

### Basische Peptide des Bienengifts, III<sup>[1,2]</sup>

## Synthese von Peptidfragmenten aus der Sequenz des Mastzellen-degranulierenden Peptids

Peter HARTTER

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Tübingen

(Der Schriftleitung zugegangen am 23. Dezember 1976)

Herrn Professor Dr. Helmut Zahn zum 60. Geburtstag gewidmet

**Zusammenfassung:** Die Synthese von drei Peptiden aus der Sequenz des Mastzellen-degranulierenden Peptids wird beschrieben. Die Fragmente

MCD(8-11) Boc-His(Trt)-Val-Ile-Lys(Z) (III)  
MCD(5-7) Boc-Cys(SiPr)-Lys(Z)-Arg(Tos) (IV)

und

MCD(1-4) Boc-Ile-Lys(Z)-Cys(Trt)-Asn(Mbh) (V)  
wurden nach klassischen Verfahren zur Synthese

von Peptiden dargestellt. Ihre Reinheit wurde durch Aminosäureanalyse, Dünnschichtchromatographie und Elementaranalyse geprüft. Sie ermöglichen zusammen mit den Fragmenten

Boc-Lys(Z)-Ile-Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z) (I)  
und

Boc-Pro-His(Trt)-Ile-Cys(Trt)-Arg(Tos) (II)<sup>[2]</sup>  
den Aufbau der Sequenz des MCD-Peptids an einem mit Asparagin beladenen polymeren Träger.

### *Basic Peptides in Bee Venom, III. Synthesis of Peptide Fragments from the Sequence of the Mast-Cell-Degransulating Peptide*

**Summary:** The synthesis by conventional methods of the following three peptides is described:

MCD(8-11) Boc-His(Trt)-Val-Ile-Lys(Z) (III)  
MCD(5-7) Boc-Cys(SiPr)-Lys(Z)-Arg(Tos) (IV)

and

MCD(1-4) Boc-Ile-Lys(Z)-Cys(Trt)-Asn(Mbh) (V).

These peptides are fragments of the mast cell degranulating peptide from bee venom. The purity

of the fragments synthesized was examined by thin-layer chromatography, amino acid and elementary analysis. Including the fragments

Boc-Lys(Z)-Ile-Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z) (I)  
and

Boc-Pro-His(Trt)-Ile-Cys(Trt)-Arg(Tos) (II),  
which were described earlier<sup>[2]</sup>, the synthesis of the mast-cell-degranulating peptide on a polyethylene-asparagine support appears possible.

**Key words:** Bienengift, Mastzellen-degranulierendes Peptid, Peptidsynthese, *N*-Hydroxysuccinimidester.

**Abkürzungen:** MCD-Peptid = Mastzellen-degranulierendes Peptid (= P 401); Boc = *t*-Butyloxycarbonyl; DCC = Dicyclohexylcarbodiimid; Mbh = 4,4'-Dimethoxybenzhydryl; OMe = Methyl ester; ONP = *p*-Nitrophenylester; ONSu = *N*-Hydroxysuccinimidester; SiPr = *S*-Isopropylthio; Trt = Trityl; Tos = Tosyl; Z = Benzylloxycarbonyl.

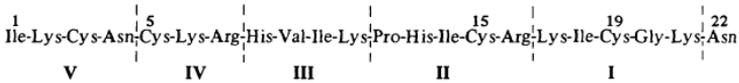


Abbildung. Sequenz des MCD-Peptids.

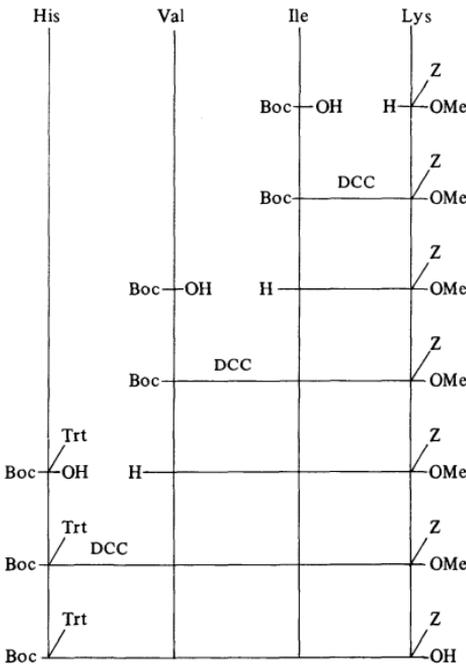
Disulfidbrücken in Pos. 3 - 15 und Pos. 5 - 19. I - V: Fragmente zum Aufbau der Sequenz

Zur Totalsynthese des Mastzellen-degranulierenden Peptids aus Bienengift wurde die Sequenz von 22 Aminosäuren in fünf Peptidfragmente unterteilt (Abb.). Die Synthese der Fragmente I und II wurde i.c.<sup>[2]</sup> beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wird die Synthese der Fragmente III, IV und V nach den in den Schemata 1 - 3 dargestellten Methoden durchgeführt. Die Carboxylendständige Aminosäure Asparagin (Pos. 22) soll bei der Synthese des Gesamtpeptids als Polyäthylenglykolester eingesetzt werden. Durch

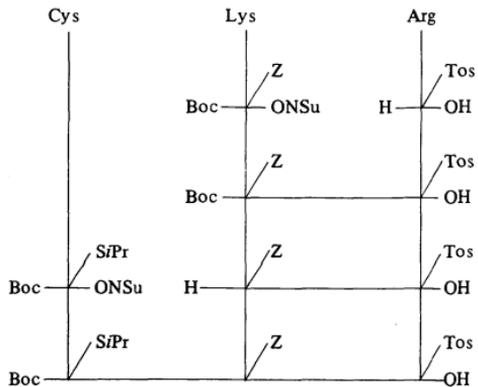
schrittweises Ankuppeln der Fragmente I bis V soll dann das MCD-Peptid synthetisiert werden.

### Synthese der Fragmente

Die Synthese von Fragment III [Boc-His(Trt)-Val-IleLys(Z)] wurde durch schrittweises Ankuppeln jeweils einer Boc-geschützten Aminosäure, ausgehend von  $\epsilon$ -Benzyloxycarbonyllysin-methylester, nach Schema 1 durchgeführt. Die Kondensation erfolgte mittels Dicyclohexylcarbodiimid und 1-Hydroxybenzotriazol<sup>[3]</sup>. Intermediär wurde der Boc-Rest jeweils mit 1N HCl/Eisessig abgespalten. Die Verseifung des Boc-Tetrapeptid-methylesters konnte nicht quantitativ durchgeführt werden. Auch bei Zugabe von 50% Überschuß an Natronlauge und bei Verwendung verschiedener Lösungsmittel konnte keine vollständige Verseifung erreicht werden. Die Abtrennung des Methylesters vom Endprodukt gelang durch mehrmaliges Umkristallisieren.

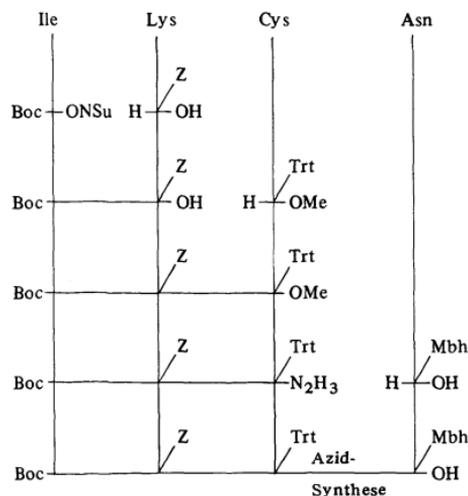


Synthese-Schema 1.



Synthese-Schema 2.

Fragment IV [Boc-Cys(SiPr)-Lys(Z)-Arg(Tos)] wurde durch Verwendung von Boc-Aminosäurehydroxysuccinimidestern<sup>[4,5]</sup> nach Schema 2 dargestellt. Diese Methode bietet viele experimentelle Vorteile, da die Ausgangsprodukte leicht darzustellen sind, die aktivierten Ester eine hohe Aminolysebereitschaft zeigen und bei der Knüpfung der Peptidbindung kaum Racemisierung auftritt<sup>[6]</sup>. Bei der Reinheitsprüfung der zur Synthese eingesetzten aktivierten Ester mittels Dünnschichtchromatographie sollte beachtet werden, daß sie sich durch Laufmittel- und Silikageleinflüsse zersetzen können<sup>[7]</sup>.



Synthese-Schema 3.

Fragment V [Boc-Ile-Lys(Z)-Cys(Trt)-Asn(Mbh)] wurde nach Schema 3 dargestellt. Eine andere Strategie, bei der Boc-Ile-Lys(Z)-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub> durch Azidsynthese mit Cys(Trt)-Asn verknüpft werden sollte, mußte aufgegeben werden, da Asparagin wegen seiner schlechten Löslichkeit in den üblichen Lösungsmitteln weder mit Boc-Cys(Trt)-ONSu noch mit Boc-Cys(Trt)-ONP zur Reaktion gebracht werden konnte. Bei der Reaktion von Boc-Ile-Lys(Z)-Cys(Trt)-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub> mit Asparagin nach der Azidmethode wurden ebenfalls keine befriedigenden Ausbeuten erzielt. Für dieses Verhalten sind wahrscheinlich Wasserstoffbrücken innerhalb des Asparaginmoleküls verantwortlich. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde deshalb der 4,4'-Dimethoxybenzhydrylrest als Amid-schutzgruppe nach König und Geiger eingeführt<sup>[8]</sup>. Die Einführung dieser Schutzgruppe vermeidet gleichzeitig eine mögliche Nitrilbildung, eine Diacylaminbildung und eine Transpeptidierung bei der Knüpfung von Peptidbindungen<sup>[9,10]</sup>.

Die Fragmente III, IV und V konnten chromatographisch rein erhalten werden und ergaben die in der Tabelle aufgeführten Aminosäureanalysen.

## Material und Methoden

### Ausgangsstoffe

Die L-Aminosäuren wurden von Ajinomoto (Tokio), Diamalt (München) und Merck (Darmstadt) bezogen. Die Darstellung von Boc-Azid erfolgte nach i.c.<sup>[11]</sup>, die Synthese von 4,4'-Dimethoxybenzhydryl nach i.c.<sup>[8]</sup>. Zur Synthese und zur Umkristallisation wurden absolute Lösungsmittel eingesetzt. Alle übrigen Reagenzien waren p.a. Substanzen der Firma Merck (Darmstadt).

Tabelle. Aminosäureanalyse der synthetisierten Peptide. Die theoretischen Werte stehen jeweils in Klammern.

Peptid	Asn	Arg	Cys	His	Ile	Lys	Val
Val-Ile-Lys(Z)-OMe	—	—	—	—	1.00 (1)	1.12 (1)	1.00 (1)
Boc-His(Trt)-Val-Ile-Lys(Z)-OH	—	—	—	1.00 (1)	0.90 (1)	1.03 (1)	0.92 (1)
Boc-Cys(Trt)-Lys(Z)-Arg(Tos)	—	0.97 (1)	0.81 (1)	—	—	1.00 (1)	—
Boc-Ile-Lys(Z)-Cys(Trt)-Asn(Mbh)	0.93 (1)	—	0.78 (1)	—	1.00 (1)	1.00 (1)	—

### Methoden

Die Schmelz- und Sinterpunkte wurden in einem Gerät nach Dr. Tottoli bestimmt und sind nicht korrigiert. Die Bestimmung der Drehwerte erfolgte an einem lichtelektrischen Polarimeter der Firma Zeiss. Nach der Hydrolyse der Peptide mit 5N HCl bei 110 °C unter Stickstoff wurden die Aminosäuren an einem Amino Acid Analyzer Unichrom der Firma Beckman quantitativ bestimmt. Zur Ermittlung der Elementaranalysen stand ein Elemental Analyzer der Firma Perkin Elmer zur Verfügung.

Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-Schichtete Aluminiumfolien mit und ohne Fluoreszenzindikator der Firma Riedel de Haen verwendet. Als Laufmittel dienten

1. n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 (v/v)
2. n-Butanol/Eisessig/Wasser 2:1:1 (v/v)
3. n-Butanol/Eisessig/Pyridin/Wasser 30:6:20:24 (v/v)
4. 2-Propanol/Eisessig/Pyridin/Wasser 10:4:5:4 (v/v)

Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte nach Fixierung mit Ninhydrin. Bei Laufmittel 1 und 2 konnten Peptide mit Trt-geschützten Aminosäuren außerdem im UV-Licht (Fluotest, Hanau) sichtbar gemacht werden.

### Synthesen

Die *N*-Boc-geschützten Aminosäuren wurden nach l.c.<sup>[12]</sup> synthetisiert. Das zur Synthese verwendete Dicyclohexylcarbodiimid wurde stets als 2N Lösung in Methylchlorid eingesetzt. Beim Arbeiten mit Dicyclohexylcarbodiimid wurde zur Vermeidung von Racemisierung und zur Erhöhung der Ausbeuten 1-Hydroxybenzotriazol zugefügt<sup>[3]</sup>.

### FRAGMENT III

#### *Boc-His(Trt)*<sup>[13]</sup>

100 mmol *Boc-His(Trt)-OMe*<sup>[13]</sup> werden in 250 ml Äthanol gelöst und mit 55 ml 2N NaOH versetzt. Nach 1 h wird mit 110 ml 1N HCl neutralisiert, im Vak. eingengt und der Rückstand in 200 ml Wasser und 400 ml Äthylacetat aufgenommen. Die wäßrige Phase wird noch zweimal mit Äthylacetat extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und noch zweimal mit 0.5N NaHCO<sub>3</sub>, zweimal mit verd. Citronensäurelösung und viermal mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über MgSO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel im Vak. abdestilliert und der ölige Rückstand aus 2-Propanol mit Petroläther ausgefällt.

Ausbeute: 33 g (67% d.Th.); Schmp. 145 - 150 °C  
[α]<sub>D</sub><sup>25</sup>: +10° (c = 1, in Methanol)

C<sub>30</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (497.60)

Ber.	C 72.41	C 6.28	N 8.44
Gef.	C 71.83	C 6.09	N 8.32

#### *N*<sup>ε</sup>-Benzylloxycarbonyl-lysine-methylester<sup>[14]</sup>

600 ml Methanol werden langsam bei -15 °C mit 40 ml Thionylchlorid versetzt. Dazu gibt man portionsweise 80 g (288 mmol) *N*<sup>ε</sup>-Benzylloxycarbonyllysine und rührt bei 0 °C 30 min. Dann erhitzt man 2 h auf 40 °C und läßt 12 h bei Zimmertemperatur stehen. Das Lösungsmittel wird im Vak. abdestilliert und der Rückstand in 400 ml Wasser gelöst. Mit 4N NaOH stellt man den pH-Wert der Lösung auf 9.0 ein, extrahiert dreimal mit je 250 ml Äthylacetat und filtriert von ausfallendem, nicht umgesetztem Produkt ab. Die vereinigten Äthylacetatphasen werden noch einmal mit Wasser extrahiert, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vak. abgedampft. Der ölige Rückstand wird in 200 ml absolutem Methanol gelöst und mit 60 ml 4N HCl/Methanol versetzt. Nach Zugabe von Äther fällt der Methylester als Hydrochlorid aus, wird abfiltriert und aus Äthanol/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 85 g (89% d.Th.); Schmp. 111 - 113 °C  
[α]<sub>D</sub><sup>25</sup>: +14.5° (c = 1, in Methanol)

C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Cl (330.82)

Ber.	C 54.46	H 7.01	N 8.47
Gef.	C 54.25	H 7.12	N 8.58

#### *Boc-Ile-Lys(Z)-OMe*<sup>[15]</sup>

33 g (100 mmol) *N*<sup>ε</sup>-Benzylloxycarbonyl-lysine-methylesterhydrochlorid werden in 200 ml Methylchlorid suspendiert und mit 14 ml Triäthylamin, 27 g 1-Hydroxybenzotriazol in 50 ml Dimethylformamid und mit 23.1 g *Boc-Ile* versetzt. Bei 0 °C tropft man unter Rühren 100 mmol DCC zu und läßt über Nacht reagieren. Nach der Zugabe von weiteren 300 ml Methylchlorid wird von ausgefallenem Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Lösungsmittel im Vak. abgedampft und der Rückstand in 700 ml Äthylacetat unter Erwärmen gelöst. Die warme Äthylacetatlösung wird einmal mit Wasser, zweimal mit 1N NaHCO<sub>3</sub>, zweimal mit 0.5N HCl und dreimal mit Wasser extrahiert und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach dem Entfernen des Äthylacetats kann das Peptid aus Äther/Petroläther kristallisiert werden.

Ausbeute: 38 g (77% d.Th.); Schmp. 98 - 100 °C  
[α]<sub>D</sub><sup>25</sup>: -25° (c = 1, in Methanol)

C<sub>26</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> (507.64)

Ber.	C 61.52	H 8.14	N 8.27
Gef.	C 61.47	H 8.31	N 8.37

#### *Ile-Lys(Z)-OMe-Hydrochlorid*

19 g (50 mmol) *Boc-Ile-Lys(Z)-OMe* werden bei Zimmertemperatur in 200 ml 1N HCl/Eisessig gelöst. Nach 30 min wird der Eisessig bei 35 °C Badtemperatur im Vak. abdestilliert und der ölige Rückstand in Methanol gelöst, das Peptid mit Äther ausgefällt und aus Methanol/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 21 g (95% d.Th.); Schmp. 147 - 148 °C

$[\alpha]_{578}^{25}$ : + 6° (c = 1, in Methanol)

$C_{21}H_{32}N_3O_5 \cdot HCl$  (442.98)

Ber. C 56.94 H 7.51 N 9.49

Gef. C 56.89 H 7.65 N 9.58

#### *Boc-Val-Ile-Lys(Z)-O-Me*

44 g (100 mmol) *Ile-Lys(Z)-O-Me-HCl* werden in 300 ml Methylchlorid suspendiert, mit 14 ml Triäthylamin versetzt und auf 0 °C gekühlt. Dazu gibt man unter Rühren 27 g 1-Hydroxybenzotriazol, gelöst in 50 ml Dimethylformamid, 22 g *Boc-Valin* und 100 mmol DCC. Nach 12 h wird von ausgefallenem Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, der Rückstand gut mit Methylchlorid gewaschen, die organische Phase im Vak. eingeeengt, der Rückstand in 700 ml warmem Äthylacetat gelöst und der nachträglich ausfallende Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wird der ölige Rückstand in 200 ml Dimethylformamid gelöst und die Lösung unter starkem Rühren in 2 l 1N  $NaHCO_3$ -Lösung gegossen. Das fest ausfallende Tripeptid wird abfiltriert, gut mit Wasser gewaschen, getrocknet und aus Äthylacetat/Petroläther kristallisiert.

Ausbeute: 44 g (70% d.Th.); Schmp. 160 - 161 °C

$[\alpha]_{578}^{25}$ : - 50° (c = 1, in Methanol)

$C_{31}H_{50}N_4O_8$  (606.74)

Ber. C 61.36 H 8.31 N 9.23

Gef. C 61.22 H 8.31 N 9.26

#### *Val-Ile-Lys(Z)-O-Me-Hydrochlorid*

31 g (70 mmol) *Boc-Val-Ile-Lys(Z)-O-Me* werden in 250 ml 1N HCl/Eisessig gelöst und 30 min gerührt. Dann wird der Eisessig abrotiert, der Rückstand zur Entfernung überschüssiger HCl noch einmal in Eisessig gelöst und wieder im Vak. einrotiert, und das Peptid aus Methanol/Äther kristallisiert.

Ausbeute: 34 g (92% d.Th.); Schmp. 213 °C

$[\alpha]_{578}^{25}$ : - 15° (c = 1, in Methanol)

$C_{26}H_{42}N_4O_6 \cdot HCl$  (543.12)

Ber. C 57.50 H 7.98 N 10.32

Gef. C 57.43 H 7.92 N 10.18

Aminosäureanalyse siehe Tabelle.

#### *Boc-His(Trt)-Val-Ile-Lys(Z)-O-Me*

15.9 g (30 mmol) *Val-Ile-Lys(Z)-O-Me-Hydrochlorid* werden in 150 ml Methylchlorid suspendiert, mit 4.2 ml Triäthylamin, 8.1 g 1-Hydroxybenzotriazol in 30 ml Dimethylformamid, 14.7 g *Boc-His(Trt)* und 30 mmol DCC versetzt und 12 h gerührt. Von ausgefallenem Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert, der Rückstand in 500 ml Äthylacetat gelöst und die organische Phase mit 1N  $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser extrahiert, getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird aus Äthanol/Äther kristallisiert.

Ausbeute: 19 g (65% d.Th.); Schmp. 112 - 115 °C

$[\alpha]_{578}^{25}$ : - 27,5° (c = 1, in Methanol)

$C_{56}H_{71}N_7O_9$  (986.24)

Ber. C 68.20 H 7.26 N 9.94

Gef. C 67.91 H 7.37 N 9.93

#### *Boc-His(Trt)-Val-Ile-Lys(Z)*

29.7 g (30 mmol) *Boc-His(Trt)-Val-Ile-Lys(Z)-O-Me* werden in 150 ml Dioxan gelöst und mit 17 ml 2N NaOH versetzt. Nach 1 h wird mit 34 ml 1N HCl neutralisiert, im Vak. eingeeengt und der Rückstand in 500 ml Äthylacetat gelöst. Die organische Phase wird mit Wasser mehrmals extrahiert, getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wird in wenig Chloroform gelöst und die Lösung unter starkem Rühren in 1 l Äther eingegossen. Das ausgefallene Peptid wird abfiltriert und aus Aceton, dem wenig Äthanol zugefügt wird, umkristallisiert.

Ausbeute: 12 g (42% d.Th.); Schmp. 193 - 195 °C

$[\alpha]_{578}^{25}$ : - 24.5° (c = 1, in Methanol)

$C_{55}H_{69}N_7O_9$  (972.21)

Ber. C 67.95 H 7.36 N 10.08

Gef. C 67.69 H 7.21 N 9.98

Aminosäureanalyse siehe Tabelle.

#### FRAGMENT IV

##### *Boc-Lys(Z)-Arg(Tos)*

16.4 g (50 mmol) *N<sup>G</sup>-Tosylarginin* werden in 250 ml Dioxan gelöst. Dazu gibt man eine wäßrige Lösung von 100 mmol  $NaHCO_3$  und 100 mmol *Boc-Lys(Z)-ONSu* und läßt 2 Tage reagieren. Man gibt dann 7 ml Eisessig hinzu, dampft das Lösungsmittel im Vak. ab und nimmt den Rückstand in 300 ml Äthylacetat auf. Die organische Phase wird einmal mit Wasser, zweimal mit 0.5N HCl und wieder dreimal mit Wasser extrahiert, getrocknet und im Vak. eingeeengt. Der Rückstand wird aus Chloroform/Petroläther kristallisiert.

Ausbeute: 32 g (91% d.Th.); Schmp. 66 - 67 °C

$[\alpha]_{578}^{25}$ : - 6° (c = 1, in Methanol)

$C_{32}H_{46}N_6O_9S$  (690.83)

Ber. C 55.63 H 6.71 N 12.17

Gef. C 56.08 H 7.07 N 12.03

##### *Lys(Z)-Arg(Tos)*

17 g (25 mmol) *Boc-Lys(Z)-Arg(Tos)* werden in 60 ml 1N HCl/Eisessig gelöst und 30 min gerührt. Nach dem Entfernen des Eisessigs wird der Rückstand in wenig Chloroform aufgenommen und in Äther gegossen. Das Dipeptid fällt dabei ölig aus. Man dekantiert den Äther ab, löst in Äthanol, neutralisiert mit Pyridin und gießt unter Rühren in Petroläther ein. Das ölig ausfallende Produkt wird in Äthanol/Aceton (1:1) gelöst und kann mit Petroläther fest ausgefällt werden.

Ausbeute: 9 g (60% d.Th.); Sinterpunkt 90 - 95 °C  
 $[\alpha]_{578}^{25}$ : +13° (c = 1, in Methanol)

$C_{27}H_{38}N_6O_7S$  (590.72)

Ber. C 54.89 H 6.48 N 14.23

Gef. C 54.23 H 6.31 N 13.97

#### *Boc-Cys(SiPr)-Lys(Z)-Arg(Tos)*

29.5 g (25 mmol) *Lys(Z)-Arg(Tos)* werden unter Erwärmen in 200 ml Dioxan gelöst und mit 100 mmol  $NaHCO_3$ , gelöst in 80 ml Wasser, versetzt. Nach 4 h gibt man eine Lösung von 50 mmol *Boc-Cys(SiPr)-ONSu* in 80 ml Dioxan zu und läßt 3 Tage reagieren. Nach der Zugabe von 100 mmol Eisessig wird das Lösungsmittel im Vak. abgedampft, der Rückstand in 500 ml Äthylacetat gelöst und die organische Phase mit 0.5N HCl und Wasser extrahiert. Nach dem Trocknen über  $MgSO_4$  wird eingeeengt und der ölige Rückstand in wenig Chloroform aufgenommen. Beim Eingießen dieser Lösung in 1.2 l Äther fällt das geschützte Tripeptid aus und wird abfiltriert.

Ausbeute: 23 g (55% d.Th.); Sinterpunkt 90 - 92 °C

$[\alpha]_{578}^{25}$ : -29° (c = 1, in Methanol)

$C_{38}H_{57}N_7O_{10}S_2$  (836.02)

Ber. C 54.59 H 6.87 N 11.72 S 7.67

Gef. C 54.00 H 6.62 N 11.39 S 7.32

Aminosäurenanalyse siehe Tabelle.

#### FRAGMENT V

##### *Asn(Mbh)*

49 g (100 mmol) *Z-Asn(Mbh)*<sup>[8]</sup> werden in 250 ml Eisessig/200 ml Methanol suspendiert und mit Palladium/Aktivkohle als Katalysator hydriert. Nach 3 h war die Reaktion beendet. Von der klaren Lösung wird der Katalysator abfiltriert, das Lösungsmittel im Vak. bei 35 °C Badtemperatur abgedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und unter Rühren in eine 1M Natriumacetatlösung gegossen. Das ausgefallene Produkt wird abgesaugt und getrocknet.

Ausbeute: 25 g (70% d.Th.); Schmp. 193 - 195 °C

$[\alpha]_{578}^{25}$ : +5° (c = 1, in Methanol/Eisessig 4:1)

$C_{19}H_{22}N_2O_5$  (358.40)

Ber. C 63.67 H 6.19 N 7.82

Gef. C 63.13 H 6.22 N 7.62

#### *Boc-Ile-Lys(Z)-Diäthylammoniumsalz*

28 g (100 mmol) *Lys(Z)* werden in 200 ml Dioxan suspendiert. Dazu gibt man eine konzentrierte Lösung von 200 mmol Natriumhydrogencarbonat in Wasser und nach 30 min 32.8 g (100 mmol) *Boc-Ile-ONSu*. Nach 2 Tagen wird mit 13 ml Eisessig versetzt und im Vak. eingeeengt. Der Rückstand wird in Äthylacetat gelöst, die organische Phase mit Wasser, 0.5N HCl und wieder mit Wasser extrahiert und über  $MgSO_4$  getrocknet. Nach dem

Entfernen des Äthylacetats wird der ölige Rückstand in 500 ml Äther gelöst und bei 0 °C mit 100 mmol Diäthylamin versetzt. Durch Zugabe von Petroläther fällt das Diäthylammoniumsalz fest aus, wird abfiltriert und aus Aceton/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 35 g (62% d.Th.); Schmp. 112 - 114 °C

$[\alpha]_{578}^{25}$ : -7° (c = 1, in Methanol)

$C_{25}H_{39}N_3O_7 \cdot C_4H_{11}N$  (566.75)

Ber. C 61.45 H 8.89 N 9.89

Gef. C 60.97 H 8.98 N 10.04

#### *Boc-Ile-Lys(Z)-Cys(Trt)-OMe*

42.5 g (75 mmol) *Boc-Ile-Lys(Z)-Diäthylammoniumsalz* werden in 300 ml Äthylacetat suspendiert und mit einer 3M Citronensäurelösung zweimal extrahiert. Die organische Phase wird dann säurefrei gewaschen, getrocknet und auf 100 ml eingeeengt. Dazu gibt man eine Lösung von 20 g 1-Hydroxybenzotriazol in 30 ml Dimethylformamid, 31 g (75 mmol) *Cys(Trt)-OMe-Hydrochlorid* und 75 mmol Triäthylamin, kühlt auf 0 °C und tropft unter Rühren 75 mmol DCC zu. Nach 12 h wird der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, und nach Zugabe von weiteren 200 ml Äthylacetat die organische Phase mit 1N  $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser extrahiert. Nach dem Trocknen über  $MgSO_4$  wird das Lösungsmittel im Vak. abdestilliert und der Rückstand aus Äther kristallisiert.

Ausbeute: 43 g (68% d.Th.); Schmp. 114 - 116 °C

$[\alpha]_{578}^{25}$ : -18° (c = 1, in Methanol)

$C_{48}H_{60}N_4O_8S$  (853.11)

Ber. C 67.58 H 7.09 N 6.57 S 3.76

Gef. C 67.28 H 7.17 N 6.70 S 3.46

#### *Boc-Ile-Lys(Z)-Cys(Trt)-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>*

45 g (53 mmol) *Boc-Ile-Lys(Z)-Cys(Trt)-OMe* werden in 250 ml Methanol gelöst und mit 15 ml Hydrazinhydrat versetzt. Nach 3 Tagen wird das Lösungsmittel im Vak. abgedampft und das dabei ausfallende Hydrazid abfiltriert. Das Produkt wird aus 250 ml Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 43 g (95% d.Th.); Schmp. 194 - 196 °C

$[\alpha]_{578}^{25}$ : -23° (c = 1, in Dimethylformamid)

$C_{47}H_{60}N_6O_7S$  (853.11)

Ber. C 66.17 H 7.09 N 9.85 S 3.76

Gef. C 65.83 H 6.91 N 9.69 S 3.41

#### *Boc-Ile-Lys(Z)-Cys(Trt)-Asn(Mbh)*

17 g (20 mmol) *Boc-Ile-Lys(Z)-Cys(Trt)-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>* werden in 60 ml Dimethylformamid gelöst und auf -20 °C gekühlt. Dazu gibt man 24 ml 4N HCl in Tetrahydrofuran und 3 ml Isoamylnitrit und hält bei -20 °C. Nach 20 min wird nochmals 1 ml Isoamylnitrit zugegeben und nach insgesamt 30 min auf -50 °C gekühlt und mit 13.2 ml Triäthylamin neutralisiert. Dazu gibt man eine

Lösung von 7.2 g *Asn(Mbh)* in 20 ml Dimethylformamid/10 ml Wasser, der man zuvor 2.8 ml Triäthylamin zugefügt hat. Man rührt 3 h bei  $-50^{\circ}\text{C}$ , 12 h bei  $-25^{\circ}\text{C}$ , 24 h bei  $0^{\circ}\text{C}$  und 12 h bei Zimmertemperatur und gießt dann die klare Lösung auf 1.5 l Wasser, dem etwas Citronensäure zugesetzt wurde. Das Peptid fällt fest aus, wird gut mit Wasser auf der Nutsche gewaschen, getrocknet und aus Chloroform/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 13 g (60% d.Th.); Schmp. 114 - 118  $^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_{578}^{25}$ :  $+3^{\circ}$  ( $c = 1$ , in Methanol)

$\text{C}_{66}\text{H}_{78}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{S}$  (1179.46)

Ber. C 67.21 H 6.66 N 7.13 S 2.72

Gef. C 67.01 H 6.68 N 6.97 S 2.42

Aminosäurenanalyse siehe Tabelle.

Ich danke Frau Dr. A. M. Fretzdorff für die Aminosäurebestimmungen und die Durchführung der Analysen sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung.

#### Literature

- 1 I. Mitteil.: Hartter, P. & Weber, U. (1975) *diese Z.* 356, 693 - 699.
- 2 II. Mitteil.: Hartter, P. (1976) *diese Z.* 357, 1683 - 1693.
- 3 König, W. & Geiger, R. (1970) *Chem. Ber.* 103, 788 - 798.
- 4 Wünsch, E. & Jaeger, E. (1966) *diese Z.* 346, 301 - 302.
- 5 Anderson, G. W., Zimmerman, J. E. & Callahan, F. M. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1839 - 1842.
- 6 Wendelberger, G. (1974) in Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie 15/2, (Wünsch, E. & Müller, E., Hrsg.), S. 149 - 166, Thieme Verlag Stuttgart.
- 7 Löw, M. & Kisfaludy, L. (1965) *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* 44, 61 - 67.
- 8 König, W. & Geiger, R. (1970) *Chem. Ber.* 103, 2041 - 2051.
- 9 Paul, R. & Kende, A. S. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* 86, 4162 - 4166.
- 10 Kovacs, J., Medzihradsky, K. & Bruckner, V. (1954) *Naturwissenschaften* 41, 450.
- 11 Carpino, L. A., Giza, C. A. & Carpino, B. A. (1959) *J. Am. Chem. Soc.* 81, 955 - 957.
- 12 Schnabel, E. (1967) *Liebigs Ann. Chem.* 702, 188 - 196.
- 13 Losse, G. & Krychowski, U. (1970) *J. Prakt. Chem.* 312, 1097 - 1103.
- 14 Boissonnas, R. A., Guttman, St., Huguenin, R. L., Jaquenoud, P.-A. & Sandrin, Ed. (1958) *Helv. Chim. Acta* 41, 1867 - 1882.
- 15 Arold, H. (1969) *J. Prakt. Chem.* 311, 511 - 515.

Dr. Peter Hartter, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Tübingen,  
Höppe-Seyler-Straße 1, D-7400 Tübingen.

