

worden. Prinzipiell läßt sich die Verbindung sowohl vom C-terminalen als auch vom N-terminalen Ende her synthetisieren. Frühere Arbeiten [3] und Untersuchungen mit nicht radioaktiven Ausgangsverbindungen hatten ergeben, daß bei der Synthese vom C-terminalen Ende her bei den einzelnen Kupplungsschritten größere Ausbeuteverluste auftreten. Unter Verwendung der N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid- oder der gemischten Anhydridmethode erzielten wir Ausbeuten von 26%, bezogen auf die eingesetzte radioaktiv markierte Aminosäure. Günstiger verlief die Synthese vom N-terminalen Ende her. Als Aminoschutzgruppe verwendeten wir den tert-Butyloxycarbonylrest (Boc-) und als Carboxylschutzgruppe den Methyl ester. Alle Kupplungsschritte wurden nach der Methode der gemischten Anhydride mit Chlorameisensäureisobutylester durchgeführt. Die Ausbeute an Ala-(Leu-1-¹⁴C)-Pro bezogen auf eingesetztes Leucin-1-¹⁴C betrug 47%.

Experimentelles

Massenspektren wurden mit dem Molekül-Massenspektrographen des Forschungsinstitutes M. v. Ardenne, Dresden, aufgenommen. Für die Dünnschichtchromatographie (DC) verwendeten wir Kieselgel PF₂₅₄ Merck.

Laufmittelsystem (LM) A: Methyl ethyl keton : Pyridin : Eisessig : Wasser (73:5:2:20); B: Benzen : Ethanol (9:1); C: Chloroform : Ethanol (95:5); D: n-Propanol : Wasser (7:3).

Boc-L-alanyl-(L-leucyl-1-¹⁴C)-methyl ester (I): 3 mmol Boc-L-alanin wurden in 30 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran (THF) gelöst und nach Zusatz von 0,42 ml Triethylamin bei -15°C mit 0,39 ml Chlorameisensäureisobutylester zum gemischten Anhydrid umgesetzt. Man rührte bei -15°C 8 min und gab anschließend 2,5 mmol (L-Leucin-1-¹⁴C)-methyl ester. HCl (3,7 · 10¹⁰ Bq) und 0,35 ml Triethylamin hinzu. Es wurde weiter bei -15°C 1 Stunde gerührt und eine Stunde bei Zimmertemperatur. Nach Einengen im Vakuum wurde der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen und nacheinander je dreimal mit 10%iger Citronensäurelösung, Wasser und NaHCO₃-Lösung und erneut mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde im Vakuum abdestilliert und I als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 780 mg (98% d.Th.); DC: R_F 0,35 (B);

0,86 (C); [α]_D²⁵ - 44,5°C (c = 1, Ethanol)

MS (m/e): 317 (M + 1), 316, 260, 246, 230, 214, 201, 186, 170, 158, 144, 130.

Boc-L-alanyl-(L-leucin-1-¹⁴C) (II): 780 mg I wurden in 30 ml Methanol gelöst. Nach Zugabe von 3 ml 2N NaOH und 10 ml Wasser rührte man 4 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurde mit 30 ml H₂O verdünnt und mehrfach mit je 30 ml Essigsäureethylester ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wurde nun mit Citronensäure angesäuert (pH 3) und erneut erschöpfend mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organische Phase wurde mit H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und nach Einengen Boc-Ala-(Leu-1-¹⁴C) als weißes amorphes Pulver erhalten.

Ausbeute: 675 mg (90% d.Th.); DC: R_F 0,15 (B);

0,8 (D); [α]_D²⁵ - 36,9°C (c = 1, Ethanol)

MS (m/e): 303 (M + 1), 302, 285, 257, 246, 229, 211, 202, 183, 160, 144, 130.

Boc-L-alanyl-(L-leucyl-1-¹⁴C)-L-prolinmethyl ester (III): 675 mg (2,24 mmol) II wurden in 30 ml THF gelöst. Nach Zugabe von 0,31 ml Triethylamin wurde auf -15°C abgekühlt und 0,29 ml Chlorameisensäureisobutylester zugegeben. Nach Rühren (10 min) fügte man 412 mg L-Prolinmethyl ester · HCl und 0,35 ml Triethylamin in 20 ml THF hinzu. Die weitere Aufarbeitung wurde wie bei I durchgeführt. III wurde als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 780 mg (84% d.Th.); DC: R_F 0,37 (B);

0,59 (C); [α]_D²⁵ - 88,4°C (c = 2, Ethanol).

MS (m/e): 413 (M⁺), 398, 381, 357, 340, 325, 314, 301, 286, 269, 257, 229, 209, 184, 170, 157, 142, 128.

L-Alanyl-(L-leucyl-1-¹⁴C)-L-prolin · HCl (IV): 780 mg III wurden wie bei II angegeben mit 2 ml 2N Natronlauge verseift. Nach Reinigung wurden 600 mg (80% d.Th.) Boc-Ala-(Leu-1-¹⁴C)-Pro (V) als weißer Schaum erhalten. DC: R_F 0,16 (B); MS (m/e): 399 (M⁺), 382, 355, 343, 326, 311, 299, 287, 255, 229, 201, 170, 144, 124.

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgte durch einstündiges Stehenlassen von Boc-Ala-(Leu-1-¹⁴C)-Pro in 10 ml 1N HCl/Eisessig. Anschließend wurde das Tripeptid-Hydrochlorid mit absol. Ether ausgefällt.

Ausbeute: 400 mg (79% d.Th.); DC: R_F 0,18 (A); [α]_D²⁴ = -69,3°C (c = 1, Ethanol)

Im Scannogramm war nur eine radioaktive Bande nachweisbar.

Literatur

[1] Boguschewski, C.; Unverricht, A.; Schütte, H. R.: Z. Chem. **19** (1979) 375

[2] Gröger, D.: Planta med. [Stuttgart] **28** (1975) 37

[3] Maier, W.; Baumert, A.; Gröger, D.: Biochem. Physiol. Pflanzen **172** (1978) 15

[4] Wünsch, E.: Synthesen von Peptiden in *Houben/Weyl*: Bd. 15 Methoden der organischen Chemie (Herausgeber: Müller, E. Stuttgart, Georg Thieme-Verlag 1974, S. 316

Alfred Baumert und Detlef Gröger, Institut für Biochemie der Pflanzen, Halle, des Forschungszentrums für Molekularbiologie und Medizin der Akademie der Wissenschaften der DDR, 4020 Halle/S., Weinberg 3

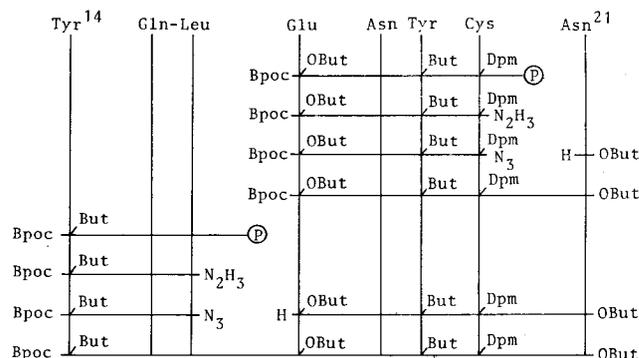
eingegangen am 20. November 1979

ZCM 6570

Synthese der Insulin-A-Kettensequenz A¹⁴⁻²¹ aus an fester Phase dargestellten Fragmenten

Zur Darstellung einer Insulin-A-Kette mit präformiertem 6,11-Di-sulfidring [1] benötigten wir das A-Kettenfragment A 14-21 mit der im Schema 1 angegebenen Schutzgruppenstruktur, für das wir kürzlich eine konventionelle Synthese in Lösung beschrieben [2]. Daneben versuchten wir nun die Vorteile der Festphasenmethode beim Aufbau dieser Sequenz nutzbar zu machen. Allerdings verbietet sich hier eine stufenweise Festphasensynthese, weil einerseits für die Sequenz ein C-terminaler tert-Butylester-Schutz gefordert wird, der bei der Ablösung des Peptides von der Matrix nicht eingeführt werden kann, und andererseits Festphasensynthesen an einem Asparagylträger Schwierigkeiten bereiten [3], [4]. Wolters [4] ging deshalb bei der Festphasensynthese eines ähnlichen Insulin-A-Kettenfragmentes so vor, daß er das Hexapeptid A 14-19 an Träger synthetisierte und dieses dann in Lösung mit dem klassisch dargestellten C-terminalen Dipeptid A 20-21 verlängerte.

Wir wählten den im Schema 1 dargestellten Aufbau aus den durch Festphasensynthesen hergestellten N^α-Bpoc-geschützten Fragmenten A 14-16 und A 17-20, wobei letzteres zunächst mit Asparagin-tert-butylester in Lösung C-terminal zur Sequenz



Schema 1

A 17-21 verlängert und nach der N^α-Deblockierung über eine zweite Azidsynthese zum gewünschten Kettenfragment A 14-21 verknüpft wurde. Dabei sollte die Unterteilung des durch Festphasensynthese dargestellten Sequenzabschnitts A 14-20 in die Fragmente A 14-16 und A 17-20 sicherstellen, daß bei der C-terminalen Verlängerung um eine Aminosäure eine hinreichende Reinigung des geschützten Peptides durch Gelfiltration gewährleistet

wird. Die Wahl der Azidtechnik für die Fragmentverknüpfungen in homogener Phase ergibt sich zwingend, wenn die Fragmente am üblichen Polystyrenharz in benzylesterverankerter Form synthetisiert und durch Hydrazinolyse abgespalten werden. Letzteres vermeidet einen höheren Aufwand zur Darstellung spezieller Ankergruppen am Harz, die zur Festphasensynthese geschützter Fragmente mit C-terminal freien Carboxylgruppen geeignet wären und hat gleichzeitig den Vorteil, daß hydrazinolytische Abspaltungen der Fragmente vom Träger meist mit sehr guten Ausbeuten verlaufen.

Die beiden Festphasensynthesen erfolgten an jeweils 5 g mit Boc-Leu-OH bzw. Boc-Cys(Dpm)-OH veresterter Polystyrenmatrix. Die Beladung betrug 0,3 bzw. 0,5 mmol/g Harz. Zum Aufbau des Fragmentes A 14-16 wurde an das Leucylharz zunächst Boc-Gln-OH und anschließend Bpoc-Glu(OBut)-OH ancondensiert. Analog wurden bei der Synthese von A 17-20 an das S-Diphenylmethyl-cysteinyharz nacheinander die Aminosäurederivate Bpoc-Tyr(But)-OH, Bpoc-Asn-OH und Bpoc-Glu(OBut)-OH geknüpft. Die Kondensationschritte wurden mit jeweils 3 Äquivalenten der Aminosäurederivate unter Verwendung von DCCI in Methylenchlorid vorgenommen. Dabei wurde bei der Anknüpfung von Boc-Gln-OH und Bpoc-Asn-OH zur Vermeidung der Dehydratisierung der Amidfunktionen in Gegenwart äquivalenter Mengen von Hydroxybenzotriazol gearbeitet [4]. Die Deblockierungsschritte erfolgten bei den Boc-geschützten Peptidharzen mit 50%iger TFA in Chloroform und bei den Bpoc-geschützten Peptidharzen mit 1%iger TFA in Chloroform jeweils über 30 Minuten. Die Umsatzkontrolle mit dem Bromkresolpurpur-Farbstoff [5] zeigte auf jeder Stufe bereits nach einmaliger Kupplung ein Ausbleiben der Farbreaktion auf der Harzprobe, was nach unseren Erfahrungen einer Umsatzrate >97% entspricht. Der Syntheszyklus lehnte sich in den übrigen Arbeitsschritten an von uns bereits früher publizierte Schemen an [6].

Durch Hydrazinolyse der N^α-Bpoc-geschützten Peptidharze mit 80%igem Hydrazin in DMF (Raumtemperatur, 24 Stdn.) wurden die geschützten Peptidhydrazide A 14-16 und A 17-20 in 83- bzw. 87%iger Rohausbeute erhalten. Wiederholtes Umfällen aus CHCl₃/Methanol/Petrolether lieferte Bpoc-Tyr(But)-Gln-Leu-N₂H₃, Schmp. 178-181°C, [α]_D²⁵ -11,3° (MeOH) in 70%iger Ausbeute und Bpoc-Glu(OBut)-Asn-Tyr(But)-Cys(Dpm)-N₂H₃, Schmp. 196 bis 198°C, [α]_D²⁵ -35,5° (MeOH) in 57%iger Ausbeute (jeweils bezogen auf die Startaminosäure).

Die Azidkupplung zur C-terminalen Verlängerung des Fragmentes A 17-20 erfolgte mit 4 Äquivalenten Asparagin-tert-butylester nach der *Rudinger-Honzl*-Methode [7] in DMF. Dabei wurde der HCl-Überschuß zur Vermeidung einer partiellen Abspaltung der N^α-Bpoc-Gruppe auf 3 Äquivalente begrenzt. Das Fragment A 17-21, Bpoc-Glu(OBut)-Asn-Tyr(But)-Cys(Dpm)-Asn-OBut [8], wurde nach Kieselgelchromatografie (Chloroform/Methanol 9:1) und Gelfiltration an Sephadex LH 20 (DMF) in 76%iger Ausbeute gewonnen. Schmp. 193°C, [α]_D²⁵ -41,8° (MeOH); Aminosäureanalyse: Glu 1,0(1); Asp 2,05(2); Tyr 0,75 (1).

Schließlich wurde die N^α-Bpoc-Gruppe des Pentapeptides A 17-21 mit 80%iger Essigsäure entfernt und dieses mit dem in der vorstehend genannten Weise hergestellten Azid des Fragmentes A 14-16 zum geschützten Oktapeptid A 14-21, Bpoc-Tyr(But)-Gln-Leu-Glu(OBut)-Asn-Tyr(But)-Cys(Dpm)-Asn-OBut, verknüpft. Die Ausbeute betrug nach gelochromatografischer Reinigung an Sephadex LH 20 in DMF 50%. [α]_D²⁵ -37,0° (MeOH), Aminosäureanalyse: Leu 1,0(1); Asp 2,02(2); Glu 1,85(2); Tyr 1,7(2)

Literatur

- [1] Kaufmann, K.-D.; Kunzek, H.; Dölling, R.; Halatsch, W.-R.; Rose, K.-B.; Neke, E.; Schönherr, Ch.; Bauschke, S.: Proc. 15. Europ. Peptide Symp., Gdansk, 1978
- [2] Kaufmann, K.-D.; Schönherr, Ch.; Jeschke, C.; Bauschke, S.; Kietzer, M.; Dölling, R.: J. prakt. Chem., im Druck
- [3] Marglin, A.: Tetrahedron Letters [London] 1971, 3145
- [4] Wolters, E. T. M.; Tesser, G. I.; Nivard, J. F.: J. org. Chemistry 39 (1974) 3388
- [5] Beyermann, H. C.; Hindricks, H.: Proc. 10. Europ. Peptide Symp., Abano Terme 1969, Amsterdam North-Holland Publ. Comp., 1971, S. 145

[6] Kaufmann, K.-D.; Raddatz, F.: J. prakt. Chem. 320 (1978) 847

[7] Honzl, J.; Rudinger, J.: Collect. czechoslov. chem. Commun. 26 (1961) 2333

[8] Schreier, E.; Hermann, P.: J. prakt. Chem. 318 (1976) 502

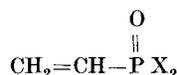
Klaus-Dieter Kaufmann und Sibylle Bauschke, Sektion Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin

eingegangen am 30. Juli 1979

ZCM 6477

Pfropfcopolymerisationen von Vinylphosphonsäurederivaten auf ataktisches Polypropylen

Im Rahmen unserer Untersuchungen zur Modifizierung von ataktischem Polypropylen (at. PP) interessierte die radikalische Pfropfcopolymerisation von Vinylphosphonsäure (Ia), Vinylphosphonsäure-dichlorid (Ib), Vinylphosphonsäure-diethylester (Id) auf at. PP als Rückgratpolymeres. Vgl. [1]-[3].



X = OH (Ia); Cl (Ib); OC₂H₅ (Ic); OSi(CH₃)₃ (Id)

Da die Pfropfeffektivität für ein gegebenes Polymer-Monomer-System in homogener Phase am größten ist [4], wurden die Pfropfreaktionen in Lösung mit Dibenzoylperoxid als Initiator durchgeführt.

Tabelle 1 Pfropfcopolymerisation von Vinylphosphonsäurederivaten auf at. PP^{a)}

[Monomer] in mol · l ⁻¹	Lösungs- mittel	[BPO] ^{b)} in Masse-%	t in h	P-Gehalt ^{c)} in Masse-%	PG ^{d)} in %
Ia 0,555	Benzen/DMF (10:1 v/v)	5	8,5	8,8	44,2
Ib 0,690	THF	2	100	0,8	4,2
0,942	Benzen/DMF (10:1 v/v)	5	20	3,3	18,3
1,036	Benzen/DMF (10:1 v/v)	10	8,5	3,9	22,7
Ic 0,488	Benzen	2	20	1,0	5,6
Id 0,488	Benzen	2	20	1,0	8,8

a) [at. PP] = 1,08 mol · l⁻¹; T = 80°C

b) Dibenzoylperoxid, bezogen auf das Monomer

c) bestimmt nach [5]

d) Pfropfgrad (%) = $\frac{\text{Gewicht des gepfropften Monomeren}}{\text{Gewicht des Rückgratpolymeren}} \cdot 100\%$

Tabelle 2 Abhängigkeit des Pfropfgrades von den Reaktionsbedingungen bei der Pfropfung von Vinylphosphonsäure-dichlorid auf at. PP^{a)}

[Ib] in mol · l ⁻¹	[BPO] ^{b)} in Masse-%	t in h	P-Gehalt in Masse-%	PG in %
0,276	1	8,5	1,9	9,8
0,276	2	8,5	1,4	7,3
0,276	5	8,5	1,0	5,2
0,276	10	8,5	1,0	5,2
0,828	10	8,5	1,9	9,8
1,036	10	8,5	3,9	22,7
0,276	2	20	1,5	7,5
0,276	5	20	1,1	5,6
0,627	5	20	2,5	13,3
0,942	5	20	3,3	18,3

a) [at. PP] = 1,08 mol · l⁻¹; T = 80°C; Benzen/DMF-Gemisch (10:1 v/v)

b) Dibenzoylperoxid, bezogen auf das Monomer