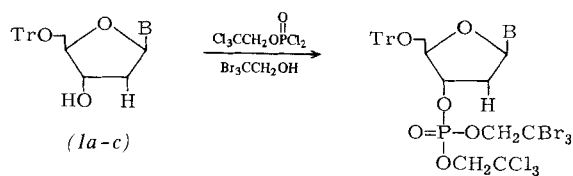


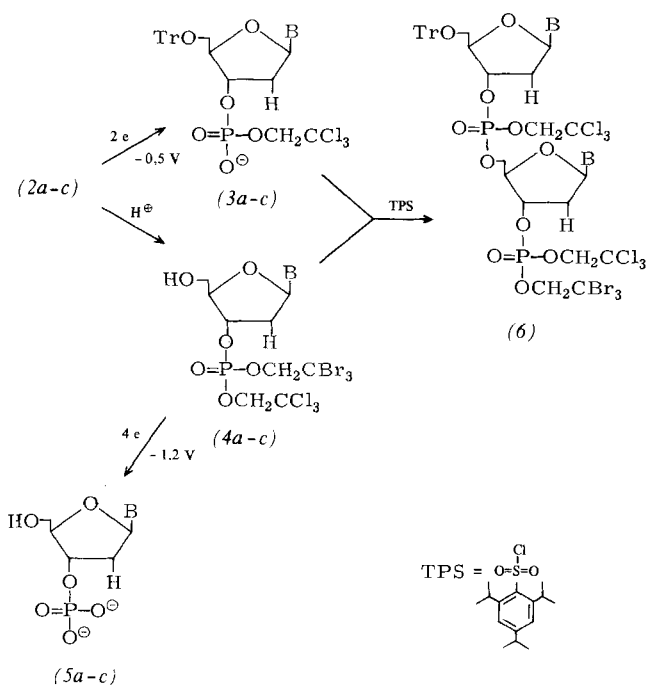
der Abspaltung einer Esterfunktion sehr viel geringer als beim Angriff des Reagens am Phosphor.



(a), B = Thymynyl Tr = Trityl oder (2a-c)  
 (b), B = N<sup>4</sup>-Benzoylcytosyl Monomethoxytrityl  
 (c), B = N<sup>6</sup>-Benzoyladenyl

Die geschützten Nucleoside (1a-c) wurden mit 2,2,2-Trichlorethylphosphorsäuredichlorid<sup>[5]</sup> und danach mit 2,2,2-Tribromethanol umgesetzt. Die Triester (2a-c) ließen sich durch Chromatographie auf Silicagel in 85–90 % Ausbeute isolieren. Die Detritylierung von (2a-c) gelingt mit 1 % Trifluoressigsäure in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> oder mit BF<sub>3</sub>Et<sub>2</sub>O/MeOH in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub><sup>[6]</sup>; die resultierenden kristallinen Ester (4a-c) sind stabil und lassen sich in 5'-Richtung verlängern.

Durch potentialgesteuerte Elektroreduktion<sup>[7]</sup> an einer Quecksilberkathode ist es möglich, bei –0.5 bis –0.6 V die Tribromethylschutzgruppe aus (2a-c) quantitativ abzuspalten. Die Reaktion wird in Acetonitril/Pyridin mit LiClO<sub>4</sub> als Leitsalz durchgeführt; die entstandenen Diester (3a-c) können nach Extraktion mit CHCl<sub>3</sub> direkt für die Kondensationsreaktion verwendet werden. Mit TPS und den Triestern (4a-c) wurde (6) in sehr glatter Reaktion erhalten. Die neun möglichen Kombinationen (6) lassen sich dann weiter durch selektive Elektroreduktion spalten und danach in 3'-Richtung verlängern oder nach saurer Spaltung am 5'-Ende zu einer Blockkondensation verwenden.



Die vollständige elektrochemische Entblockierung zu den freien Phosphaten wurde an den Triestern (4a-c) durchgeführt. Bei der Reduktion in Dimethylformamid (DMF) mit Tetrabutylammonium-tetrafluorborat als Leitsalz lassen sich bei –1.2 bis –1.4 V (4a) und (4c) glatt zu (5a) bzw. (5c) in 90 % Ausbeute reduzieren. Der Dichlorethylester, das in <sup>[4]</sup> zitierte Nebenprodukt, entsteht zu maximal 2 % und ist fast nicht vom Trichlorethylester (Edukt) zu trennen.

## Arbeitsvorschrift

Reduktion von (2a-c): In einer geteilten Elektrolysezelle<sup>[8]</sup> (Pt-Anode, Hg-Kathode, Ag-Draht) mit Nafion 125 als Membran werden als Katholyt 0.5 M LiClO<sub>4</sub> in Pyridin/CH<sub>3</sub>CN (1:5) und 0.5–1 mmol (2a-c) vorgelegt und als Anolyt 0.5 M LiClO<sub>4</sub> und 1–2 mmol Pyridin. Bei Raumtemperatur unter Stickstoff wird das Kathodenpotential auf –0.5 V (Ag-Draht) potentiostatisch eingestellt und coulometrisch die Aufnahme der Elektronen verfolgt. Wenn der Strom seinen Blindwert erreicht hat, ist die Reaktion beendet. Durch Einengen des Lösungsmittels, Verteilen zwischen Wasser und Chloroform, Extrahieren mit Chloroform, Trocknen der Chloroformphase mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sowie Filtrieren und Einengen wird (3a-c) erhalten, das in Pyridin direkt weiter umgesetzt werden kann.

Reduktion von (4a-c): In obiger Zelle werden als Katholyt 0.5 M Tetrabutylammonium-tetrafluorborat in DMF/CH<sub>3</sub>CN (1:1) und 0.5–1 mmol (4a-c) verwendet, im Anolyten noch zusätzlich 1–2 mmol 2,6-Lutidin. Bei Raumtemperatur unter Stickstoff wird das Kathodenpotential auf –1.2 V (Ag-Draht) eingestellt. Die Aufarbeitung erfolgt durch Extraktion des Leitsalzes mit Chloroform und durch Chromatographie der wäßrigen Phase, die (5a-c) enthält, über RP8- oder RP18-Silicagel mit Wasser oder Wasser/Ethanol als Eluens.

Eingegangen am 11. Dezember 1978 [Z 136]

- [1] V. Amarnath, A. D. Broom, Chem. Rev. 77, 183 (1977).
- [2] J. Engels, Nucl. Acid Res. Spec. Publ. 4, s 31 (1978); Chem. Ber., im Druck.
- [3] E. Cherbuliez, A. Gabriel, H. Probst, A. Yazgi, J. Rabinowitz, Helv. Chim. Acta 45, 2282 (1962).
- [4] M. F. Semmelhack, G. E. Heinsohn, J. Am. Chem. Soc. 94, 5139 (1972).
- [5] P. Cashion, K. Porter, T. Cadger, G. Sathe, T. Tranquilla, H. Notman, E. Jay, Tetrahedron Lett. 1976, 3769.
- [6] K. Dax, W. Wölfehner, H. Weidmann, Carbohydr. Res. 65, 132 (1978).
- [7] V. G. Mairanovsky, Angew. Chem. 88, 283 (1976); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 15, 281 (1976).
- [8] R. Gottlieb, W. Pfeleiderer, Chem. Ber. 111, 1753 (1978).

## Synthese des Mastzellen-degranulierenden (MCD)-Peptides aus Bienengift<sup>[\*\*]</sup>

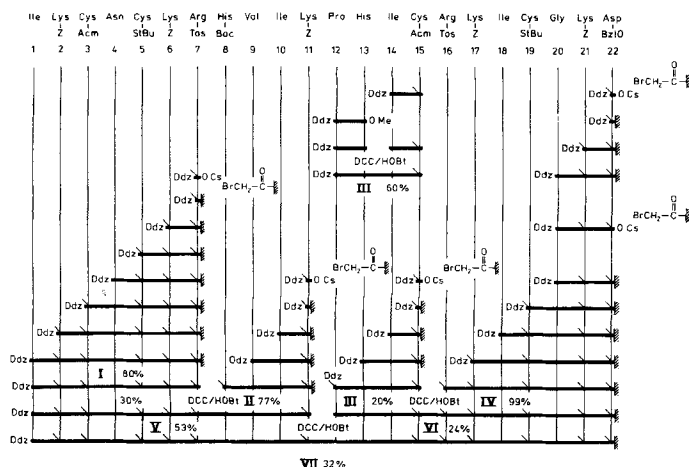
Von Christian Birr und Margot Wengert-Müller<sup>[\*]</sup>

Das Mastzellen-degranulierende Peptid (MCD-Peptid) ist eine Minimalkomponente (1–3 %) des Bienengiftes<sup>[1]</sup>. Die aus 22 Aminosäuren bestehende, einsträngige Sequenz<sup>[2]</sup> (vgl. Schema 2) wird von zwei Disulfidbindungen überbrückt und enthält 5 Lysin-, 2 Arginin- und 2 Histidin-Reste; der isoelektrische Punkt liegt bei pH=12. In niedriger Dosierung (<0.1 mg/kg) bewirkt der Naturstoff an Mastzellen eine Histaminausschüttung (Degranulierung)<sup>[1]</sup>, die bei höheren Dosen (1 mg/kg) durch eine entzündungshemmende Wirkung<sup>[3]</sup> überkompensiert wird. Das MCD-Peptid scheint stärker entzündungshemmend zu wirken als alle sonstigen Pharmaka, ohne jedoch neurotoxisch zu sein. Diese Eigenschaft verleiht der Verbindung therapeutische Bedeutung bei rheumatischen Prozessen<sup>[4]</sup>, aber auch bei allergischen Reaktionen, und begründet unser Interesse an der Totalsynthese des Naturstoffs.

Zur Synthese des MCD-Peptides (siehe Schema 1) wurden vier Fragmente (I–IV) nach der von uns weitgehend modifizier-

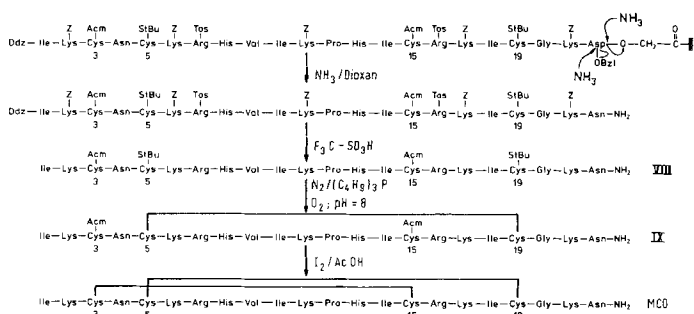
[\*] Priv.-Doz. Dr. Ch. Birr, Dr. M. Wengert-Müller  
 Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung  
 Abteilung Naturstoff-Chemie  
 Jahnstraße 29, D-6900 Heidelberg 1

[\*\*] Ch. Birr, Vortrag auf dem Deutsch-Sowjetischen Peptid-Symposium, Eibsee 1978. – Wir danken Prof. Dr. E. Habermann, Gießen, für MCD-Peptid.



Schema 1. Synthese der Fragmente und des trägergebundenen, vollgeschützten MCD-Peptides (VII). Die Ausbeuten an I–IV beziehen sich auf die Anfangsbeladung am Träger. Das in 60 % Ausbeute erhaltene Fragment III wurde zusätzlich in Lösung hergestellt. Schutzgruppen: Ac: Acetamidomethyl; Boc: *tert*-Butyloxycarbonyl; Bzl: Benzyl; Ddz: 3,5-Dimethoxy- $\alpha,\alpha$ -dimethylbenzyloxycarbonyl; StBu: *tert*-Butylthio; Tos: Toluolsulfonyl; Z: Benzyloxycarbonyl.

ten Merrifield-Methode<sup>[5]</sup> an einer Polystyrol-Gelphase (<0.5 % vernetzt) aufgebaut: Dank der spektroskopischen Eigenschaften der säurelabilen Ddz-Schutzgruppe ließ sich jede Operation kontinuierlich photometrisch auf vollständige Umsetzung hin beobachten und auf einem Schreiber darstellen<sup>[6]</sup>. Keine der Fragmentsynthesen wurde bezüglich der Sequenzlänge vorprogrammiert. Vielmehr wurde der automatisierte Syntheseprozess beendet, wenn die Umsetzungen an der Polystyrol-Gelphase unter durchschnittlich 70 % abfielen. Dadurch resultierten höchstens Heptapeptide. Dank der Spaltbarkeit der 2-Oxoethylesterbindung  $\text{—O—CH}_2\text{—CO—}$  Polymer der Peptide am Polystyrolträger mit Base (0.1 N Benzyltrimethylammoniumhydroxid in wasserfreiem Methanol/Dioxan 1:3, v/v) konnten die Peptide ohne Verlust der basestabilen Schutzgruppen an Seitenfunktionen zur Zwischenreinigung vom Träger abgelöst und anschließend dort zu größeren Fragmenten kondensiert werden. So wurden I mit II am Träger zu V (53 %, bezogen auf II-Gelpolymer) und III mit IV am Träger zu VI (24 %, bezogen auf IV-Gelpolymer) umgesetzt. V wurde erneut vom Träger abgelöst, gereinigt und mit VI am Träger zum vollgeschützten Endprodukt VII vereinigt (32 %, bezogen auf VI-Gelpolymer). Das Schema der Fragmentsynthesen und der Aufbau der vollgeschützten Sequenz VII wurden schon kurz beschrieben<sup>[7]</sup>.



Schema 2. Freisetzung des MCD-Peptids aus dem trägergebundenen, vollgeschützten Endprodukt VII.

Das Produkt VII der Merrifield-Synthese wurde mit Ammoniak-gesättigtem Dioxan vom Träger als Diamid abgelöst (Schema 2). Die Ablösung von VII vom Polystyrol-Gel verlief mit 98.5 % praktisch vollständig und erbrachte nach Chroma-

tographie auf Sephadex LH 20/Dimethylformamid 1 g allseits geschützten MCD-Peptides (MG: 4067). Unter Erhaltung der Schwefelschutzgruppen in den Positionen 3, 5, 15 und 19 wurden mit Trifluormethansulfonsäure alle Benzyloxycarbonyl- und Toluolsulfonyl-Gruppen abgespalten. Ein <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum zeigte keine Signale aromatischer Protonen, während die Signale der Schwefelschutzgruppen unverändert erhalten blieben.

Nach Ionenaustausch- und Gelchromatographie wurden 507 mg Cys(Acm)<sup>3,15</sup>, Cys(StBu)<sup>5,19</sup>-MCD-Peptid (VIII) gewonnen (71 %, bezogen auf das vom Träger abgelöste VII).

Durch Reduktion mit Tributylphosphan<sup>[8]</sup> wurden in den Positionen 5 und 19 selektiv die StBu-Schutzgruppen abgespalten und bei pH=8 unter Luftoxidation die Disulfidbrücke 5–19 geschlossen; es entstanden 276 mg Cys(Acm)<sup>3,15</sup>-MCD-Peptid (IX) (61 %, bezogen auf VIII).

Zur selektiven Einführung der Disulfidbrücke 3–15 wurden aus 126 mg IX mit Iod in essigsaurer Lösung<sup>[9]</sup> die Acm-Schutzgruppen abgespalten. Die Oxidation wurde mit Ascorbinsäure gestoppt und das Endprodukt sofort in 0.1 N Essigsäure auf Sephadex G 25 chromatographiert. Aus der an synthetischem MCD-Peptid reichsten Fraktion isolierten wir nach weiterer Reinigung vorerst 16 mg reinen Produktes. Es erwies sich elektrophoretisch (Papier-, Polyacrylamid-Normal- und -SDS-Gel) und chromatographisch (HPLC, Zorbax ODS; Acetonitril-Wasser 35/65, isokratisch) als identisch mit dem Naturstoff. Aminosäureanalyse (berechnete Werte in Klammern): Cys 4.2 (4); Ile 4.0 (4); Lys 5.0 (5); Arg 2.3 (2); His 1.8 (2); Val 0.8 (1); Pro 1.4 (1); Gly 1.5 (1); Asp 2.4 (2).

Im CD-Spektrum zeigt das synthetische MCD-Peptid die gleichen vier Banden zwischen 190 und 240 nm wie der Naturstoff; die Spektren sind jedoch nicht deckungsgleich. Hieraus kann auf eine graduelle Racemisierung an besonders gefährdeten Zentren (Histidin, Cystein) geschlossen werden. Die degranulierende Wirkung des Syntheseproduktes wurde an Mastzellen der Ratte getestet. Das synthetische MCD-Peptid zeigte hierbei 35 % der Histamin-freisetzenden Wirkung des Naturstoffes.

Eingegangen am 18. Dezember 1978 [Z 139]

- [1] H. Breithaupt, E. Habermann, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Exp. Path. 261, 252 (1968).
- [2] P. Haux, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 536 (1969).
- [3] M. J. E. Billingham, J. Morley, J. M. Hanson, R. A. Shipolini, C. A. Vernon, Nature 245, 163 (1973).
- [4] B. E. C. Banks, F. D. Rumjanek, N. M. Sinclair, C. A. Vernon, Bull. Inst. Pasteur 74, 137 (1978).
- [5] Ch. Birr: Aspects of the Merrifield Peptide Synthesis. Springer, Berlin 1978; B. W. Erickson, R. B. Merrifield in H. Neurath, R. L. Hill: The Proteins. Vol. 2. 3. Aufl. Academic Press, New York 1976.
- [6] Ch. Birr in Y. Wolman: Peptides 1974. Halsted Press, New York 1975, S. 117ff.
- [7] Ch. Birr, M. Wengert-Müller, A. Buku in: M. Goodman, J. Meienhofer: Peptides. Halsted Press, New York 1977, S. 510ff.
- [8] J. van Rietschoten, C. Granier, H. Rochat, S. Lissitzky, F. Miranda, Eur. J. Biochem. 56, 35 (1975).
- [9] P. Sieber, B. Kamber, A. Hartmann, A. Jöhl, B. Riniker, W. Rittel, Helv. Chim. Acta 60, 27 (1977).

## Acetylendicarbonsäure-di-*tert*-butylester und seine Cyclotrimerisierung

Von Wolfgang Sucrow und Fritz Lübke<sup>[\*]</sup>

Für die Synthese von Enhydrazinen<sup>[1]</sup> benötigten wir Acetylendicarbonsäure-di-*tert*-butylester (2), der überraschender-

[\*] Prof. Dr. W. Sucrow, Dr. F. Lübke  
Fachbereich Naturwissenschaften II der Gesamthochschule  
Warburger Straße 100, D-4790 Paderborn