



*o*-Nitro-benzolsulfonyl-geschützten Hydroxysuccinimidestern einsetzt und anschließend die Nps-Schutzgruppe durch Einwirkung verdünnter Säuren schonend entfernt. Bei diesen Operationen wurden die vier Bunesalzgruppen nicht angegriffen. Ermuntert durch diese Ergebnisse wurden mit BIELA<sup>4</sup> Peptidsynthesen mit A-Kette sowie mit Des-Gly-A-Kette und dem tert.-Butyloxycarbonyl-geschützten Nitrophenyl-, Trichlorphenyl- oder Hydroxysuccinimidestern der Aminosäuren Glutamin, Phenylalanin, Prolin und Leucin ausgeführt. Vorbild war die Arbeit von LEVY und CARPENTER<sup>5</sup>, denen die Kupplung von Boc-Aminosäure-*p*-nitrophenylestern in Dimethylformamid und Triäthylamin an das ganze Insulinmolekül ohne Schädigung des Hormons gelang.

Im Proinsulinmolekül<sup>6</sup> bildet die A-Kette das Carboxylende<sup>7</sup>.

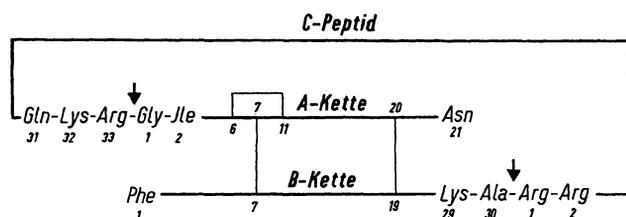


Abb. 2. Strukturformel des Schweineproinsulins nach CHANCE et al.<sup>7</sup>.

Während der Glycyl-Rest in der A-Kette des Insulins *N*-terminal steht und daher für die Insulinsynthese als Schnittstelle nicht in Frage kam, befindet sich dieser Glycyl-Rest im Proinsulin endständig, und es ergibt sich nun die reizvolle Möglichkeit, das C-Peptid um einen Glycinrest zu verlängern und mit einer Des-Gly-A-Kette als Aminokomponente zu kuppeln. Hierfür sprachen die guten Erfahrungen, welche BIELA<sup>4</sup> bei den Kupplungen von Boc-Aminosäureestern mit Des-Gly-A-Kette gemacht hatte.

Allerdings wurden in dieser früheren Arbeit nur neutrale Aminosäuren als Carboxylkomponenten an die Des-Gly-A-Kette angebaut. In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir die Acylierung von

A-Kette mit aktiven Estern von Lysin und Histidin sowie von Des-Gly-A-Kette mit dem C-terminalen Dipeptid Arginyl-glycin aus der um einen Glycinrest verlängerten C-Kette. Dabei sollte auch geprüft werden, ob die mit DRECHSEL<sup>8</sup> erstmalig beschriebene A-Kette in der Bisdisulfidform A(SS)<sub>2</sub> die Operationen einer Peptidsynthese mit aktiven Estern und die nachfolgende Abspaltung der Boc-Schutzgruppe ohne Schädigung der cyclischen Disulfidbindungen übersteht.

## Material und Methoden

### 1. Insulin und Insulinketten

*Krist. Rinderinsulin* (24 E/mg) wurde von der Firma Dr. Ch. Brunnengräber, Lübeck, bezogen und durch Gelchromatographie an Sephadex G-50 in 1M Essigsäure<sup>6</sup> von höhermolekularen Begleitstoffen weitgehend befreit.

Darstellung von A(SSO<sub>3</sub><sup>⊖</sup>)<sub>4</sub> aus Insulin nach BAILEY und COLE<sup>1</sup> und der Arbeitsvorschrift bei ZAHN und DRECHSEL<sup>8</sup>. Die oxydative Sulfitolyse wurde jedoch in 40 ml 0,2M Tris in 8M Harnstoff bei pH 7,5 ausgeführt.

*Darstellung von A(SS)<sub>2</sub> aus A(SSO<sub>3</sub><sup>⊖</sup>)<sub>4</sub>*: Die mit Stickstoff entlüftete Lösung von 200 mg A(SSO<sub>3</sub><sup>⊖</sup>)<sub>4</sub> in 40 ml 0,05M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Puffer wurde mit 0,08 g EDTA versetzt und der pH-Wert mit Ammoniak auf 8,5 eingestellt. Man fügte 0,4 ml *Mercaptoäthanol* zu und ließ die Reduktion 4 Std. unter Stickstoff ablaufen. Hierauf wurde die Thiol-A-Kette nach DU et al.<sup>9</sup> durch Ansäuern mit Essigsäure bis zu einem pH von 3,8 ausgefällt und abzentrifugiert. Das Zentrifugat wurde mit 0,01M Essigsäure solange gewaschen, bis der Geruch nach *Mercaptoäthanol* verschwunden war. Das gereinigte A(SH)<sub>4</sub>-Präparat wurde in mit Natronlauge auf pH 10,6 eingestelltem 0,05M Boratpuffer gelöst und die Lösung auf einer Sephadex-G-50-Säule (70 × 4 cm) chromatographiert. Während der Chromatographie erfolgte die Oxydation. Das Eluat wurde 7 Std. gegen 7 Chargen dest. Wasser dialysiert und das Dialysat gefriergetrocknet. Das dabei anfallende Gemisch der oligomeren A-Kettenbisdisulfide wurde in 10 ml 0,05M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> gelöst und auf einer Sephadex-G-50-Säule (200 × 2,8 cm) fraktioniert. Die letzte Fraktion bestand aus A(SS)<sub>2</sub> und wurde nach Gefrierdrying in einer Ausbeute von 141 mg (82% d. Th.) erhalten.

*Darstellung von Des-glycin-A-Ketten-Bunesalz (Des-Gly-A-(SSO<sub>3</sub><sup>⊖</sup>)<sub>4</sub>: Phenylthiocarbonyl-A-Ketten-Bunesalz (Ptc-A(SSO<sub>3</sub><sup>⊖</sup>)<sub>4</sub>)* war ein von Frau BIELA freundlicherweise überlassenes Präparat, das an DEAE-Sephadex A-25 zweimal durch Gradientenelution mit salz-

<sup>8</sup> H. ZAHN u. E. DRECHSEL, diese Z. 349, 359 [1968].

<sup>9</sup> Y.-C. DU, R.-Q. YANG u. C.-L. TSOU, *Scientia sinica* 14, 229 [1965].

<sup>4</sup> M. BIELA, D. BRANDENBURG u. H. ZAHN, unveröffentl. Manusk. 1967.

<sup>5</sup> D. LEVY u. F. H. CARPENTER, *Biochemistry* [Washington] 6, 3559 [1967].

<sup>6</sup> D. F. STEINER u. P. E. OYER, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 57, 473 [1967].

<sup>7</sup> R. E. CHANCE, R. M. ELLIS u. W. W. BROMER, *Science* [Washington] 161, 165 [1968].

sauren Harnstofflösungen<sup>10</sup> gereinigt wurde. 10 mg Ptc-A( $\text{SSO}_3^\ominus$ )<sub>4</sub> wurden mit 1 ml *Trifluoressigsäure* behandelt, die Säure nach 1 Std. abgezogen und das Produkt mit Äther gründlich gewaschen. Hierauf folgte eine Fraktionierung durch Gradientenelution an DEAE-Sephadex A-25.

## II. Aminosäurederivate

*N<sup>α</sup>.N<sup>ε</sup>-Bis-[tert.-butyloxycarbonyl]-lysin* wurde aus *Lysin-hydrochlorid* und *tert.-Butyl-trichlorphenyl-carbonat*<sup>11</sup> dargestellt und stimmte in der Drehung sowie dem Schmelzpunkt des Dicyclohexylammoniumsalzes mit den Literaturwerten<sup>12,13</sup> für das durch Umsetzung von Lysin mit dem Boc-Azid gewonnenen Präparat überein. Der Ansatz aus 1,83 g Lysin-hydrochlorid (10 mMol), 6,8 g *tert.-Butyl-trichlorphenyl-carbonat* (23 mMol), 7 ml Triäthylamin, 16 ml Wasser und 24 ml *tert.-Butanol* wurde 2 Std. bei 60–62°C gerührt. Nach dem Entfernen der Hauptmenge des *tert.-Butanols* im Vak. wurden 30 ml Wasser zugegeben und die Mischung mit konz. Citronensäure bei 0°C auf pH 3 eingestellt. Der angesäuerte Ansatz wurde dreimal mit 30 ml Essigsäure-äthylester extrahiert und die Extrakte mit 1N  $\text{NaHCO}_3$  (einmal mit 20 ml, hierauf dreimal mit 10 ml) gewaschen. Die Waschlösungen wurden bei 0°C mit gesättigter Citronensäurelösung auf pH 3 eingestellt und das Bis-Boc-Derivat mit Essigsäure-äthylester extrahiert und nach dem Abziehen des Essigsäure-äthylesters in Form eines gelblichen gelartigen Produktes in einer Ausbeute von 2,1 g (62% d. Th.) isoliert.

$$[\alpha]_D^{22} = -3,4^0 \quad (c = 1; \text{Methanol}) \quad (\text{l. c.}^{12}: -3,1^0).$$

*N<sup>α</sup>.N<sup>ε</sup>-Bis-[tert.-butyloxycarbonyl]-lysin-trichlorphenylester*: Die Lösung von 3,5 g (0,01 Mol) *(Boc)<sub>2</sub>-Lys* und 2 g (0,01 Mol) 2,4,5-Trichlor-phenol in 50 ml trockenem Essigsäure-äthylester wurde mit 2,1 g (0,01 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach 18 Std. Stehenlassen bei 0–4°C wurde der gebildete Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Lösungsmittel abgezogen und 6 g harzförmiges Produkt erhalten, das nach Verreiben mit Petroläther weiß und fest wurde.

$$[\alpha]_D^{24} = +14,0^0 \quad (c = 1; \text{Dimethylformamid}).$$

$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{N}_2\text{Cl}_3$  (524,8)

Ber. C 50,42 H 5,94 N 5,34 Cl 20,23

Gef. C 50,54 H 6,52 N 4,85 Cl 18,08

<sup>10</sup> Y. SHIMONISHI u. H. ZAHN, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **154**, 598 [1968].

<sup>11</sup> W. BROADBENT, J. S. MORLEY u. B. E. STONE, *J. chem. Soc., Sect. C* [London] **1967**, 2632.

<sup>12</sup> K. HOFMANN, W. HAAS, M. J. SMITHERS u. G. ZANETTI, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 631 [1965].

<sup>13</sup> L. BERNARDI, G. BOSISIO, R. DE CASTIGLIONE, O. GOFFREDO u. F. CHILLEM, *Gazz. chim. ital.* **94**, 853 [1964].

*N<sup>α</sup>.N<sup>ε</sup>-Bis-[tert.-butyloxycarbonyl]-histidin-p-nitro-phenylester* war ein Präparat von SCHNABEL<sup>14</sup>, das dieser freundlicherweise zur Verfügung stellte.

*N-tert.-Butyloxycarbonyl-arginyl-glycin-p-nitro-phenylester*: 0,6 g *Boc-Arg-Gly*, freundlicherweise von Dr. NAITHANI<sup>15</sup> überlassen, wurden in 3 ml Pyridin und 23 ml Dimethylformamid gelöst, die Lösung auf 0°C abgekühlt und mit 0,45 g *p-Nitro-phenyl-trifluoacetat*<sup>16</sup> versetzt. Nach zweistündigem Stehenlassen bei Raumtemperatur wurde das überschüssige Trifluoacetat durch Zugabe von 5 ml Wasser hydrolysiert. Die Lösungsmittel wurden abgezogen. Es wurden nochmals 10 ml Wasser zugefügt und wieder abgezogen. Der ölige Rückstand von 0,9 g wurde mit Äther gewaschen und ohne weitere Kristallisationsversuche direkt zur Umsetzung mit den A-Ketten-Präparaten eingesetzt.

## III. Umsetzungen von aktiven Estern von Aminosäuren mit A( $\text{SSO}_3^\ominus$ )<sub>4</sub>

*Lysyl-A*( $\text{SSO}_3^\ominus$ )<sub>4</sub>: 74 mg (0,028 mMol) *A*( $\text{SSO}_3^\ominus$ )<sub>4</sub> und 51 mg (0,097 mMol) *(Boc)<sub>2</sub>-Lys-OTcp* wurden in 3 ml Dimethylformamid mit 0,012 ml Triäthylamin aufgeschlämmt, das Gemisch wurde 4 Tage lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsprodukt wurde mit Äther ausgefällt, die Fällung dreimal mit Äther gewaschen, im Exsiccator über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet und zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppen mit 2 ml Trifluoressigsäure 10 Min. lang behandelt. Die Säure wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand dreimal mit absol. Äther gewaschen.

*Histidyl-A*( $\text{SSO}_3^\ominus$ )<sub>4</sub>: 93 mg (0,035 mMol) *A*( $\text{SSO}_3^\ominus$ )<sub>4</sub> und 58 mg (0,12 mMol) *(Boc)<sub>2</sub>-His-ONp* wurden in 4 ml Dimethylformamid und 0,1 ml Pyridin aufgeschlämmt. Nach 20 Min. hatte sich eine klare Lösung gebildet. Nach 5 Tagen wurde das Reaktionsprodukt aus der Lösung mit Äther ausgefällt, die Fällung dreimal mit Äther gewaschen und über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet. Zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppen wurde mit 2 ml Trifluoressigsäure 10 Min. lang behandelt. Nach dem Abziehen der Trifluoressigsäure wurde der Rückstand mit absol. Äther gewaschen.

*Umsetzung von Boc-Arg-Gly-ONp mit Des-Gly-Bunte-salz-A-Kette*: Zur Aufschlammung von 60 mg *Des-Gly-A*( $\text{SSO}_3^\ominus$ )<sub>4</sub> in 2 ml Dimethylformamid wurden 0,007 ml Triäthylamin und etwa 150 mg *Boc-Arg-Gly-ONp* zugefügt. Nach 5 Tagen wurden die A-Ketten-Produkte mit Äther ausgefällt; die Fällung wurde mit Äther gewaschen, abermals in 2 ml Dimethylformamid aufgeschlämmt und mit *Boc-Arg-Gly-ONp* umgesetzt. Nach weiteren 5 Tagen wurde der Ansatz mit Äther versetzt, die Fällung mit Äther gewaschen und mit Trifluoressigsäure behandelt. Das Reaktionsprodukt wurde

<sup>14</sup> E. SCHNABEL, *Liebigs Ann. Chem.* **702**, 188 [1967].

<sup>15</sup> K. NAITHANI, unveröffentl. Vers. 1968.

<sup>16</sup> S. SAKAKIBARA u. N. INUKAI, *Bull. chem. Soc. Japan* **37**, 1231 [1964]; **38**, 1979 [1965].

durch Gradientenelution an DEAE-Sephadex A-25 fraktioniert.

*Reinigung von substituierten Bunesalz-A-Ketten durch Chromatographie an DEAE-Sephadex A-25:* Es wurde unter Anlehnung an die Vorschrift von SHIMONISHI und ZAHN<sup>10</sup> gearbeitet und die Gradientenelution angewendet. Startpuffer war eine 8M Harnstofflösung von pH 5. Mischungspuffer war 0,25M HCl in 8M Harnstoff. Die aufgefängenen Fraktionen wurden 7 Std. lang gegen 7 Chargen dest. Wasser dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

#### IV. Umsetzungen von aktiven Estern von Aminosäuren mit $A(SS)_2$

*Lysyl- $A(SS)_2$ :* Die Lösung von 92 mg (0,04 mMol)  $A(SS)_2$  und 48 mg (0,09 mMol)  $(Boc)_2$ -Lys-OTcp in 3 ml Dimethylformamid und 0,01 ml Triäthylamin wurde nach 3 täg. Stehenlassen bei Raumtemperatur mit Äther versetzt, wobei das Reaktionsprodukt ausfiel. Dieses wurde mit Äther gewaschen, über  $P_2O_5$  getrocknet und zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppen mit Trifluoressigsäure behandelt. Die Säure wurde abdestilliert und das Produkt mit absolutem Äther gewaschen.

*Histidyl- $A(SS)_2$ :* Die Lösung von 12 mg (0,005 mMol)  $A(SS)_2$  in 1 ml Dimethylformamid wurde mit 6 mg  $(Boc)_2$ -His-ONp (0,012 mMol) und 0,0015 ml Triäthylamin versetzt. Nach drei Tagen wurde das Reaktionsprodukt mit Äther gefällt, gewaschen und über  $P_2O_5$  getrocknet. Zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppen wurde mit 1 ml Trifluoressigsäure 10 Min. lang behandelt. Der nach dem Abdestillieren der Trifluoressigsäure erhaltene Rückstand wurde mit absol. Äther gewaschen.

*Reinigung von substituierten  $A(SS)_2$ -Präparaten:* Diese erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie an einer Dowex-50X2-Säule (50 × 0,8 cm) mit einer 5proz. Essigsäurelösung in 8M Harnstoff als Startpuffer und einem Mischungspuffer aus 400 ml 0,25M Natriumacetat-lösung in 8M Harnstoff.

## Ergebnisse

### I. Umsetzungen mit der Bunesalz-A-Kette $A(SSO_3^-)_4$

Die Umsetzung der geschützten aktiven Ester von Lysin und Histidin mit  $A(SSO_3^-)_4$  wurden wie bei LEVY und CARPENTER<sup>5</sup> in absol. Dimethylformamid unter Zusatz von Triäthylamin durchgeführt.

Der Einfluß des Molverhältnisses wurde in Reihenversuchen mit dem Lysinderivat untersucht. Von diesem wurden die 2-, 4-, 6- und 8fachen molaren Mengen, bezogen auf  $A(SSO_3^-)_4$ , eingesetzt. Alle

24 Std. wurden den Ansätzen Proben entnommen und elektrophoretisch auf nicht umgesetztes  $A(SSO_3^-)_4$  geprüft. Nach 72 Std. war eine weitgehende Umsetzung auch schon bei dem Molverhältnis von 2:1 erfolgt. Nach der Abspaltung der Boc-Schutzgruppen mit Trifluoressigsäure ist Lys-A  $(SSO_3^-)_4$  Hauptprodukt, welches bei der Elektrophorese in dem ameisensauren Puffer die Nettoladung  $-2$  besitzt (Abb. 3).

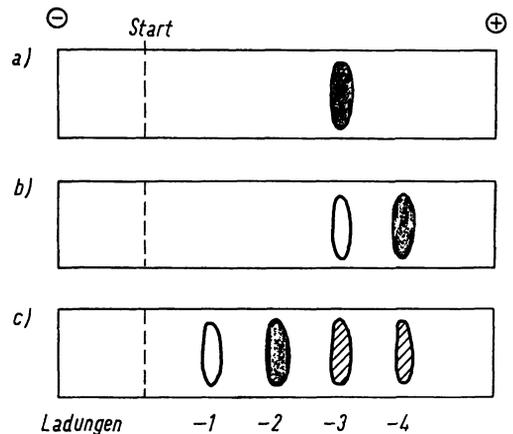


Abb. 3. Elektropherogramme von  $A(SSO_3^-)_4$  und dem Produkt, das sich nach Umsetzung mit  $(Boc)_2$ -Lys-OTcp sowie nach anschließender Trifluoressigsäure-Behandlung bildet (Pufferlösung: 4M Harnstoff, 2,4M  $HCO_2H$ , pH 2,1<sup>17</sup>). Die Intensitäten der Flecken sind durch Schwärzung und Schraffur angedeutet.

Feldstärke: 4,4 Volt/cm, Laufzeit 6 Std.

Temp. ca. 20°C, nach dem Trocknen Entwicklung mit PAULY-Reagenz.

a) reines  $A(SSO_3^-)_4$ ,

b) nach Umsetzung mit  $(Boc)_2$ -Lys-OTcp,

c) nach Umsetzung mit  $(Boc)_2$ -Lys-OTcp sowie Behandlung mit Trifluoressigsäure.

Daneben tritt noch eine Verbindung mit der Nettoladung  $-1$  auf. Für die Fraktionierung der Produkte in Abb. 3c bot sich aufgrund der verschiedenen Nettoladungen eine Fraktionierung an DEAE-Sephadex A-25 durch Gradientenelution mit salzsaurer Harnstofflösungen nach SHIMONISHI<sup>10</sup> an. Dabei ergab sich die erwartete glatte Auftrennung in elektrophoretisch einheitliche Produkte (vgl. Abb. 4).

Die bei der Gradientenelution erhaltenen Fraktionen wurden elektrophoretisch identifiziert (vgl.

<sup>17</sup> Y.-C. DU, Y.-S. ZHANG, Z.-X. LU u. C.-L. TSOU, Scientia sinica 10, 84 [1961].

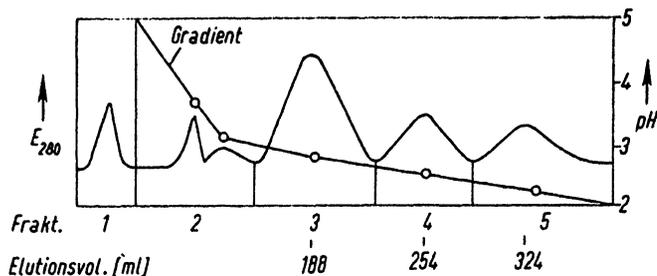


Abb. 4. DEAE-Sephadex-A-25-Chromatogramm des Produktes, das aus  $A(SSO_3^-)_4$  nach Umsetzung mit  $(Boc)_2$ -Lys-OTcp und anschließender Trifluoressigsäurebehandlung entstand (s. Abb. 3c).

Säule:  $11 \times 45$  mm. Gradientenelution mit 250 ml/ 8M Harnstoff, pH 5, als Startpuffer und 250 ml/ 0,25M HCl in 8M Harnstoff als Mischungspuffer.

Tab. 1. Aminosäurezusammensetzung der Totalhydrolysate (6N HCl,  $105^\circ C$ , 24 Std.) von  $A(SSO_3^-)_4$ , Lys- $A(SSO_3^-)_4$  und His- $A(SSO_3^-)_4$  durch Analyse nach SPACKMAN et al.<sup>18</sup>.

Angabe der Zahl der Aminosäuren pro A-Kette, bezogen auf Glutaminsäure = 4,0.

| Aminosäure | $A(SSO_3^-)_4$ | Lys- $A(SSO_3^-)_4$ | His- $A(SSO_3^-)_4$ |
|------------|----------------|---------------------|---------------------|
| Lys        | 0,0            | 1,06                | 0,0                 |
| His        | 0,0            | 0,0                 | 1,02                |
| Asp        | 1,92           | 1,98                | 1,99                |
| Ser        | —              | 1,82                | 1,94                |
| Glu        | 4,00           | 4,00                | 4,00                |
| Gly        | 0,99           | 0,99                | 1,07                |
| Ala        | 0,94           | 0,98                | 0,96                |
| Cystin     | 2,10           | —                   | 1,68                |
| Val        | 1,34           | 1,34                | 1,47                |
| Ile        | 0,38           | 0,40                | 0,41                |
| Leu        | 2,02           | 1,93                | 2,03                |
| Tyr        | 1,95           | 1,88                | 2,05                |

Abb. 3). Die dritte Fraktion war das Lys- $A(SSO_3^-)_4$ -Produkt der Nettoladung  $-2$ , welches eine befriedigende Aminosäureanalyse lieferte (vgl. Tab. 1). Die Frakt. 5 besaß die Nettoladung  $-4$ , ist aber nicht mit  $(Boc)_2$ -Lys- $A(SSO_3^-)_4$  identisch.

Das bei der Umsetzung von  $(Boc)_2$ -His-ONp mit  $A(SSO_3^-)_4$  gebildete Produkt besaß im ameisen-sauren Harnstoffpuffer die gleiche Nettoladung von  $-3$  wie die nicht substituierte A-Kette. Daher wurde hier zur Kontrolle der Reaktion die Dünnschichtchromatographie in einem Gemisch aus 30 ml n-Butanol, 20 ml Wasser, 24 ml Pyridin und

<sup>18</sup> D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN u. S. MOORE, Analytic. Chem. **30**, 1190 [1958].

6 ml Eisessig nach KATSOYANNIS et al.<sup>19</sup> herangezogen. Nach der Abspaltung der beiden Boc-Schutzgruppen wurde als Hauptprodukt His- $A(SSO_3^-)_4$  mit der Nettoladung  $-2$  im Ameisensäure/Harnstoff-Puffer erhalten. Das durch Gradientenelution gereinigte Produkt ergab eine befriedigende Aminosäureanalyse (vgl. Tab. 1).

## II. Umsetzungen mit der Bisdisulfid-A-Kette $A(SS)_2$

Das Gemisch der isomeren Bisdisulfide  $A(SS)_2$  löst sich glatt in wasserfreiem Dimethylformamid, während sich die Buntsalzkette in Dimethylformamid auch nach Zusatz von Pyridin oder Triäthylamin nicht löst. Erst die Umsetzungsprodukte mit den Estern der geschützten Aminosäuren lieferten Dimethylformamid-lösliche Produkte. Die Umsetzungen mit  $A(SS)_2$  in wasserfreiem Dimethylformamid verliefen von Beginn an in homogener Phase. Auch genügte ein Molverhältnis von Aminosäureester zu  $A(SS)_2$  von 2:1 und eine Reaktionsdauer von 2 bis 3 Tagen bei Raumtemperatur. Die nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppen erhaltene verlängerte A-Kette Lys- $A(SS)_2$  besaß bei der Elektrophorese in ameisen-saurer Lösung die erwartete Nettoladung  $+2$  (vgl. Abb. 5), war aber von zwei Produkten der

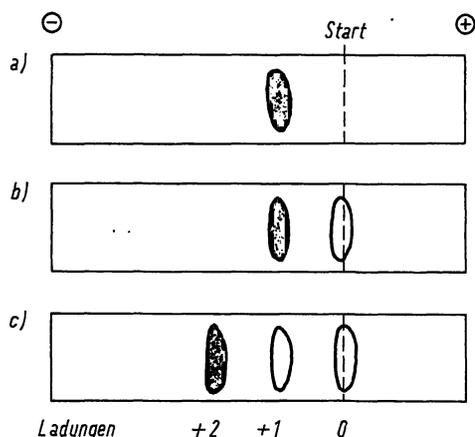


Abb. 5. Elektropherogramme von  $A(SS)_2$  und dem Produkt, das sich nach Umsetzung mit  $(Boc)_2$ -Lys-OTcp, sowie nach anschließender Trifluoressigsäurebehandlung bildet.

Bedingungen wie Abb. 3.

- a) reines  $A(SS)_2$ ,  
 b) nach Umsetzung mit  $(Boc)_2$ -Lys-OTcp,  
 c) nach Umsetzung mit  $(Boc)_2$ -Lys-OTcp sowie Behandlung mit Trifluoressigsäure.

<sup>19</sup> P. G. KATSOYANNIS, A. M. TOMETSKO, C. ZALUT u. K. FUKUDA, J. Amer. chem. Soc. **88**, 5625 [1966].

Ladung 0 und +1 begleitet. Daher wurde das Produkt an Dowex 50X2 durch Gradientenelution fraktioniert. Die Hauptfraktion ergab bei der elektrophoretischen Prüfung noch einen schwachen Fleck der Ladung +1. Die Aminosäureanalyse (Tab. 2) dieser Hauptfraktion zeigt daher einen etwas zu niedrigen Lysinwert.

Tab. 2. Aminosäurezusammensetzung der Totalhydrolysate von A(SS)<sub>2</sub> und Lys-A(SS)<sub>2</sub> durch Analyse nach SPACKMAN et al.<sup>18</sup>. Angabe der Zahl der Aminosäuren pro A-Kette, bezogen auf Glutaminsäure = 4,0.

| Aminosäure | A(SS) <sub>2</sub> | Lys-A(SS) <sub>2</sub> |
|------------|--------------------|------------------------|
| Lys        |                    | 0,76                   |
| Asp        | 1,98               | 1,98                   |
| Ser        | —                  | 1,92                   |
| Glu        | 4,0                | 4,00                   |
| Gly        | 0,94               | 1,04                   |
| Ala        | 0,99               | 0,93                   |
| Cystin     | 1,80               | 1,10                   |
| Val        | 1,40               | 1,14                   |
| Ile        | 0,38               | 0,27                   |
| Leu        | 1,92               | 1,88                   |
| Tyr        | 1,95               | 1,86                   |

III. Umsetzungen mit der Des-glycin-Buntesalz-A-Kette (Des-Gly-A(SSO<sub>3</sub><sup>⊖</sup>)<sub>4</sub>)

Die Umsetzung des aus Boc-Arg-Gly und *p*-Nitrophenyl-trifluoracetat durch Umesterung erhaltenen Produktes mit der Des-glycin-Buntesalzkette in Dimethylformamid verlief weniger befriedigend als die Umsetzungen der aktiven Ester des Lysins und Histidins mit der kompletten Buntesalzkette. Nach fünf Tagen war nur wenig Boc-Arg-A(SSO<sub>3</sub><sup>⊖</sup>)<sub>4</sub> gebildet worden. Auch nach zehn Tagen zeigte das Elektropherogramm noch intensive Nebenbanden. Das bei der Trifluoressigsäurebehandlung entstandene Rohprodukt wurde durch Gradientenelution an DEAE-Sephadex A-25 fraktioniert. Aber auch die Fraktion, welche im ameisen-sauren Puffer die für Arg-A(SSO<sub>3</sub><sup>⊖</sup>)<sub>4</sub> erwartete Nettoladung von -2 aufwies, ergab eine Aminosäureanalyse (Tab. 3), die dafür spricht, daß das Produkt ein Gemisch von Des-Gly-A(SSO<sub>3</sub><sup>⊖</sup>)<sub>4</sub> und Arg-A(SSO<sub>3</sub><sup>⊖</sup>)<sub>4</sub> darstellt.

Diskussion

Die eingangs gestellte Frage, ob man eine nur am Cystein geschützte A-Kette als Aminokomponente für eine Synthese von Teilen des Proinsulinmole-

Tab. 3. Aminosäurezusammensetzung von Des-Gly-A(SSO<sub>3</sub><sup>⊖</sup>)<sub>4</sub> und der DEAE-Sephadex-A-25-Fraktion mit der Nettoladung -2 aus dem Umsetzungsprodukt Boc-Arg-Gly-ONp und Des-Gly-A(SSO<sub>3</sub><sup>⊖</sup>)<sub>4</sub> nach SPACKMAN et al.<sup>18</sup>. Angabe der Zahl der Aminosäuren pro A-Kette, bezogen auf Glutaminsäure = 4,0.

| Amino-säure | Des-Gly-A(SSO <sub>3</sub> <sup>⊖</sup> ) <sub>4</sub> | Arg-Gly-Des-Gly-A(SSO <sub>3</sub> <sup>⊖</sup> ) <sub>4</sub> |
|-------------|--|--|
| Arg         | 0,0  | 0,50   |
| Asp         | 1,96   | 1,93   |
| Ser         | 1,83   | 2,03   |
| Glu         | 4,00   | 4,00   |
| Gly         | Spuren   | 0,45   |
| Ala         | 0,97   | 1,04   |
| Cystin      | 1,53   | 1,46   |
| Val         | 1,62   | 1,39   |
| Ile         | 0,50   | 0,35   |
| Leu         | 1,86   | 1,80   |
| Tyr         | 1,89   | 1,75   |

küls verwenden kann, darf positiv beantwortet werden. Die in den früheren Arbeiten<sup>3,4</sup> verwendete *S*-Sulfonat-Schutzgruppe hat sich auch in der vorliegenden Arbeit insofern bewährt, als die Buntesalzgruppen alle Operationen der Peptidsynthese, das sind Umsetzung mit den aktiven Estern in Gegenwart von Triäthylamin, Abspaltung der Boc-Schutzgruppe und Fraktionierung durch Gradientenelution in salzsauren Harnstofflösungen überstanden hat. Schon BRINKHOFF<sup>20</sup> hatte festgestellt, daß die Insulin-Buntesalzketten im pH-Bereich 1,9 bis 10,2 keinen Verlust ihres Schwefelgehaltes erleiden, falls keine Reduktions- oder Oxydationsmittel zugesetzt werden. Neu ist die Verwendung der A-Kette in der Bisdisulfidform. Das Gemisch der Isomeren der Zusammensetzung A(SS)<sub>2</sub> ist in Dimethylformamid besser löslich als A(SSO<sub>3</sub><sup>⊖</sup>)<sub>4</sub>. Die intramolekularen Disulfidbindungen erwiesen sich als genügend stabil, um die eben genannten Operationen einer Peptidsynthese zu überstehen. Die Löslichkeit dürfte noch größer werden, wenn Hydroxyl- und Carboxylgruppen zusätzlich geschützt werden.

Zuerst hatten wir angenommen, man würde einen großen Überschuß an Carboxylkomponente einsetzen müssen, um eine befriedigende Umsetzung mit der A-Kette zu erreichen.

Man kommt jedoch bereits mit der doppelten molaren Menge an Aminosäure- oder Peptidester aus.

<sup>20</sup> O. BRINKHOFF, Diplomarbeit Abteil. f. Chemie u. Biologie Techn. Hochschule Aachen 1962.

Unbefriedigend ist allerdings die Analyse der Arg-A(SSO<sup>⊖</sup><sub>3</sub>)<sub>4</sub>-Kette. Inzwischen sind aber bereits Versuche zur Kondensation von größeren Fragmenten der C-Kette mit Des-Gly-A(SS)<sub>2</sub> im Gange. Dabei dürfte die Abtrennung von nicht umgesetztem Des-Gly-A(SS)<sub>2</sub> infolge der Unterschiede in der Molekülgröße leichter gelingen. Es war naheliegend, die neuen am Aminoende um Lysyl- bzw. Histidyl- und Arginyl-Reste verlängerten A-Ketten mit isolierter B-Kette zur Hybridinsulinen zu kombinieren. Diese Versuche wurden unter Anlehnung an die A-Kettenüberschußmethode von Du et al.<sup>9</sup> ausgeführt. Dabei wurden Resyntheseprodukte isoliert, die aus viel polymerer B-

Kette und ca. 10 % Hybridinsulin mit den erwarteten R<sub>F</sub>-Werten im Papierchromatogramm bestehen. Über diese Hybridinsuline soll jedoch erst dann im einzelnen berichtet werden, wenn sie in reiner Form isoliert und analysiert sein werden.

Wir danken dem LANDESAMT FÜR FORSCHUNG BEIM MINISTERPRÄSIDENTEN DES LANDES NORDRHEIN-WESTFALEN sowie dem BUNDESMINISTERIUM FÜR WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNG (Forschungsvorhaben St.-N. 213—69) für die Ermöglichung der vorliegenden Arbeit. Ferner danken wir dem VERBAND DER CHEMISCHEN INDUSTRIE DÜSSELDORF für die Vermittlung von Chemikalien und Lösungsmittelspenden im Rahmen der Hochschullieferungen.