

KARL STURM, ROLF GEIGER und WALTER SIEDEL

## Synthese eines Tetradecapeptidamid-Derivates mit der Aminosäuresequenz 11—24 des Corticotropins (ACTH)

Aus der Farbwerke Hoechst AG, vorm. Meister Lucius & Brüning, Frankfurt (Main)

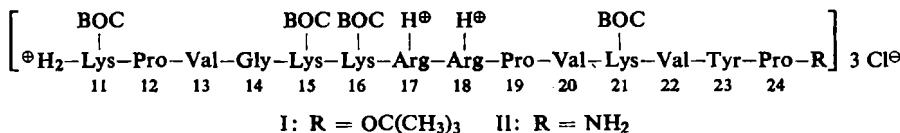
(Eingegangen am 25. August 1962)

Die Synthese des partiell durch tert.-Butyloxycarbonyl-Gruppen (Abk. BOC) geschützten Tetradecapeptidamids  $N^{\omega}$ -BOC-Lysyl-prolyl-valyl-glycyl- $N^{\omega}$ -BOC-lysyl- $N^{\omega}$ -BOC-lysyl-arginyl-arginyll-prolyl-valyl- $N^{\omega}$ -BOC-lysyl-valyl-tyrosyl-prolinamid (sämtlich L-Konfiguration) nach dem Schema (4+2) + (3+5) wird beschrieben. Die Verbindung ist ein geeignetes Zwischenprodukt für die Darstellung ACTH-wirksamer Tetracosapeptidamide.

Von H. KAPPELER und R. SCHWYZER<sup>1)</sup> wurde bereits die Synthese des Tetradecapeptides I nach dem Schema (4 + 5) + 5 beschrieben. Schlüsselsubstanzen der Synthesen sind  $N^{\omega}$ -Nitro-arginin und  $N^{\omega}$ -BOC-Lysin. Unter Verwendung bekannter Amino-Schutzgruppen (Trityl, Carbobenzoxy- und p-Phenylazo-carbobenzoxyrest) und üblicher Kondensationsverfahren (Azid-, Anhydrid- und Carbodiimidmethode) werden diese Derivate in den Peptidverband der Formel I<sup>2)</sup> eingebaut.

Wir beschäftigen uns seit längerer Zeit mit der Synthese von Eicosa- bis Tetracosapeptiden, die in der Aminosäuresequenz mit dem Aminoende der Corticotropine (ACTH) übereinstimmen und deren Carboxyl-Gruppen beide in der Amidform vorliegen, da wir vermuten, daß auch solche Verbindungen eine hohe ACTH-Aktivität aufweisen.

Ein wichtiges Zwischenprodukt dieser Synthesen ist das Tetradecapeptidamid-Derivat II, dessen Darstellung im folgenden beschrieben wird:



Auch wir fanden nach zahlreichen Versuchen mit  $N^{\omega}$ -Tosyl-arginin und  $N^{\alpha}, N^{\omega}$ -Dicarbobenzoxy-arginin die Nitrogruppe zum Schutz der Guanidinogruppe des Arginins als in diesem Falle am besten geeignet und setzten die Aminosäure in Form des  $N^{\alpha}$ -Carbobenzoxy- $N^{\omega}$ -nitro-Derivates ein.

Für die Darstellung des bereits von R. SCHWYZER und W. RITTEL<sup>3)</sup> beschriebenen  $N^{\alpha}$ -Carbobenzoxy- $N^{\omega}$ -BOC-lysins wählten wir als neuen Weg die Umsetzung des

<sup>1)</sup> Helv. chim. Acta 44, 1136 [1961].

<sup>2)</sup> In dieser und in den folgenden Formeln werden die Aminosäurereste nach dem Vorschlag von E. BRAND und J. T. EDSELL, Ann. Rev. Biochem. 16, 223 [1947] abgekürzt. — Alle Aminosäuren gehören der L-Reihe an.

<sup>3)</sup> Helv. chim. Acta 44, 159 [1961].

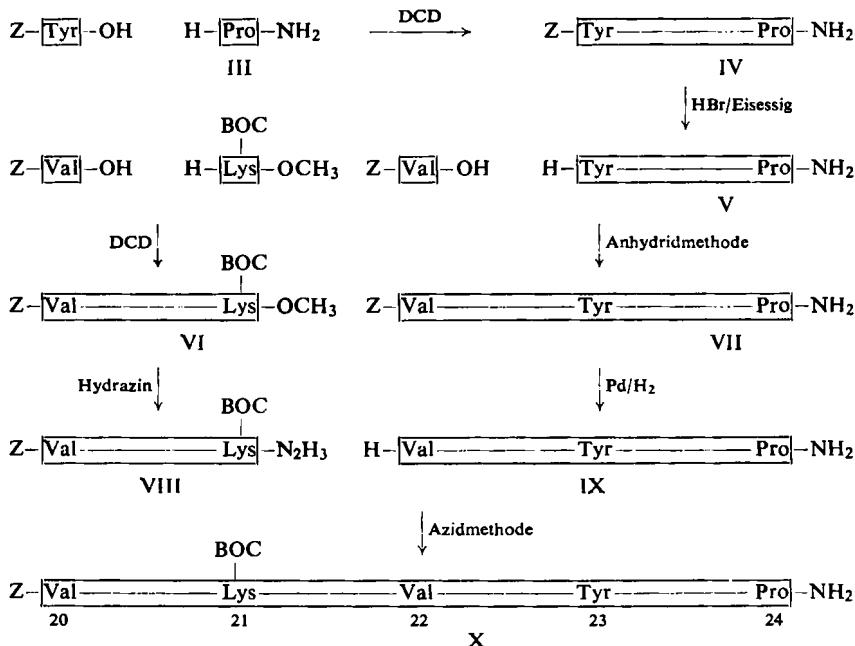
auch im technischen Maßstab leicht zugänglichen  $N^{\alpha}$ -Carbobenzoxy-lysins<sup>4)</sup> mit BOC-Azid<sup>5)</sup>. Bei diesem Verfahren (Ausb. ca. 90% d. Th.) wird, im Gegensatz zum Schwyzerschen Verfahren, einmal das wertvolle BOC-Azid optimal ausgenutzt, zum anderen das unangenehme Arbeiten mit Schwefelwasserstoff vermieden.

Das Synthese-Schema wurde ferner so gewählt, daß zum Schutze der  $\alpha$ -Aminogruppen einheitlich der Carbobenzoxyrest Verwendung finden kann.

Prolinamid war durch Aminolyse des recht stabilen Methylesters nur in mäßiger Ausbeute erhältlich. Wir haben daher  $N$ -Carbobenzoxy-prolin nach der Anhydridmethode in das entsprechende Amid übergeführt und nachfolgend den Carbobenzoxyrest hydrogenolytisch abgespalten.

Den Aufbau der Peptidkette haben wir gemäß Schema 1 und 2<sup>6)</sup> vorgenommen.

Schema 1



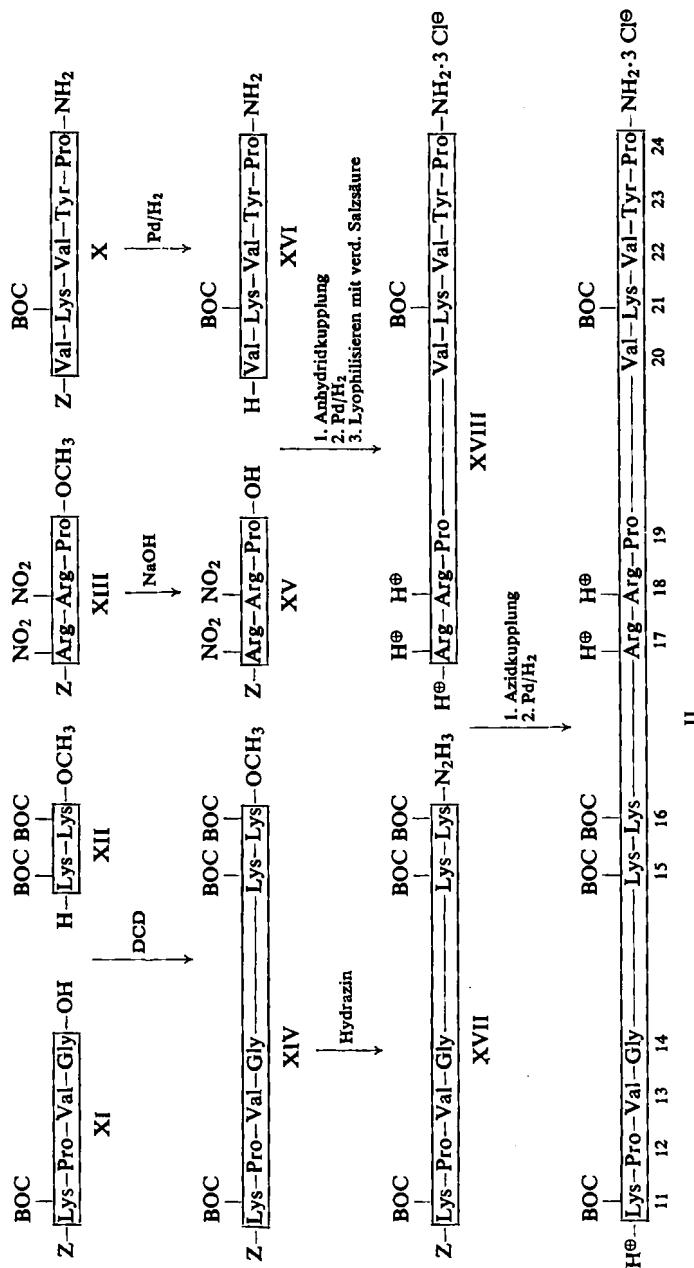
Die Kondensationsverfahren wurden so ausgesucht, daß bei keinem Kupplungsschritt mit einer nennenswerten Racemisierung gerechnet zu werden brauchte. In solchen Fällen, wo Carbodiimid- und gemischte Anhydridmethode ungefähr gleiche Ausbeuten lieferten, wie beispielsweise bei der Verknüpfung von XV und XVI zum Octapeptid, gaben wir der letzteren den Vorzug und bringen auch nur diese eine Methode im Versuchsteil.

4) B. BEZAS und L. ZERVAS, J. Amer. chem. Soc. 83, 719 [1961].

5) L. A. CARPINO, J. Amer. chem. Soc. 79, 98 [1957].

6) Abkürzungen: DCD = Dicyclohexylcarbodiimid, Z = Carbobenzoxyrest, N<sub>3</sub> = Azido-gruppe.

Schema 2



Die hydrogenolytische Abspaltung der Nitrogruppen und des Carbobenzoxyrestes aus diesem Octapeptid-Derivat verläuft überraschend glatt. Bei der Hydrierung bei Raumtemperatur in Methanol/Wasser/Eisessig (100:10:2) in Gegenwart von Palladiummohr war nach 5 Stdn. der Carbobenzoxyrest vollständig eliminiert. Die Hydrierung wurde dann über Nacht in geschlossener Apparatur fortgeführt und ergab nur noch einen Wasserstoffverbrauch, der etwa  $\frac{1}{10}$  der für beide Nitrogruppen benötigten Menge entsprach. Eine partielle Abspaltung der säurelabilen BOC-Schutzgruppe wurde unter diesen Bedingungen nicht beobachtet.

Bei der Kondensation von XVII mit XVIII zum Tetradecapeptid-Derivat erzielten wir die besten Ausbeuten (ca. 30% d. Th.) mit der Azidmethode. Die beiden freien Guanidinogruppen der Aminokomponente wurden durch Salzbildung geschützt und das Octapeptidamid XVIII als Trihydrochlorid in die Synthese eingesetzt.

Die meisten Peptid-Derivate konnten durch Umkristallisieren oder Umfällen chromatographisch einheitlich erhalten werden. In kristalliner Form fielen die Verbindungen IV, VI, VIII, XI, XIV und XVII an. Die stark basischen Peptidamide II und XVIII wurden durch Chromatographie an der 15–30fachen Gewichtsmenge Carboxymethylcellulose gereinigt, ein Verfahren, das sich besonders bei Argininpeptiden bewährt. K. HOFMANN und Mitarbb.<sup>7)</sup> demonstrierten dies bereits am Beispiel ähnlich gebauter, die Sequenz Arg-Arg enthaltender Peptide.

Bei der Gradientenelution mit Ammoniumacetatpuffer erscheint das Tetradecapeptidamid II im 0.10–0.12 molaren, das Octapeptidamid XVIII im 0.15–0.18 molaren Eluat.

Der Gehalt der einzelnen Fraktionen wurde durch Messung der Tyrosinabsorption bei 275 m $\mu$  bestimmt und die Peptide aus der Lösung durch Lyophilisieren, frei von Ammoniumacetat, als wasserhaltige amorphe Triacetate isoliert. Zur Überführung in die entsprechenden Hydrochloride stellten wir die ca. 1-proz. wässr. Lösung der Acetate mit 1 n HCl auf pH 2.2 ein und lyophilisierten anschließend. Das Endprodukt ist chromatographisch und elektrophoretisch einheitlich und zeigt die zu erwartende Aminosäurezusammensetzung.

Herrn Dr. H. H. SCHÖNE möchten wir für die Ausführung der Aminosäureanalysen bestens danken.

<sup>7)</sup> K. HOFMANN, TEH-YUNG LIU, H. YAJIMA, N. YANAIHARA und S. LANDE, J. Amer. chem. Soc. 83, 2294 [1961].

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Schmelzpunkte wurden im Kupferblock bestimmt und sind unkorrigiert. Für die aufsteigende Papierchromatographie benutzten wir folgende Lösungsmittelgemische:

System A = n-Butanol/Eisessig/Pyridin/Wasser	(30 : 6 : 20 : 24),
System B = Methyläthylketon/Pyridin/Wasser	(65 : 15 : 20),
System C = sek.-Butanol/3-proz. Ammoniak	(100 : 44),
System D = sek.-Butanol/Isopropylalkohol/Chloressigsäure/Wasser	(70 : 10 : 3 g : 40)

Die Laufzeit in System B war 8 Stdn., in den übrigen Systemen 16 Stdn.

Die Elektrophorese wurde bei 100 Volt in Pyridin/Eisessig/Wasser (180 : 40 : 1800) bei pH 5.9 ausgeführt. Die Angabe  $E_{5.9} = 2.0$  (Lys) bedeutet beispielsweise, daß die betreffende Substanz unter diesen Bedingungen 2.0 mal schneller wandert als Lysin.

*N<sup>a</sup>-Carbobenzoxy-N<sup>b</sup>-BOC-lysine*: Die Lösung von 280 g *N<sup>a</sup>-Carbobenzoxy-lysine*<sup>4)</sup> (1 Mol) in 1.4 l Wasser wird bei Raumtemperatur mit 0.8 l Dioxan, 160 g *BOC-Azid* (1.1 Mol) und 60 g fein gepulvertem Magnesiumoxyd (1.5 Mol) versetzt und die Mischung zunächst 8 Stdn. bei 40°, dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Man saugt vom überschüss. Magnesiumoxyd ab und engt das Filtrat i. Vak. unterhalb von 60° auf ein Drittel ein, wobei sich 2 Phasen bilden. Sodann wird mit 2 l Wasser verdünnt und nach Zugabe von 3 l Eisessigester, unter jeweiligem Durchschütteln, eine konzentrierte währ. Zitronensäurelösung portionsweise zugegeben, bis die währ. Phase pH 3 hat. Die organische Phase wird abgetrennt, mit 0.2 l Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. unterhalb von 60° eingedampft. Es bleiben 330 g des *BOC-Derivates* (86% d. Th.) als schwach gelbliches Harz zurück.  $R_F(A) = 0.92$ . Der daraus mit überschüss. *Diazomethan* in Äther erhaltene *Methylester* kristallisiert im Laufe einer Woche durch und schmilzt nach Waschen mit Petroläther und Trocknen an der Luft bei 57°.

*Prolinamid (III)*: In die Lösung von 249 g *N-Carbobenzoxy-prolin* (1 Mol) und 138 ccm wasserfreiem Triäthylamin (1 Mol) in 2 l absol. Tetrahydrofuran werden bei –10° unter intensivem Rühren 96 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* (1 Mol) und 10 Min. danach 100 ccm flüssiges Ammoniak auf einmal eingetragen. Man läßt noch 1 Stde. bei Raumtemperatur weiterreagieren, dampft ein und verteilt den Rückstand zwischen 1 l Wasser und 2 l Chloroform. Die Chloroformlösung wird mit je 0.2 l 2n HCl, 2n Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft. Der sirupöse Eindampfrückstand kristallisiert aus 3 l siedendem Wasser beim Abkühlen auf 0° in farblosen Prismen vom Schmp. 90–91°. Ausb. 200 g (80% d. Th.) *N-Carbobenzoxy-prolinamid*.

124 g *N-Carbobenzoxy-prolinamid* (0.5 Mol) werden in 0.5 l Methanol gelöst und in offener Apparatur in Gegenwart von 5 g Palladiummohr hydriert, bis die Kohlendioxydentwicklung beendet ist (etwa 10 Stdn.). Man filtriert vom Katalysator ab, dampft die Lösung ein und trocknet den Rückstand i. Vak. über Calciumchlorid, bis er sich pulverisieren läßt. Ausb. 55 g (fast quantitativ). Schmp. 94–96°.  $[\alpha]_D^{20} = -95 \pm 1.5^\circ$  ( $c = 2$ , Äthanol),  $R_F(A) = 0.42$ .

*N-Carbobenzoxy-tyrosyl-prolinamid (IV)*: 34.2 g *Prolinamid (III)* (0.3 Mol) und 95 g *N-Carbobenzoxy-tyrosin* (0.3 Mol) löst man in einer Mischung von 0.5 l Acetonitril und 0.2 l Dimethylformamid und tropft dann bei +5° unter Röhren die Lösung von 62 g *Dicyclohexylcarbodiimid* (0.3 Mol) in 100 ccm Acetonitril innerhalb von 10 Min. ein. Nach Belassen im Kühlschrank wird der ausgefallene *Dicyclohexylharnstoff* (54 g = 81% d. Th.) am andern Morgen abgenutscht und mit 50 ccm Dimethylformamid gewaschen. Die vereinigten Filtrate engt man i. Vak. unterhalb von 60° auf eine Drittel ein, schüttelt das Konzentrat mit 1 l 1n NaHCO<sub>3</sub> durch und kocht die sirupöse Fällung mit 0.5 l Essigester auf, wobei schon in der

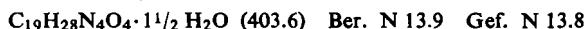
Siedehitze Kristallisation eintritt. Nach eintägigem Stehenlassen bei 0° wird das Reaktionsprodukt abgesaugt, mit 100 ccm Essigester und 50 ccm Methanol gewaschen und bei 60° getrocknet. Man erhält 75 g farblose Prismen (62% d. Th.) vom Schmp. 187–190°.  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-31.3 \pm 2^\circ$  ( $c = 1$ , Eisessig). Aus 95-proz. Äthanol kristallisiert die Substanz in Blättchen vom Schmp. 193°.



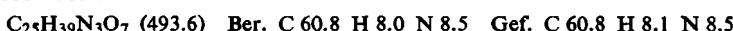
*Carbobenzoxyvalyl-tyrosyl-prolinamid (VII):* 86 g IV (0.21 Mol) werden in 210 ccm einer 37-proz. Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig unter Röhren und Feuchtigkeitsausschluß gelöst (etwa 30 Min.). Beim Durchschütteln der Lösung mit 1.8 l Äther fällt das Dipeptidamid-hydrobromid harzig aus. Die überstehende Lösung wird abgegossen und das Harz dekantierend mit zweimal 0.2 l Äther gewaschen. Man verteilt es dann zwischen 150 ccm Wasser und 150 ccm Äther, trennt die währ. Phase ab, stellt sie mit festem Natriumcarbonat auf pH 5.0 ein und gibt nach dem Abkühlen auf 0° noch 29 ccm Triäthylamin (0.21 Mol) zu. Inzwischen wird eine bereits auf  $-10^\circ$  abgekühlte Lösung von 50.2 g *N-Carbonoxy-valin* (0.20 Mol) und 29 ccm Triäthylamin (0.21 Mol) in 0.8 l absol. Tetrahydrofuran unter intensivem Röhren auf einmal mit 19.7 g *Chlorameisensäure-äthylester* (0.205 Mol) versetzt. Nach 10 Min. läßt man bei der gleichen Temperatur die obige eiskalte Lösung der Aminokomponente innerhalb 1 Min. einlaufen. Sofort anschließend wird das Kältebad entfernt und die Reaktion durch 1 stdg. Röhren bei Raumtemperatur zu Ende gebracht. Die Lösung wird i. Vak. auf etwa ein Drittel eingeengt, mit 1 l Chloroform verdünnt und die Mischung mit je 0.2 l 1n HCl, 1n NaHCO<sub>3</sub> und Wasser gewaschen. Den harzigen Eindampfrückstand nimmt man in 0.2 l Essigester auf und röhrt diese Lösung in 1 l Petroläther (40–80°) ein. Die pulverige Fällung läßt sich gut absaugen und wird nach dem Waschen mit Petroläther zunächst an der Luft, dann bei 50°/15 Torr über Paraffin getrocknet. Das farblose, amorphe Pulver hält  $\frac{1}{2}$  Äquiv. Essigester fest und besitzt keinen scharfen Schmp. Ausb. 96 g (87% d. Th.),  $R_F$  (A) = 0.95.



*Valyl-tyrosyl-prolinamid (IX):* 51.1 g VII  $\cdot \frac{1}{2} \text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$  (0.1 Mol) werden in 0.3 l Methanol gelöst und in offener Apparatur mit 3 g Palladiummohr hydriert, bis die Kohlendioxydentwicklung beendet ist (etwa 3 Stdn.). Man trennt vom Katalysator ab, dampft die Lösung i. Vak. unterhalb von 40° ein, und trocknet den Eindampfrückstand bei 1 Torr über Calciumchlorid, bis er sich pulverisieren läßt. Man gewinnt 37 g des leicht wasserlöslichen, nicht hygrokopischen Tripeptidamid-sesquihydrats (92% d. Th.).  $R_F$  (A) = 0.69,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-34.4 \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ , Methanol).



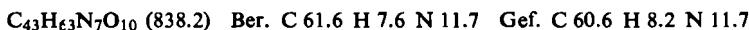
*Carbobenzoxyvalyl-N<sup>ε</sup>-BOC-lysine-methylester (VI):* Die Lösung von 27.6 g *Carbobenzoxy-valin* (0.11 Mol) und 26.0 g frisch bereitetem *N<sup>ε</sup>-BOC-Lysine-methylester*<sup>3)</sup> (0.10 Mol) in 150 ccm Acetonitril wird bei  $-10^\circ$  mit der Lösung von 22.7 g *Dicyclohexylcarbodiimid* (0.11 Mol) in 100 ccm Acetonitril versetzt. Nachdem die Mischung über Nacht bei  $+5^\circ$  gestanden hat, wird der ausgefallene *Dicyclohexylarnstoff* (18.8 g = 84% d. Th.) abgenutscht und mit 50 ccm Acetonitril gewaschen. Man dampft die vereinigten Filtrate unterhalb von 80° ein und löst den amorphen Eindampfrückstand in 0.8 l Essigester. Die mit je 0.1 l 0.5 m Zitronensäure, 1n NaHCO<sub>3</sub> und Wasser gewaschene und über Magnesiumsulfat getrocknete Lösung wird auf 0.1 l eingeengt und in der Wärme mit 0.4 l Petroläther (40–80°) versetzt. Aus der zunächst klaren Mischung kristallisiert der Dipeptidester über Nacht bei Raumtemperatur aus. Nach dem Waschen mit Petroläther wird er an der Luft getrocknet. Ausb. 38 g (77% d. Th.), Schmp. 111–113°.



*Carbobenzoxyvalyl-N<sup>ε</sup>-BOC-lysinehydrazid VIII:* 49.4 g VI (0.1 Mol) kocht man in einer Mischung von 0.5 l Methanol und 50 ccm 80-proz. Hydrazinhydrat 3 Std. unter Rückfluß, röhrt die klare Reaktionslösung in 5 l Wasser ein und stellt die Mischung mit Eisessig auf pH 8. Nach 3 stdg. Stehenlassen bei Raumtemperatur wird das mikrokristallin abgeschiedene *Hydrazid* abgesaugt, mit Wasser neutral gewaschen und bei 70° i. Vak. getrocknet: 81.5 g farbloses Pulver (84% d. Th.) vom Schmp. 180–182°.



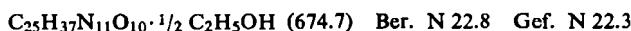
*Carbobenzoxyvalyl-N<sup>ε</sup>-BOC-lysyl-valyl-tyrosyl-prolinamid (X):* Die Lösung von 19.8 g VII (40 mMol) in 40 ccm Dimethylformamid wird bei Raumtemperatur mit 200 ccm Eisessig verdünnt. In diese Mischung trägt man bei –10° unter Röhren kurz nacheinander 44 ccm 1n *NaNO*<sub>2</sub> und 40 ccm 1n HCl und nach 2 Min. weitere 40 ccm 1n HCl ziemlich rasch ein, röhrt noch 5 Min. bei –10° und gießt die Reaktionslösung dann in 2 l Eiswasser ein. Vom harzig abgeschiedenen *Azid* wird dekantiert, dieses in eiskalter 1n NaHCO<sub>3</sub> gut abgepreßt und dekantierend mit Eiswasser gewaschen. Das feuchte, wachsartige Reaktionsprodukt und 20.2 g *Valyl-tyrosyl-prolinamid-sesquihydrat* (50 mMol) werden bei 0° unter Röhren in 200 ccm Dimethylformamid innerhalb von etwa 30 Min. in Lösung gebracht. Die trübe Mischung beläßt man 2 Tage bei +5°, saugt dann von wenig Ungelöstem ab und dampft das hellgelbe Filtrat i. Vak. ein. Das Rohprodukt wird in 50 ccm Essigester unter Erwärmung gelöst, aus dem Konzentrat mit 300 ccm Essigester als Harz ausgefällt und durch Dekantieren isoliert. Durch Lösen in 100 ccm Methanol und Einröhren der Lösung in 0.4 l Wasser wird die Verbindung schließlich pulverig erhalten. Nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen i. Vak. über Calciumchlorid Ausb. 25.2 g (60% d. Th.), Schmp. 148–153, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: –60.4 ± 1° (c = 1, Methanol), *R*<sub>F</sub> (A) nach HBr-Behandlung = 0.57, *R*<sub>F</sub> (A) nach Trifluoressigsäurebehandlung = 0.88.



*Valyl-N<sup>ε</sup>-BOC-lysyl-valyl-tyrosyl-prolinamid (XVI):* 16.8 g X (20 mMol) werden in 0.4 l Methanol in Gegenwart von 2 g Palladiummohr wie üblich hydriert. Die Methanolösung wird dann unterhalb von 40° eingedampft, der amorphe Eindampfrückstand mit 100 ccm Essigester aufgenommen und diese Lösung unter intensivem Röhren in 0.5 l Äther eingetropt. Die pulverige Fällung saugt man ab und trocknet nach dem Waschen mit Äther zunächst an der Luft, dann bei 40°/1 Torr über KOH. Ausb. 13.4 g (95% d. Th.). Das amorphe *Pentapeptidamid XVI* ist nicht hygrokopisch und kaum löslich in Wasser. Es löst sich gut in Dimethylformamid, wasserhaltigem Acetonitril und verd. Essigsäure. Schmp. 130° (Zers.). [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: –62.1 ± 2° (c = 1, Methanol), *R*<sub>F</sub> (A) = 0.93, *R*<sub>F</sub> (A) nach Trifluoressigsäurebehandlung = 0.61.



—  
*N<sup>a</sup>-Carbobenzoxy-N<sup>ω</sup>-nitro-arginyl-N<sup>ω</sup>-nitro-arginyl-prolin (XV):* Die Lösung von 43.3 g *N<sup>a</sup>-Carbobenzoxy-N<sup>ω</sup>-nitro-arginyl-N<sup>ω</sup>-nitro-arginyl-prolin-methylester*<sup>1)</sup> (XIII) (*R*<sub>F</sub> (A) = 0.91, *R*<sub>F</sub> (A) nach HBr-Behandlung = 0.60) (65 mMol) in 300 ccm 95-proz. währ. Dioxan wird mit 100 ccm 1n NaOH versetzt und die Mischung 2 Std. bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Reaktionslösung wird anschließend mit Kohlendioxyd gesättigt und unterhalb von 30° auf 100 ccm eingeengt. Man verdünnt das Konzentrat mit 400 ccm Wasser, saugt von wenig harziger Fällung ab und stellt das Filtrat mit 2n HCl auf pH 2 ein. Die amorphe Fällung wird mehrmals dekantierend mit Wasser gewaschen, zweimal mit Äthanol/Benzol (2:1) abgedampft und bei 60°/1 Torr über KOH getrocknet, bis sie pulverisierbar ist. Die in einer Ausb. von 35.0 g (78% d. Th.) erhaltene Substanz enthält noch 1/2 Äquiv. Äthanol. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: –37.7 ± 1° (c = 1, Methanol), *R*<sub>F</sub> (A) = 0.78, *R*<sub>F</sub> (D) = 0.83, Zers.-P. 105° (Sintern bei 96°).



*N<sup>a</sup>-Carbobenzoxy-N<sup>ω</sup>-nitro-arginyl-N<sup>ω</sup>-nitro-arginyl-prolyl-valyl-N<sup>ε</sup>-BOC-lysyl-valyl-tyrosyl-prolinamid:* Die auf  $-5^{\circ}$  abgekühlte Lösung von 6.75 g *XV* (10 mMol) und 1.38 ccm Triäthylamin in 150 ccm Dioxan/Dimethylformamid (1:1) wird unter intensivem Rühren mit 0.97 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* und 5 Min. danach mit der eiskalten Lösung von 7.04 g *Valyl-N<sup>ε</sup>-BOC-lysyl-valyl-tyrosyl-prolinamid (XVI)* (10 mMol) in 30 ccm 90-proz. währ. Dimethylformamid versetzt. Sofort anschließend entfernt man das Kältebad und läßt noch 2 Std. bei Raumtemperatur reagieren. Die Reaktionslösung wird unterhalb von  $50^{\circ}$  i. Vak. eingedampft, der Eindampfrückstand bei  $0^{\circ}$  mit einer Mischung von 30 ccm Methanol und 3 ccm Eisessig aufgenommen und diese Lösung in 0.3 l Wasser eingerührt. Der pulverige Niederschlag wird abgesaugt, in 80 ccm Methanol gelöst und durch Einröhren dieser Lösung in 0.6 l *n* NaHCO<sub>3</sub> erneut ausgefällt. Nach Waschen mit Wasser und Trocknen bei  $60^{\circ}/15$  Torr über KOH erhält man 10.3 g eines farblosen, amorphen Pulvers (77% d. Th.), das nicht weiter gereinigt wird. Zers.-P.  $167^{\circ}$  (Sintern bei  $147^{\circ}$ ),  $[\alpha]_D^{20} = -81.7 \pm 2^{\circ}$  ( $c = 1$ , Methanol).

$C_{60}H_{92}N_{18}O_{17}$  (1337.8) Ber. C 53.8 H 6.9 N 18.9 Gef. C 52.7 H 7.2 N 17.8

*Arginyl-arginyl-prolyl-valyl-N<sup>ε</sup>-BOC-lysyl-valyl-tyrosyl-prolinamid-trihydrochlorid-hexahydrat (XVIII):* 26.8 g des vorstehenden Rohprodukts (20 mMol) werden in 888 ccm Methanol/Wasser/Eisessig (100:10:2) in Gegenwart von 4 g Palladiummohr in offener Apparatur bis zur beendeten Kohlendioxydentwicklung und anschließend, nach Zugabe von 2 g frischem Katalysator, noch 18 Std. bei Raumtemperatur in der Schüttelente hydriert. Die vom Palladium abgetrennte Lösung wird auf 100 ccm eingeengt, mit 0.5 l 0.2-proz. Essigsäure verdünnt, filtriert und lyophilisiert. Man erhält 19.6 g farbloses, schwach hygroskopisches Pulver.  $[\alpha]_D^{20} = -72.6 \pm 1^{\circ}$  ( $c = 1$ , H<sub>2</sub>O).

Das gesamte Rohprodukt wird in 100 ccm 0.01 *m* Ammoniumacetatpuffer gelöst und auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Säule ( $7.5 \times 35$  cm) von 250 g Carboxymethylcellulose gegeben. Bei der Gradientenelution mit insgesamt 15 l 0.01–0.20 *m* Ammoniumacetatpuffer (Durchflußgeschwindigkeit 15 ccm/Min.) wird das reine Octapeptidamid im 0.15–0.18 *m* Eluat erhalten (Messung der Absorption bei 275 m $\mu$  in Fraktionen von 200 ccm) und durch dreimaliges Lyophilisieren frei von Ammoniumacetat als Triacetat-tetrahydrat isoliert. Ausb. 11.0 g (40% d. Th.).  $[\alpha]_D^{20} = -82.4 \pm 1^{\circ}$  ( $c = 1$ , H<sub>2</sub>O),  $\lambda_{\text{max}} = 275$  m $\mu$ ,  $R_F$  (A) = 0.68,  $R_F$  (D) = 0.62,  $R_F$  (A) nach Trifluoressigsäurebehandlung 0.36.

$C_{52}H_{88}N_{16}O_{11} \cdot 3 \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  (1365.8) Ber. N 16.4 H<sub>2</sub>O 5.3 Gef. N 16.4 H<sub>2</sub>O 5.5

Zur Überführung in das *Hydrochlorid* wird die Lösung des Acetats in 250 ccm Wasser bei Raumtemperatur mit 1 *n* HCl auf pH 2.2 eingestellt und sofort lyophilisiert. Nach Trocknen i. Vak. über KOH bei Raumtemperatur enthalten drei verschiedene Präparationen 3.3–3.5 Äquivv. Chlorion.  $[\alpha]_D^{20} = -81.0 \pm 1^{\circ}$  ( $c = 1$ , H<sub>2</sub>O),  $E_{5.9} = 2.3$  (Lys),  $R_F$  (A) = 0.68,  $R_F$  (B) = 0.48,  $R_F$  (C) = 0.41. Nach Trifluoressigsäurebehandlung:  $R_F$  (A) = 0.36,  $R_F$  (B) = 0.08,  $R_F$  (C) = 0.07.

Aminosäureverhältnis im Säurehydrolysat (40 Std.  $110^{\circ}$  in halbkonz. Salzsäure): Lys<sub>1.03</sub> Arg<sub>1.84</sub> Pro<sub>2.10</sub> Val<sub>2.00</sub> Tyr<sub>0.99</sub> NH<sub>31.06</sub> (vgl. S. 618 und Anm.<sup>8)</sup>).

$C_{52}H_{88}N_{16}O_{11} \cdot 3 \text{HCl} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (1330.8) Ber. N 16.8 Cl $^{\ominus}$  8.0 H<sub>2</sub>O 8.1  
Gef. N 16.7 Cl $^{\ominus}$  9.0 H<sub>2</sub>O 7.8

*N<sup>a</sup>-Carbobenzoxy-N<sup>ε</sup>-BOC-lysyl-prolyl-valyl-glycin (XI):* Die Lösung von 66.2 g *N<sup>a</sup>-Carbobenzoxy-N<sup>ε</sup>-BOC-lysyl-prolyl-valyl-glycinäthylester* (0.1 Mol)<sup>3)</sup> in 500 ccm Methanol wird mit 110 ccm 1 *n* NaOH versetzt. Nach 1 stdg. Belassen bei Raumtemperatur sättigt man das Reaktionsgemisch mit Kohlendioxyd und engt es im Rotationsverdampfer unterhalb von  $40^{\circ}$  auf  $1/3$  ein. Beim Verdünnen mit 0.8 l Wasser fällt ein harziges Nebenprodukt aus, von

<sup>8)</sup> Analytic. Chem. 30, 1190 [1958].

dem abfiltriert wird. Das Filtrat wird mit 1 m Zitronensäure auf pH 2.5 eingestellt, die Fällung in 0.8 l Essigester geschüttelt und die org. Phase mit Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Beim Verdünnen der auf 100 ccm eingeengten Essigesterlösung fällt das Verseifungsprodukt ölig aus, kristallisiert aber im Laufe einiger Std. bei Raumtemperatur durch. Nach Waschen mit Petroläther und Trocknen an der Luft werden 52 g (82% d. Th.) vom Schmp. 116–118° erhalten.  $[\alpha]_D^{20} : -81.4 \pm 2^\circ$  ( $c = 1$ , Methanol),  $R_F(A) = 0.92$ ,  $R_F(A)$  nach Trifluoressigsäurebehandlung = 0.63.



*N<sup>a</sup>-Carbobenzoxy-N<sup>e</sup>-BOC-lysyl-prolyl-valyl-glycyl-N<sup>e</sup>-BOC-lysyl-N<sup>e</sup>-BOC-lysine-methylester (XIV):* Die Mischung von 29.3 g frisch bereitetem *N<sup>e</sup>-BOC-Lysyl-N<sup>e</sup>-BOC-lysine-methylester*<sup>3)</sup> (XII) (60 mMol) in 200 ccm Acetonitril und 31.7 g XI (50 mMol) in 100 ccm Dimethylformamid wird bei –10° mit der Lösung von 11.3 g *Dicyclohexylcarbodiimid* (55 mMol) in 50 ccm Acetonitril versetzt. Nach eintägigem Stehenlassen bei 0° wird die Lösung 10 Min. zum Sieden erhitzt (um teilsweise abgeschiedenes Kondensationsprodukt in Lösung zu bringen) und heiß vom *Dicyclohexylharnstoff* abgesaugt. Der Eindampfrückstand wird in 1 l Chloroform mit 0.5 m Zitronensäure, 1 n NaHCO<sub>3</sub> und Wasser gewaschen und nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat das Lösungsmittel abgedampft. Man nimmt den harzigen Rückstand mit 200 ccm siedendem Essigester auf, filtriert von wenig *Dicyclohexylharnstoff* ab, und läßt über Nacht bei 0° kristallisieren. Das gelartig abgeschiedene Peptidderivat wird scharf abgesaugt, mit 100 ccm Essigester gewaschen und bei 60°/1 Torr über Paraffin getrocknet. Man gewinnt 44.7 g farbloses Pulver (81% d. Th.) vom Schmp. 112–114°.  $[\alpha]_D^{20} : -49.4 \pm 1.5^\circ$  ( $c = 1$ , Methanol),  $R_F(A) = 0.96$ ,  $R_F(A)$  nach Trifluoressigsäurebehandlung = 0.60,  $R_F(A)$  nach HBr-Behandlung = 0.25.



*N<sup>a</sup>-Carbobenzoxy-N<sup>e</sup>-BOC-lysyl-prolyl-valyl-glycyl-N<sup>e</sup>-BOC-lysyl-N<sup>e</sup>-BOC-lysine-hydrazid (XVII):* 50 g XIV (45 mMol) werden in einer Mischung von 50 ccm 80-proz. *Hydrazinhydrat* und 0.5 l Methanol 2 Std. unter Rückfluß gekocht. Anschließend verdünnt man die klare Reaktionslösung mit 6 l Wasser und stellt sie mit Eisessig auf pH 6 ein. Nach Aufbewahren über Nacht bei Raumtemperatur wird das ausgeschiedene *Hydrazid* abgesaugt, mit Wasser gewaschen und sofort wieder in 1.5 l siedendem Essigester gelöst. Nach Einengen der wasser-sättigten Essigesterlösung auf 0.7 l läßt man über Nacht bei 0° stehen. Das gebildete Gel wird scharf abgesaugt, mit 0.5 l Petroläther gewaschen und an der Luft getrocknet. Man erhält 39 g eines farblosen Pulvers (78% d. Th.) vom Schmp. 139–141°.  $[\alpha]_D^{20} : -56.2 \pm 2^\circ$  ( $c = 1$ , Methanol).



*N<sup>e</sup>-BOC-lysyl-prolyl-valyl-glycyl-N<sup>e</sup>-BOC-lysyl-N<sup>e</sup>-BOC-lysyl-arginyl-arginylyl-prolyl-valyl-N<sup>e</sup>-BOC-lysyl-valyl-tyrosyl-prolinamid-trihydrochlorid-tetrahydrat (II):* Die Lösung von 22.1 g XVII (20 mMol) in 250 ccm 90-proz. währ. Tetrahydrofuran wird bei –5° unter Röhren mit 22 ccm 1 m NaNO<sub>2</sub>, anschließend mit 22 ccm 1 n HCl und 5 Min. danach mit weiteren 22 ccm 1 n HCl versetzt. Nach 5 Min. neutralisiert man die überschüss. Salzsäure durch Zugabe von 3.05 ccm Triäthylamin (22 mMol) und läßt in die Reaktionslösung bei –5° die eiskalte Mischung von 13.3 g XVIII (10 mMol), 200 ccm Dimethylformamid und 1.8 ccm Triäthylamin (13 mMol) innerhalb einer Min. einlaufen. Nach zweitägigem Stehenlassen bei +5° wird das Lösungsmittel i. Vak. abgezogen, der Rückstand in 1 l Methanol gelöst und in üblicher Weise mit 8 g Palladiummohr bis zur beendeten Kohlendioxidentwicklung (ca. 5 Std.) hydriert. Nach Abdampfen des Methanols nimmt man das harzige Hydrierungsprodukt mit 0.4 l 0.1 n Essigsäure auf, filtriert die Lösung und gibt das Filtrat auf eine Säule (7.5 × 35 cm) von 250 g Carboxymethylcellulose in der H<sup>+</sup>-Form. Bei der nachfolgenden Gradientenelution 15 (ccm/

Min.) mit insgesamt 15 l 0.01–0.15 m Ammoniumacetatpuffer wird das gewünschte Peptid ( $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ m}\mu$ ) im 0.10–0.12 m Eluat erhalten und durch dreimaliges Lyophilisieren als Acetat isoliert. Ausb. 7.6 g,  $R_F$  (A) = 0.95,  $R_F$  (B) = 0.77,  $R_F$  (C) = 1.0. Kurz vor der Hauptfraktion erscheint im ca. 0.10 m Eluat ein ebenfalls bei 275 m $\mu$  absorbierendes Nebenprodukt mit  $R_F$  (A) = 0.74,  $R_F$  (B) = 0.42 und  $R_F$  (C) = 0.46.

Zur Überführung in das Hydrochlorid wird das Acetat in 0.5 l Wasser gelöst, die Lösung mit 1 n HCl bei 0° auf pH 2.2 eingestellt und sofort lyophilisiert. Auch nach mehrtägigem Trocknen bei 20°/15 Torr über KOH enthält die Substanz noch 0.5 Val freie HCl und 4 Val H<sub>2</sub>O. Die Ausb. beträgt 7.4 g (31 % d. Th.) eines farblosen, amorphen, leicht wasserlöslichen Pulvers. Das Peptidderivat ist chromatographisch und elektrophoretisch einheitlich.  $R_F$  (A) = 0.96,  $R_F$  (B) = 0.66,  $R_F$  (C) = 1.0; nach Trifluoressigsäurebehandlung:  $R_F$  (A) = 0.08,  $R_F$  (B) = 0,  $R_F$  (C) = 0.04; nach 5 Stdn. in 0.1 n HCl bei 20° (1-proz. Lösung):  $R_F$  (A) = 0.76/0.51/0.29/0.08 (ca. 2:3:2:1).  $[\alpha]_D^{20}$ : – 85.5 ± 0.5° (c = 1, H<sub>2</sub>O).

Das Aminosäureverhältnis im Hydrosysat (40 Stdn. 110° in halbkonz. Salzsäure) wurde im automatischen Aminosäureanalysator nach D. H. SPACKMANN, W. H. STEIN und S. MOORE<sup>8)</sup> bestimmt und betrug: Lys<sub>4.02</sub> Arg<sub>1.85</sub> Pro<sub>3.16</sub>Gly<sub>1.00</sub>Val<sub>3.03</sub> Tyr<sub>0.90</sub>. Die Summe der erfaßten Aminosäuren entsprach 71 % des eingesetzten Materials.

