

Zur Synthese des [15-Leucin]Human-Gastrins I

I. Mitteilung: Erstellung der Teilsequenzen 1–5, 6–13 und 14–17*

Erich Wünsch** und Karl-Heinz Deimer

(Der Schriftleitung zugegangen am 18. Mai 1972)

Zusammenfassung: Die Synthese der drei „seitenkettenfunktions-maskierten“ Teilsequenzen des [15-Leucin]Human-Gastrins I, d. s. <Glu-Gly-Pro-Trp-Leu-OH, Z-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-

-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-OH und H-Trp-Leu-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂, in einer zur „Fragmentverknüpfung“ geeigneten Form wird beschrieben.

The synthesis of [15-leucine]human gastrin I

Ist Communication: Preparation of the sequence fragments 1–5, 6–13 and 14–17

Summary: Three fragments of the sequence of [15-leucine]human gastrin I with masked side chain functions were synthesized in a form suitable for fragment coupling. The sequences were:

<Glu-Gly-Pro-Trp-Leu-OH; Z-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-OH; H-Trp-Leu-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂.

Die Isolierung eines die Magensekretion stark anregenden Wirkstoffs gelang Gregory und Tracy 1964^[1] aus der Antrum-Schleimhaut von Schweinemägen. Im Zuge der Strukturaufklärung stellte sich heraus, daß dieses gewonnene Material aus zwei Oligopeptiden, Gastrin I und Gastrin II, bestand^[2]. Beide Hormone erwiesen sich als homodet-homöomere Heptadecapeptide, wobei Gastrin II lediglich durch einen zusätzlichen Schwefelsäurerest auffiel (Sulfatbildung an der phenolischen Hydroxylgruppe des Tyrosins in

Position 12). Die nur wenig später isolierten und strukturaufgeklärten beiden Human-Gastrine^[3] waren in ihrer Aminosäuresequenz den Hormonen des Schweins sehr ähnlich: lediglich in Position 5 war ein Methionin- durch einen Leucinrest ausgetauscht.

Es ergab sich ferner, daß das carboxyl-endständige Tetrapeptidamid H-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ das biologische Wirkungszentrum des Hormons darstellt^[4]; jede Veränderung dieser Sequenz, mit Ausnahme eines Austauschs von Methionin in Position 15 durch Leucin, Norleucin oder Äthionin, bewirkte weitgehenden bzw. völligen Aktivitätsverlust^[5]. Zum gleichen Ergebnis – sowohl beim Tetrapeptidamid als auch Heptadecapeptidamid – führte auch die Oxidation des Methioninrestes in Position 15 zum Methioninsulfoxid^[6].

* Teil der Dissertation K.-H. Deimer, Technische Universität München, Juli 1970.

** *Postanschrift:* Dr. E. Wünsch, Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, Abteilung für Peptidchemie, D-8 München 2, Schillerstraße 46.

Abkürzungen (s. Empfehlungen der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1972) *Biochem. J.* **126**, 773–780): DCCD = *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid; Bu^t = tert.-Butyl-; <Glu = 2-Pyrrolidon-5-carbonsäure (Pyroglutaminsäure); OBu^t = -tert.-butylester-, ONp = -*p*-nitrophenylester; ONSu = -*N*-hydroxysuccinimidester; OPhCl₃ = 2,4,5-Trichlorphenylester; Z = Benzyloxycarbonyl-.

¹ Gregory, R. A. & Tracy, H. J. (1964) *Gut* **5**, 103.

² Gregory, R. A., Hardy, P. M., Jones, D. S., Kenner, G. W. & Sheppard, R. C. (1964) *Nature (London)* **204**, 931–933.

³ Gregory, R. A., Tracy, H. J. & Grossman, M. I. (1966) *Nature (London)* **209**, 583–586.

⁴ Tracy, H. J. & Gregory, R. A. (1964) *Nature (London)* **204**, 935–938.

⁵ Morley, J. S. (1967) Proc. 8th Eur. Peptide Symposium, Nordwijk, Holland 1966 (Beyerman, H. C., Linde, A. van de & Brink, W. M. van den, Hrsg.) S. 226–234, North Holland Publ. Co., Amsterdam; Morley, J. S. & Smith, J. M. (1968) *J. Chem. Soc.* **1968**, 726–733.

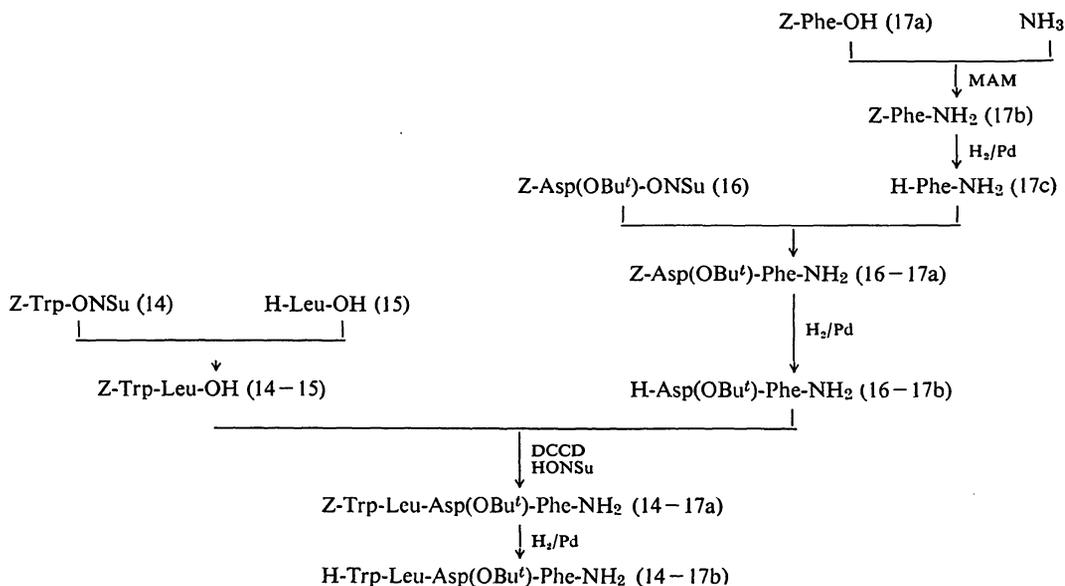
⁶ Morley, J. S., Tracy, H. J. & Gregory, R. A. (1965) *Nature (London)* **207**, 1356–1359.

Diese beiden Fakten erzwangen förmlich den Versuch der Synthese eines 15-Leucin-Analogons des Human-Gastrins I^[7]: die Gewinnung eines stabileren Wirkstoffs bei gleichzeitig zu erwartenden geringeren Schwierigkeiten im Ablauf der Syntheseroute.

Vorliegende Arbeit soll die Synthese von drei Fragmenten wiedergeben, die letztlich durch Verknüpfung mittels der racemisierungsfreien Wünsch-Weygandschen Carbodiimid-Hydroxysuccinimid-Technik^[8] zur Gesamtsequenz des [15-Leucin]-Human-Gastrins I vereinigt werden können. Alle multifunktionellen Aminosäuren wurden „drittfunktions-maskiert“ in die Synthese eingesetzt – Tyrosin als tert.-Butyläther, die Aminodicarbonsäuren, Glutaminsäure und Asparaginsäure, als ω-tert.-Butylester.

I. Teilsequenz 14–17: H-Trp-Leu-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂

H-Phe-NH₂ (17c) – erhalten durch Umsetzung von Z-Phe-OH (17a) mit Ammoniak mittels des Misch-Anhydrid-Verfahrens und anschließender hydrogenolytischer Abspaltung der Aminoschutzgruppe aus dem zunächst gewonnenen Z-Phe-NH₂ (17b) – zweckmäßigerweise als Acetat isoliert, wurde mit Z-Asp(OBu^t)-ONSu (16) in 94proz. Ausbeute zu Z-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ (16–17a) vereinigt; dessen N-Demaskierung mittels katalytisch erregten Wasserstoffs unter gleichzeitiger Titration der freiwerdenden Aminofunktion im pH-Bereich 5,0 bis 5,5 mit methanolischer Salzsäure lieferte H-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ (16–17b), isoliert in Form des Hydrochlorids^[9] (vgl. Schema 1).



Schema 1. Synthese der Teilsequenz 14–17.

HONSu = *N*-Hydroxysuccinimid; DCCD = *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid. MAM = Misch-Anhydrid-Methode.

⁷ Kurz nach Beginn unserer Arbeiten (Diplomarbeit und Dissertation K.-H. Deimer) gelangte uns die erste Synthese des [15-Leucin]Human-Gastrins I von Kenner, Sheppard et al. zur Kenntnis: Kenner, G. W., Mendive, J. J. & Sheppard, R. C. (1968) *J. Chem. Soc.* **1968**, 761–764.

⁸ Wünsch, E. & Drees, F. (1966) *Chem. Ber.* **99**, 110–120; Weygand, F., Hoffmann, D. & Wünsch, E. (1966) *Z. Naturforsch.* **21b**, 426–428.

⁹ Deimer, K.-H., (1968) Diplomarbeit Univ. München.

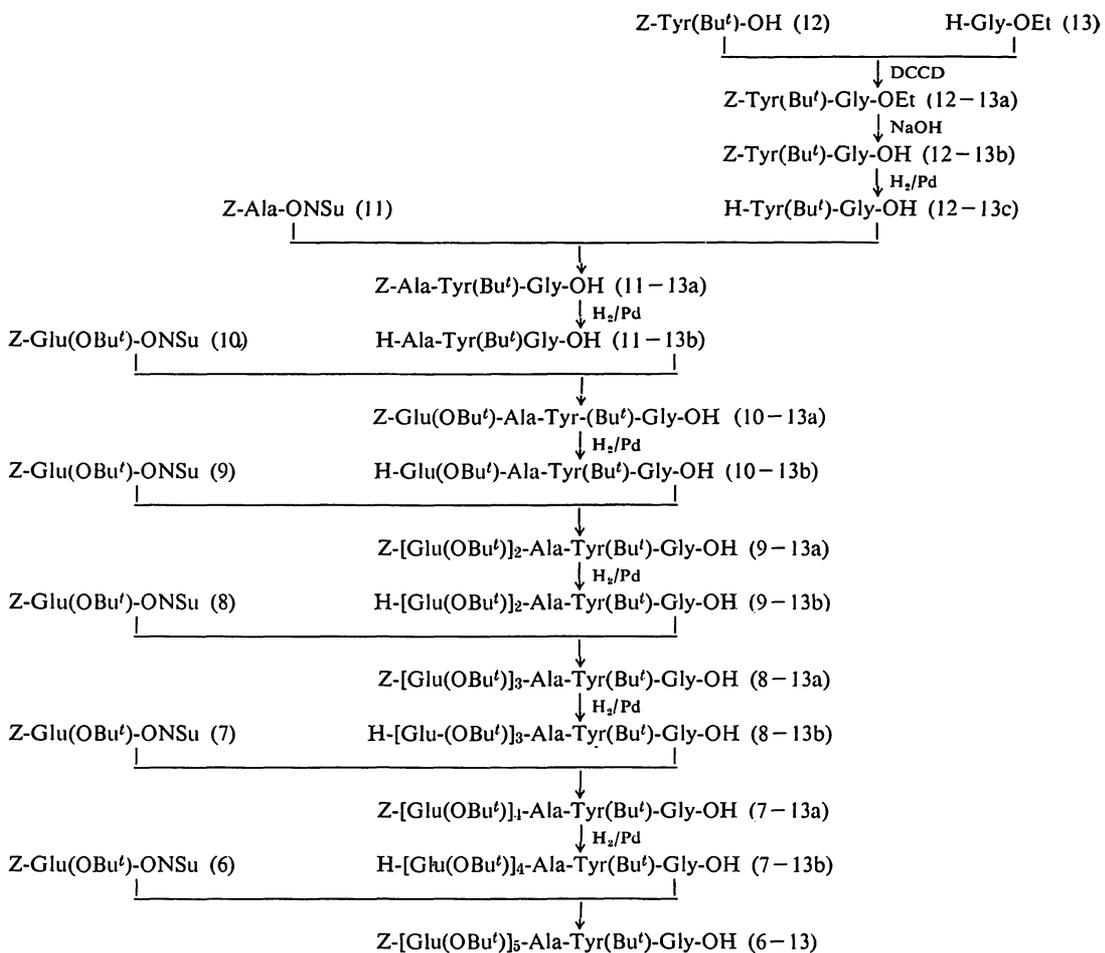
Zur Darstellung der „Dipeptid-Kopfkomponente“ Z-Trp-Leu-OH (14–15) ließ man Z-Trp-ONSu (14) mit zwei Äquivalenten Leucin in wäßrigem Dioxan unter Zusatz von gleichen Äquivalenten Natronlauge reagieren. Die Vereinigung der beiden Dipeptid-Derivate (14–15) und (16–17b) verlief nach dem Wunsch-Weygand-Verfahren ohne Komplikationen: Z-Trp-Leu-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ (14–

17a) konnte in chromatographisch und analytisch reiner Form isoliert werden. Die folgende hydrogenolytische Entacylierung zum H-Trp-Leu-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ (14–17b) gab gute Resultate, wenn die freigesetzte Aminogruppe wiederum (s. o.) sofort neutralisiert wurde. Die Ausbeute an Tetrapeptidamid-hydrochlorid (14–17b) betrug ca. 42% über alle Stufen (vgl. Schema 1).

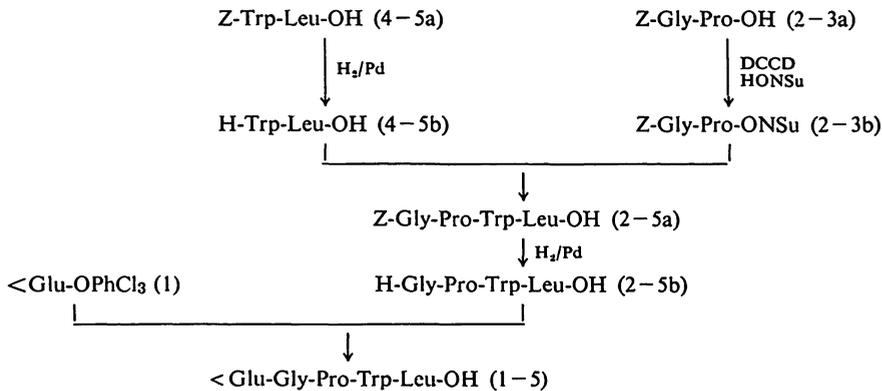
II. Teilsequenz 6–13: Z-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-OH

Z-Tyr(Bu^t)-OH (12) und H-Gly-OEt (13) wurden nach dem Carbodiimid-Verfahren zu Z-Tyr(Bu^t)-Gly-OEt (12–13a) vereinigt; dessen alkalische Verseifung führte zu Z-Tyr(Bu^t)-Gly-OH (12–13b), das man durch katalytische Hydrogenolyse zum Dipeptid-Derivat H-Tyr(Bu^t)-Gly-OH (12–13c) entacylierte. Im stufenweisen Anbauverfahren

unter Verwendung von Z-Ala-ONSu (11) und fünfmal Z-Glu(OBu^t)-ONSu (10, 9, 8, 7, 6) wurde dann genanntes Dipeptid (12–13c) zum chromatographisch und analytisch reinen Oktapeptid-Derivat (6–13), d. i. Z-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-OH, aufgestockt (vgl. Schema 2).



Schema 2. Synthese der Teilsequenz 6–13.



Schema 3. Synthese der Teilsequenz 1-5.

O₃PhCl = 2,4,5-Trichlorphenylester.

III. Teilsequenz 1-5: <Glu-Gly-Pro-Trp-Leu-OH

H-Trp-Leu-OH (4-5b) war bequem zugänglich durch hydrogenolytische Entacylierung von Z-Trp-Leu-OH (4-5a), dessen Darstellung bereits unter I. gegeben wurde [vgl. (14-15)]. Entgegen den Erwartungen ließ sich Z-Gly-Pro-OH (2-3a) ohne Komplikationen in den „aktiven“ *N*-Hydroxysuccinimidester (2-3b) überführen; weder im Verlauf der Aufarbeitung noch der Lagerung wurde Zersetzung oder Diketopiperazin-Bildung, wie im Falle des Z-Gly-Pro-ONp, beobachtet^[10]. Die Umsetzung von Z-Gly-Pro-ONSu (2-3b) mit dem freien Dipeptid (4-5b) unter üblichen Bedingungen erbrachte in hoher Ausbeute und bester Reinheit Z-Gly-Pro-Trp-Leu-OH (2-5a). Hydrogenolytische Abspaltung der Z-Schutzgruppe ließ ein leicht zu reinigendes freies Tetrapeptid (2-5b) anfallen, dessen anschließende Verknüpfung mit <Glu-O₃PhCl(1) das gewünschte Peptidfragment, d. i. <Glu-Gly-Pro-Trp-Leu-OH (1-5), ergab (vgl. Schema 3).

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

Herrn H. Stocker danken wir für seine wertvolle technische Mitarbeit. Die Elementaranalysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium der Abteilung (Leitung W. Beck) ausgeführt.

¹⁰ Wünsch, E. (1963) in Peptides, Proc. 5th Eur. Symposium, Oxford 1962 (Young, G. T., Hrsg.) S. 89-91, The Macmillan Company, New York; Goodman, M. & Stueben, K. C. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.* **84**, 1279.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden im Apparat nach Dr. Tottoli bestimmt; sie sind nicht korrigiert. Die spezifischen Drehwerte wurden im lichtelektrischen Polarimeter der Fa. Carl Zeiss (Modell LEP-A1) ermittelt; die Werte der D-Linie wurden berechnet^{*[11]}. Die chromatographischen Reinheitstests erfolgten nach den Verfahren der Dünnschichtchromatographie mit Kieselgel G nach Stahl der Fa. E. Merck als Sorptionsschicht.

I. Synthese der Teilsequenz 14-17

1. Benzyloxycarbonyl-L-phenylalaninamid (17b)^[12]

Zu 29,9 g (100 mMol) Z-Phe-OH (17a) und 11,1 ml (100 mMol) *N*-Methylmorpholin in 400 ml absol. Tetrahydrofuran werden bei -15°C unter Rühren tropfenweise 9,6 ml (100 mMol) Chlorameisensäure-äthylester gegeben. Nach 5 min fügt man bei -10°C 7,8 ml konz. Ammoniaklösung (*D* = 0,91) auf einmal zu. Das Reaktionsgemisch wird 2 h gerührt und 12 h bei Raumtemperatur stehengelassen. Das Lösungsmittel wird ca. zur Hälfte im Vak. abdestilliert, die Mischung unter Rühren mit 500 ml Wasser versetzt und anschließend im Vak. auf ein kleineres Volumen eingengt. Das ausgefallene farblose Produkt wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und letztlich bei 40°C

$$* \alpha_D = \frac{\frac{\alpha_2}{\alpha_1 - \alpha_2} \cdot \alpha_1}{\frac{\alpha_2}{\alpha_1 - \alpha_2} + 1,3727} ; \alpha_1 = \alpha_{546}; \alpha_2 = \alpha_{578}; \text{vgl. l. c.}^{[11]}$$

¹¹ Flügge, J. (1964) Grundlagen der Polarimetrie, Carl Zeiss, Oberkochen/Würt., Firmenschrift, S. 89.

¹² Fruton, J. S. & Bergmann, M. (1942) *J. Biol. Chem.* **145**, 253-265.

über P_2O_5 getrocknet. Aus Essigester/Petroläther (40–60°C) Schmp. 164–165°C; $[\alpha]_D^{20}$: $-4,9^0$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $-6,0^0$ ($c = 1,5$, in 80proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in Cyclohexan/Chloroform/Eisessig 45:45:10. Ausb. 27,3 g (91% d. Th.).

2. L-Phenylalaninamid-acetat (17c × AcOH)

26 g (87 mMol) Z-Phe-NH₂ (17b) in 500 ml 80proz. Essigsäure werden in Gegenwart von Palladiumschwarz hydrogenolytisch entacyliert. Nach beendeter Reaktion wird das Filtrat im Vak. vollständig eingedampft. Das verbleibende Öl kristallisiert aus Essigester in farblosen Nadeln. Schmp. 116–117°C; $[\alpha]_D^{20}$: $+17,5^0$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $+20,7^0$ ($c = 1,0$, in Wasser). Chromatographisch rein in Chloroform/Methanol 3:1. Ausb. 17,6 g (90% d. Th.).

3. Benzylxycarbonyl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-L-phenylalaninamid (16–17a)

16,2 g (72 mMol) H-Phe-NH₂ × AcOH (17c × AcOH) und 8 ml (72 mMol) N-Methylmorpholin in 500 ml Methylchlorid werden bei -5^0C mit 30,4 g (72 mMol) Z-Asp(OBu^t)-ONSu (16)^[13] versetzt. Die Reaktionsmischung wird nach 14stdg. Rühren im Vak. eingedampft, der verbleibende Rückstand zwischen Essigester und Wasser verteilt, die abgetrennte Essigesterphase nacheinander mit Wasser, verd. Kaliumhydrogencarbonat- und verd. Kaliumhydrogensulfatlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel im Vak. abgedampft. Der Rückstand kristallisiert aus Essigester. Schmp. 159–160°C; $[\alpha]_D^{20}$: $-30,7^0$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $-35,8^0$ ($c = 1,5$, in Äthanol). Chromatographisch rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser 6:2:2. Ausb. 31,9 g (94% d. Th.).

C₂₅H₃₁N₃O₆ (469,55) Ber. C 63,95 H 6,66 N 8,95
Gef. C 64,10 H 6,50 N 9,15

4. L-Asparagyl(β-tert.-butylester)-L-phenylalaninamid-hydrochlorid (16–17b-Hydrochlorid)

30,0 g (64 mMol) Z-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ (16–17a) in 600 ml Methanol werden unter gleichzeitigem Zutropfen von 64 ml 1N methanol. Salzsäure bei pH 5,5 wie üblich katalytisch hydriert. Nach dem Abfiltrieren des Katalysators wird die Lösung im Vak. eingedampft: es verbleibt ein Öl. Aus dessen ätherischer Lösung tritt auf Zusatz von Petroläther (40–60°C) Kristallisation ein. Die gebildete Fällung wird abfiltriert und im Vak. über P_2O_5 und KOH getrocknet. Schmp. 181°C (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$: $+15,4^0$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $+19,1^0$ ($c = 1,5$, in Methanol). Chromatographisch rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser 6:2:2. Ausb. 21,9 g (92% d. Th.).

C₁₇H₂₆N₃O₄Cl (371,88)
Ber. C 54,91 H 7,05 N 11,30 Cl 9,53
Gef. C 54,75 H 7,00 N 11,20 Cl 9,45

¹³ Wünsch, E. & Zwick, A. (1966) *Chem. Ber.* **99**, 105–109.

5. Benzylxycarbonyl-L-tryptophyl-L-leucin (14–15)^[14]

26,2 g (200 mMol) Leucin in 200 ml 1N Natronlauge werden bei 0°C unter Rühren langsam mit 44,5 g Z-Trp-ONSu (öliges Rohprodukt)* in 250 ml Dioxan versetzt. Nach 48 h Reaktionsdauer wird von ausgefallenem freien Leucin abfiltriert, das Dioxan im Vak. weitgehend abgedampft, die wäßrige Lösung mit Essigester überschichtet und schließlich mit 100 ml 2N Schwefelsäure angesäuert. Die Essigesterphase wird gut mit 0,5N Schwefelsäure und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und letztlich im Vak. eingedampft. Der Rückstand kristallisiert aus Äthanol/Wasser. Schmp. 146–148°C; (Lit. 144–146°C); $[\alpha]_D^{20}$: $-27,4^0$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $-33,9^0$ ($c = 1,7$, in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in Chloroform/Methanol 3:1 und Amylalkohol/Pyridin/Wasser 35:35:30. Ausb. 39,7 g (88% d. Th.).

6. Benzylxycarbonyl-L-tryptophyl-L-leucyl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-L-phenylalaninamid (14–17a)

21,6 g (48 mMol) Z-Trp-Leu-OH (14–15) und 5,3 ml N-Methylmorpholin in 300 ml Dimethylformamid werden bei -10^0C mit 18,7 g (50 mMol) H-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ × HCl versetzt. Nach 1/2stdg. Rühren werden bei -20^0C 7,2 g N-Hydroxysuccinimid (48 mMol) und 9,9 g N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (48 mMol) zur Reaktionsmischung gegeben. Nach 48stdg. Rühren wird von ausgefallenem Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und das Filtrat anschließend im Vak. eingedampft. Das erhaltene Öl wird in 700 ml 96proz. Äthanol aufgenommen und mit wenig Wasser zur Kristallisation gebracht. Farblose Nadeln aus Äthanol/Wasser. Schmp. 245°C (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$: $-39,4^0$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $-46,0^0$ ($c = 1,0$, in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in n-Heptan/tert.-Butanol/Pyridin 3:1:1. Ausb. 28,0 g (76% d. Th.).

C₄₂H₅₂N₆O₈ (768,44) C 65,60 H 6,81 N 10,93
Gef. C 65,51 H 6,65 N 10,97

7. L-Tryptophyl-L-leucyl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-L-phenylalaninamid-hydrochlorid (14–17b-Hydrochlorid)

22,0 g (29 mMol) Z-Trp-Leu-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ (14–17a) in 500 ml Dimethylformamid werden unter gleichzeitigem Zutropfen von 36 ml 0,8N methanol. Salzsäure bei pH 5,5 wie üblich katalytisch hydriert. Nach beendeter Reaktion wird die vom Katalysator durch Filtration befreite Lösung im Vak. eingedampft. Das verbleibende Öl kristallisiert aus wenig Dimethylformamid/Essigester. Das Produkt wird abfiltriert, mit Äther gewaschen und schließlich über KOH bei Raum-

* Hergestellt auf üblichem Wege^[13] aus 33,8 g (100 mMol) Z-Trp-OH, 11,5 g (100 mMol) N-Hydroxysuccinimid und 20,6 g (100 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid; konnte nur als Öl erhalten werden.

¹⁴ Wünsch, E., Drees, F. & Jentsch, J. (1965) *Chem. Ber.* **98**, 803–811.

temperatur getrocknet. Schmp. 180°C (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$: -29,6° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -35,1° ($c=1,0$, in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in *n*-Heptan/tert.-Butanol/Pyridin 3:1:1. Ausb. 18,4 g (96% d. Th.)

$C_{34}H_{47}N_6O_6Cl \times C_3H_7NO$ (744,28)

Ber. C 59,70 H 7,30 N 13,16 Cl 4,76

Gef. C 59,70 H 7,60 N 12,90 Cl 5,01

II. Synthese der Teilsequenz 6-13

1. Benzoyloxycarbonyl-*O*-tert.-butyl-L-tyrosyl-glycin-äthylester (12-13a)

Zu 37,0 g (100 mMol) Z-Tyr(Bu^t)-OH (12)^[15] und 14,0 ml Triäthylamin in 500 ml Methylenchlorid gibt man 14,0 g (100 mMol) H-Gly-OEt × HCl (13 × HCl) und rührt die Mischung 15 min. Dann werden bei -10°C 21,7 g (107 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid beigelegt und 12 h lang gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert, die Lösung im Vak. eingedampft. Das verbleibende Öl wird zwischen Essigester und Wasser verteilt, die abgetrennte organische Phase mit verd. Kaliumhydrogencarbonat- und Kaliumhydrogensulfatlösung und Wasser wie üblich gewaschen, die abgetrennte Essigesterlösung über Natriumsulfat getrocknet und letztlich im Vak. zur Trockene eingedampft: Öl. Chromatographisch rein in Isoamylalkohol/Pyridin/Wasser 35:35:30. Ausb. 43,4 g (95% d. Th.).

2. Benzoyloxycarbonyl-*O*-tert.-butyl-L-tyrosyl-glycin (12-13b)

43,4 g (Öl) Z-Tyr(Bu^t)-Gly-OEt (12-13a) in 500 ml wäbrigem Dioxan werden wie üblich mit 50 ml 2N Natronlauge verseift. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 50 ml 2N Schwefelsäure versetzt und im Vak. weitgehend eingedampft. Den verbleibenden Rückstand verteilt man zwischen Essigester und Wasser. Die abgetrennte organische Phase wird mit Wasser sulfatfrei gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und schließlich im Vak. eingedampft. Der Rückstand kristallisiert aus Diäthyläther/Petroläther (40-60°C). Schmp. 100-102°C; $[\alpha]_D^{20}$: -12,9° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -16,0° ($c=1,0$, in Äthanol). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 6:2:2. Ausb. 39,5 g (96% d. Th.).

$C_{23}H_{28}N_2O_6$ (428,49)

Ber. C 64,47 H 6,58 N 6,53 O 22,40

Gef. C 64,50 H 6,50 N 6,42 O 22,25

3. *O*-tert.-Butyl-L-tyrosyl-glycin (12-13c)

38,5 g (90 mMol) Z-Tyr(Bu^t)-Gly-OH (12-13b) in 500 ml Methanol/Wasser (ca. 10:15) werden nach

¹⁵ Wünsch, E. & Zwick, A. (1966) *Chem. Ber.* **99**, 105-109.

Zugabe von 1 ml Eisessig in Gegenwart von Palladiumschwarz als Katalysator hydriert. Nach beendeter Reaktion wird das Filtrat zur Trockene eingedampft, der Rückstand nach einmaligem Auskochen mit Essigester aus Methanol/Diäthyläther umkristallisiert. Schmp. 285°C (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$: +71,4° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: +85,9° ($c=1,8$, in Methanol). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 6:2:2. Ausb. 25,0 g (91% d. Th.).

$C_{15}H_{22}N_2O_4 \times 1/2 H_2O \times 1/4 CH_3CO_2C_2H_5$ (325,39)

Ber. C 59,15 H 7,75 N 8,62 O 24,60

Gef. C 59,22 H 7,60 N 8,75 O 24,42

4. Benzoyloxycarbonyl-L-alanyl-*O*-tert.-butyl-L-tyrosyl-glycin (11-13a)

24,5 g (83 mMol) H-Tyr(Bu^t)-Gly-OH (12-13c) und 11,6 ml Triäthylamin in 500 ml Dimethylformamid werden mit 29,0 g Z-Ala-ONSu (11) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vak. wird der erhaltene ölige Rückstand zwischen Essigester und 166 ml 0,5N Schwefelsäure verteilt, die abgetrennte Essigesterphase mit Wasser gewaschen und letztlich erschöpfend mit Kaliumhydrogencarbonatlösung ausgezogen. Die vereinigten Extrakte werden mit Schwefelsäure angesäuert, das hierbei ausfallende Produkt in Essigester aufgenommen. Die Lösung wird mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und schließlich im Vak. eingedampft. Der Rückstand wird aus Essigester/Petroläther (40-60°C) umkristallisiert.

Schmp. 91-93°C; $[\alpha]_D^{20}$: +38,8° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: +46,3° ($c=1,0$, in Methanol). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 3:1:1. Ausb. 40 g (96% d. Th.).

$C_{26}H_{33}O_7N_3$ (499,57) Ber. C 62,54 H 6,66 N 8,41

Gef. C 62,30 H 6,80 N 8,20

5. L-Alanyl-*O*-tert.-butyl-L-tyrosyl-glycin (11-13b)

39,0 g (78 mMol) Z-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-OH (11-13a) in 500 ml Methanol/Wasser 4:1 werden in Gegenwart von Palladiumschwarz und 3 ml Essigsäure wie üblich katalytisch hydriert. Der nach Einengen des Filtrats im Vak. erhaltene Rückstand wird aus Wasser/Äthanol umkristallisiert. $[\alpha]_D^{20}$: +28,4° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: +34,5° ($c=1,0$, in Wasser). Chromatographisch rein in *n*-Heptan/tert.-Butanol/Eisessig 3:1:1. Ausb. 27,5 g (96,5% d. Th.).

$C_{18}H_{27}N_3O_5$ (365,43) Ber. C 59,17 H 7,45 N 11,50

Gef. C 59,10 H 7,60 N 11,40

6. Benzoyloxycarbonyl-L-glutamyl-(γ -tert.-butylester)-L-alanyl-*O*-tert.-butyl-L-tyrosyl-glycin (10-13a)

Zu 24,0 g (66 mMol) H-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-OH (11-13b) in 500 ml Dimethylformamid werden nacheinander 7,3 ml *N*-Methylmorpholin und 28,6 g (66 mMol)

Z-Glu(OBu^t)-ONSu (10)* gegeben. Die Reaktionsmischung wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt und dann mit 5,3 ml Pyridin versetzt. Nach weiteren 24 h Reaktionsdauer wird das Lösungsmittel im Vak. weitgehend abgedampft und die erhaltene gallertige Masse anschließend zwischen Essigester und 0,5N Schwefelsäure verteilt. Die abgetrennte Essigesterphase wird mit Wasser gewaschen und letztlich erschöpfend mit Kaliumhydrogencarbonatlösung ausgezogen. Die vereinigten Extrakte werden mit Essigester überschichtet und mit Citronensäure angesäuert. Die Essigesterlösung wird mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und schließlich im Vak. bis auf ein Volumen von 500 ml eingeengt. Nach Anreiben kristallisiert ein farbloses Produkt. Schmp. 173–175°C; $[\alpha]_D^{20}$: -17,0° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -20,6° ($c=1,8$, in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in Chloroform/Methanol 3:1 und 5:1. Ausb. 42,0 g (93% d. Th.).

C₃₅H₄₈N₄O₁₀ (684,76) Ber. C 61,38 H 7,06 N 8,18
Gef. C 61,30 H 6,98 N 8,16

7. L-Glutamyl(γ -tert.-butylester)-L-alanyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-glycin (10–13b)

25,0 g (36 mMol) Z-Glu(OBu^t)-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-OH (10–13a) in 1500 ml Methanol/Wasser ca. 2:1 werden nach Zugabe von 1 ml Eisessig in Gegenwart von Palladiumschwarz als Katalysator hydriert. Das ausgefallene Produkt wird nach beendeter Reaktion abfiltriert und zusammen mit dem durch Eindampfen des Filtrats erhaltenen Rückstand in 200 ml 80proz. Essigsäure gelöst. Vom Katalysator wird abfiltriert, das Filtrat im Vak. bei 20°C vorsichtig bis auf ein Volumen von 50 ml eingeengt. Nach Zusatz von 300 ml Eiswasser setzt sich ein Niederschlag ab. Er wird abfiltriert, mit viel Wasser gewaschen und schließlich im Vak. bei 30°C über KOH getrocknet. $[\alpha]_D^{20}$: +7,4° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: +8,6° ($c=1,0$, in Essigsäure). Chromatographisch rein in n-Butanol/n-Heptan/Pyridin 1:2:1 und in n-Butanol/Eisessig/Wasser (6:2:2). Ausb. 18,3 g (90% d. Th.).

C₂₇H₄₂N₄O₈ · C₂H₄O₂ (610,71)
Ber. C 57,02 H 7,59 N 9,20 O 26,20
Gef. C 57,10 H 7,70 N 9,30 O 25,80

8. Benzoyloxycarbonyl-L-glutamyl(γ -tert.-butylester)-L-glutamyl(γ -tert.-butylester)-L-alanyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-glycin (9–13a)

Zu 16,5 g (27 mMol) H-Glu(OBu^t)-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-OH (10–13b) (wie unter 7. erhalten) in 300 ml Di-

* Hergestellt durch Kombination der von Nefkens^[16], Schröder^[17] und Zahn^[18] beschriebenen Verfahren.

¹⁶ Nefkens, G. H. L. & Nivard, R. J. F. (1964) *Trav. Chim.* **83**, 199–207.

¹⁷ Schröder, E. & Klieger, E. (1964) *Liebigs Ann. Chem.* **673**, 196–207.

¹⁸ Zabel, R. & Zahn, H. (1965) *Z. Naturforsch.* **20b**, 650–653.

methylformamid werden 3 ml N-Methylmorpholin und anschließend 11,8 g (27 mMol) Z-Glu(OBu^t)-ONSu gegeben. Nach ca. 2 h bildet sich eine klare Lösung. Die Reaktionsmischung wird 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ansäuern mit 27 ml 1N Schwefelsäure wird das Lösungsmittel im Vak. abgezogen. Das verbleibende Öl wird mit 200 ml Eiswasser verrieben. Das dabei anfallende feste Produkt wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und letztlich im Vak. bei 40°C getrocknet. Aus Essigester/Petroläther Schmp. 193–194°C (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$: -16,0° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -19,0° ($c=1,0$, in Essigsäure). Chromatographisch rein in Chloroform/Methanol 3:1. Ausb. 22,0 g (94% d. Th.).
C₄₄H₆₃N₅O₁₃ (869,98) Ber. C 60,74 H 7,29 N 8,05
Gef. C 60,50 H 7,69 N 7,93

9. L-Glutamyl(γ -tert.-butylester)-L-glutamyl(γ -tert.-butylester)-L-alanyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-glycin (9–13b)

22,0 g (25 mMol) Z-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-OH (9–13a) in 500 ml 80proz. Essigsäure werden in Gegenwart von Palladiumschwarz als Katalysator wie üblich hydriert. Nach beendeter Reaktion wird das Filtrat bei 30°C im Vak. eingedampft, der Rückstand mit 300 ml Eiswasser verrieben. Der gebildete Niederschlag wird abfiltriert, mit viel Wasser gewaschen und schließlich im Vak. über KOH getrocknet. $[\alpha]_D^{20}$: -7,2° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -8,6° ($c=1,5$, in 80proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in Chloroform/Methanol 3:1. Ausb. 16,8 g (90% d. Th.).

C₃₆H₅₇N₅O₁₁ · H₂O (753,86)
Ber. C 57,35 H 7,89 N 9,29 O 25,47
Gef. C 57,50 H 7,90 N 9,10 O 25,30

10. Benzoyloxycarbonyl-L-glutamyl(γ -tert.-butylester)-L-glutamyl(γ -tert.-butylester)-L-alanyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-glycin (8–13a)

Zu 16,0 g (21,3 mMol) H-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-OH (Monohydrat) (9–13b) in 300 ml Dimethylformamid/Hexamethylphosphorsäuretrisamid 1:1 werden 2,4 ml N-Methylmorpholin und anschließend 9,3 g (21 mMol) Z-Glu(OBu^t)-ONSu gegeben. Nach ca. 2 h bildet sich eine klare Lösung. Die Reaktionsmischung wird 21 h gerührt, mit 21,3 ml 1N Schwefelsäure angesäuert und schließlich unter Rühren bei Raumtemperatur in 1500 ml Wasser gegossen. Es setzt sich sofort ein farblos Niederschlag ab, der abfiltriert und anschließend mit Diäthyläther gewaschen wird. Aus Methanol/Wasser umgefällt. Schmp. 180°C (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$: -19,2° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -20,4° ($c=1,0$, in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in Chloroform/Methanol 3:1 und 5:1. Ausb. 21,0 g (93% d. Th.).

C₅₉H₇₈N₆O₁₆ (1055,20)
Ber. C 60,32 H 7,45 N 7,96
Gef. C 60,04 H 7,25 N 8,30

11. *L-Glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-alanyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-glycin (8-13b)*

21,0 g (20 mMol) Z-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-OH (8-13a) in 400 ml 80proz. Essigsäure werden in Gegenwart von Palladiumschwarz als Katalysator wie üblich hydriert. Nach beendeter Reaktion wird das Filtrat wie unter 9. für (9-13b) beschrieben aufgearbeitet. $[\alpha]_D^{20}$: -12,7⁰ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -14,6⁰ (*c*=1,0, in 80proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in Chloroform/Methanol 3:1. Ausb. 17,4 g (94% d. Th.).

C₄₅H₇₂N₆O₁₄ (921,07) Ber. C 58,67 H 7,88 N 9,12
Gef. C 58,42 H 7,98 N 8,90

12. *Benzoyloxycarbonyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-alanyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-glycin (7-13a)*

Zu 16,6 g (18 mMol) H-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-OH (8-13b) in 300 ml Dimethylformamid/Hexamethylphosphorsäuretrisamid 1:1 werden 2 ml *N*-Methylmorpholin und anschließend 7,8 g (18 mMol) Z-Glu(OBu^t)-ONSu gegeben. Nach ca. 2 h bildet sich eine klare Lösung. Die Reaktionsmischung wird 12 h gerührt, mit 18 ml 1*N* Schwefelsäure angesäuert und letztlich unter Rühren bei Raumtemperatur in 2000 ml Wasser gegossen. Es setzt sich sofort ein farblos Niederschlag ab, der abfiltriert, nacheinander mit Wasser und Diäthyläther gewaschen wird. Aus Methanol/Wasser umgefällt. Schmp. 220°C (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$: -19,4⁰ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -23,5⁰ (*c*=1,0, in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in Chloroform/Methanol 3:1 und 5:1. Ausb. 21,2 g (90% d. Th.).

C₆₂H₉₃N₇O₁₉ (1240,43) Ber. C 60,02 H 7,53 N 7,90
Gef. C 60,17 H 7,43 N 7,90

13. *L-Glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-alanyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-glycin (7-13b)*

20,0 g (16,1 mMol) Z-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-OH (7-13a) in 500 ml 80proz. Essigsäure werden in Gegenwart von Palladiumschwarz als Katalysator wie üblich hydriert. Nach beendeter Reaktion wird das Filtrat wie unter 9. für (9-13b) beschrieben aufgearbeitet. $[\alpha]_D^{20}$: -16,7⁰ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -20,4⁰ (*c*=1,0, in 80proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in Chloroform/Methanol 3:1. Ausb. 16,8 g (94,5% d. Th.).

C₅₄H₈₇N₇O₁₇ · 1/2 H₂O (1115,28)
Ber. C 58,15 H 8,00 N 8,80
Gef. C 58,05 H 7,92 N 9,16

14. *Benzoyloxycarbonyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-alanyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-glycin (6-13)*

Zu 16,0 g (14,5 mMol) H-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-OH (Hemihydrat) (7-13b) in 300 ml Dimethylformamid/Hexamethylphosphorsäuretrisamid 1:1 werden 1,65 ml *N*-Methylmorpholin und anschließend 6,3 g (14,5 mMol) Z-Glu(OBu^t)-ONSu gegeben. Nach ca. 4 h bildet sich eine klare Lösung. Die Reaktionsmischung wird 12 h gerührt, mit 14,5 ml 1*N* Schwefelsäure angesäuert und letztlich unter Rühren bei Raumtemperatur in 2000 ml Wasser gegossen. Es setzt sich sofort ein farblos Niederschlag ab, der abfiltriert, nacheinander mit Wasser und Diäthyläther gewaschen und schließlich über P₂O₅ bei Raumtemperatur getrocknet wird. Farbloses Pulver, das 1 Mol Dimethylformamid zäh festhält, vom Schmp. 230°C (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$: -17,0⁰ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -20,8⁰ (*c*=1,0, in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in Chloroform/Methanol 3:1 und 5:1. Ausb. 19,5 g (94% d. Th.).

C₇₁H₁₀₈N₈O₂₂ · C₃H₇NO (1498,73)
Ber. C 59,30 H 7,73 N 8,14 O 24,55
Gef. C 59,32 H 7,92 N 8,28 O 24,54

III. Synthese der Teilsequenz 1-5

1. *L-Tryptophyl-L-leucin (4-5b)*

25 g (55 mMol) Z-Trp-Leu-OH (14-15 und 4-5a) in 500 ml Methanol/Wasser ca. 2:1 werden in Gegenwart von Palladiumschwarz als Katalysator hydriert. Nach beendeter Reaktion werden 400 ml auf 50°C erwärmtes Wasser zugesetzt. Das bei der Hydrierung zum Teil ausgefallene Produkt geht dabei in Lösung. Das Filtrat wird im Vak. vorsichtig auf ein Volumen von ca. 20 ml eingedampft. Nach Zusatz von 300 ml Äthanol (50°C) kristallisiert sofort ein farbloses Produkt. $[\alpha]_D^{20}$: +15,0⁰ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: +18,7⁰ (*c*=1,0, in Wasser); (Lit. $[\alpha]_D^{25}$: +14,3⁰, *c*=1,0, in Wasser). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 6:2:2 und Amylalkohol/Pyridin/Wasser 35:35:30. Ausb. 15,1 g (86% d. Th.).

2. *Benzoyloxycarbonyl-glycyl-L-prolin-N-hydroxysuccinimidester (2-3b)*

15,3 g (50 mMol) Z-Gly-Pro-OH¹⁹ und 5,75 g (50 mMol) *N*-Hydroxysuccinimid in 200 ml Dimethylformamid werden bei -10°C mit 10,3 g Dicyclohexylcarbodiimid (50 mMol) wie üblich umgesetzt. Nach 12stdg. Rühren wird die Reaktionsmischung vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Filtrat im Vak. eingedampft. Das verbleibende Öl kristallisiert aus Isopropanol. Schmp. 103-104°C; $[\alpha]_D^{20}$: -80,0⁰

¹⁹ Wunsch, E. (1963) *diese Z.* 332, 288-294.

bzw. $[\alpha]_{546}^{20} - 111,0^0$ ($c=2,0$, in Dioxan). Ausb. 15,9 g (79% d. Th.).

$C_{19}H_{21}N_3O_7$ (403,39) Ber. C 56,56 H 5,38 N 10,43
Gef. C 56,30 H 5,40 N 10,20

3. *Benzoyloxycarbonyl-glycyl-L-prolyl-L-tryptophyl-L-leucin (2-5a)*

6,3 g (20 mMol) H-Trp-Leu-OH (4-5b) in 150 ml Wasser werden nacheinander unter Rühren mit 20 ml 1N Natronlauge, 150 ml Dioxan, 8,0 g (20 mMol) Z-Gly-Pro-ONSu und nach 2stdg. Rühren mit 1,6 ml Pyridin versetzt. Nach weiteren 24 h Reaktionsdauer wird das Dioxan im Vak. vorsichtig weitgehend abgedampft, die Lösung mit Essigester überschiebtet und mit 20 ml 1N Schwefelsäure angesäuert. Die Essigesterphase wird gut mit 0,5N Schwefelsäure und Wasser gewaschen und letztlich im Vak., zum Schluß unter mehrfachem Zusatz von Benzol, eingedampft. Es resultiert ein glasiges, amorphes Produkt. Chromatographisch rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser 35:35:30. Ausb. 13,0 g (107% d. Th., Lösungsmittel!).

4. *Glycyl-L-prolyl-L-tryptophyl-L-leucin (2-5b)*

12,5 g Z-Gly-Pro-Trp-Leu-OH (2-5a) (amorphes Rohprodukt) in 500 ml Methanol/Wasser 3:2 werden in Gegenwart von Palladiumschwarz als Katalysator hydriert. Nach beendeter Reaktion wird das Filtrat im Vak. weitgehend eingedampft und anschließend mit 200 ml 96proz. Äthanol versetzt. Nach einiger Zeit tritt Kristallisation ein. Das Produkt wird abfiltriert, mit Diäthyläther gewaschen und zum Schluß im Vak. bei 40°C getrocknet. $[\alpha]_D^{20} - 62,1^0$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} - 73,9^0$ ($c=1,0$ in 80proz. Essigsäure). Chromatographisch rein

in Amylalkohol/Pyridin/Wasser 35:35:30. Ausb. 8,0 g [85% d. Th., bezogen auf H-Trp-Leu-OH (4-5b)].

$C_{24}H_{33}N_5O_5 \cdot H_2O$ (489,58)
Ber. C 58,87 H 7,40 N 14,30
Gef. C 58,40 H 7,21 N 14,30

5. *L-2-Pyrrolidon-5-carbonyl-glycyl-L-prolyl-L-tryptophyl-L-leucin (1-5)*

Zu 9,4 g (20 mMol) H-Gly-Pro-Trp-Leu-OH (2-5b) (Monohydrat) und 2,2 ml (20 mMol) *N*-Methylmorpholin in 150 ml abs. Dimethylformamid werden bei Raumtemperatur 6,2 g (20 mMol) $<GluOPhCl_3^{(20)}$ gegeben; die Reaktionslösung wird 48 h bei Raumtemperatur gerührt, mit weiteren 150 mg $<GluOPhCl_3$ versetzt und nach 24 h im Vak. eingedampft. Der erhaltene ölige Rückstand wird mit 500 ml Wasser, die 2 g Kaliumhydrogencarbonat enthalten, in Lösung gebracht; diese wird gut mit Diäthyläther gewaschen, mit 10 ml 2N Schwefelsäure versetzt, im Vak. eingedampft, der Rückstand in eiskaltem 2-Propanol aufgenommen. Von ausgefallenem Kaliumsulfat wird nach mehrstündigem Stehenlassen im Kühlschrank bei -5^0C abfiltriert und die Lösung schließlich im Vak. eingedampft, das erhaltene Öl mit Diäthyläther verrieben, das dabei erhaltene farblose, amorphe Produkt auf das Filter gebracht. Schmp. 146^0C (Zers.); $[\alpha]_D^{20} - 67,8^0$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} - 80,8^0$ ($c=1,0$, in Methanol). Chromatographisch rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser 35:35:30. Ausb. 11,5 g (99% d. Th.).

$C_{29}H_{38}N_6O_7 \cdot \frac{3}{4} H_2O$ (596,16)
Ber. C 58,42 H 6,67 N 14,09 O 20,79
Gef. C 58,42 H 6,97 N 14,12 O 20,50

²⁰ Preston, J. & Sheppard, R. C. (1967) *J. Chem. Soc.* 1967, 108-113.