

*Erich Wünsch, Gerhard Wendlberger und Agnes Högel*

Zur Synthese des Sekretins, I

## Darstellung der Sequenz 18–27

Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, Abteilung für Peptidchemie, München

(Eingegangen am 21. April 1971)

Die Synthese von L-Arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-glutaminy-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-leucyl-L-glutaminy-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid-hydrobromid, der verknüpfungsfähigen C-terminalen Teilsequenz 18–27 des Sekretins, wird beschrieben.

### The Synthesis of Secretin, I

#### Preparation of the Sequence 18–27

The synthesis of L-arginyl(hydrobromide)-L-leucyl-L-glutaminy-L-arginyl(hydrobromide)-L-leucyl-L-leucyl-L-glutaminy-glycyl-L-leucyl-L-valinamide hydrobromide is described. This C-terminal fragment 18–27 of secretin, being suitable for further coupling, was prepared starting from L-valinamide using either stepwise synthesis or fragment condensation due to the most appropriate conditions of synthesis.

Das Gewebshormon Sekretin wurde 1902 von *Bayliss* und *Starling*<sup>1)</sup> entdeckt und von *Jorpes* und *Mutt*<sup>2,3)</sup> 57 Jahre später in reiner Form isoliert. Die letztgenannten Autoren<sup>4)</sup> haben auch 1966 die Aminosäuresequenz aufgeklärt; Sekretin ist ein homodet-homöomeres Heptacosapeptid und zeigt in seinem Aminosäureaufbau große Ähnlichkeit mit dem Pankreas-Hormon Glucagon<sup>5)</sup>. Im einzelnen zeichnet es sich durch den hohen Gehalt an Hydroxyaminosäuren und das Auftreten von drei  $\beta$ -freien Asparaginsäureresten aus, denen eine Anhäufung von fünf basischen Aminosäuren (vier Argininreste und ein Histidin am N-terminalen Ende) entgegensteht. Aus den ungleichen Anteilen basischer bzw. saurer Aminosäuren und dem gleichzeitigen Vorliegen des Hormons als Heptacosapeptid-amid – dem eine weitere basische  $\alpha$ -Aminogruppe entspricht – resultiert ein relativ hoher isoelektrischer Punkt des Naturstoffs im pH-Bereich zwischen 10 und 11.

1) *W. M. Bayliss* und *E. H. Starling*, Proc. Roy. Soc. [London] **69**, 352 (1902).

2) *J. E. Jorpes* und *V. Mutt*, Gastroenterologia [Basel] **36**, 377 (1959).

3) *J. E. Jorpes* und *V. Mutt*, Acta chem. scand. **15**, 1790 (1961).

4) *V. Mutt* und *J. E. Jorpes*, Recent Progr. Hormone Res. **23**, 483 (1967).

5) *W. W. Bromer*, *A. Staub*, *E. R. Dillex*, *H. L. Bird*, *L. G. Sinn* und *O. K. Behrens*, J. Amer. chem. Soc. **79**, 2794 (1957).

Eine erste Totalsynthese des Sekretins wurde von Bodanszky und Mitarbb.<sup>6,7)</sup> auf zwei Wegen erreicht. In ihrer ersten Synthese bevorzugten die Autoren generell den „stufenweisen Aufbau“, in ihrer zweiten ab Sequenzbereich 14–27 Fragmentkondensation: Benzyloxycarbonyl- und tert.-Butyloxycarbonyl-aminosäure-nitro- bzw. -dinitrophenylester<sup>8,9)</sup> waren fast ausschließlich die Startmaterialien beider Synthesen, wobei die Seitenkettenfunktionen mehrfunktioneller Aminosäuren teils ungeschützt, teils „benzyl-maskiert“<sup>10–12)</sup>, die Guanidofunktion des Arginins in „Nitro-Blok-kierung“<sup>13)</sup> vorlagen.

Basierend auf unseren Erfahrungen bei der künstlichen Herstellung des Glucagons<sup>14,15)</sup> haben wir nun eine Sekretin-Synthese entwickelt, die sich der „racemisierungsfreien“ Fragmentkondensation nach dem Carbodiimid-Hydroxysuccinimid-<sup>16,17)</sup> bzw. -Hydroxybenzotriazol-Verfahren<sup>18)</sup> bedient.

In der vorliegenden Arbeit wird die Herstellung der carboxyl-endständigen Sekretin-Teilsequenz 18–27 = Fragment I beschrieben, in jeder Synthese-Phase stets die sinnvollste Verknüpfungstechnik erwägend und erprobend.

### A) Teilsequenz 23–27: BOC-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub>

(Vgl. Schema 1)

a) Z-Val-OH [27a] wurde nach der Anhydrid-Methode — wie üblich — in Z-Val-NH<sub>2</sub> [27b], dieses durch protonensolvolytische Entfernung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe in H-Val-NH<sub>2</sub>-Hydrobromid [27c-Hydrobromid] übergeführt, letzteres schließlich mit Z-Leu-OSU [26b] zu Z-Leu-Val-NH<sub>2</sub> [26-27a] kondensiert. Nachfolgende Bromwasserstoff/Eisessig-Entacylierung erbrachte H-Leu-Val-NH<sub>2</sub>-Hydrobromid [26-27b-Hydrobromid]. Dessen Umsetzung mit Z-Gln-Gly-OH [24-25b] — aus Z-Gln-OH und H-Gly-OMe nach dem Wieland-Boissonas-Vaughanschen Anhydridverfahren und anschließender alkalischer Verseifung des zunächst erhaltenen Benzyloxycarbonyl-dipeptid-esters [24-25a] zugänglich — lieferte das Acyl-tetra-peptid-amid [24-27a]. Dessen hydrogenolytische N-Demaskierung gelang ohne Komplikationen bei gleichzeitiger Titration der freiwerdenden Amino-Gruppe im pH-Bereich 5.0–5.5 mit *n* HCl. Es erwies sich allerdings als zweckmäßig, auf eine Isolierung und Charakterisierung von H-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub>-Hydrochlorid [24-27b-Hydrochlorid] zu verzichten und sofort mit BOC-Leu-OSU [23] zu BOC-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> [23-27a] umzusetzen (Weg 1).

<sup>6)</sup> M. Bodanszky und N. J. Williams, J. Amer. chem. Soc. **89**, 685 (1967).

<sup>7)</sup> M. Bodanszky, M. A. Ondetti, S. D. Levine und N. J. Williams, J. Amer. chem. Soc. **89**, 6753 (1967).

<sup>8)</sup> M. Bodanszky und M. A. Ondetti, Nature [London] **175**, 685 (1955).

<sup>9)</sup> M. Bodanszky und M. A. Ondetti, Chem. and Ind. **1966**, 26.

<sup>10)</sup> E. Sandrin und R. A. Boissonas, Helv. chim. Acta **46**, 1637 (1963).

<sup>11)</sup> C. H. Li, B. Gorup, D. Chung und J. Ramachandran, J. org. Chemistry **28**, 178 (1963).

<sup>12)</sup> E. Wünsch und A. Zwick, Chem. Ber. **97**, 2497 (1964).

<sup>13)</sup> M. Bergmann, L. Zervas und H. Rinke, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **224**, 40 (1934).

<sup>14)</sup> E. Wünsch, Z. Naturforsch. **22b**, 1269 (1967).

<sup>15)</sup> E. Wünsch und G. Wendlberger, Chem. Ber. **101**, 3659 (1968).

<sup>16)</sup> E. Wünsch und F. Drees, Chem. Ber. **99**, 110 (1966).

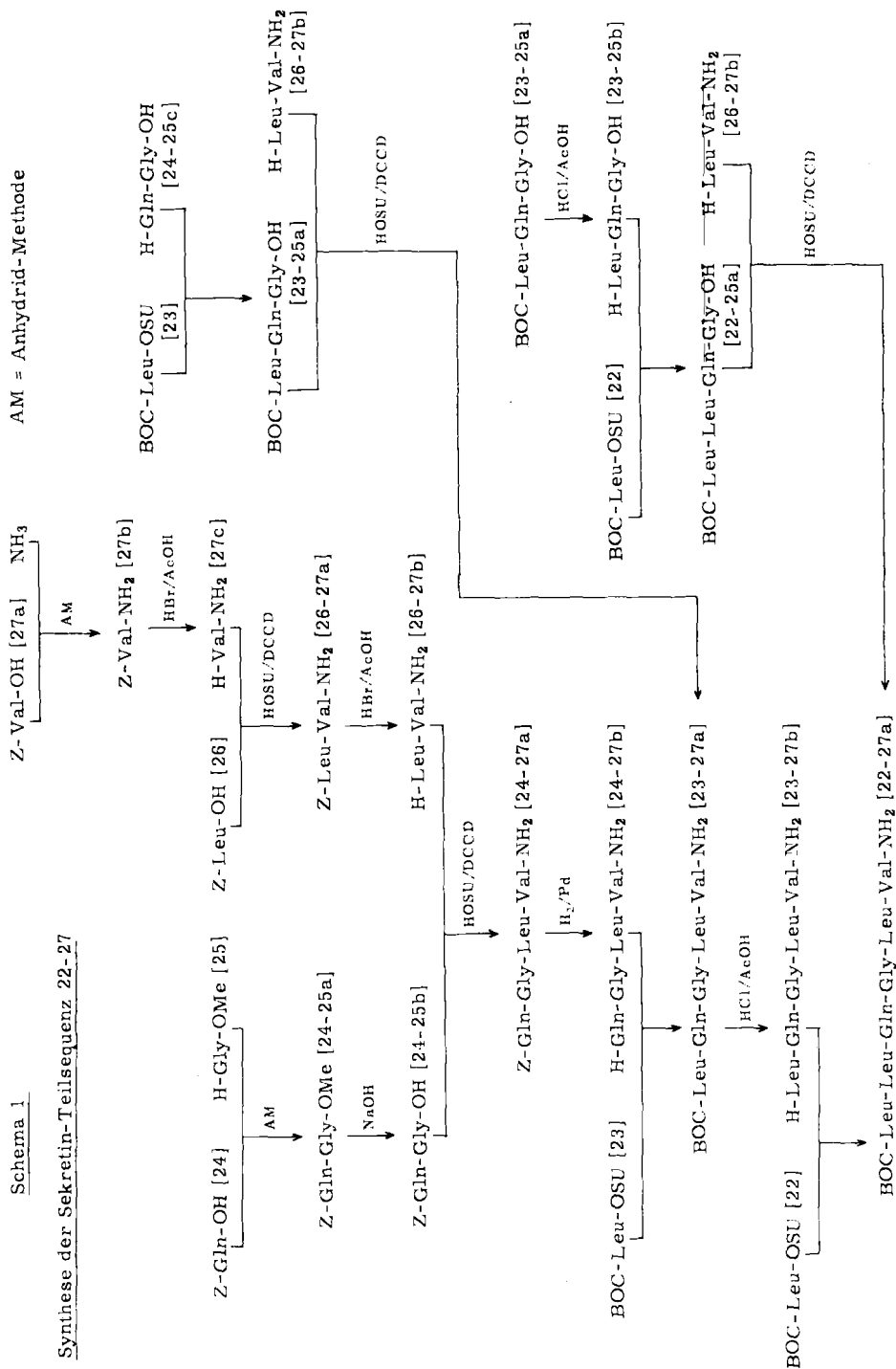
<sup>17)</sup> F. Weygand, D. Hoffmann und E. Wünsch, Z. Naturforsch. **21**, 426 (1966).

<sup>18)</sup> W. König und R. Geiger, Chem. Ber. **103**, 788 (1970).

Schema 1

## Synthese der Sekretin-Teilsequenz 22-27

AM = Anhydrid-Methode



b) Hydrogenolytische Entacylierung von Z-Gln-Gly-OH [24-25b] (s. oben Weg 1) unter „pH-Stat-Bedingungen“ (pH = 3.0; 2*n* HCl) lieferte das Dipeptid-hydrochlorid [24-25c-Hydrochlorid], welches sofort mit BOC-Leu-OSU zu BOC-Leu-Gln-Gly-OH [23-25a] vereinigt wurde. Dessen Umsetzung mit H-Leu-Val-NH<sub>2</sub> [26-27b] (s. o.) nach dem Hydroxysuccinimidester-Verfahren ergab in 79proz. Ausbeute BOC-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> [23-27a], identisch mit dem unter Weg 1 hergestellten Produkt (Weg 2).

Wegen der ungünstigen Reindarstellung von [23-25a] ist Weg 1 dem zweiten Verfahren überlegen.

### **B) Teilsequenz 22—27: BOC-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub>**

(Vgl. Schema 1)

a) Protonensolvolytische Entfernung der *N*-tert.-Butyloxycarbonyl-Gruppe vom Acyl-pentapeptid-amid [23-27a] mittels HCl/Eisessig und nachfolgende Umsetzung des resultierenden H-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub>-Hydrochlorids [23-27b-Hydrochlorid] mit BOC-Leu-OSU [22] lieferte das erwartete Hexapeptid-Derivat [22-27a] in erwünschter Reinheit (Weg 1).

b) Das durch HCl/Eisessig-Behandlung von BOC-Leu-Gln-Gly-OH [23-25a] zugängliche Tripeptid-hydrochlorid [23-25b] wurde auf üblichem Wege mit BOC-Leu-OSU zum Acyl-tetrapeptid [22-25a] kondensiert. Dessen Vereinigung mit H-Leu-Val-NH<sub>2</sub> [26-27b] gelang nach dem Hydroxysuccinimidester-Verfahren einwandfrei: BOC-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> [22-27a] konnte in 89proz. Ausbeute rein erhalten werden (Weg 2).

Da die Synthese von BOC-Leu-Gln-Gly-OH [23-25a] als Startmaterial für Weg 2 ausbeutemäßig ungünstig verläuft (s. o. a/b), ist Weg 1 der Vorrang einzuräumen.

### **C) Teilsequenz 18—27: = Fragment I: H-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub>**

(Siehe Schema 2)

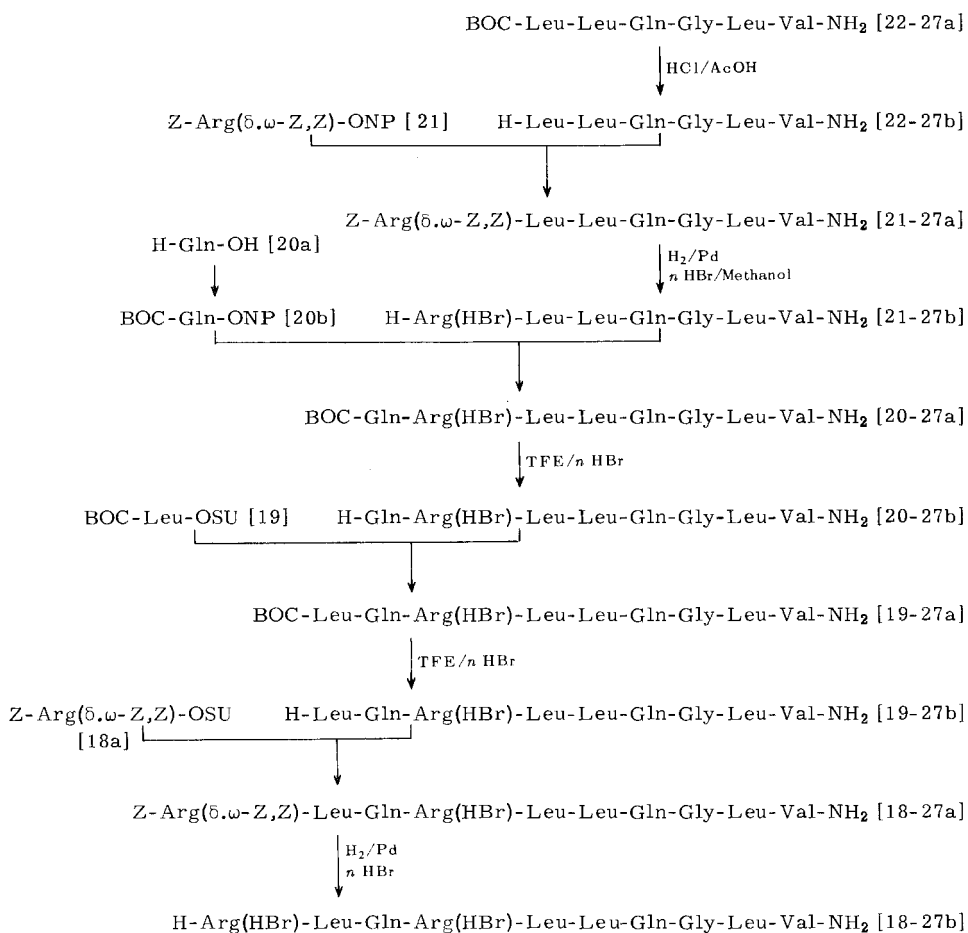
Die Darstellung von Fragment I begann mit einer HCl/Eisessig-Entacylierung von BOC-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> [22-27a]; das isolierte Hexapeptid-amid-hydrochlorid [22-27b-Hydrochlorid] wurde anschließend mit *N*<sup>α</sup>.*N*<sup>δ</sup>.*N*<sup>ω</sup>-Tris-benzyloxycarbonyl-arginin-[*p*-nitro-phenylester] [21]<sup>19)</sup> in 82proz. Ausbeute zum äußerst schwerlöslichen Z-Arg(δ.ω-Z,Z)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> [21-27a] verknüpft. Hydrogenolytische Entfernung der drei Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppen verbunden mit HBr-Titration der freigesetzten Guanido-Funktion ergab quantitativ das Heptapeptid-amid-hydrobromid-monoacetat [21-27b-Acetat].

Den Anbau des Arginin-Restes mit Benzyloxycarbonyl-arginin-hydrobromid zu vollziehen<sup>19)</sup>, gelang jedoch nur mit ca. 50proz. Ausbeute an Z-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub>.

<sup>19)</sup> E. Wünsch und G. Wendlberger, Chem. Ber. **100**, 160 (1967).

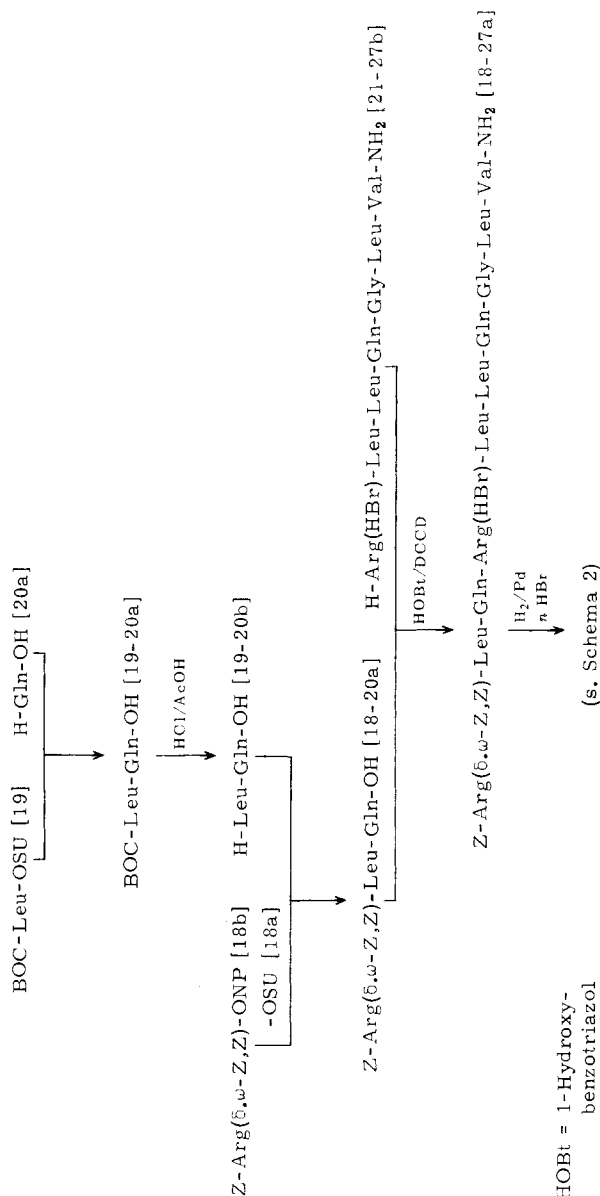
## Schema 2

## Synthese der Sekretin-Teilsequenz 18-27 (Weg 1)



a) Die weitere Erstellung des *Fragments I* geschah zunächst durch stufenweisen Anbau von BOC-Gln-OH, BOC-Leu-OH und Z-Arg( $\delta,\omega$ -Z,Z)-OH an vorstehend genanntes Heptapeptid-amid-hydrobromid [21-27b-Hydrobromid]. Die protonen-solvolytische Entacylierung des ersten „Aufstockungsproduktes“, d.i. BOC-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> [20-27a] stieß jedoch auf unerwartete Schwierigkeiten: Trotz zahlreich vorgenommener Verfahrens-Variationen — diese hatten im hiesigen Laboratorium bei früher erarbeiteten Glucagon-Teilsynthesen stets zum Erfolg geführt — gelang es nicht, der Cyclisierungs-Tendenz des amino-endständigen Glutaminrestes zu begegnen; neben dem *N*-freien Octapeptid-Derivat [20-27b] wurde die entsprechende Pyrrolidon-(5)-yl-(2)-carbonyl-Verbindung bis zu 40% im isolierten Material festgestellt. Da alle Versuche einer Auftrennung des

Schema 3

Synthese der Sekretin-Teilsequenz 18-27 (Weg 2)

Gemisches fehlschlugen, wurde die geplante stufenweise Synthese mit obigem Rohmaterial fortgesetzt. Mit der schließlich vorgenommenen „Arginin-Aufstockung“, d. h. mit der Herstellung von H-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> [18-27b], fiel ein Peptid-Derivat an, das eine Trennung von der über alle Stufen mitgeführten Pyrrolidonylcarbonyl-Verbindung erlaubte — dies allerdings unter erheblichen Materialverlusten (Weg 1).

b) König und Geiger<sup>18)</sup> hatten vor kurzem gezeigt, daß das Wünsch-Weygandsche Carbo-diimid-Hydroxysuccinimid-Verfahren vorteilhaft erweitert werden kann, wenn anstelle des *N*-Hydroxy-succinimids 1-Hydroxy-benzotriazol eingesetzt wird; diese Verfahrens-Variante soll — nach den Autoren — u.a. auch bei einer Carboxyl-aktivierung von *N*-Acyl-glutamin vorteilhaft sein.

Es erschien uns daher erfolgversprechend, die Herstellung von Fragment I aus zwei „Unterfragmenten“ zu betreiben, d.h. an die Teilsequenz [21-27b] das „glutamin-carboxyl-endständige“ Acyl-tripeptid Z-Arg( $\delta,\omega$ -Z,Z)-Leu-Gln-OH [18-20a] anzufügen (Weg 2) (siehe Schema 3).

Im stufenweisen Anbau-Verfahren wurde ausgehend von Glutamin [20a], BOC-Leu-OSU [19] und Z-Arg( $\delta,\omega$ -Z,Z)-ONP [18b] das gewünschte Tripeptid-Derivat [18-20a] in fast 60proz. Ausbeute über alle Stufen erhalten; der Einsatz von Z-Arg( $\delta,\omega$ -Z,Z)-OSU [18a] erbrachte eine zusätzliche Ausbeute-Steigerung. Die Vereinigung der „Unterfragmente“ [18-20a] und [21-27b] zu Z-Arg( $\delta,\omega$ -Z,Z)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> [18-27a] unter Anwendung der Dicyclohexylcarbo-diimid-Hydroxybenzotriazol-Technik verlief zu 70%; die anschließend erforderliche hydrogenolytische Entfernung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppen zum Decapeptid-amid [18-27b] bereitete keine Schwierigkeiten (s. Schema 3).

Den nach Weg 2 erreichten Synthese-Fortschritt des Fragments I spiegelt der Ausbeutevergleich wider: Das Decapeptid-amid-Derivat [18-27a] wurde auf Weg 1 mit 28%, auf Weg 2 dagegen mit 70% Ausbeute rein isoliert — dies in Bezug auf jeweils eingesetztes Heptapeptid-amid [21-27b].

Den *Farbwerken Hoechst AG* sind wir für umfangreiche finanzielle und materielle Unterstützung dieser und der folgenden Arbeiten zu hohem Dank verpflichtet. Ebenso danken wir der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für eine Beihilfe im Rahmen des Schwerpunktprogramms „Synthese makromolekularer Naturstoffe“.

## Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert; sie wurden in offenen Kapillaren im Apparat nach Dr. Tottoli bzw. im Gerät „Mettler FP1“ bestimmt. Die spezifischen Drehwerte wurden im lichtelektrischen Polarimeter der Fa. Zeiss ermittelt, die Werte der *D*-Linie berechnet. Der chromatographische Reinheitstest der Zwischen- und Endprodukte erfolgte nach den üblichen Verfahren der Dünnschicht- bzw. Papierchromatographie jeweils mindestens mit zwei Lösungsmittelsystemen. Die Ausführung der Aminosäureanalyse geschah nach der Methode von Stein und Moore (Beckman 120 B mit Digital-Integrator).

### Teilsequenz 23—27

1. *Benzyloxycarbonyl-L-valin-amid* [27b]: 201.5 g *Z-Val-OH* [27a] in 1500 ccm Dimethylformamid werden bei  $-15^{\circ}$  unter Rühren mit 112 ccm Triäthylamin und anschließend innerhalb von 15 Min. mit 76.8 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* versetzt. Nach weiteren 10 Min. gibt man auf einmal 60 ccm konz. NH<sub>3</sub> in 150 ccm Tetrahydrofuran zu und rührt anschließend 3 Stdn. bei  $-15^{\circ}$  sowie 12 Stdn. bei Raumtemp. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert, mit Tetrahydrofuran und viel Wasser gewaschen und getrocknet. Aus dem Filtrat erhält man nach Einengen und Versetzen mit Wasser eine zweite Fraktion. Die ver-

einigten Rohprodukte werden aus ca. 2500 ccm Äthanol umkristallisiert: farbloses Pulver vom Schmp.  $212^{\circ}$  (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+22.6 \pm 0.5^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $+26.9^{\circ}$  ( $c = 1$ , in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in n-Heptan/tert.-Butylalkohol/Eisessig (5 : 1 : 1). Ausb. 111 g (55.5%).

$C_{13}H_{18}N_2O_3$  (250.3) Ber. C 62.38 H 7.25 N 11.19 O 19.18  
Gef. C 62.24 H 7.15 N 11.33 O 19.41

2. *L-Valin-amid-hydrobromid* [27c-Hydrobromid]: 111 g *Z-Val-NH<sub>2</sub>* werden mit 200 ccm 40proz. *HBr/Eisessig* übergossen, die Mischung bei  $0^{\circ}$ , dann bei Raumtemp. insgesamt  $31\frac{1}{2}$  Stdn. stehengelassen. Nach weitgehender Entfernung des *HBr/Eisessig*-Gemisches i. Vak. und folgender azeotroper Destillation mit Toluol bringt man das Produkt durch Behandlung mit Äther zur Kristallisation. Nach mehrmaligem Auskochen mit Äther und Trocknen über  $KOH/P_4O_{10}$  bei  $10^{-2}$  Torr erhält man ein farbloses Pulver vom Schmp.  $242^{\circ}$  (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+22.4 \pm 0.5^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $+24.2^{\circ}$  ( $c = 2$ , in  $H_2O$ ). Chromatographisch rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser (3 : 1 : 1). Ausb. 87.5 g (quantitativ).

$C_5H_{13}N_2O]Br$  (197.1) Ber. C 30.47 H 6.65 Br 40.55 N 14.21 O 8.12  
Gef. C 30.28 H 6.41 Br 40.82 N 14.03 O 8.20

3. *Benzoyloxycarbonyl-L-leucyl-L-valin-amid* [26-27a]: 111.4 g *Z-Leu-OH* und 53.0 g *N-Hydroxy-succinimid* in 900 ccm Methylenchlorid werden bei  $-10^{\circ}$  mit 95 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt und anschließend 2 Stdn. bei  $-10^{\circ}$  und 12 Stdn. bei  $0^{\circ}$  gerührt. Das Filtrat vom Dicyclohexylharnstoff wird bei  $-10^{\circ}$  mit einer Lösung von 89.7 g *H-Val-NH<sub>2</sub> · HBr* und 63.8 ccm Triäthylamin in 750 ccm Dimethylformamid vereinigt. Nach 5stdg. Rühren bei  $-10^{\circ}$  und 12 Stdn. Rühren bei Raumtemp. entfernt man das Lösungsmittel durch Destillation, zum Schluß i. Vak. Den erhaltenen festen Rückstand verteilt man zwischen Essigester und Wasser; die abgetrennte Essigesterphase wird i. Vak. eingedampft. Das gewonnene Rohprodukt wird nach Umfällen aus 3000 ccm Aceton/Wasser (3 : 1) als farbloses Pulver erhalten: Schmp.  $231-232^{\circ}$  (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-24.4 \pm 0.5^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-29.7^{\circ}$  ( $c = 1.8$ , in Eisessig). Chromatographisch rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (7 : 7 : 6). Ausb. 143.5 g (90.2%).

$C_{19}H_{29}N_3O_5$  (379.5) Ber. C 60.14 H 7.70 N 11.08 O 21.08  
Gef. C 60.12 H 7.59 N 11.13 O 21.24

4. *L-Leucyl-L-valin-amid-hydrobromid* [26-27b-Hydrobromid]: 143.5 g *Z-Leu-Val-NH<sub>2</sub>* [26-27a] werden mit 250 ccm 40proz. *HBr/Eisessig* wie üblich entacyliert. Das nach Abdampfen des überschüss. Reagenzes i. Vak. erhaltene Rohprodukt wird mehrmals mit Essigester behandelt und schließlich ausgekocht. Nach Trocknen bei  $10^{-2}$  Torr über  $KOH/P_4O_{10}$  farbloses Pulver vom Schmp.  $210^{\circ}$  (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+24.2 \pm 0.5^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $+28.8^{\circ}$  ( $c = 1$ , in Eisessig). Chromatographisch rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser (3 : 1 : 1). Ausb. 121 g (96.5%).

$C_{11}H_{24}N_3O_2]Br$  (310.2) Ber. C 42.58 H 7.79 Br 25.76 N 13.54  
Gef. C 42.43 H 7.80 Br 25.81 N 13.52

5. *Benzoyloxycarbonyl-L-glutaminyglycyl-methylester* [24-25a]: Aus 140 g *Z-Gln-OH* und 69.3 g *H-Gly-OMe · HCl* nach *Wünsch* und Mitarbb.<sup>20)</sup> farbloses Pulver vom Schmp.  $175^{\circ}$ ;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-6.7 \pm 0.5^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-8.0^{\circ}$  ( $c = 1$ , in Essigsäure). Chromatographisch rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (7 : 7 : 6). Ausb. 131 g (75%).

$C_{16}H_{21}N_3O_6$  (351.4) Ber. C 54.70 H 6.02 N 11.96 O 27.32  
Gef. C 54.65 H 5.97 N 12.03 O 27.40

<sup>20)</sup> E. Wünsch, A. Zwick und E. Jaeger, Chem. Ber. **101**, 336 (1968).



6. *Benzyloxycarbonyl-L-glutaminyglycyl-L-leucyl-L-valinamid* [24-25b]: 93.6 g *Z-Gln-Gly-OMe* [24-25a] in 1000 ccm Dioxan/Wasser (5 : 2) werden wie üblich innerhalb von 2 Stdn. mit 133 ccm 2*n* *NaOH* verseift (Indikator Thymolphthalein). Nach Ansäuern mit 133 ccm 2*n* *HCl* wird das Dioxan i. Vak. entfernt, das ausgefallene Produkt nach kurzem Aufbewahren bei 0° abfiltriert und aus 1000 ccm Wasser umkristallisiert; farblose Spieße vom Schmp. 183°;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-3.1 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-3.6^\circ$  ( $c = 2$ , in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser/Pyridin (30 : 3 : 12 : 10). Ausb. 79.5 g (88.3%).

$C_{15}H_{19}N_3O_6$  (337.3) Ber. C 53.42 H 5.68 N 12.46 O 28.47  
Gef. C 53.35 H 5.72 N 12.50 O 28.42

7. *Benzyloxycarbonyl-L-glutaminyglycyl-L-leucyl-L-valinamid* [24-27a]: 101.2 g *Z-Gln-Gly-OH* [24-25b] in 750 ccm Dimethylformamid werden bei  $-15^\circ$  mit 36.3 g *N-Hydroxysuccinimid* und 65 g *Dicyclohexylcarbodiimid* unter Rühren versetzt. Man läßt das Reaktionsgemisch innerhalb 2 Stdn. auf Raumtemp. kommen, rührt 20 Stdn. bei  $25^\circ$ , kühlt auf  $-10^\circ$  und filtriert vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab. Man vereinigt das Filtrat bei  $-10^\circ$  mit einer Lösung von 88.4 g *H-Leu-Val-NH<sub>2</sub>·HBr* [26-27b-Hydrobromid] und 38.8 ccm Triäthylamin in 750 ccm Dimethylformamid und rührt nach Zugabe von 31.8 ccm *N*-Methylmorpholin 3 Stdn. bei 0° und 18 Stdn. bei Raumtemp. Das gallertig ausgefallene Reaktionsprodukt wird aufs Filter gebracht und mit reichlich Essigester digeriert. Das getrocknete Material wird mehrmals mit Wasser sorgfältig verrieben, abfiltriert, mit Äther gewaschen und schließlich mit Essigester ausgekocht. Das Filtrat vom Reaktionsansatz wird bei  $10^{-2}$  Torr zur Trockne eingedampft und aus dem erhaltenen Rückstand nach oben beschriebenen Reinigungsoperationen eine zweite Fraktion gewonnen. Nach Trocknen bei  $10^{-2}$  Torr erhält man ein farbloses Pulver vom Schmp. 239.5–240.5° (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-24.6 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-29.7^\circ$  ( $c = 1.8$ , in Essigsäure). Chromatographisch rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (7 : 6 : 6). Ausb. 136.0 g (87%).

$C_{26}H_{40}N_6O_7$  (548.7) Ber. C 56.92 H 7.35 N 15.32 O 20.41  
Gef. C 57.03 H 7.36 N 15.45 O 20.50

8. *L-Glutaminyglycyl-L-leucyl-L-valinamid-hydrochlorid* [24-27b-Hydrochlorid]: 29.4 g *Z-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub>* [24-27a], suspendiert in ca. 1500 ccm Methanol/Wasser (3 : 1), werden unter Einhaltung eines pH-Bereichs zwischen 5.0 und 5.5 (54 ccm *n* *HCl*) bis zur vollkommenen Lösung und Beendigung der CO<sub>2</sub>-Entwicklung hydriert (Pd-Schwarz). Das Filtrat wird anschließend i. Vak. auf ca. 100 ccm eingeeengt, die erhaltene Lösung des Tetrapeptid-Derivats — nach chromatographischer Reinheitskontrolle [*n*-Butanol/Eisessig/Wasser (3 : 1 : 1)] — sofort zur Synthese des Pentapeptids [23-27a] eingesetzt.

9. *tert-Butyloxycarbonyl-L-leucyl-L-glutaminyglycyl-L-leucyl-L-valinamid* [23-27a]: Die erhaltene Lösung von *H-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub>·HCl* [24-27b-Hydrochlorid] wird mit 400 ccm Dimethylformamid verdünnt und bei  $-10^\circ$  unter Rühren mit 7.6 ccm Triäthylamin, 19.7 g *BOC-Leu-OSU* und 4.35 ccm Pyridin versetzt. Nach weiteren 4 Stdn. Rühren bei  $-10^\circ$  und zweitägigem Rühren bei Raumtemp. wird i. Vak. eingedampft, der erhaltene Rückstand dreimal mit Wasser verrieben, filtriert, mit Wasser nachgewaschen, getrocknet und dreimal mit Essigester ausgekocht: farbloses Pulver vom Schmp. 233–235° (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-19.8 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-23.5^\circ$  ( $c = 1$ , in Dimethylformamid). Ausb. 29 g (86%).

$C_{29}H_{53}N_7O_8$  (627.8) Ber. C 55.48 H 8.51 N 15.62 O 20.59  
Gef. C 55.49 H 8.44 N 15.67 O 20.66

10. *L-Glutaminyglycyl-L-leucyl-L-valinamid-hydrochlorid* [24-25c-Hydrochlorid]: 149.0 g *Z-Gln-Gly-OH* [24-25b] in 3000 ccm Methanol/Wasser (4 : 1) werden wie üblich hydrogenolytisch entacyliert, wobei man mit insgesamt 221 ccm 2*n* *HCl* einen konstanten pH-Wert von 3 einhält. Das

Filtrat wird i. Vak. vom Methanol befreit, die verbliebene wäßrige Lösung des *Dipeptidhydrochlorids* (ca. 600 ccm) — nach chromatographischer Reinheitstestung [tert.-Butylalkohol/Eisessig/Wasser/Pyridin (30 : 3 : 12 : 10)] — sofort zur Synthese des Tripeptid-Derivats [23-25a] eingesetzt.

11. *tert.-Butyloxycarbonyl-L-leucyl-L-glutaminyglycyl-L-leucyl-L-glutaminyl-glycyl-L-leucyl-L-valinamid* [23-25a]: Obige Lösung — entsprechend 105.5 g *H-Gln-Gly-OH·HCl* [24-25c-Hydrochlorid] — wird bei 0° unter Rühren nacheinander mit 221 ccm 2*n* NaOH und 61.7 ccm Triäthylamin versetzt, danach mit einer Lösung von 155 g *BOC-Leu-OSU* in 34.6 ccm Pyridin und 1300 ccm Dioxan vereinigt. Man rührt 12 Stdn. bei 0°, 24 Stdn. bei Raumtemp. und fügt dann weitere 31 g *BOC-Leu-OSU* und 7 ccm Triäthylamin hinzu. Nach weiteren 24 Stdn. entfernt man das Dioxan i. Vak. und stellt die verbliebene wäßrige Lösung mit 2*n* HCl auf pH 3 ein. Die Lösung des ölig abgeschiedenen *Tripeptids* in Essigester wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und danach i. Vak. zur Trockne eingedampft. Der erhaltene, nunmehr in Essigester unlösliche Rückstand wird mehrmals mit Essigester ausgekocht und schließlich aus Wasser umkristallisiert: farbloses Pulver vom Schmp. 167—169° (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-22.0 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-26.0^\circ$  ( $c = 1$ , in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser/Pyridin (30 : 3 : 12 : 10). Ausb. 64 g (36%).

C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (416.5) Ber. C 51.92 H 7.75<sub>3</sub> N 13.45 O 26.89  
Gef. C 51.83 H 7.69 N 13.51 O 26.81

12. *tert.-Butyloxycarbonyl-L-leucyl-L-glutaminyglycyl-L-leucyl-L-valinamid* [23-27a]: 56.5 g *BOC-Leu-Gln-Gly-OH* [23-25a] und 15 g *N-Hydroxy-succinimid* in 650 ccm Dimethylformamid werden bei -15° mit 29.6 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 3 Stdn. bei -15° und 36 Stdn. bei Raumtemp. gerührt, auf -10° abgekühlt und der Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Das Filtrat vereinigt man bei -15° mit einer bei -15° hergestellten Lösung von 42.5 g *H-Leu-Val-NH<sub>2</sub>·HBr* [26-27b-Hydrobromid] und 18.9 ccm Triäthylamin in 500 ccm Dimethylformamid. Nach 3 Stdn. Rühren bei -15° und 48 Stdn. Rühren bei Raumtemp. entfernt man das Lösungsmittel bei 10<sup>-2</sup> Torr. Der erhaltene Rückstand wird mehrmals bei 40° mit Wasser digeriert und anschließend mit Äther gewaschen. Nach Trocknen bei 50° und 10<sup>-2</sup> Torr erhält man ein farbloses Pulver vom Schmp. 234—235° (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-19.4 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-23.5^\circ$  ( $c = 1$ , in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (7 : 7 : 6). Ausb. 66.5 g (78.5%).

C<sub>29</sub>H<sub>53</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub> (627.8) Ber. C 55.48 H 8.51 N 15.62 O 20.59  
Gef. C 55.32 H 8.41 N 15.71 O 20.47

### Teilsequenz 22—27

13. *L-Leucyl-L-glutaminyglycyl-L-leucyl-L-valinamid-hydrochlorid* [23-27b-Hydrochlorid]: 100.7 g *BOC-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub>* [23-27a] werden mit 320 ccm *n* HCl/Eisessig während 4 Stdn. zunächst bei 0°, dann bei Raumtemp. gespalten. Nach Abdampfen des überschüss. HCl/Eisessig i. Vak. und azeotroper Destillation mit Toluol bringt man das Produkt durch Behandlung mit Äther zur Kristallisation. Nach mehrmaligem Auskochen mit Äther und Trocknen über KOH/P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> bei 10<sup>-2</sup> Torr/50° erhält man ein farbloses amorphes Pulver:  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-32.9 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-39.5^\circ$  ( $c = 1$ , in Methanol). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (3 : 1 : 1). Ausb. 93 g (98%, berechnet für das Pentapeptid-amidhydrochlorid + 1/2 Mol Essigsäure).

C<sub>24</sub>H<sub>46</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>]Cl + 1/2 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (594.2) Ber. C 50.54 H 8.14 Cl 5.97 N 16.50 O 18.85  
Gef. C 50.53 H 8.69 Cl 5.87 N 16.30 O 18.78

14. *tert.-Butyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucyl-L-glutaminyglycyl-L-leucyl-L-valinamid-hydrat* [22-27a·H<sub>2</sub>O]: 92.1 g *H-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub>·HCl* [23-27b-Hydrochlorid] — wie oben isoliert — in 1500 ccm Dimethylformamid werden unter Rühren bei -15° nacheinander

ander mit 21.4 ccm Triäthylamin, 56 g *BOC-Leu-OSU* und 12.5 ccm Pyridin versetzt. Man rührt 3 Stdn. bei  $-15^{\circ}$  sowie 3 Tage bei Raumtemp. und dampft anschließend das gallertig gewordene Reaktionsgemisch weitestgehend i. Vak. ein. Der Rückstand wird sorgfältig nacheinander mit Äther und Wasser digeriert, mit Essigester ausgekocht und bei  $10^{-2}$  Torr/ $50^{\circ}$  getrocknet: farbloses Pulver vom Schmp.  $254^{\circ}$  (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-31.4 \pm 0.5^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-37.4^{\circ}$  ( $c = 1$ , in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser/Pyridin (30 : 3 : 12 : 10). Ausb. 106 g (90%).

$C_{35}H_{64}N_8O_9 \cdot H_2O$  (759.0) Ber. C 55.39 H 8.77 N 14.77 Gef. C 55.41 H 8.55 N 14.55

15. *L-Leucyl-L-glutaminyl-glycin-hydrochlorid* [23-25b-Hydrochlorid]: 19.5 g *BOC-Leu-Gln-Gly-OH* [23-25a] werden, wie unter 13. beschrieben, mit 100 ccm *n HCl*/Eisessig behandelt und aufgearbeitet. Die sehr hygroskopische Substanz — [chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser/Pyridin (30 : 3 : 12 : 10)] — wird ohne Charakterisierung weiterverarbeitet: Ausb. 16.5 g (quantitativ).

16. *tert.-Butyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucyl-L-glutaminyl-glycin* [22-25a]: 16.5 g *H-Leu-Gln-Gly-OH \cdot HCl* [23-25b-Hydrochlorid] in 550 ccm Dimethylformamid/Wasser (ca. 3 : 1) werden unter Rühren nacheinander mit 13.1 ccm Triäthylamin, 16.4 g *BOC-Leu-OSU* und 3.8 ccm Pyridin versetzt. Nach 3 Stdn. Rühren bei  $-10^{\circ}$  und 3 Tagen bei Raumtemp. wird i. Vak. zur Trockne gebracht. Der erhaltene Rückstand wird mit Wasser sorgfältig digeriert, mit Äther gewaschen und schließlich mit Essigester ausgekocht. Nach Trocknen bei  $50^{\circ}$  erhält man ein farbloses amorphes Pulver vom Schmp.  $189-190^{\circ}$  (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-33.0 \pm 0.5^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-39.5^{\circ}$  ( $c = 1$ , in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (3 : 1 : 1). Ausb. 17.3 g (70%).

$C_{24}H_{43}N_5O_8$  (529.6) Ber. C 54.42 H 8.18 N 13.22 Gef. C 54.49 H 8.22 N 13.26

17. *tert.-Butyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucyl-L-glutaminyl-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid* [22-27a]: 13.5 g *BOC-Leu-Leu-Gln-Gly-OH* [22-25a] und 2.94 g *N-Hydroxy-succinimid* in 250 ccm Dimethylformamid werden bei  $-15^{\circ}$  mit 5.8 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt und 3 Stdn. bei  $-10^{\circ}$  sowie 12 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Nach Abkühlen auf  $0^{\circ}$  filtriert man vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und fügt zum Filtrat bei  $-10^{\circ}$  eine Lösung von 8 g *H-Leu-Val-NH\_2 \cdot HBr* [26-27b-Hydrobromid] und 3.5 ccm Triäthylamin in 60 ccm Dimethylformamid sowie 2.1 ccm Pyridin. Man rührt weitere 2 Stdn. bei  $-10^{\circ}$  und 12 Stdn. bei Raumtemp., dampft bei  $10^{-2}$  Torr zur Trockne ein, digeriert den erhaltenen Rückstand zunächst mit Wasser und dann mit Methanol/Wasser (1 : 1) und kocht das staubtrockene Produkt zum Schluß mit Essigester aus. Nach Trocknen bei  $50^{\circ}/10^{-2}$  Torr wird ein farbloses amorphes Pulver vom Schmp.  $255^{\circ}$  (Zers.) erhalten:  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-31.5 \pm 0.5^{\circ}$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-37.8^{\circ}$  ( $c = 1$ , in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in *n*-Heptan/*tert.*-Butylalkohol/Eisessig (5 : 1 : 1). Ausb. 17 g (89%).

$C_{35}H_{64}N_8O_9$  (741.0) Ber. C 56.74 H 8.71 N 15.12 Gef. C 56.54 H 8.78 N 15.26

### Teilsequenz 18—27

18. *L-Leucyl-L-leucyl-L-glutaminyl-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid-hydrochlorid* [22-27b-Hydrochlorid]: 115.8 g *BOC-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH\_2* [22-27a] werden mit 300 ccm *n HCl*/Eisessig wie üblich entacyliert und aufgearbeitet. Nach Umfällen aus Dimethylformamid/Essigester und Trocknen über  $KOH/P_4O_{10}$  bei  $10^{-2}$  Torr/ $50^{\circ}$  erhält man ein farbloses amorphes Pulver: chromatographisch rein (Whatman Nr. 1) in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (3 : 1 : 1). Ausb. 97 g (92%).

$C_{30}H_{57}N_8O_7 \cdot Cl$  (677.3) Ber. C 53.20 H 8.48 Cl 5.24 N 16.63

Gef. C 53.11 H 8.63 Cl 5.16 N 16.55

19.  $N^{\alpha},N^{\delta},N^{\omega}$ -Tris-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-leucyl-L-leucyl-L-glutaminyl-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid [21-27a]: 77.0 g *H-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub>·HCl* [22-27b-Hydrochlorid] werden unter Rühren bei 40° langsam in 1200 ccm Dimethylformamid/Hexamethylphosphorsäuretriamid (10 : 1) eingetragen und nach erfolgter Lösung bei 0° mit 15.7 ccm Triäthylamin versetzt. Danach fügt man 89.7 g *Z-Arg(δ.ω-Z,Z)-ONP* [21]<sup>19</sup> hinzu und rührt weitere 12 Stdn. bei 0° sowie 4 Tage bei Raumtemp. Das gallertige Reaktionsgemisch wird bei 10<sup>-2</sup> Torr weitgehend eingedampft und der Rückstand mit Äther behandelt. Nach halbtägigem Aufbewahren bei -10° filtriert man das nun flockige Produkt ab, digeriert mehrmals mit Wasser, kocht das getrocknete Material mit Essigester aus und trocknet schließlich bei 50°/10<sup>-2</sup> Torr: farbloses Pulver vom Schmp. 257° (Zers.), Ausb. 112.4 g (82%).

$C_{60}H_{86}N_{12}O_{14}$  (1199.4) Ber. C 60.08 H 7.23 N 14.02 Gef. C 60.00 H 7.29 N 14.16

20. *L-Arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-leucyl-L-glutaminyl-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid-acetat* [21-27b-Acetat]: 101.7 g *Z-Arg(δ.ω-Z,Z)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub>* [21-27a] werden in 3000 ccm *Eisessig* suspendiert und bis zur völligen Lösung mit katalytisch erregtem *Wasserstoff* (Pd-Schwarz) behandelt. Das Filtrat wird i. Vak. eingedampft, die Lösung des zähen Rückstands in 1000 ccm Methanol/Wasser (9 : 1) nach Titration mit 84.8 ccm *n* methanolischer *HBr*-Lösung sofort in ca. 3000 ccm Äther eingebracht. Man filtriert das flockig abgeschiedene Produkt ab und trocknet es bei 60°/10<sup>-2</sup> Torr: farbloses amorphes Pulver:  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-34.4 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-41.0^\circ$  ( $c = 1$ , in Essigsäure). Chromatographisch rein (Whatman Nr. 1) in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (3 : 1 : 1). Ausb. 80 g (quantitativ).

$C_{36}H_{70}N_{12}O_8$ ]Br,  $CH_3CO_2$  (938.0) Ber. C 48.66 H 7.84 Br 8.52 N 17.92 O 17.06  
Gef. C 48.92 H 8.04 Br 8.49 N 18.12 O 17.15

21. *L-Arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-glutaminyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-leucyl-L-glutaminyl-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid-hydrobromid* [18-27b-Hydrobromid] (Fragment I)

#### Weg I

a) *tert.-Butyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-leucyl-L-glutaminyl-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid* [20-27a]: 80.6 g *H-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub>·AcOH* [21-27b-Acetat] in 1150 ccm Dimethylformamid/Hexamethylphosphorsäuretriamid (1 : 0.15) werden bei 0° mit 33 g *BOC-Gln-ONP* versetzt und nach 24stdg. Rühren auf Raumtemp. gebracht. Zur Vervollständigung der Umsetzung fügt man innerhalb von weiteren 6 Tagen unter Rühren bei Raumtemp. anteilweise weitere 11 g *BOC-Gln-ONP* hinzu. Danach dampft man das Reaktionsgemisch bei 10<sup>-2</sup> Torr weitgehend ein und behandelt den Rückstand mit 3000 ccm Essigester. Das erhaltene feste Produkt wird aus Dimethylformamid/Essigester umgefällt; nach Trocknen bei 10<sup>-2</sup> Torr/50° farbloses Pulver vom Schmp. 255° (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-50.3 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-58.0^\circ$  ( $c = 1$ , in 80proz. Essigsäure). Chromatographisch rein (Whatman Nr. 1) in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (3 : 1 : 1). Ausb. 84 g (88%).

$C_{46}H_{85}N_{14}O_{12}$ ]Br (1106.2) Ber. C 49.94 H 7.75 Br 7.22 N 17.73  
Gef. C 49.71 H 7.78 Br 7.25 N 17.68

Aminosäureanalyse:	Arg	Gln	Gly	Val	Leu
Ber.	1.0	2.0	1.0	1.0	3.0
Gef.	0.96	1.98	1.01	1.01	3.03

b) *L-Glutaminyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-leucyl-L-glutaminyl-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid-hydrobromid* [20-27b-Hydrobromid]: 40 g *BOC-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub>* [20-27a] werden bei -10° mit 300 ccm *Trifluoressigsäure*/60 ccm *n* *HBr* übergossen und unter Rühren langsam auf Raumtemp. erwärmt. Nach 2 Stdn. wird die wäßrige *Trifluoressigsäure* unterhalb 20° i. Vak. entfernt, der Rückstand mit Äther behandelt, das feste Produkt abfiltriert und bei 50°/10<sup>-2</sup> Torr über *KOH/P<sub>4</sub>O<sub>10</sub>* getrocknet. Ausb. 32.6 g.

Ein chromatographischer Test des erhaltenen Produkts in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (3 : 1 : 1) zeigte neben einem ninhydrin-positiven einen ninhydrin-negativen Fleck mit höherem  $R_F$ -Wert; dieses Nebenprodukt erwies sich als das Pyrrolidon-(5)-yl-(2)-carbonyl-Derivat des Heptapeptid-amids [21-27b]; es wurde später bei der Reinigung des Decapeptid-amids [18-27b] isoliert (s. dort) und durch Aminosäure- und Elementaranalyse identifiziert. Da eine völlige Abtrennung des Pyrrolidonylcarbonyl-Derivats mißlang, wurde in den folgenden Stufen jeweils mit dem Rohprodukt gearbeitet.

c) *tert*.-Butyloxycarbonyl-*L*-leucyl-*L*-glutaminyl-*L*-arginyl(hydrobromid)-*L*-leucyl-*L*-leucyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-leucyl-*L*-valin-amid [19-27a]: 32.6 g *H*-Gln-Arg(*HBr*)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub>·*HBr* [20-27b-Hydrobromid] (obiges Rohprodukt) und 12 g *BOC*-Leu-OSU in wenig Dimethylformamid werden bei  $-10^\circ$  mit 4.2 ccm Triäthylamin versetzt und 12 Stdn. bei  $0^\circ$  gerührt. Unter Rühren bei Raumtemp. versetzt man erneut innerhalb von 2 Tagen anteilweise mit insgesamt 10.5 g *BOC*-Leu-OSU. Anschließend läßt man das Reaktionsgemisch in 4000 ccm Essigester einfließen; das ausgefallene Produkt wird abfiltriert und mit Essigester nachgewaschen. Nach Umfällen aus Dimethylformamid/Essigester digeriert man das gewonnene Material sorgfältig mit 80proz. Äthanol. Ausb. 25.6 g.

Aminosäureanalyse:	Arg	Gln	Gly	Val	Leu
Ber.	1.0	2.0	1.0	1.0	4.0
Gef.	0.99	2.09	1.03	0.99	3.89

d) *L*-Leucyl-*L*-glutaminyl-*L*-arginyl(hydrobromid)-*L*-leucyl-*L*-leucyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-leucyl-*L*-valin-amid-hydrobromid [19-27b-Hydrobromid]: 9.2 g des nach c) erhaltenen Rohprodukts werden mit 300 ccm *Trifluoressigsäure* und 8 ccm *n HBr*, wie unter b) beschrieben, entacyliert und aufgearbeitet. Ausb. 7.45 g.

e)  $N^\alpha.N^\delta.N^\omega$ -*Tris*-benzyloxycarbonyl-*L*-arginyl-*L*-leucyl-*L*-glutaminyl-*L*-arginyl(hydrobromid)-*L*-leucyl-*L*-leucyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-leucyl-*L*-valin-amid [18-27a]: 5.5 g des nach d) erhaltenen Rohprodukts und 3 g *Z*-Arg( $\delta,\omega$ -*Z,Z*)-OSU in 200 ccm Dimethylformamid werden unter Rühren bei  $-10^\circ$  mit 0.64 ccm Triäthylamin und nach wenigen Min. mit 0.5 ccm *N*-Methyl-morpholin versetzt. Nach 5 Stdn. Rühren bei  $0^\circ$  und 48 Stdn. bei Raumtemp. läßt man das Reaktionsgemisch in 750 ccm heißen Essigester einfließen. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert und anschließend mit 200 ccm Methanol/Wasser (1 : 1) unter Rühren behandelt. Das aufs Filter gebrachte und mit Essigester sorgfältig gewaschene Material wird schließlich mit wäßrigem Dimethylformamid digeriert und dann i. Hochvak. getrocknet. Ausb. 5.2 g.

f) *L*-Arginyl(hydrobromid)-*L*-leucyl-*L*-glutaminyl-*L*-arginyl(hydrobromid)-*L*-leucyl-*L*-leucyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-leucyl-*L*-valin-amid-hydrobromid [18-27b-Hydrobromid]: 7.9 g des nach e) erhaltenen Rohprodukts werden in 600 ccm 80proz. Essigsäure wie üblich hydrogenolytisch entacyliert. Das Filtrat wird i. Vak. zur Trockne eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit 9.4 ccm *n HBr* titriert. Die wäßrige Lösung wird mit *n*-Butanol unter Zusatz von einigen ccm Essigsäure geschüttelt, die abgetrennte wäßrige Phase i. Vak. zur Trockne eingedampft und der erhaltene Rückstand aus Methanol/Essigester umkristallisiert:  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-49.5 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-59.6^\circ$  ( $c = 1$ , in 80proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (3 : 1 : 1). Ausb. 5.5 g.

$C_{53}H_{102}N_{19}O_{12}Br_3 \cdot H_2O$ (1455.3)	Ber.	C 43.74	H 7.20	N 18.29
	Gef.	C 43.56	H 7.48	N 18.13

Aminosäureanalyse:	Arg	Gln	Gly	Val	Leu
Ber.	2.0	2.0	1.0	1.0	4.0
Gef.	2.05	2.01	1.00	0.99	3.92

## Weg 2

g) *tert.-Butyloxycarbonyl-L-leucyl-L-glutamin* [19-20a]: 51.1 g *H-Gln-OH*, suspendiert in 800 ccm Wasser/Dioxan (2 : 1), werden unter Rühren und Eiswasserkühlung mit 175 ccm 2*n* NaOH, wobei Lösung erfolgt, und anschließend mit 49.2 g *BOC-Leu-OSU* in 500 ccm Dioxan versetzt. Man rührt 3 Stdn. bei 0° und weitere 3 Tage bei Raumtemp. Nach Ansäuern mit 60 ccm 2*n* HCl auf pH 6 entfernt man das Dioxan i. Vak. und säuert mit weiteren 115 ccm 2*n* HCl auf pH 2.5 an. Alsdann extrahiert man die wäßrige Lösung erschöpfend mit Essigester, wäscht die abgetrennte organische Phase eiskalt mit sehr verd. Schwefelsäure, anschließend sorgfältig mit Wasser, trocknet über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und dampft i. Vak. zur Trockne ein. Nach zwei- bis dreimaligem Umfällen aus Essigester/Diisopropyläther erhält man nach Trocknen i. Vak. über P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> bei 35° ein farbloses Pulver: Schmp. 187–188° (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-21.6 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-25.5^\circ$  ( $c = 1$ , in Äthanol). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (30 : 3 : 12 : 10). Ausb. 48 g (89%).

C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (359.4) Ber. C 53.47 H 8.13 N 11.69 O 26.71

Gef. C 53.49 H 8.23 N 11.34 O 26.64

h) *L-Leucyl-L-glutamin-hydrochlorid* [19-20b-Hydrochlorid]: 7.19 g *BOC-Leu-Gln-OH* [19-20a] werden wie üblich mit 50 ccm *n* HCl/Essigsäure entacyliert (90 Min.). Nach Eindampfen der Reaktionslösung i. Vak. digeriert man den verbleibenden Rückstand sorgfältig mit Äther. Farbloses Pulver nach Trocknen über KOH/P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> bei 10<sup>-2</sup> Torr, Schmp. 202–203° (Zers.); chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60 : 6 : 24 : 20). Ausb. 5.9 g (quantitativ).

j) *N<sup>α</sup>.N<sup>δ</sup>.N<sup>ω</sup>-Tris-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-leucyl-L-glutamin*<sup>+</sup> [18-20a]: α) Eine Suspension von 1.48 g *H-Leu-Gln-OH · HCl* [19-20b-Hydrochlorid] in 25 ccm Dioxan/Wasser (9 : 1) wird bei 0° unter Rühren mit 5 ccm 2*n* NaOH versetzt. Zu der erhaltenen Lösung gibt man 2.8 g *Z-Arg(δ,ω-Z,Z)-ONP* in 20 ccm Dioxan/Wasser (9 : 1), rührt 3 Stdn. bei 0° und 3 Tage bei Raumtemp. Nach Ansäuern mit 5 ccm 2*n* HCl (pH 3) verdünnt man mit 200 ccm Wasser. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert, mit Wasser digeriert und nach Trocknen i. Vak. sorgfältig mit Essigester ausgekocht: farbloses Pulver vom Schmp. 178–179.5° (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-18.8 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-20.2^\circ$  ( $c = 1$ , in Essigsäure). Chromatographisch rein in Essigester/2proz. Essigsäure. Ausb. 2.13 g (65%).

C<sub>41</sub>H<sub>51</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub> (817.9) Ber. C 60.21 H 6.29 N 11.99 O 21.52

Gef. C 59.96 H 6.76 N 11.80 O 21.55

β) 97.8 g *Z-Arg(δ,ω-Z,Z)-OSU* in 4000 ccm Dioxan werden bei 10° unter Rühren mit 47.9 g *H-Leu-Gln-OH · HCl* [19-20b-Hydrochlorid] und 12.2 g NaHCO<sub>3</sub> in 162 ccm 2*n* NaOH und 1500 ccm Wasser versetzt. Man rührt weitere 12 Stdn. bei Raumtemp., entfernt das Dioxan i. Vak. und säuert die verbleibende Lösung mit *n* HCl an (pH 3). Der ausgefallene Niederschlag wird abfiltriert und aus Dimethylformamid/Essigester umgefällt: Schmp. 185 bis 187°;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-17.3 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-19.8^\circ$  ( $c = 1$ , in Essigsäure). Chromatographisch rein in *n*-Heptan/*tert.*-Butylalkohol/Eisessig (3 : 1 : 1). Ausb. 84.2 g (71%).

C<sub>41</sub>H<sub>51</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub> (817.9) Ber. C 60.21 H 6.29 N 11.99 O 21.51

Gef. C 59.99 H 6.32 N 12.00 O 21.45

Aminosäureanalyse: Arg Leu Gln

Ber. 1.0 1.0 1.0

Gef. 1.00 0.99 1.00

k) *N<sup>α</sup>.N<sup>δ</sup>.N<sup>ω</sup>-Tris-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-leucyl-L-glutaminyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-leucyl-L-glutaminyl-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid* [18-27a]: 1.438 g *H-Arg-(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> · HBr* [21-27b-Hydrobromid] in 50 ccm Dimethyl-

formamid werden bei 0° unter Rühren mit 0.21 ccm Triäthylamin versetzt. Nach Zugabe von 1.23 g *Z-Arg(δ.ω-Z,Z)-Leu-Gln-OH* [18-20a] in 50 ccm Dimethylformamid und 0.203 g *l-Hydroxy-benzotriazol* kühlt man auf -20° ab, fügt 0.310 mg *Dicyclohexylcarbodiimid* hinzu, rührt 1 Stde. bei -20° und 7 Tage bei Raumtemp. und läßt anschließend in 300 ccm Äther einfließen. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert, mehrmals mit Wasser digeriert, über P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> i. Vak. getrocknet und schließlich mit Essigester ausgekocht: Farbloses Pulver,  $[\alpha]_{546}^{20}$ : -35.2 ± 0.5° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : -42.19° (*c* = 1, in 80proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in Isoamylalkohol/Pyridin/Wasser (35 : 35 : 30). Ausb. 1.7 g (70%).

C<sub>77</sub>H<sub>118</sub>N<sub>19</sub>O<sub>18</sub>]Br (1677.2) Ber. C 55.12 H 7.09 Br 4.74 N 15.86  
Gef. C 54.86 H 7.20 Br 4.76 N 15.85

Aminosäureanalyse:	Arg	Gln	Gly	Val	Leu
Ber.	2.0	2.0	1.0	1.0	4.0
Gef.	1.88	2.01	1.00	1.00	3.95

l) *L-Arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-glutaminyll-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-leucyl-L-glutaminyll-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid-hydrobromid* [18-27b-Hydrobromid]

21.8 g des nach k) erhaltenen *Decapeptid-amids* [18-27a] werden in 2000 ccm 80proz. Essigsäure wie üblich hydrogenolytisch entacyliert. Das Filtrat wird unter Eiskühlung mit 26 ccm *n HBr* versetzt und i. Vak. zur Trockne gebracht. Nach zweimaligem Umkristallisieren des Rückstands aus Methanol/Essigester (1 : 2):  $[\alpha]_{546}^{20}$ : -51.3 ± 0.5° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : -61.9° (*c* = 1, in 80proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (3 : 1 : 1). Ausb. 19.3 g (quantitativ, ber. für ein Peptid-amid-trihydrat).

C<sub>53</sub>H<sub>102</sub>N<sub>19</sub>O<sub>12</sub>]Br<sub>3</sub> · 3 H<sub>2</sub>O (1491.3) Ber. C 42.68 H 7.30 N 17.85  
Gef. C 42.80 H 6.93 N 17.96

Aminosäureanalyse:	Arg	Gln	Gly	Val	Leu
Ber.	2.00	2.00	1.00	1.00	4.00
Gef.	2.01	2.04	1.00	1.01	4.05

[160/71]