

CHEMISCHE BERICHTE

In Fortsetzung der

BERICHTE DER DEUTSCHEN CHEMISCHEN GESELLSCHAFT

herausgegeben von der

GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

110. Jahrg. Nr. 1

S. 1–382

Succinimidbildung bei der Synthese des Insulin-A-Ketten(14-21)-Octapeptids

Wolfgang König* und Alexander Volk

Hoechst Aktiengesellschaft,
Postfach 800320, D-6230 Frankfurt/M. 80

Eingegangen am 31. März 1976

Bei der Synthese von Teilsequenzen der Insulin-A-Kette (14–21) wurde während der alkalischen Abspaltung der Msc-Gruppe von Msc-Cys(Trt)-Asn-OBu¹, Msc-Leu-Glu(OBu¹)-Asn-Tyr(Bu¹)-Cys(Trt)-Asn-OBu¹ und Msc-Tyr(Bu¹)-Gln-Leu-Glu(OBu¹)-Asn-Tyr(Bu¹)-Cys(Trt)-Asn-OBu¹ in allen Fällen Succinimidbildung in Position 21 beobachtet.

Formation of Succinimide During the Synthesis of the Insulin A Chain(14-21) Octapeptide

During the synthesis of insulin A chain (14–21) fragments it was observed that alkaline treatment of Msc-Cys(Trt)-Asn-OBu¹, Msc-Leu-Glu(OBu¹)-Asn-Tyr(Bu¹)-Cys(Trt)-Asn-OBu¹ and Msc-Tyr(Bu¹)-Gln-Leu-Glu(OBu¹)-Asn-Tyr(Bu¹)-Cys(Trt)-Asn-OBu¹ caused quantitative formation of succinimide in position 21.

Der 2-(Methylsulfonyl)ethoxycarbonyl (Msc-)Rest ist eine durch Basen unter β -Eliminierung leicht abspaltbare Aminoschutzgruppe. Sie wurde von Tesser^{1,2)} eingeführt und bestand ihre Bewährungsprobe bereits bei der Synthese eines Insulinkettenfragments³⁾ und als reversible Schutzgruppe für Insulin⁴⁾. Die Msc-Aminosäuren und -Peptide sind im sauren und neutralen pH-Bereich stabil, kristallisieren meist und lassen sich in der Regel gut reinigen. Wir entschlossen uns deshalb, die Msc-Gruppe bei der Synthese der Human-Insulin A-Kette einzusetzen.

¹⁾ G. I. Tesser, Peptides 1974 (Proc. of the 13th European Peptide Symposium), Ed. Y. Wolman, S. 53, J. Wiley and Sons, New York und Israel Univ. Press 1975.

²⁾ G. I. Tesser und I. C. Balbert-Geers, Int. J. Pept. Protein Res. 7, 295 (1975).

³⁾ E. Th. M. Wolters, G. I. Tesser und R. J. F. Nivard, J. Org. Chem. 39, 3388 (1974).

⁴⁾ R. Geiger, R. Obermeier und G. I. Tesser, Chem. Ber. 108, 2758 (1975).

Um den Einfluß der basischen Abspaltungsbedingungen auf die Peptidkette zu studieren, wurde Msc-Tyr(Bu⁴)-Gln-Leu-Glu(OBu⁴)-Asn-Tyr(Bu⁴)-Cys(Trt)-Asn-OBu⁴ (16) auf zwei verschiedenen Wegen durch Fragmentkondensation hergestellt (siehe Reaktionsschemata I und II).

Das carboxyl-endständige **8** wurde analog zu *Kamber*⁵⁾ synthetisiert. Die restlichen Fragmente wurden über Aktivester unter 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT)-Katalyse⁶⁾ oder nach der Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol (DCC/HOBT)-Methode⁷⁾ hergestellt. Die Verknüpfung der Fragmente gelang ebenfalls mit DCC/HOBT. Nur bei der Synthese von **15** wurde **13** mittels Dicyclohexylcarbodiimid und 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin (DCC/HOObt)⁸⁾ voraktiviert und anschließend mit **6** kondensiert.

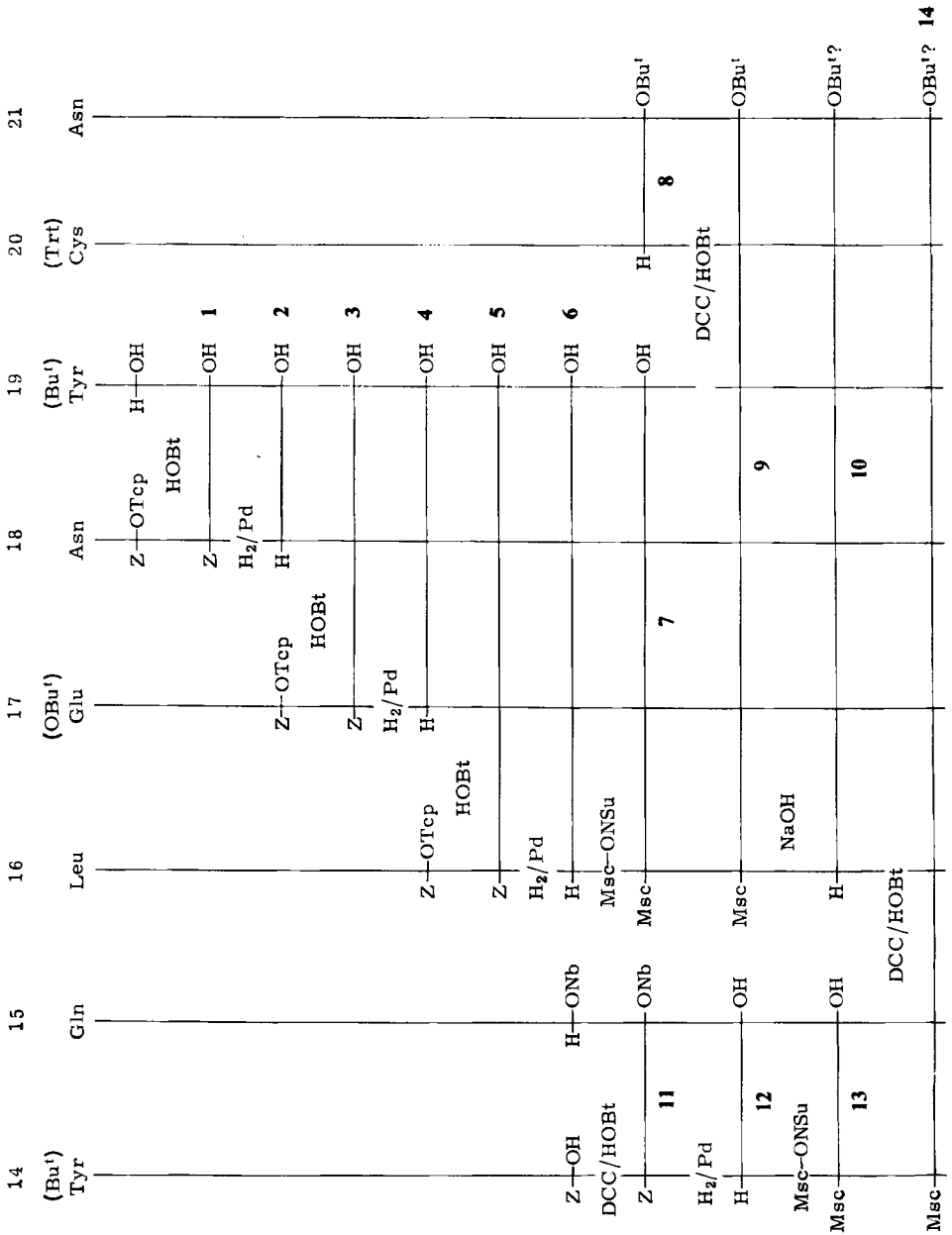
Es zeigte sich jedoch, daß die beiden nach den Reaktionsschemata I und II hergestellten Peptide nicht identisch waren. Nicht nur im chromatographischen Verhalten, sondern auch im Schmelzpunkt und in der spezifischen optischen Drehung zeigten sie deutliche Unterschiede. Das Msc-Octapeptid, welches nach Reaktionsschema I hergestellt worden war (**14**), hatte bereits auf der Hexapeptidstufe eine kurze basische Behandlung mit 2 N NaOH (90 s bei 0°C) zur Abspaltung der Msc-Gruppe erfahren, während das nach Reaktionsschema II hergestellte Msc-Octapeptid (**16**) noch nicht mit Basen in Berührung gekommen war.

Bei der Verseifung von Z-Asn-OMe entsteht bekanntlich zunächst das Z-Aminosuccinimid, das dann allmählich in eine Mischung von Z-Asparagin und Z-Isoasparagin übergeht⁹⁾. Das gleiche gilt auch für die Verseifung von β-Alkyl- und -Benzylestern von Acylasparaginsäure-α-amiden¹⁰⁾ und Asparylpeptiden¹⁰⁻¹⁶⁾. In den meisten Fällen konnte als Zwischenprodukt das relativ stabile Succinimiderivat isoliert werden. Es ist auch bekannt, daß die β-*tert*-Butylester von Asparylpeptiden gegenüber Alkali bei weitem nicht so stabil sind wie die *tert*-Butylester anderer Aminosäuren¹⁷⁻¹⁸⁾. Z-Asn-OBu⁴ scheint sich wie Z-Asn-OMe zu verhalten. So konnte nach Behandlung von Z-Asn-OBu⁴ mit 1 N NaOH bei 25°C (5 min) ebenfalls Z-Aminosuccinimid isoliert werden¹⁹⁾.

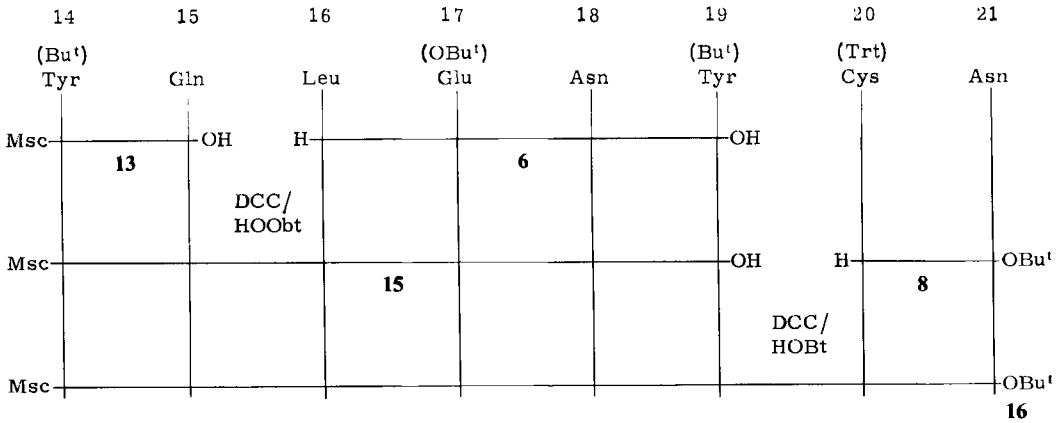
Das Octapeptid **14** enthielt, wie die Reaktion mit Diazomethan zeigte, keine Carboxylgruppe. Dagegen zeigte das IR-Spektrum die für Succinimide charakteristische Absorp-

- ⁵⁾ B. Kamber, *Helv. Chim. Acta* **42**, 398 (1971).
⁶⁾ W. König und R. Geiger, *Chem. Ber.* **106**, 3626 (1973).
⁷⁾ W. König und R. Geiger, *Chem. Ber.* **103**, 788 (1970).
⁸⁾ W. König und R. Geiger, *Chem. Ber.* **103**, 2034 (1970).
⁹⁾ E. Sondheimer und R. W. Holley, *J. Amer. Chem. Soc.* **76**, 2467 (1954).
¹⁰⁾ A. R. Battersby und J. C. Robinson, *Chem. Ind. (London)* **1954**, 45; *J. Chem. Soc.* **1955**, 259.
¹¹⁾ S. A. Bernhard, A. Berger, J. H. Carter, E. Katchalski, M. Sela und Y. Shalitin, *J. Amer. Chem. Soc.* **84**, 2421 (1962).
¹²⁾ B. Iselin und R. Schwyzer, *Helv. Chim. Acta* **45**, 1499 (1962).
¹³⁾ R. W. Hanson und H. N. Rydon, *J. Chem. Soc.* **1964**, 836.
¹⁴⁾ G. Fölsch, *Acta Chim. Scand.* **20**, 459 (1966).
¹⁵⁾ Y. Shalitin und S. A. Bernhard, *J. Amer. Chem. Soc.* **88**, 4711 (1966).
¹⁶⁾ R. B. Merrifield, *Recent Progr. Horm. Res.* **23**, 451 (1967).
¹⁷⁾ R. Schwyzer, B. Iselin, H. Kappeler, B. Riniker, W. Rittel und H. Zuber, *Helv. Chim. Acta* **46**, 1975 (1963).
¹⁸⁾ S. Bajusz, T. Lázár und Z. Paulay, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **41**, 329 (1964).
¹⁹⁾ R. Roeske, *J. Org. Chem.* **28**, 1254 (1963).

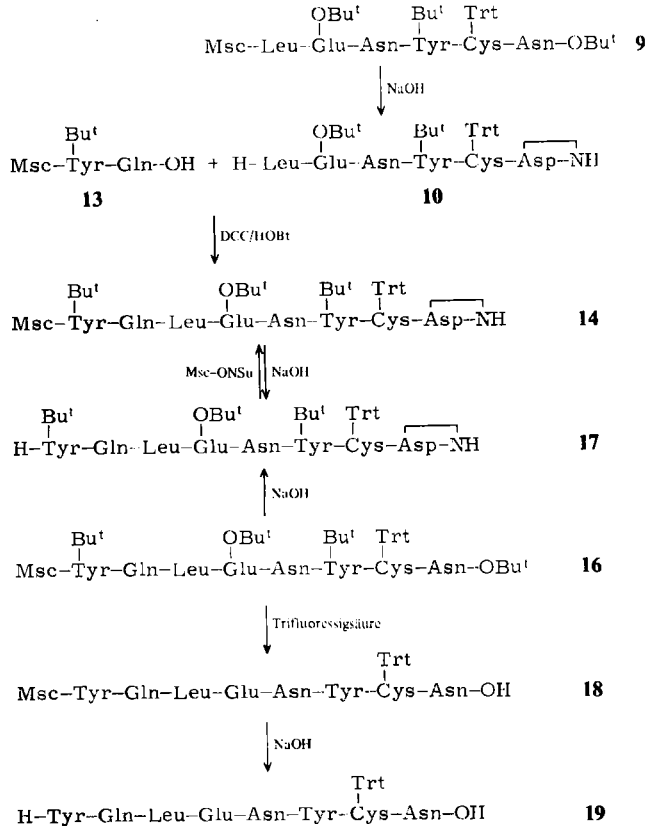
Reaktionsschema I
(Vom Msc-Hexapeptid an ist das Reaktionsschema nur noch hypothetisch. Den tatsächlichen Verlauf gibt Reaktionsschema III wieder.)



Reaktionsschema II



Reaktionsschema III

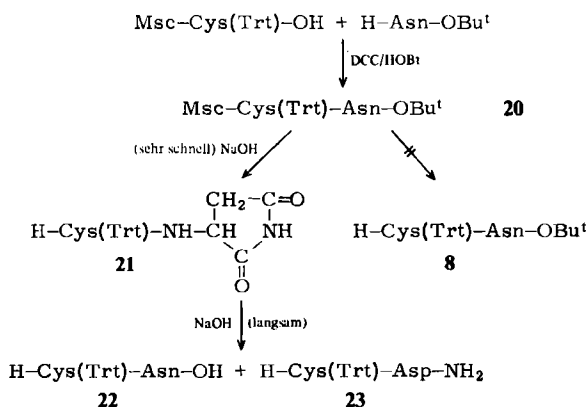


tion bei 1770 cm^{-1} . Das nach Reaktionsschema I hergestellte Msc-Octapeptid **14** ist also ein Succinimiderivat, wobei noch unklar blieb, welches der beiden Asparagine, in Position 18 oder 21, cyclisiert war.

Tesser³⁾ synthetisierte auf einem anderen Weg Msc-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys(Trt)-Asn-OH (**18**). Von diesem Derivat konnte er die Msc-Gruppe ohne Komplikationen abspalten. Durch Trifluoressigsäurebehandlung unseres Msc-Octapeptids **16** (siehe Reaktionsschema II) erhielten wir das Tessersche Msc-Octapeptid **18**. Die alkalische Abspaltung der Msc-Gruppe verlief auch bei uns ohne Bildung des Succinimids. Das IR-Spektrum der resultierenden Verbindung (**19**) zeigte keine Absorption bei 1770 cm^{-1} .

Dieser Versuch wies schon deutlich darauf hin, daß die Succinimidstruktur in dem Msc-Octapeptid **14** (Reaktionsschema I) aus dem Asparagin-*tert*-butylester in Position 21 entstanden war. Zur weiteren Sicherung dieser Annahme wurde Msc-Cys(Trt)-Asn-OBu^t (**20**) hergestellt und sein Verhalten unter Alkalibehandlung (0,2 N NaOH, 4 Äquiv. NaOH/Äquiv. Peptid) dünn-schichtchromatographisch verfolgt. Schon nach einer Minute bei 0°C hatte sich das Succinimid **21** fast quantitativ gebildet. Nur in den ersten Sekunden war neben dem bereits ninhydrin-positiven Succinimidfleck wenig H-Cys(Trt)-Asn-OBu^t (**8**) zu sehen. Das Succinimiderivat **21**, obwohl im Dünnschichtchromatogramm kaum von **8** zu unterscheiden, zeigte im IR die charakteristische Succinimidabsorption bei $1760\text{--}1770\text{ cm}^{-1}$, und im $^1\text{H-NMR}$ fehlte das starke Singulett des *tert*-Butylrestes. **21** ist im alkalischen Medium sehr stabil und hydrolysiert unter den basischen Msc-Abspaltungsbedingungen nur sehr langsam zu einem Gemisch von etwa gleichen Teilen Asparagin- (**22**) und Isoasparaginpeptid **23**. Nach etwa 7–8 Stunden bei Raumtemperatur war das Succinimid **21** vollständig hydrolysiert.

Reaktionsschema IV



Die alkalische Abspaltung der Msc-Gruppen von den beiden Msc-Octapeptiden **14** und **16** führte zu identischen Substanzen mit Succinimidstruktur (**17**). Demnach war auch auf der Octapeptidstufe ein Succinimid entstanden. Acylierung der beiden identischen

ninhydrinpositiven Octapeptide mit Msc-*N*-Hydroxysuccinimidester (Msc-ONSu) führte in beiden Fällen erwartungsgemäß zum Msc-Octapeptid 14 (Msc-Octapeptid nach Reaktionsschema I).

Wie diese Synthesversuche an der Insulin-A-Kette zeigen, ist eine alkalische Behandlung zu vermeiden, selbst wenn mit einem carboxylendständigen Asparagin-*tert*-butylester gearbeitet werden soll. Damit entfällt auch die Verwendung der Msc-Schutzgruppe, und man muß auf den 3,5-Dimethoxy- α,α -dimethylbenzyloxycarbonyl(= Ddz)²⁰⁾ oder 2-(*p*-Biphenyl)isopropylloxycarbonyl(= Bpoc)-Rest²¹⁾ als Aminoschutzgruppe ausweichen. Bei ungeschütztem Asn²¹⁾ ist die Msc-Schutzgruppe jedoch vermutlich verwendbar.

In diesem Zusammenhang sei noch auf die Semisynthese von Humaninsulin nach Ruttenberg²²⁾ hingewiesen, die unseres Wissens bis heute nicht reproduzierbar war. Hier wird (nach tryptischer Spaltung und Semisynthese) der Humaninsulin-hexamethylester mit NaOH verseift. Dabei bildet sich nach Spaltung von 5 Estergruppen ein Derivat mit einer blockierten Carboxylgruppe, das mit größter Wahrscheinlichkeit das schwer verseifbare Succinimid in Position A 21 ist²³⁾ und wie in dem hier beschriebenen Beispiel langsam zu einem Gemisch von Humaninsulin und [Isoasn^{A21}]Humaninsulin weiterreagiert. Reines Humaninsulin dürfte auf diesem Weg wohl kaum entstanden sein.

Experimenteller Teil

Schmelzpunkte: Offene Kapillaren, nicht korrigiert. — Drehwerte: 1-dm-Rohr im lichtelektrischen Polarimeter Mod. 141 der Fa. Perkin-Elmer. — Chromatographische Reinheit: Dünnschichtplatten (Kieselgel F-254) der Fa. Merck.

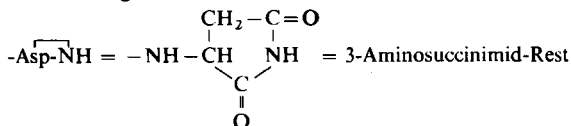
Laufmittel A: Methylenchlorid/Methanol (9 : 1)

Laufmittel B: Butanon/Pyridin/Wasser/Essigsäure (70 : 15 : 15 : 2)

Laufmittel C: Methylenchlorid/Methanol (8.5 : 1.5)

Aminosäureanalysen: Hydrolyse 48 h bei 110°C in 6 N HCl.

Abkürzungen:



-OTcp = 2,4,5-Trichlorphenoxy-

-ONb = 4-Nitrobenzyloxy-

Msc = CH₃SO₂CH₂CH₂OCO- = 2-(Methylsulfonyl)ethoxycarbonyl

HOObt = 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin

HObt = 1-Hydroxybenzotriazol

Die anderen Abkürzungen entsprechen dem Vorschlag der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature²⁴⁾.

A. Synthese von Msc-Tyr(Bu')-Gln-Leu-Glu(OBu')-Asn-Tyr(Bu')-Cys(Trt)-Asp-NH (14) (nach Reaktionsschema I)

²⁰⁾ C. H. Birr, W. Lochinger, G. Stahnke und P. Lang, Liebigs Ann. Chem. 763, 162 (1972).

²¹⁾ P. Sieber und B. Iselin, Helv. Chim. Acta 51, 622 (1968).

²²⁾ M. A. Ruttenberg, Science 177, 623 (1972).

²³⁾ R. Obermeier und R. Geiger, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 759 (1976).

²⁴⁾ Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 256 (1967); J. Biol. Chem. 247, 977 (1972).

1. *Z-Asn-Tyr(Bu¹)-OH · 0.5 H₂O (1)*: Zu einer Suspension von 50 g (0.21 mol) H-Tyr(Bu¹)-OH²⁵ in 600 ml Dimethylformamid gibt man 118.8 g *Z-Asn-OTcp*²⁶ (0.23 mol = 10% Überschuß) und 31 g (0.23 mol) HOBt. Nach 1.5 h war alles gelöst. Spuren ungelösten Materials werden abgesaugt und das Filtrat i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird dreimal mit Ether verrührt und abgesaugt. Ausb. 69.6 g (68%), Schmp. 151–154°C. Die Substanz ist dünnschichtchromatographisch praktisch einheitlich (Laufmittel B) und wird in diesem Reinheitsgrad weiterverarbeitet, da die weitere Reinigung durch Umkristallisieren aus Isopropylalkohol zu verlustreich ist. Für die Analyse wurde eine Probe aus Isopropylalkohol umkristallisiert. Schmp. 176–177°C, $[\alpha]_D^{22} = +14.6^\circ$ ($c = 1$, in Dimethylformamid).

$C_{25}H_{31}N_3O_7 \cdot 0.5H_2O$ (494.5) Ber. C 60.75 H 6.52 N 8.50 Gef. C 60.5 H 6.4 N 8.5

2. *H-Asn-Tyr(Bu¹)-OH (2)*: 37 g (75 mmol) **1** werden in 300 ml 90proz. Essigsäure mit Pd/C-Katalysator hydriert. Nach beendeter Hydrierung wird der Katalysator über Kieselgur abgesaugt und das Filtrat eingengt. Das zurückbleibende Öl wird mit Ether verrieben, abgesaugt und gut getrocknet. Ausb. 26 g (99%), Schmp. 229–230°C. Für die Analyse wurde eine Probe mit Ethanol ausgekocht. Schmp. 230°C, $[\alpha]_D^{20} = +37.2^\circ$ ($c = 1$, in Eisessig).

$C_{17}H_{25}N_3O_5$ (351.4) Ber. C 58.05 H 7.17 N 11.96 Gef. C 57.4 H 7.0 N 11.7

3. *Z-Glu(OBu¹)-Asn-Tyr(Bu¹)-OH (3)*: 7.3 g (20.75 mmol) **2** werden mit 2.66 ml (20.75 mmol) *N*-Ethylmorpholin und 2.8 g (20.75 mmol) HOBt in 70 ml Dimethylformamid gelöst. Dazu gibt man 11 g (21.3 mmol) *Z-Glu(OBu¹)-OTcp*²⁷ und läßt 3 h bei Raumtemp. rühren. Die Lösung wird eingengt, der Rückstand mit Ether verrieben und abgesaugt. Aus Ethanol/Wasser Ausb. 10.5 g (75%), Schmp. 157–160°C, $[\alpha]_D^{22} = +4.6^\circ$ ($c = 1$, in Eisessig).

$C_{34}H_{46}N_4O_{10}$ (670.8) Ber. C 60.88 H 6.91 N 8.35 Gef. C 59.2 H 6.7 N 8.3

4. *H-Glu(OBu¹)-Asn-Tyr(Bu¹)-OH · H₂O (4)*: 15.4 g (23 mmol) **3** werden analog Beispiel 2 in 300 ml 90proz. Essigsäure katalytisch hydriert. Ausb. 9.75 g (77%), Schmp. 178–180°C. Zur Analyse wurde eine Probe aus Methanol/Ether umkristallisiert, Schmp. 190–191°C, $[\alpha]_D^{22} = +33.1^\circ$ ($c = 1$, in Eisessig).

$C_{26}H_{40}N_4O_8 \cdot H_2O$ (554.6) Ber. C 56.3 H 7.63 N 10.1 Gef. C 56.5 H 7.5 N 10.0

5. *Z-Leu-Glu(OBu¹)-Asn-Tyr(Bu¹)-OH · H₂O (5)*: Zu einer Suspension von 4.4 g (7.93 mmol) **4** in 30 ml Dimethylformamid gibt man 3.6 g (8.1 mmol) *Z-Leu-OTcp*²⁸ und 1.1 g (8.1 mmol) HOBt, rührt bei Raumtemp., bis alles gelöst ist, läßt über Nacht bei Raumtemp. stehen und engt i. Vak. ein. Der Rückstand wird mit Ether verrieben und anschließend aus Methanol/Ether umgefällt. Man läßt über Nacht im Kühlschrank stehen und saugt den Niederschlag ab. Mit Ether wird nachgewaschen. Ausb. 4.6 g (72%), Schmp. 184°C, $[\alpha]_D^{20} = +5.5^\circ$ ($c = 1$, in Dimethylformamid).

$C_{40}H_{57}N_5O_{11} \cdot H_2O$ (801.9) Ber. C 60.40 H 7.42 N 8.74 Gef. C 60.3 H 7.4 N 9.0

6. *H-Leu-Glu(OBu¹)-Asn-Tyr(Bu¹)-OH (6)*: 18.6 g **5** werden analog Beispiel 2 in 250 ml 90proz. Essigsäure katalytisch hydriert. Ausb. 12.3 g (82%). Für die Analyse wurde eine Probe mit Wasser ausgekocht und aus Ethanol umkristallisiert. Schmp. 227°C, $[\alpha]_D^{21} = +13.7^\circ$ ($c = 1$, in Eisessig).

$C_{32}H_{51}N_5O_9$ (649.8) Ber. C 59.14 H 7.91 N 10.78 Gef. C 58.3 H 7.7 N 10.5

7. *Msc-Leu-Glu(OBu¹)-Asn-Tyr(Bu¹)-OH (7)*: Zu einer Lösung von 6.49 g (10 mmol) **6** in 25 ml Dimethylformamid gibt man bei Raumtemp. 2.91 g (11 mmol) Msc-ONSu² und rührt 5 h bei

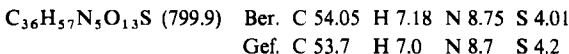
²⁵ E. Wünsch und J. Jentsch, Chem. Ber. **97**, 2490 (1964).

²⁶ J. Beacham, G. Dupuis, F. M. Finn, H. T. Storey, C. Yanaihara, N. Yanaihara und K. Hofmann, J. Amer. Chem. Soc. **93**, 5526 (1971).

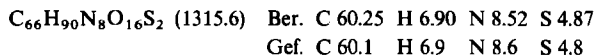
²⁷ J. Pless und R. A. Boissonnas, Helv. Chim. Acta **46**, 1609 (1963).

²⁸ G. W. Kenner, J. J. Mendive und R. C. Sheppard, J. Chem. Soc. C **1968**, 761.

Raumtemp. Danach wird das Dimethylformamid i. Vak. abdestilliert und das erhaltene Öl in Essigester gelöst. Die Essigesterlösung wird nacheinander mit gesättigter KHSO_4 -Lösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. eingengt. Der Rückstand kristallisiert beim Verreiben mit Ether. Aus Essigester/Ethanol 4.8 g (60%), Schmp. 122°C , $[\alpha]_D^{22} = -12.4^\circ$ ($c = 1$, in Methanol).

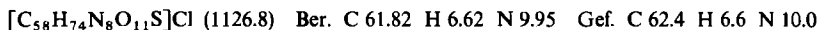


8. *Msc-Leu-Glu(OBu')-Asn-Tyr(Bu')-Cys(Trt)-Asn-OBu'* (**9**): Zu einer Lösung von 4.0 g (5 mmol) **7**, 3.2 g (6 mmol) *H-Cys(Trt)-Asn-OBu'* (**8**)⁵¹ und 0.675 g (5 mmol) HOBT in 25 ml Dimethylformamid gibt man bei 0°C eine Lösung von 1.1 g (5.3 mmol) DCC in 5 ml Dimethylformamid, rührt 1 h bei 0°C und über Nacht bei Raumtemp., filtriert vom Dicyclohexylharnstoff ab und engt i. Vak. zur Trockene ein. Nach Auskochen des Rückstands mit Essigester erhält man 4.85 g (74%) einer farblosen Substanz. Schmp. $204-206^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{23} = -7.4^\circ$ ($c = 1$, in Essigsäure). DC: einheitlich in Laufmittel B.

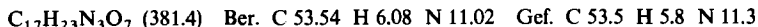


Aminosäureanalyse Ber. Asp 2.0 Glu 1.0 Cys 1.0 Leu 1.0 Tyr 1.0
Gef. Asp 2.07 Glu 0.99 Cys 0.40 Leu 0.96 Tyr 1.00

9. *H-Leu-Glu(OBu')-Asn-Tyr(Bu')-Cys(Trt)-Asp-NH-hydrochlorid* (**10** · HCl): Zu einer Lösung von 15.78 g (12 mmol) **9** in 120 ml Dioxan/Methanol (3 : 1) gibt man bei 0°C unter Rühren eine Mischung von 12 ml 4 N NaOH mit 108 ml Dioxan/Methanol (3 : 1). Nach 90 s Rühren bei $0-5^\circ\text{C}$ wird mit 24 ml 2 N HCl neutralisiert, das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert, der Rückstand mit Wasser verrieben, filtriert und getrocknet. Danach wird mit Essigester digeriert und abgesaugt. Ausb. 9.65 g (69%), Schmp. 185°C , $[\alpha]_D^{23} = -12.2^\circ$ ($c = 1$, in Essigsäure). DC: einheitlich in Laufmittel B.



10. *Boc-Gln-ONb*: 24.6 g (100 mmol) Boc-Gln-OH²⁹⁾, 23.7 g (110 mmol) 4-Nitrobenzylbromid und 14 ml (100 mmol) Triethylamin werden in 250 ml Essigester unter Rühren 8 h unter Rückfluß gekocht. Der ausgefallene Niederschlag wird abgesaugt, das Filtrat nacheinander mit gesättigter KHSO_4 -Lösung, NaHCO_3 -Lösung und Wasser ausgeschüttelt, mit Na_2SO_4 getrocknet, i. Vak. eingengt und der Rückstand mit Ether verrieben. Ausb. 24.5 g (77%), Schmp. $141-142^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{22} = -7.5^\circ$ ($c = 1$, in Essigsäure).



11. *H-Gln-ONb · HCl*: 19.05 g (50 mmol) Boc-Gln-ONb werden mit 30 ml 2 N HCl/Essigsäure 1 h bei Raumtemp. gerührt. Die Essigsäure wird i. Vak. abdestilliert und der feste Rückstand mit 300 ml trockenem Ether verrieben. Ausb. 14.1 g (89%), Schmp. 173°C , $[\alpha]_D^{22} = +6.7^\circ$ ($c = 1$, in Wasser).



12. *Z-Tyr(Bu')-OTcp*: Zu einer Lösung von 37.1 g (100 mmol) *Z-Tyr(Bu')-OH*²⁹⁾ und 19.6 g (110 mmol) 2,4,5-Trichlorphenol in 300 ml Essigester gibt man bei 0°C eine Lösung von 21 g (100 mmol) DCC in 100 ml Essigester. Man rührt 2 h bei 0°C und über Nacht bei Raumtemp. Der Niederschlag wird abgesaugt, das Filtrat eingengt, der Rückstand mit Petrolether verrieben

²⁹⁾ E. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. **702**, 188 (1967).

und abgesaugt. Ausb. 39.65 g (74.2%), Schmp. 91–95°C. Für die Analyse wurde eine Probe aus Isopropylalkohol umkristallisiert. Schmp. 98°C, $[\alpha]_D^{22} = -9.4^\circ$ ($c = 1$, in CHCl_3).

$\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{Cl}_3\text{NO}_4$ (534.9) Ber. C 60.63 H 4.90 N 2.63 Gef. C 59.5 H 5.0 N 2.6

13. *Z-Tyr(Bu')-Gln-ONb* (11): Zu einer Lösung von 15.88 g (50 mmol) *H-Gln-ONb* · HCl und 6.75 g (50 mmol) HOBt in 100 ml Dimethylformamid gibt man bei 0°C 6.4 ml *N*-Ethylmorpholin und 30.25 g (55 mmol) *Z-Tyr(Bu')-OTcp*. Man rührt 2 h bei 0°C und über Nacht bei Raumtemp. Hierbei scheidet sich das Peptid teilweise aus. Nachdem das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert ist, wird der Rückstand nacheinander mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung, 5proz. KHSO_4 -Lösung und Wasser digeriert, abgesaugt und getrocknet. Danach wird mit 250 ml warmem Ether verrührt und abgesaugt. Ausb. 29.1 g (92%), Schmp. 202°C, $[\alpha]_D^{21} = +5.0^\circ$ ($c = 1$, in Essigsäure). DC: einheitlich in Laufmittel A.

$\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_7$ (634.7) Ber. C 62.45 H 6.03 N 8.82 Gef. C 61.7 H 5.7 N 9.1

14. *H-Tyr(Bu')-Gln-OH* (12): 31.7 g (50 mmol) 11 werden in 1000 ml 90proz. Essigsäure suspendiert und analog Beispiel 2 katalytisch hydriert. Ausb. 16.1 g (88%), Schmp. 222–225°C (Zers.), $[\alpha]_D^{22} = +23^\circ$ ($c = 1$, in Essigsäure).

$\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_5$ (365.4) Ber. C 59.16 H 7.45 N 11.50 Gef. C 58.7 H 7.5 N 11.3

15. *Msc-Tyr(Bu')-Gln-OH* (13): Zu einer Suspension von 27.4 g (75 mmol) 12 in 120 ml Dimethylformamid gibt man 9.6 ml (75 mmol) *N*-Ethylmorpholin und 21.2 g (80 mmol) *Msc-ONSu*³⁾. Nach Rühren bei Raumtemp. über Nacht wird das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert, das erhaltene Öl mit 100 ml Wasser versetzt und mit verd. Citronensäure angesäuert (pH 3). Nach mehrstündigem Kühlen auf 0°C wird das Kristallisat abgesaugt und getrocknet. Ausb. 34.2 g (89%), Schmp. 195–196°C, $[\alpha]_D^{21} = +2.5^\circ$ ($c = 1$, in Essigsäure). DC: einheitlich in Laufmittel B.

$\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_9\text{S}$ (515.6) Ber. C 51.25 H 6.45 N 8.15 S 6.23
Gef. C 51.3 H 6.5 N 8.2 S 6.2

16. *Msc-Tyr(Bu')-Gln-Leu-Glu(OBu')-Asn-Tyr(Bu')-Cys(Trt)-Asp-NH* (14): Zu einer Lösung von 0.51 g (1 mmol) 13, 0.91 g (1 mmol) 10 und 0.135 g (1 mmol) HOBt in 10 ml Dimethylformamid gibt man bei 0°C 0.13 ml (1 mmol) *N*-Ethylmorpholin und 0.21 g (1 mmol) DCC. Man rührt 2 h bei 0°C und über Nacht bei Raumtemp., filtriert vom Niederschlag und engt das Filtrat i. Vak. ein. Der Rückstand wird nacheinander mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung, 5proz. KHSO_4 -Lösung und Wasser digeriert und getrocknet. Anschließend wird mit heißem Essigester digeriert. Ausb. 1.2 g (75%), Schmp. 212°C, $[\alpha]_D^{22} = -21.1^\circ$ ($c = 1$, in Essigsäure). DC: einheitlich in Laufmittel C ($R_F = 0.76$).

$\text{C}_{80}\text{H}_{105}\text{N}_{11}\text{O}_{19}\text{S}_2$ (1588.9) Ber. C 60.47 H 6.66 N 9.70 S 4.04
Gef. C 59.9 H 6.7 N 9.5 S 4.1

Aminosäureanalyse Ber. Asp 2.0 Glu 2.0 Cys 1.0 Leu 1.0 Tyr 2.0
Gef. Asp 2.09 Glu 1.97 Cys 0.48 Leu 0.98 Tyr 1.99

B. Synthese von *Msc-Tyr(Bu')-Gln-Leu-Glu(OBu')-Asn-Tyr(Bu')-Cys(Trt)-Asn-OBu'* (16) (nach Reaktionsschema II)

1. *Msc-Tyr(Bu')-Gln-Leu-Glu(OBu')-Asn-Tyr(Bu')-OH* (15): Zu einer Lösung von 5.66 g (11 mmol) 13 und 1.8 g (11 mmol) HOObt in 25 ml Dimethylformamid gibt man bei 0°C 2.52 g (12 mmol) DCC und rührt 1 h bei 0°C und 2 h bei Raumtemp. Die so voraktivierte Säurekomponente wird zu der Suspension von 6.5 g (10 mmol) 6 in 30 ml Dimethylformamid und 1.3 ml (10 mmol) *N*-Ethylmorpholin gegeben. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemp. wird i. Vak. eingengt und der Rückstand nacheinander mit 5proz. KHSO_4 -Lösung und Wasser digeriert. Die Substanz wird

über P_2O_5 getrocknet und dann mit heißem Essigester behandelt. Ausb. 6.46 g (56%), Schmp. 212–220°C, $[\alpha]_D^{25} = -6.0^\circ$ ($c = 1$, in Essigsäure).

$C_{54}H_{82}N_8O_{17}S$ (1147.3) Ber. C 56.53 H 7.20 N 9.76 Gef. C 54.8 H 6.8 N 9.5

Berechnet auf Mol.-Masse 1184:

C 54.80 H 6.98 N 9.46

Die Substanz ist also nur 96.7proz. rein. Der Rest sind anorganische Salze.

2. **16**: Zu einer Lösung von 6.3 g (4.5 mmol) **15**, 2.93 g (5.5 mmol) H-Cys(Trt)-Asn-OBu' (**8**)⁵⁾ und 0.75 g (5.5 mmol) HOBt in 50 ml Dimethylformamid gibt man bei 0°C 1.47 g (7 mmol) DCC. Man rührt 3 h bei 0°C und über Nacht bei Raumtemp. Der Niederschlag wird abgesaugt, das Filtrat i. Vak. eingengt, der Rückstand nacheinander mit $NaHCO_3$ -Lösung, 5proz. $KHSO_4$ -Lösung und Wasser digeriert, die getrocknete Substanz mehrmals mit Essigester erhitzt und abgesaugt. Ausb. 7.21 g (79%), Schmp. 214–216°C, $[\alpha]_D^{25} = -7.4^\circ$ ($c = 1$, in Essigsäure). DC: einheitlich in Laufmittel C ($R_F = 0.80$).

Aminosäureanalyse Ber. Asp 2.0 Glu 2.0 Cys 1.0 Leu 1.0 Tyr 2.0

Gef. Asp 1.94 Glu 2.03 Cys 0.58 Leu 1.00 Tyr 2.00

C. Handversuche nach Reaktionsschema III

1. H-Tyr(Bu')-Gln-Leu-Glu(OBu')-Asn-Tyr(Bu')-Cys(Trt)-Asp-NH (**17**): Analog Beispiel A. 9 werden geringe Substanzmengen 14 bzw. 16 alkalisch behandelt und aufgearbeitet. Man erhält aus beiden Verbindungen Stoffe, die sich im DC identisch verhalten (Laufmittel B, $R_F = 0.80$). Beide Stoffe zeigen im IR die charakteristische Succinimid-Absorption bei 1770 cm^{-1} .

Analytische Daten von **17** aus **14**: $[\alpha]_D^{22} = -16.1^\circ$ ($c = 1$, in Eisessig).

Aminosäureanalyse Ber. Asp 2.0 Glu 2.0 Cys 1.0 Leu 1.0 Tyr 2.0

Gef. Asp 2.03 Glu 1.99 Cys 0.52 Leu 0.98 Tyr 1.91

Analytische Daten von **17** aus **16**: $[\alpha]_D^{22} = -16.0^\circ$ ($c = 1$, in Eisessig).

Aminosäureanalyse Ber. Asp 2.0 Glu 2.0 Cys 1.0 Leu 1.0 Tyr 2.0

Gef. Asp 2.05 Glu 2.03 Cys 0.66 Leu 0.97 Tyr 1.91

Bei der Umsetzung von **17** (sowohl aus **14** als auch aus **16** gewonnen) mit Msc-ONSu analog Beispiel A. 7 entstand eine Substanz, die im DC mit **14** identisch war (Laufmittel C).

2. Msc-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys(Trt)-Asn-OH (**18**): Eine kleine Probe **16** wird in Trifluoressigsäure gelöst. Man läßt 30 min bei Raumtemp. stehen, engt ein und verreibt den Rückstand mit Ether. DC in Laufmittel B: Hauptfleck bei $R_F = 0.55$, verunreinigt durch einige Nebenprodukte.

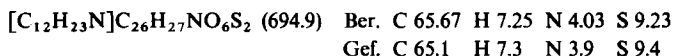
3. H-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys(Trt)-Asn-OH (**19**): Rohes **18** wird analog Beispiel A. 9 alkalisch behandelt und aufgearbeitet. DC in Laufmittel B: Hauptfleck bei $R_F = 0.25$. Im IR war keine Spur der charakteristischen Succinimidbande bei 1770 cm^{-1} zu sehen.

D. Synthese von H-Cys(Trt)-Asp-NH (nach Reaktionsschema IV)

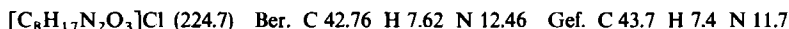
1. Msc-Cys(Trt)-OH: Zu einer Suspension von 36.35 g (0.1 mol) H-Cys(Trt)-OH³⁰⁾ in einer Mischung aus 200 ml Acetonitril und 50 ml Wasser gibt man unter Rühren 26.5 g (0.1 mol) Msc-ONSu³⁾ und anschließend tropfenweise 14 ml (0.1 mol) Triethylamin. Nach 1 h bei Raumtemp. ist alles gelöst. Man läßt noch über Nacht bei Raumtemp. rühren und engt i. Vak. ein. Der ölige Rückstand wird mit Eiswasser aufgenommen. Dazu gibt man bei 0°C 100 ml 1 N H_2SO_4 und extrahiert das ausgefallene Öl mit Essigester. Die Essigesterlösung wird mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird aus Methanol umkristallisiert. Ausb. 42.3 g (80%), Schmp. 162°C, $[\alpha]_D^{20} = -73.2^\circ$ ($c = 1$, in Essigsäure). Zur weiteren Charak-

³⁰⁾ R. G. Hiskey und J. B. Adams jr., J. Org. Chem. 30, 1340 (1965).

terisierung wurde eine Probe in das Dicyclohexylaminsalz übergeführt. Aus Ether Schmp. 164 °C, $[\alpha]_D^{21} = +24.8^\circ$ ($c = 1$, in Methanol).



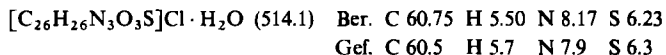
2. *H-Asn-OBu' · HCl*: 32.2 g (0.1 mol) *Z-Asn-OBu' 19)* werden in 500 ml Methanol mit Pd/C-Katalysator katalytisch hydriert, wobei unter Zutropfen von 2 N methanolischer HCl mit Hilfe eines Autotitrators pH 4.5 eingehalten wird. Nach beendiger Hydrierung saugt man vom Katalysator ab, engt die Lösung i. Vak. ein und kristallisiert den Rückstand aus Ether. Ausb. 21.2 g (94%), Schmp. 138–139 °C, $[\alpha]_D^{22} = +11.1^\circ$ ($c = 1$, in Methanol).



3. *Msc-Cys(Trt)-Asn-OBu' (20)*: Zu einer Suspension von 15.4 g (30 mmol) *Msc-Cys(Trt)-OH*, 6.72 g (30 mmol) *H-Asn-OBu' · HCl* und 4.05 g (30 mmol) HOBT in 75 ml Dimethylformamid gibt man bei 0 °C 3.84 ml (30 mmol) *N-Ethylmorpholin* und 6.3 g (30 mmol) DCC. Man läßt 1 h bei 0 °C und über Nacht bei Raumtemp. rühren. Der Niederschlag wird abgesaugt und das Filtrat i. Vak. eingeengt. Die Essigesterlösung des Rückstands wird nacheinander mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung, 5proz. $KHSO_4$ -Lösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. eingeengt. Das resultierende Öl kristallisiert mit Petrolether. Aus Essigester/Petrolether wird umkristallisiert. Ausb. 17.7 g (86%), sintert bei 90 °C, klare Schmelze bei 108 °C, $[\alpha]_D^{21} = +16.9^\circ$ ($c = 1$, in Essigsäure).



4. *H-Cys(Trt)-Asp-NH · HCl (21)*: 6.83 g (10 mmol) **20** werden in 100 ml Dioxan/Methanol (3 : 1) gelöst und nach Kühlen auf 0 °C mit einer Lösung aus 10 ml 4 N NaOH in 90 ml derselben Mischung versetzt. Nach 20 min bei 0 °C neutralisiert man mit 20 ml 2 N HCl, engt i. Vak. ein und verteilt den Rückstand zwischen Essigester und gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung. Die Essigesterphase wird mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wird 30 min mit 1.5 N HCl in Ether verrührt, abgesaugt und mit Ether gewaschen. Ausb. 3.35 g (65%), Schmp. 175–179 °C, $[\alpha]_D^{20} = +36.6^\circ$ ($c = 1$, in Methanol).



[139/76]