

Peptide, 98¹⁾

Synthese der A-Kette des Schafinsulins mit S-Tetrahydropyranylschutz

Eberhard Schwertner, Henning Klostermeyer²⁾ und Helmut Zahn^{*)***)}

Deutsches Wollforschungsinstitut an der Technischen Hochschule,
D-5100 Aachen, Veltmanplatz 8

Eingegangen am 14. Juni 1974

Die A-Kette des Schafinsulins wurde in vollständig geschützter Form synthetisiert. Dabei wurden ausschließlich besonders säurelabile Schutzgruppen verwandt, und zwar für die Carboxyl- und Hydroxyfunktionen solche vom tert.-Butyltyp, für die Thiolgruppen der Cysteinreste die Tetrahydropyranylgruppe und als Aminoschutz die 2-(*p*-Biphenylyl)isopropoxy-carbonylgruppe. Die vollständige Deblockierung der Peptidkette erfolgte mit Dirhodan in Essigsäure/Trifluoressigsäure. Nach Reinigung über das Tetra-S-sulfonat wurde das Peptid mit nativer B-Kette zu halbsynthetischem, kristallisierbarem Schafinsulin umgesetzt.

Peptides 98¹⁾. — Synthesis of the A-chain of Sheep Insulin with S-Tetrahydropyranyl Protecting Groups

The synthesis of a fully protected A-chain of sheep insulin is described. The acid labile protecting groups used were: tert. butyl substitution for the carboxylic and hydroxy functions, tetrahydropyranyl for the thiol function, and the 2-(*p*-biphenyl)isopropoxycarbonyl group for amine protection. Total deblocking was achieved with thiocyanogen in a mixture of acetic acid and trifluoroacetic acid. After purification in the tetra S-sulfonate form, the A-chain was combined with native B-chain to yield crystallizable sheep insulin.

Die Verwendung unterschiedlicher, selektiv nebeneinander und neben bereits bestehenden Disulfidbrücken absplittbarer Thiolschutzgruppen könnte eine entscheidende Verbesserung der Insulinsynthese sein³⁾. Dieses Konzept, am konsequentesten von Hiskey⁴⁾ vertreten, würde die gezielte Knüpfung der drei Disulfidbrücken des Insulinmoleküls nacheinander gestatten und damit höhere Ausbeuten und eine strukturbeweisende Synthese ermöglichen.

Eine derart systematische Synthese des Insulins konnte bisher noch nicht verwirklicht werden^{***)}, weil es an einer ausreichenden Zahl geeigneter Thiolschutzgruppen mangelt oder weil möglicherweise geeignete Schutzgruppen bisher noch gar nicht bei

*) Korrespondenz bitte an diesen Autor richten.

**) Herrn Professor Dr. Hans Netter zu seinem 75. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

***) Anmerkung bei der Korrektur (20. 6. 1975): Siehe dazu jedoch die inzwischen beschriebene Insulinsynthese unter gezielter Bildung der Disulfidbindungen, P. Sieber, B. Kamber, A. Hartmann, A. Jöhl, B. Riniker und W. Rittel, *Helv. Chim. Acta* **57**, 2617 (1974).

¹⁾ 97. Mitteilung: A. Wittinghofer, *Liebigs Ann. Chem.* **1974**, 290.

²⁾ Jetzige Anschrift: Institut für Chemie der Bundesanstalt für Milchwissenschaft, D-2300 Kiel, Hermann-Weigmannstraße 1.

³⁾ K. Lübke und H. Klostermeyer, *Advan. Enzymol.* **33**, 445 (1970).

⁴⁾ R. G. Hiskey, R. L. Smith, A. M. Thomas, J. T. Sparrow und W. C. Jones, Jr., *Peptides* 1968, S. 209, North-Holland Publishing Comp., Amsterdam 1968; R. G. Hiskey, A. M. Thomas, R. L. Smith und W. C. Jones, Jr., *J. Amer. Chem. Soc.* **91**, 7525 (1969).

so komplizierten Synthesen wie denen der Insulinketten erprobt wurden. Die Erfahrung hat nämlich gezeigt, daß eine Übertragung der von monomeren Cysteinderivaten oder kurzen cysteinhaltigen Peptiden her bekannten Eigenschaften vieler Schwefelschutzgruppen auf längere Ketten nur bedingt möglich ist.

Eine der wenig erprobten Thioischutzgruppen ist der 2-Tetrahydropyranylrest (Thp), der von *Holland* und *Cohen*⁵⁾ 1958 empfohlen wurde. Nachdem die Gruppe von *Hammerström*⁶⁾ mit gewissem Erfolg bei der Synthese von Insulinpeptiden an unlöslichen Trägern eingesetzt worden war, erschien es sinnvoll, sie auch auf ihre Brauchbarkeit für die konventionelle Peptidsynthese zu prüfen.

Syntheseplanung

Eigene Untersuchungen⁷⁾ hatten gezeigt, daß die Thp-Gruppe unter den zur Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonylgruppe (Boc) notwendigen aciden Bedingungen nicht so stabil ist, wie es für eine vielstufige Synthese erforderlich ist. Eine methodisch saubere Synthese der A-Kette des Schafinsulins mittels der konventionellen Fragmentkondensationsmethode unter Verwendung des Thp-Restes erforderte daher für den Aminogruppenschutz bei cysteinhaltigen Fragmenten eine unter noch milderen Bedingungen als der Boc-Rest abspaltbare Schutzgruppe. Hierfür erschien uns die von *Sieber* und *Iselin*⁸⁾ beschriebene 2-(*p*-Biphenyl)isopropylloxycarbonylgruppe (Bpoc-Gruppe) als besonders geeignet. Abspaltungsversuche am Cysteinderivat Bpoc-Cys-(Thp) [Dicyclohexylammoniumsalz⁹⁾] hatten gezeigt, daß die zur Entfernung der Aminoschutzgruppe geeigneten schwach sauren Medien den *S*-Tetrahydropyranylschutz nicht beeinträchtigen.

Um die fertige, mit Ausnahme der primären Amidgruppen des Asparagins (A18 und A21) und Glutamins (A5 und A15) vollgeschützte A-Kette nach selektiver Entfernung der N-terminalen Aminoschutzgruppe eventuell für weitere Synthesen (Proinsulin) verfügbar zu halten, sollte neben den cysteinhaltigen Fragmenten auch das Glycin in Position I mit der Bpoc-Gruppe versehen sein. Beim Aufbau cysteinfreier Teilstücke konnte dagegen auf die leichter zu handhabende Benzyloxycarbonylgruppe¹⁰⁾ als Aminoschutz zurückgegriffen werden.

Vorteilhafterweise gestattete⁸⁾ die Verwendung der Bpoc-Gruppe auch den Einsatz der als Schutz von Carboxyl- und Hydroxyfunktionen besonders geeigneten tert.-Butylester¹¹⁾ (OBu^t) und tert.-Butyläther¹²⁾ (Bu^t). Da sich die Thp-Gruppe mit Bromwasserstoff in Trifluoressigsäure entfernen lassen sollte⁶⁾, befanden sich also am Ende der Synthese an der geschützten A-Kette — im Einklang mit der Schwyzer-Taktik^{13,14)} — nur acidolytisch abspaltbare Schutzgruppen.

5) G. F. Holland und L. A. Cohen, J. Amer. Chem. Soc. **80**, 3765 (1958).

6) K. Hammerström, W. Lunkenheimer und H. Zahn, Makromol. Chem. **133**, 41 (1970).

7) E. Schwertner, unveröffentlichte Ergebnisse.

8) P. Sieber und B. Iselin, Helv. Chim. Acta **51**, 614, 622 (1968).

9) E. Schwertner, H. Berndt, H. G. Gielen und H. Zahn, Liebigs Ann. Chem. **1975**, 581.

10) M. Bergmann und L. Zervas, Ber. Deut. Chem. Ges. **65**, 1192 (1932).

11) G. W. Anderson und F. M. Callahan, J. Amer. Chem. Soc. **82**, 3359 (1960).

12) F. M. Callahan, G. W. Anderson, R. Paul und J. E. Zimmermann, J. Amer. Chem. Soc. **85**, 201 (1963).

13) R. Schwyzer und H. Kappeler, Helv. Chim. Acta **44**, 1991 (1961).

14) R. Schwyzer und P. Sieber, Nature (London) **199**, 172 (1963).

Der Aufbau der Kette sollte aus sechs Teilpeptiden, nämlich A 1–4, A 5–9, A 10–12, A 13–16, A 17–19 und A 20–21 erfolgen, wobei die letzte Kupplung zwischen A 1–9 und A 10–21 stattfinden sollte. Der Plan folgte damit bei der Fragmentwahl der erfolgreichen Synthese der S-tritylierten A-Kette¹⁵⁾ und unterschied sich von der ersten Insulinsynthese in unserem Arbeitskreis^{16,17)} nur durch die zusätzliche Unterteilung des C-terminalen Pentapeptids in zwei Teilstücke. Experimentelle Schwierigkeiten erzwangen später eine teilweise Änderung des Synthesepplans, worauf im folgenden näher eingegangen wird.

Syntheseverlauf

Um die bei der Abspaltung der Bpoc-Gruppe vom Dipeptidderivat Bpoc-Cys(Thp)-Ser(Bu^t)-OMe (**12**) mit 80proz. Essigsäure⁸⁾ eintretende Dioxopiperazinbildung zu unterdrücken, wurden der Reaktionslösung äquivalente Mengen Pyridiniumchlorid¹⁸⁾ zugesetzt. Die dünnschichtchromatographische Verfolgung der Deblockierung zeigte, daß sie nur in Gegenwart von Pyridiniumchlorid wirklich quantitativ verlief, daher wurde bei allen Syntheseschritten diese Variante der Bpoc-Gruppenabspaltung beibehalten.

Die Umsetzung des geschützten Pentapeptidderivates Bpoc-Gln-Cys(Thp)-Cys(Thp)-Ala-Gly-OMe (**17**) mit 80proz. Essigsäure (mit und ohne Pyridiniumchloridzusatz) lieferte neben dem gewünschten Pentapeptid-hydrochlorid oder -hydroacetat in beträchtlicher Menge (nach dünnschichtchromatographischer Abschätzung ca. 50%) ein gegen Ninhydrin negatives Nebenprodukt, bei dem es sich offensichtlich um ein Pyroglutaminsäurederivat handelt. Diese starke Nebenreaktion am N-terminalen Glutaminrest A 5 zwang uns zur Verlegung der Schnittstelle von 4–5 nach 5–6. Letztere hat sich schon bei anderen Synthesen der Insulin-A-Kette bewährt^{19–22)}. Allerdings ließ die Verwendung C-terminalen Glutamins nur noch eine Fragmentverknüpfung nach der Anhydridmethode²³⁾ oder nach König und Geiger²⁴⁾ mittels Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol zu.

Das Nonapeptidderivat der Sequenz A 1–9 konnte weder mit freier Carboxylgruppe noch als Methylester aus den entsprechenden Fragmenten A 1–5 und A 6–9 rein erhalten werden. Das veranlaßte uns schließlich, die letzte Fragmentenkupplung nicht wie vorgesehen aus den Teilpeptiden A 1–9 und A 10–21, sondern zwischen A 5 und A 6 vorzunehmen. Dazu mußte nun das Teilstück mit der Sequenz A 6–9 als Carboxylkomponente bei der Fragmentkondensation mit A 10–21 dienen. Wäh-

¹⁵⁾ H. Zahn, W. Danho, H. Klostermeyer, H. G. Gattner und J. Repin, Z. Naturforsch. **24b**, 1127 (1969).

¹⁶⁾ 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).

¹⁷⁾ H. Zahn, H. Bremer und R. Zabel, Z. Naturforsch. **20b**, 653 (1965).

¹⁸⁾ H. Klostermeyer, Chem. Ber. **102**, 3617 (1969).

¹⁹⁾ Y. Wang, J. Z. Hsu, J. Y. Loh, K. Huang und J. J. Huang, Sci. Sinica **14**, 1284 (1965).

²⁰⁾ Y. Wang, J. Z. Hsu, W. C. Chang, L. L. Cheng, H. S. Li, C. Y. Hsing, P. T. Shi, T. P. Loh, A. H. Chi, C. H. Li, Y. H. Yieh und K. L. Tang, Sci. Sinica **14**, 1887 (1965).

²¹⁾ E. Th. J. Fölsche, Dissertation Techn. Hochschule Aachen 1967.

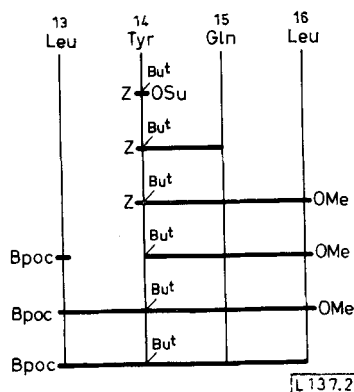
²²⁾ J. Föhles, Dissertation Techn. Hochschule Aachen 1972.

²³⁾ P. G. Katsoyannis, K. Suzuki und A. Tometsko, J. Amer. Chem. Soc. **85**, 1139 (1963).

²⁴⁾ W. König und R. Geiger, Chem. Ber. **103**, 788 (1970).

rend aus dem Tetrapeptidmethylester Bpoc-Cys(Thp)-Cys(Thp)-Ala-Gly-OMe (**16**) kein einheitliches Hydrazid hergestellt werden konnte, gelang die Verseifung zur Tetrapeptidsäure leicht.

Beim Aufbau des Tetrapeptidderivates A 13–16, Bpoc-Leu-Tyr(Bu^t)-Gln-Leu-OMe (**8**), durch stufenweise Verlängerung vom C-terminalen Ende her^{17,23,25}) ließ sich das Derivat Z-Tyr(Bu^t)-Gln-Leu-OMe nicht sauber und nur in unbefriedigenden Ausbeuten isolieren. Zufriedenstellender verlief dagegen die Synthese von **8** durch Verlängerung des aus Z-Tyr(Bu^t)-OSu und Glutamin in Dioxan/Wasser mit Natriumhydrogencarbonat erhaltenen Dipeptidderivates A 14–15 jeweils nach der Methode der gemischten Anhydride²⁶) am C-terminalen und danach am N-terminalen Ende um das entsprechende Leucinderivat.



Schema 2. Syntheseplan für das Tetrapeptid A 13–16

Wie auch schon beim Tripeptidmethylester **1** der Sequenz A 17–19 verliefen auch bei **8** sowohl die Hydrazinolyse als auch die vorsichtige Verseifung ohne Komplikationen an der Seitenkettenamidgruppe²²). Somit standen für die Ankondensation der beiden Fragmente A 17–19 und A 13–16 jeweils drei Kupplungsmethoden zur Verfügung: Azidsynthese²⁷), König-Geiger-Verfahren²⁴) sowie die Aktivierung als gemischte Anhydride²⁶). Letztere Methode lieferte in beiden Fällen die besseren Ergebnisse.

Zur Verknüpfung der Sequenz A 10–12 mit A 13–21 konnte nur die Azidmethode²⁷) herangezogen werden, da das Tripeptidderivat **13** sich nur als Hydrazid in einheitlicher Form isolieren ließ. Es wurden hierbei gute Ausbeuten erzielt.

Bei der Verlängerung zum Hexadeca-peptidderivat **21** lieferte die Methode der gemischten Anhydride²⁶) wiederum etwas bessere Ergebnisse als das König-Geiger-Verfahren²⁴), allerdings nur bei Verwendung eines Überschusses an Carboxykomponente. Bei der Kupplung zur geschützten A-Kette **24** schließlich ergab die Dicyclohexylcarbodiimid-Hydroxybenzotriazol-Aktivierung ein etwas besseres Produkt.

²⁵) H. Zahn, W. Danho und B. Gutte, Z. Naturforsch. **21b**, 763 (1966).

²⁶) G. W. Anderson, J. E. Zimmermann und F. M. Callahan, J. Amer. Chem. Soc. **89**, 5012 (1967).

²⁷) J. Honzl und J. Rudinger, Collect. Czech. Chem. Commun. **26**, 2333 (1961).

Wie bei der Kupplung der Fragmente wurde auch bei der Synthese der Teilstücke weitgehend nach der Methode der gemischten Anhydride aktiviert, und zwar mit Chlorameisensäure-isobutylester nach *Anderson* und Mitarbeitern²⁶⁾ oder mit Pivaloylchlorid^{8, 28)}. In vier Fällen wurden *N*-Hydroxysuccinimidester (A 1–5) und in zwei Fällen *p*-Nitrophenylester (A 5–9, A 18–19) verwendet.

Vom Dodecapeptidderivat **18** (A 10–21) an wurden die Kupplungsprodukte in solch einem Maße immer schwerlöslicher, daß sie sich der dünnschichtchromatographischen Kontrolle auf Einheitlichkeit entzogen. Als Reinheitskriterium diente nur noch die Aminosäureanalyse²⁹⁾ nach saurer Totalhydrolyse. Ebenso waren die großen Fragmente bei der Abspaltung der Bpoc-Gruppe in 80proz. Essigsäure nicht mehr löslich. Sie quollen nur noch stark. Um eine quantitative Deblockierung zu gewährleisten, wurden die Abspaltungszeiten verlängert, was den übrigen Schutzgruppen nicht schadete, wie Versuche an Modellsubstanzen zeigten.

Das A-Kettenmaterial **24** schließlich, das nach Aufarbeitung noch etwa 25% nicht-umgesetzte Aminkomponente **23** enthielt, besaß derart schlechte Löslichkeitseigenschaften, daß alle Versuche zur Isolierung der reinen A-Kette im vollgeschützten Zustand fehlschlagen. Lediglich die gut lösliche Carboxylkomponente **22** ließ sich leicht abtrennen. Eine echte Reinigung der A-Kette konnte somit nur nach Abspaltung sämtlicher Schutzgruppen und nach Sulfitolyse als Bunesalz (Tetra-*S*-sulfonat) erfolgen. Die Versuche zur Abspaltung der Thiolschutzgruppen mittels Silbersalzen⁵⁾ sowie mit Bromwasserstoff in Trifluoressigsäure⁶⁾ verliefen enttäuschend. Die Entfernung der vier Tetrahydropyranylgruppen blieb unvollständig. Erfolgreich gestaltete sich dagegen die Deblockierung nach *Hiskey*^{30–32)} mit Dirhodan in Eisessig-Trifluoressigsäure. Gelchromatographie des sulfitolysierten Abspaltungsproduktes an Sephadex G 25 und anschließende Ionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A 25³³⁾ lieferten reine synthetische Schafinsulin-A-Kette in Form des Bunesalzes. Die Ausbeute betrug 29%, bezogen auf die in die letzte Kupplung eingesetzte Aminkomponente **23**.

Ein enzymatischer Abbau mit Leucinaminopeptidase und die nachfolgende Aminosäurenanalyse²⁹⁾ bestätigten die optische Reinheit der synthetischen Kette. Diese wurde in Anlehnung an das Verfahren von *Du, Jiang* und *Tsou*³⁴⁾ mit natürlicher B-Kette zu halbsynthetischem, kristallisierbarem Schafinsulin kombiniert. Die Ausbeute beim Kombinationsschritt betrug 9%, bezogen auf die eingesetzte A-Kette. Das kristalline, semisynthetische Insulin lieferte die folgenden Testergebnisse:

a) Stimulierung der Glucoseoxidation an isolierten Fettzellen der Ratte^{35, 36)}: 85% (bezogen auf kristallines Rinderinsulin mit 25 iE/mg).

28) *M. Zaoral*, Collect. Czech. Chem. Commun. **27**, 1273 (1962).

29) *D. H. Spackmann, W. H. Stein* und *S. Moore*, Anal. Chem. **30**, 1190 (1958).

30) *R. G. Hiskey* und *W. P. Tucker*, J. Amer. Chem. Soc. **84**, 4789, 4794 (1962).

31) *R. G. Hiskey* und *M. A. Harpold*, Tetrahedron **23**, 3923 (1967).

32) *R. G. Hiskey, G. W. Davis, M. E. Safdy, T. Inui, R. A. Upham* und *W. C. Jones, Jr.*, J. Org. Chem. **35**, 4148 (1971).

33) *Y. Shimomishi* und *H. Zahn*, Biochim. Biophys. Acta **154**, 598 (1968).

34) *Y. C. Du, R. Q. Jiang* und *C. J. Tsou*, Sci. Sinica **14**, 229 (1965).

35) *J. Gliemann*, Diabetes **14**, 643 (1965).

36) *J. Gliemann*, Diabetologica **3**, 382 (1967).

b) Radioimmunologische Bestimmung mit doppeltem Antikörper (Rindersystem)³⁷⁾: 15% (Ermittlung des Prozentwertes aus dem Quotienten der Konzentrationen von Insulin und Probe, bei denen eine 50proz. Verdrängung des markierten Insulins aus der Bindung an Antikörper erfolgt ist).

c) Eine Röntgenstrukturanalyse³⁸⁾ ergab ein mit natürlichen Insulinkristallen identisches Bild, wenngleich auch wegen der Kleinheit der Kristalle die Zahl der Reflexe geringer war.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Verwendung der Tetrahydropyranylgruppe als Thiolenschutz bei unserer Synthese der Insulin-A-Kette durchaus vorteilhaft war. Die Frage, ob die Thp-Gruppe im Spektrum der selektiv nebeneinander absplittbaren Schwefelschutzgruppen bei vielstufigen Peptidsynthesen einen Platz einzunehmen vermag, läßt sich aber noch nicht schlüssig beantworten. Der Grund hierfür liegt darin, daß die von *Hiskey* und *Tucker*³⁰⁾ an Modellen ermittelten milden Absplittungsbedingungen für die Thp-Gruppe hier wegen der Schwerlöslichkeit des Kettenmaterials nicht ausreichen, sondern die drastischeren, für die schwerer absplittbare *S*-Benzhydrylgruppe^{31,32)} notwendigen Bedingungen gewählt werden mußten. Trotzdem stellt die hier beschriebene Neusynthese der Insulin-A-Kette unseres Erachtens einen wesentlichen methodischen Fortschritt gegenüber den bisher bekannt gewordenen Synthesen dar.

Wir danken dem *Minister für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen* für die Ermöglichung der vorliegenden Arbeit sowie der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für die Förderung des Forschungsvorhabens. Ferner danken wir dem *Verband der Chemischen Industrie* für die Überlassung von Chemikalien und dem *Fonds der Chemischen Industrie* für finanzielle Unterstützung. — Für die Durchführung der biologischen und immunologischen Untersuchungen sind wir den Herren *Dr. J. Gliemann*, Kopenhagen, und *Dr. H. A. Ooms*, Brüssel, zu großem Dank verpflichtet, ebenso wie Professor *Dr. D. Hodgkin* und ihren Mitarbeitern *Dr. T. Blundell* und *Dr. G. Dodson* für die erste Röntgenanalyse eines semisynthetischen Insulins. Herrn *Dr. M. Weinert* danken wir herzlich für die Kombination der Ketten und Frau *I. Seide* für geschickte experimentelle Mitarbeit.

Experimenteller Teil

Die angegebenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert. — Die Präparate wurden durch Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (HF₂₅₄; Fa. Merck) auf Einheitlichkeit geprüft. Laufmittel: Chloroform/Eisessig/Methanol (92.2:2.9:4.9); Chloroform/Methanol/Essigsäuremethylester/Eisessig (88.5:4.6:4.0:2.8); *n*-Heptan/*tert*.-Butylalkohol/Pyridin (75:15:10); sek.-Butanol/Ameisensäure (90proz.)/Wasser (75:13.5:11.5); sek.-Butanol/Ammoniak (10proz.) (85:15). — Verwendete Abkürzungen: DMF = Dimethylformamid, HMPT = Hexamethylphosphorsäuretriamid, DCHA = Dicyclohexylamin, CHA = Cyclohexylamin, Thp = Tetrahydropyranyl, EE = Essigsäure-äthylester.

Bpoc-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-OMe (1): 24.9 g (50.0 mmol) *Z*-Asn-Tyr(Bu^t)-OMe¹⁵⁾ wurden in einem Gemisch aus 50 ml Eisessig und 100 ml Methanol gelöst und 3.5 h an Pd-Mohr hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde das Lösungsmittel bei 25–30°C i. Vak. abgezogen. Das verbleibende Öl wurde noch einmal in wenig Methanol gelöst und

³⁷⁾ C. R. Morgan, R. L. Sorenson und A. Lazarow, *Diabetes* **13**, 579 (1964).

³⁸⁾ D. C. Hodgkin, vorgetragen auf dem Symposium „Chemie des Insulins und Proinsulins“, 12./13. Juli 1973 in Aachen.

das Einengen wiederholt. Nun löste man das Öl in DMF und kühlte die Lösung auf -10°C . Das Bpoc-Glu(OBu^t), erhalten durch Verteilung von 27.0 g (50.0 mmol) Bpoc-Glu(OBu^t), CHA⁸⁾ zwischen 100 ml 0.33 M Citronensäure und EE, wurde in 80 ml DMF gelöst, auf -15°C gekühlt und unter Rühren mit 5.50 ml *N*-Methylmorpholin versetzt. Nach Zugabe von 6.25 ml Pivaloylchlorid wurde 15 min sehr kräftig bei -10°C gerührt, die gekühlte Aminkomponente in einem Guß zugegeben und der Reaktionsansatz über Nacht bei 0°C gerührt. Nach Eindampfen i. Vak. bei $35-40^{\circ}\text{C}$ wurde der Rückstand in EE aufgenommen und im Scheidetrichter 3 mal mit auf 0°C gekühlter 0.2 M Citronensäure und darauf 3 mal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung geschüttelt. Anschließend wurde mit Wasser neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Die geförmige Masse wurde durch mehrmaliges Umfällen aus EE/Petroläther von Verunreinigungen — in erster Linie nicht umgesetzter Carboxylkomponente — befreit und fiel als weißes amorphes Pulver an. Ausb. 23.6 g (60%); Schmp. $120-122^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -9.4^{\circ}$ ($c = 1$, Methanol).

C₄₃H₅₆N₄O₁₀ (788.9) Ber. C 65.4 H 7.15 N 7.10 Gef. C 65.2 H 7.16 N 6.80

Bpoc-Cys(Thp)-Asn-OBu^t (2): Aktivierung analog 1, ausgehend von 15.62 g (25.0 mmol) Bpoc-Cys(Thp)·DCHA⁹⁾, Umsatz mit 3.13 ml Pivaloylchlorid und Kupplung mit 4.7 g (25.0 mmol) Asn-OBu^{t39)}. Der Rückstand nach dem Einengen der Reaktionslösung wurde in Äther aufgenommen und 3 mal mit gekühlter 0.2 M Citronensäure und 10 mal mit 1 N NH₄HCO₃-Lösung ausgeschüttelt. Nach Neutralwaschen mit Wasser wurde über Na₂SO₄ getrocknet und sofort filtriert. Die Lösung wurde auf ein geringes Volumen eingengt. Nach einiger Zeit begann das Produkt auszukristallisieren; die Kristallisation wurde durch allmähliche Zugabe von Petroläther bei 0°C vervollständigt. Das Produkt war noch mit nicht umgesetzter Carboxylkomponente verunreinigt. Eine Reinigung gelang durch Umkristallisation aus Äther/Petroläther (wobei sich die Substanz je nach Ausmaß der Verunreinigung manchmal nicht mehr quantitativ löste) oder durch Filtrieren über eine Kieselgelsäule ($3 \times 150\text{ cm}$). Als Elutionsmittel diente EE. Ausb. 12.6 g (82%); Schmp. $142-143^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +27.3^{\circ}$ ($c = 1.17$, DMF).

C₃₂H₄₃N₃O₇S (613.8) Ber. C 62.65 H 7.07 N 6.85 S 5.22
Gef. C 62.58 H 6.92 N 6.51 S 5.15

Bpoc-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t) (3): 78.9 g (100.0 mmol) 1 wurden in Dioxan mit wenig Wasser gelöst und unter tropfenweiser Zugabe von 100 ml 1 N NaOH bei Raumtemp. vorsichtig verseift (Indikator: Thymolphthalein). Der pH-Wert wurde mit verd. Citronensäure-Lösung auf 7 eingestellt und darauf die Lösung i. Vak. bei 35°C eingengt. Der Rückstand wurde in wäßriger NaHCO₃-Lösung aufgenommen und mehrfach mit Äther extrahiert. Anschließend wurde mit 0.2 M Citronensäure auf pH 3.5–4 angesäuert und 3 mal mit EE extrahiert. Die vereinigten Essigsterextrakte wurden mehrmals mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. eingedampft. Das erhaltene amorphe Produkt wurde wiederholt aus EE/Petroläther umgefällt. Ausb. 57.0 g (74%); Schmp. $112-116^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +4.30^{\circ}$ ($c = 1.15$, DMF).

C₄₂H₅₄N₄O₁₀ (774.9) Ber. C 65.15 H 7.02 N 7.23 Gef. C 65.09 H 6.88 N 7.18

Bpoc-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-N₂H₃ (3a): 15.57 g (19.7 mmol) 1 wurden in 80 ml absol. Methanol gelöst, bei Raumtemp. mit 9.6 ml (198 mmol) Hydrazin-hydrat versetzt und drei Tage bei Raumtemp. stehen gelassen. Die Lösung wurde anschließend in eiskaltes kochsalzhaltiges Wasser eingerührt und der flockige Niederschlag abgesaugt. Nach je einmaligem Umfällen aus Methanol/Wasser und Methanol/Äther/Petroläther konnte das Hydrazid als

³⁹⁾ E. Schnabel und H. Schüssler, Liebigs Ann. Chem. **686**, 229 (1965).

weißes Pulver isoliert werden. Ausb. 14.5 g (93 %); Schmp. 185°C; $[\alpha]_D^{25} = -21.6^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{42}H_{56}N_6O_9$ (788.9) Ber. C 63.85 H 7.15 N 10.63 Gef. C 63.37 H 7.13 N 10.62

Cys(Thp)-Asn-OBu^t (**4**) · HCl: 44.0 g (72.0 mmol) **2** wurden in 400 ml 80proz. Essigsäure gelöst, mit 75.9 ml einer 0.949 M Pyridiniumchlorid-Lösung in 80proz. Essigsäure versetzt und 14 h bei Raumtemp. gerührt. Die klare Lösung wurde i. Vak. bei 25–28°C eingedampft und das resultierende Öl mit absol. Äther verrieben. Nach kurzem Stehen bei 0°C wurde das ausgefallene Gel abgesaugt, gründlich mit Äther gewaschen und aus EE/Petroläther kristallisiert. Ausb. 29.6 g (100 %); Schmp. 158–160°C, $[\alpha]_D^{25} = +65.4^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

$C_{16}H_{30}ClN_3O_5S$ (411.9) Ber. C 46.65 H 7.34 N 10.20 S 7.78

Gef. C 46.71 H 7.35 N 9.94 S 7.53

Bpoc-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-Cys(Thp)-Asn-OBu^t (**5**): 4.12 g (10.0 mmol) **4** · HCl wurden in 30 ml DMF gelöst und nach Kühlung auf –15°C mit 1.10 ml *N*-Methylmorpholin versetzt. 7.75 g (10.0 mmol) **3** wurden in 30 ml DMF gelöst und nach Kühlen auf –15°C unter starkem Rühren mit 1.10 ml *N*-Methylmorpholin und anschließend mit 1.30 ml Chlorameisensäure-isobutylester versetzt. Nach 5 min wurde die gekühlte Aminkomponente in einem Guß zugefügt. Es wurde über Nacht weitergerührt, wobei man die Temp. langsam auf Raumtemp. ansteigen ließ. Aufarbeitung analog **1** lieferte ein Gel, das durch Umfällen aus Methanol/Wasser und anschließendes Auskochen mit EE gereinigt wurde. Ausb. 8.85 g (78 %); Schmp. 190–192°C, $[\alpha]_D^{25} = -1.76^\circ$ ($c = 1$, Methanol); Aminosäurenanalyse²⁹ des Totalhydrolysats (6 N HCl, 24 h, 110°C, Phenolzusatz): Asp. 2.02, Glu 1.00, Tyr 0.96, (Cys)₂ nicht bestimmt.

$C_{58}H_{81}N_7O_{14}S$ (1132.4) Ber. C 61.50 H 7.21 N 8.66 S 2.83

Gef. C 62.24 H 7.40 N 8.41 S 2.97

Z-Tyr(Bu^t)-Gln (**6**): 5.84 g (40.0 mmol) Glutamin wurden in einer Lösung von 3.36 g (40.0 mmol) NaHCO₃ in 50 ml Wasser unter gelindem Erwärmen nahezu gelöst. Es wurden 50 ml Dioxan zugefügt und darauf eine Lösung von 9.4 g (20.0 mmol) *Z*-Tyr(Bu^t)-OSu⁴⁰ in 50 ml Dioxan. Nun wurde bei Raumtemp. so lange gerührt, bis der aktivierte Ester vollkommen verbraucht war. Der pH-Wert der Reaktionslösung wurde durch Zugabe von NaHCO₃-Lösung auf 7.5 gehalten. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand mit Wasser aufgenommen. Nach Ansäuern mit 5proz. Citronensäure wurde mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser neutralgewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Das amorphe Produkt löste man in der Siedehitze in viel EE und engte darauf die Lösung i. Vak. auf etwa die Hälfte ein. Beim Abkühlen auf Raumtemp. begann das Gel auszufallen. Nach Zugabe von etwas Petroläther und einigem Stehen bei 0°C ließ es sich gut absaugen. Ausb. 8.5 g (84 %); Schmp. 147–148°C, $[\alpha]_D^{25} = -4.5^\circ$ ($c = 1.1$, Methanol).

$C_{26}H_{33}N_3O_7$ (499.5) Ber. C 62.51 H 6.66 N 8.41 Gef. C 62.26 H 6.65 N 8.10

Z-Tyr(Bu^t)-Gln-Leu-OMe (**7**): Synthese analog **5**, ausgehend von 5.0 g (10.0 mmol) **6** und 1.10 ml *N*-Methylmorpholin sowie 1.30 ml Chlorameisensäure-isobutylester; Kupplung mit 2.73 g (15.0 mmol) HCl · Leu-OMe⁴¹ (neutralisiert mit 2.08 ml Triäthylamin). Aufarbeitung analog **1**, allerdings mit Chloroform als Lösungsmittel. Umfällen aus EE/Petroläther lieferte 4.6 g (74 %); Schmp. 202–204°C, $[\alpha]_D^{25} = -26.1^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

$C_{33}H_{46}N_4O_8$ (626.7) Ber. C 63.24 H 7.40 N 8.94 Gef. C 63.10 H 7.35 N 9.07

⁴⁰) K. B. Mathur, H. Klostermeyer und H. Zahn, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **346**, 60 (1966).

⁴¹) R. A. Boissonnas, S. Guttmann, P. A. Jacquenoud und J. P. Waller, Helv. Chim. Acta **38**, 1491 (1955).

Bpoc-Leu-Tyr(Bu^t)-Gln-Leu-OMe (8): 12.54 g (20.0 mmol) **7** wurden in Methanol gelöst und in Gegenwart von 6 Tropfen Eisessig 4 h an Pd-Mohr hydriert. Nach Abziehen des Lösungsmittels bei 30°C i. Vak. wurde der Rückstand mit wenig DMF aufgenommen und auf -15°C gekühlt. 7.39 g (20.0 mmol) *Bpoc-Leu*⁸⁾ wurden analog **5** durch Umsetzung mit 2.20 ml *N*-Methylmorpholin und 2.60 ml Chlorameisensäure-isobutylester in Tetrahydrofuran aktiviert und mit der oben beschriebenen Aminkomponente gekuppelt. Aufarbeitung und Reinigung wie bei **1** lieferten 13.5 g (80%); Schmp. 180°C, $[\alpha]_D^{25} = -41.2^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

C₄₇H₆₅N₅O₉ (844.1) Ber. C 66.90 H 7.76 N 8.34 Gef. C 66.31 H 7.47 N 8.08

Bpoc-Leu-Tyr(Bu^t)-Gln-Leu (9): 79.7 g (94.5 mmol) **8** wurden analog **3** mit 94.5 ml 1 N NaOH verseift. Der nach Abziehen des Lösungsmittels erhaltene Rückstand wurde mit Wasser digeriert und nach kurzem Stehen bei 0°C abgesaugt. Nach dem Trocknen i. Vak. über Phosphorpentoxid wurde das noch Unverseifte durch wiederholtes Digerieren mit EE bei Raumtemp. entfernt. Danach wurde in Dioxan/Wasser gelöst, auf 0°C gekühlt, mit Citronensäure auf pH 3–4 eingestellt, abgesaugt, gründlich mit Wasser gewaschen und getrocknet. Ausb. 56.0 g (73%); Schmp. 198–200°C, $[\alpha]_D^{25} = -33.3^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

C₄₆H₆₃N₅O₉ (830.0) Ber. C 66.56 H 7.65 N 8.49 Gef. C 65.71 H 7.57 N 8.21

Bpoc-Leu-Tyr(Bu^t)-Gln-Leu-N₂H₃ (9a): 10.16 g (12.0 mmol) **8** wurden in DMF gelöst und analog **3a** mit 5.9 ml (120 mmol) Hydrazin-hydrat umgesetzt. Umfällen aus Methanol/Wasser lieferte 10.1 g (99%); Schmp. 208°C, $[\alpha]_D^{25} = -22.3^\circ$ ($c = 1.17$, DMF).

C₄₆H₆₅N₇O₈ (844.1) Ber. C 65.46 H 7.76 N 11.62 Gef. C 65.38 H 7.62 N 11.82

Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-Cys(Thp)-Asn-OBu^t (10) · HCl: 63.59 g (56.2 mmol) **5** wurden analog **4** mit 300 ml 80proz. Essigsäure und 27.1 ml einer 2.07 M Lösung von Pyridiniumchlorid in 80proz. Essigsäure behandelt. Reinigung durch Umfällen aus Methanol/Äther und Digerieren mit EE lieferten 52.2 g (100%); Schmp. 210–225°C, $[\alpha]_D^{25} = +14.5^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

C₄₂H₆₈ClN₇O₁₂S (930.6) Ber. C 54.21 H 7.37 N 10.54 Gef. C 54.34 H 7.73 N 10.30

Bpoc-Leu-Tyr(Bu^t)-Gln-Leu-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-Cys(Thp)-Asn-OBu^t (11): Synthese analog **5**, ausgehend von 8.30 g (10.0 mmol) **9**. Umsatz mit 1.10 ml *N*-Methylmorpholin sowie 1.30 ml Chlorameisensäure-isobutylester und Kupplung mit 9.31 g (10.0 mmol) **10** · HCl (neutralisiert mit 1.10 ml *N*-Methylmorpholin). Aufarbeitung nach Abziehen des Lösungsmittels durch Verreiben mit Wasser und Auskochen mit EE (2mal) und Methanol. Ausb. 11.6 g (68%); Schmp. 250–260°C, $[\alpha]_D^{25} = -13.7^\circ$ ($c = 1$, DMF); Aminosäurenanalyse²⁹⁾ des Totalhydrolysats (analog **5**): Asp. 1.93, Glu 2.06, Leu 2.00, Tyr 2.04, (Cys)₂ nicht bestimmt.

C₈₈H₁₂₈N₁₂O₂₀S (1706.2) Ber. C 61.9 H 7.56 N 9.85 S 1.88

Gef. C 61.2 H 7.33 N 9.53 S 1.95

Bpoc-Cys(Thp)-Ser(Bu^t)-OMe (12): 2.48 g (8.0 mmol) Z-Ser(Bu^t)-OMe⁴²⁾ wurden mit 0.46 ml (8.0 mmol) Eisessig in Methanol 4 h über Pd-Mohr hydriert. Nach Einengen i. Vak. bei 25–30°C wurde in DMF gelöst und auf -10°C gekühlt. 5.0 g (8.0 mmol) *Bpoc-Cys(Thp)* · DCHA⁹⁾ wurden analog zu **1** mit 1.0 ml Pivaloylchlorid umgesetzt und mit der voranstehend beschriebenen Aminkomponente gekuppelt. Zum Ausschütteln wurde nach Abziehen des Lösungsmittels mit Äther aufgenommen. Reinigung durch Filtration über eine Kieselgelsäule (5 × 75 cm) mit EE als Elutionsmittel lieferte ein gelbliches Harz. Ausb. 4.6 g (95%); $[\alpha]_D^{25} = +29.8^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

C₃₂H₄₄N₂O₇S (600.8) Ber. C 64.0 H 7.38 N 4.66 S 5.34

Gef. C 63.8 H 7.33 N 4.90 S 5.34

⁴²⁾ E. Schröder, Liebigs Ann. Chem. **670**, 127 (1963).

Bpoc-Val-Cys(Thp)-Ser(Bu^t)-N₂H₃ (13): 13.8 g (22.7 mmol) **12** wurden analog **4** mit 57.15 ml einer 0.398 M Lösung von Pyridiniumchlorid in 80proz. Essigsäure behandelt. Das ölige Produkt wurde mit Äther/Petroläther verrieben und nach Dekantation aus Methanol/Äther/Petroläther umgefällt, dekantiert und getrocknet. 10.7 g (30.0 mmol) *Bpoc-Val*⁴³⁾ wurden analog **5** in Tetrahydrofuran mit 3.30 ml *N*-Methylmorpholin und 3.90 ml Chlorameisensäureisobutylester umgesetzt und mit dem wie beschrieben hergestellten *Cys(Thp)-Ser(Bu^t)-OMe·HCl* (neutralisiert mit 3.16 ml Triäthylamin) gekuppelt. Zum Ausschütteln wurde nach Abziehen des Lösungsmittels mit Äther aufgenommen. Das ölige Produkt wurde in Methanol gelöst und mit 22.0 ml (460 mmol) Hydrazin-hydrat analog **3a** umgesetzt. Umfällen aus Methanol/Wasser und Äther/Petroläther (2 mal; je 3 mal auskochen mit 300 ml Äther, filtrieren, einengen der gesammelten Ätherfiltrate auf 200 ml, versetzten mit der gleichen Menge Petroläther und aufbewahren bei 0°C) lieferte pulveriges **13**. Ausb. 10.6 g (67%); Schmp. 130°C, $[\alpha]_D^{25} = -2.6^\circ$ ($c = 1.15$, Methanol).

$C_{36}H_{53}N_5O_7S$ (699.9) Ber. C 61.9 H 7.64 N 10.0 S 4.59
Gef. C 61.9 H 7.82 N 9.89 S 4.52

Leu-Tyr(Bu^t)-Gln-Leu-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-Cys(Thp)-Asn-OBu^t (14)·HCl: 77.4 g (45.31 mmol) **11** wurden wie bei **10** mit 300 ml 80proz. Essigsäure und 21.9 ml der dort beschriebenen Pyridiniumchlorid-Lösung behandelt. Nach dem Einengen wurde der Rückstand mit warmem Methanol digeriert und nach kurzem Stehen bei 0°C abgesaugt, das gelartige Produkt mit Äther digeriert, abgesaugt und getrocknet. Ausb. 64.2 g (94%); Schmp. 250–260°C, $[\alpha]_D^{25} = -5.2^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{72}H_{115}ClN_{12}O_{18}S$ (1504.3) Ber. C 57.5 H 7.70 N 11.2 S 2.13
Gef. C 57.2 H 7.84 N 10.9 S 2.26

Bpoc-Cys(Thp)-Ala-Gly-OMe (15): Synthese analog **1**, ausgehend von 10.0 g (16.0 mmol) *Bpoc-Cys(Thp)·DCHA*⁹⁾. Umsatz mit 2.0 Pivaloylchlorid und Kupplung mit 3.86 g (16.0 mmol) *Ala-Gly-OMe·HBr*^{44, 45)} (neutralisiert mit 2.22 ml Triäthylamin). Bei der Aufarbeitung wurde vorteilhafterweise 1 M NH_4HCO_3 -Lösung anstelle gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung verwendet. Fiel während des Ausschüttelns Produkt aus, so wurde dieses entweder durch Zugabe von etwas Chloroform wieder gelöst oder abgesaugt und am Ende der Aufarbeitung mit dem Rest zusammen aus EE/Petroläther oder wenig Methanol umkristallisiert. Ausb. 7.7 g (82%); Schmp. 173°C, $[\alpha]_D^{25} = +41.6^\circ$ ($c = 1.19$, DMF).

$C_{30}H_{39}N_3O_7S$ (585.7) Ber. C 61.5 H 6.71 N 7.17 S 5.47
Gef. C 61.2 H 6.70 N 7.80 S 5.27

Bpoc-Cys(Thp)-Cys(Thp)-Ala-Gly-OMe (16): 12.9 g (22.0 mmol) **15** wurden analog **4** mit 100 ml 80proz. Essigsäure und 23.2 ml der dort beschriebenen Pyridiniumchlorid-Lösung 20 h umgesetzt. Aufarbeitung des Öls durch Verreiben mit Äther/Petroläther bei 0°C, Dekantieren, Umfällen aus Methanol/Äther/Petroläther bei 0°C, erneutes Dekantieren und Trocknen. Synthese analog **1**, ausgehend von 13.8 g (22.0 mmol) *Bpoc-Cys(Thp)·DCHA*⁹⁾. Umsatz mit 2.75 ml Pivaloylchlorid und Kupplung mit dem wie beschrieben hergestellten *Cys(Thp)-Ala-Gly-OMe·HCl* (neutralisiert mit 3.06 ml Triäthylamin). Das kristalline Produkt wurde durch wiederholtes Auskochen mit Äther und durch Umkristallisation aus EE/Petroläther gereinigt. Ausb. 12.8 g (75%); Schmp. 151°C, $[\alpha]_D^{25} = +60.0^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{38}H_{52}N_4O_9S_2$ (773.0) Ber. C 59.0 H 6.78 N 7.25 S 8.28
Gef. C 58.8 H 7.20 N 6.94 S 8.36

⁴³⁾ S. S. Wang und R. B. Merrifield, Int. J. Protein Res. **1**, 235 (1969); J. Amer. Chem. Soc. **91**, 6488 (1969).

⁴⁴⁾ D. Ben-Ishai, J. Org. Chem. **19**, 62 (1954).

⁴⁵⁾ R. Osterloh, Dissertation Techn. Hochschule Aachen 1969.

Bpoc-Gln-Cys(Thp)-Cys(Thp)-Ala-Gly-OMe (17): 2.42 g (3.16 mmol) **16** wurden wie bei **4** mit 26.35 ml einer 0.12 M Lösung von Pyridiniumchlorid in 80proz. Essigsäure behandelt. Das aus Methanol/Äther/Petroläther umgefällte Öl wurde getrocknet, danach in DMF aufgenommen und bei -15°C mit 0.42 ml Triäthylamin neutralisiert. Nach Zugabe einer gekühlten Lösung von 1.52 (3.0 mmol) *Bpoc-Gln-ONp*⁴⁶⁾ in DMF wurde 30 min bei -10°C und vier Tage bei Raumtemp. gerührt. Nach Eindampfen i. Vak. wurde mit EE aufgenommen und mit NaHCO_3 -Lösung, 0.2 M Citronensäure, NaHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingeeengt. Zur Reinigung wurde wiederholt in viel heißem EE gelöst und auf ein geringes Volumen eingeeengt. Ausb. 1.65 g (58 %); Schmp. $140-143^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_D^{25} = +35.3^{\circ}$ ($c = 1$, DMF).

$\text{C}_{43}\text{H}_{60}\text{N}_6\text{O}_{11}\text{S}_2$ (901.1) Ber. C 57.3 H 6.71 N 9.33 S 7.12

Gef. C 56.9 H 6.80 N 9.11 S 7.08

Bpoc-Val-Cys(Thp)-Ser(But)-Leu-Tyr(But)-Gln-Leu-Glu(OBut)-Asn-Tyr(But)-Cys(Thp)-Asn-OBu^t (18): 16.0 g (10.7 mmol) **14**·HCl wurden in 80 ml DMF gelöst und bei -50°C mit 1.48 ml Triäthylamin neutralisiert. 7.44 g (10.7 mmol) **13** wurden in 40 ml DMF auf -30°C gekühlt und unter kräftigem Rühren mit 16.05 ml (32.0 mmol) einer 1.99 M Lösung von Chlorwasserstoff in Tetrahydrofuran sowie kurz darauf 1.55 ml (11.7 mmol) frisch destilliertem Isoamylnitrit versetzt. Nach 45 min wurde auf -50°C gekühlt und unter starkem Rühren mit 4.44 ml Triäthylamin neutralisiert, dann die gekühlte Lösung der Aminosäurekomponente zugegeben. Innerhalb der nächsten drei Tage ließ man auf Raumtemp. ansteigen, wobei der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von *N*-Methylmorpholin auf 7.5 gehalten wurde. Der stark gelierte Reaktionsansatz wurde mit Wasser verrührt und abgesaugt. Nachdem 2 mal mit jeweils 400 ml Methanol ausgekocht und einmal aus DMF/Wasser (pH 4–5) umgefällt worden war, erhielt man reines, amorphes Produkt. Ausb. 18.0 g (79 %); Zers. ab 200°C , $[\alpha]_D^{25} = +8.65^{\circ}$ ($c = 0.88$, HMPT); Aminosäurenanalyse²⁹⁾ des Totalhydrolysats (analog **5**): Asp 2.05, Glu 2.12, Tyr 1.97, Leu 2.00, Val 0.99, Ser 0.91, (Cys)₂ nicht bestimmt.

$\text{C}_{108}\text{H}_{163}\text{N}_{15}\text{O}_{25}\text{S}_2$ (2135.7) Ber. C 60.7 H 7.69 N 9.84 S 3.00

Gef. C 60.3 H 7.69 N 9.33 S 2.82

Bpoc-Cys(Thp)-Cys(Thp)-Ala-Gly (19): 46.4 g (60.0 mmol) **16** wurden analog **3** mit 120 ml 0.5 N NaOH verseift. Der nach dem Eindampfen erhaltene Rückstand wurde mit Wasser aufgenommen, bei 0°C mit Citronensäure auf pH 3.5–4 angesäuert und wie bei **3** extrahiert. Die Abtrennung von Unverseiftem geschah durch Umkristallisation aus EE/Petroläther oder (mit gleicher Ausbeute) durch Fällung als DCHA-Salz aus Methanol/Äther und Umkristallisation aus demselben Lösungsmittel. Ausb. 36.2 g (75 %); Schmp. 118°C , $[\alpha]_D^{22} = +17.5^{\circ}$ ($c = 1$, Methanol).

$\text{C}_{37}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}_2$ (759.0) Ber. C 58.5 H 6.64 N 7.38 S 8.45

Gef. C 57.8 H 6.68 N 7.13 S 8.90

DCHA-Salz: Schmp. $157-161^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_D^{25} = +18.6^{\circ}$ ($c = 1$, Methanol).

$\text{C}_{49}\text{H}_{73}\text{N}_5\text{O}_9\text{S}_2$ (940.3)

Val-Cys(Thp)-Ser(But)-Leu-Tyr(But)-Gln-Leu-Glu(OBut)-Asn-Tyr(But)-Cys(Thp)-Asn-OBu^t (20)·HCl: 42.7 g (20.0 mmol) **18** wurden in 400 ml 80proz. Essigsäure suspendiert und nach Zugabe von 9.66 ml einer 2.07 M Lösung von Pyridiniumchlorid in 80proz. Essigsäure 48 h bei Raumtemp. gerührt. Die Essigsäure wurde bei $25-30^{\circ}\text{C}$ i. Vak. von der stark gelierten Suspension abgezogen, der Rückstand mit Äther verrieben und nach dem Absaugen mit Methanol auf ca. 40°C erhitzt. Nach Zugabe von 25 Vol.-% Äther und Stehenlassen für

⁴⁶⁾ S. S. Wang und R. B. Merrifield, Int. J. Protein Res. **4**, 309 (1972).

einige Zeit bei 0°C wurde abgesaugt und nach gründlichem Waschen mit Äther getrocknet. Ausb. 37.8 g (98%); Zers. ab 150°C, $[\alpha]_D^{25} = +13.0^\circ$ ($c = 0.575$, Methanol).

$C_{92}H_{150}ClN_{15}O_{23}S_2$ (1933.9) Ber. C 57.1 H 7.82 N 10.8 S 3.22
Gef. C 56.9 H 7.55 N 10.2 S 3.18

Bpoc-Cys(Thp)-Cys(Thp)-Ala-Gly-Val-Cys(Thp)-Ser(Bu^t)-Leu-Tyr(Bu^t)-Gln-Leu-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-Cys(Thp)-Asn-OBu^t (21): Synthese analog **5**, ausgehend von 6.84 g (9.0 mmol) **19**, Umsatz mit 0.99 ml *N*-Methylmorpholin sowie 1.17 ml Chlorameisensäure-isobutylester und Kupplung mit 11.6 g (6.0 mmol) **20**·HCl (in 50 ml HMPT/DMF = 4:1; mit 0.84 ml Triäthylamin neutralisiert). Nach kurzem Rühren wurden weitere 0.15 ml *N*-Methylmorpholin zugefügt. Aufarbeitung durch Verrühren des stark gelierten Reaktionsansatzes mit 2 Liter Wasser, Absaugen, Auskochen mit EE und Methanol (2mal), Umfällen (4mal) aus 100 bis 150 ml heißem DMF und Digerieren mit Methanol lieferten 10.2 g (64%) **21**. Zers. ab 240°C, $[\alpha]_D^{24} = +32.9^\circ$ ($c = 0.52$, HMPT); Aminosäurenanalyse²⁹ des Totalhydrolysats (analog **5**): Asp 1.98, Glu 2.00, Leu 2.00, Tyr 2.09, Ser 1.03, Gly 1.00, Ala 0.99, Val 0.91, (Cys)₂ nicht bestimmt.

$C_{129}H_{197}N_{19}O_{31}S_4$ (2638.4) Ber. C 58.7 H 7.53 N 10.1 S 4.86
Gef. C 57.8 H 7.33 N 9.96 S 4.39

Bpoc-Gly-Ile-Val-Glu(OBu^t)-Gln (22): 20.3 g (36.0 mmol) Ile-Val-Glu(OBu^t)-Gln²² wurden in Dioxan/Wasser (2:1) unter Zugabe von 6.1 g NaHCO₃ gelöst, dann mit einer Lösung von 14.7 g (36.0 mmol) und am folgenden Tag mit einer Lösung von 13.1 g (32.0 mmol) Bpoc-Gly-OSu⁹ in Dioxan versetzt. Durch Zugabe von NaHCO₃-Lösung wurde der pH-Wert auf 7.5 gehalten. Nach 48 h wurde mit 5proz. Citronensäure angesäuert (pH 3.5) und mit Wasser stark verdünnt. Der voluminöse Niederschlag wurde abgesaugt, intensiv mit Wasser gewaschen und 2mal mit EE digeriert. Durch Lösen in NaHCO₃/Wasser/Dioxan und Ausfällen mit Citronensäure wurde umgefällt. Nun wurde 6mal mit je 400–700 ml Methanol zum Sieden erwärmt. Die Methanollösungen wurden jeweils in der Hitze sowie bei Raumtemp. filtriert. Nach Einengen dieser Filtrate erhielt man **22** als lockeres Pulver. Ausb. 16.0 g (53%); Schmp. 235–239°C, $[\alpha]_D^{23} = -10.3^\circ$ ($c = 0.55$, DMF).

$C_{43}H_{62}N_6O_{11}$ (839.0) Ber. C 61.5 H 7.45 N 10.0 Gef. C 60.3 H 7.43 N 10.6

Cys(Thp)-Cys(Thp)-Ala-Gly-Val-Cys(Thp)-Ser(Bu^t)-Leu-Tyr(Bu^t)-Gln-Leu-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-Cys(Thp)-Asn-OBu^t (23)·HCl: 8.17 g (3.1 mmol) **21** wurden analog **20** in 200 ml 80proz. Essigsäure und 1.5 ml der dort beschriebenen Pyridiniumchlorid-Lösung suspendiert. Der nach Abziehen der Essigsäure verbleibende Rückstand wurde mit Äther verrieben, abgesaugt und gründlich mit Methanol und Äther gewaschen. Ausb. 6.9 g (92%); Zers. ab 200°C, $[\alpha]_D^{24} = +43.3^\circ$ ($c = 0.5$, HMPT).

$C_{113}H_{184}ClN_{19}O_{29}S_4$ (2436.6) Ber. C 55.7 H 7.61 N 10.9 S 5.26
Gef. C 55.9 H 7.56 N 10.6 S 5.26

Bpoc-Gly-Ile-Val-Glu(OBu^t)-Gln-Cys(Thp)-Cys(Thp)-Ala-Gly-Val-Cys(Thp)-Ser(Bu^t)-Leu-Tyr(Bu^t)-Gln-Leu-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-Cys(Thp)-Asn-OBu^t (24): 7.3 g (3.0 mmol) **23**·HCl wurden in 100 ml Pyridin (gesättigt mit LiBr) über Nacht bei Raumtemp. gerührt, wobei klare Lösung eintrat. Bei 0°C wurde mit 0.42 ml Triäthylamin neutralisiert. Nach Zugabe von 6.3 g (7.5 mmol) **22** zusammen mit 1.3 g (9.0 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol (in 40 ml HMPT) und anschließend 1.95 g Dicyclohexylcarbodiimid (in 15 ml HMPT) wurde die klare Lösung 1 h bei 0°C gerührt. Danach wurde die Temp. allmählich auf 35°C erhöht und bei dieser Temp. noch 6 h gerührt. Nach weiteren 2 Tagen bei Raumtemp. wurde das Pyridin i. Vak. abgezogen und der Reaktionsansatz in Wasser eingerührt. Nach Absaugen und

Digieren mit Methanol wurde 2 mal mit Methanol ausgekocht. Das resultierende Produkt enthielt nur noch nicht umgesetzte Aminkomponente als Verunreinigung. Ausb. 7.96 g; Aminosäurenanalyse²⁹⁾ des Totalhydrolysats (analog 5 88 h): Asp 2.00, Ser 0.72, Glu 3.66, Gly 1.84, Ala 1.08, Val 1.75, Ile 0.83, Leu 2.00, Tyr 1.86; (Cys)₂ nicht bestimmt.

Tetra-S-sulfonat (Buntesalz) der A-Kette des Schafinsulins (25): 3.5 g **24** wurden in 40 ml Trifluoressigsäure gelöst und nach Zugabe von 1.4 ml Anisol 2 h bei Raumtemp. gerührt. Nach dem Abziehen der Trifluoressigsäure i. Vak. bei 22–25°C wurde 3 mal mit Äther digeriert und dekantiert. Danach wurde mit viel 0.5 M NH₄HCO₃ aufgenommen. Die entstandene, nicht ganz klare Lösung lieferte nach Gefriertrocknung 4.25 g lockeres Pulver. 550 mg (etwa 0.14 mmol) des Produktes wurden in 5 ml Trifluoressigsäure und 5 ml Eisessig gelöst und bei 0°C mit 10 ml Dirhodanlösung⁴⁷⁾ [aus 780 mg (2.4 mmol) Pb(SCN)₂ und 254 mg (1.6 mmol) Brom in 20 ml absol. EE] versetzt. Es wurde 3.5 h bei 0°C im Dunkeln gerührt. Nach Zugabe von 126.5 mg (0.8 mmol) Cystein-hydrochlorid wurde dieses Rühren weitere 2.75 h fortgesetzt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. bei Raumtemp. entfernt, der Rückstand 3 mal mit Äther digeriert und dekantiert. Nun wurde mit 30–35 ml 0.5 M NH₄HCO₃-Lösung aufgenommen und bis zur klaren Lösung mit Harnstoff versetzt. Die Sulfitylyse erfolgte mit 2.5 g Natriumtetrathionat und 3.4 g Natriumsulfit, die in fester Form zugegeben wurden, über Nacht. Die Entsalzung wurde in 2 Portionen über eine mit Sephadex G-25, fine in 0.05 M NH₄HCO₃-Puffer bereiteten Säule (2.7 × 95 cm) durchgeführt. Nach Gefriertrocknung erhielt man 447.3 mg Buntesalz. 289.5 mg wurden in vier Portionen auf einer aus Sephadex G-25, fine in 0.05 M NH₄HCO₃ bereiteten Säule (2.5 × 240 cm) in drei Fraktionen aufgetrennt. Nach Gefriertrocknung der UV-positiven Fraktion 2, die laut Papierelektrophorese (8 V/cm, Elektrolyt 2.4 M Ameisensäure/7 M Harnstoff, pH 2) die A-Kette enthielt, wurden 144.7 mg gewonnen, die nur noch wenig verunreinigt waren. Fraktion 1, über deren Zusammensetzung nichts ausgesagt werden kann, lieferte 56.8 mg. Fraktion 3 enthielt neben etwas A-Kette in erster Linie Hexadecapeptid. — 144.7 mg Tetra-S-sulfonat wurden, in 2 ml 8 M Harnstoff gelöst, auf eine Säule (10 × 1 cm) mit DEAE Sephadex A-25 (Chloridform, gequollen in 8 M Harnstoff) gegeben und durch kontinuierliche Gradientenelution mit 8 M Harnstoff und 8 M in Harnstoff in 0.3 M Chlorwasserstoff (250:250 ml) chromatographiert. Es wurden sechs UV-aktive Fraktionen erhalten, die mit NH₄HCO₃ neutralisiert und 1.5 h gegen fließendes Wasser dialysiert [Visking (18/32)-Dialyseschlauch der Fa. Fischer, Freiburg] wurden. Nach Gefriertrocknung wurde durch Gelfiltration über Sephadex G-25, fine — wie vorher beschrieben — der restliche Harnstoff entfernt. Fraktion 5 lieferte nach Gefriertrocknung und Trocknen über Phosphorpentoxid 84 mg reines Tetra-S-sulfonat der A-Kette. Ausb. 29% bez. auf eingesetzte Aminkomponente **23**, $[\alpha]_D^{25} = -81.7^\circ$ [$c = 0.245$, 0.05 M NH₄HCO₃; Lit.¹⁵⁾ -80.8° , $c = 0.25$, 0.05 M NH₄HCO₃]; Buntesalz-A-Kette (vom Schaf aus natürlicher Quelle: -84.0° , $c = 0.25$, 0.05 M NH₄HCO₃)⁴⁸⁾. Aminosäurenanalyse²⁹⁾ des Totalhydrolysats (analog 5): Asp 2.00, Ser 0.96, Glu 4.04, Gly 1.93, Ala 1.02, Val 1.46, Ile 0.47, Leu 2.00, Tyr 2.02; (Cys)₂ nicht bestimmt.

Ber. S 9.57 Gef. S 9.88

Untersuchung des Tetra-S-sulfonats der A-Kette auf optische Reinheit nach enzymatischem Abbau: 0.5 mg **25** und 0.125 mg Leucinaminopeptidase (aus Rinderaugenlinsen⁴⁹⁾) wurden in je 0.5 ml 0.05 M Trispuffer mit 0.002 M MgCl₂ (pH 8.6) gelöst. Nach einer Präinkubation der Enzymlösung für 30 min bei 40°C wurden beide Lösungen vereinigt und 24 h bei 40°C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mg EDTA-Dinatriumsalz beendet. Nach Ansäuern

47) R. G. Hiskey, F. I. Carroll, R. M. Babb, J. O. Bledsoe, R. T. Puckett und B. W. Roberts, J. Org. Chem. **26**, 1152 (1961).

48) W. Danho, Dissertation Techn. Hochschule Aachen 1967.

49) H. Hanson, D. Gläßer und H. Kirschke, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **340**, 107 (1965).

mit einem Kriställchen Citronensäure auf pH 3.6 wurde die gesamte Lösung zur Aminosäurenanalyse²⁹⁾ verwendet (Serin, Glutamin und Asparagin erschienen in einem Peak; sie waren mit den für saure Totalhydrolysate gebräuchlichen Puffern im Aminosäurenanalysator nicht zu trennen): CysSO₃ 3.41; Glu 2.09; Gly 1.98; Ala 0.98; Val 2.13; Ile 1.21; Leu 2.00; Tyr 2.02.

Kombination von gereinigter, synthetischer Schafinsulin-A-Kette mit natürlicher B-Kette (26): 100 mg **25** und 140 mg Bunesalz der natürlichen B-Kette wurden in einem Zentrifugenglas in 48 ml Wasser aufgeschlämmt und durch Zugabe von einem Tropfen 50proz. Methylamin gelöst. Der pH-Wert wurde mit Eisessig auf 5 eingestellt und nach Zusatz von einem Tropfen n-Oktanol 30 min mit Stickstoff entlüftet. Danach wurde mit 12 ml Reduktionslösung (10proz. Thioglykolsäure, mit Methylamin auf pH 5 eingestellt) 18 h bei Raumtemp. stehen gelassen. Nun wurde mit 1 N Essigsäure (entlüftet) auf pH 3.8 angesäuert, mit 12 ml 1 M Natriumacetat-Lösung (pH 3.8) versetzt, 10 min auf 0°C gekühlt und zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 95 ml 0.2 M und danach 95 ml 0.02 M Natriumacetat-Lösung gewaschen und jeweils zentrifugiert.[‡] Nach Suspension des Niederschlags in 38 ml Wasser wurde mit 7.5 ml Glycinpuffer (pH 10.6) versetzt und der pH-Wert mit 1 N NaOH auf 10.6 eingestellt. Die Lösung wurde 24 h bei 3–5°C aufbewahrt und anschließend dialysiert [Viskin-(18/32)-Dialyseschlauch] und gefriergetrocknet. Das Produkt (200 mg) wurde über Sephadex G 75 in 5proz. Essigsäure^{15,50)} chromatographiert. Die UV-aktive Fraktion 2 wurde nach Gefriertrocknung durch Gradientenelution an CM-Cellulose¹⁵⁾ (Fa. Serva, Heidelberg) mit je 250 ml 8 M Harnstoff in 0.1 M Essigsäure und 0.05 M Natriumchlorid in 0.1 M Essigsäure von Verunreinigungen befreit. Dialyse, Entsalzung an Sephadex G 25 und Gefriertrocknung lieferten 19 mg kristallisierbares Insulin. Ausb. 9%, bez. auf die im Unterschluß eingesetzte A-Kette.

Kristallisation von 26: 25 mg amorphes **26** wurden nach Zahn und Mitarbeitern¹⁵⁾ kristallisiert. Ausb. 8 mg.

⁵⁰⁾ P. Röschlau, Dissertation Techn. Hochschule Aachen 1968.