

158. Synthese von Humaninsulin. II. Aufbau des cyclischen Fragments A(1–13)¹⁾²⁾

von Peter Sieber, Bruno Kamber, Karel Eisler, Albert Hartmann, Bernhard Riniker und Werner Rittel

Chemische Forschungslaboratorien der Division Pharma der Ciba-Geigy AG, Basel

(30. III. 76)

Synthesis of human insulin. II. Preparation of the A(1–13) fragment. – Summary.

The present report gives a detailed account of the synthesis of the protected tridecapeptide

A(1–13), Boc–Gly–Ile–Val–Glu(OBu^t)–Gln–Cys–Cys(Acm)–Thr(Bu^t)–Ser(Bu^t)–Ile–Cys–Ser(Bu^t)–Leu–OH (**20**), an essential intermediate in the recently published total synthesis of human insulin [1]. The main feature in the synthesis of **20** was the specific formation of a disulfide bond between A6 and A11 in the presence of an additional cysteine residue (A7). The selective ring closure was accomplished with the segment A(6–13), H–Cys(Trt)–Cys(Acm)–Thr(Bu^t)–Ser(Bu^t)–Ile–Cys(Trt)–Ser(Bu^t)–Leu–OH (**18**), which was obtained by way of conventional synthesis routes. Treatment of **18** with iodine in trifluoroethanol formed the desired disulfide bridge from the two *S*-trityl-cysteine residues without affecting the *S*-acetamidomethyl-protected cysteine A7. A final azide coupling with the *N*-terminal derivative A(1–5) (**3**) provided the tridecapeptide fragment **20** as a crystalline compound.

In einer Kurzmitteilung berichteten wir über eine Synthese von Humaninsulin, in welcher die drei Disulfidbindungen erstmals in gezielter Weise gebildet wurden [1]. Bei diesem fragmentweise durchgeführten Aufbau war die Sequenz A(1–13), in welcher der intrachenare Ring A6–A11 bereits enthalten ist, ein wichtiges Zwischenprodukt. Die Synthese dieses Aufbaufragments (**20**) wird nachfolgend im Detail beschrieben.

Das Derivat **20** stellt ein cyclisches Cystinpeptid dar, welches als Ringglied einen weiteren Cysteinrest enthält. Bei der Synthese solcher Verbindungen besteht das Hauptproblem im selektiven Schutz der drei Thiolgruppen, da die beiden Cysteine A6 und A11 in Gegenwart eines dritten Cysteins (A7) in Cystin übergeführt werden müssen. Ausserdem hat die spezifische Bildung der Disulfidbindung unter Bedingungen zu erfolgen, unter denen die zusätzlich vorhandenen Schutzgruppen stabil sind.

Synthesen von Insulinpeptiden dieses Sequenzbereichs wurden bis heute von Zervas *et al.* [3], Hiskey *et al.* [4] und Wittinghofer [5] ausgeführt, wobei jeweils verschiedene Schutzgruppenkombinationen benützt worden sind.

¹⁾ I., siehe [1].

²⁾ Zur hier verwendeten, abgekürzten Schreibweise für Aminosäuren, Peptide und ihre Derivate vgl. [2]; ferner bedeuten: Bu^t: *t*-Butyläther; Acm–: Acetamidomethyl–; Bpoc–: 2-(*p*-Biphenyl)-isopropoxyloxycarbonyl–; DCCI: Dicyclohexyl-carbodiimid; HOBT: 1-Hydroxybenzotriazol.

In der hier beschriebenen Synthese wurden die Cysteinreste 6 und 11 als *S*-Trityl-[6] und der Cysteinrest 7 als *S*-Acetamidomethyl-Derivat [7] eingesetzt. Aus früheren Untersuchungen war bekannt [8] [9], dass Cysteinreste, geschützt durch eine dieser beiden Schutzgruppen, durch Umsetzung mit Jod direkt zu Cystinresten oxydiert werden können. Dabei lässt sich die oxydative Bildung der Disulfidbindung in Gegenwart von Schutzgruppen des *t*-Butyltyps durchführen.

In Modellversuchen wurde festgestellt, dass das Verhältnis der Geschwindigkeiten der Reaktion von Jod mit *S*-Acm- bzw. *S*-Trt-Gruppen in verschiedenen Lösungsmitteln stark variiert. In Trifluoräthanol war der Unterschied so gross, dass die selektive Bildung von Cystin aus *S*-Trt-Cystein in Gegenwart von *S*-Acm-Cystein möglich wurde. Diese neue Methode zur selektiven Bildung von Disulfidbindungen durch Jodoxydation in fluorierten Alkoholen, über die bereits kurz berichtet wurde³⁾, werden wir demnächst ausführlich beschreiben.

Der Aufbau des Fragments **20** erfolgte nach dem im *Schema* wiedergegebenen Weg; die selektive Jodoxydation wurde dabei auf der Stufe der Sequenz A(6–13) (**18**) durchgeführt.

Sequenz A (1–5), Boc–Gly–Ile–Val–Glu(OBu^t)–Gln–NH–NH₂ (3). Ausgehend von dem von Zahn *et al.* [10] beschriebenen Hydrazid **1** wurde durch eine Azidkupplung mit H–Gln–OMe [11] der Methyl ester **2** erhalten, dessen Hydrazinolyse zu **3** problemlos verlief.

Sequenz A (6–9), Trt–Cys(Trt)–Cys(Acm)–Thr(Bu^t)–Ser(Bu^t)–NH–NH₂ (9). Die Umsetzung von Trt–Cys(Trt)–ONSu mit H–Cys(Acm)–OMe⁴⁾ führte zum kristallinen Dipeptid **4**, welches zur Carboxylkomponente **5** verseift wurde⁵⁾. Aus dem als Öl erhaltenen Dipeptid **6** entstand durch katalytische Hydrierung die Aminokomponente **7**. Die Verknüpfung von **5** und **7** wurde mittels DCCI/HOBt [12] vorgenommen. Sowohl **8** wie das daraus erhaltene Hydrazid **9** waren kristallin.

Sequenz A (10–13), H–Ile–Cys(Trt)–Ser(Bu^t)–Leu–OH (16). Die Hydrogenolyse des als Öl erhaltenen Z–Ser(Bu^t)–Leu–OMe (**10**) lieferte kristallines **11**, dessen Umsetzung mit Trt–Cys(Trt)–ONSu zum amorphen Tripeptid **12** führte. Abspaltung der *N*-Tritylgruppe mit Essigsäure und Kondensation mit Bpoc–Ile–OH (Gemischtes Anhydrid) ergab kristallines Bpoc–Ile–Cys(Trt)–Ser(Bu^t)–Leu–OMe (**14**). **14** wurde zum kristallinen Säurederivat **15** verseift und letzteres durch Abspaltung der Bpoc-Gruppe mit Essigsäure bei 50° in das ebenfalls kristalline innere Salz **16** übergeführt. Da die Synthese von **16** die alkalische Hydrolyse des Methyl esters **14** enthielt, musste mit einer teilweisen Racemisierung des Cysteinrestes gerechnet werden. Die mehrfache Umkristallisation der zwei Folgeprodukte **15** und **16** bewirkte aber keine Änderung ihrer optischen Drehung, so dass es sich um optisch reine Verbindungen handeln dürfte.

Synthese des offenkettigen Octapeptids 18. Kupplung von **16** mit dem aus **9** bereiteten Azid lieferte das Octapeptid **17**, welches durch Abspaltung der *N*-Tritylgruppe mit Essigsäure in das kristalline innere Salz **18** übergeführt wurde.

3) Vorgetragen von A. Hartmann an der Herbstversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft am 3. 10. 1975 in Aarau.

4) Das von uns früher als amorphes Produkt beschriebene HCl·H–Cys(Acm)–OMe [9] wurde in der Zwischenzeit kristallin erhalten (vgl. exper. Teil).

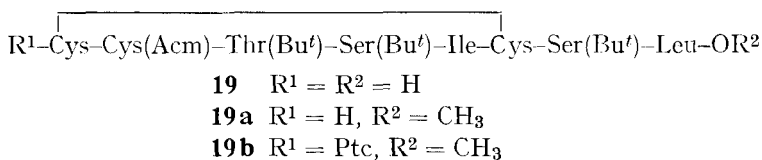
5) **5** war auch direkt aus Trt–Cys(Trt)–ONSu und H–Cys(Acm)–OH zugänglich. Wegen der grösseren Labilität der *N*-Tritylgruppe in **5** erwies sich dessen Reinherstellung jedoch als verlustreich. Auf diesem Weg synthetisiertes **5** führte bei der Kondensation mit **7** ebenfalls zum Tetrapeptid **8**, welches sich mit dem über **4** erhaltenen als identisch erwies. Damit war sichergestellt, dass bei der Verseifung von **4** eventuell gebildete Diastereomere bei den nachfolgenden Reinigungsoperationen entfernt wurden.

Die selektive Bildung des Disulfidrings A6–A11 unter Erhaltung des S-Acm-Cysteinrestes erfolgte mit Jod in stark verdünnter Lösung von **18** in Trifluoräthanol, dem zur besseren Auflösung des Jods Methylenchlorid (ca. 10%) zugesetzt wurde. Das Rohprodukt wurde mittels Gelfiltration an Sephadex-LH20 gereinigt und gab **19** in einer Ausbeute von 63%.

Haupterfordernis jeder Synthese von Insulinpeptiden ist der Nachweis, dass die Disulfidbindungen in der richtigen Weise geknüpft worden sind. Daher wurde dem Strukturbeweis des cyclischen Insulinfragmentes **19** besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

Einen direkten Nachweis dafür, dass der Acm-Rest an Cystein A7 bei der Jod-oxydation nicht angegriffen wurde, lieferte das NMR.-Spektrum von **19**. Wie schon bei der Vorstufe **18** war auch hier das Signal der Methylprotonen dieser Schutzgruppe bei 1,88 ppm deutlich von den übrigen Linien getrennt. Weiterhin belegte das Fehlen von Signalen im Bereich der aromatischen Protonen die Abwesenheit von Tritylgruppen an Cystein A6 und A11.

Weitere Strukturbeweise wurden am Phenylthiocarbamoyl-Derivat **19b** durchgeführt. Der zu dieser Verbindung führende Methylester **19a** wurde auf zwei verschiedenen Wegen erhalten, nämlich durch Aufbau aus den Fragmenten **9** und **14**



(diese Synthese wird hier nicht beschrieben) sowie durch Veresterung von **19** mit Diazomethan. Die Umsetzung von **19a** mit Phenylisothiocyanat führte zum Ptc-Derivat **19b**.

Eine Molekulargewichtsbestimmung von **19b** (vaporometrische Methode [13]) ergab einen Wert von 1280 (ber. 1215), wodurch das Vorliegen einer dimeren oder polymeren Verbindung ausgeschlossen wurde. Wurde **19b** einem Abbau nach *Edman* [14] unterworfen, so konnte nach dem ersten Abbauzyklus erwartungsgemäss kein Phenylthiohydantoin-Derivat einer Aminosäure nachgewiesen werden, da das entstandene Phenylthiohydantoin-Cystin über die (S-S)-Bindung mit dem Rest der Molekel verbunden ist. Nach dem zweiten Zyklus konnte dagegen das Phenylthiohydantoin-Derivat von S-Acm-Cystein nachgewiesen und mit einem authentischen Präparat identifiziert werden.

Die mit der Azidmethode durchgeführte Verknüpfung der Fragmente A(1–5) (**3**) und A(6–13) (**19**) ergab nach Reinigung durch Gegenstromverteilung die geschützte, cyclische Sequenz A(1–13) (**20**) in einer Ausbeute von 40% in reiner Form. Da unter diesen Bedingungen kein Disulfidaustausch auftritt [15], gilt der Strukturbeweis für die Verbindung **19** auch für **20**. **20** wurde aus Äthanol/Wasser kristallisiert. Verbrennungsanalyse und Titrationswerte zeigten, dass die Verbindung im Kristall mit zwei Mol-Äquivalenten Wasser vorliegt.

Das geschützte Insulinfragment **20** erwies sich als leicht löslich in Dimethylformamid und Chloroform/Methanol. Die guten Löslichkeitseigenschaften von **20**

und aller zu dieser Verbindung führenden Zwischenprodukte lassen den eingeschlagenen Syntheseweg im Lichte früherer Erfahrungen [4] [5] als besonders vorteilhaft erscheinen.

Experimenteller Teil

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

Für die Herstellung der eingesetzten und hier nicht näher beschriebenen Aminosäurederivate, siehe [16].

«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.-% 10proz. Pd/C 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.

Chromatographische Reinheitskontrollen: Alle angegebenen Rf-Werte beziehen sich auf Dünnschichtchromatographien auf Kieselgel (Fertigplatten SL 254 der Firma *Antec*, Birsfelden). Folgende Fließmittel wurden verwendet (Volumenanteile): System 52: 1-Butanol/Essigsäure/Wasser 71:7:22; System 3: Essigester/Pyridin/Wasser 13:4:3; System 100: Essigester/Pyridin/Essigsäure/Wasser 62:21:6:11. Die Anfärbung der Platten erfolgte mit *Reindel-Hoppe*-Reagens in der Ausführung nach [17].

1. Sequenz A(1-5). - $\text{HCl} \cdot \text{H-Gln-OMe}$. 17,1 g (58 mmol) Z-Gln-OMe [18] wurden in 300 ml Methanol hydriert, wobei der pH-Wert der Lösung durch kontinuierliches Zutropfen von 1N methanolischer Salzsäure auf 5 gehalten wurde (Glaselektrode, pH-Stat). Kristallisation aus Methanol/Äther ergab 7,1 g (62%) $\text{HCl} \cdot \text{H-Gln-OMe}$ vom Smp. 141-143° ([11]: 141°), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +29^\circ$ ($c = 1,0$, Methanol).

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{HCl}$	Ber. C 36,68	H 6,67	Cl 18,05	N 14,26%
(196,6)	Gef. ,, 36,7	,, 6,8	,, 18,0	,, 14,4 %

Boc-Gly-Ile-Val-Glu(OBu^t)-Gln-OMe (**2**). Zu einer Suspension von 8,80 g (15 mmol) *Boc-Gly-Ile-Val-Glu(OBu^t)-NH-NH₂* (**1**) [10] in 60 ml Dimethylformamid wurden bei -35° 15 ml 3N HCl in Dioxan und 2,24 ml (18,8 mmol) *t*-Butylnitrit gegeben. Nach 15 Min. bei -20° wurden zu der klaren Lösung nacheinander 2,95 g (15 mmol) $\text{HCl} \cdot \text{H-Gln-OMe}$ und 10 ml (90 mmol) *N*-Methylmorpholin hinzugefügt. Die Suspension wurde 1 Std. bei -10° und dann bei 0° gehalten. Nach 5 Std. wurden noch je 10% der eingesetzten Aminokomponente und Base zugegeben. Die gallertige Masse wurde nach weiteren 24 Std. Rühren mit 450 ml Eiswasser versetzt, der Niederschlag abfiltriert, gut gewaschen und getrocknet. Nach mehrfachem Zerreiben mit Methanol/Essigester 1:20 verblieben 8,60 g (80%) eines farblosen Pulvers von Rf 0,70 (System 52), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -13^\circ$ ($c = 1,0$, Dimethylformamid).

$\text{C}_{33}\text{H}_{58}\text{N}_6\text{O}_{11}$	Ber. C 55,54	H 8,18	N 11,76	O 24,62%
(714,9)	Gef. ,, 55,51	,, 8,40	,, 11,70	,, 24,54%

Boc-Gly-Ile-Val-Glu(OBu^t)-Gln-NH-NH₂ (**3**). 13,7 g (19,2 mmol) **2** wurden in einem Gemisch von 180 ml Dimethylformamid und 20 ml Methanol gelöst und unter Rühren mit 20 ml (400 mmol) Hydrazinhydrat versetzt. Nach 24 Std. bei 20° wurde die feste Masse mit 150 ml Methanol verdünnt und nach 2 Std. Rühren im Eisbad filtriert. Das Rohprodukt (13 g) wurde 3mal mit je 70 ml Methanol zerrieben. Ausbeute 12,4 g (91%), Rf = 0,40 (System 52), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -37^\circ$ ($c = 0,5$, Trifluoräthanol).

$\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{N}_8\text{O}_{10}$	Ber. C 53,77	H 8,18	N 15,67	O 22,38%
(714,9)	Gef. ,, 53,70	,, 8,34	,, 15,71	,, 22,27%

2. Sequenz A(6-9). - $HCl \cdot H-Cys(Acm)-OMe$. Die Verbindung wurde nach [9] hergestellt und aus 2-Propanol kristallisiert: Smp. 132-134°, $[\alpha]_D^{20} = -11^\circ$ ($c = 1,3$, Methanol).

$C_7H_{15}ClN_2O_3S$	Ber. C 34,64	H 6,23	Cl 14,61	N 11,54	S 13,21%
(242,7)	Gef. ,, 34,58	,, 6,20	,, 14,55	,, 11,44	,, 13,27%

$Trt-Cys(Trt)-Cys(Acm)-OMe$ (4). Zu 3,91 g (5 mmol) $Trt-Cys(Trt)-ONSu \cdot C_6H_6$ und 1,21 g (5 mmol) $HCl \cdot H-Cys(Acm)-OMe$ in 25 ml Dimethylformamid wurden 0,63 ml (5 mmol) *N*-Äthylmorpholin gegeben. Nach 15 Std. bei 20° wurde die Lösung eingedampft und der Rückstand wie üblich mit Essigester aufgearbeitet. Kristallisation aus Essigester/Äther gab 2,67 g (67%) **4** vom Smp. 194-195°, $[\alpha]_D^{20} = +32^\circ$ ($c = 0,5$, Methanol).

$C_{48}H_{47}N_3O_4S_2$	Ber. C 72,61	H 5,97	N 5,29	S 8,08%
(794,0)	Gef. ,, 72,43	,, 5,98	,, 5,26	,, 7,96%

$Trt-Cys(Trt)-Cys(Acm)-OH$ (5). Zu einer Lösung von 39,7 g (50 mmol) $Trt-Cys(Trt)-Cys(Acm)-OMe$ (4) in 1,15 l Dioxan und 265 ml Wasser wurden 27,5 ml 2*N* NaOH gegeben. Nach 1 Std. bei 20° gab man unter Eiskühlung 14,5 ml 2*N* Salzsäure zu, engte die Lösung auf *ca.* die Hälfte ein und gab nach dem Verdünnen mit 500 ml Essigester und 100 ml Wasser bei 0° weitere 13,0 ml 2*N* HCl zu. Die organische Phase wurde mit wässriger NaCl-Lösung (halbgesättigt) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der resultierende Schaum (Rf = 0,55 (Chloroform/Methanol 7:3)) wurde direkt in der Kondensation mit **7** eingesetzt.

$Z-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OMe$ (6). 40,6 g (0,1 mol) $Z-Thr(Bu^t)-ONSu$ und 17,5 g (0,1 mol) $H-Ser(Bu^t)-OMe$ wurden in 500 ml Essigester gelöst und die Lösung nach 15 Std. bei 20° wie üblich aufgearbeitet. **6** (45 g) fiel als leicht gelbliches, dünnflüssiges Öl an: Rf = 0,55 (Essigester).

$H-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OMe$ (7). 38,9 g (83,5 mmol) **6** wurden in 625 ml Methanol wie üblich hydriert. **7** fiel als gelbliches Öl an: Ausbeute 26,35 g, Rf = 0,45 (Chloroform/Methanol 9:1).

$Trt-Cys(Trt)-Cys(Acm)-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OMe$ (8). Zu einer Lösung von 75,5 g (97 mmol) $Trt-Cys(Trt)-Cys(Acm)-OH$ (5), 32,3 g (97 mmol) $H-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OMe$ (7) und 16,3 g (106,7 mmol) *HOBt* in 680 ml Dimethylformamid wurden unter Eiskühlung 22,0 g (106,7 mmol) *DCCI* gegeben. Nach 15 Std. bei 4° wurde abfiltriert, die Lösung auf *ca.* $\frac{1}{3}$ eingengt und in 2 l Eiswasser gegossen. Der hierbei entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und wie üblich mit Essigester aufgearbeitet. Das Produkt wurde 4mal aus Acetonitril umkristallisiert, wobei schon nach der zweiten Kristallisation konstanter optischer Drehwert und Schmelzpunkt erreicht wurden. Ausbeute 44,0 g (41,5%), Smp. 128-130°, $[\alpha]_D^{20} = +70$ ($c = 1,1$, Chloroform),

$C_{69}H_{75}N_5O_8S_2$	Ber. C 69,14	H 6,91	N 6,40	S 5,86%
(1094,45)	Gef. ,, 69,02	,, 6,77	,, 6,31	,, 5,80%

$Trt-Cys(Trt)-Cys(Acm)-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-NH-NH_2$ (9). Unter leichtem Erwärmen wurden 30,4 g (27,8 mmol) **8** in 30 ml Dimethylformamid und 84 ml Methanol gelöst. Bei 0° wurden 13,5 ml (278 mmol) Hydrazinhydrat zugetropft. Nach 8 Std. bei 20° goss man die Lösung in 600 ml Eiswasser und filtrierte ab. Der Rückstand wurde 3mal aus Acetonitril umkristallisiert. Ausbeute 22,8 g (75%), Smp. 200-203°, $[\alpha]_D^{20} = +68^\circ$ ($c = 1,0$, Chloroform).

$C_{62}H_{75}N_7O_7S_2$	Ber. C 68,04	H 6,91	N 8,96	S 5,86%
(1094,5)	Gef. ,, 67,97	,, 7,11	,, 9,06	,, 6,05%

3. Sequenz A(10-13). - $Z-Ser(Bu^t)-Leu-OMe$ (10). 5,9 g (20 mmol) $Z-Ser(Bu^t)-OH$ wurden in 25 ml Essigester gelöst und bei -15° mit 2,52 ml (20 mmol) *N*-Äthylmorpholin und 2,64 ml (20 mmol) Chlorameisensäure-isobutylester versetzt. Nach 10 Min. bei -10° wurden 4,0 g (22 mmol) $HCl \cdot H-Leu-OMe$ und 2,78 ml (22 mmol) *N*-Äthylmorpholin in 10 ml Essigester zuge-tropft. Nach 1 Std. bei -10° und 15 Std. bei 0° wurde abfiltriert und das Filtrat wie üblich aufgearbeitet. Es resultierte ein zähflüssiges Öl (8,43 g) vom Rf 0,65 (Essigester).

$HCl \cdot H-Ser(Bu^t)-Leu-OMe$ (11). **11** wurde aus 7,05 g (16,7 mmol) $Z-Ser(Bu^t)-Leu-OMe$ (10) in 80 ml 95proz. wässrigem Methanol wie $HCl \cdot H-Gln-OMe$ hergestellt (vgl. Kap. 1). Kristallisation aus Toluol/Hexan ergab 4,63 g (85%) **11** vom Smp. 109-110°, $[\alpha]_D^{20} = -25^\circ$ ($c = 1,0$, Methanol).

$C_{14}H_{28}N_2O_4 \cdot HCl$	Ber. C 51,76	H 9,00	N 8,62	Cl 10,91%
(324,8)	Gef. ,, 51,73	,, 9,12	,, 8,47	,, 10,92%

Trt-Cys(Trt)-Ser(Bu^t)-Leu-OMe (12). 11,0 g (14,2 mmol) *Trt-Cys(Trt)-ONSu · C₆H₆*, 4,62 g (14,2 mmol) *HCl · H-Ser(Bu^t)-Leu-OMe (11)* und 1,79 ml (14,2 mmol) *N*-Äthylmorpholin in 42 ml Dimethylformamid wurden 18 Std. bei 20° stehengelassen. Dann wurde auf *ca.* die Hälfte eingengt, in 200 ml Eiswasser gegossen und filtriert. Das Rohprodukt wurde durch Chromatographie an einer Silicagelsäule gereinigt. Essigester/Petroläther 1:1 eluierte 6,95 g (56%) dünn-schichtchromatographisch reines **12** vom Rf 0,45 (Essigester/Hexan 1:1).

H-Cys(Trt)-Ser(Bu^t)-Leu-OMe (13). 33,0 g (37,7 mmol) *Trt-Cys(Trt)-Ser(Bu^t)-Leu-OMe (12)* wurden in 240 ml Eisessig gelöst und tropfenweise mit 60 ml Wasser versetzt. Aus der anfänglich klaren Lösung schied sich innert 1 Std. bei 20° ein dichter Niederschlag aus (Triphenylmethanol). Man filtrierte ab, dampfte ein, nahm den Rückstand in Essigester auf und wusch die Lösung mehrmals mit 1N Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft, wobei **13** als Öl anfiel: Rf = 0,17 (Chloroform).

Bpoc-Ile-Cys(Trt)-Ser(Bu^t)-Leu-OMe (14). 31,0 g (83,6 mmol) *Bpoc-Ile-OH* wurden in 280 ml Dimethylformamid gelöst und bei -15° mit 10,5 ml (83,6 mmol) *N*-Äthylmorpholin und 11,1 ml (83,6 mmol) Chlorameisensäure-isobutylester versetzt. Nach 10 Min. bei -10° wurden 53,0 g (83,6 mmol) *H-Cys(Trt)-Ser(Bu^t)-Leu-OMe (13)* in 500 ml Dimethylformamid zuge-tropft. Nach 1 Std. bei -10° und 15 Std. bei 0° wurde die Lösung eingedampft und der Rückstand mit Essigester wie üblich aufgearbeitet. Kristallisation aus Acetonitril gab 57,5 g (70%) **14**: Smp. 183-184°, $[\alpha]_D^{20} = -12^\circ$ ($c = 1,0$, Chloroform).

C ₅₈ H ₇₂ N ₄ O ₈ S	Ber. C 70,70	H 7,37	N 5,69	S 3,25%
(985,3)	Gef. ,, 70,57	,, 7,45	,, 5,62	,, 3,21%

Bpoc-Ile-Cys(Trt)-Ser(Bu^t)-Leu-OH (15). Zu 9,85 g (10 mmol) **14** in 240 ml Dioxan und 50 ml Wasser wurden unter Eiskühlung 5,5 ml 2N Natronlauge gegeben. Nach 1½ Std. bei 20° gab man bei 0° 3,0 ml 2N Salzsäure zu. Das Gemisch wurde bei 35° am Wasserstrahlvakuum auf *ca.* die Hälfte eingengt, mit 200 ml Essigester und 100 ml Wasser verdünnt und unter Eiskühlung und Rühren mit weiteren 2,5 ml 2N Salzsäure versetzt. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, eingedampft und der Rückstand 3mal aus Essigester/Hexan kristallisiert. Ausbeute 6,32 g (65%), Smp. 143-146°, $[\alpha]_D^{20} = -3^\circ$ ($c = 1,3$, Chloroform).

C ₅₇ H ₇₀ N ₄ O ₈ S	Ber. C 70,49	H 7,26	N 5,77	S 3,30%
(971,3)	Gef. ,, 70,44	,, 7,28	,, 5,72	,, 3,42%

H-Ile-Cys(Trt)-Ser(Bu^t)-Leu-OH (16). Eine Lösung von 2,91 g (3,0 mmol) **15** in 25 ml 80proz. Essigsäure wurde 1 Std. bei 50° gehalten. Nach dem Verdünnen mit 100 ml Eisessig wurde lyophilisiert und der Rückstand 2mal mit je 50 ml Äther zerrieben. Der unlösliche Anteil wurde 3mal aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Ausbeute 1,62 g (70%), Smp. 191-194°, $[\alpha]_D^{20} = -71^\circ$ ($c = 1,0$, Chloroform).

C ₄₁ H ₅₆ N ₄ O ₆ S · 2H ₂ O	Ber. C 64,04	H 7,86	N 7,28	O 16,64	S 4,17%
(769,0)	Gef. ,, 63,98	,, 7,86	,, 7,34	,, 16,58	,, 4,26%

4. Sequenz A(6-13). - *Trt-Cys(Trt)-Cys(Acm)-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Ile-Cys(Trt)-Ser(Bu^t)-Leu-OH (17)*. Zu 1,09 g (1,0 mmol) *Trt-Cys(Trt)-Cys(Acm)-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-NH-NH₂ (9)* in 10 ml Dimethylformamid wurden bei -10° 1,28 ml (3,0 mmol) 2,34N Salzsäure in Essigester und 0,131 ml (1,1 mmol) *t*-Butylnitrit gegeben. Nach 10 Min. wurden unter Rühren bei -10° 770 mg (1,0 mmol) *H-Ile-Cys(Trt)-Ser(Bu^t)-Leu-OH (16)* und 0,57 ml (4,5 mmol) *N*-Äthylmorpholin in 7 ml Dimethylformamid zuge-tropft. Nach 1 Std. bei -10° und 15 Std. bei 0° wurde auf 100 ml Eiswasser gegossen, der Niederschlag abfiltriert und getrocknet. 2mal Um-fällen aus Dimethylformamid gab 1,47 g (82%) dünn-schichtchromatographisch reines **17** vom Rf 0,68 (System 3) bzw. 0,75 (Chloroform/Methanol 7:3).

H-Cys(Trt)-Cys(Acm)-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Ile-Cys(Trt)-Ser(Bu^t)-Leu-OH (18). 27,0 g (15 mmol) **17** wurden in 192 ml Eisessig gelöst und 48 ml Wasser zugegeben. Nach 1 Std. bei 20° engte man auf *ca.* 100 ml ein, gab 150 ml Eisessig zu und lyophilisierte. Der Rückstand wurde zu-nächst 2mal mit je 50 ml Äther/Petroläther 1:1 zerrieben und dann aus Chloroform/Methanol

umkristallisiert. Ausbeute 16,3 g (70%), Smp. 207–210°. – NMR. (DMSO- d_6): u. a. 1,88 ppm (s, CO–CH $_3$).

$C_{84}H_{113}N_9O_{13}S_3$	Ber. C 64,96	H 7,33	N 8,12	S 6,19%
(1553,1)	Gef. „ 64,67	„ 7,46	„ 8,23	„ 6,25%

$H-Cys-Cys(Acm)-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Ile-Cys-Ser(Bu^t)-Leu-OH$ (**19**). Zu einer stark gerührten Mischung von 180 ml Trifluoräthanol und 20,5 ml einer gesättigten Lösung von Jod in Methylenchlorid (0,352N, 3,6 mmol Jod) wurde bei 20° innert 10 Min. eine Lösung von 466 mg (0,3 mmol) **18** in 25 ml Trifluoräthanol getropft. 2 Min. nach der Zugabe goss man das Gemisch in eine eisgekühlte Lösung von 3,2 g Ascorbinsäure und 2,3 g Ammoniumacetat in 90 ml Wasser. Es wurde dann bis zur beginnenden Ausfällung eingeeengt und das noch als Lösung vorliegende Gemisch 2mal mit je 120 ml Chloroform/Methanol 95:5 extrahiert. Die organische Phase wurde 3mal mit je 50 ml Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand (523 mg) wurde in 3 ml Chloroform/Methanol 1:1 gelöst und auf eine in diesem Lösungsmittelgemisch bereitete Säule von Sephadex LH-20 (2 × 100 cm) gegeben. Nach einem Vorlauf von 50 ml wurden Fraktionen zu 2 ml entnommen. Die Fraktionen 35–41 ergaben 43 mg von (wahrscheinlich) polymeren Disulfiden, während die Fraktionen 45–56 202 mg (63%) **19** enthielten: Rf = 0,25 (System 3), 0,32 (System 100), 0,50 (System 52). – NMR. (DMSO- d_6): u. a. 1,88 ppm (s, CO–CH $_3$).

19a. Ausgehend von $Trt-Cys(Trt)-Cys(Acm)-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-NH-NH_2$ (**9**) und $Bpoc-Ile-Cys(Trt)-Ser(Bu^t)-Leu-OMe$ (**14**) wurde in analoger Reaktionsfolge wie bei der oben beschriebenen Synthese von **19** auch der Methyl ester **19a** hergestellt. Veresterung von **19** mit Diazomethan (Versetzen einer methanolischen Lösung von **19** mit einem Überschuss an Diazomethan in Äther und Eindampfen ergab ebenfalls **19a**: Rf = 0,55 (System 3), 0,35 (Chloroform/Methanol 85:15).

19b. 114 mg (0,1 mmol) **19a** wurden in 5 ml Pyridin 1 Std. bei 40° mit 0,12 ml (1 mmol) Phenylisothiocyanat behandelt. Das mit Hexan ausgefällte und gewaschene Produkt wurde aus *t*-Butylalkohol lyophilisiert. Ausbeute 109 mg (90%), Rf = 0,51 (Chloroform/Methanol 9:1). Molekulargewichtsbestimmung (vaporometrisch in Methylenchlorid nach [13]): 1280 (ber. 1215).

Edman-Abbau. **19b** wurde nach der üblichen Methodik [14] einem zweifachen Edman-Abbau unterworfen. Nach dem ersten Zyklus liess sich dünn-schichtchromatografisch kein Phenylthiohydantoin-Derivat einer Aminosäure nachweisen (UV. und *Reindel-Hoppe*-Reagens). Im zweiten Abbauschritt bildete sich das Phenylthiohydantoin-Derivat von *S*-Acetyl-cystein. Herstellung des authentischen Präparates nach [14]. Smp. 149–150°, Rf = 0,32 (Chloroform/2-Propanol/Wasser 70:8:2).

5. Sequenz A(1–13). – $Boc-Gly-Ile-Val-Glu(OBu^t)-Gln-Cys-Cys(Acm)-Thr(Bu^t)-Ser$

$(Bu^t)-Ile-Cys-Ser(Bu^t)-Leu-OH$ (**20**). Zu 3,30 g (4,66 mmol) $Boc-Gly-Ile-Val-Glu(OBu^t)-Gln-NH-NH_2$ (**3**) in 40 ml Dimethylformamid wurden bei –10° 5,59 ml (13,98 mmol) 2,5N Salzsäure in Essigester und 0,70 ml (6,06 mmol) *t*-Butylnitrit gegeben. Nach 15 Min. tropfte man unter Rühren bei –10° eine Lösung von 2,49 g (2,33 mmol) **19** und 2,64 ml (20,97 mmol) *N*-Äthylmorpholin in 12 ml Dimethylformamid zu. Nach 1 Std. bei –10° und 15 Std. bei 0° wurde die Lösung auf ca. 15 ml eingeeengt und dann in 100 ml Äther gegossen. Der abfiltrierte Niederschlag wurde in 10 ml Dimethylformamid aufgenommen und die Lösung in 100 ml Wasser getropft. Das getrocknete Rohprodukt (4,93 g) wurde einer Gegenstromverteilung im System Chloroform/Tetrachlorkohlenstoff/Methanol/Puffer 8:4:10:3 (Puffer: 28,6 ml Essigsäure, 19,3 g Ammoniumacetat, 1 l Wasser) unterworfen. Nach 1300 Verteilungsschritten befand sich das reine **20** in den Röhren 456–486 ($K = ca. 0,58$). Der Inhalt dieser Röhre wurde vereinigt, das Lösungsmittel abgedampft und der Rückstand zur Entfernung des Ammoniumacetats bei 40°/0,01 Torr. getrocknet. Um die letzten Reste dieses Salzes zu entfernen, wurde das Produkt in 3 ml Dimethylformamid aufgenommen, die Lösung unter Eiskühlung in 40 ml 0,05N Salzsäure getropft, der Niederschlag abfiltriert, gründlich mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die Ausbeute an reinem

20 betrug 1,92 g (41%). Das Produkt kristallisierte aus Äthanol/Wasser in feinen Nadeln vom Smp. 211–215° (Zers.): Rf = 0,35 (System 3), 0,70 (System 100).

$C_{78}H_{137}N_{15}O_{23}S_3 \cdot 2H_2O$	Ber. C 52,48	H 7,96	N 11,77	S 5,39%
(1785,3)	Gef. „ 52,55	„ 8,10	„ 11,79	„ 5,45%

Aminosäureverhältnis nach Hydrolyse mit 6N HCl, während 48 Std. bei 110° (in Klammern berechnete Werte): Thr 0,98 (1), Ser 1,65 (2), Glu 2,07 (2), Gly 0,98 (1), Cys 3,11 (3), Val 1,00 (Bezugswert), Ile 1,93 (2), Leu 1,09 (1).

Für wertvolle technische Mitarbeit danken wir Frau *V. von Arx*, Frau *Y. Rudin*, Frau *I. Zimmermann* sowie den Herren *J. R. Frei*, *D. Good*, *H. R. Keller* und *A. Stauffer*.

Die analytischen Arbeiten wurden in verdankenswerter Weise in unserem Chromatographie-Laboratorium (Leiter: Herr *E. von Arx*) durch Frau *H. Deyber*, Frä. *A. Grosshans*, Frau *J. Hohler* sowie die Herren *D. Faupel*, *A. Linder* und *W. Morgenthaler* ausgeführt.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *P. Sieber, B. Kamber, A. Hartmann, A. Jöhl, B. Riniker & W. Rittel*, *Helv.* **57**, 2617 (1974).
- [2] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Recommendations, *J. biol. Chemistry* **247**, 977 (1972).
- [3] *L. Zervas, I. Photaki, A. Cosmatos & D. Borovas*, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 4922 (1965).
- [4] *R. G. Hiskey, L. M. Beacham & V. G. Matl*, *J. org. Chemistry* **37**, 2472 (1972).
- [5] *A. Wittinghofer*, *Liebigs Ann. Chem.* **1974**, 290.
- [6] *L. Velluz, G. Amiard, J. Bartos, B. Goffinet & R. Heymès*, *Bull. Soc. chim. France* **1956**, 1464.
- [7] *D. F. Veber, J. D. Milkowski, S. L. Varga, R. G. Denkwaller & R. Hirschmann*, *J. Amer. chem. Soc.* **94**, 5456 (1972).
- [8] *B. Kamber & W. Rittel*, *Helv.* **51**, 2061 (1968).
- [9] *B. Kamber*, *Helv.* **54**, 927 (1971).
- [10] *H. Zahn, W. Danko & B. Gutte*, *Z. Naturforsch.* **21b**, 763 (1966).
- [11] *N. A. Poddubnaya, G. N. Balandina & O. A. Tambieva*, *J. Gen. Chemistry USSR*, **41**, 428 (1971).
- [12] *W. König & R. Geiger*, *Chem. Ber.* **103**, 788 (1970).
- [13] *D. Wegmann, C. Tomlinson & W. Simon*, «Microchemical Journal Symposium Series», Vol. II, «Microchemical Techniques», Ed. N. D. Cherouis, University Park 1961, New York and London 1962, S. 1069.
- [14] *P. Edman* in «Protein Sequence Determination», Ed. S. B. Needleman, Springer, Berlin 1970, S. 211.
- [15] *B. Kamber*, *Helv.* **56**, 1370 (1973).
- [16] *G. Fletcher & J. H. Jones*, *Int. J. Peptide Protein Res.* **4**, 347 (1972); *idem*, **7**, 91 (1975).
- [17] *E. von Arx & R. Neher*, *J. Chromatog.* **12**, 329 (1963).
- [18] *E. Sontheimer & R. W. Holley*, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 2467 (1954).