

Synthese einer Partialsequenz aus dem aktiven Zentrum der Streptokokken-Proteinase (EC 3.4.22.10), IX

Synthesis of a Fragment of the Active Center of the Streptococcal Proteinase (EC 3.4.22.10), IX

Andreas Raschig und Friedhelm Schneider

Physiologisch-Chemisches Institut, Universität Marburg

(Z. Naturforsch. 31 c, 418–423 [1976]; eingegangen am 24. März 1976)

Streptococcal Proteinase, Active Center Peptide, Peptide Synthesis

The synthesis of the protected pentapeptide *tert*-butyloxycarbonyl-Gln-Ile-Met-Lys(X)-Gly-*p*-nitrobenzylester (X = benzyloxycarbonyl, 3-chlor-benzyloxycarbonyl) which is part of the carboxylend of a partial sequence of the active center of the streptococcal proteinase is described. Side reactions are observed if the *tert*-butyloxycarbonyl-protective group is cleaved by trifluoroacetic acid, not with HCl/dioxane. Obviously the presence of methionine is responsible for the formation of by products. Formation of methioninesulfoxide or *tert*-butylsulfoniummethionine could not be proved. *tert*-butyloxycarbonyl-Gln-1-hydroxybenzotriazolylester was obtained in a crystalline state from the reaction of *tert*-butyloxycarbonyl-Gln, dicyclohexylcarbodiimid and 1-hydroxybenzotriazol.

Unsere bisherigen Versuche^{1–8} zur klassischen Synthese einer Partialsequenz aus dem aktiven Zentrum der Streptokokken Proteinase bestehend aus den 27 Aminosäuren

Val-Lys-Pro-Gly-Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-1 10

Ala-Thr-Gly-His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-Gln-20

Ile-Met-Lys 27

führten zu einem geschützten Tricosapeptid 1–23, das im Prinzip den Weg zum Aufbau der Gesamtsequenz eröffnet⁸. Dieses „active-center-peptide“, das die essentielle SH-Gruppe des Enzyms enthält, soll als weitere Modellverbindung zum Studium des Mechanismus SH-abhängiger hydrolytischer Enzyme dienen, mit denen wir uns seit längerem befassen^{9–15}.

Die vorliegende Arbeit hat einige Probleme zum Gegenstand, die sich bei der Synthese des carboxylendständigen Tetrapeptids Gln-Ile-Met-Lys im Hin-

blick auf die Wahl der ϵ -Aminoschutzgruppe des Lysins und des Schutzes des Carboxylendes ergaben und ihre Hauptursache in Löslichkeitsschwierigkeiten größerer Bruchstücke haben, die beim Aufbau der Gesamtsequenz vom Carboxylende her auftraten. So war bereits das Hexapeptidamid 22–27 Boc-Thr-Ala-Gln-Ile-Met-Lys(Z)-NH₂ in allen Lösungsmitteln praktisch unlöslich und konnte daher nicht weiterverarbeitet werden⁵. Obwohl der entsprechende Methylester günstigere Löslichkeitseigenschaften besaß, war eine Esterschutzgruppe für die Synthese der Gesamtsequenz nicht geeignet, da eine alkalische Verseifung auf einer Zwischenstufe oder am Ende der Synthese vermieden werden sollte. Nachdem wir bei der Synthese des geschützten Tricosapeptids im Hinblick auf die Löslichkeitseigenschaften der Zwischenstufen gute Erfahrungen mit dem *p*-Nitrobenzylester gemacht hatten, war es naheliegend auch für den Carboxylschutz des carboxylendständigen Peptids der Gesamtsequenz denselben Ester einzusetzen⁸. Die Synthese eines Boc-Lys(X)-ONB-Derivates (X = Z; 3-Cl-Z) nach dem allgemeinen Verfahren für Aminosäure-*p*-Nitrobenzylester^{16, 17} verlief jedoch mit so schlechten Ergebnissen, daß wir uns entschlossen, zunächst das Carboxylende um Glycin zu verlängern und die Sequenz Boc-Gln-Ile-Met-Lys(X)-Gly-ONB zu synthetisieren. Vorversuche haben gezeigt, daß dieses Carboxylende für eine weitere Verlängerung ausreichend „löslichkeitsvermittelnde“ Eigenschaften besitzt. So fanden

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

Abkürzungen: Boc, *tert*-Butyloxycarbonyl; DC, Dünnschichtchromatogramm; DCCI, Dicyclohexylcarbodiimid; DCH, Dicyclohexylharnstoff; DCHA, Dicyclohexylamin; DMF, Dimethylformamid; HBT, 1-Hydroxybenzotriazol; HMPT, Hexamethylphosphorsäuretriamid; ONB, *p*-Nitrobenzylester; ONp, *p*-Nitrophenylester; TFA, Trifluoressigsäure; TAA, Triäthylamin; Z, Benzyloxycarbonyl; 3-Cl-Z, 3-Chlorbenzyloxycarbonyl.



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.

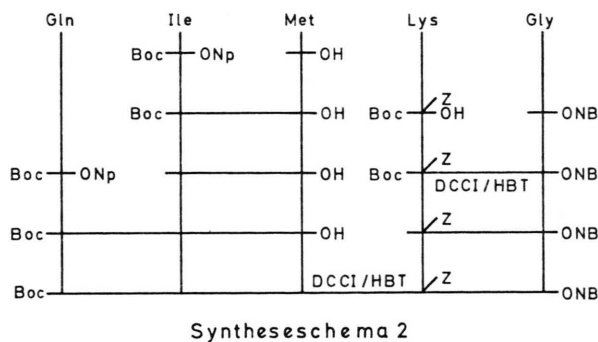
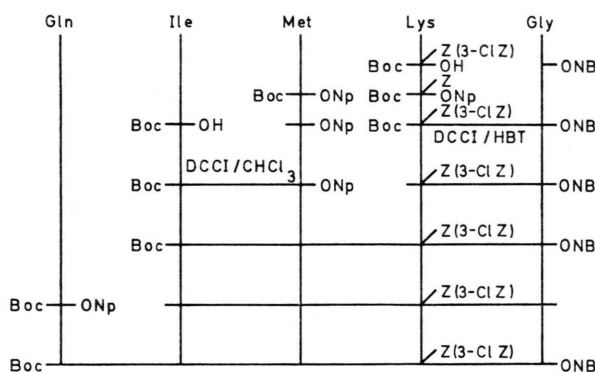
wir¹⁸, daß die geschützte Sequenz 19 – 28 Boc-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-Gln-Ile-Met-Lys(X)-Gly-ONB noch in DMF bzw. siedendem Äthanol löslich und damit als Kupplungskomponente für Verlängerungen am Aminoende geeignet ist.

Als Schutzgruppe für die ϵ -Aminofunktion des Lysins wurden der Z-rest und der 3-Cl-Z-rest, der sich durch eine größere Säurestabilität gegenüber dem Z-rest auszeichnet¹⁹, verwendet. Nach unseren Versuchen waren beide Schutzgruppen gegen eine halbstündige Behandlung mit 4 N HCl/Dioxan bei 20 °C auf allen Stufen der Synthese stabil. Da das geschützte Pentapeptid Boc-Gln-Ile-Met-Lys(X)-Gly-ONB in 4 N HCl/Dioxan nur schlecht löslich war, wurden Abspaltungsversuche der Boc-Schutzgruppe auch in 70 Vol.% TFA/Wasser bzw. 50 Vol.% TFA/Methanol durchgeführt. Dabei wurde bereits nach einer halben Stunde ein zusätzliches neues Reaktionsprodukt neben dem erwarteten in etwa derselben Menge, außerdem weitere Nebenprodukte in geringer Menge chromatographisch nachgewiesen. Sowohl das Z- als auch das 3-Cl-Z-geschützte Peptid zeigten dasselbe Verhalten. Reinigung der Reaktionsmischung durch Umkristallisation oder Umfällen war nicht möglich.

Bei dem Nebenprodukt kann es sich nicht um ein Pyroglutaminsäurederivat handeln, da es ninhydrinpositiv reagiert. Auch eine Abspaltung der ϵ -Aminoschutzgruppe kann nach den Ergebnissen von Schnabel^{19, 20} und Merrifield²¹ ausgeschlossen werden. Da Boc-Met-OH und Boc-Ile-Met-OH bei Behandlung mit TFA ebenfalls zwei Hauptprodukte liefern (mit HCl/Dioxan nicht), muß eine Nebenreaktion am Methionin angenommen werden. Zusatz von Kationenfängern (Anisol) oder Reduktionsmitteln (Dithiothreitol) zu den Abspaltungsansätzen mit TFA konnte die Nebenreaktion nicht verhindern. Wir nehmen daher an, daß weder die Bildung von Methioninsulfoxid noch von *tert*-Butyl-sulfoniummethionin²² für das Auftreten der Nebenprodukte verantwortlich ist. Die Struktur des Nebenproduktes ist noch nicht bekannt, da wir es bisher nicht in reiner Form isolieren konnten. Die acidolytische Abspaltung von Schutzgruppen in methioninhaltigen Peptiden führt bei Verwendung von TFA oder TFA/Wasser zu Nebenprodukten, die man z. B. mit HCl/Dioxan nicht beobachtet. Bei methioninhaltigen Peptiden, die nicht mehr in HCl/Dioxan löslich sind, tritt daher das Problem einer geeigneten Abspaltungsmethode für die Boc-Schutzgruppe auf.

Das geschützte Pentapeptid Gln-Ile-Met-Lys-Gly wurde auf zwei Wegen synthetisiert, die aus Schema 1 und 2 ersichtlich sind.

Das Dipeptid Boc-Lys(Z)-Gly-ONB wurde sowohl über den *p*-Nitrophenylester als auch nach der DCCI/HBT Methode²³ erhalten, wobei im ersten Fall 60%, auf dem zweiten Weg 90% Ausbeute erzielt wurden. Boc-Lys(3-Cl-Z)-Gly-ONB wurde daher nur über DCCI/HBT dargestellt. Die weiteren Kupplungsreaktionen nach Schema 1 mit Boc-Ile-Met-ONP⁶ und Boc-Gln-ONP²⁴ verliefen ohne Schwierigkeiten. Bei der Synthese des Tripeptids Boc-Gln-Ile-Met-OH, das über die *p*-Nitrophenylester mit HBT als Katalysator aufgebaut wurde, trat in der letzten Stufe eine Nebenreaktion auf. Bei Umsetzung von Boc-Gln-ONP mit Ile-Met-OH \times HCl in Gegenwart von äquimolaren Mengen HBT und zwei Äquivalenten Triäthylamin bildet sich ein Nebenprodukt, das beim Ansäuern der alkalischen Lösung zwischen pH 6 und 7 auskristallisiert. Die Elementaranalyse ergab, daß es sich dabei um den Boc-Gln-1-hydroxybenzotriazolester handelt. Der IR-spektroskopische



Nachweis eines Hydroxybenzotriazolesters bei der durch HBT katalysierten Aminolyse eines *p*-Nitrophenylesters wurde bereits von König und Geiger²⁵ geführt.

Im Hinblick auf die Löslichkeit des geschützten Pentapeptids Boc-Gln-Ile-Met-Lys(X)-Gly-ONB sind der Z und 3-Cl-Z-Rest etwa gleichwertig. Zur Abspaltung des Boc-Restes ist das 3-Cl-Z Derivat in 4 N HCl/Dioxan aber etwas besser löslich als das analoge Z-geschützte Peptid. Welche der beiden Schutzgruppen für die Synthese der Gesamtsequenz die geeignetste ist, werden unsere weiteren Experimente zeigen müssen.

Beschreibung der Versuche

Allgemeines

Die angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf das gereinigte Produkt mit den angegebenen physikalischen Daten. Die Schmelzpunkte wurden mit dem Gerät von Dr. Tottoli bestimmt, optische Drehungen mit dem Polarimeter 141 Perkin Elmer. Die Elementaranalysen wurden in der zentralen Analytik des Fachbereichs Chemie der Universität Marburg 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. Chloroform/Cyclohexan/Eisessig = 45:45:10; IV. Propanol/Ammoniak/Wasser = 6:3:1; V. *n*-Butanol/Eisessig/Methanol/Pyridin/Methylchlorid/Wasser = 4:1:1:1:2:1. Schwerlösliche Verbindungen wurden zur Chromatographie in Trifluoräthanol gelöst. Sprühreagenzien waren Ninhydrin (5-prozentig in Butanol/2 N Essigsäure = 95:5); Chlor-Tolidin²⁶, PaulyReagenz²⁷ (Diazosulfanilsäure). Aminosäuren wurden von der Firma Merck bezogen. Aminosäureanalysen wurden mit dem Beckman Unichrom Analysator durchgeführt.

Synthesen

Sequenz 27 – 28, Lys-Gly

Boc-Lys(Z)-Gly-ONB

0,01 M (2,9 g) Gly-ONB \times HBr²⁸ und 0,01 M (6,6 g) Boc-Lys(Z) \times DCHA²⁸ werden zusammen mit 0,012 M (1,6 g) HBT in 80 ml DMF bei 20 °C mit 0,012 M (2,4 g) DCCl in 20 ml DMF versetzt. Nach 10 min wird das Kältebad entfernt und der Reaktionsansatz 8 h gerührt, filtriert und in Eiswasser gegossen. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert, in Essigester aufgenommen, mit 1 N NaHCO₃-, 2 N KHSO₄-Lösung, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen

über Na₂SO₄ wird das Produkt mit Petroläther gefällt und aus Methanol mit Äther und Petroläther umkristallisiert.

DC: I, III, IV einheitlich. Ausbeute 5,2 g (91%). m.p.: 73 – 74 °C. $[\alpha]_D^{24} = -13,5^\circ$ ($c = 1$, DMF).

C₂₈H₃₆N₄O₉ (572,62):

ber.	C 58,73	H 6,34	N 9,78;
gef.	C 59,03	H 6,29	N 9,70.

Boc-Lys(3-ClZ)-Gly-ONB

Dieses Dipeptid wurde analog der obigen Synthesevorschrift aus Boc-Lys(3-ClZ)-OH \times DCHA¹⁹ hergestellt. Die Umsetzung ist auch in Essigester ohne HBT möglich. Das Produkt wird aus Essigester mit Äther vorsichtig gefällt und mit Petroläther nachgefällt.

DC: I, III, IV einheitlich.

Ausbeute: (84%). m.p.: 81 – 83 °C.

$[\alpha]_D^{24} = -9,2^\circ$.

C₂₈H₃₅N₄O₉Cl (607,06)

ber.	C 55,40	H 5,81	N 9,23;
gef.	C 55,61	H 5,87	N 9,24.

Lys(Z)-Gly-ONB \times HCl

0,01 M (5,7 g) Boc-Lys(Z)-Gly-ONB werden 30 min bei Raumtemperatur mit 4 N HCl/Dioxan behandelt und im Vacuum eingedampft. Da das Produkt stark hygroskopisch ist, wurde es nach kurzem Trocknen über P₂O₅ sofort weiterverarbeitet.

DC: I, IV, V einheitlich.

C₂₃H₂₈N₄O₇Cl (507,94).

Lys(3-ClZ)-Gly-ONB \times HCl

Die Abspaltung des Boc-Restes von Boc-Lys(3-ClZ)-Gly-ONB erfolgt wie oben. Das Produkt wurde mit absolutem Äther bis zur Trockene verrieben und aus absolutem Methanol/Äther umkristallisiert. Die Substanz ist hygroskopisch.

DC: I, IV, V einheitlich. m.p.: unscharf, 59 – 70 °C. Ausbeute: (97%). $[\alpha]_D^{24} = +15,2^\circ$ ($c = 1$, DMF).

C₂₃H₂₇N₄O₇Cl₂ (542,40)

ber.	C 50,93	H 5,02	N 10,33;
gef.	C 50,97	H 5,27	N 10,23.

Sequenz 24 – 26, Gln-Ile-Met

Met-ONp \times HCl

0,01 M (3,7 g) Boc-Met-ONp³⁰ werden wie üblich mit 4 N HCl/Dioxan behandelt, eingedampft, mit absolutem Äther zur Trockene verrieben, gewaschen und aus absolutem Methanol mit absolutem Äther gefällt.

DC: I, IV, V einheitlich. m.p.: 136 – 138 °C.

Ausbeute: 2,6 g (86%). $[\alpha]_D^{24} = +40,1^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

$C_{11}H_{15}N_2O_4S$ (306,76)

ber. C 43,07 H 4,93 N 9,13;

gef. C 42,81 H 4,78 N 8,91.

Boc-Ile-Met-ONp

0,01 M (2,3 g) Boc-Ile-OH³¹ und 0,01 M (3,1 g) Met-ONp \times HCl werden in 80 ml Chloroform gelöst und bei -20°C mit 0,01 M (1,4 ml) N-Methylmorpholin und 0,011 M (2,2 g) DCCI in 20 ml Chloroform versetzt. Nach 10 min wird das Kältebad entfernt, der Reaktionsansatz 6 h bei Zimmertemperatur gerührt, der ausgefallene DCH abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Das erhaltene Öl wird in Essigester aufgenommen, mit eisgekühlter 1 N NaHCO_3 - und halbgesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, eingedampft und aus Essigester mit Petroläther umkristallisiert.

DC: I, III, V einheitlich. m.p.: $135-136^\circ\text{C}$.

Ausbeute: 3,5 g (72%). $[\alpha]_D^{24} = -55,7^\circ$ ($c=1$, DMF).

$C_{22}H_{33}N_3O_7S$ (483,58)

ber. N 8,69; gef. N 8,23.

Boc-Ile-Met-OH

0,05 M (7,5 g) Met-OH werden zusammen mit 0,05 M (7,0 ml) TAA in 100 ml DMF bei 0°C suspendiert und mit einer Lösung von 0,05 M (17,6 g) Boc-Ile-ONp²⁹ und 0,05 M (7,0 g) HBT in 100 ml DMF versetzt. Nach drei Tagen wird das nicht umgesetzte Met-OH abfiltriert, das Filtrat in ca. 500 ml Eiswasser eingerührt, die noch alkalische Lösung mit Äther zweimal gewaschen, mit 1 N KHSO_4 unter Eiskühlung auf pH 3 vorsichtig angesäuert und mit Essigester dreimal extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden über Na_2SO_4 getrocknet, eingedampft und das Produkt wird aus Essigester mit Petroläther gefällt.

DC: I, II, IV einheitlich. m.p.: $146-147^\circ\text{C}$.

Ausbeute: 10,6 g (58,5%). $[\alpha]_D^{24} = +5,5^\circ$ ($c=1$, DMF).

$C_{16}H_{30}N_2O_5$ (362,49)

ber. N 7,73; gef. N 7,78.

Ile-Met-OH \times HCl

0,01 M (3,6 g) Boc-Ile-Met-OH werden 30 min bei Zimmertemperatur mit 4 N HCl/Dioxan behandelt, eingedampft und mit absolutem Äther bis zur Trockene verrieben und gewaschen. Die Umkristallisation erfolgte aus absolutem Methanol mit absolutem Äther.

DC: I, IV, V einheitlich. m.p.: $179-181^\circ\text{C}$.

Ausbeute: 2,7 g (91%). $[\alpha]_D^{24} = +3,7^\circ$ ($c=1$, Methanol).

$C_{11}H_{23}N_2O_3S$ (298,83)

ber. N 9,38; gef. N 9,41.

Boc-Gln-Ile-Met-OH

0,01 M (3,0 g) Ile-Met-OH \times HCl und 0,015 M (5,5 g) Boc-Gln-ONp²⁴ werden zusammen mit 0,012 M (1,6 g) HBT in 50 ml DMF gelöst und im Abstand von 16 h zweimal mit je 0,01 M (1,4 ml) TAA versetzt. Die Reaktionsdauer beträgt bei Zimmertemperatur 48 h. Die Lösung wird filtriert, in 600 ml gekühlte 1 N NaHCO_3 -Lösung eingerührt, mit Äther gewaschen und mit 2 N KHSO_4 -Lösung unter Eiskühlung vorsichtig auf pH 3 angesäuert. (Der bei pH 6 bis 7 auskristallisierende Boc-Gln-[1-hydroxybenzotriazol]-ester wird abfiltriert.) Das sich abscheidende Öl wird durch dreifache Extraktion in Essigester aufgenommen. Die vereinigten Extrakte werden mit eisgekühlter, halbgesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Die Umkristallisation erfolgt aus Essigester/Petroläther.

DC: I, IV, V einheitlich. m.p.: $155-158^\circ\text{C}$.

Ausbeute: 3,5 g (72%). $[\alpha]_D^{24} = -16,9^\circ$ ($c=1$, DMF).

$C_{21}H_{38}N_4O_7S$ (490,62)

ber. C 51,47 H 7,81 N 11,42;

gef. C 51,52 H 7,58 N 11,61.

Sequenz 24–28, Gln-Ile-Met-Lys-Gly

Boc-Ile-Met-Lys(Z)-Gly-ONB

6 mM (2,5 g) Lys(Z)-Gly-ONB \times HCl und 5 mM (2,4 g) Boc-Ile-Met-ONp werden zusammen mit 5,5 mM (0,7 g) HBT in 60 ml DMF gelöst, bei 0°C mit 5 mM (0,7 ml) TAA versetzt und bei Zimmertemperatur gerührt. Nach zwei Tagen wird die Lösung filtriert, das Filtrat in Eiswasser eingerührt und das ausfallende Produkt in Essigester aufgenommen. Der Essigesterextrakt wird mit 1 N NaHCO_3 , 2 N KHSO_4 -Lösung und halbgesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, auf ein kleines Volumen eingedampft und das ausfallende Produkt mit Petroläther vollständig ausgefällt. Die Umkristallisation erfolgt aus Äthanol/Äther/Petroläther, danach aus Essigester.

DC: I, II, III, V einheitlich. m.p.: $127-130^\circ\text{C}$.

Ausbeute: 3,8 g (92%). $[\alpha]_D^{24} = -22,0^\circ$ ($c=1$, DMF).

$C_{39}H_{56}N_6O_{11}S$ (816,97)

ber. C 57,34 H 6,91 N 10,29;

Gef. C 57,60 H 6,91 N 10,17.

Boc-Ile-Met-Lys(3-ClZ)-Gly-ONB

Dieses Peptidderivat wird analog der obigen Vorschrift ausgehend von 5 mM (2,7 g) Lys(3-ClZ)-Gly-ONB \times HCl synthetisiert. Die Fällung des Produktes erfolgt durch Einrühren der DMF-Lösung in

Äther. Anschließend wird es aus Methanol und aus Äthanol umkristallisiert.

DC: I, II, III, V einheitlich. m.p.: 130–132 °C.

Ausbeute: 7,4 g (98%). $[\alpha]_D^{24} = +1,6^\circ$ ($c=1$, DMF).

$C_{39}H_{55}N_6O_{11}S$ (851,42)

ber. C 55,02 H 6,51 N 9,87;

gef. C 54,92 H 6,38 N 9,86.

Ile-Met-Lys(Z)-Gly-ONB \times HCl

0,01 M (8,2 g) Boc-Ile-Met-Lys(Z)-Gly-ONB werden $\frac{1}{2}$ h bei Zimmertemperatur mit 4 N HCl/Dioxan behandelt, eingedampft, mit absolutem Äther verrieben, gewaschen und aus absolutem Methanol/Äther umgefällt.

DC: I, IV, V einheitlich. m.p.: 175–180 °C.

Ausbeute: 7,4 g (98%). $[\alpha]_D^{24} = +1,6^\circ$ ($c=1$, DMF).

$C_{34}H_{49}N_6O_9S$ (753,31)

ber. C 54,21 H 6,56 N 11,16;

gef. C 53,96 H 6,45 N 10,87.

Ile-Met-Lys(3-ClZ)-Gly-ONB \times HCl

Die Abspaltung des Boc-Restes erfolgt wie beim entsprechenden Z-Derivat.

DC: I, IV, V einheitlich. m.p.: 169–170 °C.

Ausbeute: (97%). $[\alpha]_D^{24} = +3,4^\circ$ ($c=1$, DMF).

$C_{34}H_{48}N_6O_9S$ (787,76)

ber. C 51,84 H 6,14 N 10,67;

gef. C 51,61 H 6,14 N 10,66.

Boc-Gln-Ile-Met-Lys(Z)-Gly-ONB

a. 0,01 M (7,5 g) Ile-Met-Lys(Z)-Gly-ONB \times HCl und 0,01 M (3,7 g) Boc-Gln-ONp²⁴ werden zusammen mit 0,012 M (1,6 g) HBT in 100 ml DMF gelöst und bei 0 °C mit 0,01 M (1,4 ml) TAA versetzt. Nach 48 h bei Zimmertemperatur wird das Reaktionsgemisch filtriert und die Lösung in Äther eingerührt. Das ausgefallene Rohprodukt wird aus Äthanol und Methanol umkristallisiert.

DC: I, II, V einheitlich. m.p.: 216–217 °C.

Ausbeute: 6,1 g (65%). $[\alpha]_D^{24} = -23,2^\circ$ ($c=1$, DMF).

ber. C 55,92 H 6,83 N 11,86;

gef. C 55,37 H 6,73 N 11,71.

b. 0,01 M (5,1 g) Lys(Z)-Gly-ONB \times HCl und 0,01 M (4,9 g) Boc-Gln-Ile-Met-OH werden zusammen mit 0,012 M (1,6 g) HBT in 80 ml DMF gelöst und bei –20 °C mit 0,012 M (2,4 g) DCCI in 20 ml DMF versetzt. Der Ansatz wird 6 h bei 0 °C und 6 h bei Zimmertemperatur gerührt. Der ausgefallene DCH wird abfiltriert, und das Filtrat in gesättigte NaCl-Lösung eingerührt, wobei das Produkt

ausfällt. Es wird abgesaugt und mit Wasser sorgfältig nachgewaschen, getrocknet und aus Äthanol und Methanol umkristallisiert.

DC: I, II, V einheitlich. m.p.: 204–205 °C.

Ausbeute: 4,6 g (49%). $[\alpha]_D^{24} = -19,5^\circ$ ($c=1$, DMF).

$C_{44}H_{64}N_8O_{13}S$ (945,10)

ber. C 55,92 H 6,83 N 11,86;

gef. C 55,65 H 6,75 N 11,94.

Aminosäureanalyse: Glu Gly Met Ile Lys

Ber. 1,0 1,0 1,0 1,0 1,0;

Gef. 1,05 1,00 1,01 1,00 1,02.

Boc-Gln-Ile-Met-Lys(3-ClZ)-Gly-ONB

0,01 M (7,9 g) Ile-Met-Lys(3-ClZ)-Gly-ONB \times HCl, 0,012 M (4,4 g) Boc-Gln-ONp²⁴ und 0,012 M (1,6 g) HBT werden in 100 ml DMF gelöst, bei 0 °C mit 0,01 M (1,4 ml) TAA versetzt und 48 h bei Zimmertemperatur gerührt. Das Produkt fällt während der Reaktion aus; es wird abgesaugt, in noch feuchtem Zustand mit Äthanol ausgekocht, abgesaugt und getrocknet. Das Filtrat der Reaktionslösung wird in 1 l Eiswasser eingerührt und das ausgefallene Produkt nach 1 h abgesaugt. Der noch feuchte Filterkuchen wird mit Äthanol ausgekocht, abgesaugt und zur Reinigung in heißem DMF gelöst, wieder in Eiswasser eingerührt und nach dem Absaugen mit Äthanol und Äther gewaschen.

DC: I, II, V einheitlich. m.p.: 223–224 °C.

Ausbeute: 7,3 g (75%). $[\alpha]_D^{24} = -10,1^\circ$ ($c=1$, HMPT).

$C_{44}H_{63}N_8O_{13}S$

ber. C 53,95 H 6,48 N 11,44;

gef. C 54,07 H 6,47 N 11,55.

Aminosäureanalyse: Glu Gly Met Ile Lys

Ber. 1,0 1,0 1,0 1,0 1,0;

Gef. 0,99 1,00 0,97 0,94 1,02.

Gln-Ile-Met-Lys(Z)-Gly-ONB \times HCl

Zur Abspaltung des Boc-Restes mit 4 N HCl/Dioxan unter den üblichen Bedingungen muß das Pentapeptidderivat vorher sorgfältig pulverisiert werden, da es nur schwer in Lösung geht. Die Umkristallisation des Peptidesters erfolgt aus absolutem Methanol/Essigester.

DC: I, II, IV eine schwache Nebenbande vom Ausgangsprodukt. Ausbeute: (93%).

$C_{39}H_{57}N_8O_{11}S$ (881,45)

ber. N 12,71; gef. N 12,34.

Gln-Ile-Met-Lys(3-ClZ)-Gly-ONB \times HCl

5 mM (4,9 g) Boc-Gln-Ile-Met-Lys(3-ClZ)-Gly-ONB werden pulverisiert, eine halbe Stunde bei Zim-

mertemperatur mit 4 N HCl/Dioxan behandelt, eingedampft und mit absolutem Äther bis zur Trockene verrieben. Das abfiltrierte Produkt wird in absolutem Methanol gelöst und mit Äther ausgefällt.

DC: I, II, IV einheitlich. m.p.: ab 179 °C (Zersetzung). Ausbeute: 4,4 g (94%). $[\alpha]_D^{24} = -7,5^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{39}H_{56}N_8O_{11}SCl_2$ (915,89)
ber. C 51,14 H 6,16 N 12,23;
gef. C 50,95 H 6,07 N 12,03.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fond der Chemischen Industrie für die Unterstützung der Arbeiten.

- ¹ E. Schaich u. Fr. Schneider, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **355**, 939 [1974].
- ² E. Schaich u. Fr. Schneider, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **355**, 945 [1974].
- ³ E. Schaich u. Fr. Schneider, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **355**, 952 [1974].
- ⁴ E. Schaich u. Fr. Schneider, Z. Naturforsch. **29 c**, 457 [1974].
- ⁵ E. Schaich u. Fr. Schneider, Z. Naturforsch. **29 c**, 464 [1974].
- ⁶ A. Raschig u. Fr. Schneider, Z. Naturforsch. **30 c**, 739 [1975].
- ⁷ A. Raschig u. Fr. Schneider, Z. Naturforsch. **30 c**, 745 [1975].
- ⁸ A. Raschig, E. Schaich u. Fr. Schneider, Z. Naturforsch. **30 c**, 752 [1975].
- ⁹ Fr. Schneider, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **348**, 1034 [1967].
- ¹⁰ Fr. Schneider, E. Schaich u. H. Wenck, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **349**, 1525 [1968].
- ¹¹ Fr. Schneider u. H. Wenck, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **350**, 1653 [1969].
- ¹² Fr. Schneider u. H. Wenck, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **350**, 1521 [1969].
- ¹³ E. Ziegler, H. Wenck u. Fr. Schneider, Z. Naturforsch. **25 b**, 1417 [1970].
- ¹⁴ H. Wenck u. Fr. Schneider, Experimentia **27**, 20 [1971].
- ¹⁵ R. v. Kleinsorge, H. G. Löffler u. Fr. Schneider, Chimia **29**, 385 [1975].
- ¹⁶ H. Schwarz u. K. Arakawa, J. Am. Chem. Soc. **81**, 5691 [1959].
- ¹⁷ R. H. Mazur u. J. M. Schlatter, J. Org. Chem. **28**, 1025 [1963].
- ¹⁸ A. Raschig, unveröffentlichte Ergebnisse.
- ¹⁹ E. Schnabel, H. Klostermeyer u. H. Berndt, Liebigs Ann. Chem. **749**, 90 [1971].
- ²⁰ E. Schnabel, H. Klostermeyer u. H. Berndt, Peptides, Proc. 11th Eur. Peptide Symp., Vienna 1971, (H. Nesvadba, Hrsg.), S. 69–76, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam 1973.
- ²¹ B. W. Erickson u. R. B. Merrifield, Chemistry and Biology of Peptides, Proc. 3rd Amer. Peptide Symp., Boston 1972 (J. Meienhofer, Hrsg.), S. 191–195, Ann Arbor Science Publ., Michigan 1972.
- ²² P. Sieber, B. Riniker, M. Brugger, B. Kamber u. W. Rittel, Helv. Chim. Acta **59**, 2135 [1970].
- ²³ W. König u. R. Geiger, Chem. Ber. **103**, 788 [1970].
- ²⁴ H. Zahn, W. Danho u. B. Gutte, Z. Naturforsch. **21 b**, 763 [1966].
- ²⁵ W. König u. R. Geiger, Chem. Ber. **106**, 3626 [1973].
- ²⁶ F. Reindel u. W. Hoppe, Chem. Ber. **87**, 1103 [1954].
- ²⁷ H. Pauly, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **42**, 517 [1904].
- ²⁸ E. Wünsch u. A. Zwick, Chem. Ber. **97**, 2497 [1964].
- ²⁹ S. Hörnle, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **348**, 1355 [1967].
- ³⁰ K. Hofmann, W. Haas, M. J. Smithers u. G. Zanetti, J. Amer. Chem. Soc. **87**, 631 [1965].
- ³¹ E. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. **702**, 188 [1967].