

## 59. Menschliches Calcitonin. V<sup>1)</sup>. Aufbau und Charakterisierung des geschützten Synthese-Zwischenprodukts Calcitonin M-(1-10)-decapeptid<sup>2)</sup>

von **B. Kamber, H. Brückner, B. Riniker, P. Sieber** und **W. Rittel**

Chemische Forschungslaboratorien des Departementes Pharmazeutika der  
*CIBA Aktiengesellschaft, Basel*

(20. II. 70)

*Summary.* The present report describes in detail the synthesis and characterisation of the protected Calcitonin M decapeptide 1–10, Boc-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(But)-Thr(But)-Cys-Met-Leu-Gly-OH (I), a key intermediate in the synthesis of Calcitonin M. I was obtained from the open-chain precursor Boc-Cys(Trt)-Gly-Asn-Leu-Ser(But)-Thr(But)-Cys(Trt)-Met-Leu-Gly-OH (II) by oxidation with iodine in a yield of 70%, after purification by counter-current distribution.

II was prepared by fragment coupling of the sequences 1–4 and 5–10.

The free calcitonin M (1–10)-decapeptide, obtained from I by removal of the protecting groups by acidolysis, has no hypocalcaemic activity and does not inhibit specific binding of calcitonin M to its antibodies in rabbit serum.

Eine wesentliche Bedingung zum Erfolg der in letzter Zeit beschriebenen Synthesen [1] [4] von Calcitoninen verschiedener Spezies stellt die Verwendung von Aufbaufragmenten mit bereits geschlossenem Disulfidring zwischen den Cysteinresten 1 und 7 dar.

So haben wir bei der Synthese [1] des aus menschlichem Schilddrüsen-Tumorgewebe isolierten [5] Calcitonins M die geschützte Teilsequenz 1–10, Boc-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(But)-Thr(But)-Cys-Met-Leu-Gly-OH verwendet, deren Aufbau wir im Folgenden ausführlich beschreiben. Dabei konnte hinsichtlich der Kombination der Schutzgruppen sowie der Wahl der Verknüpfungsstellen und Kupplungsmethoden direkt die zur Herstellung des  $\alpha$ -Thyrocalcitonin-(1–9)-Fragments entwickelte Arbeitsweise [6] übernommen werden.

Gemäss Schema 1 wurde zunächst das offenkettige Decapeptidderivat II dargestellt. Darin liegt die zur weiteren Kupplung vorgesehene Carboxylgruppe des Glycinrests 10 bereits frei vor; Modellversuche hatten ergeben, dass in Estern entsprechender Fragmente der Disulfidring unter Bedingungen alkalischer Verseifung oder Hydrazinolyse nicht stabil ist. Das sehr schwerlösliche II konnte durch Oxydation mit Jod [7] in einem Gemisch von Methanol und Dimethylformamid direkt in das cyclische Decapeptid I übergeführt werden; die beiden Tritylreste werden dabei als Trityl-methyl-äther abgespalten. Nach Gegenstromverteilung erhielt man I in einer

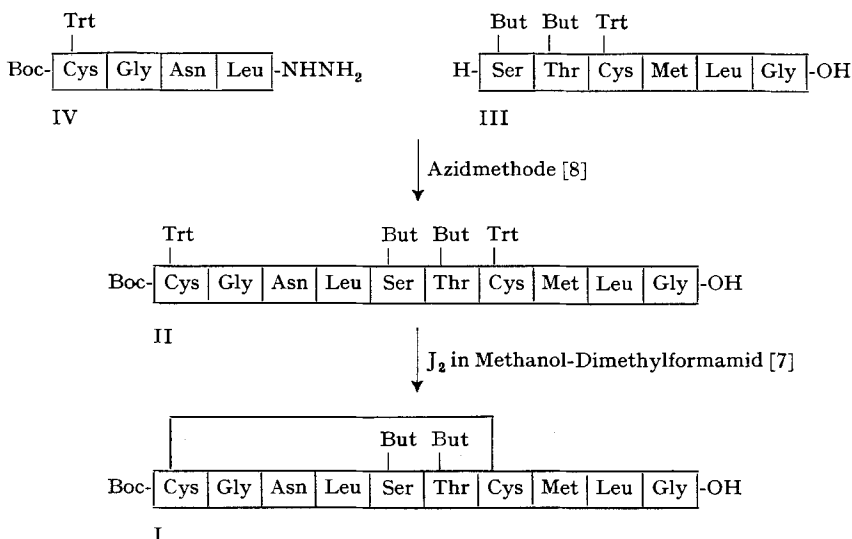
<sup>1)</sup> IV.: siehe [1].

<sup>2)</sup> Zur hier verwendeten, abgekürzten Schreibweise für Aminosäuren, Peptide und ihre Derivate vgl. [2]; ferner bedeuten: Boc-: *t*-Butyloxycarbonyl-; Bpoc-: 2-(*p*-Biphenyl)-isopropoxy-carbonyl- [3]; But-: *t*-Butyl-; -ONp: *p*-Nitrophenyloxy-; -OSu: N-Hydroxysuccinimidester; Trt-: Trityl-; Z-: Benzylloxycarbonyl-.

Ausbeute von 70%; die im Rohprodukt vorhandenen, geringen Anteile des Sulfoxidderivates von I sowie des I-Methylesters wurden dabei abgetrennt.

Die Bildung des Methylesters von I wird vermutlich durch die bei der Jodoxydation entstehende Jodwasserstoffsäure katalysiert. Das Produkt wurde mit authentischem, aus I durch Veresterung mit Diazomethan hergestelltem Material, identifiziert.

Schema 1. *Synthese des geschützten Calcitonin M-(1-10)-decapeptides I*



Zum Aufbau des Decapeptidderivates II diente die nachfolgend beschriebene Fragmentkondensation der Teilsequenzen 1–4 und 5–10.

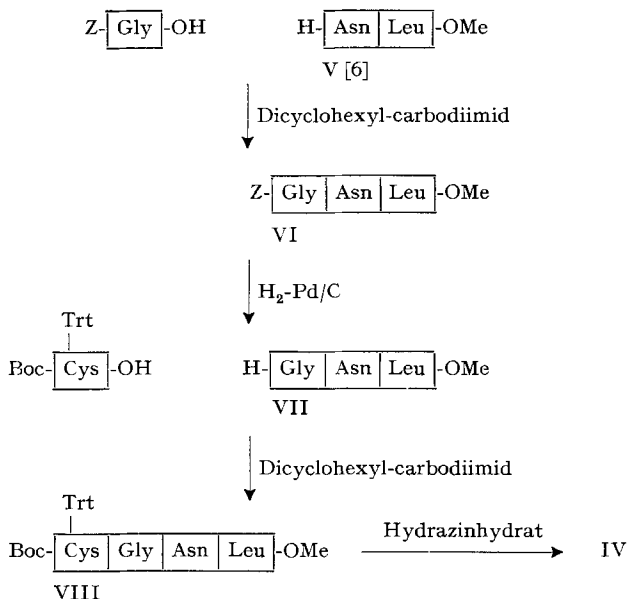
*Synthese des offenkettigen, geschützten Decapeptids II.* Man baute zunächst nach der in den Schemen 2 und 3 skizzierten Weise die Teilsequenzen 1–4 (IV) und 5–10 (III) auf.

*Sequenz 1–4, Boc-Cys(Trt)-Gly-Asn-Leu-NHNH<sub>2</sub> (IV)* (vgl. Schema 2): Ausgehend von H-Asn-Leu-OMe (V) [6] gelangte man in stufenweisem Aufbau zum gut kristallisierten Tetrapeptidderivat VIII, das durch Hydrazinolyse in das ebenfalls kristalline Hydrazid IV übergeführt wurde.

*Sequenz 5–10, H-Ser(But)-Thr(But)-Cys(Trt)-Met-Leu-Gly-OH (III)* (vgl. Schema 3): Das aus dem kristallinen Tripeptid X nach Abspaltung der Boc-Gruppe erhaltene, nicht ganz reine H-Met-Leu-Gly-OMe·HCl (XI) konnte entweder mit Trt-Cys(Trt)-OH und Dicyclohexyl-carbodiimid oder mit Trt-Cys(Trt)-OSu in annehmbaren Ausbeuten zum kristallinen Trt-Cys(Trt)-Met-Leu-Gly-OME (XII) umgesetzt werden. Nach Abspaltung der N<sup>α</sup>-Tritylgruppe mit 80-proz. Essigsäure kuppelte man das erhaltene XIII mit dem aus Bpoc-Ser(But)-Thr(But)-NHNH<sub>2</sub> (XIV) [6] nach Honzl & Rudinger [8] bereiteten Azid. Man erhielt so das kristalline Hexapeptidderivat XV (Ausbeute: 82%), das nach Abspalten der Bpoc-Gruppe mit Essigsäure und anschliessender alkalischer Verseifung das kristalline, sehr schwerlösliche III ergab.

*Sequenz 1–10, Boc-Cys(Trt)-Gly-Asn-Leu-Ser(But)-Thr(But)-Cys(Trt)-Met-Leu-Gly-OH (II)* (vgl. Schema 1): Azidkondensation nach [8] der Fragmente III und IV führte zum Decapeptidderivat II, das sich infolge seiner Schwerlöslichkeit aus dem Reaktionsgemisch abschied und durch Umfällen gereinigt wurde.

*Sterische Einheitlichkeit von I und II:* Nach Aufbauweise und Kristallinität erscheint die sterische Einheitlichkeit der Teilsequenzen 1–4 (IV), 5–6 (XIV) und 7–10 (XII) als gesichert. Dagegen ist teilweise Racemisierung des Leucinrests 4 und des

Schema 2. *Aufbau von Boc-Cys(Trt)-Gly-Asn-Leu-hydrazid (IV)*

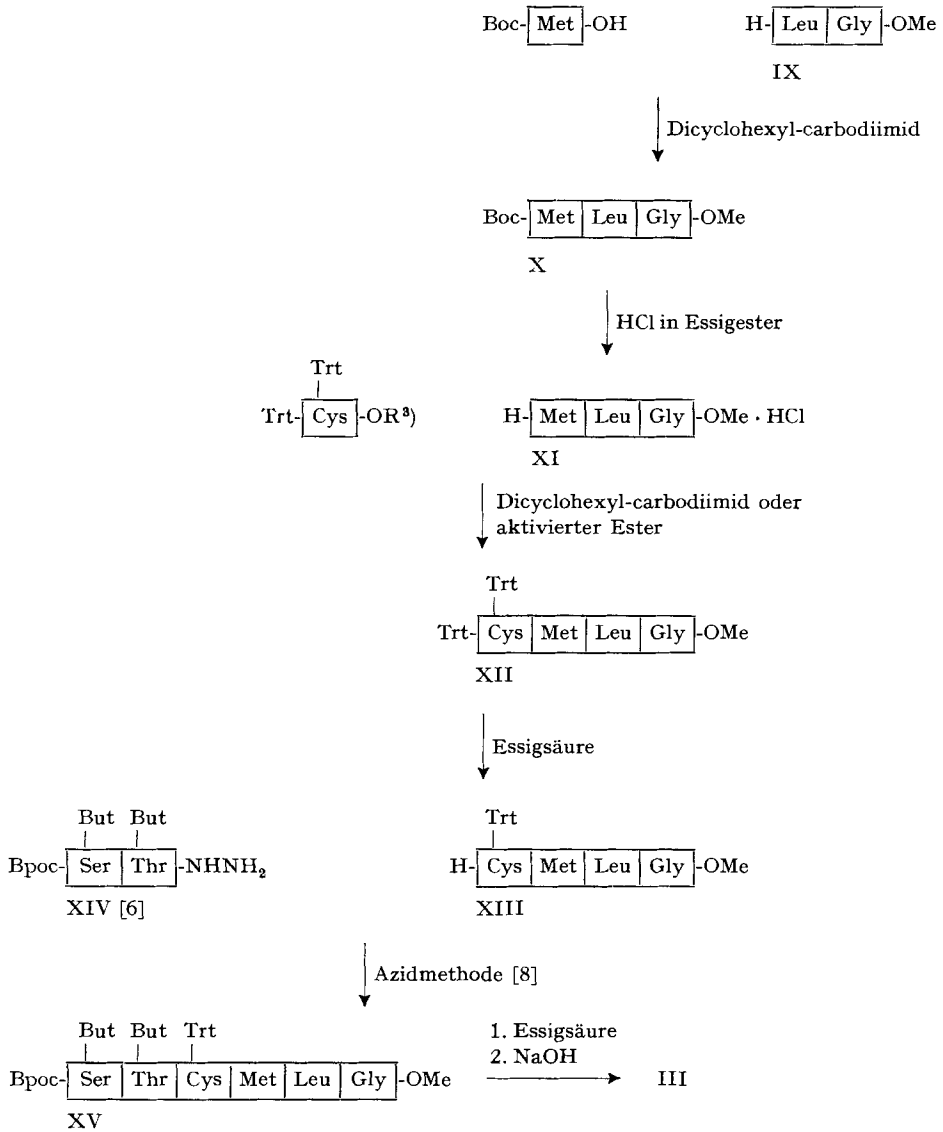
Threoninrests 6 unter den angewendeten Bedingungen der Azidkondensation (Gegenwart von Triäthylamin) möglich [9]. Das Totalhydrolysat des aus I hergestellten, freien Decapeptids H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-OH (XVI) (vgl. unten) wurde deshalb auf Gehalt an D-Allo-threonin und D-Leucin untersucht. Nach Dünnschichtchromatographie (Bedingungen vgl. exp. Teil) enthielt das Hydrolysat keine nachweisbare Menge Allo-threonin (weniger als 1% des Threonin-gehalts). Der durch L-Aminosäureoxydase-Abbau feststellbare Gehalt an D-Leucin ( $\sim 1,5\%$  des gesamten Leucins) entsprach dem durch gleiche Hydrolysebedingungen an natürlichem Calcitonin M hervorgerufenen Racemisierungsgrad des Leucins (vgl. dazu auch [10]).

Obwohl somit die beiden fraglichen Aminosäurereste in den Decapeptiden I und II in der L-Form vorliegen, ist nicht auszuschliessen, dass zwar bei den Azidkupplungen von IV und XIV Diastereomere gebildet, jedoch im Verlauf der weiteren Reinigungsoperationen wieder abgetrennt wurden.

*Freies Calcitonin-M-(1–10)-decapeptid.* Zur weiteren Charakterisierung wurde I durch Trifluoressigsäure in das Decapeptid H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-OH (XVI) übergeführt. Dieses wird dabei als zunächst wasserlösliches Trifluoracetat erhalten; aus der Lösung scheidet sich aber allmählich das ausserordentlich schwer lösliche, innere Salz aus. Nach Totalhydrolyse zeigt XVI das erwartete Aminosäurenverhältnis.

Wie bereits an anderer Stelle berichtet [11], wirkt XVI auch in hoher Dosierung nicht hypocalcaemisch; ebenso ist es ohne Hemmwirkung auf die spezifische Bindung von Calcitonin an dessen Antikörper in Kaninchenserum [12].

Schema 3. *Synthese der geschützten Sequenz 5-10, H-Ser (But)-Thr (But)-Cys (Trt)-Met-Leu-Gly-OH (III)*



### Experimenteller Teil

Alle Rf.-Werte beziehen sich auf *Dünnschichtchromatographien* auf folgenden Trägermaterialien:

S: Kieselgel (Fertigplatten SL 254 der Firma *Antec*, Birsfelden),

C: Cellulose (Avicel Fertigplatten der Firma *Schleicher & Schuell*).

Die Lösungsmittelsysteme hatten folgende Zusammensetzung (Volumteile):

<sup>a)</sup> R = H oder Su.

System 43 A	tert.-Amylalkohol-2-Propanol-Wasser	67 + 26 + 7
System 43 C	tert.-Amylalkohol-2-Propanol-Wasser	51 + 21 + 28
System 45	2-Butanol – 3-proz. wässr. NH <sub>3</sub>	70 + 30
System 48	1-Butanol-Aceton-Diäthylamin-Wasser	37 + 37 + 8 + 18
System 52	1-Butanol-Essigsäure-Wasser	71 + 7 + 22
System 52 A	1-Butanol-Essigsäure-Wasser	67 + 10 + 23
System 57	2-Propanol-Ameisensäure-Wasser	77 + 4 + 19
System 96	2-Butanol-Essigsäure-Wasser	67 + 10 + 23
System 100	Essigester-Pyridin-Essigsäure-Wasser	62 + 21 + 6 + 11
System 150	Oberphase aus 1-Butanol-Aceton-konz. NH <sub>3</sub> -Wasser	8 + 1 + 1 + 6

Die Platten wurden mit *Reindel-Hoppe*-Reagens oder mit Ninhydrin angefärbt.

**1. Boc-Cys(Trt)-Gly-Asn-Leu-NHNH<sub>2</sub> (IV).** – 1.1. *Z-Gly-Asn-Leu-OMe (VI)*: 56,5 g (218 mMol) H-Asn-Leu-OMe (V) [6] wurden in 350 ml Dimethylformamid gelöst und bei 5° mit 75,6 g (229 mMol) *Z-Gly-ONp* versetzt. Nach 15 Std. bei 5° dampfte man bei 40°/0,01 Torr zur öligen Konsistenz ein, gab 1,5 l Essigester zu, nutschte den gallertigen Niederschlag ab und kristallisierte ihn aus Methanol-Essigester-Petroläther und aus Methanol-Wasser um: 72,3 g (70% d. Th.) IV, Smp. 157–158°;  $[\alpha]_D^{20} = -30^\circ$  ( $c = 2,1$  in Methanol).

C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (450,5) Ber. C 55,99 H 6,71 N 12,44% Gef. C 56,06 H 6,66 N 12,27%

1.2. *H-Gly-Asn-Leu-OMe (VII)*: 38,22 g (85 mMol) VI wurden in 500 ml Methanol gelöst und in Gegenwart von 7,65 g Palladiumkohle (10% Pd) bei 22°/840 Torr hydriert, wobei man das entstehende CO<sub>2</sub> in einem zweiten Hydriergefäß mit Lauge absorbierte. Nach beendeter H<sub>2</sub>-Aufnahme filtrierte man vom Katalysator ab, dampfte das Filtrat ein und fällte den Rückstand aus Methanol-Essigester-Petroläther um. Smp. 138–139°;  $[\alpha]_D^{20} = -36^\circ$  ( $c = 1$  in Methanol).

C<sub>13</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (316,4) Ber. C 49,35 H 7,65 N 17,71% Gef. C 49,14 H 7,77 N 17,50%

1.3. *Boc-Cys(Trt)-Gly-Asn-Leu-OMe (VIII)*: 55,5 g (175,5 mMol) VII wurden in 560 ml Dimethylformamid gelöst, und dann 97,6 g (210 mMol) Boc-Cys(Trt)-OH [7] sowie 40,4 g (351 mMol) N-Hydroxysuccinimid zugegeben. Hierauf kühlte man auf 0° und gab 54,2 g (263 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid zu. Nach 48 Std. bei 0° filtrierte man vom Dicyclohexylharnstoff ab, engte im Hochvakuum bei 40° auf ca. 350 ml ein und goss die Lösung unter starkem Rühren in 2 l eiskalte 1N Essigsäure. Der Niederschlag wurde abgenutscht, neutral gewaschen, getrocknet und zweimal aus Chloroform-Petroläther umkristallisiert: 94 g (70%) VIII; zur Analyse kristallisierte man gleich um, Smp. 147–148°;  $[\alpha]_D^{20} = -8^\circ$  ( $c = 2,1$  in Methanol).

C<sub>40</sub>H<sub>51</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>S (761,94) Ber. C 63,05 H 6,75 S 4,21% Gef. C 62,79 H 6,90 S 4,45%

1.4. *Boc-Cys(Trt)-Gly-Asn-Leu-NHNH<sub>2</sub>-hemihydrat (IV)*: 94 g (123,3 mMol) VIII wurden in 1,4 l Methanol bei 60° gelöst, dann kühlte man auf Raumtemperatur, gab 110 ml Hydrazinhydrat zu, belies 16 Std. und goss die Lösung in ein Gemisch von 2 l Wasser, 200 ml Eisessig und 100 ml Methanol, wobei IV als flockiger Niederschlag ausfiel. Man nutschte ab und resuspendierte zur Entfernung des Hydrazins 5mal unter jeweiligem Abnutschen in je 1 l Wasser. Nach Trocknen erhielt man 89,1 g (95%) IV als Hemihydrat von Smp. 198–199°;  $[\alpha]_D^{20} = -12^\circ$  ( $c = 1,9$  in Methanol). Rf(S) = 0,59 (96), 0,24 (Chloroform-Methanol 8:2).

C<sub>39</sub>H<sub>51</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>S (771,0) Ber. C 60,76 H 6,80 N 12,72% Gef. C 60,94 H 6,81 N 12,80%

**2. H-Cys(Trt)-Met-Leu-Gly-OMe (XIII).** – 2.1. *H-Leu-Gly-OMe (IX)*: 30,24 g (90 mMol) *Z-Leu-Gly-OMe* [13] wurden in 300 ml Methanol gelöst und nach Zusatz von 6 g Palladiumkohle (10% Pd) wie bei 1.2. angegeben hydriert. Das instabile, als Öl erhaltene Produkt wurde sofort weiterverwendet. Es enthielt nach Dünnschichtchromatogramm ca. 5% des entsprechenden Dioxopiperazins [Rf-Werte in eckigen Klammern], Rf(S) = 0,38 [0,65] (Chloroform-Methanol 4 + 1), 0,28 [0,10] (Toluol-Aceton 1:1).

2.2. *Boc-Met-Leu-Gly-OMe (X)*: Ca. 90 mMol IX wurden in 350 ml Acetonitril gelöst, 24,7 g (99 mMol) Boc-Met-OH zugegeben, auf 0° gekühlt und die entstandene Suspension mit 26 g (126 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt. Man rührte 2 Std. bei 0° und 18 Std. bei 22°, filtrierte den Dicyclohexylharnstoff ab und dampfte das Filtrat ab. Nach Umfällung des Rückstandes aus Benzol-Petroläther und Kristallisation aus Methanol-Wasser: 58,9 g (79%). Zur Analyse wurde

aus Benzol-Petroläther kristallisiert, Smp. 126–128°;  $[\alpha]_D^{20} = -53^\circ$  ( $c = 2,1$  in Methanol). Rf(S) = 0,69 (43 A), 0,66 (Chloroform-Methanol 9:1).

$C_{19}H_{35}N_3O_6S$  (433,6) Ber. C 52,64 H 8,14 S 7,40% Gef. C 52,59 H 8,11 S 7,45%

2.3. *H-Met-Leu-Gly-OMe·HCl* (XI): Aus einer Lösung von 63,4 g (146 mMol) X in 225 ml 3,8 N HCl in Essigester (Gasentwicklung) wurde XI nach 30 Min. Stehen bei 20° durch Zugabe von 800 ml Petroläther als Schmiere ausgefällt, die man nach Abdekantieren mit peroxidfreiem Äther zerrieb. Nach Abnutschen, Waschen mit Äther und Trocknen über KOH erhielt man 54,8 g XI als amorphes, stark hygroskopisches Pulver, Rf(S) = 0,41 (43 A), 0,38 (Chloroform-Methanol 9:1). Das Produkt wurde in dieser Form weiter umgesetzt; es enthielt nach Dünnschichtchromatogramm ca. 5% einer stark polaren Verunreinigung (vermutlich das *t*-Butyl-sulfoniumchlorid-Derivat).

2.4. *Trt-Cys* (Trt)-OSu: 30,3 g (50 mMol) Trt-Cys(Trt)-OH [14]<sup>4</sup> wurden in 150 ml Essigester gelöst und mit einer Lösung von 6,33 g (55 mMol) N-Hydroxysuccinimid in 15 ml Dimethylformamid versetzt. Man kühlte auf 0°, gab 11,3 g (55 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid zu, rührte 1 Std. bei 0° und 5 Std. bei 22° und nutschte den Dicyclohexylharnstoff ab. Das Filtrat wurde mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Dann kristallisierte man aus Benzol-Petroläther: 34,8 g (89%) (Nadelchen), Smp. 130° (Zers.); das Produkt enthält 1 Mol. Kristall-Benzol;  $[\alpha]_D^{20} = +64^\circ$  ( $c = 2$  in Chloroform).

$C_{45}H_{38}N_2O_4S, C_6H_6$  (781,0) Ber. C 78,43 H 5,68 N 3,59% Gef. C 78,28 H 5,68 N 3,97%

2.5. *Trt-Cys* (Trt)-Met-Leu-Gly-OMe (XII). – a) *Mittels Dicyclohexyl-carbodiimid*: 111 g (183 mMol) Trt-Cys(Trt)-OH, 45,2 g (122 mMol) H-Met-Leu-Gly-OMe·HCl (XI) und 17 ml (122 mMol) Triäthylamin wurden in 600 ml Acetonitril gelöst. Unter Eiskühlung gab man dann 40,4 g (196 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid zu und belies 18 Std. bei 20° unter Stickstoff. Zur Abtrennung von Dicyclohexylharnstoff fügte man 90 ml Methanol und 140 ml Benzol zu, rührte 1 Std., nutschte ab, dampfte das Filtrat zur Trockne ein und fällte das rohe XII aus Dimethylformamid-Wasser und aus Essigester-Methanol-Petroläther um. Dann kristallisierte man aus Chloroform-Petroläther (Nadelchen); Ausbeute 91,5 g (81%); Smp. 218–220°;  $[\alpha]_D^{20} = +47^\circ$  ( $c = 2$  in Chloroform). Rf(S) = 0,55 (Chloroform-Methanol 97:3), 0,46 (*n*-Butylacetat), 0,72 (Toluol-Aceton 1:1).

$C_{55}H_{60}N_4O_5S_2$  Ber. C 71,71 H 6,57 N 6,08 S 6,96%  
(921,2) Gef. „ 71,68 „ 6,45 „ 5,84 „ 7,03%

b) *Via N-Hydroxysuccinimidester*: 14,6 g (39,5 mMol) XI wurden in 100 ml Dimethylformamid und 5,78 ml Triäthylamin gelöst und bei 0° 32,4 g (41,5 mMol) Trt-Cys(Trt)-OSu· $C_6H_6$  zugegeben. Dann liess man 18 Std. bei 23° unter Stickstoff stehen, nutschte das Triäthylamin-hydrochlorid ab, fällte aus dem Filtrat das rohe XII durch Zugabe von 200 ml Wasser und reinigte dann wie bei a): 30,7 g (84%) reines XII, das mit dem unter a) erhaltenen Produkt identisch war.

2.6. *H-Cys* (Trt)-Met-Leu-Gly-OMe· $CH_3COOH$  (XIII): Eine Lösung von 5,59 g (6 mMol) XII in 40 ml Eisessig versetzte man tropfenweise mit insgesamt 10 ml Wasser, wobei man darauf achtete, dass die Substanz gelöst blieb. Nach 1 Std. bei 20° gab man weitere 30 ml Wasser zu, nutschte das Triphenylcarbinol (1,48 g) ab, dampfte das Filtrat ein, versetzte den Rückstand mit wenig Wasser und lyophilisierte. Man erhielt 4,47 g XIII (essigsäures Salz) als farbloses Pulver; Rf(S) = 0,30 (Toluol-Aceton 7:3), 0,20 (Chloroform-Methanol 97:3).

3. **H-Ser(But)-Thr(But)-Cys(Trt)-Met-Leu-Gly-OH (III)**. – 3.1. *Bpoc-Ser(But)-Thr(But)-Cys(Trt)-Met-Leu-Gly-OMe* (XV): Zu 4,4 g (7,7 mMol) Bpoc-Ser(But)-Thr(But)-NHNH<sub>2</sub> (XIV) [6] in 40 ml Dimethylformamid wurden bei –10° 9,6 ml 2 N HCl in Essigester (19,2 mMol) und 0,91 ml (8 mMol) *t*-Butylnitrit gegeben. Nach 15 Min. tropfte man unter Rühren bei –10° eine Lösung von 5,18 g (7 mMol) XIII und 2,7 ml (19,2 mMol) Triäthylamin in 35 ml Dimethylformamid zu. Nach 1 Std. bei –10° und 15 Std. bei 0° wurde vom Triäthylamin-HCl abfiltriert und das Filtrat bei 40°/0,01 Torr eingedampft. Der Rückstand wurde mit Wasser zerrieben, abgutscht und nach Trocknen in 150 ml Benzol-Petroläther 1:2 suspendiert. Das unlösliche Produkt

4) Das Derivat wurde wie folgt in kristalliner Form erhalten: Man löste 54 g seines Diäthylaminsalzes durch Verteilen in Essigester und 10-proz. Citronensäurelösung; wusch die organische Phase neutral, trocknete sie und dampfte ein. Den Rückstand (48,5 g) kristallisierte man aus Benzol-Petroläther; Ausbeute 45,0 g, Smp. 125–128° (Zers.);  $[\alpha]_D^{20} = +70^\circ$  ( $c = 1$  in Methanol).

wurde abgenutscht und aus Methanol kristallisiert: 7,0 g (82%) XV, Smp. 175–177°;  $[\alpha]_D^{20} = -33^\circ$  ( $c = 1,1$  in Methanol). Rf(S) = 0,40 (Chloroform-Methanol 49:1), 0,45 (Chloroform-Aceton 4:1).

$C_{67}H_{88}N_6O_{11}S_2$	Ber. C 66,09	H 7,29	N 6,90	S 5,27%
(1218,6)	Gef. „ 65,86	„ 7,43	„ 6,73	„ 5,41%

3.2. *H-Ser(But)-Thr(But)-Cys(Trt)-Met-Leu-Gly-OH (III)*. – a) *Abspaltung der Bpoc-Gruppe aus XV*: Eine Lösung von 8,46 g (6,95 mMol) XV in 100 ml 80-proz. Essigsäure wurde nach  $1\frac{1}{2}$  Std. Stehen bei 45° im Vakuum eingedampft. Den Rückstand löste man in 15 ml Methanol und 65 ml Essigester und fällte bei 0° mit 300 ml Petroläther aus: 7,2 g dünn-schichtchromatographisch einheitliches H-Ser(But)-Thr(But)-Cys(Trt)-Met-Leu-Gly-OME als essigsäures Salz; Rf(S) = 0,55 (Chloroform-Aceton 1:1), 0,70 (Chloroform-Methanol 9:1).

b) *Alkalische Verseifung zu III*: Eine Lösung von 7,3 g (7 mMol) des unter a) erhaltenen Produkts in 100 ml 90-proz. Methanol wurde mit 20 ml 1N Natronlauge versetzt. Nach 30 Min. kühlte man auf 0° und setzte 20 ml 1N Salzsäure zu, wobei ein dicker Brei ausfiel. Man fügte Wasser zu, nutschte ab, wusch Chlorid-frei, trocknete und kristallisierte aus heissem Methanol (5,95 g; 88%): Smp. > 250°;  $[\alpha]_D^{20} = -17^\circ$  ( $c = 0,5$  in Dimethylformamid). Rf(S) = 0,60 (100), 0,55 (Chloroform-Methanol 1:1).

$C_{50}H_{72}N_6O_9S_2$ (965,3)	Ber. N 8,71	S 6,64%	Gef. N 8,68	S 6,80%
---------------------------------	-------------	---------	-------------	---------

4. **Boc-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(But)-Thr(But)-Cys-Met-Leu-Gly-OH (I)**. – 4.1. *Boc-Cys(Trt)-Gly-Asn-Leu-Ser(But)-Thr(But)-Cys(Trt)-Met-Leu-Gly-OH (II)*: Zu einer auf  $-10^\circ$  gekühlten Lösung von 5,95 g (7,6 mMol) IV (Hemihydrat) in 80 ml Dimethylformamid wurden 9,75 ml 2N HCl in Essigester (19,5 mMol) und 1,08 ml (9,35 mMol) *t*-Butylnitrit gegeben. Nach 15 Min. bei  $-10^\circ$  tropfte man eine gekühlte Lösung von 6,25 g (6,5 mMol) III und 3,64 ml (26 mMol) Triäthylamin in 70 ml Dimethylformamid zu und belies 1 Std. bei  $-10^\circ$  und 15 Std. bei 0°. Das Gemisch erstarrte dabei zu einem dicken Brei. Man verdünnte mit 100 ml kaltem Methanol, nutschte ab, suspendierte den Niederschlag zweimal in Wasser, nutschte wieder ab und trocknete. Man erhielt 8,70 g II (79%), das nach Titration mit  $HClO_4$  in Eisessig zu 28% als Triäthylaminsalz vorlag. II ist in organischen Lösungsmitteln schwer-, in Dimethylformamid zu etwa 2% löslich. Zur Bereitung der freien Säure löste man in heissem Dimethylformamid, gab Essigsäure zu und fällte mit Methanol aus; Smp. 230° (Zers.);  $[\alpha]_D^{20} = -8^\circ$  ( $c = 0,5$  in Dimethylformamid); Rf<sup>(5)</sup>(S) = 0,55 (Chloroform-Methanol 7:3).

$C_{89}H_{116}N_{11}O_{16}S_3$ (1695,2)	Ber. N 9,09	S 5,67%	Gef. N 9,22	S 5,73%
---	-------------	---------	-------------	---------

4.2. *Boc-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(But)-Thr(But)-Cys-Met-Leu-Gly-OH (I)*: 1,7 g (1 mMol) II (zu 28% als Triäthylaminsalz vorliegend) wurden in 170 ml Dimethylformamid gelöst und mit 0,27 ml 1N wässr. HCl versetzt. Diese Lösung tropfte man innert 20 Min. bei 20° in eine stark gerührte Lösung von 2,54 g (10 mMol) Jod in 500 ml Methanol. Man liess noch 1 Std. reagieren, kühlte dann auf 0°, entfärbte die Lösung durch tropfenweise Zugabe<sup>6)</sup> von 1N wässriger Natriumthiosulfatlösung (Verbrauch: 17,3 ml), gab noch 1,8 ml 1N Natronlauge zu und dampfte bei 40° und 11 Torr bzw. 0,01 Torr auf ca. 20 ml ein. Dann fällte man mit peroxidfreiem Äther, dekantierte ab und wusch den Niederschlag mit Äther nach. Nach Trocknen suspendierte man in Wasser, nutschte das Pulver (rohes I) ab und trocknete es (1,05 g) (die Ätherlösung gab nach Eindampfen und Extraktion mit Petroläther 503 mg (92%) kristallinen Trityl-methyl-äther). Das Rohprodukt, das nach Dünnschichtchromatographie neben I kleine Anteile seines Sulfoxidderivates sowie des Methyl-esters enthielt (Rf.-Werte vgl. Tabelle) wurde mittels Gegenstromverteilung im System Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff-Methanol-Puffer 3+1+5+2 (Puffer: 28,6 ml Essigsäure, 19,3 g Ammoniumacetat, 1 l Wasser) gereinigt. Nach 250 Verteilungsschritten befand sich das reine I in den Röhren 87–130 ( $K = 0,64$ ) (Sulfoxidderivat:  $K = 1,20$ ; Methyl-ester:  $K = 0,15$ ). Der Inhalt dieser Elemente wurde vereinigt, abgedampft und der Rückstand zur Entfernung des Ammoniumacetats bei 40°/0,01 Torr getrocknet. Zum Abtrennen der letzten Reste dieses Salzes löste man in 5 ml *t*-Butanol-Wasser (4:1), filtrierte über eine Säule (1 × 5 cm) von Amberlyst 15 und lyophilisierte das Eluat: 850 mg (70%) I als stark hygroskopisches Produkt, das nach Titration mit Lauge

<sup>5)</sup> Proben zu DS-Chromatographie, gelöst zu 1% in Chloroform-Methanol-konz.  $NH_3$  19:80:1.

<sup>6)</sup> Ein Überschuss ist zu vermeiden.

einen Gehalt an freien Carboxylgruppen von 96% aufwies; Mol.-Gew. vaporometrisch in Methanol:  $1088 \pm 100$ ;  $[\alpha]_D^{20} = -39^\circ$  ( $c = 0,5$  in Chloroform).

$C_{51}H_{89}N_{11}O_{16}S_3$  (1208,5) Ber. N 12,75 S 7,96% Gef. N 12,22 S 7,67%

Rf.-Werte (S) von I, I-sulfoxid und I-methylester

Substanz:	Rf.-Werte in den Systemen:		
	43c	45	100
I	0,35	0,35	0,45
I-Sulfoxid <sup>a)</sup>	0,28	0,30	0,20
I-Methylester <sup>b)</sup>	0,65	0,72	0,75

a) Aus I durch Oxydation mit  $H_2O_2$  dargestellt.

b) Hergestellt aus I durch Diazomethan in Methylenchlorid.

**5. Freies Decapeptid H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-OH (XVI).** – 50 mg I wurden in 1 ml 90-proz. Trifluoressigsäure gelöst und 1 Std. bei  $20^\circ$  belassen. Dann fällte man bei  $0^\circ$  mit peroxidfreiem Äther, dekantierte, wusch mit Äther nach und trocknete. Das Pulver (43 mg) wurde in 0,1N Essigsäure gelöst, über eine Säule ( $1 \times 5$  cm) von *Merck*-Ionenaustauscher Nr. II (Acetatform) filtriert und das Eluat lyophilisiert, wobei man 35 mg freies Decapeptid XVI erhielt. Die Aminosäureanalyse des Totalhydrolysats (6N HCl, 15 Std.,  $105^\circ$ ) gab folgendes molares Verhältnis (berechnete Werte in Klammern): Asn 0,91 (1), Thr 0,94 (1), Ser 0,87 (1), Gly 2,00 (2),  $1/2$  (Cys)<sub>2</sub> 1,91 (2), Met 1,14 (1), Leu 2,00 (Bezugswert); Rf(S) = 0,22 (52), 0,47 (87).

Gehalt an *Allo-threonin*: ein Aliquot des Hydrolysates (entspr. 30  $\mu$ g Threonin) wies nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie (C) (1. System: 48, 2. System: 150) kein *Allo-threonin* auf (Nachweisgrenze: 0,3  $\mu$ g).

Gehalt an *D-Leucin*: Man löste das zur Trockne eingeeengte Hydrolysats aus 1,57  $\mu$ Mol Decapeptid in 80  $\mu$ l Trispuffer (0,2M, pH 7,5), stellte mit 1N LiOH auf pH 7,5 und gab weiteren Trispuffer zu bis zum Volumen von 200  $\mu$ l. Davon entnahm man 15  $\mu$ l (entspr. 30,8  $\mu$ g Leucin) und inkubierte nach Zugabe von 2  $\mu$ l Antibiotica-Mischung<sup>7)</sup> und 6  $\mu$ l 1-proz. L-Aminosäureoxydase-Lösung (rohes Schlangengift d. Firma *Nutritional Biochemical Corp.*) unter  $O_2$  während 24 Std. bei  $38^\circ$ . Proben von 4  $\mu$ l dieser Lösung verglich man dünn-schichtchromatographisch (C) (Systeme 52 A und 87) mit einer Verdünnungsreihe von *Leucin*. Es wurde ein Gehalt von ca. 0,04  $\mu$ g oxydaseresistentes *D-Leucin* (entspr. 1,3%) gefunden.

Das Trifluoracetat von XVI ist in Wasser zu ca. 1% löslich. Eine solche Lösung erstarrt bei  $20^\circ$  in wenigen Std. zum praktisch unlöslichen, gallertigen, inneren Salz.

Für die Überlassung von Zwischenprodukten danken wir den Herren Dr. *B. Iselin* und Dr. *W. Kessler*. Wir danken den Herren *H. R. Keller*, *J. Blessing* und Fräulein *V. Hug* für ihre sorgfältige technische Mitarbeit.

Dünnschichtchromatographien und Aminosäureanalysen wurden in verdankenswerter Weise in unserem Chromatographielabor (Leitung: Herr *E. von Arx*) durch Frau *K. Reist* und Frau *M. Rist*, sowie die Herren *D. Faupel* und *R. Steiner*, ausgeführt. Mikroanalysen und Spektren verdanken wir unsern Speziallaboratorien unter der Leitung der Herren Dres. *W. Padowetz* und *H. Hürzeler*.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *P. Sieber, M. Brugger, B. Kamber, B. Riniker & W. Rittel*, *Helv. 51*, 2057 (1968).
- [2] *IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature*, Tentative Rules, *Biochim. Biophysica Acta 121*, 1 (1966); *Biochemistry 6*, 362 (1967).
- [3] *P. Sieber & B. Iselin*, *Helv. 51*, 622 (1968); *52*, 1525 (1969).

<sup>7)</sup> Lösung bzw. Suspension von je 1 mg Penicillin-G, Streptomycin, Chlortetracyclin und Nystatin in 1 ml Wasser.



- [4] *W. Rittel, M. Brugger, B. Kamber, B. Riniker & P. Sieber*, *Helv. 51*, 924 (1968); *B. Riniker, M. Brugger, B. Kamber, P. Sieber & W. Rittel*, *Helv. 52*, 1058 (1969); *St. Guttman, J. Pless, E. Sandrin, P.-A. Jaquenoud, H. Bossert & H. Willems*, *Helv. 51*, 1155 (1968); *St. Guttman, J. Pless, R. L. Huguenin, E. Sandrin, H. Bossert & K. Zehnder*, *Helv. 52*, 1789 (1969).
- [5] *B. Riniker, R. Neher, R. Maier, F. W. Kahnt, P. G. H. Byfield, T. V. Gudmundsson, L. Galante & I. MacIntyre*, *Helv. 51*, 1738 (1968).
- [6] *B. Kamber & W. Rittel*, *Helv. 52*, 1074 (1969).
- [7] *B. Kamber & W. Rittel*, *Helv. 51*, 2061 (1968).
- [8] *J. Honzl & J. Rudinger*, *Coll. czechoslov. chem. Commun. 26*, 2333 (1961).
- [9] *F. Weygand, A. Prox & W. König*, *Chem. Ber. 99*, 1451 (1966).
- [10] *B. Riniker & R. Schwyzer*, *Helv. 44*, 658 (1961).
- [11] *P. Sieber, M. Brugger, B. Kamber, B. Riniker, W. Rittel, R. Maier & M. Staehelin*, in: «Calcitonin 1969», im Druck.
- [12] *F. M. Dietrich & W. Rittel*, *Nature 225*, 75 (1970).
- [13] *R. W. Young, K. H. Wood, R. J. Joyce & G. W. Anderson*, *J. Amer. chem. Soc. 78*, 2126 (1956).
- [14] *G. Amiard, R. Heymes & L. Velluz*, *Bull. Soc. chim. France 1956*, 698.

## 60. Komplexe XLIII

### Die Komplexe des dreiwertigen Antimons mit Polyaminocarboxylaten

von **G. Anderegg** und **S. Malik**

Laboratorium für Anorganische Chemie der Eidg. Techn. Hochschule Zürich

(23. II. 70)

*Summary.* If a strong base is added to solutions containing complexes of trivalent antimony with aminopolycarboxylates, these ligands are displaced, and oversaturated solutions of antimony (III) hydroxide are formed. This reaction has been used to investigate the formation of complexes of  $\text{Sb}^{\text{III}}$  with the following ligands:  $N'$ -hydroxyethyl-ethylenediamine- $N, N, N'$ -triacetate ion, ethylenediamine- $N, N, N', N'$ -tetraacetate ion, 1,2-diaminocyclohexane- $N, N, N', N'$ -tetraacetate ion, and diethylenetriamine- $N, N, N', N'', N''$ -pentaacetate ion.

Die Komplexe des dreiwertigen Antimons werden als chemotherapeutische Mittel in der Medizin verwendet. Es ist deshalb nicht erstaunlich, dass die ersten Veröffentlichungen über die Assoziate mit den Polyaminocarboxylaten von Bearbeitern auf dem Gebiet der Chemotherapie publiziert wurden.

*Chue & Chi* [1] haben erstmals  $\text{HSbEDTA}$  präparativ gefasst und damit die Existenz eines Äthylendiamintetraacetat (EDTA)-Komplexes bewiesen. Ähnliche Beobachtungen machte einige Zeit später *Jardin* [2], der auch eine Methode für die komplexometrische Titration des dreiwertigen Antimons vorschlug. *Chu & Chi* [3] haben später Komplexsalze mit den folgenden Liganden isoliert: Äthylendiamin- $N, N, N', N'$ -tetraacetat,  $N'$ -(2-Hydroxyäthyl)-äthylendiamin- $N, N, N'$ -triacetat,  $N'$ -Benzoyl-äthylendiamin- $N, N, N'$ -triacetat, Nitrilotriacetat und  $N$ -( $\beta$ -Hydroxyäthyl)-iminodiacetat. Die festen Salze mit den zwei letzten Liganden erwiesen sich als instabil. Im Falle des Tetramethylendiamin- $N, N, N', N'$ -tetraacetates, des Di-( $\beta$ -Aminoäthyl)-thioäther- $N, N, N', N'$ -tetraacetates und einiger substituierter Iminodiacetate konnten sie keine Komplexbildung feststellen. *Privalova & Ryubchikov* [4] haben aus amperometrischen Titrationen die Zusammensetzung der EDTA- und der 1,2-Diaminocyclohexan- $N, N, N', N'$ -tetraacetat-Komplexe ermittelt. *Chu, Wang & Chang* [5] haben eine grosse Anzahl neuer Liganden, nämlich  $N'$ -substituierte Äthylendiamin- $N, N, N'$ -triacetate mit Thioätherresten hergestellt, ohne jedoch damit stabilere Anti-