

- [22] *M. J. S. Dewar* in *P. de Mayo*: «Molecular Rearrangements», Interscience Publishers, New York 1963, Vol. I, p. 303; *B. Robinson*, Chem. Reviews 63, 373 (1963); 69, 227 (1969).
- [23] *E. Hecker & M. Hopp*, Liebigs Ann. Chem. 692, 174 (1966).
- [24] *M. Traut & E. Hecker*, Liebigs Ann. Chem. 715, 214 (1968).
- [25] *M. Dvolaitzky & A. Dreiding*, Helv. 48, 1988 (1965).
- [26] *K. Grob*, Helv. 48, 1362 (1965); 51, 718 (1968).
- [27] *Organikum*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1967.
- [28] *R. Huisgen* in *Houben-Weyl*: «Methoden der organischen Chemie», Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1955, Bd. III, Teil 1, S. 98.

96. Synthese eines neuen Derivats der Insulinsequenz B1-8 mit verbesserter Löslichkeit¹⁾

von **H. R. Bosshard**²⁾

Biochemisches Institut der Universität Zürich und Institut für Molekularbiologie und Biophysik der Eidg. Techn. Hochschule Zürich

(26. II. 71)

Summary. The synthesis of the protected octapeptide N-*t*-butoxycarbonyl-phenylalanyl-valyl-asparaginyll-glutaminyll-N^{im}-tritylhistidyl-leucyl-S-benzhydrylcysteinyl-glycine-hydrazide³⁾, corresponding to the amino-terminal sequence of the insulin B-chain, is described. Up to the protected octapeptide all intermediates have greatly improved solubility properties in neutral organic solvents in comparison with other synthetic derivatives of the same sequence.

Bei den ersten Synthesen der Insulin B-Kette führte die extreme Schwerlöslichkeit der grösseren Fragmente, insbesondere des aminoterminalen Octapeptids zu schwierigen synthetischen Problemen (siehe dazu [1]). Zahn und Mitarbeiter versuchten, die Löslichkeit der Fragmente in neutralen, organischen Lösungsmitteln durch Blockierung möglichst vieler funktioneller Gruppen mit hydrophoben Substituenten zu verbessern. Bei Synthesen der Sequenzen B21–30, B14–20, B9–20 und B9–14 wurden die Hydroxyl- und Carboxyl-Funktionen mit dem *t*-Butylrest veräthert bzw. verestert, wobei man zu bedeutend besser löslichen und somit auch leichter zu reinigenden Fragmenten gelangte [2]. Histidin und Cystein wurden meistens als N^{im}- und S-benzylierte Derivate eingesetzt [1]. Eine Octapeptidsäure B1–8 mit ungeschütztem Histidin eignete sich schlechter für die Fragmentkondensation mit der Aminkomponente B9–30 [3]. Mehrere Neusynthesen im aminoterminalen Bereich der Kette führten zwar zu kondensationsfähigen, jedoch nicht zu besser löslichen Fragmenten [4] [5]. Auch die an Phenylalanin B1 mit dem extrem lipophilen Cholesteryloxycarbonyl-Rest [6] geschützten Peptide waren äusserst schwer löslich [4]. Mit Hilfe von *Debye-Scherrer*-Aufnahmen wurde gezeigt, dass die aminoterminal mit der Benzyloxycarbonyl-, der *t*-Butyloxycarbonyl- oder der Cholesteryloxycarbonyl-Gruppe blockierten Pentapeptid-methylester der Sequenz B1–5 Faltblattstrukturen ausbilden. Die Auto-

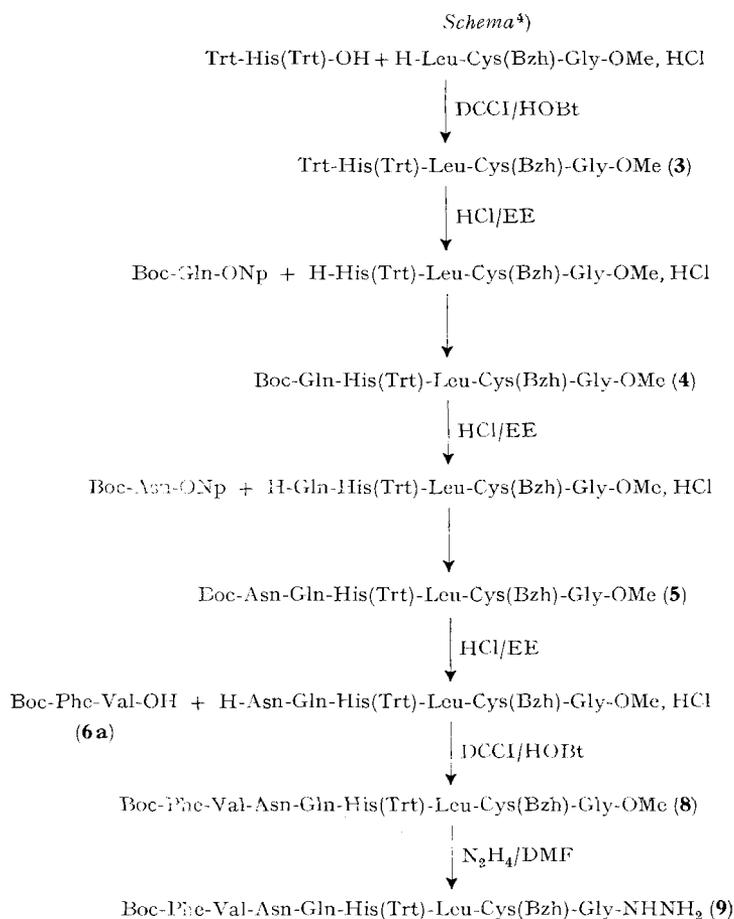
¹⁾ Diese Arbeit wurde vom *Schweizerischen Nationalfond* (Projekte Nr. 3900 und 4883) mitfinanziert.

²⁾ Gegenwärtige Adresse: Department of Biophysics, The *Weizmann* Institute of Science, Rehovot, Israel.

³⁾ Alle Aminosäuren (ausser Glycin) haben L-Konfiguration.

ren sehen in der Bildung zusätzlicher Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Seitenketten der Aminosäuren im Bereich -Asn-Gln-His- eine mögliche Erklärung für die generelle Schwerlöslichkeit der Verbindungen [4].

Im Rahmen einer Neusynthese der Rinderinsulin B-Kette musste das aminoterminaler Octapeptid in einer kondensationsfähigen Form neu aufgebaut werden. Wir vermuteten, dass die Löslichkeit der Peptide im Bereich B1–8 durch Schutz der Imidazolyl- und Sulfhydryl-Seitenketten mit stark hydrophoben, sperrigen Substituenten zu verbessern sei. Tatsächlich gelang es, durch Verwendung der Benzhydryl-Schutzgruppe [7] für Cystein B7 und des Tritylschutzes [8] für Histidin B5 die Löslichkeit der Peptide entscheidend zu verbessern. Ausgehend von Glycin-methylester gelangte man durch stufenweisen Aufbau zum geschützten Hexapeptidderivat B3–8 und über eine Fragmentkondensation mit der Dipeptidsäure B1–2 zum geschützten Octapeptidester B1–8. Der Syntheseweg ist im Schema zusammengefasst.



⁴⁾ Abkürzungen gemäss [9], ferner bedeuten Bzh Benzhydryl, DCCI Dicyclohexyl-carbodiimid, DMF Dimethylformamid, EE Äthylacetat, HOBt 1-Hydroxybenzotriazol.

Die schrittweise Synthese des Tripeptidesters *N-t*-Butoxycarbonyl-leucyl-S-benzhydrylcysteinyl-glycin-methylester (**2**) mit den entsprechenden *t*-Butoxycarbonyl-aminosäure-(*N*-succinimidyl)-estern [10] oder über zwei Dicyclohexyl-carbodiimid-Kupplungen unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazol [11] bot keine besonderen Schwierigkeiten. Die *t*-Butoxycarbonyl-Schutzgruppen wurden mit Chlorwasserstoff in wasserfreiem Äthylacetat entfernt. Der S-Benzhydrylrest widerstand diesen Bedingungen erwartungsgemäss. Der Einbau von Bistritylhistidin [8] mit Hilfe von Dicyclohexyl-carbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol [11] verlief langsam. Nicht umgesetztes Bistritylhistidin liess sich nur durch Chromatographie an Sephadex LH-20 in Methanol vom Tetrapeptidester **3** abtrennen.

Selektive Abspaltung der N^{α} -Tritylgruppe an N^{Im} -tritylierten Histidinpeptiden wurde mehrmals beschrieben [12] [13]. Wider Erwarten konnte aber die N^{α} -Tritylgruppe vom Tetrapeptidester **3** mit 80-proz. wässriger Essigsäure [13] nicht ohne partielle N^{Im} -Detritylierung entfernt werden. Selektiver verlief die Deblockierung mit einem grossen Überschuss an Chlorwasserstoff in Äthylacetat. Das Produkt enthielt etwa 5% bis 10% nicht N^{Im} -trityliertes Histidin. Auch auf den folgenden Synthesestufen bildeten sich bei der Abspaltung der *t*-Butoxycarbonylgruppen mit Chlorwasserstoff in Äthylacetat stets geringe Mengen von N^{Im} -detritylierten und daher *Pauly*-positiven Produkten, die mit den üblichen Reinigungsmethoden nicht vollständig von den Hauptprodukten abgetrennt werden konnten. In der Dünnschichtchromatographie liessen sich die Mengen der langsamer wandernden Nebenprodukte auf Grund ihrer Farbintensität abschätzen.

Infolge der Instabilität der N^{Im} -Tritylgruppe fielen die Elementaranalysen der Peptidester **4**, **5** und **8** unbefriedigend aus. Eine Probe des geschützten Hexapeptidesters **5** wurde deshalb mit Tritylchlorid in Gegenwart von Triäthylamin nachbehandelt [13]. Das erhaltene Produkt war zwar dünnschichtchromatographisch einheitlich und ergab mit diazotierter Sulfanilsäure keine eindeutige Farbreaktion, es enthielt aber gemäss der Elementaranalyse immer noch Spuren von nicht trityliertem Histidin. Weil während der Nachbehandlung mit Tritylchlorid im basischen Reaktionsmilieu mit Racemisierung am α -Kohlenstoffatom des S-benzhydryl-geschützten Cysteinrests zu rechnen war, wurden nur die partiell detritylierten Peptide zu weiteren Syntheseschritten verwendet.

Glutamin B4 und Asparagin B3 wurden sowohl nach der Methode der *p*-Nitrophenylester [14] als auch mit Dicyclohexyl-carbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol [11] eingeführt. Aus Asparagin entsteht bei der Aktivierung mit Dicyclohexyl-carbodiimid üblicherweise β -Cyanalanin [15], das im Dünnschichtchromatogramm auf Grund seiner grünen Anfärbung bei der Entwicklung mit Ninhydrinreagens erkannt wird. Gelegentlich trat in unseren Versuchen auch bei der Aminolyse von N^{α} -*t*-Butoxycarbonyl-asparagin-4-nitrophenylester mit Peptidestern in Dimethylformamid wenig N^{α} -*t*-Butoxycarbonyl- β -cyanalanin als Nebenprodukt auf. Bei einem Kontrollversuch erwies sich, dass N^{α} -*t*-Butoxycarbonyl-asparagin-4-nitrophenylester bei Raumtemperatur in Dimethylformamid in Gegenwart von nur 0,1 Moläquivalent Triäthylamin langsam zum β -Cyanalaninderivat dehydratisiert wird. Im Gegensatz dazu entstand bei der Aktivierung von N^{α} -*t*-Butoxycarbonyl-asparagin mit Dicyclohexyl-carbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol [11] keine Spur des β -Cyanalaninderivates.

Die Fragmentkondensation des aus **5** freigesetzten Hexapeptid-methylesterhydrochlorids mit der Dipeptidsäure **6a** verlief glatt und in befriedigender Ausbeute wiederum nach der Carbodiimid-Methode unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazol [11]. Die Acylkomponente wurde in etwa 1,5-fachem molaren Überschuss über die Aminkomponente eingesetzt. Auf Grund der Untersuchungen von *König & Geiger* [11] darf angenommen werden, dass diese Fragmentkondensation racemisierungsfrei verlief. Es gelang nicht, dieselbe Fragmentkondensation mit dem (5-Chlor-8-chinoly)-ester von N-Benzylloxycarbonyl-phenylalanyl-valin, der durch Acylierung des Valin-(5-chlor-8-chinoly)-esters [16] erhalten worden war, auszuführen. Die Kupplung verlief äusserst langsam, während einer Woche hatte nicht mehr als etwa die Hälfte der Aminkomponente mit dem aktivierten Dipeptidester **7** reagiert.

Der Octapeptidester **8** wurde mit einem grossen Überschuss an Hydrazinhydrat in Dimethylformamid zum Octapeptidhydrazid **9** umgesetzt, das dank seiner guten Löslichkeitseigenschaften zur B-Kettensynthese geeignet sein dürfte.

Herrn Professor *J. Rudinger* und Herrn Professor *R. Schwyzer* danke ich für wertvolle Hinweise und Ratschläge. Herrn Dr. *W. Padowetz* (CIBA-GEIGY AG., Basel) verdanke ich die Elementaranalysen.

Experimenteller Teil

Allgemeines. – Die *Schmelzpunkte* wurden auf einem Apparat nach Dr. *Tottoli* der Firma *Büchi*, Flawil, bestimmt und sind nicht korrigiert. – Die *optischen Drehungen* wurden mit einem Polarimeter der Firma *Franz Schmid und Haensch*, Berlin, gemessen. Die angegebenen Fehler basieren auf einer Ablesegenauigkeit von $\pm 0,02$ Winkelgrad. – Zur *Elementaranalyse* wurden die Substanzen 10 Std. bei Raumtemperatur über Phosphorpentoxid im Vakuum (0,03 Torr und weniger) getrocknet.

Dünnschichtchromatographische Reinheitskontrolle: Alle angegebenen Rf-Werte wurden auf Kieselgel bestimmt (Fertigplatten Kieselgel F254 auf Aluminium- oder Plastik-Folie der Firma *Merck AG.*, Darmstadt). Die Fliessmittel hatten folgende Zusammensetzung (Verhältnisse in Volumenteilen):

I	<i>n</i> -Butanol-Essigsäure-Wasser	30:10:10
II	<i>n</i> -Butanol- <i>n</i> -Heptan-Ameisensäure	30:40:4
III	Chloroform-Methanol-Essigsäure	75:25:5
IV	<i>n</i> -Butanol-Essigsäure-Wasser	100:15:35
V	Aceton-Chloroform	70:30
VI	Aceton-Benzol	50:80
VII	Chloroform-Methanol	10:10

Färbereagenzien: Ninhydrin-Cadmium Reagens [17], *Pauly*-Reagens [18] und *Reindel-Hoppe*-Reagens in der Ausführung nach [19].

«*Übliche Aufarbeitung*» bedeutet: Aufnehmen in Äthylacetat, Waschen bei 0° mit 1 N KHSO₄⁵⁾, Wasser, verdünnter NaHCO₃-Lösung, Wasser und gesättigter Kochsalzlösung, Trocknen über Magnesiumsulfat, Filtrieren und Eindampfen.

1. *N*-*t*-Butoxycarbonyl-*S*-benzhydryl-cysteinyl-glycin-methylester (**1**). – a) Über den *N*-succinimidy-lester: 1,255 g (10 mMol) Glycin-methylester-hydrochlorid in 50 ml Dimethoxyäthan und 1,26 ml (10 mMol) *N*-Äthylmorpholin wurden mit 4,843 g (10 mMol) *N*-*t*-Butoxycarbonyl-*S*-benzhydryl-cystein-(*N*-succinimidyl)-ester [20] versetzt. Das Gemisch wurde 3 Std. bei Raumtemperatur gerührt, abfiltriert, eingedampft und wie üblich aufgearbeitet. Das resultierende Öl wurde zweimal

⁵⁾ Die Methode des Waschens mit KHSO₄-Lösung wurde von Dr. *E. Wünsch* [19a] in die Peptidchemie eingeführt.

aus Äthanol-Wasser kristallisiert: 4,08 g (89%) **1**, Smp. 122–124°, $[\alpha]_D^{24} = -18,9^\circ \pm 1,8^\circ$ ($c = 1$, Äthanol), $R_f = 0,8$ (VI).

$C_{24}H_{30}N_2O_5S$	Ber. C 62,86	H 6,60	N 6,10	S 6,99%
(458,6)	Gef. ,, 62,77	,, 6,88	,, 5,88	,, 6,80%

b) Mit *Dicyclohexyl-carbodiimid*/1-Hydroxybenzotriazol: 3,875 g (10 mMol) *N-t*-Butoxycarbonyl-*S*-benzhydryl-cystein [20], 1,255 g (10 mMol) Glycin-methylester-hydrochlorid, 2,70 g (20 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol⁶⁾ und 1,26 ml (10 mMol) *N*-Äthylmorpholin in 40 ml Dimethoxyäthan wurden bei -20° mit 2,20 g (10,6 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid in 10 ml Dimethoxyäthan versetzt. Man liess 1 bis 2 Std. bei 4° und über Nacht bei Raumtemperatur stehen und arbeitete wie unter a) beschrieben auf: 4,23 g (92%) **1**, Smp. 122–124°, $[\alpha]_D^{24} = -17,7^\circ \pm 1,7^\circ$ ($c = 1$, Äthanol).

2. *N-t*-Butoxycarbonyl-leucyl-*S*-benzhydrylcysteinyl-glycin-methylester (**2**). – a) Über den *N*-succinimidylester: 10,0 g (21,8 mMol) fein verriebener Dipeptidester **1** wurden 15 Min. bei Raumtemperatur und 45 Min. bei 4° in 30 ml 4*N* HCl in trockenem Äthylacetat stehengelassen. Man versetzte mit eiskaltem, trockenem Äther, liess 30 Min. bei 4° stehen, filtrierte, wusch gründlich mit Äther und Diisopropyläther und trocknete das sehr hygroskopische *Dipeptid-hydrochlorid* im Vakuum über Natriumhydroxid: 8,044 g (94%), $R_f = 0,7$ (IV). Zur Kupplung wurden 8,0 g (20,3 mMol) dieses Produkts und 7,0 g (21,2 mMol) *N-t*-Butoxycarbonyl-leucin-(*N*-succinimidyl)-ester [10] in 60 ml Dimethoxyäthan und 2,56 ml (20,3 mMol) *N*-Äthylmorpholin 3 Std. bei 20° gerührt; es wurde abfiltriert, eingedampft und wie üblich aufgearbeitet. Das Produkt wurde zweimal aus Äthanol-Wasser umkristallisiert: 8,60 g (74%) **2**, Smp. 171–173°, $[\alpha]_D^{24} = -19,2^\circ \pm 3,8^\circ$ ($c = 1$, Äthanol), $R_f = 0,7$ (I).

$C_{30}H_{41}N_5O_6S$	Ber. C 63,02	H 7,22	N 7,35	S 5,61%
(571,7)	Gef. ,, 63,30	,, 7,38	,, 7,12	,, 5,41%

b) Mit *Dicyclohexyl-carbodiimid*/1-Hydroxybenzotriazol: 4,0 g (10,15 mMol) des unter a) beschriebenen Dipeptid-hydrochlorids, 2,34 g (10,15 mMol) *N-t*-Butoxycarbonyl-leucin [21] und 2,74 g (20,3 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol in 30 ml Dimethoxyäthan und 1,28 ml (10,15 mMol) *N*-Äthylmorpholin wurden bei -20° mit 2,26 g (11 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt. Man liess 2 Std. bei 4° und über Nacht bei Raumtemperatur stehen und arbeitete wie unter a) beschrieben auf: 4,98 g (87%) **2**, Smp. 170–172°, $[\alpha]_D^{24} = -19,4^\circ \pm 1,2^\circ$ ($c = 1$, Äthanol).

3. N^α, N^{Im} -Bistritylhistidyl-leucyl-*S*-benzhydrylcysteinyl-glycin-methylester (**3**). Die *t*-Butoxycarbonyl-Schutzgruppe wurde vom Tripeptidester **2** wie unter 2a) beschrieben abgespalten, Ausbeute 96%; $R_f = 0,8$ (III), 0,6 (I). 4,254 g (8,15 mMol) des resultierenden Tripeptid-hydrochlorids wurden zusammen mit 5,0 g (7,75 mMol) N^α, N^{Im} -Bistritylhistidin [8], 2,1 g (15,5 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol und 1,03 ml (8,15 mMol) *N*-Äthylmorpholin in 40 ml Methylenchlorid bei -20° mit 1,64 g (8 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid in 10 ml Methylenchlorid vereint. Man rührte das Reaktionsgemisch 2 Std. bei -20° , liess über Nacht bei 4° und noch 2 Tage bei Raumtemperatur stehen, filtrierte und dampfte ein. Der Rückstand wurde wie üblich aufgearbeitet. Das resultierende gelbliche Öl wurde in 100 ml Äthylacetat bei -20° in einem Guss mit 500 ml eiskaltem Hexan versetzt. Nach 1 Std. bei -20° filtrierte man das Produkt ab und fällte ein zweites Mal in der beschriebenen Weise um: 6,75 g (80%) amorpher Tetrapeptidester **3**, Smp. 95–105°; $R_f = 0,9$ (V), 0,7 (I), 0,85 (IV); schwache Verunreinigung mit Bistritylhistidin, $R_f = 0,1$ (V). Zur Analyse wurden 100 mg dieses Produkts an Sephadex LH-20 (Säule 2,5 × 85 cm) mit Methanol chromatographiert. Nach Umfällen aus Äthylacetat-Hexan erhielt man 64 mg eines dünnstschichtchromatographisch einheitlichen, amorphen, nahezu farblosen Pulvers von **3**, Smp. 95–105°, das allen Kristallisationsversuchen widerstand. $[\alpha]_D^{24} = -21,5^\circ \pm 0,7^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

$C_{60}H_{68}N_6O_5S$ (1093,4)	Ber. C 75,79	H 6,26	N 7,66%	Gef. C 75,43	H 6,27	N 7,53%
--------------------------------	--------------	--------	---------	--------------	--------	---------

4. N^α -*t*-Butoxycarbonyl-glutaminyln- N^{Im} -tritylhistidyl-leucyl-*S*-benzhydrylcysteinyl-glycin-methylester (**4**). – a) Abspaltung der N^α -Tritylgruppe aus **3**: 4,0 g (3,65 mMol) Tetrapeptidester **3** wurden in 20 ml 4*N* HCl in trockenem Äthylacetat 15 Min. bei 20° stehengelassen, auf -20° gekühlt und mit 400 ml ebenso kaltem, trockenem Äther versetzt. Nach 1 Std. bei -20° wurde abfiltriert, mit viel eiskaltem Äther gewaschen und im Vakuum über Natriumhydroxid getrocknet. Ausbeute: 2,82 g

⁶⁾ Freundlicher Weise von Herrn Dr. R. Geiger, Farbwerke Hoechst AG., Frankfurt a.M., zur Verfügung gestellt.

(94%) rohes *Tetrapeptidester-hydrochlorid*, Rf = 0,7 (I); *Pauly*-positives Nebenprodukt vom Rf = 0,4 (I) in Mengen von 2 bis 10%.

b) *Kupplung mit dem N α -t-Butoxycarbonyl-glutamin-4-nitrophenylester*: 3,25 g (3,93 mMol) Tetrapeptidester-hydrochlorid und 1,47 g (4 mMol) N α -t-Butoxycarbonyl-glutamin-4-nitrophenylester [22] wurden in 15 ml Dimethylformamid und 1,0 ml (7,94 mMol) N-Äthylmorpholin 3 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Das Lösungsmittel wurde bei 0,1 Torr abgezogen und der Rückstand wie üblich aufgearbeitet. Nach Behandlung mit Aktivkohle und Umfällen aus Äthylacetat-Diisopropyläther verblieben 2,78 g (ca. 65%) **4** als farbloses, amorphes Pulver vom Smp. 145–150° (sintern). Rf = 0,7 (I); weniger als 5% *Pauly*-positives Nebenprodukt vom Rf = 0,4 (I). Die Substanz wurde ohne weitere Reinigung zum Aufbau des Hexapeptidesters **5** verwendet.

c) *Kupplung mit Dicyclohexyl-carbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol*: 1,554 g (1,88 mMol) Tetrapeptidester-hydrochlorid (vgl. 4a)), 0,476 g (1,9 mMol) N α -t-Butoxycarbonyl-glutamin [21] und 0,514 g (3,8 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol wurden in 10 ml Dimethylformamid und 0,48 ml (3,78 mMol) N-Äthylmorpholin bei –10° mit 0,412 g (2,0 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt. Man liess über Nacht bei 4° und 24 Std. bei Raumtemperatur stehen, filtrierte ab, dampfte ein und nahm den öligen Rückstand erneut in 10 ml Äthylacetat auf. Nach 5 Std. bei 4° wurde von wenig Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und wie üblich aufgearbeitet. Das erhaltene Öl wurde mit Äther verrieben und aus Äthylacetat-Diisopropyläther umgefällt. Ausbeute: 1,55 g (etwa 85%) **4**, Smp. 146–150° (sintern), Rf = 0,7 (I); *Pauly*-positive Verunreinigung mit Rf = 0,4 (I). Aminosäureanalyse des Totalhydrolysats (6N HCl, 22 Std., 110°, Cys nicht bestimmt): Glu 1,05, His 1,00, Leu 1,00 (Bezugswert), Gly 1,09.

5. *N α -t-Butoxycarbonyl-asparaginyll-glutaminyll-N^{1m}-tritylhistidyl-leucyl-S-benzhydrilcysteinylglycyl-methylester (5)*. 4,12 g (4,2 mMol) Pentapeptidester **4** wurden in 10 ml ca. 4N HCl in Äthylacetat 30 Min. bei 20° und 60 Min. bei 4° stehengelassen, mit 300 ml trockenem Äther versetzt und erneut 1 Std. bei 4° stehengelassen. Man filtrierte, wusch mit Äther und Diisopropyläther und trocknete im Vakuum über Natriumhydroxid: 3,750 g (90%) *Pentapeptidester-hydrochlorid*, Rf = 0,6 (I), 0,7 (III); schwach *Pauly*-positiver Fleck mit Rf = 0,45 (III).

a) *Kupplung mit N α -t-Butoxycarbonyl-asparagin-4-nitrophenylester*: 3,745 g (3,93 mMol) Pentapeptidester-hydrochlorid und 1,6 g N α -t-Butoxycarbonyl-asparagin-4-nitrophenylester [23] wurden in 10 ml Dimethylformamid und 1,0 ml (7,9 mMol) N-Äthylmorpholin 3 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen und wie unter 4b) beschrieben aufgearbeitet. Nach Umfällen aus Äthylacetat-Diisopropyläther erhielt man 3,3 g (etwa 84%) **5**, fast farbloses, amorphes Pulver vom Smp. 125–135° (sintern), Rf = 0,8 (III), 0,65 (I); *Pauly*-positives Nebenprodukt mit Rf = 0,35 (I) entsprechend etwa 5 bis 10% N^{1m}-detrityliertem Hexapeptidester.

110 mg (0,1 mMol) der rohen Substanz wurden in 1 ml Dimethylformamid bei –20° mit 0,028 ml (0,2 mMol) Triäthylamin und 25 mg (0,1 mMol) aus Benzol frisch umkristallisiertem Triphenylmethylchlorid nachbehandelt. Man liess über Nacht bei 4° stehen, gab wenig zerkleinertes Eis und Wasser zu, zentrifugierte den Niederschlag ab, wusch nochmals mit kaltem Wasser, zentrifugierte und löste das Präzipitat in 0,5 ml Methanol und 0,1 ml Dimethylformamid. Zur Reinigung wurde an Sephadex LH-20 (Säule 2,5 × 85 cm) in Methanol chromatographiert. Nach Umfällen aus Äthylacetat-Äther erhielt man 41 mg eines farblosen, dünnschichtchromatographisch einheitlichen Pulvers (**5**) vom Smp. 132–135°, Rf = 0,7 (III).

C₆₄H₇₆N₁₀O₁₁S (1193,4) Ber. C 64,5 H 6,4 N 11,7% Gef. C 63,7 H 6,4 N 11,8%

Aminosäureanalyse des Totalhydrolysats (6N HCl, 22 Std., 110°, Cys nicht bestimmt): Asp 0,94, Glu 0,99, His 1,07, Leu 1,00 (Bezugswert), Gly 0,94.

b) *Kupplung mit Dicyclohexyl-carbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol*: 231 mg (0,24 mMol) Pentapeptidester-hydrochlorid, 65 mg (0,3 mMol) N α -t-Butoxycarbonyl-asparagin [21] und 81 mg (0,6 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol wurden in 1 ml Dimethylformamid in Gegenwart von 0,063 ml (0,5 mMol) N-Äthylmorpholin bei –20° mit 62 mg (0,3 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid in 0,5 ml Dimethylformamid versetzt. Man rührte 2 Std. bei –20°, liess über Nacht bei 4° und schliesslich noch 4 Std. bei Raumtemperatur stehen, verdünnte mit 100 ml Äthylacetat, liess 4 Std. bei 4° stehen, filtrierte und wusch das Filtrat wie üblich. Der ölige Rückstand wurde zweimal aus Äthylacetat-Diisopropyläther umgefällt: 191 mg (ca. 65%) **5**, schwach gelbliches Pulver, Smp. 121–130° (sintern), Rf = 0,8 (V), 0,65 (III); *Pauly*-positive Verunreinigung mit Rf = 0,35 (III).

6. *Dicyclohexylammoniumsalz von N-t-Butoxycarbonyl-phenylalanyl-valin (6)*. 1,9 g (5,24 mMol) *N-t-Butoxycarbonyl-phenylalanin-(N-succinimidyl)-ester* [10] in 10 ml Tetrahydrofuran wurden zu 0,615 g (5,24 mMol) Valin und 0,88 g (10,5 mMol) Natriumhydrogencarbonat in 10 ml Wasser gegeben. Die anfänglich trübe Reaktionsmischung wurde nach kurzer Zeit klar. Man rührte über Nacht bei 20°. Zur Aufarbeitung wurde das Tetrahydrofuran möglichst vollständig abgezogen, die verbleibende wässrige Lösung bei 0° mit 2N H₂SO₄ auf etwa pH 2 gebracht, mit Äthylacetat extrahiert und der organische Extrakt mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, abfiltriert und eingedampft. Man erhielt ein farbloses Öl, das in 30 ml Diisopropyläther mit 0,875 ml (5,24 mMol) Dicyclohexylamin versetzt wurde. Nach Stehen über Nacht bei 4° wurde das ausgefallene Peptidsalz **6** abfiltriert, mit Hexan gewaschen und einmal aus Aceton-Hexan umkristallisiert. Ausbeute: 2,40 g (84%), Smp. 155–156°; Rf = 0,75 (I), 0,8 (III); $[\alpha]_D^{24} = -6,2^\circ \pm 0,8^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

C₃₁H₅₁N₃O₅ (545,8) Ber. C 68,22 H 9,42 N 7,70% Gef. C 68,17 H 9,49 N 7,45%

7. *N-Benzoyloxycarbonyl-phenylalanyl-valin-(5-chlor-8-chinolyl)-ester (7)*. 3,56 g (15 mMol) *N-Benzoyloxycarbonyl-valin* [24] und 2,97 g (16,5 mMol) 5-Chlor-8-hydroxy-chinolin wurden in 50 ml Äthylacetat bei -10° mit 3,10 g (15 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt und 3 Std. bei 4° und über Nacht bei 20° stehengelassen. Man filtrierte vom Dicyclohexylharnstoff ab und arbeitete wie üblich auf. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äthylacetat-Petroläther erhielt man 2,50 g (44%) gelbliche, filzige Nadeln von *N-Benzoyloxycarbonyl-valin-(5-chlor-8-chinolyl)-ester*, Smp. 98–99° (*Jakubke et al.* gaben für den racemischen Ester einen Smp. von 98–99,5° und eine Ausbeute von 73% an [16]). 1,85 g (4,5 mMol) dieser Substanz wurden in 5 ml 33-proz. HBr in Eisessig während 30 Min. bei Raumtemperatur stehengelassen. Man fällte mit trockenem, eiskaltem Äther, filtrierte, wusch mit Äther und trocknete im Vakuum über Natriumhydroxid. Man erhielt 1,947 g eines *Hydrobromids*, das sofort wie folgt umgesetzt wurde: 1,32 g (4,43 mMol) *N-Benzoyloxycarbonyl-phenylalanin* [25] wurden in 10 ml Tetrahydrofuran und 0,62 ml (4,43 mMol) Triäthylamin bei -20° unter Rühren mit 0,42 ml (4,43 mMol) Chlorameisensäure-äthylester zum gemischten Anhydrid umgesetzt. Man liess 5 Min. bei -20° stehen, gab 1,23 ml (8,86 mMol) Triäthylamin und sofort das oben beschriebene Hydrobromid in 10 ml Tetrahydrofuran-Wasser (1:1) hinzu. Das Reaktionsgemisch wurde je 1 Std. bei -20° und bei Raumtemperatur gerührt, auf ein kleines Volumen eingengt und wie üblich aufgearbeitet. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äthylacetat-Hexan erhielt man 1,485 g (60% bezüglich eingesetztem *N-Benzoyloxycarbonyl-valin-(5-chlor-8-chinolyl)-ester*) Dipeptidester **7** vom Smp. 152–152,5°; Rf = 0,6 (I), 0,8 (VII); $[\alpha]_D^{24} = -39,6^\circ \pm 0,7^\circ$ ($c = 1$, Dimethylformamid).

C₃₁H₃₆ClN₃O₅ Ber. C 66,48 H 5,40 Cl 6,33 N 7,50%
(560,1) Gef. „ 66,60 „ 5,57 „ 6,18 „ 7,54%

8. *N-t-Butoxycarbonyl-phenylalanyl-valyl-asparaginyll-glutaminyll-N¹m-tryptylhistidyl-leucyl-S-benzhydrylcysteinyl-glycin-methylester (8) und -hydrasid (9)*. 418 mg (0,35 mMol) Hexapeptidester **5** wurden in 2 ml 4N HCl in trockenem Äthylacetat 1 Std. bei Raumtemperatur und 1 Std. bei 4° stehengelassen. Man versetzte mit 10 ml Äther, zentrifugierte ab, wusch gründlich mit Äther und trocknete das farblose Produkt über Natriumhydroxid im Vakuum; Rf = 0,4 (III). In einer Tüpfelprobe auf Papier war das Hexapeptid-hydrochlorid schwach *Pauly*-positiv. Zur Kupplung wurde die Substanz zusammen mit 162 mg (1,2 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol, 0,14 ml (1,12 mMol) *N*-Äthylmorpholin und etwa 0,6 mMol *Dipeptidsäure 6a*, die aus 330 mg (0,6 mMol) des Dicyclohexylammoniumsalzes **6** durch Verteilen zwischen Äthylacetat und 0,1N H₂SO₄ freigesetzt worden war, in 2 ml Dimethylformamid bei -20° mit 124 mg (0,6 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid in 0,2 ml vorgekühltem Dimethylformamid vereint. Man liess 5 Std. bei 4° und 24 Std. bei Raumtemperatur stehen, zentrifugierte den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, wusch zweimal mit wenig Dimethylformamid und fällte aus den vereinigten Überständen durch Zufügen von Eis/Wasser ein Ninhydrin-negatives Rohprodukt, das zur Reinigung an Sephadex LH-20 (Säule 2,5 × 100 cm) mit Methanol chromatographiert wurde. Im Eluat erschienen drei Pike mit maximalen Elutionsvolumen bei 145, 215 und 270 ml. Der zweite Pik enthielt gemäss Dünnschichtchromatogramm vorwiegend nicht umgesetzte *Dipeptidsäure 6a*, der dritte Pik 1-Hydroxybenzotriazol. Zwei weitere Pike mit Elutionsvolumen über 300 ml wurden nicht weiter untersucht. Die Fraktionen des ersten Piks wurden eingedampft und der Rückstand mit Wasser verrieben, abfiltriert und im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Man erhielt 355 mg (etwa 70% bezüglich des

eingesetzten, geschützten Hexapeptidesters **5**) Ester **8** als farbloses Pulver vom Smp. 210–215°; Rf = 0,9 (III), in den Systemen (I) und (IV) ausgeprägte «Schweifbildung». Im *Pauly*-Test war die Substanz schwach positiv. Eine Probe des Produkts wurde mit 4N HCl in Äthylacetat-Eisessig (2:1) behandelt. Man erhielt ein *Hydrochlorid*, das im Dünnschichtchromatogramm einheitlich wanderte: Rf = 0,6 (I), 0,55 (IV). Aminosäurenanalyse des Totalhydrolysats (6N HCl, 22 Std., 110°, Cys nicht bestimmt): Phe 1,00, Val 0,92, Asp 0,99, Glu 1,14, Leu 1,00 (Bezugswert), His 1,08, Gly 1,01.

Behandlung des geschützten Octapeptidesters **8** mit konzentrierter Ameisensäure (allgemeine Methode der Abspaltung von *t*-Butoxycarbonylgruppen nach *Halpern et al.* [26]) während 3 Std. bei 20° und Papierelektrophorese der sauren Reaktionslösung ergab eine einheitliche, kathodisch wandernde, Ninhydrin- und *Pauly*-positive Bande (*Whatman* 3M, 30% (*v/v*) wässrige Essigsäure/Methylcellosolve 2:1, 50 V/cm, 4 Std.).

Hydrazinolyse des Octapeptidesters 8: 68 mg (0,047 mMol) Octapeptidester **8** wurden in 1 ml Dimethylformamid und 0,5 ml Hydrazinhydrat 30 Min. bei 20° stehengelassen. Man dampfte bei 0,1 Torr ein, nahm noch dreimal in je 1 ml Dimethylformamid auf und dampfte ein, vertrieb den Rückstand mit Wasser, zentrifugierte ab, wusch zweimal mit Wasser und trocknete im Vakuum über Phosphorpentoxid: 45 mg (66%) *Hydrazid 9*, farbloses Pulver, das sich oberhalb 145° ohne zu schmelzen zersetzte; Rf = 0,65 (I), 0,8 (III). Im Dünnschichtchromatogramm war kein Octapeptid-methylester mehr nachzuweisen unter Bedingungen, die 5% nicht hydrazinolyisiertes Peptid sichtbar gemacht hätten.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *K. Lübke & H. Klostermeyer*, *Advances Enzymol.* **33**, 445 (1970).
- [2] *E. Schnabel*, *Liebigs Ann. Chem.* **696**, 220 (1966); *M. Kinoshita & H. Zahn*, *ibid.* **696**, 226, 234 (1966); *K. B. Mathur, H. Klostermeyer & H. Zahn*, *Z. physiol. Chem.* **346**, 60 (1966).
- [3] *H. Zahn, J. Meienhofer & H. Klostermeyer*, *Z. Naturforsch.* **19b**, 110 (1964); *H. Zahn, J. Meienhofer & E. Schnabel*, *Acta chim. Acad. Sci. hung.* **44**, 109 (1965).
- [4] *E. Schnabel, H. Klostermeyer, J. Dahlmans & H. Zahn*, *Liebigs Ann. Chem.* **707**, 227 (1967).
- [5] *H. Zahn & G. Schmidt*, *Liebigs Ann. Chem.* **731**, 91 (1970).
- [6] *P. Schellenberg*, *Angew. Chem.* **73**, 770 (1961).
- [7] *L. Zervas & I. Photaki*, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 3887 (1962).
- [8] *G. Amiard, R. Heymès & L. Velluz*, *Bull. Soc. chim. France* **1955**, 191.
- [9] *IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature*, *Biochemistry* **5**, 2485 (1966).
- [10] *G. W. Anderson, J. E. Zimmerman & F. M. Callahan*, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 1839 (1964).
- [11] *W. König & R. Geiger*, *Chem. Ber.* **103**, 788 (1970).
- [12] *G. C. Stelatakos, D. M. Theodoropoulos & L. Zervas*, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 2884 (1959); *S. Guttman, R. Boissonnas & J. Pless*, *belg. Pat. Nr. 695259* (1966); *S. Guttman, J. Pless & R. Boissonnas*, in «Peptides», S. 221, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam 1967.
- [13] *CIBA AG, Basel*, *franz. Pat. Nr. 1336686*, *belg. Pat. Nr. 644130* (1964).
- [14] *M. Bodanszky*, *Nature* **175**, 685 (1955).
- [15] *C. Ressler*, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 5956 (1956); *B. Liberek*, *Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. chim.* **10**, 227 (1962).
- [16] *H. D. Jakubke & A. Voigt*, *Chem. Ber.* **99**, 2944 (1966).
- [17] *J. Heilmann, J. Barrolier & E. Watzke*, *Z. physiol. Chem.* **309**, 219 (1957).
- [18] *L. Bailey*, in «Techniques in Protein Chemistry», S. 23, Elsevier, Amsterdam 1967.
- [19] *E. von Arx & R. Neher*, *J. Chromatogr.* **12**, 329 (1963).
- [19a] *R. Spangenberg, P. Thamm & E. Wünsch*, *Z. physiol. Chem.*, im Druck.
- [20] *R. Schwyzer, Aung Tun-Kyi, M. Caviezel & (z.T.) P. Moser*, *Helv.* **53**, 15 (1970).
- [21] *E. Schnabel*, *Liebigs Ann. Chem.* **702**, 188 (1967).
- [22] *H. Zahn, W. Danho & B. Gutte*, *Z. Naturforsch.* **21b**, 763 (1966).
- [23] *E. Schröder & K. Klieger*, *Liebigs Ann. Chem.* **673**, 208 (1964).
- [24] *R. L. M. Synge*, *Biochem. J.* **42**, 99 (1948).
- [25] *W. Grassmann & E. Wünsch*, *Chem. Ber.* **91**, 462 (1958).
- [26] *B. Halpern & D. E. Nitecki*, *Tetrahedron Lett.* **31**, 3031 (1967).