

## Zur Synthese von Motilin, I

# Darstellung der Sequenzen 9 - 22 von [13-Norleucin]motilin und [13-Leucin] motilin<sup>(1)\*</sup>

Erich WÜNSCH, Gerhard WENDBERGER und Karl-Heinz DEIMER

Max-Planck-Institut für Biochemie, Abt. Peptidchemie, München

(Der Schriftleitung zugegangen am 2. Dezember 1975)

**Zusammenfassung:** Die Synthesen von zwei „verknüpfungsfähigen“ Tetradecapeptid-Derivaten mit der C-terminalen Sequenz 9 - 22 des [13-Norleucin]motilins [H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Leu-Gln-Arg-(HBr)-Nle-Glu(OBu<sup>t</sup>)-(Glu(OBu<sup>t</sup>)-Lys(Boc)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Arg(HBr)-Asn-Lys(Boc)-Gly-Gln-

-OBu<sup>t</sup>] und des [13-Leucin]motilins durch stufenweise Fragmentkondensation der zunächst aufgebauten vier Teilstücke mit den Aminosäuresequenzen 18 - 22, 14 - 17, 12 - 13 (Norleucin- bzw. Leucin-Derivat) und 9 - 11 werden beschrieben.

### *The Synthesis of Motilin, I: Preparation of the Sequence Fragments 9 - 22 of [13-Norleucine]motilin and [13-Leucine]motilin*

**Summary:** The syntheses of two suitably protected tetradecapeptides corresponding to the sequences 9 - 22 of [13-norleucine]motilin [H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Nle-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Lys(Boc)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Arg(HBr)-Asn-Lys(Boc)-Gly-Gln-OBu<sup>t</sup>] and [13-leucine]motilin, respectively, are described. The two building blocks for

the total syntheses of the motilin analogs were obtained by fragment-condensation of smaller units, prepared by stepwise procedure and corresponding to the sequences 18 - 22, 14 - 17, 12 - 13 (norleucine- and leucine-derivatives) and 9 - 11.

**Key words:** Motilin analogues, motilin synthesis.

\* Die ursprünglich vorgeschlagene Sequenz<sup>[3]</sup> wurde nach vergleichenden Untersuchungen mit dem von uns synthetisierten Material in Position 14 korrigiert<sup>[4]</sup> (Glutamin anstelle von Glutaminsäure); falls die Korrektur sich bestätigt, müßten die beiden Verbindungen [13-Norleucin]- bzw. [13-Leucin]14-Desamidomotilin heißen.

#### Abkürzungen:

Boc = tert.-Butyloxycarbonyl;  
DBSA = (Dibenzolsulfonylamin n. Beilstein)  
= Bis(phenylsulfonyl)amin n. IUPAC;  
DCCD = Dicyclohexylcarbodiimid;  
OBu<sup>t</sup> = tert.-Butylester;  
OME = Methylester;

ONp = p-Nitrophenylester;  
ONSu = Succinimido-oxy;  
Z = Benzyloxycarbonyl;  
LMO9-22 = [Leu<sup>13</sup>]Motilin-(9-22)-tetradecapeptid;  
NMO12-22 = [Nle<sup>13</sup>]Motilin-(12-22)-undecapeptid.

Auf Grund der Vereinbarungen biochemischer Zeitschriften werden hier die von der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature empfohlenen Abkürzungen für Schutzgruppen verwendet. Die Autoren bevorzugen aber wegen ihrer universellen Anwendbarkeit die in Houben-Weyl (Methoden der Organischen Chemie, 4. Aufl., Bd. 15, S. 20 - 27, Verlag G. Thieme, Stuttgart 1975) verwendeten und eingehend erläuterten Abkürzungen.

Brown et al.<sup>[2]</sup> isolierten im Zuge der Reindarstellung des Hormons Sekretin ein Nebenprodukt, das intravenös appliziert, motorische Aktivität im Fundus-Pouch und ebenso im denervierten Antrum-Pouch signifikant erhöhte sowie einen Pepsin-Ausstoß bewirkte, ohne eine in das Gewicht fallende Steigerung der H<sup>0</sup>-Sekretion.

Der neue gastrointestinale Wirkstoff „Motilin“ wurde als lineares Dokosa-Peptid der Sequenz: H-Phe-Val-Pro-Ile-Phe-Thr-Tyr-Gly-Glu-Leu-Gln-Arg-Met-Glu-Glu-Lys-Glu-Arg-Asn-Lys-Gly-Gln-OH ausgewiesen<sup>[3]</sup>.

Da die Totalsynthese des Naturstoffes auf Grund des Vorliegens einer mittelständigen Arginyl-Methionyl-Bindung bekanntermaßen Schwierigkeiten mit sich bringt, haben wir zunächst die Totalsynthese eines 13-Norleucin- bzw. daran anschließend eines 13-Leucin-Analogons angestrebt, aus der Überlegung heraus, daß

- diese beiden Analoga rasch zugänglich sein sollten,
- trotz der Norleucin- bzw. Leucin-Reste eine Überprüfung der ermittelten Struktur schnellstens möglich sein sollte und
- um zusätzlich die „offene“ Frage der biologischen Wirkungsspezifität des Methionin-Restes (in Position 13) zu untersuchen.

Die Totalsynthesen der beiden Analoga [13-Norleucin]- und [13-Leucin]motilin sahen jeweils drei Etappen vor:

A) Erstellung von sechs zur weiteren Verknüpfung geeigneten, entsprechend geschützten Teilsequenzen, wobei alle Seitenkettenfunktionen mehrfunktioneller Aminosäuren acidolytisch leicht abspaltbare Schutzgruppen auf tert.-Alkohol-Basis trugen und die komplexe Funktion des Arginins teils durch N<sup>ω</sup>, N<sup>δ</sup>-Diacylierung, teils durch Protonierung (Salzbildung mit Bromwasserstoff) maskiert wurde.

B) „Stufenweise“ Vereinigung der sechs Fragmente I - VI nach dem weitgehend racemisierungs-freien „Wunsch-Weygandschen Carbodiimid-N-Hydroxysuccinimid-Verfahren“<sup>[5,6]</sup> bzw. dessen „Geiger-König-Modifikation“<sup>[7]</sup> zur allseits maskierten Gesamtsequenz 1 - 22, Abspaltung aller Schutzgruppen mittels Trifluoressigsäure, anschließende Entfernung der Trifluoressigsäure- und

Bromid-Ionen mittels Dowex 44 und Isolierung der Rohprodukte.

C) Reindarstellung der beiden synthetischen Analoga.

In der vorliegenden Arbeit wird die Erstellung der geschützten carboxylendständigen Teilsequenzen 9 - 22 (Hauptfragmente I - IV beider Analoga des Motilins beschrieben).

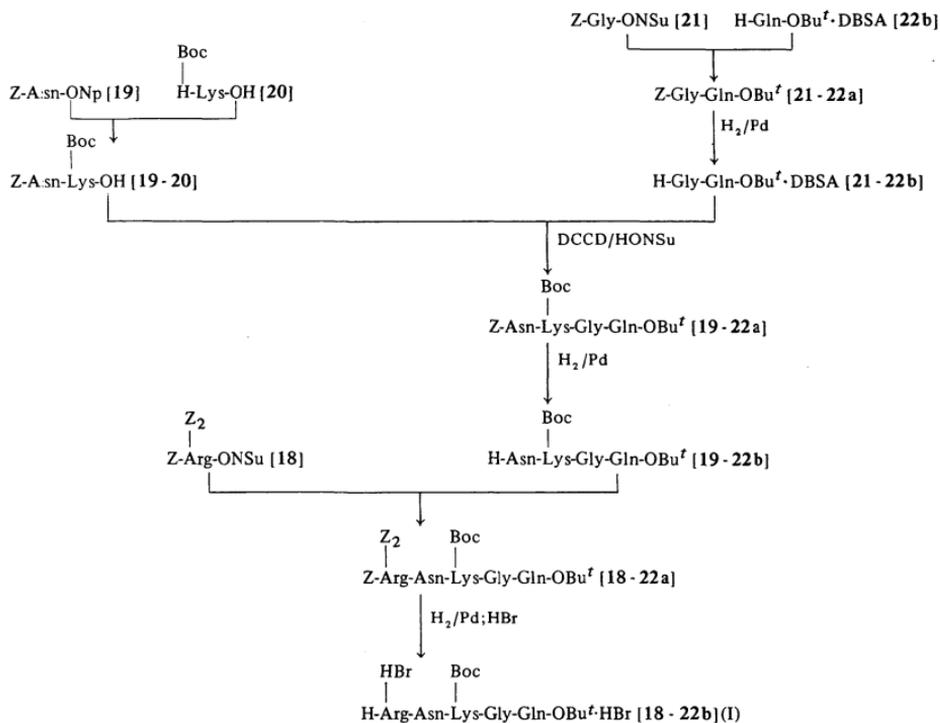
#### Teilsequenz 18 - 22 (Fragment I)

H-Gln-OBu<sup>t</sup> [22b], aus Z-Gln-OH durch Veresterung mit Essigsäure-tert.-butylester unter Schwefelsäure-Katalyse und folgende hydrogenolytische Entfernung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe zugänglich, wurde mit Z-Gly-ONSu [21] zum Benzyloxycarbonyl-dipeptidester [21 - 22a] verknüpft; der nach hydrogenolytischer Entfernung der N-Schutzgruppe erhaltene H-Gly-Gln-OBu<sup>t</sup> [21 - 22b] wurde mit Z-Asn-Lys(Boc)-OH [19 - 20] nach dem Wunsch-Weygandschen-Verfahren<sup>[5,6]</sup> zum Benzyloxycarbonyl-tetrapeptid-tert.-butylester [19 - 22a] verknüpft. Die Kopfkomponente [19 - 20] konnte durch Aminoacylierung von H-Lys(Boc)-OH [20] mit Z-Asn-ONp [19] unter üblichen Bedingungen gewonnen werden.

Entfernung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe aus Z-Asn-Lys(Boc)-Gly-Gln-OBu<sup>t</sup> [19 - 22a] mittels katalytisch erregten Wasserstoffs führte zum Tetrapeptidester-Derivat [19 - 22b], das mit Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-ONSu [18] mit Erfolg zum Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Asn-Lys(Boc)-Gly-Gln-OBu<sup>t</sup> [18 - 22a] vereinigt werden konnte. Mit der Entfernung der drei Benzyloxycarbonyl-Maskierungen durch katalytische Hydrogenolyse unter Zusatz von zwei Äquivalenten Bromwasserstoff gelangten wir zum gewünschten Fragment I H-Arg(HBr)-Asn-Lys(Boc)-Gly-Gln-OBu<sup>t</sup>·HBr [18 - 22b] (s. Schema 1).

#### Teilsequenz 14 - 17 (Fragment II)

Z-Lys(Boc)-ONSu [16] und H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OMe [17] ließen sich erwartungsgemäß gut zum Benzyloxycarbonyl-dipeptidester [16 - 17a] vereinigen; alkalische Esterverseifung und anschließende katalytische Entacylierung führte über das Dipeptid-Derivat [16 - 17b] zu H-Lys(Boc)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OH [16 - 17c]. In zweimaligem Anbauverfahren mit Hilfe von Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-ONSu [15 bzw. 14]



Syntheseschema 1: Fragment I (Teilsequenz 18-22).

als jeweilige Kopfkomponente konnte letztlich Fragment II, d. i. Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Lys-(Boc)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OH [14-17a] erhalten werden (s. Schema 2).

#### Teilsequenzen 12-13 (Fragmente III für beide Analoga)

Die Herstellung dieser Teilstücke für beide Analoga, d. s. Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Nle-OH [NMo12-13] bzw. Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Leu-OH [LMO12-13], konnte jeweils in ca. 86% Ausbeute durch Aminoacylierung von Norleucin bzw. Leucin mittels Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-ONSu [12] bewerkstelligt werden (s. Schema 3).

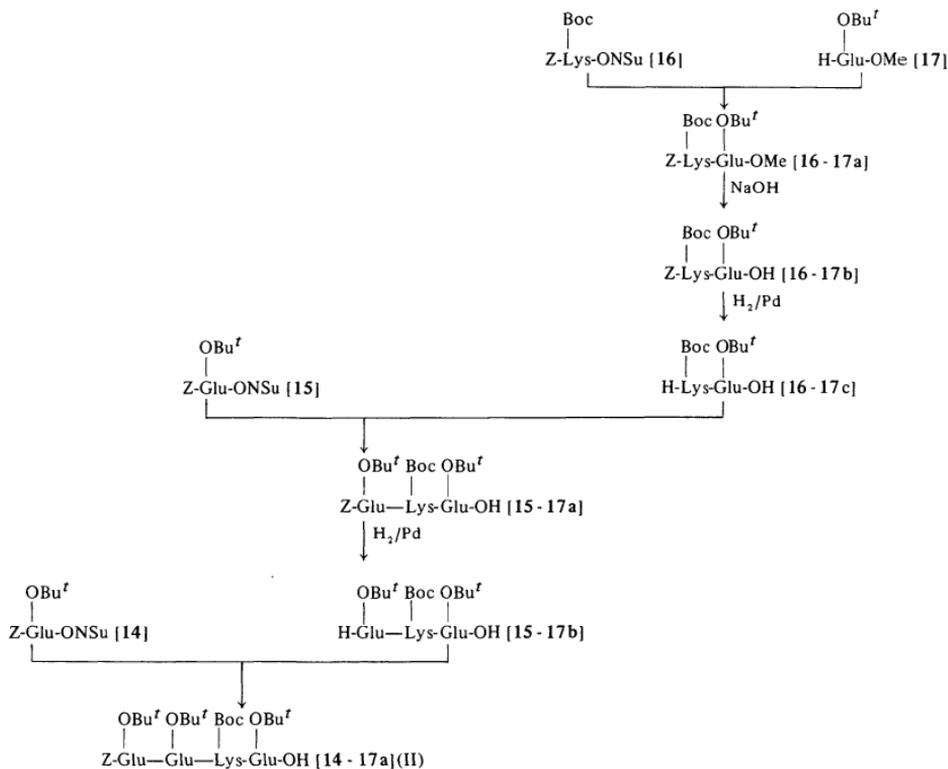
#### Teilsequenz 9-11 (Fragment IV)

Im Zuge unserer Sekretin-Synthese hatten wir das Dipeptid H-Leu-Gln-OH aufgebaut<sup>[8]</sup>; es

konnte jetzt als Sequenzbruchstück [10-11] für die Synthese der beiden Motilin-Analoga Verwendung finden. Anknüpfung von Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-ONSu [9] an das Dipeptid [10-11] führte in 74% Ausbeute zum Fragment IV, d. i. Z-Glu-(OBu<sup>t</sup>)-Leu-Gln-OH [9-11] (s. Schema 3).

#### Teilsequenz 14-22 (Hauptfragment I-II)

An das carboxylendständige Fragment I, d. i. H-Arg(HBr)-Asn-Lys(Boc)-Gly-Gln-OBu<sup>t</sup>·HBr [18-22b], wurde unter Anwendung der Dicyclohexylcarbodiimid-*N*-Hydroxysuccinimid-Technik<sup>[5,6]</sup> das Fragment II, d. i. Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Lys(Boc)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OH [14-17a], mit bestem Erfolg angeknüpft; der erhaltene *N*-Benzyloxycarbonyl-nonapeptid-*tert*.-butylester [14-22a] ließ sich durch katalytische Hydrogeno-



Syntheschema 2: Fragment II (Teilsequenz 14 - 17).

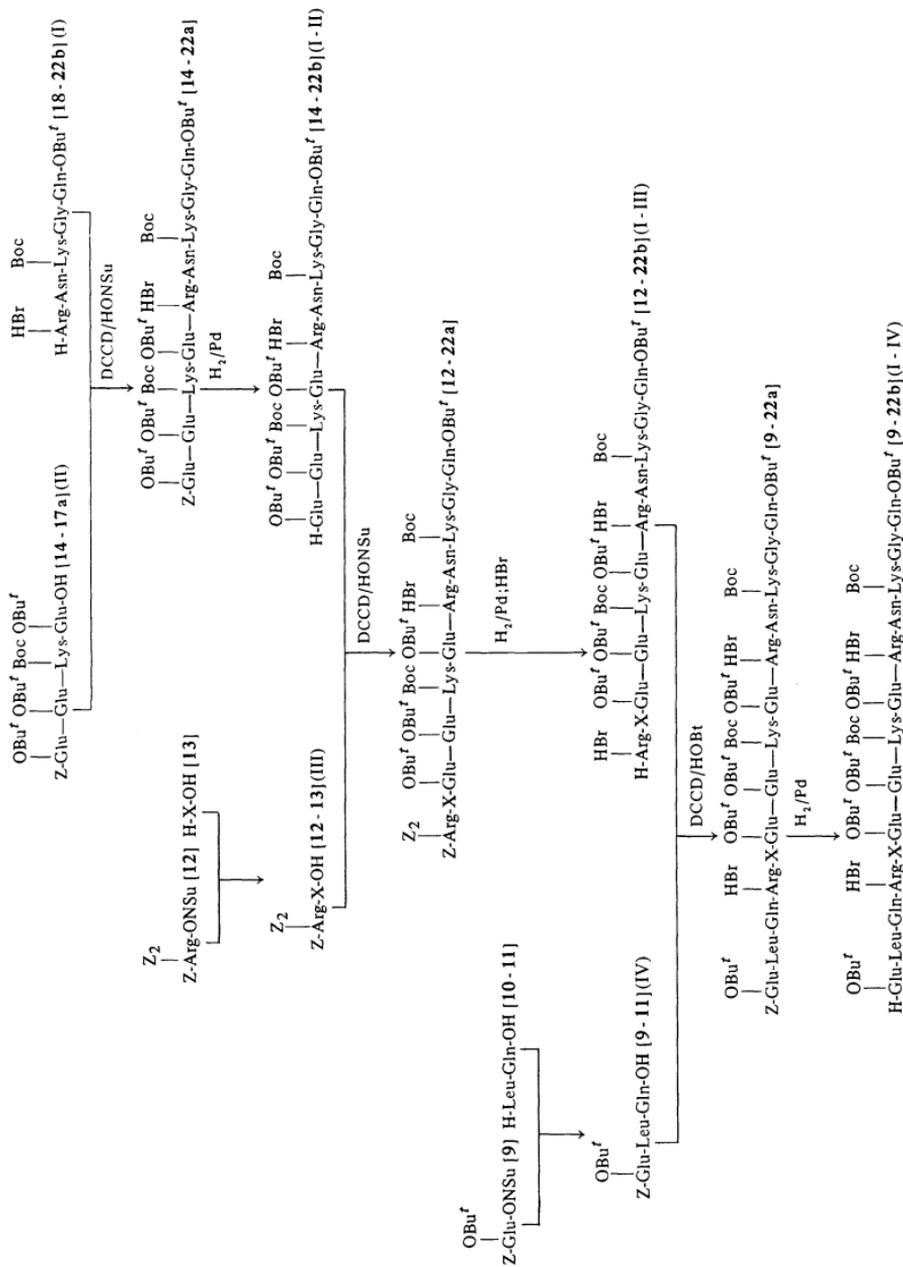
lyse einwandrei in H-Glu(OBU<sup>f</sup>)-Glu(OBU<sup>f</sup>)-Lys(Boc)-Glu(OBU<sup>f</sup>)-Arg(HBr)-Asn-Lys(Boc)-Gly-Gln-OBU<sup>f</sup> [14 - 22b] überführen (s. Schema 3).

#### Teilsequenzen 9 - 22 (Hauptfragmente I - IV für beide Analoga)

Der Anbau der Fragmente III, d.s. Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Nle-OH [NMo12-13] bzw. Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Leu-OH [LMo12-13], auf das erstellte Nonapeptid-ester-Derivat [14 - 22b] gelang wiederum unter Anwendung des Wunsch-Weygand-Verfahrens<sup>[5,6]</sup> eindeutig: Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Nle-Glu(OBU<sup>f</sup>)-Glu(OBU<sup>f</sup>)-Lys(Boc)-Glu(OBU<sup>f</sup>)-Arg(HBr)-Asn-Lys(Boc)-Gly-Gln-OBU<sup>f</sup> [NMo12-22a] und das Leucin-Ana-

logon [LMo12-22a] ließen sich beide in der erwünschten Reinheit isolieren.

Einwirkung von katalytisch erregtem Wasserstoff auf die beiden Undecapeptid-Derivate [NMo12-22a und LMo12-22a] führte zur Entfernung der drei Benzoyloxycarbonyl-Schutzgruppen; nach jeweiliger Neutralisation der freigesetzten Guanidino-Funktionen an beiden Peptid-Derivaten mit Bromwasserstoffsäure (gleichzeitig während der Hydrierung vorgenommen) konnten H-Arg(HBr)-Nle-Glu(OBU<sup>f</sup>)-Glu(OBU<sup>f</sup>)-Lys(Boc)-Glu(OBU<sup>f</sup>)-Arg(HBr)-Asn-Lys(Boc)-Gly-Gln-OBU<sup>f</sup> [NMo12-22b] wie auch das Leucin-Analogon [LMo12-22b] in Form der Hydrobromide gewonnen werden.



Ankondensation des Fragmentes IV, d.i. Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Leu-Gln-OH [9 - 11], an die beiden Undecapeptid-tert.-butylester verlief nach dem von König und Geiger<sup>[7]</sup> modifizierten Wünsch-Weygand-Verfahren<sup>[5,6]</sup> (*N*-Hydroxybenzotriazol anstelle von *N*-Hydroxysuccinimid) erfolgreich: Aus den Verknüpfungsprodukten, d.s. die beiden Tetradecapeptid-Derivate [NMo9-22a] bzw. [LMo9-22a] waren nach hydrogenolytischer Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppen H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Nle-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Lys(Boc)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Arg(HBr)-Asn-Lys(Boc)-Gly-Gln-OBu<sup>t</sup> [NMo9-22b] sowie das Leucin-Analogon [LMo9-22b] jeweils in Form der Hydrobromide und Tetrahydrate zugänglich (s. Schema 3).

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir für eine Beihilfe im Rahmen des Schwerpunktprogramms „Synthese makromolekularer Naturstoffe“ zu Dank verpflichtet.

Unsere technischen Assistenten Herrn H. Stocker und Herrn J. Musiol danken wir für ihre ausgezeichnete Mitarbeit, Fräulein R. Scharf für die Ausführung der Aminosäureanalysen. Die Elementaranalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium der Abteilung (Leitung Dr. P. Thamm) durchgeführt.

## Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert; sie wurden in offenen Kapillaren im Apparat nach Dr. Tottoli bzw. im Gerät „Mettler FPI“ bestimmt. Die spezifischen Drehwerte wurden im lichtelektrischen Polarimeter der Firma Zeiss bzw. im Perkin-Elmer 241MC ermittelt. Der chromatographische Reinheitstest der Zwischen- und Endprodukte erfolgte nach den üblichen Verfahren der Dünnschicht- bzw. Papierchromatographie jeweils mindestens mit zwei Lösungsmittelsystemen. Die Ausführung der Aminosäureanalysen geschah nach der Methode von Stein und Moore (Beckmann 120B mit Digital-Integrator bzw. Multichrom B), der CHN-Analysen mittels des „Elemental Analyzer“ Perkin-Elmer 240. Die Ausgangsaminosäuren wurden von der Fa. Fluka AG, Buchs/Schweiz bezogen.

### 1) Benzyloxycarbonyl-L-glutamin-tert.-butylester [22a]<sup>[9]</sup>

140 g Z-Gln-OH werden in 1500 cm<sup>3</sup> Essigsäure-tert.-butylester suspendiert und mit 125 g konz. Schwefelsäure und 2.5 cm<sup>3</sup> Oleum (65%) unter Rühren versetzt. Nach 3stdg. Rühren bei Raumtemp. wird mit Essigsäure-äthylester verdünnt, mit Kaliumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert, mit Wasser gewaschen, über Natriumsul-

fat getrocknet und im Vak. eingeengt. Der Rückstand kristallisiert aus Äther. Schmp. 92 - 93 °C;  $[\alpha]_D^{20}$ : -20.55 ± 0.5° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : -24.42° (c = 1; in Äthanol). Chromatographisch rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30); Ausb. 103 g (61%).

C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (336.3)

Ber.	C 60.70	H 7.19	N 8.33
Gef.	C 60.72	H 7.20	N 8.26

### 2) L-Glutamin-tert.-butylester-Bis(phenylsulfonyl)-ammoniumsalz [22b]

103 g Z-Gln-OBu<sup>t</sup> [22a] in 1500 cm<sup>3</sup> Methanol werden unter Zutropfen einer methanolischen Lösung von 91 g Bis(phenylsulfonyl)amin bei pH 3.5 hydrogenolytisch entacyliert. Das Filtrat vom Katalysator wird im Vak. eingeengt und der ölige Rückstand aus Essigsäure-äthylester/Äther kristallisiert. Farbloses Pulver aus wenig Methanol/Äther. Schmp. 136 - 137 °C;  $[\alpha]_D^{20}$ : +10.38 ± 0.5° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : +11.41° (c = 1; in Methanol). Chromatographisch rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30) und n-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1); Ausb. 130 g (87%).

C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>S<sub>2</sub> (499.6)

Ber.	C 50.49	H 5.85	N 8.41	S 12.84
Gef.	C 50.49	H 5.79	N 8.36	S 12.90

### 3) Benzyloxycarbonyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester [21 - 22a]

115 g H-Gln-OBu<sup>t</sup> · DBSA [22b] werden in 800 cm<sup>3</sup> Dichlormethan suspendiert, mit 32.2 cm<sup>3</sup> Triäthylamin und nach 10 min mit 70.5 g Z-Gly-ONSu [21] versetzt. Man rührt anschließend 24 h bei Raumtemp., engt die klare Lösung im Vak. ein und nimmt den öligen Rückstand in Essigsäure-äthylester auf. Zur Entfernung nicht umgesetzter Ausgangssubstanzen wäscht man ausreichend mit Citronensäure-Lösung, Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser, trocknet über Natriumsulfat und dampft im Vak. zu einem farblosen Öl ein. Chromatographisch rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30). Ausb. 87 g (93%).

### 4) Glycyl-L-glutamin-tert.-butylester-Bis(phenylsulfonyl)-ammoniumsalz [21 - 22b]

80 g Z-Gly-Gln-OBu<sup>t</sup> [21 - 22a] in 900 cm<sup>3</sup> Methanol werden unter Zutropfen einer methanolischen Lösung von 60 g Bis(phenylsulfonyl)amin bei pH 3.5 hydrogenolytisch entacyliert. Das Filtrat vom Katalysator wird im Vak. eingeengt; der ölige Rückstand erstarrt beim Verreiben mit Petroläther. Farbloses Pulver vom Schmp. 92 °C (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ : -8.5° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : -9.7° (c = 1; in Methanol). Chromatographisch rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30); Ausb. 110 g (98%).

C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> · C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>S<sub>2</sub> (556.6)

Ber.	C 49.64	H 5.80	N 10.07	S 11.54
Gef.	C 49.70	H 5.89	N 9.65	S 11.51

5) *Benzyloxycarbonyl-L-asparaginyln-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysine* [19-20]

51 g *H-Lys(Boc)-OH* [20] werden als Benzyltrimethylammoniumsalz (Triton B) in 700 cm<sup>3</sup> Dimethylformamid mit 81 g *Z-Asn-ONp* [19] umgesetzt. Nach Zugabe von 16.1 cm<sup>3</sup> Pyridin wird 48 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend das Dimethylformamid im Vak. entfernt. Bei der Verteilung des Rückstandes zwischen Essigsäure-äthylester und Kaliumhydrogensulfat-Lösung entsteht ein fein kristallisierter Niederschlag. Farblose Kristalle aus Äthanol/Petroläther. Schmp. 174 - 175 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : +13.8 ± 0.5° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : +16.7° (*c* = 1; in Pyridin). Chromatographisch rein in *n*-Heptan/tert.-Butanol/Essigsäure (3:2:1); Ausb. 70 g (71%).

C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> (494.5)

Ber. C 55.85 H 6.93 N 11.33

Gef. C 55.68 H 6.92 N 11.29

6) *Benzyloxycarbonyl-L-asparaginyln-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester* [19-22a]

61.5 g *H-Gly-Gln-OBu<sup>t</sup>-DBSA* [21-22b] und 54.5 g *Z-Asn-Lys(Boc)-OH* [19-20] in 700 cm<sup>3</sup> Dimethylformamid werden unter Rühren bei 0 °C mit 15.5 cm<sup>3</sup> Triäthylamin und nach 15 min mit 13 g *N*-Hydroxysuccinimid und 23 g Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach 34 stg. Rühren bei Raumtemp. wird der Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und das Lösungsmittel im Vak. entfernt. Der Rückstand kristallisiert nach Zugabe von Essigsäure-äthylester. Farblose Kristalle aus Methanol/Wasser und 2-Propanol/Essigsäure-äthylester. Schmp. 155 - 156 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : -20.8 ± 0.5° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : -24.9° (*c* = 1; in Äthanol). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1); Ausb. 63 g (78%).

C<sub>34</sub>H<sub>53</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub> (735.8)

Ber. C 55.50 H 7.26 N 13.33

Gef. C 55.26 H 7.18 N 13.27

7) *L-Asparaginyln-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester-hydrochlorid* [19-22b]

47.5 g *Z-Asn-Lys(Boc)-Gly-Gln-OBu<sup>t</sup>* [19-22a] in 800 cm<sup>3</sup> Methanol werden unter Zutropfen von 25.2 cm<sup>3</sup> methanolischer Chlorwasserstoff-Lösung (2.5N) wie üblich hydrogenolytisch entacyliert. Das Filtrat vom Katalysator wird im Vak. eingedampft, der ölige Rückstand mit Äther verrieben. Farbloses Pulver. Schmp. 98 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : +9.5° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : +10.8° (*c* = 1; in Methanol). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1); Ausb. 40 g (97%).

C<sub>26</sub>H<sub>47</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>·HCl (638.1)

Ber. C 48.94 H 7.58 N 15.36 Cl 5.56

Gef. C 48.68 H 7.85 N 15.11 Cl 5.49

8) *N<sup>α</sup>,N<sup>δ</sup>,N<sup>ω</sup>-Tris(benzyloxycarbonyl)-L-arginyl-L-asparaginyln-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester* [18-22a]

33.68 g *Z-Arg(Z)-ONSu* [10] [18] und 31.9 g *H-Asn-Lys(Boc)-Gly-Gln-OBu<sup>t</sup>-HCl* [19-22b] werden in 1000 cm<sup>3</sup> Dimethylformamid gelöst, die Lösung auf 0 °C gekühlt und anschließend unter Rühren mit 7 cm<sup>3</sup> Triäthylamin versetzt. Nach 24 stg. Rühren bei Raumtemp. wird das Lösungsmittel im Vak. entfernt, der Rückstand aus Methanol/Wasser umgefällt und anschließend aus Methanol umkristallisiert. Das erhaltene Produkt wird mehrmals mit heißem Essigsäure-äthylester gewaschen und getrocknet. Farbloses Pulver von  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : -7.6° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : -9.4° (*c* = 1; in Essigsäure). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) und *n*-Heptan/tert.-Butanol/Essigsäure (5:1:1); Ausb. 46.5 g (80%).

C<sub>56</sub>H<sub>77</sub>N<sub>11</sub>O<sub>16</sub> (1160.3)

Ber. C 57.98 H 6.69 N 13.29 O 22.02

Gef. C 57.70 H 6.56 N 13.29 O 22.45

9) *L-Arginyl(hydrobromid)-L-asparaginyln-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester-hydrobromid-Dihydrat* [18-22b]

46.4 g *Z-Arg(Z)-Asn-Lys(Boc)-Gly-Gln-OBu<sup>t</sup>* [18-22a] in 1500 cm<sup>3</sup> Dimethylformamid/Methanol (2:1) werden unter Zutropfen von 80 cm<sup>3</sup> *N*-Bromwasserstoffsäure bei pH 4.5 wie üblich hydrogenolytisch entacyliert. Nach Entfernen des Katalysators wird das Lösungsmittel im Vak. abdestilliert und der Rückstand aus Äthanol/Diäthyläther umgefällt. Amorphe Substanz;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : -4.8° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : -6.05° (*c* = 1; in 80proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) und Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30); Ausb. 37 g (98%).

C<sub>32</sub>H<sub>59</sub>N<sub>11</sub>O<sub>10</sub>·2HBr·2H<sub>2</sub>O (955.8)

Ber. C 40.21 H 6.85 N 16.12 Br 17.72

Gef. C 40.56 H 6.93 N 15.89 Br 16.51

10) *N<sup>α</sup>-Benzyloxycarbonyl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-α-methylester* [16-17a]

24 g *Z-Lys(Boc)-ONSu* [16] und 12.7 g *H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OMe-HCl* [17] in 400 cm<sup>3</sup> Dioxan werden bei 5 °C unter Rühren mit 7 cm<sup>3</sup> Triäthylamin versetzt. Nach 12 stg. Rühren bei ca. 20 °C wird die Lösung im Vak. eingedampft und der Rückstand zwischen Essigsäure-äthylester und Wasser verteilt. Die organische Phase wird nacheinander sorgfältig mit verd. Kaliumhydrogensulfat-Lösung, Wasser, verd. Kaliumhydrogencarbonat-Lösung, Wasser und gesätt. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vak. eingedampft. Der erhaltene Rückstand kristallisiert aus Diisopropyläther. Schmp. 82 - 83 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : -17.3° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : -20.7° (*c* = 1; in Methanol). Chromatographisch rein in

Cyclohexan/Chloroform/Essigsäure (45 : 45 : 10); Ausb. 26 g (90%).

$C_{29}H_{45}N_3O_9$  (579.7)

Ber. C 60.09 H 7.82 N 7.24  
Gef. C 60.12 H 7.80 N 7.28

11) *N*<sup>α</sup>-Benzoyloxycarbonyl-*N*<sup>ε</sup>-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*L*-glutaminsäure- $\gamma$ -*tert*-butylester [16 - 17b]

25.2 g *Z*-*Lys*(*Boc*)-*Glu*(*OBu*<sup>t</sup>)-*OMe* [16 - 17a] in 400 cm<sup>3</sup> Dioxan/Wasser (ca. 4 : 1) werden durch Zutropfen von 45 cm<sup>3</sup> 1N NaOH in Gegenwart von Thymolphthalein als Indikator im Laufe von 3 h titrimetrisch verseift. Nach Zugabe von 20 cm<sup>3</sup> 1N HCl wird das Dioxan im Vak. weitgehend abgedampft, der Rückstand mit 500 cm<sup>3</sup> Essigsäure-äthylester überschichtet und mit 25 cm<sup>3</sup> 1N HCl versetzt. Die organische Phase wird abgetrennt und mit 1N KHCO<sub>3</sub>-Lösung erschöpfend extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden mit 500 cm<sup>3</sup> Essigsäure-äthylester überschichtet und mit 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bis pH 3 angesäuert. Die Essigesterphase wird mit Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung sulfatfrei gewaschen und nach dem Trocknen über Natriumsulfat im Vak. eingedampft. Der erhaltene Rückstand kristallisiert bei 0 °C aus Essigsäure-äthylester/Petroläther (40-60 °C). Schmp. 108 - 110 °C;  $[\alpha]_D^{20}$ : - 9.1° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : - 10.9° (c = 1; in Methanol). Chromatographisch rein in Cyclohexan/Chloroform/Essigsäure (45 : 45 : 10); Ausb. 21.7 g (90%).

$C_{28}H_{43}N_3O_9$  (565.7)

Ber. C 59.45 H 7.66 N 7.42  
Gef. C 59.90 H 7.87 N 7.70

12) *N*<sup>ε</sup>-*tert*-Butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*L*-glutaminsäure- $\gamma$ -*tert*-butylester [16 - 17c]

21.0 g *Z*-*Lys*(*Boc*)-*Glu*(*OBu*<sup>t</sup>)-*OH* [16 - 17b] in 600 cm<sup>3</sup> Methanol/Wasser (ca. 8 : 2) werden wie üblich in Gegenwart von Palladiumschwarz als Katalysator hydrogenolytisch entacyliert. Die vom Katalysator befreite Lösung wird im Vak. zur Trockene eingedampft und aus Methanol/Diisopropyläther umkristallisiert.  $[\alpha]_D^{20}$ : + 24.2° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : + 28.9° (c = 1; in Methanol). Chromatographisch rein in Methanol/Chloroform (1 : 3); Ausb. 16.0 g (95%).

$C_{20}H_{37}N_3O_7$  (431.54)

Ber. C 55.66 H 8.64 N 9.73  
Gef. C 55.50 H 8.80 N 9.75

13) Benzoyloxycarbonyl-*L*-glutamyl( $\gamma$ -*tert*-butylester)-*N*<sup>ε</sup>-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*L*-glutaminsäure- $\gamma$ -*tert*-butylester [15 - 17a]

16.0 g *Z*-*Glu*(*OBu*<sup>t</sup>)-*ONSu* [15] und 15.5 g *H*-*Lys*(*Boc*)-*Glu*(*OBu*<sup>t</sup>)-*OH* [16 - 17c] in 200 cm<sup>3</sup> Dimethylformamid werden bei - 5 °C unter Rühren mit 5 cm<sup>3</sup> Triäthyl-

amin und 4 cm<sup>3</sup> Pyridin versetzt. Nach 24 stdg. Rühren bei 20 °C wird das Lösungsmittel im Vak. abgedampft, der Rückstand zwischen 800 cm<sup>3</sup> Essigsäure-äthylester und Wasser verteilt und mit 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 2.5 gestellt. Die Essigesterphase wird zweimal mit je 100 cm<sup>3</sup> 0.5N KHCO<sub>3</sub>-Lösung geschüttelt, dann mit verd. Kaliumhydrogensulfat-Lösung bis zur sauren Reaktion behandelt, mit Wasser, gesätt. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und schließlich im Vak. eingedampft. Der Rückstand kristallisiert aus Essigsäure-äthylester/Petroläther (40 : 60). Schmp. 99 - 102 °C;  $[\alpha]_D^{20}$ : - 6.9° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : - 8.1° (c = 1; in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in Cyclohexan/Chloroform/Essigsäure (45 : 45 : 10) und *n*-Heptan/*tert*-Butanol/Essigsäure (5 : 1 : 1); Ausb. 24.7 g (91.5%).

$C_{37}H_{58}N_4O_{12}$  (750.9)

Ber. C 59.18 H 7.78 N 7.46  
Gef. C 58.90 H 7.70 N 7.32

14) *L*-Glutamyl( $\gamma$ -*tert*-butylester)-*N*<sup>ε</sup>-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*L*-glutaminsäure- $\gamma$ -*tert*-butylester [15 - 17b]

24.5 g *Z*-*Glu*(*OBu*<sup>t</sup>)-*Lys*(*Boc*)-*Glu*(*OBu*<sup>t</sup>)-*OH* [15 - 17a] in 1000 cm<sup>3</sup> Methanol/Wasser (ca. 9 : 1) werden in Gegenwart von Palladiumschwarz katalytisch hydriert. Das Filtrat vom Katalysator wird im Vak. weitgehend eingedampft; dabei beginnt sich ein farbloses Produkt auszuscheiden. Die Fällung wird durch Zugabe von 300 cm<sup>3</sup> dest. Wasser vervollständigt, das erhaltene Material abfiltriert und im Vak. bei 35 °C über KOH und P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> getrocknet.  $[\alpha]_D^{20}$ : + 7.4° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : + 9.1° (c = 1; in 80 proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in Methanol/Chloroform (1 : 3) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (6 : 2 : 2); Ausb. 18.5 g (92%).

$C_{29}H_{52}N_4O_{10}$  (616.7)

Ber. C 56.47 H 8.49 N 9.00  
Gef. C 56.00 H 8.75 N 9.15

15) Benzoyloxycarbonyl-*L*-glutamyl( $\gamma$ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl( $\gamma$ -*tert*-butylester)-*N*<sup>ε</sup>-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*L*-glutaminsäure- $\gamma$ -*tert*-butylester [14 - 17a] (Fragment II)

20.0 g *H*-*Glu*(*OBu*<sup>t</sup>)-*Lys*(*Boc*)-*Glu*(*OBu*<sup>t</sup>)-*OH* [15 - 17b] und 14.5 g *Z*-*Glu*(*OBu*<sup>t</sup>)-*ONSu* [14] in 500 cm<sup>3</sup> Dimethylformamid werden bei - 5 °C unter Rühren mit 4.6 cm<sup>3</sup> Triäthylamin versetzt. Nach 15 stdg. Rühren wird das Lösungsmittel im Vak. abgedampft und der Rückstand in Essigsäure-äthylester aufgenommen. Die Lösung wird zweimal mit viel verd. Kaliumhydrogen-carbonat-Lösung geschüttelt, mit Kaliumhydrogensulfat-Lösung bis zur sauren Reaktion behandelt, mit gesätt. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und letztlich im Vak. eingedampft. Der erhal-

tene Rückstand wird aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Schmp. 147 - 149 °C;  $[\alpha]_D^{20}$ : - 9.8° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : - 12.3° (c = 1; in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in Cyclohexan/Chloroform/Essigsäure (45 : 45 : 10); Ausb. 22.3 g (75%).

C<sub>46</sub>H<sub>73</sub>N<sub>5</sub>O<sub>15</sub> (936.1)

Ber. C 59.02 H 7.86 N 7.78  
Gef. C 58.70 H 8.04 N 7.72

16) *Benzyloxycarbonyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-arginyl(hydrobromid)-L-asparaginyln-<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester [14 - 22a]*

9.36 g *Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Lys(Boc)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OH [14 - 17a]* und 9.2 g *H-Arg(HBr)-Asn-Lys(Boc)-Gly-Gln-OBu<sup>t</sup>-HBr [18 - 22b]* in 200 cm<sup>3</sup> Dimethylformamid werden mit 1.4 cm<sup>3</sup> Triäthylamin sowie 2.3 g *N*-Hydroxysuccinimid und nach Abkühlen auf - 5 °C mit 3.1 g Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Man rührt die Reaktionsmischung 24 h bei 5 °C, danach 4 Tage bei Raumtemperatur und destilliert das Dimethylformamid im Vak. ab. Der Rückstand wird mehrmals mit Wasser digeriert und letztlich zwei- bis dreimal aus Methanol/Essigsäure-äthylester umgefällt. Farblose, amorphe Substanz (nach Trocknen bei 10<sup>-3</sup> Torr/80 °C über P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> von  $[\alpha]_D^{20}$ : - 14.6 ± 0.5° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : - 17.4° (c = 1; in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60 : 6 : 24 : 20) sowie *n*-Heptan/*tert*-Butanol/Essigsäure (3 : 2 : 1) und *n*-Heptan/*n*-Butanol/Pyridin (2 : 1 : 1); Ausb. 14.8 g (84%).

C<sub>78</sub>H<sub>130</sub>N<sub>16</sub>O<sub>24</sub>·HBr (1756.9)

Ber. C 53.20 H 7.60 N 12.62 O 21.88 Br 4.24  
Gef. C 53.32 H 7.51 N 12.53 O 21.86 Br 4.55

17) *L-Glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-arginyl(hydrobromid)-L-asparaginyln-<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester-hydrobromid [14 - 22b]*

12.3 g *Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Lys(Boc)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Arg(HBr)-Asn-Lys(Boc)-Gly-Gln-OBu<sup>t</sup> [14 - 22a]* in 800 cm<sup>3</sup> Methanol werden unter Zutropfen von 7 cm<sup>3</sup> 1N HBr (pH 5.5) wie üblich katalytisch hydriert. Das Filtrat vom Katalysator wird im Vak. eingedampft und der Rückstand zweimal aus Äthanol/Essigsäure-äthylester umgefällt.  $[\alpha]_D^{20}$ : - 21.5 ± 0.5° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : - 26.2° (c = 1; in Methanol); Ausb. 11.4 g (96%).

C<sub>70</sub>H<sub>124</sub>N<sub>16</sub>O<sub>22</sub>·2HBr (1703.7)

Ber. C 49.34 H 7.45 N 13.15 Br 9.38  
Gef. C 48.83 H 7.48 N 13.18 Br 9.23

18) *N<sup>α</sup>,N<sup>δ</sup>,N<sup>ω</sup>-Tris(benzyloxycarbonyl)-L-arginyl-L-norleucin [NM012-13]*

Eine Lösung von 3.87 g *Norleucin [13]* in 29.7 cm<sup>3</sup> 1N NaOH, 40 cm<sup>3</sup> Wasser und 200 cm<sup>3</sup> Dioxan wird bei 10 °C mit 10 g *Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-ONSu [12]* versetzt und 8 h bei Raumtemp. gerührt. Danach wird Dioxan im Vak. (Badtemp. 20 °C) entfernt, die wäßrige Phase nach Ansäuern mit 1N HCl mehrmals mit Essigsäure-äthylester extrahiert und die Essigesterphase zuerst mit 1N HCl und dann mit Wasser gewaschen. Das nach Entfernen des Lösungsmittels im Vak. erhaltene Material wird nacheinander aus Methanol/Wasser und Essigsäure-äthylester/Diisopropyläther/Petroläther umgefällt. Schmp. 130 - 132 °C;  $[\alpha]_D^{20}$ : + 1.3° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : + 2.0° (c = 1; in Essigsäure) oder  $[\alpha]_D^{20}$ : + 7.2° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : + 8.4° (c = 1; in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in *n*-Heptan/*tert*-Butanol/Essigsäure (3 : 2 : 1) und Chloroform/Methanol (9 : 1); Ausb. 8.8 g (86%).

C<sub>36</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub> (689.8)

Ber. C 62.69 H 6.28 N 10.15  
Gef. C 62.45 H 6.28 N 10.16

19) *N<sup>α</sup>,N<sup>δ</sup>,N<sup>ω</sup>-Tris(benzyloxycarbonyl)-L-arginyl-L-leucin \* [LM012-13]*

30 g *Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-ONSu [12]* und 11.6 g *Leucin [13]* in 1500 cm<sup>3</sup> Dioxan/Wasser (2 : 1) werden nach Zugabe von 89 cm<sup>3</sup> 1N NaOH unter 18stdg. Rühren wie unter 18 beschrieben, umgesetzt und aufgearbeitet. Der Rückstand wird aus Äthanol/Wasser und Essigsäure-äthylester/Diäthyläther/Petroläther umgefällt. Schmp. 126 - 128 °C;  $[\alpha]_D^{20}$ : - 5.8 ± 1° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : - 7.1° (c = 1; in Essigsäure). Chromatographisch rein in *n*-Heptan/*tert*-Butanol/Essigsäure (5 : 1 : 1); Ausb. 26.6 g (86.6%).

C<sub>36</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub> (689.8)

Ber. C 62.69 H 6.28 N 10.15  
Gef. C 62.59 H 6.41 N 9.94

Aminosäureanalyse:

	Arg	Leu
Ber.	1	1
Gef.	1.00	1.00

20) *N<sup>α</sup>,N<sup>δ</sup>,N<sup>ω</sup>-Tris(benzyloxycarbonyl)-L-arginyl-L-norleucyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-arginyl(hydrobromid)-L-asparaginyln-<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester [NM012-22a]*

Eine Lösung von 3.40 g *H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Lys(Boc)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Arg(HBr)-Asn-Lys(Boc)-Gly-Gln-*

\* Abgeänderte Vorschrift nach Wünsch et al.[11].

$-OBU^t \cdot HBr$  [14-22b], 2,80 g *Z*-Arg(*Z*)-Nle-OH [NMo12-13], 0,6 g *N*-Hydroxysuccinimid und 0,280 cm<sup>3</sup> Triäthylamin in 200 cm<sup>3</sup> Dimethylformamid werden bei  $-10^\circ\text{C}$  mit 0,825 g Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und 24 h bei  $4^\circ\text{C}$  gerührt. Nach weiterem 24 stg. Rühren bei Raumtemp. filtriert man vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, entfernt das Lösungsmittel im Vak. und fällt den Eindampf-Rückstand zweimal aus Methanol/Essigsäure-äthylester um. Das erhaltene Material wird sorgfältig mit Wasser digeriert, abfiltriert und getrocknet.  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-4.9^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-6.9^\circ$  ( $c = 0.7$ ; in Methanol). Chromatographisch rein in *n*-Heptan/tert-Butanol/Essigsäure (3:2:1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1); Ausb. 4,0 g (87%).

$C_{106}H_{165}N_{21}O_{30} \cdot HBr$  (2294,6)  
Ber. C 55,48 H 7,29 O 20,92 N 12,82 Br 3,48  
Gef. C 55,24 H 7,27 O 20,97 N 12,62 Br 3,20

21)  $N^\alpha, N^\beta, N^\omega$ -Tris(benzyloxycarbonyl)-*L*-arginyl-*L*-leucyl-*L*-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-*L*-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-*N*<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*L*-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-*L*-arginyl(hydrobromid)-*L*-asparaginyll-*N*<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-glycyl-*L*-glutamin-tert.-butylester [LMO12-22a]

Eine Lösung von 1,7 g *H*-Glu(*OBU*<sup>t</sup>)-Glu(*OBU*<sup>t</sup>)-Lys(*Boc*)-Glu(*OBU*<sup>t</sup>)-Arg(*HBr*)-Asn-Lys(*Boc*)-Gly-Gln-*OBU*<sup>t</sup>·*HBr* [14-22b], 1,4 g *Z*-Arg(*Z*)-Leu-OH [LMO12-13], 0,3 g *N*-Hydroxysuccinimid und 0,140 cm<sup>3</sup> Triäthylamin in 100 cm<sup>3</sup> Dimethylformamid werden bei  $-10^\circ\text{C}$  mit 0,412 g Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und 24 h bei  $4^\circ\text{C}$  gerührt. Nach weiterem 24 stg. Rühren bei Raumtemp. filtriert man vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, entfernt das Lösungsmittel im Vak. und fällt den Eindampf-Rückstand aus Methanol/Essigsäure-äthylester um. Das erhaltene Material wird sorgfältig mit Wasser digeriert, abfiltriert und getrocknet. Chromatographisch rein in *n*-Heptan/tert.-Butanol/Essigsäure (3:2:1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1); Ausb. 1,94 g (85%).

Aminosäureanalyse:

	Lys	Arg	Asp	Glu	Gly	Leu
Ber.	2	2	1	4	1	1
Gef.	2.02	2.01	1.00	3.98	1.01	1.00

22) *L*-Arginyl(hydrobromid)-*L*-norleucyl-*L*-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-*L*-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-*N*<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*L*-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-*L*-arginyl(hydrobromid)-*L*-asparaginyll-*N*<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-glycyl-*L*-glutamin-tert.-butylester-hydrobromid-Dihydrat [NMO12-22b]

3,5 g *Z*-Arg(*Z*)-Nle-Glu(*OBU*<sup>t</sup>)-Glu(*OBU*<sup>t</sup>)-Lys(*Boc*)-Glu(*OBU*<sup>t</sup>)-Arg(*HBr*)-Asn-Lys(*Boc*)-Gly-Gln-*OBU*<sup>t</sup>

[NMO12-22a] in 800 cm<sup>3</sup> Methanol werden unter Zutropfen von 31 cm<sup>3</sup> 0,1N *HBr* bei pH ca. 4,5 mit katalytisch erregtem Wasserstoff entacyliert. Das vom Katalysator befreite Filtrat wird im Vak. eingedampft und der Rückstand aus Methanol/Essigsäure-äthylester umgefällt.  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-21.7 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-25.6^\circ$  ( $c = 1$ ; in Methanol); Ausb. 3 g (95%).

$C_{82}H_{147}N_{21}O_{24} \cdot 3HBr \cdot 2H_2O$  (2090)  
Ber. C 47,12 H 7,43 N 14,07  
Gef. C 47,17 H 7,45 N 13,78

23) *L*-Arginyl(hydrobromid)-*L*-leucyl-*L*-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-*L*-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-*N*<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*L*-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-*L*-arginyl(hydrobromid)-*L*-asparaginyll-*N*<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-glycyl-*L*-glutamin-tert.-butylester-hydrobromid-Dihydrat [LMO12-22b]

1,8 g *Z*-Arg(*Z*)-Leu-Glu(*OBU*<sup>t</sup>)-Glu(*OBU*<sup>t</sup>)-Lys(*Boc*)-Glu(*OBU*<sup>t</sup>)-Arg(*HBr*)-Asn-Lys(*Boc*)-Gly-Gln-*OBU*<sup>t</sup> [LMO12-22a] in 500 cm<sup>3</sup> Methanol werden unter Zutropfen von 15,70 cm<sup>3</sup> 0,1N *HBr* bei pH 4,5 mit katalytisch erregtem Wasserstoff entacyliert. Das vom Katalysator befreite Filtrat wird im Vak. eingedampft und der Rückstand aus Methanol/Essigsäure-äthylester umgefällt. Ausb. 1,61 g (98%).

$C_{82}H_{147}N_{21}O_{24} \cdot 3HBr \cdot 2H_2O$  (2090)  
Ber. C 47,12 H 7,43 N 14,07  
Gef. C 47,20 H 7,50 N 14,00

24) Benzyloxycarbonyl-*L*-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-*L*-leucyl-*L*-glutamin [9-11]

23,1 g *H*-Leu-Gln-OH [10-11] werden in einem Lösungsmittelgemisch aus 89,1 cm<sup>3</sup> 1N NaOH und Dioxan/Acetonitril/Wasser (300:300:300) gelöst und mit einer Lösung von 7,5 g Natriumhydrogencarbonat in 100 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt. Nach Zugabe von 39 g *Z*-Glu(*OBU*<sup>t</sup>)-*ONSu* [9] in 200 cm<sup>3</sup> Dioxan wird 24 h bei Raumtemp. gerührt. Nun werden die organischen Lösungsmittel im Vak. entfernt, die wässrige Phase mit 1N HCl auf pH 1-2 gestellt und anschließend mit viel Essigsäure-äthylester extrahiert. Nach Neutralwaschen der Essigsäure-äthylester-Phase wird das Lösungsmittel im Vak. abdestilliert und der Rückstand aus Essigsäure-äthylester/Diisopropyläther umgefällt. Schmp.  $146-148^\circ\text{C}$ ;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-31.6 \pm 0.5^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-38.1^\circ$  ( $c = 1$ ; in Methanol). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) und *n*-Heptan/tert.-Butanol/Essigsäure (5:1:1); Ausb. 38 g (74%).

$C_{28}H_{42}N_4O_9$  (578,7)  
Ber. C 58,12 H 7,32 N 9,68  
Gef. C 58,05 H 7,24 N 9,48

25) *Benzyloxycarbonyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-leucyl-L-glutaminyll-L-arginyl(hydrobromid)-L-norleucyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-arginyl(hydrobromid)-L-asparaginyll-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester-Dihydrat* [NMo9-22a]

2.7 g *H-Arg(HBr)-Nle-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Lys(Boc)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Arg(HBr)-Asn-Lys(Boc)-Gly-Gln-OBu<sup>t</sup>-HBr* [NMo12-22b], 1.5 g *Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Leu-Gln-OH* [9-11], 0.182 cm<sup>3</sup> Triäthylamin und 0.405 g 1-Hydroxybenzotriazol in 200 cm<sup>3</sup> Dimethylformamid werden bei -10 °C mit 0.577 g Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und anschließend 24 h bei 5 °C gerührt. Nach weiterem 5tägigen Rühren bei 20 °C dampft man das Lösungsmittel im Vak. ab und fällt den Rückstand zweimal aus 1600 cm<sup>3</sup> Methanol/Essigsäure-äthylester (1:15) um. Nach erneutem Umfällen aus 1050 cm<sup>3</sup> Methanol/Äther (1:20) wird das erhaltene Material abfiltriert, der Filterkuchen sorgfältig mit Wasser digeriert und die wäßrige Phase dekantiert. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -4.1° bzw. [α]<sub>546</sub><sup>20</sup>: -5.7° (c = 0.8; in Methanol) oder [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -12.7 ± 0.5° bzw. [α]<sub>546</sub><sup>20</sup>: -15.8° (c = 0.6; in 80proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in n-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) und n-Heptan/tert.-Butanol/Essigsäure (3:2:1); Ausb. 2.7 g (82%).

C<sub>110</sub>H<sub>187</sub>N<sub>25</sub>O<sub>32</sub>·2HBr·2H<sub>2</sub>O (2569.8)  
Ber. C 51.41 H 7.57 N 13.63 O 21.17 Br 6.22  
Gef. C 51.34 H 7.60 N 13.72 O 21.05 Br 6.01

Aminosäureanalyse:

	Lys	Arg	Asp	Glu	Gly	Leu	Nle
Ber.	2	2	1	6	1	1	1
Gef.	2.02	1.98	1.00	6.06	0.98	0.98	1.00

26) *Benzyloxycarbonyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-leucyl-L-glutaminyll-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-arginyl(hydrobromid)-L-asparaginyll-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester-Dihydrat* [LMO9-22a]

1.56 g *H-Arg(HBr)-Leu-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Lys(Boc)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Arg(HBr)-Asn-Lys(Boc)-Gly-Gln-OBu<sup>t</sup>-HBr* [LMO12-22b] und 0.87 g *Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Leu-Gln-OH* [9-11] in 100 cm<sup>3</sup> Dimethylformamid werden nach Zusatz von 0.105 cm<sup>3</sup> Triäthylamin und 0.210 g 1-Hydroxybenzotriazol mit 0.320 g Dicyclohexylcarbodiimid (wie in Beispiel 25 beschrieben) kondensiert. Ausb. 1.6 g (83%).

C<sub>110</sub>H<sub>187</sub>N<sub>25</sub>O<sub>32</sub>·2HBr·2H<sub>2</sub>O (2569.8)  
Ber. C 51.41 H 7.57 N 13.63 Br 6.22  
Gef. C 51.28 H 7.55 N 13.57 Br 6.15

27) *L-Glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-leucyl-L-glutaminyll-L-arginyl(hydrobromid)-L-norleucyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-arginyl(hydrobromid)-L-asparaginyll-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester-hydrobromid-Tetrahydrat* [NMo9-22b]

2 g *Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Nle-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Lys(Boc)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Arg(HBr)-Asn-Lys(Boc)-Gly-Gln-OBu<sup>t</sup>* [NMo9-22a] in 800 cm<sup>3</sup> Methanol werden unter Zusatz von 8 cm<sup>3</sup> 0.1N HBr bei pH 4.5 durch katalytische Hydrogenolyse entacyliert. Die vom Katalysator befreite Lösung wird eingedampft und aus Methanol/Essigsäure-äthylester umgefällt. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -6.3° bzw. [α]<sub>546</sub><sup>20</sup>: -8.3° (c = 0.7; in Methanol). Chromatographisch rein in n-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1); Ausb. 1.86 g (94%).

C<sub>102</sub>H<sub>181</sub>N<sub>25</sub>O<sub>30</sub>·3HBr·4H<sub>2</sub>O (2552.6)  
Ber. C 47.99 H 7.58 N 13.72  
Gef. C 47.81 H 7.28 N 13.69

Aminosäureanalyse:

	Lys	Arg	Asp	Glu	Gly	Leu	Nle
Ber.	2	2	1	6	1	1	1
Gef.	1.99	1.98	1.03	6.05	0.98	0.97	1.01

28) *L-Glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-leucyl-L-glutaminyll-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-arginyl(hydrobromid)-L-asparaginyll-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycyl-L-glutamin-tert.-butylester-hydrobromid-Tetrahydrat* [LMO9-22b]

1.6 g des erhaltenen *Tetradecapeptid-Derivates* [LMO9-22a] in 600 cm<sup>3</sup> Methanol werden unter pH-Stat-Bedingungen in bekannter Weise (wie im Beispiel 27) katalytisch hydriert. Das vom Katalysator befreite Filtrat wird im Vak. eingedampft und der Rückstand aus Methanol/Essigsäure-äthylester umgefällt. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -5.3 ± 1° bzw. [α]<sub>546</sub><sup>20</sup>: -7.2° (c = 0.7; in Methanol). Chromatographisch rein in n-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1); Ausb. 1.5 g (96%).

C<sub>102</sub>H<sub>181</sub>N<sub>25</sub>O<sub>30</sub>·3HBr·4H<sub>2</sub>O (2552.6)  
Ber. C 47.99 H 7.58 N 13.72  
Gef. C 47.85 H 7.30 N 13.75

Aminosäureanalyse:

	Lys	Arg	Asp	Glu	Gly	Leu
Ber.	2	2	1	6	1	2
Gef.	2.04	2.01	0.98	6.05	1.01	2.00

## Literatur

- 1 Wünsch, E., Brown, J. C., Deimer, K.-H., Drees, F., Jäger, E., Musiol, J., Scharf, R., Stocker, H., Thamm, P. & Wendlberger, G. (1973) *Z. Naturforsch.* **28c**, 235 - 240. — D.B.P. 2315271 Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften, Göttingen. Erf. Wünsch, E. et al, und Zusatzanmeldung.
- 2 Brown, J. C., Mutt, V. & Dryburgh, J. R. (1971) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **49**, 399 - 405.
- 3 Brown, J. C., Cook, M. A. & Dryburg, J. R. (1973) *Can. J. Biochem.* **51**, 533 - 537.
- 4 Schubert, H. & Brown, J. C. (1974) *Can. J. Biochem.* **52**, 7 - 8.
- 5 Wünsch, E. & Drees, F. (1966) *Chem. Ber.* **99**, 110 - 120.
- 6 Weygand, F., Hoffmann, D. & Wünsch, E. (1966) *Z. Naturforsch.* **21 b**, 426.
- 7 König, W. & Geiger, R. (1970) *Chem. Ber.* **103**, 788 - 798.
- 8 Wünsch, E., Wendlberger, G. & Högel, A. (1971) *Chem. Ber.* **104**, 2430 - 2444.
- 9 Schnabel, E. & Schüssler, H. (1965) *Liebigs Ann. Chem.* **686**, 229 - 238.
- 10 Anderson, G. W., Zimmerman, J. E. & Callahan, F. M. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1839 - 1842.
- 11 Abgeänderte Vorschrift nach Wünsch, E., Wendlberger, G. & Thamm, P. (1971) *Chem. Ber.* **104**, 2445 - 2453.

Prof. Dr. Erich Wünsch, Dr. Gerhard Wendlberger und Karl-Heinz Deimer, Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Peptidchemie, Schillerstr. 42, D-8000 München 2.