε-tert-butylloxycarbonyl-L-lysyl-N^ε-tert-butylloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutaminyll-glycyl-L-prolyl-L-tryptophyl-L-leucin-monohydrat [15—22b]

2,0 g Z-Ser(Bu^t)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-OH [15—22a] in 30 ml DMF werden in Gegenwart von Palladium-Schwarz hydrogenolytisch entacycliert. Anschließend wird die vom Katalysator abfiltrierte Lösung im Vak. eingedampft, der Rückstand mit Ether behandelt, abfiltriert und getrocknet. Schmp. 195—197°C; $[\alpha]_D^{20}$: —42,8° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —51,8° ($c = 1$, in DMF). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20); Ausb. 1,79 g (99% d. Th.).

$C_{58}H_{94}N_{12}O_{15} \cdot H_2O$ (1217,5). Ber. C 57,22, H 7,95, N 13,80.
Gef. C 57,02, H 7,99, N 13,51.

2-Nitrophenylsulfenyl-*O*-tert-butyl-L-seryl-L-leucyl-L-valyl-L-alanyl-L-asparagyl(β-tert-butylester)-L-prolyl-*O*-tert-butyl-L-seryl-N^ε-tert-butylloxycarbonyl-L-lysyl-N^ε-tert-butylloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutaminyll-glycyl-L-prolyl-L-tryptophyl-L-leucin [9—22]

Eine auf 0°C gekühlte Lösung von 1,13 g *Nps*-Ser(Bu^t)-Leu-Val-Ala-Asp(OBu^t)-Pro-OH · 1/2 H₂O [9—14]^{2b} in 10 ml DMF wird mit 0,18 g *N*-Hydroxysuccinimid und 0,29 g DCCD versetzt und 15 h bei 4°C gerührt. Die durch Zusatz von Ether abgeschiedene Substanz wird abfiltriert, mit Ether gewaschen und dann zusammen mit 1,20 g H-Ser(Bu^t)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-OH · H₂O [15—22b] und 0,14 ml Triethylamin in 10 ml DMF gelöst. Das Reaktionsgemisch rührt man 3 Tage bei Raumtemp., filtriert vom unlöslichen Material ab und läßt das Filtrat in eine Lösung von 0,17 g Kaliumhydrogensulfat in 200 ml Wasser einfließen. Das ausgefallene Produkt wird abgenutscht, mit Wasser gewaschen, zweimal aus DMF/Essigester umgefällt, 3 h mit Ethanol digeriert, abermals abfiltriert, mit Ethanol Ether gewaschen und getrocknet. Schmp. 216—218°C (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$: —40,4° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —45,8° ($c = 1$, in DMF). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1), *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20) und Chloroform/Methanol (3:1); Ausb. 1,79 g (89% d. Th.).

$C_{98}H_{155}N_{19}O_{26}S$ (2047,51). Ber. C 57,49, H 7,63, N 13,00.
Gef. C 57,60, H 7,52, N 12,84.

Aminosäureanalyse:

| | Lys | Asp | Ser | Glu | Pro | Gly | Ala | Val | Leu | Trp |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Ber. | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| Gef. | 1,95 | 1,03 | 2,02 | 1,02 | 2,00 | 0,98 | 1,00 | 0,96 | 1,96 | 0,99 |

2-Nitrophenylsulfenyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*L*-leucyl-*L*-valyl-*L*-alanyl-*L*-asparagyl(β -*tert*-butylester)-*L*-prolyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*N*^ε-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*N*^ε-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-prolyl-*L*-tryptophyl-*L*-leucyl-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-alanyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-tyrosyl-glycyl-*L*-tryptophyl-*L*-methionyl-*L*-asparagyl(β -*tert*-butylester)-*L*-phenylalaninamid-tetrahydrat [9—34 a]

0,520 g H-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Ala-Tyr(*Bu*^t)-Gly-Trp-Met-Asp(*OBu*^t)-Phe-NH₂·HCl [23—34 b] und 0,037 ml Triethylamin werden in 40 ml Dimethylacetamid/*HMPA* (3:1) verrührt und anschließend nacheinander mit 0,614 g *Nps*-Ser(*Bu*^t)-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^t)-Pro-Ser(*Bu*^t)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-OH [9—22], 0,052 g *N*-Hydroxysuccinimid und nach Abkühlen auf -10°C mit 0,062 g *DCCD* versetzt. Man rührt 24 h bei 4°C, dann 2 Tage bei Raumtemp. und gibt dann nochmals 0,102 g *Nps*-[9—22]-OH, 0,012 g *N*-Hydroxysuccinimid sowie 0,010 g *DCCD* hinzu. Nach weiterem 24stdg. Rühren wird das Dimethylacetamid im Hochvak. entfernt, die verbliebene Lösung mit Wasser versetzt, der gebildete Niederschlag mehrmals mit warmem Methanol digeriert und abfiltriert. Der Filterkuchen wird in Dimethylacetamid gelöst und durch eine Sephadex-Säule LH-20 (200 × 3 cm, Elutionsmittel: Dimethylacetamid, Fließgeschwindigkeit 4,3 ml/h·cm²) geschickt. Die zuerst aus der Säule austretenden Fraktionen (je 7,6 ml) enthalten reines *Nps*-[9—34]-NH₂, spätere Fraktionen sind durch H-[23—34]-NH₂ verunreinigt und werden unter den oben angegebenen Bedingungen rechromatographiert. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -14,9° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -17,1° (*c* = 0,5, in *DMF*). Chromatographisch rein in Chloroform/Trifluorethanol (3:1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1); Ausb. 0,72 g (67,5% d. Th.)

C₁₉₄H₂₉₇N₃₃O₅₀S₂·4 H₂O (4027,885). Ber. C 57,85, H 7,63, N 11,48.
Gef. C 58,02, H 7,50, N 11,20.

O-*tert*-Butyl-*L*-seryl-*L*-leucyl-*L*-valyl-*L*-alanyl-*L*-asparagyl(β -*tert*-butylester)-*L*-prolyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*N*^ε-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*N*^ε-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-prolyl-*L*-tryptophyl-*L*-leucyl-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-alanyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-tyrosyl-glycyl-*L*-tryptophyl-*L*-methionyl-*L*-asparagyl(β -*tert*-butylester)-*L*-phenylalaninamid-hydrochlorid-hexahydrat [9—34 b]

0,44 g *Nps*-Ser(*Bu*^t)-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^t)-Pro-Ser(*Bu*^t)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Ala-Tyr(*Bu*^t)-Gly-Trp-Met-Asp(*OBu*^t)-Phe-NH₂·4 H₂O [9—34 a] und

0,303 g 2-Methylindol in 60 ml *DMF*/Methanol (5:1) werden unter Rühren allmählich mit 0,145 ml (1,83*N*) methanol. Chlorwasserstoff in 10 ml Methanol versetzt. Nach 6 h Rühren wird Methanol und *DMF* im Vak. bis auf ein Volumen von 15 ml entfernt und die Restlösung in 500 ml Ether eingerührt. Der gebildete Niederschlag wird abfiltriert, mit Ether mehrmals gewaschen und getrocknet. $[\alpha]_D^{20}$: $-15,1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $-18,5^\circ$ ($c = 0,5$, in *DMF*). Chromatographisch rein in Chloroform/Trifluorethanol (3:1): Ausb. 0,378 g (88% d. Th.).

$C_{188}H_{294}N_{32}O_{48}S \cdot HCl \cdot 6 H_2O$ (3947,210). Ber. C 57,20, H 7,84, N 11,35.
Gef. C 57,23, H 7,54, N 11,36.

Aminosäureanalyse:

| | Lys | Asp | Ser | Glu | Pro | Gly | Ala | Val | Met | Leu | Tyr | Phe |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Ber. | 2 | 2 | 2 | 6 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| Gef. | 1,96 | 1,96 | 1,96 | 6,20 | 0,96 | 2,00 | 1,98 | 0,95 | 1,05 | 1,95 | 1,04 | 0,98 |

L-2-Pyrrolidon-5-carbonyl-*L*-leucyl-glycyl-*L*-prolyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-histidyl(*N*^{im}-adamantylloxycarbonyl)-*L*-prolyl-*O*-tert-butyl-*L*-seryl-*L*-leucyl-*L*-valyl-*L*-alanyl-*L*-asparagyl(β -tert-butylester)-*L*-prolyl-*O*-tert-butyl-*L*-seryl-*N*^t-tert-butylloxycarbonyl-*L*-lysyl-*N*^e-tert-butylloxycarbonyl-*L*-lysyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-prolyl-*L*-tryptophyl-*L*-leucyl-*L*-glutamyl(γ -tert-butylester)-*L*-glutamyl(γ -tert-butylester)-*L*-glutamyl(γ -tert-butylester)-*L*-alanyl-*O*-tert-butyl-*L*-tyrosyl-glycyl-*L*-tryptophyl-*L*-methionyl-*L*-asparagyl(β -tert-butylester)-*L*-phenylalaninamid [1—34 a]

0,450 g H-Ser(*Bu*^t)-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^t)-Pro-Ser(*Bu*^t)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Ala-Tyr(*Bu*^t)-Gly-Trp-Met-Asp(*OBu*^t)-Phe-NH₂·HCl·6 H₂O [9—34 b] werden in 40 ml *DMF*/*HMPA* (25:15) gelöst, 10 min mit 0,016 ml Triethylamin verrührt und dann nacheinander mit 0,349 g <Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-His(*Adoc*)-Pro-OH·H₂O [1—8 c], 0,060 g *N*-Hydroxysuccinimid und nach Abkühlen der Reaktionsmischung auf $-10^\circ C$ mit 0,072 g *DCCD* versetzt. Nach viertägigem Rühren bei Raumtemp. wird *DMF* im Hochvak. abdestilliert, der Rückstand mit Wasser digeriert, abfiltriert und anschließend zweimal mit warmem Methanol behandelt. In der Dünnschichtchromatographie zeigen sich im Lösungsmittelsystem *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) neben dem Tetratriacontapeptid [1—34 a] nur noch Spuren von Octapeptid [1—8 c]; Ausb. 0,410 g ($\sim 75\%$ d. Th.).

$C_{235}H_{359}N_{43}O_{60}S$ (4778,758).

Aminosäureanalyse:

| | Glu | Leu | Gly | Pro | His | Ser | Val | Ala | Asp | Lys | Trp |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Ber. | 8 | 3 | 4 | 4 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Gef. | 8,08 | 2,87 | 3,96 | 4,17 | 0,92 | 1,98 | 0,97 | 1,97 | 2,05 | 1,95 | 1,79 |

| Tyr | Met | Phe |
|------|------|------|
| 1 | 1 | 1 |
| 1,04 | 1,07 | 1,02 |

Weg B zur Erstellung der Gesamtsequenz 1—34

O-tert-Butyl-L-seryl-N^ε-tert-butyloxycarbonyl-L-lysyl-N^ε-tert-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutaminyll-glycyl-L-prolin-monohydrat [15—20 b]

10,34 g Z-Ser(*But*^t)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-OH [15—20 a]^{2a} in 450 ml Methanol/Wasser (4:1) werden über Palladium-Schwarz hydriert. Die vom Katalysator befreite Lösung wird im Vak. eingengt, der erhaltene Niederschlag abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Schmp. 211—212°; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -29,3° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -34,8° ($c = 1$, in *DMF*). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20): Ausb. 7,93 g (88% d. Th.).

C₄₁H₇₃N₉O₁₃ · H₂O (918,1). Ber. C 53,63, H 8,23, N 13,73.
Gef. C 53,67, H 8,37, N 13,74.

2-Nitrophenylsulfenyl-*O*-tert-butyl-L-seryl-N^ε-tert-butyloxy-carbonyl-L-lysyl-N^ε-tert-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutaminyll-glycyl-L-prolin [15—20 c]

Zu 6,30 g H-Ser(*But*^t)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-OH · H₂O [15—20 b] und 0,98 ml Triethylamin in 30 ml *DMF* werden unter Rühren innerhalb 60 min 1,99 g frisch kristallisiertes 2-Nitrophenylsulfenylchlorid und 1,47 ml Triethylamin in fünf gleichen Portionen gegeben. Nach 15 h wird das Reaktionsgemisch im Vak. eingengt, das verbliebene Öl mit Chloroform verdünnt, die erhaltene Lösung mit 1,05 g Kaliumhydrogensulfat in Wasser geschüttelt, mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nun wird das Chloroform im Vak. abgedampft, die entstandene Gallerte mit wenig Methanol verdünnt und im Vak. zur Trockene gebracht. Das amorphe Material wird in wenig Methanol gelöst, die Lösung in Ether eingerührt, der gebildete Niederschlag abfiltriert, mit Ether gewaschen und getrocknet. Schmp. 215—218°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -40° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -43,9° ($c = 1$, in *DMF*). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1), *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20) und Chloroform/Methanol (9:1): Ausb. 6.12 g (85% d. Th.).

C₄₇H₇₆N₁₀O₁₅S (1053,2). Ber. C 53,60, H 7,27, N 13,30.
Gef. C 53,42, H 7,29, N 13,23.

| Aminosäureanalyse: | Lys | Ser | Glu | Pro | Gly |
|--------------------|------|------|------|------|------|
| Ber. | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Gef. | 2,00 | 1.01 | 1.00 | 1.00 | 0.98 |

2-Nitrophenylsulfenyl-*O*-tert-butyl-L-seryl-N^ε-tert-butyloxy-carbonyl-L-lysyl-N^ε-tert-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutaminyll-glycyl-L-prolyl-L-tryptophyl-L-leucin [15—22 c]

Eine auf 0°C gekühlte Lösung von 2,63 g *Nps*-Ser(*But*^t)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-OH [15—20 c] und 0,35 g *N*-Hydroxysuccinimid in 10 ml *DMF* wird mit 0,57 g *DCCD* versetzt und 15 h bei 4°C gerührt. Das durch Zugabe von Ether abgeschiedene Produkt wird abfiltriert, mit Ether gewaschen und anschließend in 15 ml *DMF* gelöst. Zu der Lösung fügt man 0,95 g H-Trp-Leu-OH [21—22 b]⁷ sowie 0,42 ml Triethylamin und läßt drei Tage bei Raumtemp. rühren. Dann wird vom Unlöslichen abfiltriert, das Filtrat in eine Lösung von

0,45 g Kaliumhydrogensulfat in 200 ml Wasser eingerührt, der gebildete Niederschlag abgenutscht, mit Wasser und Ether gewaschen und letztlich zweimal aus *DMF*/Essigester umgefällt. Schmp. 216—218 °C: $[\alpha]_D^{20}$: —36,9° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —42,1° ($c = 1$, in *DMF*). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20) und Chloroform/Methanol (3:1): Ausb. 2,94 g (87% d. Th.).

$C_{64}H_{97}N_{13}O_{17}S$ (1352,6). Ber. C 56,83, H 7,23, N 13,46.
Gef. C 56,78, H 7,34, N 13,29.

| Aminosäureanalyse: | Lys | Ser | Glu | Pro | Gly | Leu | Trp |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Ber. | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Gef. | 2,11 | 1,03 | 0,98 | 1,02 | 0,98 | 1,00 | 1,00 |

2-Nitrophenylsulfenyl-O-tert-butyl-L-seryl-N^ε-tert-butylloxycarbonyl-L-lysyl-N^ε-tert-butylloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutaminyl-glycyl-L-prolyl-L-tryptophyl-L-leucyl-L-glutamyl(γ-tert-butylester)-L-glutamyl(γ-tert-butylester)-L-glutamyl(γ-tert-butylester)-L-glutamyl(γ-tert-butylester)-L-glutamyl(γ-tert-butylester)-L-alanyl-O-tert-butyl-L-tyrosyl-glycyl-L-tryptophyl-L-methionyl-L-asparagyl(β-tert-butylester)-L-phenylalaninamid-dihydrat [15—34 a]

0,73 g H-Glu(*OBu^t*)-Glu(*OBu^t*)-Glu(*OBu^t*)-Glu(*OBu^t*)-Glu(*OBu^t*)-Ala-Tyr(*Bu^t*)-Gly-Trp-Met-Asp(*OBu^t*)-Phe-NH₂·HCl [23—34 b] werden in 75 ml Dimethylacetamid/*DMF*/*HMPA* (8:4:3) gelöst, mit 0,053 ml Triethylamin versetzt, dann nacheinander 0,51 g *Nps*-Ser(*Bu^t*)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-OH [15—22 c], 0,075 g *N*-Hydroxysuccinimid und schließlich bei —10 °C 0,085 g *DCCD* zugegeben. Nach 24 h Rühren bei 4 °C wird vier Tage bei Raumtemp. gerührt. Anschließend entfernt man *DMF* und Dimethylacetamid im Hochvak., behandelt den Rückstand mit viel heißem Essigester (1000 ml), mehrere Male mit Methanol, Wasser und Wasser/Methanol, filtriert ab und wäscht mit Methanol nach. $[\alpha]_D^{20}$: —10,4° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —11,9° ($c = 0,7$, in Trifluorethanol). Chromatographisch rein in Chloroform/Trifluorethanol (3:1) und (3:2) sowie *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1): Ausb. 0,9 g (73% d. Th.).

$C_{160}H_{239}N_{27}O_{41}S_2 \cdot 2 H_2O$ (3296,98). Ber. C 58,29, H 7,43, N 11,47.
Gef. C 58,44, H 7,38, N 11,40.

Aminosäureanalyse:

| | Lys | Asp | Ser | Glu | Pro | Gly | Ala | Met | Leu | Tyr | Phe |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Ber. | 2 | 1 | 1 | 6 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Gef. | 1,95 | 1,06 | 1,00 | 6,05 | 1,00 | 1,97 | 1,00 | 1,00 | 0,96 | 1,00 | 1,00 |

O-tert-Butyl-L-seryl-N^ε-tert-butylloxycarbonyl-L-lysyl-N^ε-tert-butylloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutaminyl-glycyl-L-prolyl-L-tryptophyl-L-leucyl-L-glutamyl(γ-tert-butylester)-L-glutamyl(γ-tert-butylester)-L-glutamyl(γ-tert-butylester)-L-glutamyl(γ-tert-butylester)-L-glutamyl(γ-tert-butylester)-L-alanyl-O-tert-butyl-L-tyrosyl-glycyl-L-tryptophyl-L-methionyl-L-asparagyl(β-tert-butylester)-L-phenylalaninamid-hydrochlorid-hexahydrat [15—34 b]

0,6 g *Nps*-Ser(*Bu^t*)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(*OBu^t*)-Glu(*OBu^t*)-Glu(*OBu^t*)-Glu(*OBu^t*)-Ala-Tyr(*Bu^t*)-Gly-Trp-Met-

Asp(*OBu*^t)-Phe-NH₂ · 2 H₂O [15—34 a] werden durch mehrstdg. Rühren in 20 ml *DMF* gelöst, dann 0,482 g 2-Methylindol zugesetzt und unter Rühren innerhalb 30 min 0,238 ml (1,84 *N*) methanol. Chlorwasserstoff in 10 ml absol. Methanol zugetropft. Nach 3 h Rühren bei Raumtemp. entfernt man das Methanol im Vak., versetzt den Rückstand mit 600 ml absol. Ether und dekantiert die überstehende Flüssigkeit vom öligen Produkt ab. Das inzwischen erstarrte Material wird in wenig warmem Methanol gelöst, mit viel Ether versetzt und der gebildete Niederschlag abfiltriert. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: —16,2° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —19,6° (*c* = 0,6, in Trifluorethanol). Chromatographisch rein in Chloroform/Trifluorethanol (3:1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1); Ausb. 0,515 g (87% d. Th.).

C₁₅₄H₂₃₆N₂₆O₃₉S · HCl · 6 H₂O (3252,355). Ber. C 56,87, H 7,72, N 11,20.
Gef. C 56,76, H 7,55, N 11,20.

2-Nitrophenylsulfenyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*L*-leucyl-*L*-valyl-*L*-alanyl-*L*-asparagyl(β-*tert*-butylester)-*L*-prolyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*N*^ε-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*N*^ε-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*L*-glutaminyglycyl-*L*-prolyl-*L*-tryptophyl-*L*-leucyl-*L*-glutamyl(γ-*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ-*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ-*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ-*tert*-butylester)-*L*-alanyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-tyrosyl-glycyl-*L*-tryptophyl-*L*-methionyl-*L*-asparagyl(β-*tert*-butylester)-*L*-phenylalaninamid-tetrahydrat [9—34 a]

0,314 g H-Ser(*Bu*^t)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Ala-Tyr(*Bu*^t)-Gly-Trp-Met-Asp(*OBu*^t)-Phe-NH₂ · HCl · 6 H₂O [15—34 b] werden in 30 ml frisch destilliertem *DMF* gelöst, mit 0,014 ml Triethylamin versetzt, 10 min gerührt, dann 0,260 g *Nps*-Ser(*Bu*^t)-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^t)-Pro-OH · 1/2 H₂O [9—14], 0,038 g *N*-Hydroxysuccinimid und nach Abkühlen auf —10 °C 0,062 g *DCCD* zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 24 h bei 5 °C und anschließend drei Tage bei Raumtemp. gerührt. Nun entfernt man *DMF* im Hochvak., behandelt den Rückstand mehrmals mit heißem Methanol und filtriert ab. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: —14,6° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —16,9° (*c* = 0,5, in *DMF*). Chromatographisch rein in Chloroform/Trifluorethanol (3:1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1); Ausb. 0,320 g (82% d. Th.).

C₁₉₄H₂₉₇N₃₃O₅₀S₂ · 4 H₂O (4027,885). Ber. C 57,85, H 7,63, N 11,48.
Gef. C 57,88, H 7,49, N 11,45.

Aminosäureanalyse:

| | | | | | | | |
|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | Lys | Asp | Ser | Glu | Pro | Gly | Ala |
| Ber. | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 2 |
| Gef. | 1,94 | 1,93 | 1,95 | 6,07 | 2,03 | 2,05 | 2,06 |
| | Val | Leu | Tyr | Phe | Trp | Met | |
| | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | |
| | 1,03 | 2,01 | 1,05 | 1,04 | 2,03 | 0,97 | |

Zur weiteren Umsetzung siehe Weg A.

Weg C zur Erstellung der Gesamtsequenz 1—34

2-Nitrophenylsulfenyl-*L*-tryptophyl-*L*-leucin-dicyclohexylaminsalz [21—22 c]

Zu 1,27 g H-Trp-Leu-OH [21—22b]⁷ in 125 ml Dioxan/Wasser (4:1) und 4 ml 1 *N*-Natronlauge werden bei Raumtemp. unter Rühren 0,76 g 2-Nitrophe-

nylsulfenylchlorid und 4 ml 1*N*-Natronlauge bei *pH* 8 gegeben. Die Reaktionsmischung wird 15 min nachgerührt, mit 200 ml Wasser verdünnt, mit Ether überschiebt und mit wäßriger Zitronensäure-Lösung bis *pH* 4 angesäuert. Die abgetrennte organische Phase wird mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und mit Dicyclohexylamin versetzt. Das abfiltrierte Material wird aus Acetonitril umkristallisiert. Schmp. 134—136 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: —24,4° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —13,3° ($c = 1$, in Methanol). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20) sowie Cyclohexan/Chloroform/Essigsäure (45:45:10); Ausb. 1,85 g (71% d. Th.).

$\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5\text{S} \cdot \text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}$ (651,9). Ber. C 64,49, H 7,58, N 10,74, S 4,92.
Gef. C 64,53, H 7,70, N 10,55, S 4,89.

2-Nitrophenylsulfenyl-*L*-tryptophyl-*L*-leucyl-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-alaninyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-tyrosyl-glycyl-*L*-tryptophyl-*L*-methionyl-*L*-asparagyl(β -*tert*-butylester)-*L*-phenylalaninamid-dihydrat [21—34 a]

0,980 g *H*-Glu(*OBu*^{*t*})-Glu(*OBu*^{*t*})-Glu(*OBu*^{*t*})-Glu(*OBu*^{*t*})-Glu(*OBu*^{*t*})-Ala-Tyr(*Bu*^{*t*})-Gly-Trp-Met-Asp(*OBu*^{*t*})-Phe-NH₂·HCl [23—34 b], 0,07 ml Triethylamin, 0,705 g (des aus seinem Dicyclohexylaminsalz mit 1*N*-Schwefelsäure in Freiheit gesetzten) *Nps*-Trp-Leu-OH [21—22 c] und 0,230 g *N*-Hydroxysuccinimid werden in 40 ml *DMF*/Dimethylacetamid/*HMPA* (2:1:1) gelöst, auf —10 °C abgekühlt, mit 0,309 g *DCCD* versetzt und 24 h bei 4 °C gerührt. Nach weiterem zweitägigem Rühren bei Raumtemp. wird die Reaktionsmischung 10 min auf 60 °C erwärmt und anschließend in 800 ml Ether eingerührt. Der erhaltene Niederschlag wird mit bidestilliertem Wasser verrührt, abfiltriert und getrocknet. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: —6,9° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —2,6° ($c = 0,2$, in *HMPA*). Chromatographisch rein in Chloroform/Trifluorethanol (3:1) und Chloroform/Methanol/Trifluorethanol (18:1:2); Ausb. 1,07 g (88% d. Th.).

$\text{C}_{119}\text{H}_{168}\text{N}_{18}\text{O}_{29}\text{S}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2414,9). Ber. C 59,19, H 7,18, N 10,44.
Gef. C 59,09, H 7,36, N 10,47.

L-Tryptophyl-*L*-leucyl-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-alaninyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-tyrosyl-glycyl-*L*-tryptophyl-*L*-methionyl-*L*-asparagyl(β -*tert*-butylester)-*L*-phenylalaninamid-hydrochlorid-trihydrat [21—34 b]

0,948 g *Nps*-Glu(*OBu*^{*t*})-Glu(*OBu*^{*t*})-Glu(*OBu*^{*t*})-Glu(*OBu*^{*t*})-Glu(*OBu*^{*t*})-Ala-Tyr(*Bu*^{*t*})-Gly-Trp-Met-Asp(*OBu*^{*t*})-Phe-NH₂·2 H₂O [21—34 a] und 1,05 g 2-Methylindol werden in 50 ml Trifluorethanol in der Wärme gelöst und anschließend bei Raumtemp. mit 0,285 ml (1,68 *N*) methanol. Chlorwasserstoff unter Rühren innerhalb 30 min versetzt. Nach weiterem 2 h Rühren bei Raumtemp. wird Trifluorethanol im Vak. entfernt, der Rückstand mehrmals mit Ether digeriert, abfiltriert und getrocknet. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: —9,7° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$:

— 12,3° ($c = 0,2$, in *HMPA*). Chromatographisch rein in Chloroform/Methanol/Trifluorethanol (18:1:2); Ausb. 0,8 g (88,6% d. Th.).

$C_{113}H_{165}N_{17}O_{27}S \cdot HCl \cdot 3 H_2O$ (2316,2). Ber. C 58,60, H 7,48, N 10,24.
Gef. C 58,60, H 7,63, N 10,27.

Aminosäureanalyse:

| | Asp | Glu | Gly | Ala | Met | Leu | Tyr | Phe |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Ber. | 1 | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Gef. | 1,02 | 5,10 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 0,95 | 1,00 | 1,00 |

2-Nitrophenylsulfenyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*N*^ε-*tert*-butyloxy-carbonyl-*L*-lysyl-*N*^ε-*tert*-butyloxy-carbonyl-*L*-lysyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-prolyl-*L*-tryptophyl-*L*-leucyl-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-alanyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-tyrosyl-glycyl-*L*-tryptophyl-*L*-methionyl-*L*-asparagyl(β -*tert*-butylester)-*L*-phenylalaninamid-dihydrat [15—34 a]

Zu einer Lösung von 0,6 g H-Trp-Leu-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Ala-Tyr(*Bu*^t)-Gly-Trp-Met-Asp(*OBu*^t)-Phe-NH₂ · HCl · 3 H₂O [21—34 b] und 0,036 ml Triethylamin in 50 ml *DMF*/Dimethylacetamid/*HMPA* (20:20:10) gibt man nacheinander 0,558 g *Nps*-Ser(*Bu*^t)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-OH [15—20 c], 0,115 g *N*-Hydroxysuccinimid und nach Abkühlen auf — 10 °C 0,109 g *DCCD*. Die Reaktionsmischung wird 24 h bei 5 °C und zwei Tage bei Raumtemp. gerührt. Danach wird *DMF* und Dimethylacetamid im Hochvak. entfernt, der Rückstand zuerst mit Wasser, dann mit Wasser/Methanol und schließlich mit heißem Methanol digeriert und abfiltriert. $[\alpha]_D^{20}$: — 10,9° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: — 12,1° ($c = 0,5$, in Trifluorethanol). Chromatographisch rein in Chloroform/Trifluorethanol (3:1) bzw. (3:2) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1); Ausb. 0,7 g (82% d. Th.).

$C_{160}H_{239}N_{27}O_{41}S_2 \cdot 2 H_2O$ (3296,98). Ber. C 58,29, H 7,43, N 11,47.
Gef. C 58,31, H 7,34, N 11,48.

Zur weiteren Umsetzung vgl. Weg B.

Erstellung der Gesamtsequenz 1—34 des [32-Leucin]-Human-Big-Gastrins I

Benzyloxycarbonyl-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-alanyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-tyrosyl-glycyl-*L*-tryptophyl-*L*-leucyl-*L*-asparagyl(β -*tert*-butylester)-*L*-phenylalaninamid [LHBG 23—34 a]

6,5 g Z-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-OH [23—27 b]⁹ und 4,0 g H-Ala-Tyr(*Bu*^t)-Gly-Trp-Leu-Asp(*OBu*^t)-Phe-NH₂ · H₂O [LHBG 28—34 b]⁹ werden in 60 ml Dimethylacetamid/*HMPA* (3:1) unter Rühren gelöst. Zu der auf 0 °C abgekühlten Mischung gibt man 0,760 g *N*-Hydroxy-

succinimid, nach Abkühlen auf -10°C 1,24 g *DCCD*. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei 0°C , dann 26 h bei Raumtemp. belassen; nach dieser Zeit erstarrt es zu einem festen Gel. Nach Zugabe von 250 ml Methanol und 15 min Rühren wird abgesaugt. Das erhaltene Produkt digeriert man zweimal mit je 300 ml warmem Methanol, filtriert, wäscht den Filterkuchen mit Methanol und Ether und trocknet im Vak. bei 40°C . Schmp. $234\text{--}235^{\circ}\text{C}$ (Zers.). $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: $-11,4^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $-14,3^{\circ}$ ($c = 1,2$, in *HMPA*). Chromatographisch rein in Chloroform/Trifluorethanol (3:1); Ausb. 7,0 g (86% d. Th.).

$\text{C}_{105}\text{H}_{152}\text{N}_{14}\text{O}_{27}$ (2042,4). Ber. C 61,75, H 7,50, N 9,60.
Gef. C 61,43, H 7,41, N 9,69.

| Aminosäureanalyse: | Asp | Glu | Gly | Ala | Leu | Tyr | Phe |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Ber. | 1 | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Gef. | 0,91 | 5,35 | 1,04 | 1,03 | 0,98 | 0,94 | 1,00 |

L-Glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-alanyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-tyrosyl-glycyl-*L*-tryptophyl-*L*-leucyl-*L*-asparagyl(β -*tert*-butylester)-*L*-phenylalaninamid [LHBG 23—34 b]

6,85 g *Z*-Glu(*OBu*^{*t*})-Glu(*OBu*^{*t*})-Glu(*OBu*^{*t*})-Glu(*OBu*^{*t*})-Ala-Tyr(*Bu*^{*t*})-Gly-Trp-Leu-Asp(*OBu*^{*t*})-Phe-NH₂ [LHBG 23—34 a] in 200 ml *HMPA* werden unter gleichzeitigem Zutropfen von 8,4 ml 0,4*N*-Salzsäure bei *pH* 5 in Gegenwart von Palladium-Schwarz katalytisch hydriert. Nach 7 Tagen Reaktionsdauer wird das Filtrat vom Katalysator unter Rühren in eine Lösung von 3,9 g Kaliumhydrogencarbonat in 2000 ml Wasser gegossen. Der gallertige Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser, Methanol, Ether gewaschen und im Vak. bei 40°C getrocknet. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: $-12,5^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $-14,9^{\circ}$ ($c = 1$, in *HMPA*). Chromatographisch rein in Chloroform/Trifluorethanol (3:1); Ausb. 6,1 g (95% d. Th.).

$\text{C}_{97}\text{H}_{146}\text{N}_{14}\text{O}_{25}$ (1908,3). Ber. C 61,05, H 7,71, N 10,27.
Gef. C 60,71, H 7,90, N 10,17.

| Aminosäureanalyse: | Asp | Glu | Gly | Ala | Leu | Tyr | Phe |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Ber. | 1 | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Gef. | 0,94 | 5,24 | 1,03 | 1,03 | 0,97 | 0,95 | 1,00 |

2-Nitrophenylsulfenyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*L*-leucyl-*L*-valyl-*L*-alanyl-*L*-asparagyl(β -*tert*-butylester)-*L*-prolyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*N*^{*t*}-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*N*^{*t*}-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-prolyl-*L*-tryptophyl-*L*-leucyl-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-alanyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-tyrosyl-glycyl-*L*-tryptophyl-*L*-leucyl-*L*-asparagyl(β -*tert*-butylester)-*L*-phenylalaninamid-tetrahydrat [LHBG 9—34 a]

0,572 g H-Glu(*OBu*^{*t*})-Glu(*OBu*^{*t*})-Glu(*OBu*^{*t*})-Glu(*OBu*^{*t*})-Ala-Tyr(*Bu*^{*t*})-Gly-Trp-Leu-Asp(*OBu*^{*t*})-Phe-NH₂ [LHBG 23—34 b] werden in 45 ml

HMPA/Dimethylacetamid (25:20) gelöst, dann 0,716 g *Nps-Ser(Bu^t)-Leu-Val-Ala-Asp(OBu^t)-Pro-Ser(Bu^t)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-OH* [9—22], 0,058 g *N-Hydroxysuccinimid* und nach Abkühlen auf -10°C 0,074 g *DCCD* zugesetzt. Man rührt 24 h bei 4°C , anschließend zwei Tage bei Raumtemp., gibt nochmals 0,204 g [9—22], 0,023 g *N-Hydroxysuccinimid* sowie 0,021 g *DCCD* hinzu und hält das Reaktionsgemisch weitere zwei Tage bei Raumtemp. Nun wird das Dimethylacetamid im Hochvak. entfernt, der Rückstand unter Rühren mit Wasser versetzt, der gebildete Niederschlag abfiltriert und zweimal mit warmem Methanol digeriert. Das isolierte Material wird nach Lösen in Dimethylacetamid einer Gelfiltration durch Sephadex LH-20 unterworfen und in gleicher Weise wie bei Weg A [9—34 a] beschrieben, aufgearbeitet. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: $-15,9^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $-18,3^{\circ}$ ($c = 0,6$, in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in Chloroform/Trifluorethanol (3:1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1); Ausb. 0,820 g (68% d. Th.).

$\text{C}_{195}\text{H}_{299}\text{N}_{33}\text{O}_{50}\text{S} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (4009,8). Ber. C 58,41, H 7,72, N 11,53.
Gef. C 58,65, H 7,57, N 11,51.

Aminosäureanalyse:

| | | | | | | |
|------|------|------|------|------|------|------|
| | Lys | Asp | Ser | Glu | Pro | Gly |
| Ber. | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 |
| Gef. | 2,03 | 2,03 | 1,98 | 6,09 | 2,03 | 1,96 |
| | Ala | Val | Leu | Tyr | Phe | Trp |
| | 2 | 1 | 3 | 1 | 1 | 2 |
| | 2,04 | 0,99 | 2,90 | 1,00 | 1,00 | 2,01 |

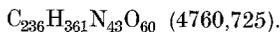
O-tert-Butyl-L-seryl-L-leucyl-L-valyl-L-alanyl-L-asparagyl
(β -*tert-butylester*)-*L-prolyl-O-tert-butyl-L-seryl-N^ε-tert-butylloxycarbonyl-L-lysyl-N^ε-tert-butylloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutaminyl-glycyl-L-prolyl-L-tryptophyl-L-leucyl-L-glutamyl*
(γ -*tert-butylester*)-*L-glutamyl*(γ -*tert-butylester*)-*L-glutamyl*
(γ -*tert-butylester*)-*L-glutamyl*(γ -*tert-butylester*)-*L-glutamyl*
(γ -*tert-butylester*)-*L-alanyl-O-tert-butyl-L-tyrosyl-glycyl-L-tryptophyl-L-leucyl-L-asparagyl*(β -*tert-butylester*)-*L-phenylalaninamid-hydrochlorid-hexahydrat* [LHBG 9—34 b]

0,197 g *Nps-Ser(Bu^t)-Leu-Val-Ala-Asp(OBu^t)-Pro-Ser(Bu^t)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-Trp-Leu-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ · 4 H₂O* [LHBG 9—34 a] und 0,131 g 2-Methylindol in 22 ml *DMF*/Methanol (10:1) werden innerhalb 20 min unter Rühren mit 0,066 ml (1,83*N*) methanol. Chlorwasserstoff versetzt. Die Reaktionsmischung wird 6 h nachgerührt, anschließend das Lösungsmittel bis auf ein Volumen von 5 ml im Vak. entfernt und die Restlösung mit Ether verrührt. Der gebildete Niederschlag wird abfiltriert und getrocknet. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: $-17,2^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $-19,0^{\circ}$ ($c = 0,5$, in *DMF*). Chromatographisch rein in Chloroform/Trifluorethanol (3:1); Ausb. 0,180 g (94% d. Th.).

$\text{C}_{189}\text{H}_{296}\text{N}_{32}\text{O}_{48} \cdot \text{HCl} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (3929,2). Ber. C 57,77, H 7,93, N 11,41.
Gef. C 57,66, H 7,66, N 11,45.

L-2-Pyrrolidon-5-carbonyl-*L*-leucyl-glycyl-*L*-prolyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-histidyl (*N*^{im}-adamantylloxycarbonyl)-*L*-prolyl-*O*-tert-butyl-*L*-seryl-*L*-leucyl-*L*-valyl-*L*-alanyl-*L*-asparagyl (β -tert-butylester)-*L*-prolyl-*O*-tert-butyl-*L*-seryl-*N*^t-tert-butylloxycarbonyl-*L*-lysyl-*N*^t-tert-butylloxycarbonyl-*L*-lysyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-prolyl-*L*-tryptophyl-*L*-leucyl-*L*-glutamyl (γ -tert-butylester)-*L*-glutamyl (γ -tert-butylester)-*L*-glutamyl (γ -tert-butylester)-*L*-glutamyl (γ -tert-butylester)-*L*-alanyl-*O*-tert-butyl-*L*-tyrosyl-glycyl-*L*-tryptophyl-*L*-leucyl-*L*-asparagyl (β -tert-butylester)-*L*-phenylalaninamid [LHBG 1—34 a]

0,250 g H-Ser(*But*^t)-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^t)-Pro-Ser(*But*^t)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Ala-Tyr(*But*^t)-Gly-Trp-Leu-Asp(*OBu*^t)-Phe-NH₂ · HCl · 6 H₂O [LHBG 9—34 b] in 25 ml *DMF/HMPA* (15:10) werden mit 0,009 ml Triethylamin versetzt, 15 min gerührt und dann nacheinander 0,194 g <Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-His(*Adoc*)-Pro-OH · H₂O [1—8 c], 0,034 g *N*-Hydroxysuccinimid und bei —10 °C 0,040 g *DCCD* zugegeben. Die Reaktionsmischung wird vier Tage bei Raumtemp. gerührt, anschließend *DMF* im Hochvak. abdestilliert und die Restlösung mit Wasser verrührt. Das isolierte Produkt wird 2 h mit heißem Methanol digeriert, abfiltriert und getrocknet. Das so erhaltene Tetratriacontapeptid ist im Lösungsmittelsystem *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) mit geringen Mengen Octapeptid verunreinigt. Ausb. 0,230 g (~75% d. Th.).



Aminosäureanalyse:

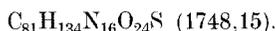
| | Glu | Leu | Gly | Pro | His | Ser | Val | Ala | Asp | Lys |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Ber. | 8 | 4 | 4 | 4 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| Gef. | 8,15 | 3,98 | 3,97 | 4,15 | 0,96 | 1,99 | 0,98 | 1,98 | 2,03 | 1,96 |
| | | | | Trp | Tyr | Phe | | | | |
| | | | | 2 | 1 | 1 | | | | |
| | | | | 1,80 | 1,02 | 1,04 | | | | |

Darstellung der Sequenz 1—20 des Human-Big-Gastrins I

2-Nitrophenylsulfenyl-*O*-tert-butyl-*L*-seryl-*L*-leucyl-*L*-valyl-*L*-alanyl-*L*-asparagyl (β -tert-butylester)-*L*-prolyl-*O*-tert-butyl-*L*-seryl-*N*^t-tert-butylloxycarbonyl-*L*-lysyl-*N*^t-tert-butylloxycarbonyl-*L*-lysyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-prolin [9—20 a]

Eine auf 0 °C gekühlte Lösung von 1,13 g *Nps*-Ser(*But*^t)-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^t)-Pro-OH · ½ H₂O [9—14] in 5 ml *DMF* wird mit 0,18 g *N*-Hydroxysuccinimid und 0,29 g *DCCD* versetzt und 16 h bei 4 °C gerührt. Der Aktivester wird mit Ether gefällt, abfiltriert, mit Ether gewaschen und schließlich zur Lösung von 0,9 g H-Ser(*But*^t)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-OH · H₂O [15—20 b] und 0,14 ml Triethylamin in 10 ml *DMF* gegeben. Das Reaktionsgemisch rührt man drei Tage bei Raumtemp., filtriert vom unlöslichen Material ab und läßt das Filtrat in eine Lösung von 1,7 g Kaliumhydrogensulfat in 200 ml Wasser einfließen. Das ausgefallene Produkt wird abgesaugt, mit Wasser und anschließend mit Ether digeriert und letztlich aus *DMF*/Essigester umgefällt. Schmp. 218 °C (Zers.); $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: —39,5° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —44,0° (*c* = 1, in

DMF). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20): Ausb. 1,54 g (88% d. Th.).



Aminosäureanalyse:

| | Lys | Asp | Ser | Glu | Pro | Gly | Ala | Val | Leu |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Ber. | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Gef. | 1,93 | 1,01 | 2,05 | 1,00 | 2,08 | 0,98 | 0,99 | 0,97 | 1,01 |

L-2-Pyrrolidon-5-carbonyl-*L*-leucyl-glycyl-*L*-prolyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-histidyl(*N*^{im}-adamantylloxycarbonyl)-*L*-prolyl-*O*-tert-butyl-*L*-seryl-*L*-leucyl-*L*-valyl-*L*-alanyl-*L*-asparagyl(β-tert-butylester)-*L*-prolyl-*O*-tert-butyl-*L*-seryl-*N*^ε-tert-butylloxy-carbonyl-*L*-lysyl-*N*^ε-tert-butylloxycarbonyl-*L*-lysyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-prolin [I—20 a]

Zu einer auf 0°C gekühlten Lösung von 1,22 g *Nps*-Ser(*Bu*^t)-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^t)-Pro-Ser(*Bu*^t)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-OH [9—20 a] in 50 ml *DMF* werden unter Rühren innerhalb 30 min 0,54 ml (2,58 *N*) methanol. Chlorwasserstoff in 10 ml absol. Methanol zugetropft. Nach 2 h Rühren bei Raumtemp. wird die Lösung eingeeengt und mit Ether versetzt. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit Ether digeriert und getrocknet. Das erhaltene Produkt [9—20 b] ist chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20). Ausb. 0,99 g (87% d. Th.). 0,7 g <Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-His(*Adoc*)-Pro-OH [1—8 c] in 5 ml *DMF* werden bei 0°C mit 0,1 g *N*-Hydroxysuccinimid und 0,16 g *DCCD* versetzt und über Nacht bei 4°C gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vak. abgedampft und der Rückstand mit Ether verrieben. Der rohe Aktivester wird in 20 ml *DMF* mit 0,82 g [9—20 b] und 0,14 ml Triethylamin versetzt und bei Raumtemp. drei Tage gerührt. Man filtriert vom unlöslichen Material ab und läßt das Filtrat in eine Lösung von 75 mg Kaliumhydrogensulfat in 100 ml Wasser einfließen. Der Niederschlag wird abgesaugt, sorgfältig mit Wasser gewaschen und schließlich aus *DMF*/Essigester umgefällt. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: —42,1° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —50,8° (*c* = 1, in *DMF*). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1); Ausb. 0,88 g (69% d. Th.).



Aminosäureanalyse:

| | Lys | His | Asp | Ser | Glu | Pro | Gly | Ala | Val | Leu |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Ber. | 2 | 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 3 | 1 | 1 | 2 |
| Gef. | 1,95 | 0,91 | 1,01 | 2,08 | 2,80 | 3,85 | 2,94 | 0,99 | 0,95 | 1,88 |

Literatur

- 1 Vorläufige Mitteilung: E. Wünsch, G. Wendlberger, A. Hallett, E. Jaeger, S. Knof, L. Moroder, R. Scharf, P. Thamm und L. Wilschowitz, *Z. Naturforsch.* **32c**, 495 (1977).
- 2 a) 1. Mitt.: G. Wendlberger, L. Moroder, A. Hallett und E. Wünsch, *Mh. Chem.* **110**, 1301 (1979); b) 2. Mitt.: G. Wendlberger, L. Moroder, P. Thamm, L. Wilschowitz und E. Wünsch, *Mh. Chem.* **110**, 1317 (1979).

- ³ R. A. Gregory und H. J. Tracy, in: *Gastrointestinal Hormones* (J. C. Thomson, Hrsg.), S. 13. Austin: University of Texas Press. 1975.
- ⁴ E. Wünsch und F. Drees, *Chem. Ber.* **99**, 110 (1966).
- ⁵ F. Weygand, D. Hoffmann und E. Wünsch, *Z. Naturforsch.* **21 b**, 426 (1966).
- ⁶ E. Wünsch und F. Drees, *Chem. Ber.* **100**, 816 (1967).
- ⁷ E. Wünsch und K. H. Deimer, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353**, 1246 (1972).
- ⁸ E. Wünsch und K. H. Deimer, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353**, 1255 (1972).
- ⁹ L. Moroder, F. Drees, E. Jaeger und E. Wünsch, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 147 (1978).
- ¹⁰ W. König und R. Geiger, *Chem. Ber.* **103**, 788 (1970).
- ¹¹ G. Wendlberger, Diskussionsbeitrag, in: *Peptides 1976* (A. Loffet, Hrsg.), S. 60. Editions de l'Université de Bruxelles. 1976.
- ¹² E. Jaeger, L. Moroder, M. Gemeiner, S. Knof, R. Scharf und E. Wünsch, in Vorbereitung.
- ¹³ H. Matsubara und R. M. Saraki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **35**, 175 (1969).