

SYNTHESE EINES DEKAPEPTID-DERIVATES MIT DER SEQUENZ B 21-30 DES RINDERINSULINS

G. LOSSE, B. MEISEGEIER, M. MAUCK und H. KIENGL
Sektion Chemie der Technischen Universität Dresden, DDR

(Received in Germany 30 September 1976; Received in the UK for publication 24 January 1977)

Zusammenfassung—Es wird die Synthese des durch Schutzgruppen vom Benzyltyp abgedeckten Rinderinsulin-Fragmentes B 21-30 Boc-Glut(Obzl)-Arg(H⁺)-Gly-Phe-Phe-Tyr(Bzl)-Pro-Lys(Z)-Ala-Obzl¹ nach dem Aufbauprinzip 3 · 3 · 4 beschrieben. Für die Synthese des entsprechend geschützten Sequenzbereiches B 24-30 wurde ausserdem die Festphasentechnik herangezogen.

Abstract—The synthesis of the benzyltype protected bovine insulin fragment B 21-30 Boc-Glut(Obzl)-Arg(H⁺)-Gly-Phe-Phe-Tyr(Bzl)-Thr(Bzl)-Pro-Lys(Z)-Ala-Obzl following the route 3 · 3 · 4 is described. In addition, the solid phase technique is applied to the synthesis of the corresponding protected sequence B 24-30.

Nachfolgend möchten wir über die Synthese eines neuen, kondensationsfähigen Dekapeptidderivates aus der C-terminalen Sequenz 21-30 der Rinderinsulin-B-Kette berichten, in welchem nach dem Prinzip des maximalen Schutzes alle Seitenketten sowie die Carboxylfunktion durch Gruppen vom Benzyltyp abgedeckt sind und die N⁶-Gruppe des Arginins durch Protonierung blockiert ist. Dieses Konzept ermöglicht einmal die wahlweise Abspaltung aller Schutzgruppen durch HBr/TFE-Acidolyse oder nach Sakakibara,¹ zum anderen ist der Hauptteil der geschützten Sequenz auch alternativ durch die Festphasenmethode mit anschliessender Alkoholyse zugänglich.

Zum konventionellen Aufbau des Teilstückes 27-30 (Schema 1) wurde Alaninbenzylester nach dem König-Geiger-Verfahren unter Anwendung von HOBT/DCC² in DMF mit Boc-Lys(Z)-OH, Boc-Pro-OH und Boc-Thr(Bzl)-OH verlängert, wobei die Abspaltung der N⁶-Boc-Gruppe jeweils mit 1 n HCl in Eisessig erfolgte. Beim Teilfragment 24-26 gingen wir analog vor, wählten jedoch den Methylester des O-Benzyltyrosins, welcher sich leichter als der Benzylester über das Hydrazid in das Azid überführen lässt, als Ausgangsstoff. Die Vereinigung beider Teilsequenzen über die 26-27-Bindung zum Heptapeptidderivat erfordert eine racem-

isierungsstabile Kuppelungsmethode. Gegenüber der König-Geiger²-Methode mit der 24-26-Peptidsäure lieferte hier die Kuppelung des 24-26-Azids in DMF nach dem Honzl-Rudinger Eintopfverfahren¹ unter Anwendung von Isoamylnitrit für die Azidbildung mit ca 50% Reinausbeute die besseren Ergebnisse.

Obwohl die Festphasentechnik bei der Totalsynthese von Insulinketten insgesamt keine günstigen Resultate erbrachte,^{3,4} so bietet sie sich doch weiterhin für den Aufbau kondensationsfähiger Teilsequenzen an. Besonders geeignet hierfür ist der Sequenzbereich B 24-30, den wir parallel zum angeführten Synthesegang unter den in Tabelle 1 wiedergegebenen Kenngrössen trägergebunden und in derselben derivatisierten Form aufgebaut haben. Die einzelnen Kuppelungsschritte wurden in CH₂Cl₂ mit jeweils 3 Äquivalenten Überschuss an Kuppelungskomponente ausgeführt und der Anteil nicht umgesetzter NH₂-Gruppen mit Pyridin-Hydrobromid⁵ bestimmt. Der nach basenkatalysierter Benzylalkoholyse in 43.6-proz. Gesamtausbeute erhaltene Boc-Heptapeptidester war nach anschliessender gelochromatographischer Reinigung identisch mit dem nach konventioneller Methode gewonnenen Produkt.

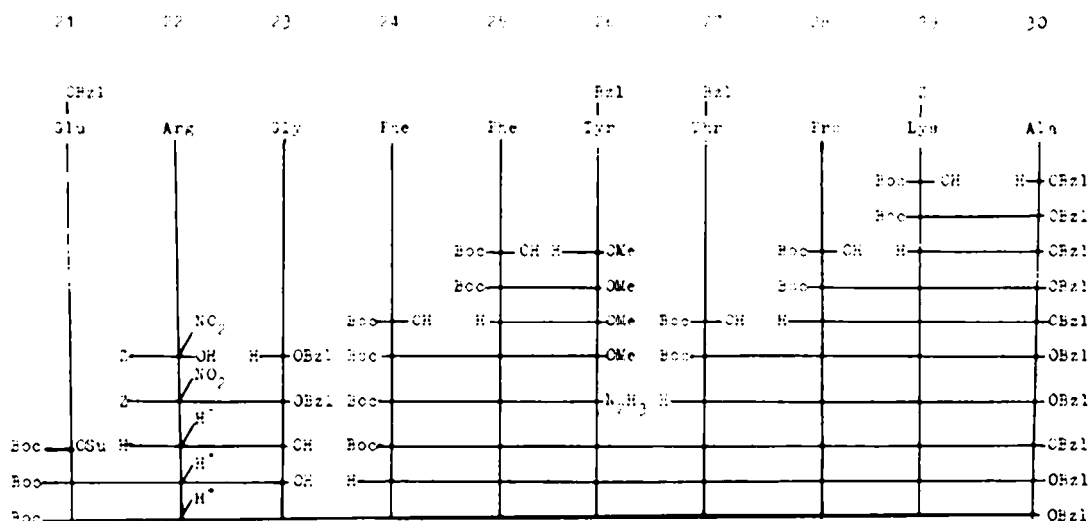
Für die Darstellung des Teilstückes 21-23 erwies sich die Kuppelung von Boc-Glutaminsäure-γ-benzylester mit Arginylglycin unter Anwendung von Aktivester-Methoden als am zweckmässigsten. Ein alternatives Vorgehen ergibt sich bei diesem Sequenzabschnitt auch in der Kuppelung von N⁶-Boc, N⁶-Z-Arginin¹⁰ mit Glycyl-tert-butylester und nachfolgender Entfernung der beiden tert. Butylschutzgruppen zum H-Arg(Z)-Gly-OH, was eine analoge Weiterführung der Synthese mit einer durch

*Abkürzungen nach den Regeln der IUPAC-IUB-Commission on Biochem. Nomenclature; *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **348**, 256 (1967); *J. Biol. Chem.* **247**, 977 (1972); ferner bedeutet: TFE = Trifluoressigsäure, DCC = Dicyclohexylcarbodiimid, HOBT = 1-Hydroxybenzotriazol, HMPT = Hexamethylphosphorsäuretriimid.

Tabelle 1 Festphasensynthese des Sequenzbereiches B 24-30. Ausgangsharz: Polystyrol/2% Divinylbenzol (Merrifield-Typ), beladen mit 5.3% Cl entspr. 1.5 mÄqu./g. Aminosäurebeladung: 0.45 mMol Boc-Ala-OH/g, davon mit Benzylalkohol/Et₃N abspaltbar 57.3%

Kuppelung zur harzgebundenen Sequenz	Mittlerer Umsatzgrad i.d. einzelnen Kuppelungsschritten bez. auf Startaminosäure	R _f [†]	
		Boc-Peptid-OBzl I	II
Boc-Phe-Phe-Tyr(Bzl)-Thr(Bzl)-Pro-Lys(Z)-Ala-	96.7%	0.86 (0.82)	0.24 (0.69)

[†]DC mit einer benzylalkoholytisch abgespaltenen Probe auf Kieselgel G (Merck) I. n. Butanol/Eisessig/H₂O 4:1:1 II: Benzol/Aceton 8:5



Scheme 1.

die 7-Gruppe abgedeckten N^6 -Funktion ermöglichen würde. In der auf das Tripeptidderivat bezogenen Ausbeutebilanz steht dieser Weg aber gegenüber dem im Schema wiedergegebenen nach.

Nach Überführung der Boc-Tripeptidsäure 21–23 aus der Acetat in die Hydrochlorid-Form bewährte sich für die Kondensation mit dem N-deblockierten Heptapeptidderivat 24–30 DCC in Pyridin als Lösungsmittel. Hierdurch konnte nach Chromatographie an Kieselgel in 60% Ausbeute ein chromatographisch und elektrophoretisch einheitliches Dekapeptidderivat B 21–30 erhalten werden. Ebenso ergab die 8-Hydroxychinolin-Methode¹¹ gute, präparativ verwertbare Resultate. Die HOBt/DCC-, die Mischanhydrid-Methode mit Chlorkohlensäure-isopropylester sowie die Nitrophenyl-ester-Methode lieferten in diesem Kondensationsschritt dagegen schwieriger zu reinigende Rohprodukte bzw. unbefriedigende Kuppelungsstraten.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Die $[\alpha]_D^{20}$ -Werte wurden mit einer Genauigkeit von $\pm 0.01^\circ$ und die $[\alpha]_D^{25}$ -Werte mit $\pm 0.5^\circ$ bestimmt. Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Kieselgel-G-Schichten (Merck). Laufmittelsysteme: System A: n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1); System B: *sec*-Butanol/25-proz. wässr. NH_4 /Wasser (85:7.5:7.5); System C: *sec*-Butanol/Ameisensäure/Wasser (75:15:10); System D: n-Butanol/Aceton/Wasser/25-proz. wässr. NH_3 (40:8:15:5).

A. H-Thr(Bzl)-Pro-Lys(Z)-Ala-OBzl

Boc-Lys(Z)-Ala-OBzl. 3.05 g (10.2 mmol) Tos-OH \times Ala-OBzl^{12,13} (Schmp. 114.5–115.5°C) wurden in 10 ml CH_2Cl_2 suspendiert und bei 0°C mit 1.12 ml (10.2 mmol) N-Methylmorpholin versetzt. Man fügte eine Lösung von 3.0 g (10.2 mmol) Boc-Lys(Z)-OH (DCHA-Salz: Schmp. 110–111°C) in 10 ml CH_2Cl_2 , danach 1.37 g (10.2 mmol) HOBt, nach Abkühlung auf $-15^\circ C$ eine Lösung von 2.15 g (10.2 mmol) DCC in 10 ml CH_2Cl_2 hinzu und rührte 18 h bei 0°C sowie 10 h bei Raumtemp. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert, die Lösung bei 20 Torr zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 100 ml Essigester aufgenommen. Wie üblich wurde mit 5-proz. $KHSO_4$ -Lösung, ges. $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und bei 20 Torr eingeeengt. Ausbeute: 4.65 g (84.0% d. Th.) nach Umkristallisation aus Essigester/Petroläther; Schmp. 112.5–113.5°C; $[\alpha]_D^{20} = -18.5^\circ$ ($c = 3.0$ in DMF); R_f 0.76 (A), 0.81 (C), 0.88 (D). (Gef. C, 64.46; H, 7.60; N, 7.49. $C_{22}H_{30}N_2O_6$ (541.63) erfordert C, 64.30; H, 7.26; N, 7.76%).

Boc-Pro-Lys(Z)-Ala-OBzl. 4.5 g (8.3 mmol) Boc-Dipeptidester wurden zur N-Deblockierung mit 30 ml 1.2 n HCl/Eisessig in 30 min. behandelt. Das Lösungsmittel wurde bei 25°C und 0.01 Torr abgedampft und der Rückstand aus CH_2Cl_2 /Äther umkristallisiert. Ausbeute: 3.94 g (95.4% d. Th.); Schmp. 264°C (Zers.); R_f 0.50 (A), 0.50 (B), 0.53 (C); (Gef. Cl, 7.53. $C_{22}H_{31}N_3O_6 \times HCl$ (477.97) erfordert Cl, 7.42%).

3.8 g (7.6 mmol) N-deblockierter Dipeptidester wurden in Essigester aufgenommen, mit 0.01 n Na_2CO_3 -Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet, i. Vak. zur Trockne eingedampft, in 7 ml DMF gelöst, danach mit 2.4 g (11.0 mmol) Boc-Pro-OH^{14,15} [Schmp. 136°C; $[\alpha]_D^{20} = -66.5^\circ$ ($c = 1.0$ in HOAc)], 1.48 g (11.0 mmol) HOBt und nach Abkühlung auf $-15^\circ C$ mit 2.3 g (11.0 mmol) DCC in 5 ml DMF versetzt. Es wurde 3 h bei $-15^\circ C$, 18 h bei 4°C und 12 h bei Raumtemp. gerührt, mit Essigester versetzt, intensiv mit 5-proz. $KHSO_4$ -Lösung, ges. $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen. Der sirupöse Rückstand (4.45 g, 92.0% d. Th.) wurde in 10 ml CH_2Cl_2 aufgenommen und auf eine Kieselgelsäule (5 \times 30 cm) gegeben. Nach 1-tägigem Durchwaschen mit CH_2Cl_2 wurde mit Essigester/Methanol (98:2) eluiert. Nach dem Eindampfen der Eluate bei 20 Torr wurde aus Essigester/Petroläther umkristallisiert. Ausbeute: 3.63 g (75.0% d. Th.) Schmp. 89–90°C; $[\alpha]_D^{20} = -46.1^\circ$ ($c = 3.0$ in DMF); R_f 0.74 (A), 0.83 (B), 0.82 (C), 0.81 (D); (Gef. C, 64.21; H, 7.15; N, 8.86. $C_{24}H_{34}N_4O_6$ (638.74) erfordert C, 63.93; H, 7.26; N, 8.77%).

Boc-Thr(Bzl)-Pro-Lys(Z)-Ala-OBzl. 3.5 g (5.5 mmol) N-geschützter Tripeptidester wurden in 20 ml 1.2 n HCl/Eisessig gelöst und 35 Min. bei Raumtemp. gehalten. Man dampfte bei 25°C und 0.01 Torr ein und liess aus CH_2Cl_2 /Äther kristallisieren. Ausbeute: 2.85 g (89.0% d. Th.); Schmp. 142–143°C; R_f 0.46 (A), 0.53 (B), 0.54 (C); (Gef. C, 60.79; H, 7.09; N, 9.75; Cl, 6.34. $C_{28}H_{38}N_4O_6 \times HCl$ (574.11) erfordert C, 60.67; H, 6.67; N, 9.65; Cl, 6.18%).

2.58 g (4.5 mmol) Tripeptidester-Hydrochlorid wurden in Essigester aufgenommen, mit 0.01 n Na_2CO_3 -Lösung und Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet, zur Trockne eingedampft, in 7 ml DMF gelöst und mit 2.78 g (9.0 mmol) Boc-Thr(Bzl)-OH¹⁶ [Schmp. 113–115°C; DCHA-Salz: Schmp. 154–155°C; $[\alpha]_D^{20} = -29.0^\circ$ ($c = 2.0$ in Methanol)], 1.82 g (13.5 mmol) HOBt sowie nach Abkühlung auf $-15^\circ C$ mit 1.85 g (9.0 mmol) DCC in 3 ml DMF versetzt. Es wurde 3 h bei $-15^\circ C$, 18 h bei 4°C und 12 h bei Raumtemp. gerührt, mit Essigester nachgewaschen, das Filtrat dann mit 5-proz. $KHSO_4$ -Lösung, ges. $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknen über $MgSO_4$ und Eindampfen blieben 3.58 g (96.0% d. Th.) sirupöses dünnflüssiges chromatographisch einheitliches Tetrapeptidderivat zurück. Dieses wurde zur weiteren Reinigung an einer Kieselgelsäule (5 \times 30 cm) chromatographiert. Dabei wurde nach 1-tägigem Durchwaschen mit CH_2Cl_2 mittels Essigester/Methanol (98:2) eluiert. Nach Einengen des Eluats und Umkristallisieren des Rückstandes aus

Essigester/Äther/Hexan wurden 3.15 g (85.0% d. Th.) vom Schmp. 73–74°C erhalten. $[\alpha]_D^{25} = -62.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_D^{25} = -60.7^\circ$ ($c = 2.0$ in Methanol); R_f 0.85 (C), 0.81 (D); (Gef. C, 64.82; H, 7.18; N, 8.45. $C_{44}H_{64}N_{10}O_{16}$ (829.54) erfordert C, 65.15; H, 7.12; N, 8.44%).

HCl \times Thr(Bzl)-Pro-Lys(Z)-Ala-OBzl (B 27–30). 2.98 g (3.6 mMol) Boc-Tripeptidester wurden in 30 ml 1.0 n HCl/Eisessig 20 Min. bei Raumtemp. behandelt. Der beim Eindampfen bei 25°C und 0.01 Torr verbliebene Rückstand wurde mehrmals mit Äther verrieben und erneut zur Trockne eingengt. Aus dem öligen Rückstand kristallisierten unter Petroläther allmählich 2.68 g (97.5% d. Th.) mit dem Schmp. 80–82°C; $[\alpha]_D^{25} = -43.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_D^{25} = -38.0^\circ$ ($c = 1.0$ in Methanol); (Gef. Cl, 4.78. $C_{46}H_{70}N_{10}O_{16} \times HCl$ (766.35) erfordert Cl, 4.63%).

B. Boc-Phe-Phe-Tyr(Bzl)-OH und Boc-Phe-Phe-Tyr(Bzl)-N,H. Boc-Phe-Tyr(Bzl)-OMe. Zu einer Suspension von 3.22 g (10.0 mMol) HCl \times Tyr(Bzl)-OMe¹⁷ [Schmp. 192°C; $[\alpha]_D^{25} = +12.75^\circ$ bzw. $[\alpha]_D^{25} = +11.0^\circ$ ($c = 4.0$ in Methanol)] in 10 ml CH_2Cl_2 wurden bei 0°C 1.1 ml (15.0 mMol) N-Methylmorpholin, danach 5.07 g (15.0 mMol) Boc-Phe-OH^{14,15} [Schmp. 85–86°C; $[\alpha]_D^{25} = -3.8^\circ$ bzw. $[\alpha]_D^{25} = -4.3^\circ$ ($c = 1.0$ in HOAc)] in 5 ml CH_2Cl_2 und 2.70 g (20.0 mMol) HOBt gegeben. Bei -15°C fügte man eine Lösung von 2.91 g (15.0 mMol) DCC in 3 ml CH_2Cl_2 hinzu, rührte 3 h bei -15°C, hielt 18 h bei 4°C und 20 h bei Raumtemp. Vom ausgefallenen Harnstoff wurde abgetrennt, wie üblich mit $KHSO_4$ -Lösung, $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet, im Wasserstrahlvakuum eingedampft und aus Essigester/Petroläther umkristallisiert. Ausbeute: 5.2 g (98.0% d. Th.); Schmp. 145°C; $[\alpha]_D^{25} = -4.67^\circ$ bzw. $[\alpha]_D^{25} = -5.00^\circ$ ($c = 3.0$ in DMF); R_f 0.88 (A), 0.85 (B), 0.82 (C); (Gef. C, 70.25; H, 7.01; N, 5.36. $C_{31}H_{40}N_2O_8$ (532.65) erfordert C, 69.90; H, 6.82; N, 5.27%).

Boc-Phe-Phe-Tyr(Bzl)-OMe. Zur Deblockierung wurden 5.0 g (9.4 mMol) N-geschützter Dipeptidester mit 80 ml 1.1 n HCl/Eisessig 30 Min. bei Raumtemp. behandelt. Nach Eindampfen und Umkristallisieren aus CH_2Cl_2 /Äther wurden 4.64 g (99.0%) HCl \times Phe-Tyr(Bzl)-OMe vom Schmp. 200°C (Zers.) erhalten. $[\alpha]_D^{25} = +18.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_D^{25} = +16.0^\circ$ ($c = 2.0$ in DMF); R_f 0.60 (A), 0.78 (B), 0.72 (C); (Gef. C, 66.76; H, 6.36; N, 6.07; Cl, 7.73. $C_{24}H_{28}N_2O_6 \times HCl$ (468.99) erfordert C, 66.59; H, 6.23; N, 5.97; Cl, 7.56%).

4.48 g (9.0 mMol) Dipeptidester-Hydrochlorid wurden in 50 ml Essigester aufgenommen, bei 0°C mit 20 ml 1 n NH_3 -Lösung, anschliessend mit Wasser neutral gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet, zur Trockne i. Vak. eingedampft, getrocknet und in 10 ml DMF gelöst, danach mit 2.65 g (13.5 mMol) Boc-Phe-OH^{14,15} und 2.42 g (18.0 mMol) HOBt in 7 ml DMF versetzt. Nach Abkühlung auf -15°C fügte man 2.78 g (13.5 mMol) DCC in 3 ml DMF hinzu, rührte 3 h bei -15°C, 18 h bei 0°C und liess 20 h bei Raumtemp. stehen. Nach üblicher Aufarbeitung wurden 5.9 g (98.0% d. Th.) amorpher Boc-Tripeptidester und nach mehrmaligem Fällen aus Essigester/Petroläther 4.4 g (72.0% d. Th.) Kristalle vom Schmp. 186–187°C erhalten. $[\alpha]_D^{25} = -11.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_D^{25} = -10.5^\circ$ ($c = 2.0$ in DMF); R_f 0.87 (A), 0.90 (B), 0.84 (C); (Gef. C, 70.75; H, 6.85; N, 6.22. $C_{46}H_{70}N_{10}O_{16}$ (829.54) erfordert C, 70.67; H, 6.67; N, 6.18%).

Boc-Phe-Phe-Tyr(Bzl)-OH (B 24–27). Zu 4.07 g (6.0 mMol) Boc-Phe-Phe-Tyr(Bzl)-OMe in 35 ml Dioxan wurden 5 ml Wasser und 8 ml 1 n NaOH gegeben. Nach 1 h Stehen bei 25°C gab man 2 ml 1 n HCl zu und engte die Lösung auf etwa 15 ml ein, fügte 50 ml Essigester zu und stellte bei 0°C mit 1 n HCl auf pH 3 ein. Nach mehrmaligem Waschen der Essigesterphase mit Wasser wurde im Wasserstrahlvakuum abgedampft und aus Acetonitril umkristallisiert. 3.43 g (86.0 d. Th.); Schmp. 203–204°C (Zers.); $[\alpha]_D^{25} = -3.4^\circ$ bzw. $[\alpha]_D^{25} = -3.3^\circ$ ($c = 4.0$ in DMF); R_f 0.89 (A), 0.50 (B); (Gef. C, 70.14; H, 6.43; N, 6.21. $C_{46}H_{70}N_{10}O_{16}$ (829.54) erfordert C, 70.36; H, 6.52; N, 6.31%).

Boc-Phe-Phe-Tyr(Bzl)-NH-NH₂ (B 24–27). Eine Lösung von 4.07 g (6.0 mMol) Boc-Phe-Phe-Tyr(Bzl)-OMe in 30 ml DMF wurden mit 15 ml Hydrazinhydrat versetzt. Nach 4 h begann das Hydrazid auszufallen. Es wurde 24 h bei Raumtemp. stehen gelassen, die gelartige Masse mit eiskaltem Wasser behandelt, der Niederschlag bei 0°C über Nacht kristallisieren gelassen,

abgesaugt, mit Wasser gewaschen und bei 0.01 Torr über P_2O_5 getrocknet. Ausbeute: 3.6 g (88% d. Th.); Schmp. 225°C; $[\alpha]_D^{25} = -18.3^\circ$ bzw. $[\alpha]_D^{25} = -16.0^\circ$ ($c = 3.0$ in DMF); R_f 0.32 (B); (Gef. C, 68.61; H, 6.57; N, 10.38. $C_{46}H_{70}N_{10}O_{14}$ (679.83) erfordert C, 68.91; H, 6.67; N, 10.33%).

C. Boc-Glu(OBzl)-Arg(H⁺)-Gly-OH

Z-Arg(NO₂)-Gly-OBzl. Eine Suspension von 7.0 g (30.0 mMol) TosOH \times Gly-OBzl¹² [Schmp. 132–135°C] in 100 ml Essigester wurde unter Rühren bei 0°C mit 4.2 ml (30.0 mMol) Triäthylamin versetzt. Nach 1 h wurde abfiltriert und mehrmals mit Essigester gewaschen. Der nach Einengen der Essigesterlösungen im Wasserstrahlvakuum erhaltene Rückstand wurde in 140 ml abs. Tetrahydrofuran aufgenommen, die Lösung mit 10.5 g (30.0 mMol) Z-Arg(NO₂)-OH¹⁸ [Schmp. 134–135°C; $[\alpha]_D^{25} = -4.0^\circ$ ($c = 1.0$ in Methanol) 8.0 g (60.0 mMol) HOBt und nach Abkühlung auf -20°C mit 6.15 g (30.0 mMol) DCC in 60 ml Tetrahydrofuran versetzt. Man rührte 5 h bei -20°C, liess 24 h bei 4°C und 48 h bei 20°C stehen, filtrierte vom Harnstoff ab, engte bei 20 Torr zur Trockne ein und nahm in 300 ml Essigester auf. Die Essigesterlösung wurde mehrmals mit 1 n HCl, Wasser, ges. $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen und dabei bereits ausgefallenes Dipeptidderivat abgesaugt. Die Essigesterphase wurde über $MgSO_4$ getrocknet und bei 20 Torr eingengt. Nach Umkristallisation aus Methanol/Wasser und Trocknen i. Vak. wurden 11.40 g (76.0% d. Th.) Z-Dipeptidester vom Schmp. 151–153°C erhalten; $[\alpha]_D^{25} = -13.0^\circ$ ($c = 1.0$ in Methanol); $[\alpha]_D^{25} = -13.9^\circ$ ($c = 1.0$ in Methanol); R_f 0.62 (A).

Arg(2 \times HOAc)-Gly. 4.5 g (9.0 mMol) Z-Dipeptidester wurden in 80 ml Methanol und 10 ml Eisessig suspendiert, mit 1.0 g Pd-Schwarz versetzt und 2 Tage hydriert. Das Reaktionsgemisch wurde in 3 \times 100 ml Alkohol aufgenommen, vom Rückstand abfiltriert und die Lösung i. Vak. bei 20 Torr eingengt. Das Rohprodukt wurde aus Eisessig/Essigester umkristallisiert. Ausbeute: 2.7 g (85.5% d. Th.); Schmp. 160–162°C; [Schmp. 167–170°C]; $[\alpha]_D^{25} = +32.4^\circ$ ($c = 1.0$ in Wasser); $[\alpha]_D^{25} = +38.3^\circ$ ($c = 1.0$ in Wasser).²⁰

Boc-Glu(OBzl)-Arg(HOAc)-Gly-OH (B 21–23). Zu der Lösung von 1.05 g (3.0 mMol) Arg(2HOAc)-Gly in 1.5 ml DMF und 1.5 ml Wasser wurden bei -10°C 0.66 ml (6.0 mMol) N-Methylmorpholin und 2.6 g (6.0 mMol) Boc-Glu(OBzl)-OSu [Schmp. 100–103°C; $[\alpha]_D^{25} = -20.4^\circ$ ($c = 2.0$ in Dioxan) in 6 ml DMF und 1.5 ml Wasser gegeben. Man rührte 2 Tage bei 20°C, engte die Lösung i. Vak. bei 0.1 Torr ein, nahm den Rückstand in Methanol, das 2 ml Eisessig enthält, auf und chromatographierte auf einer Kieselgelsäule (Kieselgel G, 0.2 bis 0.5 mm; Säule 50 \times 2.5 cm) mit dem Elutionsmittel Chloroform/Methanol (2:1). Nach dem Umkristallisieren aus Methanol/Äther erhielt man 1.4 g (77.8% d. Th.) Tripeptidsäure vom Schmp. 133–136°C; $[\alpha]_D^{25} = -18.5^\circ$; $[\alpha]_D^{25} = -16.0^\circ$ ($c = 2.0$ in Methanol); R_f 0.40 (A), R_f 0.58 (n-But./HOAc/Wasser; Pyridin 30:6:24:20); R_f 0.35 (Chloroform/Methanol 2:1). (Gef. N, 14.08. $C_{37}H_{48}N_6O_{16} \times CH_3COOH$ (610.68) erfordert N, 13.76%).

Überführung in das Hydrochlorid: 610 mg (1 mMol) Boc-Glu(OBzl)-Arg(HOAc)-Gly-OH, in Dioxan gelöst, werden bei 0°C mit 5 ml (1 mMol) 0.2 n HCl/Dioxan versetzt, die Lösung i. Vak. auf 10 ml eingengt und bei 0°C mit 100 ml absol. Äther versetzt. Das hygroskopische Tripeptid-Hydrochlorid wird abzentrifugiert und i. Vak. über KOH getrocknet.

D. Boc-Phe-Phe-Tyr(Bzl)-Thr(Bzl)-Pro-Lys(Z)-Ala-OBzl

(a) *Acid-Methode*.¹ Eine auf 20°C gekühlte Lösung von 0.678 g (1.0 mMol) Boc-Phe-Phe-Tyr(Bzl)-N₂H₃ in 6 ml DMF wurde mit 2.22 ml (4.0 mMol) 1.8 n HCl/Essigester und 0.2 ml (1.52 mMol) Isoamylnitrit versetzt, 30 Min. bei -20°C gerührt und bei -50°C mit 0.57 ml (5.18 mMol) N-Methylmorpholin neutralisiert. Zu der Azidlösung gab man bei -50°C eine Lösung von 0.536 g (0.70 mMol) HCl \times Thr(Bzl)-Pro-Lys(Z)-Ala-OBzl und 0.07 ml (0.70 mMol) N-Methylmorpholin in 4 ml DMF, hielt 1 Tag die Temperatur bei -40°C, liess dann langsam auf 0°C ansteigen und hielt sie 4 Tage bei 0°C konstant. Es wurde mit 40 ml Essigester verdünnt, mit $KHSO_4$ -Lösung und Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und bei 12 Torr auf 10 ml eingengt. Diese Lösung wurde in 2.5 ml-Portionen auf eine mit

Essigester äquilibrierte Sephadex-LH-20-Säule (2×120 cm) gebracht und mit Essigester zu Fraktionen von 5 ml bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 28 ml/h eluiert. Die Fraktionen 24-32 enthielten insgesamt 0.608 g (60.5% d. Th.) chromatographisch reinen Boc-Heptapeptidester. Nach Umkristallisation aus Essigester/Petroläther: 0.536 g (53.0% d. Th.); Schmp. 163–165°C; $[\alpha]_D^{25} = -21.2^\circ$ bzw. $[\alpha]_D^{25} = -20.2^\circ$ ($c = 0.5$ in DMF); $[\alpha]_D^{25} = -27.0^\circ$ ($c = 1.0$ in CHCl_3); R_f 0.84 (B), R_f 0.88 (C); (Gef. C, 68.88; H, 6.77; N, 8.13. $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_{14}$ (1377.67) erfordert C, 68.61; H, 6.96; N, 8.30%). Aminosäureanalyse: Phe (2.00), Tyr (0.91), Thr (0.95), Pro (1.06), Lys (0.99), Ala (1.04).

(b) **Festphasenmethode.** Boc-Ala-O-(P): 3.73 g (19.7 mMol) Boc-Ala-OH wurden in 65 ml Äthanol gelöst, 2.49 ml (17.7 mMol) Triäthylamin und 12.8 g Chlormethylpolystyrol²¹ (5.3% Cl, 19.7 mMol Cl) zugegeben und 48 h bei 75°C gerührt. Anschließend wurde je 3 × mit Äthanol, Methanol und 4 × mit Dioxan gewaschen. Die Bestimmung des angeesterten Anteils erfolgte nach Abspaltung der Boc-Gruppe (s.u.) mit Hilfe von Pyridinhydrobromid⁹ oder durch Totalhydrolyse mit anschließender Ninkhydrinkolorimetrie.²² Der Benzylalkoholytisch von der Matrix abspaltbare Boc-Ala-OH-Anteil wurde durch Behandeln einer Harzprobe mit der 4-fachen Menge 1 n Triäthylamin in Benzylalkohol bei 20°C und über 48 h erhalten (Tabelle 1).

Boc-Phe-Phe-Tyr(Bzl)-Thr(Bzl)-Pro-Lys(Z)-Ala-O-(P): Das aus dem obigen Ansatz gewonnene Boc-Ala-O-(P) (13.7 g = 5.8 mMol Ala) wurde 30 Min. mit 4 n HCl/Dioxan geschüttelt, je 3 × mit Dioxan, Methylchlorid und Dimethylformamid gewaschen, die Aminogruppen mit 10-proz. Triäthylamin in Dimethylformamid (15 Min.) freigesetzt (Neutralisationsschritt), 3 × mit Dimethylformamid und mit Methylchlorid gewaschen und die Lösung von 6.64 g Boc-Lys(Z)-OH (17.4 mMol, 3 Val) in 40 ml Methylchlorid zugegeben. Nach 20 Min. Schütteln folgten die Zugabe von 3.58 (17.4 mMol) DCC und weiteres 12-stündiges Schütteln. Es wurde je 3 × mit Methylchlorid, Eisessig/Methylchlorid 1:1 und Methylchlorid ausgewaschen, ein Neutralisationsschritt zwischengeschaltet und die nicht umgesetzten freien Aminogruppen mit Hilfe von Pyridinhydrobromid bestimmt.⁹ Anschließend wurde der Kuppelungsschritt unter gleichen Bedingungen noch einmal wiederholt. Dieser Zyklus wurde bis zum Aufbau der harzgebundenen Heptapeptidsequenz nacheinander mit je 17.4 mMol Boc-Pro-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Tyr(Bzl)-OH und Boc-Phe-OH (Verlängerung um 2 Phe-Einheiten) unter Anwendung von jeweils 17.4 mMol DCC wiederholt. Danach wurde das Peptidharz 6 × mit Methylchlorid gewaschen und 1 h bis zu einem Druck von 0.5 mm Hg getrocknet: 25.0 g.

Boc-Phe-Phe-Tyr(Bzl)-Thr(Bzl)-Pro-Lys(Z)-Ala-OBzl: 2.50 g (10.0%) des grob getrockneten Peptidharzes wurden mit 10 ml 1 n Triäthylamin in Benzylalkohol versetzt und 48 h geschüttelt, nach Beendigung der Reaktion abgesaugt und das Harz 6 × mit Chloroform gewaschen. Das Filtrat der Benzylalkoholyse und die Waschlösungen wurden vereint und 2 × mit 50 ml H_2O , die mit 5-proz. KHSO_4 auf pH 3–4 eingestellt waren, 1 × mit H_2O , 2 × mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und H_2O ausgeschüttelt, die organische Phase mit MgSO_4 getrocknet, das Chloroform im Vakuum abgezogen und dann bei 0.1 mm Hg bis zur Trockne eingengt: 0.345 g (43.6% d. Th.), bezogen auf harzgebundene Startaminosäure Ala. Nach der Reinigung durch Gelchromatographie an Sephadex LH 20 in Chloroform (Säule 1000×23 mm; 15 ml/h) wurde das dünn-schichtchromatographisch einheitliche Peptidderivat Boc-Phe-Phe-Tyr(Bzl)-Thr(Bzl)-Pro-Lys(Z)-Ala-OBzl erhalten. Schmp. 163–165°C (Chloroform/Äther); $[\alpha]_D^{25} = -21.2^\circ$ ($c = 0.5$ in DMF); $[\alpha]_D^{25} = -27.0^\circ$ ($c = 1.0$ in Chloroform); R_f 0.86 (A), $R_f = 0.24$ (Benzol/Aceton 8:5). Phe (2.0), Tyr (0.9), Thr (0.9), Pro (0.9), Lys (1.0), Ala (1.0); (Gef. N, 8.41. $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_{14}$ (1377.67) erfordert N, 8.30%).

E. Boc - Glu(OBzl) - Arg(H⁺) - Gly - Phe - Phe - Tyr(Bzl) - Thr(Bzl) - Pro - Lys(Z) - Ala - OBzl

HCl × Phe - Phe - Tyr(Bzl) - Thr(Bzl) - Pro - Lys(Z) - Ala - OBzl (B 24–30). 2.06 g (1.5 mMol) Boc-Heptapeptidester wurden in 60 ml 1.2 n HCl/Eisessig bei Raumtemp. gelöst und nach 50 Min. in 400 ml eiskaltem Äther innerhalb weniger Minuten

tropfenweise unter Rühren eingetragen. Der Niederschlag wurde abgetrennt, aus CH_2Cl_2 /Äther umgefällt und i. Vak. getrocknet (1.42 g, 72.0% d. Th., Schmp. 113–119°C). Zur weiteren Reinigung wurde das Rohprodukt in 20 ml CH_2Cl_2 aufgenommen und auf eine Kieselgelsäule (5×30 cm) gegeben. Es wurde 1 Tag mit CH_2Cl_2 gewaschen und danach der Heptapeptidester mit CH_2Cl_2 /Methanol (97:3) eluiert. Nach Umfällen aus CH_2Cl_2 /Äther wurden 1.0 g (50.6% d. Th.) chromatographisch reines Produkt vom Schmp. 118–120°C erhalten. $[\alpha]_D^{25} = -38.0^\circ$ bzw. $[\alpha]_D^{25} = -32.5^\circ$ ($c = 0.5$ in Methanol); R_f 0.68 (A), 0.82 (n-Butanol/Eisessig/Wasser/Pyridin 30:6:24:20), 0.61 (n-Propanol/Wasser 7:3), 0.67 (Chloroform/Methanol 2:1). (Gef. C, 61.41; H, 6.72; N, 7.71. $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_{12} \times \text{HCl} \times 7\text{H}_2\text{O}$ (1440.13) erfordert C, 61.72; H, 6.93; N, 7.78%).

Boc - Glu(OBzl) - Arg(H⁺) - Gly - Phe - Phe - Tyr(Bzl) - Thr(Bzl) - Pro - Lys(Z) - Ala - OBzl (B 21–30).

(a) **Oxin-Methode.** 580 mg (1 mMol) Boc - Glu(OBzl) - Arg(HCl) - Gly - OH wird mit 145 mg (1 mMol) 8-Hydroxychinolin in 1 ml DMF gelöst und bei -10°C 204 mg (1 mMol) DCC in 0.5 ml DMF hinzugefügt. Nach 2-stündigem Stehenlassen bei 0°C wird mit 630 mg (0.5 mMol) Heptapeptidester H - Phe - Phe - Tyr(Bzl) - Thr(Bzl) - Pro - Lys(Z) - Ala - OBzl in 1 ml DMF versetzt, welcher in Chloroform durch Waschen mit kalter 0.5 n NH_4OH -Lösung, anschließendem Neutralwaschen und Trocknen erhalten wurde. Danach wurde 2 h bei 0°C und 2 Tage bei Raumtemp. gelassen sowie mit 5 ml DMF verdünnt, ausgefallener Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, das Filtrat i. Vak. bei 0.1 Torr auf etwa 2 ml eingengt und unter Rühren bei 0°C in Äther/Petroläther (3:1) eingetragen. Der ausgefallene Niederschlag wird abgesaugt, in 100 ml Chloroform aufgenommen, mehrmals mit 0.5 n NH_4OH -Lösung und H_2O gewaschen, getrocknet und auf ein Volumen von etwa 3 ml eingengt. Durch Chromatographie an Kieselgel ("Merck", 0.2–0.5 mm, 3×50 cm) mit Chloroform/Methanol 97:3 wurden 182 mg (42% d. Th.) chromatographisch reines Dekapeptidester-Hydrochlorid erhalten. Schmp. 157–160°C; $[\alpha]_D^{25} = -19.0^\circ$ ($c = 1.0$ in Chloroform/Methanol 8:2) bzw. $[\alpha]_D^{25} = -16.0^\circ$ ($c = 1.0$ in Chloroform/Methanol 8:2); $R_f = 0.56$ (A), 0.58 (C), 0.15 (Chloroform/Methanol 9:1), 0.65 (Chloroform/Methanol 2:1); (Gef. C, 60.08; H, 7.05; N, 9.71. $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_{10} \times \text{HCl} \times 7\text{H}_2\text{O}$ (1972.62) erfordert C, 60.28; H, 6.85; N, 9.94%). Aminosäureanalyse: Glu (1.00), Arg (0.92), Gly (1.00), Phe (2.05), Tyr (0.80), Thr (0.89), Pro (0.97), Lys (0.90), Ala (1.00).

(b) **DCC in Pyridin.** 580 mg (1 mMol) Boc - Glu(OBzl) - Arg(HCl) - Gly - OH wurden in 1 ml trockenem Pyridin gelöst, nach Abkühlung auf -10°C mit 100.0 mg (0.5 mMol) DCC in 0.3 ml Pyridin versetzt und dazu 315.0 mg (0.25 mMol) H - Phe - Phe - Tyr(Bzl) - Thr(Bzl) - Pro - Lys(Z) - Ala - OBzl, welcher in Essigester durch Waschen mit kalter 0.5 n NH_4OH -Lösung und anschließendem Neutralwaschen, Trocknen und Einengen aus dem Hydrochlorid erhalten wurde, in 0.2 ml Pyridin zugegeben. Anschließend wurde 2 h bei -10°C , 2 Tage bei 0°C und 1 Tag bei Raumtemp. stehengelassen. Nach erneutem Abkühlen auf -10°C wurden weitere 100 mg (0.5 mMol) DCC in 0.3 ml Pyridin zugefügt, 1 Tag bei 0°C und 2 Tage bei Raumtemp. stehengelassen. Das Reaktionsgemisch wurde mit 5 ml kaltem Pyridin verdünnt, vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Filtrat i. Vak. bei 10 Torr eingengt, der Rückstand in 3 ml Chloroform/Methanol (9:1) aufgenommen und in Portionen zu je 1 ml auf eine mit Chloroform äquilibrierte Gelsäule (Kieselgel "Merck", 0.2–0.5 mm, 2.2×45 cm) gegeben. Es wurde zunächst mit 200 ml Chloroform durchgewaschen und dann mit Chloroform/Methanol (97:3) eluiert. Anschließend chromatographiert man mit Chloroform/Methanol (8:2) bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 15 ml/h und gewinnt insgesamt 261 mg (60% d. Th.) des Dekapeptidester-Hydrochlorids vom Schmp. 145–150°C. Nach Umfällen aus Chloroform/Methanol (8:2) mit Äther wurde kristallines Dekapeptidester-Salz vom Schmp. 157–160°C erhalten. $[\alpha]_D^{25} = -19.2^\circ$ ($c = 1.0$ in Chloroform/Methanol 8:2) bzw. $[\alpha]_D^{25} = -16.6^\circ$ ($c = 1.0$ in Chloroform/Methanol 8:2); R_f 0.55 (A), 0.60 (C), 0.12 (Chloroform/Methanol 9:1), 0.63 (Chloroform/Methanol 2:1). (Gef. N, 9.59. $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_{10} \times \text{HCl} \times 7\text{H}_2\text{O}$ (1972.62) erfordert N, 9.94%). Aminosäureanalyse: Glu (1.00), Arg (0.90), Gly (1.00), Phe (2.00), Tyr (0.80), Thr (0.95), Pro (1.03), Lys (0.92), Ala (0.97).

LITERATUR

- ¹S. Sakakibara und T. Fuji, *Bull. Chem. Soc. Jap.* **42**, 1466 (1969), **43**, 3954 (1970).
- ²W. König und R. Geiger, *Chem. Ber.* **103**, 788 (1970).
- ³J. Honzl und J. Rudinger, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **26**, 2333 (1961).
- ⁴Zusammenfassung K. Lübke und H. Klostermeyer, *Adv. Enzymol.* **33**, 445 (1970).
- ⁵R. B. Merrifield und A. Marglin, *Peptides* 1966, S. 85. North-Holland, Amsterdam (1967).
- ⁶S. Hörnle, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **348**, 1355 (1967).
- ⁷H. Zahn und T. Okunda, *Makromol. Chem.* **121**, 87 (1969).
- ⁸Y. R. Schwachkin und Mitarbb., *Zh. Obshch. Khim.* **43**, 216 (1973).
- ⁹G. Losse und R. Ulbrich, *Z. Chem.* **11**, 346 (1971).
- ¹⁰G. Losse und C. Rüger, *Ibid.* **13**, 344 (1973).
- ¹¹H. D. Jakubke und A. Voigt, *Chem. Ber.* **99**, 2419 (1966).
- ¹²L. Zervas, M. Winitz und J. P. Greenstein, *J. Org. Chem.* **22**, 1515 (1957).
- ¹³N. Izumiya und S. J. Makisumi, *J. Chem. Soc. Jap.* **78**, 662 (1957).
- ¹⁴E. Schnabel, *Liebigs Ann. Chem.* **702**, 188 (1967).
- ¹⁵E. Schnabel, H. Herzog, P. Hoffmann, E. Klauke und I. Ugi, *Ibid.* **716**, 175 (1968).
- ¹⁶T. Mizoguchi, G. Lewin, D. W. Woolley und J. M. Stewart, *J. Org. Chem.* **33**, 903 (1968).
- ¹⁷E. Wünsch, G. Fries und A. Zwick, *Chem. Ber.* **91**, 542 (1958).
- ¹⁸O. H. van Orden und E. L. Smith, *J. Biol. Chem.* **208**, 751 (1954).
- ¹⁹H. Zahn und F. H. Diehl, *Z. Naturforschg.* **12b**, 85 (1957).
- ²⁰S. Sakakibara, Y. Kishida, R. Nishizawa und Y. Shimonishi, *Bull. Chem. Soc. Jap.* **41**, 438 (1968).
- ²¹G. Losse, W. Grenzer und K. Neubert, *Z. Chem.* **8**, 21 (1968).
- ²²S. Moore und W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* **211**, 907 (1954).