

Zur Synthese von Peptiden mit Eigenschaften des Human-Proinsulin-C-Peptids ($_{\text{h}}$ C-Peptid), V¹⁾

Darstellung der Sequenz 9–31 des Human-Proinsulin-C-Peptids und seines [Glu⁹,Gln¹¹]-Analogen

Rolf Geiger*, Gerda Treuth und Ferdinand Burow

Farbwerke Hoechst AG, vormals Meister Lucius & Brüning,

D-6230 Frankfurt (Main)-Höchst, Postfach 800320

Eingegangen am 11. April 1973

Die Synthese der partiell geschützten Sequenzen 9–31 des Human-Proinsulin-C-Peptids ($_{\text{h}}$ C-Peptid) und seines [Glu⁹,Gln¹¹]-Analogen wird beschrieben.

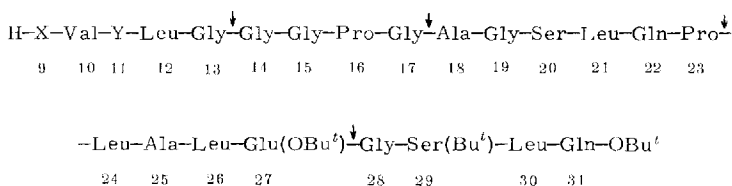
Notes on the Synthesis of Peptides with the Properties of Human Proinsulin C-Peptide ($_{\text{h}}$ C-Peptide), V¹⁾

Synthesis of the Sequence 9–31 of the Human Proinsulin C-Peptide and its [Glu⁹, Gln¹¹]Analogue

The syntheses of the partially protected sequences 9–31 of human proinsulin C-peptide and its [Glu⁹,Gln¹¹]analogue are described.

In vorangehenden Publikationen beschrieben wir die Synthesen von Partialsequenzen des $_{\text{h}}$ C-Peptids und seines [Glu⁹,Gln¹¹]-Analogen^{1–4)}.

In der vorliegenden Arbeit wird über die Synthese der partiell geschützten Peptide **1** und **2**, die der Sequenz 9–31 des $_{\text{h}}$ C-Peptids bzw. seines [Glu⁹,Gln¹¹]-Analogen entsprechen, berichtet⁵⁾.



1: X = Gln(Mbh); Y = Glu(OBu^t)

2: X = Glu(OBu^t); Y = Gln

¹⁾ IV. Mitteil.: G. Jäger, Chem. Ber. **106**, 206 (1973).

²⁾ I. Mitteil.: R. Geiger, G. Jäger, W. König und G. Treuth, Chem. Ber. **106**, 188 (1973).

³⁾ II. Mitteil.: W. König, Chem. Ber. **106**, 193 (1973).

⁴⁾ III. Mitteil.: R. Geiger und A. Volk, Chem. Ber. **106**, 199 (1973).

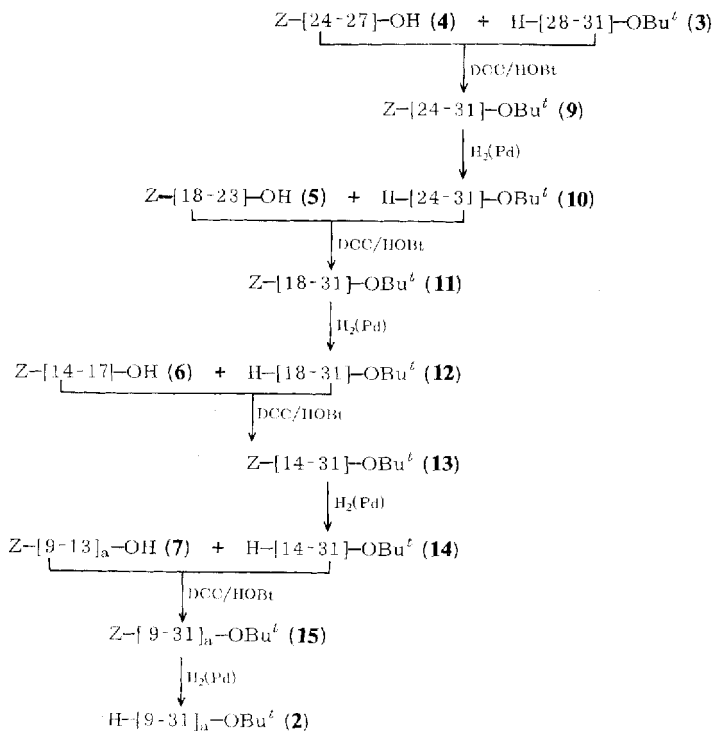
⁵⁾ Abkürzungen entsprechend dem Vorschlag der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature; vgl. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **348**, 245, 256, 262 (1967). Weitere Abkürzungen siehe experimenteller Teil.

In Formel 1 bzw. 2 sind die Verknüpfungsstellen durch Pfeile gekennzeichnet. Der Aufbau der Peptide folgte Schema 1 und 2, wobei die in Tab. 1 aufgeführten Fragmente eingesetzt wurden.

Tab. 1. Geschützte Peptid-Fragmente aus der Sequenz 9-31 des ${}_h$ C-Peptids und seines [Glu⁹, Gln¹¹]-Analogen

H-Gly-Ser(Bu ^t)-Leu-Gln-OBu ^t (28-31)	3
Z-Leu-Ala-Leu-Glu(OBu ^t)-OH (24-27)	4
Z-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-OH (18-23)	5
Z-Gly-Gly-Pro-Gly-OH (14-17)	6
Z-Glu(OBu ^t)-Val-Gln-Leu-Gly-OH (9-13) _a	7
Nps-Gln(Mbh)-Val-Glu(OBu ^t)-Leu-Gly-OH (9-13) _b	8

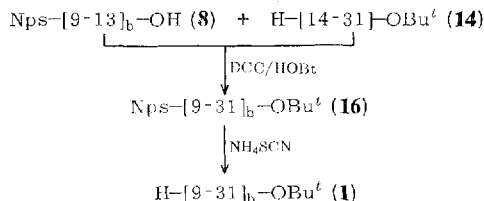
Schema 1. Synthese der geschützten Sequenz 9-31 des [Glu⁹, Gln¹¹]_hC-Peptids



Racemisierungsgefahr bestand nur bei der Synthese des Octapeptids 9. Sie wurde durch Verwendung der DCC/HOBt-Methode⁶⁾ auf ein Minimum reduziert⁷⁾. Die

⁶⁾ W. König und R. Geiger, Chem. Ber. **103**, 788 (1970).

⁷⁾ W. König und R. Geiger, Chem. Ber. **103**, 2041 (1970).

Schema 2. Synthese der geschützten Sequenz 9-31 des ${}_h\text{C}$ -Peptids

Kondensation von **10** mit dem Hexapeptid **5** war dagegen wegen des C-terminalen Prolins schon nahezu racemisierungssicher, beim Ankondensieren von **6**, **7** und **8** bestand bei C-terminalem Glycin keine solche Gefahr mehr.

Bei der Synthese der Sequenz 9-31 des $[\text{Glu}^9, \text{Gln}^{11}]_h\text{C}$ -Peptids verliefen alle Reaktionsschritte unter Anwendung der DCC/HOBt-Technik mit guter Ausbeute, und dank günstiger Lösungseigenschaften von Ausgangs- und Reaktionsprodukten erbrachten einfache Reinigungsmethoden wie Auskochen mit Methanol und Diglierieren mit 1 N NaHCO_3 und Wasser Produkte von bereits hoher Reinheit.

Auch die katalytische Hydrierung stieß auf keine Schwierigkeiten, obwohl gerade bei der Synthese höherer Peptide gelegentlich sterische Hinderung oder unerwartete Schwerlöslichkeit bei der katalytischen Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-Gruppe das Weiterführen einer Synthese verhindern können. Hier lagen allerdings schon günstige Erfahrungen vor, die wir bei der Darstellung des Schweine-Proinsulin-C-Fragments gewonnen hatten⁸⁾.

So konnte schließlich das partiell geschützte Peptid der Sequenz 9-31 des $[\text{Glu}^9, \text{Gln}^{11}]_h\text{C}$ -Peptids nach Schema 1 in sehr befriedigender Reinheit und mit guten analytischen Daten erhalten werden.

Die Synthese der entsprechenden Sequenz des ${}_h\text{C}$ -Peptids selbst verlief weniger günstig. Bei der Umsetzung von **8** mit **14** nach Schema 2 waren auch bei der Verwendung von 2 Moläquivv. DCC dünnschichtchromatographisch im Reaktionsprodukt **16** noch die Ausgangsprodukte zu erkennen. Beim Versuch, eine vollständigere Reaktion durch Erhöhen der DCC-Menge zu erzwingen, traten zunehmend mehr Nebenprodukte auf, so daß ein unvollständiger Umsatz hingenommen werden mußte.

Versuche, das Reaktionsprodukt auf einfache Weise zu reinigen, schlugen ebenfalls fehl. Zwar wurde durch Umlösen aus Äthanol ein guter Reinigungseffekt erzielt, das Verfahren war aber zu verlustreich, denn die Hauptmenge von **16** blieb, nunmehr stärker verunreinigt, in der Mutterlauge zurück. So entschlossen wir uns, an dieser Stelle auf eine Reinigung zu verzichten und zunächst die Nps-Gruppe nach *Wünsch* und *Spangenberg*⁹⁾ mit Ammoniumrhodanid in Anwesenheit von 2-Methylindol abzuspalten.

Die Reaktion verlief ohne Komplikationen und ergab rohes **1**, in dem dünnschichtchromatographisch erwartungsgemäß neben **17** auch **14** und in geringerem Umfang



⁸⁾ R. Geiger, G. Jäger, W. König und A. Volk, Z. Naturforsch. **24 B**, 999 (1969).

⁹⁾ E. Wünsch und R. Spangenberg, Chem. Ber. **105**, 740 (1972).

einige nichtidentifizierte Verunreinigungen zu erkennen waren. Digerieren mit 1 N NaHCO_3 und Wasser entfernte neben überschüssigem Rhodanid auch einen Teil der Verunreinigungen.

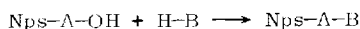
Zur weiteren Reinigung wurde die Substanz einer Gelchromatographie an Sephadex LH-20®, einem vernetzten und partiell *O*-hydroxyalkylierten Dextran¹⁰⁾, mit 90proz. Dimethylformamid (DMF) als Quell- und Elutionsmittel unterworfen. Dank der Anwesenheit der MbH-Schutzgruppe war das Peptid trotz der vergleichsweise hohen Eigenabsorption des DMF an seiner Extinktion, die bei 254 nm gemessen wurde, zu erkennen. Einzelheiten der chromatographischen Reinigung sind im experimentellen Teil beschrieben.

Ein erster Peak (Fraktion 1) enthielt das nunmehr annähernd reine Trikosipeptid 1. Eine Schulter dieses Peaks (Fraktion 2) enthielt noch beträchtliche Mengen von 1, wurde aber nicht mehr für die später zu beschreibende Synthese des ${}_h\text{C}$ -Peptids eingesetzt.

Die Aminosäureanalyse des aus Fraktion 1 erhaltenen Peptids entsprach nicht ganz der erwarteten Zusammensetzung, sondern zeigte einen geringen Überschuß der im Pentapeptid 17 enthaltenen Aminosäuren. Fraktion 1 war aber frei von 17, das erst in Fraktion 4 erschien.

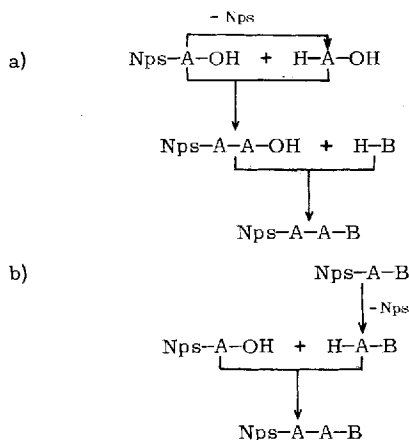
Die Erklärung für diesen zunächst unerwarteten Befund könnte eine Beobachtung geben, die erstmals von *Rudinger* gemacht worden war¹¹⁾. Die Nps-N-Bindung kann danach von dem nucleophilen, sauren 1-Hydroxybenzotriazol reversibel abgespalten werden.

Neben der Hauptreaktion



würden dann unter anderem die beiden Nebenreaktionen a) und b) in Schema 3 ablaufen, die beide zu mehrfachem Einbau der Komponente A führen.

Schema 3. Nebenreaktionen von Nps-Peptiden bei der Peptidsynthese mit DCC/HOBt



¹⁰⁾ Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala.

¹¹⁾ J. *Rudinger*, persönliche Mitteilung.

Durch die chromatographische Reinigung konnten entsprechende Nebenprodukte, die sich in Fraktion 2 stärker anreicherten, größtenteils entfernt werden.

Wir danken Herrn Prof. Dr. J. Rudinger für seine wertvollen Hinweise und Diskussionen.

Experimenteller Teil

Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren bestimmt und sind nicht korrigiert. Drehwerte wurden im lichtelektrischen Polarimeter Mod. 141 der Fa. Perkin-Elmer gemessen, die chromatographische Reinheit der Verbindungen auf Dünnschichtplatten der Fa. E. Merck in folgenden Laufmitteln geprüft.

A: Methyläthylketon/Pyridin/Wasser/Essigsäure (70:15:15:2),

B: n-Butanol/Essigsäure/Wasser (6:2:2),

C: n-Heptan/Pyridin/*tert*-Butylalkohol (3:1:1),

D: Chloroform/Methanol/Pyridin (5:2:3),

E: Chloroform/Methanol (8:2)

Die Aminosäureanalysen wurden nach 24stdg. bzw. 48stdg. Hydrolyse mit 5 N HCl bei 110°C mit einem Beckman-Aminosäure-Analysator Unichrom vorgenommen.

Abkürzungen:

DCC	Dicyclohexylcarbodiimid	HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl	Nps	2-Nitrophenylsulfenyl
Bu'	<i>tert</i> -Butyl	DMF	Dimethylformamid
Mbh	4,4'-Dimethoxybenzhydryl		

$R_F(A)$: $X \times Y$ bedeutet R_F in System A = X mal R_F der Bezugssubstanz Y.

1. *Benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-alanyl-L-leucyl-L-glutamyl(γ-tert-butylester)-glycyl-O-tert-butyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutamin-tert-butylester* (9): Zur Lösung von 26.6 g (42 mmol) **4**³⁾ und 28.0 g (39.7 mmol) **3**²⁾ in 350 ml DMF gibt man 11.3 g (84 mmol) HOBt und 5.1 ml (39.7 mmol) *N*-Äthylmorpholin und versetzt bei -5°C mit der Lösung von 9.3 g (45 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in 30 ml DMF. Dann wird 3 h bei Raumtemp. gerührt, vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und das Filtrat i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wird zweimal mit Tetrahydrofuran und einmal mit Essigester ausgekocht, wobei das schwerlösliche Reaktionsprodukt jedesmal noch heiß abfiltriert wird.

Beim Erwärmen mit 500 ml Tetrahydrofuran ging das Peptid teilweise in Lösung, beim Abkühlen bildete sich eine Gallerte. Nach Zugabe von 500 ml Essigester und 500 ml Aceton und 1 stdg. Rühren bei Raumtemp. ließ sich das Produkt abfiltrieren. Es wurde mit Essigester/Aceton (1:1) gewaschen und i. Vak. bei Raumtemp. über P₂O₅ getrocknet. Ausb. 32.5 g (72%). DC: rein in System C. $[\alpha]_D^{25} = -30.0^\circ$ ($c = 1$, in DMF). Schmp. 218°C (Zers.).

C₅₆H₉₃N₉O₁₅ (1132.9) Ber. C 59.41 H 8.28 N 11.12 Gef. C 59.3 H 8.3 N 11.0

2. *L-Leucyl-L-alanyl-L-leucyl-L-glutamyl(γ-tert-butylester)-glycyl-O-tert-butyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutamin-tert-butylester · TosOH* (10): 19.0 g (18.65 mmol) **9** werden in 80 ml DMF warm gelöst. Man versetzt mit 350 ml Methanol und hydriert katalytisch an Palladiumschwarz unter gleichzeitiger automatischer Titration mit 1 N methanol. TosOH bei pH 4.5. Nach 4½ h ist die Hydrierung beendet. Man filtriert vom Katalysator ab,engt das Filtrat i. Vak. auf ein kleines Vol. ein und versetzt mit Äther. Der ausgefallene Niederschlag wiegt nach dem Trocknen i. Vak. über P₂O₅ 19.7 g (90%). Schmp. 192–197°C (Zers.). $[\alpha]_D^{25} = -19.5^\circ$ ($c = 1$, in DMF). DC: rein in den Systemen A und B. $R_F(B)$: 0.8 × 9.

[C₄₈H₈₈N₉O₁₃]C₇H₇O₃S (1171.0) Ber. N 10.75 S 2.74 Gef. N 11.0 S 2.8

3. *Benzyloxycarbonyl-L-alanyl-glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutaminyl-L-prolyl-L-leucyl-L-alanyl-L-leucyl-L-glutamyl(γ-tert-butylester)-glycyl-O-tert-butyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutamin-tert-butylester · 2 H₂O (11)*: 7.24 g (10 mmol) **5**³⁾, 11.7 g (10 mmol) **10**, 2.7 g (20 mmol) HOBT und 1.28 ml (10 mmol) *N*-Äthylmorpholin in 300 ml DMF werden bei −5°C mit 2.27 g (11 mmol) DCC, gelöst in 10 ml DMF, versetzt. Man rührt 3 h bei Raumtemp. und läßt über Nacht bei 4°C stehen. Die Lösung, aus der kein Dicyclohexylharnstoff ausgefallen ist, wird i. Vak. bei 40°C Badtemp. auf 100 ml eingengt und auf 0°C gekühlt. Dabei fällt Dicyclohexylharnstoff aus, der abfiltriert wird (1.6 g). Das Filtrat wird unter Rühren in 1.3 Liter Äther/Petroläther (1:1) eingegossen. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit Äther/Petroläther (1:1) gewaschen. Zur Reinigung löst man in 150 ml Methanol. Die Lösung wird mit einem Gemisch aus 20 ml 1 N NaHCO₃ und 300 ml Wasser versetzt. Der feine Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und über P₂O₅ i. Vak. getrocknet. Ausb. 11.1 g (64.5%). Schmp. 211°C (Zers.). $[\alpha]_D^{25} = -50.6^\circ$ ($c = 1$, in Methanol). DC: rein in System E.

C₈₀H₁₃₂N₁₆O₂₃ · 2 H₂O (1723.0) Ber. C 55.76 H 7.96 N 13.01

Gef. C 55.9 H 8.1 N 13.2

4. *L-Alanyl-glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutaminyl-L-prolyl-L-leucyl-L-alanyl-L-leucyl-L-glutamyl(γ-tert-butylester)-glycyl-O-tert-butyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutamin-tert-butylester · TosOH · H₂O (12)*: 9.0 g (5.2 mmol) **11** werden in 125 ml Methanol unter Titration mit 1 N methanol. TosOH bei pH 4.5 analog Versuch 2. katalytisch hydriert. Nach beendeter Hydrierung wird vom Katalysator abfiltriert und das Filtrat i. Vak. zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird mit 40 ml Acetonitril ausgekocht und heiß abfiltriert. Ausb. nach Trocknen über P₂O₅ i. Vak. 8.2 g (90.5%). Schmp. 192°C (Zers.). $[\alpha]_D^{25} = -55.2^\circ$ ($c = 1$, in Methanol). DC: rein in den Systemen A und E.

[C₇₂H₁₂₆N₁₆O₂₁][C₇H₇O₃S · H₂O (1742.1) Ber. C 54.46 H 7.82 N 12.86 S 1.84

Gef. C 54.4 H 8.0 N 12.6 S 2.0

Aminosäureanalyse: Ser 1.65 (2), Glu 2.95 (3), Pro 0.96 (1), Gly 2.00 (2), Ala 1.97 (2), Leu 4.12 (4).

5. *Benzyloxycarbonyl-glycyl-glycyl-L-prolyl-glycyl-L-alanyl-glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutaminyl-L-prolyl-L-leucyl-L-alanyl-L-leucyl-L-glutamyl(γ-tert-butylester)-glycyl-O-tert-butyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutamin-tert-butylester · 2 H₂O (13)*: 5.9 g (3.4 mmol) **12** und 2.26 g (5.4 mmol) **6**⁴⁾ werden, in 150 ml DMF gelöst, mit 0.51 ml (4 mmol) *N*-Äthylmorpholin und 1.35 g (10 mmol) HOBT versetzt. Bei −5°C trägt man 2.06 g (10 mmol) DCC ein, rührt 16 h bei Raumtemp. und fällt dann mit 800 ml Äther/Petroläther (1:1) das Reaktionsprodukt aus, das nach dem Trocknen mehrmals mit 0.5 N NaHCO₃ und Wasser gewaschen wird. Trocknen i. Vak. über P₂O₅. Ausb. 5.6 g (82.5%). DC: rein im System A. $[\alpha]_D^{25} = -44.4^\circ$ ($c = 0.5$, in Methanol). Schmp. 208–209°C (Zers.).

C₉₁H₁₄₈N₂₀O₂₇ · 2 H₂O (1991.3) Ber. C 54.92 H 7.71 N 14.06

Gef. C 55.1 H 7.9 N 13.9

Aminosäureanalyse: Ser 1.75 (2), Glu 3.10 (3), Pro 1.81 (2), Gly 5.00 (5), Ala 2.12 (2), Leu 4.28 (4).

6. *Glycyl-glycyl-L-prolyl-glycyl-L-alanyl-glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutaminyl-L-prolyl-L-leucyl-L-alanyl-L-leucyl-L-glutamyl(γ-tert-butylester)-glycyl-O-tert-butyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutamin-tert-butylester · TosOH · H₂O (14)*: 3.9 g **13** werden in 100 ml Methanol bei pH 4 mit 0.1 N methanol. TosOH während 2 h an Pd katalytisch hydriert. Verbrauch 19.5 ml 0.1 N TosOH (theoret. 19.4 ml). Man filtriert vom Katalysator ab, entfernt das Lösungsmittel i. Vak. und verreibt den Rückstand mit Äther. Ausb. 3.7 g (94%). DC: fast rein in System A.

Kein Ausgangsprodukt, nur eine Spur einer nicht identifizierten Substanz mit etwas höherem R_F -Wert.

$[C_{83}H_{142}N_{20}O_{25}]C_7H_7O_3S \cdot H_2O$ (2011.4) Ber. N 13.91 S 1.59 Gef. N 13.8 S 1.8

7. *Benzyloxycarbonyl-L-glutamyl(γ -tert-butylester)-L-valyl-L-glutaminyl-L-leucyl-glycyl-glycyl-L-prolyl-glycyl-L-alanyl-glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutaminyl-L-prolyl-L-leucyl-L-alanyl-L-leucyl-L-glutamyl(γ -tert-butylester)-glycyl-O-tert-butyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutamin-tert-butylester $\cdot H_2O$ (15)*: Zur Lösung von 2.83 g (1.4 mmol) **14** und 1.12 g (1.5 mmol) **74** in 60 ml DMF gibt man 0.18 ml (1.4 mmol) *N*-Äthylmorpholin, 405 mg (3 mmol) HOBT und bei $-5^\circ C$ 412 mg (2 mmol) DCC zu und rührt 6 h bei Raumtemp. Nach dem Einengen i. Vak. auf ein kleines Vol. fällt man mit 500 ml Äther/Petroläther (1:1) ein Rohprodukt aus, das durch zweimaliges Auskochen mit je 10 ml Methanol gereinigt wird. Ausb. 2.46 g (69%). DC: rein in den Systemen A und D. $[\alpha]_D^{25} = -31.1^\circ$ ($c = 1$, in DMF).

$C_{118}H_{194}N_{26}O_{35} \cdot H_2O$ (2556.1) Ber. C 55.52 H 7.74 N 14.24 Gef. C 55.7 H 7.9 N 14.1

8. *L-Glutamyl(γ -tert-butylester)-L-valyl-L-glutaminyl-L-leucyl-glycyl-glycyl-L-prolyl-glycyl-L-alanyl-glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutaminyl-L-prolyl-L-leucyl-L-alanyl-L-leucyl-L-glutamyl(γ -tert-butylester)-glycyl-O-tert-butyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutamin-tert-butylester $\cdot TosOH \cdot H_2O$ (2)*: 1.8 g (0.7 mmol) **15** werden in 60 ml DMF warm gelöst. Man verdünnt mit 100 ml Methanol, gibt ca. 1 g Pd auf $BaSO_4$ hinzu und hydriert analog Beispiel 2. unter Zugabe von 0.1 N TosOH bei pH 4.5. Man filtriert vom Katalysator ab, klärt das Filtrat durch erneute Filtration über Kieselgur, engt i. Vak. auf ein kleines Vol. ein und versetzt mit Äther. Der Niederschlag wird mit Äther gewaschen und über P_2O_5 i. Vak. getrocknet. Ausb. 1.69 g (92.5%). DC: bis auf eine Spur einer etwas höher wandernden Verbindung rein in System D. Ausgangsprodukt war nicht mehr zu erkennen.

$[C_{110}H_{188}N_{26}O_{33}]C_7H_7O_3S \cdot H_2O$ (2594.3) Ber. N 14.03 S 1.24 Gef. N 13.9 S 1.4

Aminosäureanalyse: Ser 1.79 (2), Glu 5.08 (5), Pro 1.90 (2), Gly 6.00 (6), Ala 2.10 (2), Val 0.96 (1), Leu 5.19 (5).

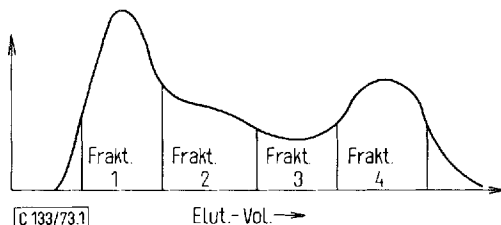
9. *2-Nitrophenylsulfenyl-N γ -(4,4'-dimethoxybenzhydryl)glutaminyl-L-valyl-L-glutamyl(γ -tert-butylester)-L-leucyl-glycyl-glycyl-L-prolyl-glycyl-L-alanyl-glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutaminyl-L-prolyl-L-leucyl-L-alanyl-L-leucyl-L-glutamyl(γ -tert-butylester)-glycyl-O-tert-butyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutamin-tert-butylester (16)*: Zur Lösung von 1.21 g (0.6 mmol) **14** in 40 ml DMF gibt man 665 mg (0.66 mmol) **84**, 180 mg (1.33 mmol) HOBT sowie 0.1 ml (0.78 mmol) *N*-Äthylmorpholin und versetzt bei $-5^\circ C$ mit 145 mg (0.7 mmol) DCC. Nach 2 h Rühren bei Raumtemp. gibt man nochmals 145 mg (0.7 mmol) DCC und 0.04 ml (0.31 mmol) *N*-Äthylmorpholin zu, rührt über Nacht bei Raumtemp. und fällt dann mit 300 ml Äther/Petroläther (1:1) 1.78 g rohes Reaktionsprodukt aus. DC: neben dem geschützten Tricosipeptid (R_F 0.68) waren im System B noch unumgesetztes Octadecapeptid (R_F 0.29) und Nps-Pentapeptid (R_F 0.86) zu erkennen.

10. *N γ -(4,4'-Dimethoxybenzhydryl)-L-glutaminyl-L-valyl-L-glutamyl(γ -tert-butylester)-L-leucyl-glycyl-glycyl-L-prolyl-glycyl-L-alanyl-glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutaminyl-L-prolyl-L-leucyl-L-alanyl-L-leucyl-L-glutamyl(γ -tert-butylester)-glycyl-O-tert-butyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutamin-tert-butylester $\cdot H_2O$ (1)*: Zu 1.65 g (0.59 mmol) **16**, in 25 ml Methanol suspendiert, gibt man 354 mg Ammoniumrhodanid, 153 mg 2-Methylindol und 7.35 ml Essigsäure, rührt 3 h bei Raumtemp., destilliert das Lösungsmittel i. Vak. ab und verreibt den Rückstand mit Äther. Nach Abfiltrieren vom Äther wird der Rückstand so lange mit 1 N $NaHCO_3$ digeriert, bis in der abdekantierten Lösung die Rhodanidprobe mit $FeCl_3$ negativ ausfällt. Man wäscht nun das schwerlösliche Reaktionsprodukt mit Wasser neutral, trocknet bei $40^\circ C$ über P_2O_5 i. Vak. und erhält 1.326 g (84%) rohes **1**, das nach dünnschicht-

chromatographischer Prüfung noch die beiden Ausgangsprodukte **14** und **17** enthält, allerdings in geringerem Maße als das bei der entsprechenden rohen Nps-Verbindung **16** der Fall war.

Zur weiteren Reinigung wurde das Rohprodukt in 6 ml 90proz. DMF gelöst und über eine Säule (100 × 2.5 cm) an Sephadex LH-20[®] chromatographiert. Quellmedium und Eluans waren 90proz. DMF. Infolge der hohen Peptidkonzentration im Eluat konnte die Konzentration des Peptids durch Extinktionsmessung bei 254 nm mit Hilfe eines Uvicord der Fa. LKB, Stockholm, verfolgt werden.

Elutionsgeschwindigkeit 0.3 ml/min.



Fraktion 1 enthielt das partiell geschützte Tricosipeptid, das dünnschichtchromatographisch im System B nahezu einheitlich war. Ausb. in Frakt. 1: 840 mg (63 %, bez. auf Rohprodukt) nach Trocknen bei 40°C über P₂O₅ i. Vak.

C₁₂₅H₂₀₂N₂₆O₃₅ · H₂O (2664.1) Ber. N 13.67 S 0 Gef. N 13.7 S <0.3 %

Aminosäureanalyse: Ser 1.68 (2), Glu 5.32 (5), Pro 1.86 (2), Gly 6.00 (6), Ala 1.94 (2), Val 1.07 (1), Leu 5.25 (5).

[133/73]