

170. Synthese eines Tetracosapeptides mit hoher corticotroper Wirksamkeit: β^1 - 24 -Corticotropin

von R. Schwyzer und H. Kappeler

(11. V. 1963)

In vorläufigen Mitteilungen¹⁾ haben wir über die Synthese eines Tetracosapeptides I berichtet, welches die (vom Aminoende her gezählten) ersten 24 Aminosäurereste des β -Corticotropins (ACTH) aus Schweinehypophysen²⁾ enthält. Wir haben inzwischen die Synthese mehrmals wiederholt und bestätigt und sind nun in der Lage, die chemischen und biologischen Eigenschaften der Verbindung und den Gang der Synthese in detaillierter Form bekanntzugeben.

A. Chemische und biologische Eigenschaften

β^1 - 24 -Corticotropin (Hexaacetat, I) wird aus der geschützten Vorstufe II durch Abspaltung der Schutzgruppen mittels Trifluoressigsäure, Austausch der Trifluoracetat- gegen Acetat-Ionen und Lyophilisieren der wässrigen Lösung in reinsten Form und in quantitativer Ausbeute erhalten. Reinigungsoperationen sind überflüssig. Die Verbindung ist sterisch einheitlich (alles-L-Form), $[\alpha]_D^{25} = -88,6 \pm 2^\circ$ ($c = 0,5$ in 1-proz. Essigsäure). Sie ist in neutraler wässriger Lösung (z. B. während 20 Min. bei 120°) chemisch und biologisch stabil. Mittels Aminosäurenanalyse³⁾, Dünnschichtchromatographie und Hochspannungselektrophorese liessen sich keine Verunreinigungen nachweisen.

Behandlung mit Wasserstoffperoxid oxydiert den Schwefel des Methionins (No. 4) zur Sulfoxidstufe; das entstandene Met-(O)⁴- β^1 - 24 -Corticotropin kann auf Dünnschicht-Chromatogrammen neben β^1 - 24 -Corticotropin gut nachgewiesen werden. Es zeigt keine ACTH-Wirkung.

Die ACTH-Wirkung des synthetischen β^1 - 24 -Corticotropins (I) beträgt im SAYERS-Test⁴⁾ 106 ± 14 Einheiten pro mg⁵⁾. Eine vergleichbare Wirkungsintensität wird auch bei der intravenösen Applikation am Menschen (Parallelver-

¹⁾ H. KAPPELER & R. SCHWYZER, *Helv.* **44**, 1136 (1961); R. SCHWYZER, *Protides of the Biological Fluids*, S. 27 (Elsevier, Amsterdam, 1961).

²⁾ R. G. SHEPHERD, S. D. WILLSON, K. S. HOWARD, P. H. BELL, D. S. DAVIES, S. B. DAVIS, E. A. EIGNER & N. E. SHAKESPEARE, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 5067 (1956).

³⁾ In freundlicher Weise von Herrn Dr. H. ZUBER nach der Methode von D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN & S. MOORE, *Analyt. Chemistry* **30**, 1190 (1958), auf einem Automaten der Fa. BENDER & HOBEIN, München, ausgeführt.

⁴⁾ M. A. SAYERS, G. SAYERS & L. A. WOODBURY, *Endocrinology* **42**, 379 (1948).

⁵⁾ In freundlicher Weise von Herrn Prof. Dr. W. SCHULER ausgeführt: Vergleich nach der Vorschrift der Pharmakopoe der Vereinigten Staaten von Amerika, subkutane Applikation in Gegenwart von Gelatine, mit einem Präparat der Fa. WILSON & Co., Inc., Chicago, Ill., mit 95 USP-Einheiten pro mg, sowie mit dem 3. internat. ACTH-Standard¹⁰⁾. Nach Hitzesterilisation (20 Min., 120°) und nach Lyophilisieren in Gegenwart von inaktiven Trägermaterialien wurden meist höhere Werte gefunden, z. B. 225 ± 50 E/mg; Grund nach unbekannt (Konformationsänderung?).

suche mit Handelspräparaten, die ca. 30 Einheiten pro mg besitzen) gefunden⁸⁾. Im Test *in vitro* nach SAFFRAN *et al.*⁹⁾ wurden ca. 110 ACTH-Einheiten pro mg gefunden¹⁰⁾.

Die Wirkung auf die Melanophoren der Froschhaut *in vitro*¹¹⁾ beträgt ca. $1-2 \times 10^8$ MSH-Einheiten pro g.

B. Anlage der Synthese

Unser Ziel bestand nicht nur in der Herstellung des Tetracosapeptides β^{1-24} -Corticotropin, sondern ganz besonders auch in der Entwicklung neuer, allgemein anwendbarer, rationeller Methoden der Peptidsynthesen. Diese haben sich denn auch, wie erwartet, zur Synthese verwandter Hypophysenhormone, α -Melanotropin (α -MSH)¹²⁾ und β -Melanotropin (β -MSH)¹³⁾, ausgezeichnet bewährt. Neuerdings haben sie auch die Synthese der gesamten Kette des ACTH (39 Reste) ermöglicht^{13a)}. Sie sind unverändert auch von andern Arbeitsgruppen übernommen worden¹⁴⁾.

Die eindeutige, reproduzierbare Synthese eines solchen Peptides bietet ganz erhebliche chemische Schwierigkeiten, die in diesem speziellen Falle – abgesehen von der Grösse der Molekel (Molgewicht = 3294) – durch die Anwesenheit von drei Arginin-, vier Lysin-, einem Histidin-, einem Glutaminsäure-, einem Tryptophan-, einem Methionin- und zwei Serin-Resten noch vergrössert werden.

Im Planungsstadium galt es insbesondere, drei Problemkomplexe zu berücksichtigen: das Schutzgruppenproblem, die Unterteilung der Tetracosapeptid-Sequenz in Untereinheiten, welche als Basis für Zwischenprodukte dienen können, und die Wahl geeigneter Kondensationsmethoden.

1) *Das Schutzgruppenproblem*: Im Jahre 1956 berichteten BOISSONNAS & Mitarbeiter¹⁵⁾ über die Synthese eines β^{1-20} -Corticotropin-esters, welcher (nach ihren eigenen Angaben) noch sehr unrein war (2–3% der erwarteten biologischen Aktivität). Drei Jahre später wurde aus demselben Arbeitskreise¹⁶⁾ eine Synthese des α -Melanotropins publiziert. Bei beiden Synthesen war Carbobenzoxy- als Amino-Schutzgruppe gewählt worden. Die Entfernung in der letzten Synthesestufe verursachte ausserordentliche Schwierigkeiten, da wegen des Methionin-Schwefels eine Hydrierung ausgeschlossen war. Die Spaltung mit HBr in Eisessig zerstört aber

⁸⁾ Private Mitteilungen von Prof. MACH, Genf, und P.-D. Dr. WALSER, Basel; vgl. auch die entsprechenden Mitteilungen am Schweiz. Internistenkongress in Bern am 11. Mai 1963.

⁹⁾ M. SAFFRAN, A. V. SCHALLY & B. G. BENFEY, *Endocrinology* **57**, 399 (1957).

¹⁰⁾ In freundlicher Weise von Frau Dr. B. SCHÄR bestimmt, vgl. W. SCHULER, B. SCHÄR & P. DESAULLES, *Schweiz. Med. Wschr.* (im Druck) 1963.

¹¹⁾ In freundlicher Weise von Herrn Dr. P. DESAULLES und von Prof. A. B. LERNER nach K. SHIZUME, A. B. LERNER & T. B. FITZPATRICK, *Endocrinology* **54**, 553 (1954), bestimmt.

¹²⁾ a) R. SCHWYZER, A. COSTOPANAGIOTIS & P. SIEBER, *Chimia* **16**, 295 (1962); b) *Helv.* **46**, 870 (1963).

¹³⁾ R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* **46**, im Druck (1963).

^{13a)} R. SCHWYZER & P. SIEBER, *Mitt. an den VII. Giornate Biochimiche Latine, S. Margherita Ligure*, 25. Mai 1963; *Nature* **199**, im Druck (1963).

¹⁴⁾ Vgl. z.B. K. STURM, R. GEIGER & W. SIEDEL, *Chem. Ber.* **96**, 609 (1963); K. HOFMANN, R. D. WELLS, H. YAJIMA & J. ROSENTHALER, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 1546 (1963).

¹⁵⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, J.-P. WALLER & P.-A. JAQUENOUD, *Experientia* **12**, 446 (1956).

¹⁶⁾ ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **42**, 1257 (1959).

einen Teil des Tryptophans¹⁷⁾ und produziert (aus der Carbobenzoxygruppe) Benzylbromid-Molekeln, bzw. Benzyl-Kationen, die auf Methionin-Schwefel¹⁸⁾, auf den Benzolring des Tyrosins¹⁹⁾ und vermutlich auch auf den Imidazolring des Histidins alkylierend wirken.

Im Jahre 1959 berichteten wir über ein geschütztes Octadecapeptid mit der Aminosäuresequenz des Rinder- β -melanotropins, welches zum Schutze von Amino-gruppen mit Carbobenzoxy- und Tosyl-, zum Schutze von Carboxylgruppen mit Amid- und Methylester-Gruppen ausgestattet war²⁰⁾. Schon beim Versuche, durch alkalische oder saure Verseifung die Carboxylgruppen freizulegen, wurden unter allen Bedingungen viele Nebenprodukte erhalten. Ebenso komplex verlief die Reaktion mit Natrium in flüssigem Ammoniak, welche die Carbobenzoxy- und die beiden Toluolsulfonyl-Gruppen hätte entfernen sollen.

Ähnliche Erfahrungen wurden von HOFMANN *et al.*²¹⁾ mit einem synthetischen N^ε-Toluolsulfonyl-Derivat des α -Melanotropins gemacht: auch hier konnte die Schutzgruppe nicht ohne Zerstörung der biologischen Aktivität entfernt werden.

Trotz diesen schlechten Aussichten, welche unsere Arbeitsgruppe und diejenige von HOFMANN bewogen, nach neuen Lösungen des Problems zu suchen, haben LI *et al.*²²⁾ die Synthese des β^{1-19} -Corticotropins mit Toluolsulfonyl-Schutzgruppen versucht. Neben dem länger bekannten N^ε-Toluolsulfonyl-L-lysin²³⁾ wurde dabei das N^ω-Tosyl-arginin²⁴⁾ verwendet (dieses Reagens bewährt sich ausgezeichnet in Fällen, bei denen eine Behandlung mit Natrium in flüssigem Ammoniak nichts schadet, z. B. bei Synthesen des Bradykinins²⁵⁾, des Kallidins²⁶⁾ und des Arginin-Vasopressins²⁷⁾). Die letzte Stufe der Synthese verlief denn auch mit sehr schlechter Ausbeute (2–3%)²⁸⁾, was die Erfahrungen mit α - und β -Melanotropin bestätigt.

Auf der Suche nach geeigneteren Schutzgruppen für die Seitenkettenfunktion stellten HOFMANN *et al.*²⁹⁾ vorerst das N^ε-Formyl-L-lysin dar. Damit bauten sie ein Derivat des α -Melanotropins auf, das Glu(NH₂)⁵, Lys(FOR)¹¹- α -Melanotropin²¹⁾. Durch Behandlung mit Säure liess sich die Verbindung jedoch nicht in α -Melanotropin überführen³⁰⁾: die Acetylamido-Gruppe (aus Ser¹) wurde gleichzeitig mit der Formyl¹¹- und der Carbonamid⁵-Gruppe hydrolysiert (wohl wegen eines Nachbar-

¹⁷⁾ D. M. THEODOROPoulos & J. S. FRUTON, *Biochemistry* 1, 933 (1962).

¹⁸⁾ Vgl. B. ISELIN, *Helv.* 44, 61 (1961).

¹⁹⁾ B. ISELIN, *Helv.* 45, 1510 (1962).

²⁰⁾ R. SCHWYZER, H. KAPPELER, B. ISELIN, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* 42, 1702 (1959).

²¹⁾ K. HOFMANN, H. YAJIMA & E. T. SCHWARTZ, *J. Amer. chem. Soc.* 82, 3732 (1960).

²²⁾ C. H. LI, J. MEIENHOFER, E. SCHNABEL, D. CHUNG, T.-B. LO & J. RAMACHANDRAN, *J. Amer. chem. Soc.* 82, 5760 (1960); 83, 4449 (1961).

²³⁾ R. ROESKE, F. H. C. STEWART, R. J. STEDMAN & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* 78, 5883 (1956).

²⁴⁾ R. SCHWYZER & C. H. LI, *Nature* 182, 1669 (1958).

²⁵⁾ ST. GUTTMANN, J. PLESS & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 45, 170 (1962).

²⁶⁾ J. PLESS, E. STÜRMER, ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 45, 394 (1962).

²⁷⁾ R. L. HUGUENIN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 45, 2707 (1962); R. O. STUDER, *Helv.* 46, 421 (1963).

²⁸⁾ Persönliche Mitteilung von C. H. LI und Mitarbeitern.

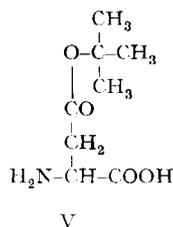
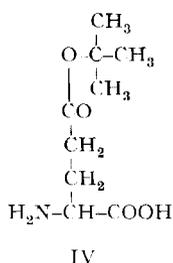
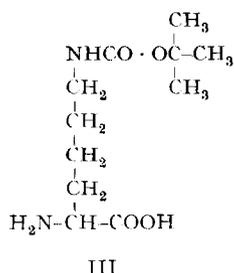
²⁹⁾ K. HOFMANN, E. STUTZ, G. SPÜHLER, H. YAJIMA & E. T. SCHWARTZ, *J. Amer. chem. Soc.* 82, 3727 (1960).

³⁰⁾ K. HOFMANN & H. YAJIMA, *J. Amer. chem. Soc.* 83, 2289 (1961).

Effektes des Ser¹-Hydroxyls). Diese Beobachtung der Unselektivität der Spaltung von N^α-Acetyl-serin, N^ε-Formyl-lysin und von Glutamin in peptidischer Bindung führte zur Verwendung dieser Kombination bei der Synthese von β¹⁻²³-Corticotropin³¹), β¹⁻²⁰-Corticotropin-Val²⁰-amid³²) und β¹⁻¹⁶-Corticotropin³³). In den letzten Synthesestufen wurden die Schutzgruppen mit 0,5N HCl (100°, 80 Min.) entfernt, wobei nach Trennung von den Nebenprodukten etwa 20–30 Prozent des gewünschten Peptides erhalten wurden.

Nachdem wir uns, unabhängig von HOFMANN, in Vorversuchen überzeugt hatten³⁴), dass die Formylgruppe in komplizierten Fällen auch gegenüber der Peptidbindung nicht die gewünschte Selektivität aufweist, befassten wir uns mit Schutzgruppen, die sich von *t*-Butanol ableiten. Bei kleinen Peptiden war der Gebrauch der *t*-Butoxycarbonyl (=BOC-) Gruppe³⁵) und der *t*-Butylester (=OBu^t) Gruppe³⁶) zum Schutze von α-Amino- und α-Carboxylfunktion bekannt. Über die Verwendbarkeit bei höhern Peptiden und insbesondere zum Schutze von Amino- und Carboxyl-Funktionen in Seitenketten lagen aber keine Beobachtungen vor.

Als Erstes stellen wir uns deshalb die drei Schlüsselderivate N^ε-*t*-Butoxycarbonyl-L-lysin (III)³⁷), L-Glutaminsäure-γ-*t*-butylester (IV)¹) und L-Asparaginsäure-β-*t*-butylester (V)³⁸) her.



Es erwies sich, dass die Schutzgruppen durch schonende Behandlung mit Säuren (Trifluoressigsäure, HCl in Methanol und andern Lösungsmitteln etc.) leicht entfernt

³¹) K. HOFMANN, H. YAJIMA, TEH-YUNG LIU & N. YANAIHARA, J. Amer. chem. Soc. *84*, 4475 (1962).

³²) K. HOFMANN, H. YAJIMA, TEH-YUNG LIU, N. YANAIHARA, CH. YANAIHARA & J. L. HUMES, J. Amer. chem. Soc. *84*, 4481 (1962).

³³) K. HOFMANN, N. YANAIHARA, S. LANDE & H. YAJIMA, J. Amer. chem. Soc. *84*, 4470 (1962).

¹⁴) Unveröffentlichte Arbeiten mit P. SIEBER (1958).

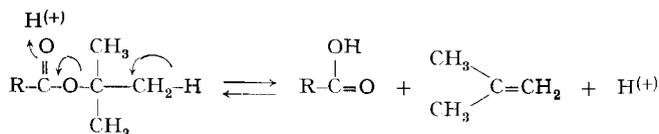
¹⁵) L. A. CARPINO, J. Amer. chem. Soc. *79*, 4427 (1957); F. C. MCKAY & N. F. ALBERTSON, *ibid.* *79*, 4686 (1957); G. W. ANDERSON & A. C. MCGREGOR, *ibid.* *79*, 6180 (1957); R. SCHWYZER, P. SIEBER & H. KAPPELER, *Helv.* *42*, 2622 (1959).

³⁶) R. W. ROESKE, *Chemistry & Ind.* 1959, 1121; E. TASCHNER, B. LIBEREC, C. WASIELEWSKI & J. BIERNAT, *Angew. Chem.* *71*, 743 (1959); E. TASCHNER, A. CHIMIAK, B. BATOR & T. SOKOLOWSKA, *Coll. czechoslov. chem. Commun.* *27*, 2234 (1962); E. TASCHNER, A. CHIMIAK, J. F. BIERNAT & C. WASIELEWSKI, *ibid.* *27*, 2237; G. W. ANDERSON & F. M. CALLAHAN, J. Amer. chem. Soc. *82*, 3359 (1960).

³⁷) R. SCHWYZER & W. RITTEL, *Helv.* *44*, 159 (1961).

³⁸) R. SCHWYZER & H. DIETRICH, *Helv.* *44*, 2003 (1961).

werden können, ohne dass dabei empfindliche Aminosäurereste (Serin, Tryptophan, Methionin etc.) geschädigt werden³⁷⁾:



Besonders ihre Selektivität in Kombination mit andern Schutzgruppen machte sie für unsere Zwecke geeignet. Einige der von uns ausprobierten Kombinationsmöglichkeiten sind in der Tabelle 1 aufgeführt³⁹⁾:

Tabelle 1. Schutzgruppenkombinationen

+ bedeutet Entfernung mit dem betr. Reagens; 0 bedeutet unerwünschte Reaktionen anderer Art

Schutzgruppe	Reagens							
	CH ₃ COOH 80%	HCl 0,2 · N MeOH, etc.	F ₃ CCOOH 80–100%	HCl 1-N MeOH, etc.	HBr 2-N CH ₃ COOH	H ₂ /Pd (C) MeOH (H ⁺)	NaOH, Ba(OH) ₂	NH ₂ NH ₂
Phthalyl- (PHT)							0	+
Methylester							+	0
<i>t</i> -Butylester (-OBu ^t)			+	+	+			
<i>t</i> -Butoxycarbonyl (BOC-)		+	+	+	+			
Triphenylmethyl (TRI-)	+	+	+	+	+	(+)		
Carbobenzoxy (Z-)					+	+		
<i>p</i> -Phenylazo-carbobenzoxy (PZ-)					+	+		
Nitro (Guanidinogruppe des Arginins)						+		

Wir setzten uns in der Folge zum Ziele, das geschützte Tetracosapeptid-Derivat II möglichst rein herzustellen. Als das gelungen war, zeigte es sich, dass sich alle Schutzgruppen quantitativ und ohne Bildung von Nebenprodukten irgendwelcher Art mit 90-proz. Trifluoressigsäure bei Zimmertemperatur abspalten lassen, wodurch sich sogar eine besondere Reinigung des Endproduktes erübrigt⁴⁰⁾.

2) Die Unterteilung der Peptidkette und die Wahl der Kondensationsmethoden. Diese beiden Probleme sind eng miteinander verflochten. Die meisten Methoden zur Knüpfung der Peptidbindung verursachen eine teilweise Racemisierung des inter-

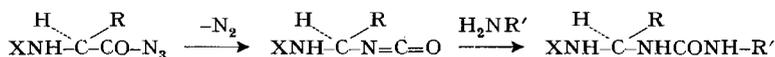
³⁹⁾ Die Selektivität der Abspaltung der N^α-BOC-Gruppe vor der β- und γ-*t*-Butylester-Gruppe wurde von H. DIETRICH am (noch unveröffentlichten) Beispiel des BOC·Phe-phe-Asp(OBu^t)·Glu(OBu^t)·OCH₃, dessen Sequenz im Tyrocin A enthalten ist, demonstriert. Mit verdünnter HCl in Methanol oder *t*-Butanol wird zuerst die BOC-Gruppe abgespalten.

⁴⁰⁾ Die neuen Seitenkettenschutzgruppen haben wir bisher zur Synthese von Glu(NH₂)⁵-β¹⁻¹⁹-Corticotropin (R. SCHWYZER, W. RITTEL, H. KAPPELER & B. ISELIN, Angew. Chem. 72, 915 [1960]), β¹⁻¹⁶-Corticotropin-Lys¹⁶-methylester (R. SCHWYZER, W. RITTEL & A. COSTOPANAGIOTIS, Helv. 45, 2473 [1962]), Ac-Ser¹-β¹⁻²⁴-Corticotropin (unveröffentlichte Arbeit mit ANTI-GONE COSTOPANAGIOTIS; Ac-Ser¹-β¹⁻²⁴-Corticotropin besitzt ca. 1 × 10⁹ MSH-Einheiten pro g, etwa 10 × soviel wie β¹⁻²⁴-Corticotropin, und ca 10–20 ACTH-Einheiten pro mg, also 5–10 × weniger als das nicht acetylierte Produkt), α-Melanotropin¹²⁾, β-Melanotropin¹³⁾ und β-Corticotropin^{13a)} herangezogen.

mediär aktivierten Carbonsäurerestes (mit Ausnahme des – optisch inaktiven – Glycin-Restes und des Prolin-Restes, welcher in dieser Hinsicht stabiler ist)⁴¹⁾:

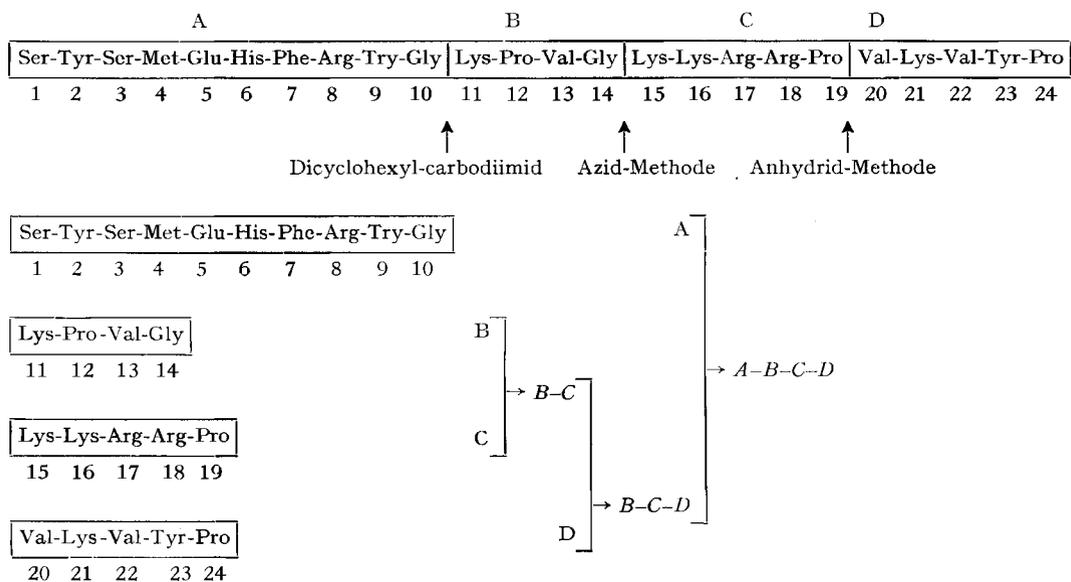


Einzig die CURTIUS'sche Azidmethode⁴²⁾ scheint eine Ausnahme zu machen; allerdings läuft man bei ihrer Anwendung auf langsame Reaktionen (bei sterischer Hinderung der Amino- und Carboxyl-Komponenten) die Gefahr, dass CURTIUS-Umlagerung eintritt mit nachfolgender Bildung von Harnstoffderivaten, die von dem erwünschten Peptid oft nur schwer zu trennen sind⁴³⁾:



Ausnahmen sind ferner N^α-Alkoxy- (oder Aryloxy-)carbonyl-, N^α-Toluolsulfonyl- und N^α-Trityl-Derivate von Aminosäuren; solche Derivate können ohne Racemisierungsgefahr zur Reaktion gebracht werden. Daraus ergeben sich gewisse Vorteile eines stufenweisen Aufbaus von Peptidketten (Angliederung einer Aminosäure nach der andern)⁴⁴⁾.

Schema 1. Unterteilung der Tetracosapeptidsequenz in synthetische Untereinheiten



41) Vgl. als neuesten Beitrag zu diesem Probleme: F. WEYGAND, A. PROX, L. SCHMIDHAMMER & W. KÖNIG, *Angew. Chem.* **75**, 282 (1963).

42) TH. CURTIUS, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **35**, 3226 (1902).

43) R. SCHWYZER & H. KAPPELER, *Helv.* **44**, 1991 (1961), wo die Umlagerung IR.-spektroskopisch verfolgt wird, vgl. ¹³⁾.

44) R. A. BOISSONNAS, St. GUTTMANN, P. A. JAQUENOUD & J. P. WALLER, *Helv.* **38**, 1491 (1955); vgl. M. BODÁNSZKY & V. DU VIGNEAUD, *Nature* **183**, 1324 (1959).

Unter gewissen Umständen kann jedoch bei der Synthese kleinerer Peptide eine Racemisierung in Kauf genommen werden, dann nämlich, wenn sich das unerwünschte Diastereomere leicht erkennen und abtrennen lässt und racemisierungsfreie Methoden keine bessern Ausbeuten liefern⁴⁵⁾.

Unter Berücksichtigung dieser Gegebenheiten schien es uns vorteilhaft, vorerst geschützte Derivate von vier kleinern, sterisch einheitlichen Peptiden (A, B, C und D) mit carboxylendständigem Glycin, bzw. Prolin, aufzubauen. Bei der Zusammenfassung dieser Einheiten zu grössern Zwischenprodukten und schliesslich zum geschützten Tetracosapeptid II liessen sich dann irgendetwelche geeignet erscheinende Kondensationsmethoden anwenden, ohne dass man Racemisierung befürchten musste. In der Praxis bewährte sich die Unterteilung und Zusammenfassung nach Schema 1 (S. 1557).

C. Ausführung der Synthese

Zur Umsetzung unserer oben entwickelten Absichten (Synthese des geschützten Tetracosapeptids II, Unterteilung der Sequenz nach Schema 1, Verwendung von Schutzgruppen-Kombinationen lt. Tabelle 1) in die Praxis synthetisierten wir die im Schema 2 angegebenen Zwischenprodukte. Sowohl die Derivate des β^{1-10} -Corticotropins (VI)⁴³⁾ und des β^{11-24} -Corticotropins (IX), die beiden wichtigsten Vorläufer des geschützten β^{1-24} -Corticotropins (II), *kristallisierten*, was ihre Brauchbarkeit ungemein erhöhte. Die Kristallisationstendenz des Tetradecapeptid-Derivates IX scheint von der farbigen *p*-Phenylazo-benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe⁴⁶⁾ begünstigt zu werden. Die Löslichkeitseigenschaften aller dieser Zwischenprodukte, die ja von den Schutzgruppen wesentlich mitbestimmt werden, erwiesen sich bei allen Reaktionen als sehr günstig.

1) *Derivate der Untereinheiten A, B, C und D*: Eine detaillierte Publikation über die Synthese des Decapeptidderivates (VI, entsprechend A) liegt bereits vor⁴³⁾⁴⁷⁾; die Synthese ist neuerdings mit geringfügigen Änderungen wiederholt worden⁴⁸⁾.

Die Peptidsequenz B lag in geeigneter Form als PZ·Lys(BOC)-Pro-Val-Gly·OC₂H₅ (XIX) vor³⁷⁾. Über die Synthese des Pentapeptides B in Form des Derivates H·Val-Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro·OBu^t (XXIV) publizieren wir separat⁴⁵⁾.

Für die Sequenz C, die wir als TRI·Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro·OCH₃ (VII) einsetzen wollten, verfügten wir bereits über Erfahrung, da wir den entsprechenden *t*-Butylester früher hergestellt hatten⁴⁹⁾. Der Gang der hier beschriebenen Synthese ist im Schema 3 aufgezeichnet; er weicht von unserem frühern Schema⁴⁹⁾ hauptsächlich in der Verwendung von Carbobenzoxy-nitroarginin⁵⁰⁾ anstelle von N^α-Trityl-N^ω-nitro-arginin ab. Jenes wurde entweder mittels

⁴⁵⁾ R. SCHWYZER, B. RINIKER & H. KAPPELER, *Helv.* **46**, 1541 (1963).

⁴⁶⁾ R. SCHWYZER, P. SIEBER & K. ZATSKÓ, *Helv.* **41**, 491 (1958).

⁴⁷⁾ Die spezifische Drehung von VI wurde neu bestimmt und beträgt $[\alpha]_D = -18,8 \pm 1^\circ$ ($c = 1$, Dimethylformamid). Der Unterschied ist vermutlich auf die Qualität des verwendeten Dimethylformamids zurückzuführen; in Lit. ⁴⁸⁾ wurde ebenfalls der niedrigere Wert gefunden.

⁴⁸⁾ R. GEIGER, K. STURM & W. SIEDEL, *Chem. Ber.* **96**, 1080 (1963).

⁴⁹⁾ W. RITTEL, *Helv.* **45**, 2465 (1962); vgl. R. SCHWYZER, W. RITTEL, H. KAPPELER & B. ISELIN, *Angew. Chem.* **72**, 915 (1960).

⁵⁰⁾ Betreffend die Herstellung einfacher Aminosäurederivate sei auf das Werk von J. P. GREENSTEIN & M. WINITZ, «Chemistry of the Amino Acids» (John Wiley & Sons, Inc., 1961), hingewiesen.

der Methode der gemischten Anhydride⁵¹⁾ oder mittels Dicyclohexyl-carbodiimid⁵²⁾ mit Prolin-methylester zu Carbobenzoxy-nitro-L-arginyl-L-prolin-methylester (X)⁵³⁾ kondensiert. Abspaltung des Carbobenzoxyrestes aus X und Reaktion mit einer weitem Molekel $Z \cdot \text{Arg}(\text{NO}_2) \cdot \text{OH}$ ergab das kristallisierte, geschützte Tripeptid XIII, welches infolge des stufenweisen Aufbaues als sterisch einheitlich (L-L-L) anzusehen ist. Die Abspaltung der Carbobenzoxygruppe wurde wieder mit HBr in Eisessig⁵⁴⁾ vorgenommen. Nach Entfernung von HBr mittels eines Ionenaustauschers in der $\text{OH}^{(-)}$ -Form wurde das erhaltene Tripeptid-Derivat mit TRI-Lys(BOC)-Lys(BOC)·OH (XV)³⁷⁾ nach zwei Methoden umgesetzt: Kondensation mit Dicyclohexyl-carbodiimid lieferte 64%, diejenige mit N-Äthyl-5-phenyl-isoxazonium-3'-sulfonat⁵⁵⁾ ergab 81% des festen, aber amorphen Pentapeptidderivates VII. Umfällen aus Aceton-Äther entfernte offenbar die bei beiden Reaktionen erwartete Beimengung des diastereomeren TRI-Lys(BOC)-lys(BOC)-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-Pro·OCH₃ (L-D-L-L-L), denn das Produkt wurde (nach Entfernung der beiden BOC-Gruppen) mit Trypsin zwischen Lys¹⁶ und Arg(NO_2)¹⁸ vollständig gespalten, was in Anbetracht der Stereospezifität der Enzymreaktion beim (L-D-L-L-L)-Isomeren nicht der Fall gewesen wäre. Das Pentapeptidderivat VII ist also sterisch einheitlich.

2) *Synthese des geschützten Tetradecapeptid-Derivates IX über das Nonapeptid-Derivat VIII, Schema 4:* Aus dem Tetrapeptid-Derivat XIX³⁷⁾ wurde das kristallisierte Säurehydrazid XX hergestellt, um es (*via* Säureazid) mit dem Pentapeptid-Derivat XXI kondensieren zu können. Letzteres wurde durch selektive Abspaltung des N^α-Tritylrestes aus VII mittels Essigsäure³⁷⁾ gewonnen. Diese Reaktionen verliefen ohne besondere Schwierigkeiten; das farbige Nonapeptid-Derivat XXII wurde aus Acetonitril kristallisiert und u. a. mittels Dünnschichtchromatographie und Ultraviolettabsorption charakterisiert. Die Verseifung zu VIII verlief erstaunlich schnell (Prolinester sind oft schwer zu verseifen). Dieses Zwischenprodukt wurde nochmals auf sterische Einheitlichkeit geprüft: Totalhydrolyse und enzymatische Oxydation der entstandenen Aminosäuren⁵⁶⁾ ergab, dass alle Aminosäuren zu mindestens 99% die L-Konfiguration aufweisen (Pro und Gly wurden natürlich nicht oxydiert).

Das kristallisierte Pentapeptid-Derivat XXIII (entsprechend D) wurde durch katalytische Hydrierung von der Carbobenzoxygruppe befreit⁴⁵⁾. Umsatz des entstandenen Peptid-Derivats mit freier α -Aminogruppe mit dem gemischten Anhydrid aus VIII und Kohlensäure-äthylester ergab das geschützte β^{11-24} -Corticotropin (IX), welches aus Acetonitril kristallisiert wurde (Ausbeute 80%).

⁵¹⁾ R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **34**, 874 (1951); TH. WIELAND & H. BERNHARD, *Liebigs Ann. Chem.* **572**, 190 (1951).

⁵²⁾ J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 1067 (1955).

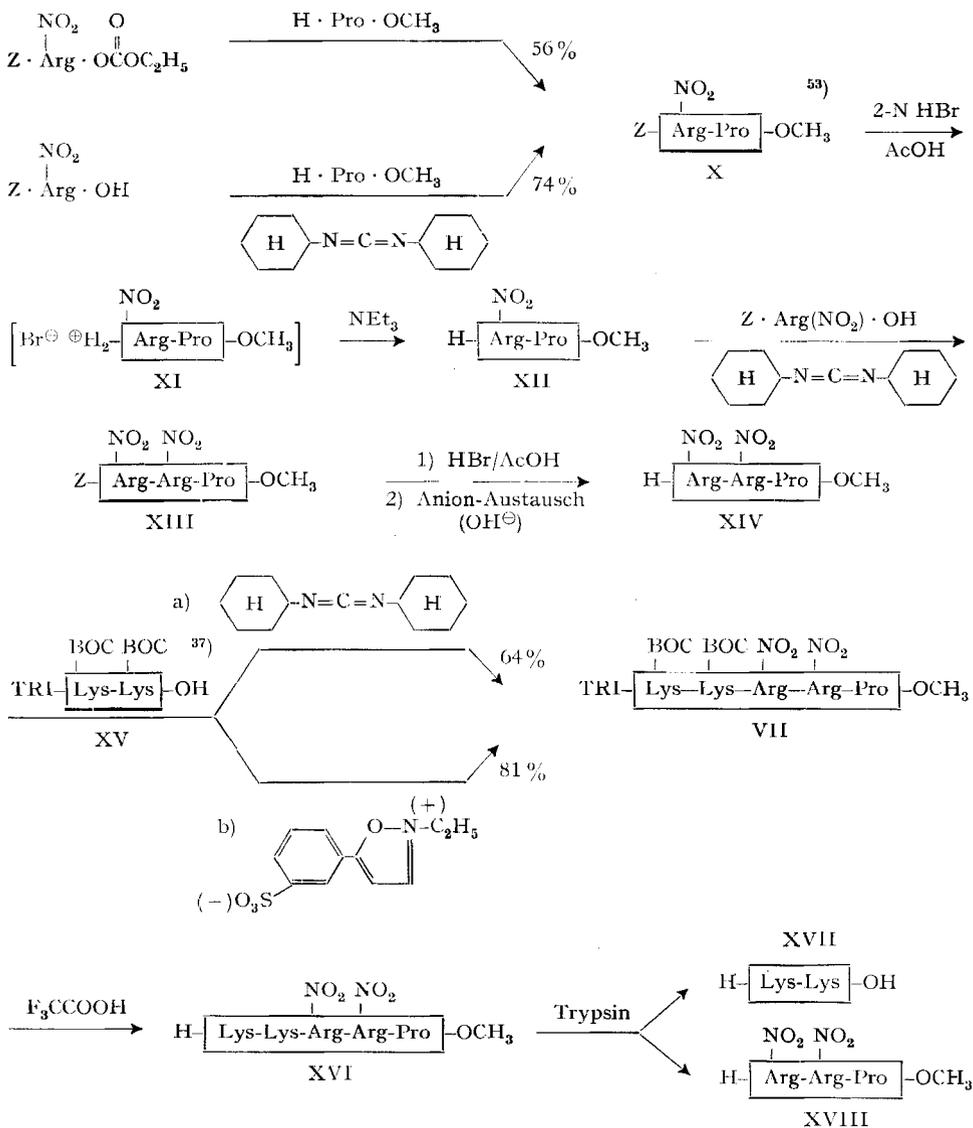
⁵³⁾ Die Verbindung wurde unabhängig von uns von H. GIBIAN & E. SCHRÖDER, *Liebigs Ann. Chem.* **642**, 145 (1961), beschrieben: Smp. 159–160°, $[\alpha]_D = -53,0^\circ$ ($c = 2$, Methanol). Diese Autoren kondensierten $Z \cdot \text{Arg}(\text{NO}_2) \cdot \text{OH}$ mit $\text{H} \cdot \text{Pro} \cdot \text{OCH}_3$ in Tetrahydrofuran-Dimethylformamid mittels Dicyclohexyl-carbodiimid.

⁵⁴⁾ D. BEN-ISHAÏ & A. BERGER, *J. org. Chemistry* **17**, 1564 (1952).

⁵⁵⁾ R. B. WOODWARD & R. A. OLOFSON, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 1007 (1961); R. B. WOODWARD, R. A. OLOFSON & H. MAYER, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 1010 (1961).

⁵⁶⁾ B. RINIKER & R. SCHWYZER, *Helv.* **44**, 658 (1961).

Schema 3. *Synthese des geschützten Pentapeptid-Derivates VII*
Aminosäuresequenz 15-19 von β -Corticotropin



3) *Die Endstufen der Synthese (Schema 5):* Wir beabsichtigen, den Nitro-Schutz der Arginin-Guanidogruppen, nachdem wir ihn durch spezielle Massnahmen bis hieher erhalten hatten (Abspaltung von Carbobenzyloxy aus dem Tripeptid-Derivat XIII mittels HBr, Einführung der N^α-Tritylgruppe in das Pentapeptid-Derivat VII mittels XV, damit die α -Aminogruppe trotz Gegenwart von Nitro- und BOC- selektiv freigelegt werden konnte), nun gleichzeitig mit dem *p*-Phenylazo-benzyloxy-carbonyl-Rest durch Hydrierung zu entfernen. Bei der hydrierenden Spaltung von

Nitrogruppen muss man unter sauren Bedingungen arbeiten, um die Entstehung von N^ω-Amino-arginin zu verhindern⁵⁷⁾. Wir arbeiteten in 90-proz. Essigsäure, in der die N^ε-BOC-Gruppen der vier Lysinreste noch genügend stabil sind. Zur Kontrolle der Reaktion setzten wir eine Probe des Reaktionsproduktes mit 2,4-Dinitrofluorbenzol um und hydrolysierten das Produkt mit Salzsäure. Es war nur *eine* Dinitrophenylaminosäure nachweisbar und zwar N^α-Mono-dinitrophenyl-lysin. Das Hydrierungsprodukt besitzt also die Struktur XXV (als Triacetat), bei der nur die α-Aminogruppe in freier Form vorhanden ist. Eine ganz unbedeutende, auf Dünnschicht-Chromatogrammen erkennbare Verunreinigung wurde durch Chromatographie an Carboxymethylcellulose⁵⁸⁾ entfernt. Das gereinigte Produkt zeigte die richtige Aminosäurezusammensetzung. Da die Acetat-Anionen unter den Bedingungen der nächsten Stufe acetylierend wirken würden (CH₃COOH + Dicyclohexylcarbodiimid), mussten sie durch Anionen einer stärkern Säure ersetzt werden. Dies gelang, ohne die BOC-Gruppen anzugreifen, durch Behandlung mit der äquivalenten Menge Toluolsulfosäure in Pyridin; beim Eindampfen verflüchtigte sich das entstandene Pyridinium-acetat. Die Elementaranalyse stimmt auf die Struktur XXV.

Die Kondensation dieses Tetradecapeptid-Derivates XXV mit dem Decapeptid-Derivat VI erfolgte in absolutem Pyridin mittels Dicyclohexylcarbodiimid. Nach einer Reaktionszeit von drei Tagen wurden im Reaktionsgemisch die Tosylat-Ionen gegen Acetat-Ionen ausgetauscht. Multiplikative Verteilung über 400 Stufen in einem Gemisch aus CCl₄, CHCl₃, Methanol und Ammoniumacetat-Puffer führte zum reinen, geschützten β¹⁻²⁴-Corticotropin (II). Zur Reinigung bewährt sich auch Chromatographie an Carboxymethylcellulose. Wir haben die Erfahrung gemacht⁵⁹⁾, dass Polykationen mit Schutzgruppen (die in wässrigen Pufferlösungen zu schwer löslich sind) sich in 50-proz. *t*-Butanol unter Zusatz steigender Mengen von Essigsäure sehr gut an Carboxymethylcellulose und Carboxymethyl-SEPHADEX[®] chromatographieren lassen. Die Charakterisierung und Reinheitsprüfung erfolgte ferner durch UV.-Absorptionsspektrographie, Aminosäureanalyse und Dünnschichtchromatographie.

Aus einem derart gereinigten Tetracosapeptid-Derivat II lässt sich durch einfaches Lösen in 90-proz. Trifluoressigsäure, gefolgt vom Austausch der Trifluoracetat-Ionen ein Präparat von β¹⁻²⁴-Corticotropin (Hexaacetat, I) in sozusagen quantitativer Ausbeute gewinnen, in welchem keine Verunreinigungen nachgewiesen werden können (Elektrophorese in drei Puffersystemen, Dünnschicht-Chromatographie). Nach dem Aufbau ist die Verbindung sterisch einheitlich; die Aminosäureanalyse gibt die erwarteten Werte^{59a)}.

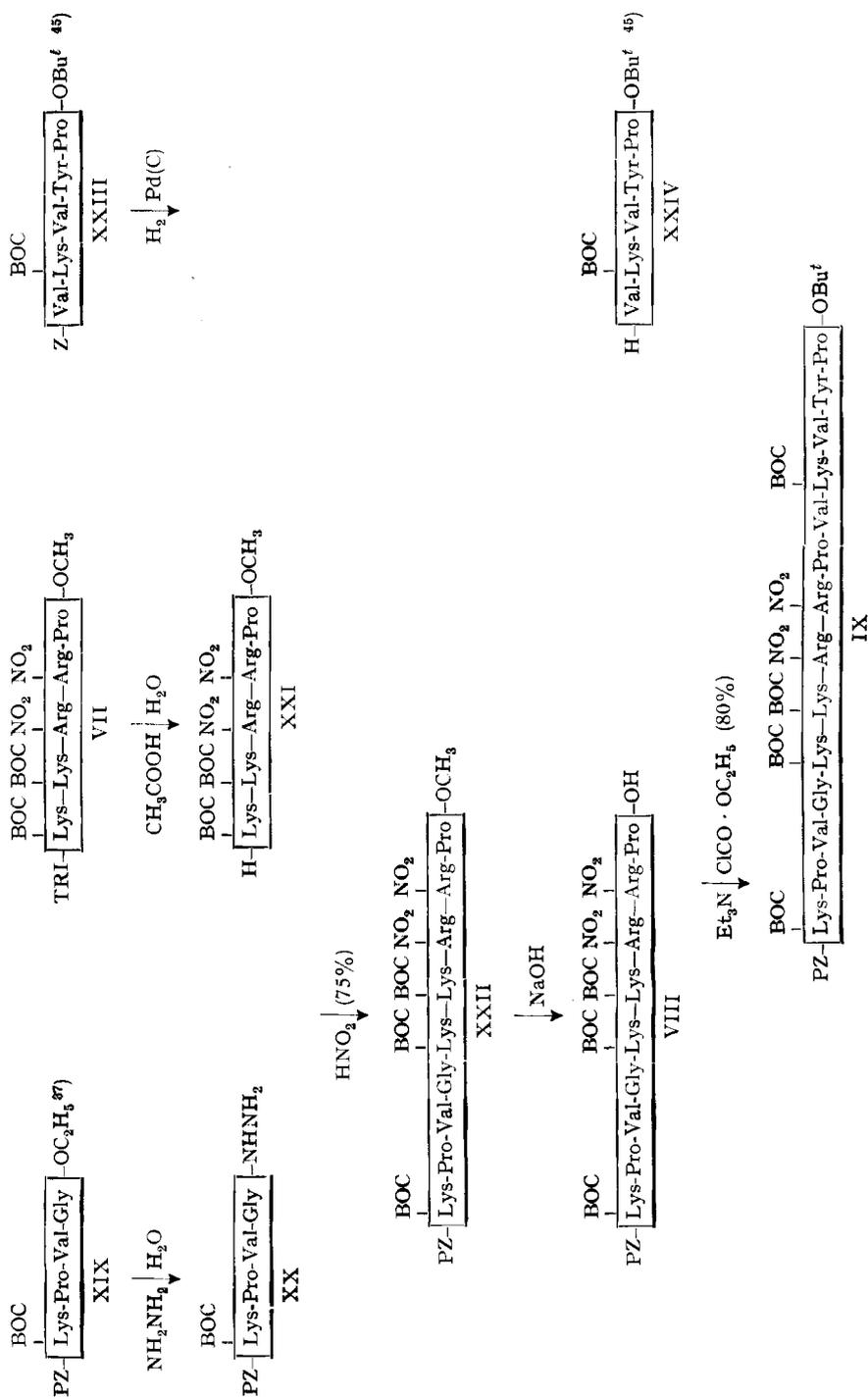
57) Vgl. CLAUDE GROS, M. PRIVAT DE GARILHE, ANTIGONE COSTOPANAGIOTIS & R. SCHWYZER, *Helv.* 44, 2042 (1961).

58) E. A. PETERSON & H. A. SOBER, *J. Amer. chem. Soc.* 78, 751 (1956).

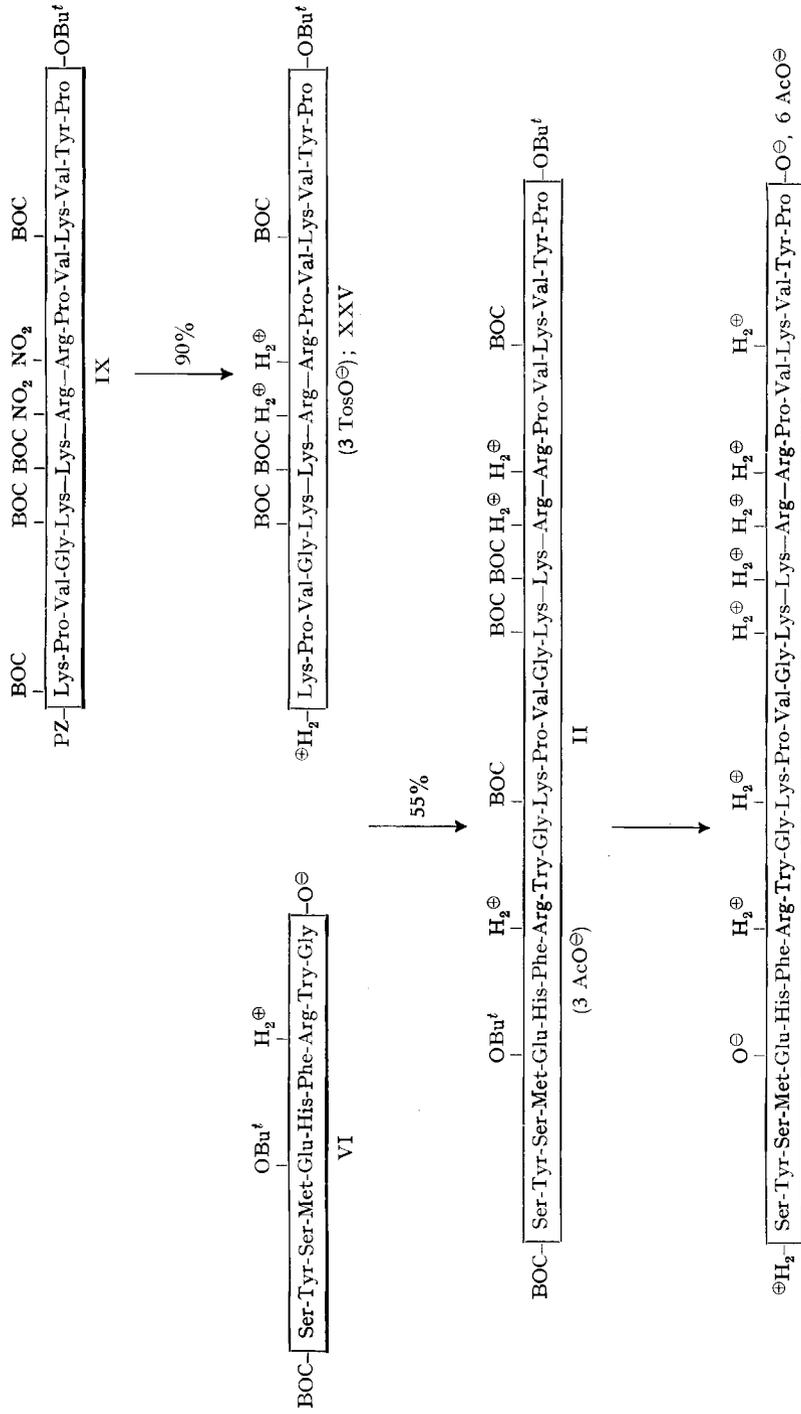
59) Zusammen mit P. SIEBER.

59a) Bei einzelnen Präparationen, deren geschützte Vorstufe nicht absolut rein war, liess sich im Dünnschichtchromatogramm auf Al₂O₃ (DA) eine kleine, schneller wandernde Verunreinigung (ca. 5%) nachweisen, die sich durch multiplikative Verteilung (*sec*-Butanol/0,5-proz. Trichloroessigsäure) von I abtrennen lässt. Sie unterscheidet sich von I ausserdem durch die spez. Drehung: $[\alpha]_D^{25} = -80,2^\circ$ ($c = 1$ in 1-proz. Essigsäure), nicht aber durch Hochspannungselektrophorese (bei versch. pH-Werten), UV.-Absorptionsspektrum und Aminosäureanalyse. Wir werden die Verbindung chemisch und biologisch weiter untersuchen.

Scheme 4: Synthese des geschützten Tetradecapeptid -- Derivates IX, Aminosäuresequenz 11-24 von β -Corticotropin, über das Nonapeptid-Derivate VIII, Positionen 11-19



Schema 5. Synthese von β^{1-24} -Corticotropin (I) aus den kristallisierten Decapeptid- und Tetradecapeptid-Derivaten VI bzw. IX



Die Oxydation mit H_2O_2 ergab das Methionin-sulfoxid-Analoge des β^{1-24} -Corticotropins, welches dünn-schichtchromatographisch neben β^{1-24} -Corticotropin gut nachweisbar ist. Es kann mit Thioglykolsäure wieder reduziert werden. Offenbar ist bei der multiplikativen Verteilung keine Oxydation des geschützten Tetracosapeptids eingetreten, was sonst bei Verwendung üblicher, butanolhaltiger Systeme fast immer der Fall ist⁶⁰): neben der grossen Anpassungsfähigkeit bezüglich der Verteilungskonstante ist das ein grosser Vorteil der von uns immer wieder verwendeten, chloroform- und methanolhaltigen Systemen⁶¹).

Experimenteller Teil

Die Smp. sind in der Kapillare im Smp.-Apparat nach Dr. TOTTOLI (Firma W. BÜCHI, Flawil) bestimmt und nicht korrigiert. «Übliche Aufarbeitung» bedeutet Aufnehmen in einem in Wasser schwerlöslichen organischen Lösungsmittel und Waschen mit verd. Säure, Wasser, verd. Alkali, Wasser, Trocknen mit Natriumsulfat, Eindampfen im Vakuum im Rotationsverdampfer (org. L.m., Säure und Alkali werden jeweils spezifiziert).

Lösungsmittel für Papierchromatographie (PC) und Dünnschichtchromatographie (Zahlenangaben = Volumenteile, wo nichts anderes angegeben):

45: *sec*-Butanol, 3-proz. Ammoniak (100:44)

48: *n*-Butanol, Aceton, Diäthylamin, H_2O (100:100:20:50)

49: *sec*-Butanol, *iso*-Propanol, Triäthylamin, Veronal, H_2O (100 ml:10 ml:0,2 ml:1,8 g:60 ml), pH = 8–9

52: *n*-Butanol, Eisessig, H_2O (100:10:30, d. h. gerade mit H_2O gesättigt)

54: *sec*-Butanol, *iso*-Propanol, Chloressigsäure, H_2O (70 ml:10 ml:3 g:40 ml)

87: *iso*-Propanol, Ameisensäure, H_2O (400:20:100)

100: Essigester, Pyridin, Eisessig, H_2O (60:20:6:11)

101: *n*-Butanol, Pyridin, Eisessig, H_2O (30:20:6:24)

Schichtmaterialien für die Dünnschichtchromatographie werden wie folgt bezeichnet: DS = Kieselgel G, DA = Aluminiumoxid G.

Analytische Elektrophorese erfolgte auf Papierstreifen SCHLEICHER & SCHÜLL Nr. 2043b in einer Apparatur mit Kühlung (HSE).

Präparative Elektrophorese erfolgte auf hängendem gekühltem Karton in der ELPHOR-Apparatur (BENDER & HOBEN, München).

Aminosäureanalysen, vgl. 3).

Trispuffer ist aus Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan und HCl hergestellt.

Mikroanalysen und Spektren wurden in den analytischen Laboratorien der CIBA A.G. ausgeführt (Dr. W. PADOWETZ).

Papier- und Dünnschichtchromatogramme wurden im Speziallaboratorium der CIBA A.G. (Dr. R. NEHER und E. VON ARX) ausgeführt.

A. Schema 3. – *X*:*Z*·Arg(NO₂)-Pro·OCH₃, Carbobenzoxy-nitro-L-arginyl-L-prolin-methylester. – a) Nach der Carbodiimidmethode. 500 mg L-Prolin-methylester-hydrochlorid wurden in wenig Wasser gelöst, mit 50 ml Äther überschichtet und unter Eiskühlung mit so viel K₂CO₃ versetzt, dass die wässrige Phase körnig und fest wurde. Die Pottasche wurde abgenutscht und mehrmals mit Äther gewaschen. Die gekühlten Ätherphasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft: 367 mg (94,5%) L-Prolin-methylester.

223 mg L-Prolin-methylester wurden in 4 ml Acetonitril gelöst und mit einer Lösung von 610 mg *Z*:Arg(NO₂)·OH in 2 ml Dimethylformamid versetzt. Zur entstandenen, klaren Lösung wurden bei –15° 426 mg Dicyclohexyl-carbodiimid zugegeben. Nach 30 Min. bei –15° wurde der Ansatz 3 Tage bei 0° aufbewahrt. Danach wurde der ausgeschiedene Dicyclohexylharnstoff abgenutscht und mit kaltem Acetonitril gewaschen: 329 mg, Smp. 227–228°. Das Filtrat wurde bei 40° Badtemperatur zuerst bei 12 Torr, dann bei 0,01 Torr von den Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand wurde in 25 ml Essigester gelöst und im Scheidetrichter nacheinander mit 3,5 ml

⁶⁰) Beobachtungen von Dr. B. RINKER.

⁶¹) R. SCHWYZER & P. SIEBER, *Helv.* 40, 624 (1957).

2N H₂SO₄, 5 ml H₂O, 5 ml NaHCO₃-H₂O (halbgesättigt) und 5 ml H₂O gewaschen. Bei dieser Prozedur schied sich nochmals Dicyclohexylharnstoff aus, der abfiltriert wurde: 63,5 mg Smp. 210–211°. Die Waschflüssigkeiten wurden mit 5 ml Essigester gewaschen. Die vereinigten Essigesterextrakte wurden 15 Std. bei 0° aufbewahrt, wobei das Dipeptid-Derivat X, nunmehr frei von Dicyclohexylharnstoff, auszukristallisieren begann: 366 mg (45,7%), Smp. 158–159°. Die Mutterlauge wurde auf ca. 10 ml eingengt und schied bei 0° nochmals 259 mg (32,3%) kristallisiertes X aus, Smp. 155–157°. Nun wurde die Mutterlauge zur Trockne verdampft und der Rückstand aus wenig Essigester kristallisiert: 15,4 mg (1,9%), Smp. 156,5–157,5°. Alle Kristallfraktionen mit Smp. zwischen 155 und 160° wurden zusammengenommen und aus Methanol umkristallisiert: 600 mg (74%), Smp. 159–161°. $[\alpha]_D^{25} = -36,04^\circ$ ($c = 1,3$ in Dimethylformamid).

C₂₀H₂₈O₇N₈ (464,47) Ber. C 51,71 H 6,08 N 18,10% Gef. C 51,98 H 6,20 N 18,32%

b) *Über das gemischte Anhydrid mit Kohensäure-äthylester.* 3 g Z·Arg(NO₂)·OH und 1,17 ml Triäthylamin wurden in 9 ml Dimethylformamid und 15 ml Tetrahydrofuran gelöst. Unter Kühlung auf –10 bis –15° und Rühren wurde nun 0,82 ml Chlorameisensäure zugegeben. Nach 10 Min. wurde eine vom ausgeschiedenen Triäthylamin-hydrochlorid abfiltrierte Lösung von 1,4 g L-Prolin-methylester-hydrochlorid und 1,3 ml Triäthylamin in 4,2 ml Dimethylformamid zugefügt. Der Ansatz wurde 1/2 Std. bei 0° und 2 Std. bei 20° aufbewahrt. Die rötlich gefärbte Mischung wurde mit 200 ml Essigester verdünnt und dreimal mit 1N HCl, Wasser, NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen. Darauf wurde die organische Schicht i. V. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde aus 20 ml Methanol kristallisiert: 2,4 g (61%), Smp. 156–157°. Umkristallisieren lieferte 2,2 g (56%) Z·Arg(NO₂)-Pro·OCH₃, Smp. 159–160°, identisch mit dem unter a) erhaltenen Produkt.

XIII: *Z·Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro·OCH₃, Carbobenzoxy-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-prolin-methylester.* Eine Mischung von 13,04 g Arg(NO₂)-Pro·OCH₃, HBr (XI, Herstellung analog XIV) und 60 ml Dimethylformamid wurde auf –10° gekühlt, mit 8,1 ml Triäthylamin versetzt und 30 Min. bei dieser Temperatur gerührt. Das Triäthylamin-hydrobromid wurde abfiltriert und das Filtrat im Rotationsverdampfer bei 20° Lufttemperatur und 0,01 Torr vom überschüssigen Triäthylamin befreit. Danach wurde die Lösung auf –10° gekühlt und nacheinander mit den Lösungen von 8,75 g Z·Arg(NO₂)·OH in 40 ml Dimethylformamid und 5,7 g Dicyclohexyl-carbodiimid in 30 ml Acetonitril versetzt. Nach 1 Std. bei –10° und 20 Std. bei 0° wurde der Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Filtrat mit 1 ml Eisessig angesäuert und bei 45°/0,01 Torr auf ein kleines Volumen eingengt. Der sirupartige Rückstand wurde in einem Gemisch von Chloroform und *n*-Butanol (1:1) gelöst und mit je 10 ml 1N HCl, H₂O, 1N-Sodalösung und H₂O gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wurde die Lösung auf ein kleines Volumen eingedampft und das Peptid mit Äther ausgefällt: 11,5 g. Umkristallisieren aus 300 ml heissem *n*-Butanol: 9,52 g (56%) Z·Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro·OCH₃, Smp. 120° (u. Zers.). Die Analysenprobe wurde nochmals aus *n*-Butanol umkristallisiert und 13 Std. bei 80° und 0,001 Torr getrocknet; Smp. 120° (u. Zers.). $[\alpha]_D^{25} = -46,3 + 1^\circ$ ($c = 1,00$ in Methanol). UV.-Absorptionsspektrum (EtOH): $\lambda_{max} = 271 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 32200$) entsprechend 2 Mol. Nitroarginin.

C₂₆H₃₉O₁₀N₁₁ Ber. C 46,91 H 5,91 O 24,04 N 23,15%
(665,69) Gef. „ 47,09 „ 6,00 „ 24,08 „ 22,90%

XIV: *H·Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro·OCH₃, Nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-prolin-methylester.* 4,2 g Z·Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro·OCH₃ (XIII) wurden während 1 Std. bei 20° mit 24 ml 2N HBr in Eisessig decarbenzoxyliert. Nach 15 Min. begann die Ausscheidung des HBr-Salzes von XIV. Das Reaktionsgemisch wurde bei 40°/11 Torr auf ein kleines Volumen eingedampft und mit Äther versetzt. Die unlösliche, klebrige Masse wurde mehrmals mit frischem Äther verrieben, wobei sie vollständig erstarrte. Die wässrige Lösung dieses Produktes (15 ml) wurde mit Essigester gewaschen und dann durch eine Säule eines stark basischen Ionenaustauschers in der OH[⊖]-Form gegossen (MERCK III). Das Filtrat hinterliess beim Verdampfen 3,2 g (95%) amorphen Tripeptid-ester XIV. PC einheitlich: Rf = 0,65 (49); 0,5 (54) (Ninhydrin). HSE einheitlich: 9 cm (pH = 1,9) (Ninhydrin).

VII: *TRI·Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro·OCH₃, Trityl-(N^ε-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-(N^ε-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-prolin-methylester.* – a) *Mit Dicyclohexyl-carbodiimid.* Eine auf –10° gekühlte Lösung von 1,5 g H·Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro·OCH₃ (XIV) in 20 ml Dimethylformamid wurde unter intensivem Rühren mit 2 g TRI·

Lys(BOC)-Lys(BOC)-OH (XV) und dann mit einer Lösung von 640 mg Dicyclohexyl-carbodiimid in 15 ml Acetonitril versetzt und 30 Min. bei -10° und 2 Tage bei 0° aufbewahrt. Der auskristallisierte Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und die Lösungsmittel bei $40^{\circ}/0,01$ Torr abdestilliert. Der Rückstand wurde in wenig Essigester gelöst, filtriert und nochmals vom Lösungsmittel befreit, worauf er 2mal aus Aceton-Äther umgefällt wurde: 2,2 g (64%), Smp. $134-136^{\circ}$, $[\alpha]_D^{25} = -41,2 \pm 1^{\circ}$ ($c = 2,703$ in Methanol). UV.-Absorptionsspektrum (EtOH 96-proz.): $\lambda_{max} = 271$ ($\epsilon = 32500$). PC einheitlich: Rf = 0,29 (49) (Trifluoressigsäure, dann Ninhydrin). PC der mit Trifluoressigsäure vorbehandelten Verbindung einheitlich: Rf = 0,43 (49) (Ninhydrin).

b) Mit *N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazonium-3'-sulfonat. Eine Lösung von 7,2 g TRI·Lys(BOC)-Lys(BOC)·OH (XV) und 1,39 ml Triäthylamin in 80 ml Acetonitril wurde bei 0° mit 2,53 g *N*-Äthyl-5'-phenyl-isoxazonium-3'-sulfonat versetzt. Die Mischung wurde 3 Std. bei 0° gerührt, wobei eine klare Lösung entstand. Nun wurden 5,3 g H·Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro·OCH₃ (XIV) zugegeben und der Ansatz 24 Std. bei Zimmertemperatur geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde darauf mit Essigester verdünnt und mit viel Wasser gewaschen. Der Essigester wurde im Vakuum abgedampft und der Rückstand zweimal aus Aceton-Äther umgefällt: 10 g (81%), nach Smp., $[\alpha]_D$, UV. und PC identisch mit der nach a) erhaltenen Verbindung VII.

Totalhydrolyse und Oxydation von VII mit *L*-Aminosäureoxydase⁵⁶): Proben von nach a) und b) hergestellten VII wurden wie üblich mit HCl gespalten und mit *L*-Aminosäureoxydase inkubiert. Lysin und Arginin wurden vollständig abgebaut, woraus auf die alles-*L*-Konfiguration von VII geschlossen werden kann.

Spaltung von VII mit Trypsin: 100 mg TRI·Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro·OCH₃ wurden mit 0,5 ml Trifluoressigsäure behandelt (15 Min. bei 20°). Nach Verdampfen der Säure wurden je 2 mg des Rückstandes, ein Trifluoacetat von H·Lys-Lys-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro·OCH₃ (XVI), in 0,2 ml 0,05M Trispuffer (pH = 9,4) gelöst und mit 0,016 ml einer 0,25-proz. Trypsinlösung während 6 Std. bei 37° inkubiert. HSE (pH = 1,9): H·Lys-Lys·OH bei 30 cm und H·Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro·OCH₃ bei 9,5 cm (Ninhydrin); Lys (bei 27 cm) kann nicht aufgefunden werden, ebenso erscheinen keine andern Flecken. Die vollständige Spaltung deutet auf die Abwesenheit des *L*-*D*-*L*-*L*-Isomeren im Endprodukt.

Aminosäureanalyse von VII: Lys 1,95; Orn 0,08; Arg 1,52; Pro 1,0; NH₃ 0,47.

B. Schema 4. - XX: PZ·Lys(BOC)-Pro-Val-Gly·NHNH₂, *p*-Phenylazo-benzyloxycarbonyl-(*N*^ε-*t*-butoxycarbonyl)-*L*-lysyl-*L*-prolyl-*L*-valyl-glycin-hydrasid: 2,34 g PZ·Lys(BOC)-Pro-Val-Gly·OC₂H₅ (XIX) wurden in 30 ml Methanol mit 1,25 ml Hydrazinhydrat 1 Std. am Rückfluss gekocht. Das Lösungsmittel wurde bei 11 Torr bis auf ein kleines Volumen verdampft und das Reaktionsprodukt mit viel Äther gefällt. Kristallisation aus 30 ml heissem Acetonitril ergab 1,95 g XX, Smp. $163-164^{\circ}$.

C₃₇H₅₃O₈N₉ (751,88) Ber. C 59,11 H 7,11 N 16,77% Gef. C 58,98 H 7,08 N 16,97%

XXI: H·Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro·OCH₃, (*N*^ε-*t*-Butoxycarbonyl)-*L*-lysyl-(*N*^ε-*t*-butoxycarbonyl)-*L*-lysyl-nitro-*L*-arginyl-nitro-*L*-arginyl-*L*-prolin-methylester: 6,0 g TRI·Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro·OCH₃ (VII) wurden in 200 ml 75-proz. Essigsäure gelöst und 45 Min. bei 30° gehalten. Die Essigsäure wurde bei 11 Torr fast vollständig abgedampft und der wässrige Rückstand mehrmals mit Äther gewaschen (Entfernung von Triphenylcarbinol; 1,2 g = 100%). Die wässrige Phase wurde hierauf vollständig getrocknet. Der Rückstand wurde nun zwischen 50 ml *n*-Butanol und 10 ml 0,5N Sodalösung (beide Phasen miteinander äquilibriert) verteilt. Die organische Phase wird noch dreimal mit je 10 ml Sodalösung und dann fünfmal mit je 10 ml Wasser (Emulsion!) gewaschen und bei 11 Torr verdampft: Rückstand 4,48 g (94%).

XXII: PZ·Lys(BOC)-Pro-Val-Gly-Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro·OCH₃, *p*-Phenylazo-benzyloxycarbonyl-(*N*^ε-*t*-butoxycarbonyl)-*L*-lysyl-*L*-prolyl-*L*-valyl-glycyl-(*N*^ε-*t*-butoxycarbonyl)-*L*-lysyl-(*N*^ε-*t*-butoxycarbonyl)-*L*-lysyl-nitro-*L*-arginyl-nitro-*L*-arginyl-*L*-prolin-methylester: 2,7 g PZ·Lys(BOC)-Pro-Val-Gly·NHNH₂ (XX) wurden in 30 ml Dimethylformamid gelöst, auf -15° gekühlt und mit 12 ml eiskalter 1N HCl versetzt. Bei -10° wurden nun 4,2 ml 1N NaNO₂-Lösung zugepumpt, wobei sich das Azid als klebriger Niederschlag ausschied. Nach 2 Min. wurden 180 ml gesättigte, eiskalte Na₂SO₄-Lösung und 24 ml 1N NaHCO₃-Lösung zugesetzt und darauf das Azid mit Essigester extrahiert. Die Extrakte wurden mit H₂O neutral gewaschen und über Na₂SO₄ bei 0° getrocknet.

Die Azidlösung wurde darauf mit der Lösung von 3 g H·Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro·OCH₃ in 36 ml Dimethylformamid bei 0° vereinigt und 24 Std. bei dieser Temperatur belassen. Darauf wurde der Ansatz mit viel Essigester verdünnt und mit Wasser, 1-proz. Essigsäure, NaHCO₃-Lösung und Wasser gründlich gewaschen. Nach Verdampfen des Essigesters wurde der Rückstand aus Chloroform-Äther umgefällt (5,13 g) und dann aus 100 ml heissem Acetonitril kristallisiert: 3,9 g (75%), Smp. 136–138°. Ultraviolett-Absorptionsspektrum in 96-proz. Äthanol: λ_{max} = 272 m μ (ϵ = 36600); 320 m μ (ϵ = 22400). DS: Rf = 0,65 (Dioxan-H₂O, 9:1); 0,20 (CHCl₃-CH₃OH, 9:1).

C₇₇H₁₂₂O₂₂N₂₂ (1708,0) Ber. C 54,15 H 7,20 N 18,08% Gef. C 53,81 H 7,25 N 18,05%

VIII: PZ-Lys(BOC)-Pro-Val-Gly-Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro·OH, p-Phenylazo-benzyloxycarbonyl-(N^ε-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-(N^ε-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-(N^ε-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-nitro-L-arginyl-L-prolin: 1,34 g (0,78 mMol) Nonapeptidester XXII in 9 ml 75-proz. Dioxan wurden mit 1,58 ml 1,95 N NaOH 15 Min. bei 20° verseift. Zur Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz in 140 ml Eiswasser, welches 3,08 ml 1 N HCl und 0,1 ml Eisessig enthielt, gegossen. Der gelbe, flockige Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit viel Wasser gewaschen und bei 0,001 Torr getrocknet: 1,26 g. DS-einheitlich: Rf = 0,25 (Dioxan-H₂O, 9:1); 0,0 (HClCl₃-CH₃OH, 9:1). Zur Analyse wurde aus Acetonitril (100 mg auf 3 ml) kristallisiert: Smp. 140–145°. Ultraviolett-Absorptionsspektrum in 96-proz. Äthanol: λ_{max} = 271 m μ (ϵ = 37200); 319 m μ (ϵ = 21700).

C₇₆H₁₂₀O₂₂N₂ (1693,98) Ber. C 53,89 H 7,14 N 18,19% Gef. C 53,57 H 7,20 N 18,52%

Totalhydrolyse und Oxydation von VIII mit L-Aminosäureoxydase: 4 mg dieser Verbindung wurden wie üblich⁵⁶) mit HCl hydrolysiert und mit L-Aminosäureoxydase inkubiert. PC 87 und 48: neben nicht oxydierten Aminosäuren Pro und Gly höchstens Spuren von Lysin.

IX: PZ-Lys(BOC)-Pro-Val-Gly-Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro-Val-Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro·OBu^t, p-Phenylazobenzyloxycarbonyl-(N^ε-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-(N^ε-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-(N^ε-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-prolyl-L-valyl-(N^ε-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-prolin-t-butylester: 990 mg (0,58 mMol) durch azeotrope Destillation mit Benzol und Trocknen über P₂O₅ vorbehandeltes PZ-Nonapeptid VIII wurden in 15 ml Dimethylformamid-Tetrahydrofuran (1:2) gelöst, auf -15° gekühlt, mit 0,58 mMol Triäthylamin (in 1 ml Tetrahydrofuran) und nach 15 Min. mit 0,58 mMol Chlorameisensäure-isobutylester (in 1 ml Tetrahydrofuran) versetzt. Nach 15 Min. bei -15° wurde die vorgekühlte Lösung von 450 mg (0,58 mMol) H·Val-Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro·OBu^t (XXIV) in 4 ml abs. Tetrahydrofuran unter Rühren zugegeben; Reaktion 30 Min. bei -15° und 90 Min. bei 20°. Die Lösung wurde vom [Et₃N, HCl] abfiltriert und i. V. auf ein kleines Volumen verdampft. Das Rohprodukt wurde mit viel Äther ausgefällt, abfiltriert und bei 45°/0,01 Torr getrocknet. Man löste es darauf in wenig Chloroform und chromatographierte diese Lösung an einer Säule von neutralem Aluminiumoxid (Akt. III; 130 g, \varnothing = 2,5 cm, l = 26 cm). Nach gründlichem Waschen mit Chloroform wurde das Tetradecapeptid-Derivat mit Chloroform-Methanol (95:5 Vol.) eluiert, wobei nicht umgesetztes Nonapeptid-Derivat oben in der Säule blieb.

Die dabei erhaltenen 1,31 g IX wurden aus 60 ml heissem Acetonitril kristallisiert: 1,14 g (80%) orangegelbe, feinste Kristalle, Smp. 160–165°. DS einheitlich: Rf = 0,65 (Dioxan-H₂O, 9:1); Ultraviolett-Absorptionsspektrum in 96-proz. Äthanol: λ_{max} = 272 m μ (ϵ = 36800); 319 m μ (ϵ = 20400).

C₁₁₅H₁₈₂O₃₀N₂₈ (2436,95) Ber. C 56,68 H 7,53 N 16,09% Gef. C 56,04 H 7,53 N 15,85%

Schema 5. – XXV: H·Lys(BOC)-Pro-Val-Gly-Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg-Arg-Pro-Val-Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro·OBu^t, 3 Tos·OH; N^ε-t-Butoxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-(N^ε-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-(N^ε-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valyl-(N^ε-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-prolin-t-butylester-tritosylat: 6,3 g (2,58 mMol) PZ-Tetradecapeptid-Derivat IX wurden in 150 ml 90-proz. Essigsäure gelöst und in Gegenwart von 1,3 g 10-proz. Pd-Kohle 5 Std. bei 5 Atm. und 20° hydriert. Anschliessend wurden nochmals 500 mg Katalysator zugegeben und die Hydrierung 18 Std. bei ca. 720 Torr und 20° weitergeführt (entstehendes CO₂ wurde in einem zweiten Gefäss über KOH absorbiert). Darauf filtrierte man die Lösung, verdampfte sie im Vakuum und wiederholte die Verdampfung sechsmal unter Zugabe von Wasser (zur Entfernung von Ammoniumacetat und organischen Basen): 5,3 g (90%) Rohprodukt.

DS: Hauptfleck (positive Reaktion mit PAULY-, Ninhydrin-, SAKAGUCHI- und REINDEL-HOPPE-Reagentien) $R_f = 0,35$ (45) und $0,25$ (52); schwacher Nebenfleck (mit denselben Reagentien anfärbbar) mit kleinerem R_f .

Die *Dinitrophenylierung* des rohen Hydrierungsproduktes, gefolgt von Totalhydrolyse, ergab N^α -DNP-Lysin als einziges gelbgefärbtes Aminosäure-Derivat, DS (100): $R_f = 0,1$ (insbesondere weder Bis-DNP-, $R_f = 0,7$ oder N^ϵ -DNP-Lysin, $R_f = 0,2$).

Zur weiteren *Reinigung* wurden 4 g des Hydrierungsproduktes, in 0,01M Ammoniumacetat-Puffer, pH = 6, gelöst, auf eine Säule von Carboxymethylcellulose (90 ml) gegossen und stufenweise mit je 250 ml Ammoniumacetat-Puffer, pH = 6, folgender molarer Konzentrationen eluiert: 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,4 und 0,5. Die Hauptmenge (2,8 g = 70%) erschien mit 0,1 bis 0,2M Puffer und erwies sich als chromatographisch einheitlich: DA, $R_f = 0,4$ (100). Die langsamer wandernde Verunreinigung war schon bei Molaritäten von 0,01 und 0,05 eluiert worden: 900 mg; DA, $R_f = 0,08$ (100).

Dinitrophenylierung und Hydrolyse beider Fraktionen ergab wiederum nur N^α -DNP-Lysin (DS 100: $R_f = 0,1$).

Das Hauptprodukt besitzt folgende Eigenschaften: $[\alpha]_D = -83,9 \pm 2^\circ$ ($c = 0,54$, Wasser); Ultraviolett-Absorptionsspektrum in 96-proz. Äthanol: $\lambda_{max} = 278 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 1650$) (Tyrosin).

$C_{107}H_{186}O_{30}N_{24}$ (2288,80) Ber. N 14,69 $CH_3(-CO)$ 1,98% Gef. N 14,52 $CH_3(-CO)$ 1,74%

Nach Totalhydrolyse wurden folgende Aminosäure-Verhältnisse gefunden: Lys 4,15; Arg 1,75; Pro 3,05; Gly 1,23; Val 3; Tyr 0,96; NH_3 0,18 (bezogen auf Valin).

Dieses Triacetat wurde wie folgt in das *Tritosylat* XXV übergeführt: 5 g (2,18 mMol) Triacetat wurden in 7,5 ml Pyridin gelöst und bei 0° mit der Lösung von 1,11 g wasserfreier *p*-Toluolsulfosäure in 7,5 ml Pyridin versetzt. Das Pyridin (und Pyridin-acetat) wurde bei 0,01 Torr verdampft. Der Rückstand wurde mit Äther und Benzol mehrmals verrieben und gewaschen: 5,7 g (100%); $[\alpha]_D = -41,4 \bullet 1^\circ$ ($c = 0,943$, Pyridin); Titration in 80-proz. Methylcellosolve⁶²): Gef. (Molekulargewicht) 2490, $pK_{mcs}^* = 7,0$.

$C_{122}H_{198}N_{24}O_{33}S_3$ Ber. C 55,82 H 7,60 N 12,81 S 3,66%
(2625,25) Gef. „ 55,49 „ 7,61 „ 12,69 „ 3,90%

II: BOC-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBu^t)-His-Phe-Arg-Tyr-Gly-Lys(BOC)-Pro-Val-Gly-Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg-Arg-Pro-Val-Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro-OBu^t, 3 AcOH (geschütztes β^{1-24} -Corticotropin): 5,69 g (2,14 mMol) Tetradecapeptid-tritosylat XXV und 4 g BOC-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBu^t)-His-Phe-Arg-Tyr-Gly-OH (VI) (2,75 mMol) wurden in 55 ml abs. Pyridin 30 Min. gerührt und dann mit 1,8 g (8,7 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt. Nach 3 Tagen (Rühren bei 20°) wurde der auskristallisierte Dicyclohexylharnstoff abfiltriert (500 mg), das Filtrat auf ein kleines Volumen eingedampft und das Reaktionsprodukt mit viel Essigester ausgefällt. Durch Chromatographie an eine Säule von Amberlit IR-4B wurde Tosylat-Ion gegen Acetat-Ion ausgetauscht.

Die weitere *Reinigung* erfolgte mittels multiplikativer Verteilung⁶³) über 400 Stufen im System Methanol, Puffer, $CHCl_3$, CCl_4 (8:4:5:2 Vol.; Puffer: 285 ml Eisessig + 192,5 g Ammoniumacetat mit Wasser auf 10 l aufgefüllt, pH = 4,5). Während der ersten 20 Verteilungsschritte (Unterphase = 100 ml) traten Emulsionen auf, die sich aber mit längeren Wartezeiten meistern lassen; später machte die Verteilung keine Mühe. Die Hauptmenge des geschützten Tetracosapeptids II befindet sich in den Elementen Nr. 75–121 ($K = 0,45$). Nach Verdampfen des Lösungsmittels und Absublimieren des Ammoniumacetates verblieben 4,2 g (55%) des reinen, geschützten Tetracosapeptid-Derivates II. $[\alpha]_D = -52,5 \pm 3^\circ$ ($c = 0,45$ in Methanol); Ultraviolett-Absorptionsspektrum in 0,5N NaOH-Methanol (1:1 Vol): $\lambda_{max} = 244 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 29200$), $284 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 9650$), $290 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 9950$), woraus sich das Molverhältnis Tyr/Try = 2,19 berechnete⁶⁴). DA: $R_f = 0,3$ (100), einheitlich.

Aminosäureanalyse des Totalhydrolysates ergab: Arg 2,76; Glu 1,01; Gly 2,08; His 1,07; Lys 4,08; Met 1,06; Phe 1,10; Pro 3,15; Ser 1,74; Tyr 2,10; Val 3 (Bezugspunkt).

Das geschützte β^{1-24} -Corticotropin-triacetat lässt sich auch mittels Chromatographie an Carboxymethylcellulose (CMC) aus dem rohen Peptidgemisch gewinnen: 7,49 g dieses Gemisches

⁶²) Vgl. W. SIMON, *Helv.* 41, 1835 (1958).

⁶³) Die Ausarbeitung verdanken wir Dr. B. RINKER.

⁶⁴) Vgl. G. H. BEAVAN & E. R. HOLIDAY, *Advances Protein Chemistry* 7, 319 (1952).

wurden in etwa 50-proz. *t*-Butanol gelöst und auf eine CMC-Säule (25 g) gegossen und dann mittels diskreten, steigenden Mengen von Essigsäure chromatographiert. Das gewünschte Tetracosapeptid-Derivat erscheint mit 50-proz. *t*-Butanol-2*N* Essigsäure beim Volumenverhältnis 98:2 und 96:4. Ausbeute 3,15 g (50%). DA: Rf = 0,3 (100), einheitlich.

I: *H*·*Ser*-*Tyr*-*Ser*-*Mel*-*Glu*-*His*-*Phe*-*Arg*-*Try*-*Gly*-*Lys*-*Pro*-*Val*-*Gly*-*Lys*-*Lys*-*Arg*-*Arg*-*Pro*-*Val*-*Lys*-*Val*-*Tyr*-*Pro*·OH, 6 AcOH; *L*-*Seryl*-*L*-*tyrosyl*-*L*-*seryl*-*L*-*methionyl*-*L*-*glutamyl*-*L*-*histidyl*-*L*-*phenylalanyl*-*L*-*arginyl*-*L*-*tryptophyl*-*glycyl*-*L*-*lysyl*-*L*-*prolyl*-*L*-*valyl*-*glycyl*-*L*-*lysyl*-*L*-*lysyl*-*L*-*arginyl*-*L*-*arginyl*-*L*-*prolyl*-*L*-*valyl*-*L*-*lysyl*-*L*-*valyl*-*L*-*tyrosyl*-*L*-*prolin-hexaacetat*: 2,125 g reines, geschütztes Tetracosapeptid-Derivat II wurden in 10 ml 90-proz. Trifluoressigsäure gelöst und 1 Std. bei 20° aufbewahrt. Die Säure wurde bei 20° Badtemperatur und 12 Torr abdestilliert. Den Rückstand trocknete man über KOH und P₂O₅ bei 0,001 Torr und filtrierte ihn in wässriger Lösung durch eine Ionenaustauschersäule (MERCK III) in der Acetatform. Das Filtrat wurde verdampft und der Rückstand getrocknet: 1,68 g (90%).

DA einheitlich: Rf = 0,55–0,60 (101), positive Reaktion mit PAULY-, Ninhydrin-, SAKAGUCHI- und REINDEL-HOPPE-Reagens. Elektrophorese einheitlich; bei ca. 30 V/cm auf Papierträger fand man nach 1 Std. folgende Quotienten der Wanderungsstrecken (Lys = 1):

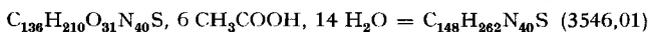
	pH = 1,9	pH = 6,3	pH = 9,3
β^{1-10}	0,50	0,20	0,3 cm
β^{1-24}	0,65	0,65	0,60 cm
β^{11-24}	0,85	0,85	1,0 cm

Es konnten weder β^{1-10} - noch β^{11-24} -Corticotropin nachgewiesen werden. Ultraviolet-Absorptionsspektrum in 0,1*N* NaOH: $\lambda_{max} = 283 m\mu$ ($\epsilon = 8550$); $289 m\mu$ ($\epsilon = 8810$); Molverhältnis Tyr/Try = 2,0^{6a}). $[\alpha]_D^{25} = -88,6 \pm 2^\circ$ ($c = 0,511$ in 1-proz. Essigsäure).

Aminosäureanalyse von *I*: vgl. auch die Werte in ^{12a}). Proben wurden bei 115° mit 7,1*N* HCl während 24 und 72 Std. verseift. Eine typische Analyse ergab (Bezugswert: Val = 3):

	His	Lys	Arg	NH ₃	Ser	Glu	Pro	Gly	Val	Met	Tyr	Phe
24 Std.	1,13	3,97	2,92	0,63	1,80	1,10	3,15	2,08	3	0,93	1,95	0,91
72 Std.	1,11	4,20	2,66	1,59	1,12	0,88	3,10	1,98	3	0,72	1,65	1,03
Ber.	1,00	4,00	3,00	0,00	2,00	1,00	3,00	2,00	3	1,00	2,00	1,00

Oxydationsprodukt von *I*: Behandlung mit H₂O₂ in Essigsäure ergab das Met⁴-Sulfoxid-Derivat des β^{1-24} -Corticotropins. DA einheitlich: Rf = 0,45 (101); es kann neben β^{1-24} -Corticotropin mittels DA gut nachgewiesen werden. Die Verbindung wird mit verd. wässriger Thioglykolsäurelösung bei 50° wieder zu β^{1-24} -Corticotropin reduziert. Das Analysenpräparat wurde in 0,01*N* Essigsäure faserfrei filtriert, lyophilisiert und 24 Std. bei 0,001 Torr über P₂O₅ getrocknet.



Ber. C 50,13 H 7,45 N 15,80 S 0,90 CH₃COOH 2,52%

Gef. „ 50,31 „ 7,03 „ 15,77 „ 1,18 „ 2,88%

„ „ 50,34 „ 7,17 „ 15,50 — „ 2,60%

Titration in 80-proz. Methylcellosolve^{6a}): Gef. (Molgewicht) 3440.

SUMMARY

The synthesis of the tetracosapeptide β^{1-24} -corticotropin, containing the N-terminal 24 amino-acid residues of β -corticotropin (ACTH)², is described in detail. Many intermediates, including derivatives of the decapeptide β^{1-10} -corticotropin and of the tetradecapeptide β^{11-24} -corticotropin, were obtained in the crystalline state. A new scheme for the protection of amino and carboxyl groups in the side chains of amino-acid residues was developed: this led to a blocked tetracosapeptide II

which contains only protective groups derived from *t*-butanol. These may be removed quantitatively, without formation of side-products. β^{1-24} -Corticotropin (I) is thus obtained directly in an analytically pure state; $[\alpha]_D^{25} = -88,6 \pm 2^\circ$ ($c = 0,5$ in 1 per cent acetic acid). The biological activity of the product was found to be 106 ± 14 USP-U/mg (ACTH). It is equally active on intravenous application in human beings.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

171. Analyse radiochimique par activation aux neutrons thermiques Dosage direct du vanadium dans un acier 18/8, par mesure de l'activité du vanadium 52 (période 3,76 minutes)¹⁾

par W. Haerdi, Ed. Martin et D. Monnier

(30 IV 63)

I. Introduction. – Dans deux publications précédentes¹⁾, nous avons décrit des applications intéressant l'analyse par activation aux neutrons thermiques, basée sur la formation d'isotopes à courte période (dosage du cobalt par activation du cobalt 60m). Nous proposons ici un dosage, sans séparation, de traces de vanadium dans l'acier 18/8. Cette méthode est plus précise et plus rapide que les méthodes chimiques et physico-chimiques ordinaires.

Le dosage radiochimique du vanadium par activation en ^{52}V a été utilisé par divers auteurs: BROOKSBANK et coll.²⁾ déterminent ainsi le vanadium dans le titane; THOMSON et coll.³⁾, dans le silicium (la méthode est peu précise); KEMP et coll.⁴⁾, dans les roches et météorites; DEYRIS & ALBERT⁵⁾, dans l'aluminium, et enfin, dans les aciers, LELIAERT et coll.⁶⁾, par discrimination (entre 1,3 et 1,55 MeV), méthode basée sur la décroissance du ^{52}V et du ^{56}Mn (principal radio-isotope gênant).

La courte période du ^{52}V ($T = 3,76$ min) exige un dosage radiochimique très rapide, si possible sans séparations chimiques.

Le dosage que nous proposons diffère de celui de LELIAERT par la méthode d'irradiation, d'étalonnage et de mesure. Il se fait directement sur l'échantillon solide («non destructif» N.D., sans séparation chimique).

II. Mesure de l'activité. – Dans le cas de courte période il faut connaître de façon précise, non seulement le temps qui s'écoule entre la fin de l'irradiation et le début de la mesure de l'activité (t'), mais aussi la décroissance de l'isotope au cours du

¹⁾ D. MONNIER, W. HAERDI & J. VOGEL, *Helv.* **44**, 897, 1565 (1961).

²⁾ W. A. BROOKSBANK, G. W. LEDDICOTTE & S. A. REYNALDS, *Analyt. Chemistry* **28**, 1033 (1956).

³⁾ B. A. THOMSON, B. M. SHAUSE & M. B. LEBOEUF, *Analyt. Chemistry* **30**, 1023 (1958).

⁴⁾ D. M. KEMP & A. A. SMALES, *Analyt. chim. Acta* **23**, 397 (1960).

⁵⁾ M. DEYRIS & PH. ALBERT, *Rev. Métallurg., Mémoires scient.* **59**, 14 (1962).

⁶⁾ G. LELIAERT, J. HOSTE & J. EECKHAUT, *Analyt. chim. Acta* **19**, 100 (1958).