

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

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

Andreas Raschig und Friedhelm Schneider

Physiologisch-Chemisches Institut, Universität Marburg

(Z. Naturforsch. **30 c**, 739–744 [1975]; eingegangen am 19. August/19. September 1975)

Streptococcal Proteinase, Active Center Peptide, Peptide Synthesis

The synthesis and properties of the protected peptide Boc-His(Boc)-Cys(X)-Val-OH (ONP) [X = *tert*-butylmercapto, *p*-methoxybenzyl, tetrahydropyran-2-yl] are described. This peptide is a fragment of an active center sequence of the streptococcal proteinase (EC 3.4.22.10) containing the essential SH group of the enzyme.

Im Rahmen unserer Modelluntersuchungen zum molekularen Mechanismus der Enzymkatalyse, die sich u. a. mit dem Einfluß von Nachbargruppeneffekten auf die nucleophile Reaktivität von SH-Gruppen befassen^{1–6}, haben wir die Synthese einer Partialsequenz der Streptokokken-Proteinase begonnen, die die essentielle SH-Gruppe des Enzyms, sowie einen wahrscheinlich ebenfalls an der Katalyse beteiligten Histidinrest enthält⁷. Diese Sequenz bildet ein Bindeglied zwischen den bisher untersuchten niedermolekularen Imidazol/SH-Verbindungen und jenen Enzymen, von denen aufgrund mechanistischer Studien angenommen wird, daß sie eine SH-Gruppe und einen Imidazolrest im aktiven Zentrum enthalten.

Darüberhinaus dient uns die Partialsequenz als Modellfall für einen direkten Vergleich der Festkörpersynthese nach Merrifield, der Fragmentkondensation von Teilpeptiden an festen Trägern sowie der klassischen Fragmentkondensation in Lösung.

Unsere bisherigen Versuche zur Synthese der Partialsequenz führten zu einer Reihe von Fragmenten, die die gesamte aus 27 Aminosäuren bestehende Sequenz

Val-Lys-Pro-Gly-Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-
1 10
Ala-Thr-Gly-His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala-Gln-
20

Ile-Met-Lys
27

umfassen, deren Verknüpfung zum angestrebten

Endprodukt aber an Löslichkeitsschwierigkeiten scheiterte^{8–12}. Wir haben daher die Strategie der Synthese im Hinblick auf die Art und Länge der Fragmente modifiziert¹³ und berichten in der vorliegenden Arbeit über die Synthese des geschützten Peptids Boc-His(Boc)-Cys(X)-Val-OH (ONP), die auf verschiedenen Wegen und unter Verwendung verschiedener Schwefelschutzgruppen durchgeführt wurde¹³. Für die neue Strategie, die zur Synthese eines geschützten Tricosapeptids führte (s. folgende Mitteilungen und l.c. 13) bildet dieses Tripeptid, das die essentielle SH-Gruppe des Enzyms enthält, ein wichtiges Teilstück. Die besondere Problematik dieses Teilstücks ergibt sich aus der Wahl der SH-Schutzgruppe, eine für den Aufbau der gesamten Partialsequenz wichtige Frage.

Die in der VIII. Mitteilung beschriebene Synthese eines Tricosapeptids stellt einen ersten Teilerfolg auf dem Wege zu der aus 27 Aminosäuren bestehenden Sequenz dar, die uns bisher aber noch nicht gelungen ist.

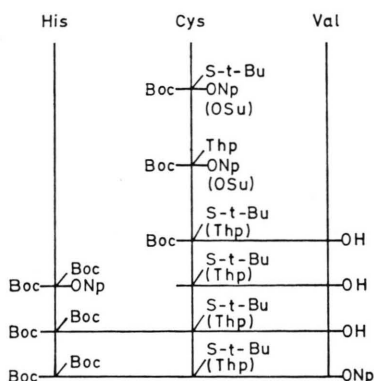
Synthese des Fragments His-Cys-Val

Die Synthese des geschützten Tripeptids wurde auf zwei verschiedenen Wegen und unter Verwendung des *tert*-Butylmercapto¹⁴, *p*-Methoxybenzyl¹⁵.

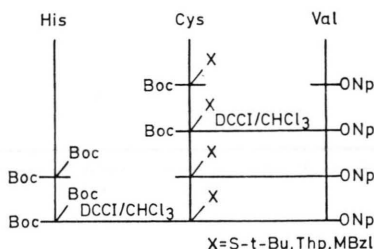
Abkürzungen: Boc, *tert*-Butyloxycarbonyl; DCCI, Dicyclohexylcarbodiimid; DCH, Dicyclohexylharnstoff; DC, Dünnschichtchromatogramm; DMF, Dimethylformamid; HBT, 1-Hydroxybenzotriazol; MBzl, *p*-Methoxybenzyl; NMM, N-Methylmorpholin; ONp, *p*-Nitrophenylester; OSu, N-Hydroxysuccinimidester; S-t-Bu, *tert*-Butylmercapto; Thp, Tetrahydropyran-2-yl; THF, Tetrahydrofuran; TAA, Triäthylamin.

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

und Tetrahydropyranyl-(2)-restes¹⁶ als Schwefelschutzgruppen durchgeführt. Einzelheiten des Vorgehens sind aus den beiden Syntheschemata ersichtlich.



Syntheschema 1



Syntheschema 2

Die Wahl der Schwefelschutzgruppe erfolgte einmal unter dem Gesichtspunkt der unterschiedlichen Abspaltbarkeit (acidolytisch, reduktiv), zum anderen in der Absicht, eventuell auftretende Löslichkeitsschwierigkeiten in späteren Stadien der Synthese durch Wechsel der S-Schutzgruppe günstig beeinflussen zu können. Als besonders vorteilhaft erwies sich der Start der Synthese mit Valin-*p*-nitrophenylester und nachfolgende Knüpfung der Peptidbindungen in Chloroform mit DCCI (Schema 2). Der Schutz des Carboxylendes als aktiver Ester und die Kupplung mit DCCI ermöglichen eine rationelle Synthese des geschützten und zugleich aktivierten Tripeptids in hoher Ausbeute und Reinheit, so daß dieser Syntheseweg die Methode der Wahl darstellt. Als Histidinderivat hat sich der Bis-Boc-histidin-*p*-nitrophenylester¹⁷ bei beiden Synthesen sehr bewährt. Die verschiedenen Schwefelschutzgruppen führten im Syntheseweg 2 zu gut handhabbaren und kristallisierbaren Zwischen- und Endprodukten, während bei Syntheseweg 1 schon ein Vergleich der Endausbeuten den deutlich schlechteren Verlauf der

Synthese erkennen läßt: Boc-Hic(Boc)-Cys(Thp)-Val-ONp 3% nach Schema 1, 42% nach 2; Boc-His(Boc)-Cys(S-*t*-Bu)-Val-ONp 14% nach Schema 1, 60% nach 2 (Ausbeute bezogen auf die erste Aminosäure). Bei Prüfung der Frage, ob auch am Schwefel geschützte Cystein-*p*-nitrophenylester als carboxylendständige Derivate bei Peptidsynthesen verwendbar sind, zeigte sich, daß bei der acidolytischen Abspaltung der Aminoschutzgruppe des Boc-Cys(MBzl)-ONp, Boc-Cys(Thp)-ONp, Boc-Cys(S-*t*-Bu)-ONp und (Boc-Cys-ONp)₂ unabhängig von der Wahl des Schwefelschutzes eine bis zu 50-prozentige Spaltung des *p*-Nitrophenylesters eintrat, eine Nebenreaktion, die bei anderen Aminosäuren nur in unerheblichem Ausmaß auftrat¹⁸.

Beschreibung der Versuche

Allgemeines

Die angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf das gereinigte Produkt mit den angegebenen physikalischen Daten. Die Schmelzpunkte wurden mit dem Gerät nach Dr. Tottoli bestimmt, optische Drehungen mit dem Polarimeter 141 Perkin Elmer. Die Elementaranalysen wurden in der zentralen Analytik des Fachbereichs Chemie der Universität Marburg und im Mikroanalytischen Labor Alfred Bernhardt, Elbach über Engelskirchen, durchgeführt. Für die Dünnschichtchromatogramme wurden mit Kieselgel SiF beschichtete Aluminiumfolien der Firma Riedel de Haen, Hannover, benutzt.

Als Laufmittel dienen: I. *n*-Butanol/Eisessig/Wasser = 4:1:1, II. *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser = 30:20:6:24; III. Chloroform/Cyclohexan/Eisessig = 45:45:10; IV. Propanol/Ammoniak/Wasser = 6:3:1; V. Chloroform/Eisessig = 9:1; VI. *n*-Butanol/Eisessig/Methanol/Pyridin/Methylchlorid/Wasser = 4:1:1:1:2:1.

Schwerlösliche Verbindungen wurden zur Chromatographie in Trifluoräthanol gelöst. Sprühreagenzien waren Ninhydrin (5-prozentig in Butanol/2 N Essigsäure = 95:5); Chlor-Tolidin¹⁹, Pauly-Reagenz²⁰ (Diazosulfanilsäure).

Aminosäuren wurden von den Firmen Merck und Serva bezogen. Aminosäureanalysen wurden mit Beckmann Unichrom Analysator durchgeführt.

Synthesen

Boc-Cys(S-*t*-Bu)-ONp

0,05 M (15,5 g) Boc-Cys(S-*t*-Bu)-OH¹⁴ und 0,055 M (7,7 g) *p*-Nitrophenol werden in 100 ml Essigester gelöst und bei -20 °C mit 0,055 M

(11,4 g) DCCI in 50 ml Essigester versetzt. Nach 30 min wird das Kältebad entfernt und der Reaktionsansatz 6 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, erneut gekühlt und der DCH abfiltriert. Das Filtrat wird mit eisgekühlter 1 N NaHCO_3 -Lösung und Eiswasser (neutral) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Das Öl wird in Äther aufgenommen und mit Petroläther gefällt. Die Umkristallisation erfolgt aus Essigester/Petroläther.

DC: I, III, VI einheitlich.

Ausbeute: 15,7 g (73%). Schmelzpunkt: 115 – 116 °C.

$[\alpha]_D^{24} = +33,6^\circ$ ($c = 1$, THF).

$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$ (430,51):

Ber. C 50,22 H 6,09 N 6,51;

Gef. C 50,17 H 5,91 N 6,21.

Boc-Cys(S-t-Bu)-OSu

Die Synthese des N-Hydroxysuccinimidesters erfolgt analog der Vorschrift für Boc-Cys(S-t-Bu)-ONp.

DC: I, III, VI einheitlich.

Ausbeute: 18,7 g (92%). Schmelzpunkt: 84 – 86 °C.

$[\alpha]_D^{24} = -45,9^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$ (406,52):

Ber. C 47,28 H 6,54 N 6,89;

Gef. C 47,95 H 6,46 N 7,12.

Boc-Cys(Thp)-ONp

Die Synthese erfolgt analog den oben beschriebenen Cysteinderivaten. Der *p*-Nitrophenylester konnte jedoch nur als Öl gewonnen werden und wurde als solches weiterverarbeitet.

$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$ (426,49).

Boc-Cys(S-t-Bu)-Val-OH

0,01 M (4,1 g) Boc-Cys(S-t-Bu)-OSu werden in 100 ml DMF gelöst und mit 0,01 M (1,2 g) Val in 100 ml Wasser, in dem 0,01 M (0,7 g) NaHCO_3 gelöst sind, bei 5 °C versetzt. Man läßt 24 Stunden bei Zimmertemperatur rühren, filtriert vom Rückstand ab, verdünnt mit ca. 600 ml Eiswasser und wäscht mit Äther. Die wäßrige Phase wird vorsichtig unter Eiskühlung mit gesättigter KHSO_4 -Lösung auf pH 2 – 3 angesäuert, das Produkt mit Essigester aufgenommen und die Essigesterphase mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert, im Vakuum eingedampft, erneuert in wenig Essigester aufgenommen und mit Petroläther vorsichtig unter Kühlung gefällt.

DC: I, II, IV einheitlich.

Ausbeute: 1,8 g (44%). Schmelzpunkt: 108 – 110 °C.

$[\alpha]_D^{24} = -95,6^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$ (408,54):

Ber. C 49,97 H 7,89 N 6,85;

Gef. C 50,49 H 8,10 N 7,14.

Cys(S-t-Bu)-Val-OH × HCl

0,01 M (4,1 g) Boc-Cys(S-t-Bu)-Val-OH werden mit 50 ml 4 N HCl/Dioxan eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird eingedampft und das Produkt mit absolutem Äther bis zur Trockene verrieben, zweimal mit absolutem Äther gründlich aufgeschlämmt und gewaschen. Es wird aus absolutem Methanol/Äther umkristallisiert.

DC: I, II, IV einheitlich.

Ausbeute: 3,4 g (98%). Schmelzpunkt: 136 – 137 °C.

$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2\text{Cl}$ (344,92).

Boc-His(Boc)-Cys(S-t-Bu)-Val-OH

0,01 M (3,4 g) Cys(S-t-Bu)-Val-OH × HCl, 0,01 M (1,35 g) HBT und 0,01 M (4,8 g) Boc-His(Boc)-ONp¹⁷ werden in 100 ml DMF gelöst und bei 0 °C werden 0,01 M (1,4 ml) TAA zugegeben. Der Reaktionsansatz wird 24 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, vom Rückstand abfiltriert und das Filtrat in 1,5 l gesättigte NaCl-Lösung gegossen. Das Produkt wird durch dreifache Extraktion in Essigester aufgenommen; die Extrakte werden mit 1 N KHSO_4 gewaschen, mit gesättigter NaCl-Lösung neutral gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, eingedampft, in wenig Essigester aufgenommen und mit Petroläther gefällt. Umkristallisiert wird aus Essigester/Petroläther.

DC: I, III, IV einheitlich.

Ausbeute: 4,5 g (70%) Schmelzpunkt: 114 – 116 °C.

$[\alpha]_D^{24} = -51,2^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$\text{C}_{28}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_8\text{S}_2$ (645,84):

Ber. C 52,07 H 7,33 N 10,84;

Gef. C 52,14 H 7,30 N 10,79.

Boc-His(Boc)-Cys(S-t-Bu)-Val-ONp

5 mM (3,0 g) Boc-His(Boc)-Cys(S-t-Bu)-Val-OH und 5 mM (0,7 g) *p*-Nitrophenol werden in 100 ml DMF gelöst und bei 0 °C mit 6 mM (1,2 g) DCCI in 20 ml DMF versetzt. Nach 10 min wird die Reaktionslösung aus dem Kältebad entfernt und 36 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, der gebildete DCH abfiltriert und das Filtrat in eiskalte gesättigte NaCl-Lösung gegossen. Das Produkt wird mit Essigester extrahiert, die vereinigten Essigesterlösungen werden mit eiskalter 1 N NaHCO_3 -Lösung, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, eingedampft und aus wenig

Tetrachlorkohlenstoff mit reichlich Petroläther gefällt. Die Umkristallisation erfolgt aus absolutem Äther/Petroläther.

DC: I, III, VI einheitlich.

Ausbeute: 1,8 g (47%). Schmelzpunkt: 85–89 °C.

$[\alpha]_D^{24} = -59,2^\circ$ ($c = 1$, DMF).

Analyse: siehe unten.

Boc-Cys(S-t-Bu)-Val-ONp

0,01 M (3,1 g) Boc-Cys(S-t-Bu)-OH und 0,01 M (3,2 g) Val-ONp $\times$ HBr²¹ werden in 100 ml Chloroform aufgeschlämmt und bei 0 °C mit 0,01 M (1,4 ml) NMM und 0,011 M (2,3 g) DCCI versetzt. Nach 10 min wird die Reaktionslösung noch 12 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, gekühlt, vom Rückstand abfiltriert, eingedampft, in Essigester aufgenommen und erneut vom ausgefallenen DCH abfiltriert. Das Produkt wird aus wenig Essigester mit Petroläther gefällt.

DC: I, III, V einheitlich.

Ausbeute: 4,7 g (79%). Schmelzpunkt: 97–98 °C.

$[\alpha]_D^{24} = -76,3^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{23}H_{35}N_3O_7S_2$ (529,67):

Ber. C 52,15 H 6,66 N 7,93;

Gef. C 52,57 H 7,08 N 7,84.

Cys(S-t-Bu)-Val-ONp $\times$ HCl

0,01 M (5,3 g) Boc-Cys(S-t-Bu)-Val-ONp werden eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur mit 100 ml 4 N HCl/Dioxan behandelt, einrotiert und mit absolutem Äther verrieben, bis das Produkt fest ist. Die stark hygroskopische Substanz wird noch zweimal mit absolutem Äther sorgfältig aufgeschlämmt und gründlich gewaschen.

DC: I, III, VI einheitlich.

Ausbeute: 4,1 g (87%). Schmelzpunkt: 145–147 °C.

$[\alpha]_D^{24} = +21,9^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{18}H_{28}N_3O_5S_2Cl$ (466,02):

Ber. C 46,39 H 6,06 N 9,02;

Gef. C 45,97 H 5,80 N 9,18.

Boc-His(Boc)-Cys(S-t-Bu)-Val-ONp

0,01 M (5,3 g) Cys(S-t-Bu)-Val-ONp $\times$ HCl und 0,01 M Boc-His(Boc)-OH¹⁷ werden in 100 ml Chloroform aufgeschlämmt und bei 0 °C mit 0,01 M (1,4 ml) NMM und 0,01 M (2,3 g) DCCI in 20 ml Chloroform versetzt. Nach 5 Minuten läßt man auf Zimmertemperatur ansteigen, über Nacht rühren, kühlt, filtriert vom DCH ab, dampft ein und nimmt das Produkt in Essigester auf. Nach Kühlung wird vom letzten DCH abfiltriert, zweimal in 1 N NaHCO₃- und mit gesättigter NaCl-Lösung neutral gewaschen, die Lösung einrotiert und in Äther auf-

genommen. Die Fällung erfolgt mit Petroläther, die Umkristallisation aus Äther/Petroläther.

DC: I, III, VI einheitlich.

Ausbeute: 6,6 g (87%). Schmelzpunkt: 88–90 °C.

$[\alpha]_D^{24} = -62,6^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{34}H_{50}N_6O_{10}S_2$ (766,93):

Ber. C 53,25 H 6,57 N 10,96;

Gef. C 53,39 H 6,72 N 10,68.

Boc-Cys(Thp)-Val-OH

0,01 M (4,3 g) Boc-Cys(Thp)-ONp (Öl) werden in 100 ml DMF gelöst. Man tropft bei 0 °C langsam eine Lösung von 0,01 M (1,2 g) Val und 0,7 g NaHCO₃ in 100 ml Wasser zu. Danach wird noch 48 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird in ca. 600 ml Eiswasser gegossen, mit Äther dreimal gewaschen und vorsichtig unter Eiskühlung mit gesättigter KHSO₄-Lösung auf pH 3 angesäuert. Das sich abscheidende Öl wird durch dreifache Extraktion in Essigester aufgenommen, mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und aus Essigester mit Petroläther gefällt. Das Öl wird über P₂O₅ getrocknet.

DC: I, II, IV einheitlich.

Ausbeute: 2,6 g (64%).

$C_{18}H_{32}N_2O_6S$ (404,53).

Cys(Thp)-Val-OH $\times$ HCl

0,01 M (4,0 g) Boc-Cys(Thp)-Val-OH werden mit 40 ml 3 N HCl/Dioxan eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur behandelt. Die Reaktionslösung wird eingedampft, mit absolutem Äther bis zur Trockene verrieben, zweimal mit absolutem Äther gründlich aufgeschlämmt und aus absolutem THF/Äther und absolutem Äthanol/Äther umgefällt und über P₂O₅ getrocknet.

DC: trotz wiederholter Umkristallisation nicht einheitlich.

Ausbeute: 1,5 g (44%).

$[\alpha]_D^{24} = +3,9^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{13}H_{25}N_2O_4S_2Cl$ (340,87).

Boc-His(Boc)-Cys(Thp)-Val-OH

0,02 M (6,8 g) Cys(Thp)-Val-OH $\times$ HCl werden in 100 ml DMF gelöst und bei 0 °C mit 0,04 M (5,6 ml) TAA und 0,02 M (9,5 g) Boc-His(Boc)-ONp in 100 ml DMF versetzt. Nach 24 Stunden Reaktionsdauer wird der Ansatz in 1,2 l eisgekühlte gesättigte NaCl-Lösung gegossen und das ausfallende Produkt in Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterextrakte werden mit 1 N KHSO₄ und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, eingedampft und aus Äther/Pe-

troläther gefällt. Die Umkristallisation erfolgt aus Tetrachlorkohlenstoff/Petroläther.

DC: I, III, IV einheitlich.

Ausbeute: 4,3 g (66%). Schmelzpunkt: 120 – 122 °C.

$[\alpha]_D^{24} = -20,9^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{29}H_{47}N_5O_9S$ (641,78):

Ber. C 54,27 H 7,38 N 10,91;

Gef. C 54,56 H 7,36 N 10,81.

Boc-His(Boc)-Cys(Thp)-Val-ONp

0,01 M (6,4 g) *Boc-His(Boc)-Cys(Thp)-Val-OH* und 0,015 M (2,1 g) *p*-Nitrophenol werden in 100 ml absolutem Essigester gelöst und bei –20 °C mit 0,011 M (2,2 g) DCCI in 20 ml absolutem Essigester versetzt. Nach zehn Minuten läßt man auf Zimmertemperatur ansteigen und rührt noch sechs Stunden. Dann wird der gebildete DCH abfiltriert, die Reaktionslösung dreimal mit kalter 1 N $NaHCO_3$ - und einmal mit kalter 2 N $KHSO_4$ -Lösung gewaschen. Die weitere Reinigung erfolgt durch Waschen mit gesättigter NaCl-Lösung. Es wird über Na_2SO_4 getrocknet, eingedampft, in Äther aufgenommen und mit Petroläther gefällt. Um ein analysenreines Produkt zu erhalten, muß mehrfach umgefällt werden.

Ausbeute: 1,1 g (14,4%).

$[\alpha]_D^{24} = -37,2^\circ$ ($c = 1$, DMF).

Weitere Daten siehe unten.

Boc-Cys(Thp)-Val-ONp

0,01 M (3,0 g) *Boc-Cys(Thp)-OH* und 0,01 M (3,2 g) *Val-ONp* $\times$ HBr^{21} werden in 100 ml Chloroform aufgeschlämmt und bei –20 °C mit 0,011 M (2,3 g) DCCI in 20 ml Chloroform und 0,01 M (1,4 ml) NMM versetzt. Nach zehn Minuten entfernt man das Kühlbad und rührt über Nacht. Nach kurzem Kühlen wird der ausgefallene DCH abfiltriert, die Lösung eingedampft, in Essigester aufgenommen und erneut filtriert. Die klare Lösung wird mit eisgekühlter 1 N $NaHCO_3$ -Lösung, Eiswasser und gesättigter NaCl-Lösung je zweimal gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Die Kristallisation erfolgt aus Essigester/Petroläther.

DC: I, II, III einheitlich.

Ausbeute: 4,2 g (80%). Schmelzpunkt: 132 – 134 °C; $[\alpha]_D^{24} = +6,6^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{24}H_{35}N_3O_8S$ (525,62):

Ber. C 54,84 H 6,71 N 7,99;

Gef. C 54,86 H 6,42 N 7,96.

Cys(Thp)-Val-ONp $\times$ *HCl*

0,01 M (5,3 g) *Boc-Cys(Thp)-Val-ONp* werden eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur mit 3 N HCl /Dioxan behandelt. Nach dem Eindampfen wird

das Öl mit absolutem Äther zur Trockene verrieben, und mit absolutem Äther nochmals aufgeschlämmt. Die stark hygroskopische Substanz wird aus absolutem Äthanol mit absolutem Äther gefällt.

DC: I, II, III einheitlich.

Ausbeute: 4,2 g (91%). Schmelzpunkt: 98 – 100 °C.

$[\alpha]_D^{24} = -7,6^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{19}H_{28}N_3O_6S$ (461,96):

Ber. C 49,40 H 6,11 N 9,10;

Gef. C 49,54 H 5,85 N 9,30.

Boc-His(Boc)-Cys(Thp)-Val-ONp

0,01 M (4,6 g) *Cys(Thp)-Val-ONp* $\times$ HCl und 0,012 M *Boc-His(Boc)-OH*¹⁷ werden in 100 ml DMF gelöst, auf –20 °C gekühlt und mit 0,01 M (1,4 ml) NMM und 0,011 M (2,2 g) DCCI versetzt. Man entfernt das Kältebad nach zehn Minuten und rührt die Reaktionslösung acht Stunden bei Zimmertemperatur. Nach dem Abfiltrieren des ausgefallenen DCH wird die Lösung einrotiert, in Essigester aufgenommen, erneut vom DCH abgetrennt und die klare Lösung mit eisgekühlter 1 N $NaHCO_3$ -Lösung und mit Eiswasser je dreimal gewaschen. Die über Na_2SO_4 getrocknete Lösung wird eingedampft, das Öl in absolutem Äther aufgenommen und mit Petroläther gefällt. Die Umkristallisation erfolgt aus Äther/Petroläther.

DC: I, III, VI einheitlich.

Ausbeute: 4,4 g (57,7%). Schmelzpunkt: 79 – 81 °C.

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

$C_{35}H_{50}N_6O_{11}S$ (762,88):

Ber. C 55,10 H 6,61 N 11,02;

Gef. C 54,40 H 6,37 N 11,16.

Boc-Cys(MBzl)-Val-ONp

0,01 M (3,4 g) *Boc-Cys(MBzl)-OH*¹⁶ und 0,01 M (3,2 g) *Val-ONp* $\times$ HBr^{21} werden in 100 ml Chloroform aufgeschlämmt und bei 0 °C mit 0,01 M (1,4 ml) NMM und 0,011 M (2,3 g) DCCI versetzt. Nach zehn Minuten wird die Reaktionslösung noch 12 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, gekühlt, vom Rückstand abfiltriert, einrotiert, mit Essigester aufgenommen und erneut vom ausgefallenen DCH abfiltriert. Das Produkt wird aus wenig Essigester mit Petroläther gefällt.

DC: I, III, V einheitlich. Ausbeute: 4,1 g (73%). Schmelzpunkt: 130 – 131 °C.

$[\alpha]_D^{24} = -32,8^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{27}H_{35}N_3O_8S$ (561,65):

Ber. C 57,73 H 6,28 N 7,48;

Gef. C 58,18 H 6,41 N 7,54.

Cys(MBzl)-Val-ONp $\times$ *HCl*

0,01 M (5,6 g) *Boc-Cys(MBzl)-Val-ONp* werden eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur mit 100 ml

4 N HCl/Dioxan behandelt, eingedampft und mit absolutem Äther verrieben bis das Produkt fest ist. Nach gründlichem Auswaschen mit absolutem Äther wird das Produkt vorsichtig aus absolutem Methanol und absolutem Äther gefällt. Die Kristallisation dauert über 24 Stunden.

DC: I, III, VI einheitlich. Ausbeute: 3,8 g (75%). Schmelzpunkt: 137–139 °C.

$C_{22}H_{28}N_3O_6S$ (498,00):

Ber. C 53,06 H 5,67 N 8,44;

Gef. C 53,05 H 5,51 N 8,63.

Boc-His(Boc)-Cys(MBzl)-Val-ONp

0,01 M (5,0 g) Cys(MBzl)-Val-ONp $\times$ HCl und 0,01 M Boc-His(Boc)-OH¹⁷ werden in 100 ml Chloroform gelöst und bei 0 °C mit 0,01 M (1,4 ml) NMM und 0,011 M (2,3 g) DCCI in 20 ml Chloroform versetzt. Nach 5 Minuten läßt man auf Zimmer-

temperatur ansteigen, läßt über Nacht rühren, kühlt, filtriert vom DCH ab, rotiert ein und nimmt das Produkt wieder in Essigester auf. Nach abermals guter Kühlung wird vom letzten DCH abfiltriert, die Lösung einrotiert und in Äther aufgenommen. Die Fällung erfolgt mit Petroläther, die Umkristallisation ebenfalls aus Äther/Petroläther.

DC: I, III, VI einheitlich. Ausbeute: 6,0 g (75%). Schmelzpunkt: 126–127 °C.

$[\alpha]_D^{24} = -33,6^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{38}H_{50}N_6O_{11}S$ ((798,91):

Ber. C 57,13 H 6,31 N 10,52;

Gef. C 56,98 H 6,28 N 10,28.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fond der Chemischen Industrie für die Unterstützung der Arbeit.

¹ Fr. Schneider, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **348**, 1034 [1967].

² Fr. Schneider, E. Schaich u. H. Wenck, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **349**, 1525 [1968].

³ Fr. Schneider u. H. Wenck, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **350**, 1653 [1969].

⁴ Fr. Schneider u. H. Wenck, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **350**, 1521 [1969].

⁵ E. Ziegler, H. Wenck u. Fr. Schneider, Z. Naturforsch. **25b**, 1417 [1970].

⁶ H. Wenck u. Fr. Schneider, Experimentia **27**, 20 [1971].

⁷ T. G. Liu, J. Biol. Chem. **242**, 4029 [1967].

⁸ E. Schaich u. Fr. Schneider, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **355**, 939 [1974].

⁹ E. Schaich u. Fr. Schneider, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **355**, 945 [1974].

¹⁰ E. Schaich u. Fr. Schneider, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **355**, 952 [1974].

¹¹ E. Schaich u. Fr. Schneider, Z. Naturforsch. **29c**, 457 [1974].

¹² E. Schaich u. Fr. Schneider, Z. Naturforsch. **29c**, 464 [1974].

¹³ A. Raschig, Dissertation Marburg 1975.

¹⁴ U. Weber u. P. Hartter, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **351**, 1384 [1970].

¹⁵ S. Sakakibara, Y. Nobuhara, Y. Shimonishi u. R. Kiyoi, Bull. Chem. Soc. I. **38**, 120 [1965].

¹⁶ G. F. Holland u. L. A. Cohen, J. Ann. Chem. Soc. **80**, 3765 [1958].

¹⁷ E. Schaich, A. M. Fretzdorff u. Fr. Schneider, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **354**, 897 [1973].

¹⁸ A. Raschig, E. Schaich u. Fr. Schneider, 4. Amerikanisches Peptidsymposium, New York, N. Y. 1975.

¹⁹ F. Reindel u. W. Hoppe, Chem. Ber. **87**, 1103 [1954].

²⁰ H. Pauly, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **42**, 517 [1904].

²¹ K. Lübke u. E. Schröder, Z. Naturforsch. **16b**, 765 [1961].