

ben ist. Die beiden wahrscheinlich aus verschiedenen Molekelteilen stammenden Abbauprodukte I und II würden 17 der 19 Kohlenstoffe des Betanidins repräsentieren.

Bei den ersten Versuchen über den Alkaliabbau sind Herr Dr. G. VINCENTI und Herr E. WETH beteiligt gewesen.

Wir danken der Firma F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel, für die grosszügige Unterstützung dieser Arbeit. Danken möchten wir auch der *Jubiläumsspende für die Universität Zürich* für einen Beitrag zur Anschaffung von Apparaturen.

SUMMARY

Two aglucones of betanin, called betanidin and *isobetanidin*, are described. Empirical formulas ($C_{19}H_{18-20}O_8N_2$) and certain structural features are deduced for them. Degradations of the aglucones are shown to yield indole and pyridine compounds.

Zürich, Chemisches Institut der Universität

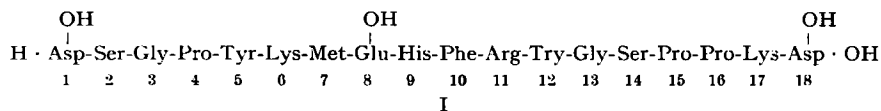
184. Synthese und biologische Aktivität von geschützten Polypeptidsequenzen des β -Melanophoren-stimulierenden Hormons (β -MSH) des Rindes

Vorläufige Mitteilung¹⁾

von R. Schwyzer, H. Kappeler, B. Iselin, W. Rittel und H. Zuber

(20. VI. 59)

Die Konstitution des β -MSH des Rindes ist nach GESCHWIND, LI & BARNAFI²⁾ die des Oktadekapeptides I. Das Rinder- β -Melanotropin unterscheidet sich von demjenigen des Schweines³⁾ durch den Ersatz der zweiten Aminosäure (Glu im letzteren) durch Serin.



Nachdem wir festgestellt hatten, dass natürliches β -MSH⁴⁾ durch die Behandlung mit Natrium in flüssigem Ammoniak nur geringfügige Abschwächung der Wirkung (und andere Veränderungen) erleidet, schritten wir zur Synthese eines Derivates des Oktadekapeptides I mit solchen Schutzgruppen (Carbobenzoxy- an N $^{\alpha}$ des Asp¹

¹⁾ Vorgetragen an der 2. Tagung der Schweiz. Gesellschaft für Biochemie in Zürich am 30. Mai 1959.

²⁾ I. I. GESCHWIND, C. H. LI & L. BARNAFI, J. Amer. chem. Soc. **79**, 1003 (1957).

³⁾ I. I. GESCHWIND, C. H. LI & L. BARNAFI, J. Amer. chem. Soc. **78**, 620 (1956); **79**, 620 (1957); J. I. HARRIS & P. ROOS, Nature **178**, 90 (1956); Biochemical J. **71**, 445 (1959).

⁴⁾ Das Präparat wurde uns in freundlicher Weise von Prof. Dr. C. H. LI (Berkeley) überlassen.

und Tos- an den N^ε der Lysinreste 6 und 17), welche durch diese Behandlung entfernt werden können. Die β-Carboxylgruppen von Asp¹ und Glu⁸ schützten wir durch Amidbildung, da nach den Erfahrungen mit synthetischem Hypertensin⁵) die biologische Wirkung durch diese Massnahme sehr wahrscheinlich nicht beeinträchtigt wird. Die beiden Carboxylgruppen von Asp¹⁸ liegen als Methylester vor (Schema 1, D 1–18), die Seitenkette des Argininrestes¹¹ ist protonisiert (Gegenion: Cl⁻).

Die Synthese erfolgte aus den drei geschützten Peptiden A 1–7, A 8–13 und A 14–18 des Schemas 1. Das geschützte Undekapeptid B 8–18 wurde aus A 8–13 und A 14–18 durch Kondensation mittels Dicyclohexyl-carbodiimid⁶) gewonnen (da in A 8–13 Gly C-endständig ist, ist die Entstehung eines Diastereomeren ausgeschlossen); es wurde mittels multiplikativer Verteilung (MV) (Schema 1) gereinigt. Die Verbindung zeigt die richtige Aminosäurezusammensetzung⁷) und die angegebene MSH-Wirkung⁸), welche *in vitro* ungefähr derjenigen des Pentapeptides H · His-Phe-Arg-Try-Gly · OH (II)⁹) entspricht, *in vivo* (wohl durch biologische Veränderung der Molekel) aber bereits die Grössenordnung derjenigen des α_b-ACTH¹⁰) erreicht.

Mit den weiteren, in Schema 1 angegebenen Reaktionen wurde D 1–18 erhalten, welches durch Verteilungschromatographie an einer Cellulosesäule gereinigt wurde. Die Verbindung zeigt (semiquantitativ) die richtige Aminosäurezusammensetzung. An der Froschhaut ist sie *in vitro* etwa 200mal aktiver als B 8–18 (und C 8–18). Die Stereochemie des Met⁷ ist noch nicht geklärt.

Die Synthese des Heptapeptides A 1–7 (Schema 1) ist in den beiden Schemata 2 und 3 dargestellt. Schema 2 zeigt die Herstellung des Tetrapeptidesters K 4–7, Schema 3 die Synthese des Carbobenzoxo-tripeptides E 1–3 und dessen Kondensation mit dem eben erwähnten Tetrapeptidester A 4–7 (Schema 3). Da die meisten Zwischenstufen kristallin erhalten wurden, ist anzunehmen, dass sie weitgehend diastereomerenfrei sind (kristallisierte Peptide und Derivate sind durch einen dicken, untern Strich im Rahmen der Formel gekennzeichnet).

Das Mittelstück (Carbobenzoxo-hexapeptid A 8–13) wurde nach einer Anzahl Methoden gewonnen, über die später zusammenfassend berichtet werden soll. Synthese aus dem optisch einheitlichen Pentapeptid II¹¹) und enzymatischer Abbau mit Leucin-Aminopeptidase sicherten die optische Reinheit.

Das Pentapeptidderivat A 14–18 (Schema 1) wurde zur Sicherung der optischen Einheitlichkeit stufenweise vom C-Ende (Asp) her aufgebaut (Schema 4). Trotz dieser Aufbaumethode und der Reinigung durch multiplikative Verteilung (MV) konnten keine höhern Peptidderivate als das Tripeptidderivat C 16–18 in kristallisierter Form erhalten werden.

⁵) Vgl. R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* **41**, 1273, 1287 (1958).

⁶) J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 1067 (1955).

⁷) In freundlicher Weise von Prof. Dr. M. BRENNER und Dr. M. WEBER (Basel) im Automaten nach MOORE & STEIN bestimmt, wofür wir bestens danken.

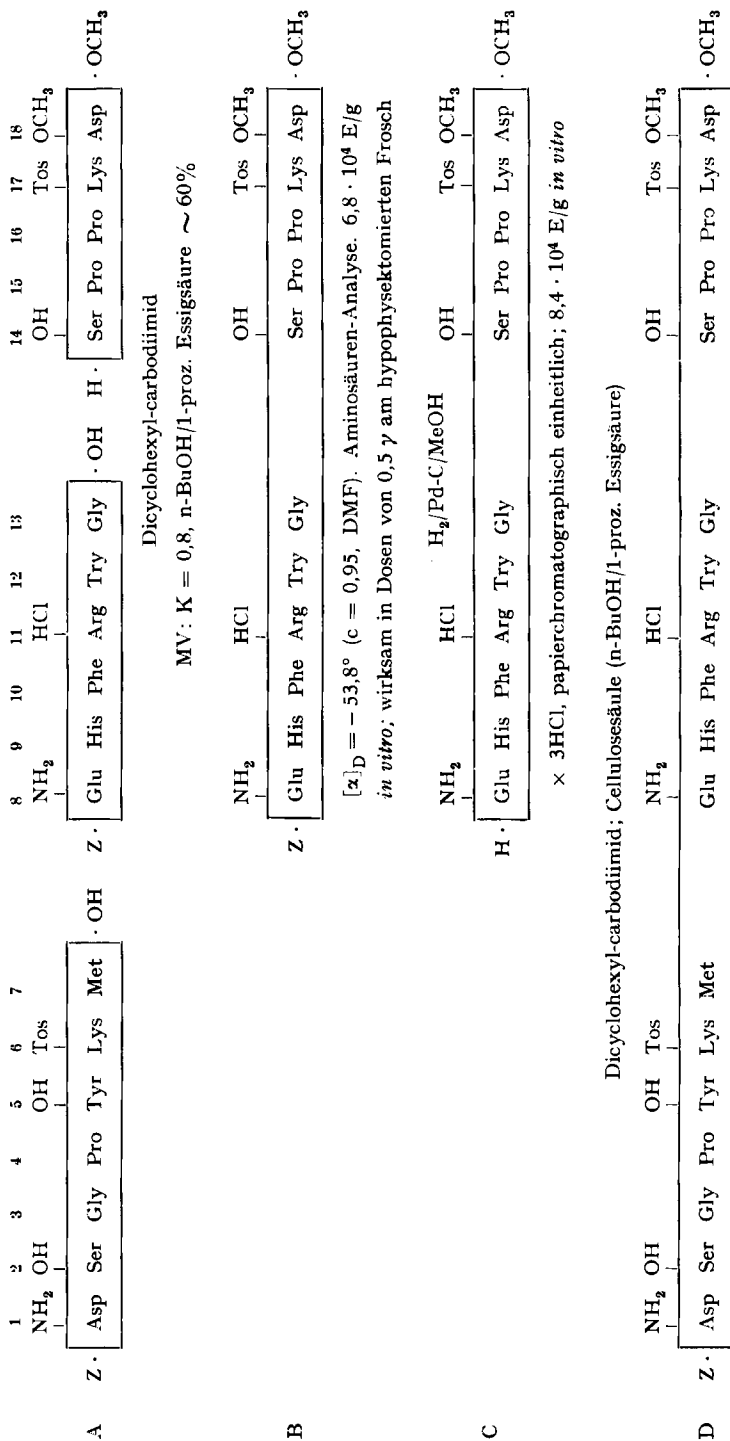
⁸) In freundlicher Weise von Prof. Dr. C. H. LI (Berkeley) bestimmt, wofür wir bestens danken.

⁹) R. SCHWYZER & C. H. LI, *Nature* **182**, 1669 (1958); II besitzt 3 · 10⁴ E/g.

¹⁰) Zur Terminologie vgl. C. H. LI, *Science* **129**, 969 (1959).

¹¹) Zum stufenweisen Aufbau von II vom C-Ende her vgl. R. SCHWYZER & C. H. LI, *Nature* **182**, 1669 (1958).

Schema 1



DMF = Dimethylformamid, Z = Carbobenzoxy-, Tos = Tosyl-, Funktionen der Seitenketten oder evtl. Schutzgruppen davon sind oberhalb der Formel angebracht.

Schema 2

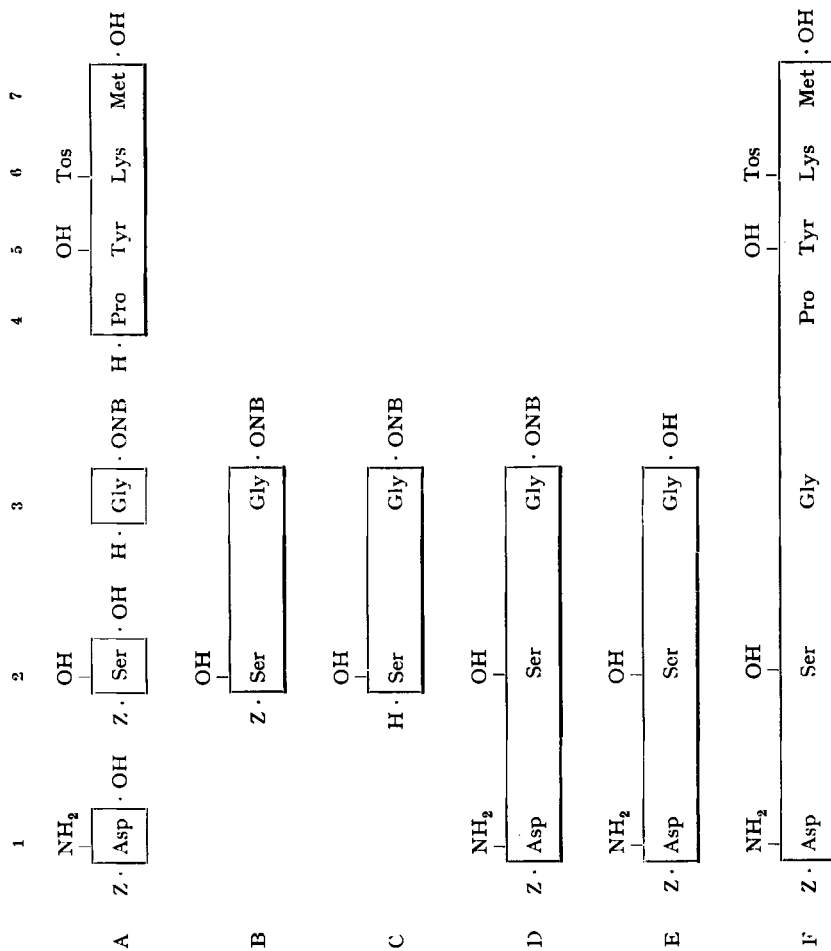
	4	5	6	7	
A	Z · Pro · OH	H · Tyr · OMe	H · Lys · OMe	H · Met · ONB	
		OH	Tos		Dicyclohexyl-carbodiimid in CH ₂ Cl ₂ ; 91%
B	Z · Pro	Tyr · OMe			Smp. 72–74°, [α] _D = -24° (c = 4,08, EtOH)
		OH			NaOH in MeOH, 94%
C	Z · Pro	Tyr · OH			Harz, nicht weiter gereinigt
		OH	Tos		Dicyclohexyl-carbodiimid, CH ₃ CN, 0°; 60%
D	Z · Pro	Tyr	Lys · OMe		Smp. 134–136°, [α] _D = -47° (c = 4,0, EtOH)
		OH	Tos		O-Acetylderiv. Smp. 109–111°, [α] _D = -42,3°
E	H · Pro	Tyr	Lys · OMe		H ₂ /Pd-C/HCl/MeOH; 87%
		OH	Tos		HCl, Smp. 198–200° (Zers.), [α] _D = -19,4° (c = 2, H ₂ O)
					freier Ester, Smp. 85–87°, [α] _D = -15,8 (c = 5, EtOH)
					(CH ₃) ₃ CO-CO-O--NO ₂ ¹³ , Py; 98%
F	BOC · Pro	Tyr	Lys · OMe		Harz, MV: einheitlich
		OH	Tos		NaOH in MeOH; 96%
G	BOC · Pro	Tyr	Lys · OH		Harz. Freies Peptid, Smp. 224–226°, [α] _D = -36,4° (c = 2,4, 0,5-n. KHCO ₃)
		OH	Tos		Dicyclohexyl-carbodiimid, CH ₃ CN, 0°; 83%
H	BOC · Pro	Tyr	Lys	Met · ONB	Harz, ca. 10% Verunreinigung
		OH	Tos		NaOH, MeOH, 83%
I	BOC · Pro	Tyr	Lys	Met · OH	Harz
		OH	Tos		2-n. HCl in Essigester; 66%
K	H · Pro	Tyr	Lys	Met · OH	Nadeln, Smp. 212–213°, [α] _D = -38,3° (c = 3,7, 0,5-n. KHCO ₃); ca. 5% Nebenprodukt (Sulfoxyd)

-ONB = p-Nitrobenzyl-¹²), Z = Carbobenzyloxy-, BOC = t-Butyloxycarbonyl-

¹²) Vgl. R. SCHWYZER & P. SIEBER, Helv. 42, 972 (1959).

¹³) G. W. ANDERSON & A. C. MC GREGOR, J. Amer. chem. Soc. 79, 6180 (1957).

Schema 3



-ONB = *p*-Nitrobenzyl¹²⁾, Z = Carbobenzoxy-, DMF = Dimethylformamid

Kond. mit Dicyclohexyl-carbodiimid in CH₂Cl₂; 70%

Smp. 121–123°, [α]_D = -8,5° (c = 2,0, AcOH)

2-n. HBr in Essigester; 79%

HBr-Salz, Smp. 148–150°,

[α]_D = +12° (c = 2,0, H₂O);

freier Ester, Smp. 94–96°

Dicyclohexyl-carbodiimid/DMF,

-10° bis 0°; 45%

Smp. 210–212°,

[α]_D = -12,2° (c = 2,4, AcOH)

NaOH, Dioxan, 67%

Smp. 185–186°

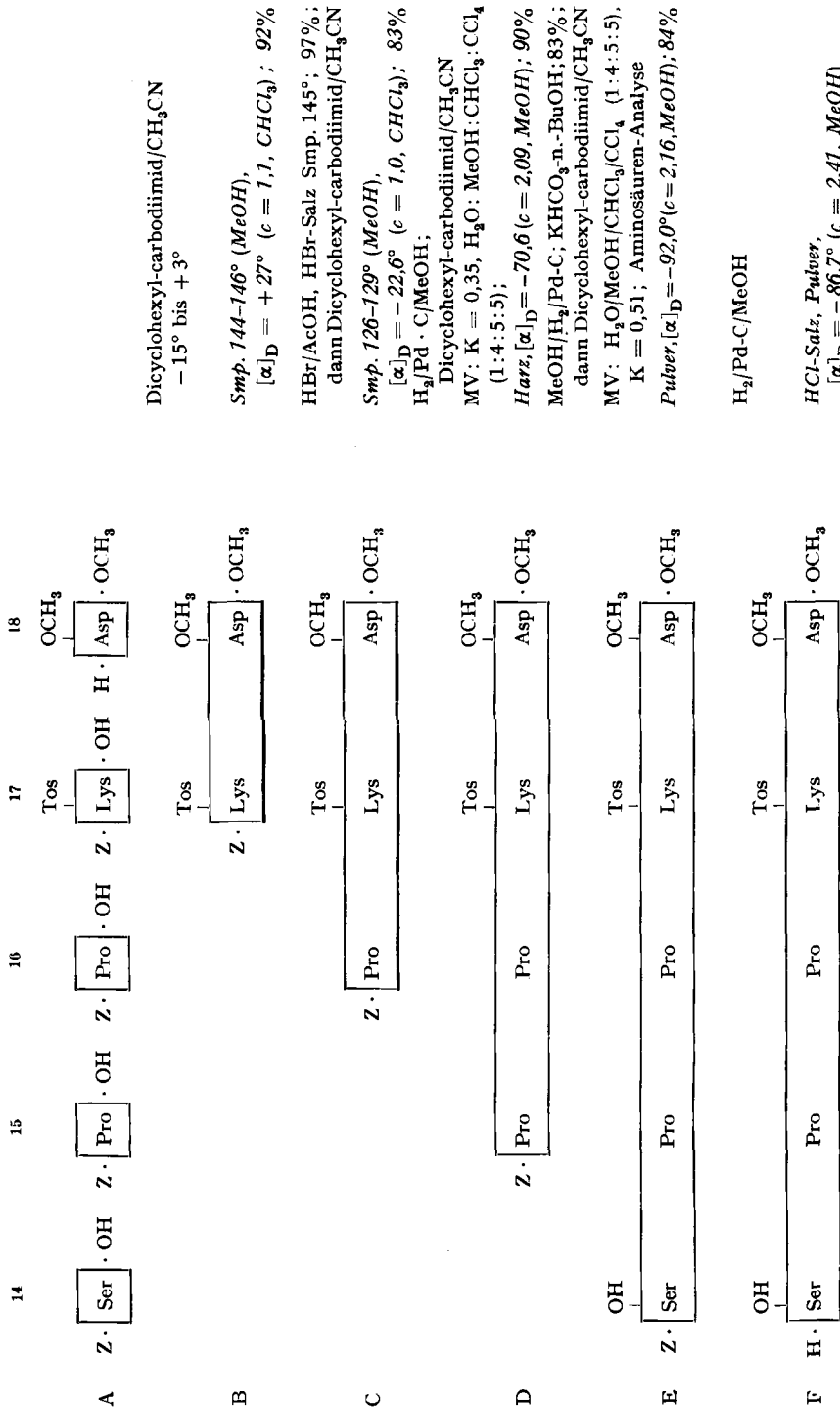
(CH₂)₂CHCH₂COCl;

MV: MeOH/H₂O/CHCl₃/CCl₄ (3:1:3:1)

Smp. 175–177° (MeOH),

[α]_D = -30,7° (c = 2,06, DMF)

Scheme 4



Z = Carbobenzoxy-

Dicyclohexyl-carbodiimid/CH₃CN

-15° bis +3°

Smp. 144-146° (MeOH),

[α]_D = +27° (c = 1,1, CHCl₃); 92%

HBr/AcOH, HBr-Salz Smp. 145°; 97%;
dann Dicyclohexyl-carbodiimid/CH₃CN

Smp. 126-129° (MeOH),

[α]_D = -22,6° (c = 1,0, CHCl₃); 83%

H₂/Pd · C/MeOH;

Dicyclohexyl-carbodiimid/CH₃CN

MV: K = 0,35, H₂O: MeOH: CHCl₃: CCl₄

(1:4:5:5);

Harz, [α]_D = -70,6 (c = 2,09, MeOH); 90%

MeOH/H₂/Pd-C; KHCO₃ · n-BuOH; 83%;

dann Dicyclohexyl-carbodiimid/CH₃CN

MV: H₂O/MeOH/CHCl₃/CCl₄ (1:4:5:5),

K = 0,51; Aminosäuren-Analyse

Pulver, [α]_D = -92,0° (c = 2,16, MeOH); 84%

H₂/Pd-C/MeOH

HCl-Salz, Pulver,

[α]_D = -86,7° (c = 2,41, MeOH)

SUMMARY

The synthesis of beef β -MSH (I) carrying protecting groups on N $^{\alpha}$ (carbobenzoxy-), N $^{\epsilon}$ (tosyl-), β -COOH (Asp 1 with β -CONH $_2$, Asp 18 with β -COOCH $_3$), γ -COOH (Glu 8 with γ -CONH $_2$), and α -COOH (Asp 18 with β -COOCH $_3$) is described. The compound elicits an activity (*in vitro*, frog skin) of 1.4×10^7 U/g as compared to 1.2×10^9 U/g for β_b -MSH and 3.7×10^7 U/g for α_3 -ACTH.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel
Pharmazeutische Abteilung

185. Cholinesterase-Modelle¹⁾

von **Elsbeth Schätzle, Max Rottenberg** und **Max Thürkauf**

(8. VI. 59)

Seit den grundlegenden Untersuchungen von LOEWI und später besonders von NACHMANSOHN²⁾ wissen wir, dass die chemischen Vorgänge bei der Nervenleitung durch den Wirkstoff Acetylcholin beherrscht werden. Zahlreiche Forscher³⁾ haben sich deshalb mit der enzymkatalysierten Hydrolyse von Acetylcholin beschäftigt. Durch fast lückenlose Messung der Cholinesterase-Aktivität in Abhängigkeit von Substratkonzentration⁴⁾, pH des Mediums⁵⁾ 6), sowie der chemischen Natur ausgewählter Substrate und Inhibitoren⁷⁾ haben sich wichtige Anhaltspunkte gewinnen lassen zur Struktur-Erforschung des aktiven Zentrums und auch schon zur Entwicklung der ersten wirksamen Gegenmittel bei Vergiftung dieser Enzyme mit «Nervengasen».

Bei allen modernen Ideen über die Substrat-Spezifität der Cholinesterasen steht das «anionische Zentrum» im Vordergrund der Betrachtungen^{3,3) 8)}. Als Beitrag zur weiteren Charakterisierung dieses immer noch hypothetischen Enzym-Bezirks untersuchen wir das hydrolytische Verhalten oxa-analoger Cholinester, das sind Substrate,

1) Über den gegenwärtigen Stand der Wissenschaft auf dem Gebiet der Enzym-Modelle unterrichten zwei kürzlich erschienene Aufsätze: a) W. LANGENBECK, *Tetrahedron* **3**, 185 (1958); b) F. H. WESTHEIMER, in *The Enzymes* (BOYER-LARDY-MYRBÄCK), 2. Aufl., Academic Press, New York 1959, S. 259–304.

2) Vgl. D. NACHMANSOHN, *Ergebnisse der Physiol.* **48**, 375–683 (1955).

3) Vgl. die Übersichtsreferate: a) D. R. DAVIES & A. L. GREEN, *Adv. Enzymol.* **20**, 283–318 (1958); b) F. BERGMANN, *Adv. Catal.* **10**, 131–164 (1958).

4) K. B. AUGUSTINSSON, *Arch. Biochemistry* **23**, 111 (1949).

5) I. B. WILSON, in *The Mechanism of Enzyme Action*, Johns Hopkins Press, Baltimore 1954, S. 642–657.

6) a) F. BERGMANN, *Faraday Soc. Discuss.* **20**, 126–134 (1955); b) F. BERGMANN, R. SEGAL, A. SHIMONI & M. WURZEL, *Biochem. J.* **63**, 684 (1956); c) F. BERGMANN, S. RIMON & R. SEGAL, *ibid.* **68**, 493 (1958).

7) S. L. FRIESS, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 3269 (1957), und frühere Arbeiten.

8) I. B. WILSON, *Faraday Soc. Discuss.* **20**, 119 (1955).