

- [4] IR (ohne Lösungsmittel): (2a): 1737 cm^{-1} (C=O); (2b): 1740; (2c): 1735; $^1\text{H-NMR}$ (CCl_4 , δ -Werte, CHO-Proton): (2a): 9.44; (2b): 9.45; (2c): 9.46 (alle d, $J=2\text{ Hz}$).
- [5] Y. Seki, S. Murai, N. Sonoda, *Angew. Chem.* 90, 139 (1978); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 17, 199 (1978).
- [6] L. Marko, *Proc. Chem. Soc.* 1962, 67; L. Marko, P. Szabo, *Chem. Tech. (Berlin)* 13, 482 (1961); *Chem. Abstr.* 56, 7102 (1962); M. Polievka, E. J. Mistrik, *Chem. Zvesti* 26, 149 (1972); siehe auch [3], dort S. 12 und 84.
- [7] J. A. Gladysz, J. C. Selover, C. E. Strouse, *J. Am. Chem. Soc.* 100, 6766 (1978).
- [8] G. Henrici-Olivé, S. Olivé, *Angew. Chem.* 88, 144 (1976); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 15, 136 (1976).
- [9] R. L. Pruett, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 295, 239 (1977).

Synthese von Thymosin α_1 , einem Polypeptid des Thymus^[**]

Von Christian Birr und Ulrich Stollenwerk^[*]

Derzeit wird intensiv untersucht, welche Funktion die Polypeptide der Thymusdrüse bei der Regulation des immunologischen Abwehrapparates im Körper besitzen. An Mäusen mit genetisch bedingter Thymuslosigkeit (oder nach Thymectomie) konnte durch Injektion zellfreier Proteinextrakte aus Kalbsthymus gezeigt werden, daß immunologische Mangelerscheinungen wie erhöhte Anfälligkeit gegen Infektionen, gesteigerte Wahrscheinlichkeit der Tumorbildung, beschleunigtes Altern und verminderte Abstoßung von Hauttransplantaten mit unterschiedlichem Erfolg behoben werden können^[1].

Der Differenzierungsprozeß unreifer, Thymus-abhängiger Immunabwehrzellen (T-Zellen, T-Lymphocyten) zu reifen, immunkompetenten T-Lymphocyten kann mit einer gereinigten „Proteinfraktion Nr. 5“ aus Kalbsthymus^[1] stimuliert werden^[2]. Diese „Proteinfraktion Nr. 5“ (Thymosin) wird versuchsweise klinisch gegen mehrere Krebsarten angewendet^[3]. Bei der Zerlegung von Thymosin durch Elektrofokussierung wurde das besonders saure Polypeptid „Thymosin α_1 “ entdeckt ($\text{pI}=4.2$)^[4a]. Seine Sequenz wurde aufgeklärt, die 1977 angekündigte Synthese (Wang et al.) aber bisher nicht veröffentlicht^[4b].

Wir beschreiben im folgenden kurz eine Synthese der für Thymosin α_1 angegebenen Sequenz^[4] (Schema 1); alternative

Synthesen und biologische Daten werden an anderer Stelle mitgeteilt^[5].

Das Peptid wurde durch Fragmentkondensation mit Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol (DCC/HOBt)^[6] aus fünf Teilsequenzen aufgebaut: I (1–6), II (7–12), III (13–19), IV (20–24) und V (25–28). Alle Fragmente wurden in Lösung unter Verwendung überschüssiger gemischter Anhydride der Ddz-Aminosäuren mit Isobutyloxycarbonylchlorid/*N*-Methylmorpholin^[7] durch N-terminale, schrittweise Sequenzverlängerung allseits geschützt aufgebaut. Danach lagen die Fragmente I und V als Benzylester, II, III und IV als Methylester mit folgenden über alle Schritte berechneten Ausbeuten vor: I (67%), II (20%), III (31%), IV (56%) und V (39%).

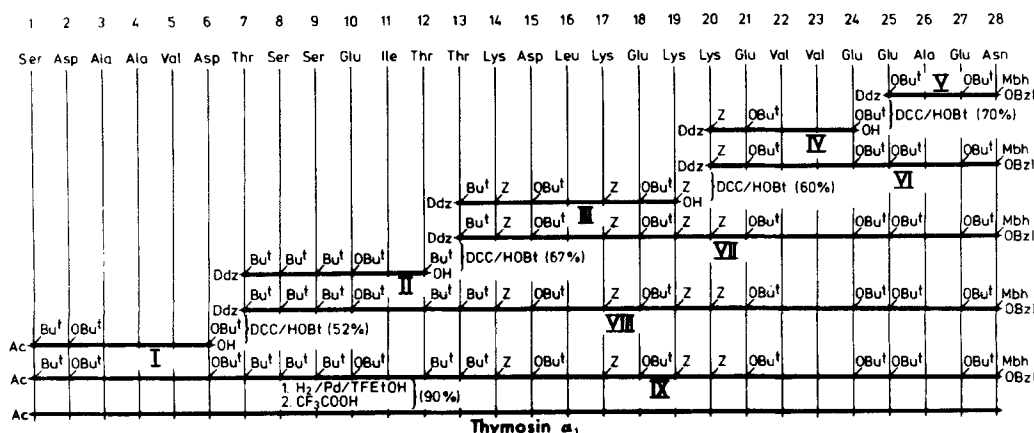
Nach alkalischer Verseifung in wäßrigem Dioxan wurde Fragment IV in Dimethylformamid mit V (nach Ddz-Abspaltung mit 1proz. Trifluoressigsäure/Dichlormethan (v/v) in 24 h mit 70% Ausbeute zur Teilsequenz VI kondensiert.

Fragment III wurde nach alkalischer Verseifung in wäßrigem Tetrahydrofuran/Methanol mit VI in Dimethylformamid in 66 h mit 60% Ausbeute zur Teilsequenz VII verknüpft.

Nach Ddz-Abspaltung (wie bei V) wurde VII in Dimethylformamid N-terminal in 18 h bei 0°C und 10 h bei ca. 20°C mit dem in Dioxan/ H_2O 8:2 (v/v) verseiften Fragment II zu VIII verlängert (67%).

Vor der letzten Kondensation wurde vom N-terminalen Acetylfragment I durch Hydrierung (Pd/C) in 2-Propanol/Eisessig die Benzylestergruppe abgespalten. Die freie Säure von I wurde in *N*-Methylpyrrolidon/Dimethylformamid 2:1 (v/v) in 24 h mit VIII (nach Ddz-Abspaltung wie bei V) mit 52% Ausbeute zum allseits geschützten Produkt IX umgesetzt. IX wurde in 2,2,2-Trifluorethanol an Sephadex LH 20 chromatographisch gereinigt. Aminosäuren-Analyse (berechnete Werte in Klammern; 6 N HCl/110°C/24 h): Asp 4.11(4); Thr 2.64(3); Ser 2.38(3); Glu 6.80(6); Lys 4.59(4); Ile 1.13(1); Leu 1.23(1); Ala 2.51(3); Val 2.41(3).

In drei abschließenden Reaktionsschritten wurde IX von allen Schutzgruppen befreit: Durch Hydrogenolyse in 2,2,2-Trifluorethanol mit Pd/C ließen sich alle Benzylloxycarbonyl-Schutzgruppen und der C-terminale Benzylester entfernen (Ausbeute 96%). Durch 30 min Einwirkung von Trifluoressigsäure/Dichlormethan 1:1 (v/v) in Gegenwart von 10 Vol.-% Anisol wurden hauptsächlich die *tert*-Butylestergruppen abgespalten. Nach Abziehen der flüchtigen Bestandteile bei Raum-



Schema 1. Synthese von Thymosin α_1 durch Kondensation der Fragmente I–VIII. Die jeweils N-terminalen Fragmente wurden in doppelter Menge eingesetzt; die Ausbeuten beziehen sich auf die C-terminalen Komponenten. Schutzgruppen: Ac: Acetyl; Bu^t: *tert*-Butyl; Bzl: Benzyl; Ddz: 3,5-Dimethoxy- α , α -dimethyl-benzylloxycarbonyl; Mbh: 4,4'-Dimethoxybenzhydryl; Z: Benzyl-oxycarbonyl.

[*] Priv.-Doz. Dr. Ch. Birr, Dipl.-Chem. U. Stollenwerk
Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung
Abteilung Naturstoff-Chemie
Jahnstraße 29, D-6900 Heidelberg 1

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

temperatur im Vakuum versetzte man den Polypeptid/Anisol-Rückstand mit reiner Trifluoressigsäure, um die 4,4'-Dimethoxybenzhydryl-Schutzgruppe und verbliebene *tert*-Butylreste abzuspalten (120 min, ca. 20°C). Nach Fällern und Waschen mit Ether wurde das synthetische Thymosin α_1 chromatogra-

phisch gereinigt. Dazu wurde an einer Säule (0.6 × 240 cm), die Bio-Gel P-6 enthielt, in 1 % Essigsäure (10proz. an Trifluor-ethanol) zunächst das Retentionsvolumen für die oxidierte Insulin-B-Kette (MG: 3495) bestimmt und anschließend das synthetische Thymosin α_1 chromatographiert; es trat mit dem seinem Molekulargewicht (3107) entsprechenden Elutionsvolumen aus der Säule aus (Ausbeute 90 % bezogen auf IX). Aminosäuren-Analyse (berechnete Werte in Klammern; 6 N HCl/110°C/24, 48, 96 h): Asp 4.11(4); Thr 2.86(3); Ser 2.70(3); Glu 5.89(6); Lys 3.98(4); Ile 0.97(1); Leu 1.00(1); Ala 3.05(3); Val 2.97(3); Dünnschicht-Chromatogramm (Kieselgel MERCK 60F-254; 0.25 mm): $R_f = 0.16$ (n-Butanol/Pyridin/Eis-essig/Wasser 5:5:1:4 (v/v)), einheitlich. $[\alpha]_D^{25}$: -96° (579 nm), -201.7° (435 nm), -242.5° (408 nm), -338.5° (365 nm), -587.0° (313 nm); $c = 0.083$ in Wasser. Das synthetische Thymosin α_1 ist im Test auf Lymphocytenstimulation, im E-Rosetten-Test und im Mitogen-Test biologisch aktiv; die Daten werden an anderer Stelle vorgelegt^[5].

Eingegangen am 26. Februar 1979 [Z 196]

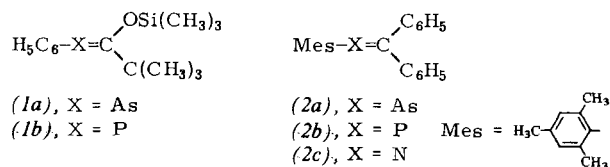
- [1] D. W. van Bekkum: The Biological Activity of Thymic Hormones. Kooeyer Scientific Publ., Rotterdam 1975; J.-F. Bach, C. Carnaud, Prog. Allergy 21, 342 (1976).
- [2] J. A. Hooper, M. C. McDaniel, G. B. Thurman, G. H. Cohen, R. S. Schulof, A. L. Goldstein, Ann. N. Y. Acad. Sci. 249, 125 (1975).
- [3] L. A. Schafer, J. U. Gutterman, E. M. Hersh, G. M. Mavligit, A. L. Goldstein, Prog. Cancer Res. Therapy 2, 329 (1977).
- [4] a) A. L. Goldstein, T. L. K. Low, M. McAdoo, J. McClure, G. B. Thurman, J. Rossio, C.-Y. Lai, D. Chang, S.-S. Wang, C. Harvey, A. H. Ramel, J. Meienhofer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 725 (1977). – b) Anmerkung bei der Korrektur: Inzwischen wurde uns die Publikation zugänglich: S. S. Wang, J. D. Kulesha, D. P. Winter, J. Am. Chem. Soc. 101, 253 (1979), beschreiben eine Synthese von Thymosin α_1 , bei der das Endprodukt der letzten Schutzgruppenabspaltungsreaktion mit HF in einer Ausbeute von 9.2% gewonnen wird.
- [5] Ch. Birr, U. Stollenwerk, O. Brodner, H.-G. Manke, 6th Am. Pept. Symp., Washington, Juni 1979.
- [6] W. König, R. Geiger, Chem. Ber. 103, 788 (1970).
- [7] Ch. Birr, M. Nassal, R. Pipkorn, Int. J. Pept. Protein Res. 13, 287 (1979).

Mesityl(diphenylmethylen)arsan^[**]

Von Theo C. Klebach, Hans van Dongen und Friedrich Bickel-
haupt^[*]

Professor Egbert Havinga zum 70. Geburtstag gewidmet

In Einklang mit der empirischen „Doppelbindungsregel“ und theoretischen Argumenten ist in der 5. Hauptgruppe die Neigung zum $\pi\pi$ -hybridisierten Zustand mit der Koordinationszahl 2 beim Arsen noch schwächer ausgeprägt als beim Phosphor. Nur wenige Verbindungen mit zweibändigem Arsen sind bekannt, und sie sind weniger stabil als die des Phosphors^[1]. Die Stabilisierung ist in den Arsamethincyaninen^[2] sowie im Arsabenzol^[3] und seinen Derivaten^[1] vorwiegend auf Delokalisierung zurückzuführen. Die einzige stabile Verbindung mit offenbar lokalisierter $\text{As}=\text{C}$ -Bindung ist Phenyl[2,2-dimethyl-1-(trimethylsiloxy)propyliden]arsan (1a)^[4]:

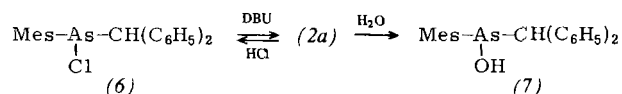
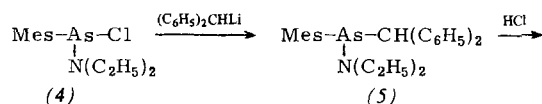
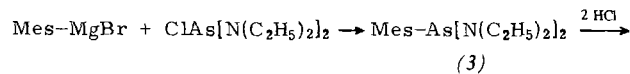


[*] Prof. Dr. F. Bickelhaupt, Drs. Th. C. Klebach, cand. chem. H. van Dongen
Scheikundig Laboratorium der Vrije Universiteit
De Lairesestraat 174, Amsterdam-Z. (Niederlande)

[**] Wir danken Drs. D. Schipper für die ^{13}C -NMR-Spektren und Dr.
R. J. M. Weustink für die Experimente mit Phenyl(diphenylmethylen)arsan.

es bedarf jedoch weiterer Klärung, inwieweit das Sauerstoffatom diese Bildung beeinflusst.

Es erschien daher untersuchenswert, ob eine Verbindung mit einer lokalisierten, nur durch Kohlenstoff substituierten $\text{As}=\text{C}$ -Bindung thermisch stabil ist. Wir konnten jetzt Mesityl-(diphenylmethylen)arsan (2a) synthetisieren, nachdem an der Phosphorverbindung (2b) gezeigt worden war, daß sich die Mesitylgruppe zur sterischen Abschirmung der reaktiven $\text{P}=\text{C}$ -Bindung eignet^[5].



Die Reaktion von Mesitylmagnesiumbromid mit Chlorbis-(diethylamino)arsan in Tetrahydrofuran (THF) lieferte eine Lösung von (3), die direkt mit 2 Äquivalenten HCl in THF bei -40°C zu (4) umgesetzt wurde [Ausb. 40% bez. auf Chlorbis(diethylamino)arsan; $K_p = 85-89^\circ\text{C}/10^{-3}$ Torr]. (4) in THF ergab mit Diphenylmethyllithium (20% Überschuß) (5), welches beim Einleiten von gasförmigem HCl zu (6) [Ausb. ca. 50% bez. auf (4); $F_p = 58-62^\circ\text{C}$ nach chromatographischer Reinigung an Al_2O_3 (Brockmann, Akt. 2-3, Toluol/Chloroform 9:1) und Sublimation ($140^\circ\text{C}/10^{-3}$ Torr)] weiterreagierte. Die Abspaltung von HCl aus (6) mit Diazabicycloundecen (DBU) in THF (25°C , 3 h) gelang nahezu quantitativ und ergab nach Abfiltrieren von $\text{DBU} \cdot \text{HCl}$, Eindampfen der Lösung und Extraktion mit Cyclohexan (2a) als hellgelbes, viskoses Öl, das bei Raumtemperatur unter Luftausschluß stabil ist; reines (2a) konnte bisher nur im abgeschmolzenen Hochvakuumssystem erhalten werden.

Tabelle 1. Spektrale Daten von (2a) und (2b).

	$^1\text{H-NMR}$ [a]	$^{13}\text{C-NMR}$ [a]	UV [b]
(2a)	7.80–7.00 (m, 10H, C_6H_5)	212.1 ($\text{As}=\text{C}$)	346 (3.52)
	6.63 (s, 2H, Mes-H)	140–125 (Aryl-C)	
	2.23 (s, 6H, o- CH_3)	22.8 (o- CH_3)	
	2.19 (s, 3H, p- CH_3)	20.6 (p- CH_3)	
(2b)	7.60–6.75 (m, 10H, C_6H_5)	193.37 ($\text{P}=\text{C}$)	254 (3.20)
[5]	6.69 (s, 2H, Mes-H)	144.9–125.5 (Aryl-C)	268 (3.01)
	2.27 (s, 6H, o- CH_3)	22.67; 22.06 (o,o'- CH_3)	324 (2.84)
	2.19 (s, 3H, p- CH_3)	20.96 (p- CH_3)	

[a] CDCl_3 , δ -Werte. [b] THF, λ in nm (log ϵ).

Die spektralen Daten von (2a) [Tabelle 1; MS: $m/e = 360.0867$ (M^+ , 15%), ber. 360.0859] bestätigen die vorgeschlagene Struktur. Charakteristisch ist das ^{13}C -NMR-Signal für den Kohlenstoff der $\text{As}=\text{C}$ -Bindung, das durch seine Lage bei sehr tiefem Feld die Hybridisierung des Kohlenstoffs ($\text{sp}^2\pi$) und den Effekt des benachbarten Arsens^[6] widerspiegelt. Ähnlich wie beim Paar (1a)^[4]/(1b)^[7] liegt dieses Signal bei der Arsenverbindung (2a) bei tieferem Feld als bei der Phosphorverbindung (2b). Das UV-Maximum von (2a), das einem $n \rightarrow \pi^*$ Übergang zuzuordnen ist^[8], ist erwartungsgemäß gegenüber dem von (2b) nach längeren Wellenlängen verschoben.

Wie bei (2b) ist auch bei (2a) die sterische Hinderung der Polymerisation offenbar der wichtigste Faktor für die