Dem Bundeswirtschaftsministerium, Bonn (Forschungsvorhaben 822), der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen, Köln, dem Landesamt für Forschung beim Ministerpräsidenten des Landes Nordrhein-Westfalen, Düsseldorf, dem Forschungskuratorium Gesamt-

textil, Frankfurt, und der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, danken wir für finanzielle Unterstützung der vorliegenden Arbeit. Dem Verband der chemischen Industrie und seinen Mitgliedsfirmen danken wir für die Überlassung von Chemikalien im Rahmen von Hochschullieferungen.

Synthese einer teilgeschützten A-Kette des Schafinsulins^{*, **}

H. ZAHN, H. BREMER^{***} und R. ZABEL

Deutsches Wollforschungsinstitut an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen

(Z. Naturforsch. **20 b**, 653—660 [1965]; eingegangen am 3. Mai 1965)

Die A-Kette des Schafinsulins wurde als teilgeschütztes Derivat Carbobenzoxy-glycyl-L-isoleucyl-L-valyl-L-glutamyl-L-glutaminyl-S-benzyl-L-cysteinyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-alanyl-glycyl-L-valyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminyl-L-leucyl-L-glutamyl-L-asparaginy-L-tyrosyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-asparagin synthetisiert und in dieser Form durch Gelfiltration über Sephadex G 25 in wäßriger Lösung bei pH 8,5—8,7 gereinigt. Das synthetische Material entspricht dem natürlichen in biologischen und chemischen Testen.

1963 wurde in dieser Zeitschrift über eine Synthese der A- und B-Kette des Schafinsulins und deren Kombination zu insulinaktivem Material in einer Kurzmitteilung berichtet¹. Die Aminosäuresequenz des Schafinsulins² (Abb. 1) wurde deshalb für die Synthese gewählt, weil sie im Gegensatz zu den Sequenzen anderer Insuline in der Position 9 der A-Kette einen Glycinrest aufweist. Dies ermöglicht die Synthese der aus 21 Aminosäuren bestehenden A-Kette aus den Fragmenten A 1—9 und A 10 bis 21 nach jeder Methode der Carboxylgruppen-

Aktivierung, ohne daß man Racemisierung befürchten mußte.

Eine ähnliche Synthese der A-Kette des Schafinsulins wurde von KATSOYANNIS und Mitarbb. publiziert³. Unterschiede zu unserer Synthese bestehen in der Wahl einiger Schutzgruppen und Kondensationsmethoden. WANG et al.⁴ synthetisierten unlängst auch die A-Kette des Rinderinsulins auf vergleichbarem Wege.

Für die Synthese benötigten wir zwei Teilpeptide (vgl. Schema 1), die durch Fragmentkondensation

Abb. 1. Aminosäureformel des Schafinsulins.

* 47. Mitt. über Peptide. 46. Mitt.: R. ZABEL u. H. ZAHN, voranstehend.

** Abkürzungen nach E. BRAND u. J. T. EDSALL, *Ann. Rev. Biochem.* **16**, 224 [1947] sowie *Peptides — Proceedings of the 5th European Symposium Oxford 1962*, Pergamon Press 1963.

*** Teil der Diss. H. BREMER, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, 1964.

¹ J. MEIENHOFER, E. SCHNABEL, H. BREMER, O. BRINKHOFF, R. ZABEL, W. SROKA, H. KLOSTERMEYER, D. BRANDENBURG, T. OKUDA u. H. ZAHN, *Z. Naturforsch.* **18 b**, 1120 [1963].

² H. BROWN, F. SANGER u. R. KITAI, *Biochem. J.* **60**, 556 [1955].

³ P. G. KATSOYANNIS, A. TOMETSKO u. K. FUKUDA, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 2863 [1963].

⁴ Y. WANG, J.-Z. HSU, W.-C. CHANG, L.-L. CHENG, C.-Y. HSING, A.-H. CHI, T.-P. LOH, C.-H. LI, P.-T. SHI u. Y.-H. YIEH, *Sci. Sinica [Peking]* **13**, 2030 [1964].

⁵ R. A. BOISSONNAS, *Helv. chim. Acta* **34**, 874 [1951]; J. R. VAUGHAN, *J. Amer. chem. Soc.* **73**, 3547 [1951]; TH. WIELAND u. H. BERNHARD, *Liebigs Ann. Chem.* **572**, 190 [1951].

Schema 1. Synthese der partiell geschützten A-Kette des Schafinsulins.

	10 Val	11 Cys	12 Ser	13 Leu	14 Tyr	15 Glu	16 Leu	17 Glu	18 Asp	19 Tyr	20 Cys	21 Asp
I		BZL Z — ONP — OMe										
		BZL Z — — OMe										
II	Z — ONP	BZL — — OMe										
	Z —	BZL — OMe										
III	Z —	BZL — N ₂ H ₃										
	Z —	BZL — N ₃ —				NH ₂ — OMe						
IV	Z —	BZL — OMe				NH ₂ — OMe						
V	Z —	BZL — N ₂ H ₃				NH ₂ — N ₂ H ₃						
	Z —	BZL — N ₃				NH ₂ — N ₃		NH ₂ —		BZL —	NH ₂ —	
VI	Z —	BZL —				NH ₂ —		NH ₂ —		BZL —	NH ₂ —	

Schema 2. Synthese des Dodekapeptids der Sequenz A 10–21.

aus insgesamt fünf kleineren Peptiden aufgebaut wurden.

Die Synthese der Teilsequenzen A 1–4⁶, A 5 bis 9⁶ und A 1–9⁶ sowie A 17–21⁷ ist in den

beiden voranstehenden Arbeiten beschrieben. Hier folgt die Beschreibung der Synthesen des Teilpeptides A 10–21 und des teilgeschützten Heneikosipeptides A 1–21.

⁶ H. ZAHN, H. BREMER, W. SROKA u. J. MEIENHOFER, Z. Naturforschg. **20 b**, 646 [1965].

⁷ R. ZABEL u. H. ZAHN, Z. Naturforschg. **20 b**, 650 [1965].

Synthese des Dodekapeptids A 10–21 (Schema 2)

Das Tripeptid der Sequenz A 10–12 wurde als Z-Val-Cys(BZL)-Ser-OMe* nach der Nitrophenylester-Methode dargestellt und mit Hydrazinhydrat in Dimethylformamid/Butanol-2 (1:1) in das Hydrazid Z-Val-Cys(BZL)-Ser-N₂H₃* überführt. Die Gesamtausbeute über alle Stufen betrug 40% der Theorie. Die Darstellung des Dipeptids Z-Cys(BZL)-Ser-OMe verlief ohne Nebenreaktionen in Dimethylformamid, worin die Kupplungskomponenten vollständig gelöst waren. In Äthylacetat oder Tetrahydrofuran ist das Serinmethylesterhydrochlorid dagegen nur wenig löslich und die Freisetzung des Esters erfolgt langsam. Für die Kondensation ist also ein Unterschluß Serinester verfügbar. Aus dem Reaktionsprodukt solcher Ansätze konnten bis 25% eines Nebenproduktes isoliert werden, dessen Elementaranalyse mit der Formel

übereinstimmt.

Zur Darstellung des Heptapeptids mit der Sequenz A 10–16 wurde das Hydrazid durch Umsetzung mit Salpetriger Säure in das Azid Z-Val-Cys(BZL)-Ser-N₃ überführt und dieses mit dem Tetrapeptid Leu-Tyr-Glu(NH₂)-Leu-OMe* gekuppelt. Die Kupplung verlief in Äthylacetat/Dimethylformamid mit 53% Ausbeute. Der erhaltene Heptapeptidmethylester wurde durch Einwirkung von Hydrazinhydrat in Dimethylformamid in das Hydrazid Z-Val-Cys(BZL)-Ser-Leu-Tyr-Glu(NH₂)-Leu-N₂H₃ umgewandelt.

Das gewünschte Dodekapeptid der Sequenz A 10 bis 21 wurde nun durch Kondensation des Heptapeptidazids A 10–16 mit dem Pentapeptid-Derivat Glu-Asp(NH₂)-Tyr-Cys(BZL)-Asp(NH₂)** in Dimethylformamid als Z-Val-Cys(BZL)-Ser-Leu-Tyr-Glu(NH₂)-Leu-Glu-Asp(NH₂)-Tyr-Cys(BZL)-Asp(NH₂) erhalten. Das Präparat ist nicht kristallisiert und wurde wiederholt mit Methanol ausgekocht, bis im Dünnschichtchromatogramm keine Nebenprodukte mehr erkennbar waren. Das Ergebnis der quant. Aminosäureanalyse⁸ eines 48-Stdn.-Hydrolysates bei 105° in 6-n. Salzsäure mit 10% Trifluoressigsäure-Zusatz als Lösungsvermittler ergab gute

Übereinstimmung der erwarteten und gefundenen Aminosäureverhältnisse: Val 0,71 (1,00), Ser 0,83 (1,00), Leu 2,08 (2,00), Tyr 1,68 (2,00), Glu 2,06 (2,00), Asp 2,00 (2,00); Cystein anwesend, aber nicht bestimmt (in Klammern theoretische Werte, Berechnungsbasis Asp). Im Hydrolysat wurde außer den vorhandenen Aminosäuren papierchromatographisch eine weitere Substanz ermittelt, bei der es sich vermutlich um Val-Cys(BZL) handelt. Die zu niedrigen Werte für Serin und Tyrosin sind auf Zersetzung während der Hydrolyse zurückzuführen.

Synthese des Heneikosiheptids A 1–21 (Schema 1)

Zur Synthese des Heneikosiheptids A 1–21 wurde das Nonapeptid-Derivat Z-Gly-Ile-Val-Glu(OBu⁺)-Glu-(NH₂)-Cys(BZL)-Cys(BZL)-Ala-Gly in Hexamethylphosphorsäuretriäthylester mit Chlorameisensäure-äthylester in das gemischte Anhydrid⁵ übergeführt und mit einer Lösung des decarbobenzoxylierten Dodekapeptids Val-Cys(BZL)-Ser-Leu-Tyr-Glu(NH₂)-Leu-Glu-Asp(NH₂)-Tyr-Cys(BZL)-Asp(NH₂) in dem gleichen Lösungsmittel umgesetzt. Bei der ersten Synthese waren zwei Äquivalente des Nonapeptid-Derivates eingesetzt worden. Mit Wasser wurden

Abb. 2. Gelfiltration der teilgeschützten A-Kette (VII) in 0,1-m. TRIS-Lösung. a) 1. Ansatz (2 Äquivalente Nonapeptid). b) Zweiter Durchlauf von Peak I, $[\alpha]_D^{25} = -51^\circ$. c) 2. Ansatz (1 Äquivalent Nonapeptid) $[\alpha]_D^{25} = -48^\circ$. d) 2. Ansatz nach Auskochen mit Methanol $[\alpha]_D^{25} = -50,5^\circ$.

* Diese Derivate sind unabhängig von uns auch von P. G. KATSOYANNIS und Mitarbeitern dargestellt worden, vgl. l. c.³⁾.

* Synthese des entsprechenden N-geschützten Peptids Z-Leu-Tyr-Glu(NH₂)-Leu-OMe: l. c.³⁾.

** Synthese des geschützten Peptids Z-Glu(OBu⁺)-Asp(NH₂)-Tyr-Cys(BZL)-Asp(NH₂): l. c.⁷⁾.

⁸ ST. MOORE, D. H. SPACKMAN u. W. H. STEIN, *Analytic. Chem.* **30**, 1185 [1958].

30% mehr Produkt ausgefällt, als man an Heneikosipeptid erwartete. Das überschüssige Nonapeptid-Derivat war also mit ausgefallen und konnte weder durch Umfällen noch durch Auskochen mit Methanol abgetrennt werden.

Das Heneikosipeptid war aber nach der Abspaltung der tert.-Butylestergruppe als Anion wasserlöslich, damit ergab sich die Möglichkeit der Gelfiltration (Abb. 2) an Sephadex G 25 in TRIS-Puffer bei p_H 8,5 – 8,7.

Bei den späteren Synthesen wurden äquivalente Mengen Nona- und Dodekapeptid eingesetzt. Die Gelfiltration lieferte nur noch 2 – 4% Nonapeptid, während das Heneikosipeptid-Derivat in einer Ausbeute von 90 – 95% anfiel.

Für das so gereinigte Heneikosipeptid-Derivat wurde eine befriedigende Elementaranalyse erhalten (vgl. experimenteller Teil). Die Ergebnisse der quantitativen Aminosäureanalyse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Berechnete Molzahlen	Gefunden nach Hydrolyse in	
	6-n. HCl + 10% Tri-fluoressigsäure nach 72 Stdn. bei 110°	13-n. HCl nach 85 Stdn. bei 110°
Gly	2,00	2,00
Asp	2,00	1,88
Ser	1,00	0,88
Glu	4,00	4,54
Ala	1,00	1,11
Val	2,00	1,25
Ile	1,00	0,40
Leu	2,00	2,26
Tyr	2,00	1,58
Cys (BZL)	4,00	3,23
		Bezugswert

Tab. 1. Quantitative Aminosäureanalyse des durch Gelfiltration gereinigten Heneikosipeptids.

Die Amidgruppen-Bestimmung an einem 17-Stdn.-Hydrolysat bei 105° in 13-n. HCl ergab 3,65 (berechnet 4,00) Amidgruppen pro Mol Peptid.

Dem hier beschriebenen Peptid-Derivat lag die von SANGER² angegebene Formel der Insulin-A-Kette zugrunde. Es diente auf zweierlei Weise zum Beweis der durch Abbau ermittelten Struktur des nativen Materials:

A) Die synthetische Insulin-A-Kette lieferte bei der Kombination mit synthetischer^{1,9} und natürli-

cher (s. exp. Teil) Insulin-B-Kette insulinaktive Präparate, deren Aktivitäten in der zu erwartenden Größenordnung lagen. Die Substanzen wurden nach drei verschiedenen Verfahren in drei Laboratorien getestet, die Ergebnisse (vgl. Tab. 1) sprechen zwar für die Richtigkeit der Formel von SANGER, stellen allein aber noch keinen Beweis dar, da vielleicht auch insulinähnliche Proteine dieselbe Aktivität besitzen (zur Aktivität der oxydierten A-Kette allein vgl. l. c.⁹).

Präparat	% Insulinaktivität		
	Mauskrampf-test ¹⁰	Glucose-verbrauch ¹¹	Glucose-oxydation ¹²
Nat.A + nat.B	1–2	1–2	1–2
Synth. A ₁ + nat. B	0,5–1,0	0,2 *	0,67
Synth. A ₂ + nat. B	1,08	2–3	—

Tab. 2. Insulinaktivität halbsynthetischer Insuline; Bezugsstandard = 25 I.E./mg.

A₁ = erster Ansatz, mit überschüssigem Nonapeptid dargestellt. A₂ = zweiter Ansatz aus äquivalenten Mengen Nona- und Dodekapeptid, über Sephadex G 25 gereinigt. * Die Löslichkeit des Präparates war bei p_H 7,2 zu gering, um in der zu diesem Test erforderlichen Konzentration gelöst zu werden.

B) Um auch die chemische Gleichheit der synthetischen A-Kette mit der aus natürlichem Schafinsulin zu beweisen, wurden beide unter gleichen Bedingungen partialhydrolysiert und mit der Fingerprint-Technik verglichen.

Die Bedingungen der Hydrolyse entsprachen der Arbeitsweise von SANGER²: Die Ketten wurden in der zum Cysteinsäure-Derivat oxydierten Form in 12-n. Salzsäure bei 37° einen, zwei und drei Tage lang der Hydrolyse unterworfen. Zum Vergleich wurde daneben unter denselben Bedingungen die oxydierte A-Kette des Rinderinsulins hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden zweidimensional [Butanol-2/Eisessig/Wasser (75 : 13,5 : 11,5) und Phenol/Wasser (80 : 20)] chromatographiert. Die Peptidbruchstücke der synthetischen und der natürlichen A-Kette des Schafinsulins waren in der Anfärbung, Intensität und den Wanderungswegen völlig identisch (vgl. Abb. 3). Andererseits war der Unterschied zwischen den A-Ketten des Schaf- und des Rinderinsulins

⁹ H. ZAHN, J. MEIENHOFER u. O. BRINKHOFF sowie E. F. PFEIFFER u. H. DITSCHUNEIT u. C. GLOXHUBER, Z. Naturforsch. **20b**, 666 [1965].

¹⁰ British Pharmacopoeia, pp. 816–819, The Pharmaceutical Press, London 1956.

¹¹ J. GROEN, C. E. KAMMINGE, A. F. WILLEBRANDS u. J. R. BLICKMAN, J. clin. Invest. **31**, 47 [1956]; J. VALLANCE-OWEN u. B. HURLOCK, Lancet **1**, 68 [1954].

¹² H. DITSCHUNEIT, J.-D. FAULHABER u. E. F. PFEIFFER, 8. Symp. Endokrinologie, München 1961, S. 387–392; Atompraxis **8**, 172 [1962].

Abb. 3. Zweidimensionale Chromatographie (Papier Nr. 2043 b, Schleicher & Schüll) von Partialhydrolysaten oxydierter Insulin-A-Ketten. Zwischen natürlicher und synthetischer A-Kette des Schafinsulins besteht kein Unterschied, Rind- und Schaf-Kette unterscheiden sich dagegen durch acht Flecke.

deutlich zu erkennen. Als typisch für die A-Kette des Schafinsulins erscheinen drei Peptide, wogegen fünf nur bei der Partialhydrolyse des Rinderinsulins auftreten. Die beiden Hormone unterscheiden sich nur in der Position neun der A-Kette, das Rinderinsulin enthält dort einen Serinrest an Stelle des Glycinrestes (Schaf).

Die Ergebnisse der Abbauprobe und die biologische Aktivität des synthetischen und halbsynthetischen Insulins lassen den Schluß zu, daß die von SANGER ermittelte Formel für die A-Kette des Schafinsulins die richtige Sequenz darstellt und daß durch die Synthese ein Peptid gewonnen wurde, welches mit dem natürlichen übereinstimmt.

Beschreibung der Versuche

Alle Synthesen wurden mit L-Aminosäuren ausgeführt. Die Schmelzpunkte wurden mit dem Monoskop der Firma H. Bock, Bad Oeynhausen, bestimmt und mit Hilfe von Eichsubstanzen der Firma Reichert, Wien, korrigiert.

Die R_f -Werte wurden in aufsteigender Technik dünnstichtchromatographisch auf mit Kieselgel G der Firma E. Merck, Darmstadt, beschichteten Platten bestimmt. Da die Schichtdicken nicht genau reproduziert werden konnten, sind alle R_f -Werte auf Leucin bezogen.

Laufmittel: Butanol-2/90-proz. Ameisensäure/Wasser (75 : 15 : 10).

Abkürzungen: DMF = Dimethylformamid, TAA = Triäthylamin, THF = Tetrahydrofuran.

Synthese des Dodekapeptids A10–21 (Schema 2)

Carbobenzoxy-S-benzyl-cysteinyl-serinmethylester (I)

25 g (0,16 Mol) $\text{HCl} \cdot \text{H-Ser-OMe}^{13}$ wurden in 150 ml DMF gelöst, mit 25 ml (0,18 Mol) TAA, 2,5 ml Eisessig und einer Lösung von 75 g (0,16 Mol) Z-Cys (BZL)-ONP¹⁴ in 200 ml DMF versetzt. Nach 48 Stdn. bei 0–5° wurde der Ansatz unter Rühren in 3 l 0,1-n. KHCO_3 -Lösung gegossen. Das ölige Produkt kristallisierte bald, wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus Methanol und Äthylacetat umkristallisiert.

Ausbeute 47 g (65%), Schmp. 111–112°, $[\alpha]_D^{23} = -29,8^\circ$ (c 2; DMF).

Lit.¹⁵: Schmp. 111°, $[\alpha]_D^{22} = -31^\circ$ (c 1,8; DMF), $R_{\text{Leu}} = 1,31$.

Di-(carbobenzoxy-S-benzyl-cysteinyl)-serin-methylester

Bei Verwendung von Äthylacetat oder Tetrahydrofuran als Lösungsmittel für die Umsetzung konnte durch fraktionierte Kristallisation aus Äthylacetat eine schwerer lösliche Komponente (Ausbeute bis zu 25%) vom Schmp. 133–134° und $[\alpha]_D^{23} = -42,2^\circ$ (c 2; DMF) isoliert werden. Nach der Elementaranalyse kann es sich um den diacylierten Serinmethylester handeln.

$\text{C}_{40}\text{H}_{43}\text{O}_9\text{N}_3\text{S}_2$ (773,9) $R_{\text{Leu}} = 1,48$.

Ber. C 62,08 H 5,60 N 5,43 S 8,29,

Gef. C 62,04 H 5,65 N 5,47 S 8,14.

Carbobenzoxy-valyl-S-benzyl-cysteinyl-serinmethylester (II)

5,0 g (0,011 Mol) I wurden in 25 ml Trifluoressigsäure gelöst und trockenes HBr-Gas durchgeleitet¹⁶. Nach 1½ Stdn. wurde die Lösung in 400 ml absol. Äther eingerührt, der Niederschlag durch Dekantieren mit Äther gewaschen und aus Methanol/Äther umkristallisiert. Schmp. 140–142°, $[\alpha]_D^{25} = +4,0$ (c 2; MeOH).

4,50 g (0,011 Mol) $\text{HBr} \cdot \text{H-Cys (BZL)-Ser-OMe}$ wurden in 20 ml DMF gelöst, mit 0,2 ml Eisessig, 1,75 ml TAA und 4,26 g (0,0114 Mol) Z-Val-ONP¹⁷ in 50 ml

¹³ E. FISCHER u. W. A. JACOBS, Ber. dtsch. chem. Ges. **39**, 2942 [1906].

¹⁴ M. BODANSZKY, Nature [London] **175**, 685 [1955].

¹⁵ ST. GUTTMANN u. R. A. BOISSONNAS, Helv. chim. Acta **43**, 200 [1960].

¹⁶ ST. GUTTMANN u. R. A. BOISSONNAS, Helv. chim. Acta **42**, 1257 [1959].

¹⁷ B. ISELIN, W. RITTEL, P. SIEBER u. R. SCHWYZER, Helv. chim. Acta **40**, 373 [1957].

DMF versetzt. Nach 5 Tagen bei 0° wurde durch Einrühren in 1 l 0,1-n. KHCO₃-Lösung gefällt, abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus THF oder sek.-Butanol umkristallisiert.

Ausbeute 3,5 g (56%), Schmp. 203–204, $[\alpha]_D^{20} = -28,0^\circ$ (c 2; DMF).

Lit.³: Schmp. 192–195°, $[\alpha]_D^{28} = -29,1^\circ$ (c 0,94; DMF).

C₂₇H₃₅O₇N₃S (545,6) $R_{Leu} = 0,95$.

Ber. C 59,43 H 6,47 N 7,70 S 5,88,

Gef. C 59,67 H 6,35 N 7,46 S 5,65.

Carbobenzoxy-valyl-S-benzyl-cysteinyl-serinhydrazid (III)

10,0 g II wurden in einer Mischung aus 100 ml DMF und 100 ml Butanol-2 mit 5 ml Hydrazinhydrat 1 Tag bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Hydrazid kristallisierte aus der Lösung, wurde abgesaugt und mit Methanol und Äther gewaschen. Ausbeute 9,4 g (94%), Schmp. 222–224°, $[\alpha]_D^{25} = -22,3^\circ$ (c = 1; DMF).

Lit.³: Schmp. 230°, $[\alpha]_D^{29} = -19,6^\circ$ (c 0,58; DMF).

C₂₆H₃₅N₅O₆S (545,6)

Ber. C 57,23 H 6,47 N 12,84 S 5,88,

Gef. C 56,99 H 6,45 N 12,71 S 6,03.

Hydrazid-Stickstoff¹⁸, ber. 5,16, gef. 5,37.

Carbobenzoxy-valyl-S-benzyl-cysteinyl-seryl-leucyl-tyrosyl-glutaminy-leucinmethylester (IV)

Bereitung des Azids

1,13 g (2,05 mMol) III wurden in 4 ml 2-n. HCl, 10 ml Eisessig und 10 ml THF gelöst. Bei –5° wurden 147 mg (2,13 mMol) NaNO₂ gelöst in 1 ml Wasser, zugesetzt. Nach 5 Min. bei 0° wurde mit 20-proz. K₂CO₃-Lösung neutralisiert und das Azid durch zweimaliges Ausschütteln mit Äthylacetat extrahiert. Die Essigesterphase wurde einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und kurz über Na₂SO₄ getrocknet.

Bereitung der Aminkomponente

1,50 g (2,19 mMol) Z-Leu-Tyr-Glu(NH₂)-Leu-OMe¹⁹ wurden 2 Stdn. mit 25 ml 2,5-n. HBr/Eisessig behandelt und das Hydrobromid mit 300 ml Äther gefällt.

Kondensation

Das Tetrapeptidhydrobromid wurde in 10 ml DMF gelöst, mit 0,4 ml TAA versetzt und mit der Azidlösung vereinigt. Die Reaktionsmischung blieb einen Tag bei 0° und zwei weitere Tage bei Raumtemperatur stehen. Das ausgefallene Heptapeptid-Derivat wurde abgesaugt und mit Äthylacetat und Methanol gewaschen. Nach dem Umfällen aus DMF/Wasser betrug die Ausbeute

1,15 g (53%), Schmp. 247–248°, $[\alpha]_D^{25} = -36,4^\circ$ (c 1; DMF).

C₅₃H₇₄N₈O₁₃S (1063,3) $R_{Leu} = 1,40$.

Ber. C 59,88 H 7,02 N 10,54 S 3,03,

Gef. C 59,75 H 6,97 N 10,44 S 3,23.

Carbobenzoxy-valyl-S-benzyl-cysteinyl-seryl-leucyl-tyrosyl-glutaminy-leucinhydrazid (V)

1,85 g (1,73 mMol) IV wurden in 20 ml DMF gelöst und nach Zusatz von 0,85 ml Hydrazinhydrat fünf Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die gelierte Masse wurde mit 20 ml Dioxan und 20 ml Wasser verrührt. Das Gel wurde abgesaugt und mit Wasser und Methanol gewaschen. Dann wurde mit Methanol aufgekocht und wieder abgesaugt.

Ausbeute 1,57 g (85%), Schmp. 248–250° Zersetzung. $[\alpha]_D^{25} = -38,4^\circ$ (c 1; Ameisensäure).

C₅₂H₇₄N₁₀O₁₂S (1063,3)

Hydrazid-Stickstoff¹⁸: Ber. 2,63, gef. 2,64.

Carbobenzoxy-valyl-S-benzyl-cysteinyl-seryl-leucyl-tyrosyl-glutaminy-leucyl-glutamyl-asparaginy-tyrosyl-S-benzyl-cysteinyl-asparagin (VI)

Bereitung des Azids

1,06 g (1 mMol) V wurden in 15 ml Eisessig und 3 ml 1-n. HCl gelöst. Nach Kühlung auf –2° wurde eine Lösung von 69 mg (1 mMol) Natriumnitrit in 1 ml Wasser zugefügt, worauf das Azid bald ausfiel. Es wurde ohne Isolierung nach 10 Min. in Äthylacetat von 0° suspendiert und die Suspension mit 0,1-n. KHCO₃ und NaCl-Lösung gewaschen. Auf Zusatz von 100 ml DMF ging das Azid in Lösung. Der Essigester wurde im Vakuum abgedampft. Bei allen diesen Operationen stieg die Temperatur nicht über 0°.

Bereitung der Aminkomponente

0,92 g (1 mMol) Z-Glu(OBu^t)-Asp(NH₂)-Tyr-Cys(BZL)-Asp(NH₂)⁷ wurden eine Stde. mit 20 ml 2,5-n. HBr/Eisessig behandelt und die Lösung dann in 600 ml absol. Äther eingerührt. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit Äther gewaschen und im Vakuum über KOH/P₂O₅ getrocknet. Das so gewonnene Hydrobromid wurde in 10 ml DMF gelöst, mit 0,2 ml TAA versetzt und filtriert.

Kondensation

Die Azidlösung wurde bei 0° mit der Lösung der Aminkomponente vereinigt und die Mischung 3 Tage bei 0° stehen gelassen. Durch Einrühren in 1 l Eiswasser, dem die etwa äquivalente Menge HCl zugesetzt worden war, wurde die Peptidsäure gefällt. Nach dem Einstellen des pH-Wertes auf 2–3 blieb die Fällung

¹⁸ H. MEDZIHRAZSKY-SCHWEIGER, Acta chim. Acad. Sci. hung. 34, 213 [1962].

¹⁹ P. G. KATSOYANNIS, K. SUZUKI u. A. TOMETSKO, J. Amer. chem. Soc. 85, 1139 [1963].

noch 1 Stde. stehen, dann wurde abgesaugt, gut mit Wasser gewaschen und getrocknet. Rohausbeute 1,32 g (74%).

Das Rohprodukt ließ sich durch zweimaliges Auskochen mit Methanol auf einen konstanten Schmelzpunkt bringen und von im Dünnschichtchromatogramm sichtbaren Verunreinigungen befreien. Ausbeute 0,80 g (45%); R_{Leu} 1,38.

Schmp. 257–259°, $[\alpha]_D^{25} = -37,5^\circ$ (c 1; Ameisensäure).

$\text{C}_{84}\text{H}_{111}\text{N}_{15}\text{O}_{23}\text{S}$ (1763,0)

Ber. C 57,22 H 6,35 N 11,92 S 3,64,

Gef. C 56,73 H 6,21 N 12,27 S 3,53.

Synthese des Heneikosi-peptids A 1–21 (Schema 1)

Carbobenzoxy-glycyl-isoleucyl-valyl-glutamyl-glutaminyl-S-benzyl-cysteinyl-S-benzyl-cysteinyl-alanyl-glycyl-valyl-S-benzyl-cysteinyl-seryl-leucyl-tyrosyl-glutaminyl-leucyl-glutamyl-asparaginy-l-tyrosyl-S-benzyl-cysteinyl-asparagin (VII)

Bereitung der Aminkomponente

300 mg (0,17 mMol) VI wurden in 8 ml Trifluoressigsäure gelöst und während 30 Min. trockenes HBr durchgeleitet¹³. Dann wurde im Vakuum eingedampft und das zurückbleibende Öl mit Benzol verrieben. Nach Abdampfen des Benzols wurde mit absol. Äther verrührt, das feste Produkt abgesaugt und mit Äther gewaschen. Das Hydrobromid wurde in 2,5 ml Hexamethylphosphorsäuretriämid gelöst und mit 0,09 ml (0,65 mMol) TAA versetzt.

Bereitung des gemischten Anhydrids

215 mg (0,17 mMol) Z-Gly-Ile-Val-Glu(OBu^t)-Glu(NH₂)-Cys(BZL)-Cys(BZL)-Ala-Gly⁶ (vorher 1 Stde. bei 95° im Vakuum über P₂O₅ getrocknet) wurden in 1,7 ml absol. Hexamethylphosphorsäuretriämid gelöst und mit 0,025 ml (0,18 mMol) TAA versetzt. Nach Kühlung auf –30° wurden 0,0164 ml (0,17 mMol) Chlorameisensäureäthylester zugegeben und 15 Min. bei –20° gerührt.

Kondensation

Zu der –20° kalten Lösung des gemischten Anhydrids wurde die ebenfalls gekühlte Lösung der Aminkomponente gegeben. Das Gemisch wurde bei –10° noch 3 Stdn. gerührt und anschließend 24 Stdn. bei 0° aufbewahrt. Durch Einrühren in 200 ml mit NaCl gesättigtes Wasser wurde das Peptid ausgefällt. Nach 2 Stdn. wurde der feinpulvrige Niederschlag abgesaugt und gründlich mit Wasser gewaschen. Das Produkt wurde noch feucht in 15 ml DMF und 3 ml Methanol gelöst und durch Einrühren in 300 ml Äther wieder ausgefällt. Nach dem Trocknen betrug die Ausbeute 480 mg.

Acidolyse des Glu⁴-γ-tert.-Butylesters

480 mg des Rohproduktes wurden in 6 ml Trifluoressigsäure gelöst. Nach 1-stdg. Stehen wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand mit Äther verrieben und abgesaugt. Ausbeute 444 mg (94%), Schmp. > 300° Zersetzung. $[\alpha]_D^{25} = -48^\circ$ (c 1; HCOOH).

Beim Auskochen mit Methanol gingen 15% der Substanz in Lösung. Der Rückstand hatte nach dem Trocknen einen Drehwert von $[\alpha]_D^{25} = -50^\circ$ (c 1; HCOOH).

Gelfiltration

50 mg des teilgeschützten Heneikosi-peptids und 60 mg TRIS-Puffer (Tris-hydroxymethyl-aminomethan) wurden in 1 ml Wasser gelöst, mit weiteren 4 ml Wasser verdünnt und mit 0,1-n. HNO₃ auf pH 8,5–8,7 gebracht. Diese Lösung wurde auf eine Säule (Länge 670 mm, Durchmesser 28 mm, Füllung Sephadex G 25 fine, eingeschlämmt mit 0,1 M TRIS-Puffer vom pH 8,5–8,7) gegeben und mit 0,1 M TRIS-Puffer vom pH 8,5–8,7 eluiert. Die UV-Absorptionskurve des Eluats zeigte zwei Peaks. Die entsprechenden Fraktionen wurden aufgefangen, mit verd. HNO₃ auf pH 3 angesäuert, wobei die Peptide ausflockten. Die so erhaltenen Suspensionen wurden in Viskingschlauch 18/32 drei Tage gegen Wasser dialysiert und gefriergetrocknet. Die erste Fraktion ergab 43 mg und erwies sich als A-Ketten-Derivat. Zersetzung über 300°, kein Schmelzpunkt. $[\alpha]_D^{25} = -51^\circ$ (c 1; HCOOH).

$\text{C}_{132}\text{H}_{179}\text{N}_{25}\text{O}_{35}\text{S}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (2894,3)

Ber. C 54,77 H 6,58 N 12,10 S 4,43 O 22,11,

Gef. C 53,95 H 6,51 N 12,06 S 5,48 O 21,95.

Quant. Aminosäureanalyse und Amidbestimmung vgl. S. 656

Die zweite Fraktion schmolz bei 250–253°. Im zweidimensionalen Papierchromatogramm fanden sich alle Aminosäuren des Nonapeptids A 1–9 sowie ein weiterer Fleck, dessen R_f -Werte mit denen des Dipeptids Ile-Val übereinstimmten. Eine Probe Z-Gly-Ile-Val-Glu(OBu^t)-Glu(NH₂)-Cys(BZL)-Cys(BZL)-Ala-Gly hatte nach Spaltung der tert.-Butylestergruppe des Glu⁴-Restes einen Schmelzpunkt von 253–255°.

Kombination der synthetischen A-Kette mit natürlicher Insulin-B-Kette

29 mg des gereinigten A-Kettenderivates VII und 43 mg B-Kette-7,19-bis-thiosulfat²⁰ wurden vermischt und im Hochvakuum 5 Stdn. bei 55° über Phosphor-pentoxid getrocknet. Die Reaktion mit Natrium in flüssigem Ammoniak und Weiterverarbeitung erfolgten in der von ZAHN et al.⁹ beschriebenen Weise bei pH 9,0. Ausbeute: 30 mg (69% d. Th.).

Sequenzvergleiche

a) Deblockierung und Oxydation

33 mg der gereinigten teilgeschützten A-Kette des Schafinsulins (VII) wurden drei Stdn. bei 50° im Va-

²⁰ J. L. BAILEY, Biochem. J. **67**, 21 P [1957].

kuum über P_2O_5 getrocknet und in 100 ml über Natrium dest. flüssigem Ammoniak gelöst. Die Schutzgruppen wurden durch Reduktion mit Natrium (portionsweise Zugabe bis zur bleibenden Blaufärbung) innerhalb von 40 Min. abgespalten. Die restliche, nach 10 Min. noch verbliebene Blaufärbung wurde durch tropfenweise Zugabe von 0,5 ml Eisessig entfernt. Nach Abdampfen des Ammoniaks wurde der weiße Rückstand in 50 ml Wasser aufgenommen, mit Citronensäure-Lösung (10%) auf p_H 5 gebracht und 22 Std. im Visking-Schlauch 18/32 gegen Wasser dialysiert. Eine Prüfung auf Thiolgruppen mit Nitroprussidnatrium fiel schon vor der Dialyse negativ aus. Nach der Gefriertrocknung wurden 23 mg = 86% als weiße, pulverige Substanz erhalten.

Die weitere Oxydation zum Cysteinsäurepeptid erfolgte mit Perameisensäure²¹: 4 ml Ameisensäure (99%) und 1 ml H_2O_2 (30%) wurden nach 15 Min. Reaktionsdauer bei Raumtemperatur auf 0° gekühlt und 20 mg des Peptids (in der Disulfidform) darin gelöst. Nach 30 Min. Oxydation bei 0°²² wurde die überschüssige Perameisensäure durch Zugabe von 5 ml Wasser zerstört. Anschließend wurde im Vakuum abgedampft, wobei zweimal nach Einengung auf die Hälfte 5 ml Wasser zugesetzt wurden. Die wäßrige Lösung ließ sich durch Gefriertrocknung in ein weißes, lockeres Pulver überführen.

b) Partialhydrolyse

Je 2,5 mg (0,001 mMol) der oxydierten synthetischen und natürlichen A-Kette des Schafinsulins sowie je 2,5 mg der oxydierten A-Kette des natürlichen Rinderinsulins wurden zusammen mit je 1 ml 12-n. HCl in Hydrolyseröhrchen eingeschmolzen und 24, 48 und 72 Std. bei 37° hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden in 10-ml-Bechergläser übergeführt und sofort im Vakuum bei Raumtemperatur über P_2O_5 und KOH ge-

trocknet, der Rückstand in einigen Tropfen Wasser gelöst und zur Entfernung der überschüssigen Salzsäure nochmals im Vakuum getrocknet.

Zum Chromatographieren wurde in 0,2 ml Wasser gelöst und davon 0,1 ml so auf den Startpunkt aufgetragen, daß der Auftragfleck nicht mehr als 10 mm Durchmesser hatte (nach je 0,02 ml Auftrag getrocknet). Chromatographiert wurde zuerst in Butanol-2/Ameisensäure/Wasser und dann in Phenol (80%). Entwickelt wurde mit Ninhydrinlösung. Die Chromatogramme wurden nach dem Sprühen an der Luft getrocknet und danach 1 Min. im Trockenschrank auf 110° erhitzt. Die Farbe und Lage der gebildeten Flecken wurde nach einer Stde. notiert (vgl. Abb. 3).

Wir danken den Herren Dr. J. MEIENHOFER, Dr. E. SCHNABEL und Dr. O. BRINKHOFF für wertvolle Ratschläge, den Herren Dr. KL. ZIEGLER, Dr. H. KLOSTERMEYER und Dr. J. MEIENHOFER für analytische Untersuchungen sowie den Herren Prof. Dr. E. F. PFEIFFER und Dr. H. DITSCHUNEIT, Frankfurt, Dr. C. GLOXHUBER, Farbenfabriken Bayer, Leverkusen, und Prof. H. CLAUSER, Paris, für biologische Tests. Weiter danken wir dem Bundeswirtschaftsministerium, Bonn, (Forschungsvorhaben 822), der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen, Köln, dem Forschungskuratorium Gesamttextil, Frankfurt, dem Landesamt für Forschung beim Ministerpräsidenten des Landes Nordrhein-Westfalen, Düsseldorf, und der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, für finanzielle Unterstützung der vorliegenden Arbeit. Dem Verband der chemischen Industrie, Düsseldorf, und seinen Mitgliedsfirmen danken wir für die Überlassung von Chemikalien im Rahmen von Hochschullieferungen.

²¹ G. TOENNIES u. R. P. HOMILLER, J. Amer. chem. Soc. **64**, 3054 [1942].

²² E. O. P. THOMPSON, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **15**, 440 [1954].