

Georg Jäger, Rolf Geiger und Walter Siedel

Der Piperidinocarbonyl-Rest als neue Schutzgruppe für die Iminofunktion des Histidins

Aus den Farbwerken Hoechst AG, vormals Meister Lucius & Brüning,
Frankfurt a. M.-Höchst

(Eingegangen am 9. Mai 1968)

Der Piperidinocarbonyl-Rest eignet sich zum Schutz der Iminogruppe des Histidins. Er erhöht die Löslichkeit auch höherer histidinhaltiger Peptide und ist gegen Protonensolvolyse und Hydrogenolyse beständig. Die N^{im} -Schutzgruppe wird mit nucleophilen Reagentien, bevorzugt mit Hydrazin, schonend abgespalten und wird bei Peptidsynthesen von der Amino-komponente nicht angegriffen.

Die Synthese histidinhaltiger Peptide bereitet infolge der Basizität und Acylierbarkeit des Imidazolrestes und wegen der oft geringen Löslichkeit solcher Peptide Schwierigkeiten. Es wurden deshalb N^{im} -Schutzgruppen empfohlen, die wie der Benzyl-¹⁾ oder der Trityl-Rest²⁾ Acylierungsreaktionen verhindern oder wie der N^{im} -Benzyloxycarbonyl-Rest³⁾ oder die beständigere Adamantylloxycarbonyl-Gruppe⁴⁾ außerdem die Basizität herabsetzen und die Löslichkeit erhöhen. Die genannten Wirkungen übt auch die neuartige 2.2.2-Trifluor-1-acylamino-äthyl-Schutzgruppe aus⁵⁾.

Wie wir fanden, eignen sich auch Carbamoylreste, die sich als *O*-Schutzgruppen für Tyrosin bewährt haben⁶⁾, zum Schutz der Iminofunktion des Histidins. Bekanntlich sind Carbamoylderivate des Imidazols, die sich von primären Aminen ableiten, thermisch unbeständig und zerfallen leicht in Imidazol und Isocyanat⁷⁾. Derselben Reaktion unterliegen auch entsprechende Derivate des Histidins, während N^{im} -Carbamoylverbindungen, die sich von sekundären Aminen ableiten, diese Zerfallsmöglichkeit nicht besitzen und deshalb beständig sind.

Diese N^{im} -Carbamoyl-Reste, von denen wir im Verlauf unserer Versuche dem Piperidinocarbonyl-Rest den Vorzug gaben, setzen die Basizität des Histidins herab

¹⁾ V. du Vigneaud und O. K. Behrens, J. biol. Chemistry **117**, 27 (1937).

²⁾ G. C. Stelakatos, D. M. Theodoropoulos und L. Zervas, J. Amer. chem. Soc. **81**, 2884 (1959).

³⁾ S. Akabori, K. Okawa und F. Sakiyama, Nature [London] **181**, 772 (1958); F. Sakiyama, K. Okawa, T. Yamakawa und S. Akabori, Bull. chem. Soc. Japan **31**, 926 (1958); A. Pat-chornik, A. Berger und E. Katchalski, J. Amer. chem. Soc. **79**, 6416 (1957).

⁴⁾ W. L. Haas, E. V. Krumkalns und K. Gerzon, J. Amer. chem. Soc. **88**, 1988 (1966).

⁵⁾ F. Weygand, W. Steglich und P. Pietta, Chem. Ber. **100**, 3841 (1967).

⁶⁾ G. Jäger, R. Geiger und W. Siedel, Chem. Ber. **101**, 2762 (1968).

⁷⁾ R. A. Henry und W. M. Dehn, J. Amer. chem. Soc. **71**, 2297 (1949).

und verleihen den Histidinpeptiden eine erhöhte Löslichkeit. Die Eigenschaften der neuen Schutzgruppe entsprechen etwa denen der *O*-Carbamoyl-Reste am Tyrosin⁶⁾: sie sind gegen Protonensolvolyse und Hydrogenolyse stabil und werden durch nucleophile Reagentien, bevorzugt Hydrazin, Alkoholat oder Alkalilauge, leicht abgespalten. Unter den Reaktionsbedingungen der Peptidsynthese reicht die Nucleophilie der Aminokomponente zur Abspaltung nicht aus.

Infolge dieser Eigenschaften sind sie gegenüber den am häufigsten verwendeten, durch Protonensolvolyse oder Hydrogenolyse entfernbaren *N*^z-Schutzgruppen, einschließlich der in schwach saurem Medium durch eine Übertragungsreaktion⁸⁾ abspaltbaren Nps-Gruppe, differenzierbar.

Die Einführung der Piperidinocarbonyl-Gruppe in *N*^{im}-ungeschütztes Histidin gelingt sowohl durch Umsetzung von *N*^z-Acyl-histidin-estern als auch von *N*^z-Acyl-histidin-peptid-estern mit Chlorameisensäure-piperidid in wasserfreiem Pyridin bei 65°. Mit Chlorameisensäure-piperidid in kleinem Überschuß lagen die Ausbeuten zwischen 68 und 100% (s. Tab.). Bei der Darstellung des *N*^z-Benzyloxycarbonyl-*N*^{im}-piperidinocarbonyl-L-histidin-methylesters (**1**), bei der nur 1 Äquivalent Chlorameisensäure-piperidid verwendet wurde, betrug die Ausbeute nach dem Umkristallisieren allerdings nur noch 30%.

N^{im}-Piperidinocarbonyl-histidin-Derivate und -Peptide⁹⁾

Nr.	Verbindung	Ausgangsmaterialien	Ausb. %	Schmp.	$[\alpha]_D^{25}$	c	Lösungsmittel
1	Z-His(Ppc)-OCH ₃	Z-His-OCH ₃ ¹⁰⁾	30	104°	-2.5°	1	a
2	Z-His(Ppc)-OBzl	Z-His-OBzl (2a)	100	--	-13.9°	1	a
3	H-His(Ppc)-OCH ₃ · 2HBr	1	69	167.5°	+10.8°	1.2	a
4	H-His(Ppc)-OH	2	80	189-191.5°	-4.7°	1	b
5	Nps-His(Ppc)-OSu	4	49*)	157°	+5.6°	1	c
6	Z-Phe-His(Ppc)-OCH ₃	Z-Phe-OSu ¹¹⁾ + 3	93	--	-12.35°	1.2	a
7	Z-His(Ppc)-Met-OCH ₃	Z-His-Met-OCH ₃ (7a)	95	--	-9.1°	2	a
8	Nps-His(Ppc)-Leu-ONb	5 + H-Leu-ONb · HBr ¹²⁾	85	94-95°	-1.1°	1	c
9	Z-Phe-His(Ppc)-OBzl	Z-Phe-His-OBzl (9a)	68	58-62°	-4.2°	1	a
10	H-Phe-His(Ppc)-OH	9	57	234-237°	+108°	1	a
11	Z-His(Ppc)-Leu-ONb	Z-His-Leu-ONb ¹²⁾	97	~63-66°	+24.8°	1	c
12	H-His(Ppc)-Leu-OH	11	83	156.5-157.5°	-0.6°	1	b
13	Nps-His(Ppc)-Gly-ONb	5 + H-Gly-ONb · HBr ¹²⁾	83	159-160°	+15.0°	1	c
14	H-His(Ppc)-Gly-ONb · 2HCl	13	96	181°	+11.7°	1	d
15	Z-Phe-His(Ppc)-Gly-ONb	Z-Phe-OSu ¹¹⁾ + 14	85	134.5-135.5°	+19.8°	1	c
16	Nps-His(Ppc)-Leu-Val-Glu(OtBu)-Ala-Leu-Tyr(tBu)-OH **)	5 + H-Leu-Val-Glu(OtBu)-Ala-Leu-Tyr(tBu)-OH ¹³⁾	68	238.5-240.5°			

a = Methanol; b = Wasser; c = Chloroform; d = Äthanol/Wasser (1:1)

*) Die Zwischenstufe Nps-His(Ppc)-OH wurde sofort weiterverarbeitet.

**) Unter Mitarbeit von Herrn A. Volk dargestellt.

8) E. Wünsch, A. Fontana und F. Drees, Z. Naturforsch. **22b**, 607 (1967).

9) Abkürzungen entspr. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **348**, 256, 262 (1967). Weiterhin verwenden wir in der vorliegenden Arbeit für den Piperidinocarbonyl-Rest Ppc, den *N*-Hydroxy-succinimidester OSu und den 4-Nitro-benzylester ONb.

10) R. W. Holley und E. Sondheimer, J. Amer. chem. Soc. **76**, 1326 (1954).

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

12) H. Schwarz und K. Arakawa, J. Amer. chem. Soc. **81**, 5691 (1959).

13) Von Herrn A. Volk freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Über die Herstellung wird in anderem Zusammenhang berichtet.

Die Stabilität der Piperidinocarbonyl-Schutzgruppe selbst gegen starke Säuren und gegen katalytische Hydrierung ließ sich an mehreren Beispielen zeigen. **1** ergab mit Bromwasserstoff in Eisessig glatt N^{im} -Piperidinocarbonyl-L-histidin-methylester-dihydrobromid (**3**), N^{α} -[2-Nitro-phenylsulfenyl]- N^{im} -piperidinocarbonyl-L-histidyl-glycin-[4-nitro-benzylester] (**13**) mit 2*n* methanolischer HCl in noch höherer Ausbeute N^{im} -Piperidinocarbonyl-L-histidyl-glycin-[4-nitro-benzylester]-dihydrochlorid (**14**).

Durch katalytische Hydrierung von N^{α} -Benzyloxycarbonyl- N^{im} -piperidinocarbonyl-L-histidin-benzylester (**2**) entstand N^{im} -Piperidinocarbonyl-L-histidin (**4**) in einer Ausbeute von 80%. Mit ebenfalls guten Ausbeuten verlief die Hydrogenolyse der völlig geschützten Peptide **9** und **11**, wobei in gleicher Weise unter Freisetzung der Amino- und Carboxylgruppe die Verbindungen **10** und **12** gebildet wurden, die nur noch an der Iminogruppe des Histidins blockiert sind.

Das N^{im} -geschützte Histidin **4** konnte in den N^{α} -[2-Nitro-phenylsulfenyl]- N^{im} -piperidinocarbonyl-L-histidin-[*N*-hydroxy-succinimidester] (**5**) übergeführt werden, dessen Umsetzung mit Aminosäureestern in Ausbeuten von 83–85% die Peptide **8** und **13** unter Kettenverlängerung am Carboxylende des Histidins lieferte. Andererseits konnten Acylaminosäuren auch am Aminoende des N^{im} -geschützten Histidins ankondensiert werden; Beispiele hierfür sind die Synthesen der Peptide **6** und **15** mit Ausbeuten von 93 bzw. 85%. Schließlich gelang die Synthese des Nitrophenylsulfenyl-heptapeptids **16** in einer Ausbeute von 68%. Dieses Peptid ist schon in kaltem Dimethylformamid leicht löslich.

Zur Abspaltung der N^{im} -Piperidinocarbonyl-Schutzgruppe verwendet man bevorzugt Hydrazin, wobei etwa dieselben Reaktionsbedingungen wie bei der Entfernung der *O*-Carbamoyl-⁶⁾ und *O*-Äthoxycarbonyl-Schutzgruppen¹⁴⁾ des Tyrosins eingehalten werden. Unter Freisetzung der Iminogruppe des Histidins entstehen durch Hydrazinolyse der Peptide **6**, **7** und **15** Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-histidin-hydrazid, Benzyloxycarbonyl-L-histidyl-L-methionin-hydrazid bzw. Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-glycin-hydrazid in Ausbeuten von 80–95%. Jedoch kann man die N^{im} -Schutzgruppe auch leicht mit 2*n* NaOH/Dioxan entfernen. Aus **9** erhält man so Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-histidin in 84proz. Ausbeute.

Die Tatsache, daß durch Hydrazinolyse von N^{α} -Benzyloxycarbonyl-L-histidyl-L-methionin-methylester (**7a**) und daraus hergestelltem **7** identische Hydrazide vom gleichen spezif. Drehwert entstehen, zeigt, daß bei der Einführung der N^{im} -Schutzgruppe keine Racemisierung stattfindet.

¹⁴⁾ R. Geiger, G. Jäger, A. Volk und W. Siedel, Chem. Ber. **101**, 2189 (1968).

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden im Apparat nach Dr. Tottoli bestimmt und sind nicht korrigiert, die spezif. Drehwerte im Polarimeter 141 von Perkin-Elmer gemessen. Die Reinheitsprüfung aller Substanzen erfolgte nach den üblichen Methoden der Dünnschichtchromatographie.

A. *N*^{im}-Piperidinocarbonyl-histidin-Derivate und -Peptide

1. *N*^z-Benzyloxy-carbonyl-*N*^{im}-piperidinocarbonyl-*L*-histidin-methylester (**1**): 36.8 g (121 mMol) *Z*-His-*OCH*₃¹⁰⁾ werden in 105 ccm Pyridin mit 17.9 g (121 mMol) Chlorameisensäure-piperidid 6 Stdn. auf 65° erwärmt. Nach Entfernen des Pyridins i. Hochvak. wird der rotbraune sirupartige Rückstand mehrmals mit Essigester verrieben, die zähe Masse dann zwischen Wasser und Essigester verteilt, die Essigesterphase abgetrennt und die wäbr. Schicht noch zweimal mit Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten Essigesterextrakte werden i. Vak. eingedampft. Zur Lösung der zurückbleibenden bräunlichen Kristalle in Essigester gießt man unter Rühren langsam Petroläther zu und filtriert von der gebildeten dunkelbraunen sirupösen Masse ab. Das Filtrat wird mit weiterem Petroläther versetzt, wobei schwach beigefarbene Kristalle ausfallen, die nochmals in der beschriebenen Weise aus Essigester/Petroläther umgefällt werden. Ausb. 15.1 g (30%). Schmp. 104°; $[\alpha]_D^{25}$: -2.5° ($c = 1$; in Methanol).

C₂₁H₂₆N₄O₅ (414.5) Ber. C 60.86 H 6.32 N 13.52 Gef. C 60.4 H 6.2 N 13.6

2. *N*^z-Benzyloxy-carbonyl-*N*^{im}-piperidinocarbonyl-*L*-histidin-benzylester (**2**): Die Ausgangssubstanz *N*^z-Benzyloxy-carbonyl-*L*-histidin-benzylester (**2a**) wird wie folgt dargestellt: 11.8 g (20 mMol) *H*-His-*OBzI*·*TosOH*¹⁵⁾ und 4.98 g (20 mMol) *Z*-*OSu*¹⁶⁾ werden in 120 ccm Dimethylformamid bei -5° mit 5.56 ccm (40 mMol) Triäthylamin versetzt. Nach 2 Stdn. Stehenlassen bei Raumtemp. wird i. Hochvak. eingedampft, der farblose ölige Rückstand dreimal mit absol. Äther verrieben und abgegossen. Das Öl wird in Essigester unter Zusatz von etwas Methylenchlorid gelöst, die Lösung zweimal mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung und viermal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. zur Trockne gebracht. Ausb. 6.15 g (79%). Der Sirup ist chromatographisch fast rein. Zur Entfernung der geringen Menge Verunreinigung, besonders *Z*-His(*Z*)-*OBzI*, kann man das Produkt in Aceton/Wasser (2:1) 15 Min. mit Dowex 50 WX 1 (H-Form) verrühren. Nach Absaugen wird das Austauschharz dreimal mit Aceton/Wasser (2:1) geschüttelt, abgesaugt und gewaschen. Dann rührt man den Ionenaustauscher zweimal unter Kühlung 10 Min. mit *n* Triäthylaminlösung in Aceton/Wasser (5:1), saugt ab und dampft die vereinigten Filtrate i. Vak. ein. Der Rückstand wird in Essigester gelöst, filtriert, dreimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Ausb. 3.46 g (45%) farbloser Sirup, der chromatographisch einheitlich ist (Butanol/Eisessig/Wasser 3:1:1). $[\alpha]_D^{25}$: -17.8° ($c = 1$; in Methanol).

C₂₁H₂₁N₃O₄· $\frac{1}{2}$ H₂O (388.4) Ber. C 64.94 H 5.71 N 10.82 Gef. C 65.1 H 5.7 N 10.6

11.65 g (30 mMol) *Z*-His-*OBzI*· $\frac{1}{2}$ H₂O (**2a**· $\frac{1}{2}$ H₂O) werden in 80 ccm Pyridin mit 6.0 g (40 mMol) Chlorameisensäure-piperidid 6 Stdn. auf 65° erwärmt. Nach Eindampfen der Lösung i. Hochvak. wird der hellbraune ölige Rückstand mit Wasser verrieben, die Mischung mit Essigester ausgeschüttelt, der Extrakt einmal mit *n* HCl und dreimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Ausb. 14.62 g (fast quantitativ) fast farbloses Öl. $[\alpha]_D^{25}$: -13.9° ($c = 1$; in Methanol).

C₂₇H₃₀N₄O₅ (490.6) Ber. C 66.11 H 6.16 N 11.42 Gef. C 66.0 H 6.4 N 11.1

¹⁵⁾ S. Akabori, S. Sakakibara und S. Shiina, Bull. chem. Soc. Japan **31**, 784 (1958).

¹⁶⁾ M. Frankel, D. Ladkany, C. Gilon und Y. Wolman, Tetrahedron Letters [London] **39**, 4765 (1966).

3. *N*^{im}-Piperidinocarbonyl-*L*-histidin-methylester-dihydrobromid (3): 8.28 g (20 mMol) *Z*-His(*Ppc*)-OCH₃ (1) werden in 40 ccm Bromwasserstoff/Eisessig 30 Min. bei Raumtemp. aufbewahrt. Nach Zugabe von 1 l absol. Äther und 2stdg. Stehenlassen wird abgegossen und der Rückstand mit absol. Äther gewaschen. Das Rohprodukt wird zunächst aus absol. Äthanol/Essigester/Äther, dann aus heißem absol. Äthanol/Essigester umkristallisiert. Ausb. 6.08 g (69%). Schmp. 167.5° (Zers.); [α]_D²⁵: +10.8° (*c* = 1.2; in Methanol).

C₁₃H₂₂N₄O₃Br₂ (442.2) Ber. C 35.31 H 5.02 Br 36.15 N 12.67

Gef. C 35.6 H 5.2 Br 35.8 N 12.7

4. *N*^{im}-Piperidinocarbonyl-*L*-histidin (4): 13.75 g (28 mMol) *Z*-His(*Ppc*)-OBzl (2) werden in 150 ccm Methanol und 20 ccm Wasser in Gegenwart von Palladiumschwarz 2 Stdn. hydriert. Die vom Katalysator befreite Lösung wird i. Vak. eingedampft und der farblose Lack (7.46 g = 100%) in heißem absol. Äthanol verrieben. Die gebildeten Kristalle werden mit absol. Äthanol gewaschen und über Phosphorpentoxid getrocknet. Ausb. 5.97 g (80%). Schmp. 189–191.5° (Zers.); [α]_D²⁵: -4.7° (*c* = 1; in Wasser). Bei nochmaligem Verreiben in heißem absol. Äthanol und längerem Stehenlassen steigt der Zersetzungspunkt auf 193–194.5°.

C₁₂H₁₈N₄O₃ (266.3) Ber. C 54.12 H 6.81 N 21.04 Gef. C 54.5 H 6.8 N 21.3

5. *N*^a-[2-Nitro-phenylsulfenyl]-*N*^{im}-piperidinocarbonyl-*L*-histidin-[*N*-hydroxy-succinimid-ester] (5): 2.66 g (10 mMol) *H*-His(*Ppc*)-OH (4) in 5 ccm 2*n* NaOH und 13 ccm Dioxan werden im Verlauf von 15 Min. unter Rühren mit 2.08 g (11 mMol) 2-Nitro-phenylsulfenylchlorid in 10 Portionen und gleichzeitig mit 6 ccm 2*n* NaOH tropfenweise versetzt. Nach Verdünnen der Lösung mit 100 ccm Wasser wird filtriert, das Filtrat mit *n* H₂SO₄ auf pH 2 gebracht, die abgeschiedene halb feste Masse in 300 ccm Essigester aufgenommen und die Lösung zweimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und in der Kälte i. Vak. eingedampft. Rückstand: 3.15 g (75%) kristallines *Nps*-His(*Ppc*)-OH, das sofort weiterverarbeitet wird.

3.15 g (7.5 mMol) *Nps*-His(*Ppc*)-OH und 0.97 g (8.4 mMol) *N*-Hydroxy-succinimid werden in 60 ccm Acetonitril bei -7° mit 1.73 g (8.4 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach 16stdg. Stehenlassen bei 0° und 3stdg. Stehenlassen bei Raumtemp. wird vom Harnstoff filtriert, mit Essigester gewaschen und das Filtrat i. Vak. eingedampft. Der kristalline Rückstand wird in absol. Äther verrieben und 2 Tage bei 0° aufbewahrt. Die abgesaugten Kristalle werden mit absol. Äther gewaschen. Ausb. 2.87 g (74%); Schmp. 154–156°. Aus Chloroform/Petroläther 2.52 g (65%) vom Schmp. 157°. [α]_D²⁵: +5.6° (*c* = 1; in Chloroform).

C₂₂H₂₄N₆O₇S (516.6) Ber. C 51.16 H 4.68 N 16.27 S 6.21

Gef. C 51.1 H 4.6 N 15.9 S 5.9

6. Benzylloxycarbonyl-*L*-phenylalanyl-*N*^{im}-piperidinocarbonyl-*L*-histidin-methylester (6): 4.42 g (10 mMol) *H*-His(*Ppc*)-OCH₃·2HBr (3) und 3.96 g (10 mMol) *Z*-Phe-OSu¹¹) in 60 ccm absol. Dimethylformamid werden bei -5° mit 2.77 ccm (20 mMol) Triäthylamin versetzt. Nach 4 Stdn. Stehenlassen bei Raumtemp. wird i. Hochvak. in der Kälte eingedampft, der halb feste Rückstand in Chloroform gelöst und die Lösung über zweimal mit gesätt. Natriumhydrogencarbonat-Lösung, *n* HCl und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. zur Trockene gebracht. Ausb. 5.65 g (93%), hygroskopisches, amorphes Pulver. [α]_D²⁵: -12.35° (*c* = 1.2; in Methanol).

C₃₀H₃₅N₅O₆·2¹/₂H₂O (606.7) Ber. C 59.39 H 6.65 N 11.55 Gef. C 59.0 H 6.6 N 11.7

7. *N*^a-Benzylloxycarbonyl-*N*^{im}-piperidinocarbonyl-*L*-histidyl-*L*-methionin-methylester (7): Das *N*^{im}-ungeschützte Ausgangspeptid *N*^a-Benzylloxycarbonyl-*L*-histidyl-*L*-methionin-methylester

(7a) wird aus *Z-His-NHNH₂*¹⁰) und *H-Met-OCH₃*¹⁷) nach der Azid-Methode analog Holley und Sondheimer¹⁰) mit 66% Ausb. dargestellt. Schmp. 120°.

C₂₀H₂₆N₄O₅S (434.5) Ber. C 55.28 H 6.03 N 12.90 Gef. C 55.6 H 6.0 N 12.9

2.87 g (6.6 mMol) *Z-His-Met-OCH₃* (7a) und 1.47 g (10 mMol) *Chlorameisensäure-piperidid* werden in 20 ccm *Pyridin* 6 Stdn. auf 65° erwärmt. Das nach Abdampfen des *Pyridins* i. Vak. zurückbleibende rotbraune Öl wird zwischen Wasser und Essigester verteilt, die Essigesterphase über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Ausb. 3.42 g (95%) brauner Lack. $[\alpha]_D^{25}$: -9.1° ($c = 2$; in Methanol).

C₂₆H₃₅N₅O₆S (545.7) Ber. C 57.23 H 6.47 S 5.88 Gef. C 57.0 H 6.6 S 5.9

8. *N^α-[2-Nitro-phenylsulfenyl]-N^{im}-piperidinocarbonyl-L-histidyl-L-leucin-[4-nitro-benzylester]* (8): Die Lösung von 2.58 g (5 mMol) *Nps-His(Ppc)-OSu* (5) und 1.74 g (5 mMol) *H-Leu-ONb·HBr*¹²) in 30 ccm Dimethylformamid wird bei -5° mit 0.7 ccm (5 mMol) *Triäthylamin* versetzt. Nach 2stdg. Stehenlassen bei Raumtemp. wird i. Hochvak. zur Trockene gebracht, der sirupartige Rückstand in Chloroform gelöst, die Chloroformlösung 2mal mit gesätt. Natriumhydrogencarbonat-Lösung, 2mal mit 0.2*n* H₂SO₄ und 4mal mit natriumchlorid-haltigem Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Der zurückbleibende Schaum wird in Essigester gelöst und das Produkt durch allmähliche Zugabe von Petroläther unter Rühren ausgefällt. Ausb. 2.82 g (85%). Schmp. 94–95°; $[\alpha]_D^{25}$: -1.1° ($c = 1$; in Chloroform).

C₃₁H₃₇N₇O₈S (667.7) Ber. C 55.76 H 5.58 N 14.69 S 4.80
Gef. C 55.9 H 5.4 N 14.9 S 5.0

9. *Benzylloxycarbonyl-L-phenylalanyl-N^{im}-piperidinocarbonyl-L-histidin-benzylester* (9): Das Ausgangspeptid *Benzylloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-histidin-benzylester* (9a), von Akabori und Mitarbb. nach der Methode der gemischten Anhydride bzw. der Carbodiimid-Methode dargestellt¹⁵), kann auch über einen aktivierten Ester gewonnen werden: Die Lösung von 2.95 g (5 mMol) *H-His-OBzl·2TosOH*¹⁵) und 1.98 g (5 mMol) *Z-Phe-OSu*¹¹) in 30 ccm Dimethylformamid wird bei -5° mit 1.39 ccm (10 mMol) *Triäthylamin* versetzt. Nach 4stdg. Stehenlassen bei Raumtemp. wird wie unter 6. aufgearbeitet. Ausb. 1.45 g (55%). Das Produkt kristallisiert beim Verreiben in heißem Äthanol/Wasser. Schmp. 121–123.5°; $[\alpha]_D^{25}$: -18.8° ($c = 1$; in Äthanol) (Lit.¹⁵): Schmp. 118–118.5° bzw. 117–118.5°; $[\alpha]_D^{30}$: -17.3° bzw. -22.4° ($c = 1$; in Äthanol).

C₃₀H₃₀N₄O₅· $\frac{1}{4}$ H₂O (531.1) Ber. C 67.84 H 5.79 N 10.55 Gef. C 67.8 H 5.9 N 10.3

2.66 g (5 mMol) *Z-Phe-His-OBzl· $\frac{1}{4}$ H₂O* (9a· $\frac{1}{4}$ H₂O) und 0.96 g (6.5 mMol) *Chlorameisensäure-piperidid* werden in 15 ccm *Pyridin* 6 Stdn. auf 65° erwärmt. Nach Abdampfen des *Pyridins* i. Hochvak. wird der braune sirupöse Rückstand mit Wasser verrieben, mit Essigester ausgeschüttelt, der Extrakt über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. zur Trockene gebracht. Der zurückbleibende bräunliche Sirup (3.0 g = 94%) wird aus Essigester/Petroläther umgefällt und scharf getrocknet. Ausb. 2.17 g (68%); Schmp. 58–62°; $[\alpha]_D^{25}$: -4.2° ($c = 1$; in Methanol).

C₃₆H₃₉N₅O₆ (637.8) Ber. C 67.80 H 6.16 N 10.98 Gef. C 68.1 H 6.3 N 10.9

10. *L-Phenylalanyl-N^{im}-piperidinocarbonyl-L-histidin* (10): 2.55 g (4 mMol) *Z-Phe-His(Ppc)-OBzl* (9) werden in 50 ccm Methanol in Gegenwart von *Palladiumschwarz* 2 $\frac{1}{2}$ Stdn. hydriert. Nach Entfernen des Katalysators wird i. Vak. eingedampft und der Rückstand in heißem absol. Äthanol verrieben. Ausb. 0.95 g (57%). Schmp. 234–237° (Zers.); $[\alpha]_D^{25}$: $+108^\circ$ ($c = 1$; in Methanol).

C₂₁H₂₇N₅O₄ (413.5) Ber. C 61.00 H 6.58 N 16.94 Gef. C 60.7 H 6.7 N 16.7

¹⁷) M. Brenner und R. W. Pfister, Helv. chim. Acta 34, 2085 (1951).

11. N^α -Benzyloxycarbonyl- N^{im} -piperidinocarbonyl-*L*-histidyl-*L*-leucin-[4-nitro-benzylester] (**11**): 5.38 g (10 mMol) *Z*-His-Leu-ONb¹²) werden mit 1.96 g (13.3 mMol) Chlorameisensäure-piperidid in 30 ccm Pyridin wie unter 7. umgesetzt. Ausb. 6.3 g (97%) Lack. Schmp. ~ 63 – 66° (Sintern ab $\sim 57^\circ$). $[\alpha]_D^{25}$: $+24.8^\circ$ ($c = 1$; in Chloroform).

$C_{33}H_{40}N_6O_8$ (648.7) Ber. C 61.10 H 6.21 N 12.96 Gef. C 61.4 H 6.2 N 13.1

12. N^{im} -Piperidinocarbonyl-*L*-histidyl-*L*-leucin (**12**): 5.19 g (8 mMol) *Z*-His(*Ppc*)-Leu-ONb (**11**) werden in 75 ccm Methanol und 15 ccm Wasser in Gegenwart von 0.5 ccm Eisessig und Palladiumschwarz 4 Stdn. hydriert. Das kristalline Rohprodukt wird mit Essigester ausgekocht. Ausb. 2.64 g (83%) Peptid-monohydrat. Schmp. 156.5 – 157.5° (Zers.); $[\alpha]_D^{25}$: -0.6° ($c = 1$; in Wasser).

$C_{18}H_{29}N_5O_4 \cdot H_2O$ (397.5) Ber. C 54.39 H 7.86 N 17.62 Gef. C 54.6 H 7.9 N 17.5

13. N^α -[2-Nitro-phenylsulfenyl]- N^{im} -piperidinocarbonyl-*L*-histidyl-glycin-[4-nitro-benzylester] (**13**): Die Lösung von 1.72 g (3.33 mMol) *Nps*-His(*Ppc*)-OSu (**5**) und 0.97 g (3.33 mMol) *H*-Gly-ONb·HBr¹²) in 20 ccm Dimethylformamid wird bei -5° mit 0.46 ccm (3.33 mMol) Triäthylamin versetzt. Nach 2stdg. Stehenlassen bei Raumtemp. wird wie unter 8. aufgearbeitet. Das kristalline Rohprodukt (1.79 g = 88%) vom Schmp. 152 – 155° wird aus Chloroform/Petroläther umkristallisiert. Ausb. 1.70 g (83%); Schmp. 159 – 160° ; $[\alpha]_D^{25}$: $+15.0^\circ$ ($c = 1$; in Chloroform).

$C_{27}H_{29}N_7O_8S$ (611.6) Ber. C 53.02 H 4.78 N 16.03 S 5.24
Gef. C 53.1 H 4.7 N 15.8 S 5.1

14. N^{im} -Piperidinocarbonyl-*L*-histidyl-glycin-[4-nitro-benzylester]-dihydrochlorid (**14**): 1.53 g (2.5 mMol) *Nps*-His(*Ppc*)-Gly-ONb (**13**) werden in 10 ccm 2*n* methanolischer HCl 10 Min. geschüttelt. Nach Zugabe von absol. Äther wird das kristalline Produkt abgesaugt und getrocknet. Ausb. 1.28 g (96%). Schmp. 181° (Zers.); $[\alpha]_D^{25}$: $+11.7^\circ$ ($c = 1$; in Äthanol/Wasser 1:1).

$C_{21}H_{28}N_6O_6Cl_2$ (531.4) Ber. C 47.47 H 5.31 Cl 13.34 N 15.82
Gef. C 47.5 H 5.3 Cl 13.4 N 16.1

15. Benzyloxycarbonyl-*L*-phenylalanyl- N^{im} -piperidinocarbonyl-*L*-histidyl-glycin-[4-nitro-benzylester] (**15**): Die Mischung aus 1.06 g (2 mMol) *H*-His(*Ppc*)-Gly-ONb·2HCl (**14**) und 0.79 g (2 mMol) *Z*-Phe-OSu¹¹) in 15 ccm Dimethylformamid wird bei -5° unter Schütteln mit 0.56 ccm (4 mMol) Triäthylamin versetzt. Nach 2stdg. Stehenlassen bei Raumtemp. wird i. Hochvak. eingedampft, der Rückstand in Chloroform/Essigester (1:2) aufgenommen, die Lösung wie üblich mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung, *n* HCl und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Aus Chloroform/Äther/Petroläther Ausb. 1.26 g (85%). Schmp. 134.5 – 135.5° ; $[\alpha]_D^{25}$: $+19.8^\circ$ ($c = 1$; in Chloroform).

$C_{38}H_{41}N_7O_9$ (739.8) Ber. C 61.69 H 5.59 N 13.26 Gef. C 61.7 H 5.7 N 13.2

16. N^α -[2-Nitro-phenylsulfenyl]- N^{im} -piperidinocarbonyl-*L*-histidyl-*L*-leucyl-*L*-valyl-*L*-glutamyl- γ -tert.-butylester-*L*-alanyl-*L*-leucyl-*O*-tert.-butyl-*L*-tyrosin (**16**): 0.84 g (1 mMol) *H*-Leu-Val-Glu(*OtBu*)-Ala-Leu-Tyr(*tBu*)-OH¹³) werden in 4 ccm Dimethylformamid suspendiert und mit 0.15 ccm (1.5 mMol) *N*-Methyl-morpholin versetzt. Nach Abkühlen auf -10° werden 0.78 g (1.5 mMol) *Nps*-His(*Ppc*)-OSu (**5**) zugegeben und die Mischung bei Raumtemp. gerührt, wobei nach einiger Zeit Lösung eintritt. Nach 18 Stdn. wird die gallertartige Masse mit absol. Äther zu einem Pulver verrieben und abgesaugt. Das Rohprodukt wird zweimal mit verd. Citronensäure-Lösung vom pH 2 unter Zusatz von wenig Äthanol verrieben und mit Wasser gewaschen. Schließlich wird die Substanz in 20 ccm Chloroform/Methanol (19:1) 3 Stdn. verrührt, in 200 ccm Äther gegossen, verrieben, abgesaugt, mit

Äther gewaschen und i. Hochvak. über Phosphorpentoxid bei Raumtemp. getrocknet. Ausb. 0.85 g (68%). Schmp. 238.5–240.5° (Zers.); Sintern ab ~229°. R_F 0.49 (Chloroform/Methanol 8 : 3; Dünnschicht-Fertigplatte Kieselgel F, E. Merck AG, Darmstadt). Das als Ausgangsmaterial dienende Hexapeptid besitzt den R_F -Wert 0.

$C_{60}H_{89}N_{11}O_{14}S \cdot 2H_2O$ (1256.6) Ber. C 57.35 H 7.46 N 12.26 S 2.55
Gef. C 57.8 H 7.5 N 11.9 S 2.2

B. Abspaltung der Piperidinocarbonyl-Schutzgruppe

1. *Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-histidin-hydrazid*: 2.42 g (4 mMol) *Z-Phe-His(Ppc)-OCH₃ · 2¹/₂ H₂O* ($6 \cdot 2^{1/2} H_2O$) werden in 12 ccm Dimethylacetamid und 4 ccm absol. Äthanol nach Zusatz von 0.97 ccm (20 mMol) 100proz. *Hydrazinhydrat* 24 Stdn. bei Raumtemp. aufbewahrt. Die Lösung wird i. Hochvak. eingedampft, der sirupartige Rückstand in absol. Äthanol verrieben und erneut i. Hochvak. zur Trockene gebracht. Das nunmehr kristalline Rohprodukt wird mit absol. Äthanol gewaschen und aus heißem Äthanol/Wasser umkristallisiert. Ausb. 1.44 g (80%). Schmp. 180.5° (Zers.); $[\alpha]_D^{25}$: -31.7° ($c = 1$; in 50proz. Essigsäure).

$C_{23}H_{26}N_6O_4$ (450.5) Ber. C 61.32 H 5.82 N 18.66 Gef. C 61.7 H 5.9 N 19.0

2. *Benzyloxycarbonyl-L-histidyl-L-methionin-hydrazid*: 2.73 g (5 mMol) *Z-His(Ppc)-Met-OCH₃* (**7**) werden in 13 ccm Dimethylacetamid und 5 ccm Äthanol mit 1.21 ccm (25 mMol) 100proz. *Hydrazinhydrat* wie oben umgesetzt. Das kristalline Rohprodukt wird mit Äthanol verrieben. Ausb. 1.73 g (80%); aus Äthanol Schmp. 192.5° (Zers.); $[\alpha]_D^{25}$: -17.2° ($c = 1.2$; in Dimethylformamid).

$C_{19}H_{26}N_6O_4S$ (434.5) Ber. C 52.52 H 6.03 N 19.34 S 7.38
Gef. C 52.4 H 5.9 N 19.2 S 7.4

Das zu Vergleichszwecken aus *Z-His-Met-OCH₃* (**7a**) in analoger Weise dargestellte *Hydrazid* schmilzt bei 192–193°; $[\alpha]_D^{25}$: -17.1° ($c = 1.1$; in Dimethylformamid).

3. *Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-glycin-hydrazid*: Die Lösung von 0.37 g (0.5 mMol) *Z-Phe-His(Ppc)-Gly-ONb* (**15**) in 1 ccm absol. Äthanol und 1 ccm Dimethylacetamid läßt man mit 0.12 ccm (2.5 mMol) 100proz. *Hydrazinhydrat* 15 Stdn. bei Raumtemp. reagieren. Die entstandene Suspension wird i. Vak. zur Trockene gebracht und der kristalline Rückstand mit absol. Äthanol ausgekocht. Ausb. 0.24 g (95%). Schmp. 221.5° (Zers.); $[\alpha]_D^{25}$: -26.2° ($c = 1$; in Dimethylformamid).

$C_{25}H_{29}N_7O_5$ (507.5) Ber. C 59.16 H 5.76 N 19.32 Gef. C 59.4 H 5.8 N 19.3

4. *Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-histidin*: 4.47 g (7 mMol) *Z-Phe-His(Ppc)-OBzl* (**9**) werden in 20 ccm Dioxan mit 10.5 ccm (21 mMol) *2n NaOH* 2 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Nach Verdünnen mit 200 ccm Wasser werden 12.3 ccm *2n HCl* zugefügt, der kristalline Niederschlag abgesaugt und über Phosphorpentoxid i. Vak. getrocknet. Ausb. 2.56 g (84%). Schmp. 196–197°. Nach Verreiben in heißem Äthanol Schmp. 204–206°. $[\alpha]_D^{25}$: -5.8° ($c = 1$; in Dimethylformamid).

$C_{23}H_{24}N_4O_5$ (436.5) Ber. C 63.29 H 5.54 N 12.84 Gef. C 63.3 H 5.8 N 12.8

[184/68]