

255. Menschliches Calcitonin. VI¹⁾. Die Synthese von Calcitonin M²⁾

von P. Sieber, B. Riniker, M. Brugger, B. Kamber und W. Rittel

Chemische Forschungslaboratorien der Division Pharmazeutika der
CIBA-GEIGY AG., Basel

(14. X. 70)

Summary. A detailed account is given of the total synthesis of human calcitonin M, the hypocalcaemic hormone possessing the dotriacontapeptide sequence I. In the build up of I, the protected sequences 1–10 and 11–32 served as intermediates for the preparation of the protected precursor dotriacontapeptide 1–32 (II). While the synthesis of the fragment 1–10 has been reported previously [1], the present account includes a detailed description of the build up of the intermediate 11–32. Racemisation encountered in the synthesis of this fragment is discussed and conditions indicated in which it is minimized.

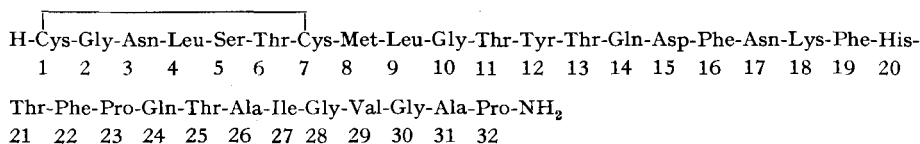
From the final coupling step using dicyclohexylcarbodiimide-*N*-hydroxysuccinimide [3], the protected dotriacontapeptide II was obtained pure in a yield of 65% after counter-current distribution.

In the removal by acidolysis of the protecting groups from II even under optimal conditions two side reactions occur: alkylation of the 8-methionine side chain and *N* to *O* acyl migration at the serine or threonine residues. By-products from these reactions were removed by counter-current distribution giving very pure I free of diastereoisomers and possessing the biological activity of highly purified natural calcitonin M. In the routine assay [4] after repeated testing its activity was evaluated at 100 ± 5 U/mg (calculated on content of free peptide).

In einer Kurzzmitteilung [2] haben wir die Synthese des aus menschlichem Schilddrüsentumorgewebe isolierbaren hypocalcaemischen Hormons Calcitonin M [5], das die Dotriacontapeptidsequenz I besitzt [6], beschrieben. Die Synthese, die bereits zum biologisch voll aktiven, mit natürlichem Calcitonin M identischen Hormon führte, ist inzwischen mehrmals wiederholt worden.

Im Folgenden beschreiben wir ausführlich den vorteilhaftesten Syntheseweg. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei der Reinigung und Charakterisierung von Zwischen- und Endprodukten sowie dem Nachweis und der Unterdrückung von Nebenreaktionen gewidmet.

Formelschema 1. I, Calcitonin M [6]³⁾



¹⁾ V.: siehe [1].

²⁾ Vorläufige Mitteilung vgl. [2].

³⁾ Zur in dieser Arbeit verwendeten, abgekürzten Schreibweise für Aminosäuren, Peptide und ihre Derivate vgl. [7]. Weitere Abkürzungen: Boc = *t*-Butyloxycarbonyl-; But = *t*-Butyl-; DCCI = Dicyclohexylcarbodiimid; Np = *p*-Nitrophenyl-; Su = 1-Succinimidyl-; Z = Benzoyloxycarbonyl-.

Beschreibung der Synthese

Die zur Synthese von I herangezogene Methodik folgte weitgehend derjenigen, die in unsern Laboratorien zum Aufbau des Schweine- α -Thyrocalcitonins entwickelt und ausführlich beschrieben worden ist [8]. Die nachfolgende Diskussion kann deshalb auf die beim Aufbau der grösseren Teilsequenzen sowie bei den letzten Stufen gemachten Beobachtungen eingeschränkt werden.

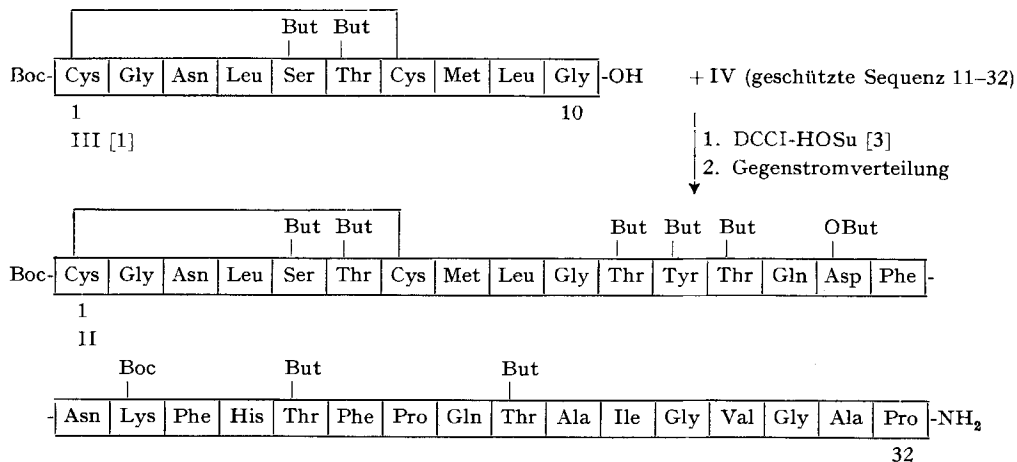
Herstellung des geschützten Calcitonin M-(1-32)-dotriacontapeptidamids II. Wie im Formelschema 2 angegeben, ging der letzte Aufbauschritt von den geschützten Teilsequenzen 1-10 (III) und 11-32 (IV) aus. Über die Synthese von III wurde kürzlich [1] eingehend berichtet, diejenige von IV wird weiter unten beschrieben.

Zur Herstellung von II verknüpfte man diese beiden Fragmente nach der Methode von *Weygand-Wünsch* [3] mittels DCCI-HOSu. Nach Gegenstromverteilung des Rohprodukts erhielt man dabei reines II in 65% Ausbeute (berechnet auf die im Unterschuss eingesetzte Komponente IV). Bei diesem Reinigungsverfahren wurden auch geringe Mengen des in II enthaltenen *D*-Histidin²⁰-Isomeren (zu seiner Entstehung vgl. unten) auf Grund seines stärker polaren Verhaltens abgetrennt.

Der Nachweis dieses Diastereomeren, das sich von II dünn-schichtchromatographisch nicht unterscheiden lässt, ist umständlich: dazu wurden die einzelnen Verteilungsfractionen durch Acidolyse mittels konz. Salzsäure von den Schutzgruppen befreit und die freien Peptidfraktionen mit Trypsin inkubiert. Im *D*-His²⁰-Calcitonin M ist die Trypsinspaltung am Lysinrest 18 gegenüber derjenigen in I sehr stark verlangsamt. Dieses Diastereomere macht sich deshalb in Dünn-schichtchromatogrammen als «trypsinresistentes I» bemerkbar. Dass es sich dabei tatsächlich um das *D*-Histidin-Isomere handelt, wurde durch Totalhydrolyse und Abbau mit *L*-Aminosäureoxydase nachgewiesen (Methodik vgl. exper. Teil).

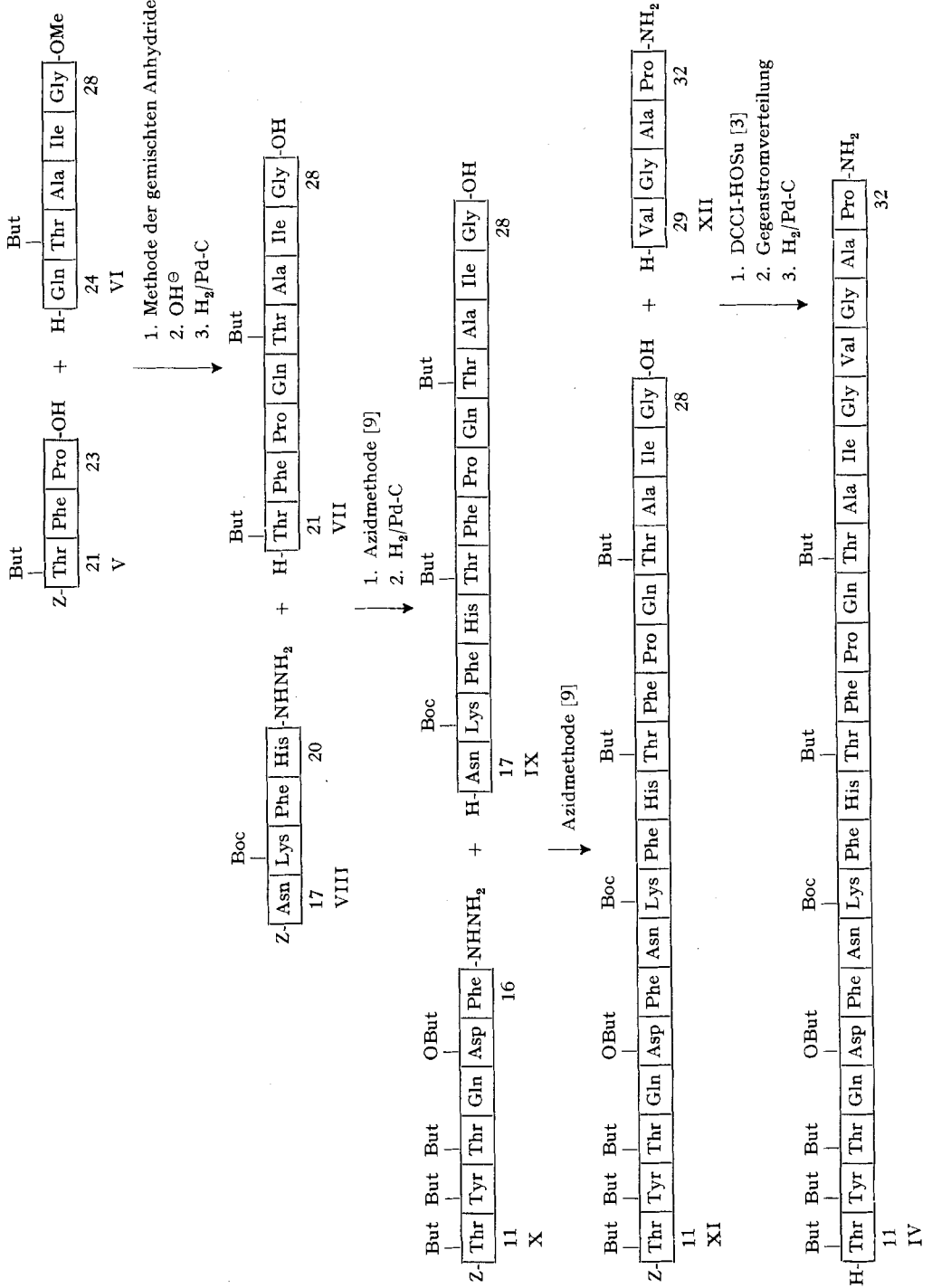
Bis auf eine Spur des Sulfoxidderivates wurden im gereinigten II dünn-schichtchromatographisch keine Verunreinigungen nachgewiesen, dagegen wurde die Bildung von Artefakten beobachtet.

Formelschema 2. Aufbau der geschützten Calcitonin M-(1-32)-sequenz (II)



Aufbau des geschützten Calcitonin M-(11-32)-docosa-peptidamids (IV); Racemisierung und Verseifung von Peptidaziden. Zunächst stellte man, meist in stufenweisem Aufbau, die im Formelschema 3 angegebenen Teilsequenzen 11-16 (X), 17-20 (VIII),

Formelschema 3. Aufbau der geschützten Calcitonin M-(11-32)-sequenz (IV)



21–23 (V), 24–28 (VI) und 29–32 (XII), dar. Diese Synthesen führten ohne Schwierigkeiten in allen Fällen zu kristallinen Derivaten. Die weitere Verknüpfung erfolgte nach Formelschema 3.

Kupplung der Teilsequenzen V und VI mittels der Methode der gemischten Anhydride führte zum kristallinen Benzyloxycarbonyl-methylesterderivat der Sequenz 21–28, das ohne Schwierigkeiten verseift und dann zu VII hydriert wurde.

Mehr Schwierigkeiten bot die weitere Kupplung der Fragmente VIII und VII nach der *Azidmethode*. Da diese unter optimalen Bedingungen, d. h. unter Isolierung des Azids, angewendet, bekanntlich [10] praktisch ohne Racemisierung verläuft, versuchte man zunächst, das nach *Honzl & Rudinger* [9] aus VIII hergestellte Azid zu isolieren. Dabei trat aber weitgehende Verseifung zur freien Carbonsäure am His²⁰ ein. Offenbar wird die Hydrolyse durch die Imidazolgruppe katalysiert⁴⁾.

Wurde aber das aus VIII hergestellte Azid in üblicher Weise im Eintopfverfahren mit VII umgesetzt, wobei man zur Neutralisation der Säure gerade so viel Triäthylamin zusetzte, dass die Mischung auf feuchtem Indikatorpapier schwach alkalisch reagierte, so trat erhebliche Racemisierung des Histidinrests auf; das so hergestellte Benzyloxycarbonylderivat von IX enthielt bis zu 6 Mol-% D-Histidin (nachgewiesen durch Totalhydrolyse und Abbau mit L-Aminosäureoxidase). Offenbar stellt die zuerst von *Weygand, Prox & König* [11] sowie von *Anderson* und Mitarbeitern [12] in speziellen Fällen beobachtete Azidracemisierung durch Triäthylamin auch unter den hier und vielfach andernorts verwendeten, nicht besonders drastisch erscheinenden Reaktionsbedingungen, eine nicht zu unterschätzende Gefahr dar.

In Modellversuchen wurde zunächst [13] versucht, Einfluss von Basentyp und -Konzentration auf den Grad der Racemisierung abzuklären. Obwohl in einzelnen Fällen der Wechsel von Triäthylamin zu Äthyl-diisopropylamin (*Hünig*-Base) die Racemisierung teilweise herabsetzte, so war im Fall des Azids von VIII die Vermeidung von jeglichem Basenüberschuss von grösserer Bedeutung. Fügte man zum Azidansatz im Verlauf der Reaktion nur die genau zur Neutralisation der freien Salzsäure und zur Freisetzung der Aminogruppe des als inneres Salz zugegebenen VII notwendige Menge *Hünig*-Base zu, so fiel der Gehalt an D-Histidin der Sequenz IX auf 1,5 Mol-%. Dieser geringe Gehalt an Diastereomerem liess sich in den nächsten Synthesestufen nicht abtrennen, konnte aber auf der Stufe des geschützten Dotriacontapeptids II durch Gegenstromverteilung entfernt werden.

Das aus der Azidkondensation von VIII und VII erhaltene Benzyloxycarbonylderivat von IX reinigte man durch Umfällen und entfernte die Benzyloxycarbonylgruppe durch katalytische Hydrierung.

Bei der weitem Umsetzung mit dem aus der Sequenz 11–16 (X) hergestellten Azid nach dem Eintopfverfahren bewirkte Zusatz von überschüssigem Triäthylamin bis zu 20% Racemisierung des Phenylalaninrests 16. Auch hier konnte sie stark vermindert werden durch Verwendung von genau einem Äquivalent *Hünig*-Base, berechnet auf

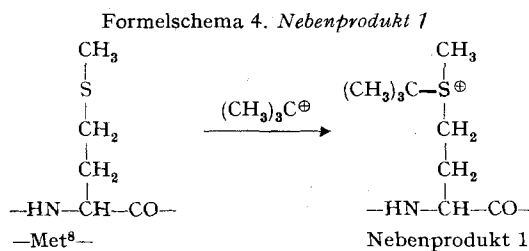
⁴⁾ Versuche, diese Reaktion präparativ zur Verseifung von Aziden anzuwenden, mit dem Ziel, die Reaktionsfolge Methylester → Hydrazid → Azid → Carbonsäure zur Verseifung schwer verseifbarer Peptidester nutzbar zu machen, haben ergeben, dass Azide in organisch-wässrigem Milieu bei schwach basischen Bedingungen in Gegenwart von Imidazol quantitativ verseift werden. Dabei tritt aber teilweise Racemisierung ein, wodurch die Anwendbarkeit der Reaktion erheblich eingeschränkt wird.

die zur Bildung des Azids zugegebene Salzsäure. Der Gehalt an D-Phenylalanin im Endprodukt XI betrug dann noch 2%; allerdings war die Ausbeute unter diesen Bedingungen etwas geringer, offenbar weil keine zusätzliche Base zur Freisetzung der Aminogruppe aus dem als essigsäures Salz eingesetzten IX zugegen war. Auch hier konnte der Anteil an D-Phenylalanin-Diastereomeren erst auf einer späteren Synthesestufe, bei Gegenstromverteilung des Benzyloxycarbonylderivates der Teilsequenz IV (11–32) entfernt werden.

Die Sequenz XI reinigte man durch Umfällen und kondensierte sie nach [3] mit einem Überschuss des Tetrapeptids 29–32 (XII). Aus der Gegenstromverteilung des Rohprodukts erhielt man 56% reines Benzyloxycarbonylderivat von IV, wobei das D-Phe¹⁶-Diastereomere mit den hydrophileren Fraktionen abgetrennt wurde. Katalytische Hydrierung zur Entfernung der Benzyloxycarbonylgruppe führte zu IV.

Freies Calcitonin M-(11–32)-docosa-peptidamid. Abspaltung der Schutzgruppen aus IV durch Acidolyse mit konz. Salzsäure führte zum freien Calcitonin M-(11–32)-peptidamid, das, wie wir bereits früher berichtet haben [14], an der Ratte auch in hohen Dosen keine hypocalcaemische Aktivität besitzt.

Charakterisierung von Calcitonin M (I). Zur acidolytischen Abspaltung der Schutzgruppen aus II eignete sich am besten die Einwirkung von konz. Salzsäure bei 0° (5–10 Min.). Das dabei erhaltene, rohe I besass zwar bereits volle biologische Aktivität, enthielt aber neben ca. 5% Sulfoxidderivat zwei weitere, bei der Säurebehandlung entstandene Nebenprodukte. Nebenprodukt 1, das nur zu ca. 1% vorhanden ist, zeigt bei Elektrophorese (pH 1,9) gegenüber I eine zusätzliche positive Ladung und verhält sich bei Dünnschichtchromatographie stärker polar. Auf Grund seiner Ladung, seines chemischen Verhaltens und anhand von Modellversuchen⁵⁾ handelt es sich dabei um I, das an der Thioäthergruppe des Methionins⁸ durch die bei der Abspaltung der Schutzgruppen gebildeten *t*-Butyl-Kationen alkyliert worden ist (Formelschema 4).



⁵⁾ Belässt man das freie Calcitonin M-(1–10)-decapeptid H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-OH [1] in *t*-Butanol-haltiger Trifluoressigsäure, so wird es grösstenteils in ein Produkt umgewandelt, das wie Nebenprodukt 1 bei Elektrophorese (pH 1,9) eine positive Ladung mehr besitzt. Dass die Veränderung an der Methionin⁸-thioäthergruppe stattgefunden hat, geht daraus hervor, dass das Umwandlungsprodukt nicht mehr in das Sulfoxidderivat überführt werden kann; ferner wird die sehr ähnlich gebaute α -Thyrocalcitoninsequenz 1–9, H-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-OH [15], die aber kein Methionin enthält, unter obigen Alkylierungsbedingungen nicht verändert.

Bedingungen, unter denen *t*-Butylsulfoniumderivate in die entsprechenden Thioäther zurückverwandelt werden [16], wandeln sowohl das alkylierte Decapeptid wieder in das Ausgangsmaterial um und führen auch Nebenprodukt 1 grösstenteils wieder in I über.

Diese Nebenreaktion, die bei der Acidolyse der von *t*-Butanol abgeleiteten Schutzgruppen auftritt, ist auch in andern Fällen beobachtet worden [17]. Bei optimalen Acidolysebedingungen sind im rohen I zusätzlich zum Nebenprodukt 1 ca. 10% Material enthalten, das bei der Elektrophorese ebenfalls eine positive Ladung mehr besitzt (vgl. Fig. 1, Nr. 1). Bei dem als «Nebenprodukt 2» bezeichneten Produkt handelt es sich um Derivate, die aus I durch eine N → O-Acylwanderung an einem der Serin- oder Threoninreste entstanden sind [18]. Da potentiell die N-Acylgruppe jedes dieser 6 Aminosäurereste der Umlagerungsreaktion unterliegt, müssen wir annehmen, dass das in der Elektrophorese einheitlich erscheinende «Nebenprodukt 2» in Wirklichkeit ein Gemisch mehrerer Verbindungen darstellt, die an je einer einzelnen dieser 6 Stellen umgelagert wurden. Diese Annahme wird bestätigt durch die Beobachtung, dass bei längerdauernder Säureeinwirkung weitere Nebenprodukte mit 2 oder mehr zusätzlichen positiven Ladungen auftreten («Nebenprodukt 2»; Fig. 1, Nr. 5). Unter neutralen oder schwach basischen Bedingungen wird «Nebenprodukt 2» wieder in I zurückverwandelt, weshalb es sich bei Dünnschichtchromatographie der Beobachtung entzieht.

Durch Gegenstromverteilung des rohen I werden alle Nebenprodukte abgetrennt; das gereinigte Produkt enthält aber wieder geringe Mengen des bei der Aufarbeitung entstandenen Sulfoxidderivates. Sein Gehalt, bestimmt nach [19], betrug 4%.

Fig. 1 zeigt den dünnschichtelektrophoretischen Vergleich des Acidolyse-Rohprodukts von I (Nr. 1) mit dem durch Gegenstromverteilung gereinigten I (Nr. 2), sowie die vermehrte Bildung von Nebenprodukten bei längerdauernder Einwirkung

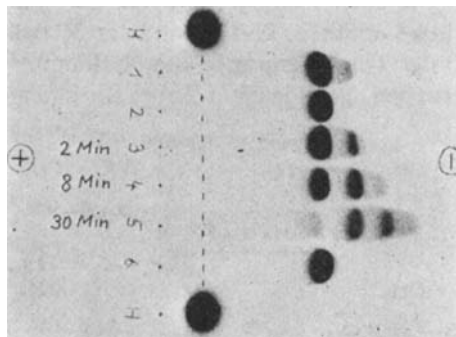


Fig. 1. Cellulose-Dünnschichtelektrophorese (pH 1,9, 90 Min. 16 V/cm) von Calcitonin M und dessen «Nebenprodukt 2»

Details siehe Text; H = Harnstoff

von konzentrierter Salzsäure bei Raumtemperatur (Nr. 3–5). Nr. 6 zeigt die Rückverwandlung des «Nebenprodukts 2» in Nr. 3 durch kurzes Stehen in wässriger Lösung bei pH = 7,5.

Zur Prüfung auf optische Reinheit baute man das Totalhydrolysat von I mit L-Aminosäureoxidase ab; dabei wurden die durch das Enzym abbaubaren Aminosäuren (Lys, His, Ala, (Cys)₂, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe) in gleichem Masse oxydiert wie diejenigen eines Vergleichshydrolysates von natürlichem Calcitonin M (Fehlergrenze ± 0,5 Mol-%). Damit ist die optische Reinheit aller im Verlauf der Synthese

racemisierungsgefährdeten Aminosäurereste (Leu⁴, Leu⁹, Thr⁷, Phe¹⁶, His²⁰) gesichert⁶⁾.

Über die Identifizierung des synthetischen mit natürlichem I haben wir bereits berichtet [2]. Das synthetische Produkt zeigte in mehrfach wiederholter biologischer Testierung⁷⁾ genau gleiche Wirkstärke und Wirkdauer wie hochgereinigtes, natürliches I; die Aktivität betrug im Test nach *Kumar et al.* [4] 100 ± 5 ⁸⁾ E/mg (berechnet auf Peptidrockengewicht⁹⁾).

Assoziation von I in wässriger Lösung. In Form seines Acetats oder Hydrochlorids ist I in Wasser leicht löslich. Im Gegensatz zu Schweine- α -Thyrocalcitonin neigt es aber in solchen schwach sauren Lösungen zu Assoziation, äusserlich erkennbar an der Bildung gallertiger Fällungen oder an der starken Viskositätszunahme der Lösung. Der Vorgang kann, ähnlich wie ein Kristallisationsprozess, durch Überimpfen beschleunigt werden. Die flockig-gallertigen Fällungen sind «sphärokristallin» [23]; im Polarisationsmikroskop sind doppelbrechende, zentrosymmetrische Partikel (Sphärite) erkennbar. Die viskosen (fibrillären) Lösungen, die zumeist auch Sphärite enthalten, weisen statische Doppelbrechung auf (Fig. 2).

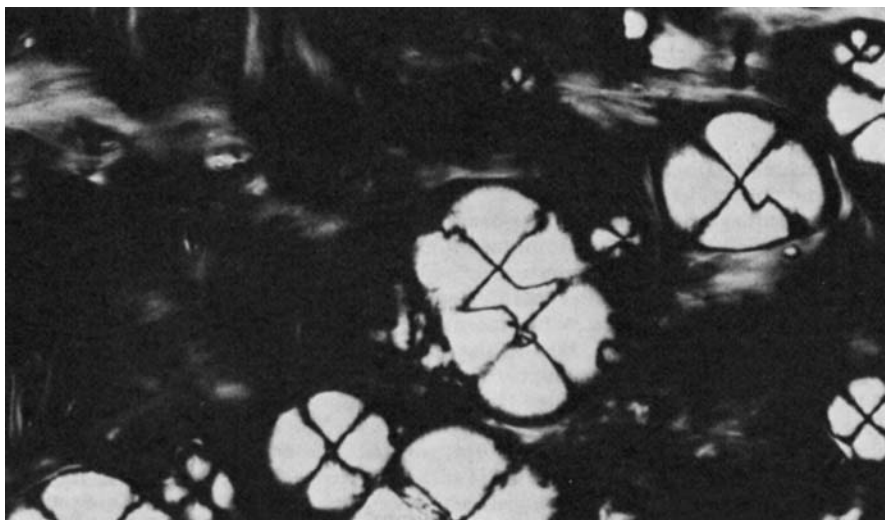


Fig. 2. Fibrilläre Lösung und Sphärite von Calcitonin M im Dunkelfeld des Polarisationsmikroskops Vergrösserung ca. 100

- ⁶⁾ Diejenige von Leu⁴ und Thr⁷ wurde bereits auf der Stufe des Decapeptids 1–10 nachgewiesen [1].
- ⁷⁾ Für die Überlassung dieser Resultate danken wir Herrn Dr. R. Maier und Herrn W. Pignat.
- ⁸⁾ S. E. M. aus 41 Versuchen.
- ⁹⁾ *Greven & Tax* [20] fanden für ein auf anderem Syntheseweg hergestelltes I in der gleichen Testierungsanordnung 82 E/mg, ein Wert, der mit dem von uns gefundenen innerhalb der Fehlergrenze übereinstimmen dürfte. Dagegen wurde kürzlich [21] für das von uns synthetisierte I eine biologische Aktivität von 309 E/mg angegeben. Diese Differenz dürfte durch die verschiedene Applikationsweise bedingt sein: während hier im Test nach [4] die Proben intravenös appliziert werden, erfolgte bei [21] die Testierung nach subcutaner Injektion, bei der, wie früher gezeigt werden konnte [22], die Ratte eine mehrfach erhöhte Empfindlichkeit gegen I aufweist im Vergleich mit dem als Standardpräparat verwendeten Schweine-Thyrocalcitonin.

Im Elektronenmikroskop¹⁰⁾ (vgl. Fig. 3) sind Fibrillen mit einem Durchmesser von etwa 80 Å sichtbar, die häufig zu spiralförmigen Doppelfibrillen mit einer Ganghöhe von ca. 1500 Å vereinigt sind.

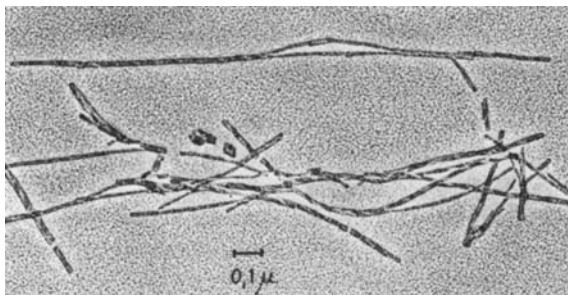


Fig. 3. Elektronenmikroskopische Aufnahme von Pt-beschatteten Calcitonin M-Fibrillen

Die Assoziation von Calcitonin M ist physikalischer Natur und beruht nicht auf der Bildung kovalent gebundener Polymerer. Der Prozess ist vollständig reversibel; so erhält man z.B. bei kurzem Erwärmen der Fibrillen oder Sphärite in 50-proz. Essigsäure wieder das leichtlösliche monomere I zurück. Eine analoge Assoziation zu Fibrillen wurde auch bei Insulin [23] [24] und Glucagon [25] beobachtet.

Experimenteller Teil

Allgemeines. – Die Smp. sind auf einem Apparat nach Dr. *Tottoli* (der Fa. *Büchi*, Flawil) bestimmt und unkorrigiert.

Für Literaturangaben zur Darstellung der hier verwendeten Aminosäurederivate vgl. [26].

«Übliche Aufarbeitung» bedeutet: Aufnehmen im angegebenen Lösungsmittel, Waschen der Lösung mit 5-proz. wässriger Zitronensäurelösung, Wasser, verdünnter NaHCO_3 -Lösung und Wasser, Trocknen mit Natriumsulfat und Eindampfen.

Hydrierungen unter «üblichen Bedingungen» zur Entfernung der Z-Gruppe wurden wie folgt ausgeführt: man schüttelte die Lösung der Substanz in Gegenwart von 10–20 Gew.-% Palladiumkohle (10% Pd) in H_2 -Atmosphäre bei 25° und 840 Torr. Das entstehende CO_2 wurde in einem zweiten, mit Natronlauge gefüllten Hydriergefäß absorbiert. Nach beendeter H_2 -Aufnahme nutschte man den Katalysator ab und engte das Filtrat zur Trockne ein.

Reinheitskontrolle durch Dünnschichtchromatographie: Alle angegebenen Rf-Werte beziehen sich auf Dünnschichtchromatographien. Dazu dienen folgende Trägermaterialien: S: Kieselgel (Fertigplatten SL 254 der Fa. *Antec*, Birsfelden). C: Cellulose (Avicel Fertigplatten 1440 der Fa. *Schleicher & Schüll*). Als Fließmittel dienen die nachfolgenden Lösungsmittelsysteme (Verhältnisse in Volumenteil):

43 E: <i>t</i> -Amylalkohol-2-Propanol-Wasser	32 + 32 + 36
45: 2-Butanol-3-proz. wässriges NH_3	70 + 30
52: 1-Butanol-Essigsäure-Wasser	71 + 7 + 22
52 A: 1-Butanol-Essigsäure-Wasser	67 + 10 + 23
70: Oberphase aus Essigester-Pyridin-Wasser	40 + 20 + 40
89: Essigester-Aceton-Wasser	72 + 24 + 4
100: Essigester-Pyridin-Essigsäure-Wasser	62 + 21 + 6 + 11
101 A: 1-Butanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser	42 + 24 + 4 + 30
102 E: Essigester-2-Butanon-Essigsäure-Wasser	50 + 30 + 10 + 10
107: Essigester-Pyridin-Wasser	49 + 24 + 27
115: Essigester-Pyridin-Ameisensäure-Wasser	63 + 21 + 10 + 6

¹⁰⁾ Herrn Dr. *W. Stäubli*, Biologische Forschungslaboratorien, sind wir für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen sehr zu Dank verpflichtet.

Die Anfärbung der Platten erfolgte mit *Reindel-Hoppe*-Reagens oder mit spezifischen Farb-reaktionen nach [27].

Abbau mit L-Aminosäureoxidase: Man hydrolysierte 2 mg Peptid mit 1,5 ml 6 N HCl während 15 Std. bei 105°, löste das über KOH zur Trockne eingeengte Hydrolysat in 50 μ l 0,2 M Trispuffer (pH = 7,5), stellte durch Zugabe von 2 N LiOH auf pH = 7,5 und ergänzte mit weiterem Trispuffer auf ein Volumen von 100 μ l. Dann gab man 80 μ l 2-proz. L-Aminosäureoxidase¹¹⁾-Lösung in Trispuffer und 20 μ l Antibioticamischung¹²⁾ zu und inkubierte 24 Std. in O₂-Atmosphäre bei 38°. Proben dieser Lösung gab man direkt auf den Aminosäureanalysator.

Die Blindwerte für die während der HCl-Totalhydrolyse auftretende Racemisierung wurden anhand von natürlichem Calcitonin M bestimmt; man fand hierbei die folgenden Mengen nicht oxydierbarer D-Aminosäuren (Angaben in Mol-%): His 2,0%, Ala 1,2%, (Cys)₂ 1,0–1,5%¹³⁾, Val < 1%, Met \leq 1%, allo-Ile \leq 1%, Leu 0,9%, Tyr 1,0–1,5%, Phe 1,0%¹⁴⁾.

1. Sequenz 11–16, Z-Thr(But)-Tyr(But)-Thr(But)-Gln-Asp(OBut)-Phe-NHNH₂ (X).

–1.1. *H-Asp(OBut)-Phe-OMe·HCl*: 48,6 g (0,1 Mol) Z-Asp(OBut)-Phe-OMe [28] wurden in 700 ml Methanol nach Zugabe von 33,5 ml 3 N HCl in Dioxan (0,1 Mol) wie üblich hydriert. Man erhielt 38,7 g farbloses Harz, das direkt für die nächste Umsetzung verwendet wurde.

1.2. *Z-Gln-Asp(OBut)-Phe-OMe*: Eine Lösung von 38,6 g (0,1 Mol) H-Asp(OBut)-Phe-OMe·HCl und 42,0 g Z-Gln-ONp (0,105 Mol) in 210 ml Dimethylformamid wurde mit 13,9 ml (0,1 Mol) Triäthylamin versetzt. Die entstandene Suspension wurde dann 24 Std. bei 35° Badtemperatur gerührt, gekühlt und mit 200 ml Wasser gefällt. Der Niederschlag wurde genutscht und mit Wasser, Dimethylformamid-Wasser und Essigester gewaschen. Das Produkt kristallisierte aus Methanol bei 0°, Ausbeute 53,5 g (87% d. Th.). Smp. 186–188°; $[\alpha]_D^{20} = -28^\circ$ ($c = 1,3$ in Dimethylformamid).

C₃₁H₄₀N₄O₉ (612,66) Ber. C 60,77 H 6,58 N 9,15% Gef. C 60,66 H 6,56 N 9,14%

1.3. *H-Gln-Asp(OBut)-Phe-OMe·HCl*: 7,55 g (12,3 mMol) Z-Gln-Asp(OBut)-Phe-OMe wurden in 400 ml Methanol und 4,1 ml Chlorwasserstoff in Dioxan (3,0 N; 12,3 mMol) hydriert. Der Eindampfdruckstand, ein farbloser, fester Schaum, wurde direkt in die nächste Stufe eingesetzt. Rf(S) = 0,13 (CHCl₃-MeOH 9:1), 0,22 (102 E).

1.4. *Z-Thr(But)-Gln-Asp(OBut)-Phe-OMe*: 15,6 g (39,8 mMol) Z-Thr(But)-OSu und 13,7 g (26,6 mMol) H-Gln-Asp(OBut)-Phe-OMe·HCl wurden in 40 ml Dimethylformamid gelöst und bei 0° mit 3,7 ml (26,6 mMol) Triäthylamin versetzt. Man rührte 20 Std. bei 24° und arbeitete dann in Essigester wie üblich auf. Man kristallisierte zweimal aus Äthanol um, Smp. 155–161°; $[\alpha]_D^{20} = -17^\circ$ ($c = 1,84$ in Äthanol).

C₃₉H₅₅N₅O₁₁ (769,89) Ber. C 60,84 H 7,20 N 9,10% Gef. C 60,66 H 7,15 N 9,07%

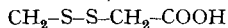
1.5. *H-Thr(But)-Gln-Asp(OBut)-Phe-OMe*: 781 mg (1,0 mMol) Z-Thr(But)-Gln-Asp(OBut)-Phe-OMe wurden in 150 ml Methanol wie üblich hydriert. Man erhielt 640 mg (99%) farblosen, festen Schaum, Rf(S) = 0,75 (Chloroform-Methanol 1:1), 0,23 (102 E).

1.6. *Z-Tyr(But)-Thr(But)-Gln-Asp(OBut)-Phe-OMe*: 460 mg (1,24 mMol) Z-Tyr(But)-OH (aus dem DCHA-Salz freigesetzt) wurden mit 0,139 ml (1,2 mMol) N-Methylmorpholin in 6,5 ml Tetrahydrofuran gelöst und bei –22° mit 0,17 ml (1,3 mMol) Chlorameisensäure-isobutylester versetzt. Man rührte 30 Min. bei –10° und liess dann die Lösung von 395 mg (0,62 mMol) H-Thr(But)-Gln-Asp(OBut)-Phe-OMe in 20 ml Tetrahydrofuran, auf 0° vorgekühlt, einlaufen. Nach 30 Min. Rühren erwärmte man auf 23° und liess während 15 Std. reagieren. Nun wurde im Vakuum eingengt und dann wie üblich aufgearbeitet. Das Rohprodukt fällt man aus Essigester-Äther und kri-

¹¹⁾ Rohes Schlangengift der Fa. *Nutritional Biochemical Corp.*

¹²⁾ Lösung bzw. Suspension der je 1 mg Penicillin-G, Streptomycin, Chlortetracyclin und Nystatin in 1 ml H₂O.

¹³⁾ Ein wesentlicher Teil (ca. 20%?) des L-Cystins wird unter den totalhydrolytischen Bedingungen an einem der beiden C-Atome racemisiert, d. h. es bildet sich meso-Cystin. Dieses wird von



L-Aminosäure-Oxydase zu $\text{NH}_2\text{-}\overset{|}{\text{C}}\text{-COOH}$ (D-Form) abgebaut und erscheint im Aminosäure-Analysator als Pik zwischen Asparaginsäure und Threonin.

¹⁴⁾ Lysin wurde ebenfalls abgebaut, doch konnte die geringe Restmenge von D-Lysin wegen der fast gleichzeitigen Elution mit einem Fremdpek aus Trispuffer nicht genau bestimmt werden.

stallisierte dann aus Methanol; man erhielt 460 mg (75%) Prismen, Smp. 169–173°; $[\alpha]_D^{20} = -4$, ($c = 2,0$ in Dimethylformamid). Rf(S) = 0,46 (Chloroform-Methanol 9:1), 0,73 (102 E).

$C_{52}H_{72}N_6O_{13}$ (989,18) Ber. C 63,14 H 7,34 N 8,50% Gef. C 63,00 H 7,31 N 8,65%

1.7. *H-Tyr(But)-Thr(But)-Gln-Asp(OBut)-Phe-OMe*: 2,36 g (2,38 mMol) *Z-Tyr(But)-Thr(But)-Gln-Asp(OBut)-Phe-OMe* wurden in 450 ml Methanol wie üblich hydriert. Es resultierten 2,02 g (99%) farbloser Schaum, der sich dünnschichtchromatographisch als einheitlich erwies; Rf(S) = 0,22 (Chloroform-Methanol 95:5), 0,42 (89).

1.8. *Z-Thr(But)-Tyr(But)-Thr(But)-Gln-Asp(OBut)-Phe-OMe*: 4,33 g (11,0 mMol) *Z-Thr(But)-OSu* und 6,31 g (7,38 mMol) *H-Tyr(But)-Thr(But)-Gln-Asp(OBut)-Phe-OMe* wurden in 13 ml Dimethylformamid 21 Std. bei 25° gerührt. Anschliessend wurde mit Essigester wie üblich aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde aus Methanol-Äther umgefällt und dann aus Methanol bei 0° kristallisiert: 6,67 g (79%) Produkt vom Smp. 180–182°; $[\alpha]_D^{20} = +9$ ($c = 2,1$ in Dimethylformamid); Rf(S) = 0,55 (Chloroform-Methanol 9:1), 0,60 (Chloroform-Aceton 1:1).

$C_{60}H_{87}N_7O_{15} \cdot H_2O$ (1164,41) Ber. C 61,89 H 7,70 N 8,42% Gef. C 62,02 H 7,55 N 8,37%

1.9. *Z-Thr(But)-Tyr(But)-Thr(But)-Gln-Asp(OBut)-Phe-NH-NH₂(X)*: 5,71 g (4,91 mMol) *Z-Thr(But)-Tyr(But)-Thr(But)-Gln-Asp(OBut)-Phe-OMe \cdot H₂O* wurden in 250 ml Methanol gelöst und bei 20° mit 25 ml Hydrazinhydrat versetzt. Nach 3 Std. Rühren bei 20° und nach Stehen über Nacht, wurde die mikrokristalline Fällung abfiltriert und mit Methanol gewaschen: 4,6 g, Smp. 226–229° (Zers.). $[\alpha]_D^{20} = +5$ ($c = 1,0$ in Dimethylformamid); Rf(S) = 0,32 (Chloroform-Methanol 9:1), 0,34 (89).

$C_{59}H_{87}N_9O_{14} \cdot H_2O$ (1164,4) Ber. C 60,86 H 7,70 N 10,83% Gef. C 60,66 H 7,56 N 10,80%

2. Sequenz 17–20, *Z-Asn-Lys(Boc)-Phe-His-NHNH₂(VIII)*. – 2.1. *Z-Lys(Boc)-Phe-NHNH₂*: Eine Lösung von 142 g (0,26 Mol) *Z-Lys(Boc)-Phe-OMe* [29] in 700 ml Methanol wurde unter Kühlung mit 130 ml Hydrazinhydrat versetzt. Das Hydrazid begann nach kurzer Zeit auszufallen. Nach 18 Std. Stehen bei 25° wurde mit Wasser zerrieben, abgenutscht und mit Wasser Hydrazin-frei gewaschen. Man erhielt 139 g (98%) Hydrazid vom Smp. 173–174°. Zur Analyse wurde aus Methanol-Wasser umkristallisiert, Smp. unverändert; $[\alpha]_D^{20} = -34$ ($c = 1,2$ in Methanol); Rf(S) = 0,22 (Chloroform-Methanol 95:5).

$C_{28}H_{39}N_5O_6$ (541,6) Ber. C 62,09 H 7,26 N 12,93% Gef. C 62,17 H 7,23 N 12,73%

2.2. *Z-Lys(Boc)-Phe-His-OMe*: Eine Lösung von 54 g (0,1 Mol) *Z-Lys(Boc)-Phe-NHNH₂* in 440 ml Dimethylformamid wurde bei –20° mit 59 ml 4,2N HCl in Dioxan und 15 ml *t*-Butylnitrit versetzt. Nach 10 Min. rühren bei –15° wurden 28 ml *N*-Methylmorpholin zugetropft, dann 36 g (0,15 Mol) *H-His-OMe \cdot 2HCl* zugegeben, weitere 33 ml *N*-Methylmorpholin zugetropft und über Nacht bei 0° gerührt. Die Suspension wurde unter Rühren in kleinen Portionen in 600 ml eiskaltes Wasser eingegossen, wobei man durch Zusatz von Natriumhydrogencarbonat auf pH 8 stellte. Nach längerem Rühren bei 0° wurde die feste Fällung abgenutscht und mit Wasser chloridfrei gewaschen. Das erhaltene Rohprodukt (61,7 g; 91%) wurde zur Reinigung an Silicagel chromatographiert; die reine Substanz wurde mit Chloroform-Methanol 95:5 eluiert und aus Essigester umkristallisiert, Smp. 136–137°; $[\alpha]_D^{20} = -15$ ($c = 1$ in Dimethylformamid); Rf(S) = 0,42 (Chloroform-Methanol 9:1).

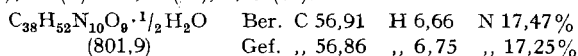
$C_{35}H_{46}N_6O_8$ (678,8) Ber. C 61,93 H 6,83 N 12,38% Gef. C 61,66 H 6,79 N 12,38%

2.3. *Z-Asn-Lys(Boc)-Phe-His-OMe*: 68 g (0,1 Mol) *Z-Lys(Boc)-Phe-His-OMe* wurden in 700 ml Methanol und 12 ml Eisessig wie üblich hydriert. Der erhaltene Rückstand (64 g, Rf(S) = 0,2 (Chloroform-Methanol 85:15)) wurde in 120 ml Dimethylformamid gelöst und mit 42,5 g *Z-Asn-ONp* versetzt. Nach 18 Std. bei 25° zerrieb man die entstandene feste Gallerte mit viel Äther, nutschte ab und wusch mit Äther und Essigester nach (77,4 g; 98%). Zur Reinigung kristallisierte man zweimal aus Methanol, Smp. 183–184°; $[\alpha]_D^{20} = -28$ ($c = 1,1$ in Dimethylformamid); Rf(S) = 0,55 (100).

$C_{39}H_{52}N_8O_{10} \cdot 1/2 H_2O$ Ber. C 58,42 H 6,66 N 13,97%
(801,9) Gef. ,, 58,62 ,, 6,94 ,, 13,72%

2.4. *Z-Asn-Lys(Boc)-Phe-His-NHNH₂(VIII)*: 79,3 g (0,1 Mol) *Z-Asn-Lys(Boc)-Phe-His-OMe* wurden in 160 ml warmem Dimethylformamid gelöst, bei 25° mit 240 ml Methanol und 50 ml Hydrazinhydrat versetzt und 18 Std. bei 25° belassen. Die breiige Suspension wurde mit viel Wasser versetzt, die Fällung abfiltriert und Hydrazin-frei gewaschen. Ausbeute 67,6 g (85%). Das

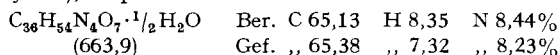
Rohprodukt wurde aus 2,5 l Methanol umkristallisiert, Smp. 201–202°; $[\alpha]_D^{20} = -27^\circ$ ($c = 1$ in 95-proz. Essigsäure); Rf(S) = 0,43 (52), 0,55 (45).



3. Sequenz 21–28, H-Thr(But)-Phe-Pro-Gln-Thr(But)-Ala-Ile-Gly-OH (VII). –

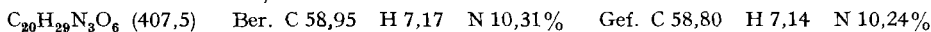
3.1. *H-Phe-Pro-OH*: 94,5 g *Z-Phe-Pro-OH* [30] wurden in 90-proz. Methanol wie üblich hydriert. Das Rohprodukt brachte man nach Einengen der Hydrierlösung durch Zugabe von Wasser-Aceton zur Kristallisation und nutschte ab. Nach Gewinnung einer 2. Kristallmenge aus der Mutterlauge erhielt man total 58 g *H-Phe-Pro-OH*·H₂O, Smp. 123–124° (Zers.)¹⁵⁾

3.2. *Z-Thr(But)-Phe-Pro-OH (V)*: – a) *Triäthylaminsalz*: 61 g *H-Phe-Pro-OH*·H₂O in 400 ml Dimethylformamid wurden mit 30,2 ml Triäthylamin und 107 g *Z-Thr(But)-OSu* versetzt. Man rührte bei Raumtemperatur bis Lösung eintrat und belies dann 18 Std. Dann dampfte man im Hochvakuum zu öligem Konsistenz ein, nahm in Essigester auf, wusch die Lösung mehrmals mit 5-proz. Weinsäurelösung und Wasser und dampfte sie dann zur Trockne ein. Den Rückstand löste man in 800 ml Äther und gab 61 ml Triäthylamin und 5 ml Wasser zu, wobei Kristallisation eintrat. Nach Abnutschen und Trocknen erhielt man 123 g des Triäthylaminsalzes von *Z-Thr(But)-Phe-Pro-OH* (Hemihydrat), Smp. 90–93°.

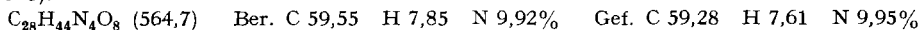


b) *freies Z-Thr(But)-Phe-Pro-OH*: Man verteilte das unter a) erhaltene Triäthylaminsalz zwischen Essigester und 5-proz. wässriger Zitronensäurelösung, wusch die Essigesterlösung mehrmals mit Wasser und dampfte zur Trockne ein. Man erhielt nach Trocknung bei 40° im Hochvakuum 105 g amorphes Pulver vom Smp. ca. 85°, dessen Peptidgehalt gemäss Titration mit NaOH 92% betrug. Rf(S) = 0,68 (115).

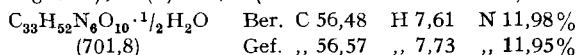
3.3. *Z-Ala-Ile-Gly-OMe*: 24,0 g (0,1 Mol) HCl *H-Ile-Gly-OMe* [31] und 37,8 g (0,11 Mol) *Z-Ala-ONp* wurden in 130 ml Dimethylformamid bei 40° gelöst. Bei 20° wurde die Mischung unter schwacher Kühlung mit 11,1 ml (0,1 Mol) *N-Methylmorpholin* versetzt und gerührt bis sie erstarrte. Nach 18 Std. wurde mit Äther zerrieben, abgenutscht, mit Äther Nitrophenol-frei und mit Wasser chloridfrei gewaschen: 37,2 g (91%), Smp. 189–190°. Zur Analyse wurde aus Essigester-Hexan umkristallisiert, Smp. unverändert; $[\alpha]_D^{20} = -59^\circ$ ($c = 1$ in Methanol); Rf(S) = 0,40 (Chloroform-Methanol 95:5).



3.4. *Z-Thr(But)-Ala-Ile-Gly-OMe*: 56,0 g (0,137 Mol) *Z-Ala-Ile-Gly-OMe* wurden in 450 ml Dimethylformamid wie üblich hydriert. Ohne das Produkt (Rf(S) = 0,38 (100), 0,1 (Chloroform-Methanol 95:5)) zu isolieren, versetzte man die Dimethylformamidlösung unter Kühlung mit 61,9 g *Z-Thr(But)-OSu* in 100 ml Dimethylformamid. Nach kurzer Zeit trat Verfestigung ein. Nach 18 Std. bei 25° wurde mit Äther zerrieben, abgenutscht und mit Wasser und Äther gewaschen: 62,5 g (80%) *Z-Thr(But)-Ala-Ile-Gly-OMe*, das man zur Analyse aus Äthanol umkristallisierte, Smp. 229–230°; $[\alpha]_D^{20} = -43^\circ$ ($c = 1$ in Methanol); Rf(S) = 0,51 (Chloroform-Methanol (95:5)).



3.5. *Z-Gln-Thr(But)-Ala-Ile-Gly-OMe*: 22,6 g (40 mMol) *Z-Thr(But)-Ala-Ile-Gly-OMe* wurden in 300 ml Dimethylformamid wie üblich hydriert. Die erhaltene Dimethylformamidlösung wurde im Hochvakuum auf 130 ml eingeeengt und dann mit einer Lösung von 19 g *Z-Gln-ONp* in 50 ml Dimethylformamid versetzt. Nach kurzer Zeit trat Verfestigung ein. Nach 18 Std. bei Raumtemperatur wurde unter Eiskühlung mit 200 ml Wasser versetzt, die Fällung abgenutscht und mit 50-proz. Dimethylformamid, Wasser und Äther ausgewaschen. Das Rohprodukt wurde mit 1 l Acetonitril-Wasser (1:1) 30 Min. unter Rühren ausgekocht, dann wurde auf 40° abgekühlt und die Fällung abgenutscht: 26,3 g (95%) *Z-Gln-Thr(But)-Ala-Ile-Gly-OMe*, Smp. 260–262° (Zers.). Zur Analyse wurde aus Acetonitril-Wasser umkristallisiert, Smp. unverändert; $[\alpha]_D^{20} = -26^\circ$ ($c = 1$ in 95-proz. Essigsäure); Rf(S) = 0,36 (Chloroform-Methanol 9:1).



¹⁵⁾ Beim Schmelzen Umwandlung in *cyclo(-Phe-Pro-)*.

3.6. *H-Gln-Thr(But)-Ala-Ile-Gly-OMe (VI)*: Eine Suspension von 37,4 g (54 mMol) *Z-Gln-Thr(But)-Ala-Ile-Gly-OMe* in 800 ml 80-proz. *t*-Butanol wurde bei 40° wie üblich hydriert. Nach Lyophilisierung erhielt man 30 g (100%) VI, Smp. 242–245° (Zers.); Gehalt (durch Titration mit 0,1N Perchlorsäure in Eisessig): 98%; Rf(S) = 0,33 (100). Das Produkt enthält Spuren des Pyroglutamyl-Derivats, Rf(S) = 0,71 (100).

3.7. *Z-Thr(But)-Phe-Pro-Gln-Thr(But)-Ala-Ile-Gly-OMe*: Zu einer Lösung von 30 g (54 mMol) VI, 37 g (63 mMol) 92-proz. V und 15,6 g HOSu in 290 ml Dimethylformamid gab man bei 5° 16,8 g DCCI, rührte 2 Std. bei 0° und belies 18 Std. bei 25°. Nach Verdünnen der Suspension mit 160 ml Dimethylformamid und 1 Std. Rühren bei Raumtemperatur wurde der Dicyclohexylharnstoff abgenutscht und das Filtrat bei 0° mit 1,7 l Wasser gefällt. Die abgenutschte Fällung wurde mit Wasser und Äther gewaschen. Nach Lösen des Rohprodukts in 650 ml siedendem Methanol wurde heiss filtriert und durch sehr langsames Abkühlen auf Raumtemperatur zur Kristallisation gebracht. Man erhielt 41 g (69%) Octapeptidderivat, Smp. 231–234°, sowie aus der Mutterlauge eine zweite, etwas weniger reine Fraktion von 4,2 g (7%). Zur Analyse wurde nochmals aus Methanol umkristallisiert, Smp. unverändert; $[\alpha]_D^{20} = -57^\circ$ ($c = 1$ in Methanol); Rf(S) = 0,33 (89), 0,70 (115).

$C_{55}H_{83}N_9O_{14} \cdot H_2O$ (1112,3) Ber. C 59,39 H 7,70 N 11,33% Gef. C 59,3 H 7,6 N 11,6%

3.8. *Z-Thr(But)-Phe-Pro-Gln-Thr(But)-Ala-Ile-Gly-OH*: 44 g (40 mMol) *Z-Thr(But)-Phe-Pro-Gln-Thr(But)-Ala-Ile-Gly-OMe* wurden unter Erwärmen in 800 ml 90-proz. Methanol gelöst. Man kühlte auf Raumtemperatur und gab unter Rühren 120 ml 1N NaOH zu; nach 10 Min. fügte man 670 ml Wasser innerhalb 15 Min. zu und filtrierte nach total 30 Min. von einer geringeren Trübung ab. Das Filtrat fällte man durch Eintropfen in 2,4 l 0,05N eiskalte Salzsäure. Die Fällung wurde abgenutscht, mit Wasser gewaschen und im Hochvakuum bei 50° getrocknet: 42 g (97%) Octapeptidderivat, Smp. 221–223°; Gehalt (durch NaOH-Titration) 98%. Zur Analyse wurde aus Acetonitril-Wasser umkristallisiert, Smp. 223–225°; $[\alpha]_D^{20} = -18^\circ$ ($c = 1$ in Dimethylformamid); Rf(S) = 0,55 (100).

$C_{54}H_{81}N_9O_{14} \cdot 2H_2O$ (1116,3) Ber. C 58,10 H 7,68 N 11,29%
Gef. „ 58,24 „ 7,50 „ 11,53%

3.9. *H-Thr(But)-Phe-Pro-Gln-Thr(But)-Ala-Ile-Gly-OH (VII)*: 38 g (34 mMol) *Z-Thr(But)-Phe-Pro-Gln-Thr(But)-Ala-Ile-Gly-OH \cdot 2H_2O* wurden in 1100 ml 80-proz. Essigsäure wie üblich hydriert. Nach Verdampfen der Essigsäure im Vakuum wurde der Rückstand aus 90-proz. *t*-Butanol lyophilisiert. Man erhielt 34 g eines weissen Pulvers, das nach Perchlorsäure-Titration einen Gehalt von 95% an freiem Peptid aufwies. Auf Grund einer NaOH-Titration enthielt das Produkt 0,26 Mol Essigsäure pro Mol Peptid; Rf(S) = 0,30 (100).

4. Sequenz 29–32, **H-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ (XII)**. – 4.1. *Z-Ala-Pro-NH₂*: Man löste 2,28 g *H-Pro-NH₂* und 7,57 g *Z-Ala-ONp* in 20 ml Dimethylformamid, belies 20 Std. bei 25°, dampfte im Bad von 40° unter 0,01 Torr ab und kristallisierte den Rückstand aus Äther: 5,5 g, Smp. 168–169°; $[\alpha]_D^{20} = -94^\circ$ ($c = 2$ in Methanol).

$C_{16}H_{21}N_3O_4$ (319,35) Ber. C 60,17 H 6,63 N 13,16% Gef. C 60,10 H 6,82 N 13,33%

4.2. *Z-Gly-Ala-Pro-NH₂*: Eine Lösung von 27,9 g *Z-Ala-Pro-NH₂* in 425 ml Äthanol wurde mit 85 ml 1,0N wässriger Salzsäure versetzt und wie üblich hydriert. Man löste das Rohprodukt bei 40° in 40 ml Dimethylformamid, kühlte auf 20°, gab 29,1 g *Z-Gly-ONp* zu und tropfte nach vollständiger Lösung innert 45 Min. 11,2 ml Triäthylamin unter Rühren zu. Man rührte noch 20 Std. bei 20°, dampfte dann im Bad von 40° unter 0,01 Torr ein und verteilte den Rückstand zwischen Wasser und Äther. Man wusch die wässrige Schicht mehrmals mit Äther nach, extrahierte die Ätherphasen mit Wasser zurück, vereinigte die wässrigeren Phasen und dampfte sie ab. Nach Aufnehmen des Rückstands in Essigester filtrierte man von Triäthylamin-hydrochlorid ab und brachte durch Zugabe von Äther zur Kristallisation, Smp. 105–106°. Nach Umkristallisieren aus Aceton-Methanol-Äther, Smp. 144,5–145,5° (Kristallpolymorphie); $[\alpha]_D^{20} = -93^\circ$ ($c = 1,0$ in Methanol).

$C_{18}H_{24}N_4O_5$ (376,40) Ber. C 57,43 H 6,43 N 14,89% Gef. C 57,59 H 6,62 N 15,19%

4.3. *Z-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂*: Man löste 18,8 g *Z-Gly-Ala-Pro-NH₂* in 400 ml Dimethylformamid und hydrierte wie üblich. Dann gab man 20,1 g *Z-Val-ONp* zu. Nach 18 Std. bei 22° dampfte man im Bad von 50° unter 0,01 Torr ab, zerrieb den Rückstand mit Äther, nutschte ab

und trocknete. Das Pulver suspendierte man in 200 ml Äthanol, rührte 15 Min. bei 80°, kühlte auf 0° und nutschte ab. Das Produkt wurde aus einem Gemisch von 170 ml Tetrahydrofuran, 25 ml Wasser und 110 ml Äther kristallisiert, Smp. 209–211°; $[\alpha]_D^{20} = -31^\circ$ ($c = 2.0$ in Dimethylformamid).

$C_{23}H_{33}N_5O_6$ (475,53) Ber. C 58,09 H 7,00 N 14,73% Gef. C 58,08 H 7,11 N 14,83%

4.4. *H-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂* (XII): 1,1 g *Z-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂* wurden in 50 ml 80-proz. Methanol wie üblich hydriert. Das Produkt ist ein amorphes, hygroskopisches Pulver, Rf(S) = 0,20 (CHCl₃-MeOH 1:1).

5. **Sequenz 17–28, H-Asn-Lys(Boc)-Phe-His-Thr(But)-Phe-Pro-Gln-Thr(But)-Ala-Ile-Gly-OH (IX)**. – 5.1. *Z-Derivat von IX*. Eine Lösung von 21 g (26 mMol) VIII in 84 ml Dimethylformamid wurde bei –20° mit 21 ml (70 mMol) 3,35*N* HCl in Dioxan und bei –15° mit 3,85 ml *t*-Butylnitrit versetzt und 10 Min. bei –10° belassen. Hierauf tropfte man bei –15° eine Lösung von 17 g (18 mMol) VII in 320 ml Dimethylformamid zu. Nach Zugabe von 12 ml (70 mMol) Äthyl-diisopropyl-amin (Hünig-Base) wurde 24 Std. bei 0° belassen, wobei man in den ersten 6 Std. jede Std. 0,5 ml Hünig-Base (insgesamt 6 Portionen) zugab. Zum Schluss fällte man das Peptid durch Eingiessen in 1,8 l eiskalte 1-proz. Essigsäure. Das nach Trocknen erhaltene Rohprodukt (23 g, 75%) wurde in 150 ml wässrigem 80-proz. Acetonitril gelöst, filtriert, in der Wärme mit 600 ml Acetonitril versetzt und das gefällte Material isoliert: 20,5 g (67%) praktisch reines Produkt, Smp. 218–221° (Zers.). Zur Analyse wurde aus heissem 60-proz. Methanol kristallisiert, Smp. unverändert; $[\alpha]_D^{20} = -26^\circ$ ($c = 1$ in Dimethylformamid); Rf(S) = 0,35 (100), 0,50 (70), 0,40 (Isopropanol-konz. Ammoniak 9:1).

$C_{84}H_{123}N_{17}O_{21}$ (1707,0) Ber. C 59,10 H 7,26 N 13,95% Gef. C 59,00 H 7,31 N 13,67%

Abbau des Totalhydrolysats mit *L*-Aminosäureoxidase ergab 1,5 Mol-% *D*-His (nach Abzug des Hydrolyse-Blindwertes)¹⁶.

5.2. *Hydrierung zu IX*: 15,0 g des unter 5.1. erhaltenen *Z*-Derivates wurden in 1 l 80-proz. Essigsäure wie üblich hydriert. Der nach Verdampfen der Essigsäure im Vakuum erhaltene Rückstand wurde zweimal aus 80-proz. *t*-Butanol lyophilisiert. Man erhielt 15,0 g IX (Gehalt an freiem Peptid 93%, bestimmt durch Perchlorsäure-Titration, neben 1,5 Mol Essigsäure pro Mol Peptid, durch Titration mit NaOH bestimmt). Rf(S) = 0,15 (100). Aminosäure-Analyse (Hydrolyse 24 Std., 110°, 6*N* HCl) (ber. Werte in Klammern): Ala 1,07 (1), Asp 0,98 (1), Glu 1,02 (1), Gly (Bezugswert) 1,00 (1), His 1,09 (1), Ile 1,06 (1), Lys 1,19 (1), Phe 2,15 (2), Pro 1,04 (1), Thr 1,92 (2), NH₃ 2,25 (2).

6. **Sequenz 11–28, Z-Thr(But)-Tyr(But)-Thr(But)-Gln-Asp(OBut)-Phe-Asn-Lys(Boc)-Phe-His-Thr(But)-Phe-Pro-Gln-Thr(But)-Ala-Ile-Gly-OH (XI)**. – Eine Lösung von 12,0 g (10,5 mMol) X in 70 ml Dimethylformamid wurde bei –20° mit 6,6 ml (28 mMol) 4,2*N* HCl in Dioxan und bei –15° mit 1,55 ml (13 mMol) *t*-Butylnitrit versetzt. Nach 10 Min. bei –10° wurde eine Lösung von 11,8 g (7 mMol) IX (93-proz.) in 200 ml Dimethylformamid bei –15° zuge tropft. Nach Zugabe von 4,8 ml (28 mMol) Äthyl-diisopropyl-amin wurde auf 0° erwärmt und 24 Std. gerührt. Man fällte durch Eingiessen in Äther, nutschte ab und wusch mit Äther und Essigester. Nach Lösen in 100 ml Dimethylformamid wurde durch Eintropfen in eiskalte 0,02*N* Salzsäure gefällt. Nach Abnutschen und Waschen mit Wasser erhielt man 13,9 g (74%) XI, das 35 Mol-% Chlorid enthielt (bestimmt durch Perchlorsäure-, Natronlauge- und Silbernitrat-Titrationen). Nach Dünnschichtchromatogramm enthielt das Produkt noch etwa 5% Verunreinigungen. Rf(S) = 0,52 (70); 0,42 (100). Aminosäure-Analyse (Hydrolyse 15 Std., 105°, 6*N* HCl) (ber. Werte in Klammern): Ala 1,03 (1), Asp 2,25 (2), Glu 2,18 (2), Gly (Bezugswert) 1,00 (1), His 0,94 (1), Ile 0,97 (1), Lys 1,10 (1), Phe 3,26 (3), Pro 0,98 (1), Thr 4,24 (4), Tyr 1,05 (1), NH₃ 2,69 (3). Nach Abbau mit *L*-Aminosäure-Oxidase wurden 2 Mol-% *D*-Phe gefunden (nach Abzug des Hydrolyse-Blindwertes).

7. **Sequenz 11–32, H-Thr(But)-Tyr(But)-Thr(But)-Gln-Asp(OBut)-Phe-Asn-Lys(Boc)-Phe-His-Thr(But)-Phe-Pro-Gln-Thr(But)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ (IV)**. – 7.1. *Z-Derivat von IV*: Eine Lösung von 12,1 g (4,5 mMol) XI und 2,3 g (6,75 mMol)

¹⁶) Wurde bei der Azid-Kondensation an Stelle der portionenweisen Zugabe von 1 Äq. Hünig-Base, 1,7 Äq. Triäthylamin zugegeben, so enthielt das Produkt 3 Mol-% *D*-Histidin.

XII in 130 ml Dimethylformamid bei 45° wurde mit 0,78 g HOSu und 1,4 g DCCI versetzt und 16 Std. bei 45° gerührt. Das durch Ausfällen mit Äther erhaltene Rohprodukt wurde durch *Craig*-Verteilung im System Methanol-Puffer-Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff (10 + 3 + 5 + 6, Puffer: 29 ml Eisessig, 19 g Ammoniumacetat, 1 l Wasser) gereinigt. Nach 1600 Verteilungsschritten (Apparatur: 200 Rohre, Kreislaufverfahren) ergab eine dünnschichtchromatographische Analyse, dass sich die reine Substanz in den Elementen $r = 260$ –340 befand. Es wurden Fraktionen von je 10 Elementen vereinigt, eingedampft und aus *t*-Butanol lyophilisiert. Das reine Produkt befand sich in $r = 260$ –320 ($K = 0,22$), während das *D*-Phe¹⁶-Isomere in $r = 321$ –340 ($K \sim 0,27$) nachweisbar war¹⁷⁾. Die Elemente $r = 260$ –320 ergaben 7,6 g (56%) reine Substanz; Smp.: ab 220° Zers.; $[\alpha]_D^{20} = -35^\circ$ ($c = 1$ in Chloroform-Methanol-Wasser 25 + 70 + 5); $Rf(S) = 0,65$ (70); 0,42 (100). Abbau mit *L*-Aminosäure-Oxidase ergab, nach Abzug des Hydrolyse-Blindwertes, den innerhalb der Fehlergrenze liegenden Wert von 0,5 Mol-% *D*-Phe.

7.2. *Hydrierung zu IV*: 6 g (2 mMol) des unter 7.1. erhaltenen Produkts wurden in 600 ml 80-proz. Essigsäure wie üblich hydriert. Zur Entfernung von Essigsäure wurde der Rückstand zweimal aus Methanol-Natriumcarbonatlösung umgefällt. Ausbeute 5,28 g (92%); $Rf(S) = 0,33$ (52 A); 0,30 (100).

7.3. *Freies Calcitonin M-(11–32)-docosapeptidamid, H-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂*: 60 mg IV wurden unter Eiskühlung mit 1,2 ml eiskalter konz. Salzsäure versetzt. Nach 8 Min. gab man 20 ml Eisessig zu und lyophilisierte. Man erhielt 50 mg Docosapeptid als Trihydrochlorid, $Rf(C) = 0,45$ (45), 0,55 (101 A). Aminosäure-Analyse (Hydrolyse 24 Std., 110°, 6N HCl) (ber. Werte in Klammern): Ala 2,06 (2), Asp 1,80 (2), Glu 1,99 (2), Gly 1,98 (2), His 0,93 (1), Ile 0,97 (1), Lys 1,03 (1), Phe 3,06 (3), Pro 1,99 (2), Thr 4,37 (4), Tyr 0,98 (1), Val (Bezugswert) 1,00 (1), NH₃ 3,61 (4).

8. Geschütztes Calcitonin M-(1–32)-dotriacontapeptidamid, Boc-Cys-Gly-Asn-Leu-

Ser(But)-Thr(But)-Cys-Met-Leu-Gly-Thr(But)-Tyr(But)-Thr(But)-Gln-Asp(OBut)-Phe-Asn-Lys(Boc)-Phe-His-Thr(But)-Phe-Pro-Gln-Thr(But)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ (II). – Eine Lösung von 2,51 g (2,08 mMol) III in 50 ml Dimethylformamid wurde im Hochvakuum auf etwa 35 ml eingengt. In dieser Lösung wurden 5,0 g (1,74 mMol) IV bei 45° unter N₂ gelöst. Dann wurden nacheinander 480 mg (4,17 mMol) HOSu und 650 mg (3,15 mMol) DCCI zugegeben und das ganze 3½ Std. bei 45° gerührt. Das durch Fällen mit peroxidfreiem Äther erhaltene Rohprodukt wurde im Gemisch Methanol-Puffer-Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff (11 + 3 + 6 + 7; Puffer: 29 ml Eisessig, 19 g Ammoniumacetat, 1 l Wasser) einer *Craig*-Verteilung über 1150 Stufen unterworfen (Apparatur mit 200 Elementen, Kreislaufverfahren). Reine Substanz enthielten die Elemente $r = 415$ –485 ($K = 0,65$); das *D*-Histidin²⁰-Isomere¹⁸⁾ liess sich in den Elementen $r = 470$ –485 ($K \sim 0,73$) nachweisen. Der Inhalt der Elemente mit $r = 415$ –470 wurde vereinigt; man erhielt daraus 4,6 g (65%) reines II, Smp. ca. 250° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -49^\circ$ ($c = 0,775$ in Chloroform-Methanol-Wasser 25 + 70 + 5); $Rf(S) = 0,38$ (52 A), 0,35 (100), 0,55 (43 E), 0,65 (107). (In allen Systemen bilden sich leicht Artefakte.)

9. Calcitonin M, H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ (I). – 2,0 g (0,49 mMol) II wurden unter N₂ und Eiskühlung unter kräftigem Rühren mit 40 ml eiskalter, konz. Salzsäure (*p. a.*) versetzt. Nach 8 Min. gab man 400 ml Eisessig zu, lyophilisierte, löste den Rückstand in Wasser und lyophilisierte abermals, dann äquilibrierte man mit Luftfeuchtigkeit. Man erhielt 1,87 g (97%) rohes I, das nach Dünnschichtchromatogramm ($Rf(A) = 0,36$ (45); $Rf(C) = 0,50$ (101 A)) wenig Sulfoxid ($Rf(A) = 0,32$ (45); $Rf(C) = 0,46$ (101 A))

¹⁷⁾ Zum Nachweis des *D*-Phe¹⁶-Peptids wurden Proben der verschiedenen Fraktionen hydriert, mit konz. Salzsäure bei 0° behandelt und mit Trypsin inkubiert, wobei Spaltung am Lys¹⁸ erfolgte. Die dabei erhaltenen isomeren *D*-Phe¹⁸-11-18- und *L*-Phe¹⁶-11-18-Peptide unterscheiden sich bei Dünnschichtchromatographie; *D*-Peptid, $Rf(C) = 0,32$ (101 A); *L*-Peptid = 0,27.

¹⁸⁾ Die analytische Auswertung erfolgte ähnlich wie beim *Z*-Derivat von IV beschrieben (vgl. 7.1.). Das *D*-His²⁰-Peptid wird durch Trypsin nur sehr langsam gespalten; im Dünnschichtchromatogramm verhält es sich wie das Ausgangsmaterial, $Rf(C) = 0,55$ (101 A).

enthält. Dünnschicht-Elektrophorese (C, pH = 1,9, 2 Std., 16 V/cm) zeigte «Nebenprodukt 2», Laufstrecke – 60 mm (I: – 45 mm). Das rohe I führte man durch Filtration über eine Säule von *Merck*-Ionenaustauscher Nr. II (Acetatform) in das Acetat über und unterwarf letzteres einer Gegenstromverteilung über 300 Stufen im System *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (4 + 1 + 5 Volumteile). Die Elemente $r = 80$ –130 enthielten das reine I ($K = 0,52$), während «Nebenprodukt 2» ($K \sim 0,2$) sowie das Sulfoxid von I ($K = 0,30$) in den Elementen $r = 0$ –70 angereichert waren. Nach Vereinigen der reinen Fraktionen, Eindampfen, Aufnahme in Wasser, Lyophilisieren und Äquilibrieren mit Luftfeuchtigkeit erhielt man 1,60 g gereinigtes I. Das Produkt enthielt nach jodometrischer Titration [19] 4,0% Sulfoxidderivat. Peptidgehalt (Mittelwert aus Aminosäureanalyse, UV.-Spektrum und CH- und N-Bestimmung): 90%. UV.-Spektrum: $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 4,7$ ($\lambda_{\text{max}} = 275$ nm in 10-proz. Essigsäure); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -77^\circ$ ($c = 0,9$ in 10-proz. Essigsäure). Aminosäure-Analyse (Hydrolyse 15 Std., 105°, 6N HCl) (ber. Werte in Klammern): Ala 1,99 (2); Asp 3,07 (3); $\frac{1}{2}$ (Cys)₂ 1,94 (2); Glu 2,00 (2); Gly 4,05 (4); His 0,98 (1); Ile 1,02 (1); Leu 2,09 (2); Lys 1,03 (1); Met 0,98 (1); Phe 2,98 (3); Pro 1,93 (2); Ser 1,06 (1); Thr 4,74 (5); Tyr 0,88 (1); Val (Bezugswert) 1,00 (1); NH₃ 4,88 (5). Abbau mit Aminosäureoxidase: Inkubation des Totalhydrolysates mit *L*-Aminosäureoxidase (Bedingungen s. S. 2143) ergab folgende Restmengen nicht oxydierbarer *D*-Aminosäuren (Angaben in Mol-%): His 2,3%, Ala 1,0%, (Cys)₂ 1,8%, Val 0,8%, Met 0,5%, allo-Ile 0,6%, Leu 1,1%, Tyr 1,5%, Phe 1,4%. Diese Werte stimmen innerhalb der Fehlergrenzen ($\pm 0,5\%$) mit den Blindwerten aus der Totalhydrolyse von natürlichem Calcitonin M überein.

Den Herren *K. Eisler*, Dr. *B. Iselin* und Dr. *W. Kessler* danken wir für die Überlassung verschiedener Zwischenprodukte. Den Herren *R. Baumann*, *H. Brückner*, *D. Good*, *H. R. Keller* und *A. Stauffer* sind wir für sorgfältige, technische Mitarbeit sehr zu Dank verpflichtet. Dünnschichtchromatographien, Elektrophoresen und Aminosäureanalysen wurden in verdankenswerter Weise in unserem Chromatographielabor (Leiter: Herr *E. von Arx*) durch Frll. *J. Keller*, Frau *K. Reist* und Frau *M. Rist*, sowie die Herren *D. Faupel* und *R. Steiner*, ausgeführt. Mikroanalysen und Bestimmung der optischen Drehung verdanken wir unsern Speziallaboratorien unter der Leitung der Herren Dres. *W. Padowetz* und *H. Hürzeler*.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *B. Kamber*, *H. Brückner*, *B. Riniker*, *P. Sieber* & *W. Rittel*, *Helv.* 53, 556 (1970).
- [2] *P. Sieber*, *M. Brugger*, *B. Kamber*, *B. Riniker* & *W. Rittel*, *Helv.* 51, 2057 (1968).
- [3] *F. Weygand*, *D. Hoffmann* & *E. Wünsch*, *Z. Naturf.* 21b, 426 (1966).
- [4] *M. A. Kumar*, *E. Slach*, *A. Edwards*, *H. A. Soliman*, *A. Baghdiantz*, *G. V. Foster* & *I. MacIntyre*, *J. Endocrinol.* 33, 469 (1965).
- [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] *R. Neher*, *B. Riniker*, *W. Rittel* & *H. Zuber*, *Helv.* 51, 1900 (1968).
- [7] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochim. biophysic. Acta* 121, 1 (1966).
- [8] *B. Riniker*, *M. Brugger*, *B. Kamber*, *P. Sieber* & *W. Rittel*, *Helv.* 52, 1058 (1969).
- [9] *J. Honzl* & *J. Rudinger*, *Coll. czech. chem. Commun.* 26, 2333 (1961).
- [10] *I. Antonovics*, *A. L. Heard*, *J. Hugo*, *M. W. Williams* & *G. T. Young*, «Peptides», p. 121, *Proc. Sixth Europ. Peptide Symposium*, *L. Zervas*, Ed., Pergamon Press, Oxford 1966; *D. S. Kemp*, *S. W. Wang*, *G. Busby* & *G. Hegel*, *J. Amer. chem. Soc.* 92, 1043 (1970).
- [11] *F. Weygand*, *A. Prox* & *W. König*, *Chem. Ber.* 99, 1451 (1966).
- [12] *G. W. Anderson*, *J. E. Zimmermann* & *F. M. Callahan*, *J. Amer. chem. Soc.* 88, 1338 (1966).
- [13] *P. Sieber*, *M. Brugger* & *W. Rittel*, «Peptides 1969», *E. Scoffone*, Ed., North-Holland Publ. Co., Amsterdam 1970, in press.
- [14] *P. Sieber*, *M. Brugger*, *B. Kamber*, *B. Riniker*, *W. Rittel*, *R. Maier* & *M. Staehelin*, «Calcitonin 1969», p. 28; *S. Taylor* & *G. V. Foster*, Eds., W. Heinemann, London 1970.
- [15] *B. Kamber* & *W. Rittel*, *Helv.* 52, 1074 (1969).
- [16] *E. D. Hughes* & *C. K. Ingold*, *J. chem. Soc.* 1933, 1571.
- [17] *P. Sieber*, «Peptides 1968», p. 236, *E. Bricas*, Ed., North-Holland Publ. Co., Amsterdam 1968; *D. F. Veber*, *S. L. Varga*, *J. D. Milkowski*, *H. Joshna*, *J. B. Lonn*, *R. Hirschmann* & *R. G. Denkwaller*, *J. Amer. chem. Soc.* 91, 506 (1969).

- [18] *D. F. Elliott*, *Biochem. J.* **50**, 542 (1952).
 [19] *B. Riniker & W. Rittel*, *Helv.* **53**, 513 (1970).
 [20] *H. M. Greven & L. J. W. M. Tax*, *op. cit.* [14], p. 34.
 [21] *A. M. Tashjian & E. F. Voelkel*, *J. clin. Endocrinol.* **31**, 116 (1970).
 [22] *R. Maier, R. Neher, W. Rittel & M. Staehelin*, *op. cit.* [14], p. 381.
 [23] *D. F. Waugh*, *J. Amer. chem. Soc.* **68**, 247 (1946).
 [24] *J. L. Farrant & E. H. Mercer*, *Biochim. biophysic. Acta* **8**, 355 (1952).
 [25] *A. Staub, L. Sinn & O. K. Behrens*, *J. biol. Chemistry* **214**, 619 (1955).
 [26] *E. Schröder & K. Lübke*, «The Peptides», Vol. I, Academic Press, New York 1965.
 [27] *E. von Arx & R. Neher*, *J. Chromatogr.* **12**, 329 (1963).
 [28] *T. A. Hylton, J. Preston & B. Weinstein*, *J. org. Chemistry.* **31**, 3400 (1966).
 [29] *H. Klostermeyer*, *Chem. Ber.* **102**, 3617 (1969).
 [30] *R. E. Neumann & E. L. Smith*, *J. biol. Chemistry* **193**, 95 (1951).
 [31] *H. Determann & Th. Wieland*, *Makromol. Chem.* **44–46**, 312 (1961).

256. Synthèses dans la série des bis-indéno-anthracènes, I

Le tétraoxo-5, 10, 15, 16-tétrahydro-5, 10, 15, 16-bis-indéno [2.1-a; 2'.1'-c] anthracène et le dihydro-5, 16-bis-indéno [2.1-a; 2'.1'-c] anthracène

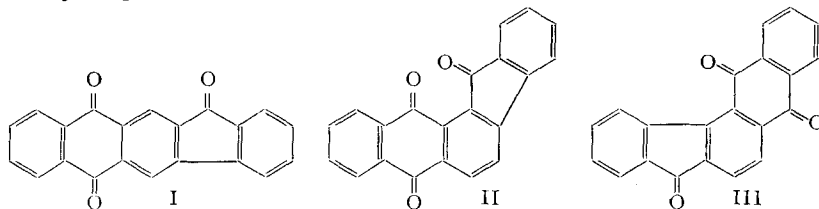
par **Louis Chardonens, François Schorderet, Luc Salamin**
 et **Paul Sunder-Plassmann**

Institut de chimie inorganique et analytique de l'Université de Fribourg

(15 X 70)

Summary. Starting from 5-carboxy-6-methyl-7, 12-dioxo-7, 12-dihydro-indéno[1.2-a]fluorene (phthalacone-carboxylic acid) the first title compound, XI, has been synthesized in 4 steps (overall yield 28%). By an independent way the corresponding hydrocarbon (second title compound, IV) has been obtained in 3 steps (overall yield 35%) starting from 2, 3'-bi-indényle and 1, 4-naphthoquinone.

Les trois systèmes mono-indéno-anthracéniques, résultant formellement de l'accolement d'une molécule d'indène à la molécule d'anthracène avec mise en commun de deux atomes de carbone du cycle pentagonal de l'indène et de deux atomes de carbone d'un noyau hexagonal de l'anthracène, sont connus, entre autres, sous la forme des trois phtaloylfluorénones isomères I [1], II [2] et III [3], en nomenclature rationnelle respectivement trioxo-6, 11, 13-dihydro-6, 11-13*H*-indéno[1.2-*b*]anthracène, trioxo-7, 12, 13-dihydro-7, 12-13*H*-indéno[2.1-*a*]anthracène et trioxo-5, 8, 13-dihydro-5, 13-8*H*-indéno[1.2-*a*]-anthracène.



Les systèmes bis-indéno-anthracéniques résultent, de manière analogue, de l'accolement de deux molécules d'indène à une molécule d'anthracène. Si l'on se limite