

42. Die Synthese von Insulinfragmenten mit intakter interchenarer Disulfidbrücke A²⁰-B¹⁹

von B. Kamber

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

(1. XII. 70)

Summary. The synthesis of six insulin fragments is described, in which various sequences of the two chains are linked by the disulfide bridge between A²⁰ and B¹⁹. The fragments in question are: A²⁰⁻²¹-B¹⁹⁻²¹, A²⁰⁻²¹-B¹⁸⁻²¹, A²⁰⁻²¹-B¹⁷⁻²¹, A¹⁹⁻²¹-B¹⁹⁻²¹, A¹⁶⁻²¹-B¹⁸⁻²¹ and A²⁰⁻²¹-B¹³⁻²¹.

In order to build up the simpler fragments the disulfide bridge was established by oxidation with iodine of two S-trityl cysteine peptides in which the carboxyl and amino groups were protected by the *t*-butyl and *t*-butyloxycarbonyl residue. From the mixture obtained the unsymmetrical cysteine peptide was separated in all cases from the two symmetrical ones by counter-current distribution.

In the synthesis of the more complex fragments advantageous use was made of smaller unsymmetrical fragments prepared as above but having one amino group protected by the N-trityl residue. After selective elimination of this group it was possible to lengthen the peptide chain at this position.

The free peptides were obtained by removal of the protecting groups with strong acids, in particular concentrated hydrochloric acid. While in this deprotecting step the disulfide bond was stable, conditions are discussed under which disproportionation was observed.

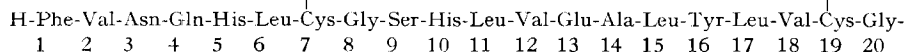
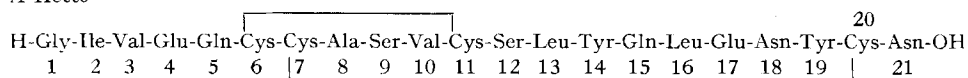
None of the six synthetic insulin fragments showed activity in stimulating rat adipose tissue to convert ¹⁴C-labelled glucose to CO₂ *in vitro*.

Zur Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurden von den meisten bekannten Peptidhormonen auf synthetischem oder enzymatischem Weg Fragmente hergestellt. Diese erwiesen sich in vielen Fällen noch als biologisch aktiv (für eine Zusammenstellung siehe [1]).

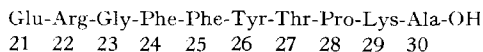
Über Fragmente des Insulins (Formelschema 1), die Teile beider Ketten enthalten, ist bis heute nur wenig bekannt.

Formelschema 1. Strukturformel des Rinderinsulins (nach Sanger [2])¹⁾

A-Kette



B-Kette



Nach Rudman *et al.* [4] führt die Inkubation von Insulin mit einem Homogenat aus dem Fettgewebe der Ratte zu biologisch aktiven Bruchstücken.

¹⁾ Abgekürzte Schreibweise entsprechend den Empfehlungen der «IUPAC-IUB»-Commission on Biochemical Nomenclature» [3]. Es bedeuten ferner: Boc-: *t*-Butyloxycarbonyl-; But-: *t*-Butyl-; DCCI-Dicyclohexylcarbodiimid; Hosu: N-Hydroxysuccinimid; GA: Methode der gemischten Anhydride.

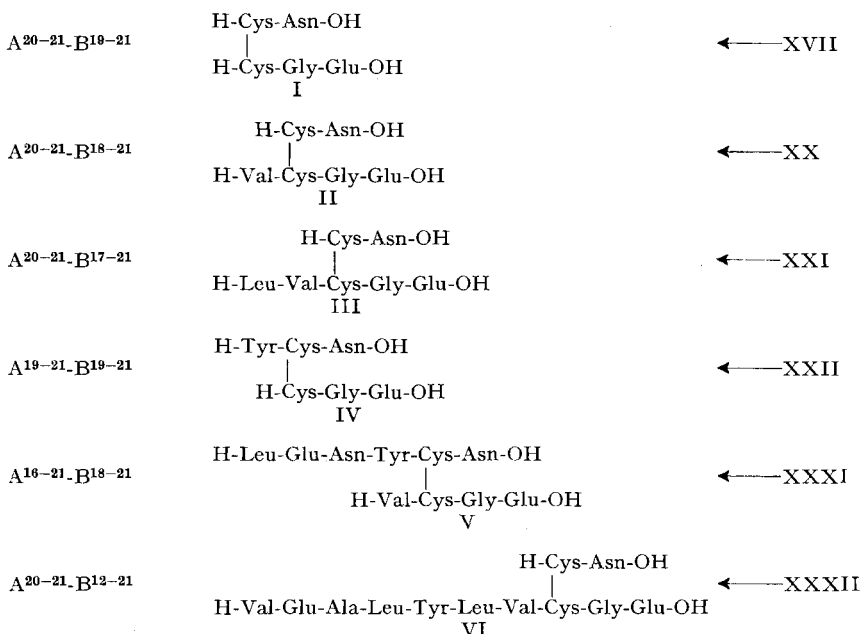
Bei Fragmenten, die durch Abbau des natürlichen Hormons gewonnen werden, kann die Anwesenheit von nicht oder nur teilweise abgebautem Material oft nicht ausgeschlossen werden. Vor allem sehr geringe biologische Aktivität kann daher eindeutig durch Testierung synthetischer Präparate nachgewiesen werden.

Wir beschreiben in dieser Arbeit die Synthese der sechs offenkettigen asymmetrischen Cystinpeptide I–VI (Formelschema 2). Diese stellen Insulinfragmente dar, in welchen verschieden grosse Bruchstücke der beiden Ketten durch die interchenare Disulfidbrücke A²⁰–B¹⁹ verbunden sind.

Zur Bestimmung der Insulinaktivität dieser Fragmente wurde die Stimulierung der Oxydation von [1-¹⁴C]-Glucose in isolierten Fettzellen der Ratte gemessen [5]. Bis zu einer Dosis von 100 µg/ml zeigte keines der Präparate Insulinaktivität (Insulin ist bei einer Konzentration von 10⁻² µg/ml voll wirksam²⁾).

Die Synthese des Fragmentes A²⁰⁻²¹–B¹⁷⁻²¹ (III) wurde kürzlich von *Veber et al.* [6] beschrieben. Das auf einem anderen Syntheseweg erhaltene Präparat dieser Autoren zeigte ebenfalls keine Insulinaktivität³⁾.

Formelschema 2: Synthetische Insulinfragmente



Anlage der Synthesen. – Die sich bei der Synthese von asymmetrischen Cystinpeptiden stellenden Probleme wurden in den letzten Jahren vor allem in den Laboratorien von *Zervas* [7] und *Hiskey* [8] intensiv bearbeitet. Es können prinzipiell drei Strategien angewandt werden:

1. Spezifische Verknüpfung zweier Cysteinderivate zu einem asymmetrischen Disulfid.

²⁾ Die biologische Testierung verdanke ich Herrn Dr. *K. Müller* (CIBA-GEIGY AG., Basel).

³⁾ Zum Vergleich der beiden Präparate siehe exp. Teil.

2. Unspezifische Verknüpfung von zwei Cysteinpeptiden und Isolierung des neben den beiden symmetrischen in statistischer Ausbeute gebildeten asymmetrischen Cystinderivates.

3. Synthese eines geeignet geschützten, asymmetrischen Cystinderivates (nach einem der zwei obigen Konzepte) und Peptidkondensation mit einer daraus selektiv freigesetzten Amino- oder Carboxylgruppe.

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden zuletzt genannten Strategien befolgt. Vergleichsweise bedienten wir uns auch in zwei Beispielen der von *Hiskey et al.* [8] eingehend untersuchten Dirhodanmethode, welche die spezifische Bildung asymmetrischer Disulfide erlaubt (Strategie 1).

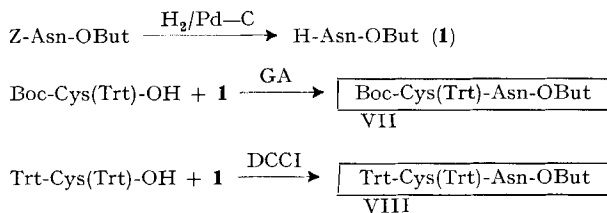
Die Synthesen wurden so geplant, dass in einem letzten Schritt die vom *t*-Butanol abgeleiteten Amino- und Carboxyl-Schutzgruppen (Boc- und -OBut) durch milde Behandlung mit Säure entfernt werden konnten (die Phenolgruppe des Tyrosins blieb ungeschützt). Unter diesen Bedingungen zeigten die asymmetrischen Cystinpeptide keinerlei Tendenz zur Disproportionierung.

Die Mercaptogruppe des Cysteins wurde mit dem Tritylrest geschützt. Die direkte Überführung von S-Tritylderivaten in Cystinpeptide durch Reaktion mit Jod haben wir bereits beschrieben [9]. Zudem war auch schon bekannt [10], dass sich die S-Tritylbindung in Gegenwart des Boc-Restes mit Quecksilber(II)-Salzen spalten lässt.

Nebst den mit dem Boc- und OBut-Rest voll geschützten asymmetrischen Cystinderivaten synthetisierten wir auch solche, bei denen das Aminoende der einen Kette mit der Tritylgruppe verschlossen war. Da sich letztere selektiv entfernen liess, erlaubten dermassen geschützte Derivate die spezifische Verlängerung einer Kette (Strategie 3).

Zum intermediären Schutz der α -Aminogruppen beim Aufbau der Kettenfragmente dienten der Benzoxycarbonyl- und der Tritylrest.

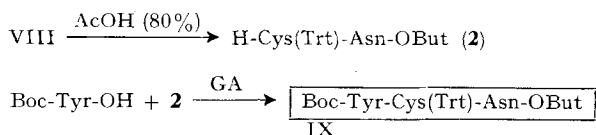
Synthese der geschützten Kettenfragmente⁴⁾. – A^{20-21} . Durch Hydrierung von Z-Asn-OBut gelangte man zum kristallinen Asparagin-*t*-butylester (**1**). Acylierung desselben mit Boc-Cys(Trt)-OH [11] (gemischtes Anhydrid) bzw. Trt-Cys(Trt)-OH (DCCI) lieferte die kristallinen Dipeptide VII und VIII, letzteres in einer Ausbeute von 76%⁵⁾.



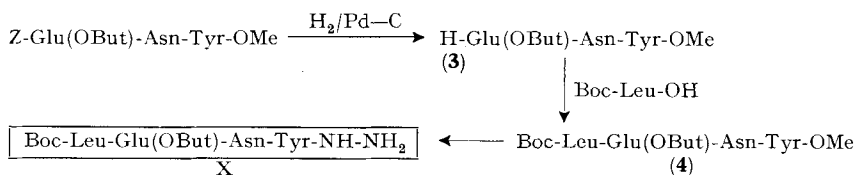
⁴⁾ In den Formelschemata dieses Abschnittes sind die Verbindungen, welche weiter unten zum Aufbau der Cystinderivate verwendet wurden, eingerahmt und mit römischen Ziffern bezeichnet. Für die Herstellung der nicht speziell beschriebenen Aminosäurederivate siehe [1].

⁵⁾ Diese befriedigende Ausbeute steht im Widerspruch zu kürzlich von *Zahn et al.* [12] gemachten Angaben. Diese Autoren erzielten bei der Darstellung von Trt-Cys(Trt)-Asn-OBzl (ebenfalls mit DCCI) bloss eine Ausbeute von 14%. Es mag wesentlich sein, dass in diesem Fall die Aminokomponente *in situ* aus dem Trifluoracetat freigesetzt wurde, während wir sie in der freien Form einsetzten.

A^{19–21}. Die N-Tritylgruppe in VIII wurde mit 80-proz. Essigsäure bei Raumtemperatur in einer Stunde quantitativ abgespalten. Unter diesen Bedingungen erwies sich die S-Tritylgruppe als vollkommen stabil. Das resultierende Acetat von 2 wurde nach der Methode der gemischten Anhydride zum kristallinen IX kondensiert.

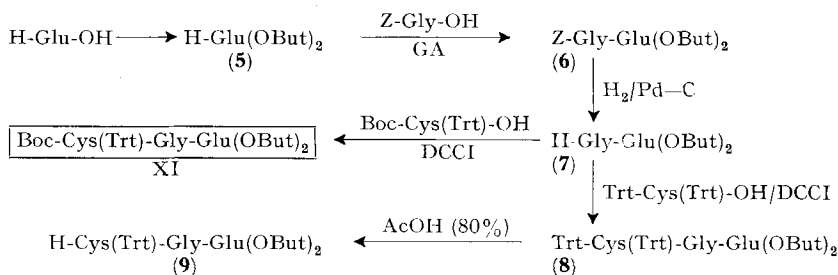


A^{16–19}. Zur Kondensation des aus dem bekannten Z-Glu(OBut)-Asn-Tyr-OMe [13] durch Hydrierung erhaltenen 3 mit Boc-Leu-OH wandten wir die von Koenig & Geiger [14] beschriebene Aktivierungsmethode an (DCCI/1-Hydroxybenzotriazol). Der Methyl ester 4 wurde mit Hydrazinhydrat in Methanol in das kristalline Hydrazid X überführt.

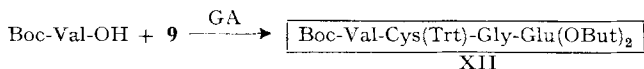


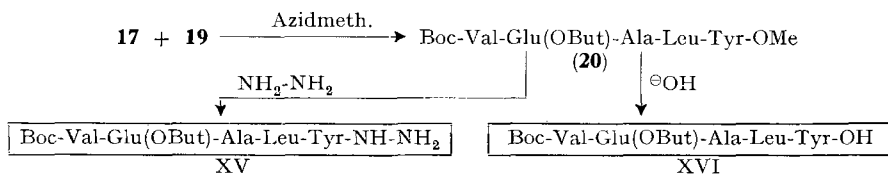
B^{19–21}. Der Di-*t*-Butylester der Glutaminsäure 5 wurde direkt aus Glutaminsäure durch Reaktion mit Isobutylem und Schwefelsäure hergestellt und über das bekannte Hydrochlorid [15] gereinigt. Die nach der Methode der gemischten Anhydride durchgeführte Kondensation mit Z-Gly-OH gab kristallines 6, dessen Aminoschutzgruppe hydrogenolytisch entfernt wurde. Das resultierende 7 wurde mit Boc-Cys(Trt)-OH und Trt-Cys(Trt)-OH kondensiert (DCCI). Die kristallinen Tripeptide XI und 8 fielen in Ausbeuten um 60% an.

Die selektive Abspaltung der N-Tritylgruppe von 8 zu 9 erfolgte auch hier durch 80-proz. Essigsäure bei Raumtemperatur.



B^{18–21}. Überraschend gut gelang die Verknüpfung der sterisch stark gehinderten Komponenten Boc-Val-OH und 9. Nach der Methode der gemischten Anhydride betrug die Ausbeute an kristallinem XII 70%.





Bildung der Cystinbrücke und Verlängerung einer Kette. – Drei Methoden der Verknüpfung zweier S-Tritylderivate zu einem asymmetrischen Cystinpeptid wurden am Beispiel der Synthese von XVII miteinander verglichen (siehe Formelschema 3 und Tabelle 1):

Die Umsetzung der beiden Komponenten VII und XI mit Jod (Weg a) und die Isolierung der drei in statistischer Ausbeute gebildeten Cystinderivate XVII, XVIII und XIX durch Gegenstromverteilung haben wir bereits beschrieben [9].

Wesentlich schlechter verlief die Verknüpfung, wenn Abspaltung der Schwefel-schutzgruppe und Oxydation in zwei getrennten Schritten durchgeführt wurden (Weg b). Nach den Angaben von *Zervas et al.* [10] detritylierte man VII und XI durch Reaktion mit Quecksilber(II)-acetat und nachträgliche Behandlung mit Schwefelwasserstoff.

Die Thiolderivate **21** und **22** erwiesen sich gegenüber Luftydation als bemerkenswert resistent. So bildete sich zum Beispiel das Cystinderivat XVIII beim 24-stündigen Durchleiten eines Luftstroms durch eine methanolische Lösung von **21** nur zu ca. 10% (nach Dünnschichtchromatogramm⁶).

Tabelle 1. Ausbeuten an asymmetrischem Cystinderivat XVII bei drei Verknüpfungsmethoden von VII und XI

Verknüpfungsmethode	Molverhältnis		Ausbeute an XVII ^{a)}
	VII	XI	
a) Jod/Methanol	1	1	50%
	2	1	63
b) Dijodäthan ^{b)}	1	1	36
c) Dirhodan	1	1 ^{e)}	55
	1	1 ^{d)}	42
	2	1 ^{d)}	70

a) Die Ausbeuten beziehen sich auf die im Unterschuss eingesetzte Komponente.

b) Nach Detritylierung von VII und XI mit $\text{Hg}(\text{OAc})_2/\text{H}_2\text{S}$.

c) VII als S-Thiocyanat, XI detrityliert eingesetzt.

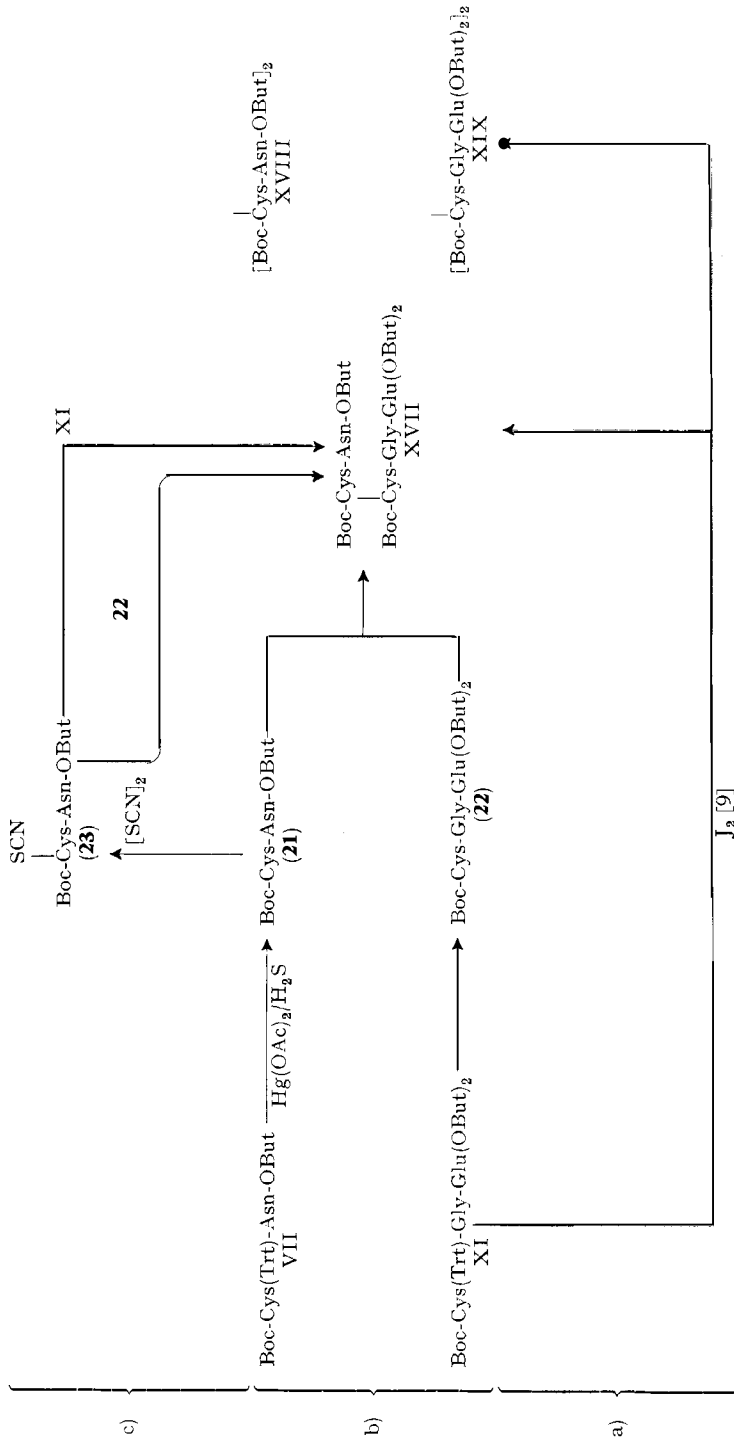
d) VII als S-Thiocyanat, XI als S-Tritylderivat eingesetzt.

Die Oxydation eines äquivalenten Gemisches von **21** und **22** wurde nach *Weygand & Zumach* [20] mit Dijodäthan durchgeführt. Die Gegenstromverteilung des Rohproduktes lieferte das asymmetrische Derivat XVII in einer Ausbeute von 36% (72% der statistischen Ausbeute).

Schliesslich stellten wir XVII auch nach der von *Hiskey et al.* [8] ausgearbeiteten Dirhodanmethode her (Weg c). Das aus **21** mit Dirhodan erhaltene S-Thiocyanat **23**

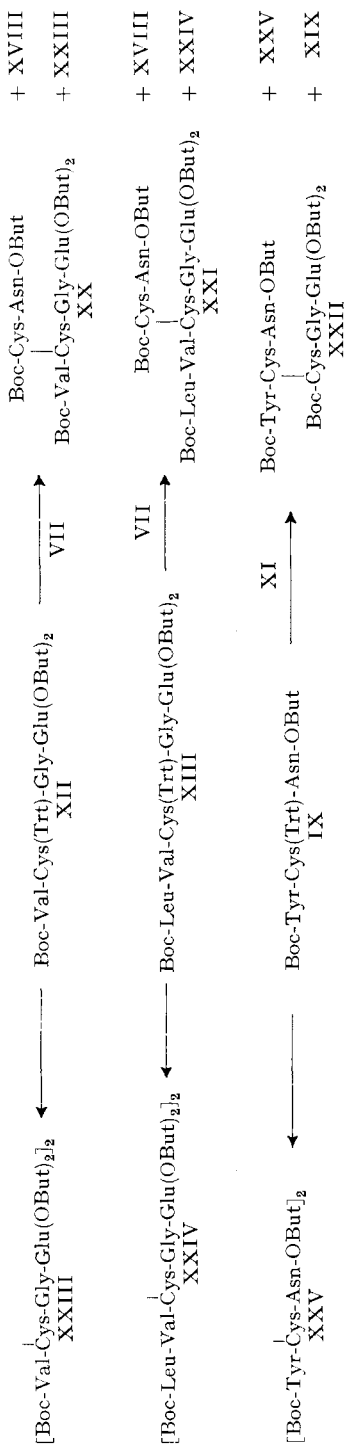
⁶) *Hope et al.* [18] und *Photaki* [19] haben ebenfalls beschrieben, dass amino- und carboxylgeschützte Cysteinderivate mit freier Mercaptogruppe mit Luft nur schwer zu oxydieren sind.

Formelschema 3. Synthese von XVIII nach drei Methoden (Details siehe Text)



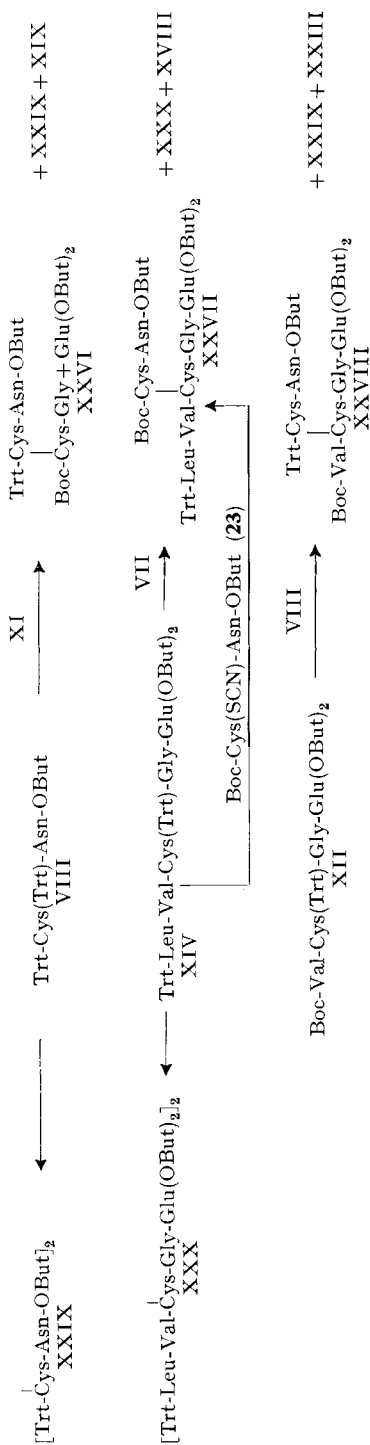
Formelschema 4

Durch Reaktion mit Jod erhaltene geschützte asymmetrische und symmetrische Cystinpeptide



Formelschema 5

Cystinderivate mit der N-Triethyl-Schutzgruppe durch Reaktion mit Jod in Gegenwart von Pyridin



wurde *in situ* sowohl mit der detritylierten Komponente **22** als auch direkt mit XI umgesetzt. Auch hier wurde XVII jeweils durch Gegenstromverteilung gereinigt.

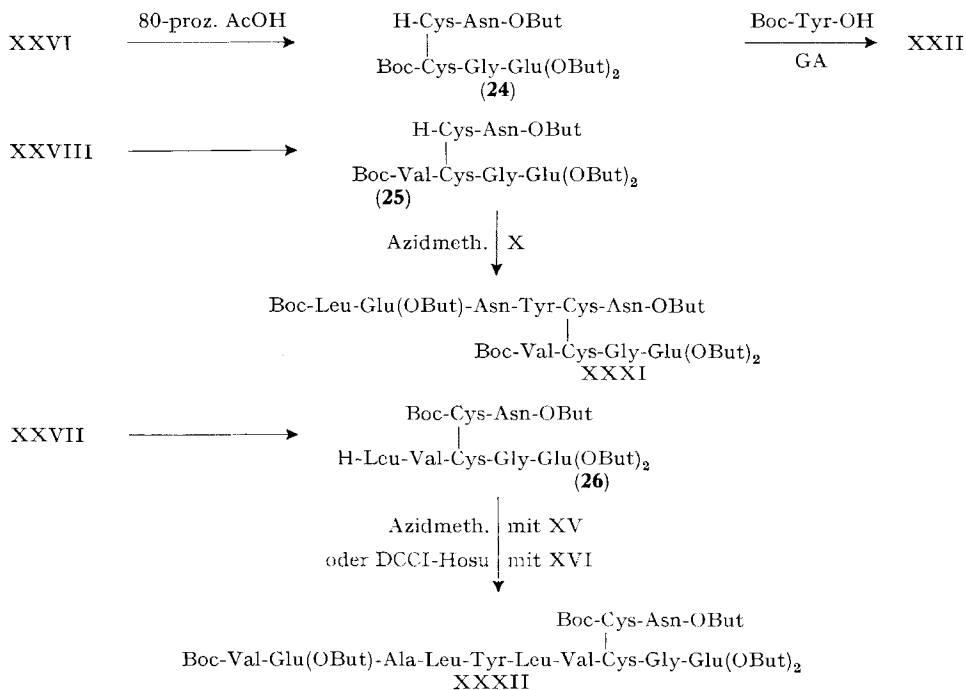
Obwohl die Umsetzung von zwei S-Tritylderivaten mit Jod *a priori* zu einem Gemisch von drei Produkten führt, zeigen obige Resultate doch deutlich, dass diese Methode für die Darstellung asymmetrischer Cystinpeptide präparativ durchaus attraktiv ist. Dies trifft vor allem dann zu, wenn eine der beiden Komponenten leicht zugänglich ist und daher in grossem Überschuss eingesetzt werden kann. Da wir weiter unten die Synthese von asymmetrischen Cystinderivaten beschreiben, in denen sich eine Kette selektiv verlängern lässt, ist diese Forderung stets erfüllbar.

Mit jeweils nahezu statistischer Ausbeute gelang nach dieser Methode auch die Synthese der drei geschützten Insulinfragmente XX, XXI und XXII (vgl. Formelschema 4). In allen Fällen liessen sich dieselben ohne Schwierigkeiten durch Gegenstromverteilung von den symmetrischen Derivaten abtrennen. Wie aus dem Schema ersichtlich, wurden letztere überdies separat aus den entsprechenden S-Tritylderivaten dargestellt. Die erfolgreiche Umsetzung von IX zeigt zudem, dass sich die Reaktion auch für die Synthese von Tyrosinpeptiden eignet.

Nach der gleichen Methode erhielt man auch die im Formelschema 5 aufgeführten asymmetrischen Cystinderivate, in welchen eine Kette die N-Tritylgruppe enthält. Es erwies sich dabei als vorteilhaft, den bei der Reaktion gebildeten Jodwasserstoff mit Pyridin abzufangen.

Die geschützten Insulinbruchstücke XXVI, XXVII und XXVIII wurden auch hier durch Gegenstromverteilung isoliert.

Formelschema 6. Verlängerung einer Kette in asymmetrischen Cystinpeptiden



In einem parallel durchgeführten Versuch stellte man XXVII auch nach der Dirhodanmethode aus dem S-Tritylderivat XIV und dem schon weiter oben beschriebenen S-Thiocyanat **23** her. Letzteres wurde in einem 50-proz. Überschuss eingesetzt. XXVII fiel bei der Gegenstromverteilung in einer Ausbeute von 50% an.

Die selektive Freisetzung der tritylgeschützten Aminogruppe in XXVI gelang durch Einwirkung von 80-proz. Essigsäure bei Raumtemperatur (siehe Formelschema 6).

Das bei dieser Spaltung resultierende Acetat von **24** erwies sich als überraschend stabil. In fester Form war bei Lagerung bei 0° auch nach Wochen im Dünnschichtchromatogramm keine Veränderung feststellbar. In einer methanolischen Lösung hatten sich nach acht Tagen bei Raumtemperatur ca. 20% in zwei lipophilere Produkte umgewandelt. Die Reaktion verlief beim freien Amin **24** wesentlich schneller. Dieses liess sich zwar durch Extraktion einer Essigesterlösung mit Natriumhydrogencarbonat bei 0° rein darstellen, aber es wandelte sich in methanolischer Lösung innert 24 Std. bei Raumtemperatur zu über 50% um.

Das Acetat von **24** wurde durch Kondensation mit Boc-Tyr-OH (Methode der gemischten Anhydride) in das schon oben beschriebene geschützte Insulinfragment XXII überführt.

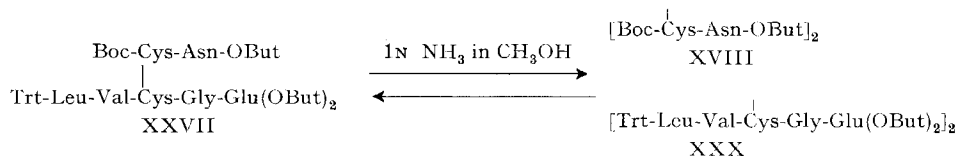
Analog gelangte man durch Detritylierung von XXVIII zu **25**. Dieses wurde (ebenfalls in der Acetatform) durch Azidkupplung – ausgeführt in der von *Honzl & Rudinger* [21] modifizierten Form – mit X zu XXXI umgesetzt, dessen Reinigung sich wegen seiner geringen Löslichkeit in Methanol besonders einfach gestaltete.

Bei dem aus XXVII zugänglichen **26** nahm man die Verlängerung der Kette nach zwei Kondensationsmethoden vor: Die wie in obigem Beispiel durchgeführte Azidkupplung mit XV lieferte XXXII in sehr guter Ausbeute. Zu einem uneinheitlicheren Produkt führte die Kondensation der Pentapeptidsäure XVI mit dem durch Natriumhydrogencarbonatextraktion erhaltenen Aminoderivat **26** nach der Methode von *Weygand-Wünsch* [16]. In diesem Fall wurden nicht näher untersuchte Nebenprodukte durch Gelfiltration an einer Säule von SEPHADEX LH 20 abgetrennt. Die Ausbeute an XXXII betrug 55%.

Stabilität der geschützten asymmetrischen Cystinpeptide. Alle in dieser Arbeit beschriebenen geschützten, asymmetrischen Cystinpeptide erwiesen sich in neutralen organischen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur über Wochen als vollkommen stabil. Im weiteren zeigen obige Versuche, dass unter der Einwirkung von schwachen Säuren (d. h. Bedingungen, unter denen die Boc- und OBut-Schutzgruppen noch stabil sind) keine Disproportionierung zu befürchten ist. Die im Formelschema 6 wiedergegebenen Umsetzungen illustrieren überdies, dass solche Derivate ohne störende Nebenreaktionen als Komponenten in Peptidkondensationen eingesetzt werden können.

Als ausserordentlich schwierig durchführbar dürfte sich hingegen jegliche Umsetzung in auch nur schwach basischem Milieu erweisen. Vor allem sind die in der Peptidsynthese oft benutzte Verseifung und Hydrazinolyse eines Esters bei dieser Verbindungsklasse nicht anwendbar. Unter diesen Bedingungen trat nicht nur Disulfidaustausch, sondern auch weitgehende Zersetzung ein. Mildere basische Bedingungen (1-proz. Triäthylamin in Methanol oder 1N Ammoniak in Methanol) führten hingegen ausschliesslich zu einer Disproportionierung der gemischten Disulfide.

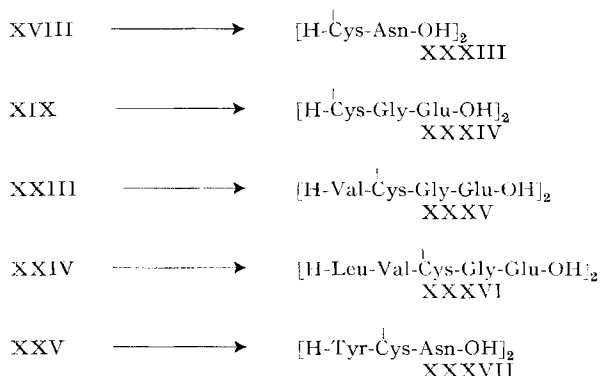
Im Falle der Verbindung XXVII wurde die Lage des Disproportionierungsgleichgewichtes durch Isolierung der Komponenten bestimmt. Dieses Beispiel wurde gewählt, weil sich hier die drei Cystinpeptide



durch Gelfiltration an einer Säule von SEPHADEX LH 20 sauber und bequem abtrennen liessen. In zwei parallelen Versuchen wurde sowohl XXVII als auch ein molares Gemisch von XVIII und XXX mit 1N methanolischem Ammoniak bei 40° umgesetzt. In beiden Fällen ergab sich ziemlich genau eine statistische Zusammensetzung des Gemisches, d. h. 50% XXVII und je 25% XVIII und XXX⁷⁾. Das aus den zwei Disproportionierungsversuchen isolierte XXVII zeigte den spezifischen Drehwert des authentischen Materials. Da dieser Wert aber klein ist ($[\alpha]_D = +3^\circ \pm 1^\circ$), lässt sich aus diesem Versuch die Frage nicht eindeutig beantworten, ob die Disproportionierung teilweise zu einer Racemisierung des Cystins führt⁸⁾.

Abspaltung der Schutzgruppen und Charakterisierung der freien Cystinpeptide. – Als vorteilhaftester Weg zur Entfernung der Schutzgruppen erwies sich die Acidolyse mit konzentrierter Salzsäure bei 0° (5 Min.) nach der von *Riniker et al.* [22] beschriebenen Methodik (vgl. Formelschemata 2 und 7). Eine Disproportionierung der asymmetrischen Cystinpeptide war unter diesen Bedingungen nicht zu beobachten, hingegen waren die erhaltenen Produkte jeweils mit lipophileren Nebenprodukten schwach verunreinigt (für die Charakterisierung eines derselben vgl. unten). Die

Formelschema 7. Durch Acidolyse der geschützten Derivate erhaltene symmetrische Cystinpeptide



⁷⁾ Bei den hier behandelten gemischten und voll geschützten Cystinpeptiden ist die Asymmetrie durch unterschiedliche Strukturelemente bedingt, die relativ weit von der Disulfidgruppierung entfernt sind. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass bei asymmetrischen Disulfiden von diesem Typus Disproportionierungsgleichgewicht und statistisches Gleichgewicht identisch sind.

⁸⁾ Jedenfalls zeichnet sich hier eine Möglichkeit ab, die bei einer unspezifischen Bildung der Disulfidbrücke anfallenden symmetrischen Derivate nachträglich teilweise in die gewünschten asymmetrischen überzuführen.

Insulinfragmente I–VI wurden durch Chromatographie (siehe exp. Teil) in Ausbeuten um 80% dünn-schichtchromatographisch und elektrophoretisch rein erhalten. Ausser im Falle des symmetrischen Cystinpeptides [H-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-OH]₂ (XXXVI) waren sämtliche auf diese Weise erhaltenen Hydrochloride gut wasserlöslich. Sie wurden an einem Ionenaustauscher in die salzfreien Peptide überführt. Mit Ausnahme des Insulinbruchstückes VI lösten sich alle auch in dieser Form leicht in Wasser. Für eine Zusammenstellung der physikalischen und analytischen Daten siehe Tabellen 3 und 4 im experimentellen Teil.

Zu einer vermehrten Bildung obiger Nebenprodukte führte die Acidolyse mit 90-proz. Trifluoressigsäure. Die vollständige Abspaltung der Schutzgruppen erforderte eine ungewöhnlich lange Reaktionszeit (2 $\frac{1}{2}$ Std. bei Raumtemperatur)⁹⁾. Die besten Resultate erzielte man, wenn das Peptid mit Äther aus der Trifluoressigsäurelösung ausgefällt wurde. Nach dieser Methodik wurden die Schutzgruppen in XX entfernt. Die Chromatographie des dabei erhaltenen Rohproduktes an DEAE-SEPHADEX lieferte II in 54% Ausbeute. Der Anteil an Nebenprodukten vergrösserte sich noch, wenn das Peptid nicht mit Äther ausgefällt, sondern durch Eindampfen der Trifluoressigsäurelösung gewonnen wurde. Es ist aber zu betonen, dass auch in diesem Falle keine Disproportionierung nachzuweisen war.

Stabilität der freien asymmetrischen Cystinpeptide. In Tabelle 2 sind die Resultate von Versuchen zusammengestellt (ausgeführt an II), welche abklären sollten, unter welchen Bedingungen in einem asymmetrischen Cystinpeptid Disproportionierung eintritt bzw. unterbleibt. Wie schon bei den geschützten Derivaten zeigte sich auch hier, dass die Neigung zum Disulfidaustausch vor allem im alkalischen Bereich stark ist.

In wässriger Lösung liess sich nach mehreren Tagen bei Raumtemperatur bei allen sechs Insulinfragmenten (I–VI) das Auftreten eines Umwandlungsproduktes beobachten (nach 10 Tagen ca. 20%). Diese liessen sich schon unter den oben erwähnten Nebenprodukten der Acidolyse nachweisen. Analog verhielten sich auch die zwei

Tabelle 2. Tendenz des Insulinfragments II zur Disproportionierung^{a)}

Lösungsmittel	Temp.	Zeit	Disproportionierung
Wasser ^{b)}	20°	10 Tage	0
„	60°	3 Std.	0
0.1N HCl	20°	24 Std.	0
90-proz. CF ₃ COOH	20°	48 Std.	0
2N HCl	20°	30 Min.	+
konz. HCl	0°	30 Min.	+
Puffer ^{c)} pH 8	20°	20 Std.	0
„ pH 9	20°	4 Std.	+
„ pH 10	20°	1 Std.	+

a) Eine 10-proz. Lösung von II unterwarf man den betreffenden Bedingungen, verdünnte sie dann mit Wasser auf 1% und prüfte sie dünn-schichtchromatographisch (auf Cellulose im System 101 D, vgl. exp. Teil) auf die Anwesenheit von [H-Cys-Asn-OH]₂ (XXXIII) und [H-Val-Cys-Gly-Glu-OH]₂ (XXXV).

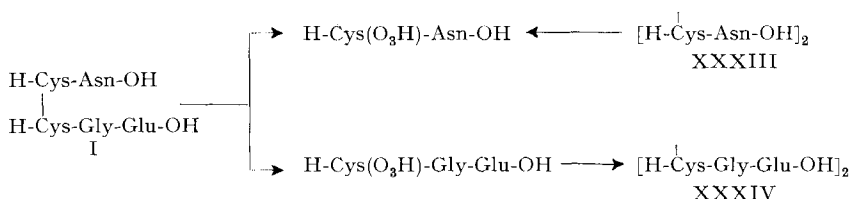
b) Eine 5-proz. Lösung hat pH 4,3.

c) Puffer (*Titrisol-Merck*): pH 8 (Borat-Salzsäure); pH 9 und 10 (Borsäure-Kaliumchlorid-Natronlauge).

9) Für Beispiele ähnlich langsam verlaufender acidolytischer Schutzgruppenabspaltungen siehe [23].

symmetrischen Cystinpeptide XXXIII und XXXVII, während die aus Sequenzen der B-Kette abgeleiteten XXXIV, XXXV und XXXVI vollkommen stabil waren. Auf Grund des elektrophoretischen Verhaltens dieser Produkte handelt es sich bei der langsam verlaufenden Umwandlung um die Hydrolyse der primären Amidogruppe des Asparaginrestes¹⁰⁾. Auf die besondere Labilität dieser Gruppe im Insulin haben *Slobin & Carpenter* [24] hingewiesen.

Cysteinsäurepeptide. Bei der Identifizierung der beschriebenen Insulinbruchstücke erwies sich deren Oxydation in Perameisensäure als sehr nützlich. Wie am Beispiel von I ersichtlich, liessen sich damit die asymmetrischen Cystinpeptide mit den entsprechenden symmetrischen experimentell verknüpfen¹¹⁾.



Die Rf-Werte der auf diese Weise dargestellten Cysteinsäurepeptide sind in Tabelle 5 (exp. Teil) aufgeführt.

Experimenteller Teil

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

Für die Herstellung der verwendeten Aminosäurederivate siehe [1].

«Übliche Aufarbeitung» bedeutet: Aufnehmen im betreffenden Lösungsmittel, Waschen mit verdünnter Zitronensäure, Wasser, verdünnter NaHCO_3 -Lösung und Wasser, Trocknen über Natriumsulfat, Filtrieren und Eindampfen.

Katalytische Hydrierung zur Entfernung der Benzyloxycarbonylgruppen: Schütteln der im betreffenden Lösungsmittel gelösten Substanz mit 10 bis 20 Gew.-% Pd-Kohle (10% Pd) in H_2 -Atmosphäre (25°, 840 Torr) unter Auffangen des entstehenden CO_2 in einem zweiten, mit KOH gefüllten Hydriergefäss. Nach Beendigung der H_2 -Aufnahme Filtrieren und Eindampfen.

Für die *Gegenstromverteilung* dienten folgende Lösungsmittelsysteme (Angaben in Volumenteilen): Tetrachlorkohlenstoff-Methanol-0,1M Ammoniumacetat (pH 7): I = 4 + 5 + 1; Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff-Methanol-0,1M Ammoniumacetat: II = 1 + 3 + 4 + 1; III = 1 + 3 + 4 + 2; IV = 1 + 7 + 4 + 2; V = 1 + 8 + 5 + 1; Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff-Methanol-Puffer (19,3 g Ammoniumacetat, 28,6 ml Eisessig, 1 l Wasser): VI = 1 + 1 + 2 + 1.

Chromatographische Reinheitskontrollen: Alle Rf-Werte beziehen sich auf *Dünnschichtchromatographien* auf folgenden Trägern:

S: Kieselgel (Fertigplatten SL 254 der Firma *Antec*, Birsfelden), C: Cellulose (DC-Fertigplatten 1440 der Firma *Schleicher & Schüll*).

¹⁰⁾ Beim Stehen einer wässrigen Lösung von I ist nach 10 Tagen bei Raumtemperatur im Dünnschichtchromatogramm ein Umlagerungsprodukt zu beobachten. $\text{Rf}(\text{C}) = 0,47$ (101 D). Dieses zeigt in der Elektrophorese bei pH 4,0 und 7,6 dieselbe Mobilität wie $[\text{H-Cys-Gly-Glu-OH}]_2$ (XXXIV).

¹¹⁾ Bei den Insulinfragmenten V und VI verlief die Oxydation nicht einheitlich. Dies ist wahrscheinlich auf eine Kettenspaltung der Tyrosinpeptide zurückzuführen. Bei $[\text{H-Tyr-Cys-Asn-OH}]_2$ (XXXVII) führte die Oxydation hingegen zu einem dünnschichtchromatographisch einheitlichen Produkt.

Folgende Fliessmittel wurden verwendet (Volumenteile):

System 43	<i>t</i> -Amylalkohol-2-Propanol-Wasser	51 + 21 + 28
System 45	2-Butanol-3-proz. wässeriger NH ₃	70 + 30
System 52	1-Butanol-Essigsäure-Wasser	71 + 7 + 22
System 52A	1-Butanol-Essigsäure-Wasser	67 + 10 + 23
System 87	2-Propanol-Ameisensäure-Wasser	77 + 4 + 19
System 100	Essigester-Pyridin-Essigsäure-Wasser	62 + 21 + 6 + 11
System 101A	1-Butanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser	42 + 24 + 4 + 30
System 101D	1-Butanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser	34 + 24 + 12 + 30
System 112A	1-Butanol-Pyridin-Ameisensäure-Wasser	42 + 24 + 4 + 20
System 112C	1-Butanol-Pyridin-Ameisensäure-Wasser	38 + 24 + 8 + 30
System 112D	1-Butanol-Pyridin-Ameisensäure-Wasser	34 + 24 + 12 + 30

Die Anfärbung der Platten erfolgte mit *Reindel-Hoppe*-Reagens in der Ausführung nach [25].

Die *Elektrophoresen* wurden auf DC-Fertigplatten 1440 ausgeführt. 90 Min., 16 V/cm. Die Laufstrecken sind in cm gegen die Kathode (–) bzw. Anode (+) angegeben. Folgende Puffer wurden verwendet: pH 1,9 (95,2 ml Eissessig, 26,5 ml Ameisensäure, 1 l Wasser); pH 4,0 (0,2M Ammoniumacetat); pH 7,6 (55,5 ml Methylmorpholin, mit Wasser auf 5 l auffüllen; 370 ml 0,05M Essigsäure).

1. Synthese der geschützten Kettenfragmente. – *H-Asn-OBu* (**1**). 23,6 g (73,2 mMol) *Z*-Asn-OBu wurden in 200 ml Essigester wie üblich hydriert. Beim Einengen der vom Katalysator abfiltrierten Lösung kristallisierte **1** aus. Zugabe von Hexan und Stehenlassen bei 0° lieferten 13,0 g vom Smp. 96–98°. $[\alpha]_D^{20} = +2^\circ$ ($c = 2,2$ in Methanol).

C₈H₁₆N₂O₃ Ber. C 51,05 H 8,57 N 14,88% Gef. C 50,87 H 8,87 N 14,86%

Boc-Cys(Trt)-Asn-OBu (**VII**). 18,52 g (40 mMol) Boc-Cys(Trt)-OH [11] in 200 ml absolutem Tetrahydrofuran wurden bei –10° mit 5,6 ml (40 mMol) Triäthylamin und 5,4 ml (40 mMol) Isobutylchlorocarbonat versetzt. Nach 20 Min. bei –10° wurde eine Lösung von 7,52 g (40 mMol) *H-Asn-OBu* (**1**) in 150 ml Tetrahydrofuran zugetropft und die Mischung 1 Std. bei –10° und 15 Std. bei 20° gelassen. Nach Abnutschen des Triäthylaminhydrochlorids und Eindampfen des Filtrats wurde der Rückstand in Essigester wie üblich aufgearbeitet. Aus dem dabei resultierenden öligen Produkt wurden durch Kristallisation aus Essigester-Petroläther 14,2 g (55%) vom Smp. 155–157° gewonnen. $[\alpha]_D^{20} = +34^\circ$ ($c = 2,1$ in Chloroform).

C₃₅H₄₃N₃O₆S Ber. C 66,33 H 6,84 N 6,63 S 5,06%
(633,8) Gef. „ 66,22 „ 6,80 „ 6,70 „ 5,09%

Trt-Cys(Trt)-Asn-OBu (**VIII**). Zu einer auf 0° gekühlten Lösung von 27,26 g (45 mMol) Trt-Cys(Trt)-OH und 8,37 g (45 mMol) *H-Asn-OBu* (**1**) in 400 ml Essigester gab man 10,32 g (50 mMol) DCCI und belies 15 Std. bei 0°. Dann nutschte man ab und arbeitete das Filtrat wie üblich auf. Beim Einengen der Essigesterlösung und Zugabe von Hexan kristallisierte das Produkt aus. Smp. 209–210°. Ausbeute 26,6 g (76%). $[\alpha]_D^{20} = +39^\circ$ ($c = 2,2$ in Chloroform).

C₄₀H₄₉N₃O₄S Ber. C 75,84 H 6,36 N 5,41 S 4,13%
(776,0) Gef. „ 75,48 „ 6,44 „ 5,30 „ 4,20%

H-Cys(Trt)-Asn-OBu (**2**). Zu 1,16 g (1,5 mMol) Trt-Cys(Trt)-Asn-OBu (**VIII**) in 9 ml Eissessig wurden 1,5 ml Wasser gegeben und 1 Std. bei 20° gerührt. Nach Zugabe von 7,5 ml Wasser wurde abfiltriert, das Filtrat bei 40° und 0,01 Torr eingedampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen und mit 1N Natriumhydrogencarbonat und Wasser gewaschen. Eindampfen der mit Natriumsulfat getrockneten Lösung lieferten 840 mg (**2**), welches nach Dünnschichtchromatogramm noch Spuren von Tritylcarbinol enthielt. Rf(S) = 0,43 (43A): 0,26 (Toluol-Aceton 1:1).

Boc-Tyr-Cys(Trt)-Asn-OBu (**IX**). Zu 2,81 g (10 mMol) Boc-Tyr-OH in 250 ml absolutem Tetrahydrofuran wurden bei –10° 1,4 ml (10 mMol) Triäthylamin und 1,33 ml (10 mMol) Isobutylchlorocarbonat gegeben und 20 Min. reagieren gelassen. Nach Zugabe einer auf –10° gekühlten Lösung von 5,4 g (10 mMol) *H-Cys(Trt)-Asn-OBu* (**2**) in 150 ml Tetrahydrofuran wurde noch 1 Std. bei –10° und 15 Std. bei 20° gehalten. Man filtrierte das Gemisch, dampfte das Filtrat ein,

löste den Rückstand in Essigester und arbeitete wie üblich auf. Der gelbliche Schaum lieferte durch zweimalige Kristallisation aus Essigester-Petroläther dünn-schichtchromatographisch einheitliches IX vom Smp. 176–178°. $[\alpha]_D^{20} = -8^\circ$ ($c = 1,9$ in Methanol).

$C_{44}H_{52}N_4O_8S$ (797,0)	Ber. C 66,31 Gef. „ 65,74	H 6,58 „ 6,56	N 7,03 „ 7,23	S 4,02% „ 3,97%
----------------------------------	------------------------------	------------------	------------------	--------------------

H-Glu(OBu)-Asn-Tyr-OMe (**3**). 1,80 g (2,9 mMol) Z-Glu(OBu)-Asn-Tyr-OMe [13] wurden in 80 ml Methanol wie üblich hydriert. Man filtrierte vom Katalysator ab und dampfte die Lösung ein. Der resultierende weisse Schaum (1,52 g) wurde direkt weiter verwendet.

Boc-Leu-Glu(OBu)-Asn-Tyr-OMe (**4**). Zu 11,9 g (24 mMol) (**3**) und 6,7 g (28,8 mMol) Boc-Leu-OH in 200 ml Dimethylformamid wurden 5,93 g (28,8 mMol) DCCl und 3,89 g (28,8 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol gegeben. Nach 24 Std. bei 20° filtrierte man, engte das Filtrat auf ca. 30 ml ein und tropfte es in 750 ml Äther; dabei fiel **4** als flockiger Niederschlag aus. Er wurde abfiltriert und aus 50-proz. Methanol umkristallisiert. 14,9 g (88%) **4**. Smp. 170–172° $[\alpha]_D^{20} = -23^\circ$ ($c = 2,0$ in Methanol).

$C_{34}H_{53}N_5O_{11}$ (707,8)	Ber. C 57,69 Gef. C 57,28	H 7,55 H 7,58	N 9,89% N 9,78%
---------------------------------	------------------------------	------------------	--------------------

Boc-Leu-Glu(OBu)-Asn-Tyr-NH-NH₂ (**X**). Eine Lösung von 1,42 g (2 mMol) **4** in 50 ml Methanol versetzte man mit 5 ml Hydrazinhydrat. Nach 24 Std. wurde die Lösung auf ca. 15 ml eingengt und bei 0° unter Rühren mit 150 ml Äther versetzt. Das ausgeschiedene Produkt wurde aus Methanol-Wasser umkristallisiert: 1,38 g (97%) **X** Smp. 218–220°. $[\alpha]_D^{20} = -42^\circ$ ($c = 0,97$ in Methanol).

$C_{33}H_{53}N_7O_{10}$ (707,8)	Ber. C 56,00 Gef. C 55,89	H 7,55 H 7,52	N 13,85% N 13,83%
---------------------------------	------------------------------	------------------	----------------------

HCl, H-Glu(OBu)₂ (**5**). In eine in einem Rundkolben befindliche Suspension von 4,41 g (30 mMol) Glutaminsäure in 150 ml Chloroform wurden bei –70° 150 ml Isobutylen kondensiert. Nach Zugabe von 3,0 ml konz. Schwefelsäure wurde der Kolben verschlossen und die Temperatur auf 20° gebracht. Durch gelegentliches Schütteln entstand innert ca. 15 Std. eine klare Lösung. Nach 3 Tagen wurde der Kolben bei 0° geöffnet und das überschüssige Isobutylen im Rotationsverdampfer bei 20° abgedampft. Bei 0° wurde dann mit einer Lösung von 22 g Kaliumhydrogencarbonat in 50 ml Wasser versetzt und die organische Phase mit Wasser neutral gewaschen. Nach Abdampfen des Lösungsmittels und Trocknen bei 40° und 0,01 Torr resultierte ein dünnflüssiges Öl (10,72 g). Titration einer Probe desselben ergab einen Gehalt an «freiem Ester» von 63,5%. Zur Überführung in das Hydrochlorid wurde das Produkt in 10 ml Methanol aufgenommen und bei 0° mit der berechneten Menge Chlorwasserstoff in Methanol versetzt. Die Lösung wurde eingedampft und der Rückstand aus Essigester-Hexan kristallisiert: 6,21 g (84%) **5** vom Smp. 112–113° (Lit. 116–117°). $[\alpha]_D^{20} = +22^\circ$ ($c = 2,1$ in Methanol) (Lit. [15]: 18,7°, $c = 2$ in Äthanol).

$C_{13}H_{26}NO_4Cl$ (295,8)	Ber. C 52,79 Gef. C 52,98	H 8,86 H 9,07	N 4,74% N 4,80%
------------------------------	------------------------------	------------------	--------------------

Z-Gly-Glu(OBu)₂ (**6**). Zu einer Lösung von 23,2 g (0,11 Mol) Z-Gly-OH und 15,54 ml (0,11 Mol) Triäthylamin in 200 ml Tetrahydrofuran wurden bei –10° 14,97 ml (0,11 Mol) Isobutylchlorocarbonat gegeben und 20 Min. reagieren gelassen.

Ein Gemisch von 28,52 g (96,5 mMol) HCl, H-Glu(OBu)₂ (**5**) und 13,5 ml (96,5 mMol) Triäthylamin in 300 ml Tetrahydrofuran wurde vom ausgeschiedenen Triäthylamin-hydrochlorid abfiltriert und das Filtrat zu obiger Lösung gegeben (–10°). Nach 1 Std. bei –10° und 15 Std. bei 20° wurde das Gemisch filtriert, das Filtrat eingedampft und der Rückstand in Essigester wie üblich aufgearbeitet. Aus dem resultierenden Öl wurden aus Essigester-Hexan 42,1 g (96%) Kristalle vom Smp. 71–74° erhalten. $[\alpha]_D^{20} = -17^\circ$ ($c = 2,2$ in Methanol).

$C_{23}H_{34}N_2O_7$ (450,6)	Ber. C 61,31 Gef. C 61,08	H 7,61 H 7,66	N 6,22% N 6,45%
------------------------------	------------------------------	------------------	--------------------

H-Gly-Glu(OBu)₂ (**7**). 2,7 g (6,0 mMol) Z-Gly-Glu(OBu)₂ (**6**) wurden in 30 ml Essigester unter üblichen Bedingungen hydriert. Es resultierte ein Öl (1,67 g), welches im Dünnschichtchromatogramm einheitlich war. Rf(S) = 0,50 (43A), 0,27 (Toluol-Aceton 7:3), 0,37 (Chloroform-Methanol 9:1).

Boc-Cys(Trt)-Gly-Glu(OBu)₂ (**XI**). 18,52 g (40 mMol) Boc-Cys(Trt)-OH in 200 ml absolutem Tetrahydrofuran wurden bei –10° mit 5,6 ml (40 mMol) Triäthylamin und 5,4 ml (40 mMol) Isobutylchlorocarbonat versetzt. Nach 20 Min. wurden 14,0 g (44 mMol) H-Gly-Glu(OBu)₂ (**7**) in 80 ml Tetrahydrofuran zugegeben; dann wurde noch 1 Std. bei –10° und 15 Std. bei 20° ge-

rührt. Nach Abnutschen des Triäthylamin-hydrochlorids wurde eingedampft und der Rückstand aus Essigester-Petroläther kristallisiert: 18,66 g (61%) **XI**. Smp. 108–110°. $[\alpha]_D^{20} = +6^\circ$ ($c = 2,1$ in Methanol).

$C_{42}H_{55}N_3O_8S$ (762,0)	Ber. C 66,20 Gef. „ 66,22	H 7,28 „ 7,09	N 5,51 „ 5,51	S 4,21% „ 4,08%
----------------------------------	------------------------------	------------------	------------------	--------------------

Trt-Cys(Trt)-Gly-Glu(OBut)₂ (**8**). Zu 224 g (0,37 Mol) *Trt-Cys(Trt)-OH* und 117 g (0,37 Mol) *H-Gly-Glu(OBut)₂* (**7**) in 1 l Essigester wurden bei 0° 83 g (0,40 Mol) DCCI gegeben. Nach 15 Std. bei 0° wurde abfiltriert und das Filtrat wie üblich aufgearbeitet. Kristallisation aus Essigester-Hexan lieferte 216 g (65%) **8**. Smp. 98–110°. $[\alpha]_D^{20} = +8^\circ$ ($c = 2,0$ in Methanol).

$C_{56}H_{61}N_3O_6S$ (904,2)	Ber. C 74,39 Gef. „ 74,14	H 6,80 „ 6,79	N 4,65 „ 4,43	S 3,55% „ 3,43%
----------------------------------	------------------------------	------------------	------------------	--------------------

H-Cys(Trt)-Gly-Glu(OBut)₂ (**9**). Zu 3,16 g (3,5 mMol) *Trt-Cys(Trt)-Gly-Glu(OBut)₂* (**8**) in 20 ml Eisessig wurden unter Rühren bei 20° 5 ml Wasser derart getropft, dass sich der anfänglich gebildete Niederschlag stets wieder löste. Nach 1 Std. wurde mit 15 ml Wasser versetzt, filtriert und das Filtrat bei 40°/0,01 Torr eingedampft. Den Rückstand nahm man in Essigester auf und extrahierte die Lösung bei 0° mit 0,5N Natriumhydrogencarbonat und Wasser. Abdampfen des Lösungsmittels lieferte einen weissen Schaum (2,23 g) welcher sich im Dünnschichtchromatogramm (abgesehen von Spuren von Triphenylcarbinol) als einheitlich erwies. Rf(S) = 0,55 (Toluol-Aceton 1:1), 0,40 (Chloroform-Methanol 95:5).

Boc-Val-Cys(Trt)Gly-Glu(OBut)₂ (**XII**). Bei –10° wurden 7,17 g (33 mMol) *Boc-Val-OH* und 4,62 ml (33 mMol) Triäthylamin in 80 ml Essigester mit 4,4 ml (33 mMol) Isobutylchlorocarbonat versetzt. Nach 20 Min. bei –10° tropfte man 21,92 g (33 mMol) *H-Cys(Trt)-Gly-Glu(OBut)₂* (**9**) in 200 ml Essigester zu. Nach 1 Std. bei –10° und 15 Std. bei 20° wurde filtriert und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wurde mit Wasser verrührt, abfiltriert und über Kaliumhydroxyd getrocknet. Kristallisation aus heissem Methanol lieferte 19,87 g (70%) **XII** vom Smp. 213–215°. $[\alpha]_D^{20} = +19^\circ$ ($c = 2,2$ in Chloroform).

$C_{47}H_{64}N_4O_9S$ (861,1)	Ber. C 65,56 Gef. „ 65,45	H 7,49 „ 7,46	N 6,51 „ 6,52	S 3,72% „ 3,90%
----------------------------------	------------------------------	------------------	------------------	--------------------

Boc-Leu-Val-OMe (**10**). 21,86 g (94,46 mMol) *Boc-Leu-OH* und 13,22 ml (94,46 mMol) Triäthylamin in 300 ml Acetonitril wurden bei –10° mit 12,56 ml (94,46 mMol) Isobutylchlorocarbonat versetzt. Nach 20 Min. wurde eine Suspension von 15,8 g (94,46 mMol) *HCl, H-Val-OMe* und 13,22 ml (94,46 mMol) Triäthylamin in 160 ml Acetonitril in diese Lösung hinein filtriert. Nach 1 Std. bei –10° und 15 Std. bei 20° wurde abfiltriert, das Filtrat eingedampft und der Rückstand in Essigester wie üblich aufgearbeitet. Einengen der Essigesterlösung und Zugabe von Petroläther lieferten 26,2 g (81%) **16** vom Smp. 143–144°. $[\alpha]_D^{20} = -44^\circ$ ($c = 2,4$ in Methanol).

$C_{17}H_{32}N_2O_5$ (344,5)	Ber. C 59,28 Gef. C 59,03	H 9,37 H 9,34	N 8,13% N 8,13%
------------------------------	------------------------------	------------------	--------------------

Boc-Leu-Val-OH (**11**). Zu 13,76 g (40 mMol) *Boc-Leu-Val-OMe* (**10**) in 260 ml Dioxan-Wasser (3:1) wurden 24 ml 2N Natronlauge gegeben. Nach 1 Std. Stehen bei 20° engte man die Lösung auf ca. 100 ml ein, gab 400 ml Essigester zu und stellte bei 0° mit 2N Salzsäure auf pH 2,5. Nach dreimaligem Waschen der Essigesterlösung mit Wasser wurde eingedampft. Der resultierende weisse Schaum wurde aus Benzol-Hexan umkristallisiert: 11,70 g (89%), Smp. 109–111°. $[\alpha]_D^{20} = -32^\circ$ ($c = 2,0$ in Methanol).

$C_{16}H_{30}N_2O_5$ (330,4)	Ber. C 58,16 Gef. C 58,16	H 9,15 H 9,06	N 8,48% N 8,54%
------------------------------	------------------------------	------------------	--------------------

HCl, H-Leu-Val-OMe (**12**). Eine Lösung von 1,03 g (3 mMol) *Boc-Leu-Val-OMe* (**10**) in 20 ml Essigester wurde bei 0° mit 20 ml 4N Salzsäure in Essigester versetzt, 30 Min. bei 0° und 1 Std. bei 20° gerührt, dann im Rotationsverdampfer bei 35° eingengt und durch tropfenweise Zugabe von Petroläther zur Kristallisation gebracht: 818 mg (97%) **12**. Smp. 173–175°. $[\alpha]_D^{20} = +3^\circ$ ($c = 2,4$ in Methanol).

$C_{12}H_{25}ClN_2O_3$ (280,8)	Ber. C 51,32 Gef. C 51,32	H 8,97 H 8,97	N 9,97% N 10,16%
--------------------------------	------------------------------	------------------	---------------------

Trt-Leu-Val-OMe (**13**). Zu 8,42 g (30 mMol) *HCl, H-Leu-Val-OMe* (**12**) und 8,4 ml (60 mMol) Triäthylamin in 100 ml Chloroform (alkoholfrei) wurden unter Rühren bei 0° 12,55 g (45 mMol) Tritylchlorid in 100 ml Chloroform derart getropft, dass die Temperatur nie über 5° stieg. Nach beendetem Eintragen und 1 Std. Stehen bei 20° wurde wie üblich aufgearbeitet. Das Rohprodukt

wurde aus Essigester-Hexan umkristallisiert: 12,6 g (86%) **13**. Smp. 170–172°. $[\alpha]_D^{20} = -51^\circ$ ($c = 1,8$ in Chloroform).

$C_{31}H_{38}N_2O_3$ (486,6) Ber. C 76,51 H 7,87 N 5,76% Gef. C 76,20 H 7,67 N 5,52%

Trt-Leu-Val-OH (**14**). 10,77 g (22,2 mMol) Trt-Leu-Val-OMe (**13**) in 150 ml Dioxan-Wasser (3:1) wurden mit 14,3 ml 2N Natronlauge während 3 Std. bei 20° verseift. Im Rotationsverdampfer destillierte man bei 35° das Dioxan weitgehend ab, gab 300 ml Essigester und 100 ml Wasser hinzu und säuerte bei 0° mit 1N Zitronensäure auf pH 3 an. Die organische Phase wurde mehrmals mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand ergab aus Essigester-Hexan 8,73 g (83%) **14** vom Smp. 148–151°. $[\alpha]_D^{20} = -40^\circ$ ($c = 2,0$ in Methanol).

$C_{30}H_{36}N_2O_3$ (472,6) Ber. C 76,24 H 7,68 N 5,93% Gef. C 76,32 H 7,64 N 5,82%

*Boc-Leu-Val-Cys(Trt)-Gly-Glu(OBut)*₂ (**XIII**). 13,4 g (40 mMol) Boc-Leu-Val-OH (**11**) und 26,5 g (40 mMol) H-Cys(Trt)-Gly-Glu(OBut)₂ (**9**) in 500 ml Dimethylformamid wurden bei 0° mit 9,2 g (80 mMol) Hosu und 12,37 g (60 mMol) DCCI versetzt. Nach 15 Std. bei 0° wurde filtriert und das Filtrat bei 40° und 0,01 Torr eingedampft. Der Rückstand wurde einer Gegenstromverteilung im System I unterworfen. Nach 550 Schritten befand sich XIII in den Elementen 30–64 ($r_{max} = 47$; $K = \sim 0,1$). Der Inhalt dieser Rohre wurde vereinigt, bei 40° im Wasserstrahlvakuum eingedampft und durch 4 Std. Erwärmen bei 40°/0,01 Torr vom Ammoniumacetat befreit. Der amorphe Rückstand (17,1 g XIII, 43%) erwies sich im Dünnschichtchromatogramm als einheitlich. Rf(S) = 0,51 (Chloroform-Methanol 95:5); 0,71 (Toluol-Aceton 1:1). Die Aminosäureanalyse des Totalhydrolysates (6N HCl, 24 Std., 110°) einer Probe gab folgendes molares Verhältnis (berechnete Werte in Klammern): Leu 0,92 (1), Val 0,87 (1), $\frac{1}{2}$ (Cys)₂ 0,54 (1), Gly 0,99 (1), Glu 1 (Bezugswert).

*Trt-Leu-Val-Cys(Trt)-Gly-Glu(OBut)*₂ (**XIV**). 14,2 g (30 mMol) Trt-Leu-Val-OH (**14**) und 19,86 g (30 mMol) H-Cys(Trt)-Gly-Glu(OBut)₂ (**9**) in 300 ml Dimethylformamid wurden bei 0° mit 6,9 g (60 mMol) Hosu und 9,3 g (45 mMol) DCCI versetzt. Nach 15 Std. bei 0° wurde abfiltriert, das Filtrat bei 40°/0,01 Torr eingedampft und der Rückstand in Essigester wie üblich aufgearbeitet. Der Rückstand wurde an einer in Essigester bereiteten Säule (5,3 × 60 cm) von Silicagel chromatographiert. 450 ml dieses Lösungsmittels eluierten zunächst lipophile Nebenprodukte. Die folgenden 1,8 l gaben dann 12,4 g (37%) reines XIV, welches aus Essigester-Hexan kristallisiert wurde. Smp. 155–159°. $[\alpha]_D^{20} = 0^\circ$ ($c = 2,1$ in Methanol).

$C_{87}H_{81}O_8N_5S$ Ber. C 72,08 H 7,31 N 6,27 S 2,87%
(1116,5) Gef. „ 72,08 „ 7,56 „ 6,13 „ 3,05%

HCl, H-Glu(OBut)-Ala-OMe (**15**). 6,33 g (15 mMol) Z-Glu(OBut)-Ala-OMe wurden in 70 ml Methanol, welches 17 mMol HCl enthielt, wie üblich hydriert. Die vom Katalysator abfiltrierte Lösung wurde bei 35° im Rotationsverdampfer eingedampft. Der über Kaliumhydroxyd bei 0,01 Torr getrocknete weisse Schaum (4,85 g **15**, 98%) erwies sich im Dünnschichtchromatogramm als einheitlich. Rf(S) = 0,56 (45); 0,58 (Methanol); 0,35 (Toluol-Aceton 1:1).

Boc-Val-Glu(OBut)-Ala-OMe (**16**). Eine Lösung von 3,91 g (18 mMol) Boc-Val-OH in 60 ml absolutem Tetrahydrofuran wurden bei –10° mit 2,52 ml (18 mMol) Triäthylamin und 2,39 g (18 mMol) Isobutylchlorocarbonat versetzt und 20 Min. bei dieser Temperatur gerührt. Unter Eiskühlung wurden zu 4,80 g (14,8 mMol) HCl, H-Glu(OBut)-Ala-OMe (**15**) in 40 ml Tetrahydrofuran 2,07 ml (14,8 mMol) Triäthylamin gegeben und in obige Lösung bei –10° filtriert. Nach 1 Std. bei –10° und 15 Std. bei 20° wurde filtriert, das Filtrat eingedampft und in Essigester wie üblich aufgearbeitet. Umkristallisation aus Essigester-Hexan gab 5,17 g (72%) **16** vom Smp. 134–135°. $[\alpha]_D^{20} = -49^\circ$ ($c = 1,9$ in Methanol).

$C_{23}H_{41}N_3O_8$ (487,6) Ber. C 56,66 H 8,48 N 8,62% Gef. C. 56,48 H 8,19 N 8,70%

Boc-Val-Glu(OBut)-Ala-NH-NH₂ (**17**). Eine Lösung von 4,87 g (10 mMol) Boc-Val-Glu(OBut)-Ala-OMe (**16**) in 60 ml Methanol wurde mit 10 ml Hydrazinhydrat versetzt. Innert 15 Std. bei 20° kristallisierte **17** aus. Umkristallisation aus heissem Methanol gab 4,1 g (84%) vom Smp. 226–227°. $[\alpha]_D^{20} = -49^\circ$ ($c = 2,0$ in Methanol).

$C_{22}H_{41}N_5O_7$ (487,6) Ber. C 54,19 H 8,48 N 14,36% Gef. C 54,07 H 8,68 N 14,22%

Boc-Leu-Tyr-OMe (**18**). 2,31 g (10 mMol) Boc-Leu-OH in 30 ml Essigester wurden bei –10° mit 1,4 ml (10 mMol) Triäthylamin und 1,33 ml (10 mMol) Isobutylchlorocarbonat versetzt.

Nach 20 Min. bei -10° wurde ein auf -10° abgekühltes Gemisch von 2,31 (10 mMol) HCl, H-Tyr-OMe und 1,4 ml (10 mMol) Triäthylamin in 40 ml Essigester in *c* sige Lösung filtriert. Nach 1 Std. bei -10° und 15 Std. bei 20° wurde vom ausgeschiedenen Triäthylamin-hydrochlorid abfiltriert und das Filtrat wie üblich aufgearbeitet. Kristallisation aus Äther gab 3,31 g (81%) (**18**) vom Smp. $106-108^\circ$. $[\alpha]_D^{20} = -20^\circ$ ($c = 2,3$ in Methanol).

$C_{21}H_{32}N_2O_8$ (408,5) Ber. C 61,74 H 7,90 N 6,86% Gef. C 61,80 H 7,90 N 7,03%

HCl, H-Leu-Tyr-OMe (**19**). 4,08 g (10 mMol) Boc-Leu-Tyr-OMe (**18**) in 40 ml Essigester wurden bei 0° mit 40 ml 4N HCl in Essigester versetzt. Nach 30 Min. bei 0° und 2 Std. bei 20° wurde im Rotationsverdampfer bei 35° auf ca. 15 ml eingengt und durch Zugabe von 120 ml Petroläther ein klebriges Produkt ausgefällt, welches über Kaliumhydroxyd bei 0,01 Torr getrocknet wurde. Die hydroskopische Substanz (3,36 g) erwies sich im Dünnschichtchromatogramm als einheitlich und wurde direkt weiter verwendet. Rf(S) = 0,20 (Chloroform-Methanol 9:1).

Boc-Val-Glu(OBut)-Ala-Leu-Tyr-OMe (**20**). Zu 4,25 g (8,67 mMol) Boc-Val-Glu(OBut)-Ala-NH-NH₂ (**17**) in 100 ml Dimethylformamid wurden bei -15° 30,34 ml 1N Salzsäure (auf -15° gekühlt) und 1,9 ml einer 5N Lösung von Natriumnitrit in Wasser gegeben. Nach 15 Min. bei -10° versetzte man mit einem Gemisch von 3,0 g (8,67 mMol) HCl, H-Leu-Tyr-OMe (**18**) und 1,21 ml (8,67 mMol) Triäthylamin in 35 ml Chloroform. Nach 1 Std. bei -10° und 15 Std. bei 0° wurde die klare Lösung eingedampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen und wie üblich aufgearbeitet. Kristallisation aus Essigester-Petroläther gab 5,46 g (82%) **20** vom Smp. $191-192^\circ$. $[\alpha]_D^{20} = -43^\circ$ ($c = 2,1$ in Methanol).

$C_{38}H_{61}N_5O_{11}$ (763,9) Ber. C 59,75 H 8,05 N 9,17% Gef. C 59,76 H 7,99 N 9,32%

Boc-Val-Glu(OBut)-Ala-Leu-Tyr-NH-NH₂ (XV). 1,15 g (1,5 mMol) Boc-Val-Glu(OBut)-Ala-Leu-Tyr-OMe (**20**) wurden in 25 ml Methanol mit 2,5 ml Hydrazinhydrat umgesetzt. Nach ca. 1 Std. bei 20° begann XV auszukristallisieren. Nach 24 Std. wurde abfiltriert und der Niederschlag aus heissem Methanol umkristallisiert: 850 mg (74%) vom Smp. $215-216^\circ$. $[\alpha]_D^{20} = -46^\circ$ ($c = 0,87$ in Methanol).

$C_{37}H_{61}N_7O_{10}$ (763,9) Ber. C 58,17 H 8,05 N 12,83% Gef. C 58,01 H 8,17 N 12,75%

Boc-Val-Glu(OBut)-Ala-Leu-Tyr-OH (XVI). Zu 1,15 g (1,5 mMol) Boc-Val-Glu(OBut)-Ala-Leu-Tyr-OMe (**20**) in 15 ml Dioxan-Wasser (3:1) wurden 3,37 ml 1N Natronlauge gegeben. Nach 1 Std. bei 20° tropfte man unter Eiskühlung 3,35 ml 1N Salzsäure zu und nahm das Gemisch in 150 ml Essigester auf. Die organische Phase wurde dreimal mit Wasser extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Umfällen des Rückstandes aus Essigester-Hexan lieferte 1,01 g dünn-schichtchromatographisch reines XVI als weisses Pulver. Rf(S) = 0,35 (43); 0,67 (100).

2. Bildung der Disulfidbrücke und Verlängerung der Ketten. – Boc-Cys-Asn-OBut (**21**). 2,54 g (4 mMol) Boc-Cys(Trt)-Asn-OBut (VII) und 1,40 g (4,4 mMol) Quecksilber(II)-acetat wurden in 40 ml Essigester-Methanol (1:1) unter Stickstoff während 4 Std. bei 20° stehengelassen. Durch die klare Lösung leitete man Schwefelwasserstoff (30 Min.) und Stickstoff (15 Min.), filtrierte vom schwarzen Niederschlag ab und dampfte das gelbe Filtrat bei 40° zu einem Öl ein, welches zweimal mit je 10 ml Petroläther extrahiert wurde. Der ölige, in Petroläther unlösliche Rückstand (1,42 g) zeigte im Dünnschichtchromatogramm (Toluol-Aceton 1:1) das Hauptprodukt (**21**) mit Rf(S) = 0,37 sowie zu ca. 10% dessen Oxydationsprodukt XVIII.

Boc-Cys-Gly-Glu(OBut)₂ (**22**). 3,05 g (4 mMol) Boc-Cys(Trt)-Gly-Glu(OBut)₂ (XI) wurden wie bei **21** detriplyliert. **22** fiel als Öl an (1,94 g), das nach Dünnschichtchromatogramm ebenfalls zu ca. 10% das Cystinpeptid XIX enthielt. Rf(C) = 0,50 (Chloroform-Methanol 95:5).

XVII. – a) Oxydation mit Dijodäthan. Rohes **21** und **22**, erhalten aus je 4 mMol VII bzw. XI, wurden in 30 ml Essigester-Methanol 1:1 gelöst und mit 1,12 ml (8 mMol) Triäthylamin und 1,69 g (6 mMol) frisch umkristallisiertem Dijodäthan versetzt. Nach 15 Std. bei 20° dampfte man ein und verrieb den Rückstand mit Petroläther und dann mit Wasser. Das erhaltene Rohprodukt, wie in [9] beschrieben einer Gegenstromverteilung im System II unterworfen, ergab 1,34 g (36%) reines XVII. $[\alpha]_D^{20} = -103^\circ$ ($c = 1,9$ in Dimethylformamid).

b) Dirhodanmethode. Zu einer gerührten Suspension von 905 mg (2,8 mMol) Pb(SCN)₂ in 6 ml Essigester wurde bei 0° unter Rühren eine Lösung von 336 mg (2,1 mMol) Brom in 6 ml Essigester

derart getropft, dass die anfängliche Braunfärbung jeweils verschwand. Nach beendetem Eintragen (15 Min.) rührte man noch 15 Min. und filtrierte dann. Zu dem schwach rötlichen Filtrat wurde eine Lösung von Boc-Cys-Asn-OBuT (**21**) (erhalten aus 1,27 g (2 mMol) VII) in 15 ml Essigester innert 15 Min. bei 0° getropft. Nach weiteren 15 Min. bei 0° versetzte man mit 164 mg (2 mMol) wasserfreiem Natriumacetat und tropfte dann rohes Boc-Cys-Gly-Glu(OBuT)₂ (**22**) (aus 1,52 g (2 mMol) XI) in 15 ml Essigester innert 30 Min. zu und rührte noch 10 Min. bei 0° und 2 Std. bei 20°. Die braune Lösung wurde mit 50 ml Essigester verdünnt und mit 1N Natriumhydrogencarbonat und Wasser gewaschen. Die über Natriumsulfat getrocknete Lösung gab beim Eindampfen einen gelben Schaum. Aus diesem wurde wie oben durch Gegenstromverteilung 1,0 g (55%) XVII isoliert.

In weiteren Ansätzen wurden anstelle von (**22**) bei sonst gleicher Ausführung 1,52 g (2 mMol) bzw. 762 mg (1 mMol) Boc-Cys(Trt)-Gly-Glu(OBuT)₂ (XI) eingesetzt. Die Ausbeuten an XVII betragen 760 mg (42%) und 630 mg (70%).

XX. Zu 1,0 g (4 mMol) Jod in 5 ml Methanol wurde eine Lösung von 1,27 g (2 mMol) Boc-Cys(Trt)-Asn-OBuT (VII) und 1,72 g (2 mMol) Boc-Val-Cys(Trt)-Gly-Glu(OBuT)₂ (XII) in 15 ml Essigester-Methanol 2:1 gegeben. Nach 1 Std. bei 20° wurden 100 ml Essigester zugegeben, die Lösung durch Schütteln mit 0,5N Natriumthiosulfat entfärbt, mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde zweimal mit Petroläther verrieben und dann einer Gegenstromverteilung im System III unterworfen. Nach 400 Schritten befand sich XX in den Röhren 14–41 ($r_{max} = 26$; $K = 0,07$). Eindampfen des Inhalts dieser Elemente und Absublimieren von Ammoniumacetat bei 40°/0,01 Torr lieferte 960 mg (statistisch 1,0 g) dünnschichtchromatographisch reines XX. Rf(S) = 0,28 (Toluol-Aceton 1:1); 0,47 (Chloroform-Methanol 9:1). $[\alpha]_D^{20} = -64^\circ$ ($c = 1,9$ in Methanol).

XXI. Zu einer Lösung von 1,52 g (6 mMol) Jod in 15 ml Methanol wurden 1,27 g (2 mMol) Boc-Cys(Trt)-Asn-OBuT (VII) und 975 mg (1 mMol) Boc-Leu-Val-Cys(Trt)-Gly-Glu(OBuT)₂ (XIII) in 20 ml Chloroform-Methanol 1:1 gegeben. Nach 1 Std. bei Raumtemperatur wurde auf 0° gekühlt und die Lösung mit 1N Thiosulfat entfärbt. Nach Entfernen des Chloroforms im Rotationsverdampfer durch dreimaliges Einengen und erneute Zugabe von Methanol wurde die resultierende methanolische Lösung (ca. 10 ml) mit 50 ml Wasser versetzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, über Kaliumhydroxyd getrocknet und mit Petroläther verrieben. Dieses Produkt unterzog man einer Gegenstromverteilung im System IV. Nach 560 Schritten befand sich XXI in den Elementen 7–35 ($r_{max} = 18$; $K = 0,035$). Eindampfen des Inhalts dieser Elemente und Absublimieren von Ammoniumacetat ergab 680 mg (statistisch: 750 mg) reines XXI. Rf(S) = 0,52 (Chloroform-Methanol 95:5); 0,57 (Toluol-Aceton 1:1). $[\alpha]_D^{20} = -80^\circ$ ($c = 2,0$ in Dimethylformamid).

XXII. 1,59 g (2 mMol) Boc-Tyr-Cys(Trt)-Asn-OBuT (IX) und 1,52 g (2 mMol) Boc-Cys(Trt)-Gly-Glu(OBuT)₂ (XI) wurden in 30 ml Methanol mit 1 g (4 mMol) Jod umgesetzt. Nach Reduktion des überschüssigen Jods mit 1N Thiosulfat bei 0° fällte man mit 100 ml Wasser aus. Der über Kaliumhydroxyd getrocknete Niederschlag wurde mit Petroläther ausgerührt und dann einer Gegenstromverteilung im System VI unterworfen. Nach 290 Schritten wurde die Substanz aus den Elementen 7–24 ($K = 0,05$) erhalten. Diese Fraktionen wurden vereinigt, eingedampft und bei 40°/0,01 Torr vom Ammoniumacetat befreit. Es resultierten 920 mg (statistisch: 1,07 g) reines XXII. Rf(S) = 0,37 (Toluol-Aceton 1:1); 0,46 (Chloroform-Methanol 9:1). $[\alpha]_D^{20} = -67^\circ$ ($c = 1,8$ in Methanol).

[Boc-Val-Cys-Gly-Glu(OBuT)₂]₂ (XXIII). 1,72 g (2 mMol) Boc-Val-Cys(Trt)-Gly-Glu(OBuT)₂ (XII) in 15 ml Chloroform wurden mit 1,0 g (4 mMol) Jod in 5 ml Methanol versetzt. Nach 1 Std. bei 20° verdünnte man mit 50 ml Chloroform und wusch die Lösung mit 0,5N Thiosulfat und Wasser. Eindampfen der Lösung lieferte XXIII, aus welchem durch Umfällen aus Essigester-Hexan 800 mg (65%) amorphes Pulver erhalten wurde. Rf(S) = 0,34 (Toluol-Aceton 1:1). $[\alpha]_D^{20} = -68^\circ$ ($c = 1,8$ in Methanol).

$C_{56}H_{98}N_8O_{18}S_2$	Ber.	C 54,44	H 8,00	N 9,07	S 5,19%
(1235,6)	Gef.	,, 53,97	,, 7,99	,, 9,11	,, 5,11%

[Boc-Leu-Val-Cys-Gly-Glu(OBuT)₂]₂ (XXIV). 3,9 g (4 mMol) Boc-Leu-Val-Cys(Trt)-Gly-Glu(OBuT)₂ (XIII) wurden in 70 ml Essigester-Methanol 1:1 mit 2,0 g (8 mMol) Jod versetzt. Nach 1 Std. bei 20° wurde die Lösung auf 0° gekühlt und mit 1N Thiosulfat entfärbt. Durch drei-

maliges Einengen im Rotationsverdampfer bei 40° und jeweiliges Verdünnen mit Methanol befreite man das Gemisch vom Chloroform und fällte dann mit Wasser aus. Der über Kaliumhydroxyd getrocknete Niederschlag wurde mit Petroläther verrieben und schliesslich aus heissem Methanol umgelöst. So wurden 2,40 g (82%) XXIV als in allen organischen Lösungsmitteln nur spärlich lösliches, amorphes Pulver erhalten. Rf(S) = 0,40 (Chloroform-Methanol 95:5). $[\alpha]_D^{20} = -42^\circ$ ($c = 0,75$ in Dimethylformamid).

$C_{68}H_{120}N_{10}O_{20}S_2$	Ber.	C 55,87	H 8,27	N 9,58	S 4,39%
(1461,9)	Gef.	„ 56,16	„ 8,51	„ 9,59	„ 4,46%

[*Boc-Tyr-Cys-Asn-OBut*]₂ (XXV). Zu 500 mg (2 mMol) Jod in 2 ml Methanol wurden 800 mg (1 mMol) Boc-Tyr-Cys(Trt)-Asn-OBut (IX) in 8 ml Methanol gegeben. Nach 1 Std. bei 20° entfärbte man die Lösung mit 1N Thiosulfat bei 0° und fällte dann mit 25 ml Wasser aus. Der flockige Niederschlag wurde nach dem Trocknen über Kaliumhydroxyd mit Petroläther ausgerührt und dann aus Methanol umkristallisiert: 490 mg (89%) XXV vom Smp. 187–189°. $[\alpha]_D^{20} = -24^\circ$ ($c = 1,8$ in Methanol).

$C_{50}H_{74}N_8O_{16}S_2$	Ber.	C 54,23	H 6,74	N 10,12	S 5,79%
(1107,8)	Gef.	„ 54,44	„ 6,83	„ 9,93	„ 5,64%

XXVI. Zu einem gerührten Gemisch von 3,18 g (12,5 mMol) Jod und 1,38 g (17,5 mMol) Pyridin in 75 ml Methanol wurden 1,94 g (2,5 mMol) Trt-Cys(Trt)-Asn-OBut (VIII) und 1,90 g (2,5 mMol) Boc-Cys(Trt)-Gly-Glu(OBut)₂ (XI) in 50 ml Essigester-Methanol (1:1) gegeben. Nach 2 Std. bei 20° entfernte man das überschüssige Jod mit 1N Thiosulfat bei 0°, engte im Rotationsverdampfer bei 40° auf ca. 20 ml ein, gab 50 ml Methanol zu, engte nochmals auf 20 ml ein und goss dann auf 150 ml Eiswasser. Der Niederschlag wurde über Kaliumhydroxyd getrocknet, mit Petroläther ausgerührt und dann einer Gegenstromverteilung im System V unterworfen. Nach 410 Schritten entnahm man den Elementen 45–69 ($K = 0,15$) 1,11 g (statistisch: 1,32 g) reines XXVI. Rf(S) = 0,60 (Chloroform-Methanol 9:1); 0,55 (Toluol-Aceton 1:1). $[\alpha]_D^{20} = -19^\circ$ ($c = 1,8$ in Methanol).

XXVII. – a) *Oxydation mit Jod in Methanol und Pyridin*. Zu einem gerührten Gemisch von 1,9 g (7,5 mMol) Jod und 830 mg (10,5 mMol) Pyridin in 15 ml Methanol wurden 1,12 g (1 mMol) Trt-Leu-Val-Cys(Trt)-Gly-Glu(OBut)₂ (XIV) und 1,27 g (2 mMol) Boc-Cys(Trt)-Asn-OBut (VII) in 30 ml Methanol gegeben. Das Gemisch wurde 2 Std. bei 20° gehalten, dann bei 0° mit 1N Thiosulfat entfärbt und mit 60 ml Wasser ausgefällt. Der Niederschlag wurde über Kaliumhydroxyd getrocknet, mit Petroläther ausgerührt und dann einer Gegenstromverteilung im System I über 178 Schritte unterworfen. XXVII befand sich in den Elementen 44–64 ($v_{max} = 52$; $K = 0,45$). Aus dem Inhalt dieser Rohre wurden 720 mg (statistisch: 835 mg) reines XXVII erhalten. Rf(S) = 0,38 (Chloroform-Methanol 95:5); 0,53 (Toluol-Aceton 1:1). $[\alpha]_D^{20} = +3^\circ$ ($c = 1,3$ in Chloroform).

b) *Dirhodanmethode*. 1,94 g (3 mMol) Boc-Cys(Trt)-Asn-OBut (VII) wurden wie oben beschrieben zu rohem Boc-Cys-Asn-OBut (**21**) detriptyliert, das mit Dirhodan [aus 1,36 g Pb(SCN)₂ und 505 mg Brom in 14 ml Essigester] wie bei XVII angegeben in das S-Thiocyanat (**23**) übergeführt wurde. Dieses wurde ohne Isolierung mit 2,23 g (2 mMol) Trt-Leu-Val-Cys(Trt)-Gly-Glu(OBut)₂ (XIV) umgesetzt und wie oben beschrieben aufgearbeitet. Aus dem Rohprodukt (2,84 g) erhielt man durch Gegenstromverteilung wie unter a) 1,20 g (50%) reines XXVII.

XXVIII. Zu 1,0 g (4 mMol) Jod und 635 mg (8 mMol) Pyridin in 5 ml Methanol gab man 1,55 g (2 mMol) Trt-Cys(Trt)-Asn-OBut (VIII) und 1,72 g (2 mMol) Boc-Val-Cys(Trt)-Gly-Glu(OBut)₂ (XII) in 30 ml Essigester-Methanol 1:1. Nach 2 Std. bei 20° wurde auf 0° gekühlt und mit 1N Thiosulfat entfärbt. Durch dreimaliges Einengen im Rotationsverdampfer, wobei jedesmal mit Methanol verdünnt wurde, befreite man vom Essigester und fällte dann mit Wasser aus. Nach dem Trocknen über Kaliumhydroxyd und Ausrühren mit Petroläther wurde das Rohprodukt im System V verteilt. Nach 430 Stufen befand sich XXVIII in den Elementen 48–65 ($K = 0,15$). Durch Eindampfen dieser Fraktionen und Absublimieren des Ammoniumacetats bei 40°/0,01 Torr wurde 1,0 g (statistisch: 1,15 g) reines XXVIII erhalten. Rf(S) = 0,25 (Toluol-Aceton 7:3). $[\alpha]_D^{20} = -20^\circ$ ($c = 1,0$ in Methanol).

[*Trt-Cys-Asn-OBut*]₂ (XXIX). Zu 625 mg (2,5 mMol) Jod und 277 mg (3,5 mMol) Pyridin in 5 ml Methanol gab man 776 mg (1 mMol) Trt-Cys(Trt)-Asn-OBut (VIII) in 10 ml Dimethyl-

formamid. Nach 2 Std. bei 20° wurde bei 0° mit 1N Thiosulfat entfärbt und dann bei 40° und 0,01 Torr auf ca. 3 ml eingengt. Das Produkt wurde mit 20 ml Wasser ausgefällt und nach dem Trocknen über Kaliumhydroxyd mit Petroläther ausgerührt. Umfällen aus Essigester-Petroläther gab 410 mg (77%) reines XXIX. Rf(S) = 0,45 (Chloroform-Methanol 95:5). $[\alpha]_D^{20} = +11^\circ$ ($c = 1,8$ in Methanol).

$C_{60}H_{88}N_6O_8S_2$	Ber.	C 67,64	H 6,43	N 7,89	S 6,02%
(1065,4)	Gef.	„ 67,15	„ 6,46	„ 7,71	„ 5,77%

[Trt-Leu-Val-Cys-Gly-Glu(OBut)₂]₂ (XXX). 1,27 g (5 mMol) Jod und 554 mg (7 mMol) Pyridin in 10 ml Methanol wurden mit 2,23 g (2 mMol) Trt-Leu-Val-Cys(Trt)-Gly-Glu(OBut)₂ (XIV) in 20 ml Methanol umgesetzt. Nach 1 Std. bei 20° entfärbte man mit 1N Thiosulfat und engte im Rotationsverdampfer auf ca. 5 ml ein. Man fällt dann mit Wasser aus, verrührte den über Kaliumhydroxyd getrockneten Niederschlag mit Petroläther und kristallisierte aus Methanol-Essigester um: 1,3 g (75%) XXX vom Smp. 224–225°. $[\alpha]_D^{20} = -25^\circ$ ($c = 1,9$ in Chloroform).

$C_{96}H_{132}N_{10}O_{16}S_2$	Ber.	C 66,03	H 7,62	N 8,02	S 3,67%
(1746,3)	Gef.	„ 65,86	„ 7,78	„ 8,01	„ 3,69%

24. 1,05 g (1 mMol) XXXVI wurden in 8 ml Eisessig gelöst und 2 ml Wasser zugegeben. Nach 1 Std. bei 20° verdünnte man mit 6 ml Wasser, filtrierte vom ausgeschiedenen Triphenylcarbinol ab, gab zum Filtrat 100 ml Eisessig und lyophilisierte. Das Acetat von **24** fiel dabei als voluminöses weisses Pulver an (900 mg), welches noch Spuren von Triphenylcarbinol enthält. Rf(S) = 0,50 (Chloroform-Methanol 8:2).

XXVII (aus **24**). Zu 310 mg (1,1 mMol) Boc-Tyr-OH in 8 ml Tetrahydrofuran gab man bei –15° 1,1 ml 1N Triäthylamin in Tetrahydrofuran und 1,1 ml 1N Isobutylchlorocarbonat in Tetrahydrofuran. Nach 6 Min. bei –10° wurde das Gemisch mit 890 mg **24** in 4 ml Tetrahydrofuran versetzt und nach 1 Std. Stehen bei –10° und 15 Std. Stehen bei 20° in 100 ml Essigester wie üblich aufgearbeitet. Umfällen aus Essigester-Petroläther ergab 920 mg reines XXVII.

25. 576 mg (0,5 mMol) XXVIII wurden in 5 ml 80-proz. Essigsäure, wie bei **24** beschrieben, detriyliert. Es resultierten 525 mg rohes **25**, welches direkt weiter umgesetzt wurde Rf(S) = 0,22 (Chloroform-Methanol 9:1).

XXXI. 425 mg (0,6 mMol) Boc-Leu-Glu(OBut)-Asn-Tyr-NH-NH₂ (X) in 5 ml Dimethylformamid versetzte man bei –10° mit 0,97 ml (1,5 mMol) 1,55N HCl in Essigester und 0,083 ml *t*-Butylnitrit. Nach 10 Min. bei –10° gab man die gekühlte Lösung von obigem **25** und 0,28 (2 mMol) Triäthylamin in 5 ml Dimethylformamid zu und liess 1 Std. bei –10° und 15 Std. bei 5° reagieren. Die Lösung wurde dann bei 40° und 0,01 Torr eingedampft und der ölige Rückstand mit Wasser verrieben. Das dabei entstandene Pulver wurde nach Trocknung über Kaliumhydroxyd aus heissem Methanol umgefällt: 720 mg (91%) reines XXXI. Rf(S) = 0,32 (Chloroform-Methanol 9:1); 0,72 (Essigester-Methanol 8:2). $[\alpha]_D^{20} = -91^\circ$ ($c = 1,0$ in Dimethylformamid).

26. 636 mg (0,5 mMol) XXVII wurden wie oben in 5 ml 80proz. Essigsäure detriyliert. Das rohe Acetat von **26** fiel als voluminöses, farbloses Pulver an (553 mg). Zur Überführung in das freie Amin wurde in 100 ml Essigester aufgenommen und bei 0° dreimal mit je 10 ml 0,5N Natriumhydrogencarbonatlösung und dreimal mit je 10 ml Wasser gewaschen. Eindampfen der über Natriumsulfat getrockneten Lösung gab 518 mg Amin **26** als weissen Schaum. Rf(S) = 0,25 (Chloroform-Methanol 9:1).

XXXII. – a) *Azidmethode*. 460 mg (0,6 mMol) Boc-Val-Glu(OBut)-Ala-Leu-Tyr-NH-NH₂ (XV) in 5 ml Dimethylformamid versetzte man bei –10° mit 0,94 ml (1,5 mMol) 1,59N HCl in Essigester und 0,083 ml (0,72 mMol) *t*-Butylnitrit. Nach 10 Min. bei –10° gab man die Lösung des Acetates von **26** (erhalten aus 0,5 mMol XXVII) und 0,28 ml (2 mMol) Triäthylamin in 5 ml Dimethylformamid zu und liess 1 Std. bei –10° und 15 Std. bei 5° stehen. Die Lösung wurde dann unter starkem Rühren in 100 ml Wasser getropft und der Niederschlag nach dem Trocknen über Kaliumhydroxyd aus Methanol-Äther umgefällt: 785 mg (89%) dünn-schichtchromatographisch reines XXXII. Rf(S) = 0,29 (Chloroform-Methanol 9:1); 0,55 (Essigester-Methanol 8:2). $[\alpha]_D^{20} = -78^\circ$ ($c = 1,7$ in Methanol).

$C_{82}H_{137}N_{13}O_{24}S_2$	(1753,2)	Ber.	N 10,39	S 3,66%	Gef.	N 10,35	S 3,55%
--------------------------------	----------	------	---------	---------	------	---------	---------

b) *Hosu-DCII*. Zu 480 mg **26** (als freies Amin; erhalten aus 0,5 mMol XXVII) und 375 mg (0,5 mMol) Boc-Val-Glu(OBut)-Ala-Leu-Tyr-OH (XVI) in 8 ml Dimethylformamid gab man bei

0° 115 mg (1 mMol) Hosu und 155 mg (0,75 mMol) DCCI. Nach 4 Std. bei 0° und 15 Std. bei 20° wurde bei 40°/0,01 Torr eingedampft und der ölige Rückstand mit Wasser verrieben. Das als Pulver erhaltene Rohprodukt wurde in 3 ml Methanol gelöst auf eine, mit Methanol äquilibrierte Säule (2×100 cm) SEPHADEX LH 20 gebracht und mit Methanol eluiert. Nach einem Vorlauf von 100 ml fing man Fraktionen zu 5 ml auf. Die Fraktionen 5–10 enthielten 465 mg (55%) reines XXXII.

Disproportionierungsversuche. Ein Gemisch von 39 mg (0,05 mMol) [Boc-Cys-Asn-OBu]₂ (XVIII) und 87 mg (0,05 mMol) [Trt-Leu-Val-Cys-Gly-Glu(OBu)₂]₂ (XXX) wurde in 5 ml 1N NH₃ in Methanol 2 Std. bei 40° gehalten. Man gab dann 5 ml 1N Essigsäure zu, dampfte ein und trocknete bei 40°/0,01 Torr. Zur Auftrennung des Gemisches wurde in 3 ml Methanol aufgenommen, auf eine in diesem Lösungsmittel bereitete Säule (2×100 cm) von SEPHADEX LH 20 gebracht und mit Methanol eluiert. Nach einem Vorlauf von 100 ml entnahm man Fraktionen zu 2 ml. Es enthielten: Frakt. 16–19: 14 mg XVIII; Frakt. 22–28: 54 mg XXVII; Frakt. 29–35: 32 mg XXX.

Die analog ausgeführte Disproportionierung von 126 mg (0,1 mMol) XXVII lieferte 15 mg XVIII, 56 mg XXVII und 29 mg XXX.

3. Abspaltung der Schutzgruppen und Charakterisierung der Cystinpeptide. – Alle Insulinfragmente und symmetrischen Cystinpeptide (Formelschemata 2 und 7) wurden durch Abspaltung der Schutzgruppen mit konzentrierter Salzsäure bei 0° gewonnen. Im folgenden wird die Methodik am Beispiel von III illustriert. Bei den übrigen Insulinfragmenten wird nur die Reinigungsoperation beschrieben. Die symmetrischen Cystinpeptide wurden nicht chromatographiert. Sämtliche freien Peptide wurden als farblose, nicht hygroskopische Pulver erhalten. Die analytischen Daten sind in den Tabellen 3 und 4 zusammengefasst.

H-Cys-Asn-OH

3.1. *Acidolyse mit konz. Salzsäure, H-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-OH (III).* 205 mg XXI wurden mit 2 ml eiskalter, konz. Salzsäure übergossen und 5 Min. bei 0° gerührt. Zur Entfernung eines Teils des gelösten Chlorwasserstoffs evakuierte man bei 0° während 5 Min. auf 0,01 Torr, verdünnte dann mit 25 ml *t*-Butanol und lyophilisierte¹²⁾. Das als weisses Pulver erhaltene Dihydrochlorid wurde in 0,5N Essigsäure gelöst über eine Säule (1,3×7 cm) *Merck*-Ionenaustauscher Nr. III (Acetatform) filtriert. Man dampfte das Eluat bei 0,01 Torr und 40° Badtemperatur ein, nahm den Rückstand in Wasser auf und lyophilisierte. Das so erhaltene Rohpeptid wurde in wässriger Lösung an einer Säule (2×100 cm) SEPHADEX G 25 (äquilibriert mit Wasser) unter Elution mit Wasser chromatographiert (Fraktionen zu 6 ml). Die Fraktionen 11–17 enthielten reines III. Sie wurden lyophilisiert und das erhaltene Produkt bis zur Gewichtskonstanz an der Luft stehen gelassen. Es resultierten 114 mg III. Die Verunreinigungen wurden in den Fraktionen 20–23 eluiert.

A^{20–21}-B^{19–21} (I). 300 mg XVII lieferten bei der Acidolyse 151 mg leicht verunreinigtes I. Reinigung an einer Säule (1,2×13 cm) DEAE-SEPHADEX A 25 (äquilibriert mit 0,5-proz. Essigsäure). 40 ml 0,5-proz. Essigsäure eluieren die Verunreinigungen, 55 ml 1,0-proz. Essigsäure 155 mg reines I.

C ₁₇ H ₂₈ N ₆ O ₁₀ S ₂ · H ₂ O	Ber.	C 36,55	H 5,41	N 15,05	S 11,48%
(558,6)	Gef.	„ 36,39	„ 5,50	„ 15,00	„ 11,43%

A^{20–21}-B^{18–21} (II). Die Acidolyse von 300 mg XX lieferten 208 mg rohes II. Chromatographie an einer Säule (1×12 cm) DEAE-SEPHADEX A 25 (äquilibriert mit 0,5-proz. Essigsäure) unter Elution mit 0,5-proz. Essigsäure ergab aus den Fraktionen 18–26 186 mg reines II.

A^{19–21}-B^{19–21} (IV). Bei dem aus 100 mg XXII durch Acidolyse erhaltenen IV (62 mg) erübrigte sich eine chromatographische Reinigung.

A^{16–21}-B^{18–21} (V). 150 mg XXXI lieferte 118 mg rohes V. Chromatographie an einer Säule (1×12 cm) DEAE-SEPHADEX A 25 (äquilibriert mit 0,5-proz. Essigsäure). Mit 25 ml 0,5-proz.

¹²⁾ *Anmerkung bei der Korrektur:* Die hier beschriebene Methode zur Entfernung der Salzsäure ist günstiger als das in [26], S. 2148 beschriebene Vorgehen, wo Eisessig anstelle von *t*-Butanol verwendet wurde. Bei Serin enthaltenden Peptiden kann unter nicht optimal durchgeführten Lyophilisationsbedingungen (zeitweises Auftauen der Mischung) eine geringe Acetylierung der Hydroxylgruppen eintreten.

Tabelle 3. Analytische Daten der synthetischen Insulinfragmente

	Rf(C)-Werte		Elektrophorese		Aminosäure-Analyse ^{a)}							$[\alpha]_D^{20}$	
	pH 1,9	pH 4,0	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr	Cys	Gly	Asp			
I	0,45 (112D)	−6,1	+2,0	Ber.	1				2	1	1	−45°	
	0,12 (101D)			1.	1,10				1,86	1,00 ^B	1,02	($c = 0,48$	
	0,30 (112C)			2.	1,09				1,73	1,00 ^B	1,00	in H ₂ O)	
II	0,10 (101A)	−5,8	+1,3	Ber.	1	1			2	1	1	−62°	
	0,20 (101D)			1.	1,00 ^B	1,08			1,96	1,06	1,03	($c = 0,5$	
	0,62 (112D)			2.	1,00 ^B	0,99			1,81	0,97	0,95	CH ₃ COOH)	
	0,45 (112C)												
III	0,60 (112C)	−5,3	+1,2	Ber.	1	1	1		2	1	1	−68° ^{b)}	
	0,10 (52)			1.	1,00 ^B	1,06	0,98		1,98	1,10	1,06	($c = 0,49$	
	0,37 (101D)			2.	1,00 ^B	1,03	0,96		1,64	0,98	1,02	in 1-proz.	
	0,18 (101A)											CH ₃ COOH)	
IV	0,42 (112C)	−5,3	+1,6	Ber.	1			1	2	1	1	−34°	
	0,15 (101A)			1.	1,02			0,85	2,02	1,00 ^B	0,91	($c = 0,47$	
	0,25 (101D)			2.	1,02			0,86	1,90	1,00 ^B	0,88	in H ₂ O)	
	0,57 (112D)												
V	0,28 (87)	−4,5	+1,2	Ber.	1	2	1	1	2	1	2	−52°	
	0,25 (101A)			1.	0,98	2,16	1,03	0,96	1,94	1,00 ^B	2,06	($c = 0,58$	
	0,18 (52A)			2.	1,00 ^B	2,09	1,03	0,82	1,84	0,97	2,00	in H ₂ O)	
VI	0,50 (101D)	−3,9	+1,7	Ber.	2	2	1	2	1	2	1	−10°	
e)	0,22 (101A)			1.	2,00 ^B	1,98	0,92	1,93	0,77	1,99	0,92	0,99	($c = 0,48$
	0,15 (45)			2.	2,00 ^B	2,00	0,91	1,81	0,68	1,83	0,99	0,97	in H ₂ O)

a) Hydrolyse mit 6N HCl bei 105°. Die Hydrolysezeit betrug bei der ersten Analyse 24 Std., bei der zweiten 72 Std. Die mit ^B versehenen Werte sind die Bezugswerte.

b) *Veber et al.* [5] publizierten $[\alpha]_D^{20} = -8,0^\circ$. Wie uns *R. Hirschmann* brieflich mitteilte, ergaben nachträgliche Bestimmungen einen Wert von $-80^\circ \pm 8^\circ$.

c) Als Hydrochlorid.

Essigsäure wurden die Verunreinigungen eluiert, während anschliessend mit 7 ml 1,0-proz. Essigsäure 95 mg reines V erhalten wurden.

*A*²⁰⁻²¹-*B*¹²⁻²¹ (VI). Aus 195 mg XXXII wurden 165 mg rohes VI in der Hydrochloridform erhalten. Als solches wurde es an einer Säule (1,6 × 80 cm) SEPHADEX G 100 (äquilibriert mit 0,01N HCl) gereinigt. Die Substanz wurde in 0,01N HCl aufgetragen und mit 0,01N HCl eluiert (Fraktionen zu 5 ml). Fraktionen 19–23 lieferten 115 mg reines VI.

H-Cys-Asn-OH

3.2. *Acidolyse mit 90-proz. Trifluoressigsäure, H-Val-Cys-Gly-Glu-OH (II)*. Man versetzte 300 mg XX bei 0° mit 5 ml 90-proz. Trifluoressigsäure. Nach vollständiger Lösung der Substanz (ca. 1 Min.) liess man die Temperatur auf 20° ansteigen. Nach 2½ Std. kühlte man wieder auf 0° und fällte mit 30 ml kaltem Äther aus. Das Trifluoracetat wurde in 0,5N Essigsäure gelöst und durch eine Säule (1 × 7 cm) von *Merck*-Ionenaustauscher Nr. III (Acetatform) filtriert. Das erhaltene Rohprodukt wurde wie oben beschrieben an DEAE-SEPHADEX A 25 chromatographiert und ergab 105 mg reines II.

3.3. *Oxydation der Cystinpeptide mit Perameisensäure*. Lösung von Perameisensäure nach *Hirs* [27]: 0,5 ml 30-proz. Perhydrol und 9,5 ml 99-proz. Ameisensäure 2 Std. bei 25° stehen lassen.

Tabelle 4. Analytische Daten der symmetrischen Cystinpeptide

	Rf(C)-Werte	Elektrophorese		Aminosäure-Analyse ^{a)}						
		pH 1,9	pH 4,0	Leu	Val	Cys	Gly	Glu	Tyr	Asp
XXXIII	0,22 (112C) 0,33 (101D) 0,10 (101D)	-6,6	0			2 2,08				2 2,00 ^B
XXXIV	0,55 (112D) 0,15 (101D) 0,40 (112C)	-5,5	+3,3			2 2,00	2 1,94	2 2,00 ^B		
XXXV	0,10 (52) 0,40 (101D) 0,63 (112C)	-5,1	+2,2		2 1,81	2 1,55	2 1,94	2 2,00 ^B		
XXXVI ^{b)}	0,25 (52) 0,65 (101D) 0,35 (101A)	-4,5	+1,6	2 2,00 ^B	2 1,98	2 2,03	2 2,02	2 2,07		
XXXVII	0,17 (45) 0,40 (101D) 0,60 (112D)	-4,9	0			2 2,14			2 1,93	2 2,00

a) Hydrolyse: 24 Std. bei 105° mit 6N HCl. Die mit ^B versehenen Werte sind Bezugswerte.

b) als Hydrochlorid

1 mg Cystinpeptid wurde mit 0,1 ml der obigen Lösung versetzt. Nach 3 Std. Stehen bei 0° wurde die Lösung bei 40°/0,01 Torr eingedampft und der Rückstand über Kaliumhydroxyd getrocknet. Für die Dünnschichtchromatographie wurde das glasige Produkt in 0,1 ml Wasser gelöst. (Rf-Werte siehe Tabelle 5.)

Tabelle 5. Rf(C)-Werte der Cysteinsäurepeptide

Cysteinsäurepeptid	45	52	Lösungsmittelsystem				
			101A	101D	112A	112C	112D
H-Cys(O ₃ H)-Asn-OH	0,05	0,05	0,15	0,25		0,35	0,45
H-Tyr-Cys(O ₃ H)-Asn-OH				0,58	0,68		
H-Cys(O ₃ H)-Gly-Glu-OH				0,40	0,60	0,55	0,64
H-Val-Cys(O ₃ H)-Gly-Glu-OH				0,50		0,65	0,75
H-Leu-Val-Cys(O ₃ H)-Gly-Glu-OH	0,27	0,37	0,50	0,70			

Den Herren *H. R. Keller & A. Fischer* bin ich für die wertvolle Mitarbeit im Labor zu Dank verpflichtet. Dünnschichtchromatogramme, Elektrophoresen und Aminosäureanalysen wurden in verdankenswerter Weise in unserem Chromatographielabor (Leiter: Herr *E. von Arx*) durch Frau *K. Reist*, Frau *M. Rist* und die Herren *D. Faupel & R. Steiner* ausgeführt. Die Mikroanalysen und optischen Drehungen verdanke ich unseren Speziallaboratorien (Leitung: Dr. *W. Padowetz* und Dr. *H. Huerzeler*).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *E. Schröder & K. Lübke*, «The Peptides», Academic Press, New York 1965.
- [2] *F. Sanger*, Brit. med. Bull. **16**, 183 (1960).
- [3] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Biochim. biophysica Acta **121**, 1 (1966).
- [4] *D. Rudman, L. A. Garcia, A. Del Rio & S. Akgun*, Biochemistry **7**, 1864 (1968).
- [5] *J. Gliemann*, Diabetologia **3**, 382 (1967).

- [6] *D. F. Veber, R. Hirschmann & R. G. Denkewalter*, *J. org. Chemistry* **34**, 753 (1969).
[7] *I. Photaki, I. Phocas, J. Taylor-Papdimitriou & L. Zervas*, in «Peptides 1968, Proc. 9th Europ. Peptide Symposium», S. 201, North-Holland Publ. Co., Amsterdam 1968.
[8] *R. G. Hiskey, R. L. Smith, A. M. Thomas, J. T. Sparrow & W. C. Jones, Jr.*, *op. cit.* [7], S. 209.
[9] *B. Kamber & W. Rittel*, *Helv.* **51**, 2061 (1968).
[10] *L. Zervas, I. Photaki, A. Cosmatos & D. Borovas*, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 4922 (1965).
[11] *B. Kamber & W. Rittel*, *Helv.* **52**, 1074 (1969).
[12] *H. Zahn, W. Danho, H. Klostermeyer, H. G. Gattner & J. Repin*, *Z. Naturforsch.* **24b**, 1127 (1969).
[13] *H. Zahn & E. Th. J. Fölsche*, *Liebigs Ann. Chem.* **716**, 164 (1968).
[14] *W. König & R. Geiger*, *Chem. Ber.* **103**, 788 (1970).
[15] *E. Taschner, A. Chimiak, B. Bator & T. Sokolowska*, *Liebigs Ann. Chem.* **646**, 134 (1961).
[16] *F. Weygand, D. Hoffmann & E. Wünsch*, *Z. Naturforsch.* **21b**, 426 (1966).
[17] *J. Meienhofer*, *Z. Naturforsch.* **19b**, 114 (1964).
[18] *D. Hope, V. V. S. Murti & V. du Vigneaud*, *J. biol. Chemistry* **237**, 1563 (1962).
[19] *I. Photaki*, *J. Amer. chem. Soc.* **88**, 2292 (1966).
[20] *F. Weygand & G. Zumach*, *Z. Naturforsch.* **17b**, 807 (1962).
[21] *J. Honzl & J. Rudinger*, *Coll. czechosl. chem. Commun.* **26**, 2333 (1961).
[22] *B. Riniker, M. Brugger, B. Kamber, P. Sieber & W. Rittel*, *Helv.* **52**, 1058 (1969).
[23] *F. Weygand & W. Steglich*, *Z. Naturforsch.* **14b**, 472 (1959); *D. F. Elliott & D. Morris*, *Chimia* **14**, 373 (1960); *K. Blaha & J. Rudinger*, *Coll. czechosl. chem. Commun.* **30**, 585 (1965).
[24] *L. I. Slobin & F. H. Carpenter*, *Biochemistry* **2**, 22 (1963).
[25] *E. von Arx & R. Neher*, *J. Chromatog.* **12**, 329 (1963).
[26] *P. Sieber, B. Riniker, M. Brugger, B. Kamber & W. Rittel*, *Helv.* **53**, 2135 (1970).
[27] *C. H. W. Hirs*, *J. biol. Chemistry* **219**, 611 (1956).

Giornate Biochimiche Latine International Biochemical Meeting

Santa Margherita Ligure - Italy, May 3–6 1971

The Scientific programme will include a plenary lecture, three symposia and free communications. For information contact the organizing Committee: Istituto di Chimica Biologica, Università degli Studi, V. le Benedetto XV. 1 – 16132 Genova, Italy.

International Meeting on Boron Compounds

Castle Liblice near Prague, Czechoslovakia June 21–25, 1971

Topics: Boron hydrides, Organoboron Compounds, Carboranes, Metallo Boron Compounds, Theory, Syntheses, Properties and Applications.

Short communications: The abstracts (100–150 words) should be submitted not later than February 15, 1971.

For information, final registration form and visa application form, write to the: Imeboron Symposium Secretariat, Institute of Inorganic Syntheses, Czechoslovak Academy of Sciences, Řež near Prague, Czechoslovakia.