

222. Die Synthese des β -Melanotropins (β -MSH) mit der Aminosäuresequenz des bovinen Hormons¹⁾

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

(22. VI. 63)

Herrn Prof. Dr. KARL BERNHARD zum 60. Geburtstag gewidmet

In den Hypophysen von Wirbeltieren befinden sich im wesentlichen drei Hormontypen, welche eine Dispersion der Melaninkörner in den Pigmentzellen (Chromophoren) der Haut von Fröschen und andern Amphibien bewirken. Es sind dies (nach steigender biologischer Wirksamkeit geordnet):

1. das Corticotropin (adrenocorticotropes Hormon, ACTH);
2. das β -Melanotropin (β -melanophorenstimulierendes Hormon, β -MSH) und
3. das α -Melanotropin (α -melanophorenstimulierendes Hormon, α -MSH).

Gemeinsame Aminosäuresequenzen (z. B. die Heptapeptidsequenz Met-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly²⁾) sind offenbar verantwortlich für die melanophoretische Wirkung aller dieser Polypeptide³⁾ 4). Die hauptsächliche physiologische Wirkung des ACTH ist ohne Zweifel die Steuerung von Wachstum und Hormonausschüttung der Nebennierenrinde; seine melanotrope Wirkung scheint eher nebensächlich zu sein. Letztere ist beim α -MSH und β -MSH sehr ausgeprägt und ist die einzige wirklich auffällige biologische Wirkung dieser beiden Hormone, welche bisher beschrieben wurde⁵⁾.

Währenddem beim α -MSH noch keine Speziesunterschiede entdeckt werden konnten, sind solche beim β -MSH recht auffällig⁶⁾. Das bovine β -MSH ist durch eine N-terminale Sequenz Asp-Ser-Gly gekennzeichnet, die auch bei vielen hydrolytischen Enzymen anzutreffen ist und dort teilweise für die spezifische Wirkung verantwortlich zu sein scheint.

Struktur und Wirkungsgrad der drei melanotropen Hormone⁷⁾

H·Ser-Tyr-Ser-**Met-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly**-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asp-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu(NH₂)-Leu-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe·OH
I: β -Corticotropin (ACTH)⁸⁾: $1,8 \times 10^8$ MSH-E/g⁹⁾ 39

¹⁾ An den VII Giornate Biochimiche Latine in S. Margherita Ligure am 25. V. 1963 vorgetragen (R. S.).

²⁾ Für Abkürzungen von Aminosäuren, Peptiden, Schutzgruppen usw. sowie für die Einleitung zum experimentellen Teil vgl. die entsprechenden Fussnoten und Abschnitte in ⁹⁾.

³⁾ J. I. HARRIS, Brit. med. Bull. **16**, 189 (1960).

⁴⁾ R. SCHWYZER: «Chemical structure and biological activity in the field of polypeptide hormones», Pure appl. Chemistry **6**, 265 (1963); «Synthetische Polypeptide mit physiologischer Wirkung», Ergebn. Physiol. **53** (1963), im Druck.

⁵⁾ Vgl. aber ⁴⁾ für weitere Wirkungen.

⁶⁾ Vgl. T. H. LEE, A. B. LERNER & V. BUETTNER-JANUSCH, J. biol. Chemistry **236**, 1390 (1961), sowie ⁴⁾.

⁷⁾ Gemeinsame Sequenzen sind kursiv gedruckt.

⁸⁾ Aminosäuresequenz nach R. G. SHEPHERD, S. D. WILLSON, K. S. HOWARD, P. H. BELL, D. S. DAVIES, S. B. DAVIS, E. A. EIGNER & N. SHAKESPEARE, J. Amer. chem. Soc. **78**, 5067 (1956).

⁹⁾ R. SCHWYZER, A. COSTOPANAGIOTIS & P. SIEBER, Helv. **46**, 870 (1963).

H · Asp-Ser-Gly-Pro-Tyr-Lys-**Met-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly**-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp · OH
 II: β -Melanotropin (bovines β -MSH): 2×10^9 MSH-E/g¹⁰) 18

Ac · Ser-Tyr-Ser-**Met-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly**-Lys-Pro-Val · NH₂
 III: α -Melanotropin (α -MSH): 2×10^{10} MSH-E/g¹¹) 13

Frühere Versuche auf dem Gebiete des bovinen β -MSH hatten zur Synthese eines geschützten Octadecapeptides mit etwa 1% der biologischen Wirksamkeit des nativen Hormons geführt¹²). Die dort gewählten Schutzgruppen (Carbobenzoxy-, Toluolsulfonyl- und Methylester-) liessen sich jedoch ohne Zerstörung der Peptidkette nicht entfernen. Diese Beobachtungen brachten uns zur Überzeugung, dass die damals angewandten Kondensationsprinzipien durchaus brauchbar seien, dass aber neue, mildere Schutzgruppen und Kombinationen davon gesucht werden müssten. Die systematische Anwendung von Schutzgruppen, welche sich vom *t*-Butanol ableiten, erwies sich als ausserordentlich fruchtbar¹³). Sie hat bisher die Synthese des α -Melanotropins (III)⁹), des (hier beschriebenen) bovinen β -Melanotropins (II) und neuerdings (neben aktiven Corticotropin-Teilsequenzen¹³)) auch die Synthese des ACTH (I) selbst¹⁴) erlaubt. Damit sind die Synthesen aller drei Hormontypen (β -MSH und ACTH erstmals) dank dieser Methodik¹⁵) verwirklicht worden.

Reinstes, synthetisches «Rinder»- β -MSH (II) besitzt (innerhalb der Fehlergrenze) den gleichen Verteilungskoeffizienten wie das Naturprodukt¹⁰) ($K = 0,56$, bestimmt durch multiplikative Verteilung über 1300 Verteilungsschritte im System 0,5% Trichloressigsäure-*sec*-Butanol). Es wird, nach Austausch der Trifluoracetat-Ionen gegen Acetat-Ionen, durch Gefriertrocknung als farbloses Pulver erhalten, welches 78% Peptid, 15,5% Wasser und 6,5% Essigsäure enthält. Durch scharfes Trocknen bei 50° wird nicht ganz die Hälfte des Wassers abgegeben (7,1%); sie wird beim Stehen an der Luft wieder adsorbiert. Die spezifische Drehung beträgt $[\alpha]_D^{25} = -57,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$ in 1 N Essigsäure), also -73° auf wasser- und acetat-freies Peptid berechnet.

Herr Dr. DESAULLES (CIBA AG., Biologische Abt.) bestimmte die melanotrope Wirkung *in vitro* zu etwa $1/10$ derjenigen unseres synthetischen α -MSH; in Einheiten ausgedrückt, würde das bedeuten, dass 1 g unseres synthetischen β -MSH-Präparates (mit Wasser und Acetat) ungefähr $1,2-4 \times 10^9$ MSH-E enthält. Diese Zahl stimmt gut mit der in der Literatur für das Naturprodukt angegebenen (2×10^9 MSH-E/g)¹⁰) überein. Wie beim α -MSH hat Herr Prof. LERNER (Yale School of Medicine) in seiner *in vitro*-Testanordnung eine unerwartet hohe Aktivität gefunden (ca.

¹⁰) Isolierung, Konstitutionsaufklärung: I. I. GESCHWIND, C. H. LI & L. BARNAFI, J. Amer. chem. Soc. **79**, 1003, 6394 (1957). Verteilungskoeffizient $K = 0,53$ (702 Schritte, 2-Butanol/0,5-proz. Cl₃CCOOH). Aktivität vgl. auch C. H. LI, Lab. Investigation **8**, 574 (1959).

¹¹) Isolierung, Konstitutionsaufklärung: J. I. HARRIS & A. B. LERNER, Nature **179**, 1346 (1957); J. I. HARRIS, Biochem. J. **71**, 451 (1959).

¹²) R. SCHWYZER, H. KAPPELER, B. ISELIN, W. RITTEL & H. ZUBER, Helv. **42**, 1702 (1959).

¹³) Vgl. dazu H. KAPPELER & R. SCHWYZER, Helv. **44**, 1136 (1961); R. SCHWYZER & H. KAPPELER, *ibid.* **46**, 1550 (1963).

¹⁴) R. SCHWYZER & P. SIEBER, Nature (London) **199**, 172 (1963).

¹⁵) Unsere in den letzten vier Jahren entwickelten Methoden (vgl. ⁹) und ¹³) sind unverändert von den Arbeitsgruppen in Hoechst (K. STURM, R. GEIGER & W. SIEDEL, Chem. Ber. **96**, 609 (1963); R. GEIGER, K. STURM & W. SIEDEL, *ibid.* **96**, 1080) und in Pittsburgh (K. HOFMANN, R. D. WELLS, H. YAJIMA & J. ROSENTHALER, J. Amer. chem. Soc. **85**, 1546 [1963]) – im letzten Falle ohne Hinweis auf unsere Vorarbeiten – übernommen worden.

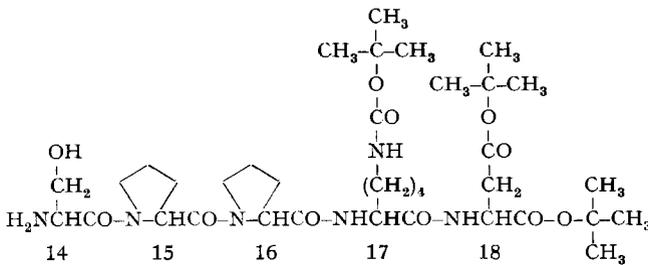
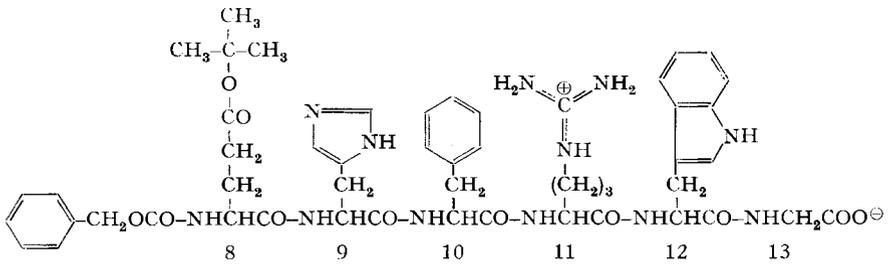
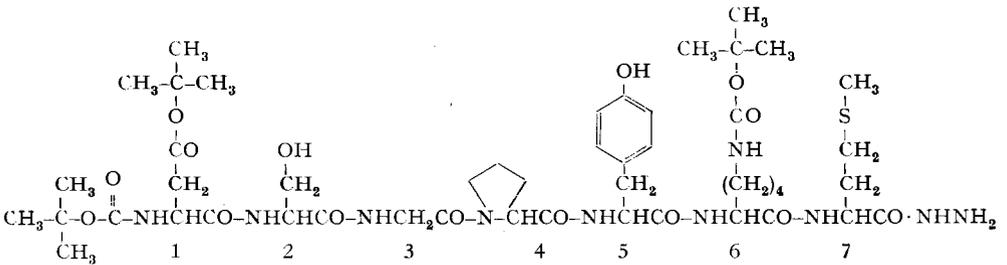
2×10^{11} MSH-E/g), obwohl die Aktivitäten anderer Peptide im gewohnten Bereiche lagen (z. B. β^{1-24} -Corticotropin = $1,8 \times 10^8$ MSH-E/g). Eine Erklärung für diese, in vielen Versuchen bestätigte Erscheinung wurde noch nicht gefunden¹⁶⁾.

Verlauf der Synthese

Als grössere Zwischenprodukte wollten wir drei Peptidderivate haben, welche

- a) sterisch einheitlich,
- b) ohne partielle Racemisierung verknüpfbar, und
- c) im Besitze der richtigen, im «geschützten» Endprodukt erwünschten Schutzgruppen sein sollten.

Um die Punkte a) und b) zu verwirklichen, haben wir, wie in unserem früheren Schema¹²⁾, die Gesamtkette von 18 Aminosäureresten in drei Teile, umfassend die



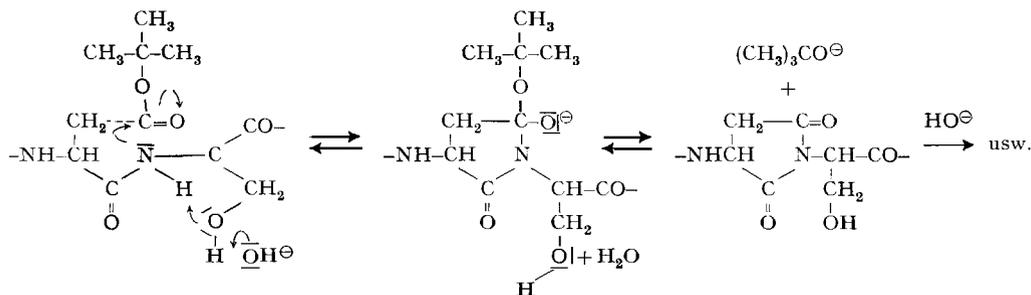
¹⁶⁾ Beiden Herren möchten wir für die Mitteilung ihrer Resultate bestens danken.

Reste 1–7, 8–13 und 14 bis 18, aufgeteilt. Bei der Verknüpfung dieser Untereinheiten miteinander wird partielle Racemisierung dadurch vermieden, dass Rest No. 13 Glycin ist und deshalb nicht racemisiert werden kann, und dass zur Knüpfung der Peptidbindung No. 7 → 8 die CURTIUS'sche Azidmethode verwendet wird.

Unser erstes Ziel war also die Herstellung drei Zwischenprodukte (S. 1977).

1. *Synthese des Heptapeptid-Derivates IV, Pos. 1–7.* Das Heptapeptid-Derivat IV wurde nach Schema 1 aufgebaut; als wichtige Zwischenprodukte waren das Tripeptid-Derivat VIII, Pos. 1–3, und das Tetrapeptid-Derivat XIV, Pos. 4–7, anzusehen.

Bei der Synthese des ersteren (VIII) wurde bald klar, dass Derivate des Asparaginsäure- β -*t*-butylesters, bei denen die α -Carbonylgruppe peptidisch verknüpft ist, gegenüber Alkali bei weitem nicht so stabil sind wie z. B. Derivate des Glutaminsäure- γ -*t*-butylesters. Die *t*-Butylestergruppe wird mit merklicher Geschwindigkeit hydrolysiert – allerdings lange nicht so schnell wie eine entsprechende Methylestergruppe. Dazu mag ein intramolekularer Mechanismus unter Beteiligung des mit der α -Carboxylgruppe verbundenen Stickstoffs, sowie, in unserem speziellen Falle, auch unter Beteiligung der Serin-Hydroxylgruppe, erheblich beitragen:



Ein solcher Mechanismus ist kürzlich von BERNHARD und Mitarb.¹⁷⁾ für die beschleunigte Hydrolyse anderer, veresterter Asparaginsäurepeptide vorgeschlagen worden.

Aus diesem Grunde wurde durch Verknüpfung von *t*-Butoxycarbonyl-L-asparaginsäure- β -*t*-butylester und L-Seryl-glycin-*p*-nitrobenzylester, H·Ser-Gly·ONB¹⁸⁾ (mittels Carbodiimid) der Tripeptid-*p*-nitrobenzylester VII hergestellt. Dieser kann nämlich leicht durch katalytische Hydrierung in die freie Säure VIII verwandelt werden.

Aus demselben Grunde waren Schwierigkeiten bei der Hydrazinolyse des Heptapeptid-methylesters XV vorauszusehen. Tatsächlich wurden bei längerdauernder Einwirkung von Hydrazinhydrat in methanolischer Lösung auf XV etliche Nebenprodukte erhalten, welche dünnschichtchromatographisch nachgewiesen wurden. Durch Beschränkung der Reaktionsdauer auf 4 Std. (Zimmertemperatur, fünffacher Überschuss an Hydrazinhydrat) können die Nebenprodukte auf etwa 10% eingeschränkt werden, und es gelingt, neben Ausgangsmaterial (XV), das gewünschte, kristallisierte Heptapeptid-hydrazid IV in ca. 60-proz. Ausbeute zu erhalten.

¹⁷⁾ S. A. BERNHARD, A. BERGER, J. H. CARTER, E. KATCHALSKI, M. SELA & Y. SHALITIN, J. Amer. chem. Soc. 84, 2421 (1962).

¹⁸⁾ B. ISELIN & R. SCHWYZER, Helv. 45, 1499 (1962).

Die Synthese des Tetrapeptid-Derivats XIV gestaltete sich auch schwierig. Wegen des Methionins entschlossen wir uns für eine Schutzgruppenkombination Trityl-(am N α) und *t*-Butoxycarbonyl-(am N ϵ)¹⁹) im vollständig geschützten Tetrapeptid-Derivat XIII. Um das Methionin möglichst spät einzuführen und um den Schwierigkeiten, welche bei der Verknüpfung von N α -Tritylamino-säuren infolge sterischer Hinderung auftreten, möglichst nur einmal und möglichst zu Beginn der Synthese begegnen zu müssen, wählten wir eine stufenweise Synthese, welche vom N-Terminus zum C-Terminus hin verläuft.

N α -Trityl-L-prolin wurde aus N α -Trityl-L-prolin-benzylester durch selektive katalytische Hydrierung in mässiger Ausbeute gewonnen; bei der Kristallisation entstehen immer Verluste, da durch die inhärente Acidität der Verbindung ein Teil der Tritylgruppen abgespalten wird (dieser Schwierigkeit begegnet man wieder bei der Herstellung der Verbindungen Xa und XIIa, welche im kristallisierten Zustande stabil sind, sich in organischen Lösungsmitteln aber langsam zersetzen).

Eine ebenfalls mässige Ausbeute wurde in der folgenden Stufe, der Kondensation mittels Carbodiimid zu Trityl-L-prolyl-L-tyrosin-methylester (IX), erhalten: eine Folge der sterischen Hinderung durch Trityl. Daneben entstehen beträchtliche Mengen N'-(Trityl-prolyl)-,N'N''-dicyclohexyl-harnstoff (bis 50%), welcher in kristallisierter Form isoliert wurde.

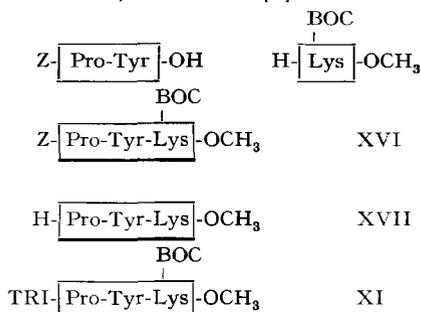
Von nun an macht sich die sterische Hinderung kaum mehr bemerkbar; das Trityl-L-prolyl-L-tyrosin (Xa) und sein Säurehydrazid (Xb) werden in über 80% Ausbeute erhalten. Die Säure Xa zeigt eine auffallende Neigung, mit verschiedenen Lösungsmitteln Addukte zu bilden; sie kristallisiert z. B. mit 1 Molekel Aceton oder mit 1 bis 2 Molekeln Dimethylformamid.

Die Überführung von Xb in das Säureazid und anschliessende Kondensation mit N ϵ -*t*-Butoxycarbonyl-L-lysin-methylester¹⁹) lieferte reinen Trityl-L-prolyl-L-tyrosyl-(N ϵ -*t*-butoxycarbonyl)-L-lysin-methylester (XI) in kristallisierter Form (Ausbeute 47%). Eine entsprechende Kondensation von Xa mittels Carbodiimid ergab sogar 72% des Tripeptid-Derivates (XI) mit denselben physikalischen Eigenschaften (eventuell entstandenes Tripeptid-Derivat mit D-Tyrosin scheint also in den Mutterlaugen der Kristallisation zurückzubleiben). Die optische Einheitlichkeit von XI wurde durch Abspaltung der Schutzgruppen und Behandlung mit Chymotrypsin bewiesen: das Peptid wurde vollständig zu L-Prolyl-L-tyrosin und L-Lysin gespalten.

Wir versuchten, die schlechten Ausbeuten, welche zu Beginn der Synthese von XI aufgetreten waren, zu verbessern, indem wir den Umweg über die entsprechenden N α -Carbobenzoxy-Verbindungen wählten (Schema 2). Carbobenzoxy-L-prolyl-L-tyrosyl-(N ϵ -*t*-butoxycarbonyl)-L-lysin-methylester (XVI) wurde als kristallisierte Verbindung durch Kondensation von Carbobenzoxy-L-prolyl-L-tyrosin²⁰) mit N ϵ -*t*-Butoxycarbonyl-L-lysin-methylester mittels Dicyclohexyl-carbodiimid erhalten (69%). Katalytische Hydrierung ergab XVII (92%), welches mit Triphenylchlor-methan und Triäthylamin in das Trityl-tetrapeptid-Derivat XI übergeführt wurde. Da die Ausbeute auf dieser Stufe nur 32% betrug, ergab sich kein Vorteil von Schema 2 über Schema 1.

¹⁹) R. SCHWYZER & W. RITTEL, Helv. 44, 159 (1961).

²⁰) B. ISELIN, Helv. 44, 61 (1961).

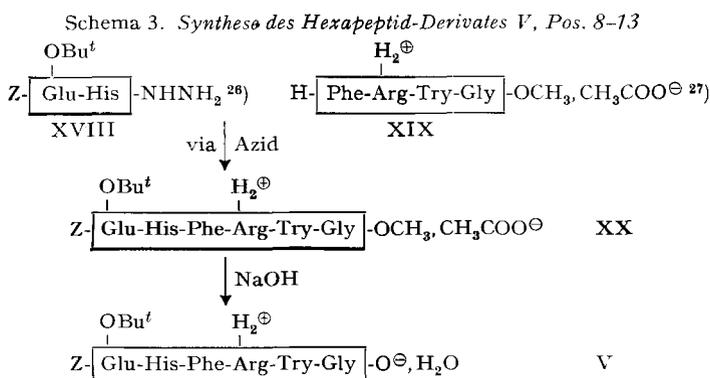
Schema 2. *Alternative Synthese des Tripeptid-Derivates XI, Pos. 4-6*

Das kristallisierte Tetrapeptid-Derivat mit freier α -Aminogruppe (XIV) wurde auf einfache Weise und in ausgezeichneter Ausbeute durch selektive Spaltung der N^α -Trityl-Schutzgruppe mittels Essigsäure erhalten.

Die Kondensation der beiden sterisch einheitlichen Komponenten VIII und XIV (mittels Dicyclohexyl-carbodiimid) führte nun in 82% Ausbeute zum (sterisch einheitlichen) Heptapeptid-Derivat XV, welches wie beschrieben ins Hydrazid IV verwandelt wurde.

2. *Synthese des Hexapeptid-Derivates V, Pos. 8-13.* Zur Synthese des Hexapeptid-Derivates Z-Glu(OBu^t)-His-Phe-Arg-Try-Gly (V) wurden nach Schema 3 die beiden bekannten Verbindungen Carbobenzoxy-(β -*t*-butyl)-L-glutamyl-L-histidin-hydrazid (XVIII) und L-Phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-methylester-monoacetat (XIX) mittels der Azid-Methode kondensiert (Ausbeute 60-70%). Das kristallisierte, vollständig geschützte Hexapeptid-Derivat XX ergab durch Verseifung das ebenfalls kristallisierte V, mit freier Carboxylgruppe, in über 90-proz. Ausbeute.

3. *Synthese des Pentapeptid-Derivates VI, Pos. 14-18.* Schema 4 zeigt den Aufbauweg, den wir eingeschlagen haben: eine stufenweise Synthese vom C-Terminus gegen den N-Terminus hin. Dieser Weg, zusammen mit der grossen Zahl kristallisierter Zwischenprodukte, bietet eine genügende Garantie für die sterische Einheitlichkeit des Endproduktes²²⁾. Für den Schutz der α -Aminogruppen wurde durchwegs der



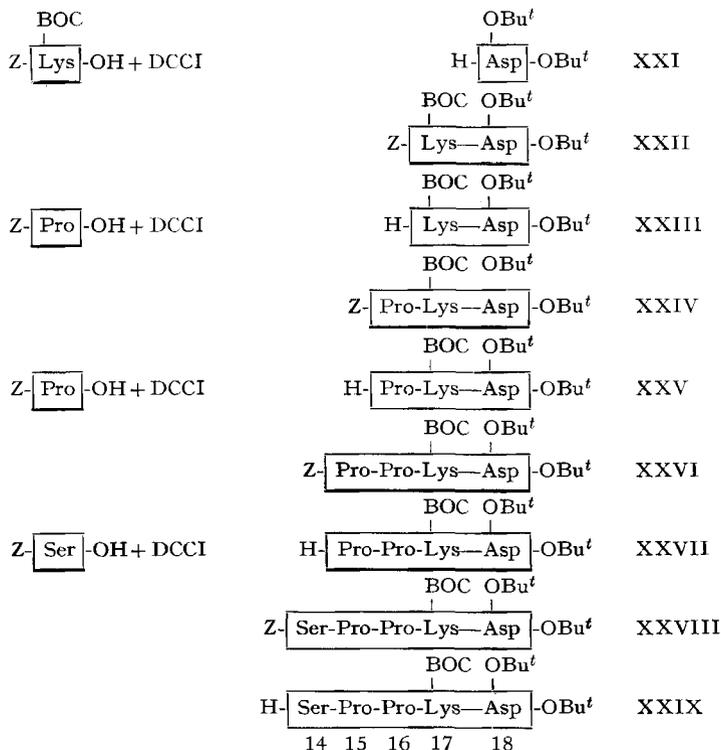
²²⁾ F. WEYGAND, A. PROX, L. SCHMIDHAMMER & W. KÖNIG, *Angew. Chem.* 75, 282 (1963).

²⁶⁾ R. SCHWYZER & H. KAPPELER, *Helv.* 44, 1991 (1961).

²⁷⁾ H. KAPPELER, *Helv.* 44, 476 (1961).

Schema 4. *Synthese des Pentapeptid-Derivates VI, Pos. 14-18*

(Abspaltung des Carbobenzyrestes Z-, hydrogenolytisch; DCCI = Dicyclohexyl-carbodiimid)



Carbobenzy-Rest gewählt, der sich durch katalytische Hydrierung leicht selektiv (vor Butoxycarbonyl und *t*-Butoxy) abspalten lässt. Alle Kondensationen wurden mit Carbodiimid ausgeführt. Für weitere Details verweisen wir auf den experimentellen Teil.

4. *Schlussphase der Synthese von β -MSH*. Nachdem nun auf diese Weise die drei gewünschten Zwischenprodukte IV, V und VI (vgl. S. 1977) hergestellt worden waren, schritten wir zu ihrer Kondensation zum geschützten Octadecapeptid-Derivat XXXII, Schema 5.

Das Hexapeptid-Derivat V ist ein inneres Salz, welches mit einer Mol. Wasser kristallisiert. Um es in eine Form zu bringen, die mittels Carbodiimid kondensiert werden kann, wurde es in Dimethylformamid mit 1 Äquivalent *p*-Toluolsulfonsäure vorbehandelt (Protonisierung der Carboxylgruppe) und erst dann mit dem Pentapeptid-Derivat VI umgesetzt.

Das Kondensationsprodukt (nach Überführung ins Acetat = vollständig geschütztes Undecapeptid-Derivat XXX) konnte mittels multiplikativer Verteilung über 230 Stufen in einem Methanol-Ammoniumacetat-Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff-System gereinigt werden (Ausbeute 57%). Trotz einer kleinen, ca. 5% betragenden, dünn-schichtchromatographisch nachweisbaren Verunreinigung wurde die Verbindung weiterverarbeitet.

Ihre Hydrierung ergab das Undecapeptid-Derivat XXXI, mit freier α -Amino-gruppe, in quantitativer Ausbeute. Es war, abgesehen von der 5% betragenden Verunreinigung, die von XXX her übernommen wurde, dünn-schichtchromatographisch einheitlich.

Kondensation dieses XXXI mit dem Azid aus dem Heptapeptid-hydrazid IV ergab, nach Reinigung mit Gegenstromverteilung, das vollständig geschützte Octadecapeptid-Derivat XXXII. Obschon seine Elementaranalyse im Bereiche der Fehlergrenze richtige Werte ergab, war das Produkt dünn-schichtchromatographisch nicht ganz einheitlich, sondern zeigte eine etwas langsamer wandernde Verunreinigung von ca. 10%. Diese ist nicht das dem geschützten Octadecapeptid XXXII entsprechende Sulfoxid (Vergleich mit einem oxydierten Präparat von XXXII), könnte aber das Harnstoffderivat sein, welches sich aus dem Produkte der CURTIUS'schen Umlagerung des Azids von IV mit XXXI gebildet haben würde. Nach der Aminosäureanalyse eines nach F_3CCOOH -Behandlung (s. u.) angereicherten Nebenproduktes ist deutlich zu wenig Methionin vorhanden. Die endgültige Aufklärung der Struktur steht noch aus.

Spaltung mit Trifluoressigsäure und Austausch der Trifluoracetat- gegen Acetat-Ionen ergab ein Gemisch, welches aus 10% einer Verbindung, die aus der eben genannten Verunreinigung von XXXII entstanden war, und 84–90% des freien Octadecapeptids II bestand. Neben diesen Verbindungen waren nur Spuren dreier anderer Substanzen nachweisbar, deren eine aus β -MSH-Oxid bestand. Zur Reinigung wurde das Gemisch einer 1300-stufigen, multiplikativen Verteilung unterworfen (System 0,5-proz. Trichloressigsäure-*sec*-Butanol¹⁰). Dabei bildeten sich neu in *jeder Fraktion* der Verteilung β -MSH-Oxid und eine dünn-schichtchromatographisch sehr langsam wandernde Verbindung. Die vollständige und endgültige Reinigung wurde durch Chromatographie an Carboxymethyl-SEPHADEX® vorgenommen. Dabei wurde ein β -MSH erhalten, welches dünn-schichtchromatographisch absolut einheitlich war (auch frei von Sulfoxid) und die eingangs beschriebenen Eigenschaften besass. Es wurde weiter durch seine Ultraviolettabsorption²³), durch sein Verhalten bei Dünnschichtchromatographie und Elektrophorese und durch quantitative Aminosäure-analyse charakterisiert.

Experimenteller Teil²⁾

Lösungsmittel für Chromatographie (zusätzlich zu ²⁾):

42 = *n*-PrOH-EtOAc-H₂O (7:1:2 Vol.)

43c = *t*-AmylOH-*i*-PrOH-H₂O (100:40:55 Vol.)

46 = *n*-BuOH-Me·CO·Et-Dicyclohexylamin-H₂O (10:10:2:5 Vol.)

54 = *sec*-BuOH-*i*-PrOH-ClCH₂COOH-H₂O (70 ml:10 ml:3 g:40 ml)

56 = *sec*-BuOH-*i*-PrOH-5-proz. Natrium-diäthylbarbiturat-Lösung-H₂O (100:15:10:60 Vol.)

104 = CHCl₃-MeOH-17-proz. NH₃ (20:20:9 Vol.)

BOC·Asp(OBu^t)·OH, *t*-Butoxycarbonyl-L-asparaginsäure- β -*t*-butylester: 9,5 g (50 mMol) L-Asparaginsäure- β -*t*-butylester²⁴) wurden in 25 ml 2N NaOH gelöst und mit einer Lösung von 8,6 g (60 mMol) *t*-Butyl-azidoformiat²⁵) in 25 ml Methanol versetzt. Anschliessend wurden unter

²³) Vgl. G. H. BEAVAN & E. R. HOLIDAY, *Advances Protein Chemistry* 7, 319 (1952).

²⁴) R. SCHWYZER & H. DIETRICH, *Helv.* 44, 2003 (1961).

²⁵) L. A. CARPINO, *Abstracts of Papers*, 129th Meeting, Amer. chem. Soc. 59-N (1956); *J. Amer. chem. Soc.* 79, 98 (1957).

Rühren bei 40° 7,7 ml (55 mMol) Triäthylamin in 30 ml Methanol innert 1 Std. zugetropft. Nach weiterem Rühren während 2 Std. bei 40° und 15 Std. bei 20° wurde die Lösung mit 2N HCl auf pH = 7 eingestellt und dann bei 12 Torr/30° vom Methanol befreit. Die wässrige Lösung wurde mit Äther überschichtet und bei 0° unter Umschütteln mit 100 ml 1N HCl angesäuert. Die Ätherphase wurde rasch abgetrennt, mehrmals mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand kristallisierte nach Animpfen langsam; nach Verreiben mit Petroläther wurden 12,9 g (89%) Rohprodukt, Smp. 59–63°, erhalten. Nach Umkristallisieren aus Petroläther: 10 g (69%) verfilzte Nadeln, Smp. 63–66°; $[\alpha]_D^{25} = +1,7^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,9$ in Methanol). DS einheitlich: Rf = 0,47 (43); 0,74 (101).

$C_{13}H_{23}O_6N$ (289,3) Ber. C 53,96 H 8,01 N 4,84% Gef. C 54,24 H 8,14 N 4,85%

Zur Gewinnung von Impfkristallen empfiehlt sich die Reinigung über das Dicyclohexylaminsalz: 2,6 g (9 mMol) Rohprodukt wurden in 15 ml Äther gelöst und mit 2,1 ml (10 mMol) Dicyclohexylamin versetzt. Beim Stehen der Lösung begann das Salz langsam auszukristallisieren. Umkristallisation aus Acetonitril: 3,24 g (77%); Smp. 145–147°; $[\alpha]_D^{25} = +12,7^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,0$ in Methanol).

$C_{25}H_{46}O_6N_2$ (470,6) Ber. C 63,80 H 9,85 N 5,95% Gef. C 63,60 H 9,61 N 6,01%

Zur Überführung in die freie Säure wurden 2,35 g (5 mMol) dieses Salzes in 50 ml 50-proz. Äthanol mit 5 ml Dowex 50 X-8 (in der H⁺-Form) 15 Min. geschüttelt. Filtration und Verdampfen der Lösung ergaben (nach Verreiben des Rückstandes mit Petroläther) 1,28 g (89%) Kristalle, Smp. 64–67°.

VII: BOC·Asp(OBu^t)-Ser-Gly·ONB, *t*-Butoxycarbonyl-(β-*t*-butyl)-L-aspartyl-L-seryl-glycin-*p*-nitrobenzylester: 10 g (35 mMol) BOC·Asp(OBu^t)·OH und 10,4 g (35 mMol) H·Ser-Gly·ONB¹⁸) wurden in 200 ml Acetonitril gelöst und unter Rühren bei –5° mit einer vorgekühlten Lösung von 7,8 g (38 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid in 50 ml Acetonitril versetzt. Nach weiterem Rühren während 30 Min. bei –5° und 15 Std. bei 0° wurde 1 ml Eisessig zugegeben und vom Dicyclohexylharnstoff abfiltriert (7,86 g = 92%). Das Filtrat wurde bei 12 Torr eingedampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen und bei 0° mit 1N HCl, 1N NaHCO₃ und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Verdampfen verblieb ein Rückstand, der beim Verreiben mit Äther 14,2 g kristallines Material lieferte: Smp. 124–128°. Umkristallisieren aus Essigester: 10,6 g (53%) nadel-förmige Kristalle, Smp. 131–133°; $[\alpha]_D^{25} = -15,8^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,0$ in Methanol). UV.-Absorptionsspektrum: $\lambda_{max} = 267 \mu\text{m}$, $\epsilon = 9600$ (in 98-proz. Alkohol). DS einheitlich: Rf = 0,76 (43); 0,45 (Benzol-Aceton 1 : 1).

$C_{35}H_{56}O_{11}N_4$ (568,6) Ber. C 52,61 H 6,38 N 9,85% Gef. C 52,96 H 6,46 N 9,77%

VIII: BOC·Asp(OBu^t)-Ser-Gly·OH, *t*-Butoxycarbonyl-(β-*t*-butyl)-L-aspartyl-L-seryl-glycin: 5,7 g (10 mMol) BOC·Asp(OBu^t)-Ser-Gly·ONB (VII) wurden in 100 ml Methanol mittels 1 g Palladiumkohle (10-proz.) bei Zimmertemperatur und Atmosphärendruck hydriert, wobei das entstehende CO₂ in einer zweiten Schüttelente absorbiert wurde. Wasserstoffaufnahme etwas mehr als 4 Äquivalente. Die vom Katalysator abfiltrierte Lösung wurde bei 12 Torr verdampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen und das Peptidderivat VIII mit 3 × 10 ml 1N KHCO₃-Lösung ausgezogen (Tolidin bleibt im Essigester). Die vereinigten alkalischen Extrakte wurden mit 150 ml Essigester überschichtet und bei 0° mit 10 ml 5N HCl versetzt. Die Essigesterphase wurde rasch abgetrennt, die wässrige Phase wiederholt mit Essigester gewaschen. Die Essigesterextrakte wurden vereinigt, mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet und i. V. auf ca. 10 ml eingengt. Nun wurde bei 50° vorsichtig Petroläther zugegeben, worauf beim langsamen Abkühlen VIII in Form verfilzter Nadeln ausgeschieden wurde: 4,0 g (92%), Smp. 132–134°. Keine Veränderung beim Umkristallisieren aus Essigester-Hexan; $[\alpha]_D^{25} = -16,9^\circ \pm 5^\circ$ ($c = 1,9$ in Methanol), $-13,4^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,0$ in Eisessig). DS einheitlich: Rf = 0,32 (43); 0,65 (101).

$C_{18}H_{31}O_6N_3$ (433,5) Ber. C 49,87 H 7,21 N 9,70% Gef. C 50,06 H 7,40 N 9,59%

Spaltung mit Trifluoressigsäure ergab ein einheitliches Tripeptid, H·Asp-Ser-Gly·OH. DS: Rf = 0,20 (101); PC: Rf = 0,13 (49); 0,33 (54); 0,23 (87).

Überschüssiges NaOH (5 mg BOC·Asp(OBu^t)-Ser-Gly·OH in 0,1 ml 1N NaOH, 1 Std., 25°, dann mit 0,1 ml 1N Essigsäure neutralisiert) spaltet die *t*-Butylestergruppe vollständig. BOC·Asp-Ser-Gly·OH: DS einheitlich, Rf = 0,12 (43); 0,42 (101).

Überschüssiges Ammoniak (gleiche Bedingungen wie für NaOH) ergibt neben BOC·Asp-Ser-Gly·OH ein zusätzliches, nicht identifiziertes Produkt (BOC·Asp-Ser-Gly·OH?): DS einheitlich, Rf = 0,20 (43); 0,50 (101). Ein scheinbar identisches Produkt entsteht auch nach längerer Einwirkung von 10-proz. *Hydrazinhydrat* in Methanol. Das freie Peptid H·Asp-Ser-Gly·OH ist unter den angegebenen, alkalischen Bedingungen stabil.

TRI·Pro·OBZL, Trityl-L-prolin-benzylester: Eine Lösung von 97 g (0,4 Mol) L-Prolin-benzylester-hydrochlorid²¹) in 800 ml HCCl_3 wurde bei 0° unter Rühren mit 125 ml (0,88 Mol) Triäthylamin versetzt. Anschliessend wurde bei gleicher Temperatur eine Lösung von 123 g (0,44 Mol) Triphenylchloromethan in 1,2 l HCCl_3 innert 2 Std. zugetropft. Nach 15 Std. bei 25° wurde die Lösung unter Eiskühlung mit 1N Zitronensäure, 1N NaHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet, eingedampft und der Rückstand aus Äther kristallisiert: 136 g (76%), Smp. 117–119°; nach Umkristallisieren aus Äther-Petroläther 124 g (69%); Smp. 118–119°; $[\alpha]_D^{25} = -67,9^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,0$ in HCCl_3).

$\text{C}_{31}\text{H}_{29}\text{O}_2\text{N}$ (447,6) Ber. C 83,19 H 6,53 N 3,13% Gef. C 83,36 H 6,65 N 3,04%

TRI·Pro·OH, Trityl-L-prolin: 135 g (0,3 Mol) TRI·Pro·OBZL wurden in 800 ml Essigester gelöst und in Gegenwart von 10 g Palladiummohr bei Zimmertemperatur und Atmosphärendruck hydriert. Wasserstoffaufnahme: 8 l (ber. 6,7 l) innert 7 Std. Die vom Katalysator und vom ausgeschiedenen L-Prolin abfiltrierte Lösung wurde bei 12 Torr schonend auf ca. 100 ml eingengt und angeimpft (Impfkristalle aus Äther). Die Kristalle wurden nach 30 Min. isoliert: 44,6 g (42%); Smp. ca. 165°, dann Verfestigung und erneutes Schmelzen bei 218–220° (Prolin). Aus der Mutterlauge konnten weitere 8,2 g (7%) der gleichen Substanz erhalten werden. DS fast einheitlich, Rf = 0,67 (43) + 0,09 (Prolin). Beim Umkristallisieren grösserer Substanzmengen wird, auch bei vorsichtigem Arbeiten, die Tritylgruppe immer teilweise abgespalten. Zur Analyse wurde deshalb eine kleine Probe rasch aus Essigester umkristallisiert.

$\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{O}_2\text{N}$ (357,4) Ber. C 80,64 H 6,49 N 3,92% Gef. C 80,58 H 6,53 N 3,74%

IX: TRI·Pro·Tyr·OMe, Trityl-L-prolyl-L-tyrosin-methylester: 90 g (0,25 Mol) rohes TRI·Pro·OH und 49 g (0,25 Mol) L-Tyrosin-methylester wurden unter schwachem Erwärmen in 1,5 l Acetonitril gelöst, unter Rühren bei –5° mit 58 g (0,28 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt, 30 Min. bei 0° und 15 Std. bei 25° gerührt. Zum Schluss wurde zur Zerstörung von überschüssigem Carbodiimid 2 ml Eisessig zugegeben. Das ausgeschiedene Gemisch von Dicyclohexylharnstoff und Dipeptidderivat IX wurde abfiltriert, mit Acetonitril gewaschen und mit 500 ml Dimethylformamid verrührt: 32 g (51%) unlöslicher Dicyclohexylharnstoff. Das Filtrat wurde auf ca. 200 ml eingengt und mit 1 l Methanol versetzt, worauf das Dipeptidderivat IX rasch auskristallisierte: 47,5 g (35%), Smp. 222–224°; Umkristallisieren aus Dimethylformamid-Methanol: 39 g (29%), Smp. 226–228°; $[\alpha]_D^{25} = -85,2^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2$ in Dimethylformamid). DS einheitlich: Rf = 0,77 (43); 0,76 (Benzol-Aceton 1 : 1).

$\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{O}_4\text{N}_2$ (534,6) Ber. C 76,38 H 6,41 N 5,24% Gef. C 76,42 H 6,43 N 5,29%

Aus den Mutterlauen verschiedener Ansätze wurden bis zu 50% TRI·Pro-N(C_6H_{11})-CO-NHC $_6\text{H}_{11}$, Smp. 163–164° (aus Äther oder aus Methanol), isoliert. DS einheitlich: Rf = 0,85 (Benzol-Aceton 1 : 1).

$\text{C}_{37}\text{H}_{45}\text{O}_2\text{N}_3$ (563,7) Ber. C 78,82 H 8,05 N 7,45% Gef. C 79,10 H 8,20 N 7,40%

Xb: TRI·Pro·Tyr·NHNH₂, Trityl-L-prolyl-L-tyrosin-hydrazid: Eine Lösung von 0,8 g (1,5 mMol) TRI·Pro·Tyr·OMe in 4 ml Dimethylformamid wurde mit 0,75 ml (15 mMol) Hydrazinhydrat versetzt, 24 Std. bei 25° aufbewahrt und dann bei 0° allmählich mit 10 ml H_2O versetzt. Das anfänglich ölig ausgeschiedene Säurehydrazid kristallisierte beim Verreiben. Es wurde auf der Zentrifuge abgetrennt und mit H_2O gewaschen: 0,78 g, Smp. 216–218° (Zers.). Umkristallisieren aus viel heissem Methanol (Einengen der heissen Lösung auf ein kleines Volumen): 0,67 g (84%), Smp. 217–219°; $[\alpha]_D^{25} = -77,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,0$ in Dimethylformamid). DS einheitlich, Rf = 0,71 (43).

$\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{O}_3\text{N}_4$ (534,6) Ber. C 74,13 H 6,41 N 10,48% Gef. C 74,04 H 6,71 N 10,37%

Xa: TRI·Pro·Tyr·OH, Trityl-L-prolyl-L-tyrosin: 40 g (75 mMol) TRI·Pro·Tyr·OMe wurden in 400 ml Methanol suspendiert und unter Rühren mit 120 ml 2N NaOH versetzt, wobei durch

leichte Kühlung eine Temperatur von 20° eingehalten wurde. Das Ausgangsmaterial ging innert 30 Min. in Lösung; nach weiteren 30 Min. wurde der Ansatz mit 100 ml Wasser verdünnt, das Methanol bei 12 Torr verdampft und die wässrige Lösung mit Essigester und Zitronensäurelösung in üblicher Weise aufgearbeitet. Der essigesterlösliche Anteil wurde aus Methanol kristallisiert: 34,7 g (88%), Smp. 163–166° (Zers.). Zur Analyse wurde eine Probe aus Methanol umkristallisiert: Smp. 169–171°, $[\alpha]_D^{25} = -76,7^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,0$ in Dimethylformamid).

$C_{33}H_{32}O_4N_2$ (520,6) Ber. C 76,13 H 6,20 N 5,38% Gef. C 75,76 H 6,53 N 5,39%

Beim Umkristallisieren aus Methanol wurde immer ein gewisser Anteil der Tritylreste abgespalten (vgl. TRI·Pro·OH). Durch vorsichtiges Lösen des Rohproduktes (34 g) in 120 ml Tetrahydrofuran und anschließende Zugabe des gleichen Volumens Äther liess sich die Spaltung weitgehend vermeiden, doch wurde ein Addukt mit Tetrahydrofuran erhalten (36,1 g), Smp. 157–161° (Zers.). DS: Rf = 0,48 (43), mit Spuren von H·Pro·Tyr·OH bei 0,11.

$C_{33}H_{32}O_4N_2, C_4H_8O$ (592,7) Ber. C 74,97 H 6,80 N 4,73% Gef. C 74,79 H 6,96 N 4,83%

Umkristallisieren aus Aceton liefert ein analysenreines Kristallinat mit 1 Äquivalent Aceton: Smp. 172–175°; aus Dimethylformamid-Äther wurde ein Addukt mit 1–2 Äquivalenten Dimethylformamid erhalten, Smp. 132–134°.

XI: TRI·Pro·Tyr-Lys(BOC)·OMe, Trityl-L-protyl-L-tyrosyl-(N^ε-t-butoxycarbonyl)-L-lysine-methylester. – a) Azid-Methode: Eine Lösung von 535 mg (1 mMol) TRI·Pro·Tyr·NHNH₂ in 7,5 ml Dimethylformamid wurde unter Rühren bei –15° mit 2 ml 2 N HCl und anschliessend mit 0,22 ml einer 5 N wässrigen Lösung von NaNO₂ versetzt. Nach weiterem Rühren während 5 Min. bei –10° wurde überschüssiges Nitrit durch Zugabe einer Lösung von 60 mg Ammoniumsulfamat in 0,3 ml Wasser zerstört. Die Reaktionslösung wurde dann in 30 ml Eiswasser eingetropfelt, wobei das Azid in fester Form ausgeschieden wurde. Es wurde abgenutscht, mit Eiswasser gewaschen, in 30 ml Dimethylformamid gelöst und bei 0° während einiger Minuten mit Magnesiumsulfat getrocknet (IR.-Spektrum zeigt typische Azid-Bande bei 4,75 μ). Nach Zugabe von 0,26 g (1 mMol) Lys(BOC)·OMe¹⁹ in 2 ml Dimethylformamid wurde die Lösung 24 Std. bei 0° aufbewahrt und darauf bei max. 35°/0,1 Torr eingedampft. Der ölige Rückstand wurde wie üblich bei 0° mit Essigester, 1 N Zitronensäure und 0,1 N NaOH aufgearbeitet: 510 mg festes Material (Verreiben mit Äther), Smp. 178–184°. Umkristallisieren aus Methanol: 360 mg (47%), Smp. 204–206°; $[\alpha]_D^{25} = -66,8^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,9$ in Dimethylformamid). DS einheitlich: Rf = 0,81 (43); 0,62 (Essigester); 0,74 (Benzol-Aceton 1 : 1); 0,39 (Benzol-Methanol 9 : 1).

$C_{45}H_{54}O_7N_4$ (762,9) Ber. C 70,84 H 7,13 N 7,34% Gef. C 70,61 H 7,12 N 7,26%

b) *Carbodiimid-Methode:* 29,6 g (50 mMol) TRI·Pro·Tyr·OH (Tetrahydrofuran-Addukt) und 13 g (50 mMol) Lys(BOC)·OMe wurden unter Rühren in einem Gemisch von 100 ml Dimethylformamid und 250 ml Acetonitril gelöst und bei –5° mit 11,5 g (55 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt. Nach 1 Std. bei –5° und 15 Std. bei 0° wurde 0,5 ml Eisessig zugegeben. Dicyclohexylharnstoff (10,4 g, 84%) wurde abfiltriert und das Filtrat bei 0,1 Torr eingedampft. Der Rückstand wurde in Essigester aufgenommen und wie sub. a) aufgearbeitet. Aus Methanol umkristallisiert: 27,6 g (72%), Smp. 203–205°. Spezifische Drehung und DS wie sub. a).

Abspaltung der Schutzgruppen: 15 mg XI wurden in 0,2 ml konz. HCl 1 Std. auf 40° erwärmt, dann mit 1 ml H₂O versetzt, Triphenylcarbinol abfiltriert, Filtrat verdampft und Rückstand mit Äther verrieben: 8 mg H·Pro·Tyr-Lys·OH. PC einheitlich: Rf = 0,50 (49); 0,28 (54); 0,38 (56); 0,37 (87).

Spaltung mit Chymotrypsin: 5 mg H·Pro·Tyr-Lys·OH in 0,5 ml 0,1 M Tris-Puffer mit 0,1 mg Chymotrypsin (0,2-proz. Lösung in Tris-Puffer) bei 37° inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten je 0,05 ml davon 1 Min. auf 100° erhitzt und im PC untersucht: langsame Spaltung zu H·Pro·Tyr·OH (Rf = 0,63 [54]; 0,66 [87]) und Lysin. Nach 18 Std. vollständige Spaltung: das Tyrosin liegt also ganz in der L-Konfiguration vor.

c) *Tritylierung von H·Pro·Tyr-Lys(BOC)·OMe (XVII):* Die Lösung von 7,2 g (14 mMol) H·Pro·Tyr-Lys(BOC)·OMe (XVII); aus dem N^α-Carbobenzoxy-Derivat hergestellt) in 60 ml HCCl₃ wurde mit 2 ml (14 mMol) Triäthylamin versetzt und unter Rühren bei 0° tropfenweise mit der Lösung von 4 g (14 mMol) Triphenylchlormethan in 60 ml HCCl₃ versetzt (30 Min.). Nach 15 Std. wurde die Reaktionslösung wie üblich bei 0° mit 1 N Zitronensäure, 1 N NaHCO₃-Lösung usw. aufgearbeitet. Kristallisation aus Äther: 4,7 g XI, Smp. 190–193°; nach Umkristallisation aus

Methanol: 3,4 g (32%), Smp. 204–206°; vollkommen identisch mit dem sub. a) und b) erhaltenen Material. Bei Verwendung von 2 Äquivalenten Triphenylchlormethan wird kein kristallines Material erhalten (Verätherung des Tyrosin-Hydroxyls?).

XVI: Z-Pro-Tyr-Lys(BOC)·OMe, Carbobenzoxy-L-prolyl-L-tyrosyl-(N^e-t-butoxycarbonyl)-L-lysin-methylester: 14,5 g (35 mMol) Z-Pro-Tyr·OH¹⁸) und 9,1 g (35 mMol) Lys(BOC)·OMe wurden in 500 ml Acetonitril gelöst, bei –5° mit 7,8 g (38 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt und 15 Std. bei 0° aufbewahrt. Nach Zugabe von 1 ml Eisessig wurde Dicyclohexylharnstoff (7,6 g, 89%) abfiltriert, das Filtrat bei 12 Torr eingedampft, der Rückstand wie üblich aufgearbeitet (Essigester, 0°, 1N HCl, 1N NaHCO₃ usw.). Ausfällen aus 150 ml Essigester mit Äther, umlösen aus Essigester: 15,8 g (69%), Smp. 105–108° (sintern bei 100°); $[\alpha]_D^{25} = -51,5^\circ \pm 0,3^\circ$ ($c = 4,0$ in Äthanol).

C₃₄H₄₆O₉N₄ (654,7) Ber. C 62,37 H 7,08 N 8,56% Gef. C 62,27 H 7,20 N 8,79%

XVII: H-Pro-Tyr-Lys(BOC)·OMe, L-Prolyl-L-tyrosyl-L-lysin-methylester: 9,8 g (15 mMol) Z-Pro-Tyr-Lys(BOC)·OMe wurden in 150 ml Methanol gelöst und in Gegenwart von 1,5 g Palladiumkohle (10-proz.) bei 25° und Atmosphärendruck hydriert (Absorption von CO₂ in einer zweiten Schüttelente). Die Wasserstoffaufnahme kam nach etwa 1 Std. zum Stillstand. Nach Filtration und Verdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand mit Äther verrieben: 7,2 g (92%), Smp. unsharp bei 95–100°; PC einheitlich: Rf = 0,88 (54); 0,83 (56). Die Substanz lässt sich in kleinen Mengen aus Essigester kristallisieren, doch wird der Smp. nicht erhöht und es treten Zersetzungserscheinungen auf. $[\alpha]_D^{25} = -16,4^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,9$ in Äthanol).

C₂₆H₄₀O₇N₄ (520,6) Ber. N 10,76% Gef. N 10,50%

XIIb: TRI-Pro-Tyr-Lys(BOC)·NHNH₂, Trityl-L-prolyl-L-tyrosyl-(N^e-t-butoxycarbonyl)-L-lysin-hydrazid: Eine Suspension von 760 mg (1 mMol) TRI-Pro-Tyr-Lys(BOC)·OMe in 15 ml Methanol und 1,5 ml Hydrazinhydrat wurde 30 Min. unter Rückfluss erhitzt (vollständige Lösung). Nach 15 Std. bei 25° wurde bei 12 Torr eingedampft. Der Rückstand wurde mit Wasser mehrmals verrieben, getrocknet und in 10 ml Essigester gelöst; nach längerer Zeit scheidet sich das Säurehydrazid in kristalliner Form aus: 530 mg (70%), Smp. 142–150° (Sintern bei 130°). DS: Rf = 0,79 (43); 0,08 (Benzol-Methanol 9 : 1); Nebenfleck (ca. 10%), Rf = 0,17 (Benzol-Methanol 9 : 1). Weiteres Kristallisieren aus Essigester oder Acetonitril ergibt keine weitere Reinigung.

C₄₄H₅₄O₆N₆ (762,9) Ber. N 11,02% Gef. N 10,82%

XIIa: TRI-Pro-Tyr-Lys(BOC)·OH, Trityl-L-prolyl-L-tyrosyl-(N^e-t-butoxycarbonyl)-L-lysin: 21,5 g (28 mMol) TRI-Pro-Tyr-Lys(BOC)·OMe wurden in 150 ml Methanol suspendiert und unter Rühren bei ca. 15° mit 45 ml 2N NaOH versetzt. Die Mischung wurde 1 Std. weiter gerührt, wobei eine klare Lösung entstand. Diese wurde i. V. vom Methanol befreit. Aus der wässrigen Phase wurde in üblicher Weise (Essigester, 0°, 1N Zitronensäurelösung, usw.) die Säure als zäher Schaum isoliert. Verreiben mit Äther (zweimal) und mit Petroläther ergibt 19,5 g (93%) amorphes, farbloses Pulver. DS: Rf 0,53 (43); zusätzlich noch ca. 5% H-Pro-Tyr-Lys(BOC)·OH, Rf = 0,28. In trockenem Zustande ist die Verbindung stabil (Kontrolle mit DS); in organischen Lösungsmitteln erfolgt eine allmähliche Abspaltung der Tritylgruppe.

XIII: TRI-Pro-Tyr-Lys(BOC)-Met·OCH₃, Trityl-L-prolyl-L-tyrosyl-(N^e-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-methionin-methylester. – a) *Azid-Methode:* 762 mg (1 mMol) TRI-Pro-Tyr-Lys(BOC)·NHNH₂ wurden, wie für TRI-Pro-Tyr·NHNH₂ beschrieben, ins Azid übergeführt. Das mit Wasser ausgefällte Azid wurde abfiltriert, in 40 ml Essigester gelöst, die Lösung bei 0° mit 1N NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und auf ca. 10 ml eingengt (eine mit der 10fachen Menge Methylchlorid verdünnte Probe zeigte im IR.-Spektrum die Azid-Bande bei 4,75 μ und ca. 5% Isocyanat bei 4,50 μ; nach 15 Std. bei 0° ist etwa die Hälfte des Azids umgelagert). Die Lösung des Azids wurde sofort mit 205 mg (1,25 mMol) L-Methionin-methylester (frisch aus dem HCl-Salz hergestellt und destilliert, Sdp. 58–60° bei 0,02 Torr) versetzt und 24 Std. bei 0° aufbewahrt. Das gallertig ausgeschiedene Material wurde auf einer kalten Nutsche gesammelt, gut abgepresst, mit wenig kaltem Essigester und Äther gewaschen und aus viel Essigester umkristallisiert: 340 mg (38%) verfilzte Nadeln, Smp. 172–174° (keine Erhöhung beim Umkristallisieren aus Methanol); $[\alpha]_D^{25} = -60,1^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,0$ in Dimethylformamid). DS: Rf = 0,87 (43);

0,47 (Essigester); 0,19 (Benzol-Methanol 9 : 1); einheitlich bis auf Spuren des entsprechenden Sulfoxid-Derivates: Rf = 0,80; 0,03 und 0,12 in den angegebenen Systemen.

| | | | | |
|-----------------------|--------------|--------|--------|---------|
| $C_{50}H_{68}O_8N_5S$ | Ber. C 67,16 | H 7,10 | N 7,83 | S 3,59% |
| (894,2) | Gef. „ 66,98 | „ 7,25 | „ 7,93 | „ 3,71% |

b) *Carbodiimid-Methode*: 20 g (ca. 26 mMol) rohes TRI·Pro-Tyr-Lys(BOC)·OH und 6 g (37 mMol) frisch destillierter L-Methionin-methylester wurden in einem Gemisch von 200 ml Acetonitril und 25 ml Dimethylformamid gelöst, bei -5° mit 6,2 g (30 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und während 1 Std. bei -5° und 20 Std. bei 0° gerührt. Festes Material wurde abgetrennt und daraus mit 100 ml Dimethylformamid das Peptidderivat extrahiert (unlöslich: 6,6 g Dicyclohexylharnstoff). Das Filtrat wurde bei 0,1 Torr eingedampft und der Rückstand aus 100 ml warmem Essigester kristallisiert: 9,6 g (41%) verfilzte Nadeln, Smp. 169–171°. Das 1. Filtrat der Reaktionslösung wurde nach Zusatz von 0,2 ml Eisessig verdampft und der Rückstand mit Essigester wie üblich aufgearbeitet. Das Produkt wurde gründlich mit Äther gewaschen und aus wenig Methanol kristallisiert: 3,1 g (13%), Smp. 170–172°. Beide Kristallisate wurden vereinigt und umkristallisiert: 10,1 g (48%), Smp. 172–174°; Drehung und DS wie beim Azid-Ansatz a).

Abspaltung der Schutzgruppen: 35 mg wurden in 0,5 ml konz. HCl 1 Std. auf 40° erwärmt, das nach Zusatz von 2 ml H_2O ausgeschiedene Triphenylcarbinol abfiltriert, das Filtrat verdampft und der Rückstand mit Äther verrieben: 22 mg H·Pro-Tyr-Lys-Met·OH. PC: Rf = 0,55 (49); 0,52 (54); 0,50 (56); 0,52 (87) – schwache Verunreinigung mit Sulfoxid-Derivat (ca. 5%): Rf = 0,37 (49); 0,25 (54; 87).

Spaltung mit Trypsin: 5 mg des freien Tetrapeptids in 0,5 ml 0,1M Tris-Puffer mit 0,1 mg Trypsin (0,2-proz. Lösung in Tris-Puffer) bei 37° inkubiert und nach verschiedenen Zeiten je 0,05 ml Lösung 1 Min. auf 100° erhitzt und auf Papier chromatographiert: vollständige Spaltung innert 15 Min. zu H·Pro-Tyr-Lys·OH (Rf-Werte siehe dort) und Methionin. Im kristallisierten Tetrapeptid-Derivat liegt das Lysin in der L-Konfiguration vor, was auch aus dem Vergleich mit dem unter a) hergestellten Präparat hervorgeht.

XIV: H·Pro-Tyr-Lys(BOC)-Met·OCH₃: L-Prolyl-L-tyrosyl-(N^ε-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-methionin-methylester: 5,8 g (6,5 mMol) TRI·Pro-Tyr-Lys(BOC)-Met·OCH₃ wurden in 40 ml 75-proz. Essigsäure suspendiert und 1 Std. bei 25° geschüttelt; dabei ging das Material in Lösung und Triphenylcarbinol wurde ausgeschieden. Nach Zugabe von 20 ml H_2O wurde filtriert, das Filtrat i. V. eingedampft und der Rückstand bei 0,1 Torr getrocknet und mehrmals mit Äther verrieben: 4,42 g Pulver. Zur Bereitung des «freien Esters» wurde dieses Acetat in 25 ml H_2O gelöst, die Lösung mit viel Essigester überschichtet und bei 0° unter Schütteln mit 2N K_2CO_3 -Lösung alkalisch gestellt. Die Essigesterphase wurde wie üblich aufgearbeitet. Beim Eindampfen begann bei einem Volumen von ca. 100 ml die Abscheidung festen Materials; diese wurde durch Zugabe von Äther (200 ml) vervollständigt: 3,3 g (78%), Smp. 177–180°; DS: Rf = 0,52 (43); 0,32 ($HCCl_3$ - CH_3OH , 5 : 1); Spuren des Sulfoxid-Derivats: Rf = 0,36 und 0,12. Umkristallisieren aus Acetonitril: DS einheitlich; Smp. 181–183°; $[\alpha]_D^{25} = -19,2^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,5$ in Dimethylformamid).

| | | | | |
|-----------------------|--------------|--------|---------|---------|
| $C_{31}H_{40}O_8N_5S$ | Ber. C 57,12 | H 7,58 | N 10,74 | S 4,92% |
| (651,8) | Gef. „ 56,94 | „ 7,69 | „ 10,54 | „ 4,96% |

XV: BOC·Asp(OBu^t)-Ser-Gly-Pro-Tyr-Lys(BOC)-Met·OCH₃, t-Butoxycarbonyl-(β-t-butyl)-L-aspartyl-L-seryl-glycyl-L-prolyl-L-tyrosyl-(N^ε-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-methionin-methylester: 1,52 g (3,5 mMol) BOC·Asp(OBu^t)-Ser-Gly·OH und 2,28 g (3,5 mMol) H·Pro-Tyr-Lys(BOC)-Met·OCH₃ wurden in einem Gemisch von 50 ml Acetonitril und 10 ml Dimethylformamid gelöst und bei -10° mit 0,87 g (4,2 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt (alles unter N_2). Nach 1 Std. bei -10° und 15 Std. bei 0° (Rühren) wurden einige Tropfen Eisessig zugegeben, filtriert und bei 0,1 Torr eingeeengt. Übliche Aufarbeitung des Rückstandes ergab 3,21 g festes Material (aus Essigester mit Äther ausgefällt), Smp. 115–125°; nach Umfällen aus Essigester-Äther: 3,13 g (82%), Smp. 123–130°; $[\alpha]_D^{25} = -48,3^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,9$ in Methanol); DS: Rf = 0,86 (43); 0,75 ($HCCl_3$ - CH_3OH , 5 : 1); Spuren von Sulfoxid-Derivat: Rf = 0,64 und 0,45.

| | | | | |
|--------------------------|--------------|--------|---------|---------|
| $C_{49}H_{78}O_{18}N_8S$ | Ber. C 55,14 | H 7,37 | N 10,50 | S 3,00% |
| (1067,3) | Gef. „ 55,04 | „ 7,58 | „ 10,39 | „ 2,96% |

IV: BOC·Asp(OBu^t)-Ser-Gly-Pro-Tyr-Lys(BOC)-Met·NHNH₂, t-Butoxycarbonyl-(β-t-butyl)-L-aspartyl-L-seryl-glycyl-L-prolyl-L-tyrosyl-(N^ε-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-methionin-hydrazid: Eine

Lösung von 3 g (2,8 mMol) BOC·Asp(OBu^t)-Ser-Gly-Pro-Tyr-Lys(BOC)-Met·OCH₃ in 7 ml Methanol wurde mit 0,7 ml (5 Äquivalenten) Hydrazinhydrat versetzt und 4 Std. unter N₂ bei 25° aufbewahrt (längeres Reagieren schadet, es entsteht mehr Nebenprodukt s. u.). Das gallertig ausgeschiedene Hauptprodukt wurde durch Verrühren mit 40 ml Äther fein suspendiert und dann abfiltriert, mit Äther gewaschen und anschliessend 2mal mit je 40 ml Wasser verrieben: 2,47 g, Smp. 178–183°; DS: Rf = 0,77 (43); 0,32 (HCCl₃-Methanol, 5 : 1); enthält zusätzlich wenig Ausgangsmaterial sowie ca. 10% eines Nebenproduktes, Rf = 0,65 und 0,0. Umkristallisieren aus Wasser-Methanol und Methanol-Äther liefert vollkommen einheitliches Material: 1,78 g (59%), Smp. 187–190°; $[\alpha]_D^{25} = -48,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,9$ in Methanol).

| | | | | |
|---|--------------|--------|---------|---------|
| C ₄₈ H ₇₈ O ₁₅ N ₁₀ S | Ber. C 54,02 | H 7,37 | N 13,12 | S 3,00% |
| (1067,3) | Gef. „ 53,92 | „ 7,55 | „ 13,21 | „ 3,29% |

Schema 3

XX: Z·Glu(OBu^t)-His-Phe-Arg-Try-Gly·OMe, AcOH; Carbobenzoxy-(γ-t-butyl)-L-glutamyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-methylester-monoacetat: 6,34 g Z·Glu(OBu^t)-His·NHNH₂²⁶) wurden in 19,5 ml 1,9 N HCl bei 0° gelöst, mit 40 ml H₂O verdünnt und bei -5° bis 0° tropfenweise mit 14,3 ml 1 N NaNO₂-Lösung versetzt. Man liess die Mischung 5 Min. bei dieser Temperatur stehen, neutralisierte sie mit 52 ml 1,1 N, eiskalter Na₂CO₃-Lösung und extrahierte das ausgeschiedene Azid mit kaltem CH₂Cl₂. Die Extrakte wurden mit gesättigter NaCl-Lösung neutral gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und bei 12 Torr auf 100 ml eingedampft (die Lösung zeigt im IR.-Spektrum die Azidbande bei 4,75 μ und keine Isocyanatbande bei 4,5 μ; Eindampfen eines Aliquots ergab eine Ausbeute von 90% (letztere Probe zeigt im IR. nur sehr wenig Isocyanat, also scheint das Azid relativ stabil zu sein). Diese Azidlösung wurde mit einer kalten Lösung von 6,38 g H·Phe-Arg-Try-Gly·OMe, 1CH₃COOH²⁷) in 50 ml Dimethylformamid vermischt und 20 Std. bei 0° belassen. Darauf fällt man das Reaktionsprodukt mit 200 ml Essigester aus und wusch den gallertigen Niederschlag auf der Zentrifuge mit Essigester: 7,6 g (70%) rohes Hexapeptid-Derivat (XX). DS zeigt noch Spuren einer langsamer laufenden Substanz neben dem Hauptprodukt, Rf = 0,4 (100; positive Reaktion mit PAULY-, EHRLICH- und REINDEL-HOPPE-Reagentien). Umkristallisieren aus Acetonitril ergab ein reines Produkt, Smp. 175–180° (Zers.; vorheriges Erweichen bei 173°); $[\alpha]_D^{25} = -34,3^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$ in Methanol).

| | | | |
|---|--------------|--------|----------|
| C ₅₂ H ₆₆ O ₁₁ N ₁₂ ·CH ₃ COOH | Ber. C 59,22 | H 6,44 | N 15,35% |
| (1095,23) | Gef. „ 58,83 | „ 6,30 | „ 15,47% |

V: Z·Glu(OBu^t)-His-Phe-Arg-Try-Gly·OH, H₂O; Carbobenzoxy-(γ-t-butyl)-L-glutamyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-L-glycin-hydrat: 9,6 g (8,7 mMol) Z·Glu(OBu^t)-His-Phe-Arg-Try-Gly·OMe, HOAc (XX) wurden in 150 ml 75-proz. Dioxan mit 18 ml 1 N NaOH während 20 Min. bei 20° verseift. Das Produkt wurde mit 150 ml Eiswasser und 30 ml 10-proz. Essigsäure ausgefällt: 8 g (90%), Smp. 204° (Zers.). Aus der Mutterlauge liessen sich noch 780 mg weniger reines Material gewinnen, Smp. 180°. Umkristallisieren aus 90-proz. Methanol: Smp. 206°. DS einheitlich, Rf = 0,2 (52); 0,75 (101); $[\alpha]_D^{25} = -27,8^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,924$ in Methanol).

| | | | |
|---|--------------|--------|----------|
| C ₅₁ H ₆₄ O ₁₁ N ₁₂ ·H ₂ O | Ber. C 58,95 | H 6,40 | N 16,17% |
| (1021,11) | Gef. „ 59,13 | „ 6,57 | „ 15,85% |

Schema 4

XXI: H·Asp(OBu^t)·OBu^t, L-Asparaginsäure-di-t-butylester. – a) Hydrochlorid: In einem Druckgefäss wurden 3,0 g (22,5 mMol) getrocknete L-Asparaginsäure, 100 ml trockenes Chloroform und 3 ml konz. H₂SO₄ bei -20° mit 100 ml flüssigem Isobutylen versetzt und die Mischung unter Verschluss bei 25° geschüttelt, bis klare Lösung eintrat (2–3 Tage). Hierauf wurde wieder auf -20° gekühlt und das Isobutylen bei 12 Torr unter Feuchtigkeitsausschluss abdestilliert. Die verbleibende Lösung wurde mit 200 ml HCCl₃ verdünnt und bei 0° mit halbesättigter K₂CO₃-Lösung gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Zur Gehaltsbestimmung des öligen Rückstandes an «freiem Ester» (XXI) wurde eine Probe mit Säure titriert (gef. 17,6 mMol entspr. 78% d. Th.). Die restliche Menge Ester wurde darauf in Methanol gelöst und bei -20° mit der berechneten Menge HCl in Methanol versetzt. Nach Eindampfen wurde Äther zugegeben, wobei 4,5 g (71%) des

Hydrochlorids von XXI in Form von Stäbchen kristallisierten: Smp. 152–155°. Umkristallisieren aus Aceton und Aceton-Äther: Smp. 156–158°; $[\alpha]_D^{26} = +6,6^\circ \pm 1,1^\circ$ ($c = 0,9$ in Methanol).

$C_{12}H_{23}O_4N, HCl$ Ber. N 4,97 Cl 12,58% Gef. N 5,07 Cl 12,52%

b) *Freier Ester (XXI)*: Dieser wurde mit Äther- K_2CO_3 in 90% Ausbeute als Öl erhalten und ohne weitere Reinigung verwendet.

Das kristalline *Hydrochlorid* ist PC einheitlich: Rf = 0,87 (42); 0,85 (87). H·Asp(OBu^t)·OBu^t wird bei 20° von konz. HCl innert 1–2 Min. vollständig zu Asparaginsäure abgebaut; F₃CCOOH (+0,5% H₂O) spaltet beide Estergruppen innert 2 Std.; zu Beginn der Hydrolyse tritt ein Zwischenprodukt auf, vermutlich Asparaginsäure- α -*t*-butylester (PC, Rf = 0,79 [87]); Asparaginsäure- β -*t*-butylester (PC, Rf = 0,69 [87]) konnte dabei nicht beobachtet werden.

XXII: Z·Lys(BOC)-Asp(OBu^t)OBu^t, Carbobenzoxy-(N^ε-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-asparaginsäure-di-t-butylester: 7,81 g (31,9 mMol) H·Asp(OBu^t)·OBu^t und 13,4 g (35,2 mMol) Z·Lys(BOC)·OH¹⁹ wurden in 180 ml Acetonitril gelöst und bei –20° mit 8,6 g (41,8 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach 30 Min. bei –20° und 3 Tagen bei +2° wurde vom ausgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff filtriert, eingedampft und der Rückstand wie üblich aufgearbeitet. Zur Abtrennung von unverbrauchtem Dicyclohexylcarbodiimid wurde mit Petroläther verrieben, wobei auch eine kleine Menge von XXII gelöst wurde; beim Einengen des Petrolätherauszugs kristallisierten 3,88 g XXII, Smp. 90–95°. Der Petroläther-unlösliche Anteil wurde aus Äther-Petroläther kristallisiert: 11,6 g, Smp. 73–76° (aus den Mutterlaugen: 1,7 g, Smp. 78–90°). Umkristallisieren aus Methanol-Wasser ergab insgesamt 15,6 g (81%), Smp. 95–99°. Analysenprobe nochmals umkristallisiert, Smp. 96–99°; $[\alpha]_D^{25} = -14,8^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2$ in Methanol). DS einheitlich: Rf = 0,56 (Butylacetat); 0,74 (Essigester); 0,81 (Chloroform-Methanol 19 : 1).

$C_{31}H_{49}O_9N_3$ (607,73) Ber. C 61,26 H 8,13 N 6,91% Gef. C 61,44 H 8,26 N 6,92%

XXIII: H·Lys(BOC)-Asp(OBu^t)·OBu^t, N^ε-t-Butoxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginsäure-di-t-butylester: Eine Lösung von 17,2 g (28,3 mMol) Z·Lys(BOC)-Asp(OBu^t)·OBu^t in 250 ml reinem, 96-proz. Äthanol wurde in Gegenwart von 1,0 g Palladiumkohle (10% Pd) hydriert; CO₂ wurde in einer zweiten Ente absorbiert. Nach 50 Min. (Verbrauch: 630 ml H₂, ber. 635 ml) war die Hydrierung fertig. Filtrieren und Eindampfen ergab 12,7 g (95%) XXIII als farbloses Harz, welches sofort weiter verarbeitet wurde.

Hydrolyse mit konz. HCl (2 Min., 40°) ergab H·Lys-Asp·OH; PC einheitlich: Rf = 0,05 (45); 0,30 (54); Laufstrecke 5,2 cm im System 46 (40 Std. Laufzeit).

XXIV: Z·Pro-Lys(BOC)-Asp(OBu^t)·OBu^t, Carbobenzoxy-L-prolyl-(N^ε-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-asparaginsäure-di-t-butylester: Eine Lösung von 12,5 g (26,4 mMol) H·Lys(BOC)-Asp(OBu^t)·OBu^t und 7,23 g (29,1 mMol) Z·Pro·OH in 100 ml Acetonitril wurde bei –20° mit 6,53 g (31,7 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und 30 Min. bei –20° und 38 Std. bei +2° belassen. Nach Abnutschen des Dicyclohexylharnstoffs (6,22 g) wurde das Filtrat eingedampft und der Rückstand wie üblich aufgearbeitet. Verreiben mit Petroläther und mit Äther, Umfällen aus Essigester-Äther: 12,83 g (69%), Smp. 103–105°. Kristallisation aus *t*-Butanol-Wasser, Smp. 104–105°; $[\alpha]_D^{30} = -43,6^\circ \pm 0,6^\circ$ ($c = 1,7$ in Äthanol). DS einheitlich: Rf = 0,46 (Essigester); 0,64 (Benzol-Aceton 1 : 1); 0,78 (Chloroform-Methanol 19 : 1).

$C_{36}H_{56}O_{10}N_4$ (708,84) Ber. C 61,34 H 8,01 N 7,95% Gef. C 61,64 H 8,14 N 8,08%

Aus den Ätherextrakten und aus der Essigester-Äther-Mutterlauge konnten durch Chromatographie an 55 g Al₂O₃ (Aktivität II) mit Benzol-Chloroform weitere 500 mg XXIV, Smp. 103–104°, isoliert werden. Gesamtausbeute: 72%.

XXV: H·Pro-Lys(BOC)-Asp(OBu^t)·OBu^t, L-Prolyl-L-(N^ε-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-asparaginsäure-di-t-butylester: 12,0 g (17,0 mMol) Z·Pro-Lys(BOC)-Asp(OBu^t)·OBu^t wurden in 700 ml Äthanol mittels 1 g Palladiumkohle (10% Pd) hydriert. Verbrauch: ber. 377 ml H₂, gef. 380 ml in 5 Std. Farbloses Harz, 9,10 g (94%).

Hydrolyse mit konz. HCl (2 Min., 40°) ergab H·Pro-Lys-Asp·OH; PC einheitlich: Rf = 0,07 (45); 0,38 (54); Laufstrecke: 10 cm in 40 Std. (46).

XXVI: Z·Pro-Pro-Lys(BOC)-Asp(OBu^t)·OBu^t, Carbobenzoxy-L-prolyl-L-prolyl-(N^ε-t-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-asparaginsäure-di-t-butylester: 9,10 g (16,0 mMol) H·Pro-Lys(BOC)-Asp(OBu^t)·OBu^t und 4,40 g (17,7 mMol) Z·Pro·OH wurden in 80 ml Acetonitril gelöst und bei –20° mit 4,0 g

(19,4 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt. Nach 1 Std. bei -20° und 3 Tagen bei $+2^{\circ}$ wurde vom ausgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff (3,7 g) abfiltriert, eingedampft und wie üblich aufgearbeitet. Verreiben mit Petroläther (Abtrennung von Dicyclohexyl-carbodiimid). Unlösliches (12,81 g) in Benzol- HCCl_3 (1 : 1) an 600 g Silicagel chromatographiert. Waschen mit Benzol- HCCl_3 (1 : 1) und (1 : 2); Elution mit (1 : 4)- und (1 : 9)-Gemisch. Kristallisation nach Versetzen mit Petroläther innert 3–4 Tagen bei 35 – 40° : 9,20 g (72%), Smp. 77 – 84° . Zweimal aus Äther umkristallisiert: Smp. 78 – 85° ; $[\alpha]_D^{25} = -72,9^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 2$ in Äthanol). DS einheitlich: Rf = 0,17 (Essigester); 0,47 (Benzol-Aceton, 1 : 1); 0,82 (Dioxan-Wasser, 9 : 1).

$\text{C}_{41}\text{H}_{68}\text{O}_{11}\text{N}_5$ (801,99) Ber. C 61,40 H 7,93 N 8,73% Gef. C 61,37 H 8,02 N 8,93%

XXVII: *H*·*Pro-Pro-Lys*(BOC)-*Asp*(*OBu*^t)·*OBu*^t, *L-Prolyl-L-prolyl*-(*N*^ε-*t-butoxycarbonyl*)-*L-lysyl-L-asparaginsäure-di-t-butylester*: 7,06 g (8,80 mMol) *Z*·*Pro-Pro-Lys*(BOC)-*Asp*(*OBu*^t)·*OBu*^t wurden mit Palladiumkohle in 100 ml Methanol hydriert (H_2 -Aufnahme: ber. 197 ml, gef. 185 ml in 90 Min.). Das Rohprodukt wurde aus Äther kristallisiert: 5,19 g nadelförmige Kristalle, Smp. 146 – 149° (88%). Umkristallisieren aus Methanol-Äther: Smp. 147 – 149° ; $[\alpha]_D^{25} = -73,1^{\circ} \pm 0,7^{\circ}$ ($c = 1,4$ in Methanol). DS einheitlich: Rf = 0,12 (Dioxan-Wasser, 9 : 1); 0,18 (Methanol). Löslich in verdünnten wässrigen Säuren.

$\text{C}_{33}\text{H}_{57}\text{O}_9\text{N}_5$ (667,86) Ber. C 59,35 H 8,60 N 10,49% Gef. C 59,46 H 8,82 N 10,46%

Behandlung mit konz. HCl (2 Min., 40°) ergab *H*·*Pro-Pro-Lys-Asp*·OH. PC einheitlich: Rf = 0,05 (45); 0,33 (54); 0,11 (56); Laufstrecke nach 30 Std.: 4,9 cm (46).

XXVIII: *Z*·*Ser-Pro-Pro-Lys*(BOC)-*Asp*(*OBu*^t)·*OBu*^t, *Carbobenzoxy-L-seryl-L-prolyl-L-prolyl*-(*N*^ε-*t-butoxycarbonyl*)-*L-lysyl-L-asparaginsäure-di-t-butylester*: Eine auf -20° gekühlte Lösung von 5,18 g (7,75 mMol) *H*·*Pro-Pro-Lys*(BOC)-*Asp*(*OBu*^t)·*OBu*^t und 2,22 g (9,30 mMol) *Z*·*Ser*·OH in 60 ml Acetonitril wurde mit 2,88 g (14,0 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt und 65 Std. bei $+2^{\circ}$ aufbewahrt. Aufarbeitung wie bei *Z*·*Pro-Pro-Lys*(BOC)-*Asp*(*OBu*^t)·*OBu*^t (XXVI) beschrieben: 7,40 g in Petroläther unlöslicher Neutralteil. Chromatographie an 350 g Silicagel aus Benzol- HCCl_3 (1 : 4), Fraktionen je 500 ml:

| Fraktion | Gemisch | Eindampfrückstand | Habitus |
|----------|---|-------------------|--|
| 1–3 | Benzol- HCCl_3 (1 : 4) | – | |
| 4–5 | Benzol- HCCl_3 (1 : 9) | – | |
| 6–8 | Benzol- HCCl_3 (1 : 9) | 280 mg | Krist., Smp. 165 – 168° (a. Aceton) |
| 9–11 | HCCl_3 | 40 mg | Harz |
| 12–15 | HCCl_3 - CH_3OH (99 : 1) | 40 mg | Harz |
| 16 | HCCl_3 - CH_3OH (98 : 2) | 112 mg | Harz |
| 17–22 | HCCl_3 - CH_3OH (98 : 2) | 5360 mg | Harz |
| 23–25 | HCCl_3 - CH_3OH (19 : 1) | 130 mg | Harz |
| 26–28 | HCCl_3 - CH_3OH (9 : 1) | 40 mg | gelbes Harz |

Der Rückstand der Fraktionen 17–22 (5,36 g, 78%) wurde aus Äther-Petroläther umgefällt: amorphes Pulver, $[\alpha]_D^{25} = -96,6^{\circ} \pm 0,7^{\circ}$ ($c = 1,4$ in Methanol). DS einheitlich: Rf = 0,22 (HCCl_3 - CH_3OH , 19 : 1); 0,62 (Dioxan); 0,66 (HCCl_3 - CH_3OH , 9 : 1). In den meisten organischen Lösungsmitteln ausser Petroläther leicht löslich.

XXIX: *H*·*Ser-Pro-Pro-Lys*(BOC)-*Asp*(*OBu*^t)·*OBu*^t, *L-Seryl-L-prolyl-L-prolyl*-(*N*^ε-*t-butoxycarbonyl*)-*L-lysyl-L-asparaginsäure-di-t-butylester*: 550 mg (0,62 mMol) *Z*·*Ser-Pro-Pro-Lys*(BOC)-*Asp*(*OBu*^t)·*OBu*^t wurden in 30 ml Methanol mit Palladiumkohle hydriert: 463 mg XXIX als farbloses Harz. Das Material enthielt nach DS eine Spur unhydriertes XXVIII. Zweimal aus Äther-Petroläther umgefällt: DS einheitlich, Rf = 0,11 (HCCl_3 - CH_3OH , 9 : 1); 0,20 (CH_3OH); 0,26 (52); 0,71 (101). $[\alpha]_D^{25} = -92^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 2,0$ in Methanol); Smp. unscharf ca. 80 – 90° . In organischen Lösungsmitteln (ausser Petroläther) leicht lösliches Harz, schwer löslich in H_2O , löslich in verdünnten Säuren.

Behandlung mit konz. HCl (2 Min., 40°) ergab *H*·*Ser-Pro-Pro-Lys-Asp*·OH. DS einheitlich: Rf = 0,03 (45); 0,20 (54); 0,18 (56).

Schema 5

XXX: *Z·Glu(OBu^t)-His-Phe-Arg-Try-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(BOC)-Asp(OBu^t)·OBu^t, CH₃COOH*; Carbobenzoxy-(γ -*t*-butyl)-L-glutamyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycyl-L-seryl-L-prolyl-L-prolyl-(*N*^ε-*t*-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-asparaginsäure-di-*t*-butylester: 1,271 g (1,25 mMol) *Z·Glu(OBu^t)-His-Phe-Arg-Try-Gly·OH* und 0,237 g (1,25 mMol) *p*-Toluolsulfonsäure (Hydrat) wurden unter Erwärmen auf 50° in 3,5 ml absolutem Dimethylformamid gelöst, auf 20° abgekühlt und mit einer Lösung von 0,89 g (1,18 mMol) *H·Ser-Pro-Pro-Lys(BOC)-Asp(OBu^t)·OBu^t* in 3,5 ml HCCL₃ versetzt. Unter Rühren wurde sodann 0,315 g (1,53 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid in fester Form zugegeben und die Mischung über Nacht bei 22° und dann noch während 8 Std. bei 40° gerührt. Nach Abkühlen auf 0° filtrierte man den ausgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff ab (260 mg), engte das Filtrat bei 12 Torr und 40° soweit wie möglich ein und fällte das Kondensationsprodukt mit 35 ml Benzol und 35 ml Petroläther als zähe Masse aus. Diese wurde in 4 ml Methanol gelöst und durch Zugabe von 40 ml Äther als Pulver ausgeschieden: 2,26 g (Toluolsulfonat). Umwandlung ins Acetat an einer Säule (2 × 15 cm) von schwach basischem Ionenaustauscher (MERCK Nr. II) in der Acetatform (Auftragen in Gemisch von 32 ml Methanol und 16 ml H₂O; Elution mit Methanol-Wasser, 1 : 1). Das Eluat wurde vom Methanol und einem Teil des Wassers befreit und dann lyophilisiert: 2,08 g rohes Acetat. Reinigung durch multiplikative Verteilung über 230 Stufen im System Methanol/0,1M Ammoniumacetat (pH = 7)/Chloroform/Tetrachlorkohlenstoff (2 : 1 : 1 : 1) mit Phasenvolumina von 25 ml pro Stufe. Die Verteilung wurde mittels DS kontrolliert. Der Inhalt der Elemente Nr. 56–85 (Maximum bei Nr. 68; *K* = 0,42) ergab 1,22 g (57%, bezogen auf eingesetztes Pentapeptid-Derivat) geschütztes Undecapeptid-acetat (XXX). Das Produkt wies bei der Chromatographie noch ca. 5% einer Verunreinigung auf, wurde aber trotzdem weiterverarbeitet. DS: Rf = 0,29 (52); 0,81 (101).

XXXI: *H·Glu(OBu^t)-His-Phe-Arg-Try-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(BOC)-Asp(OBu^t)·OBu^t, nCH₃COOH*; (γ -*t*-Butyl)-L-glutamyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycyl-L-seryl-L-prolyl-L-prolyl-(*N*^ε-*t*-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-asparaginsäure-di-*t*-butylester: 1,21 g Carbobenzoxyverbindung XXX wurde in 30 ml Methanol in Gegenwart von 0,04 ml Eisessig und 300 mg Palladiumkohle (10% Pd) bei 30° und Atmosphärendruck in einem Kolben mit Magnetrührer ohne CO₂-Absorption hydriert, wobei der Verlauf mittels DS kontrolliert wurde. Die Abspaltung der Carbobenzoxygruppe war nach 4 Std. beendet, und die Lösung wurde nach Abfiltrieren des Katalysators zur Trockne eingedunstet, der amorphe Rückstand pulverisiert und bei 40°/0,01 Torr getrocknet: 1,076 g (96%). DS: abgesehen von einer Verunreinigung von ca. 5% einheitlich, Rf = 0,12 (52); 0,67 (101).

XXXII: *BOC·Asp(OBu^t)-Ser-Gly-Pro-Tyr-Lys(BOC)-Met-Glu(OBu^t)-His-Phe-Arg-Try-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(BOC)-Asp(OBu^t)·OBu^t, CH₃COOH*; *t*-Butoxycarbonyl-(β -*t*-butyl)-L-aspartyl-L-seryl-glycyl-L-prolyl-L-tyrosyl-(*N*^ε-*t*-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-methionyl-(γ -*t*-butyl)-L-glutamyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycyl-L-seryl-L-prolyl-L-prolyl-(*N*^ε-*t*-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-asparaginsäure-di-*t*-butylester: 814 mg (0,763 mMol) BOC·Asp(OBu^t)-Ser-Gly-Pro-Tyr-Lys(BOC)-Met·NHNH₂ (IV) wurden in 8 ml absolutem Dimethylformamid gelöst und im Eis-Kochsalz-Bad (-12°) mit 3,05 ml 1N HCl und 0,632 ml 10-proz. NaNO₂-Lösung (0,916 mMol) versetzt. Die klare Lösung wurde 5 Min. bei -12° belassen und dann fällte man das Azid durch Zugabe von 38 ml auf -12° vorgekühlter, 20-proz. Kochsalzlösung aus. Der flockige Niederschlag wurde bei 0° abfiltriert, auf der Nutsche mit 10 ml eiskalter, 5-proz. NaHCO₃-Lösung und zuletzt viermal mit H₂O gewaschen. In feuchtem Zustand wurde er in 16 ml Dimethylformamid bei 0° gelöst und mit einer Lösung von 1,07 g (0,635 mMol) *H·Glu(OBu^t)-His-Phe-Arg-Try-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(BOC)-Asp(OBu^t)·OBu^t, nCH₃COOH* in 10 ml Dimethylformamid vereinigt. Die klare Lösung wurde 18 Std. bei 0° aufbewahrt, kurz evakuiert (15 Min., Entfernung von HN₃) und noch während 23 Std. bei 20° stehengelassen. Das Lösungsmittel wurde sodann bei 0,01 Torr/40° grösstenteils verdampft, der honigartige Rückstand in 60 ml heissem Benzol gelöst und durch Zugabe von 60 ml Petroläther ausgefällt: 1,88 g. Vorreinigung durch Lösen in 60 ml Methanol und Ausfällen mittels 48 ml Essigester und 80 ml Petroläther: 1,63 g. Reinigung durch multiplikative Verteilung über 500 Stufen im System Methanol/0,1M Ammoniumacetat (pH = 7)/Chloroform/Tetrachlorkohlenstoff (17 : 7 : 8 : 8) mit Phasenvolumina von je 25 ml. Die Verteilung wurde mittels DS kontrolliert. Die Röhren Nr. 110–149 (Maximum bei Nr. 130; *K* = 0,35) ergaben 952 mg (55%, bezogen auf Undecapeptid-Derivat) geschütztes β -MSH-Acetat. Weisses Pulver, Smp. 220–225° (Zers.). DS im

System 52 zeigte die Anwesenheit von ca. 10% eines unbekanntes Nebenproduktes mit kleinerem Rf-Wert, welches einen etwas grösseren Verteilungskoeffizienten aufweist (Maximum im Röhrchen Nr. 140, $K = \text{ca. } 0,39$). Nicht nachweisbar war hingegen das Sulfoxid-Derivat. DS: Hauptprodukt (XXXII), $R_f = 0,56$ (43c); $0,45$ (52); Nebenprodukt, $R_f = 0,56$ (43c); $0,39$ (52). Zum Vergleich wurde eine Probe des Materials mit einer 1-proz. H_2O_2 -Lösung in 90-proz. Methanol zum Sulfoxid oxydiert: $R_f = 0,45$ (43c); $0,26$ (52).

Das so gereinigte, geschützte β -MSH besitzt $[\alpha]_D^{25} = -36^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,06$ in Methanol). UV-Absorption in Methanol-1N NaOH (9:1): $\lambda_{max} = 283 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 7550$); $289 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 7400$); $\text{Try/Tyr} = 1,05^{23}$).

| | | | | | | |
|--|--------------|--------|---------|---------|--------|------------|
| $\text{C}_{129}\text{H}_{196}\text{O}_{36}\text{N}_{26}\text{S}$ | Ber. C 56,98 | H 7,27 | O 21,18 | N 13,39 | S 1,18 | AcOH 2,21% |
| (Monoacetat; 2719,1) | Gef. „ 56,53 | „ 7,55 | „ 20,84 | „ 13,10 | „ 1,28 | „ 2,10% |

II: *H·Asp·Ser·Gly·Pro·Tyr·Lys·Met·Glu·His·Phe·Arg·Try·Gly·Ser·Pro·Pro·Lys·Asp·OH, L-Aspartyl-L-seryl-glycyl-L-prolyl-L-tyrosyl-L-lysyl-L-methionyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycyl-L-seryl-L-prolyl-L-prolyl-L-lysyl-L-asparaginsäure, β -MSH*: 440 mg geschütztes Octadecapeptid XXXII wurden in 8,8 ml 97-proz. F_3CCOOH gelöst und während 1 Std. im Dunkeln bei 20° aufbewahrt. Die Lösung wurde schonend eingeengt, mit 4 ml H_2O verdünnt, wieder eingeengt und dann lyophilisiert: 565 mg Trifluoracetat, das wiederum in Wasser gelöst und durch Filtration durch eine Säule ($0,9 \times 15 \text{ cm}$) von schwach basischem Ionenaustauscher (MERCK Nr. II) in der Acetatform ins Acetat verwandelt wurde: 389 mg. DS ergab folgendes Bild (System 104):

| | | |
|--------------|---------|---|
| $R_f = 0,07$ | Spuren | Struktur unbekannt |
| 0,18 | Spuren | β -MSH-Sulfoxid |
| 0,26 | ca. 10% | Struktur unbekannt (vgl. 10% Verunreinigung in [XXXII]) |
| 0,31 | 85–90% | β -MSH |
| 0,52 | Spuren | Struktur unbekannt. |

Dieses Gemisch wurde durch eine multiplikative Verteilung über insgesamt 1300 Stufen im System 0,5% Trichloressigsäure-*sec*-Butanol gereinigt. Die Apparatur, bestehend aus 100 Verteilungselementen (Nr. 0–99) für je 10 ml Unter- und Oberphase, wurde mit einer Vorrichtung zur kontinuierlichen Begasung mit Stickstoff versehen und erlaubte das Umschalten auf Kreislauf. Nach Auflösen der 389 mg Rohprodukte im Element (Nr. 0) wurden 205 Schritte ausgeführt und die austretenden Oberphasen verworfen. Die Lage des Substanzmaximums wurde nun durch Proben von je 0,2 ml Unterphase bestimmt, die mit 2,5 ml H_2O verdünnt und bei $280 \text{ m}\mu$ photometriert wurden (Maximum bei Nr. 75). Alle Elemente mit Ausnahme von Nr. 63–85 wurden nun geleert und mit frischem Lösungsmittel beschickt, worauf im Kreislauf weitere 505 Schritte ausgeführt wurden. Das Maximum lag jetzt im Röhrchen Nr. 58 (entsprechend $q_{max} = 258$). Die Apparatur wurde mit Ausnahme der Elemente Nr. 18–87 wiederum entleert und frisch beschickt. Nach weiteren 590 Stufen (total 1300) lag das Maximum bei Nr. 68 ($q_{max} = 468$; $K = \frac{468 + 0,5}{1300 - 468 + 0,5} = 0,56$). Die Lösung wurde in Fraktionen von je 5 Verteilungselementen ent-

nommen, im Vakuum schonend auf ein kleines Volumen eingeengt und lyophilisiert. Bei der DS (System 104) waren die Proben aus den Elementen 53–87 frei vom Nebenprodukt mit $R_f = 0,26$. Dieses war in den Elementen Nr. 8–32 angereichert (Mischfraktionen mit β -MSH; Maximum des Nebenproduktes bei Nr. 16, $q_{max} = 416$, $K = 0,47$). Sämtliche Fraktionen zeigten jedoch wieder, wie schon das eingesetzte Rohprodukt, Spuren von Verunreinigungen mit $R_f = 0,07$ und $0,18$ (Sulfoxid), die offenbar im Laufe der Verteilung, bzw. während des Aufarbeitens frisch gebildet worden waren.

Die Fraktionen aus den Elementen Nr. 53–87 wurden vereinigt und mit schwach basischem Ionenaustauscher behandelt (Ersatz von Trichloracetat- durch Acetat-Ionen): 188 mg. Zur endgültigen Reinigung wurde das Produkt an einer Säule von Carboxymethyl-SEPHADEX C-25, medium grade (Pharmacia, Uppsala), wie folgt chromatographiert: Die Säule ($l = 17,5 \text{ cm}$; $\varnothing 0,96 \text{ cm}$) wurde vorerst mit $0,05 \text{ M}$ Ammoniumacetatpuffer ($\text{pH} = 5,5$) äquilibriert und nach Auftragen der in $0,5 \text{ ml}$ H_2O gelösten Substanz mit weiteren 30 ml $0,05 \text{ M}$ Pufferlösung gewaschen (Eluat verworfen). Danach wurde ein linear steigender Konzentrationsgradient angesetzt (erhalten durch Mischen des Inhaltes von 2 offenen, zylindrischen Gefässen mit je 80 ml $0,05 \text{ M}$ bzw. $0,6 \text{ M}$ Am-

moniumacetatpuffer vom pH = 5,5. Die optische Dichte (254 $\mu\mu$) des Eluats wurde mit Hilfe eines «UVICORD» (LKB-Produkt A. B., Stockholm) kontinuierlich registriert. Die verschiedenen Fraktionen wurden auf ein kleines Volumen konzentriert, lyophilisiert und chromatographisch untersucht:

| Fraktion Nr. | Volumen (ml) | Pufferkonz. | Gewicht (mg) | Beurteilung (DS, 104) |
|--------------|--------------|-------------|--------------|--|
| 1 | 51 | 0,05–0,22 | Spuren | |
| 2 | 9 | 0,22–0,25 | 4,5 | β -MSH (40%), Sulfoxid (50%) |
| 3 | 15 | 0,25–0,30 | 96 | β -MSH + 1–2% Sulfoxid |
| 4 | 9 | 0,30–0,33 | 94 | reines β -MSH |
| 5 | 8 | 0,33–0,36 | 6 | β -MSH (20%) + Nebenprod. (80%, Rf = 0,07) |
| 6 | 9 | 0,36–0,39 | 4,5 | Nebenprodukt, Rf = 0,07 |
| 7 | 18 | 0,39–0,45 | 5 | – |
| 8 | 16 | 0,45–0,51 | 2 | – |

Die beiden β -MSH-Fractionen 3 und 4 verloren beim Nachtrocknen (40°/0,001 Torr) kein Gewicht, obwohl sie noch beträchtliche Mengen Feuchtigkeit und Essigsäure sowie Spuren von Ammoniak (NESSLER'sche Probe schwach positiv) enthielten. Fraktion 4 wurde deshalb erneut in 2 ml Wasser gelöst, lyophilisiert und 15 Std. bei 50°/0,01 Torr über KOH getrocknet. Das erhaltene Material war stark hygroskopisch und nahm beim Stehen an der Luft in kurzer Zeit wieder 7,1% Feuchtigkeit auf. In diesem Zustande wurde die Probe analysiert.

Ultraviolett-Absorption in 0,1N NaOH:

2,134 mg in 10 ml ($M = 2134$)

$D_{293,4} = 0,380-0,011$ (Basisabsorption) = 0,369

$D_{280} = 0,582-0,013$ (Basisabsorption) = 0,569

Daraus ergibt sich nach ²³): $M_{\text{Try}} + M_{\text{Tyr}} = 1,56 \times 10^{-4}$ Mol pro l;

Peptidgehalt = $\frac{1,56 \cdot 100}{2} = 78\%$.

$M_{\text{Try}}/M_{\text{Tyr}} = 1,27$.

Essigsäure-Bestimmung: Destillation mit Schwefelsäure und Titration mit NaOH: 6,5%.

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{25} = -57,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,99$ in 1N Essigsäure); bei 100% Peptidgehalt also $[\alpha]_D = -73^\circ$.

Aminosäure-Bestimmung im Totalhydrolysat (16 Std. 110°, 20-proz. HCl), theoretische Werte in Klammern:

His (1) 1,07; Lys (2) 1,98; Arg (1) 0,96; Asp (2) 2,07; Ser (2) 1,83; Glu (1) 0,97; Pro (3) 3,20; Glu (2) 2,03; Met (1) 0,91; Tyr (1) 1,05; Phe (1) 1,00 (Bezugswert).

DS: Rf = 0,23 (101); 0,31 (104); für das Sulfoxid ergibt sich Rf = 0,17 (101); 0,18 (104).

Papierelektrophorese (WHATMAN-Papier Nr. 1):

pH = 2 (Ameisensäure-Essigsäure) 50 V/cm, 1 Std. – 11 cm

pH = 6,3 (Pyridinacetat) 75 V/cm, 2 Std. – 4,9 cm

Für die Ausführung spezieller analytischer Arbeiten danken wir den Herren Dres. HÜRZELER, NEHER und PADOWETZ, sowie Herrn E. VON ARX.

SUMMARY

The synthesis of an octadecapeptide with the amino-acid sequence of bovine β -melanotropin (seryl- β -MSH¹⁰) has been accomplished using the same scheme for the protection of amino and carboxyl groups as in the case of α -melanotropin (α -MSH)⁹, β -corticotropin (ACTH)^{11,14}, and active sequences of β -corticotropin (e.g. β^{1-24} -corticotropin¹³) = CIBA 30920-Ba, SYNACTHEN®). The compound has

been obtained in a very pure state, as shown by thin-layer chromatography, electrophoresis, counter-current distribution, chromatography on carboxymethyl-SEPHADEX® and amino-acid analysis. The amino-acid residues are in the correct (L-) configuration, this being ascertained by the methods of synthesis and by enzymic degradation. Synthetic seryl- β -MSH has a distribution coefficient in 2-butanol/0.5 per cent trichloroacetic acid of 0.56 (1300 transfers) corresponding very closely to that reported for the natural product (same solvents: 0.53; 702 transfers¹⁰); $[\alpha]_D^{25} = -57.5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$ in 1 N acetic acid). The product contains 78% peptide, 15.5% water and 6.5% acetic acid (both solvents firmly bound). Its biological activity is $1/_{10}$ that of synthetic α -MSH⁹).

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel
Pharmazeutische Abteilung

223. Chemische Korrelation von Condylcarpin mit Akuammicin

von D. Schumann und H. Schmid

Herrn Prof. Dr. F. LEUTHARDT zum 60. Geburtstag gewidmet

(22. VI. 63)

Vor einiger Zeit wurde aus *Diplorrhynchus condylcarpon* (MUELL. ARG.) PICHON *ssp. mossambicensis* (BENTH.) DUVIGN. (*Apocynaceae*) das α -Methylenindolin-Alkaloid Condylcarpin¹⁾ isoliert, dem auf Grund chemischer und namentlich massenspektrometrischer Befunde die Konstitution I²⁾ 3) zugewiesen wurde. Relative und absolute Konfiguration dieses Alkaloides blieben unbestimmt. Ein damit verwandtes Alkaloid, das Tubotaiwin (= 19,20-Dihydrocondylcarpin (II)), wurde kürzlich aus den Blättern von *Pleiocarpa tubicina*⁴⁾ (*Apocynaceae*) und aus den Wurzeln von *Aspidosperma limae*⁵⁾ (*Apocynaceae*) gewonnen. Diese beiden Alkaloide sind strukturell sehr nahe verwandt dem Akuammicin (III)⁶⁾ bzw. dem 19,20-Dihydroakuammicin (IV)⁴⁾ 7). Relative und absolute Konfiguration der beiden letzteren Alkaloide sind durch Korrelierung mit Strychnin bzw. Dihydrostrychnin gesichert⁸⁾.

1) D. STAUFFACHER, *Helv.* 44, 2006 (1961).

2) K. BIEMANN, A. L. BURLINGAME & D. STAUFFACHER, *Tetrahedron Letters* No. 12, 527 (1962).

3) A. SANDOVAL, F. WALLS, J. N. SHOOLERY, J. M. WILSON, H. BUDZIKIEWICZ & C. DJERASSI, *Tetrahedron Letters* No. 10, 409 (1962).

4) W. G. KUMP, B. PATEL & H. SCHMID; über die Isolierung und Strukturbestimmung der Alkaloide wird später berichtet.

5) M. PINAR & H. SCHMID, im Druck.

6) K. AGHORAMURTHY & R. ROBINSON, *Tetrahedron* 1, 172 (1957); G. F. SMITH & J. T. WRÓBEL, *J. chem. Soc.* 1960, 792; P. N. EDWARDS & G. F. SMITH, *ibid.* 1961, 152; K. BERNAUER, W. ARNOLD, CH. WEISSMANN, H. SCHMID & P. KARRER, *Helv.* 43, 717 (1960); J. LEVY, J. LE MEN & M.-M. JANOT, *C. r. hebd. Séances Acad. Sci.* 253, 131 (1962).

7) CH. WEISSMANN, H. SCHMID & P. KARRER, *Helv.* 44, 1877 (1961).

8) Über die chemische Ableitung der absoluten Konfiguration des Strychnins s. K. NAGARAJAN, CH. WEISSMANN, H. SCHMID & P. KARRER, *Helv.* 46, 1212 (1963).