

Synthese von Cystinpeptiden mit Sequenzen aus dem C-terminalen Bereich der Humaninsulin-A-Kette¹⁾

von Helmut Zahn*) und Edgar Th. J. Fölsche

Aus dem Deutschen Wollforschungsinstitut an der Technischen Hochschule Aachen

Eingegangen am 4. Januar 1968

Die teilweise geschützten Cysteinpeptide Z-Glu(OBu⁴)-Asn-Tyr-Cys(Bzl)-Asn, Z-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys(Bzl)-Asn (3) und Z-Ile-Cys(Bzl)-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys(Bzl)-Asn (13), die den Sequenzen 17—21, 13—21 und 10—21 in der A-Kette des Humaninsulins entsprechen, wurden durch Fragmentkondensation aufgebaut (vgl. Schema S. 166), durch Behandeln mit Natrium in flüssigem Ammoniak deblockiert und anschließend durch Luftoxydation in die Cystinpeptide 14—16 übergeführt.

Nach Wilson u. a.²⁾ besitzt ein symmetrisches Cystinpeptid mit der Sequenz 1—8³⁾ aus der B-Kette des Schafinsulins⁴⁾ im Test auf passive cutane Anaphylaxie am Meerschweinchen die immunochemischen Eigenschaften des Insulins; das teilgeschützte Cysteinpeptid der gleichen Sequenz reagiert jedoch nur mit Antikörpern gegen Insulin-B-Kette. — Die gleichen Autoren²⁾ messen aufgrund von Untersuchungen an synthetischen Teilstücken der Insulin-A-Kette dem C-terminalen Bereich dieser Kette eine besondere immunologische Bedeutung bei. Zum gleichen Ergebnis kamen auch Arquilla u. a.⁵⁾. Sie glauben, daß besonders die Tyrosyl-Reste in den Positionen A 14 und A 19 den antigenen Charakter des Insulins bestimmen.

Zur Klärung der Frage, ob sich auch Cystinpeptide mit Sequenzen aus der Insulin-A-Kette immunologisch wie das intakte Hormon verhalten können, und zur näheren Lokalisierung der Antigen-Determinante wurden die Cystinpeptide mit den Sequenzen 17—21 (14), 13—21 (15) und 10—21 (16) der Humaninsulin-A-Kette synthetisiert. Ihre Darstellung erfolgte aus den entsprechenden teilgeschützten Cystein-Peptiden

*) Karl Ziegler zum 70. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

1) 66. Mitteilung über Peptide; 65. Mitt.: J. Halström und H. Klostermeyer, Liebigs Ann. Chem. 715, 208 (1968). — 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); deutsch: Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 256 (1967). — DMF = Dimethylformamid.

2) S. Wilson, M. A. Aprile und L. Sasaki, Canad. J. Biochem. 45, 1135 (1967).

3) H. Zahn und W. Sroka, Liebigs Ann. Chem. 706, 230 (1967).

4) H. Brown, F. Sanger und R. Kitai, Biochem. J. 60, 556 (1955).

5) E. R. Arquilla, H. Ooms und J. Finn, Diabetologia 2, 1 (1966).

(vgl. Synthese-Schema S. 166) nach Deblockierung mit Natrium in flüssigem Ammoniak durch Oxydation mit Luft. Dabei konnte auch an diesen neuen Beispielen (vgl. dazu Lit.³⁾) untersucht werden, ob es hier bei der Deblockierung zu Entschwefelung⁶⁾ und Spaltung von Peptid-Bindungen⁷⁾ kommt.

Synthese der geschützten Cystein-Peptide

Die Synthese der C-terminalen Sequenzen der Humaninsulin-A-Kette erfolgte analog zu der der Schafinsulin-A-Kette⁸⁾, wobei in Position A 10⁹⁾ Isoleucin eingebaut wurde. Das Dodecapeptid-Derivat wurde aus den Fragmenten A 10–12 (**12**) und A 13–21 gewonnen. Das *Pentapeptid-Derivat* Benzyloxycarbonyl-glutamyl- γ -tert.-butylester-asparaginylyl-tyrosyl-S-benzyl-cysteinyl-asparagin (A 17–21) wurde, wie beschrieben¹⁰⁾, aus Benzyloxycarbonyl-glutamyl- γ -tert.-butylester-asparaginylyl-tyrosinazid und S-Benzyl-cysteinyl-asparagin dargestellt. Im Unterschied zum alten Syntheseplan erfolgte die Darstellung des Tripeptidhydrazids (A 17–19) nicht über den Äthylester, sondern über den entsprechenden Methylester (**2**); das Dipeptid Z-Cys(Bzl)-Asn¹¹⁾ wurde nicht über das gemischte Anhydrid, sondern in guter Ausbeute¹²⁾ nach der Nitrophenylester-Methode synthetisiert. Nach Entfernen der Benzyloxycarbonyl und der tert.-Butyl-Gruppe durch Bromwasserstoff in Eisessig konnte das Pentapeptid mit Benzyloxycarbonyl-leucyl-tyrosyl-glutaminylyl-leucinazid¹³⁾ (Sequenz A 13–16) zum geschützten Nonapeptid **3** umgesetzt werden.

Weder der Methylester¹⁴⁾ noch das Hydrazid¹³⁾ des Tetrapeptides (A 13–16) kristallisierten; beide Peptid-Derivate unterschieden sich nicht merklich in ihrer Löslichkeit. Das erschwerte die Reinigung des Hydrazids. Daher wurde das Peptid **7** nochmals aus dem Benzyloxycarbonyl-leucin-tert.-butyl-oxycarbonyl-hydrazid (**4**) nach der Nitrophenylester-Methode aufgebaut.

Dieser Weg war jedoch auch nicht vorteilhafter, da die Ausgangssubstanz ölig anfällt¹⁵⁾; auch sind die einzelnen Peptid-Derivate amorph und werden mit wachsender Peptid-Größe immer schwerer löslich. Das Tripeptid-Derivat **6** (A 14–16) mußte zur Hydrierung in Dimethylformamid gelöst werden.

⁶⁾ P. G. Katsoyannis, Amer. J. Med. **40**, 652 (1966).

⁷⁾ W. F. Benisek und R. D. Cole, Biochem. biophysic. Res. Commun. **20**, 655 (1965); W. F. Benisek, M. A. Raftery und R. D. Cole, Biochemistry [Washington] **6**, 3780 (1967).

⁸⁾ 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); H. Zahn, H. Bremer und R. Zabel, ebenda **20b**, 653 (1965).

⁹⁾ D. S. H. W. Nicol und L. F. Smith, Nature [London] **187**, 483 (1960).

¹⁰⁾ R. Zabel und H. Zahn, Z. Naturforsch. **20b**, 650 (1965).

¹¹⁾ S. J. Leach und H. Lindley, Austral. J. Chem. **7**, 173 (1954) [C. A. **49**, 6832a (1955)].

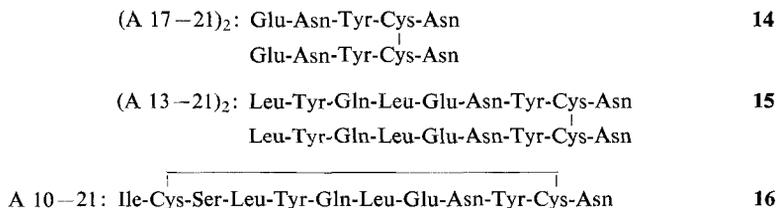
¹²⁾ H. Klostermeyer, unveröffentlicht.

¹³⁾ P. G. Katsoyannis, A. Tometsko und K. Fukuda, J. Amer. chem. Soc. **85**, 2863 (1963).

¹⁴⁾ P. G. Katsoyannis, K. Suzuki und A. Tometsko, J. Amer. chem. Soc. **85**, 1139 (1963).

¹⁵⁾ Die freie Base kristallisiert; vgl. dazu: E. Wünsch, F. Drees und J. Jentsch, Chem. Ber. **98**, 803 (1965).

Das Pentapeptid-Derivat (A 17–21) mußte vorher durch Behandeln mit Trifluoressigsäure von der tert.-Butylester-Schutzgruppe befreit werden. — Die erhaltenen Präparate ließen sich durch Gelfiltration über Sephadex G 25 in 0.1 *m* Ammoniumhydrogencarbonat bei pH 8.0 reinigen. Ihr Disulfid-Gehalt wurde polarographisch bestimmt¹⁶⁾. Nebenreaktionen bei der Deblockierung durch Natrium in flüssigem Ammoniak wurden nicht beobachtet.



Da das Dodecapeptid 13 (A 10–21) zwei Cystein-Reste enthält, können bei der Oxydation neben einem cyclischen Monomeren zwei Dimere (mit parallelen und antiparallelen Ketten) und polymere Produkte entstehen; bei stark verdünnter Lösung (1.8×10^{-4} Mol/l) war ein Überwiegen des monomeren Cystinpeptides zu erwarten. Bei der Gelfiltration wurde zunächst ein breites Spektrum von Substanzen eluiert, bevor zwei definierte Verbindungen isoliert werden konnten (Fraktionen 2 und 3 in Abb. 1). Ihre Aminosäuren-Zusammensetzung entsprach der des Dodecapeptids. Bei der Elektrophorese in alkalischem Puffer (Barbital/Natriumacetat, pH 8.6) wanderte Fraktion 2 fast doppelt so weit wie Fraktion 3.

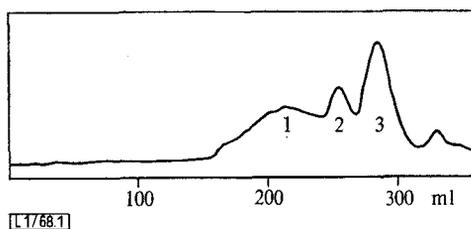


Abbildung 1. Gelfiltration der Cystinpeptide aus dem Dodecapeptid (A 10–21) an Sephadex G 25 in 0.1 *m* Ammoniumhydrogencarbonat, pH 8.0 (Säule 1.8×135 cm)

Die Konzentration des Eluats wurde kontinuierlich mittels Absorption bei 254 nm beobachtet.

Eine Molekulargewichtsbestimmung mit der Ultrazentrifuge ergab für Fraktion 3 einen Wert von 1540 g/Mol. Damit war das monomere Cystinpeptid (A 10-21) angezeigt (Mol.-Gew. 1460). Für Fraktion 2 wurde ein Wert gleicher Größenordnung erhalten. Die Natur dieser Verbindung ist nicht ermittelt worden.

¹⁶⁾ S. J. Leach, Austral. J. Chem. **13**, 520 (1960) [C. A. **55**, 16617 c (1961)].

Aufgrund der Elutionsvolumina bei der Gelfiltration und der daraus ermittelten Verteilungskoeffizienten (K_d -Werte) waren die Molekulargewichte nicht abzuschätzen¹⁷⁾, da beide Verbindungen in der Säule stark zurückgehalten werden (Abb. 2).

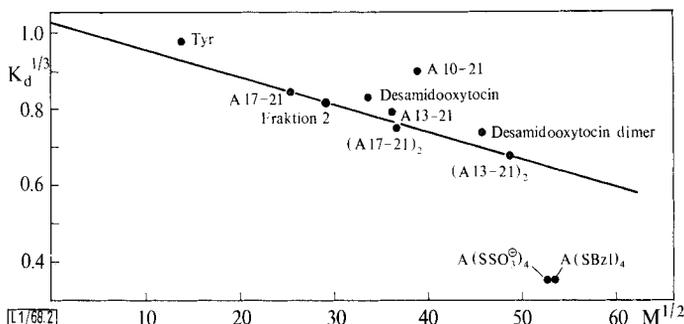


Abbildung 2. Beziehung zwischen Molekulargewicht und Elutionsvolumen bei der Gelfiltration (Verteilungskoeffizient $K_d^{1/3}$ gegen Mol-Gewicht $M^{1/2}$)

A (SBzl)₄ = Tetra-S-benzyl-Insulin-A-Kette;

A (SSO₃[⊖])₄ = Tetra-S-sulfonat der Insulin-A-Kette;

A 17–21 und A 13–21, Peptid-Derivate nach Deblockierung mit Bromwasserstoff in Eisessig

Bei der Oxydation von Cysteinyl-polyglycyl-cystein wurde beobachtet, daß fast ausschließlich das intramolekulare Disulfid gebildet wird, sobald die Ringgröße 20 Glieder erreicht^{18,19)} oder überschreitet²⁰⁾. In den untersuchten Peptiden waren N- und C-terminales Cystein durch bis zu sechs Glycin-Reste getrennt. Im hier beschriebenen Dodecapeptid liegen acht Aminosäuren dazwischen.

Das 32gliedrige cyclische Cystinpeptid wurde neben anderen Oxydationsprodukten mit einer Ausbeute von 18.7% erhalten^{18,19)}.

Nach Wilson und Mitarbeitern²¹⁾ gibt das monomere Dodecapeptid (A 10–21) schon bei einer intravenösen Dosis von 10 γ /kg eine eindeutige *passive cutane Anaphylaxie*-Reaktion (PCA) mit Meerschweinchen-Antiserum gegen Rinderinsulin. Die bei der Oxydation des Dodecapeptids erhaltene Fraktion 2 und das Peptid 15 (A 13–21)₂ reagieren bei einer Dosis von 10 γ /kg nur mit Antiserum gegen Rinderinsulin-A-Kette. Das dimere Pentapeptid 14 (A 17–21)₂ zeigt selbst bei einer Dosis von 1000 γ /kg keine Reaktion mit Antiserum gegen A-Kette oder gegen Insulin. Alle Peptide sind biologisch inaktiv.

¹⁷⁾ J. Porath, Pure appl. Chem. 6, 233 (1963); H. Determann und W. Michel, J. Chromatogr. [Amsterdam] 25, 303 (1966), dort weitere Lit.

¹⁸⁾ G. S. Heaton, H. N. Rydon und J. A. Schofield, J. chem. Soc. [London] 1956, 3157.

¹⁹⁾ D. G. Large, H. N. Rydon und J. A. Schofield, J. chem. Soc. [London] 1961, 1749.

²⁰⁾ D. Jarvis, H. N. Rydon und J. A. Schofield, J. chem. Soc. [London] 1961, 1752.

²¹⁾ S. Wilson und J. K. Davidson, unveröffentlicht; vgl. Vortrag beim 6. Kongreß der Internat. Diabetes Föderation, Kopenhagen, 30. Juli–4. August 1967.

Herrn Dr. S. Wilson und Herrn Dr. J. K. Davidson, Toronto, danken wir für die Erlaubnis, unveröffentlichte immunochemische und biologische Messungen an den Cystinpeptiden zu zitieren. Herr Dr. H.-G. Gattner bestimmte den Disulfid-Gehalt der Präparate, Herr Prof. G. Hamoir, Lüttich, führte die Messungen mit der Ultrazentrifuge aus, Herr Dozent Dr. H. Schönert half durch Hinweise bei der Auswertung. Herr Dr. K. Ziegler und Frau I. Liesenfeld übernahmen die Aminosäureanalysen. Ihnen sei nochmals gedankt.-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

Die Schmelzpunkte sind mit einem Monoskop bestimmt und nicht korrigiert. — Alle Substanzen sind, soweit sie nicht durch Niedervolt-Papierlektrophorese charakterisiert wurden, durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel HF₂₅₄ der Fa. Merck in Butanol-(2)/90proz. Ameisensäure/Wasser (150 : 27 : 23) auf ihre Einheitlichkeit untersucht worden.

Z-Asn-Tyr-OMe (1). — 20.3 g (88 mMol) *HCl-Tyr-OMe*²², gelöst in 100 ccm DMF, wurden bei 0° erst mit 12.25 ccm (88 mMol) Triäthylamin, dann mit einer Lösung von 34 g (88 mMol) *Z-Asn-ONp*²³ in 100 ccm DMF versetzt. Nach 3 tägigem Stehenlassen bei 0° wurde durch Einrühren in 2 l Wasser gefällt, der Niederschlag abfiltriert, mit Wasser gewaschen und aus Methanol umkristallisiert. Ausbeute 32 g (82%); Schmp. 193–195°; $[\alpha]_D^{23} = +5.7^\circ$ ($c = 1$; Ameisensäure).

C₂₂H₂₅N₃O₇ (443.5) Ber. C 59.58 H 5.69 N 9.48 Gef. C 59.44 H 5.64 N 9.61

Z-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr-OMe (2). — 31 g (70 mMol) **1** wurden in 100 ccm Eisessig gelöst und mit 100 ccm 5 n *HBr/Eisessig* versetzt. Nach 1 Stde. wurde durch Einrühren in 1 l absol. Äther gefällt, der Niederschlag abfiltriert, in 400 ccm DMF gelöst, dann bei 0° erst mit Triäthylamin bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt und anschließend eine Lösung von 31 g (70 mMol) *Z-Glu(OBu^t)-OSu*¹⁰ in 100 ccm DMF zugegeben. Nach 2 tägigem Stehenlassen bei 0° wurde das Peptid durch Einrühren in 2 l Wasser gefällt, abfiltriert und 2 mal aus Methanol/Wasser umgefällt. Ausbeute 35 g (80%); Schmp. 191–192°; $[\alpha]_D^{23} = -2.9^\circ$ ($c = 1$; DMF).

C₃₁H₄₀N₄O₁₀ (628.7) Ber. C 59.23 H 6.41 N 8.92 Gef. C 58.69 H 6.32 N 8.94

Z-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys(Bzl)-Asn (3). — 1) *Bereitung der Aminkomponente*: 9.22 g (10 mMol) *Z-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr-Cys(Bzl)-Asn*¹⁰ wurden 2.5 Stdn. mit 60 ccm 2 n *HBr/Eisessig* behandelt. Dann wurde durch Einrühren in 1 l absol. Äther gefällt, der Niederschlag abfiltriert, mit absol. Äther gewaschen und über KOH/P₂O₅ i. Vak. getrocknet. Darauf wurde das *Hydrobromid* in 100 ccm DMF gelöst und mit Triäthylamin bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt.

²²) R. A. Boissonnas, St. Guttman, P.-A. Jaquenoud und J.-P. Waller, Helv. chim. Acta **38**, 1491 (1955).

²³) M. Bodanszky und V. du Vigneaud, J. Amer. chem. Soc. **81**, 5688 (1959).

2) *Bereitung des Azids*: 6.15 g (9 mMol) *Z-Leu-Tyr-Gln-Leu-N₂H₃*¹⁴⁾, in 125 ccm DMF gelöst, wurden bei -30° mit 20.5 ccm (45 mMol) 2.2 *n HCl* in Tetrahydrofuran und 1.48 ccm (11 mMol) *Isoamylnitrit* versetzt^{24,25)}. Nach 30 Min. wurde mit 6.25 ccm (45 mMol) Triäthylamin neutralisiert.

3) *Kondensation*: Die *Azid-Lösung* wurde bei -30° mit der Lösung des *Amins* vereinigt. Innerhalb 15 Stdn. wurde auf 0° gebracht und 3 Tage dabei belassen. Es wurde durch Einrühren von 1.5 l wäbr. Eisessig (pH 4) gefällt, abgesaugt und 2mal mit Methanol ausgekocht. Ausbeute 9.6 g (77%); Schmp. $237-240^{\circ}$; $[\alpha]_D^{24} = -39.5^{\circ}$ ($c = 1$; Ameisensäure); -46.0° ($c = 1$; DMF). Lit.²⁶⁾; Schmp. $235-236^{\circ}$; $[\alpha]_D^{19} = -43^{\circ}$ ($c = 1$; DMF).

C₆₆H₈₆N₁₂O₁₉S (1383.5) Ber. C 57.28 H 6.26 N 12.14 O 21.96 S 2.31
Gef. 56.34 6.35 12.15 22.35 2.25

Aminosäureanalyse (24 Stdn., 6 *n HCl*, 110°):

	Asp	Glu	Leu	Tyr	(Cys) ₂	Cys(Bzl)
Theor.	2	2	2	2	—	1
Gef.	2.0	2.2	1.9	1.3	0.5	0.2

Z-Leu-N₂H₂-Boc (4). — 26.5 g (0.1 Mol) *Z-Leu*²⁷⁾ und 13.2 g (0.1 Mol) *tert.-Butylcarbazat*²⁸⁾ wurden in 150 ccm Essigester gelöst und bei 0° mit 20.6 g (0.1 Mol) *Dicyclohexylcarbodiimid* in 50 ccm Essigester versetzt. Nach 2tägigem Stehenlassen bei 0° wurde der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, der Essigester i. Vak. abdestilliert und der ölige Rückstand aus Essigester/Petroläther umgefällt. Es wurde ein öliges Produkt erhalten. Ausbeute 30.8 g (81%).

Z-Gln-Leu-N₂H₂-Boc (5). — 15.2 g (40 mMol) 4 wurden in 300 ccm Methanol gelöst und über *Palladium-Mohr* (aus 1 g PdCl₂) hydriert. Nach Beendigung der Reaktion wurde abfiltriert, i. Vak. eingedampft und der Rückstand in 100 ccm DMF gelöst. Bei 0° wurden 16 g (40 mMol) *Z-Gln-ONp*²³⁾ in 50 ccm DMF hinzugegeben. Nach 3tägigem Stehenlassen bei 0° wurde bei 40° i. Vak. eingedampft, der Rückstand in Essigester gelöst und die Lösung mit Triäthylamin-haltigem Wasser, verd. Citronensäure und Wasser ausgeschüttelt. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde eingedampft. Der Rückstand wurde aus Essigester/Petroläther umgefällt. Ausbeute 10 g (49%); Schmp. $153-155^{\circ}$; $[\alpha]_D^{23} = -19.8^{\circ}$ ($c = 1$; DMF).

C₂₄H₃₇N₅O₇ (507.6) Ber. C 56.79 H 7.35 N 13.80 Gef. C 57.03 H 7.34 N 13.54

Z-Tyr-(Bzl)-Gln-Leu-N₂H₂-Boc (6). — 12.2 g (24 mMol) 5 in 200 ccm Essigester wurden über *Palladium-Mohr* (aus 1 g PdCl₂) hydriert. Nach Beendigung der Reaktion wurde abfiltriert, eingedampft und der Rückstand in 75 ccm DMF gelöst. Bei 0° wurden 12.8 g (24 mMol) *Z-Tyr(Bzl)-ONp*²³⁾ (8a) in 50 ccm DMF zugegeben. Nach 1 Tag bei 0° und 3 Tagen bei Raumtemperatur wurde durch Einrühren in 700 ccm 0.1 *n KHCO*₃ gefällt, mit 0.1 *n KHCO*₃

²⁴⁾ J. Honzl und J. Rudinger, Collect. czechoslov. chem. Commun. **26**, 2333 (1961).

²⁵⁾ R. H. Mazur und J. M. Schlatter, J. org. Chemistry **29**, 3212 (1964).

²⁶⁾ Y. Wang und Mitarbeiter, Scientia sinica **14**, 1887 (1965) [C. A. **64**, 14 523 e (1965)].

²⁷⁾ W. Grassmann und E. Wünsch, Chem. Ber. **91**, 462 (1958).

²⁸⁾ L. A. Carpino, J. Amer. chem. Soc. **79**, 98 (1957).

gewaschen und aus viel Methanol umgefällt. Ausbeute 12 g (66%); Schmp. 230–233°; $[\alpha]_D^{23} = -24.1^\circ$ ($c = 1$; DMF).

$C_{40}H_{52}N_6O_9$ (760.9) Ber. C 63.14 H 6.89 N 11.05 Gef. C 62.76 H 6.81 N 11.44

Z-Leu-Tyr-Gln-Leu-N₂H₂-Boc (7). — Aus 2.28 g (3 mMol) **6**, das in 50 ccm DMF, wie oben beschrieben, katalytisch *hydriert* war, durch Umsetzung der filtrierten Lösung bei 0° mit 1.16 g (3 mMol) *Z-Leu-ONp*²³ in 20 ccm DMF. Verbindung **7** wurde durch Einrühren in 500 ccm 0.1 *n* KHCO₃ gefällt, mit 0.1 *n* KHCO₃ gewaschen und aus Essigester/Petroläther umgefällt. Ausbeute 1.6 g (68%); Schmp. 233–235°; $[\alpha]_D^{23} = -31.7^\circ$ ($c = 1$; DMF).

$C_{39}H_{57}N_7O_{10}$ (783.9) Ber. C 59.74 H 7.33 N 12.50 Gef. C 60.07 H 7.44 N 12.55

Z-Tyr(Z)-OSu (**8b**). — 11.2 g (25 mMol) *Z-Tyr(Z)*²⁹ und 3 g (26 mMol) *N-Hydroxy-succinimid*³⁰ in 50 ccm Essigester + 50 ccm Acetonitril wurden bei 0° mit 5.1 g (25 mMol) *Dicyclohexylcarbodiimid* in 30 ccm Essigester versetzt. Nach 1 Tag bei 0° und 1 Tag bei Raumtemperatur wurde vom Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, i. Vak. eingedampft und der Rückstand 2 mal aus Isopropanol umkristallisiert. Ausbeute 9 g (66%); Schmp. 142–144°; $[\alpha]_D^{24} = -48.3^\circ$ ($c = 1$; DMF).

$C_{29}H_{26}N_2O_9$ (546.5) Ber. C 63.73 H 4.80 N 5.13 Gef. C 63.70 H 4.66 N 4.65

Z-Tyr(Z)-Gln-Leu-OMe (**9**). — 6.55 g (16 mMol) *Z-Gln-Leu-OMe*¹⁴ wurden 1.5 Stdn. mit 40 ccm 2 *n* HBr in Eisessig behandelt. Das *Hydrobromid* wurde danach durch Einrühren in 500 ccm absol. Äther gefällt. Nach Abdekantieren des Äthers wurde der Rückstand in 50 ccm DMF gelöst, Triäthylamin bis zur schwach alkalischen Reaktion und danach eine Lösung von 8.8 g (16 mMol) **8b** in 50 ccm DMF zugegeben. Nach 3 tägigem Stehenlassen bei Raumtemperatur wurde durch Einrühren in 1 l Wasser gefällt, abgesaugt und aus Methanol umgefällt. Ausbeute 7.5 g (66%); Schmp. 203–205°; $[\alpha]_D^{23} = -17.7^\circ$ ($c = 1$; DMF).

$C_{37}H_{44}N_4O_{10}$ (704.8) Ber. C 63.06 H 6.29 N 7.95 Gef. C 62.83 H 6.20 N 7.94

Z-Tyr(Z)-N₂H₂-Boc (**10**). — 11.2 g (25 mMol) *Z-Tyr(Z)*²⁹ und 3.3 g (25 mMol) *tert.-Butylcarbazat*²⁸ in 70 ccm Essigester wurden bei 0° mit 5.1 g (25 mMol) *Dicyclohexylcarbodiimid* in 30 ccm Essigester versetzt. Nach 3 tägigem Stehenlassen bei 0° wurde wie für **8b** aufgearbeitet und mehrmals aus Methanol/Wasser umgefällt. Ausbeute 6.0 g (43%); Schmp. 135–136°; $[\alpha]_D^{23} = -18.7^\circ$ ($c = 0.7$; DMF).

$C_{30}H_{33}N_3O_8$ (563.6) Ber. C 63.93 H 5.91 N 7.46 Gef. C 64.18 H 5.86 N 7.00

Z-Ile-Cys(Bzl)-Ser-OMe (**11**). — Durch 22.3 g (50 mMol) *Z-Cys(Bzl)-Ser-OMe*³¹ in 100 ccm *Trifluoressigsäure* wurde 1.5 Stdn. *Bromwasserstoff* geleitet. Dann wurde durch Einrühren in 1 l absol. Äther gefällt, vom klebrigen Rückstand dekantiert, dieser in 200 ccm DMF gelöst, dann unter Kühlen Triäthylamin bis zur schwach alkalischen Reaktion und schließlich eine Lösung von 19.3 g (50 mMol) *Z-Ile-ONp*²³ in 75 ccm DMF zugegeben. Nach 5 Tagen bei 0° wurde durch Einrühren in 1.5 l 0.1 *n* KHCO₃ gefällt, der Niederschlag abfiltriert, mit

²⁹ E. Katchalski und M. Sela, J. Amer. chem. Soc. **75**, 5284 (1953).

³⁰ G. W. Anderson, J. E. Zimmerman und F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **86**, 1839 (1964).

³¹ St. Guttmann und R. A. Boissonnas, Helv. chim. Acta **43**, 200 (1960).

Wasser gewaschen und aus Methanol umkristallisiert. Ausbeute 14 g (50%); Schmp. 195 bis 198°; $[\alpha]_D^{24} = -31.7^\circ$ ($c = 1$; DMF) [Lit.³²]; Schmp. 196–198°; $[\alpha]_D^{27} = -31.0^\circ$ ($c = 1$; DMF).

$C_{28}H_{37}N_3O_7S$ (559.5) Ber. C 60.12 H 6.61 N 7.51 O 20.02 S 5.73
Gef. 60.17 6.62 7.64 20.08 5.84

Z-Ile-Cys(Bzl)-Ser-N₂H₃ (**12**). — 10 g (18 mMol) **11** in 100 ccm DMF + 100 ccm Butanol-(2) wurden mit 5 ccm *Hydrazinhydrat* 3 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Dabei kristallisierte **12** aus. Es wurde abgesaugt und mit Methanol und Äther gewaschen. Ausbeute 9.0 g (90%); Schmp. 219–221°; $[\alpha]_D^{25} = -31.0^\circ$ ($c = 1$; HCO₂H) [Lit.³²]; Schmp. 219–220°; $[\alpha]_D^{27} = -22.0^\circ$ ($c = 1$; DMF).

$C_{27}H_{37}N_5O_6S$ (559.7) Ber. C 57.94 H 6.66 N 12.52 S 5.72
Gef. 57.77 6.73 12.42 5.94

*Hydrazid-Stickstoff*³³: Ber. 5.00 Gef. 5.22

Z-Ile-Cys(Bzl)-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys(Bzl)-Asn (**13**). — 1) *Bereitung der Aminkomponente*: 4.15 g (3 mMol) **3** wurden 2 Stdn. lang mit 50 ccm 2 n *HBr*/Eisessig behandelt. Anschließend wurde durch Einrühren in 1 l absol. Äther gefällt, das *Hydrobromid* abfiltriert, mit absol. Äther gewaschen, über KOH/P₂O₅ i. Vak. getrocknet, in 50 ccm DMF gelöst und mit Triäthylamin bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt.

2) *Bereitung des Azids*: 1.68 g (3 mMol) **12**, gelöst in 50 ccm DMF, wurden bei –30° mit 5.4 ccm 2.8 n *HCl* in Tetrahydrofuran und 0.61 ccm (4.5 mMol) *Isoamylnitrit* versetzt^{24,25}. Nach 1 Stde. wurde mit 2.5 ccm (18 mMol) *Triäthylamin* neutralisiert.

3) *Kondensation*: Die *Azid-Lösung* wurde bei –20° mit der Lösung der *Amin-Komponente* vereinigt. Innerhalb 15 Stdn. wurde die Temperatur auf 0° gebracht und 3 Tage dabei belassen. Durch Einrühren in 700 ccm wäbr. Essigsäure vom pH 4 wurde gefällt; dann wurde abgesaugt und 2mal mit Methanol gekocht. Ausbeute 4.1 g (77%); Schmp. 259–261°; $[\alpha]_D^{25} = -37.9^\circ$ ($c = 1$; Ameisensäure).

$C_{85}H_{113}N_{15}O_{23}S_2$ (1777.1) Ber. C 57.45 H 6.42 N 11.82 S 3.61
Gef. 56.65 6.19 11.72 4.03

Aminosäureanalyse (24 Stdn., 6 n HCl, 110°):

	Asp	Ser	Glu	Ile	Leu	Tyr	Cys(Bzl)
Theor.	2	1	2	1	2	2	2
Gef.	2.2	1.0	2.3	1.0	2.1	1.6	1.9

[Glu-Asn-Tyr-Cys(-)-Asn]₂ (**14**). — 1 g (1.22 mMol) *Z-Glu(OBut^t)-Asn-Tyr-Cys(Bzl)-Asn*¹⁰ wurde zur Spaltung des tert.-Butylesters 1 Stde. mit 30 ccm *Trifluoressigsäure* behandelt. Darauf wurde durch Einrühren in 500 ccm absol. Äther gefällt und der Niederschlag erst über KOH/P₂O₅, dann über P₂O₅ bei 76° i. Vak. getrocknet. Zur weiteren Deblockierung wurde in 400 ccm frisch über Natrium destilliertem Ammoniak gelöst und mit Natrium bis zur bleibenden Blaufärbung versetzt. Nach 0.5 Min. wurde durch Zugabe von Ammonium-

³² P. G. Katsoyannis, A. Tometsko und C. Zalut, J. Amer. chem. Soc. **88**, 166 (1966).

³³ H. Medzihradzsky-Schweiger, Acta chim. Acad. Sci. hung. **34**, 213 (1962).

chlorid entfärbt, eingedampft, restliches Ammoniak über konz. Schwefelsäure i. Vak. entfernt, der Rückstand mit wenig 0.1 *n* HCl versetzt und mit verd. Ammoniak-Lösung ein pH von 8.3 eingestellt. Die Lösung wurde so lange stehengelassen (4–5 Tage), bis keine SH-Gruppen mehr nachzuweisen waren (Rotfärbung bei Zugabe einer sodaalkalischen Lösung von Nitroprussidnatrium). Nach Gelfiltration an Sephadex G 25 in 0.1 *m* NH₄HCO₃ wurde das Produkt durch Gefriertrocknung isoliert. Ausbeute 356 mg (45%); die Substanz sintert bei 180° und schmilzt ab 215°; $[\alpha]_D^{23} = -82.1^\circ$ (*c* = 0.5; 0.1 *m* NH₄HCO₃). — Zur Analyse wurde bei 40° i. Hochvak. getrocknet.

C₅₀H₆₈N₁₄O₂₂S₂ (1281.2) Ber. C 46.87 H 5.35 N 15.30 S 4.99
 Gef. 46.42 5.20 14.83 4.83
 Disulfidbestimmung¹⁶⁾: 100% S—S

Aminosäureanalyse (24 Stdn., 6*n* HCl, 110°, Phenol):

	Asp	Glu	(Cys) ₂	Tyr
Theor.	4	2	1	2
Gef.	3.9	2.0	0.82	1.9

[Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys(-)-Asn]₂ (15). — Analog 14 aus 500 mg (0.36 mMol) 3 (48 Stdn. bei 76° i. Vak. getrocknet) in 300 ccm Ammoniak. Bei pH 7.9 wurde so lange stehengelassen (6 Tage), bis keine SH-Gruppen mehr nachzuweisen waren. Nach Gelfiltration und Gefriertrocknung betrug die Ausbeute 132 mg (31%); Schmp. (Zers.) ab 240°; $[\alpha]_D^{23} = -83.8^\circ$ (*c* = 0.46; 0.1 *m* NH₄HCO₃). — Zur Analyse wurde die Substanz bei 40° i. Hochvak. getrocknet.

C₁₀₂H₁₄₆N₂₄O₃₄S₂ (2316.5) Ber. C 52.88 H 6.35 N 14.51 S 2.76
 Gef. 51.09 6.34 14.31 3.22
 Disulfidbestimmung¹⁶⁾: 84% S—S

Aminosäureanalyse (24 Stdn., 6*n* HCl, 110°):

	Asp	Glu	(Cys) ₂	Leu	Tyr
Theor.	4	4	1	4	4
Gef.	4.0	4.5	0.9	3.9	4.0

Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (16). — Analog 14 aus 1 g (0.56 mMol) 13 (15 Stdn. bei 76° über P₂O₅ getrocknet) in 400 ccm Ammoniak, jedoch wurde mit Wasser auf 3 l aufgefüllt, mit 1 *n* Ammoniak auf pH 8 gebracht und 6 Wochen stehengelassen. Nach Gefriertrocknung wurde durch Gelfiltration in 0.1 *m* NH₄HCO₃ entsalzt und fraktioniert (Abb. 1 S. 167). In einer zweiten Reinigung ließen sich die Fraktionen 2 und 3 nicht weiter auftrennen.

Fraktion 2: Ausbeute 73 mg (9%); die Substanz sintert ab 200° und schmilzt ab 260° (Zers.); $[\alpha]_D^{23} = -70.7^\circ$ (*c* = 0.5; 0.1 *m* NH₄HCO₃). — Zur Analyse wurde bei 40° i. Hochvak. getrocknet.

C₆₂H₉₅N₁₄O₂₃S₂)_n (*n* · 1468.7) Ber. C 50.70 H 6.52 N 13.35 S 4.37
 Gef. 50.62 6.51 13.04 4.37
 Disulfidbestimmung¹⁶⁾: 98.6% S—S

Aminosäureanalyse (24 Std., 6*n* HCl, 110°, Phenol):

	Asp	Ser	Glu	(Cys) ₂	Ile	Leu	Tyr
Theor.	2	1	2	1	1	2	2
Gef.	1.9	0.9	2.2	0.7	0.7	2.0	2.1

Fraktion 3 = 16: Ausbeute 153 mg (18.7%); die Substanz sintert ab 200° und schmilzt ab 250° (Zers.); $[\alpha]_D^{23} = -79.6^\circ$ ($c = 0.5$; 0.1 *m* NH₄HCO₃). Zur Analyse wurde bei Raumtemperatur i. Hochvak. getrocknet.

C₆₃H₉₃N₁₅O₂₁S₂ (1460.6) Ber. C 51.80 H 6.41 N 14.38 S 4.39

Gef. 51.43 6.36 14.14 4.52

*Disulfidbestimmung*¹⁶⁾: 115% S—S

Aminosäureanalyse (24 Std., 6*n* HCl, 110°, Phenol):

	Asp	Ser	Glu	(Cys)- ₂	Ile	Leu	Tyr
Theor.	2	1	2	1	1	2	2
Gef.	1.9	0.9	2.0	0.8	0.8	2.1	2.2

[1/68]