

Basische Peptide des Bienengifts, II^[1]

Synthese zweier Pentapeptide aus der Sequenz des Mastzellen-degranulierenden Peptids

Peter HARTTER

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Tübingen

(Der Schriftleitung zugegangen am 18. Oktober 1976)

Herrn Professor Dr. Helmut Zahn zum 60. Geburtstag gewidmet

Zusammenfassung: Die Synthese zweier geschützter Pentapeptide aus der Sequenz des Mastzellen-degranulierenden Peptids wird beschrieben. Die Fragmente Boc-Lys(Z)-Ile-Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z) (I) und Boc-Pro-His(Trt)-Ile-Cys(Trt)-Arg(Tos) (II) wurden nach konventionellen Methoden syntheti-

siert. Ein Disulfidaustausch, der bei Abspaltung der Boc-Schutzgruppe an Boc-Ile-Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z) mit starken Säuren auftritt, und die Bildung von allo-Isoleucin bei saurer Hydrolyse einer Ile-Cys(Trt)-Bindung werden diskutiert.

Basic Peptides in Bee Venom, II. Synthesis of Two Pentapeptides from the Sequence of the Mast-Cell-Degrading Peptide

Summary: The synthesis of two protected pentapeptides is described. The peptides are fragments of the sequence of a mast-cell-degranulating peptide from bee venom. The fragments Boc-Lys(Z)-Ile-Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z) (I) and Boc-Pro-His(Trt)-Ile-Cys(Trt)-Arg(Tos) (II) were synthesised conventionally. The deprotection of the α -amino

group by HCl/acetic acid of Boc-Ile-Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z) was accompanied by a disulfide exchange at the cysteine residue. After the hydrolysis of fragment II with 6N HCl, allo-isoleucine could be detected by gas chromatography and amino-acid analysis.

Key words: Mast-cell-degranulating peptide, peptide synthesis, disulfide exchange, allo-isoleucine.

Aus Bienengift wurden in den vergangenen 10 Jahren mehrere basische Peptide isoliert^[2,3]. Die wichtigsten sind Melittin (27 Aminosäurereste), Apamin (18 Reste) und das Mastzellen-degranulierende Peptid (22 Reste). Die Synthese von

Melittin wurde bereits von Lübke et al.^[4] durch Kondensation von Fragmenten erfolgreich durchgeführt. Das neurotoxische Peptid Apamin wurde mit Hilfe der Festkörpermethode an einem Poly-[trifluorchloräthylen-g-(α -aminobenzyl)]styrol-

Abkürzungen:

MCD-Peptid = Mastzellen-degranulierendes Peptid oder P401; Boc = *t*-Butyloxycarbonyl; DCC = Dicyclohexylcarbodiimid; OMe = Methyl ester; ONSu = *N*-Hydroxysuccinimid ester; SiPr = *S*-Isopropylthio, Trt = Trityl; Tos = Tosyl; Z = Benzyloxycarbonyl; alle = allo-Isoleucin.

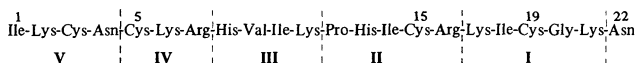


Abb. 1. Sequenz des MCD-Peptids.

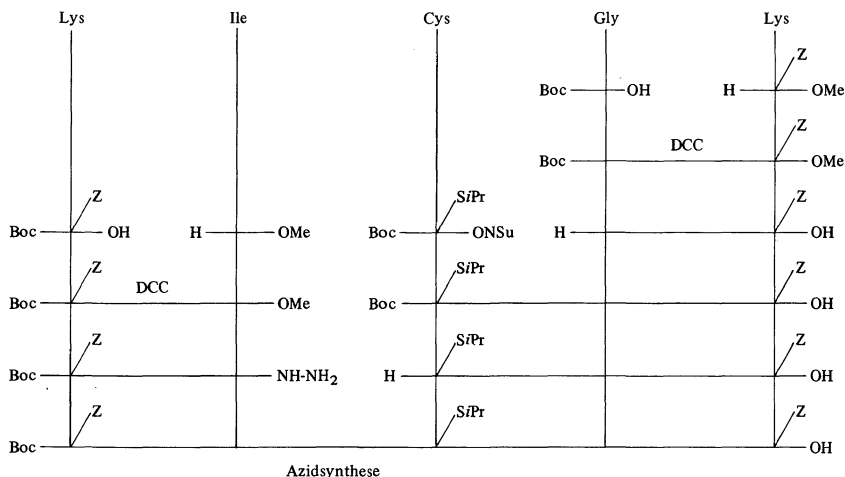
Disulfidbrücken in Pos. 3 - 15 und Pos. 5 - 19. I - V: Fragmente zum Aufbau der Sequenz.

Harz als Träger dargestellt^[5]. Die schwierig herzustellende Sequenz des MCD-Peptids wurde bisher noch nicht synthetisiert.

Das Verhalten des Peptids an der Zellmembran von Mastzellen und seine entzündungshemmenden Eigenschaften machen seine Synthese und mögliche Sequenzvariationen interessant^[6,7]. Das Peptid enthält 13 trifunktionelle Aminosäuren und zwei Disulfidbrücken (Abb. 1). Die Knüpfung der beiden intramolekularen Disulfidbindungen wird durch das günstige Verhalten des Peptids bei Reoxidationsreaktion erleichtert^[1]. Die vorliegende Sequenz läßt es nicht ratsam erscheinen, die Festkörpermethode nach Merrifield^[8] oder eine klassische Fragmentkondensa-

tion anzuwenden. Beim ersten Verfahren ist es unmöglich, Fehlsequenzen und Peptidrümpfe abzutrennen und beim anderen ist höchst wahrscheinlich mit Löslichkeitsproblemen zu rechnen. Einen gangbaren Weg bietet eine Methode von Bayer et al.^[9], Peptidfragmente an einem löslichen Träger zu kuppeln und Verunreinigungen durch Umkristallisation des Reaktionsproduktes abzutrennen.

Die Sequenz des MCD-Peptids wurde deshalb in 5 Fragmente unterteilt (Abb. 1). Vier Fragmente enthalten je ein Cystein, was eine spätere säulenchromatographische Reinigung des Tetra-S-sulfonat-Peptids erleichtert. Die Synthese der Fragmente I und II und dabei auftretende Besonderheiten werden zunächst beschrieben.



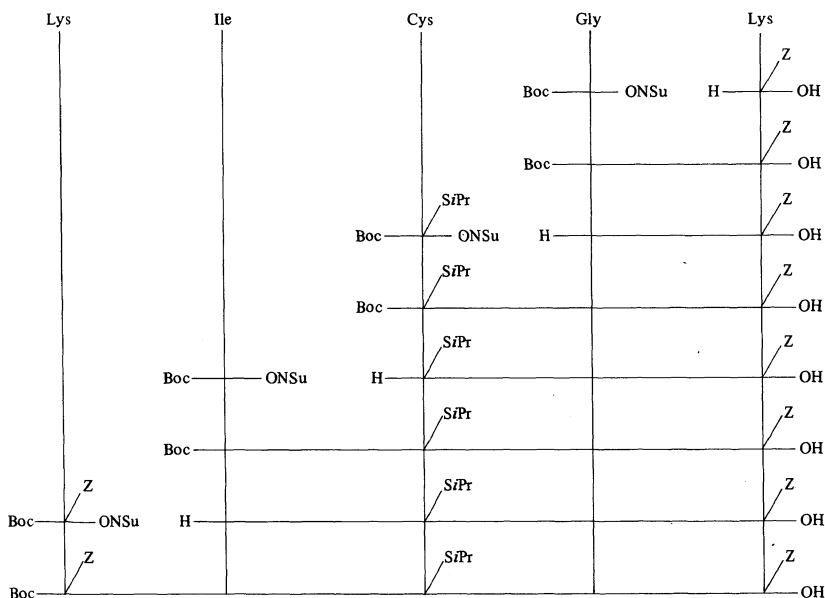
Synthese-Schema 1a

Synthese der Fragmente

Die Fragmente wurden nach konventionellen Methoden synthetisiert. Bei Kupplungen und Veresterungen mit Dicyclohexylcarbodiimid wurde zur Vermeidung von Racemisierung und zur Erhöhung der Ausbeuten 1-Hydroxybenzotriazol nach König zugefügt^[10]. Die ϵ -Aminofunktion am Lysin wurde mit dem Z-Rest, der Stickstoff am Imidazolring des Histidins wurde mit dem Tritylrest und die SH-Funktion am Cystein wurde mit dem Isopropylthio-Rest (Fragment I) und dem Tritylrest (Fragment II) geschützt.

Fragment I wurde zunächst nach Schema 1 synthetisiert. Die Kupplung des Hydrazids Boc-Lys(Z)-Ile-N₂H₃ mit dem Tripeptid Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z) zum Pentapeptid nach der Azidmethode lieferte ein Peptidgemisch, dessen Reinigung sehr aufwendig und dessen Ausbeute sehr ge-

ring war. Die Synthese dieses Fragments wurde deshalb nach Schema 1b durchgeführt. Dabei trat ein bisher nicht beobachtetes Phänomen auf. Bei der Abspaltung des Boc-Restes vom Tetrapeptid Boc-Ile-Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z) mit 1N HCl/Eisessig oder mit CH₂Cl₂/Trifluoressigsäure 1:1 erhält man das in Abb. 2, Bahn 2, gezeigte Dünnschichtchromatogramm. Die beiden Produkte A und B konnten durch Chromatographie an einer Kieselgelsäule mit Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 (V/V) als Elutionsmittel getrennt werden. Beide Peptide zeigten eine identische Aminosäurenanalyse (Tabelle). In Peptid A konnte durch chemische Methoden Isopropylmercaptan nachgewiesen werden. Peptid B zeigt kein Mercaptan an. Peptid A ist also das geschützte Tetrapeptid, während es sich bei Peptid B um ein Octapeptid handelt, das aus zwei Peptiden der Sequenz des Tetrapeptids besteht, die durch eine Disulfidbrücke



Synthese-Schema 1b

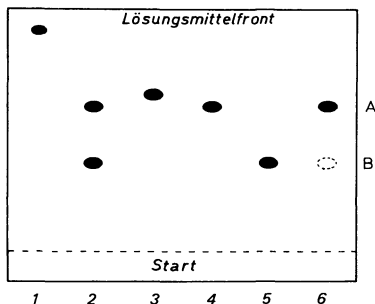


Abb. 2. Dünnschichtchromatogramm folgender Peptide: 1 = Boc-Ile-Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z); 2 = Peptid 1 nach Boc-Abspaltung mit 1N HCl/Eisessig; 3 = Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z); 4 = aus Gemisch 2 abgetrennte Substanz A; 5 = aus Gemisch 2 abgetrennte Substanz B; 6 = Peptid 1 nach Boc-Abspaltung mit Bortrifluorid-ätherat. Laufmittel: Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1.

A = Ile-Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z);

B = $\begin{array}{c} \text{Ile-Cys-Gly-Lys(Z)} \\ | \\ \text{Ile-Cys-Gly-Lys(Z)} \end{array}$

verknüpft sind. Löst man A in 1N HCl/CH₃OH 1:1 (V/V) bei Zimmertemperatur, so stellt sich innerhalb 12 h ein Gleichgewicht zwischen A und B ein.

Bei den oben beschriebenen sauren Abspaltungsmethoden muß ein Disulfidaustausch stattgefunden haben. Dies wurde von uns bei anderen Cys(SiPr)-haltigen Peptiden unter gleichen Bedingungen in diesem Ausmaß nie beobachtet. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppen von dem oben genannten Tetrapeptid mit Bortrifluorid-ätherat^[11] ist günstiger, da hierbei nur geringe Mengen an B entstehen, die sich durch Umfällen abtrennen lassen. Durch Umsetzen von Boc-Lys(Z)-ONSu mit dem Tetrapeptid A erhält man in guter Ausbeute Fragment I.

Die Darstellung von Fragment II erfolgte nach der in Schema 2 aufgezeigten Methode. Verbesserte Verfahren zur Darstellung von *N*^{im}-Tritylhistidinmethylester^[12] und *N*^G-Tosylarginin^[13] werden beschrieben.

Das Pentapeptid konnte in guter Ausbeute und chromatographisch rein dargestellt werden. Die Aminosäurenanalyse des Fragments brachte jedoch ein erstaunliches Ergebnis. Nach saurer Hydrolyse des Peptids ergab sich am Analysator das in Abb. 3 gezeigte Elutionsdiagramm und die in der Tabelle aufgeführte Aminosäurenanalyse. Der für Isoleucin um 40 - 50% zu niedrige Wert konnte zunächst nicht erklärt werden. Das Peptid wurde durch Fragmentkondensation aus Boc-Pro-His(Trt)-N₂H₃ und Ile-Cys(Trt)-Arg(Tos) durch Azidsynthese dargestellt. Da die Werte von Arginin, Prolin und Histidin äquimolar sind, und das

Tabelle. Aminosäurenanalysen der synthetisierten Peptide. Die theoretischen Werte stehen jeweils in Klammern.

Peptid	Arg	Cys	Gly	His	Ile	allo-Ile	Ile gesamt	Lys	Pro
Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z)	—	0.88 (1)	1.00 (1)	—	—	—	—	1.08 (1)	—
Ile-Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z) (A)	—	0.82 (1)	1.00 (1)	—	0.91 (1)	—	—	1.01 (1)	—
Ile-Cys-Gly-Lys(Z) Ile-Cys-Gly-Lys(Z) (B)	—	1.74 (2)	2.00 (2)	—	1.98 (2)	—	—	1.90 (2)	—
Boc-Lys(Z)-Ile-Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z) (Fragment I)	—	0.84 (1)	1.00 (1)	—	1.03 (1)	—	—	2.04 (2)	—
Boc-Ile-Cys(Trt)-Arg(Tos)	1.00 (1)	0.92 (1)	—	—	0.73 (1)	0.24 (0)	0.97 (1)	—	—
Boc-Pro-His(Trt)-Ile-Cys(Trt)- -Arg(Tos) (Fragment II)	1.00 (1)	0.91 (1)	—	1.04 (1)	0.6 (1)	0.47 (0)	1.07 (1)	—	1.07 (i)

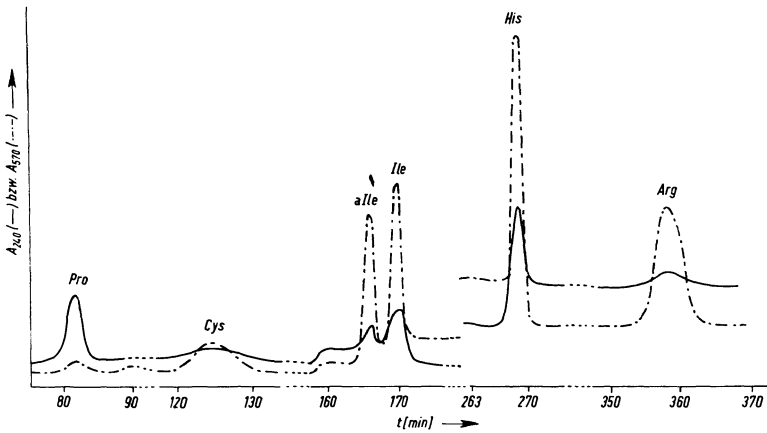
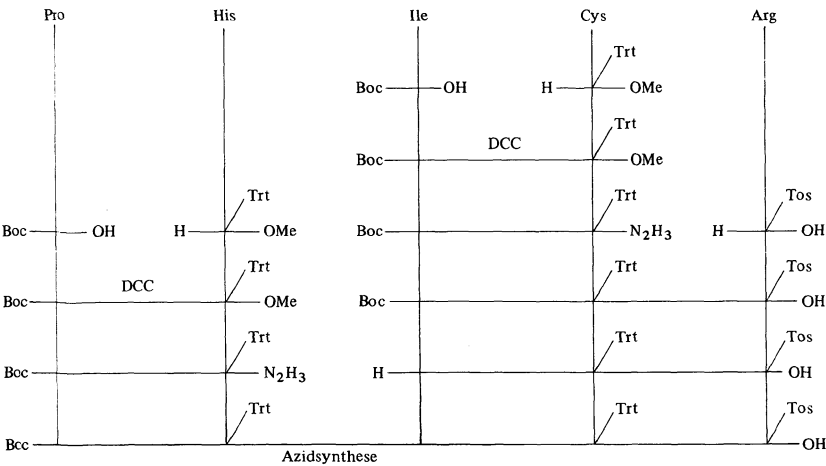


Abb. 3. Aminosäurenanalyse nach saurer Hydrolyse von Boc-Pro-His(Trt)-Ile-Cys(Trt)-Arg(Tos). Säulenlänge 69 x 0.9 cm, Harz Typ M 82, Füllhöhe 58 cm, Temp. = 55 °C. Geschwindigkeit: Puffer 68 ml/h, Ninhydrin 34 ml/h
Puffer pH 3.26 Na-citrat 0.2N 0 - 120 min
pH 4.25 Na-citrat 0.2N 120 - 220 min
pH 6.4 Na-citrat 0.2N/1M NaCl 220 - 370 min



Syntese-Schema 2

Peptid in verschiedenen Laufmitteln chromatographisch einheitlich ist, muß die richtige Sequenz vorliegen. Bei der Aminosäurenanalyse tritt im Elutionsdiagramm vor dem Isoleucin-Gipfel ein zusätzliches Gipfel auf. Es handelt sich dabei weder um His(Trt) noch um Cys(Trt). Das legt die Vermutung nahe, daß der Gipfel von einem Isoleucin-Derivat stammt. Durch vergleichende Untersuchungen mittels Aminosäurenanalyse und Gaschromatographie an einer optisch aktiven Säule konnte gezeigt werden, daß das auftretende Produkt ein allo-Isoleucin darstellt (Abb. 4). Durch Addition der Flächenwerte für Isoleucin und allo-Isoleucin erhält man für Fragment II eine gute Aminosäurenanalyse (Tabelle).

Die saure Hydrolyse von Fragment II deutet auf innermolekulare Bedingungen hin, die dazu führen, daß das zweite Asymmetriezentrum am Isoleucin an C-3 racemisiert. Das bei der Hydrolyse entstehende Trityl-Kation allein kann diesen Effekt nicht bewirken, da bei der Hydrolyse anderer Peptide, die Cys(Trt) und Ile, aber keine Ile-Cys(Trt)-Bindung enthalten, kein allo-Isoleucin nachgewiesen werden konnte. Eine Verunreinigung des zur Synthese verwendeten Isoleucins durch allo-Isoleucin konnte ausgeschlossen werden. Die Tatsache, daß nahezu 50% allo-Isoleucin gefunden werden, spricht für einen Mechanismus, bei dem das Proton, das sich nach der Abspaltung des Tritylrestes am Cystein-Schwefel befindet, nicht aus dem Lösungsmittel, sondern vom C-3 des benachbarten Isoleucins stammt. Das sich so intermediär am Isoleucin bildende Anion würde dann nach S_N1 durch ein Lösungsmittelproton substituiert. Die Bildung von Isoleucin und allo-Isoleucin kann so erklärt werden. Die Möglichkeit dieses Reaktionsmechanismus wird auch sichtbar, wenn man das in Abb. 5a gezeigte Kalottenmodell des Ile-Cys(Trt)-Moleküls betrachtet. Das Proton an C-3 des Isoleucins und das Schwefelatom befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft, so daß eine gegenseitige Überlappung der Orbitale möglich wird. Weiterhin zeigt das Molekül in diesem Bereich ein lipophiles Zentrum, das durch Tritylrest und Isoleucin-Seitenkette gebildet wird. Dadurch kann eine Spaltung der S-Trityl-Bindung durch H_3O^+ erschwert werden.

Das in Abb. 5b gezeigte Modell des Ile-Cys(SiPr)-Moleküls zeigt für die Lage des Protons am Ile-C-3 und die Lage der Disulfidgruppe am Cystein eine

Überlappungsmöglichkeit der Orbitale, wie sie am Ile-Cys(Trt)-Molekül stattfinden kann. Der an diesem Molekül unter sauren Bedingungen beobachtete Disulfidaustausch könnte durch diesen Effekt begünstigt werden.

Eine weitere Untersuchung dieser Befunde soll durch Synthese und Stabilitätsuntersuchungen an weiteren Modellen durchgeführt werden. Sie zeigen eventuell neue Gesichtspunkte auf, die bei Überlegungen zur Basizität von SH-Funktionen und Disulfidbindungen in Peptiden und Proteinen berücksichtigt werden müssen.

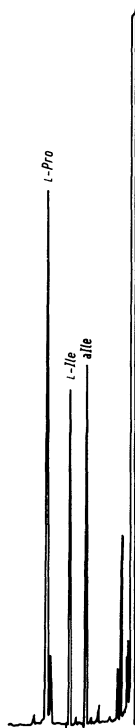
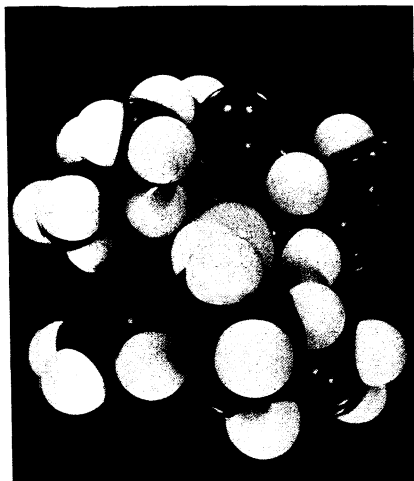
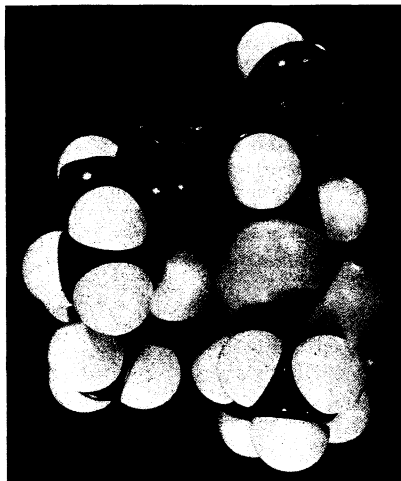


Abb. 4. Gaschromatographische Analyse von Fragment II. Säule: Glaskapillare 23 m, n-Docosanoyl-L-valin-tert.-butylamid; Temperatur: 100 °C isotherm, Trägergas: H_2 , Detektor: FID.



a) -Ile-Cys(Trt)-



b) -Ile-Cys(SiPr)-

Abb. 5. Kalottenmodelle zum Mechanismus der allo-Isoleucin-Bildung.

Ich danke Frau Dr. A.M. Fretzdorff und Herrn G. Nicholson für die Aminosäurebestimmungen und die Durchführung der Analysen, sowie der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für finanzielle Unterstützung.

Material und Methoden

Ausgangsstoffe

Die L-Aminosäuren wurden von folgenden Firmen bezogen: Ajinomoto (Tokio) und Diamalt (München). Das Kieselgel zur Säulenchromatographie (Korngröße 50 - 100 μ) lieferte Serva (Heidelberg). Alle übrigen Reagenzien waren Substanzen p.A. der Firma Merck (Darmstadt). Die Darstellung von Boc-Azid erfolgte nach l.c.^[14]. Alle verwendeten Lösungsmittel wurden nach bekannten Verfahren absolutiert.

Methoden

Die Schmelzpunkte wurden in einem Gerät nach Dr. Totoli bestimmt und sind nicht korrigiert. Die Bestimmung der Drehwerte erfolgte an einem lichtelektrischen Polariometer der Fa. Zeiss. Zur Aminosäureanalyse wurden die Peptide 48 h unter Stickstoff im Einschlußrohr mit

6N HCl bei 110 °C hydrolysiert. Die quantitative Bestimmung der Aminosäuren konnte an einem Amino Acid Analyzer Unichrom der Fa. Beckman vorgenommen werden. Unter den Hydrolysebedingungen wird S-Iso-propylthiocystein teilweise zerstört. Die Elementaranalysen wurden an einem Elemental Analyzer der Fa. Perkin-Elmer durchgeführt.

Für die Dünnschichtchromatogramme verwendeten wir Kieselgel-S-beschichtete Aluminiumfolien mit und ohne Fluoreszenzindikator der Fa. Riedel de Haen. Als Laufmittel dienten

1. n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 (v/v)
2. n-Butanol/Eisessig/Pyridin/Wasser 30:6:20:24 (v/v)

Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte nach Fixierung mit Ninhydrin. Bei Laufmittel 1 konnten Peptide mit Trt-geschützten Aminosäuren außerdem im UV-Licht (Fluotest, Hanau) sichtbar gemacht werden.

Synthesen

Die N-Boc-geschützten Aminosäuren wurden mit Boc-Azid nach l.c.^[15] synthetisiert. Das zu Synthesen verwendete Dicyclohexylcarbodiimid wurde stets als 2N Lösung in CH_2Cl_2 eingesetzt.

FRAGMENT I

Boc-Lys(Z)-ONSu

140 g (250 mmol) *Boc-Lys(Z)-Dicyclohexylammoniumsalz* werden in Äthylacetat suspendiert, mit Citronensäure und Wasser gewaschen, die Esterphase getrocknet und auf 500 ml einrotiert. Man kühlt auf 0 °C, gibt 29 g *N-Hydroxysuccinimid* zu und tropft unter Rühren 250 mmol DCC zu. Man läßt 1 h bei 0 °C, 2 h bei Zimmertemperatur und über Nacht im Kühlraum bei 4 °C reagieren. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird abgesaugt, die Lösung bei 35 °C im Vak. eingeeengt und der Rückstand wieder in Äthylacetat gelöst. Von ungelöstem Dicyclohexylharnstoff wird nochmals abfiltriert, eingeeengt und der ölige Rückstand aus Äthanol/Petroläther kristallisiert.

Ausbeute: 69 g (58% d. Th.); Schmp. 94–95 °C
 $[\alpha]_{578}^{25}$: –23° ($c = 1$, in Methanol)

$C_{23}H_{31}N_3O_8$ (477.56)

Ber.	C 57.84	H 6.54	N 8.80
Gef.	C 57.91	H 6.44	N 8.66

Boc-Cys(SiPr)-ONSu

28.5 g (100 mmol) *Boc-Cys(SiPr)*^[16] werden mit 100 mmol *N-Hydroxysuccinimid* in 300 ml Äthylacetat gelöst und bei 0 °C unter Rühren mit 100 mmol DCC versetzt. Man läßt 1 h bei 0 °C, 2 h bei Zimmertemperatur und 12 h bei 4 °C reagieren, erwärmt auf 40–50 °C, filtriert vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, wäscht mit warmem Äthylacetat nach, engt ein und kristallisiert aus Äthanol.

Ausbeute: 28 g (69% d. Th.); Schmp. 124–125 °C
 $[\alpha]_{578}^{25}$: –117° ($c = 1$, in Methanol)

$C_{15}H_{24}N_2O_6S_2$ (392.51)

Ber.	C 45.89	H 6.16	N 7.14	S 16.34
Gef.	C 45.81	H 6.30	N 7.21	S 16.45

Boc-Gly-ONSu^[17]

26.2 g (150 mmol) *Boc-Gly* werden in 500 ml Äthylacetat gelöst. Man fügt 17.4 g *N-Hydroxysuccinimid* zu, kühlt auf 0 °C und gibt unter Rühren 150 mmol DCC hinzu. Nach 1 h bei 0 °C wird 2 h bei Zimmertemperatur und 12 h bei 4 °C gerührt, 300 ml Äthylacetat zugeben, erwärmt und vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Die Lösung wird bei 35 °C im Vak. eingeeengt und das zurückbleibende Öl aus Äthylacetat kristallisiert.

Ausbeute: 37 g (91% d. Th.); Schmp. 168–170 °C

$C_{11}H_{16}N_2O_6$ (272.27)

Ber.	C 48.53	H 5.92	N 10.29
Gef.	C 48.59	H 6.01	N 10.39

Boc-Ile-ONSu

69 g (300 mmol) *Boc-Ile* werden in 600 ml Äthylacetat gelöst, mit 34.8 g *N-Hydroxysuccinimid* versetzt und auf

0 °C gekühlt. Man tropft 300 mmol DCC zu, läßt 1 h bei 0 °C, 2 h bei Zimmertemperatur und 12 h bei 4 °C reagieren, filtriert den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, engt im Vak. bei 35 °C ein und kristallisiert das zurückbleibende Öl aus Äthanol/Petroläther.

Ausbeute: 62 g (63%); Schmp. 101–103 °C
 $[\alpha]_{578}^{25}$: –42° ($c = 1$, in Methanol)

$C_{15}H_{24}N_2O_6$ (328.37)

Ber.	C 54.87	H 7.37	N 8.53
Gef.	C 54.69	H 7.45	N 8.55

Gly-Lys(Z)

28 g (100 mmol) *N^ε-Benzyloxycarbonyllysine* werden in 100 ml Wasser suspendiert, mit einer Lösung von 200 mmol $NaHCO_3$ in 100 ml Wasser versetzt, 1 h gerührt und langsam mit einer Lösung von 27.2 g *Boc-Gly-ONSu* in 200 ml Dioxan versetzt. Man läßt zwei Tage reagieren, gibt 200 mmol Essigsäure hinzu und engt im Vak. ein. Der Rückstand wird in 600 ml Äthylacetat aufgenommen und die Esterphase zweimal mit Wasser, zweimal mit 0.5N HCl und wieder mit Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und einrotiert. Das erhaltene Öl läßt sich nicht kristallisieren, ist aber chromatographisch rein. Zur Abspaltung des Boc-Restes löst man das erhaltene Öl in 200 ml 1N HCl/Eisessig und läßt 30 min reagieren. Die Essigsäure wird im Vak. entfernt, das zurückbleibende Öl in wenig Chloroform aufgenommen und die Lösung unter starkem Rühren in 1.5 l Äther gegossen. Das ausfallende Dipeptid-hydrochlorid wird abfiltriert, mit Äther gewaschen und getrocknet. Das trockene, hygroscopische Hydrochlorid wird in 250 ml Wasser gelöst und der pH-Wert mit verdünnter NaOH auf 7 eingestellt. Das Dipeptid fällt aus, wird abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute: 20 g (60% d. Th.); Schmp. 198–200 °C (Zers.)
 $[\alpha]_{578}^{25}$: +2° ($c = 1$, in Methanol/2N HCl 4:1)

$C_{16}H_{23}N_3O_5$ (337.38)

Ber.	C 56.96	H 6.87	N 12.46
Gef.	C 56.76	H 6.77	N 12.45

Boc-Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z)-Diäthylammoniumsalz

33 g (50 mmol) *Gly-Lys(Z)* werden in 100 ml Wasser/100 ml Dioxan suspendiert und mit einer Lösung von 100 mmol $NaHCO_3$ in 50 ml Wasser versetzt. Nach 30 min gibt man eine Lösung von 39 g *Boc-Cys(SiPr)-ONSu* in 100 ml Dioxan zu und rührt 3 Tage bei Zimmertemperatur. Die klare Lösung wird mit 100 mmol Essigsäure versetzt und einrotiert. Der Rückstand wird in 500 ml Äthylacetat aufgenommen, die organische Phase mit Wasser, verdünnter Citronensäure und Wasser extrahiert, getrocknet und einrotiert. Das zurückbleibende Öl wird in Aceton/Äther 1:1 gelöst, mit 100 mmol *Diäthylamin* bei 0 °C versetzt und das aus-

gefallene Diäthylammonsalz abfiltriert. Aus Essigester/Äthanol wird umkristallisiert.

Ausbeute: 71 g (61 % d. Th.); Schmp. 107 - 108 °C
[α]_D²⁵₇₈: - 14° (c = 1, in Methanol)

C₂₇H₄₂N₅O₈S₂ · C₄H₁₁N (687.94)
Ber. C 54.12 H 7.77 N 10.18
Gef. C 53.89 H 7.98 N 10.23

Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z)

50 mmol *Boc-Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z)* (aus 34.4 g des oben beschriebenen Salzes freigesetzt) werden 30 min mit 100 ml 1N HCl/Eisessig behandelt. Der Eisessig wird im Vak. abgedampft, das zurückbleibende Öl noch zweimal mit Eisessig nachrotiert und der Rückstand in wenig Chloroform gelöst. Man gießt unter starkem Rühren in 1 l Äther, filtriert das ausgefallene Hydrochlorid ab und trocknet über KOH im Exsikkator.

Zur Reinigung löst man das Hydrochlorid in 200 ml Wasser und stellt mit einer äquivalenten Menge NaHCO₃ den pH-Wert auf 7 ein. Das Peptid wird abfiltriert, in Aceton suspendiert, wieder abgesaugt und getrocknet.

Ausbeute: 22 g (83 % d. Th.); Schmp. 200 - 202 °C (Zers.)
[α]_D²⁵₇₈: - 20° (c = 1, in Methanol/1N HCl 9:1)

C₂₂H₃₄N₄O₆S₂ (514.68)
Ber. C 51.34 H 6.66 N 10.88 S 12.46
Gef. C 51.26 H 6.63 N 10.97 S 12.32

Boc-Ile-Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z)

25.5 g (50 mmol) *Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z)* werden in 150 ml Dioxan suspendiert und mit einer Lösung von 8.4 g NaHCO₃ in 100 ml Wasser versetzt. Nach 30 min gibt man unter Rühren eine Lösung von 16.4 g *Boc-Ile-ONSu* in 150 ml Dioxan zu und läßt 3 Tage reagieren. Durch Zugabe von 100 mmol Eisessig wird neutralisiert und die Lösung eingeeengt. Der Rückstand wird in 500 ml Äthylacetat aufgenommen. Unlösliches, nicht umgesetztes Tripeptid wird abzentrifugiert, der Überstand erwärmt und mit verdünnter Citronensäure und Wasser gewaschen. Das Tetrapeptid kann aus Äthylacetat/Äther kristallisiert werden.

Ausbeute: 21 g (58 % d. Th.); Schmp. 189 - 192 °C
[α]_D²⁵₇₈: - 67° (c = 1, in Methanol)

C₃₃H₅₃N₅O₉S₂ (727.96)
Ber. C 54.45 H 7.34 N 9.62 S 8.81
Gef. C 54.24 H 7.27 N 9.57 S 8.99

Ile-Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z)

18.1 g (25 mmol) *Boc-Ile-Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z)* werden in 25 ml Eisessig gelöst und mit 4.2 ml (33.5 mmol) Bortrifluorid-ätherat versetzt. Nach 2.5 h wird im Vak. bei 30 °C das Lösungsmittel abgezogen, der Rückstand nochmals in Eisessig gelöst, wieder abrotiert und in wenig Chloroform aufgenommen. Man gießt in 1 l absol. Äther

und filtriert das ausfallende Peptid ab. Zur Reinigung wird in Wasser gelöst und mit NaHCO₃ auf pH 7 gebracht. Das Peptid fällt aus, wird abfiltriert und nochmals in Wasser mit wenig Citronensäure in Lösung gebracht. Durch Neutralisieren fällt das Tetrapeptid wieder aus, wird abgesaugt und über P₂O₅ getrocknet.

Ausbeute: 12 g (77 % d. Th.); Schmp. 180 - 182 °C (Zers.)
[α]_D²⁵₇₈: - 48° (c = 1, in Methanol/1N HCl 9:1)
Der Drehwert wurde sofort nach Lösen des Peptids bestimmt.

C₂₈H₄₅N₅O₇S₂ (627.84)
Ber. C 53.57 H 7.22 N 11.15 S 10.21
Gef. C 53.28 H 7.15 N 10.92 S 10.48

Aminosäureanalyse siehe Tabelle.

Boc-Lys(Z)-Ile-Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z)

6.2 g (10 mmol) *Ile-Cys(SiPr)-Gly-Lys(Z)* werden in 100 ml Dioxan suspendiert und mit einer Lösung von 1.6 g NaHCO₃ in 30 ml Wasser versetzt. Nach 1 h gibt man 4.8 g *Boc-Lys(Z)-ONSu* in 100 ml Dioxan zu und läßt 2 Tage reagieren. Zu der klaren Lösung gibt man 20 mmol Eisessig und engt im Vak. ein. Das gallertig-fest ausfallende Peptid wird durch Erwärmen in Äthylacetat gelöst, die organische Phase mit verd. Citronensäure und Wasser extrahiert, getrocknet und eingeeengt. Das fest ausfallende Peptid wird aus Aceton/Äther kristallisiert, abfiltriert und auf der Nutsche mit Äther gewaschen.

Ausbeute: 6.5 g (66 % d. Th.); Schmp. 108 - 112 °C
[α]_D²⁵₇₈: - 64° (c = 1, in Methanol)

C₄₇H₇₁N₇O₁₂S₂ (990.27)
Ber. C 57.01 H 7.23 N 9.90 S 6.48
Gef. C 56.78 H 7.12 N 9.83 S 6.23

Aminosäureanalyse siehe Tabelle.

FRAGMENT II

Boc-His(Trt)-OMe^[12]

26.9 g (100 mmol) *Boc-His-OMe*^[18] werden in 150 ml Methylchlorid gelöst und bei 0 °C mit 16 ml Triäthylamin und 54 g *Tritylchlorid* versetzt. Man rührt 12 h bei Zimmertemperatur, gibt weitere 300 ml Methylchlorid hinzu und wäscht die organische Phase mit Wasser, zweimal mit Citronensäurelösung, zweimal mit Wasser, fünfmal mit 1N NaHCO₃-Lösung und Wasser. Nach dem Trocknen über MgSO₄ wird das Lösungsmittel abgedampft und der Rückstand in 150 ml Methanol gelöst. Im Kühlschrank fällt Tritylalkohol aus, der abfiltriert wird. Das Methanol wird im Vak. abgedampft. Das zurückbleibende ölige Produkt kann nicht kristallisiert werden.

Ausbeute: 40 g (78 % d. Th.)
C₃₁H₃₃N₃O₄ (511.63)

His(Trt)-OMe^[12]

25.5 g (50 mmol) *Boc-His(Trt)-OMe* werden mit 100 ml 1N HCl/Eisessig 30 min lang behandelt. Nach dem Abdampfen des Eisessigs bleibt ein Öl zurück, das in wenig Chloroform gelöst wird. Die Lösung gießt man unter Rühren in 1 l absol. Äther. Das fest ausfallende, rohe Hydrochlorid wird abfiltriert und über KOH getrocknet. Zur Abtrennung von Histidin-methylester, der als Nebenprodukt entsteht, wird das Hydrochlorid in Wasser gelöst, mit NaHCO₃ neutralisiert und die wäßrige Phase dreimal mit Chloroform extrahiert. Die Chloroformphase wird dann noch dreimal mit Wasser extrahiert und getrocknet. Die Verunreinigung bleibt bei diesem Verfahren in der wäßrigen Phase. Nach dem Abdampfen des Chloroforms kann das Produkt aus Äther kristallisiert werden.

Ausbeute: 13 g (63% d. Th.); Schmp. 122 °C

[α]_D²⁵: + 7° (c = 1, in Methanol)

C₂₆H₂₅N₃O₂ (411.51)

Ber. C 75.88 H 6.12 N 10.26

Gef. C 75.36 H 6.23 N 10.09

N^G-Tosylarginin^[13]

100 g (324 mmol) *N^α-Benzyloxycarbonylarginin*^[19] werden in 500 ml Wasser/600 ml Aceton suspendiert. Durch Zugabe von NaOH wird das Produkt bei pH 13 in Lösung gebracht. Man kühlt auf 0 °C, stellt mit verd. HCl den pH-Wert zurück auf 11 und gibt dann 250 ml *Tosylchlorid*-Lösung (50 g Tosylchlorid in 250 ml Aceton) hinzu. Durch einen pH-Stat wird der pH-Wert durch Zugabe von 4N NaOH konstant bei 11 gehalten. Nach einer Stunde gibt man weitere 250 ml *Tosylchlorid*-Lösung hinzu. Nach 2 h werden die letzten 250 ml *Tosylchlorid*-Lösung zugetropft. Man läßt über Nacht bei pH 11 weiterreagieren und dampft dann das Aceton im Vak. ab, füllt mit Wasser auf (ca. 1.6 l) und extrahiert viermal mit je 250 ml Äther. Die wäßrige Phase wird auf pH 7 gebracht, nochmals zweimal mit Äther extrahiert und mit 5N HCl auf pH 2 angesäuert. Das ausfallende Öl wird mit Äthylacetat extrahiert. Die vereinigten Essigesterphasen werden dann mit Wasser säurefrei gewaschen. Nach dem Trocknen und Abdampfen des Essigesters bleibt *N^α-Benzyloxy-N^G-tosylarginin* als Öl zurück.

Zur Abspaltung des Z-Restes wird das Öl in 250 ml Eisessig durch Erwärmen gelöst. Man kühlt dann auf 0 °C, gibt 250 ml 4N HBr/Eisessig zu und läßt 2 h bei Zimmertemperatur reagieren. Der Eisessig wird abrotiert und der ölige Rückstand in 1.5 l Wasser durch Erwärmen gelöst. Von Unlöslichem wird abfiltriert und die wäßrige Phase fünfmal zur Entfernung des Benzylbromids mit Äther extrahiert. Die wäßrige Phase wird im Vak. auf 300 ml eingeeengt und auf pH 6 gebracht. Im Kühlschrank kristallisiert das *N^G-Tosylarginin* aus. Es wird aus Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 45 g (43% d. Th.); Schmp. 80 - 82 °C

[α]_D²⁵: + 3 (c = 1, in Dimethylformamid)

C₁₃H₂₀O₄N₄S (328.40)

Ber. C 47.55 H 6.14 N 17.06

Gef. C 47.72 H 6.06 N 16.92

Boc-Pro-His(Trt)-OMe

20.5 g (50 mmol) *His(Trt)-OMe* werden in 100 ml Methylenchlorid gelöst. Dazu gibt man 13.5 g (100 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol (gelöst in 50 ml Dimethylformamid) und 11 g *Boc-Pro*. Bei 0 °C gibt man unter Rühren 50 mmol DCC zu, läßt über Nacht reagieren und filtriert den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels nimmt man in Äthylacetat auf, extrahiert mit Wasser, verdünnter Citronensäure, 1N NaHCO₃-Lösung und Wasser, trocknet und engt ein. Man erhält ein Öl, das sich nicht kristallisieren läßt.

Ausbeute: 42 g (69% d. Th.)

C₃₆H₄₀N₄O₅ (608.75)

Boc-Pro-His(Trt)-N₂H₃

Das oben erhaltene Öl wird in 250 ml Methanol gelöst, mit 12 ml 90proz. *Hydrazinhydrat* versetzt und 3 Tage bei Zimmertemperatur gehalten. Das bei der Reaktion ausfallende Hydrazid wird abfiltriert und aus Methanol/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 12 g (40% d. Th.) bezogen auf eingesetztes *Boc-Pro*; Schmp. 106 - 108 °C

[α]_D²⁵: - 41° (c = 1, in Methanol)

C₃₅H₄₀N₆O₄ (608.75)

Ber. C 69.06 H 6.62 N 13.81

Gef. C 69.21 H 6.51 N 13.76

Boc-Ile-Cys(Trt)-OMe

41 g (100 mmol) *Cys(Trt)-OMe · HCl*^[20] werden in 300 ml Methylenchlorid gelöst, mit 15 ml Triäthylamin, 13.5 g 1-Hydroxybenzotriazol und 23 g *Boc-Ile* versetzt und auf 0 °C gekühlt. Man tropft 100 mmol DCC hinzu, läßt über Nacht reagieren, filtriert den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und dampft das Lösungsmittel ab. Der Rückstand wird in Essigester gelöst, mit Wasser, Hydrogencarbonat und Wasser extrahiert, getrocknet und einrotiert. Das Peptid kann aus Äthylacetat/Petroläther kristallisiert werden.

Ausbeute: 38 g (65% d. Th.); Schmp. 145 °C

[α]_D²⁵: - 17° (c = 1, in Methanol)

C₃₄H₄₂N₂O₅S (590.79)

Ber. C 69.13 H 7.16 N 4.74

Gef. C 69.24 H 7.22 N 4.65

Boc-Ile-Cys(Trt)-N₂H₃

11.8 g (20 mmol) *Boc-Ile-Cys(Trt)-OMe* werden in 100 ml Methanol gelöst und mit 6 ml *Hydrazinhydrat* versetzt. Man läßt 3 Tage rühren, impft die Lösung an

und stellt kalt. Das ausgefallene Hydrazid wird abfiltriert, getrocknet und aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 9 g (76% d. Th.); Schmp. 162–163 °C
[α]_D²⁵₇₈: – 28° (c = 1, in Methanol)

C₃₃H₄₂N₄O₄S (590.79)

Ber. C 67.09 H 7.16 N 9.48

Gef. C 67.31 H 7.21 N 0.54

Boc-Ile-Cys(Trt)-Arg(Tos)

11.8 g *Boc-Ile-Cys(Trt)-N₂H₃* (20 mmol) werden in 80 ml Dimethylformamid gelöst, bei – 20 °C mit 3 ml Isoamylnitrit und 24 ml 4N HCl/Tetrahydrofuran versetzt und 30 min bei – 20 °C gehalten. Danach kühlt man auf – 50 °C, gibt 13.2 ml Triäthylamin zu und versetzt mit einer Lösung von 6.6 g *Arg(Tos)*-Triäthylammoniumsalz in 40 ml Dimethylformamid. Man hält 4 h bei – 50 °C, 12 h bei – 20 °C, 24 h bei 0 °C und 12 h bei Zimmertemperatur, gießt dann langsam in 1.5 l Wasser, dem etwas Citronensäure zugefügt ist und filtriert das fest ausfallende Peptid ab. Durch mehrmaliges Suspensieren in Wasser wird das Peptid gewaschen und dann über P₂O₅ getrocknet.

Ausbeute: 12.5 g (73% d. Th.); Schmp. 141–142 °C
[α]_D²⁵₇₈: – 17° (c = 1, in Methanol)

C₄₆H₅₈N₆O₈S₂ (887.15)

Ber. C 62.28 H 6.59 N 9.47

Gef. C 61.98 H 6.70 N 9.28

Ile-Cys(Trt)-Arg(Tos)-Hydrochlorid

13 g (15 mmol) *Boc-Ile-Cys(Trt)-Arg(Tos)* werden mit 50 ml 1N HCl/Eisessig 30 min lang behandelt. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels bei 30 °C nimmt man den Rückstand in Chloroform auf und gießt die Lösung in 1 l absol. Äther. Das Tripeptid-hydrochlorid fällt fest aus, wird abfiltriert und aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 11 g (90%); Schmp. 132 °C

[α]_D²⁵₇₈: + 11° (c = 1, in Methanol)

C₄₁H₅₀N₆O₆S₂ · HCl (823.49)

Ber. C 59.80 H 6.24 N 10.21

Gef. C 59.13 H 6.08 N 10.07

Boc-Pro-His(Trt)-Ile-Cys(Trt)-Arg(Tos)

12.2 g (20 mmol) *Boc-Pro-His(Trt)-N₂H₃* werden in 60 ml Dimethylformamid gelöst und mit 3 ml Isoamylnitrit und 24 ml 4N HCl/Tetrahydrofuran bei – 20 °C versetzt. Nach 30 min wird auf – 50 °C gekühlt und mit 13.2 ml Triäthylamin versetzt. Zu dieser Lösung gibt man eine Lösung von 20 mmol *Ile-Cys(Trt)-Arg(Tos)*-Triäthylammoniumsalz in 40 ml Dimethylformamid, hält 4 h bei – 50 °C, rührt 12 h bei – 20 °C, 24 h bei

0 °C und 12 h bei Zimmertemperatur. Man gießt dann unter starkem Rühren in 1.5 l Wasser, das etwas Citronensäure enthält und filtriert das ausfallende Peptid ab, trocknet und kristallisiert aus Methanol um.

Ausbeute: 16 g (61%); Schmp. 138–140 °C

[α]_D²⁵₇₈: – 22° (c = 1, in Methanol)

C₇₆H₈₆N₁₀O₁₀S₂ (1363.74)

Ber. C 66.97 H 6.36 N 10.27 S 4.70

Gef. C 65.98 H 6.29 N 10.14 S 4.28

Die Aminosäurenanalyse befindet sich in der Tabelle.

Literatur

1. I. Mitteil.: Hartter, P. & Weber, U. (1975) *diese Z.* 356, 693–699.
2. Habermann, E. (1968) *Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exp. Pharmacol.* 60, 220–325.
3. Gauldie, J., Hanson, J.M., Rumjanek, F.D., Shipolini, R.A. & Vernon, C.A. (1976) *Eur. J. Biochem.* 61, 369–376.
4. Lübke, K., Matthes, S. & Kloss, G. (1971) *Experientia* 27, 764–765.
5. Van Rietschoten, J., Garnier, C., Rochat, H., Lisitzky, S. & Miranda, F. (1975) *Eur. J. Biochem.* 56, 35–40.
6. Breithaupt, H. & Habermann, E. (1968) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Exp. Pathol.* 261, 252–270.
7. Jennifer, M.H., Hanson, J.M. & Soria-Herrera, C. (1974) *Brit. J. Pharmacol.* 50, 383–392.
8. Marshall, G.R. & Merrifield, R.B. (1965) *Biochemistry* 4, 2394–2401.
9. Mutter, M. & Bayer, E. (1974) *Angew. Chem.* 86, 101–102.
10. König, W. & Geiger, R. (1970) *Chem. Ber.* 103, 788–798.
11. Schnabel, E., Klostermeyer, H. & Berndt, H. (1971) *Liebigs Ann. Chem.* 749, 90–108.
12. Losse, G. & Krychowski, U. (1970) *Journal Prakt. Chem.* 312, 1097–1103.
13. Ramachandran, J. & Li, C.H. (1962) *J. Org. Chem.* 27, 4006–4009.
14. Carpino, L.A., Giza, C.A. & Carpino, B.A. (1959) *J. Am. Chem. Soc.* 81, 955–957.
15. Schnabel, E. (1967) *Liebigs Ann. Chem.* 702, 188–196.
16. Weber, U. & Hartter, P. (1970) *diese Z.* 351, 1384–1388.
17. Laufer, D.A. & Blout, E.R. (1967) *J. Am. Chem. Soc.* 89, 1246–1249.
18. Handford, B.O., Hyloton, T.A., Kung-Tsung Wang & Weinstein, B. (1968) *J. Org. Chem.* 33, 4251–4255.
19. Bergmann, M. & Zervas, L. (1932) *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 65, 1192–1201.
20. Zervas, L. & Photaki, J. (1962) *J. Am. Chem. Soc.* 84, 3887–3897.

Dr. Peter Hartter, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Tübingen, Hoppe-Seyler-Str. 1, D-7400 Tübingen.

