

Alfons Schöberl, Manfred Rimpler und Eberhard Clauß

Untersuchungen zur Struktur von Malformin, III¹⁾

Synthese von Malformin und struktureller Analoga

Aus dem Chemischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover

(Eingegangen am 8. Juni 1970)



Malformin ist ein aus Leucin, Isoleucin, Valin und Cystin aufgebautes cyclisches Pentapeptid mit Disulfidstruktur. Zum Strukturbeweis wurden aus homomeren, homodeten Peptiden (**5a**–**8a**) Bis-thiol-peptide (**5b**–**8b**) synthetisiert, die in Disulfid-Strukturen (**1**–**4**) übergeführt wurden. Durch Vergleich der biologischen Aktivitäten wurde bewiesen, daß dem Malformin die Primärstruktur *cyclo*-S,S'-Dehydro-D-leucyl-L-isoleucyl-D-cysteinyl-L-valyl-D-cysteinyl (**1**) zuzuschreiben ist.

On the Structure of Malformin, III¹⁾

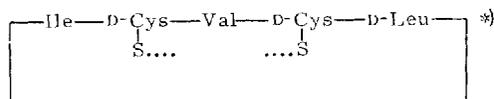
Syntheses of Malformin and Related Analogues

Malformin, a cyclic pentapeptide containing leucine, isoleucine, valine and cystin, has a disulfide structure. For proof of its structure, bithiol peptides (**5b**–**8b**) have been synthesized from homomeric, homodetic peptides (**5a**–**8a**) and changed to disulfides (**1**, **2**, **3**, **4**). By comparing biological activities it was demonstrated that malformin has the primary structure *cyclo*-S,S'-dehydro-D-leucyl-L-isoleucyl-D-cysteinyl-L-valyl-D-cysteinyl (**1**).



Curtis²⁾ fand 1958, daß Kulturfiltrate des Pilzes *Aspergillus niger* bei höheren Pflanzen Mißbildungen verursachten und wies nach, daß eine Malformin³⁾ genannte Substanz die Ursache dafür war.

Aus Kulturfiltrat isoliertes Malformin⁴⁾ enthielt keine sauren oder basischen Gruppen und zeigte neutrales Verhalten bei der Elektrophorese. Nach Hydrolyse wurden L-Valin, D-Leucin, L-Isoleucin und D-Cystin als Aminosäurebausteine bestimmt. Aus diesen Befunden und dem negativen Ninhydrin-test formulierten Marumo und Curtis⁵⁾ für das Malformin folgende cyclische Struktur:



*¹⁾ Um die Sulfid- bzw. Disulfidbrücken deutlicher hervortreten zu lassen, wird in dieser Arbeit der Cystein-Rest mit Cys (statt Cys, wie die IUPAC-Regeln es eigentlich verlangen) abgekürzt.

1) II. Mittel.: A. Schöberl, M. Rimpler und E. Clauß, Liebigs Ann. Chem., im Druck.

2) R. W. Curtis, Plant Physiol. 33, 17 (1958).

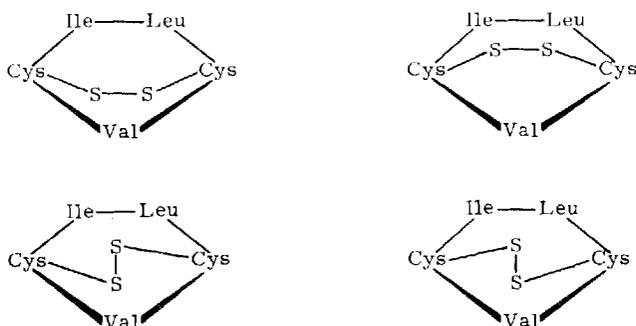
3) R. W. Curtis, Plant Physiol. 33, XXXI (1958).

4) N. Takahashi und R. W. Curtis, Plant Physiol. 36, 30 (1961).

5) S. Marumo und R. W. Curtis, Phytochemistry 1, 245 (1961).

Offen blieben die Bindungsverhältnisse am Schwefel. Versuche, Thiol- oder Disulfidgruppen nachzuweisen, lieferten keine eindeutigen Aussagen, so daß auch eine Thiazolinstruktur vorgeschlagen wurde, die jedoch nicht die 5 Äquivalente *N*-gebundenen Wasserstoff erklären konnte.

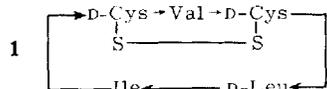
Als Hinweis auf das Vorliegen einer Disulfidbindung werteten *Anzai* und *Curtis*⁶⁾ den Befund, daß aus Malformin durch Reduktion zugängliches Bis-thiol-malformin mittels Jod in Dimethylsulfoxid wieder in biologisch aktives Malformin umgewandelt werden konnte. Unter Einbeziehung einer Disulfidstruktur formulierten sie folgende verschiedene Stereoisomere für das Malformin:



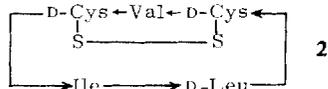
Zum Strukturbeweis versuchten *Isono* und *Curtis*⁷⁾ Malformin zu synthetisieren und mit natürlichem Material zu vergleichen, jedoch erwiesen sich ihre Syntheseprodukte im biologischen Test als inaktiv.

Diese Situation veranlaßte erneut Untersuchungen, die Primärstruktur des Malformins durch Synthese zu beweisen.

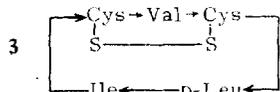
Neben der von *Marumo* und *Curtis*⁵⁾ dem Malformin zugeschriebenen Struktur (1) sollte zum Vergleich ein auf die Peptidbindung bezogenes Spiegelbildisomeres (2) sowie die entspr. Verbindungen mit *L*-Cystinresten (3 und 4) synthetisiert⁸⁾ werden.



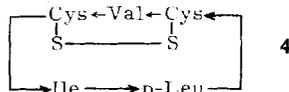
cyclo-*S,S'*-Dehydro-*D*-leucyl-*L*-isoleucyl-*D*-cysteinyl-*L*-valyl-*D*-cysteinyl



cyclo-*S,S'*-Dehydro-*L*-isoleucyl-*D*-leucyl-*D*-cysteinyl-*L*-valyl-*D*-cysteinyl



cyclo-*S,S'*-Dehydro-*D*-leucyl-*L*-isoleucyl-*L*-cysteinyl-*L*-valyl-*L*-cysteinyl



cyclo-*S,S'*-Dehydro-*L*-isoleucyl-*D*-leucyl-*L*-cysteinyl-*L*-valyl-*L*-cysteinyl

⁶⁾ *K. Anzai* und *R. W. Curtis*, *Phytochemistry* **4**, 263 (1965).

⁷⁾ *K. Isono* und *R. W. Curtis*, *Phytochemistry* **3**, 277 (1964).

⁸⁾ Die Nomenklatur der cyclischen Cystinpeptide richtet sich nach einem Vorschlag von *D. G. Large*, *H. N. Rydon* und *J. A. Schofield*, *J. chem. Soc.* [London] **1961**, 1749.

Solche unsymmetrisch substituierten Disulfidpeptide lassen sich auf verschiedene Weise synthetisieren. Beispielsweise können von Cystinderivaten⁹⁾ ausgehend durch Kuppeln mit Aminosäuren bzw. Peptidketten bestimmte unsymmetrische Disulfide^{10,11)} erhalten werden.

Für die angestrebten Peptide schied diese Reaktion jedoch aus, da schon Schutzgruppen- und Aktivierungsprobleme eine racemisierungsfreie Synthese in Frage gestellt hätten. Als zusätzliche Schwierigkeit können hier bei der Abspaltung von Schutzgruppen oder der Darstellung aktivierter Zwischenstufen Disulfid-Austausch-Reaktionen stattfinden. Diese von *Ryle* und *Sanger*¹²⁾ sowie *Schöberl* und *Gräffe*¹³⁾ an gemischten Disulfiden beobachtete Disproportionierung kann zu einer Verminderung der Ausbeute an unsymmetrischem Disulfid führen. Ein anderer Weg ist die Umsetzung von Bunte-Salzen mit Mercaptanen^{14,15,16)}, was *Katsoyannis* und Mitarbb.¹⁷⁾ zur Vereinigung der A- und B-Ketten des Insulins ausnutzten.

Zum Strukturbeweis des Malformins wurde zunächst schrittweise vom C-terminalen Ende her ein offenkettiges Peptid synthetisiert¹⁸⁾. Als endständige Aminosäure wurde nach Voruntersuchungen D-Cystein¹⁹⁾ in geschützter Form eingesetzt. Aus den linearen Peptiden ließen sich nach Abspaltung der beiden endständigen Schutzgruppen durch Cyclisierung mittels Dicyclohexylcarbodiimid/*N*-Hydroxy-succinimid bestimmte homomere, homodete Cyclopeptide (**5a**–**8a**)¹⁾ erhalten.

Letztere unterscheiden sich von den gesuchten Cystinpeptiden (**1**–**4**) nur noch durch das Fehlen der Disulfidbrücke. Dieses für das Malformin besonders wichtige Strukturmerkmal wurde nach Abspaltung der beiden *S*-Benzyl-Schutzgruppen durch Oxydation des erhaltenen Bis-thiols eingeführt.

Disulfidbindungen lassen sich beispielsweise mit Luft, Wasserstoffperoxid, Kaliumhexacyanoferrat(III) oder Jod²⁰⁾ erzeugen. Eine Variante der Jod-Oxydation ist das Verfahren von *Weygand* und *Zumach*²¹⁾, die erstmals zur Synthese gemischter Disulfide aus Thiolen ein vicinales Dihalogenid einsetzten. Diese Reaktion läuft unter Bedingungen ab, die einen Disulfidaustausch nicht begünstigen. Da sowohl die Löslichkeit aller Reaktanten als auch das Oxydationspotential zur Synthese von Disulfidstrukturen zu berücksichtigen sind, schien für die angestrebten speziellen Cystinpeptide (**1**–**4**) besonders die letzte Variante brauchbar. Zunächst wurden die beiden

9) *E. Fischer* und *O. Gerngross*, Ber. dtsch. chem. Ges. **42**, 1485 (1909).

10) *L. Zervas*, *L. Benoiton*, *E. Weiss*, *M. Winitz* und *J. P. Greenstein*, J. Amer. chem. Soc. **81**, 1729 (1959).

11) *H. N. Rydon* und *F. O. dos Serrao*, J. chem. Soc. [London] **1964**, 3638.

12) *A. P. Ryle* und *F. Sanger*, Biochem. J. **60**, 535 (1955).

13) *A. Schöberl* und *H. Gräffe*, Liebigs Ann. Chem. **617**, 71 (1958).

14) *H. B. Footner* und *S. B. Smiles*, J. chem. Soc. [London] **1925**, 2887.

15) *A. Schöberl* und *G. Bauer*, Angew. Chem. **69**, 478 (1957).

16) *J. M. Swan*, Nature [London] **180**, 643 (1957).

17) *P. G. Katsoyannis*, *K. Fukuda*, *A. Tometsko*, *K. Suzuki* und *M. Tilak*, J. Amer. chem. Soc. **86**, 930 (1964).

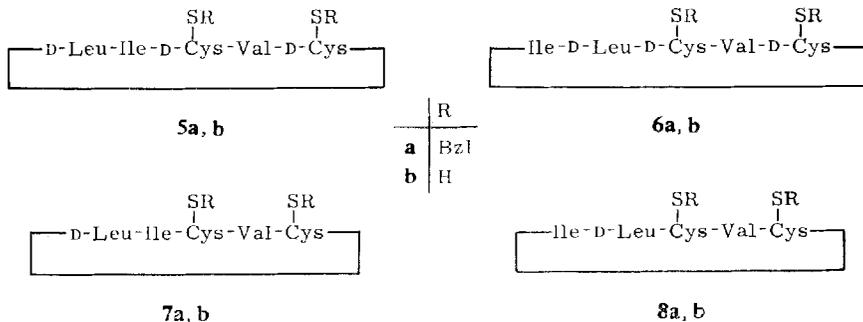
18) *A. Schöberl*, *M. Rimpler* und *E. Clauß*, Chem. Ber. **103**, 2252 (1970).

19) *A. Schöberl*, *M. Rimpler* und *K.-H. Magosch*, Chem. Ber. **102**, 1767 (1969).

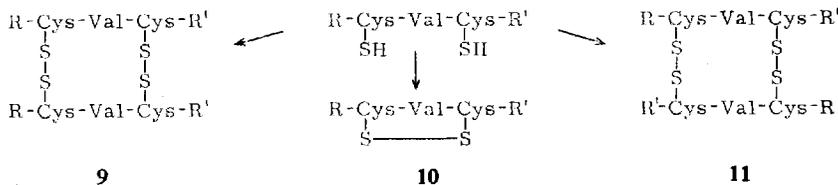
20) *A. Schöberl* und *A. Wagner* in Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl-Müller), Band IX, S. 59 ff., Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1955.

21) *F. Weygand* und *G. Zumach*, Z. Naturforsch. **17b**, 807 (1962).

S-Schutzgruppen in **5a–8a** mit Natrium in flüssigem Ammoniak²²⁾ abgespalten, wobei Bis-thiole (**5b–8b**) anfielen. Es war dies ohne eine gelegentlich beobachtete Entschwefelung²³⁾ oder eine Spaltung von Peptidbindungen²⁴⁾ möglich.



In Anlehnung an ähnliche Namensbildungen – Cystein-Cystin, Oxytocein-Oxytocin, Keratein-Keratin²⁵⁾ – wird für das Bis-thiol des Malformins (**5b**) die Abkürzung Malformein vorgeschlagen. Das Malformein (**5b**) wurde schließlich wie seine anderen Analoga (**6b–8b**) in Dimethylformamid/Methanol mit 1,2-Dijod-äthan^{21,26)} zum Disulfid oxydiert (**1–4**).



Zur Vermeidung von Dimeren (**9**, **11**) oder Polymeren durch intermolekulare Oxydation wurde bei ausreichenden Verdünnungen gearbeitet. Durch Gelfiltration über eine Sephadex LH-20-Säule konnten anschließend alle Cystinpeptide gereinigt werden.

Zur Charakterisierung wurde neben der Aminosäureanalyse der Disulfidgehalt nach Hydrolyse photometrisch nach *Folin* und *Marenzi*²⁷⁾ in der Ausführung nach *Schöberl* und *Rambacher*²⁸⁾ bestimmt. Eine Molekulargewichtsbestimmung bewies die monomere Natur des isolierten Cystinpeptids. Biologische Aktivitätsbestimmungen ergaben, daß von den verschiedenen Möglichkeiten **1–4** dem Malformin die

22) R. H. Sifferd und V. du Vigneaud, J. biol. Chemistry **108**, 753 (1935).

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

24) W. F. Benisek und R. D. Cole, Biochem. biophysic. Res. Commun. **20**, 655 (1965).

25) Nach einem Vorschlag von A. Schöberl, Angew. Chem. **70**, 646 (1958), wird reduziertes Haar-Keratin als Keratein bezeichnet.

26) I. Photaki, J. Amer. chem. Soc. **88**, 2292 (1966).

27) O. Folin und A. D. Marenzi, J. biol. Chemistry **83**, 103 (1929).

28) A. Schöberl und P. Rambacher, Biochem. Z. **295**, 377 (1938).

Struktur **1** zuzuordnen war. Nur dieses Analogon, *cyclo-S,S'*-Dehydro-D-leucyl-L-isoleucyl-D-cysteinyl-L-valyl-D-cysteinyl, zeigte bei einer Konzentration von 0,05 mg/ccm im „corn root test“ und im Bohnentest²⁹⁾ 90% Mißbildungen, die denen des natürlichen Malformins glichen. Damit kann die Primärstruktur des Malformins als bewiesen gelten.

Dem *Fonds der Chemischen Industrie*, der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* und der *Stiftung Volkswagenwerk* haben wir für die Bereitstellung von Forschungsmitteln sehr zu danken.

Beschreibung der Versuche

Schwefel wurde nach *Schöniger*, Stickstoff nach *Kjeldahl* bestimmt. Die Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmungen führte das mikroanalytische Laboratorium Alfred Bernhardt, Elbach über Engelskirchen, durch. Zur Aminosäure-Analyse wurde eine Trennapparatur der Firma Bender und Hobein, München, benutzt. Schmelzpunkte sind nicht korrigiert; Zersetzungspunkte wurden im Kupferblock bestimmt. Die Messung der optischen Drehung erfolgte mit einem Zeiß-Winkel-Kreis-Polarimeter, Genauigkeit 0,01°. Die Molekulargewichte wurden mit einem Dampfdruck-Osmometer der Firma Knauer, Berlin, ermittelt. Die Eichung erfolgte mit Benzil; als Lösungsmittel diente Dimethylformamid bei 90°. Trifluoressigsäure = TFE.

cyclo-S,S'-Dehydro-D-leucyl-L-isoleucyl-D-cysteinyl-L-valyl-D-cysteinyl (**1**): Zur Abspaltung der beiden *S*-Benzyl-Schutzgruppen löste man 80 mg (0,11 mMol) staubfeines, trockenes *cyclo-D-Leucyl-L-isoleucyl-S-benzyl-D-cysteinyl-L-valyl-S-benzyl-D-cysteinyl* (**5a**)¹⁾ in 200 ccm über Natrium dest. Ammoniak³⁰⁾ und fügte bei -33,4° (Sdp.) so lange Natrium³¹⁾ hinzu, bis die entstandene Blaufärbung etwa 60 Sec. bestehen blieb. Diese wurde durch Zugabe von 110 mg Ammoniumtrifluoracetat³²⁾ zerstört. Nach Verdampfen des Ammoniaks wurde das erhaltene *Bis-thiol 5b* i. Vak. über Schwefelsäure getrocknet und von Ammoniakspuren befreit. Dann wurde in 100 ccm entlüftetem DMF gelöst und diese Lösung gleichzeitig mit einer Lösung von 35,7 mg (0,127 mMol) frisch umkristallisiertem *1,2-Dijod-äthan* in 100 ccm absol. Methanol unter Stickstoff in 400 ccm entlüftetes DMF/Methanol (3 : 1) getropft. Nach einstdg. Rühren bei Raumtemp. wurde das Lösungsmittel bei 20° bis auf etwa 3 ccm verdampft, und durch Eingießen in 30 ccm 20proz. Äthanol **1** gefällt. Nach Kühlen über Nacht zentrifugierte man ab und trocknete i. Vak. über P₂O₅. Ausb. 40 mg (65%).

Zur Feinreinigung wurde eine filtrierte Lösung von 40 mg Rohprodukt in 6 ccm DMF/Äthanol (1:2) auf eine Sephadex LH-20-Säule (25 × 1000 mm) gegeben und mit DMF/Äthanol (1 : 2) eluiert. Es wurden 65 Fraktionen gesammelt, deren photometrische Auswertung mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz nach *Lowry* und Mitarbb.³³⁾ erfolgte. Nach der Gelfiltra-

²⁹⁾ Die Versuche wurden freundlicherweise im Laboratorium von Prof. R. W. Curtis, Purdue University, Lafayette, Indiana/USA, ausgeführt, wofür auch an dieser Stelle herzlich gedankt sei; Brief vom 16. 6. 1969.

³⁰⁾ Für die laufende Unterstützung mit Trockeneis wird der Firma Kali-Chemie AG, Hauptverwaltung Hannover, besonders gedankt.

³¹⁾ Die genaue Dosierung des Natriums erfolgte durch Eintupfen einer mit Natrium gefüllten kalibrierten Kapillare in das Ammoniak.

³²⁾ Hergestellt aus Ammoniak und Trifluoressigsäure, Schmp. 125° (Lit.: 129—130°; A. Ya. Yakubovich, E. L. Zaitseva, R. M. Gitina, V. P. Bazov, I. M. Filatowa und G. I. Braz, Chem. J. Ser. A., J. allg. Chem. (russ.) **36**, 862 (1966), C. A. **65**, 12205 d (1966)).

³³⁾ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall, J. biol. Chemistry **193**, 265 (1951).

tionskurve (ein ausgeprägtes Maximum) wurden die peptidhaltigen Fraktionen vereinigt und im Vakuumrotationsverdampfer bis zur Entfernung der organischen Lösungsmittel eingedampft. Mit Wasser wurde das *Cystinpeptid* ausgefällt und zur Isolierung gefriergetrocknet. Man erhielt 15 mg eines staubfeinen, farblosen Pulvers. Zers.-P. über 300°. $[\alpha]_D^{24}$: +58,6° ($c = 0.5$; DMF). Massenspektroskopische Untersuchungen³⁴⁾ waren infolge der schweren Verdampfbarkeit der Substanz nicht möglich.

$C_{23}H_{39}N_5O_5S_2 \cdot 1 H_2O$ (547.8)³⁵⁾ Ber. C 50.43 H 7.55 N 12.79 S 11.71

Gef. C 50.29 H 7.45 N 12.48 S 11.89 Mol.-Gew. 566

Aminosäureanalyse³⁶⁾ (Molverhältnisse): Cystinhalbreste (2.0) : Valin (1.0) : Leucin (1.0) : Isoleucin (1.0).

*Photometrische Cystinbestimmung*²⁸⁾: Cystin-Standardlösung für Eichkurve: Man löste 250 mg *L-Cystin* in 50 ccm 15proz. *Schwefelsäure*, versetzte mit 150 ccm 2*n NaOH* und füllte mit Wasser auf 250 ccm auf. Aliquote Teile (0.1–0.5 ccm) davon wurden in 25-ccm-Meßkölbchen mit 6 ccm Acetatpuffer pH 5.2 versetzt und auf 25° temperiert. Nun fügte man 2 ccm einer frisch bereiteten 25proz. *Natriumsulfit*-Lösung und nach 10 Min. 2 ccm *Folin-Reagenz*-Lösung hinzu. Nach 30 Min. wurde mit Acetatpuffer pH 5.2 aufgefüllt und die Extinktion bei 578 nm bestimmt.

3.125 mg *Peptid* wurden mit 0.6 ccm 6*n Schwefelsäure* p. a. und 2.4 ccm konz. *Salzsäure* p. a. in einem kleinen Bombenrohr durch Erhitzen etwa auf die Hälfte eingengt. Es war darauf zu achten, daß keinesfalls zu stark konzentriert wurde.

Dreimalige Wiederholung dieses Verfahrens unter jeweiliger Zugabe von konz. *Salzsäure* lieferte zuletzt eine klare Lösung, die noch mit 3 ccm 5.3*n HCl* versetzt wurde. Nach Einfrieren schmolz man i. Vak. ab und hydrolysierte 20 Stdn. bei 115°. Anschließend wurde i. Vak. eingedampft und der Rückstand in 5 ccm Pufferlösung pH 2.2 gelöst. 1 ccm diente zur Cystinbestimmung: gef. Extinktion 0.396 = 0.273 mg Cystin, entsprechend 101.5%.

Biologische Aktivitätsbestimmung: Im corn-root-Test²⁹⁾ wurden jeweils 30 Keimlinge eingesetzt. Es wurden Mißbildungen beobachtet, die für natürliches Malformin charakteristisch sind. Die Abhängigkeit der Wachstumsanomalien von der Peptidkonzentration gibt folgende Tabelle:

Konzentration mg/ccm	Zahl der Keimlinge mit Mißbildungen
$5 \cdot 10^{-2}$	27
$5 \cdot 10^{-3}$	17
$5 \cdot 10^{-4}$	11
$5 \cdot 10^{-5}$	5

Zur Sicherung dieser Befunde wurde auch der Bohnentest²⁹⁾ durchgeführt.

cyclo-S,S'-Dehydro-L-isoleucyl-D-leucyl-D-cysteinyl-L-valyl-D-cysteinyl (2): Aus 73 mg (0.1 mMol) *cyclo-L-Isoleucyl-D-leucyl-S-benzyl-D-cysteinyl-L-valyl-S-benzyl-D-cysteinyl (6a)*¹⁾ wurden in 200 ccm *nH₃* die *S*-Schutzgruppen, wie bei **1** beschrieben, mit *Natrium* entfernt (100 mg

³⁴⁾ Für die Aufnahme der Spektren wird Herrn Prof. Dr. H. H. Inhoffen und Herrn Dr. H. Budzikiewicz, Technische Universität Braunschweig, gedankt.

³⁵⁾ Die Analysenwerte sprechen dafür, daß in manchen Peptiden noch Kristallwasser enthalten ist. Eine direkte Bestimmung wurde nicht vorgenommen.

³⁶⁾ Die Hydrolyse erforderte spezielle Bedingungen und ist später bei der Cystinbestimmung beschrieben. Nachträglich wurde gefunden, daß auch mittels *HCl*/Eisessig hydrolysiert werden kann.

Ammoniumtrifluoracetat). Das *Bis-thiol-peptid 6b* wurde diesmal mit 32.4 mg (0.115 mMol) *1.2-Dijod-äthan* in 100 ccm absol. Methanol oxydiert und die Lösungsmittel wie oben entfernt. Das *Cystinpeptid* ließ sich mit Wasser ausfällen und nach Kühlen im Eisschrank abzentrifugieren. Ausb. 33.4 mg (61%). Nach Feinreinigung und Gefriertrocknung 11 mg, Zers.-P. über 300°, $[\alpha]_D^{25}$: -43.2° ($c = 0.25$; TFE).

$C_{23}H_{39}N_5O_5S_2 \cdot 1 H_2O$ (547.8)³⁵ Ber. C 50.43 H 7.55 N 12.79 S 11.71
Gef. C 50.71 H 7.09 N 12.39 S 11.48

Aminosäureanalyse (Molverhältnisse): Cystinhalbreste (2.0): Valin (1.0): Leucin (1.0): Isoleucin (1.0).

Cystinbestimmung: Hydrolyseneinwaage 3.121 mg; Verfahren wie vorher. Gef. Extinktion 0.402 = 0.278 mg Cystin, entsprechend 101.2%.

cyclo-S,S'-Dehydro-D-leucyl-L-isoleucyl-L-cysteinyl-L-valyl-L-cysteinyl (3): In 300 ccm dest. *Ammoniak* wurden die Schutzgruppen von 178 mg (0.25 mMol) *cyclo-D-Leucyl-L-isoleucyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-valyl-S-benzyl-L-cysteinyl (7a)*¹⁾ abgespalten. Nach Zugabe von 250 mg Ammoniumtrifluoracetat wurde alles NH₃ entfernt. Mit 78 mg (0.277 mMol) *1.2-Dijod-äthan* in 100 ccm absol. Methanol wurde das in 100 ccm DMF gelöste *Bis-thiol 7b* unter gleichzeitigem Eintropfen in 400 ccm DMF/absol. Methanol (3 : 1) oxydiert. Man rührte noch 1 Stde. bei Raumtemp., engte bis auf 2.5 ccm ein und fällte das *Cystinpeptid* durch Eingießen in 30 ccm 20proz. Äthanol aus. Es wurde 12 Stdn. im Kühlschrank belassen, abzentrifugiert und i. Vak. über P₂O₅ getrocknet. Ausb. 110 mg (85%). Feinreinigung über die Sephadex LH-20-Säule und anschließende Lyophilisierung ergaben 35 mg farbloses, staubfeines Produkt. Zers.-P. über 300°, $[\alpha]_D^{24}$: -24.8° ($c = 0.5$; DMF).

$C_{23}H_{39}N_5O_5S_2 \cdot 1 H_2O$ (547.8)³⁵ Ber. C 50.43 H 7.55 N 12.79 S 11.71
Gef. C 50.59 H 7.55 N 12.42 S 11.37

Aminosäureanalyse (Molverhältnisse): Cystinhalbreste (2.0): Valin (1.0): Leucin (1.0): Isoleucin (1.0).

Cystinbestimmung: Hydrolyseneinwaage 3.083 mg; Verfahren wie vorher. Gef. Extinktion 0.396 = 0.273 mg Cystin, entsprechend 101.0%.

cyclo-S,S'-Dehydro-L-isoleucyl-D-leucyl-L-cysteinyl-L-valyl-L-cysteinyl (4): 100 mg (0.137 mMol) *cyclo-L-Isoleucyl-D-leucyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-valyl-S-benzyl-L-cysteinyl (8a)*¹⁾ in 300 ccm *Ammoniak* wurden mit *Natrium* behandelt und die Blaufärbung mit 140 mg Ammoniumtrifluoracetat entfernt. Nach Trocknung i. Vak. über Schwefelsäure wurde das *Bis-thiol 8b* mit 44.5 mg (0.158 mMol) *1.2-Dijod-äthan* zum Disulfid oxydiert und wie vorher aufgearbeitet. Das mit 20 ccm Wasser gefällte *Cystinpeptid* wurde einige Zeit im Kühlschrank belassen, abzentrifugiert und i. Vak. über P₂O₅ getrocknet. Ausb. 52.5 mg (70%). Nach erfolgter Feinreinigung über eine Sephadex LH-20-Säule wurden 13 mg Gefriertrocknung erhalten. Zers.-P. über 300°, $[\alpha]_D^{25}$: -98.0° ($c = 0.25$; TFE).

$C_{23}H_{39}N_5O_5S_2 \cdot 1 H_2O$ (547.8)³⁵ Ber. C 50.43 H 7.55 N 12.79 S 11.71
Gef. C 50.19 H 7.42 N 12.37 S 11.32

Aminosäureanalyse (Molverhältnisse): Cystinhalbreste (2.0): Valin (1.0): Leucin (1.0): Isoleucin (1.0).

Cystinbestimmung: Hydrolyseneinwaage 3.132 mg; Verfahren wie vorher. Gef. Extinktion 0.393 = 0.268 mg Cystin, entsprechend 97.5%.