

Tabelle 1. Daten für das  $\alpha$ -Anomer (3a) und das  $\beta$ -Anomer (4a).

(3a), DC (Silicagel, $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ , 200:1); $R_F = 0.25$ ; $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{D}_6$ -Dimethylsulfoxid): $\delta = 2.56$ (s, $\text{CH}_3\text{S}$ ), 3.67 (d, $\text{CH}_2\text{-}5'$ , $J = 5.0$ Hz), 4.28 (t, $\text{H}\text{-}4'$ , $J = 4.0$ Hz), 4.5–4.7 (m, $\text{H}\text{-}3'$ , 3 Benzyl- $\text{CH}_2$ ), 4.83 (t, $\text{H}\text{-}2'$ , $J = 4.0$ Hz); 6.40 (d, $\text{H}\text{-}1'$ , $J = 4.0$ Hz), 6.63 (d, $\text{H}\text{-}5$ , $J = 4.0$ Hz), 7.1–7.3 (m, 15 arom. H), 7.75 ppm (d, $\text{H}\text{-}6$ , $J = 4.0$ Hz).
(4a), DC; $R_F = 0.20$ ; UV ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ): $\lambda_{\text{max}} = 253$ , 276, 310 nm ( $\epsilon = 22400$ , 6500, 6500); $^1\text{H-NMR}$ : $\delta = 2.56$ (s, $\text{SCH}_3$ ), 3.75 (d, $\text{CH}_2\text{-}5'$ , $J = 5$ Hz), 4.0–4.5 (m, $\text{H}\text{-}2'$ , $\text{H}\text{-}3'$ , $\text{H}\text{-}4'$ ), 4.55–4.75 (3-Benzyl- $\text{CH}_2$ ), 6.53 (d, $\text{H}\text{-}5$ , $J = 4.0$ Hz), 6.73 (d, $\text{H}\text{-}1'$ , $J = 6.0$ Hz), 6.8–7.5 (m, 15 arom. H), 7.65 ppm (d, $\text{H}\text{-}6$ , $J = 4.0$ Hz)

Ausgehend vom Aglycon (1) und vom Halogenzucker (2), beide in organischer Phase, und 50proz. Natronlauge als anorganischer Phase ist die *N*-Glycosidierung in Gegenwart von Benzyltriethylammoniumchlorid<sup>[5]</sup> bei intensivem Mischen nach 2 h quantitativ. Das Reaktionsgemisch wird an Silicagel mit Chloroform/Methanol (200:1) als Laufmittel aufgetrennt. Zur Bestimmung der Glycosidierungsposition und zur Zuordnung der Anomere wurde der Inhaltsstoff der langsamer wandernden Zone B (Hauptprodukt) in methanolischem Natriummethoxid zur 4-Methoxyverbindung umgesetzt. Diese wandert im Dünnschichtchromatogramm (Silicagel, Chloroform/Methanol, 200:1) mit  $R_F = 0.17$  wie authentisches (4b)<sup>[6]</sup>. Da das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der 4-Methoxyverbindung ebenfalls mit dem von (4b) übereinstimmt, ist das Hauptprodukt aus der Phasentransfer-Katalyse das  $N^7$ -verknüpfte  $\beta$ -Anomer (4a). Aufgrund des NMR-Spektrums von (3b)<sup>[6]</sup> kann der Inhaltsstoff der schnell wandernden Zone A (Nebenprodukt) dem  $\alpha$ -Anomer (3a) zugeordnet werden (siehe Tabelle 1).

Das Anomerenverhältnis ( $\beta : \alpha$ ) lässt sich durch den Phasentransfer-Katalysator beeinflussen. Für Tetrabutylammoniumhydrogensulfat beträgt es 6:4, für Benzyltriethylammoniumchlorid 8:2.

#### Arbeitsvorschrift

In 2.85 g (5 mmol) 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-1-*O*-*p*-nitrobenzoyl-D-arabinofuranose<sup>[7]</sup> in 15 ml Dichlormethan wird so lange trockener Bromwasserstoff eingeleitet, bis keine *p*-Nitrobenzoësäure mehr ausfällt. Die Säure wird abgesaugt und mit wenig kaltem Dichlormethan gewaschen. Beim Eindampfen der vereinigten Filtrate bleibt gelbliches, viskoses (2) zurück. – 1.0 g (5.0 mmol) (1) werden in 10 ml Benzol suspendiert und mit wenig Dimethoxyethan gerade in Lösung gebracht. Man versetzt mit 0.3 g (1.1 mmol) Benzyltriethylammoniumchlorid und dem gleichen Volumen 50proz. Natronlauge und führt 5 min mit dem Vibro-Mischer. – Der Halogenzucker (2) in 3 ml Benzol wird langsam unter Rühren (Vibro-Mischer) in die Emulsion getropft und das Durchmischen der Phasen 2 h fortgesetzt. Man trennt die organische Phase ab, schüttelt mit Wasser, trocknet mit Natriumsulfat, filtriert und destilliert das Lösungsmittel im Vakuum ab. Der ölige Rückstand wird in wenig Chloroform/Methanol (200:1) gelöst und im gleichen Lösungsmittel an einer Säule (70 × 5 cm, Kieselgel 60, Merck, 0.04–0.063 mm) chromatographiert. Die beiden Hauptzonen werden abgetrennt; aus der schneller wandernden Zone A werden nach dem Abdampfen 0.44 g (15%) (3a), aus der langsamer wandernden Zone B 2.12 g (70%) (4a) als farblose, viskose Substanzen gewonnen.

Eingegangen am 26. März 1979 [Z 241]

- [1] J. Davoll, J. Chem. Soc. 1960, 131.
- [2] R. L. Tolman, G. L. Tolman, R. K. Robins, L. B. Townsend, J. Heterocycl. Chem. 7, 799 (1970).
- [3] T. Kondo, T. Ohgi, T. Goto, Agric. Biol. Chem. 41, 1501 (1977).
- [4] R. J. Suhadolnik: Nucleoside Antibiotics. Wiley-Interscience, New York 1971.
- [5] E. V. Dehmlow, Angew. Chem. 86, 187 (1974); 89, 521 (1977); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 13, 170 (1974); 16, 493 (1977).
- [6] U. Lüpke, F. Seela, Chem. Ber., im Druck.
- [7] R. Barker, H. G. Fletcher, Jr., J. Org. Chem. 26, 4605 (1961).

#### Voll aktives Insulin durch selektive Bildung der Disulfidbrücken zwischen synthetischer A-Kette und natürlicher B-Kette<sup>[\*\*]</sup>

Von Christian Birr und Rüdiger Pipkorn<sup>[\*]</sup>

Bei der Insulinsynthese in *E. coli* nach erfolgreichem „Genetic Engineering“<sup>[1]</sup> werden A- und B-Ketten in getrennten Kulturen aufgebaut und als freie Polypeptide geerntet. Die statistische Disulfid-Oxidation zum Insulinmolekül verlief ähnlich verlustreich wie bei den früheren Totalsynthesen<sup>[2]</sup>. Auch Rekombinationsversuche mit natürlichen A- und B-Ketten (1:1) ergeben nur Insulinausbeuten von ca. 10%<sup>[3]</sup>. Um die Ausbeuten zu verbessern, ist es demnach vordringlich, die drei Disulfidbrücken gezielt und nicht statistisch zu schließen.

Wir beschreiben hier die Synthese einer Insulin-A-Kette, die selektiv abspaltbare Schwefelschutzgruppen enthält, am polymeren Träger, und die Umsetzung dieser A-Kette unter schrittweiser, oxidativer Bildung der Disulfidbrücken mit einer natürlichen B-Kette zu voll aktivem, kristallinem Rinderinsulin. Das Konzept ist eine Weiterentwicklung der Prinzipien, die die Synthese des MCD-Peptides ermöglichten<sup>[4]</sup>.

Das Fragment I (1–3) synthetisierten wir aus Ddz-Aminosäuren<sup>[5]</sup> in Lösung<sup>[6]</sup> mit 84% Ausbeute. Die Fragmente II (4–14) (Schema 1, links) und IV (15–21) (Schema 1, rechts) wurden zur Überprüfung der optimierten Synthesen je zweimal an 0.5% vernetztem Polystyrol-Gel aufgebaut. Alle Syntheseschritte wurden photometrisch verfolgt<sup>[7]</sup> (vgl. [4]). Statt  $\text{Gln}^5$  und  $\text{Gln}^{15}$  sowie  $\text{Asn}^{18}$  wurden  $\text{Glu(OBzl)}$  bzw.  $\text{Asp(OBzl)}$  verwendet, um eine Nitrilbildung an den Amid-Seitenfunktionen durch Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zu vermeiden. Im Fragment IV ist  $\text{Asp}^{21}$  mit seiner  $\beta$ -Carboxyfunktion über eine elektrophile 2-Oxoethylesterbindung an den Träger gebunden. Auf diese Weise konnten am Ende der Synthese alle zukünftigen Amid-Seitenfunktionen durch Ammonolyse der Benzylester- und 2-Oxoethylesterbindungen bei der Ablösung von IV und V (Schema 2) vom Träger gleichzeitig eingeführt werden.

Durch Kondensation von I in 15fachem Überschuss mit DCC/1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) mit dem trägegebundenen Fragment II entstand III (1–14) am Träger in 86% Ausbeute (bezogen auf II-Gelpolymer). Durch Abspaltung von III vom Träger (0.5 N Triethylamin in Methanol/Dioxan 1:1 (v/v) + 0.5 Vol-% 1 N NaOH) und anschließende chromatographische Reinigung der abgelösten, voll geschützten Peptidsäure erhielten wir 1 g reines III (59% Ausbeute, bezogen auf III-Gelpolymer). Die Stabilität des Benzylesters in Position A<sup>5</sup> unter den Abspaltungsbedingungen wurde durch das Massenspektrum bewiesen. Das Fragment IV wurde vom Träger zunächst mit Ammoniak-gesättigtem Dioxan, dann mit flüssigem Ammoniak/Methanol 4:1 (v/v) unter Druck bei 20 °C abgespalten. Nach chromatographischer Reinigung (DEAE A 25 Sephadex/Methanol-0.5 N Essigsäure 4:1 (v/v) und Sephadex LH 20/Methanol) erhielten wir 1.45 g (86%, bezogen auf die trägegebundene Vorstufe) reines IV. Die Bildung des C-terminalen  $\beta$ -Amids ist durch Modellversuche gesichert.

[\*] Priv.-Doz. Dr. Ch. Birr, Phil. cand. R. Pipkorn  
Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung  
Abteilung Naturstoff-Chemie  
Jahnstraße 29, D-6900 Heidelberg 1

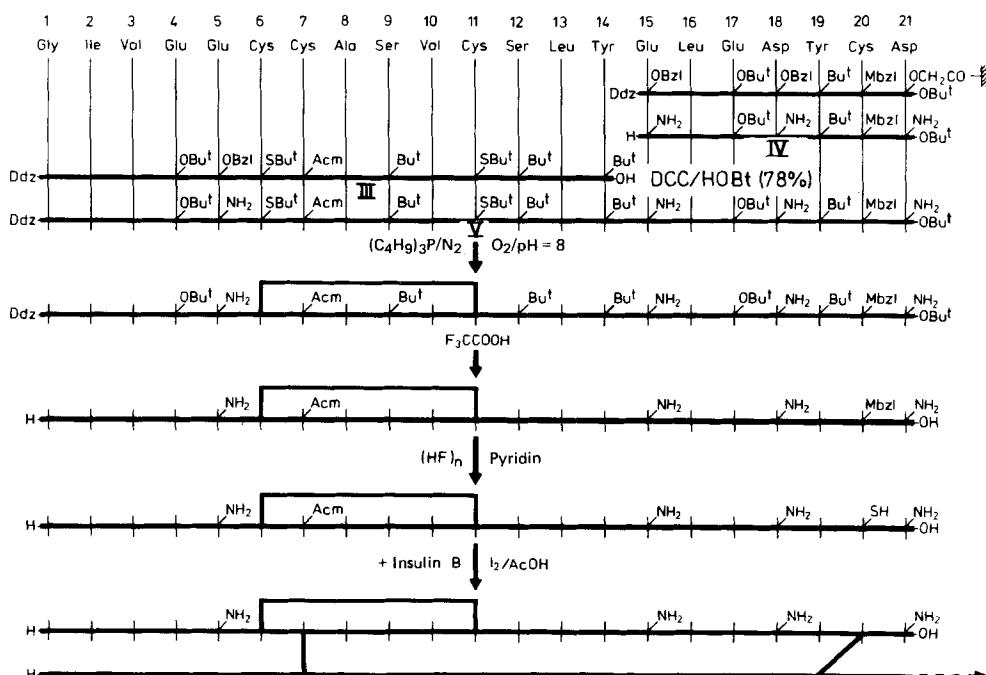
[\*\*] Ch. Birr, auszugsweise vorgetragen auf dem 15. Europäischen Peptid-Symposium, Gdańsk 1978. – Wir danken Prof. Dr. H. Zahn und Dr. H.-G. Gattner, Aachen, für die Unterweisung in der Rekombinationstechnik und für Insulin-B-Kette; Dr. R. Renner, München, und Dr. H.-G. Gattner, Aachen, danken wir für die biologischen Tests.

	4 Glu	5 Glu	6 Cys	7 Cys	8 Ala	9 Ser	10 Val	11 Cys	12 Ser	13 Leu	14 Tyr		15 Glu	16 Leu	17 Glu	18 Asp	19 Tyr	20 Cys	21 Asp	
Synth. (%)																				
a)	58	70	—	—	—	—	—	Ddz	—	—	—	—	100	100	—	—	—	—	—	
b)	—	—	—	—	—	—	—	Ddz	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	96	97	—	—	—	—	—	Ddz	—	—	—	—	78	100	—	—	—	—	—	
	98	98	—	—	—	—	—	Ddz	SBu <sup>t</sup>	—	—	—	—	92	100	—	—	—	—	—
	96	77	—	—	—	—	—	Ddz	SBu <sup>t</sup>	—	—	—	—	86	90	—	—	—	—	—
	99	90	—	—	—	—	—	Ddz	SBu <sup>t</sup>	—	—	—	—	81	95	—	—	—	—	—
	100	100	—	—	—	—	—	Ddz	SBu <sup>t</sup>	—	—	—	—	96	100	—	Ddz	—	—	—
	98	98	—	—	—	—	—	Ddz	AcM	—	—	—	—	IV	—	—	—	—	—	—
	100	96	—	—	—	—	—	Ddz	SBu <sup>t</sup> AcM	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	86	89	—	—	—	—	—	Ddz	OBzI SBu <sup>t</sup> AcM	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	69	86	—	—	—	—	—	Ddz	OBzI OBzI SBu <sup>t</sup> AcM	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	OCH <sub>2</sub> CO-‡	—	—	—	—	—	—	—	—

Schema 1. Synthese der trägegebundenen, voll geschützten [5] Fragmente II (4–14) (links) und IV (15–21) (rechts) der Rinderinsulin-A-Kette mit den in zwei Durchgängen (a und b) stufenweise erzielten Umsätzen. Die über beide Synthesen gemittelte und auf die Anfangsbeladung am Träger bezogene Gesamtausbeute betrug 90 bzw. 93%.

Die Kondensation von 0.5 mmol III mit 1 mmol IV zur voll geschützten Ziel-Sequenz V (1–21) mit DCC/HOBt (4 Tage) in Dimethylformamid ergab nach chromatographischer Reinigung 1.3 g V (78%, bezogen auf III). Gleichartige

Bind mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die *p*-Methoxybenzylgruppe ließ sich selektiv mit HF in Pyridin in Gegenwart von Anisol entfernen (ca. 80%, in Analogie zu Modellstudien). Die verbleibende A-Kette mit einer einzigen freien



Schema 2. Synthese der voll geschützten Rinderinsulin-A-Kette durch Kondensation der vom Träger abgelösten, gereinigten Fragmente III und IV in Lösung sowie Freisetzung der A-Kette und ihre selektive Disulfidverbrückung mit natürlicher B-Kette. Fragment III entstand in 86% Ausbeute am Träger durch Reaktion von 1 (1–3) mit trägegebundenem II.

Kondensation von III in 2.4fachem Überschuß mit IV am Träger mit Carbonyldimidazol ergab V in 12% Ausbeute; 50% des überschüssigen III konnten in diesem Fall zurückgewonnen werden. In V ließ sich der Benzylester in Position A<sup>5</sup> mit NH<sub>3</sub>/Methanol unter Druck in das Amid umwandeln.

Zur selektiven Bildung des intrachenaren Disulfidringes A<sup>6</sup>–A<sup>11</sup> durch Luftoxidation (Schema 2) wurden die *tert*-Butylidisulfide in Position A<sup>6</sup> und A<sup>11</sup> reduktiv mit Tributylphosphan gespalten (84% Ringschluß-Ausbeute, bezogen auf voll geschütztes V). Alle *tert*-Butylgruppen wurden anschlie-

SH-Funktion wurde sofort in 30proz. Essigsäure gelöst, mit der essigsauren Lösung einer äquimolaren Menge reduzierter, natürlicher B-Kette aus Rinderinsulin (zwei freie SH-Funktionen) vermischt und mit 0.1 N Iodlösung oxidiert. Hierbei entstand die angestrebte interchenare Disulfidbrücke A<sup>20</sup>–B<sup>19</sup>; als Sekundärabschritt wurde die letzte AcM-Schutzgruppe iodolytisch entfernt und dann auch die zweite interchenare Disulfidbrücke oxidativ gebildet. Es wurde sofort in 10% Essigsäure an Sephadex G 50 chromatographiert. Die Fraktionsgläser 4 und 5 dieser ersten Reinigung enthiel-

ten reines, elektrophoretisch und dünnenschichtchromatographisch mit authentischen Proben übereinstimmendes Rinderinsulin; Ausbeute 25%. Dies lyophilisierte Rohprodukt hatte im biologischen Lipogenesetest an Fettzellen bereits 52% und im kompetitiven Rezeptorbindungstest 65% Aktivität. Der Zn-Komplex zeigte die charakteristische Kristallform. Nach wiederholter Gel-Chromatographie an Biogel P6 in 1% Essigsäure und Ionenaustausch-Chromatographie an Carboxymethylcellulose war unser semisynthetisches Rinderinsulin in beiden oben genannten Testsystemen biologisch voll aktiv.

Selektiv abspaltbare Schwefelschutzgruppen nur an der Insulin-A-Kette verbessern demnach die Ausbeute der Vereinigung von A- und B-Kette (1:1) gegenüber der statistischen Kombination bereits um mehr als 100%. Die hier geschilderte Strategie wird erst vollkommen wirksam, wenn auch B<sup>7</sup> Acm- und B<sup>19</sup> Mbzl-geschützt sind und die SH-Gruppen auch dort selektiv freigesetzt werden können.

Eingegangen am 19. März 1979 [Z 240]

- [1] D. V. Goeddel, D. G. Kleid, F. Bolivar, H. L. Heynecker, D. G. Yansura, R. Crea, T. Hirose, A. Krazewski, K. Itakura, A. D. Riggs, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 106 (1979).
- [2] R. E. Humbel, H. R. Bosshard, H. Zahn in D. F. Steiner, N. Freinkel: Handbook of Physiology. Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore 1972, S. 111 ff.
- [3] H.-G. Gattner, Aachen, persönliche Mitteilung 1979.
- [4] Ch. Birr, M. Wengert-Müller, Angew. Chem. 91, 156 (1979); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 18, 147 (1979).
- [5] Schutzgruppen: Acm: Acetamidomethyl; Bu<sup>t</sup>: tert-Butyl; Ddz: 3,5-Dimethoxy- $\alpha,\omega$ -dimethyl-benzylloxycarbonyl; Mbzl: 4-Methoxybenzyl; OBu<sup>t</sup>: tert-Butyloxy; OBzI: Benzyloxy; SBu<sup>t</sup>: tert-Butylthio.
- [6] Ch. Birr, M. Nassal, R. Pipkorn, Int. J. Pept. Protein Res. 13, 287 (1979).
- [7] Ch. Birr in Y. Wolman: Peptides 1974. Halsted Press, New York 1975, S. 117 ff.

## Die Bootkonformation von *cyclo-[L-Pro<sub>2</sub>-D-Pro]*<sup>[\*\*]</sup>

Von Jan Willem Bats, Axel Friedrich, Hartmut Fuess, Horst Kessler, Werner Mästle und Manfred Rothe<sup>[\*]</sup>

Kleine cyclische Peptide sind für Konformationsuntersuchungen besonders geeignet, da die eingeschränkte Molekülbeweglichkeit nur wenige Konformationen zuläßt. Cyclotripeptide können in Lösung außer in der Kronenkonformation mit C<sub>3</sub>-Gerüstsymmetrie<sup>[1]</sup> auch in einer unsymmetrischen Bootkonformation vorliegen<sup>[2]</sup>. Im kristallinen Zustand wurde bisher nur die Kronenkonformation nachgewiesen<sup>[3]</sup>. NMR-Untersuchungen und stereochemische Betrachtungen zeigten, daß beide Formen in Lösung immer dann nebeneinander auftreten, wenn das Cyclotripeptid mindestens eine achirale Aminosäure (Sarcosin, N-Benzylglycin) enthält<sup>[2]</sup>. Besteht es jedoch nur aus chiralen Aminosäuren, so wird die Konformation durch deren Chiralität bestimmt: Drei Aminosäuren gleicher Chiralität erzwingen die Kronenform; bei unterschiedlicher Chiralität sollte dagegen die Bootform ein-

[\*] Prof. Dr. H. Fuess, Dr. J. W. Bats

Institut für Kristallographie der Universität  
Senckenberganlage 30, D-6000 Frankfurt am Main 1

Prof. Dr. H. Kessler [<sup>†</sup>], Dipl.-Chem. A. Friedrich  
Institut für Organische Chemie der Universität  
Niederurseler Hang, D-6000 Frankfurt am Main 50

Prof. Dr. M. Rothe, Dipl.-Chem. W. Mästle  
Lehrstuhl Organische Chemie II der Universität  
Oberer Eselsberg, D-7900 Ulm

[<sup>†</sup>] Korrespondenzautor.

[\*\*] Peptidkonformationen, 7. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Die Rechnungen wurden am Hochschulrechenzentrum der Universität Frankfurt durchgeführt. – 6. Mitteilung: H. Kessler, P. Kondor, Chem. Ber., im Druck.

genommen werden. Wir fanden, daß *cyclo-[L-Pro<sub>2</sub>-D-Pro]*<sup>[4]</sup> in Lösung und im Kristall in der Bootkonformation vorliegt.

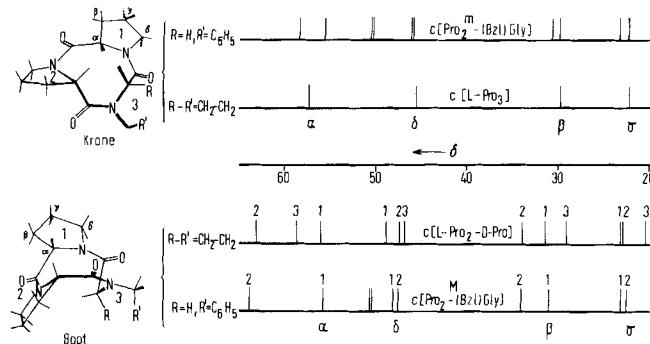


Abb. 1. Korrelation der <sup>13</sup>C-NMR-Verschiebungen der aliphatischen Prolin-Kohlenstoffatome in cyclischen Tripeptiden.

Die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren der Titelverbindung zeigen, daß die Umgebung der drei Prolinringe verschieden ist. Die chemischen Verschiebungen der <sup>13</sup>C-NMR-Signale im aliphatischen Bereich (Abb. 1) sind denen der in Chloroform dominierenden Konformation M von *cyclo-[L-Pro<sub>2</sub>-(Bzl)Gly]*, für die die Bootform bewiesen wurde<sup>[2a,5]</sup>, sehr ähnlich. Charakteristisch ist der Unterschied zu den Spektren von *cyclo-[L-Pro<sub>3</sub>]*<sup>[6]</sup> und *cyclo-[L-Pro<sub>2</sub>-(Bzl)Gly]* (m-Form)<sup>[2a]</sup>; diese Peptide nehmen die Kronenkonformation ein.

Die Signale von C<sub>α</sub> und C<sub>β</sub> des Prolinringes 2 (Abb. 1) sind durch den für Prolinpeptide ungewöhnlichen Winkel ψ an Pro<sup>2</sup> (siehe Tabelle 1) zu tiefem Feld verschoben. Im 270MHz-<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum in CDCl<sub>3</sub> erscheinen die α-Protonen als zwei Triplets bei δ=4.47 (Ring 1) und 4.72 (Ring 2) sowie als Dublett bei δ=4.70 (Ring 3)<sup>[7]</sup>. Die Kopplungskonstanten zu den β-Protonen entsprechen völlig den Werten, die man nach dem Spektrum von *cyclo-[Pro<sub>2</sub>-(Bzl)Gly]* und aus Modellbetrachtungen erwartet: Pro<sup>1</sup>: J<sub>12</sub>≈J<sub>13</sub>≈7.2 Hz; Pro<sup>2</sup>: J<sub>12</sub>≈J<sub>13</sub>≈7.4 Hz; Pro<sup>3</sup>: J<sub>12</sub>≈1.4 Hz, J<sub>13</sub>≈6.4 Hz.

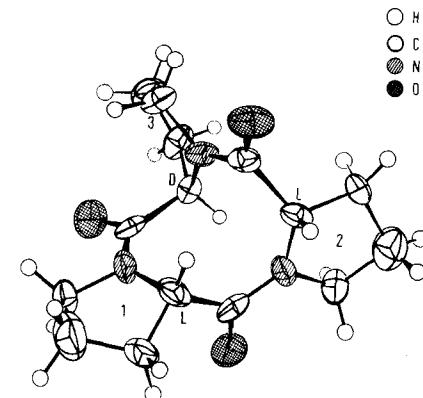


Abb. 2. Struktur von kristallinem *cyclo-[L-Pro<sup>1</sup>-L-Pro<sup>2</sup>-D-Pro<sup>3</sup>]*.

Die Titelverbindung kristallisiert aus Ether in der orthorhombischen Raumgruppe P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> mit zwei unabhängigen Molekülen in der asymmetrischen Einheit. Die Röntgen-Strukturanalyse ergab auch im kristallinen Zustand die Bootkonformation für beide Moleküle<sup>[3c]</sup>. Eines der beiden Moleküle ist in Abbildung 2 dargestellt. Das zweite Molekül weicht nur unwesentlich davon ab. Die Konformationswinkel sind in Tabelle 1 mit denen von *cyclo-[L-Pro-(Bzl)Gly<sub>2</sub>]*