

ROLF GEIGER, KARL STURM und WALTER SIEDEL

Synthese eines biologisch aktiven Tricosapeptidamids mit der Aminosäuresequenz 1–23 des Corticotropins (ACTH)

Aus der Farbwerke Hoechst AG, vorm. Meister Lucius & Brüning, Frankfurt (Main)
(Eingegangen am 11. Oktober 1963)

Das partiell durch *N*-tert.-Butyloxycarbonylgruppen (Abk. BOC) und tert.-Butylreste (Abk. t.Bu) geschützte β^{1-23} -Corticotropin-tyrosin²³-amid¹⁾ wird nach dem Schema 10 + 13 mittels der Nitrophenylester- und der Carbodiimidmethode synthetisiert und durch Chromatographie an Sephadex®-G 25 angereichert. Das durch Abspalten der Schutzgruppen mit Trifluoressigsäure erhaltene Tricosapeptidamid-trifluoacetat wird durch Chromatographie an Carboxymethylcellulose und durch kontinuierliche Hochspannungselektrophorese gereinigt. Die chromatographisch und elektrophoretisch einheitliche Verbindung zeigt im Sayers-Test an der Ratte bei intravenöser Applikation volle ACTH-Aktivität.

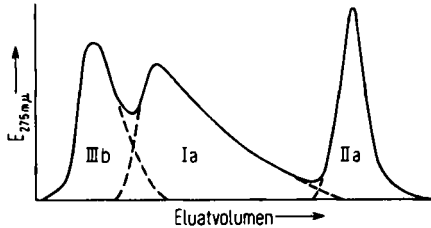
Über die Synthese adrenocorticotrop wirksamer Peptide wurde während der vergangenen Jahre aus mehreren Arbeitskreisen berichtet²⁻⁷⁾. Unsere eigenen Arbeiten galten vor allem dem Versuch, ergiebige Wege zur Darstellung solcher Peptide zu finden. Eine wesentliche Voraussetzung hierfür war die Wahl geeigneter Schutzgruppen.

R. SCHWYZER und Mitarbeiter⁵⁻⁷⁾ stellten ihre Synthesen adrenocorticotrop wirksamer Peptide auf Endprodukte ab, die nur noch BOC-⁸⁾ und tert.-Butylreste⁹⁾ als Schutzgruppen tragen. Da die Labilität des β -Corticotropins in alkalischem Medium und die Anwesenheit von Methionin sowie die Notwendigkeit, eine vollständige und ohne wesentliche Verluste an wertvollem Peptid verlaufende Abspaltung der Schutzgruppen zu erreichen, alle anderen bekannten Reste ungeeignet machte, war auch bei unserem Synthesepan die Verwendung von BOC-Gruppen vorgesehen,

- 1) Zur Nomenklatur vgl. Lit.⁶⁾. Eine Zusammenfassung der verwendeten Abkürzungen findet sich bei J. MEIENHOFER, *Chimia* [Zürich] **16**, 385 [1962].
- 2) R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, J.-P. WALLER und P. A. JACQUENOUD, *Experientia* [Basel] **12**, 446 [1956].
- 3) C. H. LI, J. MEIENHOFER, E. SCHNABEL, D. CHUNG, T.-B. LO und J. RAMACHANDRAN, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 5760 [1960], **83**, 4449 [1961].
- 4) K. HOFMANN, H. YAJIMA, T.-Y. LIU, N. YANAIHARA und S. LANDE, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 487 [1961], **84**, 4475 [1962].
- 5) R. SCHWYZER, W. RITTEL, H. KAPPELER und B. ISELIN, *Angew. Chem.* **72**, 915 [1960].
- 6) R. SCHWYZER und H. KAPPELER, *Helv. chim. Acta* **44**, 1136 [1961], **46**, 1550 [1963].
- 7) R. SCHWYZER und P. SIEBER, *Nature* [London] **199**, 172 [1963].
- 8) L. A. CARPINO, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 4427 [1957]; F. C. MCKAY und N. F. ALBERTSON, ebenda **79**, 4686 [1957]; G. W. ANDERSON und A. C. MCGREGOR, ebenda **79**, 6180 [1957]; R. SCHWYZER, P. SIEBER und H. KAPPELER, *Helv. chim. Acta* **42**, 2622 [1959].
- 9) R. W. ROESKE, *Chem. and Ind.* **1959**, 1121; E. TASCHNER, B. LIBEREK, CZ. WASIELEWSKI und J. BIERNAT, *Angew. Chem.* **71**, 743 [1959]; G. W. ANDERSON und F. M. CALLAHAN, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 3359 [1960].

aber eine Adsorption, die durch den Gehalt der Peptide an aromatischen Aminosäuren bedingt ist. Als Folge davon erscheint nicht das Tricosapeptidamid Ia, sondern das Tridecapeptidamid IIIb als erstes im Eluat. Ihm folgt das Tricosapeptidamid Ia und in etwas größerem Abstand das Decapeptid IIa.

Trotz der geringen Löslichkeit des Tricosapeptidamids Ia in reinem Puffer wurde eine gute Trennung erreicht. Die Konzentration der Peptide im Eluat war oft so hoch, daß man stark opaleszierende Fraktionen erhielt, die bald einen Niederschlag auschieden. Ein Zusatz von Alkoholen zum Eluans erhöhte die Löslichkeit der Peptide.



Chromatographie des rohen Kondensationsprodukts an Sephadex®-G 25. Elutionskurve

Als Eluans verwendeten wir Ammoniumacetat-Essigsäurepuffer pH 3.8. Der Peptidgehalt der einzelnen Fraktionen wurde durch Messen der Tyrosin- und Tryptophanabsorption bei 275 m μ bestimmt, die Peptide durch Lyophilisieren als wasserhaltige Acetate isoliert. Die Verbindungen IIIb und Ia sind noch nicht völlig voneinander getrennt. Das Tridecapeptidamid IIIb, das noch 3–5% Ia enthält, wurde jedoch ohne weitere Reinigung erneut zur Kondensation eingesetzt, das Decapeptid IIa wurde vor der Herstellung des Nitrophenylesters IIb durch Lyophilisieren mit verdünnter Salzsäure in das Hydrochlorid übergeführt.

Das gereinigte Tricosapeptidamid Ia wurde durch Behandeln mit Trifluoressigsäure von den Schutzgruppen befreit, das zunächst vorliegende Trifluoracetat in wäßriger Lösung durch Behandeln mit der Acetatform eines basischen Ionenaustauschers in das Acetat übergeführt und nach Lyophilisieren als solches gewonnen. Die biologische Aktivität lag im Sayers-Test bei 60–70 I. E./mg.

Eine weitere Anreicherung konnte wahlweise durch Chromatographie an Carboxymethylcellulose⁴⁾ oder durch kontinuierliche Hochspannungselektrophorese erreicht werden; beide Verfahren lieferten ein Produkt mit etwa 100 I. E./mg (Sayers-Test, bezogen auf den 2. internat. ACTH-Standard), das chromatographisch und elektrophoretisch einheitlich war. Die optische Drehung wurde in 1-proz. Essigsäure zu $-76.8 \pm 1.5^\circ$ bestimmt.

In gleicher Weise wie das Tridecapeptidamid III wurden auch die in der voranstehenden¹³⁾ und einer früher erschienenen Arbeit¹⁷⁾ beschriebenen Deca- bis Tetradecapeptidderivate mit dem Decapeptid IIa oder dessen Nitrophenylester IIb zu den entsprechenden Eicosa- bis Tetracosapeptidderivaten umgesetzt. Sie alle waren nach Abspaltung der Schutzgruppen und Reinigung biologisch voll aktiv. Bei der Reinigung der Rohprodukte wurde in diesem

¹⁷⁾ K. STURM, R. GEIGER und W. SIEDEL, Chem. Ber. 96, 609 [1963].

Fall auf die Wiedergewinnung eines Teils der nicht umgesetzten Ausgangsstoffe verzichtet und die Reinigung durch Chromatographie an Carboxymethylcellulose und anschließend durch kontinuierliche Hochspannungselektrophorese nach Versuch 4. C. vorgenommen.

Wir danken Herrn Dr. G. VOGEL für die biologische Auswertung der Verbindungen, Herrn Dr. H. H. SCHÖNE für Aminosäureanalysen und Fermentuntersuchungen.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Wegen der Länge der Peptidketten wird in der vorliegenden Arbeit auch im Versuchsteil die abgekürzte Schreibweise¹⁾ eingeführt.

Aufsteigende Papierchromatographie auf Papier Nr. 2043b der Firma Schleicher & Schüll in System A (n-Butanol/Essigsäure/Pyridin/Wasser (30:6:20:24))^{4, 12)}.

1. *BOC-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(Ot.Bu)-His-Phe-Arg-Try-Gly-ONP, HCl (IIb)*: 1.55 g (1 mMol) *IIa-HCl*, das aus der entsprechenden, 1 Äquiv. Essigsäure enthaltenden Verbindung^{12, 13)} durch Lyophilisieren mit 0.14 g Triäthylamin-HCl und Trocknen bei 60° i. Hochvak. erhalten wurde, und 0.560 g (4 mMol) *4-Nitro-phenol* werden in 20 ccm Dimethylformamid gelöst. Man fügt 0.620 g (3 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid zu und rührt 24 Stdn. bei Raumtemperatur. Der gebildete Nitrophenylester wird mit peroxydfreiem Äther ausgefällt und nach Trocknen ohne weitere Reinigung verwendet. Ausb. 1.6 g.

2. *BOC-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(Ot.Bu)-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys(BOC)-Pro-Val-Gly-Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg-Arg-Pro-Val-Lys(BOC)-Val-Tyr-NH₂, CH₃CO₂H (bzw. HCl) (Ia, Rohprodukt)*

A. Nitrophenylester-Methode: Man trocknet 2.9 g (1.3 mMol) *Tridecapeptidamid IIIb-hexahydrat* 2 Stdn. bei 60° i. Hochvak. und löst es sodann zusammen mit 1.7 g (1 mMol) *IIb* in 30 ccm absol. Pyridin. Dann läßt man 3 Tage bei Raumtemperatur stehen oder erwärmt 3 Stdn. auf 70–80° und fällt anschließend mit 300 ccm Essigester/Äther 4.4 g eines gelb gefärbten Rohprodukts aus, das im Exsiccator getrocknet wird.

B. Carbodiimid-Methode: 1.49 g (1 mMol) *IIa*, die durch Trocknen der essigsäurehaltigen Verbindung¹²⁾ bei 60° i. Hochvak. erhalten wurden, werden zusammen mit 2.17 g (1 mMol) *IIIa-Hexahydrat*, gewonnen aus dem essigsäuren Salz durch Lyophilisieren mit Triäthylaminhydrochlorid, nochmals 2 Stdn. bei 60° i. Hochvak. getrocknet. Dann nimmt man das Gemisch in 10 ccm absol. Pyridin auf, gibt 620 mg (3 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid zu und rührt 4 Tage bei Raumtemperatur. Anschließend fällt man das rohe Kondensationsprodukt durch Zugabe von Essigester aus und wäscht den Niederschlag mit Aceton. Ausb. 3.4 g.

¹⁸⁾ Während der Niederschrift der vorliegenden Arbeit erschien die Veröffentlichung von R. SCHWYZER und H. KAPPELER⁶⁾, in der für *IIa* als neu bestimmte Drehung $-18.8 \pm 1^\circ$ ($c = 1$ in Dimethylformamid) angegeben und die Ursache für die Differenz zum früher gefundenen Wert von $-12.4 \pm 0.8^\circ$ ($c = 1.328$ in Dimethylformamid) in der unterschiedlichen Qualität des Lösungsmittels vermutet wird. Wir fanden für *IIa* in Dimethylformamid stets Werte zwischen -13.0 und -13.6° und untersuchten nun den Einfluß einiger Zusätze auf den Drehwert. Der Zusatz von Säure oder Base wirkte sich kaum aus; die Änderung von $[\alpha]_D$ lag innerhalb der Fehlergrenzen. In anderen Gemischen ergaben sich folgende Werte:

$[\alpha]_D$: $-18.6 \pm 1.2^\circ$ ($c = 0.75$ in 90% Dimethylformamid + 10% Wasser)
 $-15.7 \pm 1.0^\circ$ ($c = 1$ in 95% Dimethylformamid + 5% Wasser)
 $-10.6 \pm 1.5^\circ$ ($c = 0.5$ in 90% Dimethylformamid + 10% Formamid)
 $-15.2 \pm 1.5^\circ$ ($c = 0.5$ in Dimethylformamid mit 0.2% Dicyclohexylharnstoff)
 $-17.7 \pm 1.0^\circ$ ($c = 1$ in 90-proz. Essigsäure)

3. *Reinigung des geschützten Tricosapeptidamids Ia an Sephadex[®]-G 25*: Man läßt 100 g Sephadex[®]-G 25, medium,¹⁵⁾ über Nacht in 2 l einer Pufferlösung quellen, die 10 ccm Essigsäure und 3 g Ammoniumacetat pro l Wasser enthält. Dann füllt man das Gel in eine Glassäule von 2 cm Durchmesser und 130 cm Länge, löst 2.0 g rohes Ia in 8 ccm Dimethylformamid, verdünnt mit 8 ccm der Pufferlösung, gibt die klare Lösung auf die Säule und eluiert mit demselben Puffer. Das Eluat wird in Fraktionen zu 10 ccm aufgefangen; der Peptidgehalt der einzelnen Fraktionen wird durch Messung der Extinktion bei 275 m μ kontrolliert. Man erhält eine der Abbildung entsprechende Elutionskurve. Bei der Reinigung eines nach 2.A. gewonnenen Rohprodukts erhielten wir zum Beispiel in der angegebenen Reihenfolge:

640 mg Tridecapeptidamid III b

930 mg Tricosapeptidamid Ia (A[⊖] = Acetat; ca. 70 I. E./mg nach Abspaltung der Schutzgruppen)

300 mg Decapeptid II a

4. *H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-NH₂, 7 CH₃CO₂H, aq. (Ib)*

A. *Abspaltung der Schutzgruppen*: 1.0 g geschütztes Tricosapeptidamid Ia wird in 8 ccm Trifluoressigsäure, der 1 Tropfen Thioglycolsäure zugesetzt wurde, 45 Min. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Man fällt das Reaktionsprodukt mit 100 ccm peroxydfreiem Äther, wäscht mit Äther und trocknet i. Vak. Ausb. 1.0 g. Nach Lösen in wenig Wasser, Filtrieren über eine kurze Säule Amberlite IRA 410-Acetat und Lyophilisieren des Filtrats erhält man 0.80 g *Ib-Acetat*.

B. *Endreinigung eines an Sephadex[®] vorgereinigten Tricosapeptidamids*

a) *durch Chromatographie an Carboxymethylcellulose⁴⁾*: 20 g Carboxymethylcellulose (Whatman) werden mit 200 ccm 0.1 n HCl in eine Säule 3.2 × 11.0 cm eingeschlämmt. Man wäscht mit Wasser Cl[⊖]-frei, belädt mit der Lösung von 600 mg *Ib-Acetat* (nach Versuch 3. und 4.A. gewonnen) in 20 ccm Wasser und eluiert bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 4 ccm/Min. nacheinander mit

0.4 l 0.10 m Ammoniumacetatpuffer pH 6.0

0.4 l 0.20 m Ammoniumacetatpuffer pH 6.5

0.4 l 0.25 m Ammoniumacetatpuffer pH 7.0

0.4 l 0.28 m Ammoniumacetatpuffer pH 8.0

0.4 l 0.30 m Ammoniumacetatpuffer pH 9.0

0.8 l 0.30 m Ammoniumacetatpuffer pH 9.2

Man nimmt Fraktionen zu 40 ccm ab, stellt diese sofort mit Eisessig auf pH 5 ein und mißt ihre UV-Absorption bei 275 m μ gegen Wasser. Die Verbindung Ib erscheint bei pH 8–9 und befindet sich in den Fraktionen 40–60. Nach zweimaligem Lyophilisieren werden 395 mg Ib mit etwa 100 I. E./mg gefunden, d. s. ungefähr 85% der eingesetzten Aktivität.

b) *durch kontinuierliche Hochspannungselektrophorese*: 200 mg rohes, nach Versuch 3. und 4.A. gewonnenes *Ib-Acetat* (auch die entsprechende Menge Trifluoracetat kann eingesetzt werden) werden in der trägerfreien Elphor VaP-Apparatur der Firma Bender & Hobein, München, in einem Puffer, der 50 g Ammoniumacetat und 25 ccm Eisessig in 10 bzw. 30 l Wasser enthält, bei 1500 V und 160 mA der Elektrophorese unterworfen. Die Substanz wird in 10 ccm Puffer gelöst und innerhalb 20 Stdn. eingepumpt (10 mg/Stde.). Bei einer Auftrennung in 48 Fraktionen – Fraktion 1 entspricht der stärksten Ablenkung – befindet sich das *Peptid Ib* in den Fraktionen 32–35 und wird durch zweimaliges Lyophilisieren gewonnen. Ausb. 125 mg mit etwa 100 I. E./mg, d. s. ungefähr 80% der eingesetzten Aktivität.

C. *Reinigung eines rohen Reaktionsproduktes Ia durch kombinierte Chromatographie an Carboxymethylcellulose und Hochspannungselektrophorese nach Abspaltung der Schutzgruppen*: 1.0 g eines nach 2.B. gewonnenen geschützten *Tricosapeptidamids Ia* (nach Abspaltung der Schutzgruppen ca. 40 I. E./mg) werden mit 20 ccm 0.05 *m* Ammoniumacetatpuffer pH 3.8 gründlich verrieben. Das Ungelöste, in dem sich das Reaktionsprodukt Ia befindet, wiegt nach dem Trocknen 790 mg. Aus dem Filtrat werden durch Lyophilisieren 180 mg nicht umgesetztes *Tridecapeptidamid III* als Rückstand erhalten. Das angereicherte *Tricosapeptidamid Ia* wird nun wie beschrieben von den Schutzgruppen befreit. Bei der anschließenden Chromatographie an Carboxymethylcellulose nach 4.B.a) erhält man 460 mg *Ib* mit ca. 75 I. E./mg, die nach erneuter Reinigung durch kontinuierliche Hochspannungselektrophorese nach Versuch 4.B.b) 315 mg *Ib* mit etwa 100 I. E./mg ergeben, d. s. ungefähr 70% der ursprünglich eingesetzten Aktivität.

Das hochgereinigte β^{1-23} -*Corticotropin-tyrosin²³-amid Ib* ist chromatographisch und elektrophoretisch einheitlich. Es besitzt mit etwa 100 I. E./mg im Sayers-Test bei intravenöser Applikation annähernd die für ähnliche Peptide gefundene biologische Aktivität^{4, 6, 10}.

$$R_F(A) 0.32-0.33 (= 1.3, \text{ bezogen auf } R_{His} = 1)$$

$$[\alpha]_D: -76.8 \pm 1.5^\circ (c = 0.5 \text{ in } 1\text{-proz. Essigsäure}).$$

Die quantitative Aminosäurebestimmung nach Totalhydrolyse mit HCl ergab (theoret. Werte in Klammern): 4.12 (4) Lys; 0.95 (1) His; 1.51 (1) NH₃; 2.92 (3) Arg; 1.69 (2) Ser 0.99 (1) Glu; 2.26 (2) Pro; 2.28 (2) Gly; 3.03 (3) Val; 1.01 (1) Met; 1.94 (2) Tyr; 1.00 (1) Phe (Bezugswert).

Das Tyr/Try-Verhältnis wurde spektrophotometrisch zu 2.03 (2.0) bestimmt¹⁹.

¹⁹ G. H. BEAVEN und E. R. HOLIDAY, *Advances in Protein Chemistry* 7, 319 [1952].