

Synthese einer Partialsequenz aus dem aktiven Zentrum der Streptokokken-Proteinase (EC 3.4.22.10), VII

Synthesis of a Fragment of the Active Center of the Streptococcal Proteinase
(EC 3.4.22.10), VII

Andreas Raschig und Friedhelm Schneider

Physiologisch-Chemisches Institut, Universität Marburg

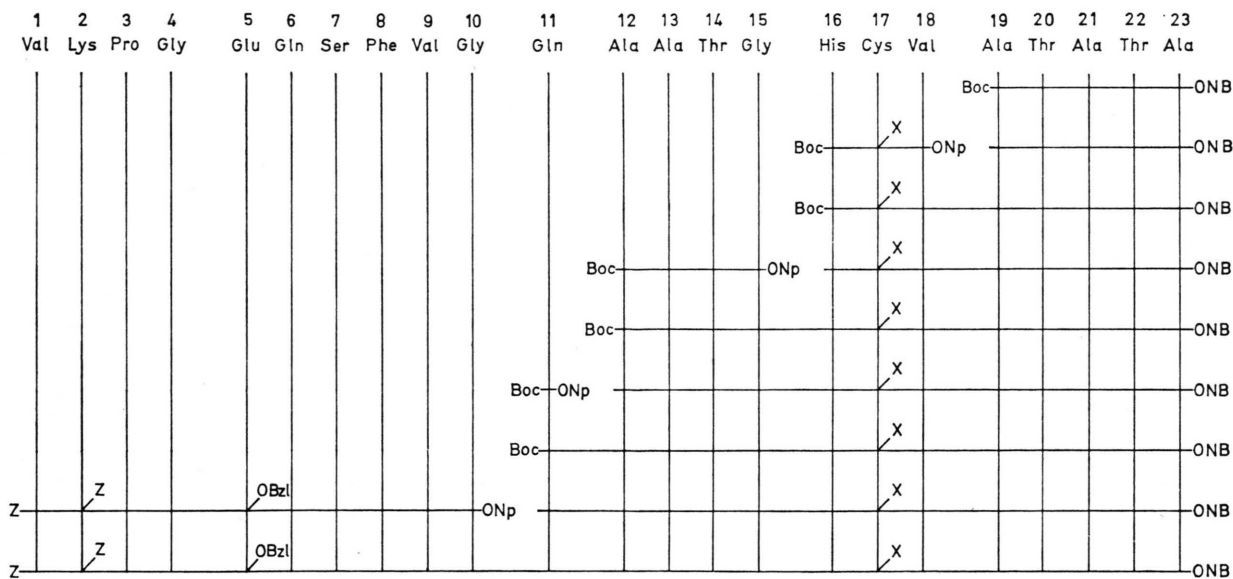
(Z. Naturforsch. 30 c, 745–751 [1975]; eingegangen am 19. August 1975)

Streptococcal Proteinase, Active Center Peptide, Peptide Synthesis

The synthesis of the protected peptides Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-ONp, Boc-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB and Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(X)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB [X = *p*-methoxybenzyl, *tert*-butylmercapto, tetrahydropyranyl-(2)] is described. These peptides are fragments of an active center sequence of the streptococcal proteinase (EC 3.4.22.10) which contains the essential SH group of the enzyme.

Wie in der vorangehenden Mitteilung¹ bereits erwähnt, sind Löslichkeitsschwierigkeiten der Hauptgrund für die bei der Synthese einer Partialsequenz aus dem aktiven Zentrum der Streptokokken Proteinase aufgetretenen Probleme. Diese Probleme konnten durch Änderung der Strategie der Gesamtsynthese weitgehend überwunden werden². Wir be-

richten nachstehend über die Synthese der Fragmente Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-ONp, Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB und Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(X)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB, wobei X = *p*-Methoxybenzyl, *tert*-Butylmercapto oder Tetrahydropyranyl-(2) bedeutet. Diese Fragmente ermöglichen den Aufbau eines geschützten Tricosapeptids², einer



Syntheschema 1.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Fr. Schneider, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, D-3550 Marburg, Lahnberge.

Abkürzungen: Boc, *tert*-Butyloxycarbonyl; DCCI, Dicyclohexylcarbodiimid; DCH, Dicyclohexylharnstoff; DC, Dünnschichtchromatogramm; DMF, Dimethylformamid; HBT, 1-Hydroxybenzotriazol; HMPT, Hexamethylphos-

phorsäuretriimid; MBzl, *p*-Methoxybenzyl; NMM, N-Methylmorpholin; ONB, *p*-Nitrobenzylester; ONp, *p*-Nitrophenylester; OSu, N-Hydroxysuccinimidester; S-t-Bu, *tert*-Butylmercapto; TFA, Trifluoressigsäure; Thp, Tetrahydropyranyl-(2); THF, Tetrahydrofuran; TAA, Triäthylamin; Zers., Zersetzung.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

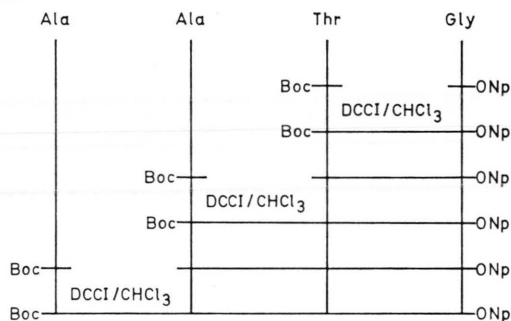
This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Vorstufe der aus 27 Aminosäuren³ bestehenden Gesamtsequenz. Der Syntheseplan für das Tricosapeptid ist aus Schema I ersichtlich. Das in der vorliegenden Mitteilung beschriebene Dodecapeptid umfaßt die Sequenz 12 – 23. Die Synthese der Gesamtsequenz 1 – 23 ist Gegenstand der nächsten Arbeit.

Synthese des Fragments Ala-Ala-Thr-Gly

Das Syntheschema I zeigt, daß beim Aufbau dieses geschützten und aktivierten Tetrapeptids mit Glycin-*p*-Nitrophenylester gestartet wurde. Alle weiteren Kupplungsschritte verliefen in Chloroform mit DCCI ohne Schwierigkeiten. Der Vorteil der Verwendung des *p*-Nitrophenylesters als Carboxylschutz und -Aktivierung wird bei einem Vergleich mit einer Synthese über den Glycin-*p*-nitrobenzylester⁴ deutlich: der aktivierte Peptidester wird nach Schema 2 in einer Ausbeute von 28% erhalten gegenüber 13% bei Start mit dem *p*-Nitrobenzylester zum Aufbau des Peptidesters, hydrogenolytischer Esterspaltung und anschließender Synthese des *p*-Nitrophenylesters. Der Drehwert des Endproduktes stimmt für beide Synthesewege überein⁴.



Syntheschema 2.

Synthese des Fragments Ala-Thr-Ala-Thr-Ala

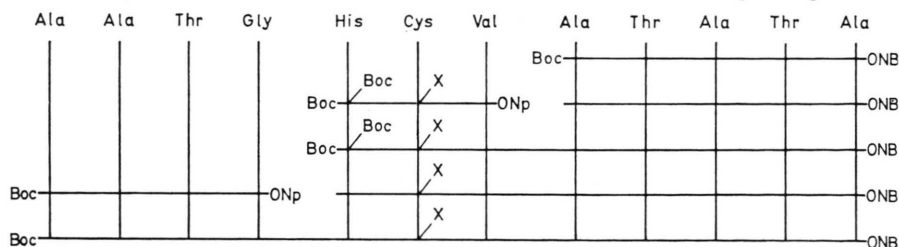
Der Pentapeptidester Boc-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB stellt das Carboxylende des oben erwähnten

geschützten Tricosapeptids dar. Für seine Synthese wurde der bereits früher beschriebene Tripeptidester Ala-Thr-Ala-ONB⁵ unter Verwendung von DCCI/HBT mit Boc-Thr- bzw. Boc-Ala-ONp verlängert. Bei diesen Synthesen traten keine Schwierigkeiten auf; der Pentapeptidester ist in Äthanol gut löslich.

Synthese des Fragments Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(X)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala

Der Aufbau dieses Dodecapeptids erfolgte aus den beiden oben beschriebenen Fragmenten und dem in der Mitteilung VI¹ beschriebenen Tripeptid His-Cys(X)-Val, wobei X = *tert*-Butylmercapto, *p*-Methoxybenzyl und Tetrahydropyranyl-(2) bedeutet (s. Schema 3).

Zur Kupplung der Fragmente wurden nur die *p*-Nitrophenylester verwendet. Bereits auf der Stufe des geschützten Oktapeptids Boc-His(Boc)-Cys(X)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB machte sich der Einfluß der verschiedenen Schwefelschutzgruppen auf die Löslichkeit bemerkbar. Während das Oktapeptid mit X = *tert*-Butylmercapto bei geschützter und freier Aminogruppe noch in Äthanol löslich ist, sind die geschützten Peptide mit X = *p*-Methoxybenzyl und Tetrahydropyranyl-(2) aus den gängigen Lösungsmitteln nicht mehr umkristallisierbar und nur durch Auswaschen zu reinigen. Nach Deblockierung der Aminogruppen erhält man jedoch auch in diesen Fällen in DMF lösliche, kupplungsfähige Aminosäurekomponenten, so daß alle drei Peptide, die sich nur durch die SH-Schutzgruppe unterscheiden, mit Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-*p*-Nitrophenylester zum geschützten Dodecapeptid Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(X)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB gekuppelt werden konnten. Die auf der vorangehenden Stufe zu beobachtenden Löslichkeitsunterschiede aufgrund der verschiedenen Schwefelschutzgruppen verwischen sich jetzt, denn alle Produkte sind schwerlöslich. Nach Abspaltung des Boc-Restes läßt



X = S-t-Bu, Thp, MBzl

Syntheschema 3.

sich sowohl der *tert*-Butylmercapto als auch der *p*-Methoxybenzyl geschützte Peptidester aus Äthanol umkristallisieren. Damit sind beide Komponenten für eine Kettenverlängerung am Aminoende geeignet. Da bereits bei der Acidolyse des Boc-Restes des S-Tetrahydropyranyl-(2)-oktapeptidesters mit Trifluoressigsäure Nebenreaktionen beobachtet wurden (ein selektiver Abspaltungsversuch mit Bortrifluorid-Ätherat/Eisessig⁶ scheiterte am Löslichkeitsproblem²), und der Tetrahydropyranyl-(2)-rest im Hinblick auf die Löslichkeit keine Vorteile erkennen ließ, wurde dieser Peptidester zunächst nicht in die weiteren Synthesen einbezogen.

Beschreibung der Versuche

Allgemeines s. VI. Mitteilung.

Synthesen

Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-ONp

Boc-Thr-Gly-ONp

0,02 M (4,4 g) Boc-Thr⁹ und 0,02 M (5,6 g) Gly-ONp × HBr (HCl)¹⁰ werden in 80 ml Chloroform aufgeschlämmt, auf -20°C gekühlt, mit 0,02 M (2,8 ml) NMM und mit 0,021 M (4,3 g) DCCI in 20 ml Chloroform versetzt. Man läßt nach zehn Minuten auf Zimmertemperatur ansteigen und weitere 12 Stunden rühren. Nach erneuter Abkühlung wird der ausgefallene DCH abfiltriert. Das Filtrat wird mit Eiswasser, kalter 5-prozentiger NaHCO_3 - und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und eingedampft. Das Produkt wird in wenig Essigester aufgenommen und vorsichtig bis zur schwachen Trübung mit Petroläther versetzt. Die Kristallisation wird mit weiteren Gaben Petroläther vervollständigt und dauert mehrere Tage. Die Umkristallisation erfolgt aus Essigester/Petroläther.

DC: I, II, III einheitlich.

Ausbeute: 6,9 g (87%). Schmelzpunkt: $90 - 95^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -7,4^{\circ}$ ($c = 1$, DMF).

$\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_8$ (397,38):

Ber. C 51,38 H 5,83 N 10,57;

Gef. C 51,26 H 5,86 N 10,70.

Thr-Gly-ONp × HCl

0,01 M (4,0 g) Boc-Thr-Gly-ONp werden eine halbe Stunde mit 20 ml 4 N HCl/Dioxan bei Zimmertemperatur behandelt, eingedampft, zweimal mit absolutem Äther bis zur Trockene verrieben, abfiltriert und aus absolutem Äthanol/Äther umkristalli-

siert. Das stark hygroskopische Produkt kann nur über P_2O_5 gelagert werden.

DC: I, II, VI einheitlich.

Ausbeute: 3,1 g (94%). Schmelzpunkt: $95 - 105^{\circ}\text{C}$.

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +6,8^{\circ}$ ($c = 1$, DMF).

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_6\text{Cl}$ (333,73).

Boc-Ala-Thr-Gly-ONP

0,015 M (5,0 g) Thr-Gly-ONp × HCl und 0,015 M (2,9 g) Boc-Ala⁸ werden in 100 ml Chloroform aufgeschlämmt. Bei -20°C werden 0,015 M (2,1 ml) NMM und 0,016 M (3,3 g) DCCI in 40 ml Chloroform zugegeben. Nach zehn Minuten läßt man auf Zimmertemperatur ansteigen und rührt noch 12 Stunden. Der ausgefallene DCH wird abfiltriert, die Lösung einrotiert, mit Essigester aufgenommen, gekühlt, ungelöstes Produkt abfiltriert und das Filtrat mit Eiswasser, gekühlter 5-prozentiger NaHCO_3 - und gesättigter NaCl-Lösung ausgewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Eindampfen wird das Produkt in wenig Essigester aufgenommen, mit Petroläther gefällt und aus Äthanol/Äther umkristallisiert.

DC: I, II, III einheitlich.

Ausbeute: 4,2 g (60%). Schmelzpunkt: $161 - 162^{\circ}\text{C}$.

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -16,3^{\circ}$ ($c = 1$, DMF).

$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_9$ (468,46):

Ber. C 51,28 H 6,02 N 11,96;

Gef. C 51,11 H 5,92 N 12,10.

Ala-Thr-Gly-ONp × HCl

0,01 M (4,7 g) Boc-Ala-Thr-Gly-ONp werden eine halbe Stunde mit 50 ml 4 N HCl/Dioxan bei Zimmertemperatur behandelt. Das Reaktionsprodukt beginnt schon nach wenigen Minuten auszufallen. Die Reaktionsmischung wird einrotiert, zweimal mit absolutem Äther verrieben und gewaschen und aus absolutem Äthanol mit absolutem Äther gefällt.

DC: I, II, VI einheitlich.

Ausbeute: 3,7 g (92%). Schmelzpunkt: $183 - 185^{\circ}\text{C}$ (Zers.).

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -8,8^{\circ}$ ($c = 1$, DMF).

$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_7\text{Cl}$ (404,81):

Ber. C 44,51 H 5,23 N 13,84;

Gef. C 44,27 H 5,27 N 13,76.

Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-ONp

0,01 M (4,0 g) Ala-Thr-Gly-ONp × HCl und 0,011 M (2,1 g) Boc-Ala⁹ werden in 200 ml Chloroform aufgeschlämmt und bei -20°C mit 0,01 M (1,4 ml) NMM und 0,011 M (2,3 g) DCCI in 50 ml Chloroform versetzt. Das Reaktionsgemisch wird nach 10 min auf Zimmertemperatur gebracht und

noch 12 Stunden gerührt. Man filtriert den Rückstand ab, wäscht die Lösung zweimal mit eisgekühlter 1 N NaHCO_3 -Lösung, mit Eiswasser neutral und einmal mit gesättigter NaCl -Lösung, trocknet über Na_2SO_4 , filtriert und engt die Lösung ein. Der Rückstand wird in Äthanol aufgenommen und der Peptidester mit Äther ausgefällt. Die Umfällung aus Äthanol durch Eingießen in Eiswasser ist ebenfalls möglich. Die Umkristallisation erfolgt aus Äthanol/Äther.

DC: I, II, III einheitlich.

Ausbeute: 3,3 g (61%). Schmelzpunkt: 190 °C (Zers.).

$[\alpha]_D^{24} = -19,0^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_{10}$ (539,54):

Ber. C 51,20 H 6,17 N 12,98;

Gef. C 51,03 H 6,12 N 13,09.

Aminosäureanalyse:

Ber. Ala 2,0 Thr 1,0 Gly 1,0;

Gef. Ala 2,00 Thr 0,99 Gly 1,04.

Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

Boc-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

0,01 M (4,3 g) Ala-Thr-Ala-ONB $\times \text{HCl}$ ⁵, 0,01 M (2,2 g) Boc-Thr ⁹ und 0,012 M (1,6 g) HBT werden in 60 ml DMF gelöst, auf -20°C gekühlt, 0,01 M (1,4 ml) TAA zugegeben und mit 0,011 M (2,3 g) DCCI in 20 ml DMF versetzt. Nach 10 min läßt man auf Zimmertemperatur ansteigen und rührt noch weitere 12 Stunden. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt, der ausgefallene DCH abfiltriert und das Filtrat in eisgekühlte gesättigte NaCl -Lösung gegossen, wobei das Tetrapeptid ausfällt. Es wird abgesaugt, gewaschen, aus Äthanol/Wasser gefällt und nach sorgfältigem Trocknen aus Äthanol/Petroläther umgefällt. Das gallertige Produkt wird über P_2O_5 getrocknet.

DC: I, III, IV einheitlich.

Ausbeute: 5,0 g (84%). Schmelzpunkt: 124 – 125 °C.

$[\alpha]_D^{24} = -14,5^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_{11}$ (597,62):

Ber. C 52,25 H 6,58 N 11,72;

Gef. C 52,02 H 6,52 N 11,55.

Aminosäureanalyse:

Ber. Ala 2,0 Thr 2,0;

Gef. Ala 2,00 Thr 2,06.

Thr-Ala-Thr-Ala-ONB $\times \text{TFA}$

0,01 M (6,0 g) Boc-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB werden eine halbe Stunde mit 40 ml TFA bei Zimmertemperatur behandelt und einrotiert. Das Öl wird mit Äther aufgenommen und verrieben bis alles Produkt fest ist und zweimal mit Äther gründlich

aufgeschlämmt und gewaschen. Das Trifluoracetat, das sich nicht aus Äthanol/Äther/Petroläther umkristallisieren läßt, wird über P_2O_5 getrocknet.

DC: I, II, IV einheitlich.

Ausbeute: 5,9 g (98%). Schmelzpunkt: 164 – 166 °C (Zers.).

$[\alpha]_D^{24} = -8,8^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{F}_3$ (611,53):

Ber. C 45,17 H 5,27 N 11,45;

Gef. C 45,88 H 5,23 N 11,64.

Boc-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

0,05 M (30,5 g) Thr-Ala-Thr-Ala-ONB $\times \text{TFA}$, 0,05 M (15,5 g) Boc-Ala-ONp ¹¹ und 0,055 M (7,5 g) HBT werden in 400 ml DMF gelöst, auf -20°C gekühlt und mit 0,05 M (7,0 ml) TAA versetzt. Nach 10 min wird das Kältebad entfernt und die Reaktionslösung über Nacht gerührt. Nach kurzem Kühlen auf 0°C wird abfiltriert und die Lösung in eisgekühlte, gesättigte NaCl -Lösung gegossen. Das Produkt ist nach drei Stunden ausgefallen, wird abgenutscht und gründlich mit Wasser nachgewaschen. Der noch feuchte Filterkuchen wird in Äthanol unter Erwärmen gelöst und mit Wasser erneut gefällt. Nach dem Absaugen wird scharf getrocknet, aus absolutem Äthanol/Petroläther umgefällt und wie üblich getrocknet.

DC: I, III, IV einheitlich.

Ausbeute: 23,4 g (70%). Schmelzpunkt: 211 – 212 °C.

$[\alpha]_D^{24} = -19,6^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{N}_6\text{O}_{12}$ (668,70):

Ber. C 52,08 H 6,63 N 12,56;

Gef. C 51,93 H 6,56 N 12,51.

Aminosäureanalyse:

Ber. Ala 3,0 Thr 2,0;

Gef. Ala 3,00 Thr 1,92.

Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB $\times \text{TFA}$

Eine halbe Stunde werden 0,01 M (6,7 g) Boc-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB mit 100 ml TFA bei Zimmertemperatur behandelt und einrotiert. Der feste Rückstand wird mit Äther zweimal gründlich aufgeschlämmt und gewaschen. Die Umfällung erfolgt aus absolutem Äthanol/absolutem Äther. Die amorphe Substanz wird über P_2O_5 getrocknet.

DC: I, II, IV einheitlich.

Ausbeute: 6,2 g (98%). Schmelzpunkt: 183 – 186 °C.

$[\alpha]_D^{24} = -4,6^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{F}_3$ (682,60):

Ber. C 45,74 H 5,46 N 12,31;

Gef. C 45,63 H 5,30 N 12,33.

Boc-His(Boc)-Cys(X)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB**Boc-His(Boc)-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB**

4 mM (2,7 g) Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB \times TFA, 4,4 mM (3,5 g) Boc-His(Boc)-Cys(MBzl)-Val-ONp¹ und 5 mM (0,65 g) HBT werden in 300 ml DMF gelöst und bei 0 °C 4 mM (0,6 ml) TAA zugetropft. Nach 24 Stunden bei Raumtemperatur beginnt das Produkt auszufallen. Nach weiteren 24 Stunden wird der flockige Niederschlag abgesaugt und mit Äthanol, Essigester und Äther nacheinander gründlich aufgeschlämmt und sorgfältig gewaschen, Umkristallisation ist nicht möglich. Nach dem Zerreiben der getrockneten Masse im Mörser erhält man ein weißes Pulver.

DC: II, VI einheitlich.

Ausbeute: 3,5 g (71,4%). Schmelzpunkt: 226 °C (Zers.).

$[\alpha]_D^{24} = 25,3^\circ$ ($c = 1$, HMPT).

$C_{56}H_{81}N_{11}O_{18}S$ (1228,39):

Eine Elementaranalyse wurde auf der nächsten Stufe durchgeführt.

Aminosäureanalyse:

	Thr	Ala	Cys	Val	His
Ber.	2,0	3,0	1,0	1,0	1,0;
Gef.	1,98	3,00	n.b.	1,02	1,01.

His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB $\times 2$ TFA

2,5 mM (3,0 g) des oben beschriebenen Oktapeptidderivates werden eine halbe Stunde bei Raumtemperatur mit 30 ml TFA behandelt. Nach dem Einrotieren wird das ölige Rohprodukt mit absolutem Äther verrieben und die dabei entstehende Kristallmasse noch zweimal sorgfältig mit absolutem Äther aufgeschlämmt und gründlich gewaschen. Auf Grund der geringen Löslichkeit ist eine Umkristallisation aus Äthanol nicht geeignet. Eine Umfällung aus DMF mit Äther zeigt keine zusätzliche Reinigung.

DC: I, II, IV einheitlich, in VI eine schwache Tolidinpositive Bande zusätzlich.

Ausbeute: 2,9 g (92,3%). Schmelzpunkt: 200 – 202 °C (Zers.).

$[\alpha]_D^{24} = -20,7^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{50}H_{67}N_{11}O_{18}SF_6$ (1256,20):

Ber.	C 47,81	H 5,38	N 12,27;
Gef.	C 49,31	H 5,51	N 12,73.

Boc-His(Boc)-Cys(S-t-Bu)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

4 mM (2,7 g) Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB \times TFA, 4,2 mM (3,2 g) Boc-His(Boc)-Cys(S-t-Bu)-Val-

ONp¹ und 5 mM (0,65 g) HBT werden in 300 ml DMF gelöst und bei 0 °C mit 4 mM (0,6 ml) TAA versetzt. Die Reaktionslösung wird 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, in 2,5 l Eiswasser gegossen und nach sechs Stunden Kühlung abfiltriert. Das gewonnene Produkt wird zweimal aus siedendem Äthanol umkristallisiert und mit Äther und Petroläther gewaschen.

DC: I, II, IV je eine zusätzliche schwache Pauly-positive Band; evtl. Mono-Boc-Derivat.

Ausbeute: 3,1 g (65,4%). Schmelzpunkt: 223 °C (Zers.).

$[\alpha]_D^{24} = -33,4^\circ$ ($c = 1$, HMPT).

$C_{52}H_{81}N_{11}O_{17}S_2$ (1196,40):

Eine Elementaranalyse wurde auf der nächsten Synthesestufe durchgeführt.

Aminosäureanalyse:

	Thr	Ala	Cys	Val	His
Ber.	2,0	3,0	1,0	1,0	1,0;
Gef.	1,96	3,00	n.b.	1,01	0,95.

His-Cys(S-t-Bu)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB $\times 2$ TFA

2,5 mM (2,8 g) des oben beschriebenen Oktapeptidderivates werden eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur mit 20 ml TFA behandelt und einrotiert. Das erhaltene Öl wird mit absolutem Äther bis zur Trockene verrieben, filtriert und nochmals mit absolutem Äther sorgfältig aufgeschlämmt und gewaschen. Die weiße Kristallmasse wird in 300 ml siedendem absolutem Äthanol gelöst, langsam abgekühlt, auf ca. 50 ml einrotiert und vorsichtig durch langsame Zugabe von absolutem Äther ausgefällt.

DC: I, II, IV einheitlich.

Ausbeute: 2,6 g (81,7%). Schmelzpunkt: 201 – 202 °C (Zers.).

$[\alpha]_D^{24} = -44,2^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{46}H_{67}N_{11}O_{17}S_2F_6$ (1224,22):

Ber.	C 45,13	H 5,52	N 12,59;
Gef.	C 45,43	H 5,36	N 12,60.

Boc-His(Boc)-Cys(Thp)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

4 mM (2,7 g) Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB \times TFA, 4,4 mM (3,1 g) Boc-His(Boc)-Cys(Thp)-Val-ONp¹ und 5 mM (0,65 g) HBT werden in 300 ml DMF gelöst und bei 0 °C werden 4 mM (0,6 ml) TAA zugetropft. Nach 48 Stunden Reaktionszeit bei Zimmertemperatur wird die leicht trübe, dickflüssige Lösung in 2 l Eiswasser gegossen, noch zwei Stunden gekühlt und das ausgefallene Produkt abfiltriert. Der mit Wasser, Äthanol und Essigester gewaschene Filterkuchen wird über Nacht in Äthanol suspendiert, abgesaugt und mit Äther und Petroläther nachgewa-

schen. Das Produkt läßt sich nicht in siedendem Äthanol oder Tetrahydrofuran lösen.

DC: I, II, IV einheitlich.

Ausbeute: 3,4 g (71,4%). Schmelzpunkt: 225 °C (Zers.).

$[\alpha]_D^{14} = -24,5^\circ$ ($c = 1$, HMPT).

$C_{53}H_{81}N_{11}O_{18}S$ (1192,35).

Eine Elementaranalyse wurde auf der nächsten Stufe durchgeführt.

Aminosäureanalyse:

	Thr	Ala	Cys	Val	His
Ber.	2,0	3,0	1,0	1,0	1,0;
Gef.	2,03	3,00	n.b.	1,03	1,04.

His-Cys(Thp)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB
 $\times 2 TFA$

2,5 mm (2,8 g) des oben beschriebenen Oktapeptidderivates werden eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur mit 20 ml TFA behandelt. Nach dem Einrotieren wird das entstandene Öl mit absolutem Äther bis zur Trockene verrieben, filtriert und nochmals mit absolutem Äther sorgfältig aufgeschlämmt. Die amorphe Substanz wird in 600 ml siedendem absolutem Äthanol gelöst, langsam abgekühlt, auf ca. 60 ml eingengt und langsam mit absolutem Äther bis zur Kristallisation versetzt.

DC: I, II, IV einheitlich.

Ausbeute: 0,9 g (29,5%). Schmelzpunkt: 205 – 207 °C (Zers.).

$[\alpha]_D^{24} = -20,0^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{47}H_{67}N_{11}O_{18}SF_6$ (1220,17):

Ber. C 46,27 H 5,53 N 12,63;

Gef. C 46,22 H 5,50 N 12,97.

In Äthanol unlöslich sind 1,1 g chromatographisch einheitliche Substanz, die auf der Startlinie verbleibt und UV-, Ninhydrin-, Pauly- und Tolidin-positiv ist.

Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(X)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

2,5 mm (3,1 g) *His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB* $\times 2 TFA$ werden zusammen mit 3 mm (1,6 g) *Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-ONp* und 2,5 mm (0,34 g) HBT in 80 ml DMF gelöst und bei 0 °C werden 5 mm (0,7 ml) TAA zugetropft. Nach wenigen Minuten wird das Eisbad entfernt und die gallertige Lösung drei Tage bei Zimmertemperatur heftig gerührt. Dann wird der Reaktionsansatz in 1,4 l Eiswasser gegossen, 12 Stunden in der Kälte stehengelassen und das ausgefallene Produkt auf einem Filter gesammelt. Es wird mit Methanol, Äthanol, Essigester und Petroläther nachgewaschen

und der Filterkuchen erneut in Äthanol aufgerührt, mit der halben Menge Äther versetzt, 12 Stunden im Kühlschrank belassen, abgesaugt und getrocknet.

DC: I, II, VI einheitlich.

Ausbeute: 2,6 g (72,8%). Schmelzpunkt: 241 °C (Zers.).

$[\alpha]_D^{24} = -25,7^\circ$ ($c = 1$, HMPT).

$C_{63}H_{93}N_{15}O_{21}S$ (1428,58):

Ber. C 52,97 H 6,56 N 14,71;

Gef. C 52,54 H 6,55 N 14,24.

Aminosäureanalyse:

	Thr	Gly	Ala	Cys	Val	His
Ber.	3,0	1,0	5,0	1,0	1,0	1,0;
Gef.	2,83	0,90	5,00	n.b.	1,03	0,97.

Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB $\times 2 TFA \times H_2O$

1,4 mm (2,0 g) des oben beschriebenen Dodecapeptidderivates werden wie üblich mit 20 ml TFA eine halbe Stunde bei Raumtemperatur behandelt, einrotiert und mit absolutem Äther trocken gerieben. Die Umkristallisation erfolgt aus siedendem absolutem Äthanol und Zugabe von Äther.

DC: I, II, IV einheitlich.

Ausbeute: 1,9 g (94%). Schmelzpunkt: 191 – 193 °C (Zers.).

$[\alpha]_D^{24} = -24,3^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{62}H_{89}N_{15}O_{24}SF_6$ (1574,52):

Ber. C 47,30 H 5,70 N 13,34;

Gef. C 47,25 H 5,47 N 12,73.

Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(S-t-Bu)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

2,0 mm (2,5 g) *His-Cys(S-t-Bu)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB* $\times 2 TFA$ werden zusammen mit 2,2 mm (1,2 g) *Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-ONp* und 2 mm (0,27 g) HBT in 40 ml DMF gelöst und bei 0 °C mit 4 mm (0,56 ml) TAA versetzt. Nach kurzer Zeit beginnt die Lösung zu gelieren und es werden nochmals 60 ml DMF zugefügt. Das Kältebad wird entfernt und bei Zimmertemperatur wird drei Tage heftig gerührt. Der Ansatz wird in 1,4 l Eiswasser eingerührt, 12 Stunden in der Kälte stehen gelassen, über eine Nutsche abgesaugt und mit Methanol, Äthanol, Essigester und Petroläther gründlich nachgewaschen. Der Filterkuchen wird erneut in Äthanol aufgerührt, mit der halben Menge Äther versetzt, 12 Stunden im Kühlschrank belassen, abgesaugt und getrocknet.

DC: I, II, VI einheitlich.

Ausbeute: 1,9 g (68%). Schmelzpunkt: 236 – 237 °C (Zers.).

$[\alpha]_D^{24} = -33,9^\circ$ ($c = 1$, HMPT).

$C_{59}H_{93}N_{15}O_{20}S_2$ (1396,60).

Ber. C 50,74 H 6,71 N 15,04;

Gef. C 50,53 H 6,55 N 14,62.

Aminosäureanalyse:

	Thr	Gly	Ala	Cys	Val	His
Ber.	3,0	1,0	5,0	1,0	1,0	1,0;
Gef.	2,88	0,91	5,00	n.b.	1,02	1,02.

Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(S-t-Bu)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB $\times 2$ TFA $\times H_2O$

1,3 mM (1,8 g) des oben beschriebenen Dodecapeptidderivates werden wie üblich mit 20 ml TFA eine halbe Stunde bei Raumtemperatur behandelt, einrotiert und mit absolutem Äther bis zur Trockene verrieben. Die Umkristallisation erfolgt aus siedendem absolutem Äthanol und Nachfällung mit Äther. DC: I, II, IV einheitlich.

Ausbeute: 1,6 g (82%). Schmelzpunkt: 196 – 197 °C (Zers.).

$[\alpha]_D^{24} = -37,5^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{58}H_{89}N_{15}O_{23}S_2F_6$ (1542,55):

Ber. C 45,16 H 5,82 N 13,62;

Gef. C 44,89 H 5,71 N 13,19.

Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(Thp)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

0,7 mM (0,8 g) His-Cys(Thp)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB $\times 2$ TFA werden zusammen mit

1,0 mM (0,54 g) Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-ONp und 0,8 mM (0,11 g) HBT in 50 ml DMF gelöst und bei 0 °C mit 1,4 mM (0,2 ml) TAA versetzt. Nach zehn Minuten wird das Kältebad entfernt und die nun dickflüssige Lösung drei Tage heftig gerührt. Der Reaktionsansatz wird in einen Liter Eiswasser eingegrührt, 12 Stunden in der Kälte stehen gelassen, der Niederschlag abgesaugt und mit Methanol, Äthanol, Essigester und Petroläther gründlich nachgewaschen. Das gewonnene Produkt ist in geringen Mengen in heißem DMF löslich.

DC: I, II, VI einheitlich.

Ausbeute: 0,3 g (30,8%). Schmelzpunkt: 215 – 217 °C.

$[\alpha]_D^{24} = -22,1^\circ$ ($c = 1$, HMPT).

$C_{60}H_{93}N_{15}O_{21}S$ (1392,55):

Ber. C 51,75 H 6,73 N 15,09;

Gef. C 51,17 H 6,81 N 14,85.

Aminosäureanalyse:

	Thr	Gly	Ala	Cys	Val	His
Ber.	3,0	1,0	5,0	1,0	1,0	1,0;
Gef.	2,86	0,97	5,00	n.b.	1,03	0,95.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die Unterstützung der Arbeiten.

¹ A. Raschig u. Fr. Schneider, VI. Mitteilung dieser Reihe, Z. Naturforsch. **30 c**, 739 [1975].

² A. Raschig, Dissertation Marburg 1975.

³ T. Y. Liu, W. H. Stein, S. Moore u. P. D. Elliott, J. Biol. Chem. **240**, 1143 [1965].

⁴ A. Raschig, E. Schaich u. Fr. Schneider, 4. Amerikanisches Peptidsymposium, New York, N. Y. 1975.

⁵ E. Schaich u. Fr. Schneider, Z. Naturforsch. **29 c**, 450 [1974].

⁶ R. G. Hiskey u. J. B. Adams, jr., J. Org. Chem. **31**, 2178 [1966].

⁷ F. Reindel u. W. Hoppe, Chem. Ber. **87**, 1103 [1951].

⁸ H. Pauly, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **42**, 517 [1904].

⁹ G. Schnabel, Ann. Chem. **702**, 188 [1967].

¹⁰ J. Kovacs u. R. L. Rodin, J. Org. Chem. **33**, 2418 [1968].

¹¹ K. Hofmann, R. Schmichen, R. D. Wells, Y. Wohman u. N. Yanaihara, J. Amer. Chem. Soc. **87**, 611 [1965].