

Erich Wünsch, Gerhard Wendlberger und Paul Thamm

Zur Synthese des Sekretins, II¹⁾

Darstellung der Sequenz 12–27

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-arginyl(hydrobromid)-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-alanyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-glutaminyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-leucyl-L-glutaminyl-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid-hydrobromid (= Fragment II) der amino-freien, sonst allseits geschützten Sequenz 12–27 des Sekretins, aufbauend auf der früher synthetisierten Sequenz 18–27, wird beschrieben.

The Synthesis of Secretin, II¹⁾

Preparation of the Sequence 12–27

The synthesis of L-arginyl(hydrobromide)-L-leucyl-L-arginyl(hydrobromide)-L-aspartyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-alanyl-L-arginyl(hydrobromide)-L-leucyl-L-glutaminyl-L-arginyl(hydrobromide)-L-leucyl-L-leucyl-L-glutaminyl-glycyl-L-leucyl-L-valinamide hydrobromide is described. This fully side-chain protected hexadecapeptideamide (fragment 12–27 of secretin) was prepared starting from the fragment 18–27, which was described earlier, and could easily be purified by gelfiltration on Sephadex in aqueous solutions due to the presence of four watersoluble arginine hydrobromide moieties.

In der vorstehenden Mitteilung¹⁾ haben wir über die Darstellung der *N*-freien Sekretin-Teilsequenz 18–27 berichtet. Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es sein, das Sekretin-Teilstück 12–27 in einer verknüpfungsfähigen Form aufzubauen: Damit wäre das Kernstück einer neuen Totalsynthese des pankreas-anregenden Hormons erarbeitet.

Diese Teilsequenz 12–27 weist alle vier Argininreste in der Peptidkette auf — in seiner „guanido-protonierten“ Form müßte dieses Teilstück die noch folgenden Verknüpfungswege vor allen Dingen hinsichtlich der Löslichkeit günstig beeinflussen.

Unser Syntheseplan sah zunächst den Aufbau einer mit dem früher beschriebenen Fragment I zur Verknüpfung geeigneten Teilsequenz 14–17 vor:

Ausgehend von Alanin-methylester [17] wurde durch Vereinigung mit Z-Ser(tBu)-OSU [16]²⁾ der Benzyloxycarbonyl-dipeptid-ester [16-17a] hergestellt; dessen alkalische Verseifung und katalytische Hydrogenolyse des intermediären Acyl-dipeptids [16-17b] ergab das leicht zur Diketopiperazin-Bildung neigende H-Ser(tBu)-Ala-OH

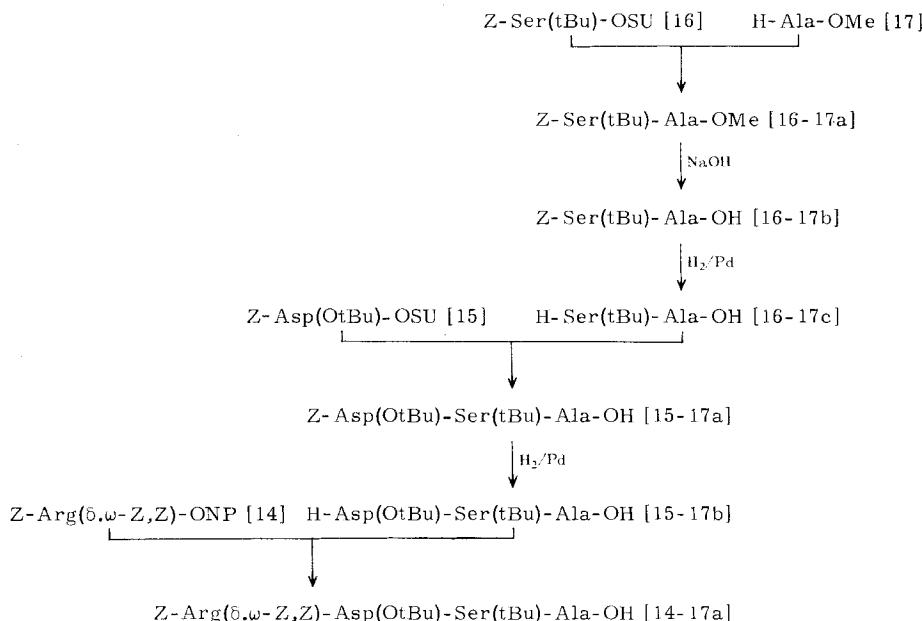
¹⁾ I. Mitteil.: E. Wünsch, G. Wendlberger und A. Högel, Chem. Ber. 104, 2430 (1971), vorstehend.

²⁾ E. Wünsch, A. Zwick und A. Fontana, Chem. Ber. 101, 326 (1968).

[16-17c]. Stufenweiser Anbau von Z-Asp(OtBu)-OSU [15]³⁾ bzw. Z-Arg(δ,ω-Z,Z)-ONP [14]⁴⁾ führte über die beiden Tripeptid-Derivat-Zwischenstufen [15-17a] und [15-17b] zum gewünschten Z-Arg(δ,ω-Z,Z)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Ala-OH [14-17a] — als mikrokristallines Pulver, chromatographisch und analytisch rein, in 63 proz. Ausbeute über alle Stufen erhalten (vgl. Schema 1).

Schema 1

Synthese der Sekretin-Teilsequenz 14-17



Die angestrebte Verknüpfung der beiden Teilstücke [14-17a] und [18-27b · HBr] gelang unter Anwendung der Carbodiimid-Hydroxysuccinimid-Technik eindeutig: Z-Arg(δ,ω-Z,Z)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂ [14-27a] wurde in 76 proz. Ausbeute und höchster Reinheit isoliert.

Einwirkung von katalytisch erregtem Wasserstoff auf [14-27a] führte zur gewünschten Entfernung der drei Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppen; nach Neutralisation der freigewordenen Guanidogruppe mit *n* HBr konnte H-Arg(HBr)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂ · HBr [14-27b · HBr] chromatographisch und analytisch rein in Form feiner, farbloser Kristalle isoliert werden (s. Schema 2).

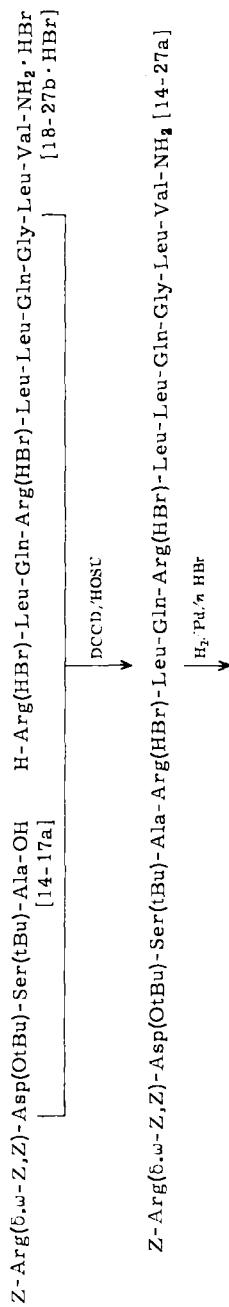
3) E. Wünsch und A. Zwick, Chem. Ber. **99**, 105 (1966).

4) E. Wünsch und G. Wendlberger, Chem. Ber. **100**, 160 (1967).

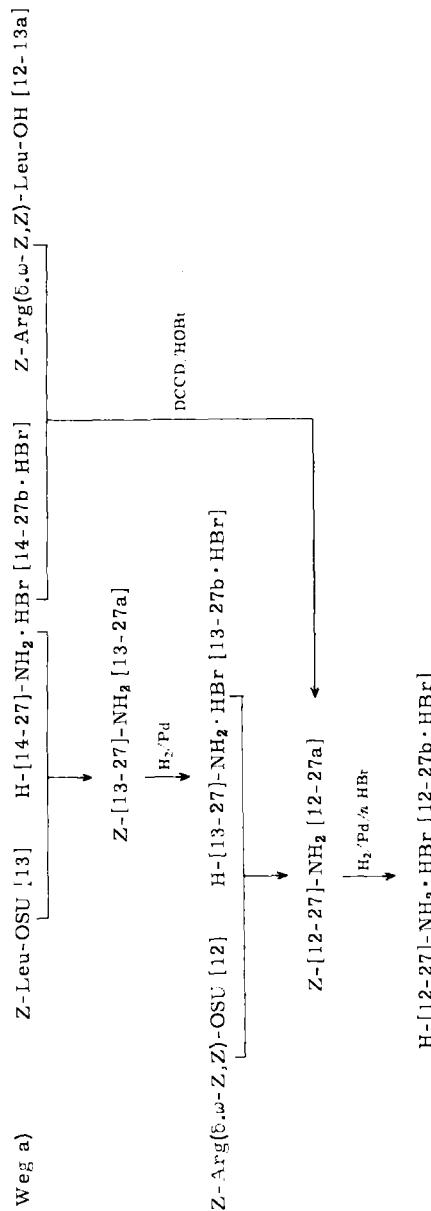
5) G. W. Anderson, J. E. Zimmerman und F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **86**, 1839 (1964).

6) G. W. Anderson, J. E. Zimmerman und F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **86**, 1839 (1964).

Schema 2: Synthese der Sekretin-Teilsequenz 14-27



Schema 3: Synthese der Sekretin-Teilsequenz 12-27 (Fragment II)



Zur Darstellung von Fragment II, d.h. der Sekretin-Teilsequenz 12-27, schien der stufenweise Anbau von Z-Leu-OSU [13]⁵⁾ bzw. Z-Arg(δ,ω-Z,Z)-OSU [12]⁶⁾ an das oben beschriebene Tetradecapeptid-Derivat [14-27b·HBr] die folgerichtige Entscheidung zu sein: In der Tat waren die Ergebnisse zunächst erfreulich, die beiden Pentadecapeptid-Derivate [13-27a] und [13-27b] in bester Reinheit und hoher Ausbeute isolierbar, die Hexadecapeptid-Derivate (nach erfolgter Anknüpfung der Arginin-Kopfkomponente [12]) letztlich dank der ausgezeichneten Löslichkeiteigenschaften von [12-27b·HBr] und der damit möglichen Reinigung durch Gel-filtration des anfallenden Rohprodukts über Sephadex G 15 bzw. G 25 *anscheinend* ebenfalls gut zugänglich. Eine Aminosäureanalyse zeigte zu unserer Überraschung einen relativ hohen Ornithin-Gehalt (ca. 10% des Argininbetrags), der nach unserer heutigen Kenntnis auf ein noch unbekanntes, bei der Anknüpfung von Z-Arg(δ,ω-Z,Z)-OSU [12] entstandenes Nebenprodukt zurückzuführen sein muß.

Da es uns durch Variation der Versuchsbedingungen zunächst nicht gelang, dieser Nebenreaktion Herr zu werden, haben wir die Herstellung von Fragment II schließlich durch Aufkondensation des „Unterfragments“ Z-Arg(δ,ω-Z,Z)-Leu-OH [12-13a] an das Tetradecapeptid-Derivat [14-27b·HBr] gestaltet: Nach hydrogenolytischer Entfernung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppen von [12-27a] bei gleichzeitiger Titration mit 0.1*n* HBr konnte H-Arg(HBr)-Leu-Arg(HBr)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂·HBr [12-27b·HBr] in über 80 proz. Ausbeute (über beide Stufen) und bester Reinheit isoliert werden (s. Schema 3).

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“.

Unseren technischen Assistenten Herrn *J. Musiol* und Fräulein *M. Heisler* danken wir für ihre ausgezeichnete Mitarbeit, Fräulein *R. Scharf* für die Ausführung der Aminosäureanalysen, Herrn *W. Beck* für die Durchführung der Elementaranalysen.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren im Apparat nach Dr. Tottoli bestimmt, die spezif. Drehwerte im lichtelektrischen Polarimeter der Firma Carl Zeiss ermittelt; die Werte der D-Linie wurden berechnet. Der chromatographische Reinheitstest der Zwischen- und Endprodukte erfolgte nach üblichen Verfahren der Papier- und Dünnschichtchromatographie jeweils mindestens mit zwei Lösungsmittelsystemen.

1. *Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-alanin-methylester* [16-17a]: Eine Suspension von 27.9 g *H-Ala-OMe·HCl* [17·HCl] in 200 ccm Tetrahydrofuran wird unter Rühren bei -10° mit 21.5 ccm *N*-Methyl-morpholin und nach 5 Min. mit 78.5 g *Z-Ser(tBu)-OSU* [16]²⁾ in 200 ccm Tetrahydrofuran versetzt. Man röhrt anschließend 48 Stdn. bei 0° und befreit das Reaktionsgemisch durch Filtrieren vom ausgefallenen *N*-Methyl-morpholinhydrochlorid. Das Filtrat wird bei 20° i. Vak. zur Trockne eingedampft und der erhaltene Rückstand in Essigester aufgenommen. Zur Entfernung nicht umgesetzter Ausgangssubstanzen wäscht man ausreichend mit Citronensäurelösung, Kaliumhydrogencarbonatlösung und Wasser, trocknet über *Na₂SO₄* und dampft i. Vak. zur Trockne ein. Nach Umkristallisieren aus Äther/Petroläther erhält man farblose Nadeln vom Schmp. 78-79°; [α]_D²⁰: -13.5 ± 0.5°

bzw. $[\alpha]_{546}^{20} : -16.4^\circ$ ($c = 2$, in Methanol). Chromatographisch rein in Chloroform/Methanol (9 : 1). Ausb. 67 g (88%).

$C_{19}H_{28}N_2O_6$ (380.4) Ber. C 59.98 H 7.42 N 7.36 O 25.23
Gef. C 60.03 H 7.48 N 7.28 O 25.26

2. *Benzylloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-alanin* [16-17b]: 67 g *Z-Ser(tBu)-Ala-OMe* [16-17a] in 900 ccm Dioxan/Wasser (7 : 2) werden mit 88 ccm 2n *NaOH* „titrimetrisch“ verseift. Nach Abdestillieren des Dioxans i. Vak. wird mit 2n H_2SO_4 vorsichtig angesäuert ($pH \sim 1.5$), das abgeschiedene *Acyl-dipeptid* in Essigester aufgenommen und die abgetrennte organische Phase nach üblicher Aufarbeitung i. Vak. zur Trockne gebracht. Aus Äther/Petroläther farblose Nadeln: Schmp. 101–102°; $[\alpha]_D^{20} : +11.5 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} : +13.43^\circ$ ($c = 2$, in Äthanol). Chromatographisch rein in n-Heptan/tert.-Butylalkohol/Eisessig (3:1:1). Ausb. 62 g (96%).

$C_{18}H_{26}N_2O_6$ (366.4) Ber. C 59.00 H 7.15 N 7.65 O 26.20
Gef. C 58.83 H 7.20 N 7.70 O 26.20

3. *O-tert.-Butyl-L-seryl-L-alanin* [16-17c]: 64.5 g *Z-Ser(tBu)-Ala-OH* [16-17b] in 900 ccm Methanol/Wasser (7 : 2) werden wie üblich hydrogenolytisch entacyliert. Das Filtrat wird i. Vak. (Badtemp. max. 20°!) zur Trockne eingedampft, der Rückstand bei 20°/10⁻² Torr über P_4O_{10} getrocknet: Farblose Kristalle vom Schmp. 105°; $[\alpha]_D^{20} : -16.5 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} : -19.8^\circ$ ($c = 4$, in Wasser; berechnet auf die wasserfreie Verbindung). Chromatographisch rein in Isoamylalkohol/Pyridin/Wasser (7 : 7 : 6). Ausb. 40.5 g (quantitativ).

$C_{10}H_{20}N_2O_4 \cdot 1/2 H_2O$ (241.3) Ber. C 49.77 H 8.77 N 11.62 O 29.84
Gef. C 49.60 H 8.93 N 11.59 O 29.81

4. *Benzylloxycarbonyl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-alanin-dicyclohexylammonium-Salz* [15-17a-DCHA]: 25.5 g des nach 3. hergestellten *H-Ser(tBu)-Ala-OH* [16-17c], 50 ccm Pyridin und 11.3 ccm *N*-Methyl-morpholin in 500 ccm Dimethylformamid werden bei 0° mit 44 g *Z-Asp(OtBu)-OSU* [15]³ versetzt, die Mischung 2 Tage bei Raumtemp. und nach Zugabe von 2 ccm *N*-[2-Amino-äthyl]-piperazin weitere 30 Min. gerührt. Anschließend dampft man i. Vak. zur Trockne ein. Der Rückstand wird zwischen verd. Schwefelsäure und Äther verteilt und die abgetrennte, sulfatfrei gewaschene Ätherphase erschöpfend mit Kaliumhydrogencarbonat-Lösung ausgezogen. Aus den vereinigten Extrakten wird nach Ansäuern mit verd. Schwefelsäure ($pH \sim 1.5$) das *Acyl-tripeptid* in Äther übergeführt; nach Säurefrei-waschen und Trocknen der organischen Phase versetzt man bei 0° mit 19.8 ccm *Dicyclohexylamin*. Nach kurzem Stehenlassen im Kühlschrank filtriert man das abgeschiedene *Dicyclohexylammoniumsalz* des Acyl-tripeptids ab. Aus dem Filtrat erhält man auf Zusatz von Petroläther eine zweite Fraktion. Nach Trocknen bei 10⁻² Torr über P_4O_{10} : Farbloses Pulver vom Schmp. 154–157°; $[\alpha]_D^{20} : +3.0 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} : +3.3^\circ$ ($c = 2$, in Äthanol). Das wie üblich freigesetzte Acyl-tripeptid ist chromatographisch rein in Chloroform/Cyclohexan/Eisessig (9:9:2). Ausb. 55 g (73%).

$(C_6H_{11})_2NH_2C_{26}H_{38}N_3O_9$ (718.9) Ber. C 63.48 H 8.69 N 7.79 O 20.03
Gef. C 63.68 H 8.64 N 7.90 O 20.15

5. *L-Asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-alanin* [15-17b]: 54.3 g *Z-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Ala-OH* [15-17a-DCHA] werden zwischen verd. Schwefelsäure und Äther verteilt. Die abgetrennte organische Phase wird sulfatfrei gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. vollständig eingedampft. Die Lösung des harzigen Rückstands in 600 ccm Methanol/Wasser (5 : 1) wird wie üblich mit katalytisch erregtem Wasserstoff behandelt; um das bei der Hydrierung ansonsten ausfallende freie *Tripeptid* in Lösung zu halten, werden im Verlauf der Operation insgesamt 1000 ccm Wasser zugegeben. Das Filtrat

liefert nach Eindampfen i. Vak. ein farbloses Pulver, das bei $20^{\circ}/10^{-2}$ Torr getrocknet wird: Schmp. 133° (Zers.). Chromatographisch rein in n-Heptan/tert.-Butylalkohol/Eisessig (5 : 1 : 1). Ausb. 29.8 g. (Wegen des wechselnden Lösungsmittelgehaltes des Peptids wurden keine Elementaranalyse und keine Drehwertsbestimmung ausgeführt; scharfes Trocknen führt zur Zersetzung der Substanz.)

6. *N^a,N^δ,N^ω-Tris-benzylloxycarbonyl-L-arginyl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-alanin* [14-17a]: 29.7 g *H-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Ala-OH* [15-17b] -- vorstehendes Rohprodukt -- und 7.92 ccm *N*-Methyl-morpholin in 500 ccm Dimethylformamid werden unter Eiskühlung mit 51.5 g *Z-Arg(δ,ω-Z,Z)-ONP* [14]⁴ versetzt, anschließend 4 Stdn. bei 0° und 2 Tage bei Raumtemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch wird i. Vak. weitgehend eingeengt, der breiige Rückstand mit 0.5 *n* H_2SO_4 verrührt, das nunmehr fest gewordene Produkt abfiltriert, mit Wasser digeriert und mit Essigester ausgekocht: Farbloses, mikrokristallines Pulver vom Schmp. $172-173^{\circ}$ (Zers.); $[\alpha]_D^{20}: -6.6 \pm 0.5^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}: -8.0^{\circ}$ (*c* = 2, in Eisessig). Chromatographisch rein in Essigester/Eisessig (99 : 1). Ausb. 61.2 g (86%).

$C_{48}H_{63}N_7O_{14}$ (962.1) Ber. C 59.92 H 6.60 N 10.20 O 23.28
Gef. C 59.89 H 6.89 N 10.23 O 23.33

Aminosäureanalyse: Arg Asp Ser Ala
Ber. 1.0 1.0 1.0 1.0
Gef. 0.97 1.00 1.02 1.00

7. *N^a,N^δ,N^ω-Tris-benzylloxycarbonyl-L-arginyl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-alanyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-glutaminyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-leucyl-L-glutaminyl-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid* [14-27a]: 7.5 g *H-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂-HBr* [18-27b-HBr]¹ und 6 g *Z-Arg(δ,ω-Z,Z)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Ala-OH* [14-17a] in wenig Dimethylformamid werden unter Rühren bei -10° mit 0.735 ccm Triäthylamin und nach 15 Min. mit 0.80 g *N*-Hydroxy-succinimid und 1.44 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt. Nach 3 Stdn. lässt man auf Raumtemp. kommen und nach ca. 140 stdg. Nachröhren in heißen Essigester einfließen. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert, mehrmals mit heißem Essigester gewaschen, zweimal sorgfältig mit Wasser digeriert, zentrifugiert und anschließend nochmals mit heißem Essigester nachgewaschen. Nach Trocknen i. Vak. bei 80° : Farbloses Pulver von $[\alpha]_D^{20}: -31.05 \pm 0.5^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}: -36.0^{\circ}$ (*c* = 1, in 80 proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser (3 : 1 : 1). Ausb. 9.1 g (76%).

$C_{101}H_{162}N_{26}O_{25}]Br_2$ (2300.4) Ber. C 52.73 H 7.10 Br 6.95 N 15.83
Gef. C 52.79 H 7.39 Br 6.65 N 15.62

Aminosäureanalyse: Arg Asp Ser Gln Gly Ala Val Leu
Ber. 3.0 1.0 1.0 2.0 1.0 1.0 1.0 4.0
Gef. 2.99 1.02 1.00 2.00 1.00 1.01 0.99 4.00

8. *L-Arginyl(hydrobromid)-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-alanyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-glutaminyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-leucyl-L-glutaminyl-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid-hydrobromid* [14-27b-HBr]: 11.5 g des nach 7. erhaltenen *Tetradecapeptid-amids* [14-27a] werden in 1000 ccm 80 proz. Essigsäure wie üblich hydrogenolytisch entacyliert. Das Filtrat wird i. Vak. eingedampft, die wäßrige Lösung des Rückstands nach Titration mit 10 ccm *n HBr* erneut i. Vak. zur Trockne gebracht. Aus Methanol/Essigester: Farblose kristalline Substanz, $[\alpha]_D^{20}: -32.1 \pm 0.5^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}: -40.5^{\circ}$ (*c* = 1, in 80 proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser (3 : 1 : 1). Ausb. 9.8 g (95%).

$C_{77}H_{146}N_{26}O_{19}]Br_4$ (2059.9) Ber. C 44.90 H 7.14 Br 15.52 N 17.68
Gef. C 44.92 H 7.47 Br 15.62 N 17.43

Aminosäureanalyse:	Arg	Asp	Ser	Gln	Gly	Ala	Val	Leu
Ber.	3.0	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	4.0
Gef.	2.99	1.00	0.99	2.01	1.00	1.00	0.99	4.12

9. *Benzoyloxycarbonyl-L-leucyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-alanyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-glutaminyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-leucyl-L-glutaminyl-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid* [13-27a]: 9.3 g *H-Arg(HBr)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂·HBr* [14-27b·HBr] in 300 ccm Dimethylformamid/Dimethylacetamid (5:1) werden bei -10° unter Röhren erst mit 0.630 ccm Triäthylamin und dann mit 3.6 g *Z-Leu-OSU* [13]⁵⁾ versetzt. Nach 3 stdg. Röhren bei 0° werden 0.5 ccm *N*-Methyl-morpholin und weitere 1.7 g *Z-Leu-OSU* zugefügt. Nach 48 stdg. Röhren bei Raumtemp. lässt man das Reaktionsgemisch in heißen Essigester einfließen; das ausgefallene Material wird abfiltriert, in heißem Methanol aufgenommen (200 ccm) und aus dieser Lösung mit einer Mischung von 600 ccm Äthanol/Essigester (1:5) erneut ausgefällt. Das abfiltrierte Produkt digeriert man sorgfältig mit Chloroform: Farbloses Pulver von $[\alpha]_D^{20}$: -33 \pm 0.5° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -39° (c = 1, in 80 proz. Essigsäure). Ausb. 8.5 g (85%).

$C_{91}H_{162}N_{27}O_{22}Br_3$ (2226.3) Ber. C 49.09 H 7.33 N 16.99 Gef. C 49.02 H 7.62 N 16.68

Aminosäureanalyse:	Arg	Asp	Ser	Gln	Gly	Ala	Val	Leu
Ber.	3.0	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	5.0
Gef.	2.97	0.97	0.98	2.04	1.02	1.01	1.02	4.96

10. *L-Leucyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-alanyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-glutaminyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-leucyl-L-glutaminyl-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid-hydrobromid* [13-27b·HBr]: 8.0 g *Z-Leu-Arg(HBr)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂* [13-27a] in 500 ccm 80 proz. Essigsäure werden wie üblich hydrogenolytisch entacyliert und aufgearbeitet; der erhaltene Rückstand wird schließlich aus Methanol/Essigester umgefällt: Farbloses Pulver von $[\alpha]_D^{20}$: -33.65 \pm 0.5° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -41.76° (c = 0.8, in 80 proz. Essigsäure). Ausb. 7.8 g (quantitativ, berechnet für das Monoacetat).

$C_{83}H_{156}N_{27}O_{20}Br_3, CH_3CO_2$ (2152.2) Ber. C 47.44 H 7.49 N 17.57
Gef. C 47.59 H 8.01 N 17.53

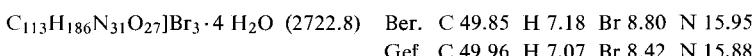
Aminosäureanalyse:	Arg	Asp	Ser	Gln	Gly	Ala	Val	Leu
Ber.	3.0	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	5.0
Gef.	3.02	1.00	0.98	2.05	1.02	1.02	1.00	4.97

11. *N^a.N^δ.N^ω-Tris-benzoyloxycarbonyl-L-arginyl-L-leucin* [12-13a]: 11.6 g *Leucin* in 110 ccm Wasser und 89 ccm *n* NaOH werden bei 0° unter Röhren mit einer Lösung von 30 g *Z-Arg(δ,ω-Z,Z)-OSU* [12]⁶⁾ in 200 ccm Dioxan versetzt. Nach 8 Stdn. wird i. Vak. zur Trockne gebracht, der Rückstand zwischen Essigester und Wasser verteilt, die abgetrennte organische Phase wie üblich mit verd. Salzsäure und Wasser gewaschen, getrocknet und i. Vak. wiederum eingedampft. Aus Methanol/Essigester/Petroläther, Essigester/Äther/Petroläther bzw. Methanol/Wasser kristallisiert das *Acyl-dipeptid*. Nach Trocknen i. Vak. bei 60–70°: Schmp. 126–128°; $[\alpha]_D^{20}$: -5.8 \pm 0.5° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -7.1° (c = 1, in Eisessig). Ausb. 26.6 g (77%).

$C_{36}H_{43}N_5O_9$ (689.8) Ber. C 62.69 H 6.28 N 10.15 O 20.88
Gef. C 62.59 H 6.41 N 9.94 O 21.05

Aminosäureanalyse:	Arg	Leu
Ber.	1.0	1.0
Gef.	1.00	1.00

12. *N^a,N^ω-Tris-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-leucyl-L-arginyl (hydrobromid)-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-alanyl-L-arginyl (hydrobromid)-L-leucyl-L-glutaminyl-L-arginyl (hydrobromid)-L-leucyl-L-leucyl-L-glutaminyl-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid* [12-27a]: 15.9 g *H-Arg(HBr)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂·HBr* [14-27b·HBr] und 15 g *Z-Arg(δ,ω-Z,Z)-Leu-OH* [12-13a] in 800 ccm Dimethylformamid werden mit 3.8 g *1-Hydroxy-benzotriazol*, nach Abkühlen der Lösung auf -15° schließlich mit 1.08 ccm Triäthylamin und 4.5 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt. Man röhrt 48 Stdn. bei 0° , anschließend 96 Stdn. bei Raumtemp. und gibt dann nochmals 6.9 g *Z-Arg(δ,ω-Z,Z)-Leu-OH*, 2 g *Hydroxybenzotriazol* und 2.06 g *Dicyclohexylcarbodiimid* hinzu. Nach weiteren 20 Stdn. Röhren wird $1/2$ Stde. auf dem Wasserbad auf ca. 60° erwärmt; nach Abkühlen auf -5° und mehrstdg. Stehenlassen wird vom ausgefallenen *Dicyclohexylharnstoff* abfiltriert. Das Filtrat dampft man i. Vak. auf 300 ccm ein und läßt die Restlösung unter Röhren in 18000 ccm Essigester einfließen. Der nach Stehenlassen über Nacht entstandene Niederschlag wird abfiltriert; nach zweimaligem Umfällen aus Methanol/Essigester: $[\alpha]_{D}^{20}$: $-25.8 \pm 0.5^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -32.1° ($c = 1$, in 80 proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in n-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20). Ausb. 17.9 g (87%).



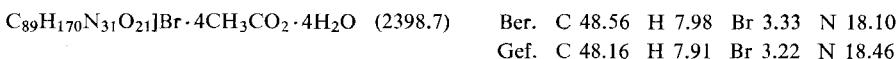
Aminosäureanalyse:	Arg	Orn	Asp	Ser	Gln	Gly	Ala	Val	Leu
Ber.	4.0	0.0	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	5.0
Gef.	3.94	0.04	1.00	1.00	2.01	1.01	1.01	1.02	5.02

13. *L-Arginyl (hydrobromid)-L-leucyl-L-arginyl (hydrobromid)-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-alanyl-L-arginyl (hydrobromid)-L-leucyl-L-glutaminyl-L-arginyl (hydrobromid)-L-leucyl-L-leucyl-L-glutaminyl-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid-hydrobromid* [12-27b·HBr]

Weg I

a) 5.6 g *H-Leu-Arg(HBr)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂·HBr* [13-27b·HBr] in 500 ccm Dimethylformamid werden bei -10° mit 0.364 ccm Triäthylamin und anschließend mit 5.25 g *Z-Arg(δ,ω-Z,Z)-OSU* [12]⁶ versetzt. Nach 5 stdg. Röhren bei 0° gibt man 0.288 ccm *N*-Methyl-morpholin und weitere 1.75 g *Tris-Z-Arg-OSU* dazu, röhrt 72 Stdn. bei Raumtemp. nach und dampft anschließend i. Vak. ein. Der Rückstand wird in Methanol aufgenommen; auf Zugabe von Essigester/Äther tritt Fällung ein. Das abfiltrierte Material (5.9 g) wird ohne weitere Charakterisierung sofort der üblichen katalytischen Hydrierung unterworfen.

b) 5.8 g *Z-Arg(δ,ω-Z,Z)-Leu-Arg(HBr)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂* [12-27a] — nach a) erhaltenes Rohprodukt — werden in 380 ccm 80 proz. Essigsäure suspendiert und wie üblich mit katalytisch erregtem Wasserstoff behandelt, wobei Lösung erfolgt. Das Filtrat wird i. Vak. eingedampft, der Rückstand in wäßrigem Methanol aufgenommen, die Lösung nach Titration mit 44 ccm 0.1 n *HBr* erneut i. Vak. zur Trockne gebracht, das erhaltene Produkt mit Äther digeriert und die Lösung in 5 proz. Essigsäure einer Gelfiltration über Sephadex G-15 oder G-25 unterworfen (Elutionsmittel 5 proz. Essigsäure). Lyophilisiertes Material: $[\alpha]_{D}^{20}$: $-28.4 \pm 0.5^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -34.8° ($c = 1$, in 80 proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in n-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20) bzw. n-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1); Dünnschicht-Pherogramm einheitlich (2.4 m Ameisensäure, pH 2). Ausb. 3.4 g (65%, ber. für das Mono-hydrobromid-tetraacetat-tetrahydrat).



Titration mit 0.1 n wäßr. *Bromwasserstoff*-Lösung in Methanol liefert das *Hexadecapeptid-amid-pentahydrobromid* [12-27b·HBr], isoliert nach Lyophilisation als Pentahydrat.

$C_{89}H_{170}N_{31}O_{21}Br_5 \cdot 5 H_2O$ (2500.2) Ber. C 42.75 H 7.25 Br 15.98 N 17.36
Gef. C 42.76 H 7.12 Br 15.25 N 17.44

Aminosäureanalyse: Arg Asp Ser Gln Gly Ala Val Leu Orn
Ber. 4.0 1.0 1.0 2.0 1.0 1.0 1.0 5.0 0.0
Gef. 3.75 1.00 0.93 2.05 1.04 1.01 0.97 5.02 0.37

Abbau mit Aminopeptidase M: Arg Ala Val Leu Orn
Ber. 4.0 1.0 1.0 5.0 0.0
Gef. 3.66 1.00 0.99 4.93 0.42

Weg 2

13.9 g *Z*-*Arg*(δ,ω -*Z,Z*)-*Leu*-*Arg*(*HBr*)-*Asp*(*OtBu*)-*Ser*(*tBu*)-*Ala*-*Arg*(*HBr*)-*Leu*-*Gln*-*Arg*(*HBr*)-*Leu*-*Leu*-*Gln*-*Gly*-*Leu*-*Val*-*NH*₂ [12-27a] in 3000 ccm Methanol/Wasser (4:1) werden wie üblich hydrogenolytisch entacyliert, wobei die freiwerdende Aminofunktion unter titrimetrischer Zugabe von 0.1 n wäßriger *HBr* (105 ccm; pH 4-5) gleichzeitig neutralisiert wird. Das i. Vak. vorsichtig eingedampfte Filtrat hinterläßt einen Rückstand, der aus Methanol/Essigester umgefällt wird: Farbloses Pulver von $[\alpha]_{D}^{20}$: +31.8 \pm 0.5° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: +38.2° (c = 1, in 80proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in n-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) bzw. n-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20). Dünnschicht-elektrophoretisch einheitlich in 2.4 m Ameisensäure (pH 2). Ausb. 12.5 g (95%).

$C_{89}H_{170}N_{31}O_{21}Br_5 \cdot 3 CH_3OH$ (2506.3) Ber. C 44.09 H 7.32 Br 15.94 N 17.33
Gef. C 44.37 H 7.28 Br 15.45 N 17.27

Aminosäureanalyse: Arg Orn Asp Ser Gln Gly Ala Val Leu
Ber. 4.0 0.0 1.0 1.0 2.0 1.0 1.0 1.0 5.0
Gef. 4.04 0.003 1.00 1.00 2.01 1.00 0.99 0.99 5.02

[161/71]