

Identifizierung mit natürlichem Calcitonin M: Der Vergleich mit dem natürlichen Hormon erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie und Elektrophorese unter den bei [2] angegebenen Bedingungen. Zusätzlich wurden beide Peptide mit Wasserstoffperoxid zum Methionin⁸-sulfoxid- und mit Perameisensäure zum Dicysteinsäure^{4,7}, methionin⁸-sulfon-Derivat oxydiert, sowie mit Trypsin abgebaut. Stets verhielten sich die synthetischen Peptide genau wie die Vergleichssubstanzen aus natürlichem Calcitonin M.

Für sorgfältige, technische Mitarbeit sind wir den Herren R. BAUMANN, H. BRÜCKNER, H. R. KELLER, A. STAUFFER und M. WETLI sehr zu Dank verpflichtet. Dünnschichtchromatographien, Elektrophoresen und Aminosäureanalysen wurden in verdankenswerter Weise in unserem Chromatographie-Labor (Leiter: Herr E. VON ARX) durch Frau K. REIST, Frau M. RIST und die Herren D. FAUPEL und R. STEINER, ausgeführt.

Den Herren Dres. B. ISELIN und W. KESSLER danken wir für die Überlassung von Ausgangsmaterialien.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. NEHER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* *51*, 1900 (1968).
- [2] B. RINIKER, R. NEHER, R. MAIER, F. W. KAHNT, P. G. H. BYFIELD, T. V. GUDMUNDSSON, L. GALANTE & I. MACINTYRE, *Helv.* *51*, 1738 (1968).
- [3] R. NEHER, B. RINIKER, R. MAIER, P. G. H. BYFIELD, T. V. GUDMUNDSSON & I. MACINTYRE, *Nature* (1968) (im Druck).
- [4] W. RITTEL, M. BRUGGER, B. KAMBER, B. RINIKER & P. SIEBER, *Helv.* *51*, 924 (1968).
- [5] B. KAMBER & W. RITTEL, *Helv.* *51*, 2001 (1968).
- [6] J. T. POTTS, H. D. NIALL, H. T. KEUTMANN, H. R. BREWER & L. J. DEFTOS, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* *59*, 1321 (1968); R. NEHER, B. RINIKER, H. ZUBER, W. RITTEL & F. W. KAHNT, *Helv.* *51*, 917 (1968); P. H. BELL, W. F. BARG, D. F. COLUCCI, M. C. DAVIES, C. DZIOBKOWSKY, M. E. ENGLERT, E. HEYDER, R. PAUL & E. H. SNEDEKER, *J. Amer. chem. Soc.* *90*, 2704 (1968).
- [7] IUPAC-IUB-Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochim. biophysica Acta* *121*, 1 (1966).
- [8] J. HONZL & J. RUDINGER, *Coll. czechoslov. chem. Commun.* *26*, 2333 (1961).
- [9] F. WEYGAND, D. HOFFMANN & E. WÜNSCH, *Z. Naturforsch.* *21b*, 426 (1966).
- [10] P. SIEBER & B. ISELIN, *Helv.* *51*, 622 (1968).
- [11] P. SIEBER & B. ISELIN, in Vorbereitung.
- [12] D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN & S. MOORE, *Analyt. Chemistry* *30*, 1190 (1958).
- [13] M. A. KUMAR, E. SLACK, A. EDWARDS, H. A. SOLIMAN, A. BAGHDIAZT, G. V. FOSTER & I. MACINTYRE, *J. Endocrinol.* *33*, 469 (1965).

235. Eine neue, einfache Methode zur Synthese von Cystinpeptiden

von B. Kamber und W. Rittel

Chemische Forschungslaboratorien des Departements Pharmazetika
der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel

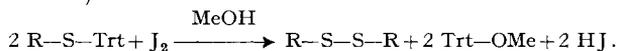
(12. XI. 68)

Summary. A report is given on the conversion of S-trityl-cysteine-containing protected peptides to cystine peptides by a reaction with iodine in methanol. The new method permits the synthesis of symmetrical, open-chain unsymmetrical, and especially cyclic cystine peptides.

Beim Aufbau von Cystinpeptiden hat sich die Tritylgruppe zum intermediären Schutz der Mercaptofunktion von Cystein bewährt [1] [2] [3]. Zur Überführung in

Cystinpeptide wird die Schutzgruppe mit Säure oder Quecksilber- bzw. Silbersalzen abgespalten und nachträglich mit Luft, Jod oder Dijodäthan oxydiert. Zudem wird in der von HISKEY *et al.* [2] eingehend untersuchten Dirhodan-Methode, die vor allem die gezielte Synthese von unsymmetrischen, offenkettigen Cystinpeptiden ermöglicht, Abspaltung und Oxydation in einer einzigen Reaktion ausgeführt.

Wir haben nun gefunden, dass aus S-Tritylcystein-enthaltenden, geschützten Peptiden durch Reaktion mit Jod in Methanol (eine Stunde bei Zimmertemperatur) in sehr guten Ausbeuten direkt die entsprechenden Cystinderivate und Tritylmethyläther gebildet werden¹⁾:

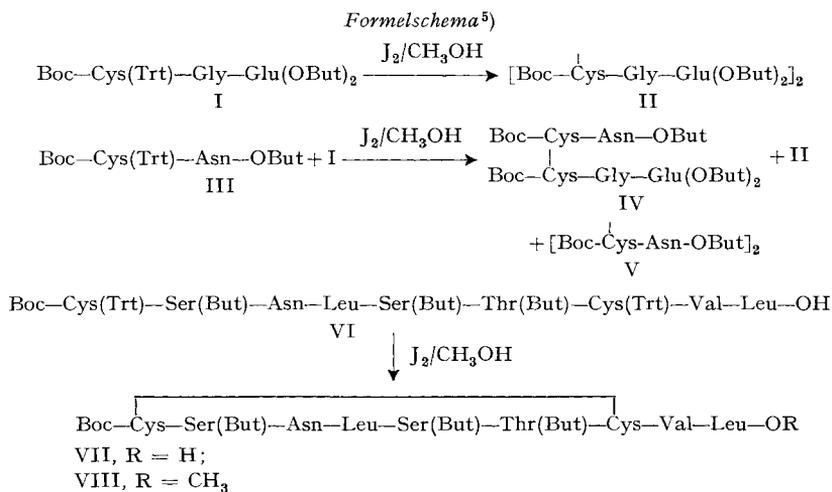


Als Beispiele für die neue Methode beschreiben wir die Herstellung von Insulin- und Thyrocalcitonin-Fragmenten (vgl. Formelschema):

I²⁾ ergibt quantitativ das symmetrische Cystinpeptid II.

Aus den zwei S-Tritylcystein-Derivaten I und III werden die beiden symmetrischen (II, V) und das geschützte, unsymmetrische Insulinpeptid IV (A-Kette 20–21, B-Kette 19–21) in nahezu statistischer Ausbeute erhalten³⁾.

Ganz besonders dürfte sich die neue Methode für die Darstellung cyclischer Cystinpeptide eignen. So wird das geschützte α -Thyrocalcitonin-(1-9)-nonapeptid-Derivat VII – ein wichtiges Zwischenprodukt bei der kürzlich beschriebenen Synthese [5] des hypocalcämischen Hormons α -Thyrocalcitonin – durch Oxydation der offenkettigen Sequenz VI in 85% Ausbeute erhalten⁴⁾. Zweckmässig sorgt man für einen jeweili-



1) Die Bildung von Diphenyldisulfid und Trityläthyläther aus Tritylphenylsulfid und Jod in Äthanol wurde von TARBELL & HARNISCH beschrieben [4].

2) Die Synthese von I bis V und weiterer Insulinsequenzen wird demnächst in Helv. beschrieben.

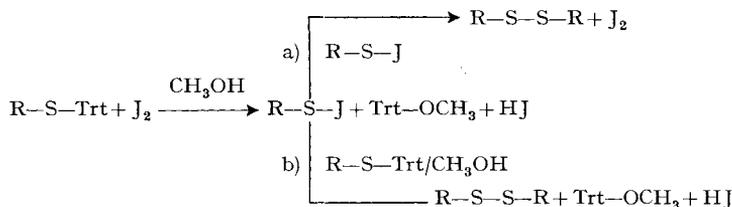
3) Eine Disproportionierung unsymmetrischer Disulfide findet unter den Reaktionsbedingungen nicht statt. Reines IV wird nach der Behandlung mit Jod in Methanol unverändert zurückgewonnen.

4) Daneben wird zu ca. 10% der Methylester VIII gebildet.

5) Abgekürzte Schreibweise entsprechend den Empfehlungen der «IUPAC-IUB-Commission on Biochemical Nomenclature» [6].

ligen Überschuss an Jod, z. B. durch Arbeiten in verdünnten Lösungen und Zugabe des Peptides zur Jodlösung (siehe exper. Teil). Dabei wird ausschliesslich das gewünschte Monomere erhalten. Wird umgekehrt vorgegangen, d. h. Eintropfen der Jod- in die Peptidlösung (bei gleichen Konzentrationen), so werden beträchtliche Mengen Polymere gebildet!

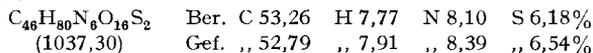
Die Reaktion erfolgt wahrscheinlich über ein Sulfenyljodid, dessen Bildung durch Ausstossen des stabilen Triphenylcarbonium-Ions ermöglicht wird⁶⁾. Der Übergang der unbeständigen Sulfenyljodide in Disulfid und Jod (Weg a) ist eine bekannte Reaktion [7]. Denkbar wäre allerdings auch die Bildung der Disulfidbindung durch Umsetzung eines Sulfenyljodid-Zwischenprodukts mit einem noch unveränderten S-Tritylderivat (Weg b). Ein analoger Mechanismus wurde bei der Reaktion von Tritylthioäthern mit Dirhodan postuliert [8]. Die beobachtete Bildung von Polymeren beim Arbeiten mit einem Unterschuss an Jod lässt diesen Ablauf hier aber als weniger wahrscheinlich erscheinen.



Die säurelabilen Schutzgruppen (Boc und But) werden unter den Reaktionsbedingungen nicht angegriffen, obwohl bei den (hypothetischen) Reaktionswegen a) und b) freier Jodwasserstoff entstehen müsste. Andererseits deutet doch die Bildung des Methylesters VIII bei der Herstellung des cyclischen Nonapeptids VII auf das Auftreten freier Säure.

Wie orientierende Versuche zeigten, ist die Methode auch bei Peptidsequenzen, die Tyrosin oder Methionin enthalten, ohne störende Nebenreaktionen anwendbar. Bei Methioninpeptiden tritt die in wässrigem Milieu erfolgende Oxydation zu Sulfoxiden [9] nicht ein.

Experimentelles. – [*Boc-Cys-Gly-Glu(OBut)*]₂ (II): 1,524 g (2,0 mMol) I und 508 mg (2,0 mMol) Jod liess man in 25 ml Methanol eine Stunde bei Zimmertemperatur reagieren. Durch tropfenweise Zugabe von wässriger 1N Natriumthiosulfatlösung wurde die Lösung bei 0° entfärbt und das Produkt mit 50 ml Wasser ausgefällt. Das getrocknete Rohprodukt wurde dreimal mit je 10 ml Petroläther zerrieben. Der Petrolätherauszug enthielt 522 mg reinen Tritylmethyläther (95%). Kristallisation des Rückstandes aus Essigester-Petroläther lieferte 945 mg (91%) II vom Smp. 150–152°.



*Oxydation von Boc-Cys(Trt)-Gly-Glu(OBut)*₂ (I) und *Boc-Cys(Trt)-Asn-OBu* (III): Die Reaktion von 762 mg (1,0 mMol) I und 634 mg (1,0 mMol) III mit 508 mg (2,0 mMol) Jod und die Aufarbeitung wurden wie oben ausgeführt. Isolierter Tritylmethyläther: 509 mg (93%). Das Rohprodukt zeigte im Dünnschichtchromatogramm drei Flecke: Rf = 0,60 (II), 0,25 (V), 0,45 (IV) (Chloroform-Methanol 9:1). Die Trennung gelang durch Gegenstromverteilung im System Methanol-0,1M Ammoniumacetat-Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff (4:2:1:3). Nach 100 Schritten be-

⁶⁾ Die S-Benzylgruppe reagiert unter den angewandten Bedingungen nicht, während S-Diphenylmethylcystein zu ca. 20% gespalten wird.

fand sich V in den Elementen 56–76 ($r_{max} = 65$; $K = 1,85$). Diese wurden geleert, frische untere Phase eingefüllt und weitere 100 Schritte ausgeführt. IV befand sich nun in den Röhren 8–25 ($r_{max} = 16$; $K = 0,09$), II in den Elementen 0–5. Eindampfen dieser Fraktionen und Absublimieren von Ammoniumacetat lieferte die drei Verbindungen dünnstschichtchromatographisch rein:

II: Umkrist. aus Essigester-Petroläther. Smp. 150–152°. Ausbeute 225 mg (statistisch: 260 mg).

IV: Amorph. Ausbeute 463 mg (statistisch 455 mg)⁷⁾.

V: Umkrist. aus Methanol-Äther. Smp. 194–196°. Ausbeute 162 mg (statistisch 195 mg).

$C_{32}H_{56}N_6O_{12}S_2$	Ber. C 49,22	H 7,23	N 10,76	S 8,21%
(780,96)	Gef. „ 49,08	„ 7,24	„ 10,95	„ 8,27%

Wurde die Reaktion mit 1 mMol I, 2 mMol III und 3 mMol Jod ausgeführt, so wurden 580 mg IV isoliert (statistisch 606 mg).

$\overbrace{\text{Boc-Cys-Ser(But)-Asn-Leu-Ser(But)-Thr(But)-Cys-Val-Leu-OH}}^{\text{VII}}$: Zu einer gerührten Lösung von 3,73 g (14,78 mMol) Jod in 500 ml Methanol wurden bei Zimmertemperatur 2,50 g (1,478 mMol) VI in 500 ml Methanol innert 45 Min. getropft. Nach beendetem Eintragen rührte man 1 Std. weiter und entfärbte dann die Lösung bei 0° mit 1N wässriger Natriumthiosulfatlösung (26,05 ml). Bei 30° wurde auf ca. 100 ml eingengt, mit 1,5 l Wasser ausgefällt, filtriert und mit Wasser gewaschen. Nach zweimaligem Extrahieren mit Petroläther wurde das Produkt einer Gegenstromverteilung im System Methanol-Puffer⁸⁾-Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff (10:3:5:4) über 135 Stufen unterworfen. VII befand sich in den Elementen 39–68 ($r_{max} = 53$; $K = 0,65$). Ausbeute 1,49 g. Dünnschichtchromatogramm auf Silicagel: Rf = 0,4 2(*s*-Butanol-3% wässriger Ammoniak); = 0,22 (*t*-Amylalkohol-Isopropanol-Wasser = 67:26:7). $[\alpha]_D^{20} = -16^\circ$ ($c = 2$ in Chloroform).

In den Röhren 12–29 ($r_{max} = 19$; $K = 0,17$) befanden sich 172 mg des *Methylesters VIII*⁹⁾.

Herrn H. R. KELLER sind wir für die sorgfältige, technische Mitarbeit zu Dank verpflichtet. Die Dünnschichtchromatographien und Aminosäureanalysen wurden in verdankenswerter Weise in unserem Chromatographie-Labor (Leiter: Herr E. VON ARX) durch Frau K. REIST und die Herren D. FAUPEL und R. STEINER ausgeführt. Die Elementaranalysen verdanken wir unserem mikroanalytischen Laboratorium (Leitung: Dr. W. PADOWETZ).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] L. VELLUZ, G. AMIARD, J. BARTOS, B. GOFFINET & R. HEYMÈS, Bull. Soc. chim. France 1956, 1464.
- [2] R. G. HISKEY & R. L. SMITH, J. Amer. chem. Soc. 90, 2677 (1968), und frühere Arbeiten.
- [3] L. ZERVAS, I. PHOTAKI, A. COSMATOS & D. BOROVAS, J. Amer. chem. Soc. 87, 4922 (1965), und frühere Arbeiten.
- [4] D. S. TARBELL & D. P. HARNISCH, J. Amer. chem. Soc. 74, 1862 (1952).
- [5] W. RITTEL, M. BRUGGER, B. KAMBER, B. RINIKER & P. SIEBER, Helv. 57, 924 (1968).
- [6] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Tentative Rules, Abbreviated Designation of Amino Acid Derivatives and Polypeptides, Biochim. biophysica Acta 127, 1 (1966).
- [7] H. RHEINOLDT & E. MOTZKUS, Ber. deutsch. chem. Ges. 72, 657 (1939).
- [8] R. G. HISKEY & D. N. HARPP, J. Amer. chem. Soc. 87, 3965 (1965).
- [9] T. HIGUCHI & K.-H. GENSCHE, J. Amer. chem. Soc. 88, 5486 (1966).

7) Der Strukturbeweis von IV erfolgte durch Überführen in das freie Peptid mit 90-proz. Tri-fluoressigsäure (Aminosäureanalyse: $\frac{1}{2}$ (Cys)₂ 1,86, Asp 1,02, Gly 1,00, Glu 1,10) und Oxydation desselben mit Perameisensäure zu den zwei Cysteinsäure-Peptiden H-Cys(O₃H)-Asn-OH und Cys(O₃H)-Gly-Glu(OH)-OH (z. Charakterisierung dieser Derivate vgl. 2)).

8) Puffer: 28,6 ml Eisessig, 19,25 g Ammoniumacetat, mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

9) Das identische Produkt wurde durch Veresterung von VII mit Diazomethan in Methylenchlorid erhalten.