

Synthesen von Peptid-Derivaten der Insulinsequenzen B 1–4, B 1–5 und B 1–8 *)

von Eugen Schnabel, Henning Klostermeyer, Jacques Dahlmans und Helmut Zahn

Aus dem Deutschen Wollforschungsinstitut an der Technischen Hochschule Aachen

Eingegangen am 25. April 1967

Für neue Synthesen der Insulin-B-Kette wurden als kondensationsfähige Fragmente die Peptid-Derivate Z-Phe-Val-Asn-Gln-N₂H₃ **) (s. Tab. 1), Z-Phe-Val-Asn-Gln-His-N₂H₃ (s. Tab. 2) und Z-Phe-Val-Asn-Gln-His(Bzl)-Leu-Cys(Bzl)-Gly (s. Tab. 4) durch schrittweise Kettenverlängerung mit aktivierten Estern der entsprechenden Acylaminosäuren aufgebaut. — Das Pentapeptid-Derivat wurde auch durch Fragmentkondensation aus den Teilstücken B 1–2 und B 3–5 synthetisiert. Als N-terminale Schutzgruppen für die Sequenz B 1–5 wurden die tert.-Butyloxycarbonyl- bzw. Cholesteryloxycarbonylgruppe verglichen (s. Tab. 2); diese Derivate waren wider Erwarten in organischen Lösungsmitteln noch schlechter löslich als das Benzoyloxycarbonyl-Derivat. Das Phänomen wird anhand von Debye-Scherrer- und Langperioden-Aufnahmen diskutiert (s. Tab. 3).

Seit der ersten Synthese des Insulins¹⁾ suchen wir nach Möglichkeiten, das Hormon mit besserer Ausbeute darzustellen. Für die Vereinigung der beiden separaten Polypeptidketten zum aktiven Protein wurden inzwischen zwei wirkungsvolle Verfahren erarbeitet^{2,3)}. Durch Variation von Schutzgruppen, Kondensationsmethoden und Fragmentlängen konnten bereits beschriebene Teilstücke der Ketten in verbesserter Ausbeute oder aber neue Derivate mit günstigeren Eigenschaften, insbesondere besseren Löslichkeiten, hergestellt werden⁴⁾.

*) 64. Mitteilung über Peptide; 63. Mitt.: H. Zahn und W. Sroka, Liebigs Ann. Chem. 706, 230 (1967).

**) Alle Aminosäuren haben die L-Konfiguration. Abkürzungen und Symbole nach den Regeln der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur, J. biol. Chemistry 241, 2491 (1966), ferner Coc = Cholesteryloxycarbonyl, OSu = N-Hydroxysuccinimid-ester.

1) J. Meienhofer, E. Schnabel, H. Bremer, O. Brinkhoff, R. Zabel, W. Sroka, H. Klostermeyer, D. Brandenburg, T. Okuda und H. Zahn, Z. Naturforsch. 18b, 1120 (1963).

2) H. Zahn, B. Gutte, E. F. Pfeiffer und J. Ammon, Liebigs Ann. Chem. 691, 225 (1966).

3) Y.-c. Du, R.-q. Jiang und C.-l. Tsou, Scientia sinica 14, 229 (1965); variiert durch P. G. Katsoyannis und A. Tometsko, Proc. nat. Acad. Sci. USA 55, 1554 (1966).

4) J. Meienhofer, Acta chim. Acad. Sci. hung. 48, 171 (1966); E. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. 696, 220 (1966); M. Kinoshita und H. Klostermeyer, ebenda 696, 226 (1966); M. Kinoshita und H. Zahn, ebenda 696, 234; K. B. Mathur, H. Klostermeyer und H. Zahn, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 346, 60 (1966); H. Zahn, W. Danho und B. Gutte, Z. Naturforsch. 21b, 763 (1966).

An der α -Aminogruppe Benzyloxycarbonyl-substituierte Peptid-Derivate mit der Sequenz B 1–8 des Schafinsulins wurde sowohl mit benzyliertem^{5,6)} als auch mit ungeschütztem⁷⁾ Histidinrest beschrieben. Für die Kondensation zur ganzen B-Kette war das N^{im} -benzylierte Derivat zweckmäßiger als das ungeschützte, da sich letzteres nicht vollständig entwässern ließ und weniger löslich war⁸⁾.

Leider wird die N^{im} -Benzylgruppe nur von Natrium in flüssigem Ammoniak⁹⁾ relativ langsam von der fertigen Peptidkette entfernt. Bei dieser Reaktion wird viel Peptidmaterial zerstört, man strebt daher an, neue Insulinsynthesen ganz mit säurelabilen Schutzgruppen durchzuführen. Für die Seitengruppe des Histidins gibt es noch keine bewährte Schutzgruppe dieses Typs, man wird zunächst also ganz auf eine Maskierung der N^{im} -Funktion verzichten, aber die Insulin-B-Kette dann aus kürzeren Fragmenten als bisher zusammenfügen.

Als neue Schnittstelle im aminoterminalen Bereich der Kette bietet sich die Position B 5/6 (–His–Leu–) an, da Azidkupplungen¹⁰⁾ an dieser Stelle bereits mit hohen Ausbeuten gelangen⁷⁾. In der vorliegenden Arbeit wird die Synthese aktivierungsfähiger Derivate des Insulinteilstückes B 1–5 mit ungeschütztem Histidin beschrieben, auch wurden Derivate mit der Aminosäurefolge B 1–4 synthetisiert. Die Sequenz B 1–8 wurde noch einmal in Form des N^{im} -benzylierten Derivates aufgebaut, da die früheren Synthesen^{5,6)} nicht zu kristallinen Präparaten geführt hatten. Soweit als möglich wurden anstelle der früher benutzten Acyl-aminosäure-*p*-nitrophenylester¹¹⁾ die *N*-Hydroxy-succinimidester¹²⁾ eingesetzt, weil das die Reinigung der Peptid-Derivate erleichtert.

Synthesen im Sequenzbereich B 1–4

Alle Peptid-Derivate der Sequenz B 1–4 des Insulins wurden durch stufenweise Kettenverlängerung mit Benzyloxycarbonyl-aminosäure-*p*-nitrophenylestern in Dimethylformamid aufgebaut. Um das Tetrapeptid-Derivat racemisierungsfrei¹³⁾ mit dem nachfolgenden Insulinteilstück zu kondensieren, wurde das Hydrazid dargestellt. Weil in Proteinen die ω -Amidgruppen von Glutamin- und Asparaginresten teilweise mit Hydrazinhydrat reagieren¹⁴⁾, wurde das Hydrazid Z-Phe-Val-Asn-Gln-N₂H₃ (10) einmal von Z-Gln-NH-NH-Boc angehend aufgebaut und einmal durch Hydrazinolyse des entsprechenden Methylesters 3.

5) H. Zahn und R. Zabel, Liebigs Ann. Chem. **659**, 163 (1962).

6) C.-c. Chen, W.-t. Huang und C.-i. Niu, Scientia sinica **13**, 1235 (1964).

7) H. Zahn, J. Meienhofer und H. Klostermeyer, Z. Naturforsch. **19b**, 110 (1964).

8) H. Zahn, J. Meienhofer und E. Schnabel, Acta chim. Acad. Sci. hung. **44**, 109 (1965).

9) V. du Vigneaud und O. K. Behrens, J. biol. Chemistry **117**, 27 (1937).

10) T. Curtius, Ber. dtsh. chem. Ges. **35**, 3226 (1902).

11) M. Bodanszky, Nature [London] **175**, 685 (1955).

12) G. W. Andersson, J. E. Zimmerman und F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **85**, 3039 (1963).

13) Vgl. M. W. Williams und G. T. Young, J. chem. Soc. [London] **1963**, 466.

14) O. O. Blumenfeld und P. M. Gallop, Biochemistry **1**, 947 (1962); R. de la Burd , L. Peckham und A. Veis, J. biol. Chemistry **238**, 189 (1962); M. Zaoral, Collect. czechoslov. chem. Commun. **30**, 1853 (1965).

Tabelle 1. Derivate aus dem Sequenzbereich B 1-4

Nr.	Substanz	Analyse			Ausbeute	Schmp. (aus Lsgsm.)	[α] _D ²⁰ (c, Lsgsm.)	Lsgsm. bei Hydrierung (Hydrazinolyse)	R _F der freien Base (Mol N ₂ H ₂ ·H ₂ O/Mol Ester)
		C	H	N					
1	Z-Asn-Gln-OMe	52.9	5.92	13.7	92%	223-225° (90% ÄtOH)	-5.6° (1, DMF)	90-proz. MeOH	0.10
2	Z-Val-Asn-Gln-OMe	52.8	5.90	13.7	65	265-267° (DMF)	-37.2° (0.5, HCO ₂ H)	AcOH	0.08
3	Z-Phe-Val-Asn-Gln-OMe	54.4	6.55	13.8	75	278-279° (DMF/H ₂ O)	-26.0° (0.5, HCO ₂ H)	—	—
4	Z-Gln-N ₂ H ₂ -Boc	57.9	6.59	13.1	71	193-194° (DMF/H ₂ O)	-18.0° (1, DMF)	DMF	0.34
5	Z-Asn-Gln-N ₂ H ₂ -Boc	58.2	6.57	13.0	9.35 g	231-233° (DMF/H ₂ O)	-15.5° (0.5, DMF)	90-proz. MeOH	0.22
6	Z-Val-Asn-Gln-N ₂ H ₂ -Boc	54.8	6.65	14.2	69%	252-254° (DMF/ÄtOH)	-13.7° (1, DMF)	DMF	0.16
7	Z-Phe-Val-Asn-Gln-N ₂ H ₂ -Boc	51.7	6.34	16.7	64	260-261° (DMF/ÄtOH)	-12.5° (0.5, DMF)	—	—
8	Z-Asn-Gln-N ₂ H ₃	53.6	7.19	15.8	64	250-252° (DMF)	-10.5° (0.7, AcOH)	ÄtOH/Isopropanol	(10)
9	Z-Val-Asn-Gln-N ₂ H ₃	50.0	5.92	20.6	65	238-243° (DMF)	-12.0° (0.5, AcOH)	DMF	(20)
		49.9	6.09	20.9	75	245-248° (DMF)	-12.5° (aus 6)	(aus 6)	(20)
10	Z-Phe-Val-Asn-Gln-N ₂ H ₃	52.1	6.55	19.3	80	268-270° (DMF)	-12.7° (0.4, AcOH)	(Me ₂ N) ₃ PO	(20)
		51.7	6.31	17.3	83	242-246° (DMF)	-11.5° (0.6, AcOH)	(aus 7)	(20)
		52.2	6.37	18.9					
		55.3	6.29	16.7	0.96 g				
		55.2	7.09	16.6	75%				
		55.4	6.47	16.3	83				

Für die vollständige Umwandlung der Ester (**1**, **2**, **3**) in die Hydrazide (**8**, **9**, **10**) war jeweils ein beträchtlicher Überschuß an Hydrazinhydrat notwendig. Trotzdem wurden in keinem Fall Hinweise für eine Hydrazinolyse der ω -Amidgruppe erhalten. Beim Tri- und Tetrapeptid-Derivat war die Darstellung aus den Boc-Hydraziden (**6** und **7**) durch Behandeln mit wasserfreier Trifluoressigsäure¹⁵⁾ günstiger als die Esterhydrazinolyse, weil sich bei der Reaktion — in Dimethylformamid — mit dem Hydrazid stets nicht umgesetzter Ester abschied. Diese Schwierigkeit läßt sich durch Verwendung von Hexamethylphosphorsäuretriamid als Lösungsmittel umgehen (Tab. 1).

Synthesen im Sequenzbereich B 1—5 (Tab. 2)

Stufenweiser Aufbau

Für eine Synthese der Insulin-B-Kette mit ungeschützten Histidinresten sollte das Derivat Z-Phe-Val-Asn-Gln-His-N₂H₃ (**24**) besonders zweckmäßig sein. Das Hydrazid wurde deshalb über den entsprechenden Methylester (**23**) auf zwei Wegen, durch Azidsynthese aus den Fragmenten B 1—2 + B 3—5, und durch schrittweise Kettenverlängerung mit aktivierten Estern synthetisiert. Die Fragmentkondensation war zweckmäßiger, weil schneller, als der schrittweise Aufbau; die Synthese wurde durch die ausgeprägte Schwerlöslichkeit aller Zwischenprodukte erschwert. Bereits das Dipeptid-Derivat Z-Gln-His-OME kristallisierte fast vollständig aus Dimethylformamid in der zehnfachen Gewichtsmenge.

Der geschützte Dipeptidester wurde früher schon von anderer Seite^{17, 18)} über das gemischte Anhydrid, den Cyanmethylester bzw. unter Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid und Carbonyldiimidazol als Kondensationsmittel dargestellt, diese Präparate waren aber amorph oder schmolzen bis zu 30° tiefer als das mit der *p*-Nitrophenylester-Methode gewonnene Produkt. Der Dipeptidester ließ sich ohne Veränderung der Amidgruppe glatt in das Hydrazid überführen.

Dagegen entstanden bei der katalytischen Hydrierung des Benzyloxycarbonyldipeptid-methylesters in methanolischer Salzsäure sieben Pauly-positive Substanzen. Auch Bromwasserstoff in Eisessig¹⁹⁾, Nitromethan²⁰⁾ oder flüssiger Form²¹⁾ lieferte zunächst kein einheitliches Dihydrobromid des Dipeptid-methylesters. Wurde das feingepulverte, geschützte Derivat aber in der zehnfachen Gewichtsmenge Eisessig gelöst und bei 30° zum gleichen Volumen einer 4*n* Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig getropft, so konnte das chromatographisch reine Dihydrobromid mit abso-

15) R. Schwyzer und W. Rittel, *Helv. chim. Acta* **44**, 159 (1961).

16) G. Losse, K.-H. Hoffmann und G. Hetzer, *Liebigs Ann. Chem.* **684**, 236 (1965).

17) F. Schneider, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **320**, 82 (1960).

18) H. Kappeler, *Helv. chim. Acta* **44**, 476 (1961).

19) D. Ben-Ishai und A. Berger, *J. org. Chemistry* **17**, 1564 (1952).

20) N. F. Albertson und F. C. McKay, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 5323 (1953).

21) M. Brenner und H. C. Curtius, *Helv. chim. Acta* **46**, 2126 (1963).

Tabelle 2. Derivate aus dem Sequenzbereich B 1-5

Nr.	Substanz	Analyse			Aus- beute	Schmp. (aus Lsgsm.)	[α] _D ²⁵ (c, Lsgsm.)	R _F	Konden- sations- methode
		oben	unten	Gef.					
		C	H	N					
11	Z-Phe-Val-OMe	67.0	6.85	6.78	85%	113 ^{a)} (MeOH/H ₂ O)	-16.7° (2, MeOH)	0.6	-ONp
12	Z-Phe-Val-N ₂ H ₃	66.5	6.86	7.17	10.9 g	214-216° (MeOH)	-22.7° (1, THF)	0.7	—
13	Z-Phe-Val	63.8	7.46	13.4	53%	149-151 ^{b)} (AcOÄt/P.-Äther)	-6.3° (2, MeOH)	0.8	-ONp
14	Phe-Val	66.2	6.78	6.76	67	256-258° (MeOH)	+16.8° (1, 1N/HCl)	0.75	—
15	Val-N ₂ H ₂ -Boc	63.6	7.61	10.6	1.57 g	106-107° (AcOÄt/P.-Äther)	+19.4° (1, MeOH)	0.75	—
16	Z-Phe-Val-N ₂ H ₂ -Boc	52.2	8.91	17.9	92	188-190° (DMF/H ₂ O)	-21.4° (2, DMF)	1	-OSu
17	Coc-Phe-Val-N ₂ H ₂ -Boc	63.3	7.06	11.1	12.6 g	140-142° (AcOÄt)	-16.0° (1, CHCl ₃)	1	—
18	Coc-His(Coc)-OMe	71.1	9.32	7.14	8.3 g	147-149° (AcOÄt)	+1.6° (1.7, CH ₂ Cl ₂)	1	—
19	Z-Gln-His-OMe	76.1	10.0	4.23	60	195-196 ^{c)} (H ₂ O)	-9.9° (1.5, HCO ₂ H)	0.55	-ONp
20	Z-Gln-His-N ₂ H ₃	52.9	5.85	22.8	83	192-194 ^{d)} (DMF/MeOH)	-33.2° (1, HCO ₂ H)	0.3	—
21	Z-Asn-Gln-His-OMe	52.9	5.83	23.0	96	198-201° (DMF/MeOH)	-13° (1, HCO ₂ H)	0.25	-ONp
22	Z-Val-Asn-Gln-His-OMe	52.9	5.97	17.9	8.7 g	219-221° (DMF/MeOH)	-34° (1, HCO ₂ H)	0.25	-ONp
23	Z-Phe-Val-Asn-Gln-His-OMe ^{e)}	54.0	6.26	17.4	60	230-233° (DMF/MeOH)	-27° (0.5, HCO ₂ H)	0.5	-ONp ^{e)}
24	Z-Phe-Val-Asn-Gln-His-N ₂ H ₃	53.7	6.60	17.3	55	231-232° (DMF/MeOH)	-32° (0.5, HCO ₂ H)	0.5	-N ₃ ^{b)}
25	Boc-Phe-Val-Asn-Gln-His-OMe	57.6	6.31	15.6	0.91 g	238-240° ([Me ₂ N] ₃ PO/DMF)	-36° (0.5, HCO ₂ H)	0.2	—
26	Coc-Phe-Val-Asn-Gln-His-OMe	55.9	6.49	19.6	80%	219-221° (DMSO/H ₂ O)	-17.8° (1, [Me ₂ N] ₃ PO)	0.8	-OSu
		55.0	6.79	16.0	45%	235-255° ([Me ₂ N] ₃ PO/H ₂ O)	-20.6° (1, [Me ₂ N] ₃ PO)	0	-N ₃
		64.7	8.33	11.7	97%				

a) Lit.⁶⁾ 112-113° - b) Lit.^{6,10)} 145-146° - c) Lit.¹⁷⁾ 190-191°; Lit.¹⁸⁾ 167° 174° - d) Lit.¹⁷⁾ 189-192° - e) Aminosäureanalyse: 0.86 Phe, 1.00 Val, 1.04 Asp, 1.08 Glu, 0.96 His. - f) 0.86 Phe, 1.00 Val, 1.04 Asp, 1.07 Glu, 1.16 His. - g) Schrittweiser Aufbau. - h) Fragmentkondensation.

analytisch einheitlichen *p*-Nitrophenylester, doch ließ sich dieser durch Kristallisation in Fraktionen unterschiedlicher optischer Aktivität (-5.7° bis $+3.7^\circ$, $c = 1$, in Methanol) zerlegen. Offensichtlich war bei der Aktivierung partielle Racemisierung eingetreten. Solche Fälle wurden gerade bei valinhaltigen Dipeptiden mehrfach beschrieben^{6, 25}). Dieser Versuch zeigte auch, daß das Dipeptid-Derivat nicht, wie es von anderer Seite⁶⁾ geschah, mit der Carbodiimidmethode zum Insulinaufbau benutzt werden darf.

Die Darstellung des für die *Azidsynthese* benötigten Benzyloxycarbonyl-dipeptid-hydrazides aus dem Methylester gelang nur mit einem erheblichen Überschuß an Hydrazinhydrat und erforderte selbst bei 60° in Methanol zwei Stunden. Neben dem kristallinen Hydrazid entstanden stets größere Mengen eines braunen Öles. Die Synthese über das Butyloxycarbonyl-geschützte Hydrazid **16** war zweckmäßiger.

Das Hydrazid ließ sich zwar in viel Eisessig/Tetrahydrofuran mit Nitrit umsetzen, bei Zugabe von Kaliumhydrogencarbonatlösung oder Eiswasser fiel aber ein grob-kristalliner Niederschlag aus, der sich in keinem neutralen Lösungsmittel mehr löste und auch mit Aminosäureestern nicht merklich reagierte. Diese für ein Azid ungewöhnliche Stabilität zeigt sich auch beim Erhitzen der Substanz. Die Kristalle verlieren bei $83-85^\circ$ plötzlich Gas, erstarren wieder und schmelzen endgültig bei $208-215^\circ$ nach vorherigem Sintern unter weiterer Zersetzung. Wie die Elementaranalyse zeigte, führte die vorhergehende Trocknung des Materials (60° , 15 Torr, 8 Std.) zu einem Gemisch von Amid und Folgeprodukten des Curtius-Abbaus. Das Totalhydrolysat enthielt dagegen mehr Phenylalanin als Valin sowie fünf unbekannt ninydrinpositive Substanzen. Eine Charakterisierung des Azides nach *Schwyzler* und *Kappeler*²⁶⁾ gelang nicht wegen der völligen Unlöslichkeit in den zur IR-Spektroskopie geeigneten Lösungsmitteln.

Während somit auch die konventionelle Azidsynthese¹⁰⁾ zum Aufbau des Pentapeptid-Derivates ausfiel, lieferte die „Eintopf“-Variante von *Honzl* und *Rudinger*²⁷⁾, bei der die Isolierung und Ausfällung des Azides umgangen wird, durchaus befriedigende Ergebnisse. Das so gewonnene Pentapeptid-Derivat kristallisierte leichter als das durch schrittweise Kettenverlängerung dargestellte Präparat.

Variation der Aminoschutzgruppe

Wir versuchten nun, die Löslichkeit des Pentapeptidesters durch Variation der Aminoschutzgruppe zu erhöhen und synthetisierten B 1–5 mit einem tert.-Butyloxycarbonyl-(Boc)²⁸⁾ (**25**) und auch mit einem Cholesteryloxycarbonyl-(Coc)-Rest²⁹⁾ (**26**). Die Darstellung von **25** erfolgte durch Kondensation des tert.-Butyloxycarbonyl-phenylalanin-*N*-hydroxy-succinimidesters mit dem Tetrapeptidmethylester. **26** wurde durch Azidsynthese mit Coc-Phe-Val-N₂H₂-Boc als Vorstufe aufgebaut. Die Reaktion

²⁵⁾ *B. Iselin* und *R. Schwyzler*, *Helv. chim. Acta* **43**, 1760 (1960); *St. Guttmann*, *Chimia* [Aarau] **14**, 368 (1960); *K. Lübke* und *E. Schröder*, *Z. Naturforsch.* **16b**, 765 (1961).

²⁶⁾ *R. Schwyzler* und *H. Kappeler*, *Helv. chim. Acta* **44**, 1991 (1961).

²⁷⁾ *J. Honzl* und *J. Rudinger*, *Collect. czechoslov. chem. Commun.* **26**, 2333 (1961).

²⁸⁾ *F. C. McKay* und *N. F. Albertson*, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 4686 (1957).

²⁹⁾ *P. Schellenberg*, *Angew. Chem.* **73**, 770 (1961); *H. Schühle*, Dissertation Techn. Hochschule Stuttgart 1963.

des deblockierten Pentapeptidmethylesters mit Cholesteryloxycarbonylchlorid³⁰⁾ in Gegenwart von Triäthylamin führte ebenfalls zu **26**, doch war in diesem Falle eine Reinigung durch Säulenchromatographie an Kieselgel notwendig.

Überraschenderweise erfolgte im Peptidverband auch mit überschüssigem Cholesteryloxycarbonylchlorid keine Acylierung des Imidazolstickstoffes im Histidin, wogegen der Histidinmethylester glatt in das Bis-Coc-Derivat überführt wurde. Allerdings wird der Coc-Rest vom Imidazolstickstoff leicht auf Amine übertragen, so daß die Gruppe als *N*^{im}-Schutz bei der Peptidsynthese nicht brauchbar ist.

Von den *Z*-, Boc- und Coc-geschützten Pentapeptidmethylestern löste sich der *Z*-Peptidester bereits wenig in Methanol, besser in Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid, gut in Hexamethylphosphorsäuretriamid. Das Boc-geschützte Peptidderivat war in Dimethylsulfoxid mäßig, gut dagegen in Hexamethylphosphorsäuretriamid löslich, das Coc-Derivat löste sich nur in Hexamethylphosphorsäuretriamid.

Dieses Verhalten stand ganz im Gegensatz zu Erfahrungen mit anderen Peptiden²⁹⁾ und ließ vermuten, daß bei den vorliegenden Substanzen besondere Strukturmerkmale die Schwerlöslichkeit bewirken. Debye-Scherrer-Aufnahmen zeigten für alle drei Verbindungen sehr starke Reflexe bei 4.7 Å, was gut ausgebildete „pleated-sheet“-Strukturen³¹⁾ anzeigt.

Wir vermuten, daß die generelle Schwerlöslichkeit unserer Verbindungen durch zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Seitengruppen der Peptidketten im Bereich -Asn-Gln-His- hervorgerufen wird. Die Polypeptidketten sind also quasi miteinander vernetzt. Die Langperioden der drei Substanzen wurden zu 30.2 Å (Ber. 29.5 Å), 52 Å (Ber. 25–26 Å) und 69 Å (Ber. 43–46 Å) ermittelt (Tab. 3). Daraus läßt sich das unterschiedliche Löslichkeitsverhalten erklären: Das Gitter des *Z*-Pentapeptidmethylesters ist aus monomolekularen Schichten aufgebaut, deren eine Seite hydrophob, die andere hydrophil ist und das Eindringen polarer, Wasserstoffbrücken spaltender Lösungsmittel erlaubt. Das Boc-Derivat bildet dagegen doppel-molekulare Schichten aus, die beidseitig von aliphatischen tert.-Butylresten abgedeckt sein werden. — Beim Coc-Derivat ist die Schutzgruppe in gestrecktem Zustand länger als der ganze Pentapeptidrest und wird die Strukturausbildung der Kristallgitter dadurch besonders beeinflussen. Der geschätzten Länge des Moleküls von 43–46 Å steht eine tatsächliche Periode von 69 Å gegenüber. Das Kristallgitter wird also auch aus molekularen Doppelschichten aufgebaut, doch ist die Schichtdicke stark verringert. Dafür gibt es zwei Erklärungen: Entweder liegen die Peptidketten schräg in den Schichten oder die kürzeren Peptidketten liegen überlappt zwischen Doppelschichten von Cholesterinresten. In jedem Falle sollte die Löslichkeit dann geringer

³⁰⁾ V. F. Kucherov und K. A. Kocheshkov, [J. allg. Chem.] **16**, 1137 (1946) [C. A. **41**, 2703 b (1947)].

³¹⁾ L. Pauling und R. B. Corey, Proc. nat. Acad. Sci. USA **39**, 253 (1953); vgl. H. Zahn, Chimia [Aarau] **14**, 401 (1960).

sein als beim Z-Derivat und auch wohl geringer als beim Boc-Derivat, weil der Coc-Rest stärkere hydrophobe Schichten ausbilden wird als der Boc-Rest.

Tabelle 3. Röntgenreflexe (Å) von Pulveraufnahmen der Verbindungen X-Phe-Val-Asn-Gln-His-OMe. A: Kießig-Kamera; B: Debeye-Scherrer-Kamera; C: Errechnete Länge des Moleküls in gestrecktem Zustand (Aminosäurerest = 3.6 Å, zwischenmolekularer Abstand = 3.0 Å, Z-Rest = 8.5 Å, Boc-Rest = 4—4.5 Å (geschätzt), Coc-Rest = 22—25 Å (geschätzt))

	X = Z (23)	X = Boc (25)	X = Coc (26)
A	(30.2, gelöscht?)	52	69
B	15.1 st (2. Ordnung von A?)	—	17.3 ss (4. Ordnung von A)
	10.3 st	10.1 st	10.8 st
	9.2 s	—	—
	7.6 m	—	7.3 ss
	—	5.2 m	5.5 s (diffus)
	4.7 sst	4.7 sst	4.7 sst
	3.9 st (diffus)	4.0 st (diffus)	3.9 st (diffus)
C	29.5	25—26	43—46

Es wird interessant sein, in die ω -Amidgruppen der Asparagin- und Glutaminreste hydrophobe Gruppen einzuführen³²⁾ und zu prüfen, ob die Derivate der Insulinsequenz B 1—5 dann in organischen Lösungsmitteln leichter löslich werden.

Die Hydrazinolyse des Z-Pentapeptid-methylesters in Hexamethylphosphorsäure-triamid/Dimethylformamid führte gewöhnlich zu einheitlichem Hydrazid, das wegen seiner extremen Schwerlöslichkeit sofort auskristallisierte. Bei größeren Ansätzen war das Hydrazid gelegentlich noch mit Methylester kontaminiert; die Verunreinigung konnte in Dimethylformamid durch Säurezugabe entfernt werden: Das doppelt protonisierbare Hydrazid wird dann wesentlich löslicher als der Ester, der nur am Imidazolring protonisierbar ist. Dimethylsulfoxid war für die Hydrazinolyse des Pentapeptidesters weniger geeignet, bei längerer Reaktionszeit kam es gelegentlich zur Erniedrigung der Histidinwerte.

Synthesen im Sequenzbereich B 1—8 (Tab. 4)

Diese Arbeiten sind im wesentlichen eine Wiederholung der Synthese von *Zahn* und *Zabel*⁵⁾ mit dem Ziel, auch die höheren Peptid-Derivate dieser Reihe, welche bisher nur amorph anfielen, kristallin zu erhalten. Beim Hexapeptid-Derivat gelang die Kristallisation aus Dimethylformamid/Essigester in der Hitze, das Heptapeptid-Derivat kristallisierte schließlich nach längerem Stehen bei Raumtemperatur aus Dimethylformamid. Das Oktapeptid-Derivat wurde nur amorph erhalten, und zwar nach wiederholtem Umfällen aus Dimethylformamid mit Essigester und Äthanol je nach den Trocknungsbedingungen wasserfrei oder als Mono- bzw. Di-hydrat. Die Schmelzpunkte sind aber wesentlich höher als früher beschrieben.

³²⁾ S. Akabori, S. Sakakibara und Y. Shimonishi, Bull. chem. Soc. Japan **37**, 433 (1964); F. Weygand, W. Steglich, J. Bjarnason, R. Akhtar und M. M. Khan, Tetrahedron Letters [London] **1966**, 3483.

Tabelle 4. Derivate aus dem Sequenzbereich B 1—8

Nr. a)	Substanz	Ausb.	Schmp.	$[\alpha]_D^{25}$	(c, Lsgsm.)
27 A	Z-His(Bzl)-Leu-Cys(Bzl)-Gly-OÄt	85 %	150—151°	—35.5°	(2, AcOH)
B		84	147—148°	—32°	(1, AcOH)
C		11.2 g/76 %	145—147°	—33.2°	(2, AcOH)
28 A	Z-His(Bzl)-Leu-Cys(Bzl)-Gly	78	195—196°	—42.0°	(2, DMF)
B		85	192—193°	—33°	(1, AcOH)
C		81	194—196°	—40.5°	(2, DMF)
29 A	Z-Gln-His(Bzl)-Leu-Cys(Bzl)-Gly	75	225—227°	—39.7°	(1, AcOH)
B		76	226—228°	—37.5°	(1, AcOH)
C		86	226—227°	—39.3°	(1, AcOH)
30 A	Z-Asn-Gln-His(Bzl)-Leu-Cys(Bzl)-Gly	71	205—208°	—33.9°	(1, AcOH)
B		69	205—208°	—34°	(1, AcOH)
C		76	222—224°	—30.2°	(1, AcOH)
31 A	Z-Val-Asn-Gln-His(Bzl)-Leu-Cys(Bzl)-Gly	75	221—223°	—45.0°	(1, AcOH)
B		69	222—224°	—	(—)
C		75	229—230°	—43.7°	(1, AcOH)
32 A	Z-Phe-Val-Asn-Gln-His(Bzl)-Leu-Cys(Bzl)-Gly	86	215—218°	—38.8°	(2, AcOH)
B		83	229—230°	—39°	(2, AcOH)
C b)		5.6/76	233—235°	—39.1°	(1, AcOH)
				—41.5°	(0.8, DMF)
				—36.3°	
					(0.5, [Me ₂ N] ₃ PO)

a) A: Lit.⁵⁾, B: Lit.⁶⁾, C: Eigene Werte. — b) Aminosäureanalyse: 0.95 Phe, 1.00 Val, 0.98 Asp, 1.00 Glu, 1.03 Leu, 0.91 Gly; His (Bzl) und Cys (Bzl) nicht ausgewertet.

Aus Benzylloxycarbonyl-asparagin und *N*-Hydroxy-succinimid konnten wir mittels Dicyclohexylcarbodiimid keinen aktivierten Ester erhalten. Zwar schied sich stets die äquivalente Menge Dicyclohexylharnstoff ab, doch wurde immer die unveränderte Acylaminosäure zurückgewonnen. Offensichtlich wird der aktivierte Ester intermediär gebildet, ist aber sehr hydrolyseempfindlich und wird bei der Aufarbeitung infolge intramolekularer Amidkatalyse³³⁾ sehr rasch wieder verseift. Asparagin wurde deshalb ebenso wie Glutamin über den *p*-Nitrophenylester in den Peptidverband eingeführt. Bei der Darstellung des Heptapeptid-Derivates lieferte der Hydroxysuccinimidester des Benzylloxycarbonyl-valins nur 29 % Ausbeute gegenüber 75 %, die mit dem *p*-Nitrophenylester erzielt wurden.

Die aus den Benzylloxycarbonylverbindungen mit Bromwasserstoff in Eisessig gewonnenen Hydrobromide enthielten, wie die Elementaranalysen zeigen, überschüssige Mengen Bromwasserstoff³⁴⁾, lediglich das Tetrapeptid-Derivat aus **28** lag als Dihydrobromid vor (Tab. 5). Zur Freisetzung der Peptidester genügte also nicht die stöchiometrisch berechnete Menge an Triäthylamin. Da aber aktivierte Ester von Acyl-

33) S. A. Bernhard, A. Berger, J. H. Carter, E. Katchalski, M. Sela und J. Shalitin, J. Amer. chem. Soc. **84**, 2421 (1964).

34) Vgl. z. B. E. D. Nicolaidis und H. A. De Wald, J. org. Chemistry **28**, 1926 (1963).

aminosäuren in Gegenwart von Basen rasch racemisieren³⁵⁾, wurden die Esterhydrobromide wohl mit überschüssigem Triäthylamin freigesetzt, vor der Kupplung aber in die Acetate übergeführt³⁶⁾.

Tabelle 5. Hydrobromide der Peptid-Derivate X-His(Bzl)-Leu-Cys(Bzl)-Gly bei Abspaltung der Schutzgruppe aus Z-Peptiden mit $4n$ HBr in Eisessig

Ausgangs-peptid	X	Äquiv. HBr	Analyse					R_F	$[\alpha]_D^{25}$ ($c=1$, AcOH)
			C	H	Br	N	S		
28	H-	2	Ber. 48.3	5.49	20.7	10.9	4.16	0.7	-25.1
		2.5	Ber. 45.9	5.28	24.6	10.4	3.95		
		Gef. 47.5	5.54	21.8	10.7	4.29			
29	H-Gln-	2	Ber. 48.1	5.61	17.8	12.5	3.57	0.3	-20.5
		2.5	Ber. 46.1	5.37	21.3	11.9	3.42		
		Gef. 45.9	5.67	23.0	10.9	3.58			
30	H-Asn-Gln-	2	Ber. 47.4	5.57	16.8	13.8	3.16	0.2	-19.5
		2.5	Ber. 43.9	5.26	21.9	12.8	2.93		
		Gef. 43.9	5.43	20.0	12.5	2.98			

Wir danken Herrn Dr. K. Ziegler für die quantitativen Aminosäurebestimmungen, Herrn Dr. M. Spei für die Röntgenaufnahmen. Weiter danken wir dem *Gesamtverband der Textilindustrie* in der Bundesrepublik Deutschland, der *Arbeitsgemeinschaft Industrieller Forschungsvereinigungen* und dem *Bundesminister für Wirtschaft* für die Förderung des Forschungsvorhabens Nr. 1318 sowie dem *Landesamt für Forschung* des Landes Nordrhein-Westfalen. Dem *Verband der chemischen Industrie* und seinen Mitgliedsfirmen danken wir für die Überlassung von Chemikalien.

Beschreibung der Versuche

Alle *Schmelzpunkte* sind unkorrigiert. — Die R_F -Werte wurden auf Papier Nr. 2043 b der Fa. Schleicher & Schüll (aufsteigend) mit Butanol-(2)/Ameisensäure/Wasser (75:13.5:11.5; V/V) bestimmt. — Ausbeuteangaben und physikalische Konstanten sind den Tabellen zu entnehmen.

Derivate aus dem Sequenzbereich B 1-4 (Tab. 1)

Z-Phe-Val-Asn-Gln-OMe (3). — 3.55 g (7 mMol) *Z-Val-Asn-Gln-OMe*, gelöst in etwa 100 ccm Eisessig, wurden wie üblich unter kräftigem Vibrieren über *Pd-Mohr* hydriert. Nach 5 Stdn. wurde vom Katalysator abfiltriert, mit Eisessig nachgewaschen und das Filtrat i. Vak. eingengt. Der glasige Rückstand war chromatographisch einheitlich. Nach Auflösen in Dimethylformamid wurden 3.00 g (7.1 mMol) *Z-Phe-ONp*³⁷⁾ zugegeben. Nach 3 Tagen bei Raumtemperatur und weiteren 48 Stdn. bei 40° wurde das Material durch Zugabe von Essigester und Äther ausgefällt, abgesaugt und gut mit Aceton gewaschen. Der Rückstand wurde unter Erhitzen in Dimethylformamid gelöst; nach dem Filtrieren wurde der Lösung so lange

³⁵⁾ M. Bodanszky und C. A. Birkhimer, *Chimia* [Aarau] **14**, 368 (1960).

³⁶⁾ R. Schwyzer und P. Steber, *Helv. chim. Acta* **49**, 134 (1966).

³⁷⁾ M. Goodman und K. C. Stueben, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 3980 (1959).

Wasser zugesetzt, bis eine amorphe Fällung eintrat. Nach Erwärmen auf 90° und einigem Stehenlassen erfolgte Kristallisation. Es wurde nochmals in gleicher Weise umkristallisiert und die Kristalle gut mit Äthanol und Aceton gewaschen. Rückstand 2.5 g (56%), Schmp. 278–279°. Weitere 0.8 g (18%) wurden aus den Mutterlaugen nach dem Einengen durch Umkristallisieren erhalten.

Z-Asn-Gln-N₂H₂-Boc (5). — 10.5 g (26.5 mMol) *Z-Gln-NH-NH-Boc* wurden unter Erhitzen in 400 ccm Methanol gelöst und wie üblich katalytisch hydriert. Nach dem Aufarbeiten erhielt man ein chromatographisch einheitliches Glas, das in 10 ccm Dimethylformamid mit 10.8 g (28 mMol) *Z-Asn-ONp*³⁸⁾ umgesetzt wurde. Nach 30 Min. war der Kolbeninhalt zu einem Gel erstarrt, dem nach 20 Stdn. 80 ccm heißes Dimethylformamid und 5 ccm Wasser zugesetzt wurden (Kristallisation). Schließlich wurden 13.5 g (100%) vom Schmp. 214–217° abfiltriert und wiederholt aus 90-proz. Dimethylformamid umkristallisiert. Ausbeute 9.35 g (69%) vom Schmp. 231–233°.

Z-Phe-Val-Asn-Gln-N₂H₂-Boc (7). — 4.8 g *Z-Val-Asn-Gln-NH-NH-Boc* wurden unter Erhitzen in 150 ccm Dimethylformamid gelöst und mit viel Katalysator wie üblich hydrierend decarbobenzoyliert. Nach 8 Stdn. war die Reaktion, wie chromatographisch ermittelt wurde, beendet ($R_F = 0.26$ sowie Spuren bei 0.16 und 0.06); die Lösung wurde auf 3.4 g (8 mMol) *Z-Phe-ONp*³⁸⁾ filtriert und nach gründlichem Auswaschen des Katalysators i. Vak. bei 40° (Bad) auf ca. 40 ccm eingengt. Nach mehrtägigem Stehenlassen wurde die Reaktionslösung mit 40 ccm Wasser versetzt, die gelatinöse Fällung abgesaugt und gut mit Methanol, Essigester und Äther gewaschen, wobei 3.8 g (64%) **7** vom Schmp. 260–263° amorph anfielen. **7** wurde durch Behandeln mit Dimethylformamid/Äthanol gereinigt.

Z-Asn-Gln-N₂H₃ (8). — Zu 192 mg (0.47 mMol) *Z-Asn-Gln-OMe* (1) in 15 ccm 90-proz. Äthanol/Isopropanol (1:1) wurden 0.25 ccm (5 mMol) *Hydrazinhydrat* gegossen. Bereits nach kurzer Zeit begann die Kristallisation des Hydrazides. Nach 20 Stdn. wurde abgesaugt und der Rückstand gut mit Essigester und Äthanol gewaschen und schließlich aus 30 ccm 80-proz. Äthanol umkristallisiert; Schmp. 250–252°.

Z-Phe-Val-Asn-Gln-N₂H₃ (10). — a) 1.2 g **3** wurden unter Erhitzen in 10 ccm Dimethylformamid gelöst und in die noch heiße Lösung 0.5 ccm *Hydrazinhydrat* eingetragen. Alsbald schied sich das gelatinöse Hydrazid ab und wurde schließlich mehrmals aus Dimethylformamid/Wasser umgefällt, wobei 0.96 g **10** anfielen. Die Hydrazinolyse gelingt auch in 5 ccm Hexamethylphosphorsäuretriamid. Das Hydrazid bleibt dann in Lösung und wird mit Essigester/Äther ausgefällt.

b) 1.0 g **7** wurden bei 0° unter N₂ mit 10 ccm *Trifluoressigsäure* übergossen. Dabei ging **7** ziemlich rasch in Lösung. Nach 60 Min. bei 20° wurde die Trifluoressigsäure i. Vak. abgezogen und der Rückstand mit Äther behandelt. Der Rückstand wurde abgesaugt und durch Waschen mit Hydrogencarbonatlösung von anhaftender Säure befreit. Schließlich wurde mehrfach aus 95-proz. Dimethylformamid umgelöst, wobei 0.75 g **10** anfielen.

Derivate aus dem Sequenzbereich B 1–5 (Tab. 2)

Z-Phe-Val-N₂H₃ (12). — 20.6 g (50 mMol) *Z-Phe-Val-OMe* (11) und 25 ccm (~500 mMol) *N₂H₄·H₂O* in 300 ccm absol. Äthanol wurden 4 Tage bei 20° stehengelassen, dann noch

³⁸⁾ M. Bodanszky und V. du Vigneaud, J. Amer. chem. Soc. **81**, 5688 (1959).

1 Stde. auf 60° erhitzt und abgekühlt. Das ausgeschiedene Gel wurde scharf abgesaugt, mit wenig Methanol und Äther gewaschen und in siedendem Tetrahydrofuran gelöst. Durch tropfenweise Zugabe von Cyclohexan fiel **12** zunächst gelatinös, bei anhaltendem Sieden dann kristallin an. 15.7 g (76%) vom Schmp. 208–210°, nach Umkristallisation aus Methanol 10.9 g (53%) vom Schmp. 214–216°.

Phe-Val (**14**). — 3.0 g *Z-Phe-Val* (**13**) in 60 ccm Äthanol, 10 ccm Eisessig + 30 ccm H₂O, wurden an *Pd-Mohr* 2 Stdn. hydriert. Nach Abfiltrieren vom Katalysator wurde i. Vak. eingedampft, der kristalline Rückstand in 50 ccm Tetrahydrofuran gelöst und mit 200 ccm Cyclohexan als Gel gefällt, dann unter Zugabe von wenig Methanol bis zur völligen Kristallisation erhitzt.

Z-Phe-Val-N₂H₂-Boc (**16**). — 6.7 g *Val-N₂H₂-Boc* (**15**), durch Hydrierung von *Z-Val-N₂H₂-Boc*³⁹⁾ erhalten, wurden in 50 ccm Essigester gelöst und bei 0° mit 11.9 g *Z-Phe-OSu*¹²⁾ umgesetzt. Dabei schied sich sofort ein steifer Niederschlag ab, nach 12stdg. Rühren bei Raumtemperatur wurde abgesaugt und aus Dimethylformamid/H₂O umkristallisiert.

Coc-Phe-Val-N₂H₂-Boc (**17**). — 8.4 g (17 mMol) **16** wurden in 100 ccm absol. Methanol an *Pd* hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Abdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in absol. Methylenchlorid gelöst und mit 8.7 g (19 mMol) *Cholesteryloxy-carbonylchlorid*³⁰⁾ versetzt. Dann wurden bei 0° in 1/2 Stde. 2.5 ccm (19 mMol) *Triäthylamin* zugetropft. Nach Stehenlassen über Nacht wurde abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde i. Vak. eingeeengt, der Rückstand in Essigester gelöst und mit Citronensäure, NaHCO₃ und Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Na₂SO₄ wurde i. Vak. eingeeengt, der Rückstand mit der vorher abfiltrierten Fraktion vereinigt und aus Essigester umkristallisiert.

Z-Asn-Gln-His-OMe (**21**). — 8.60 g (20 mMol) feingepulvertes *Z-Gln-His-OMe* (**19**) wurden langsam unter Rühren bei 40° in 85 ccm Eisessig gelöst, dann allmählich in 85 ccm *4n HBr/AcOH* eingetropft. Nach 1 Stde. wurde die Lösung in 300 ccm absol. Äther gerührt. Das Estersalz fiel als feines Pulver aus, wurde durch Dekantieren mit Äther gewaschen, abgesaugt und i. Vak. über KOH getrocknet. 11.9 g (155%), *R_F* = 0.2. — Das hygroskopische *Hydrobromid* wurde in 50 ccm Dimethylformamid gelöst, mit 7 ccm *Triäthylamin*, 2 ccm Eisessig und 7.75 g (20 mMol) *Z-Asn-ONp*³⁸⁾ umgesetzt. Der Kolbeninhalt wurde schnell fest, nach 3 Tagen mit 5 ccm *Triäthylamin* und Äther verrieben, filtriert und der Rückstand 3 mal mit je 100 ccm Methanol ausgekocht, anschließend mit Äther gewaschen und i. Vak. bei 40° getrocknet.

Z-Phe-Val-Asn-Gln-His-OMe (**23**). — 1.0 g (1.84 mMol) **21** wurde analog **19** von der Benzoyloxycarbonylgruppe befreit. Das resultierende *Hydrobromid* wurde in 10 ccm Dimethylformamid und 10 ccm Hexamethylphosphorsäuretriamid gelöst und mit *Triäthylamin* bis zur alkalischen Reaktion des überstehenden Gasraumes umgesetzt (dafür waren 0.75 ccm \cong 5.4 mMol nötig). Nach Zugabe von weiteren 0.83 ccm (6 mMol) *Triäthylamin* wurde die Lösung bei -20° zur vorbereiteten Azidlösung gegeben. — 0.76 g (1.84 mMol) **12** waren in 10 ccm Dimethylformamid gelöst worden, die Lösung wurde auf -40° abgekühlt und mit 3.0 ccm 2.0*n* HCl/Tetrahydrofuran und 0.28 ccm (2.07 mMol) *Isoamylnitrit* umgesetzt. Nach 1/2stdg. Rühren bei -40° wurde die Lösung der Aminkomponente (s. o.) zugefügt, dann ließ

³⁹⁾ J. Meienhofer, Acta chim. Acad. Sci. hung. **48**, 171 (1966).

man die Temperatur im Laufe von 3 Tagen auf 20° steigen und fällte das Reaktionsprodukt mit Äther aus. Es wurde mit 30 ccm Methanol gut ausgekocht und mit viel kaltem Methanol und Äther gewaschen.

Z-Phe-Val-Asn-Gln-His-N₂H₃ (24). — 400 mg (0.5 mMol) **23** wurden in 6 ccm Dimethylformamid und 6 ccm Hexamethylphosphorsäuretriamid unter Erwärmen gelöst und dann mit 0.5 ccm (10 mMol) *N₂H₄·H₂O* umgesetzt. Nach 1 Tag hatte sich ein Teil des Hydrazides abgeschieden. Die Fällung wurde durch Ätherzugabe vervollständigt und abfiltriert. Das Produkt (320 mg) wurde mit heißem Methanol und Äther gewaschen.

Boc-Phe-Val-Asn-Gln-His-OMe (25). — 4.2 g (6.5 mMol) **22** wurden in 65 ccm Eisessig gelöst und bei 25° 65 ccm *4n HBr/AcOH* zugegeben. Nach 1½ Stdn. wurde das Estersalz durch Eingießen in absol. Äther gefällt, mit Äther gewaschen und i. Vak. über KOH getrocknet. — Das *Dihydrobromid* wurde in 100 ccm Dimethylformamid gelöst und mit *Triäthylamin* bis zur alkalischen Reaktion des überstehenden Gasraumes versetzt. Dann wurden 2.3 g (6.5 mMol) *Boc-Phe-OSu*⁴⁰⁾ zugegeben. Nach 3 Tagen bei Raumtemperatur war **25** teilweise ausgefallen, die Fällung wurde durch Zugabe von Wasser vervollständigt. Das gelartige Produkt wurde mit Essigester gekocht und aus Dimethylsulfoxid/Wasser kristallisiert.

Coc-Phe-Val-Asn-Gln-His-OMe (26). — 8.3 g (10.5 mMol) **17** wurden in überschüssiger *Trifluoressigsäure* gelöst und nach ½ Stde. in Wasser eingegossen, worauf das Peptidsalz ausfiel. Es wurde gut mit Wasser gewaschen und über KOH getrocknet: 6.6 g (8.63 mMol) *Coc-Phe-Val-N₂H₃·CF₃CO₂H*, Schmp. 196—197°. Das Material wurde in 150 ccm absol. Dimethylformamid gelöst und bei -40° mit 25.2 mMol *HCl* in Tetrahydrofuran und 1.31 ccm *Isoamylnitrit* umgesetzt. 40 Min. lang ließ man bei -40° rühren, neutralisierte dann mit 33.8 mMol *Triäthylamin* und gab anschließend eine gekühlte Lösung von *Asn-Gln-His-OMe* (aus 4.8 g \cong 8.6 mMol **21** wie bei **23** dargestellt) in Dimethylformamid zu. Es wurde 2 Tage weitergerührt, wobei das Reaktionsgemisch langsam Raumtemperatur erreichte. Das Präparat wurde durch Eingießen in Wasser gefällt und aus Dimethylformamid/Wasser umkristallisiert.

Derivate aus dem Sequenzbereich B 1—8 (Tab. 4)

Z-Asn-Gln-His(Bzl)-Leu-Cys(Bzl)-Gly (30). — 13 g (15 mMol) *Z-Gln-His(Bzl)-Leu-Cys(Bzl)-Gly* (29) wurden unter Erhitzen in 30 ccm absol. Eisessig gelöst und nach Abkühlen 40 ccm *4n HBr* in Eisessig zugegeben. Nach 90 Min. bei Raumtemperatur wurde mit 350 ccm absol. Äther überschichtet und durch kräftiges Schütteln gut durchgemischt, wobei sich das *Hydrobromid* als farbloses Pulver abschied. Schließlich wurde abgesaugt und gründlich mit absol. Äther nachgewaschen, wobei das Material in der Nutsche stets unter Äther gehalten wurde, und dann i. Vak. getrocknet (s. Tab. 5).

Nun wurde unter Feuchtigkeitsausschluß und vorsichtigem Erwärmen in 60 ccm Dimethylformamid gelöst und nach Zugabe von etwas *p-Nitrophenol* allmählich und unter Schütteln mit insgesamt 8.5 ccm *Triäthylamin* versetzt und der Basenüberschuß schließlich mit 2.5 ccm Eisessig gebunden. Nach Zusatz von 6.3 g (16.5 mMol) *Z-Asn-ONp*³⁸⁾ hielt man 2 Tage bei Raumtemperatur. Dann wurde i. Vak. eingengt und mit 300 ccm 5-proz. Essigsäure gefällt. Nach Abfiltrieren wurde mit wenig 50-proz. Aceton und Äthanol und schließlich mit viel

⁴⁰⁾ G. W. Anderson, J. E. Zimmerman und F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **86**, 1839 (1964).

Äther gründlich gewaschen. Trockenrückstand 13.1 g (98%); Schmp. 200—203°. Es wurde aus 50 ccm Dimethylformamid mit 150 ccm Wasser umgefällt, getrocknet und wiederholt aus heißem Dimethylformamid und Essigester kristallisiert.

Z-Phe-Val-Asn-Gln-His(Bzl)-Leu-Cys(Bzl)-Gly (32). — 6.6 g (6 mMol) *Carbobenzoxyheptapeptid* 31 wurden unter Erwärmen in 30 ccm absol. Eisessig gelöst und nach Zugabe von 30 ccm 4*n* HBr/Eisessig 1 Stde. bei Raumtemperatur gehalten. Dann wurde das Peptidhydrobromid als leicht filtrierbares farbloses Pulver ($R_F = 0.33$) erhalten und gut mit Äther gewaschen.

Schließlich löste man den Rückstand unter gelindem Erwärmen in 60 ccm Dimethylformamid und versetzte nach der Zugabe von 3.2 g (7.5 mMol) *Z-Phe-ONp*³⁷) allmählich und portionsweise mit 6.3 ccm *Triäthylamin* bis zur bleibenden Gelbfärbung und gab dann noch 0.9 ccm Eisessig zu. Man hielt 48 Stdn. bei Raumtemperatur und 24 Stdn. bei 45°. Dann wurden 10 ccm Eisessig und viel Äther zugegeben. Nach Stehenlassen hatten sich 7.4 g (100%) mit einem unscharfen Schmelzpunkt ausgeschieden. Mit wenig Essigester und Äthanol wurde gewaschen und dann aus Dimethylformamid mit Essigester umgefällt. Der Schmp. stieg auf 208—216° (6.2 g; 84%). Nach nochmaligem Umfällen aus Dimethylformamid mit Äthanol und scharfem Trocknen blieben schließlich 5.6 g (76%) vom Schmp. 230—232° zurück.

$C_{62}H_{78}N_{12}O_{13}S \cdot H_2O$ (1249.5) Ber. C 59.59 H 6.45 N 13.45 O 17.93 S 2.58
Gef. 59.62 6.53 13.53 17.68 2.53

Beim milden Trocknen (40°/15 Torr in 5 Stdn.) wurde das *Dihydrat*, Schmp. 233—235°, erhalten.

$C_{62}H_{78}N_{12}O_{13}S \cdot 2H_2O$ (1267.5) Ber. C 58.75 H 6.52 N 13.26 O 18.94 S 2.53
Gef. 58.98 6.57 13.39 18.49 2.52

[80/67]