

Synthese einer Partialsequenz aus dem aktiven Zentrum der Streptokokken-Protease (EC 3.4.22.10), IV

Synthesis of a Fragment of the Active Center of the Streptococcal Proteinase, IV

Eugen Schaich und Friedhelm Schneider

Physiologisch-chemisches Institut, Universität Marburg

(Z. Naturforsch. **29 c**, 457 – 463 [1974] ; eingegangen am 22. März 1974)

Streptococcal-Proteinase, Active Center-Peptide, Peptide Synthesis

The synthesis of the protected peptide Boc-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-N₂H₃(OH) is described. This peptide is a fragment of an active center sequence of the streptococcal proteinase (EC 3.4.22.10) containing the essential SH-group of the enzyme.

In der I. – III. Mitteilung dieser Reihe^{1–3} berichteten wir über die Synthese von Bruchstücken einer Partialsequenz der Streptokokken-Protease (EC 3.4.22.10) bestehend aus den 27 Aminosäuren Val-Lys-Pro-Gly-Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-Glu-Ala-
1 10
Ala-Thr-Gly-His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-Gln-
20

Ile-Met-Lys.
27

Die in den vorangehenden Arbeiten beschriebenen Synthesen führten zu den geschützten Peptiden 1 – 10 und 11 – 15. Wir berichten in der vorliegenden Mitteilung über die Synthese des geschützten Hexapeptids His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala, das die Aminosäuren 16 – 21 umfaßt (Fragment V). Das angestrebte Ziel dieser Arbeiten haben wir in l. c. 1 ausführlich besprochen.

Synthese des Fragments V: His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala

Die Sequenz wurde zunächst (s. Schema I) von Ala-OMe × HCl⁵ ausgehend schrittweise aufgebaut mit Z-Thr⁵ (DCCI/HOBt), Z-Ala-ONp⁶, Z-Val ONp. Die hydrogenolytische Abspaltung des Z-Restes auf der Dipeptidstufe war kritisch, als Nebenprodukt konnte hier Cyclo-Thr-Ala isoliert werden. Bereits das geschützte Tetrapeptid war nur noch in heißem DMF löslich, ließ sich jedoch in Methanol/Eisessig

von der Z-Schutzgruppe befreien, da der freie Peptidester in dem Lösungsmittelgemisch löslich ist. Die anschließende Umsetzung mit Boc-Cys(MBzl)-ONp⁸ verlief reibungslos. Das erhaltene geschützte Pentapeptid 16 – 21 ist sehr schwer löslich, während das entsprechende Peptidtrifluoracetat aus Äthanol umkristallisierbar ist. Während der Behandlung mit TFA färbte sich die Lösung blaßrot; im umkristallisierten freien Peptid ließ sich mit Nitroprussidnatrium kein freies SH nachweisen. Die Anknüpfung des Histidins geschah auf drei Wegen: über Boc-his-azid⁹, Boc-his(Boc)-ONp¹⁰ sowie Boc-(His)-ONp¹¹. Nur das Boc-azid lieferte auf Anhieb ein einheitliches Produkt, während bei den beiden anderen Histidinderivaten die Imidazolschutzgruppen während der Synthese bzw. Aufarbeitung z. T. abgespalten wurden. Für die weitere Verarbeitung entstanden daraus keine Nachteile, da bei der anschließenden Hydrazinolyse aus allen drei Peptiden dasselbe, am Imidazol ungeschützte Peptidhydrazid erhalten wurde. Anstelle der p-Methoxybenzylgruppe wurde auch die S-Äthylgruppe¹² als SH-Schutz getestet. Die Löslichkeit des Endproduktes konnte dadurch nicht verbessert werden, außerdem stellte sich heraus, daß diese Schutzgruppe gegen Hydrazinolyse nicht ausreichend beständig ist.

Eine parallel laufende Synthese, ausgehend von Ala-ONB × HBr¹³ und schrittweiser Kupplung von Boc-Thr¹⁴ (DCCI/HOBt), Boc-Ala-ONp¹⁵ und Boc-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Fr. Schneider, Physiologisch-chemisches Institut der Universität, D-3550 Marburg, Lahnberge.

Abkürzungen: Boc, *tert*-butyloxycarbonyl; DCCI, Dicyclohexylcarbodiimid; DCHA, Dicyclohexylamin; DMF, Dimethylformamid; HOBt, 1-Hydroxybenzotriazol; MBzl, *p*-Methoxybenzyl; OMe, Methylester; ONp, *p*-Nitrophenylester; ONB, *p*-Nitrobenzylester; TAA, Triäthylamin; SEt, S-Äthyl; TFA, Trifluoressigsäure; Tos, Tosyl; Z, Benzyloxycarbonyl.

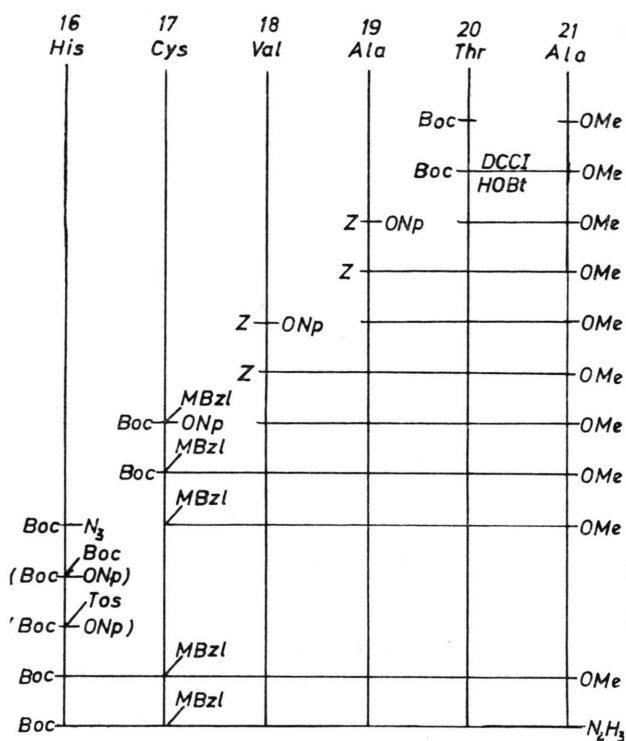


Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

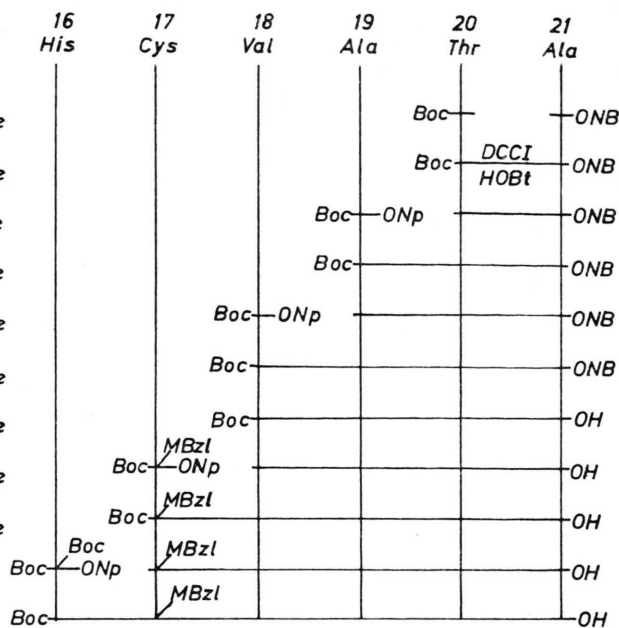
This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.



SYNTHESESCHEMA I .

Val¹⁴(DCCI/HOBt) führte zwar zu einem wesentlich besser löslichen geschützten Tetrapeptidester, auf dieser Stufe mußte jedoch die Carboxylschutzgruppe hydrogenolytisch abgespalten werden. Die Verknüpfung von Boc-Cys(MBzl)-ONp⁸ mit dem Tetrapeptid in DMF/Wasser verlief schlecht reproduzierbar, auch ein Kupplungsversuch in 5-prozentiger NaHCO₃-Lösung nicht besser; es wurde aber ein einheitliches Produkt erhalten. Das Problem verstärkte sich bei der anschließenden Kupplung von Boc-His(Boc)-ONp¹⁰ oder Boc-His(Tos)-ONp an das freie Pentapeptid. Die erhaltene geschützte Hexapeptidsäure ist ebenfalls schwer löslich. Man erhält ein Produkt, in dem der Imidazolschutz z. T. abgespalten ist, wie die Dünnschichtchromatogramme zeigen. Die Aminosäureanalyse des Peptids ist gut. Für die weitere Verarbeitung ist die teilweise Abspaltung der Imidazolschutzgruppe kein Hindernis. Nach Behandlung mit TFA verhält sich das S-geschützte Peptid bei der chromatographischen Prüfung einheitlich.



SYNTHESE-SCHEMA II .

Beschreibung der Versuche

Allgemeines

Die Ausbeuten beziehen sich, wenn nicht anders vermerkt, auf das gereinigte Produkt mit den angegebenen physikalischen Daten. Die Schmelzpunkte wurden mit dem Gerät nach Dr. Tottoli bestimmt. Optische Drehungen mit dem Polarimeter 141 (Perkin-Elmer). Die Elementaranalysen wurden von Frau Dr. A. M. Fretzdorff, Tübingen, Physiolog.-chem. Institut, sowie im Analytischen Labor Robert Glier, Röhlein über Schweinfurt, durchgeführt. Für die Dünnschichtchromatogramme wurden mit Kieselgel SIF beschichtete Aluminiumfolien der Firma Riedel de Haen, Hannover, benutzt. Als Laufmittel dienten:

I. *n*-Butanol/Eisessig/Wasser = 4:1:1; II. *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser = 30:20:6:24; III. *n*-Butanol/Eisessig/Methanol/Pyridin/Methylchlorid/Wasser = 4:1:1:1:2:1; IV. Propanol/Ammoniak/Wasser = 6:3:1; V. Chloroform/Eisessig = 9:1; VI. Chloroform/Cyclohexan/Eisessig = 45:45:10; VII. Diisopropyläther/Chloroform/Eisessig = 6:3:1.

Sprühreagenzien waren Ninhydrin (5-prozentig in Butanol/2 N Essigsäure 95:5), Chlor-Tolidin¹⁶, Pauly Reagenz¹⁷ (Diazosulfanilsäure) für histidin-haltige Peptide. Schwerlösliche Verbindungen wurden zur Chromatographie in Trifluoräthanol gelöst.

Wegen seiner guten Lösungseigenschaften und seines rel. niedrigen Siedepunktes eignet es sich wesentlich besser zum Auftragen als DMF.

Synthesen

Z-Thr-Ala-OMe

50,6 g Z-Thr⁵ (0,2 mol) und 28 g Ala-OMe x HCl⁵ (0,2 mol) wurden in 750 ml Methylenchlorid suspendiert, bei 0 °C gab man 28 ml (0,2 mol) TAA zu und dann 41 g (0,2 mol) DCCI. Man ließ über Nacht auf Zimmertemperatur kommen, saugte vom Dicyclohexylharnstoff ab, wusch die org. Phase mit NaHCO₃-Lösung (5-prozentig), Citronensäurelösung (5-prozentig) und Wasser. Nach Trocknen und Einengen kristallisierte das Produkt aus Essigester/Petroläther. Es wurde umkristallisiert aus Essigester/Petroläther und Äthanol/Petroläther.

Ausbeute: 48 g (70%). Schmelzpunkt 126 – 128 °C. $[\alpha]_D^{24} = -33,6^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC: V, VI, VII einheitlich.

C₁₆H₂₂N₂O₆ (338,4)

Ber. C 56,79 H 6,56 N 8,28,

Gef. C 56,50 H 6,53 N 8,22.

Der Ansatz kann auch in DMF durchgeführt werden. Die Aufarbeitung erfolgt dann durch Eingießen der vom Dicyclohexylharnstoff befreiten DMF-Lösung in kalte gesättigte NaCl-Lösung. Dabei fällt das Produkt aus. Endausbeute ebenfalls 70%.

Thr-Ala-OMe x CH₃COOH

33,8 g Z-Thr-Ala-OMe (0,1 mol) wurden in 250 ml Methanol mit 8 ml Eisessig hydrogenolytisch mit Pd/Aktivkohle gespalten. Nach Filtration und Abziehen des Lösungsmittels wurde das erhaltene Öl sofort weiterverarbeitet, da sonst Cyclisierung eintrat (Cyclo-Thr-Ala, Schmelzpunkt 248 – 250 °C).

Z-Ala-Thr-OMe

Das oben erhaltene Öl wurde in 150 ml DMF gelöst und mit 34,4 g Z-Ala-ONp⁶ (0,1 mol) sowie 14 ml TAA (0,1 mol) versetzt. Nach 24 Stunden Stehen bei 0 °C und 24 Stunden bei Zimmertemperatur wurde das Produkt isoliert durch Eingießen in kalte gesättigte Kochsalzlösung. Nach Absaugen und Waschen mit Wasser wurde der noch feuchte Filterkuchen in Essigester gelöst, wie üblich mit NaHCO₃-Lösung, Citronensäurelösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingengt. Kristallisation erfolgte aus Methanol/Äther/Petroläther.

Ausbeute: 30 g (75%). Schmelzpunkt 174 – 176 °C. $[\alpha]_D^{24} = -49,5^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC: V, VI, VII einheitlich.

C₁₉H₂₇N₃O₇ (409,5)

Ber. C 55,23 H 6,65 N 10,26,

Gef. C 55,28 H 6,66 N 10,09.

Ala-Thr-Ala-OMe x CH₃COOH

40,9 g Z-Ala-Thr-Ala-OMe (0,1 mol) wurden in 600 ml Methanol + 10 ml Eisessig mit Pd/Aktivkohle hydriert. Nach Abfiltrieren und Einengen zur Trockne wurde in 700 ml kochendem Äthanol unter Zusatz von einigen ml Wasser gelöst und mit Äther bis zur beginnenden Kristallisation versetzt.

Ausbeute: 30 g (90%). Schmelzpunkt 176 – 178 °C. $[\alpha]_D^{24} = -21,5^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC: I, II, III einheitlich.

C₁₃H₂₅N₃O₇ (335,4)

Ber. C 46,56 H 7,51 N 12,52,

Gef. C 45,80 H 7,52 N 12,07.

Z-Val-Ala-Thr-Ala-OMe

35,5 g Ala-Thr-Ala-OMe x CH₃COOH (0,1 mol) und 37,2 g Z-Val-ONp⁷ (0,1 mol) wurden in 750 ml DMF suspendiert und bei 0 °C mit 14 ml TAA (0,1 mol) versetzt. Man rührte 36 Stunden, wobei nach 8 Stunden Zimmertemperatur erreicht wurde. Schließlich goß man die Suspension in 1,5 l Eiswasser, saugte ab, wusch mit Wasser nach und trocknete bei 50 °C im Vakuum über CaCl₂. Anschließend wurde mehrfach mit Methanol ausgekocht.

Ausbeute: 41 g (80,7%). Schmelzpunkt 242 – 244 °C, $[\alpha]_D^{24} = -15,4^\circ$ ($c = 1$, DMF). DC: I, II, III, einheitlich.

C₂₄H₃₆N₄O₈ (508,6)

Ber. C 56,68 H 7,13 N 11,02,

Gef. C 56,70 H 7,21 N 10,41.

Val-Ala-Thr-Ala-OMe x CH₃COOH

10,2 g (0,02 mol) Z-Val-Ala-Thr-Ala-OMe wurden in 300 ml Methanol/Eisessig (2:1) mit Pd/Aktivkohle decarboxyliert. Nach Filtrieren und Einengen wurde umkristallisiert aus Methanol/Äther/Petroläther.

Ausbeute: 8 g (84%). Schmelzpunkt 178 – 181 °C zers. $[\alpha]_D^{24} = -48,3^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC: I, II, III einheitlich.

C₁₈H₃₄N₄O₈ (434,5)

Ber. C 49,76 H 7,88 N 12,89,

Gef. C 49,21 H 7,77 N 12,76.

Boc-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe

8,4 g (0,02 mol) Val-Ala-Thr-Ala-OMe x CH₃COOH und 9,2 g (0,02 mol) Boc-Cys(MBzl)-ONp⁸ wurden in 300 ml DMF von 0 °C gelöst und mit 2,8 ml TAA versetzt. Nach 12 Stunden bei 0 °C und 24 Stunden bei Zimmertemperatur wurde in 1,2 l Eiswasser eingerührt. Der sich bildende Niederschlag wurde abgetrennt, mit Wasser und 1 N NH₄OH-Lösung gut ausgewaschen und 2-mal mit Methanol ausgekocht.

Ausbeute: 11,5 g (82%). Schmelzpunkt 237 – 239 °C. $[\alpha]_D^{24} = -27,8$ ($c = 1$, DMF). DC: I, II, III einheitlich.

$C_{32}H_{51}N_5O_{10}S$ (697,9)

Ber. C 55,07 H 7,37 N 10,03 S 4,59,
Gef. C 54,96 H 7,39 N 9,95 S 4,35.

Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe
x TFA

14 g (0,02 mol) Boc-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe wurden eine halbe Stunde lang mit 50 ml Trifluoressigsäure unter Feuchtigkeitsausschluß gerührt. Das Peptid ging langsam in Lösung, die sich dabei leicht rötlich färbte. Nach Einengen wurde mit abs. Äther verrieben und das feste weiße Produkt aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 11,5 g (84%). Schmelzpunkt 201 – 203 °C. $[\alpha]_D^{24} = -38,1$ ($c = 1$, Methanol). DC: I, II, III einheitlich.

$C_{29}H_{44}F_3N_5O_{10}S$ (711,7)

Ber. C 48,94 H 6,23 N 9,84 S 4,52,
Gef. C 48,57 H 6,11 N 9,75 S 4,39.

Boc-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe

a. Bereitung der Carboxylkomponente

8,1 g (0,015 mol) Boc-His- N_2H_3 ⁹ wurden in 30 ml 2 N HCl gelöst, auf –5 °C abgekühlt und bei dieser Temperatur langsam mit einer Lösung von 2,1 g Natriumnitrit in 15 ml Wasser versetzt. Unter Schütteln hielt man noch 5 min bei 0 bis –5 °C, überschüttete mit 100 ml gekühltem Essigester und gab 30 ml 50-prozentige Kaliumcarbonat-Lösung auf einmal hinzu. Man schüttelte gut durch, trennte die Essigesterphase ab, schüttelte noch 2-mal mit Essigester aus und trocknete die vereinigten Essigesterazüge in der Kälte 10 min über Natriumsulfat.

b. Bereitung der Aminosäurekomponente und Kupplung

7,1 g (0,01 mol) Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe x TFA wurden in 150 ml DMF von –5 °C gelöst und mit 1,4 ml (0,01 mol) TAA versetzt. Unter Rühren filtrierte man zu dieser Lösung die Essigester-Lösung von Boc-His-azid hinzu. Man rührte 24 Stunden bei 0 °C und 24 Stunden bei Zimmertemperatur. Nach 1 Stunde begann der Ansatz sich zu trüben. Schließlich wurde der Essigester im Vakuum abgezogen und die klare DMF-Lösung mit 1 l Äther versetzt, wobei das Produkt ausfiel. Nach einigen Stunden im Eisbad wurde abgesaugt, der Niederschlag mehrfach mit Äther und schließlich mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt enthielt noch Spuren nicht umgesetzter Aminosäurekomponente. Es wurde umgefällt aus Äthanol/Äther.

Ausbeute: 6,5 g (79%). Schmelzpunkt 214 – 215 °C. $[\alpha]_D^{24} = -31,2$ ($c = 0,5$, DMF). DC: I, II, III einheitlich.

$C_{38}H_{58}N_8O_{11}S$ (835,0)

Ber. C 54,54 H 7,00 N 13,41 S 3,84,
Gef. C 54,08 H 7,05 N 13,13 S 3,77.

Aminosäureanalyse:

	His	Cys	Val	Ala	Thr
Ber.	1	1	1	2	1
Gef.	0,98	n. b.	0,98	2,00	0,94

Boc-His(Boc)-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe

7,1 g (0,01 mol) Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe x TFA wurden in 250 ml DMF von 0 °C gelöst, mit 4,8 g (0,01 mol) Boc-His(Boc)-ONp¹⁰ sowie 1,4 ml TAA (0,01 mol) versetzt und 12 Stunden bei 0 °C und 24 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten. Dann wurde in 1 l kalte gesättigte NaCl-Lösung eingegossen, wobei das Produkt ausfiel. Nach Absaugen und Waschen mit Wasser wurde in 600 ml heißem Äthanol aufgenommen. Beim Abkühlen fiel das Produkt als Gallerte an. Durch Zugabe von Wasser erreichte man, daß es sich besser absaugen ließ.

Ausbeute: 7,2 g. DC: jeweils 2 Flecken in den Systemen I, II, III, IV, die sowohl Pauly-positiv als auch Ninhydrin- und Chlor/Tolidin-positiv sind. Durch Vergleich mit Boc-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe ergab sich, daß es sich um ein Gemisch von imidazol-geschütztem und -freiem Peptid im ungefähren Verhältnis 2:1 handelt.

$C_{43}H_{66}N_8O_{13}S$ (934)

Boc-His(Tos)-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe

Die Durchführung der Synthese erfolgte analog zum voranstehenden Peptid aus 5,3 g (0,01 mol) Boc-His(Tos)-ONp¹¹.

Auch hier war im Verlauf der Synthese bzw. Aufarbeitung der Tosylrest z. T. abgespalten worden.

Boc-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala- N_2H_3

4,2 g Boc-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe (0,005 mol) wurden in 150 ml DMF gelöst und mit 2,5 ml Hydrazinhydrat (0,05 mol) 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 8 Stunden begann der Ansatz zu gelieren. Die Aufarbeitung erfolgte durch Eingießen in 800 ml Eiswasser, Einstellen auf pH 7, Kochsalzzugabe und Absaugen des feinen Niederschlags. Nach intensivem Waschen mit Wasser wurde über H_2SO_4 im Vakuum getrocknet. Dabei fiel das Produkt rein an.

Ausbeute: 3,5 g (84,3%). Schmelzpunkt 220 – 222 °C. $[\alpha]_D^{24} = -23,4$ ($c = 0,5$, HMPT). DC:

I, II, III einheitlich

 $C_{37}H_{58}N_{10}O_{10}S \times H_2O$ (853,0)

Ber. C 52,10 H 7,09 N 16,41 S 3,75,

Gef. C 52,03 H 7,21 N 15,99 S 3,89.

Durch Umsetzung von Boc-His(Boc)-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe oder Boc-His(Tos)-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe mit Hydrazinhydrat in DMF erhielt man jeweils dasselbe Peptidhydrazit mit Imidazol-freiem Histidin. Das gleiche gilt für Boc-His(DNP)-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe. Durch Abspaltung der Imidazol-Schutzgruppe färbte sich der Ansatz beim DNP-Derivat tiefrot. Durch Waschen mit Methanol wurde das Produkt auch hier farblos erhalten.

Boc-Cys(SEt)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe

Aus 5 g Boc-Cys(SEt)-DCHA¹² (0,011 mol) wurde durch Behandlung mit Äthylacetat/Citronensäure die freie Verbindung hergestellt und zusammen mit 4,4 g Val-Ala-Thr-Ala-OMe \times TFA (0,01 mol) in 100 ml DMF gelöst. Bei $-10^\circ C$ gab man erst 1,2 ml N-Methylmorpholin (0,01 mol) und dann 2,2 g DCCl (0,011 mol) in 20 ml DMF hinzu. Nach Rühren über Nacht – wobei der Ansatz auf Zimmertemperatur kam – wurde DC-Harnstoff abgetrennt und in 1 l Eiswasser gegossen. Das ausgefallene Produkt wurde gesammelt, gewaschen mit H_2O und aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 4,1 g (64%). Schmelzpunkt $221 - 222^\circ C$. $[\alpha]_D^{24} = -57,4$ ($c = 0,5$, DMF). DC: I, II, III einheitlich.

 $C_{26}H_{47}N_5O_9S_2$ (637,8)

Ber. C 48,96 H 7,43 N 10,98 S 10,21,

Gef. C 48,12 H 7,31 N 10,58 S 10,55.

Boc-Thr-Ala-ONB

80 g Boc-Thr-DCHA¹⁴ (0,2 mol), 60,8 g Ala-ONB \times HBr (0,02 mol) und 35 g HOBt (0,25 mol) wurden in 800 ml DMF suspendiert und bei $0^\circ C$ mit 44 g DCCl (0,21 mol) versetzt. Man ließ unter Rühren über Nacht auf Zimmertemperatur kommen, saugte vom Ungelösten ab, goß in 2 l eiskalte NaCl-Lösung und extrahierte das ausfallende Öl mit Essigester. Anschließend wurde die Essigester-Lösung mit $NaHCO_3$ -Lösung, $KHSO_4$ -Lösung und Wasser ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet, eingeeengt und aus Essigester/Petroläther kristallisiert und umkristallisiert.

Ausbeute: 73 g (87%). Schmelzpunkt $119 - 121^\circ C$. $[\alpha]_D^{24} = -27,0^\circ$ ($c = 1$, Methanol), DC: V, VI, VII einheitlich.

 $C_{19}H_{27}N_3O_8$ (425,5)

Ber. C 53,63 H 6,40 N 9,88,

Gef. C 53,21 H 6,58 N 9,96.

Der Ansatz aus Boc-Thr mit N-Methylmorpholin als Base lieferte bei gleicher Aufarbeitung dasselbe Produkt in einer Ausbeute von 96%.

Thr-Ala-ONB \times HCl

42,5 g Boc-Thr-Ala-ONB (0,1 mol) wurden mit 200 ml 4 N HCl/Dioxan eine halbe Stunde lang behandelt. Nach Einengen verblieb ein schaumiges Produkt, das über KOH/ P_2O_5 getrocknet wurde.

Boc-Ala-Thr-Ala-ONB

Das oben erhaltene Produkt wurde in 300 ml DMF gelöst, mit 31 g Boc-Ala-ONp¹⁵ (0,1 mol) und 14 ml (0,1 mol) TAA versetzt und 24 Stunden bei $0^\circ C$ und 24 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten. Dann wurde in 1,5 l eiskalte gesättigte NaCl-Lösung eingerührt und das sich abscheidende Öl mit Essigester extrahiert. Die Essigesterlösung wurde mit 5-prozentiger $NaHCO_3$ -Lösung, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung extrahiert, getrocknet und eingeeengt. Das resultierende Öl kristallisierte aus Äthanol/Wasser. Es wurde umkristallisiert aus Äthanol/Petroläther.

Ausbeute: 42 g (83%). Schmelzpunkt $86 - 88^\circ C$. $[\alpha]_D^{24} = -41,7^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC: V, VII einheitlich.

 $C_{22}H_{32}N_4O_9$ (496,5)

Ber. C 53,22 H 6,50 N 11,29,

Gef. C 53,39 H 6,65 N 11,04.

Ala-Thr-Ala-ONB \times HCl

25 g Boc-Ala-Thr-Ala-ONB (0,05 mol) wurden mit 200 ml 4 N HCl/Dioxan übergossen. Nach 10 min begann das Produkt auszufallen. Man ließ eine halbe Stunde stehen und zog das Dioxan im Vakuum ab. Der Rückstand wurde aus Äthanol/Äther/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 20,5 g (95%). Schmelzpunkt $134 - 136^\circ C$. $[\alpha]_D^{24} = -29,2$ ($c = 1$, Methanol). DC: I, II, V einheitlich.

 $C_{17}H_{25}ClN_4O_7$ (432,9)

Ber. C 47,17 H 5,82 N 12,95,

Gef. C 46,84 H 5,72 N 12,81.

Boc-Val-Ala-Thr-Ala-ONB

22 g Ala-Thr-Ala-ONB \times HCl (0,05 mol), 11 g Boc-Val¹⁴ (0,05 mol) und 10,5 g HOBt (0,075 mol) wurden in 500 ml DMF aufgeschlämmt und unter Rühren bei $-10^\circ C$ zuerst mit 6 ml N-Methylmorpholin (0,05 mol), dann mit 12 g DCCl (0,052 mol) in 50 ml DMF versetzt ohne Rücksicht darauf, daß keine klare Lösung entstand. Man ließ über Nacht auf Zimmertemperatur kommen, filtrierte vom ausgefallenen Harnstoff ab und goß in 1,5 l eiskalte NaCl-Lösung. Das ausgefallene Produkt wurde abgesaugt und aus Äthanol/Wasser, Essigester und wieder Äthanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 25 g (83%). Schmelzpunkt $168 - 170^\circ C$. $[\alpha]_D^{25} = -51,3$ ($c = 1$, Methanol). DC: I, II, V einheitlich.

$C_{27}H_{41}N_5O_{10}$ (595,7)

Ber. C 54,45 H 6,94 N 11,76,

Gef. C 53,98 H 7,02 N 11,68.

Boc-Val-Ala-Thr-Ala-OH

12 g Boc-Val-Ala-Thr-Ala-ONB (0,02 mol) wurden in Methanol mit Pd/Aktivkohle hydriert. Nach Einengen und Aufnehmen in Äthanol wurde das Produkt mit Petroläther langsam ausgefällt. Es bildete sich ein flockiger, brauner Niederschlag. Zur Reinigung wurde in 150 ml 5-prozentiger $NaHCO_3$ -Lösung aufgenommen, die mit Äthylacetat 3-mal extrahiert und dann vorsichtig bei 0 °C mit $KHSO_4$ (5-prozentig) angesäuert. Dabei fiel das Produkt aus. Es wurde abfiltriert, mit Eiswasser gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 6,6 g (72%). Schmelzpunkt 134–137 °C. $[\alpha]_D^{24} = -9,4$ ($c = 1$, DMF). DC: I, II, III, V einheitlich.

$C_{20}H_{36}N_4O_8$ (460,5)

Ber. C 52,16 H 7,88 N 12,16,

Gef. C 51,87 H 8,05 N 11,70.

Val-Ala-Thr-Ala-OH x TFA

4,6 g Boc-Val-Ala-Thr-Ala (0,01 mol) wurden mittels 20 ml TFA wie üblich deacyliert. Nach Einengen und Verreiben mit abs. Äther hinterblieb ein weißes Produkt. Es wurde zur Reinigung mit Aceton ausgekocht.

Ausbeute: 4,5 g (94%). Schmelzpunkt 197–199 °C zers. $[\alpha]_D^{24} = -55,7$ ($c = 1$, H_2O). DC: I, II, III einheitlich.

$C_{17}H_{29}F_3N_4O_8$ (475,5)

Ber. N 11,81,

Gef. N 11,58.

Boc-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OH

4,7 g Val-Ala-Thr-Ala-OH x TFA (0,01 mol) löste man in 100 ml DMF, dann gab man bei 0 °C langsam 2,8 ml TAA (0,02 mol) unter Rühren hinzu. Dabei fiel das Tetrapeptid in Form einer gelatinösen Masse aus. Man brachte es durch Zugabe von einigen ml Wasser wieder in Lösung. Dann gab man 4,6 g Boc-Cys(MBzl)-ONp⁸ (0,01 mol), gelöst in 25 ml DMF hinzu. Dabei fiel der eingesetzte p-Nitrophenylester zum Teil wieder aus. Es wurde zunächst im Eisbad gerührt, nach 1–2 Stunden gab man erneut so viel DMF hinzu, bis eine klare Lösung entstand. Dann ließ man unter Rühren auf Zimmertemperatur kommen und rührte noch 24 Stunden weiter. Schließlich wurde der Ansatz in 1 l Eiswasser gegossen, mit $KHSO_4$ -Lösung auf pH 3,5 gebracht und das ausfallende Produkt abgesaugt und mit H_2O neutral gewaschen. Das noch feuchte Material wurde erst aus Äthanol, dann aus DMF/Äthanol umgefällt. Die angegebene Ausbeute wurde nur erreicht, wenn die Komponenten des Ansatzes gelöst waren.

Ausbeute: 5,4 g (79%). Schmelzpunkt 216–217 °C. $[\alpha]_D^{24} = -21,4$ ($c = 1$, DMF), DC: I, II, III einheitlich.

$C_{31}H_{49}N_5O_{10}S$ (683,8)

Ber. C 54,45 H 7,22 N 10,24 S 4,68,

Gef. C 53,61 H 7,04 N 10,06 S 4,63.

Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala x TFA

6,8 g Boc-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala wurden mittels 50 ml TFA entacyliert. Nach Einengen und Verreiben mit abs. Äther erhielt man das Peptid Trifluoracetat als weißes Pulver. Es konnte aus Äthanol/Äther umgefällt werden, fiel dabei aber zunächst gallertig an. Durch Waschen mit Äther erhielt man schließlich ein lockeres Pulver.

Ausbeute: 6,5 g (94%). Schmelzpunkt 197–199 °C. $[\alpha]_D^{24} = -32,5$ ($c = 1$, Methanol). DC: I, II, III, IV einheitlich.

$C_{28}H_{42}F_3N_5O_{10}S$ (697,7)

Ber. N 10,00 S 4,59,

Gef. N 10,12 S 4,86.

Boc-His(Boc)-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OH

10,5 g Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala x TFA (0,015 mol) wurden in 200 ml DMF gelöst. Nach Zugabe von 4,2 ml TAA erhielt man einen gallertigen Niederschlag, man gab 7,5 g Boc-His(Boc)-ONp¹⁰ (0,016 mol) in 50 ml DMF hinzu und rührte heftig bei 0 °C. Nach 2 Stunden gab man soviel H_2O zu, daß eine fast klare Lösung entstand. Man rührte über Nacht bei 0 °C und 24 Stunden bei Zimmertemperatur, goß in Eiswasser ein, säuerte auf pH 4 an mit $KHSO_4$ -Lösung und saugte den feinen Niederschlag ab. Nach Trocknen wurde er in heißem DMF gelöst und durch Zugabe von Äthanol und etwas Äther gefällt.

Ausbeute: 10 g. DC: I, II, III, IV, V. 2 Banden mit Pauly, Ninhydrin und Chlor-Tolidin, offensichtlich handelte es sich um ein Gemisch aus imidazolfreiem und imidazolgeschütztem Peptid.

$C_{42}H_{64}N_8O_{13}S$ (920)

Aminosäureanalyse:

	His	Cys	Val	Ala	Thr
Ber.	1	1	1	2	1
Gef.	0,99	n. b.	0,97	2,00	0,96

nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppen mit TFA erhielt man ein einheitliches Produkt.

$C_{32}H_{48}N_8O_9S$ x 2 TFA (948,9)

Ber. C 45,45 H 5,31 N 11,81,

Gef. C 44,90 H 5,44 N 11,48.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung der Arbeit im Rahmen des Schwerpunktsprogramm „Synthese makromolekularer Naturstoffe“.

- ¹ E. Schaich u. Fr. Schneider, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., im Druck.
- ² E. Schaich u. Fr. Schneider, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., im Druck.
- ³ E. Schaich u. Fr. Schneider, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., im Druck.
- ⁴ T. Y. Liu, W. H. Stein u. S. Moore, J. Biol. Chem. **240**, 1143 [1965].
- ⁵ H. Zahn u. H. Schüssler, Liebigs Ann. Chem. **641**, 176 [1961].
- ⁶ M. Goodman u. K. C. Stueben, J. Amer. Chem. Soc. **81**, 3980 [1959].
- ⁷ W. Grassmann u. E. Wünsch, Chem. Ber. **91**, 462 [1958].
- ⁸ M. Bodansky u. V. Du Vigneaud, J. Amer. Chem. Soc. **81**, 2505 [1959].
- ⁹ E. Schröder u. H. Gibian, Liebigs Ann. Chem. **656**, 190 [1962].
- ¹⁰ E. Schnabel, H. Herzog, P. Hoffmann, E. Klauke u. I. Ugi, Liebigs Ann. Chem. **743**, 57 [1968].
- ¹¹ E. Schaich, A. M. Fretzdorff u. Fr. Schneider, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **354**, 897 [1973].
- ¹² U. Weber u. P. Hartter, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **351**, 1384 [1970].
- ¹³ W. K. Park, R. R. Smeby u. F. M. Bumpus, Biochemistry **6**, 3458 [1967].
- ¹⁴ E. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. **702**, 188 [1967].
- ¹⁵ K. Hofmann, R. Schmiechen, R. D. Wells, Y. Wohnan u. U. Yanaihara, J. Amer. Chem. Soc. **87**, 611 [1965].
- ¹⁶ F. Reindel u. W. Hoppe, Chem. Ber. **87**, 1103 [1954].
- ¹⁷ H. Pauly, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **42**, 517 [1904].