

Hartmut Niedrich

Hydrazinverbindungen als Heterobestandteile in Peptiden, IX¹⁾

Synthese des Eledoisin-(4-11)-Octapeptides Lys-Asp(NH₂)-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH₂ und seines Heterologen mit Hydrazinoessigsäure statt Glycin *)

Aus dem Institut für Pharmakologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, 1115 Berlin-Buch

(Eingegangen am 24. April 1967)

Die Verknüpfung zweier Tetrapeptide nach der Azid-Methode liefert das Eledoisin-(4-11)-Octapeptid · 2 TFA (6). Nach Kondensation (Phosphorazo-Methode) von Z- bzw. Boc-Ile-NH-Gly(N^α-Boc)-OH mit Leu-Met-NH₂ erlaubt die gleiche Synthese mit dem N^α-ungeschützten Heterotetrapeptid 10, aus dem Reaktionsgemisch das [5-Asparagin, 9-Hydrazinoessigsäure]Eledoisin-(4-11)-Octapeptid-Acetat (11) zu isolieren.

Durch die Einbeziehung von Hydrazinosäuren als Heterobausteine in wirksame Peptide wird die Regelmäßigkeit der Polyamidstruktur unterbrochen. Die Beurteilung einer größeren Anzahl solcher Analoga wirksamer Peptide mit Heterobindungen in der Peptidkette hilft mit bei der Klärung der Frage: hat die Polyamidkette nur eine stereochemische „Gerüstfunktion“ oder sind die Amidbindungen funktionell an der Entfaltung der Wirksamkeit im Rezeptorbereich beteiligt?

Riniker und Schwyzer²⁾ äußern im Zusammenhang mit dem „Aza- α -homo-[Tyr⁴, Val⁵]Hypertensin“ die Auffassung, daß weniger das „Peptidrückgrat“ als die „Topographie“ der Seitenketten für die biologische Wirkung nötig seien. Die von Gante³⁾ grundlegend bearbeiteten α -Aza-peptide (—NH—CHR—CO—NH—NR—CO—NH—CHR—CO—) sind wegen ihrer minimalen sterischen Veränderung gegenüber

*) Abkürzungen: NHGly = Hydrazinoessigsäure, Z = Benzyloxycarbonyl, Boc = tert.-Butyloxycarbonyl, Nps = o-Nitro-phenylsulfenyl, OCH₃ = Methylester, OÄt = Äthylester, ONp = p-Nitro-phenylester, tBuONO = tert.-Butylnitrit, TFA = Trifluoressigsäure, DMF = Dimethylformamid, THF = Tetrahydrofuran, DCCI = Dicyclohexylcarbodiimid.

Bezeichnungen nach IUPAC Information Bulletin No. 25, S. 32 (1966), No. 26, S. 11 (1966), No. 27, S. 16 (1966); abgedruckt auch in J. biol. Chemistry **241**, 2491 (1966), Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **121**, 1 (1966), und Biochemistry **5**, 2485 (1966); **6**, 362 (1967); deutsche Übersetzung: Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **348**, 256 (1967).

¹⁾ VIII. Mitteil.: W. Knobloch und G. Subert, J. prakt. Chem., im Druck.

²⁾ B. Riniker und R. Schwyzer, Helv. chim. Acta **47**, 2375 (1964).

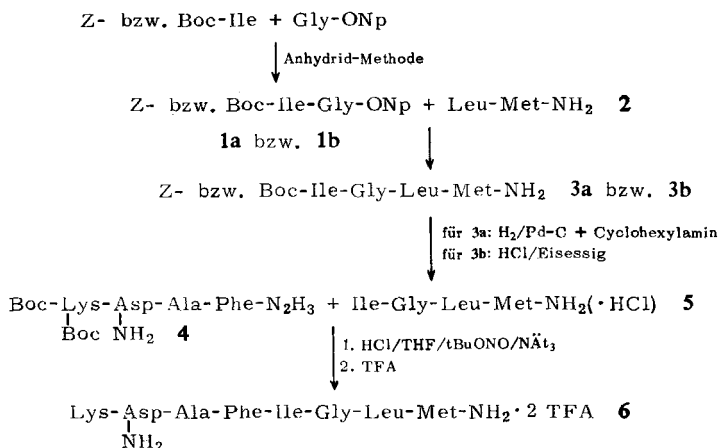
³⁾ J. Gante, Fortschr. chem. Forsch., Bd. 6, Heft 2, S. 358, Springer-Verlag, Berlin 1966.

den Peptiden zur Klärung dieser Frage besonders geeignet. Bisher wurde jedoch nur ein Aza-Analoges eines wirksamen Peptides, das [3- α -Aza-valin]Angiotensin beschrieben⁴⁾. Der gleichen Fragestellung dient der Einbau von analogen Hydroxycarbonsäuren bzw. Esterbindungen in Bradykinin.

Schukina et. al.⁵⁾ stellten vier Heterologe her und fanden beim [4-Glykolsäure]- und [6-Glycin, 8-Phenylmilchsäure]Bradykinin Wirkungen in der Größenordnung des Bradykinins⁶⁾.

A. Synthese von Eledoisinpeptiden

Eledoisinpeptide schienen uns für solche Untersuchungen besonders geeignet, weil sie eine Vielzahl von Molekülveränderungen ohne wesentliche Wirkungsabnahme zulassen (vgl. l. c.⁷⁾), solange der carboxylendständige „essentielle“ Pentapeptidbereich davon nicht berührt wird⁸⁾. Da vom Aminoende her verkürzte Eledoisinpeptide nach Lübke, Hempel und Schröder⁹⁾ und anderen Autoren¹⁰⁾ in verschiedenen Testen sogar stärkere Wirksamkeit zeigten als Eledoisin selbst, wählten wir für unsere Untersuchungen das Octapeptid Lys-Asp(NH₂)-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH₂.



4) H.-J. Hess, W. T. Moreland und G. D. Laubach, J. Amer. chem. Soc. **85**, 4040 (1963).

5) L. A. Schukina, A. L. Zhuze, E. P. Semkin und S. N. Krasnowa, Izvest. Akad. Nauk SSSR. Ser. Khim **1964**, 685, C. A. **61**, 4469 g (1964); L. A. Schukina, G. A. Rawdel, M. P. Filatowa und A. L. Zhuze, Acta chim. Acad. Sci. Hung. **44**, 205 (1965).

6) M. M. Schemjakin, L. A. Schukina, E. J. Winogradowa, G. A. Rawdel und Ju. A. Owtschinnikow, Experientia [Basel] **22**, 535 (1965); G. A. Rawdel, M. P. Filatowa et al., J. Med. Chemistry **10**, 242 (1967).

7) The Peptides, by E. Schröder und K. Lübke, Vol. II, S. 137, Academic Press, New York-London 1966.

8) G. Stopp und H. Niedrich, Ztschr. f. ärztl. Fortbildg., Jena, **61**, 315, 359 (1967).

9) K. Lübke, R. Hempel und E. Schröder, Experientia [Basel] **21**, 84 (1965).

10) L. Bernardi, G. Bosio, F. Chillemi, G. de Caro, R. de Castiglione, V. Erspamer, A. Glaesser und O. Goffredo, Experientia [Basel] **20**, 306 (1964); E. Stürmer, E. Sandrin und R. A. Boissomas, ebenda **20**, 303 (1964).

Nach den bisherigen Erfahrungen bei der Synthese von Hydrazinoessigsäurepeptiden^{11,12)} erschien die von Lübke⁹⁾ durchgeführte 4 + 4-Synthese vorteilhaft. Zunächst wurde das Stammpeptid auf folgendem Wege synthetisiert.

Leu-Met-NH₂ (**2**) wurde nach Bentley et. al.¹³⁾ erhalten und nach Behandlung mit Dowex 3 als freie Base eingesetzt.

Boc-Ile-Gly-ONp (**1b**), das auch auf dem Wege Boc-Ile-Gly-OCH₃ → Boc-Ile-Gly-OH → **1b** hergestellt wurde, wird vorteilhafter nach Goodman und Stueben¹⁴⁾ synthetisiert (63 %).

Das von Lübke et. al.¹⁵⁾ bereits auf anderem Wege erhaltene Tetrapeptid **3b** wurde in 92% Ausbeute sofort rein isoliert. Analog **3b** hergestelltes **3a** konnte nach Medzihradzky-Schweiger¹⁶⁾ durch Hydrierung an Pd-Kohle in Gegenwart von Cyclohexylamin von der Z-Schutzgruppe befreit werden. Das Tetrapeptidhydrazid **4** ließ sich aus dem entspr. Methylester^{9,17)} nur unter Zusatz von 1.2.4-Triazol^{18,19)} in verwertbaren Ausbeuten erhalten.

4 wurde nach der modifizierten Azid-Synthese nach Honzl und Rudinger²⁰⁾ in nichtwäßrigen Lösungsmitteln mit **5** kondensiert. Die Methode erwies sich nach unseren Erfahrungen der Knüpfung in dieser Position mittels DCCI⁹⁾, auch unter Zusatz von N-Hydroxy-succinimid²¹⁾, überlegen.

Als wesentlichste Verunreinigungen traten leicht abzutrennende Polykondensate auf. Die Boc-Abspaltung mit Trifluoressigsäure, gefolgt von einer 40stufigen Gegenstromverteilung in n-Butanol, Eisessig, Wasser (4:1:5), ergab **6** als einheitliches Lyophilisat.

B. Eledoisinpeptide mit Hydrazinoessigsäure statt Glycin

Nachdem Versuche zur Anwendung der o-Nitro-phenylsulfonyl(Nps)-Schutzgruppe²²⁾ bei der Herstellung der Heterosequenz -Ile-NHGly- keinen Erfolg hatten (vgl. Versuchsteil), wurde zunächst Z-Ile mit NHGly(N α -Boc)-OÄt¹²⁾ mittels DCCI zu **7a** umgesetzt.

Die Verseifung von **7a** erforderte bei einem Überschuß von NaOH eine Dauer von 10 Stdn. Auch bei der Aktivierung der Carboxylgruppe in **8a** und **8b** fand sich ein von den entspr. Stammpeptiden (z. B. Boc-Ile-Gly-OCH₃) stark abweichendes Verhalten.

¹¹⁾ H. Niedrich und W. Knobloch, J. prakt. Chem. **17**, 263, 273 (1962).

¹²⁾ H. Niedrich, Chem. Ber. **98**, 3451 (1965).

¹³⁾ P. H. Bentley, H. Gregory, A. H. Laird und J. S. Morley, J. chem. Soc. [London] **1964**, 6130, Suppl. 2.

¹⁴⁾ M. Goodman und K. C. Stueben, J. Amer. chem. Soc. **81**, 3980 (1959).

¹⁵⁾ K. Lübke, E. Schröder, R. Schmichen und H. Gibian, Liebigs Ann. Chem. **679**, 195 (1964).

¹⁶⁾ H. Medzihradzky-Schweiger und K. Medzihradzky, Acta Chim. Acad. Sci. Hung. **50**, 339 (1966).

¹⁷⁾ H. Niedrich und E. Löwe, J. prakt. Chem. **35**, 213 (1967).

¹⁸⁾ H. C. Beyerman und W. Maasen van den Brink, Proc. chem. Soc. [London] **1963**, 266; Recueil Trav. chim. Pays-Bas **84**, 213 (1965).

¹⁹⁾ R. Grupe und H. Niedrich, Chem. Ber. **99**, 3914 (1966).

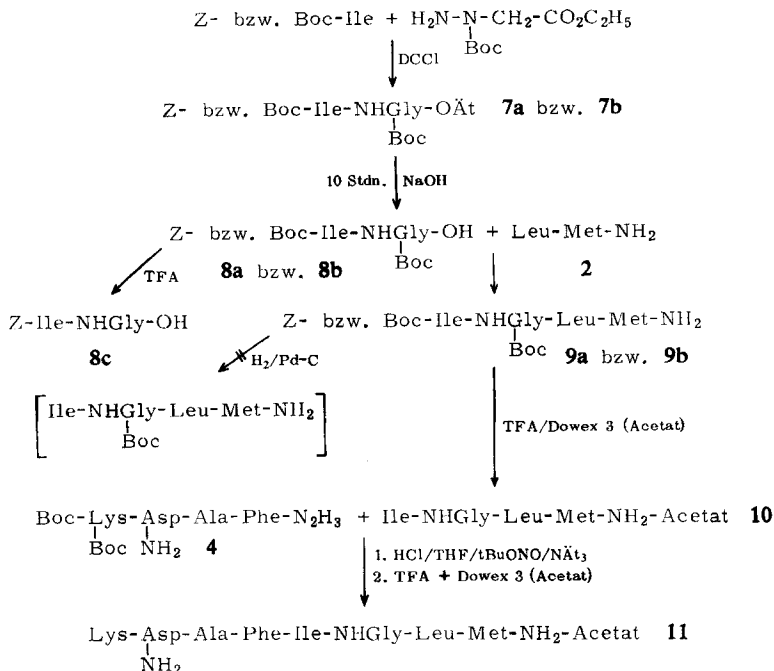
²⁰⁾ J. Honzl und J. Rudinger, Collect. czechoslov. chem. Commun. **26**, 2333 (1961).

²¹⁾ F. Weygand, D. Hoffmann und E. Wünsch, Z. Naturforsch. **21b**, 426 (1966).

²²⁾ L. Zervas, B. Borovas und E. Gazis, J. Amer. chem. Soc. **85**, 3660 (1963).

Während die Umsetzung von **8a** mit **2** nach der Methode der gemischten Anhydride nur geringe Ausbeute lieferte, waren bei Anwendung von DCCI erhöhte Temperaturen für eine vollständige Umsetzung nötig, was zu stark verunreinigten Produkten führte (Acylharnstoff).

Eine Herstellung des Hydroxysuccinimid- und des Nitrophenylesters von **8a** mittels DCCI gelang nicht.



Nach der Phosphorazo-Methode^{23,24)} erhielten wir das gewünschte Tetrapeptid **9a**. Die Z-Schutzgruppe ließ sich jedoch wie beim Stammpeptid nach l. c.¹⁶⁾ nicht entfernen. Deshalb mußte, ungeachtet der Gefahr einer *N*^α-Acylierung, das Tetrapeptid **10** mit ungeschütztem α -Stickstoff, das analog von **7b** ausgehend erhalten wurde, zur Azid-Synthese eingesetzt werden. Im Reaktionsprodukt waren elektrophoretisch und chromatographisch nach Boc-Abspaltung mit TFA fünf Komponenten nachweisbar. Durch 80stufige Gegenstromverteilung wie bei **6** und Dünnschichtchromatographie konnte eine einheitliche Substanz mit der für **11** erwarteten Aminosäure-Zusammensetzung isoliert werden. Die Eigenschaft der Hydrazinopeptide, bei der Chromatographie und Verteilung keine scharfen Flecke bzw. Maxima auszubilden, steht in Zusammenhang mit der bei der Aufarbeitung zu beobachtenden Assoziationstendenz. Dadurch werden die Reinigungsoperationen erschwert.

Die Wirksamkeit von **11** am Meerschweinchenileum, verglichen mit dem Stammpeptid **6**, beträgt ca. 1/5. (*E*_{D 50} von **6** ca. 7.9 ng/ccm, von **11** ca. 46 ng/ccm.)

²³⁾ St. Goldschmidt und H. Lautenschlager, Liebigs Ann. Chem. **580**, 68 (1953); St. Goldschmidt und G. Rosculet, Chem. Ber. **93**, 2387 (1960).

²⁴⁾ W. Grassmann und E. Wünsch, Chem. Ber. **91**, 449, 455 (1958).

Die Gegenstromverteilung brachte eine Anreicherung der Aktivität auf das 2.5 bis 3fache.

Für gewissenhafte technische Mitarbeit sei Fräulein *B. Glawe*, für die Anfertigung der Mikroelementaranalysen Frau *U. Kräft* und Frau *N. Smirnowa* gedankt. Die Durchführung der pharmakologischen Prüfungen lag in den Händen von Herrn *F. Hackenberger*.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden auf dem Mikroheitzisch nach Boëtius bestimmt und sind korrigiert.

Die Analysenproben wurden bei 70 oder 100°/0.1 Torr 5–8 Stdn. getrocknet. Die Verbindungen sind nach Abspaltung der Schutzgruppen elektrophoretisch in 7-proz. Essigsäure und Pyridinacetat-Puffer vom pH 5.6 bei 600 Volt sowie dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgel G in Essigester/Cyclohexan (3 : 1) (A), Butanol/Eisessig/Wasser- oder Methanol/-Essigester/Hexan-Gemischen auf Einheitlichkeit geprüft worden. Unter „üblicher Aufarbeitung“ versteht man a) Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. am Rotationsverdampfer, b) Lösen in Essigester oder Chloroform, c) Ausschütteln mit *n* HCl oder Citronensäure (bei Neutralstoffen), mit KHCO₃-Lösung und Wasser, d) Trocknen über MgSO₄ und e) wie a).

Die $[\alpha]$ -Werte wurden mit dem lichtelektr. Polarimeter der Fa. Bellingham & Stanley bestimmt und können um 0.5–1° vom angegebenen Wert abweichen. Das zur Verfügung stehende Isoleucin enthielt 4–5% allo-D-Isoleucin.

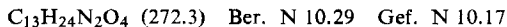
A. Eledoisinpeptide

L-Leucyl-L-methioninamid (2) wurde nach Bentley¹³⁾ erhalten. *Nps-Leu-Met-OCH₃*, Schmp. 85–86°, $[\alpha]_D^{25}$: –29.3° (*c* = 1, in DMF), 92%. *Leu-Met-NH₂*, Schmp. 129–131°, aus dem Hydrochlorid über Dowex 3 und Umkristallisation aus Wasser $[\alpha]_D^{20}$: –6.5° (*c* = 0.6, in Wasser), 75%.

tert.-Butyloxycarbonyl-L-isoleucyl-glycin-methylester: 4.0 g *Boc-Ile*²⁵⁾ (17 mMol) und 1.61 g frisch dest. *Gly-OCH₃* in 10 ccm Acetonitril werden bei 0° mittels 3.5 g *DCCI* kondensiert und nach 12 Stdn. wie üblich aufgearbeitet. Aus 4.8 g sirupösem Rückstand werden durch Äther/Hexan-Zugabe 1.6 g (32%) erhalten. Aus Cyclohexan Schmp. 83–84°, $[\alpha]_D^{25}$: –11.8° (*c* = 1, in DMF).

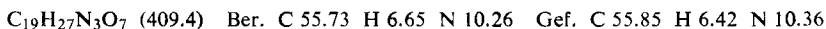


tert.-Butyloxycarbonyl-L-isoleucyl-glycin: 575 mg (2 mMol) *Boc-Ile-Gly-OCH₃* in 5 ccm Methanol + 2.5 ccm *n* NaOH werden nach 1 Stde. i. Vak. eingengt, in Wasser aufgenommen, filtriert und mit 2*n* HCl auf pH 2.5 gebracht. Der Sirup, mit Äther/Hexan kristallin gerieben, ergibt 495 mg (91%), Schmp. 132–134°.



tert.-Butyloxycarbonyl-L-isoleucyl-glycin-[p-nitro-phenylester] (1b)

a) ²⁶⁾ 535 mg (2 mMol) *Boc-Ile-Gly-OH* und 272 mg *p-Nitro-phenol* in 6 ccm Essigester werden bei 0° mit 430 mg *DCCI* versetzt. Nach 48 Stdn. gibt man 25 ccm Essigester zu, saugt vom Dicyclohexylharnstoff (430 mg) ab, engt i. Vak. auf 5 ccm ein und setzt 40 ccm Hexan zu. Ausb. 695 mg (85%), Schmp. 159–161°, $[\alpha]_D^{25}$: –24.5° (*c* = 1, in DMF).



²⁵⁾ R. Schwyzer, P. Sieber und M. Kappeler, *Helv. chim. Acta* **42**, 2622 (1959).

²⁶⁾ M. Bodanszky und V. du Vigneaud, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 5688 (1959).

b)¹⁴⁾ 2.5 g sirupöses *Boc-Ile* (ca. 10 mMol) in 30 ccm gereinigtem Chloroform werden mit 1.74 ccm *Triäthylamin* (12 mMol) versetzt. Bei -10° tropft man 1.7 g (12 mMol) *Chlorameisensäure-sek.-butylester* zu, hält 10 Min. bei 0° und kühlt dann auf -15° . Nach Zugabe von 3.0 g *Glycin-[p-nitro-phenylester]-hydrobromid* tropft man in 5 Min. 1.45 ccm *Triäthylamin* (10.5 mMol) zu, wobei -5° nicht überschritten werden dürfen. Es wird noch 1 Stde. bei -5° , 2 Stdn. bei 20° aufbewahrt und nach Zugabe von 30 ccm Chloroform zweimal mit je 40 ccm 2-proz. Citronensäure und Wasser ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet, i. Vak. zur Trockne gebracht und mit Äther kristallin gerieben. Ausb. 2.6 g (63%), Schmp. $157-161^{\circ}$.

tert.-Butyloxycarbonyl-L-isoleucyl-glycyl-L-leucyl-methioninamid (3b): 2.46 g (6 mMol) *Boc-Ile-Gly-ONp (1b)* und 1.57 g *Leu-Met-NH₂ (2)* werden unter Zusatz von 2 Tropfen Eisessig in 10 ccm DMF gelöst. Nach 3 Tagen tropft man die Reaktionsmischung unter Rühren in 200 ccm Äther ein, saugt den voluminösen Niederschlag ab und wäscht zweimal mit Äther. Ausb. 2.95 g (92%), Schmp. $214-216^{\circ}$ (Lit.¹⁵⁾: $207-209^{\circ}$; $[\alpha]_D^{20}$: -20.8° ($c = 1$, in DMF), $[\alpha]_D^{25}$: -32.9° ($c = 1$, in Eisessig).

Die Abspaltung der Boc-Gruppe erfolgt nach l. c.¹⁵⁾ durch Lösen in Eisessig und Einleiten von HCl.

Benzyloxycarbonyl-L-isoleucyl-glycin-[p-nitro-phenylester] (1a): Aus 1.42 g *Z-Ile* werden wie vorstehend (Methode b) 1.2 g (50%) vom Schmp. $212-213^{\circ}$ erhalten.

$C_{22}H_{25}N_3O_7$ (443.5) Ber. N 9.48 Gef. N 9.38

Benzyloxycarbonyl-L-isoleucyl-glycyl-L-leucyl-L-methioninamid (3a): Aus 886 mg (2 mMol) **1a** und 567 mg **2** werden analog **3b** 1.1 g (97%) vom Schmp. $225-227^{\circ}$ erhalten. Nach Umfällen mit Äther aus DMF 80%, Schmp. $235-236^{\circ}$, $[\alpha]_D^{20}$: -18.1° ($c = 1$, in DMF).

$C_{27}H_{43}N_5O_6S$ (565.7) Ber. N 12.38 S 5.67 Gef. N 12.51 S 5.88

L-Isoleucyl-glycyl-L-leucyl-L-methioninamid (entspr. **5**) (nach l. c.¹⁶⁾): 283 mg (0.5 mMol) *Z-Ile-Gly-Leu-Met-NH₂ (3a)* löst man in 14 ccm DMF, gibt 25 ccm Methanol und 8 ccm Wasser hinzu, fügt die Lösung zu einer aus 200 mg Pd-Oxid/Kohle frisch bereiteten Aufschlämmung von 10-proz. Pd-Kohle in ca. 10 ccm Methanol, gibt 0.5 ccm Cyclohexylamin hinzu, spült mit etwas Methanol nach und hydriert. Nach 30 Min. (24°) ist die *Wasserstoff*-Aufnahme beendet. Bei $45-50^{\circ}$ wird (nach Filtration über eine dünne Schicht Kieselgur) das Lösungsmittel i. Vak., zuletzt an der Ölpumpe, entfernt. Den Rückstand löst man noch zweimal in 10 ccm Wasser und engt zur Trockne ein, wobei zuletzt zur Zerstörung evtl. noch vorhandenen Carbinats mit Eisessig auf pH 6 gestellt wird. Der Rückstand wird über Nacht im Vakuumexsikkator über P_4O_{10} getrocknet. Auf Zugabe von Methanol kristallisiert das Endprodukt langsam aus. Die Ausscheidung wird durch Äther-Zugabe vervollständigt. Gereinigt wird durch Lösen in Methanol und Fällern mit Äther: 167 mg (77%), Schmp. $145-147^{\circ}$, $[\alpha]_D^{21}$: -33.7° ($c = 1$, in DMF). Bei vergrößerten Ansätzen blieb die Hydrierung unvollständig.

$C_{19}H_{37}N_5O_4S$ (431.7) Ber. C 52.86 H 8.65 N 16.22 O 14.82
Gef. C 52.38 H 8.52 N 16.28 O 15.00

N^α,N^ε-Bis-[tert.-Butyloxycarbonyl]-L-lysyl-L-asparaginyll-L-alanyl-L-phenylalanin-hydrazid (4): 2.07 g (3 mMol) *Boc-Lys(Boc)-Asp(NH₂)-Ala-Phe-OCH₃*^{9,17)} werden in 12 ccm siedendem Äthanol gelöst, nach dem Abkühlen sofort mit 1.5 ccm 90-proz. *Hydrazinhydrat* und 30 mg *1.2.4-Triazol* versetzt und über eine Schicht Kieselgur klarfiltriert. Mit 2 ccm heißem Äthanol wird nachgewaschen. Nach 12–15 Stdn. bei Raumtemperatur gibt man noch 5 ccm Äthanol hinzu, verreibt und beläßt 4 Stdn. bei $35-40^{\circ}$. Das Gemisch wird zur Ver-

vollständigung der Ausscheidung über Nacht bei -20° aufbewahrt, dann unter Rühren in ca. 80 ccm Wasser eingegossen, abgesaugt, mehrmals mit Wasser gewaschen und über konz. Schwefelsäure getrocknet. Ausb. 1.53 g (74%), Schmp. 208—211°.

Die Reinigung kann, wenn unbedingt nötig, durch Lösen in warmem DMF, Zugabe von 2—3 Tropfen Triäthylamin und Ausfällen durch Wasser erfolgen, 59%, Schmp. 213—215° (Zers.), $[\alpha]_D^{20}$: -38.6° ($c = 1$, in DMF).

Ohne Zusatz von Triazol dauerte die Umsetzung 3 Tage, und es wurde ein Rohprodukt vom Schmp. 188—196° erhalten, dessen Reinigung verlustreich war.

$C_{32}H_{51}N_8O_9$ (691.8) Ber. C 55.56 H 7.43 N 16.20 $-\text{NH}-\text{NH}_2^{27)}$ 4.05
Gef. C 55.49 H 7.52 N 16.04 $-\text{NH}-\text{NH}_2$ 4.16

N α ,N ϵ -Bis-[tert.-Butyloxycarbonyl]-L-lysyl-L-asparaginyll-L-alanyl-L-phenylalanyl-L-isoleucyl-glycyl-L-leucyl-L-methioninamid (nach der Azid-Methode²⁰⁾): 1.38 g (2 mMol) *Boc-Lys(Boc)-Asp(NH $_2$)-Ala-Phe-N $_2$ H $_3$* (**4**) werden unter schwachem Erwärmen in 5 ccm DMF gelöst, auf -20° abgekühlt und unter kräftigem Rühren mit 5 mMol *HCl* in absol. THF (4 ccm) versetzt. Man tropft sofort 0.25—0.3 ccm *tert.-Butylnitrit* hinzu, so daß Jodstärkepapiert eben blau wird, und rührt 4 Min. bei -20° (Innentemperatur). Es wird auf -50° abgekühlt und mit Triäthylamin (ca. 0.5 ccm) auf pH 7—8 gestellt. Mit einem Tropfen Eisessig stellt man auf pH 6—7 zurück.

Eine inzwischen bereitete Lösung von 940 mg *Ile-Gly-Leu-Met-NH $_2$ ·HCl* (**5**) und 0.28 ccm Triäthylamin (oder der äquiv. Menge Base) in 2.2 ccm DMF (unter Zusatz eines Tropfens Eisessig) wird vorgekühlt zu der Azid-Lösung gegeben, mit 0.5 ccm DMF nachgespült, 1 Stde. bei -20° gerührt und bei -20° aufbewahrt. Nach ca. 10 Stdn. setzt man noch 6 ccm THF hinzu und läßt 10—20 Stdn. bei 0° stehen. Das ausgeschiedene Produkt wird abgesaugt, mit einer Mischung von Essigester und 0.2*n* *HCl* verrieben, mehrmals mit Wasser gewaschen und getrocknet: 1.33 g, Schmp. 247—251° (Lit.⁹⁾: 239—240°). Aus dem Filtrat fällt man mit *HCl*-haltigem Wasser noch etwas Octapeptid, das nach Elektrophorese nicht unreiner ist als das Hauptprodukt: 0.17 g, Schmp. 234—245°, Rohausb. insges. 70%. Die Reinigung erfolgt durch Lösen in ca. 20 ccm warmem DMF und Filtration über Kieselgur. Das unlösliche Gel wäscht man mit DMF und tropft die Filtrate in ca. 200 ccm Wasser ein, saugt ab und trocknet i. Vak.: 670 mg aus 1.33 g Rohprodukt. Schmp. 251—254°.

(Aus dem getrockneten Gelrückstand sind nach *Boc*-Abspaltung mit Trifluoressigsäure und Absaugen von Polykondensaten noch 67% sehr reines Octapeptid-bis-trifluoracetat zu erhalten.)

$C_{51}H_{85}N_{11}O_{13}S$ (1092.4) Ber. C 56.08 H 7.84 N 14.11 Gef. C 56.13 H 8.19 N 14.06

Aus *Boc-Lys(Boc)-Asp(NH $_2$)-Ala-Phe-OH* und **5**, unter Zusatz von Tri-*n*-butylamin in DMF bei -10° , entstanden mit DCCI überwiegend DMF-unlösliche Produkte. Erst nach TFA-Behandlung wurde **6** in ca. 20% Ausb., frei von Dicyclohexylharnstoff, aber weniger rein als nach der Azid-Methode, erhalten.

Bei Zusatz von 3 Äquivv. *N*-Hydroxy-succinimid²¹⁾ wurden analog 40%, Schmp. 242 bis 244°, erhalten.

[5-Asparagin]Eledoisin-(4-11)-Octapeptid (**6**)

650 mg vorstehendes, geschütztes Octapeptid in 3 ccm TFA werden 40 Min. bei Raumtemperatur belassen. Danach saugt man über eine G4-Fritte vom unlöslichen Schleim ab und fällt durch Zugabe von absol. Äther das Octapeptid-trifluoracetat aus. Ausb. 540 mg (81%), Schmp. 235—238°.

²⁷⁾ H. Medzihradsky-Schweiger, Acta chim. Acad. Sci. Hung. **34**, 213 (1962).

Das Produkt zeigte bei der Elektrophorese in 7-proz. Essigsäure eine schneller laufende, in Pyridinacetat zusätzlich eine langsamer laufende, geringfügige Verunreinigung, ebenso im DS-Chromatogramm. Eine Reinigung durch Gegenstromverteilung (400 mg) in n-Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 5) erforderte 40 Stufen, $k = 1.05$, und ergab ein einheitliches Produkt: 190 mg Lyophilisat, dessen Elementaranalyse auf ein Bis-trifluoracetat-pentahydrat zu trifft.

$C_{41}H_{69}N_{11}O_9S \cdot 2 CF_3CO_2H \cdot 5 H_2O$ (1210.3) Ber. C 44.64 H 6.75 N 12.71
Gef. C 44.65 H 6.89 N 12.86

Die Aminosäureanalyse nach 48stdg. Hydrolyse mit 6*n* HCl bei 110° ergab: Asp 0.99, Gly 1.02, Ala 1.0, Ile 1.05 (ca. 5% allo-D), Leu 1.01, Phe 0.99, Met 0.89, Lys 0.97, NH_3 1.90, und aus den molaren Extinktionen ein Molgewicht von 1250.

B. Eledoisinpeptide mit Hydrazinoessigsäure statt Glycin

N^{β} -[*o*-Nitro-phenylsulfenyl-*L*-leucyl]-hydrazinoessigsäure-äthylester: 5.7 g (20 mMol) *Nps-Leu*²²), in ca. 25 ccm Dioxan unter gelindem Erwärmen gelöst, werden bei 0° mit 3.3 g frisch dest. Hydrazinoessigsäure-äthylester¹¹⁾ und mit 4.2 g *DCCI* versetzt. Nach 18 Stdn. bei ca. 20° wird wie üblich aufgearbeitet. Ausb. 5.1 g (74%), Schmp. 110–112°. Gereinigt wird durch Lösen in Essigester und langsame Zugabe des gleichen Vol. Hexan. $[\alpha]_D^{25}$: –29.9° ($c = 1$, in DMF). Auf Kieselgur (Merck) mit Essigester/Cyclohexan (3 : 1) (A) R_F 0.28.

$C_{16}H_{24}N_4O_5S$ (384.5) Ber. C 49.99 H 6.29 N 14.57 Gef. C 50.16 H 6.26 N 14.63

N^{β} -[*o*-Nitro-phenylsulfenyl-*L*-leucyl]- N^{α} -benzyloxycarbonyl-hydrazinoessigsäure-dicyclohexylammoniumsalz: Zu einer Mischung von 3 ccm Chlorameisensäure-benzylester in 80 ccm Äther und 3 g $KHCO_3$ in 80 ccm Wasser, die mittels eines Vibromischers emulgiert wird, tropft man während 1 Stde. 3.85 g (10 mMol) *Nps-Leu-NHGLy-OÄt*, gelöst in 8 ccm DMF. Nach 30 Min. gibt man 2 ccm Pyridin zu, emulgiert 10 Min., schüttelt die Ätherschicht (100 ccm) mit eiskalter 0.5*n* H_2SO_4 (50 ccm) und sofort mit $KHCO_3$. Der erhaltene Sirup (5.3 g) war einheitlich, R_F (A) 0.62. Die Lösung in 20 ccm Äthanol + 5 ccm 2*n* NaOH läßt man 2 Stdn. stehen, schüttelt mit Essigester aus, säuert mit Citronensäure an und extrahiert mit Essigester.

Aus der Lösung des Destillations-Rückstandes in Äther werden mit Dicyclohexylamin 3.67 g (55%) gelber kristalliner Niederschlag gefällt. Schmp. 165–166°, $[\alpha]_D^{25}$: –18.5° ($c = 2$, in DMF).

$C_{12}H_{24}N_4[C_{22}H_{25}N_4O_7S]$ (671.9) Ber. C 60.78 H 7.35 N 10.42
Gef. C 60.60 H 7.30 N 10.17

N^{β} -[*o*-Nitro-phenylsulfenyl-*L*-leucyl]- N^{α} -tert.-butyloxycarbonyl-hydrazinoessigsäure-äthylester: Aus *Nps-Leu* (2.85 g) und N^{α} -Boc-NHGLy-OÄt in 20 ccm Dioxan mit 2.1 g *DCCI* wie bei *Nps-Leu-NHGLy-OÄt*. Aus Essigester/Hexan 1.08 g (22%), Schmp. 147–148°, R_F (A) 0.65, $[\alpha]_D^{25}$: –19.4° ($c = 1$, in DMF).

$C_{21}H_{32}N_4O_7S$ (484.6) Ber. C 52.05 H 6.66 N 11.56 Gef. C 51.74 H 6.89 N 11.62

N^{β} -[*o*-Nitro-phenylsulfenyl-*L*-isoleucyl]-hydrazinoessigsäure-äthylester: *Nps-Ile*, aus 4.7 g Dicyclohexylammoniumsalz mit 0.2*n* H_2SO_4 in Äther freigesetzt, wird wie bei *Nps-Leu-NHGLy-OÄt* umgesetzt. Ausb. 1.55 g (47%), Schmp. 125–127°, R_F (A) 0.25.

$C_{16}H_{24}N_4O_5S$ (384.5) Ber. C 49.99 H 6.29 N 14.57 Gef. C 49.74 H 6.45 N 14.39

Die Einführung der Z-Gruppe an N^{α} gelang nicht.

N^{β} -[Benzyloxycarbonyl-*L*-isoleucyl]- N^{α} -tert.-butyloxycarbonyl-hydrazinoessigsäure-äthylester (7a): 4.5 g ca. 88-proz. sirupöses Benzyloxycarbonyl-*L*-isoleucin und 3.28 g (15 mMol)

*N*²-*tert*.-Butyloxycarbonyl-hydrazinoessigsäure-äthylester in 15 ccm Acetonitril werden bei 0° mit 3.2 g *DCCI* versetzt. Man rührt noch 1 Stde. bei 0° und läßt über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Mit ein paar Tropfen Eisessig wird der Carbodiimid-Überschuß zerstört, nach 1 Stde. der Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und das darin zum Teil enthaltene Endprodukt mit Methylchlorid ausgewaschen. Nach Zugabe von mehreren Portionen *n*-Hexan zum wie üblich erhaltenen Rückstand (insges. 40 ccm) kristallisiert das Produkt langsam aus. Ausb. 5.45 g (78 %), Schmp. 95–96°, $[\alpha]_D^{20}$: -1.5° ($c = 1$, in DMF).

$C_{23}H_{35}N_3O_7$ (465.6) Ber. C 59.34 H 7.58 N 9.03 Gef. C 59.48 H 7.69 N 9.25

N^B-[Benzyloxycarbonyl-*L*-isoleucyl]-*N*²-*tert*.-butyloxycarbonyl-hydrazinoessigsäure (**8a**): 4.65 g (10 mMol) **7a** in 60 ccm Äthanol werden mit 15 ccm *n* NaOH vermischt. Nach 10 Stdn. wird der Alkohol i. Vak. entfernt, der sirupöse Rückstand in Wasser gelöst, von ca. 100 mg unlöslichem Produkt abfiltriert und langsam unter Rühren bei 0° mit 2 *n* HCl auf pH 2.5–3 angesäuert. Das ausgeschiedene Produkt wird in Essigester aufgenommen, die Lösung auf 10–15 ccm eingengt und durch langsame *n*-Hexan-Zugabe unter Rühren kristallin ausgefällt. Ausb. 3.92 g (90 %), Schmp. nach nochmaliger Umfällung 100–102°, $[\alpha]_D^{20}$: -2.7° ($c = 1$, in DMF).

$C_{21}H_{31}N_3O_7$ (437.5) Ber. C 57.65 H 7.14 N 9.61 Gef. C 57.73 H 7.22 N 9.71

N^B-[Benzyloxycarbonyl-*L*-isoleucyl]-hydrazinoessigsäure (**8c**): 1.0 g **8a** werden in 2 ccm Trifluoressigsäure gelöst und 1 Stde. bei Raumtemperatur belassen. Durch Zugabe von 20 ccm Wasser erhält man 550 mg (71 %) Niederschlag, Schmp. 179–182°; aus Nitromethan Schmp. 181–183°.

$C_{16}H_{23}N_3O_5$ (337.4) Ber. C 56.96 H 6.87 N 12.46 Gef. C 56.89 H 7.16 N 12.66

N^B-[*tert*.-Butyloxycarbonyl-*L*-isoleucyl]-*N*²-*tert*.-butyloxycarbonyl-hydrazinoessigsäure-äthylester (**7b**): 3.5 g (15 mMol) *Boc-Ile* und 3.27 g *NH*Gly(*N*²-*Boc*)-OÄt in 10 ccm Acetonitril werden unter Rühren bei 0° mit 3.2 g *DCCI* versetzt. Weitere Aufarbeitung wie bei **7a** liefert 3.45 g (53 %), Schmp. 112–118°. Aus Äther/Hexan Schmp. 121–122°, $[\alpha]_D^{20}$: -14.5° ($c = 1$, in DMF).

$C_{20}H_{37}N_3O_7$ (431.5) Ber. C 55.67 H 8.64 N 9.74 Gef. C 55.87 H 8.52 N 10.03

N^B-[*tert*.-Butyloxycarbonyl-*L*-isoleucyl]-*N*²-*tert*.-butyloxycarbonyl-hydrazinoessigsäure (**8b**): 2.15 g (5 mMol) des *Esters* **7b** in 25 ccm Äthanol werden mit 7.5 ccm *n* NaOH 10 Stdn. bei Raumtemperatur belassen. Aufarbeitung erfolgt wie bei **8a**. Der Sirup wird in Essigester + Cyclohexan gelöst und durch portionsweise Zugabe von Hexan zur Kristallisation gebracht. Ausb. 1.71 g (84 %), Schmp. 136–137°, $[\alpha]_D^{20}$: -17.0° ($c = 1$, in DMF).

$C_{18}H_{33}N_3O_7$ (403.5) Ber. C 53.58 H 8.24 N 10.42 Gef. C 53.53 H 8.00 N 10.30

N^B-[Benzyloxycarbonyl-*L*-isoleucyl]-*N*²-*tert*.-butyloxycarbonyl-hydrazinoacetyl-*L*-leucyl-*L*-methioninamid (**9a**)

a) Nach der Phosphorazo-Methode^{23,24}): 1.04 g (4 mMol) **2** in 20 ccm absol. Pyridin werden bei -10° mit 0.3 ccm *PCl*₃ versetzt und 20 Min. bei 20° aufbewahrt. Nach Zugabe von 1.5 g (3.4 mMol) **8a** erhitzt man auf dem siedenden Wasserbad 3 Stdn. und arbeitet wie üblich auf. Durch Verreiben mit Äther 1.3 g (56 %), Schmp. 162–169°, nach Umkristallisation aus Essigester 500 mg vom Schmp. 178–181° und 280 mg mit Schmp. 170–174°. Analysenprobe: Schmp. 180–182°, $[\alpha]_D^{20}$: -32.1° ($c = 1$, in DMF).

$C_{32}H_{52}N_6O_8S$ (680.9) Ber. C 56.45 H 7.70 N 12.34 Gef. C 56.30 H 7.93 N 12.51

b) Nach der Methode der gemischten Anhydride (vgl. **1b**) unter Verwendung von *Tri-n*-butylamin und *Chlorameisensäure-isobutylester* (1 mMol-Ansatz) wurden 20 % Ausb. erzielt (Schmp. 178–181°).

c) Nach der DCCI-Methode mit und ohne Zusatz von *N*-Hydroxy-succinimid²¹⁾ war für eine einigermaßen vollständige Umsetzung nach dem üblichen Reaktionsablauf noch mehrstdg. Erwärmen auf 45° nötig. Das Produkt enthielt stets Anteile höherschmelzender Harnstoff-Derivate. Ausb. 310 mg (45%).

N^B-[*tert*.-Butyloxycarbonyl-*L*-isoleucyl]-*N*²-*tert*.-butyloxycarbonyl-hydrazinoacetyl-*L*-leucyl-*L*-methioninamid (9b): 1.56 g (6 mMol) *Leu-Met-NH*₂ (2) in 20 ccm absol. Pyridin werden bei -15° mit 0.53 g (6.6 mMol) *PCl*₃ versetzt und 25 Min. bei 20° belassen. Nach Zugabe von 2.02 g (5 mMol) *Boc-Ile-NH*Gly(*Boc*)-*OH* (8b) wird 3 Stdn. auf 100° erhitzt und wie bei 9a aufgearbeitet: 2.02 g (62%), Schmp. 195–198°. Gereinigt wird durch Lösen in ca. 15 ccm Chloroform und Fällen mit Äther (40 ccm): 1.72 g (53%), Schmp. 201–202°.

C₂₉H₅₄N₆O₈S (646.9) Ber. C 53.85 H 8.41 N 12.99 Gef. C 54.10 H 8.65 N 12.84

N^B-*L*-Isoleucyl-hydrazinoacetyl-*L*-leucyl-*L*-methioninamid-acetat (10): 1.94 g 9b (3 mMol) werden in 8 ccm *TFA* gelöst, 40 Min. bei Raumtemperatur belassen und in 75 ccm absol. Äther eingetropft. Den mit Äther mehrmals gewaschenen Niederschlag (1.90 g, aus Methanol/Äther umgefällt, Schmp. 100–105°) löst man in 60 ccm Wasser, fügt *Dowex 3* (*Acetat*) unter Rühren hinzu, bis pH 7 erreicht ist, und gibt über eine kurze Säule mit dem gleichen Ionenaustauscher. Das Eluat wird mit ein paar Tropfen Essigsäure versetzt und i. Vak. zur Trockne gebracht: 1.26 g (83%) amorphes Produkt.

C₁₉H₃₈N₆O₄S·CH₃CO₂H (506.6) Ber. C 49.78 H 8.35 N 16.59
Gef. C 50.01 H 8.53 N 16.64

Die Aminosäureanalyse nach 45 Stdn. Hydrolyse ergab: Ile 1.0, Leu 0.94, Met 0.72, NH₃ 1.62, Gly 0.05 (das sich bei der Hydrolyse von *NH*Gly-Peptiden stets bildet).

N^B-[*L*-Lysyl-*L*-asparaginy-*L*-alanyl-*L*-phenylalanyl-*L*-isoleucyl]-hydrazinoacetyl-*L*-leucyl-*L*-methioninamid-acetat-hydrat (11): Wie bei der Herstellung von 6 werden 1.24 g 4 (1.8 mMol) mit 910 mg 10 nach der Azid-Methode kondensiert. Die 1.29 g ausgefallenes Reaktionsprodukt lösen sich nur teilweise in DMF (20 ccm). Die Lösung wird von der Gallerte abfiltriert und in 150 ccm schwach mit HCl angesäuertes Wasser getropft, wobei sich 400 mg ausscheiden. Aus dem Filtrat der Reaktionslösung fallen auf Wasserzugabe noch 150 mg bräunliches amorphes Produkt aus. In der Gallerte war laut Elektrophorese (nach *TFA*-Abspaltung) neben Polykondensaten und Verunreinigungen noch ein wesentlicher Anteil Heterooctapeptid erhalten.

Auf 450 mg des umgefällten Anteiles (gut getrocknet) läßt man 5 ccm *TFA* 40 Min. einwirken, filtriert über eine G4-Fritte, fällt mit Äther 410 g unreines 11-Trifluoracetat und überführt es wie bei 10 über *Dowex 3* in das 11-Acetat, wobei 330 mg Lyophilisat erhalten werden.

Das Produkt enthielt nach den Befunden der Elektrophorese noch 3 schnellerwandernde und eine langsamere Komponente. Gegenstromverteilung (200 mg) in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 5) erlaubte nach 80 Schritten eine Auftrennung, wobei sich das gesuchte Produkt (ca. 50 mg) aus den Fraktionen 15–35 nahezu einheitlich isolieren ließ, obwohl nach Ninhydrinfärbung kein Maximum zu erkennen war. In Fraktion 22–28 war zusätzlich ein kleines Maximum enthalten, das durch gelartiges Produkt gebildet wurde. Durch Dünnschichtchromatographie konnte das Produkt in 2 Flecke getrennt werden. In Essigester/Pyridin/Eisessig/Wasser (60 : 20 : 6 : 11) *R*_F 0.61 und 0.73, in Essigester/Pyridin/Ameisensäure/Wasser (60 : 20 : 6 : 5.5) *R*_F 0.34 und 0.53; der starke Fleck mit dem höheren *R*_F-Wert enthielt die biologische Aktivität. Aminosäureanalyse: Lys 0.97, Asp 1.13, Ala 1.17, Ile 1.0, Leu 1.0, Phe 0.97, NH₃ 3.5 und Gly 0.05.

[182/67]