

302. Synthese von Humaninsulin. III. Aufbau des geschützten zweikettigen Fragments A(14-21) - B(17-30)¹⁾²⁾

von **Bruno Kamber, Bernhard Riniker, Peter Sieber** und **Werner Rittel**

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

(4. X. 76)

Synthesis of human insulin. III. Preparation of the A(14-21) - B(17-30) fragment. –

Summary. In the recently published total synthesis of human insulin [1], one of the three principal intermediates is the protected fragment in which sequence 14–21 of the A chain is linked to sequence 17–30 of the B chain by the disulfide bridge between A 20 and B 19. The synthesis of this fragment, [Bpoc-Tyr(Bu^t)-Gln-Leu-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-Cys-Asn-OBu^t] [Trt-Leu-Val-Cys-Gly-Glu(OBu^t)-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr(Bu^t)-Thr(Bu^t)-Pro-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-OBu^t], and its characterization are described in detail in the present report.

This open-chain asymmetrical cystine peptide was prepared by elongating the two chains in the already published intermediate A(20–21) – B(17–20), [H-Cys-Asn-OBu^t] [Trt-Leu-Val-Cys-Gly-OH], first with fragment A(14–19), Bpoc-Tyr(Bu^t)-Gln-Leu-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-NH-NH₂ (azide coupling), and secondly with fragment B(21–30), H-Glu(OBu^t)-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr(Bu^t)-Thr(Bu^t)-Pro-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-OBu^t (DCCI/HOBt).

In einer vorläufigen Mitteilung berichteten wir über eine Totalsynthese des Humaninsulins, in welcher die drei Disulfidbindungen in separaten Reaktionsschritten gebildet wurden [1]. Dies erreichte man durch Verknüpfung dreier Fragmente, von denen zwei je eine im Insulin vorliegende Cystingruppierung bereits enthielten. Der letzte Schritt der Synthese bestand (nebst Entfernung der «permanenten» Schutzgruppen) in der Bildung der dritten Disulfidbindung.

Über die Herstellung des Fragments A(1–13) mit dem vorgebildeten Cystinring A6–A11 haben wir kürzlich berichtet [2]. In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir die Synthese des offenkettigen asymmetrischen Cystinpeptidderivates **5** (*Schema 1*), in welchem die Sequenz 14–21 der A-Kette über die interchenare Disulfidbrücke A20–B19 mit der Sequenz 17–30 der B-Kette verknüpft ist.

Im Fragment **5** sind die beiden Amino-Enden mit Bpoc (A 14) und Trt (B 17) geschützt. Wie wir zeigen konnten [4], lässt sich bei dieser Kombination in einer pH-kontrollierten Acidolyse mit HCl in 90proz. Trifluoräthanol selektiv die Tritylgruppe entfernen. Dies ermöglicht es, zuerst die B-Kette mit dem Fragment 1–16 zu

¹⁾ I: s. [1], II: s. [2].

²⁾ Zur hier verwendeten, abgekürzten Schreibweise für Aminosäuren, Peptide und ihre Derivate vgl. [3]; ferner bedeuten: Boc: *t*-Butyloxycarbonyl; OBu^t: *t*-Butylester; Bu^t: *t*-Butyläther; Acn: Acetamidomethyl; Trt: Trityl; Z: Benzyloxycarbonyl; Bpoc: 2-(*p*-Biphenyl)-isopropylloxycarbonyl; OSu: N-Hydroxysuccinimidester; OPcp: Pentachlorphenylester; DCCI: Dicyclohexyl-carbodiimid; HOBt: 1-Hydroxybenzotriazol.

ergänzen. In der folgenden Phase kann, wiederum selektiv gegenüber allen weiteren Schutzgruppen vom *t*-Butyltyp, die Bpoc-Gruppe entfernt und darauf die A-Kette komplettiert werden.

Beim Aufbau von **5** stellte das Cystinpeptidderivat **1** eine Schlüsselverbindung dar. Über die Synthese von **1**, bei der die asymmetrisch substituierte Disulfidgruppierung in einer spezifischen Weise gebildet wurde, berichteten wir früher [5]³⁾. Die als inneres Salz, d.h. mit freier Aminogruppe an Cys^{A20} und freier Carboxylgruppe an Gly^{B20} vorliegende Verbindung **1** ist einer gezielten Verlängerung der beiden Ketten zugänglich: Zunächst durch Verknüpfung mit dem Fragment A(14–19) (**2**) und in einer zweiten Kondensation mit dem Carboxyl-Ende der B-Kette, B(21–30) (**4**).

A(14–19) (**2**) (Schema 2). Ausgehend von H-Tyr(Bu^t)-OMe baute man schrittweise durch Nitrophenylester-Kondensation das Pentapeptid **12** auf, wobei durchgehend Benzyloxycarbonyl als «temporäre» Aminoschutzgruppe verwendet wurde. Die Freisetzung der α -Aminogruppe erfolgte jeweils durch katalytische Hydrogenolyse in neutralem Milieu. **12** und die vollgeschützten Vorstufen **6**, **8** und **10** liessen sich alle kristallisieren.

Um die Cyclisierung zu einem Pyroglutaminylderivat zu verhindern, führte man die Decarbobenzoylierung von **12** in Gegenwart von Salzsäure (kontinuierliche Zugabe mittels pH-Stat) durch. Die Acylierung von **13** mit Bpoc-Tyr(Bu^t)-OPcp lieferte den kristallinen Hexapeptidmethylester **15**, der mit Hydrazinhydrat ins gewünschte Hydrazid **2** übergeführt wurde.

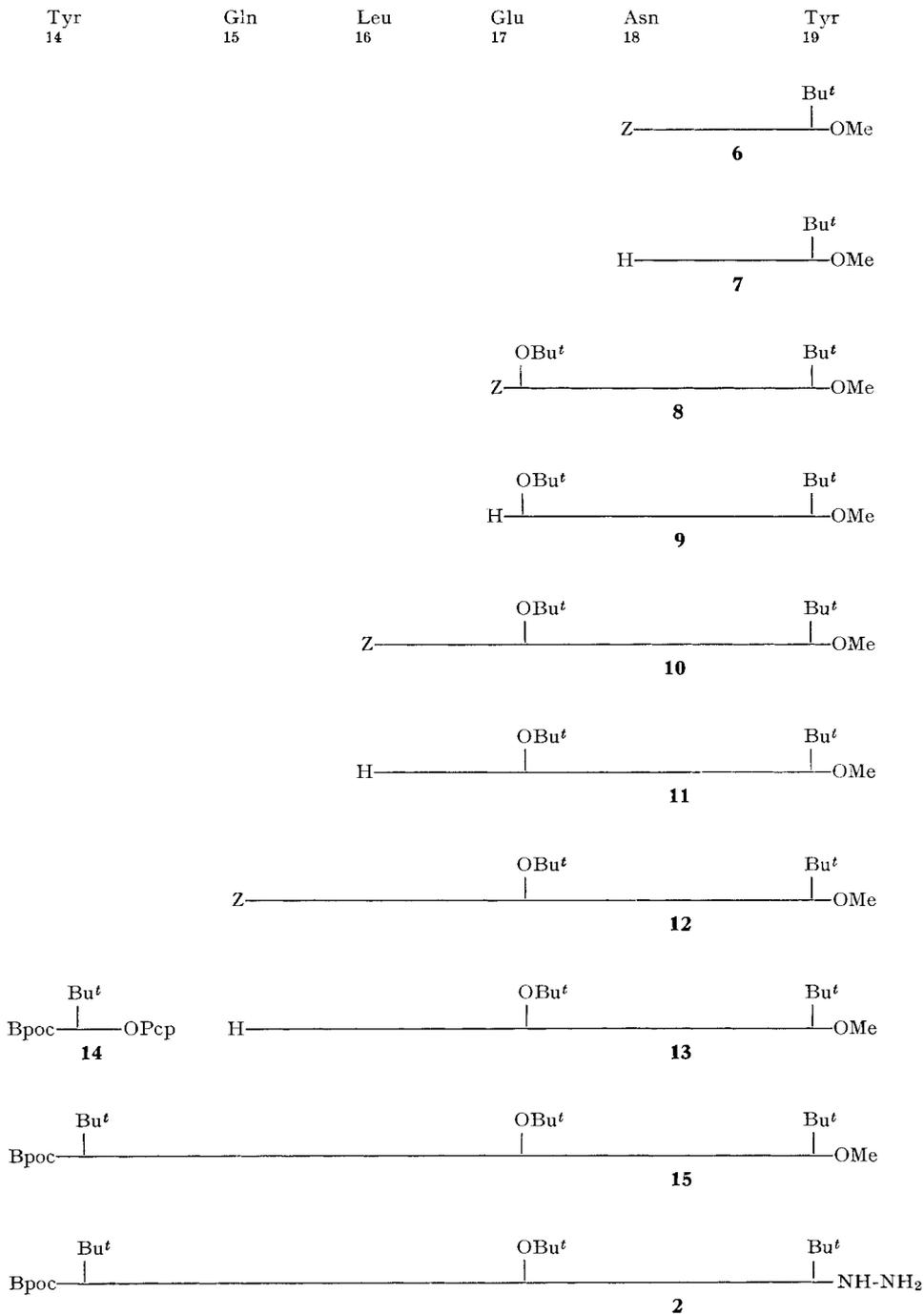
B(21–30) (**4**) (Schema 3). Das Dekapeptid **4** bzw. dessen Vorstufe **32** erhielt man durch Verknüpfung des Tripeptids **31** mit dem Heptapeptid **27**.

Die Vorstufe **26** der Aminokomponente wurde schrittweise aufgebaut. Ausser bei der Herstellung des Dipeptids **16** (Kondensation mit DCCI/HOBt), erfolgten sämtliche Kondensationen durch Einsatz der N-Hydroxysuccinimid-Ester der entsprechenden N-Benzyloxycarbonylamino-säuren. Die α -Aminogruppen setzte man jeweils durch katalytische Hydrogenolyse (neutral) frei. Alle Zwischenprodukte der zu **26** führenden Synthese waren in lipophilen Lösungsmitteln leicht löslich und zeigten nur eine geringe Tendenz zur Kristallisation. In der ganzen Reihe konnten nur die Derivate **18** und **22** in kristalliner Form gewonnen werden. Als bequemste Methode zur Reinigung der amorphen Kondensationsprodukte erwies sich die Chromatographie an Silikagel. Durch Eluierung mit lipophilen Lösungsmitteln (Gemische von Petroläther und Essigester) liessen sich überschüssige Acylkomponente und N-Hydroxysuccinimid schnell und vollständig abtrennen.

Das Hydrierungsprodukt **29** des als Öl angefallenen Z-Arg-Gly-OMe · HCl (**28**) wurde mit Z-Glu(OBu^t)-OH acyliert (DCCI/HOBt). Das ebenfalls nicht kristallisierbare Tripeptid **30** reinigte man durch Chromatographie an Silikagel. Die alkalische Hydrolyse dieses Methylesters führte zu dem als inneres Salz vorliegenden, kristallinen **31**.

³⁾ Die Verbindung **1** ist in der Zwischenzeit in kristalliner Form erhalten worden; vgl. exper. Teil.

Schema 2. Aufbau des geschützten Fragments A(14-19) (2)



Die mittels DCCI und HOBt in Gegenwart eines Äquivalentes HCl durchgeführte Kondensation von **31** und **27** lieferte das Dekapeptid **32**, welches durch Gegenstromverteilung gereinigt wurde. Wegen des im Verteilungssystem verwendeten Ammoniumacetat-Puffers fiel das den Argininrest enthaltende **32** in der Acetatform an. Da Essigsäure (und ein eventuell noch vorhandener Rest von Ammoniumacetat) in der späteren Kondensation zu **5** stören würden, führte man die anschließende Entfernung der Benzyloxycarbonylgruppe in Gegenwart von Salzsäure (pH-Stat) durch. Nach Digerieren mit Wasser fiel **4** als Dihydrochlorid an, in dem keine Essigsäure mehr nachweisbar war.

A(14–21) – B(17–30) (3) (Schema 1). Zur Verlängerung der A-Kette im Fragment **1** verknüpfte man mit **2** mittels einer nach *Honzl & Rudinger* [6] in Dimethylformamid durchgeführten Azidkondensation. Die beiden «temporären» Aminoschutzgruppen Trt und Bpoc erwiesen sich als stabil, sowohl unter den Kondensationsbedingungen als auch bei der Reinigung von **3** durch Umfällen aus Dimethylformamid-Acetonitril.

A(14–21) – B(17–30) (5). Die Fragmente **3** und **4** kondensierte man nach der von *Geiger & König* eingeführten Methode mit DCCI in Gegenwart von HOBt [7]. Das Endprodukt **5** wurde durch Gegenstromverteilung in einem neutralen System gereinigt. Auch hier war keine Abspaltung der Bpoc- oder Tritylgruppe zu beobachten.

Das geschützte Insulinfragment **5** erwies sich als leicht löslich in Dimethylformamid und in Gemischen von Chloroform und Methanol. Auch bei allen zu **5** führenden Zwischenprodukten traten nie Schwierigkeiten infolge zu geringer Löslichkeit auf.

Zur Beurteilung der *Reinheit* von **5** und seiner Vorstufen diente hauptsächlich die Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Fließmitteln. Als zusätzliche Charakterisierung stellte man jeweils auch durch Abspaltung der Schutzgruppen mit Trifluoressigsäure die freien Peptide her. Dabei zeigte sich, dass die Dünnschichtchromatogramme der freien Peptide (auf Celluloseplatten) vielfach aussagekräftiger sind als diejenigen der geschützten Verbindungen.

Die *Disproportionierung* offenkettiger, asymmetrischer Cystinpeptide stellt eine potentielle Gefahr beim Arbeiten mit dieser Verbindungsklasse dar. Zur Kontrolle wurden Proben von **3** und **5** Bedingungen ausgesetzt, unter denen Disproportionierung eintritt. Man erwärmte zum Beispiel Proben während einer Stunde in einer 1proz. methanolischen Diäthylamin-Lösung auf 50° [8]. Nach dieser Behandlung liessen sich im Dünnschichtchromatogramm nebst unverändertem Ausgangsmaterial sowohl bei **3** als auch bei **5** die entsprechenden zwei symmetrischen Cystinpeptidderivate nachweisen. Letztere konnten aber weder in den rohen Kondensationsprodukten von **3** und **5** nachgewiesen werden, noch traten sie während der Reinigungsoperationen auf.

Aufgrund der Aufbauweise dürfte die *optische Reinheit* in **5** gesichert sein, wie auch ein Abbau des Totalhydrolysates mit L-Aminosäureoxydase zeigte. Alle durch das Enzym abbaubare Aminosäuren (Tyr, Leu, Val, Arg, Phe, Lys) wurden bis auf einen Restgehalt von ca. 1% (bei der Totalhydrolyse entstehende D-Enantiomere) oxydiert.

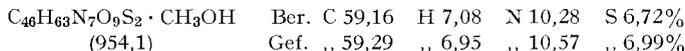
Experimenteller Teil

Allgemeines. Die Smp. sind auf einem Apparat nach Dr. *Tottoli* (Firma *Büchi*, Flawil) bestimmt und unkorrigiert. – Zur Herstellung der nicht näher beschriebenen Aminosäurederivate siehe [9]. – «Übliche Aufarbeitung» bedeutet: Aufnehmen im betreffenden Lösungsmittel, Waschen mit verd. Citronensäure, Wasser, verd. NaHCO₃-Lösung und Wasser, Trocknen über Na-

triumsulfat, Filtrieren und Eindampfen. – Eindampfen bzw. Einengen einer Lösung: Dies erfolgte im Rotationsverdampfer (RV.) bei einer Badtemperatur von 35–40° unter vermindertem Druck (11 bzw. 0,1 Torr bei höher siedenden Lösungsmitteln wie Dimethylformamid und Wasser). – Katalytische Hydrierung zur Entfernung der Benzylloxycarbonylgruppen: Schütteln der im betreffenden Lösungsmittel gelösten Substanz mit 10 bis 20proz. Pd/C in H₂-Atmosphäre (25°, 840 Torr) unter Auffangen des entstehenden CO₂ in einem zweiten, mit KOH gefüllten Hydriergefäß. Nach Beendigung der H₂-Aufnahme Filtrieren und Eindampfen. Katalytische Hydrierung am pH-Stat: Durchführung wie oben, wobei als Lösungsmittel Methanol/Wasser bzw. Trifluoräthanol/Wasser 9:1 verwendet wurde. Durch kontinuierliches Zutropfen von ca. 1N HCl im betreffenden Lösungsmittel mit Hilfe eines pH-States hielt man den pH-Wert des Reaktionsgemisches konstant bei 4,5.

Chromatographische Reinheitskontrollen. Alle Rf.-Werte beziehen sich auf *Dünnschichtchromatographien* auf folgenden Trägermaterialien: S: Kieselgel (Fertigplatten SL 254 der Firma *Antec*, Birsfelden); C: Cellulose (Avicel Fertigplatten der Firma *Schleicher & Schuell*). – Die Lösungsmittelsysteme hatten folgende Zusammensetzung (Volumenteile): System 3: Essigester/Pyridin/Wasser 65:20:15; System 45: 2-Butanol/3proz. wässriger NH₃-Lösung 70:30; System 52A: 1-Butanol/Essigsäure/Wasser 67:10:23; System 100: Essigester/Pyridin/Essigsäure/Wasser 62:21:6:11; System 101: 1-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser 38:24:8:30; System 101A: 1-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser 42:24:4:30; System 111A: 1-Butanol/Pyridin/konz. NH₃-Lösung/Wasser 42:24:4:30; System 111B: 1-Butanol/Pyridin/konz. NH₃-Lösung/Wasser 40:24:6:30; System 112A: 1-Butanol/Pyridin/Ameisensäure/Wasser 42:24:4:20; System 112E: 1-Butanol/Pyridin/Ameisensäure/Wasser 44:24:2:20; System 121: 2-Propanol/konz. NH₃-Lösung/Wasser 7:1:2; System 121A: 2-Propanol/konz. NH₃-Lösung/Wasser 85:5:10; System 155: *n*-Amylalkohol/Pyridin/Wasser/Methyläthylketon/Ameisensäure 40:28:15:11:5. Die Platten wurden mit TDM-Reagens nach [10] angefärbt.

1. Sequenz A(20-21) - B(17-20). – **1** wurde wie in [5] beschrieben hergestellt. Aus Methanol/Diisopropyläther kristallisierte die Substanz mit einem mol Methanol. Smp. 158–162° (Zers.). $[\alpha]_D^{20} = -114^\circ$ ($c = 1,4$, Methanol).

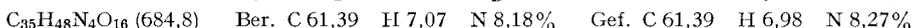


2. Sequenz A(14-19). – *Z-Asn-Tyr(Bu^t)-OMe* (**6**). 50 g (0,2 mol) H-Tyr(Bu^t)-OMe und 77,5 g (0,2 mol) Z-Asn-ONp wurden in 250 ml Dimethylformamid gelöst und 15 Std. bei 20° belassen. Die Lösung wurde eingedampft, der Rückstand in 250 ml Methanol aufgenommen, in 500 ml Äther gegossen und der Niederschlag aus heissem Methanol umkristallisiert. Ausbeute: 76 g (76%). Smp. 167–169°. $[\alpha]_D^{20} = +2^\circ$ ($c = 1,0$, Methanol). (Lit. Smp. 162–163°, $[\alpha]_D^{20} = +3,2^\circ$, $c = 2,5$, Dimethylformamid [11]).



HCl · H-Asn-Tyr(Bu^t)-OMe (**7**). 71,6 g (143,2 mmol) **6** wurden in 500 ml Methanol am pH-Stat hydriert. **7** wurde beim Eindampfen der Lösung als weisser Schaum erhalten. Rf(S) 0,60 (System 121).

Z-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-OMe (**8**). 65,65 g (143,2 mmol) Z-Glu(OBu^t)-ONp und 57,5 g (143,2 mmol) HCl · H-Asn-Tyr(Bu^t)-OMe (**7**) wurden in 700 ml Dimethylformamid aufgenommen, mit 18 ml (143,2 mmol) N-Äthylmorpholin versetzt und 15 Std. bei 20° stehengelassen. Die Lösung wurde eingedampft, der Rückstand in Chloroform aufgenommen und mit 50proz. gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach Eindampfen der organischen Phase wurde der Rückstand aus 2-Propanol umkristallisiert. Ausbeute: 74,5 g (76%). Smp. 192–193°. $[\alpha]_D^{20} = -12^\circ$ ($c = 1,0$, Methanol). (Lit. Smp. 193–195°, $[\alpha]_D^{20} = +0,6^\circ$, $c = 5$, Dimethylformamid [11]).



H-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-OMe (**9**). 13,7 g (20 mmol) **8** wurden in 250 ml Methanol katalytisch hydriert, wobei das Ausgangsprodukt zu Beginn der Hydrierung nicht vollständig gelöst war. Rf(S) 0,25 (Chloroform/Methanol 8:2).

Z-Leu-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-OMe (**10**). Eine Lösung von 33,32 g (86,2 mmol) Z-Leu-ONp und 47,5 g (86,2 mmol) **9** in 200 ml Dimethylformamid wurden nach 15 Std. bei 20° unter Rühren

in 1,5 l eisgekühlten Äther gegossen. Der Niederschlag wurde mit 250 ml Essigester angerührt, abfiltriert und aus 750 ml heissem Acetonitril umkristallisiert. Ausbeute: 59,4 g (86%). Smp. 185–190°. $[\alpha]_D^{20} = -21^\circ$ ($c = 1,3$, Methanol).

$C_{41}H_{59}N_5O_{11}$ (798,0) Ber. C 61,71 H 7,45 N 8,78% Gef. C 61,56 H 7,48 N 8,83%

H-Leu-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-OMe (11). 13,34 g (16,7 mmol) **10** wurden in 500 ml Methanol katalytisch hydriert. Rf(S) 0,55 (Chloroform/Methanol 7:3).

Z-Gln-Leu-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-OMe (12). Eine Lösung von 11,62 g (29 mmol) *Z*-Gln-ONp und 19,34 g (29 mmol) **11** in 250 ml Dimethylformamid wurden nach 15 Std. bei 20° in 1,5 l eisgekühltes Methanol gegossen. Der Niederschlag wurde abgenutscht und aus heissem Methanol (150 ml pro 1 g Substanz) umkristallisiert. Ausbeute: 22,8 g (85%). Smp. 232–234°. $[\alpha]_D^{20} = -13^\circ$ ($c = 1,2$, Dimethylformamid).

$C_{46}H_{67}N_7O_{13}$ (926,1) Ber. C 59,66 H 7,29 N 10,82% Gef. C 59,96 H 7,22 N 10,82%

HCl · H-Gln-Leu-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-OMe (13). 20,14 g (21,7 mmol) **12** wurden in 450 ml 90proz. Trifluoräthanol am pH-Stat katalytisch hydriert. **13** fiel beim Eindampfen der filtrierten Lösung als weisser Schaum an. Rf(S) 0,50 (System 45); 0,45 (System 100).

Bpoc-Tyr(Bu^t)-OPcp (14). 12,7 g (26,9 mmol) *Bpoc*-Tyr(Bu^t)-OH und 8,95 g (33,6 mmol) Pentachlorphenol wurden in 200 ml Essigester gelöst und unter Eiskühlung mit 6,1 g (29,6 mmol) DCCI versetzt. Nach 15 Std. bei 4° wurde die Lösung filtriert und wie üblich aufgearbeitet; das Produkt wurde mit 250 ml Äther und 250 ml Hexan angerührt, abgenutscht und aus Essigester/Petroläther umkristallisiert. Ausbeute: 13,0 g (67%). Smp. 121–123°. $[\alpha]_D^{20} = -31^\circ$ ($c = 1,2$, Chloroform).

$C_{35}H_{32}Cl_5NO_5$ Ber. C 58,07 H 4,46 Cl 24,49 N 1,93%
(723,9) Gef. „ 58,14 „ 4,62 „ 24,54 „ 2,10%

Bpoc-Tyr(Bu^t)-Gln-Leu-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-OMe (15). Zu einer Lösung von 22,3 g (30,8 mmol) *Bpoc*-Tyr(Bu^t)-OPcp (**14**) und 22,6 g (28 mmol) **13** in 460 ml Dimethylformamid gab man 3,53 ml (28 mmol) *N*-Äthylmorpholin. Nach 15 Std. bei 20° wurde auf ca. 100 ml eingengt und mit 750 ml Äther ausgefällt. Dieses Rohprodukt enthielt zu 5–10% das Pyroglutaminylderivat von **13**, Rf(S) 0,80 (System 100). Zu seiner Abtrennung wurde das Material einer Gegenstromverteilung im System Methanol/0,1 M Ammoniumacetat (pH 7,0)/Chloroform/Tetrachlorkohlenstoff 10:3:5:4 über 500 Stufen unterworfen. *K*-Wert von **15**: 0,14. Ausbeute: 24,87 g (71%). Rf(S) 0,65 (System 3); 0,60 (Chloroform/Methanol 8:2); 0,65 (System 45). **15** wurde aus Chloroform/Methanol 1:1 unter grossem Verlust kristallisiert. Smp. 230–231°. $[\alpha]_D^{20} = -15^\circ$ ($c = 1,4$, Methanol).

$C_{67}H_{92}N_8O_{15}$ (1249,5) Ber. C 64,40 H 7,42 N 8,97% Gef. C 64,47 H 7,52 N 9,15%

Bpoc-Tyr(Bu^t)-Gln-Leu-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-NH-NH₂ (2). Zu 20 g (16 mmol) **15** in 180 ml Dimethylformamid gab man unter Eiskühlung 20 ml Hydrazinhydrat. Nach 7 Std. bei 4° goss man die Lösung in 1 l Wasser, nutschte ab und trocknete das Produkt im Exsikkator über Phosphorpentoxid. Zweimaliges Umlösen aus Dimethylformamid/Acetonitril gab 17,85 g (89%) **2**. Rf(S) 0,55 (System 45); 0,60 (System 121 A).

3. Sequenz B(21-30). – *H-Thr(Bu^t)-OBu^t*. *Z*-Thr-OH wurde nach Callahan *et al.* [12] mit Isobutylen umgesetzt. *Z*-Thr(Bu^t)-OBu^t wurde im Gegensatz zu [12] durch Säulenchromatographie an Silikagel (Eluierung mit Essigester/Petroläther 1:2) vom ebenfalls anfallenden *Z*-Thr-OBu^t abgetrennt (Rf(S) 0,60 im System Chloroform/Methanol 9:1). Katalytische Hydrierung in Methanol lieferte *H*-Thr(Bu^t)-OBu^t als Öl. Titration mit 0,1 N Salzsäure ergab einen Gehalt von 92%. Rf(S) 0,40 (Chloroform/Methanol 9:1).

Z-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-OBu^t (16). 137 g (0,36 mol) *Z*-Lys(Boc)-OH und 83,5 g (0,36 mol) *H*-Thr(Bu^t)-OBu^t wurden in 1 l Essigester gelöst und unter Eiskühlung 82,4 g (0,40 mol) DCCI trocken zugegeben. Nach 15 Std. bei 0° wurde die Lösung filtriert und wie üblich aufgearbeitet. Das resultierende Öl wurde in 250 ml Essigester/Petroläther 1:3 aufgenommen und die Lösung auf eine Säule von Silikagel (7 × 40 cm) gegeben. Das gleiche Lösungsmittelgemisch eluierte 166 g (77%) dünn-schichtchromatographisch reines **16** als Öl. Rf(S) 0,55 (Essigester).

H-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-OBu^t (17). 65 g (0,11 mol) **16** wurden in 500 ml Methanol katalytisch hydriert. **17** fiel als weisser Schaum an. Ausbeute: 50 g. Rf(S) 0,45 (Chloroform/Methanol 9:1).

Z-Pro-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-OBu^t (18). 17,32 g (50 mmol) *Z-Pro-OSu* und 22,98 g (50 mmol) **17** wurden in 200 ml Essigester aufgenommen und die Lösung nach 24 Std. bei 20° wie üblich aufgearbeitet. Kristallisation des Rohprodukts aus Äther/Petroäther gab 29,6 g (86%) **18** vom Smp. 107–109°. $[\alpha]_D^{20} = -46^\circ$ ($c = 1,1$, Methanol).

$C_{36}H_{58}N_4O_9$ (690,9) Ber. C 62,58 H 8,46 N 8,11% Gef. C 62,38 H 8,52 N 8,12%

H-Pro-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-OBu^t (19). 13,82 g (20 mmol) **18** wurden in 150 ml Essigester katalytisch hydriert. Rf(S) 0,32 (Chloroform/Methanol 8:2).

Z-Thr(Bu^t)-Pro-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-OBu^t (20). 85,5 g (0,21 mol) *Z-Thr(Bu^t)-OSu* und 111,3 g (0,2 mol) **19** wurden in 300 ml Essigester gelöst, 24 Std. bei 20° stehengelassen, mit 300 ml Essigester verdünnt und wie üblich aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde in 200 ml Essigester auf eine mit diesem Lösungsmittel bereitete Säule von Silikagel (7 × 50 cm) gegeben. Nach einem Vorlauf von 800 ml eluierten 400 ml Essigester 146,2 g (86%) dünn-schichtchromatographisch reines **20** als weissen Schaum. Rf(S) 0,55 (Toluol/Aceton 1:1); 0,40 (Essigester).

H-Thr(Bu^t)-Pro-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-OBu^t (21). 84,81 g (0,1 mol) **20** wurden in 800 ml Essigester katalytisch hydriert. Rf(S) 0,35 (Chloroform/Methanol 9:1).

Z-Tyr(Bu^t)-Thr(Bu^t)-Pro-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-OBu^t (22). Eine Lösung von 4,69 g (10 mmol) *Z-Tyr(Bu^t)-OSu* und 7,14 g (10 mmol) **21** in 100 ml Essigester wurde nach 15 Std. bei 20° wie üblich aufgearbeitet und das erhaltene Produkt aus Äther umkristallisiert. Ausbeute: 8,25 g (77,5%). Smp. 113–116°. $[\alpha]_D^{20} = -15^\circ$ ($c = 1,1$, Chloroform).

$C_{57}H_{90}N_6O_{13}$ (1067,8) Ber. C 64,14 H 8,50 N 7,87% Gef. C 63,87 H 8,49 N 7,75%

H-Tyr(Bu^t)-Thr(Bu^t)-Pro-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-OBu^t (23). 53,39 g (50 mmol) **22** wurden in 500 ml Methanol katalytisch hydriert. Rf(S) 0,50 (Chloroform/Methanol 9:1).

Z-Phe-Tyr(Bu^t)-Thr(Bu^t)-Pro-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-OBu^t (24). 19,0 g (48 mmol) *Z-Phe-OSu* und 41,0 g (44 mmol) **23** wurden in 100 ml Dimethylformamid gelöst, 15 Std. bei 20° stehengelassen, die Lösung weitgehend eingengt, das Produkt durch Zugabe von 500 ml Wasser ausgefällt, in 500 ml Essigester aufgenommen und wie üblich aufgearbeitet. Zur Reinigung wurde es in 150 ml Essigester auf eine in Essigester bereitete Säule von Silikagel (5 × 40 cm) gegeben. Nach einem Vorlauf von 250 ml eluierten 1,5 l Essigester 44,5 g (83%) **24**. Rf(S) 0,25 (Toluol/Aceton 7:3); 0,50 (Chloroform/Methanol 95:5); 0,40 (Essigester).

H-Phe-Tyr(Bu^t)-Thr(Bu^t)-Pro-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-OBu^t (25). 24,3 g (20 mmol) **24** wurden in 200 ml Methanol katalytisch hydriert. Rf(S) 0,50 (Toluol/Aceton 1:1); 0,70 (System 100).

Z-Phe-Phe-Tyr(Bu^t)-Thr(Bu^t)-Pro-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-OBu^t (26). Eine Lösung von 17,4 g (44 mmol) *Z-Phe-OSu* und 43,2 g (40 mmol) **25** in 200 ml Dimethylformamid wurde nach 20 Std. bei 20° auf ca. 100 ml eingengt und dann in 700 ml Wasser gegossen. Der Niederschlag wurde in 400 ml Essigester wie üblich aufgearbeitet. Der resultierende Schaum wurde in 20 ml Essigester auf eine in Essigester/Petroläther 1:1 zubereitete Silikagelsäule (7 × 50 cm) gegeben und mit diesem Lösungsmittelgemisch eluiert. Nach einem Vorlauf von 750 ml wurden mit weiteren 4,5 l 45,2 g (83%) **26** eluiert. Das beim Eindampfen der Lösung als weisser Schaum anfallende Produkt war leicht löslich in Äther und liess sich nicht kristallisieren. Rf(S) 0,3 (Toluol/Aceton 7:3).

H-Phe-Phe-Tyr(Bu^t)-Thr(Bu^t)-Pro-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-OBu^t (27). 13,62 g (10 mmol) **26** wurden in 200 ml Methanol katalytisch hydriert. Rf(S) 0,30 (Chloroform/Methanol 95:5); 0,53 (Toluol/Aceton 1:1).

Freies Peptid: Zur Abspaltung der *t*-Butylschutzgruppen wurden zu 1,0 mg **27** 0,05 ml 95proz. Trifluoressigsäure gegeben. Nach 1 Std. bei 20° wurde mit 1,5 ml Äther ausgefällt, zentrifugiert und der Rückstand über Natriumhydroxid-Pillen getrocknet. Rf(C) 0,65 (System 111 B); 0,50 (System 155); 0,60 (System 101 A).

Z-Arg-Gly-OMe · HCl (28). Zu 308,3 g (1 mol) *Z-Arg-OH* (inneres Salz) und 125,6 g (1 mol) *HCl · H-Gly-OMe* in 1,9 l Dimethylformamid wurden unter Eiskühlung 227 g (1,1 mmol) DCCI gegeben. Nach 2 Std. bei 4° und 20 Std. bei 20° wurde abfiltriert, das Filtrat eingedampft und der Rückstand in 300 ml Wasser gelöst. Diese wässrige Lösung wurde 3mal mit je 200 ml Chloroform extrahiert und dann eingedampft. Das als Öl anfallende Produkt (270 g, 65%) wurde direkt weiter verwendet. Rf(S) 0,35 (System 52 A); 0,20 (System 100).

$2\text{HCl} \cdot \text{H-Arg-Gly-OMe}$ (**29**). 7,95 g (19,13 mmol) **28** wurden in 100 ml Methanol am pH-Stat katalytisch hydriert. **29** fiel als Öl an, welches direkt in der folgenden Kondensation eingesetzt wurde.

$\text{Z-Glu(OBu}^t\text{)-Arg-Gly-OMe} \cdot \text{HCl}$ (**30**). Zu 6,0 g (19 mmol) **29** und 6,36 g (19 mmol) $\text{Z-Glu(OBu}^t\text{)-OH}$ in 100 ml Dimethylformamid wurden unter Eiskühlung 2,39 ml (19 mmol) N-Äthylmorpholin , 2,89 g (19 mmol) HOBt und 4,13 g (20 mmol) DCCI gegeben. Nach 2 Std. bei 4° und 15 Std. bei 20° wurde abgenutscht und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wurde in 50 ml Methanol/Wasser 1:1 aufgenommen und die Lösung in 3 Portionen von je 75 ml Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Das Produkt wurde in Chloroform auf eine in diesem Lösungsmittel zubereitete Silikagelsäule (3 × 30 cm) aufgetragen. Nach einem Vorlauf von 400 ml mit dem Gemisch Chloroform/Methanol 95:5 eluierten 500 ml Chloroform/Methanol 9:1 9,12 g (80%) **30**. Rf(S) 0,30 (System 3). Die Chloridtitration ergab einen Gehalt von 96%.

$\text{Z-Glu(OBu}^t\text{)-Arg-Gly-OH}$ (**31**). 9,12 g (15,17 mmol) **30** wurden in 44 ml Methanol und 27 ml Wasser gelöst. Mit 2N NaOH wurde der pH-Wert der Lösung auf 11,5 gestellt und mittels pH-Stat konstant gehalten. Nach 35 Min. (Verbrauch an Natronlauge: 7,8 ml) wurde durch Zugabe von 1N HCl auf pH 6,7 gestellt. Beim Einengen der Lösung kristallisierte das Produkt aus. Umkristallisation aus heissem Wasser lieferten 6,63 g (79%) **31** vom Smp. 177–185° (Zers.). $[\alpha]_D^{20} = -23^\circ$ ($c = 1,0$, Methanol).

$\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (598,6) Ber. C 52,81 H 7,09 N 14,78% Gef. C 53,0 H 7,0 N 14,8%

Wasserbestimmung nach K. Fischer: 3,1% (Ber. 3,17%).

$\text{Z-Glu(OBu}^t\text{)-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr(Bu}^t\text{)-Thr(Bu}^t\text{)-Pro-Lys(Boc)-Thr(Bu}^t\text{)-OBu}^t$ (**32**). 6,25 g (11 mmol) **31** in 60 ml Dimethylformamid gingen nach Zugabe von 2,75 ml 4N HCl in Essigester klar in Lösung. Dazu wurden 12,28 g (10 mmol) **27** in 45 ml Dimethylformamid gegeben. Die Lösung wurde auf 0° gekühlt und unter Rühren mit 1,68 g (11 mmol) HOBt und 2,47 g (12 mmol) DCCI versetzt. Nach 20 Std. bei 4° wurde das Gemisch auf ca. 30 ml eingengt, filtriert und die Lösung in 300 ml Wasser gegossen. Der Niederschlag wurde in 100 ml 95proz. wässrigem Methanol über eine Säule (3 × 25 cm) $\text{Merck-Ionenaustauscher Nr. II (Acetatform)}$ filtriert. Das Eluat wurde eingedampft und der Rückstand einer Gegenstromverteilung im System Methanol/Puffer/ $\text{CHCl}_3/\text{CCl}_4$ 10:3:5:4 unterworfen (Puffer: 19,3 g Ammoniumacetat, 28,6 ml Essigsäure, mit Wasser auf 2 l aufgefüllt). Nach 1000 Stufen befand sich **32** in den Elementen 195–255 ($r_{\max} = 222$, $K \sim 0,3$). Ausbeute 15,25 g (84%). Rf(S) 0,65 (System 3); 0,70 (System 100).

$2\text{HCl} \cdot \text{H-Glu(OBu}^t\text{)-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr(Bu}^t\text{)-Pro-Lys(Boc)-Thr(Bu}^t\text{)-OBu}^t$ (**4**). 7,5 g **32** wurden in 170 ml 95proz. wässrigem Methanol am pH-Stat katalytisch hydriert. Das erhaltene Produkt, das aus der Verteilung von **32** her noch Essigsäure enthält, wurde in 2 Portionen mit je 20 ml Wasser angerührt, abgenutscht und über NaOH und P_2O_5 getrocknet. Ausbeute: 5,4 g. Gas-chromatographische Essigsäurebestimmung nach [13]: < 0,05%. Gehalt an **4** aufgrund einer Chlorid-Titration mit Silbernitrat: 92%. Rf(S) 0,25 (System 100); 0,20 (System 45). Aminosäure-Analyse (Hydrolyse 24 Std., 110°, 6N HCl) (Ber.-Werte in Klammern): Lys 1,01 (1), Arg 1,06 (1), Thr 1,85 (2), Glu 0,92 (1), Pro 0,96 (1), Gly 1,00 (Bezugswert), Tyr 0,93 (1), Phe 2,11 (2).

Das durch Abspaltung der Schutzgruppen (durchgeführt wie bei **27**) erhaltene freie Peptid zeigte folgende Rf(C)-Werte: 0,40 (System 101 A); 0,45 (System 112 A); 0,50 (System 111 B).

4. Sequenz A(14-21) - B(17-30). – $\text{A(14-21) - B(17-20)}$ (**3**). Zu einer auf –10° gekühlten Lösung von 10,62 g (8,5 mmol) **2** in 80 ml Dimethylformamid wurden 10,0 ml 2,09N HCl in Essigester und 1,18 ml (10,2 mmol) t-Butylnitrit gegeben. Nach 10 Min. wurde mit 8,11 g (8,5 mmol) **1** und 5,50 ml (43,65 mmol) N-Äthylmorpholin in 55 ml Dimethylformamid versetzt. Nach 1 Std. bei –10° und 15 Std. bei 4° wurde die Lösung in 850 ml eisgekühlte 1proz. Essigsäure gegossen, der Niederschlag abgenutscht und über Natriumhydroxid-Pillen und Phosphorpentoxid getrocknet. Das Produkt (Rohausbeute 17,56 g) wurde 3mal aus Dimethylformamid-Acetonitril umgefällt. Ausbeute 11,85 g (66%). Rf(S) 0,50 (System 3), 0,75 (System 100). Freies Peptid (zur Abspaltung der Schutzgruppen vgl. **27**): Rf(C) 0,45 (System 111 A), 0,55 (System 101).

$\text{A(14-21) - B(17-30)}$ (**5**). Zu einer Lösung von 5,84 g (2,73 mmol) **3**, 5,55 g (3 mmol) **4** und 0,387 ml (3 mmol) N-Äthylmorpholin in 55 ml Dimethylformamid wurden 0,625 g (4 mmol)

HOBt und 3,67 g (12 mmol) DCCI gegeben. Nach 2 Std. bei 40° wurde abfiltriert, das Filtrat auf ca. 20 ml eingengt und dann in 200 ml Wasser gegossen. Der abgenutzte und getrocknete Niederschlag wurde durch Gegenstromverteilung im System Methanol/0,1 N Ammoniumacetat (pH 7)/Chloroform/Tetrachlorkohlenstoff 10:3:5:4 gereinigt. Nach 1250 Schritten befand sich 5 in den Röhren 16–40 ($K = ca. 0,023$). Der Inhalt dieser Elemente wurde vereinigt, eingedampft und bei 40°/0,01 Torr getrocknet. Zur Überführung der Acetat- in die Chlorid-Form wurde das Produkt in 100 ml Dimethylformamid gelöst und unter Rühren in 450 ml 3proz. wässrige NaCl-Lösung gegossen. Es wurde abgenutzt, mit Wasser gewaschen und über Natriumhydroxid-Pillen und Phosphorpentoxid bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Gas-chromatographische Essigsäurebestimmung nach [13]: < 0,05%. Ausbeute 8,12 g (78,5%). Rf(S) 0,60 (System 3), 0,70 (System 100).

Freies Peptid (Abspaltung der Schutzgruppen, siehe bei 27): Rf(C) 0,30 (System 155), 0,45 (System 112 E).

Elektrophorese auf Celluloseacetatfolie: pH 1,9 (1,67 M Essigsäure + 0,7 M Ameisensäure), 90 Min., 20 V/cm: Laufstrecke 9 cm kathodisch. pH 8,6 (Veronalpuffer, enthaltend 0,28% EDTA + 25% Harnstoff), 90 Min., 20 V/cm: Laufstrecke 4 cm anodisch.

Chromatographie auf Celluloseacetatfolie nach [14]: (Fließmittel: 0,05 M NH₃, Laufdauer: 3 Std., Anfärben der Folien mit modifiziertem Barton-Reagens nach [14]): Laufstrecke 4,5 cm.

Aminosäureanalyse. Hydrolyse 24 Std., 110°, 6 N HCl. (Ber. Werte in Klammern): Lys 0,95 (1), Arg 0,94 (1), Asp 2,06 (2), Thr 1,95 (2), Glu (3,04 (3), Pro 1,00 (1), Gly 2,00 (Bezugswert), Cys 1,82 (2), Val 0,97 (1), Leu 1,99 (2), Tyr 3,08 (3), Phe 2,08 (2).

Abbau mit L-Aminosäureoxydase: 1 µmol freies Peptid wurde in 1 ml 6 N HCl während 15 Std. bei 105° hydrolysiert und dann über Kaliumhydroxid zur Trockne eingengt. Der Trockenrückstand wurde in 100 µl 0,2 N Trispuffer (pH 7,52) gelöst, mit 2 N LiOH das pH auf ca. 7,5 gestellt und dann das Volumen mit weiterem Trispuffer auf 250 µl ergänzt. Von dieser Stammlösung wurden 50 µl mit 50 µl 2proz. Enzymlösung (rohes Schlangengift der Firma *Nutritional Biochemical Corp.*) und 10 µl Toluol in O₂-Atmosphäre während 24 Std. bei 37° inkubiert. Der Aminosäuregehalt wurde mit demjenigen der Stammlösung verglichen.

Für wertvolle technische Mitarbeit danken wir Frau V. von Arx, Frau I. Zimmermann sowie den Herren H. R. Keller, R. Stoll und R. Eberle.

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

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] P. Sieber, B. Kamber, A. Hartmann, A. Jöhl, B. Riniker & W. Rittel, *Helv.* 57, 2617 (1974).
- [2] P. Sieber, B. Kamber, K. Eisler, A. Hartmann, B. Riniker & W. Rittel, *Helv.* 59, 1489 (1976).
- [3] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Recommendations, *J. biol. Chemistry* 247, 977 (1972).
- [4] B. Riniker, B. Kamber & P. Sieber, *Helv.* 58, 1086 (1975).
- [5] B. Kamber, *Helv.* 56, 1370 (1973).
- [6] J. Honzl & J. Rudinger, *Coll. Czechosl. chem. Commun.* 26, 2333 (1961).
- [7] W. König & R. Geiger, *Chem. Ber.* 103, 788 (1970).
- [8] B. Kamber, *Helv.* 54, 398 (1971).
- [9] G. Fletcher & J. H. Jones, *Int. J. Peptide Protein Res.* 4, 347 (1972); *ibidem* 7, 91 (1975).
- [10] E. von Arx, M. Faupel & M. Brugger, *J. Chromatogr.* 120, 224 (1976).
- [11] H. Zahn, W. Danho, H. Klostermeyer, H. G. Gattner & J. Repin, *Z. Naturforsch.* 24b, 1127 (1969).
- [12] F. M. Callahan, G. W. Anderson, R. Paul & J. E. Zimmermann, *J. Amer. chem. Soc.* 85, 201 (1963).
- [13] B. Riniker, M. Brugger, B. Kamber, P. Sieber & W. Rittel, *Helv.* 52, 1058 (1969).
- [14] E. von Arx & M. Faupel, *J. Chromatogr.* 123, 439 (1976).