

SYNTHESE DER GESCHÜTZTEN INSULIN-TEILSEQUENZ B 1-8

G. LOSSE, M. MAUCK und H. STANGE
Sektion Chemie der Technischen Universität Dresden, DDR

(Received in Germany 30 September 1976)

Zusammenfassung—Der Aufbau des Oktapeptidderivates Z-Phe-Val-Asn-Gln-His(Trt)-Leu-Cys(SET)-Gly-OH¹ mit der N-terminalen Sequenz 1-8 der Insulin-B-Kette aus den Untereinheiten Z-Phe-Val-OH, Boc-Asn-Gln-His(Trt)-OMe und Boc-Leu-Cys(SET)-Gly-OH wird beschrieben.

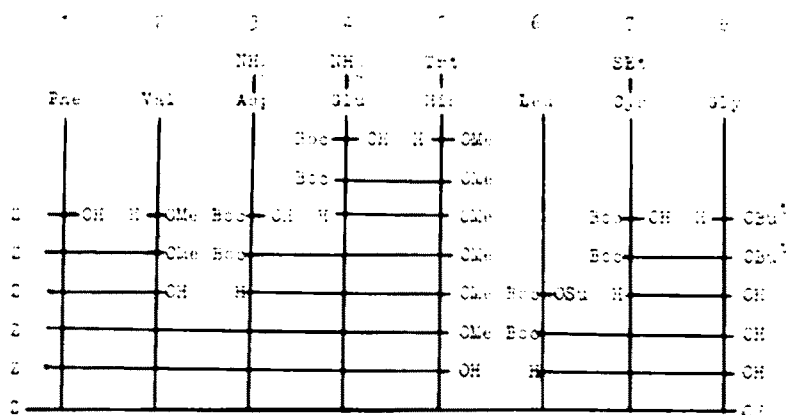
Abstract—The synthesis of the octapeptide derivative Z-Phe-Val-Asn-Gln-His(Trt)-Leu-Cys(SET)-Gly-OH with the terminal sequence 1-8 of the insulin B chain using the subunits Z-Phe-Val-OH, Boc-Asn-Gln-His(Trt)-OMe and Boc-Leu-Cys(SET)-Gly-OH is reported.

Ausgehend von den Erfahrungen der ersten Insulin-Kettensynthesen¹ wurden neben den anderen Sequenzbereichen der A- und B-Kette auch für das Teilstück B 1-8 mehrere neuere Synthesewege erarbeitet, vorzugsweise, um bessere Möglichkeiten zum Schutz der Seitenketten zu erproben.^{2,6}

Bei der Synthese der Insulin-B-Kette¹ wie des gesamten Insulinmoleküls⁷ stellt sich ausser der Frage ins-

Nebenreaktionen, welche bei Kupplungsschritten unter Mitwirkung von DCC am Imidazolring eintreten können¹⁰ und lässt sich mit TFE,^{11,12} HCOOH¹¹ und anderen Acidolyseereagenzien^{9,14} schonend wieder abspalten. Daneben kann die S-Äthylmercaptogruppe¹⁵ durch Thiolyse¹⁵ oder Sulfityolyse^{16,17} leicht entfernt werden.

Schema 1 zeigt den eingeschlagenen Syntheseweg nach dem Prinzip (2 + 3) · 3:



Schema 1.

besondere nach zweckmässigen Thiolschutzgruppen¹⁸ ein weiteres Problem in der Schwerlöslichkeit des geschützten N-terminalen B-Bereiches. Um beiden Aspekten besonders Rechnung zu tragen, entschieden wir uns für die Neusynthese des Sequenzabschnittes B 1-8 in der geschützten Form Z-Phe-Val-Asn-Gln-His(Trt)-Leu-Cys(SET)-Gly-OH.

Durch den hydrophoben N^{trt}-Trt-Rest⁹ wird in Verbindung mit der N^z-Z-Gruppe die Löslichkeit dieses Fragmentes in polaren organischen Solventien wesentlich erhöht. Gleichzeitig verhindert der Tritylrest

Obwohl die S-Äthylmercaptogruppe bisher als weitgehend^{16,18} und die N^{trt}-Tritylgruppe als hinreichend^{9,12} stabil unter den Acidolysebedingungen N^{trt}-ständiger Boc-Gruppen angesehen wurde, haben wir diese Selektivitätsfragen in Verbindung mit der vorgesehenen Synthesekonzeption nochmals eingehender überprüft.

Tabelle 1 gibt Auskunft über die hierbei nach der Methode der grössten Verdünnung gegen die entsprechenden Referenzverbindungen dunnschichtchromatographisch gemessenen Spaltungsgrade. Analog wurden auch die Daten in Tabelle 2 und 3 erhalten.

Zur gleichzeitigen Abspaltung von Boc- und tert. Butylgruppe erweist sich demnach 1.1 n HCl in Eisessig als brauchbares Reagenz, was jedoch einen Disulfidaustausch an der S-Äthylmercaptogruppe von ca. 10% nicht ausschliesst und die nachträgliche Abtrennung des gebildeten Cystinderivates erfordert.

Durch Zugabe eines 10- bis 20-fachen Überschusses

¹ Abkürzungen nach den Regeln der IUPAC-IUB-Commission on Biochemical Nomenclature; *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **348**, 256 (1967); *J. Biol. Chem.* **247**, 977 (1972); ferner bedeutet: TFE = Trifluoressigsäure, DCC = Dicyclohexylcarbodiimid, HOBT = 1-Hydroxybenzotriazol, HMPT = Hexamethylphosphorsäuretriamid.

Tabelle 1. Acidolyseraten bei Boc-Cys(SEt)-Gly-OBu[†](20°C)

Reagenz	Min.	Raten (%) [‡]		
		Boc	OBu [†]	S-Et
TFA	30	100	100	25
1.1 n HCl/HOAc	60	100	100	10
4 n HCl/Dioxan	30	100	50	3
4 n HCl/Dioxan	30	100	—	61
4 n HCl/Dioxan	60	100	—	61
3.6 n HCl/Essigester	30	100	70	25

[†]Relative Standardabweichung 25%.[‡]Für Boc-Leu-Cys(SEt)-Gly-OH.

Tabelle 2. Disulfidaustausch der SEt-Gruppe bei Boc-Leu-Cys(SEt)-Gly-OH (4 n HCl/Dioxan, 30 Min., 20°C)

C ₂ H ₅ SH-Zusatz (molarer Überschuss bei 0.2 m Peptidkonzentration)	Rate [†] (%)
0	6
5	5
10	2
20	1

[†]Relative Standardabweichung 25%.Tabelle 3. Spaltungsraten der N^{trt}-Trt-Gruppe bei Boc-His(Trt)-OMe und Boc-Asn-Gln-His(Trt)-OMe (20°C)

Reagenz	Std.	Rate [†] (%)
4 n HCl/Dioxan	0.5	1
4 n HCl/Dioxan	1	3
4 n HCl/Dioxan	3	4
3.6 n HCl/Essigester	0.5	3
3.6 n HCl/Essigester	1	5
3.6 n HCl/Essigester	3	7

[†]Relative Standardabweichung 25%.

von Äthylmercaptan kann diese Austauschreaktion aber praktisch vollständig unterbunden werden. Die auf der Tripeptidstufe notwendige Deblockierung allein der N^{trt}-Funktion lässt sich entsprechend Tabelle 1 bezüglich der S-Et-Gruppe noch schonender mit 4 n HCl/Dioxan ausführen. Nach Tabelle 2 drängen auch hier steigende Zusätze von Äthylmercaptan die Spaltung der Thiol-Schutzgruppe weiter zurück.

Die Übertragung der Acidolysebedingungen von Tabelle 1 auf die N^{trt}-Deblockierungsschritte im Teilstück 3-5 Boc-Asn-Gln-His(Trt)-OMe zeigte, dass 4 n HCl/Dioxan auch für die N^{trt}-Tritylgruppe das schonendste Reagenz ist. Demgegenüber lassen sich mit 3.6 n HCl/Essigester (Tabelle 3) sowie entgegen unseren früheren am N^{trt}-Boc-N^{trt}-Tritylhistidin ermittelten Daten¹² auch bei längerer Einwirkung von 1 n HCl/Eisessig deutlich erhöhte Spaltungsraten der N^{trt}-Tritylgruppe nachweisen.

Unter Berücksichtigung dieser Messwerte führten wir den Aufbau des Oktapeptid-Derivates auf folgendem Wege aus: S-Äthylmercaptocysteinyl-glycin wurde mit Boc-Leucin gekuppelt, wobei sich die N-Hydroxysuccinimid-Methode als besonders vorteilhaft erwies. Die Peptidsäure wurde mit 4 n HCl/Dioxan/C₂H₅SH von der N^{trt}-Boc-Gruppe befreit (Sequenzabschnitt 6-8). Zur

Darstellung des Teilstückes 3-5 wurde von N^{trt}-Trityl-Histidin-methylester⁹ ausgegangen, welcher schrittweise mit Boc-Gln-OH und Boc-Asn-OH ebenfalls unter Anwendung von 4 n HCl/Dioxan als Deblockierungsreagens weiterverlängert wurde. Da die Aktivestermethoden in beiden Knüpfungsschritten vermutlich infolge sterischer Hinderung der N^{trt}-Trt-Gruppe versagten, musste zu anderen Methoden der Carboxylaktivierung übergegangen werden. Gute Kupplungsausbeuten lieferte hier das DCC-HOBT-Verfahren, welches ebenfalls frei von Dehydratisierungseffekten an ω-Amidbindungen ist.^{19,20}

Ein sehr geeigneter Weg ist auch der Aufbau dieses Sequenzabschnittes in zunächst N^{trt}-freier Form als Boc-Asn-Gln-His-OMe aus Histidinmethylester nach der Nitrophenylestermethode und anschließende Tritylierung der N^{trt}-Funktion mittels Tritylchlorid in HMPT.

Da die Weiterverlängerung dieses Teilstückes (3-5) mit Z-Phe-Val (1-2) durch Azidaktivierung am Valin wenig vorteilhaft erschien,²¹ wurde auch für diesen Schritt die praktisch racemisierungsfreie²² DCC/HOBT-Methode herangezogen und so nach anschließender Kieselgelchromatographie der Z-Pentapeptidmethylester rein erhalten. Versuche, diesen nach Überführung in das Hydrazid durch die Azidmethode^{23,24} mit dem Teilfragment H-Leu-Cys(SEt)-Gly-OH (6-8) zu kondensieren, blieben ohne präparativ verwertbare Ergebnisse und führten lediglich zu Curtius-Abbauprodukten des Z-Pentapeptidazids. Ähnliche Schwierigkeiten bei der Herstellung der offenbar sterisch gehinderten Bindung zwischen C-terminalen N^{trt}-Trityl-histidin und Leucin durch Azidkupplung beobachteten wir auch in der Position B 10-11.²⁵ Deshalb wurde der Z-Pentapeptidester zunächst verseift, was in Gegenwart der ω-Amidbindungen schonend ausgeführt werden muss und praktisch quantitativ mit 0.2 n Ba(OH)₂ in 1 h erreicht wird. Die so erhaltene Z-Pentapeptidsäure liess sich dann mit dem Tripeptidderivat 6-8 durch die DCC/HOBT-Methode zum Oktapeptidderivat kondensieren, das nach erfolgter Reinigung durch Chromatographie an Sephadex LH 20 in chromatographisch reiner Form anfiel.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die I_{al}_{1,2}-Werte wurden mit einer Genauigkeit von ±0.5°, die I_{al}_{1,3}- und I_{al}_{1,4}-Werte mit einer Genauigkeit von ±0.01° bestimmt. Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Kieselgel G der Fa. Merck (K) sowie auf Silufol (Kavalier-CSSR) (S).

Als Laufmittelsysteme wurden verwendet: Aceton/Benzol (50:80) (A); n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) (B); Chloroform/Methanol (9:1) (C); sek. Butanol/Ameisensäure/Wasser (75:15:10) (D); n-Heptan/tert. Butanol/Eisessig (3:2:1) (E); Chloroform/Methanol (2:1) (F); Äthanol/Wasser/Benzol/Eisessig (40:20:10:5) (G).

1. H-Leu-Cys(SEt)-Gly-OH

Boc-Cys(SEt)-Gly-OH. 2.81 g (10 mMol) Boc-Cys(SEt)-OH (Schmp. 71°C)^{16,26} und 1.67 g (10 mMol) Gly-OBu[†]HCl (Schmp. 136-138°C)²⁷ werden in 35 ml CH₂Cl₂ bei -10°C gelöst, mit 1.1 ml (10 mMol) N-Methylmorpholin versetzt und 15 Min. bei 10°C gerührt. In 5 ml CH₂Cl₂ werden 2.26 g (11 mMol) DCC gelöst und zugegeben. Es wird 2 h bei -10°C, 3 h bei 0°C gerührt, über Nacht bei Raumtemp. stehengelassen, der Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und die gelbe Lösung bei 15 Torr eingengt. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen, 8× mit Citronensäurelösung (pH 3), 8× mit Bicarbonatlösung (pH 8) und mit Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und bei 0.1 Torr eingengt. Es erfolgt eine Reinigung durch Säulenchromatographie [Säule: 40×25 cm; Kieselgel 0.2-0.5 mm; Aktivitätsstufe 2; Elutionsmittel: Aceton/Benzol (50:80)]. Das geschützte Dipeptidderivat, Boc-Cys(SEt)-Gly-OBu[†], kristallisiert bei 0°C unter n-Hexan.

Ausbeute: 3,38 g (85,6% d. Th.); Schmp. 52–55°C; $[\alpha]_D^{20} = -76,3^\circ$ ($c = 1,0$ in Methanol); $R_f = 0,75$ (A), $R_f = 0,61$ (B), (Kieselgel); $R_f = 0,66$ (A) $R_f = 0,72$ (B), (Silufol); Ellmann negativ; (Gef. C, 48,72; H, 7,79; N, 7,06; S, 16,21. $C_{42}H_{68}N_{10}O_{15}S_2$ (394,2) erfordert C, 48,75; H, 7,62; N, 7,11; S, 16,24%).

Zur Abspaltung der N^α -Schutzgruppe und der Carboxylschutzfunktion versetzt man 1,97 g (5 mMol) Boc-Cys(SeEt)-Gly-OBu⁺ mit 7,35 ml (100 mMol) Äthylmercaptan und 25 ml 11 n HCl/Eisessig. Nach 60 Min. wird *i.Vak.* bei 15 Torr eingengt, das Peptidhydrochlorid mit Äther gefällt, abfiltriert, mehrere Male mit Äther gewaschen und *i.Vak.* bei 0,1 Torr über KOH getrocknet. $R_f = 0,51$ (B); $R_f = 0,68$ (G), (Silufol).

Boc-Leu-Cys(SeEt)-Gly-OH, 1,38 g (5 mMol) HCl \times Cys(SeEt)-Gly-OH werden mit 1,1 ml (10 mMol) N-Methylmorpholin versetzt und mit 1,67 g (5,6 mMol) Boc-Leu-OSu (Schmp. 112–114°C)²⁸ in 25 ml DMF zunächst bei 0°C (2 h), dann bei Raumtemp. (8 h) unter Rühren umgesetzt.

Das Reaktionsgemisch wird *i.Vak.* bei 0,1 Torr eingengt, in Essigester aufgenommen, mit Citronensäurelösung (pH 3) und Bicarbonatlösung (pH 8) gewaschen, die Bicarbonatlösung auf pH 2–3 angesäuert und mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden über $MgSO_4$ getrocknet, abfiltriert und *i.Vak.* bei 15 Torr eingengt. Die geschützte Tripeptidsäure kristallisiert aus Essigester-Äther-Petroläther. Ausbeute: 1,58 g (70,5% d. Th.); Schmp. 136–138°C; $[\alpha]_D^{20} = -106,0^\circ$ ($c = 1,0$ in Methanol); $R_f = 0,87$ (D) $R_f = 0,68$ (E), (Kieselgel); $R_f = 0,75$ (D), $R_f = 0,62$ (E), (Silufol); Ellmann negativ; (Gef. C, 47,13; H, 7,29; N, 8,87; S, 13,83. $C_{42}H_{68}N_{10}O_{15}(1/2H_2O)$ (460,34) erfordert C, 47,00; H, 7,38; N, 9,14; S, 13,95%).

H-Leu-Cys(SeEt)-Gly-OH. Zur N-Deblockierung versetzt man 135,0 mg (0,3 mMol) Boc-Leu-Cys(SeEt)-Gly-OH mit 0,44 ml (6 mMol) Äthylmercaptan und 1,06 ml 4,0 n HCl/Dioxan. Nach 30 Min. wird mit abs. Äther versetzt, der Niederschlag abfiltriert, mit Äther gewaschen und *i.Vak.* bei 0,1 Torr über KOH getrocknet. $R_f = 0,62$ (D) $R_f = 0,18$ (E), (Silufol); (Gef. C, 39,42; H, 6,77; N, 10,32; S, 16,07; $C_{42}H_{68}N_{10}O_{15}(1/2H_2O)$ (396,70) erfordert C, 39,37; H, 6,86; N, 10,58; S, 16,17%).

2. Boc-Asn-Gln-His(Trt)-OMe aus His(Trt)-OMe

Boc-Gln-His(Trt)-OMe, 2,24 g (5 mMol) N^α -Trt-His-OMe \times HCl (Schmp. 145–146°C)²⁹ werden in 20 ml $CHCl_3$ suspendiert, mit 1 n NH_3 und H_2O gewaschen, getrocknet, in 5 ml DMF übergeführt, sowie 1,23 g (5 mMol) Boc-Gln-OH (Schmp. 116–118°C)^{30,31} und 1,35 g (10 mMol) HOBt hinzugefügt. Bei 20°C werden 1,13 g (5,5 mMol) DCC in 1 ml DMF zugegeben, das Reaktionsgemisch über Nacht bei 4°C stehengelassen und 8 h bei Raumtemp. geschüttelt. Die Lösung wird *i.Vak.* bei 0,1 Torr eingengt, der Rückstand in Essigester aufgenommen, vom gebildeten Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, mit 5%iger $KHSO_4$ -Lösung, $NaHCO_3$ -Lösung und mit Wasser gewaschen. Geringe Mengen des in die $KHSO_4$ -Phase eingetretenen Dipeptidderivates wurden nach Einstellen auf pH 8 mit Essigester extrahiert, die vereinigten Essigesterphasen über $MgSO_4$ getrocknet, *i.Vak.* bei 15 Torr eingengt und aus Essigester-Äther-Petroläther kristallisiert. Ausbeute: 1,48 g (40% d. Th.); Schmp. 93–97°C; $[\alpha]_D^{20} = -4,3^\circ$ ($c = 1,0$ in DMF); $R_f = 0,60$ (D) (Kieselgel) $R_f = 0,60$ (B) $R_f = 0,50$ (D), (Silufol), Pauly negativ; (Gef. C, 67,24; H, 6,52; N, 10,70. $C_{40}H_{64}O_{12}N_4$ (639,30) erfordert C, 67,55; H, 6,42; N, 10,95%).

Zur N-Deblockierung werden 0,64 g (1,0 mMol) Boc-Gln-His(Trt)-OMe in 3 ml 4 n HCl/Dioxan bei Raumtemp. gelöst und nach 30 Min. das Peptidhydrochlorid mit eiskaltem wasserfreiem Äther gefällt, mit Äther gewaschen und *i.Vak.* bei 0,1 Torr über KOH getrocknet. $R_f = 0,25$ (D); Pauly negativ.

Boc-Asn-Gln-His(Trt)-OMe, 0,575 g (1 mMol) HCl \times Gln-His(Trt)-OMe werden in 10 ml $CHCl_3$ suspendiert, mit 1 n NH_3 und H_2O gewaschen, getrocknet, in 30 ml DMF übergeführt, 0,23 g (1 mMol) Boc-Asn-OH (Schmp. 172–173°C)³² sowie 0,27 g (2 mMol) HOBt zugegeben und bei 20°C mit 0,226 g (1,1 mMol) DCC in 1 ml DMF versetzt. Man lässt 5 h bei 0°C, dann einen Tag bei Raumtemp. stehen, engt die Lösung *i.Vak.* bei 0,1 Torr ein, nimmt das resultierende Öl in Essigester auf, filtriert vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, engt erneut *i.Vak.* bei 15 Torr ein und fällt das Peptid mit Äther aus. Die Umkristallisation

erfolgt aus Essigester-Äther-Petroläther. Das erhaltene Produkt wird an einer Kieselgelsäule (50 \times 25 cm) chromatographiert; Elutionsmittel: Chloroform/Methanol (2:1). Ausbeute: 452,0 mg (60,0% d. Th.); Schmp. 115–120°C; $[\alpha]_D^{20} = -4,7^\circ$ ($c = 1,0$ in DMF); $R_f = 0,56$ (D), (Kieselgel) $R_f = 0,62$ (F), (Silufol); Pauly negativ; (Gef. N, 12,66. $C_{40}H_{64}O_{12}N_4(2H_2O)$ (789,32) erfordert N, 12,42%).

3. Boc-Asn-Gln-His(Trt)-OMe aus His-OMe

Boc-Gln-His-OMe, 4,84 g (20 mMol) His-OMe \times 2 HCl (Schmp. 201–204°C)³³ werden in 50 ml $CHCl_3$ suspendiert, der Ester mit 4,4 ml (40 mMol) N-Methylmorpholin freigesetzt, mit 7,3 g (20 mMol) Boc-Gln-ONp (Schmp. 138–143°C)³⁴ versetzt und 3 Tage bei Raumtemp. stehengelassen. Die Reaktionslösung wird *i.Vak.* bei 15 Torr eingengt, der feste Rückstand 3 \times mit Essigester ausgekocht und *i.Vak.* bei 15 Torr über P_2O_5 /KOH getrocknet. Zweimaliges Umfällen aus Äthanol-Äther-Petroläther liefert das chromatographisch einheitliche Dipeptidderivat. Ausbeute: 6,94 g (87,5% d. Th.); Schmp. 155–158°C (135–138°C³⁵, 161–162°C³⁶); $[\alpha]_D^{20} = -4,9^\circ$ ($c = 1,0$ in Methanol), $[\alpha]_D^{20} = -5,8^\circ$ ($c = 1,0$ in Methanol); $R_f = 0,35$ (B), (Kieselgel); Pauly positiv; (Gef. C, 51,42; H, 6,84; N, 17,45. $C_{41}H_{67}O_{12}N_4$ (397,11) erfordert C, 51,40; H, 6,81; N, 17,63%).

H-Gln-His-OMe. Zur N-Deblockierung werden 4,0 g (10 mMol) Boc-Gln-His-OMe in 4 n HCl/Dioxan gelöst und nach 30 Min. mit wasserfreiem Äther gefällt, abgesaugt, mit Äther gewaschen und über KOH *i.Vak.* bei 0,1 Torr getrocknet.

Boc-Asn-Gln-His-OMe, 4,1 g (10 mMol) 2 HCl \times Gln-His-OMe werden in 40 ml DMF gelöst, der Ester mit 20 mMol N-Methylmorpholin freigesetzt und mit 7,08 g Boc-Asn-ONp (Schmp. 148–150°C)³⁷ umgesetzt. Das Reaktionsgemisch wird nach 3 Tagen *i.Vak.* bei 0,1 Torr eingengt, der feste Rückstand 3 \times mit Essigester ausgekocht und *i.Vak.* bei 15 Torr über P_2O_5 /KOH getrocknet. Zweimaliges Umkristallisieren aus Äthanol-Essigester liefert das chromatographisch einheitliche Peptidderivat. Ausbeute: 3,27 g (64,0% d. Th.); Schmp. 165–168°C (147–149°C)³⁸; $[\alpha]_D^{20} = 22,5^\circ$ ($c = 1,0$ in Methanol); $R_f = 0,30$ (D), (Kieselgel) $R_f = 0,30$ (F), (Silufol); Pauly positiv; (Gef. C, 43,20; H, 7,10; N, 17,13. $C_{41}H_{67}O_{12}N_4(4H_2O)$ (583,13) erfordert C, 43,25; H, 7,04; N, 16,80%).

Boc-Asn-Gln-His(Trt)-OMe, 1,22 g (2 mMol) Boc-Asn-Gln-His-OMe werden in 12 ml HMPT bei 10°C gelöst und mit 1,67 g (6 mMol) frisch umkristallisiertem Triphenylmethylchlorid (Schmp. 109–110°C) und mit 0,84 ml (6 mMol) Et₃N unter Rühren umgesetzt. Man lässt zunächst bei 0°C stehen (2 h) und schüttelt dann 2 Tage bei Raumtemp. Das Reaktionsprodukt wird mit 200 ml kaltem Äther-Petroläther-Gemisch (1:1) gefällt, mit Essigester intensiv extrahiert, über $MgSO_4$ getrocknet, *i.Vak.* bei 15 Torr eingengt und durch Digerieren mit abs. Äther kristallisiert. Das Produkt wird aus Essigester-Äther umkristallisiert. Ausbeute: 1,06 g (70,2% d. Th.); Schmp. 119–122°C; $[\alpha]_D^{20} = -5,2^\circ$ ($c = 1,0$ in DMF); $R_f = 0,56$ (D), (Kieselgel) $R_f = 0,62$ (F), (Silufol); Pauly negativ; (Gef. C, 60,80; H, 6,53; N, 12,40. $C_{40}H_{64}O_{12}N_4(2H_2O)$ (789,32) erfordert C, 60,77; H, 6,47; N, 12,42%).

H-Asn-Gln-His(Trt)-OMe. Zur N-Deblockierung werden 376,6 mg (0,5 mMol) Boc-Asn-Gln-His(Trt)-OMe in 3 ml 4,0 n HCl/Dioxan gelöst und 30 Min. bei Raumtemp. stehengelassen, mit kaltem Äther das Estersalz gefällt, abfiltriert, mit Äther gewaschen und über KOH *i.Vak.* bei 0,1 Torr getrocknet. $R_f = 0,20$ (F) $R_f = 0,10$ (C), (Silufol).

4. Z-Phe-Val-OH

Nach der DCC-Methode in 81,5%iger Ausbeute hergestellter Z-Phe-Val-OMe [Schmp. 110–113°C, (111–113°C)³⁹; $[\alpha]_D^{20} = -10,1^\circ$ ($c = 1,0$ in DMF)], $[\alpha]_D^{20} = 8,9^\circ$ ($c = 1,0$ in DMF)⁴⁰ wurde in Dioxan/Wasser mit 1 n NaOH in 1 h zur Dipeptidsäure Z-Phe-Val-OH [Schmp. 144–145°C, $[\alpha]_D^{20} = 6,3^\circ$ ($c = 2,0$ in Methanol)] verseift.

5. Z-Phe-Val-Asn-Gln-His(Trt)-OMe

344,9 mg (0,5 mMol) HCl \times Asn-Gln-His(Trt)-OMe werden in 10 ml $CHCl_3$ suspendiert, mit 1 n NH_3 und H_2O gewaschen, getrocknet, in 2 ml DMF übergeführt und bei 20°C mit 398,4 mg

(1.0 mMol) Z-Phe-Val-OH, 135 mg (1.0 mMol) HOBT sowie mit 204 mg (1.0 mMol) DCC in 2 ml vorgekühltem DMF versetzt. Man lässt über Nacht bei 0°C stehen und rührt einen Tag bei Raumtemp. Nach dem Abfiltrieren des gebildeten Dicyclohexylharnstoffes engt man i. Vak. bei 0.1 Torr ein und fällt das Produkt mit abs. Äther aus. Ausbeute: 312 mg (60.5% d. Th.); Schmp. 210–220°C. Zur Reinigung chromatographiert man an Kieselgel (0.2–0.5 mm) (Säule: 80 × 2.5 cm) mit Chloroform, dem 15% Methanol zugesetzt sind. Schmp. 222–224°C; $[\alpha]_D^{20} = -21.5^\circ$ ($c = 1.0$ in DMF); $R_f = 0.56$ (D), (Kieselgel) $R_f = 0.66$ (A); $R_f = 0.75$ (F), (Silufol); Pauly negativ; (Gef. N, 12.25; C, $H_{16}N_2O_{10}$ (1033.47) erfordert N, 12.20%; Aminosäureanalyse: Phe (0.97); Val (0.97); Asn (1.0); Gln (1.03); His (0.95).

6. Z-Phe-Val-Asn-Gln-His(Trt)-N₂H₂

516.0 mg (0.5 mMol) Z-Phe-Val-Asn-Gln-His(Trt)-OMe werden in 10 ml DMF gelöst, dazu 2.0 ml Hydrazinhydrat gegeben und 3 Tage bei Raumtemp. stehengelassen. Durch Zugabe von Äther wird das Hydrazid gefällt, abfiltriert, mit Äther und kaltem Methanol gewaschen und i. Vak. bei 0.1 Torr über KOH/P₂O₅ getrocknet. Ausbeute: 350 mg (72.0% d. Th.); Schmp. 217–219°C; $[\alpha]_D^{20} = -3.8^\circ$ ($c = 1.0$ in DMF); $R_f = 0.40$ (D), (Kieselgel) $R_f = 0.35$ (D), (Silufol); Pauly negativ; (Gef. N, 14.20; C, $H_{16}N_4O_{11}$ (1033.56) erfordert N, 13.95%).

7. Z-Phe-Val-Asn-Gln-His(Trt)-OH

516.7 mg (0.5 mMol) Z-Phe-Val-Asn-Gln-His(Trt)-OMe werden in 5 ml Methanol/Wasser (3:2) bei 30°C gelöst, auf 10°C abgekühlt, mit 4.5 ml 0.22 n Ba(OH)₂ versetzt und 1 h bei Raumtemp. stehengelassen. Man neutralisiert mit 4.5 ml 0.22 n H₂SO₄, filtriert vom ausgefallenen BaSO₄ ab, wäscht intensiv mit Methanol und Wasser, engt das Filtrat i. Vak. bei 1 Torr ein und trocknet bei 0.1 Torr über KOH/P₂O₅. Ausbeute: 437 mg (86.1% d. Th.); Schmp. 236–238°C; $[\alpha]_D^{20} = -10.5^\circ$ ($c = 0.5$ in DMF); $R_f = 0.45$ (D), (Kieselgel) $R_f = 0.56$ (A), (Silufol). Pauly negativ; (Gef. C, 65.90; H, 6.57; N, 12.68; C, $H_{16}N_4O_{10}$ (1019.46) erfordert C, 65.90; H, 6.57; N, 12.37%).

8. Z-Phe-Val-Asn-Gln-His(Trt)-Leu-Cys(SET)-Gly-OH

102.0 mg (0.1 mMol) Z-Phe-Val-Asn-Gln-His(Trt)-OH werden in 1.0 ml DMF gelöst, auf 20°C gekühlt, 20.2 mg (0.15 mMol) HOBT und 20.4 mg (0.1 mMol) DCC in 1.0 ml DMF zugegeben und 3 h bei -5°C bis 0°C gehalten. Das Reaktionsgemisch wird erneut auf -20°C gekühlt und mit einer Lösung von 77.54 mg (0.2 mMol) HCl × Leu-Cys(SET)-Gly-OH und 0.22 ml (0.2 mMol) N-Methylmorpholin in 1.0 ml DMF versetzt. Man lässt die Temperatur auf 0°C ansteigen, rührt 2 Tage bei Raumtemp., zentrifugiert den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und fällt mit abs. Äther ein Rohprodukt, das zur Reinigung an Sephadex LH-20 (Säule 2.5 × 100 cm) mit Methanol chromatographiert wird. Die geschützte Oktapeptidsäure wird aus Methanol/Äther gefällt und i. Vak. bei 0.1 Torr über P₂O₅ getrocknet. Ausbeute: 70.7 mg (52.2% d. Th.); Schmp. 208–212°C; $[\alpha]_D^{20} = -13.6^\circ$ ($c = 0.5$ in DMF); $R_f = 0.73$ (B), $R_f = 0.69$ (C), $R_f = 0.62$ (F), (Kieselgel); Pauly negativ; (Gef. C, 61.40; H, 6.13; N, 12.03; C, $H_{24}O_{11}N_7S_2$ (1352.82) erfordert C, 61.20; H, 6.21; N, 12.42%). Aminosäureanalyse: Phe (0.95); Val (1.04); Asn (1.02); Gln (1.09); His (1.07); Leu (1.01); Cys (0.98); Gly (1.00). Die Papierelek-

trophorese an Filtrak-Papier FN 4 in Pyridin: 0.5 n Ammoniak:Wasser (700:100:200)-Puffer ergab bei 100 V/cm in 2 h eine einheitliche, anodisch wandernde Bande

LITERATUR

- ¹Zusammenfassung K. Lübke und H. Klostermeyer, *Adv. Enzymol.* **33**, 445 (1970).
- ²P. G. Katsoyannis, *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 5862 (1971).
- ³G. P. Schwartz und P. G. Katsoyannis, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 2894 (1973).
- ⁴H. R. Bosshard, *Helv. Chim. Acta* **54**, 951 (1971).
- ⁵M. I. Titov und S. A. Adremsova, *Zh. Obshch. Khim.* **41**, 1403 (1971).
- ⁶K. Hammerström, W. Lunkenheimer und H. Zahn, *Makromol. Chem.* **133**, 41 (1970).
- ⁷P. Sieber, B. Kamber, A. Hartmann, A. Jöhl, B. Riniker und W. Rittel, *Helv. Chim. Acta* **57**, 2617 (1974).
- ⁸I. Photoki, *The Chemistry of Polypeptides*, S. 59. Plenum, New York (1974).
- ⁹G. C. Stelakatos, D. M. Theodoropoulos und L. Zervas, *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 2884 (1959).
- ¹⁰H. Rink und B. Riniker, *Helv. Chim. Acta* **57**, 831 (1974).
- ¹¹G. Losse und U. Krychowski, *J. Prakt. Chem.* **312**, 1097 (1970).
- ¹²G. Losse und U. Krychowski, *Tetrahedron Letters* 4121 (1971).
- ¹³G. Losse und G. Müller, *Chem. Ber.* **94**, 2768 (1961).
- ¹⁴R. A. Boissonnas, St. Gutmann, R. L. Huguenin, P. A. Jaquenoud und E. Sandrin, *Helv. Chim. Acta* **41**, 1867 (1958).
- ¹⁵N. Inukai, K. Nakano und M. Murakami, *Bull. Chem. Soc. Jap.* **40**, 2913 (1967).
- ¹⁶U. Weber, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **350**, 1421 (1969).
- ¹⁷U. Weber, K. Herzog, H. Grossmann, S. Hörnle und G. Weitzel, *Ibid.* **350**, 1425 (1969).
- ¹⁸G. Berndsen, Dissertation, TU Dresden (1969).
- ¹⁹W. König und R. Geiger, *Chem. Ber.* **103**, 788 (1970).
- ²⁰C. Ressler und H. Ratzkin, *J. Org. Chem.* **26**, 3356 (1961).
- ²¹H. Klostermeyer, Dissertation Techn. Hochschule Aachen (1964).
- ²²D. S. Kemp, M. Frangle und K. Trangle, *Tetrahedron Letters* 2695 (1974).
- ²³J. Honzl und J. Rudinger, *Collect. Czech. Chem. Comm.* **26**, 2333 (1961).
- ²⁴Y. S. Klausner und M. Bodansky, *Synthesis* 549 (1974).
- ²⁵G. Losse und K.-J. Schumacher, *Tetrahedron* **33**, 1817 (1977).
- ²⁶M. Nicolaus, Diplomarbeit, TU Dresden (1969).
- ²⁷E. Taschner, C. Wasielewski und J. F. Biernat, *Liebigs Ann. Chem.* **646**, 119 (1961).
- ²⁸G. W. Anderson und J. E. Zimmer, *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1839 (1964).
- ²⁹L. Zervas und N. Theodoropoulos, *Ibid.* **78**, 1359 (1956).
- ³⁰E. Schnabel, *Liebigs Ann. Chem.* **702**, 188 (1967).
- ³¹K. Hoffmann und G. Zanetti, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 620 (1965).
- ³²H. Pauly, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **43**, 568 (1904).
- ³³H. Zahn, G. Danho und R. Gutte, *Z. Naturforsch.* **21b**, 763 (1966).
- ³⁴J. Dahlmans, Dissertation, TH Aachen (1968).
- ³⁵F. Marchiori, R. Rocchi, G. Vidali, A. Tamburro und E. Scoffone, *J. Chem. Soc.* **81** (1967).
- ³⁶E. Sandrin, *Helv. Chim. Acta* **46**, 1637 (1963).