

N-Sulfanilyl-3-isopropyl-4-brom-sydnonimin (IV): Zur gerührten Lösung von 11,5 g N-Sulfanilyl-3-isopropyl-sydnonimin in 100 ml Eisessig tropft man bei Raumtemperatur langsam eine Lösung von 7 g Brom in 60 ml Eisessig und lässt anschliessend über Nacht stehen. Es setzt sich ein Öl ab, von dem die überstehende klare Lösung abgegossen wird. Man trocknet das Öl im Vakuum, löst es in 140 ml warmem Alkohol und erhält nach Abkühlen farblose Kristalle (12 g) vom Smp. 140–144° (Zers.). Nach nochmaligem Umlösen aus Alkohol ergibt sich reines N-Sulfanilyl-3-isopropyl-4-brom-sydnonimin vom Smp. 145–147° (Zers.), unlöslich in verd. wässriger Salzsäure. $C_{11}H_{13}O_3N_4BrS$ Ber. C 36,58 H 3,63 Br 22,12% Gef. C 36,95 H 3,90 Br 22,41%

Das IR.-Spektrum in Metylenchlorid zeigt in der 3μ -Region die zwei der Amingruppe zuzuordnenden Banden bei 2,85 μ und 2,93 μ , hingegen fehlt die im Spektrum des Ausgangsmaterials vorhandene C(-4)-H-Bande bei 3,14 μ . Das UV.-Spektrum in Feinsprit weist Maxima bei 265 $m\mu$ ($\epsilon = 16400$) und 306 $m\mu$ ($\epsilon = 11400$) auf.

SUMMARY

The preparation and the properties of a number of N-sulfanilyl-sydnonimines are described.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

279. Synthese von Peptid-Zwischenprodukten für den Aufbau eines corticotrop wirksamen Nonadcapeptids¹⁾

IV. Derivate der Nonapeptidsequenz Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro²⁾

von W. Rittel

(29. IX. 62)

Zur Synthese des corticotrop wirksamen Nonadcapeptids¹⁾ β^{1-19} -Corticotropin verwendeten wir Derivate der Teilsequenzen 1–10²⁾ und 11–19. Im folgenden wird die Herstellung geeigneter Derivate der letztern Sequenz beschrieben. Dabei dienen als Schutzgruppen für die N^ε-Aminofunktionen der Lysinreste die BOC-Gruppe⁴⁾ und für die Carboxylgruppe des endständigen Prolinrestes die *t*-Butylestergruppe; diese Schutzgruppen können aus den Endprodukten der Synthese durch Trifluoressigsäure in milder Weise wieder abgespalten werden. Die basischen Seitenketten der Argininreste wurden durch die hydrogenolytisch abspaltbare Nitrogruppe blockiert und die im Verlauf der Synthese wechselweise geschützten und freien α -Aminogruppen durch den Tritylrest verschlossen; wie bereits früher¹⁾ 4) festgestellt wurde,

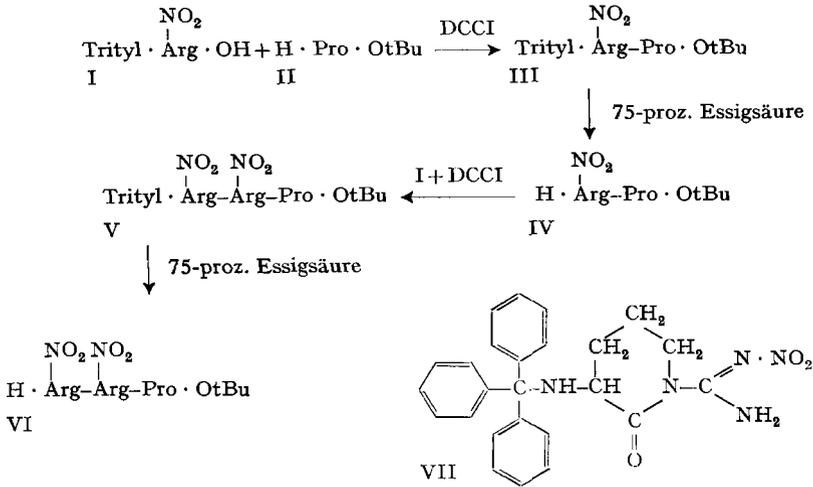
1) R. SCHWYZER, W. RITTEL, H. KAPPELER & B. ISELIN, *Angew. Chem.* 72, 915 (1960).

2) III. Mitteilung: *Helv.* 44, 1991 (1961).

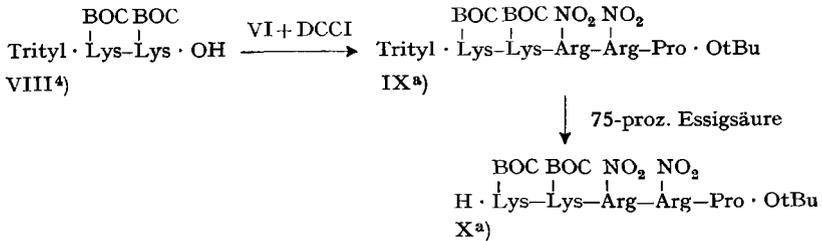
3) In dieser Arbeit erfolgt die Bezeichnung der Aminosäurereste im wesentlichen nach den Vorschlägen von E. BRAND & J. T. EDSALL, *Ann. Rev. Biochem.* 16, 223 (1947); gross geschriebene Symbole bedeuten die L-Form, klein geschriebene die D-Form. Ferner bedeuten: BOC- = *t*-Butyloxycarbonyl-, $(CH_3)_3COCO$ -; Z- = Carbobenzoxy-, $C_6H_5CH_2OCO$ -; PZ- = *p*-Phenylazo-benzyloxycarbonyl-, *p*-($C_6H_5-N=N$)- $C_6H_4-CH_2OCO$ -; OtBu- = *t*-Butyloxy-, $(CH_3)_3C-O$ -; DCCI = Dicyclohexyl-carbodiimid.

4) R. SCHWYZER & W. RITTEL, *Helv.* 44, 159 (1961).

Schema 1

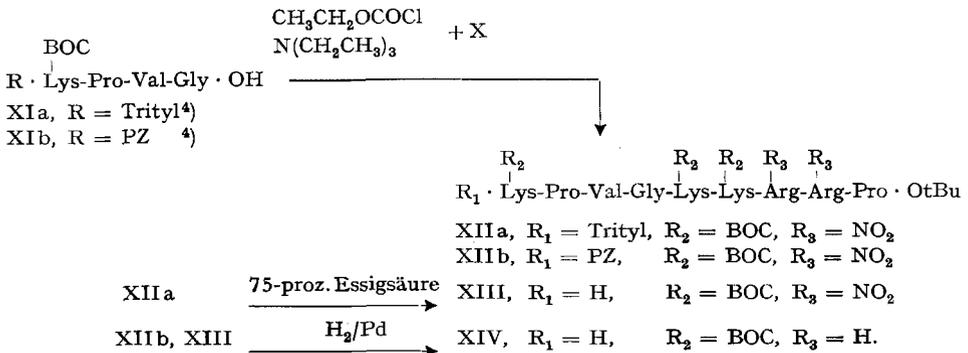


Schema 2



a) enthält 10–12% der L, D, L, L, L-Form.

Schema 3



kann die Tritylgruppe durch Einwirkung wässriger Essigsäure abgespalten werden, ohne dass dabei die ebenfalls säureempfindlichen BOC- oder OtBu-Gruppen angegriffen werden.

Die Nonapeptidsequenz 11–19 wurde, wie in den Formelschemen 1–3 angegeben, aus Derivaten der Teilsequenzen 11–14⁴⁾, 15–16⁴⁾ und aus Trityl·Arg(NO₂)-Arg-

(NO₂)-Pro·OtBu (V) aufgebaut. Zur Synthese von V dienten die neuen Aminosäure-derivate Trityl·Arg(NO₂)·OH (I) und H·Pro·OtBu (II). Tritylierung von Nitro-L-arginin nach der Methode von ZERVAS & THEODOROPoulos⁵⁾ gab I in einer Ausbeute von 38% der Theorie; II wurde nach ROESKE⁶⁾ aus freiem L-Prolin durch säurekatalysierte Veresterung mit Isobutylen dargestellt und in das kristalline Hydrochlorid übergeführt.

Zur *Reinheitskontrolle* der geschützten Peptidzwischenprodukte erwies sich die Dünnschichtchromatographie unter Verwendung organischer Lösungsmittelsysteme niedriger Polarität als besonders geeignet; dabei wurde ausgezeichnete Auftrennung erhalten; die Substanzen müssen auch nicht erst durch Abspaltung der Schutzgruppen in eine nachweisbare Form übergeführt werden (wie z. B. bei Papierchromatographie), sondern können direkt mit dem empfindlichen REINDEL-HOPPE-Reagens⁷⁾⁸⁾ sichtbar gemacht werden. Zum Nachweis der Nitroarginin-Peptide und -Derivate dienten Dünnschichtplatten, deren Schichtmaterial einen Leuchtstoff beigemischt enthielt (vgl. exp. Teil); im ultravioletten Licht erscheinen auf diesen Chromatogrammen die Nitroarginin-Derivate wegen der Absorption der Nitroguanidino-Gruppe bei 270 m μ als dunkelviolette Flecke auf hell fluoreszierendem Hintergrund.

Trityl·Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro·OtBu (V) Schema 1. Kondensation von I und II mittels Dicyclohexyl-carbodiimid⁹⁾ gab in einer Ausbeute von 58% das kristalline Dipeptidderivat III. Als Nebenprodukt wurde das schwerlösliche Lactam VII¹⁰⁾ erhalten. Nach Enttritylieren von III mit wässriger Essigsäure zum Dipeptidester IV wurde dieser erneut mit I und Dicyclohexyl-carbodiimid umgesetzt. Aus dem Rohprodukt wurde wieder Lactam VII und nach Gegenstromverteilung das reine, amorphe Tripeptidderivat V in einer Ausbeute von 43% erhalten. Abspaltung der Trityl- und OtBu-Gruppe mit konz. HCl führte V in papierchromatographisch reines H·Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro·OH über; Leucinaminopeptidase spaltete dieses Tripeptid vollständig in Nitroarginin und Nitroarginyl-prolin; das Enzym griff das letztere Dipeptidderivat erwartungsgemäss¹¹⁾ nicht an. V wurde in gleicher Weise wie III zum Tripeptidester VI enttrityliert.

Trityl·Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro·OtBu (IX) (Schema 2). Dieses Pentapeptidderivat wurde aus VI und VIII mittels Dicyclohexyl-carbodiimid hergestellt. Gegenstromverteilung des Rohproduktes gab dünn-schichtchromatographisch reines, amorphes IX in einer Ausbeute von 43%. Nach Abspalten der Trityl-, BOC- und OtBu-Gruppen mit konz. HCl und Inkubation des dabei erhaltenen Lysyl-lysyl-nitroarginyl-nitroarginyl-prolins mit Leucinaminopeptidase blieben 10–12% des Pentapeptids vom Enzym ungespalten. IX enthält somit ein

⁵⁾ J. Amer. chem. Soc. 78, 1359 (1956).

⁶⁾ Chemistry & Ind. 1959, 1121.

⁷⁾ In der Ausführungsform von C. G. GREIG & D. H. LEABACK, Nature 188, 310 (1960).

⁸⁾ E. VON ARX & R. NEHER, unveröffentlichte Versuche.

⁹⁾ J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. 77, 1067 (1955).

¹⁰⁾ Ein ähnliches Nebenprodukt bei Verwendung von Z·Arg(NO₂)·OH beobachteten M. BODANSKY & J. C. SHEEHAN, Chemistry & Ind. 1960, 1268, sowie R. PAUL, G. W. ANDERSON & F. M. CALLAHAN, J. org. Chemistry 26, 3347 (1961).

¹¹⁾ Zur Spezifität der Leucinaminopeptidase vgl. E. L. SMITH & H. D. SPACKMAN, J. biol. Chemistry 212, 27 (1955), oder auch H. ZUBER, Chimia 14, 405 (1960).

Diastereomeres, vermutlich die *L,D,L,L,L*-Form; diese dürfte durch partielle Racemisierung des carboxyl-endständigen Lysinrests in VIII bei der Carbodiimid-Kondensation entstanden sein. Eine Abtrennung des racemisierten Materials gelang erst beim Nonapeptidderivat XIIa. Durch wässrige Essigsäure wurde IX zum Pentapeptidester X enttrityliert.

Trityl-Lys(BOC)-Pro-Val-Gly-Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro-OtBu (XIIa) (Schema 3). Kondensation von XIa und X mittels der Methode der gemischten Anhydride gab das Nonapeptidderivat XIIa als in organischen Lösungsmitteln schwerlösliches Pulver, welches nach Dünnschichtchromatographie einheitlich war. XIIa wurde durch wässrige Essigsäure zum papierchromatographisch und elektrophoretisch reinen Nonapeptidester XIII enttrityliert. Katalytische Hydrierung von XIII entfernte die beiden Nitrogruppen; das dabei erhaltene XIV war nach Papier-Chromatographie und -Elektrophorese einheitlich. Zur Prüfung auf optische Reinheit wurde nach Totalhydrolyse das erhaltene Aminosäuregemisch einem Abbau mit L-Aminosäureoxydase unterworfen; die gesamte ursprünglich vorhandene Menge Lysin wurde dabei abgebaut. Da auf Grund des eingeschlagenen Syntheseweges Racemisierung an einer andern Stelle als beim Lys¹⁶ nicht wahrscheinlich ist, zeigt dieser Versuch, dass die Derivate XIIa, XIII und XIV im Gegensatz zu IX und X kein racemisiertes Material mehr enthielten, sondern in optisch reiner Form vorlagen. Bei der Reinigung des Rohprodukts XIIa wurden somit etwa vorhandene Diastereomere als in organischen Lösungsmitteln leichter löslich von der schwer löslichen «alles-L-Form» abgetrennt.

Zur weiteren Verarbeitung wurde das als essigsäures Salz erhaltene Nonapeptidderivat XIV in das zur Synthese des Nonadecapeptids besser geeignete Tritosylat übergeführt.

PZ-Lys(BOC)-Pro-Val-Gly-Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro-OtBu (XIIb) (Schema 3). Die Synthese von XIIb erfolgte in analoger Weise zu derjenigen von XIIa aus den Teilsequenzen XIb und X, die Ausbeute betrug 58% der Theorie. Katalytische Hydrierung führte XIIb unter Entfernung des PZ-Restes und der beiden Nitrogruppen in das Derivat XIV über, welches mit dem aus XIIa erhaltenen Produkt identisch war.

Synthesen der Nonapeptidsequenz 11–19 unter Verwendung anderer Schutzgruppen und eines andern Aufbauwegs sind auch von KAPPELER & SCHWYZER¹²⁾ sowie von LI und Mitarbeitern¹³⁾ beschrieben worden.

Herrn Prof. Dr. R. SCHWYZER möchte ich für sein stetes Interesse und für die Förderung dieser Arbeit herzlich danken.

Experimenteller Teil

Die Smp. sind auf einem Smp.-Block nach Dr. TOTTOLI (der Firma W. BÜCHI, Flawil) bestimmt und unkorrigiert. «Übliche Aufarbeitung» bedeutet: Aufnehmen in Essigester oder Chloroform, Waschen (unter Eiskühlung) mit verdünnter Zitronensäurelösung, Wasser, NaHCO₃-Lösung und Wasser, Trocknen mit Natriumsulfat und Eindampfen.

¹²⁾ Helv. 44, 1136 (1961).

¹³⁾ C. H. LI, J. MEIENHOFER, E. SCHNABEL, D. CHUNG, T.-B. LO & J. RAMACHANDRAN, J. Amer. chem. Soc. 82, 5760 (1960).

Zur Papierchromatographie¹⁴⁾ (auf WHATMAN-Papier Nr. 1) dienten folgende Lösungsmittelsysteme (Zahlenangaben bedeuten Volumteile, wo nichts anderes angegeben):

System 40: *n*-Butanol-Äthanol-Wasser 2:2:1.

System 41: *n*-Butanol-*tert.*-Butanol-Wasser 4:3:3.

System 42: *n*-Propanol-Essigester-Wasser 7:1:2.

System 45: *sec.*-Butanol-3% NH₃ 100:44.

System 49: *sec.*-Butanol-Isopropanol-Triäthylamin-Diäthylbarbitursäure-Wasser
100:10:0,2:1,8 g:60 (pH:8–9).

System 54: *sec.*-Butanol-Isopropanol-Monochloressigsäure-Wasser 70:10:3 g:40.

System 87: Isopropanol-Ameisensäure-Wasser 20:1:5.

Dünnschichtchromatographie¹⁴⁾: dem zur Herstellung der Platten verwendeten Silicagel (der Firma MERCK, Darmstadt) wurden 15–20% Leuchtstoff S 5, grün (Leuchtstoffwerk Heidelberg), beige mischt. Die Chromatogramme wurden zur Lokalisierung der Nitroarginin-Peptide und -Derivate erst unter der UV.-Lampe (Filter: 240 m μ) ausgewertet und dann zum Nachweis des gesamten Peptidmaterials mit REINDEL-HOPPE-Reagens⁷⁾ entwickelt.

Trityl · Arg(NO₂) · OH (I). Eine Lösung von 32,9 g (0,15 Mol) Nitro-L-arginin¹⁵⁾ in 150 ml 1N Natronlauge, 33 ml Diäthylamin und 330 ml Isopropanol wurde unter intensivem Rühren im Verlauf von 1 Std. mit 56 g (0,20 Mol) Triphenylchlormethan versetzt und weitere 3 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde das ungelöste Material abgenutscht, das Filtrat mit 500 ml Wasser versetzt und im Vakuum vom Isopropanol befreit. Die trübe wässrige Lösung wurde durch Waschen mit Äther und Filtration geklärt, hierauf mit viel Essigester überschichtet, in Eis gekühlt und mit fester Zitronensäure angesäuert, Das dabei ausfallende I wurde im Essigester aufgenommen, die Essigesterlösung mit Eiswasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und bei 25° Badtemperatur eingedampft. Der Eindampfrückstand (rohes I) wurde mit wenig eiskaltem Methanol angeteigt und das Produkt sofort durch Zugabe von viel Äther ausgefällt. Das anfänglich amorphe I wurde unter Eiskühlung zerrieben, wobei es kristallin erstarrte. Die Ausbeute betrug 26,6 g (38,5% d. Theorie), Smp. 145–152°.

C₂₅H₂₇O₄N₅ (461,51) Ber. C 65,06 H 5,90 N 15,18% Gef. C 64,87 H 6,16 N 15,32%

I zersetzt sich in Lösung rasch (Abspaltung der Tritylgruppe), es wurde deshalb auf weitere Umkristallisation verzichtet.

H · Pro · OtBu (II). – a) *Hydrochlorid*: In einem Druckgefäß wurden 5,0 g (43,4 mMol) trockenes L-Prolin, 150 ml trockenes Chloroform und 5 ml konz. H₂SO₄ bei –20° mit 150 ml flüssigem Isobutylem versetzt und die Mischung unter Druckverschluss bei Raumtemperatur so lange geschüttelt, bis klare Lösung eintrat (2–4 Tage). Nach Abkühlen des Gefäßes wurde das überschüssige Isobutylem im Vakuum abdestilliert und die verbleibende Chloroformphase mit eiskalter, gesättigter Pottasche- und Natriumsulfat-Lösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Eine Probe des öligen Rückstandes wurde mit Säure titriert, wobei sich ein Gehalt von 34,5 mMol (entsprechend 80% d. Theorie) an freiem Ester II ergab. Zur Reinigung wurde das Produkt in das kristalline Hydrochlorid übergeführt; dazu wurde das Öl in Methanol gelöst, bei –15° mit der genau berechneten Menge HCl in Methanol versetzt und die Lösung eingedampft. Der Rückstand gab aus Benzol-Äther 6,88 g des Hydrochlorids von II in Prismen, Smp. (70°) 107–108° (Ausbeute 76%). Zur Analyse wurde aus Aceton-Äther und Methanol-Äther umkristallisiert: Smp. 108–111°; $[\alpha]_D^{25} = -27° \pm 1°$ ($c = 1,036$ in Methanol).

C₉H₁₈O₂NCl (207,70) Ber. C 52,04 H 8,74 Cl 17,07% Gef. C 51,74 H 8,55 Cl 16,83%

In andern Ansätzen zeigte das Rohkristallinat einen Smp. von 70–95°; aus diesem Material wurde die höherschmelzende Form (Smp. 107–109°) durch Kristallisation aus Benzol-Äther und Animpfen gewonnen.

b) *freier Ester II*: Dieser wurde aus dem Hydrochlorid in üblicher Weise¹⁶⁾ mittels Äther-Pottasche in einer Ausbeute von 95% erhalten; das Produkt ist ein Öl.

¹⁴⁾ In verdankenswerter Weise ausgeführt in unserem Papierchromatographie-Laboratorium unter der Leitung der Herren Dr. R. NEHER und E. VON ARX.

¹⁵⁾ K. HOFMANN, W. D. PECKHAM & A. RHEINER, J. Amer. chem. Soc. 78, 238 (1956).

¹⁶⁾ E. FISCHER, Ber. deutsch. chem. Ges. 34, 436 (1901).

Trityl · Arg(NO₂)-Pro · OtBu (III). Zu einer Lösung von 17,8 g (0,104 Mol) II und 46,0 g (0,104 Mol) I in 500 ml Acetonitril wurde bei -15° 21,5 g (0,014 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid gegeben. Nach 1 Std. bei -15° und 3 Tagen bei 2° wurde das ausgeschiedene Kristallisat (17,8 g, Smp. ca. 208–222 $^{\circ}$, Gemisch von Dicyclohexylharnstoff und Lactam VII) abgenutscht und das Filtrat eingedampft. Der Eindampfrückstand wurde mit Petroläther zerrieben und die unlöslichen Anteile in Essigester wie üblich neutral gewaschen. Der Neutralteil (64,3 g Harz) wurde mit 300 ml eiskaltem Methanol versetzt, wobei 3,5 g *Lactam VII*, Smp. 171–175 $^{\circ}$, ungelöst blieben¹⁷⁾. Das gelbliche Methanolfiltrat wurde mit Tierkohle entfärbt und eingedampft. Der Eindampfrückstand gab aus Aceton-Äther 31,6 g III in Nadeln vom Smp. (161 $^{\circ}$) 163–168 $^{\circ}$; aus der Mutterlauge kristallisierten nach Einengen noch 1,1 g weniger reines Material, Smp. (148 $^{\circ}$) 157–165 $^{\circ}$. Die Ausbeute an kristallinem III betrug 58%. Umkristallisation der beiden Kristallfraktionen aus Aceton-Äther und aus Aceton lieferte 25,1 g reines III, Smp. 174–177 $^{\circ}$. Zur Analyse wurde noch zweimal aus Aceton-Äther kristallisiert: Smp. 176–178 $^{\circ}$; $[\alpha]_D^{25} = +37^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($c = 1,24$ in Methanol).

$C_{34}H_{42}O_5N_6$ (614,72) Ber. C 66,43 H 6,89 N 13,67% Gef. C 66,17 H 6,86 N 13,80%

Bei Dünnschichtchromatographie zeigte III einen Fleck, Rf-Wert = 0,59 (Chloroform-Aceton 7:3); = 0,64 (Dioxan); = 0,80 (Methanol) (REINDEL-HOPPE-Reagens, UV.-Fluoreszenz).

H · Arg(NO₂)-Pro · OtBu (IV). 2,58 g (4,20 mMol) III wurden in 40 ml 75-proz. Essigsäure gelöst und 30 Min. bei 30 $^{\circ}$ belassen. Nach Abnutschen des ausgeschiedenen Triphenylcarbinols und Eindampfen des Filtrats wurde der Rückstand zur Entfernung des restlichen Triphenylcarbinols mit Äther zerrieben, wobei 1,78 g des essigsäuren Salzes von IV als Pulver vom Smp. 57–75 $^{\circ}$ ungelöst blieben (98% der Theorie). Zur Überführung in den freien Ester IV wurden 1,49 g des Acetats in wassergesättigtem *n*-Butanol gelöst und die Lösung mit 20% Pottasche- und mit gesättigter Natriumsulfat-Lösung gewaschen; die wässrigen Phasen passierten einen zweiten Scheidetrichter mit *n*-Butanol. Die vereinigten Butanolphasen gaben nach Trocknen mit Natriumsulfat und Eindampfen 1,22 g (94%) IV als farbloses Harz.

Die Substanz erwies sich bei Papierchromatographie (Rf-Wert = 0,66 (System 40); = 0,73 (System 54)) und bei Dünnschichtchromatographie (Rf-Wert = 0,22 (Methanol); = 0,05 (Chloroform-Methanol 9:1); = 0,20 (Dioxan-Wasser 9:1)) als einheitlich (Ninhydrin, REINDEL-HOPPE-Reagens, UV.-Fluoreszenz).

Trityl · Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro · OtBu (V). 2,61 g I (5,66 mMol) und 2,10 g IV (5,62 mMol) wurden mit 40 ml Acetonitril versetzt und auf -15° gekühlt, wobei das Salz aus den beiden Peptidderivaten als gallertiger Niederschlag ausfiel. Nach Zugabe von 1,17 g (5,66 mMol) DCCI wurde 1 Std. bei -15° und 3 Tage bei 2° gerührt; dabei löste sich der gallertige Niederschlag wieder auf und Dicyclohexylharnstoff kristallisierte aus. Er wurde abgenutscht (1,01 g, 81%) und das Filtrat zur Trockne verdampft. Der Eindampfrückstand wurde in Essigester gelöst und wie üblich neutral gewaschen. Zur Reinigung wurden die neutralen Anteile erst aus Aceton-Äther umgefällt und dann mit wenig Methanol versetzt, wobei 160 mg *Lactam VII* (Smp. 173–183 $^{\circ}$) ungelöst blieben. Die methanollöslichen Anteile (2,84 g) wurden einer multiplikativen Verteilung über 54 Stufen im System Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff-Methanol-Wasser 5:5:8:2 unterworfen.

Nach Dünnschichtchromatographie (vgl. unten) der einzelnen Fraktionen befand sich das reine Tripeptidderivat V in den Fraktionen 17–27 (Gewichtsamaximum der Verteilungskurve in Fraktion 21, Verteilungszahl $K = 0,64$). Diese Fraktionen wurden vereinigt und gaben nach Umfällen aus Aceton-Äther 1,99 g analysenreines V (Ausbeute 43%) als festes Pulver vom Smp. 136–160 $^{\circ}$; $[\alpha]_D^{27} = -31,2^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($c = 0,801$ in Methanol).

$C_{40}H_{53}O_8N_{11}$ (815,95) Ber. C 58,88 H 6,55 N 18,88% Gef. C 58,87 H 6,55 N 18,92%

Bei Dünnschichtchromatographie zeigte das Produkt einen Fleck, Rf-Wert = 0,02 (Chloroform-Aceton = 7:3); = 0,29 (Dioxan); = 0,77 (Methanol) (REINDEL-HOPPE-Reagens, UV.-Fluoreszenz). Abspalten der Trityl- und OtBu-Gruppe mit konz. HCl (10 Min. bei 40 $^{\circ}$) gab papierchromatographisch einheitliches *H · Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro · OH*, Rf-Wert = 0,43 (System 54); = 0,44 (System 87) (Ninhydrin). Leucinaminopeptidase¹⁸⁾ spaltete dieses Tripeptidderivat vollständig in Nitroarginin und Nitroarginyl-prolin.

¹⁷⁾ Umkristallisieren aus Methanol und Aceton-Äther gab analysenreines VII, Smp. 192–194 $^{\circ}$.
 $C_{25}H_{25}O_3N_5$ (443,49) Ber. C 67,70 H 5,68 N 15,79% Gef. C 67,87 H 5,84 N 15,76%.

H · Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro · OtBu (VI). 3,80 g (4,65 mMol) V wurden in 80 ml 75-proz. Essigsäure wie bei IV angegeben enttrityliert. Analoge Aufarbeitung ergab 2,35 g (88%) freien Tripeptidester VI als Harz. Bei Papierchromatographie zeigte VI nur *einen* Fleck, Rf-Wert = 0,82 (System 49); das Material war auch nach Dünnschichtchromatographie einheitlich, Rf-Wert = 0,01 (Chloroform-Methanol 9:1); = 0,26 (Dioxan-Wasser 9:1); = 0,25 (Methanol) (Ninhydrin, REINDEL-HOPPE-Reagens, UV.-Fluoreszenz).

Trityl · Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro · OtBu (IX). Eine auf -15° gekühlte Lösung von 2,04 g (2,84 mMol) VIII⁴) und 1,68 g (2,93 mMol) VI in 15 ml Dimethylformamid und 80 ml Acetonitril wurde mit 0,88 g (4,26 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt und dann 15 Min. bei -15° und 4 Tage bei 2° belassen. Hierauf wurde der ausgeschiedene Dicyclohexylharnstoff abgenutscht (537 mg), das Filtrat eingedampft und der Rückstand in Essigester wie üblich neutral gewaschen. Der Neutralteil wurde zur Abtrennung des überschüssigen DCCI mit Petroläther und Äther zerrieben und das ungelöste Material (2,18 g) einer multiplikativen Verteilung über 66 Stufen im System Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff-Methanol-Wasser = 5:5:8:2 unterworfen. Nach Dünnschichtchromatographie der einzelnen Fraktion war das reine Pentapeptidderivat IX in den Fraktionen 14–28 (Maximum der Gewichtskurve in Fraktion 21, $K = 0,44$) enthalten. Diese Fraktionen gaben nach Umfällen aus Aceton-Äther 1,71 g (60%) IX als festes Pulver vom Smp. (110°), 128–155 $^{\circ}$; $[\alpha]_D^{25} = -42,4^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($c = 1,01$ in Methanol).

C₈₂H₉₃O₁₄N₁₅ (1272,55) Ber. C 58,52 H 7,37 N 16,51% Gef. C 58,13 H 7,54 N 16,42%

Das Produkt war nach Dünnschichtchromatographie einheitlich, Rf-Wert = 0,75 (Methanol); = 0,52 (Dioxan); = 0,09 (Chloroform-Methanol 19:1) (REINDEL-HOPPE-Reagens, UV.-Fluoreszenz).

IX wurde durch konz. HCl (10 Min. bei 40°) unter Abspaltung der Trityl-, BOC- und OtBu-Gruppen in *Lysyl-lysyl-nitroarginyl-nitroarginyl-prolin* übergeführt, welches bei Papierelektrophorese (3000 V; pH = 1,9; 60 Min.) eine Laufstrecke von 16,1 cm zeigte. Leucinaminopeptidase¹⁸) spaltete die Hauptmenge dieses Pentapeptidderivates in Lysin, Nitroarginin und Nitroarginyl-prolin. In mehreren Versuchen mit verschiedenen Enzymkonzentrationen blieben stets 10–12%¹⁹) des Pentapeptids unhydrolysiert.

H · Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro · OtBu (X). 1,02 g (0,803 mMol) IX wurden wie bei IV beschrieben enttrityliert. Analoge Aufarbeitung ergab 665 mg X (80%) als farbloses Harz. Das Material war nach Papierchromatographie (Rf-Wert = 0,85 (System 40); = 0,95 (System 45)) und nach Dünnschichtchromatographie (Rf-Wert = 0,52 (Methanol); = 0,63 (Dioxan-Wasser 9:1)) einheitlich (Ninhydrin, REINDEL-HOPPE-Reagens, UV.-Fluoreszenz).

Trityl · Lys(BOC)-Pro-Val-Gly-Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro · OtBu (XIIa). Eine Lösung von 5,72 g (7,70 mMol) getrocknetem XIa⁴) und 1,13 ml (8,10 mMol) absolutem Triäthylamin in 100 ml absolutem Tetrahydrofuran wurde bei -15° versetzt mit 0,73 ml (7,70 mMol) Chlorameisensäure-äthylester und 30 Min. bei -15° belassen (Abscheidung von Triäthylaminhydrochlorid). Hierauf wurde unter Rühren eine auf -15° gekühlte Lösung von 5,30 g (5,13 mMol) X in 100 ml absolutem Tetrahydrofuran zuge tropft und das Reaktionsgemisch 18 Std. bei 2° belassen. Der Hauptteil des Nonapeptidderivats XIIa schied sich dabei in gallertiger Form aus. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und unter Zentrifugieren mit wenig Tetrahydrofuran gewaschen (Verarbeitung der Tetrahydrofuranlösung vgl. unten). Die tetrahydrofuran-unlöslichen Anteile wurden zur Entfernung von Triäthylaminhydrochlorid mit Wasser zerrieben, abgenutscht und getrocknet. Zur weiteren Reinigung wurde das Rohprodukt unter jeweiligem Zentrifugieren mehrmals mit Aceton und dann Methanol zerrieben, wobei 3,90 g des reinen Nonapeptidderivats XIIa als methanol-schwerlösliches, feinkörniges Pulver vom Smp. 168–180 $^{\circ}$ erhalten wurden.

Die bei der Aufarbeitung der Reaktionsmischung erhaltene Tetrahydrofuranlösung wurde auf ein kleines Volumen eingengt, wobei eine zweite Fraktion rohes, gallertiges XIIa anfiel. Es wurde abzentrifugiert und, wie oben beschrieben, gereinigt; dabei wurden noch 0,84 g XIIa erhalten (Gesamtausbeute 52%).

¹⁸) Die Ausführung der enzymatischen Abbauprobe und die Gewinnung des Enzympräparates geschah nach den Angaben von R. L. HILL, D. H. SPACKMAN, D. M. BROWN & E. L. SMITH, *Biochem. Preparations* 6, 35 (1958). Die Vorschrift zur Isolierung wurde bis und mit der Acetonfällung befolgt; das Enzym besass eine spezifische Aktivität von $C_1 = 15$.

Zur Analyse wurde aus Dimethylformamid-Aceton umgefällt: Smp. 173–182°; $[\alpha]_D^{25} = -15,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,846$ in Dimethylformamid). UV.-Spektrum; $\lambda_{max} = 272 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,50$. $C_{85}H_{132}O_{20}N_{20}$ (1754,15) Ber. C 58,20 H 7,59 N 15,97% Gef. C 57,89 H 7,32 N 15,88%

Bei Dünnschichtchromatographie zeigte XIIa nur 1 Fleck, Rf-Wert = 0,54 (Chloroform-Methanol 9:1); = 0,79 (Dioxan-Wasser 9:1) (REINDEL-HOPPE-Reagens, UV.-Fluoreszenz). Abspaltung der Trityl-, BOC- und OtBu-Gruppen mit konz. HCl (10 Min. 40°) gab *H-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro-OH*, welches bei Papierelektrophorese (3000 V; pH = 1,9; 60 Min.) einheitlich war (Laufstrecke 18 cm).

H-Lys(BOC)-Pro-Val-Gly-Lys-Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro-OtBu (XIII). 400 mg (0,228 mMol) XIIa wurden wie bei IV beschrieben enttrityliert und gaben 353 mg (98%) des essigsäuren Salzes von XIII als ätherunlösliches Pulver, Smp. 118–151°. Bei Dünnschichtchromatographie zeigte das Material nur 1 Fleck, Rf-Wert = 0,48 (Methanol); = 0,52 (Dioxan-Wasser 9:1) (Ninhydrin, REINDEL-HOPPE-Reagens, UV.-Fluoreszenz). Die Überführung des Acetats in den freien Nonapeptidester XIII geschah wie bei IV beschrieben (Ausbeute 94%).

H-Lys(BOC)-Pro-Val-Gly-Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg-Arg-Pro-OtBu (XIV). 333 mg (0,213 mMol) XIII (essigsäures Salz) wurden in 10 ml 75-proz. Essigsäure gelöst und in Gegenwart von 100 mg Pd-C (10% Pd) hydriert. Nach 8¹/₂ Std. und Aufnahme von 33,3 ml (ber. 38,2 ml²⁰) kam die Hydrierung zum Stillstand. Hierauf wurde vom Katalysator abgenutscht, das Filtrat eingedampft und der Rückstand zur Entfernung des bei der Hydrierung gebildeten Ammonium- und Hydroxylamin-acetats unter jeweiligem Lösen in wenig Wasser mehrmals lyophilisiert. Das dabei erhaltene Triacetat von XIV (200 mg) wurde in 5 ml Pyridin gelöst, 90 mg *p*-Toluolsulfonsäure zugegeben und die Lösung eingedampft. Zerreiben des Rückstands mit Aceton gab das Tritosylat von XIV als festes Pulver vom Smp. (122°) 130–150°; $[\alpha]_D^{25} = -41,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,97$ in Methanol).

$C_{87}H_{144}O_{25}N_{19}S_3$ (1938,40) Ber. S 4,96% Gef. S 5,11%

Elektrometrische Titration (in 80-proz. Methylcellosolve): Äq.-Gew.: 1910; $pK_m = 6,64$. – Das Produkt zeigte bei Papierelektrophorese einen Fleck, Laufstrecke = 14,4 cm (3000 V; pH = 1,9; 60 Min.); bei Papierchromatographie Rf-Wert = 0,91 (System 40); = 0,87 (System 41); = 0,86 (System 42). – Quant. Aminosäurebestimmung (Totalhydrolyse mit 6N HCl) gab ein molares Aminosäureverhältnis von Lys 3,00, Arg 1,75, Pro 1,98, Gly 1,00, Val 1,04 (NH₃ 0,065).

Abbau mit L-Aminosäureoxydase²¹): 12 mg des Gemischs der Aminosäure-hydrochloride (enth. 2540 γ (17,4 mMol) Lysin) aus obigem Totalhydrolysat wurden mit 0,09 ml 1N LiOH und 0,33 ml 0,2M Tris-hydroxymethyl-aminomethan-Puffer (pH = 7,2/37°) versetzt und 0,1 ml einer 10-proz. Lösung des Enzyms im gleichen Puffer sowie ein Tröpfchen Toluol zugegeben. Hierauf wurde in einer O₂-Atmosphäre 36 Std. bei 38° gerührt. Nach dieser Zeit wurden 0,02 ml der Lösung (urspr. Lysin-Gehalt: 100 γ) entnommen und direkt dünnschichtchromatographisch untersucht; dabei liess sich kein Lysin mehr feststellen (nachweisbare Menge: 0,5–1 γ Lysin).

PZ-Lys(BOC)-Pro-Val-Gly-Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro-OtBu (XII b). 640 mg (0,865 mMol) XI b⁴) und 0,125 ml (0,90 mMol) abs. Triäthylamin wurden in einem Gemisch von 5 ml abs. Tetrahydrofuran und 5 ml abs. Dimethylformamid gelöst und die auf –5° gekühlte Lösung mit 0,082 ml (0,87 mMol) Chlorameisensäure-äthylester versetzt. Es wurde 30 Min. bei –5° gerührt, hierauf eine Lösung von 715 mg (0,695 mMol) X in 10 ml Dimethylformamid zugegeben und das Reaktionsgemisch 22 Std. bei Raumtemperatur belassen. Dann wurde im Vakuum zur Trockne verdampft, der Rückstand mit verdünnter NaHCO₃-Lösung und

¹⁹) Die Bestimmung erfolgte mittels Papierelektrophorese; die mit Ninhydrin entwickelten Pherogramme wurden mit Cu(NO₃)₂-Lösung fixiert, die Flecke mit Methanol eluiert und die Farbintensität der Lösung colorimetrisch (bei 507 m μ) gemessen unter Vergleich mit einer aus dem Pentapeptidderivat hergestellten Standardkurve.

²⁰) Der berechnete Wert beruht auf Annahme eines Verbrauchs von 4 Mol. H₂ pro Nitroargininrest, d. h. von Arginin und NH₃ als Endprodukten der Hydrierung. In obigem Versuch waren zum Schluss neben NH₃ aber merkliche Mengen Hydroxylamin vorhanden (Nachweis mit GRIESS'schem Reagens, vgl. F. FEIGL, Spot Tests in Inorganic Analysis, 1958, p. 245), welches unter den angewendeten Bedingungen nicht weiter reduziert wird; somit wurden pro Nitroguanidin-Gruppe nur 3,5 Mol. H₂ aufgenommen.

²¹) L-Amino-acid oxidase, Mann Research Laboratories, New York.

Wasser zerrieben und getrocknet. Das orangegelbe Pulver wurde mehrmals aus Methanol-Äther umgefällt und dann in heissem Acetonitril gelöst und abkühlen gelassen. Dabei schieden sich 710 mg XIIb (58%) in Form eines festen Pulvers aus. Smp. 143–148°; $[\alpha]_D^{25} = -57,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,795$ in Methanol).

$C_{80}H_{128}O_{22}N_{22}$ (1750,08) Ber. N 17,61% Gef. N 17,58%

Das Produkt war nach Dünnschichtchromatographie einheitlich, Rf-Wert = 0,65 (Chloroform-Methanol 8:2); = 0,73 (Methanol) (REINDEL-HOPPE-Reagens, UV-Fluoreszenz).

Hydrierung unter den bei XIV angegebenen Bedingungen entfernte aus XIIb die PZ- und die beiden Nitro-Gruppen. Zur Aufarbeitung wurde vom Katalysator abgenutscht, das Filtrat eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und die Lösung zur Entfernung des bei der Hydrierung (aus der PZ-Gruppe) gebildeten Anilins und *p*-Toluidins mehrmals mit Äther extrahiert. Dann wurde mit der wässrigen Phase wie bei XIV beschrieben verfahren. Das dabei erhaltene Nonapeptidderivat XIV war identisch mit dem aus XIIa dargestellten Produkt.

Herrn Dr. H. ZUBER sei für die Ausführung der Papierelektrophoresen und quant. Aminosäurebestimmung gedankt; die Mikroanalysen, Bestimmung der optischen Drehungen und Titrations wurden in unseren Speziallaboratorien unter der Leitung der Herren Dres. W. PADOWETZ, H. HÜRZELER und H. MAJER ausgeführt.

SUMMARY

The synthesis of derivatives of the nonapeptide sequence β^{11-19} -corticotropin (Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro) which have been used for the preparation of a nonadecapeptide, β^{1-19} -corticotropin, displaying corticotropic activity¹⁾, is described in detail. Combination of acid-labile protecting groups (BOC-, OtBu- and Trityl-) were found to be especially useful for this and subsequent work, as they can be cleaved in a very specific manner under very mild conditions.

The nonapeptide derivatives XII–XIV have been obtained as optically pure entities despite the fact that some racemisation had apparently occurred in step VIII \rightarrow IX.

Whereas paper chromatography of protected peptide derivatives usually gives bad separations, thin layer chromatography has been found to be very valuable for assessing the purity of intermediates and products.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

280. β^{1-16} -Corticotropin-methylester

von Robert Schwyzer, Werner Rittel und Antigone Costopanagiotis

(29. IX. 62)

Die von unserem Arbeitskreise ausgearbeiteten Methoden zur Darstellung von komplizierten Polypeptiden der Corticotropin- und Melanotropin-Reihe¹⁾ haben wir u. a. auch zur Synthese eines Polypeptids mit den ersten sechzehn N-terminalen Aminosäureresten des Corticotropins benützt. Dieses Polypeptid ist insofern interes-

¹⁾ Als Lit.-Quelle vgl. R. SCHWYZER, A. COSTOPANAGIOTIS & P. SIEBER, *Chimia (Schweiz)* 16, 295 (1962).