

19. Die Totalsynthese des β -Corticotropins (adrenocorticotropes Hormon; ACTH)¹⁾

von R. Schwyzer²⁾ und P. Sieber

(4. X. 65)

Adrenocorticotropes Hormon aus Schweine-Hypophysen ist ein Gemisch von mindestens sieben chemisch sehr nahe miteinander verwandten Polypeptiden [2³⁾]. Die Hauptkomponente ist unzweifelhaft das β -Corticotropin (Formel I), dessen Molekel 39 Aminosäurereste umfasst und volle ACTH-Wirkung aufweist. Bei andern Spezies sind die Träger der ACTH-Wirkung fast identische Nonatriaonta-Peptide, welche sich untereinander und vom Schweine- β -Corticotropin nur im Bereiche der Aminosäuren No. 25–33 durch kleine Abweichungen in der Sequenz unterscheiden [3]. Das porcine β -Corticotropin kann deshalb, mindestens für die Zwecke der chemischen Synthese, als eine für das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) repräsentative Molekel angesehen werden.

Die systematische Anwendung der in unserem Arbeitskreise entwickelten Methoden zur Synthese komplizierter Polypeptid-Naturstoffe (Gramicidin S [4], Angiotensin I [5] und II [6], α -melanophorenstimulierendes Hormon [7], β -melanophorenstimulierendes Hormon [8]) hat nun auch die Herstellung des β -Corticotropins (I) in Dezigramm-Mengen erlaubt. Mit seinen 39 Aminosäureresten ist dies z. Zt. der grösste und komplizierteste durch Totalsynthese in hoher Reinheit zugänglich gewordene Polypeptid-Wirkstoff.

Bei unserer Synthese waren sowohl die Verwendung von Aminosäurederivaten mit leicht abspaltbaren, vom *t*-Butanol sich ableitenden Schutzgruppen an Seitenkettenfunktionen [9] [10] als auch die Knüpfung von Peptidbindungen mittels «aktivierter Ester» [11], insbesondere mit *p*-Nitrophenylestern [12] [13], für den Erfolg von Bedeutung. Besondere Erwähnung verdient der stufenweise Aufbau des Pentadecapeptides, Pos. 25–39, beginnend mit Aminosäure No. 39, unter Angliederung eines Aminosäure-*p*-nitrophenylesters nach dem anderen, bis zur N-terminalen Aminosäure No. 25. Alle Stufen der Synthese sind 5- bis 12mal wiederholt worden.

Das synthetische ACTH wurde eingehend auf seine biologischen Eigenschaften hin untersucht. Sowohl tierexperimentell (Wirkung auf die Nebennierenrinde) [14] als auch immunologisch [15] [16] ist es ebenso wirksam wie reinste, durch Isolierung gewonnene ACTH-Präparate⁴⁾.

¹⁾ Vorläufige Mitteilung bei [1]; die synth. Arbeiten waren im Mai 1963 abgeschlossen; diese Veröffentlichung musste aus äusseren Gründen bis heute zurückgestellt werden.

²⁾ Neue Adresse: Laboratorium für Molekularbiologie chemischer Richtung, Eidg. Techn. Hochschule, 8006 Zürich.

³⁾ Inwiefern es sich dabei um diskrete Hormone mit etwas verschiedenen Wirkungen, um Moleküle mit genetisch bedingten Unterschieden, oder aber um Aufarbeitungs-Artefakte handelt, ist noch fraglich.

⁴⁾ Z. B. ACTH-A₁ der Firma ORGANON, Oss, Holland.

Das Syntheseprodukt besitzt die erwartete Aminosäuren-Zusammensetzung⁵⁾. Die Elementaranalyse des bei 25° und 0,001 Torr während 20 Std. getrockneten, aschefreien, amorphen Lyophilisats (aus verd. Essigsäure) wies auf eine Zusammensetzung $C_{214}H_{386}O_{93}N_{56}S$, 10 CH_3COOH , 20 H_2O hin (Formelgewicht 5528,04). Aus spektroskopischen Daten errechnet sich ein Formelgewicht zwischen 5490 und 5540 (Figur 1)⁶⁾. Aus der Aminosäuren-Analyse ergibt sich ca. 5580.

In der Ultrazentrifuge verhält sich das synthetische β -Corticotropin wie eine einheitliche Substanz vom Molekulargewicht 4559,4 (Fig. 2; ber. für freies Peptid $C_{214}H_{386}O_{93}N_{56}S$: 4567,2)⁷⁾. Nach der gleichen Methodik hatten Brown *et al.* [19] natürliches β -Corticotropin untersucht und ein Teilchengewicht von 4360 gefunden.

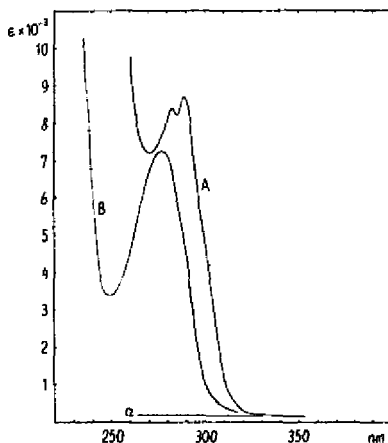


Fig. 1. UV.-Absorption von synth. ACTH in 0,1 N NaOH (A) und in 0,1 % Essigsäure (B). Basisabsorption extrapoliert (a)

$$\frac{M_{Tyr}}{M_{Trp}} = \frac{0,592 \cdot D_{294,4} - 0,263 \cdot D_{280}}{0,263 \cdot D_{280} - 0,170 \cdot D_{294,4}} = 2,15 \quad (D_{294,4} = 0,694; D_{280} = 0,802;$$

Berechnung nach G. H. BEAVAN & E. R. HOLIDAY, *Advances Protein Chemistry* 7, 319 [1952].
M.-Gew. (Einwaage 2,155 mg auf 4,100 ml):

$$1) \text{ aus } D_{280} \text{ (} \epsilon \text{ ber.} = 8377 \text{)}: \frac{8377 \cdot 2,155}{0,802 \cdot 4,10} = 5490$$

$$2) \text{ aus } D_{290} \text{ (} \epsilon \text{ ber.} = 8884 \text{)}: \frac{8884 \cdot 2,155}{0,844 \cdot 4,1} = 5540$$

Die optische Rotationsdispersionskurve des synthetischen Hormons in 0,02-proz. Essigsäure folgt zwischen 195 und 300 nm genau derjenigen eines hochgereinigten

⁵⁾ Die Bestimmung (nach SPACKMANN, STEIN & MOORE [17]) verdanken wir Herrn Dr. H. ZUBER, damals CIBA-Aktiengesellschaft, jetzt Laboratorium für Molekularbiologie chemischer Richtung, ETH.

⁶⁾ SHEPHERD *et al.* [2] fanden (nach Berücksichtigung von Asche) für das Naturprodukt $C_{214}H_{386}O_{93}N_{56}S$, 2 CH_3COOH , 32 H_2O (Formelgewicht 5263,2).

⁷⁾ Ultrazentrifugen-Versuche und Berechnungen verdanken wir Herrn ROGER WADE, Dept. of Biochemistry (Vorstand: Prof. Dr. H. NEURATH), University of Washington, Seattle 98105 USA.

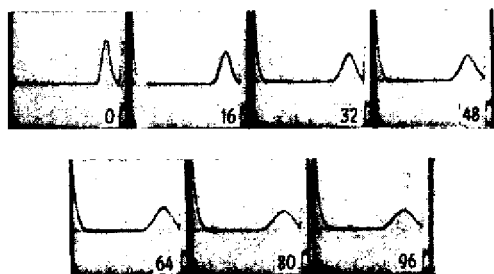


Fig. 2. Ultrazentrifugen-Lauf No. 4010-2 mit synth. ACTH

4,6 mg Peptid/1 ml 0,05 M KCl + 0,05 M HCl, «synthetic boundary cell», 52564 U./Min., Aufnahmen mit 16 Min. Abstand, Ausführung: ROGER WADE, Seattle, 22. Juli 1964, auf Spinco Analyt. Ultrazentrifuge.

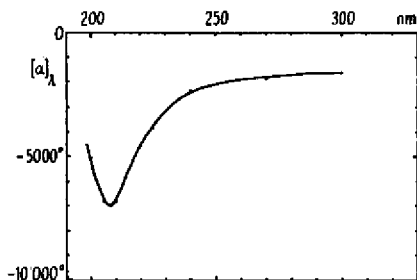


Fig. 3. Optische Rotationsdispersion von ACTH in 0,02-proz. Essigsäure (Basislinie des Lösungsmittels abgezogen)

— synth. ACTH, $c = 0,0124$ mg/ml
 porcines ACTH-A₁ (ORGANON), $c = 0,0118$ mg/ml

Ausführung: Dr. DAVID DERANLEAU mit Cary Mod. 60.

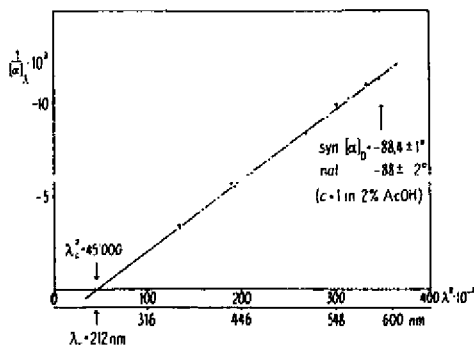


Fig. 4. Optische Rotationsdispersion von ACTH ($c = 1$ in 2-proz. Essigsäure)

$1/([\alpha]_\lambda)$ vs. λ^2 , Extrapolation gegen $1/([\alpha]_\lambda) = 0$. Synth. ACTH (.....); ACTH-A₁, ORGANON (+ + +). Aufnahme auf RUDOLPH Spectrophotopolarimeter.

Präparates von ACTH-A₁ aus Schweinehypophysen⁸⁾ (Fig. 3). Die Kurve weist ein Minimum bei 208 nm auf und steigt bei kürzeren Wellenlängen schnell wieder an⁹⁾. Oberhalb 250 nm konnte die Messung in stärkerer Essigsäure erfolgen (die Carbonyl-Absorption ist bei Wellenlängen unter 230 nm sehr störend); zwischen 400 und 600 nm,

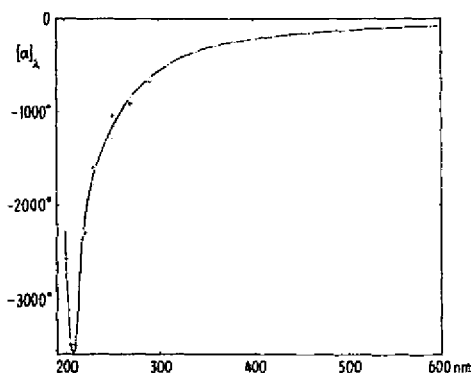


Fig. 5. *Optische Rotationsdispersion von ACTH (synth. ACTH und nat. ACTH-A₁)*

..... $c = 1,24 \cdot 10^{-3}$ in 2-proz. Essigsäure

+ + + $c = 1,24 \cdot 10^{-6}$ in 0,02-proz. Essigsäure, Werte mit $f = 0,50$ reduziert.

in 2-proz. Essigsäure, sind die Dispersionskurven der beiden Produkte ebenfalls identisch. Sie folgen einer einfachen DRUDE-Gleichung, $[\alpha]_{\lambda} = k' / (\lambda^2 - \lambda_c^2)$ (Fig. 4); $\lambda_c = 212$ nm. Diese Befunde lassen eine helicale Konformation (Sekundärstruktur) in diesen Lösungsmitteln als ausgeschlossen erscheinen. Die spezifischen Drehungen von synthetischem und natürlichem ACTH ($c = 1$ in 2-proz. Essigsäure) betragen $[\alpha]_D^{20} = -88,4 \pm 1^{\circ}$ (synth.), bzw. $-88 \pm 2^{\circ}$ (ACTH-A₁). SHEPHERD *et al.* [2] hatten $[\alpha]_D = -150^{\circ}$ ($c = 0,5$ in 0,1N Essigsäure) gefunden; die Differenz zu unsern Messungen ist mindestens teilweise auf Verdünnungseffekte zurückzuführen. Bei den Messungen in 0,02-proz. Essigsäure ($c = 0,01$) wurde nämlich eine Verdoppelung der (negativen) spezifischen Drehungswerte gegenüber denen in 2-proz. Essigsäure ($c = 1$) beobachtet. Fig. 5 stellt den Verlauf der optischen Rotationsdispersion zwischen 190 und 600 nm, korrigiert auf $c = 1$ in 2-proz. Essigsäure, dar.

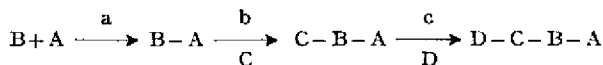
Schon diese physikalisch-chemischen Untersuchungen deuten auf eine hohe optische Reinheit des synthetischen β -Corticotropins hin (alle Aminosäuren in der natürlichen Konfiguration). Auch die chemische Ausführung der Synthese gewährleistet optische Reinheit, indem alle Peptidzwischenprodukte in sterisch einheitlicher Form (enzymatische Prüfung) eingesetzt (für den Kettenabschnitt 1–24 siehe frühere Arbeiten, insbesondere [10]) und die Kondensationsstellen bzw. Kondensationsmethoden ausgewählt wurden, um partielle Racemisierung auszuschliessen (Schema 1).

Unsere besondere Aufmerksamkeit schenken wir der optischen Einheitlichkeit der neuen Pentadecapeptid-Sequenz 25–39. Das entsprechende Peptid wurde mittels

⁸⁾ Wir danken Herrn Dr. S. SZPILFOGEL der Firma ORGANON, Oss, Holland, für die Überlassung einer Probe des Naturproduktes. Dieses ist identisch mit Schweine- β -Corticotropin [18].

⁹⁾ Diese Versuche mit dem CARY-60-Instrument verdanken wir Herrn Dr. DAVID DERANLEAU, Dept. of Biochemistry, University of Washington, Seattle.

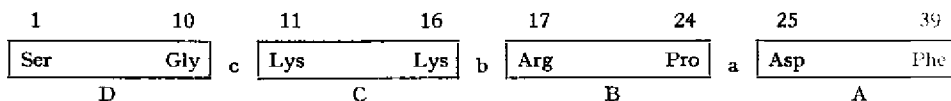
Schema 1: Zwischenprodukte der ACTH-Synthese (A, B, C, D) und ihre Verknüpfung (Methoden a, b, c)



a: Methode der gemischten Anhydride (Pro wird nicht racemisiert).

b: Azid-Methode (Methode schliesst partielle Racemisierung aus).

c: Methode mit Dicyclohexylcarbodiimid (Gly ist symmetrisch, keine Racemisierung möglich).



N^α-Carbobenzoxy-aminosäure-*p*-nitrophenylestern vom Carboxyl- gegen das Aminoende hin stufenweise aufgebaut (Schema 2). Auch dieses, sonst als zuverlässig angesehene Verfahren garantiert jedoch nicht ohne weiteres optische Einheitlichkeit, da Carbobenzoxy-aminosäure-*p*-nitrophenylester im üblicherweise basischen Kondensationsmedium u. U. racemisiert werden [20]. Wir konnten diese Gefahr umgehen, indem wir die Kondensationsreaktion in neutralem bis schwach essigsäurem Medium ausführten (einen katalytischen Effekt der Essigsäure hatten wir schon früher beobachtet [21]).

Zum Nachweis seiner optischen Einheitlichkeit wurde das synthetische β-Corticotropin-(25–39)-pentadecapeptid-Derivat XXX (worüber in einer separaten Arbeit berichtet werden wird¹⁰⁾) von seinen Schutzgruppen befreit und der Wirkung von Aminopeptidase A [22]¹¹⁾ unterworfen. Die quantitative Bestimmung der Aminosäuren im Hydrolysat ergab, dass alle Aminosäuren, aus denen das Pentadecapeptid aufgebaut ist, in der erwarteten Menge freigesetzt wurden, ausgenommen Phenylalanin Nr. 35 und Prolin Nr. 36. Offenbar vermag diese Aminopeptidase (ähnlich wie Leucinaminopeptidase) die Phe-Pro-Bindung nicht zu spalten und enthält sie eine carboxypeptidatische Wirkung [23], welche Phenylalanin³⁹, Glutaminsäure³⁸ und Leucin³⁷ abhydrolysiert. Die optische Reinheit des nicht freigesetzten Phenylalaninrestes Nr. 35 wurde durch Totalhydrolyse des Pentadecapeptides mit HCl und Oxydation des Totalhydrolysates mittels L-Aminosäure-Oxydase [24] bewiesen: quantitative Aminosäuren-Analyse zeigte vollständige Oxydation des Phenylalanins an, d. h. alle Phe-Reste besitzen L-Konfiguration.

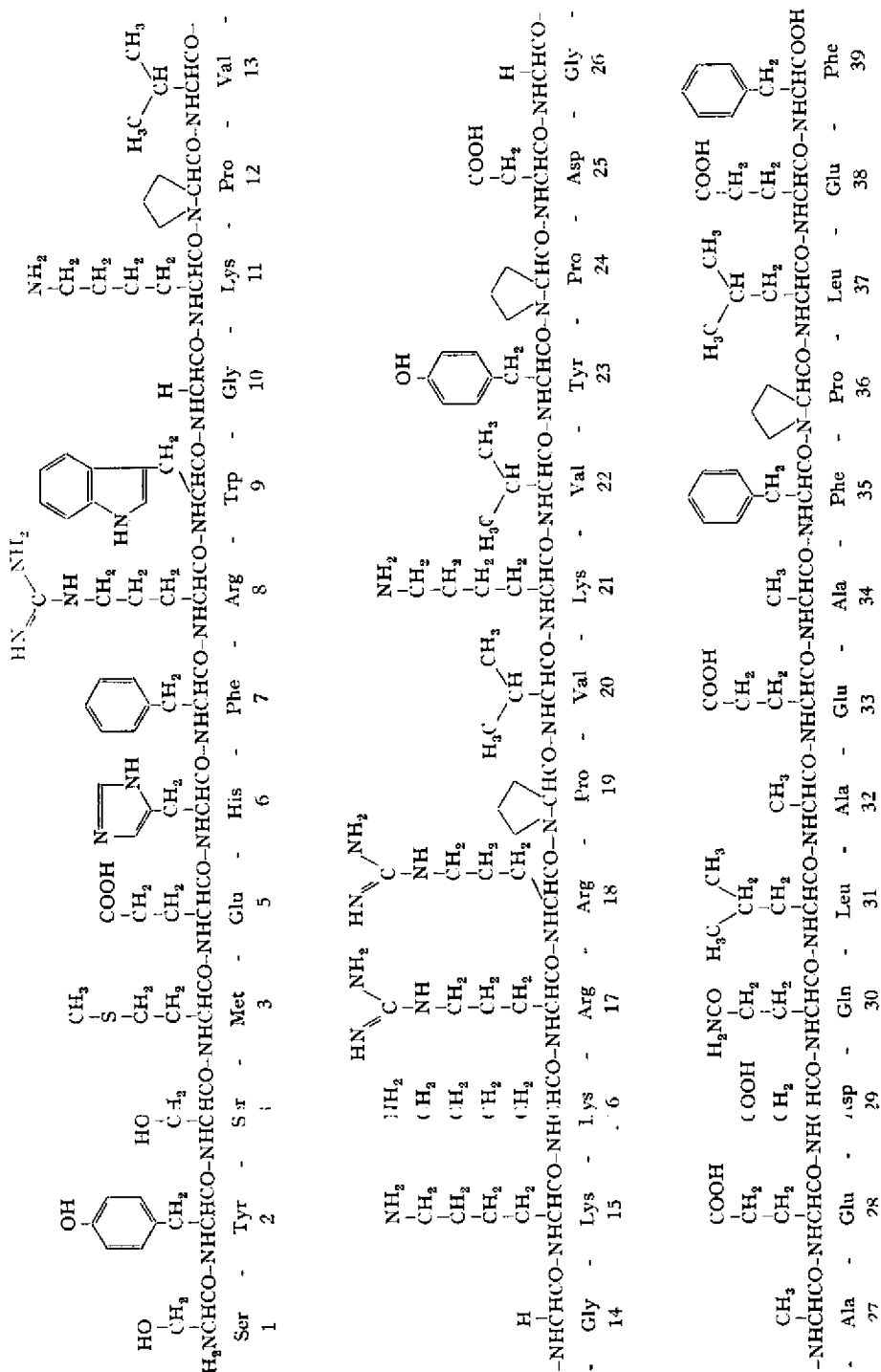
Damit ist die optische Einheitlichkeit des synthetischen β-Corticotropins auf physikalisch-chemischem, chemischem und biochemischem Wege sichergestellt und seine Identität mit natürlichem β-Corticotropin der Formel I bewiesen.

Anlage der Synthese (Schema 1). Die Synthese wurde nach den von uns früher entwickelten Gesichtspunkten [9] [10] angelegt, um auch grössere Zwischenprodukte mit möglichst guter Ausbeute und ohne Racemisierung verknüpfen zu können. Es sei hervorgehoben, dass die Abspaltung der Schutzgruppen vom Nonatriakontapeptid-Derivat XXXXI mittels Trifluoressigsäure in quantitativer Weise gelang: lag das

¹⁰⁾ Untersuchung zusammen mit B. RIDGE und P. GROGG, ausgeführt mit finanzieller Hilfe des «OTTO-NÄGELI-Preis» und der University of Washington, Seattle.

¹¹⁾ Dieses Enzym gleicht der bekannten Leucinaminopeptidase, hydrolysiert jedoch (was hier besonders wichtig ist) auch L-Peptide mit sauren Aminosäureresten. Die Überlassung einer Probe von Carboxypeptidase A verdanken wir Herrn Dr. G. G. GLENNER, NIH, Bethesda, Md.

Formel 1: *Primärsäure des porcinen β-Corticotropins nach Bell [2] (Protonierung in wässriger Lösung nicht berücksichtigt)*



geschützte ACTH (XXXXI) in chemisch reiner Form vor, so wurde daraus das freie ACTH (I) direkt in reinsten Form erhalten¹²⁾.

Stufenweiser Aufbau des β -Corticotropin-(25–39)-pentadecapeptid-Derivates XXX (Schema 2 und Tab. I und II). – Ausser bei der Herstellung des Dipeptidderivates III (wo Dicyclohexylcarbodiimid als Kondensationsmittel verwendet wurde) wurden die anzufügenden Aminosäure-Einheiten als N^{α} -Carbobenzoxy-aminosäure- p -nitrophenylester eingesetzt (Kolonne «Aktiver Ester» in Schema 2). Ihre Kondensation mit Peptid-Derivaten mit freier α -Aminogruppe konnte durch Verwendung eines Überschusses (1,1–1,6) der «aktiven Ester-Komponente» quantitativ gestaltet werden; mit grösser werdender Kettenlänge unterscheidet sich die Löslichkeit des aktiven Esters immer mehr von derjenigen des entstandenen (unlöslichen) Peptidderivates, wodurch das Reinigungsproblem gerade bei grösseren Peptiden ausserordentlich vereinfacht wird. Vor den Methoden, die mit unlöslichen Trägersubstanzen arbeiten (z. B. MERRIFIELD [29]; LETSINGER [30]), bietet das hier angewandte Verfahren (Diskussion vgl. [10] und auch BODANSZKY [33]) den zusätzlichen Vorteil, dass kleine Verunreinigungen (z. B. Spuren unumgesetzten, «freien» Peptids) abgetrennt werden können und nicht bis zum Schluss mitgeschleppt werden müssen. Diese Reinigung haben wir vorgenommen mittels Umfällen (heisses Methanol-Wasser-Gemisch hat sich besonders bewährt), Kristallisation (8 von 28 Zwischenprodukten liessen sich kristallisieren) und Gegenstromverteilung (dieses Verfahren wurde nur einmal, bei einem Vorversuch zum Pentadecapeptid (XXX) angewandt und konnte später durch Umlösen ersetzt werden). Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der Reinheitsprüfung und Analyse auf jeder Stufe (von 28 Zwischenprodukten haben wir die Reinheit eines jeden mittels Dünnschichtchromatographie und die Identität von 10, inklusive Endprodukt, durch Analyse festgestellt; vgl. Tab. I).

Bei der schrittweisen Kettenverlängerung entstanden in der vorliegenden Arbeit N^{α} -Carbobenzoxy-peptide mit *t*-Butoxy-carbonyl-(Boc)-Schutzgruppen an Seitenketten-Aminofunktionen und mit mittels *t*-Butanol veresterten Carboxylgruppen (ungerade Nummern, Schema 2). Der N^{α} -Schutz liess sich quantitativ und selektiv mittels Hydrierung in essigsäurem Medium entfernen, wobei die Acetate (gerade Nummern) entstanden, welche direkt zur Kondensation mit dem aktiven Ester eingesetzt wurden. Hochmolekulare Verbindungen neigen dazu, Palladium-Kohle und andere heterogene Hydrierungs-Katalysatoren zu blockieren; diesem Umstande (welcher wohl dem Verfahren der stufenweisen Synthese in der vorliegenden Form eine obere Grenze der Kettenlänge setzen dürfte) konnte durch Arbeiten in 80-proz. Essigsäure als Lösungsmittel und durch Anwendung grosser Verdünnung und rel. grosser Katalysatormengen entgegengewirkt werden.

¹²⁾ HOFMANN und Mitarb. [25] behaupten, dass unsere Methode der Abspaltung von Schutzgruppen mit Trifluoressigsäure auch die Säureamidgruppe von Glutaminresten (insbesondere in Stellung 5) von Corticotropinsequenzen hydrolysiere. Wir können dies nicht bestätigen. Erstens hatten wir mit Trifluoressigsäure bereits früher analysenreine, z. T. kristallisierte Peptide erhalten, z. B. Met-Gln-His-Phe-Arg-Trp-Gly [26], Ser-Tyr-Ser-Met-Gln-His-Phe-Arg-Trp-Gly [27] und Gln-His-Phe-Arg-Trp-Gly [28]; zweitens beweisen wir in dieser Arbeit anhand des β -Corticotropin-(27–39)-tridecapeptides XXVI, dass Trifluoressigsäure auch Gln³⁰ nicht hydrolysiert. Schliesslich ergab der quantitative enzymatische Abbau des durch 2-stdg. Einwirkung von Trifluoressigsäure aus XXX gewonnenen Pentadecapeptides die erwarteten Mengen von Glutamin und Glutaminsäure.

Schma 2: Stufenweiser Aufbau des geschützten β -Corticotropin-(25-39)-pentadecapeptides (XXX)
Nr.

Aktiver Ester	Bedingungen	Ausbeute
$\begin{array}{c} \text{OBu}^t \\ \\ \text{Z}-\text{Glu}-\text{OH} \\ 38 \end{array}$	DCCI CHCl ₃	84,6%
$\begin{array}{c} \text{H}-\text{Phe}-\text{OBu}^t \text{ II}^{16} \\ \\ \text{OBu}^t \\ \\ \text{Z}-\text{Glu}-\text{Phe}-\text{OBu}^t \text{ III} \\ \\ \text{OBu}^t \end{array}$	H ₂ /Pd(C) 96% EtOH	100%
$\begin{array}{c} \text{H}-\text{Glu}-\text{Phe}-\text{OBu}^t \text{ IV} \\ \\ \text{OBu}^t \\ \\ \text{Z}-\text{Leu}-\text{Glu}-\text{Phe}-\text{OBu}^t \text{ V} \\ \\ \text{OBu}^t \end{array}$	EtOAc	92%
$\begin{array}{c} \text{AcOH, H} \\ \\ \text{Z}-\text{Leu}-\text{Glu}-\text{Phe}-\text{OBu}^t \text{ VI}^{17} \\ \\ \text{OBu}^t \end{array}$	H ₂ /Pd(C) 80% AcOH	100%
$\begin{array}{c} \text{OBu}^t \\ \\ \text{Z}-\text{Pro}-\text{Leu}-\text{Glu}-\text{Phe}-\text{OBu}^t \text{ VII} \\ \\ \text{OBu}^t \end{array}$	EtOAc	93,5%
$\begin{array}{c} \text{H}-\text{Pro}-\text{Leu}-\text{Glu}-\text{Phe}-\text{OBu}^t \text{ VIII} \\ \\ \text{OBu}^t \end{array}$	H ₂ /Pd(C) 80% AcOH; K ₂ CO ₃	93,3%
$\begin{array}{c} \text{Z}-\text{Phe}-\text{Pro}-\text{Leu}-\text{Glu}-\text{Phe}-\text{OBu}^t \text{ IX} \\ \\ \text{OBu}^t \end{array}$	DMF	100%
$\begin{array}{c} \text{AcOH, H} \\ \\ \text{Z}-\text{Phe}-\text{Pro}-\text{Leu}-\text{Glu}-\text{Phe}-\text{OBu}^t \text{ X} \\ \\ \text{OBu}^t \end{array}$	H ₂ /Pd(C) 80% AcOH	96,5%

16) G. W. ANDERSON & F. M. CALLAGHAN, J. Amer. chem. Soc. 82, 3359 (1960); Methode: E. TASCHNER u. Mitarb., Liebigs Ann. Chem. 646, 123 (1961).

Aktiver Ester	Nr.	Bedingungen	Ausbeute
OBu' $\text{Z}-\text{Glu}-\text{ON}\phi$ 33	$\text{Z}-\text{Ala}-\text{Phe}-\text{Pro}-\text{Leu}-\text{Glu}-\text{Phe}-\text{OBu}'$ XI	EtOAc	97%
	$\text{AcOH}, \text{H}-\text{Ala}-\text{Phe}-\text{Pro}-\text{Leu}-\text{Glu}-\text{Phe}-\text{OBu}'$ XII	$\text{H}_2/\text{Pd}(\text{C})$ 80% AcOH	96%
	$\text{Z}-\text{Glu}-\text{Ala}-\text{Phe}-\text{Pro}-\text{Leu}-\text{Glu}-\text{Phe}-\text{OBu}'$ XIII	EtOAc NEt_3	71%
$\text{Z}-\text{Ala}-\text{ON}\phi$ 32	$\text{AcOH}, \text{H}-\text{Glu}-\text{Ala}-\text{Phe}-\text{Pro}-\text{Leu}-\text{Glu}-\text{Phe}-\text{OBu}'$ XIV	$\text{H}_2/\text{Pd}(\text{C})$ 80% AcOH	100%
	$\text{Z}-\text{Ala}-\text{Glu}-\text{Ala}-\text{Phe}-\text{Pro}-\text{Leu}-\text{Glu}-\text{Phe}-\text{OBu}'$ XV	DMF	97%
$\text{Z}-\text{Leu}-\text{ON}\phi$ 31	$\text{AcOH}, \text{H}-\text{Ala}-\text{Glu}-\text{Ala}-\text{Phe}-\text{Pro}-\text{Leu}-\text{Glu}-\text{Phe}-\text{OBu}'$ XVI	$\text{H}_2/\text{Pd}(\text{C})$ 80% AcOH	100%
	$\text{Z}-\text{Leu}-\text{Ala}-\text{Glu}-\text{Ala}-\text{Phe}-\text{Pro}-\text{Leu}-\text{Glu}-\text{Phe}-\text{OBu}'$ XVII	EtOAc <i>t</i> -BuOH	85%
NH_2 $\text{Z}-\text{Glu}-\text{ON}\phi$ 30	$\text{AcOH}, \text{H}-\text{Leu}-\text{Ala}-\text{Glu}-\text{Ala}-\text{Phe}-\text{Pro}-\text{Leu}-\text{Glu}-\text{Phe}-\text{OBu}'$ XVIII	$\text{H}_2/\text{Pd}(\text{C})$ 80% AcOH (1:30)	100%
	$\text{Z}-\text{Glu}-\text{Leu}-\text{Ala}-\text{Glu}-\text{Ala}-\text{Phe}-\text{Pro}-\text{Leu}-\text{Glu}-\text{Phe}-\text{OBu}'$ XIX	DMF	80,5%
OBu' $\text{Z}-\text{Asp}-\text{ON}\phi$ 29	$\text{HCl}, \text{H}-\text{Glu}-\text{Leu}-\text{Ala}-\text{Glu}-\text{Ala}-\text{Phe}-\text{Pro}-\text{Leu}-\text{Glu}-\text{Phe}-\text{OBu}'$ XX	$\text{H}_2/\text{Pd}(\text{C})$ DMF/1,0 <i>N</i> HCl	100%

Aktiver Ester	Nr.	Bedingungen	Ausbeute
Z- $\begin{array}{c} \text{OBu}^t \\ \\ \text{Glu} \\ \\ \text{ONp} \end{array}$ 28	XXI	DMF Et ₃ N	99,5%
Z- $\begin{array}{c} \text{OBu}^t \text{NH}_2 \\ \\ \text{Asp-Glu-Leu-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe} \\ \\ \text{OBu}^t \end{array}$	XXII	H ₂ /Pd(C) 80% AcOH	100%
Z- $\begin{array}{c} \text{OBu}^t \\ \\ \text{Glu-Asp-Glu-Leu-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe} \\ \\ \text{OBu}^t \end{array}$ 27	XXIII	DMF	61%
Z- $\begin{array}{c} \text{OBu}^t \\ \\ \text{Ala} \\ \\ \text{ONp} \end{array}$	XXIV	H ₂ /Pd(C) 80% AcOH	100%
Z- $\begin{array}{c} \text{OBu}^t \\ \\ \text{Gly} \\ \\ \text{ONp} \end{array}$ 26	XXV	DMF	78%
Z- $\begin{array}{c} \text{OBu}^t \\ \\ \text{Asp} \\ \\ \text{ONp} \end{array}$ 25	XXVI	H ₂ /Pd(C) 80% AcOH (1:50)	92%
Z- $\begin{array}{c} \text{OBu}^t \\ \\ \text{Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Leu-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe} \\ \\ \text{OBu}^t \end{array}$	XXVII	DMF	79,5%
Z- $\begin{array}{c} \text{OBu}^t \\ \\ \text{Asp} \\ \\ \text{ONp} \end{array}$ 25	XXVIII	H ₂ /Pd(C) 80% AcOH (1:50)	100%
Z- $\begin{array}{c} \text{OBu}^t \\ \\ \text{Asp-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Leu-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe} \\ \\ \text{OBu}^t \end{array}$	XXIX	DMF	68,5%
Z- $\begin{array}{c} \text{OBu}^t \\ \\ \text{Asp-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Leu-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe} \\ \\ \text{OBu}^t \end{array}$	XXX	H ₂ /Pd(C) 80% AcOH (1:250)	100%
			Total ≈ 6,85%

1 g II (MG 217) ergibt theoretisch 9,5 g XXV (MG 2048); praktisch 0,65 g XXV (ohne Verluste bei Vorversuchen etc.)

Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- γ -*t*-butylester¹³⁾ wurde mittels Dicyclohexylcarbodiimid in Chloroform mit Phenylalanin-*t*-butylester¹⁴⁾ kondensiert; die Hydrierung von 44,2 g des kristallisierten Dipeptid-Derivates III in 800 ml Feinsprit (6 g 10-proz. Palladium-Kohle) ergab den Dipeptid-diester IV als freie Base. Dieser (730 mg) wurde direkt mit 1,1 Äquivalenten (740 mg) Carbobenzoxy-L-leucin-*p*-nitrophenylester in 3 ml Essigester umgesetzt, wobei das *Tripeptidderivat V* auskristallisierte. 23,4 g V wurden in 600 ml 80-proz. Essigsäure mit 2,5 g Pd-C hydriert; das entstehende ölige Acetat (VI) wurde als solches weiterverwendet, nachdem festgestellt worden war, dass es sich quantitativ in das kristallisierte Hydrochlorid (VIa) überführen liess. Kondensation von VI (20,7 g) mit Carbobenzoxy-L-prolin-*p*-nitrophenylester (15,8 g) in 90 ml Essigester (18 Std. bei 20°) lieferte das kristallisierte *Tetrapeptidderivat VII*, welches (22 g) in 600 ml 80-proz. Essigsäure mit Wasserstoff und 2,5 g 10% Pd-C in den kristallisierten *Tetrapeptiddiester VIII* (19,5 g) übergeführt wurde. Dieses (16,8 g) wurde mit 1,2 Äquiv. Carbobenzoxy-L-phenylalanin-*p*-nitrophenylester (13,8 g) in 32 ml abs. Dimethylformamid in quant. Ausbeute zum amorphen *Carbobenzoxy-pentapeptidderivat IX* (25 g) kondensiert (15 Std., 20°).

Hydrierung (25 g IX, 2,6 g Pd-C, 700 ml 80-proz. Essigsäure) ergab das *Acetat X*, welches durch Ausschütteln seiner Lösung in Essigester mit wenig Wasser vollständig von einer Spur einer dünn-schichtchromatographisch feststellbaren Verunreinigung abgetrennt werden konnte. Die Kondensation von X (21,75 g) mit 10 g aktivem Ester 34 in 40 ml Essigester ergab *Carbobenzoxy-hexapeptidderivat XI*, welches durch Lösen in Essigester, Versetzen mit gleichviel Äther und Eintropfen in Petroläther fest und chromatographisch rein gewonnen werden konnte (24,85 g).

Die Hydrierung (22,85 g XI, 2,3 g Pd-C, 680 ml 80-proz. Essigsäure) lieferte in normaler Weise chromatographisch reines, mit aktivem Ester 33 umsetzbares *Hexapeptid-acetat XII*. Wurde dagegen in neutraler Lösung hydriert oder das reine XII (2,4 mg) mit 2,4 mg Pd-C und 2 μ l Triäthylamin in 48 μ l Methanol 1 Std. bei 60° aufbewahrt, entstanden grosse Mengen eines Nebenproduktes mit kleinerem Rf-Wert (0,15–0,2, System 7, DS), welches nicht mit aktivem Ester 33 reagiert, sich aber ohne weiteres in das ursprüngliche XII zurückverwandeln lässt (Behandeln mit HCl bis zum scheinbaren pH von 4,3 in 60-proz. Methylcellulose)¹⁵⁾. Nun wird wie bei XII (18 g XII, 12,4 g Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- α -*p*-nitrophenyl- β -*t*-butylester, 26 ml abs. Essigester) das kristallisierte *Carbobenzoxy-heptapeptidderivat XIII* in guter Ausbeute gewonnen.

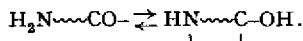
Die Hydrierung von XIII (17,5 g XIII, 530 ml 80-proz. Essigsäure, 1,8 g Pd-C), dessen RÖNTGEN-Pulverdiagramm auf vollständige Kristallinität hinweist, lieferte amorphes, chromatographisch einheitliches *Heptapeptidacetat XIV*, welches (16,5 g) mit 1,27 Äquiv. Carbobenzoxy-L-alanin-*p*-nitrophenylester (6,65 g) in 19 ml Dimethylformamid zum ebenfalls amorphen *Carbobenzoxy-octapeptidderivat XV* kondensiert wurde.

Bei dieser Kondensation erstarrte die Mischung gallertig; nach 18 Std. bei 20° wurde mit Äther verdünnt und verrieben, das feste Produkt abgenutscht und mit Äther-Essigester (2:1) gewaschen. 11,8 g XV wurden in 350 ml 80-proz. Essigsäure hydriert (1,2 g Pd-C); das entstandene *Octapeptidderivat-acetat XVI* erwies sich dünn-schichtchromatographisch als rein. Seine Kondensation mit Carbobenzoxy-L-leucin-*p*-nitrophenylester (1,35 Äquiv. = 5 g, plus 11,2 g XVI in 21 ml Essigester + 4 ml *t*-Butanol, 18 Std. bei 50°, Eintropfen in Äther) lieferte reines, amorphes *Carbobenzoxy-nonapeptidderivat XVII*, welches zu amorphem *Acetat XVIII* hydriert wurde (10,9 g XVII, 2 g Pd-C, 330 ml 80-proz. Essigsäure). Hier liegt der erste Fall vor, wo die Hydrierung in konzentrierter Lösung (z. B. 1:10) nicht mehr gelingt. Die Aminosäureanalyse und das Dünn-schichtchromatogramm wiesen auf eine einheitliche Verbindung mit der richtigen Primärstruktur hin (Tab. I).

¹³⁾ Für Literaturangaben betreffend einfachere Aminosäurederivate vgl. frühere Arbeiten aus unserem Kreise (z. B. [10]) sowie das Handbuch von GREENSTEIN (zitiert in [10]).

¹⁴⁾ Durch Hydrierung von nach TASCHNER [31] dargestelltem und mit L-Aminosäureoxydase auf optische Reinheit geprüftem Carbobenzoxy-L-phenylalanin-*t*-butylester.

¹⁵⁾ Ein ähnliches Verhalten haben wir bisher nur in einem Falle, und zwar ebenfalls bei einem Hexapeptid-Ester, dem H-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OCH₃, beobachtet. Es stellt sich die Frage, ob man es mit einer Ring-Ketten-Isomerie zu tun habe, zu der die α -Aminogruppe eines Hexapeptides aus sterischen Gründen besonders befähigt wäre, z. B.



Kristallisiert konnte die nächste Stufe, das Carbobenzoxydecapeptidderivat XIX, gewonnen werden (10,66 g XVIII und 4,4 g Carbobenzoxy-L-glutamin-*p*-nitrophenylester in 47 ml Dimethylformamid). Die Reaktionsmischung wurde 2 Tage lang bei 60° und dann 2 Tage lang bei 20° geschüttelt, wobei das Produkt langsam auskristallisierte (um gute und quantitative Kristallisation zu bekommen, ist das Einhalten dieser Bedingungen wichtig). Einige der 8 verschiedenen Ansätze enthielten Spuren von Verunreinigungen, die aber leicht durch Umkristallisieren aus heissem Methanol-H₂O (250 ml:180 ml) entfernt werden konnten (Ausbeute auf umkrist. Substanz ber., Analyse: Tab. I). Die Hydrierung erfolgte wiederum in 1:30 Verdünnung (9,6 g XIX, 2 g Pd-C) in 300 ml abs. Dimethylformamid, denen 6,55 ml 1,0*x* HCl zugesetzt worden waren. Dieser Zusatz bewirkt vollständige Protonierung der freigesetzten α -Aminogruppe, wodurch die intramolekulare Zyklisierung des N-terminalen Glutaminrestes zum Reste der Pyroglutaminsäure verhindert wird (die in essigsaurer Lösung schnell vorstatten geht).

Die Kondensation des *Hydrochlorids* XX (8,95 g) mit Carbobenzoxy-L-asparaginsäure- α -*p*-nitrophenyl- β -*t*-butylester (1,4 Äquiv., 4,07 g) erfolgte während 18 Std. bei 50° unter Schütteln in 30 ml Dimethylformamid unter Zusatz von 0,905 ml Triäthylamin. Das Produkt XXI wurde mit Äther ausgefällt und aus viel heissem Methanol unter Verdünnen mit heissem Wasser auf ca. 60% Methanolgehalt (Abkühlen im Dewargefäß) umgelöst. Die Hydrierung wurde wie üblich in 80-proz. Essigsäure (300 ml, 9,8 g XX, 2 g Pd-C) ausgeführt. Eine Spur einer Verunreinigung wurde durch Lösen in 250 ml *n*-Butanol + 50 ml Wasser und 3maligem Waschen mit Wasser entfernt: das *Undecapeptidderivat* XXII (mit freier α -Aminogruppe) verblieb als reines Acetat in der Butanol-Phase.

9,6 g dieses Produktes wurden mit Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- α -*p*-nitrophenyl- γ -*t*-butylester (4,12 g) in 25 ml feuchtem Dimethylformamid 18 Std. bei 50° kondensiert. Die Lösung wurde sodann in 1200 ml Äther eingetroppt, der Ndg. in 400 ml siedendem Methanol gelöst, mit 400 ml heissem Wasser versetzt und wie üblich sehr langsam auf 0° gekühlt. Dreimalige Wiederholung des UmlöSENS führte zum chromatographisch reinen *Dodecapeptidderivat* XXIII (Ausbeute 61%), welches durch Hydrierung (6,8 g XXIII, 250 ml 80-proz. Essigsäure, 1,5 g Pd-C) ebenfalls reines *Acetat* XXIV ergab.

Dessen Kondensation mit Carbobenzoxy-L-alanin-*p*-nitrophenylester führte zu analysenreinem, kristallisiertem *Tridecapeptidderivat* XXV (6,65 g XXIV, 27 ml Dimethylformamid, 2,11 g aktiver Ester 27; Kond. 18 Std. bei 50°; Krist. aus heissem Methanol mit Zugabe von ca. 25% heissem Wasser). Zur Hydrierung von XXV musste bereits in Verdünnungen von 1:50 gearbeitet werden; das Produkt XXVI (Acetat) wurde in *n*-Butanol-Essigester 1:1 aufgenommen und mit Wasser, dem etwas Ammoniacetats zugesetzt worden war, gewaschen. Der Rückstand der organischen Phase bestand aus reinem, amorphen XXVI. Zur Kontrolle, ob Trifluoressigsäure-Spaltung der *t*-Butoxycarbonyl- und *t*-Butylester-Gruppen eventuell die γ -Amidgruppe des Glutaminrestes Nr. 30 in Mitleidenschaft ziehe, wurden 6,2 mg (3,4 μ Mol) XXVI in 0,6 ml Trifluoressigsäure bei 20° während ca. 30 Min. aufbewahrt und im Rückstand der Ammoniak auf dem autom. Aminosäuren-Analysator bestimmt: gef. 0,05 NH₃, ber. 1,00.

Zur Kontrolle wurde eine Probe mit konzentrierter HCl während 12 Std. auf 50° erhitzt: gef. 1,04 NH₃, ber. 1,00. Unter den üblichen Bedingungen, welche zur Entfernung der Schutzgruppen ausreichend sind, wird die Säureamidgruppe also nicht gespalten.

4,65 g Acetat XXVI wurden nun zusammen mit 1,44 g Carbobenzoxy-glycin-*p*-nitrophenylester während 18 Std. bei 50° in 24 ml abs. Dimethylformamid geschüttelt und die Lösung in 300 ml Wasser eingetroppt. Das feste *Tetradecapeptidderivat* XXVII wurde mit Wasser und Äther gewaschen und aus 220 ml siedendem Methanol mit heissem Wasser (110 ml, bis zur Trübung zugefügt) umgelöst. Die Hydrierung zum *Tetradecapeptid-acetat* XXVIII gelang in einer Verdünnung von 1:50 in 80-proz. Essigsäure mit 20 Gewichtsprozent Pd-C (10-prozentig).

Die Kondensation zum vollständig geschützten *Pentadecapeptid* XXIX wurde mit einem 60-proz. Überschuss von Carbobenzoxy-L-asparaginsäure- α -*p*-nitrophenyl- β -*t*-butylester in abs. Dimethylformamid bei 50° ausgeführt. Das Produkt, welches durch Eintropfen der Reaktionslösung in die 20fache Menge Wasser isoliert worden war, wurde durch Umlösen aus der 50fachen Menge heissen Methanols unter Zusatz von 26%, heissem Wasser gereinigt. Hydrierung in 80-proz. Essigsäure (Verdünnung 1:250) führte zum reinen geschützten *Pentadecapeptid* XXX mit freier α -Aminogruppe.

Tabelle I. Einige Eigenschaften der Zwischenprodukte der Synthese des geschützten β -Corticotropin-(25-39)-pentadecapeptides (X,XX)

Nr.	Zahl AS-Reste	Aggregatzustand	Elementarformel (Ber.)	M.-Gew.	Analyse		Dünnschichtchromatogramm					
					Elementarformel	Aminosäuren	Mat.	System	Rf	Nachw.	Menge	
III	2	krist.	$C_{30}H_{40}O_7N_2$	540,64	Ber. C 66,64 Gef. „ 66,86	H 7,38 „ 7,46	N 5,15% „ 5,15%	DS	2	0,77	JRH	20 γ
IV	2	Öl	$C_{32}H_{34}O_6N_2$	406,5				DS	2	0,62	JRH	20 γ
V	3	krist.	$C_{36}H_{51}O_8N_3$	653,79	Ber. C 66,13 Gef. „ 66,38	H 7,86 „ 8,07	N 6,43% „ 6,47%	DS	2	0,78	JRH	20 γ
VIa	3	krist.	$C_{28}H_{35}O_8N_3 \cdot HCl$	556,14	Ber. C 60,47 Gef. „ 60,17	H 8,34 „ 8,26	Cl-6,37% „ 6,41%	DS	2	0,5	JRH	20 γ
VII	4	krist.	$C_{41}H_{55}O_9N_4$	750,93	Ber. C 65,58 Gef. „ 65,33	H 7,79 „ 7,96	N 7,46% „ 7,22%	DS	2	0,65	JRH, NE	20 γ 60 γ
VIII	4	krist.	$C_{33}H_{52}O_7N_4$	616,78	Ber. C 64,26 Gef. „ 64,17	H 8,50 „ 8,51	N 9,08% „ 9,37%	DS	7	0,37	JRH	20 γ
IX	5	glasig	$C_{50}H_{67}O_{10}N_5$	898,1				DS	2	0,7	JRH	20 γ
X	5	glasig	$C_{42}H_{61}O_8N_5 \cdot CH_3COOH$	824,0				DS	7	0,86		
XI	6	fest	$C_{53}H_{72}O_{11}N_6$	969,2				DS	2	0,07	JRH	20 γ
XII	6	glasig	$C_{45}H_{66}O_9N_6 \cdot CH_3COOH$	895,11				DS	7	0,45	JRH, NE	20 γ 40 γ

XIII	7	krist.	$C_{62}H_{87}O_{14}N_7$	1154,41	Ber. C 64,51 Gef. „ 64,61	H 7,60 „ 7,79	N 8,49% „ 8,54%	DS	2 6 7	0,35 0,63 0,85	JRH	20 γ
XIV	7	glasig	$C_{34}H_{81}O_{12}N_7 \cdot CH_3COOH$	1080,35				DS	6 7 3 10	0,15 0,63 0,30 0,80	JRH, NE	20 γ 40 γ
XV	8	fest	$C_{63}H_{92}O_{15}N_8$	1225,8				DS	2 6 7	0,24 0,50 0,80	JRH, NE	30 γ 60 γ
XVI	8	fest	$C_{97}H_{186}O_{13}N_8 \cdot CH_3COOH$	1151,3				DS	7 10	0,3 0,73	JRH, NE	30 γ 60 γ
XVII	9	fest	$C_{71}H_{103}O_{16}N_9$	1338,6				DS	6 7 3	0,38 0,57 0,55	JRH, NE	30 γ 60 γ
XVIII	9	fest	$C_{60}H_{97}O_{14}N_9 \cdot CH_3COOH$	1264,5	Glu 2,00; Pro 1,18; Ala 2,02; Leu 2,04; Phe 2,08			DS	7 3 4	0,38 0,14 0,4	JRH, NE	30 γ 60 γ
XIX	10	krist.	$C_{76}H_{111}O_{18}N_{11}$	1466,78	Ber. C 62,23 Gef. „ 62,08	H 7,63 „ 7,68	N 10,50% „ 10,53%	DS	7 10	0,46 0,9	JRH, NE	30 γ 60 γ
XX	10	fest	$C_{66}H_{105}O_{18}N_{11} \cdot HCl$	1369				DS	7 10 9	0,1 0,55 0,4	JRH, NE	30 γ 60 γ
XXI	11	fest	$C_{84}H_{123}O_{21}N_{12}$	1638				DS	7 3	0,5 0,2	JRH, NE	30 γ 60 γ
XXII	11	fest	$C_{76}H_{113}O_{19}N_{12} \cdot CH_3COOH$	1564				DS	7 10	0,2 0,7	JRH, NE	20 γ 40 γ
XXIII	12	fest	$C_{93}H_{128}O_{24}N_{13}$	1823,2				DS	7 4	0,63 0,55	JRH, NE	20 γ 40 γ

Tabelle I (Schluss)

Nr.	Zahl AS-Reste	Aggregatzustand	Elementarformel (Ber.)	M.-Gew.	Analyse Elementar-; Aminosäuren	Dünnschichtchromatogramm				
						Mat.	System	Rf	Nachw.	Menge
XXIV	12	fest	$C_{98}H_{132}O_{22}N_{12}CH_3COOH$	1749		DS	7	0,23	JRH,	20 γ
							8	0,65	NE	40 γ
							5	0,55		
XXV	13	krist.	$C_{98}H_{144}O_{25}N_{14}$	1894,28	Ber. C 60,87 H 7,66 N 10,35% Gef. „ 60,37 „ 7,48 „ 10,53%	DS	7	0,5	JRH,	30 γ
									NE	60 γ
XXVI	13	fest	$C_{98}H_{144}O_{25}N_{14} \cdot H_2O$	1912,28	Ber. „ 60,50 „ 7,76% Ber. „ 60,32 „ 7,69 „ 10,25%	DS	8	0,45	JRH,	30 γ
				1820					NE	60 γ
XXVII	14	fest	$C_{98}H_{147}O_{26}N_{15}$	1951,3		DS	7	0,23	JRH,	30 γ
							8	0,55	NE	60 γ
XXVIII	14	glässig	$C_{90}H_{141}O_{24}N_{16}CH_3COOH$	1877		DS	10	0,34	JRH,	30 γ
							8	0,17	NE	60 γ
							11	0,38		
XXIX	15	fest	$C_{108}H_{140}O_{30}N_{16}$	2122,5		DS	7	0,35	JRH,	20 γ
							8	0,65	NE	40 γ
XXX	15	fest	$C_{98}H_{154}O_{27}N_{16}CH_3COOH$	2048	Ala 2,79 (3); Asp 1,95 (2); Glu 1,0 (1); Glu 2,79 (3); Gly 1,0 (1); Leu 1,98 (2); Phe 1,1 (1); Pro 1,0 (1).	DS	8	0,43	JRH,	20 γ

Lösungsmittelsysteme für Dünnschichtchromatographie:

1	$CHCl_3$ (80), Aceton (20)	4	$CHCl_3$ (30), Aceton (70)	7	$CHCl_3$ (90), MeOH (10)	10	EtOAc (50), MeCOEt (30), HCOOH (10), H_2O (10)
2	$CHCl_3$ (70), Aceton (30)	5	$CHCl_3$ (10), Aceton (90)	8	$CHCl_3$ (85), MeOH (15)	11	EtOAc (60), Py (20), AcOH (6), H_2O (11)
3	$CHCl_3$ (50), Aceton (50)	6	$CHCl_3$ (95), MeOH (5)	9	$CHCl_3$ (80), MeOH (20)		

Tabelle II. Schmelzpunkte und spezifische Drehungen kristallisierter Zwischenprodukte der Synthese des geschützten β -Corticotropin-(25-39)-pentadeca-peptides (XXX)

Nr.	Anzahl Aminosäure-reste	Smp. °C	Krist. aus:	Spezifische Drehung bei λ m μ , [c] _D					r %, LM.		
				313	364	405	436	546		578	
III	2	131,5-132,5	Essigester-Petroläther	-	- 39,9	- 30,9	- 27,2	- 16,6	- 14,0 \pm 0,5	2, EtOH 95%	
V	3	116,5-117,5	Essigester	-	- 82,6	- 63,3	- 52,9	- 31,2	- 26,3 \pm 0,6	2, EtOH 95%	
VIa	3	Zersetzung	Essigester-Petroläther oder Methanol-Äther	+	+ 20,2	+ 10,5	+ 6,7	+ 1,5	+ 1,0	+ 0,9 \pm 0,5	2, MeOH
VII	4	152-153	Essigester-Petroläther	-	- 191,6	- 143,4	- 118,3	- 68,2	- 59,7	- 56,8 \pm 0,6	2, EtOH 95%
VIII	4	186-187	MeOH-H ₂ O	-	- 159,1	- 119,5	- 98,7	- 57,0	- 47,9 \pm 0,5	2, EtOH 95%	
XIII	7	172-173	CH ₃ CN oder Essigester								
XIX	10	235-237	MeOH-H ₂ O	-	- 321,3	- 199,3	- 122,0	- 69,7	- 61,7	- 59,0 \pm 2	0,5, AcOH 90%
XXV	13	227-228	MeOH-H ₂ O								

Synthese des β -Corticotropin-(17-24)-octapeptidderivates XXXV (Schema 3, Tab. III und Exp. Teil). – Ausgehend von Carbobenzoxy-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valyl-(N^ε-*t*-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-prolin-*t*-butylestersulfat (XXXI)¹⁸⁾ wurde durch Abspaltung aller *t*-Butylgruppen mit Trifluoressigsäure und Behandlung des α -Carobenzoxy-octapeptides (XXXII) mit *t*-Butylformazat das kristallisierte Octapeptidderivat Carbobenzoxy-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valyl-(N^ε-*t*-butoxycarbonyl)-L-lysyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-prolin-hemisulfat (XXXIII) hergestellt. Diese Verbindung besitzt nun die beiden Aminogruppen in selektiv geschützter, die α -Carboxylgruppe des Prolins²⁴ in freier, aktivierbarer Form. Um Schwierigkeiten mit der Löslichkeit und mit der Abspaltung zusätzlicher Schutzgruppen (z. B. Nitrogruppen) zu umgehen, setzten wir die Argininreste mit *ungeschützter Guanidinfunktion* ein (sie sind ja unter pH 12 mit dem Proton geschützt). Um jedoch für die weitere Synthese und vor allem für die Herstellung des gemischten Anhydrids mit Trimethyl-essigsäure günstige Verhältnisse zu schaffen, tauschten wir die Sulfationen gegen Chlorionen aus. Dies gelang durch Ionenaustausch-Chromatographie, aber erst nachdem das schwerlösliche Hemisulfat XXXIII mittels der berechneten Menge HCl aus der Form eines innern Salzes in das Hemisulfat-hydrochlorid XXXIV übergeführt worden war. Das Octapeptid-dihydrochlorid XXXV erwies sich als amorphe, aber dünnschichtchromatographisch einheitliche Verbindung.

Synthese des β -Corticotropin-(17-39)-tricosapeptidderivates XXXVIII (Schema 4, Tab. III und Exp. Teil). – Das Octapeptidderivat XXXV wurde in Dimethylformamid mit Triäthylamin und Pivaloylchlorid zum gemischten Anhydrid XXXVI (Schema 4) umgesetzt. Durch verschiedene Versuche wurde festgestellt, dass die Bildung des gemischten Anhydrids nach genau 3 Minuten bei -10°C optimal ist; wartet man länger, so vermindert sich die Ausbeute an Tricosapeptid XXXVII, und Nebenprodukte, die nur die Aminosäuren des Octapeptides enthalten, treten in störendem Masse auf. Es dürfte sich dabei um Produkte der Selbstkondensation von XXXVI handeln, z. B. um intermolekulare Ester zwischen der C-terminalen Carboxylgruppe und der phenolischen Hydroxylgruppe des Tyrosinrestes.

Der Umsatz des gemischten Anhydrids XXXVI mit dem Pentadecapeptidderivat XXX verläuft bei -10 bis -5° in Dimethylformamid. Das Produkt, welches im wesentlichen zwei Verunreinigungen, eine wasserlösliche (mit XXXV verwandt) und eine weniger wasserlösliche (XXX) enthielt, konnte mittels Gegenstromverteilung vollständig rein gewonnen werden (Figur 6). Solchermassen gereinigtes Trikosapeptid lieferte bei der katalytischen Hydrierung direkt analysenreines Trikosapeptid-triacetat XXXVIII (Tabelle III).

Synthese des β -Corticotropin-(11-37)-noncosapeptides XL (Schema 4, Tab. III, Exp. Teil). – Das Hexapeptid-hydrazid Z-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-NHNH₂¹⁹⁾ wurde ins Azid übergeführt und mit dem Tricosapeptid-triacetat XXXVIII kondensiert. Um möglichst alles Tricosapeptid umzusetzen, wurden 100 Proz. Überschuss des Azids verwendet. Nach 3 Std. Reaktionsdauer wurde das überschüssige Azid mit Cyclohexylamin umgesetzt, um seine CURTIUS'sche Umlagerung und die Bildung komplizierter Folgeprodukte zu verhindern. Das Reaktionsprodukt

¹⁸⁾ Die Überlassung dieses Produktes verdanken wir Herrn Dr. B. ISELIN in unseren Laboratorien.

¹⁹⁾ Wir verdanken dieses Zwischenprodukt Herrn Dr. W. RITTEL in unseren Laboratorien.

(XXXIX) musste durch multiplikative Verteilung gereinigt werden, dazu wurde ein ähnliches System wie für das Tricosapeptid XXXVII verwendet. Da aber XXXIX lipophiler ist als XXXVII, genügte eine 10fach verdünntere Ammoniacetat-Lösung in der Oberphase, um eine genügende Konzentration des Peptidderivates in der Unterphase zu erzielen (Fig. 7).

Das gereinigte Produkt wurde wie üblich hydriert; das entstehende Nonicosapeptid-triacetat war aber für die letzte Kondensationsstufe, die mit Dicyclohexylcarbodiimid ausgeführt werden musste, ungeeignet, da dieses Reagens natürlich auch das Acetat aktivieren und zu acetylierten Peptiden führen würde. Mittels Natriumsulfatlösung liess sich leicht ein festes, sehr reines Sesquisulfat XI herstellen, welches analysiert wurde (Tab. III). Dieses konnte nun ohne Gefahr für die Kondensation verwendet werden.

Synthese des Nonatriacontapeptidderivates XLI und seine Überführung in β -Corticotropin (Schema 4, Tab. III, Exp. Teili. - Viele Versuche ergaben, dass die besten Ausbeuten bei der Kondensation der β -Corticotropin-(1-10)-decapeptid-Einheit [27] mit dem Nonicosapeptid-derivat-sesquisulfat XI mittels Dicyclohexylcarbodiimid dann erhalten werden, wenn: 1) ein dreifacher Überschuss der Decapeptidkomponente verwendet wird, 2) zwei Drittel dieser Menge mit HCl protoniert werden (ein Drittel konkurrenziert das Nonicosapeptidderivat-sesquisulfat um dessen Proton an der α -Aminogruppe), 3) als Lösungsmittel absolutes Pyridin dient, 4) ein achtfacher Überschuss von Dicyclohexylcarbodiimid in Abständen von mehreren Stunden portionenweise zugegeben wird, 5) die Reaktion während etwa 90-100 Std. bei 50° ausgeführt wird.

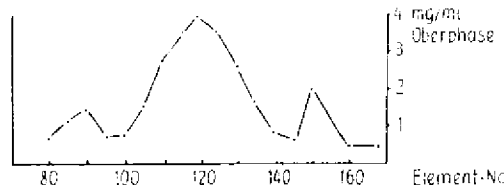


Fig. 6. Multiplikative Verteilung des geschützten β -Corticotropin-17-39-tricosapeptides XXXVII. 170 Stufen im System: CHCl_3 , CCl_4 , MeOH, 0,5M NH_4OAc , 5:5:8:2; $K_{22} = 2,3$; Elemente 105-130 enthielten reinstes XXXVII.

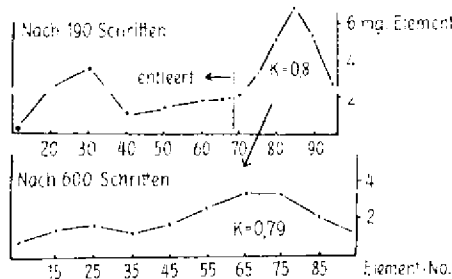


Fig. 7. Multiplikative Verteilung des geschützten β -Corticotropin-11-39-nonicosapeptides XXXIX. 190 Schritte offen, 410 Schritte im Kreislauf im System: CHCl_3 , CCl_4 , MeOH, 0,05-M NH_4OAc , 5:5:8:2; $K_{22} = 0,79$.

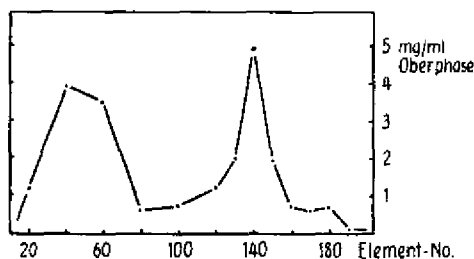


Fig. 8. Multiplikative Verteilung des rohen Nonatriacontapeptidderivates XLI. 280 Stufen im System CHCl_3 , CCl_4 , MeOH, 0,1 M Ammoniumacetat, 8:8:17:7; $K_{22} = 1,00$. 1,62 g Rohprodukt in 7 Elemente (10 ml Unterphase) eingefüllt; 412 mg (38% d. Th.) reinstes XLI in den Elementen 120–152; in den Elementen 108–119 und 153–162 86 mg (8%) verunreinigte Substanz.

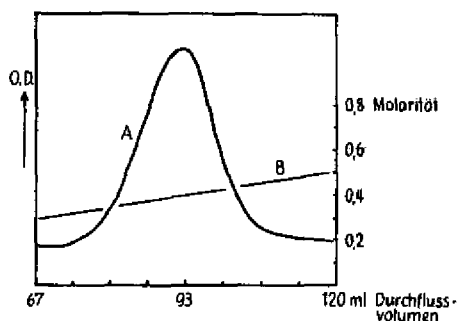


Fig. 9. Chromatographie von synth. β -Corticotropin an Carboxymethyl-Sephadex G 25. 38 mg XLI mit 2 ml CF_3COOH während 15' bei 20° behandelt und mit einem linearen Konzentrationsgradienten aus je 100 ml 0,05 M und 0,8 M Ammoniumacetat (pH = 6,5) an 1 g CM-Sephadex G 25 chromatographiert. A = Lichtabsorption (O.D.) bei 254 nm (Uvicord). B = Konzentrationsgradient.

Schema 3. Aufbau des geschützten β -Corticotropin-(17–24)-octapeptides (XXXV)

	Nr.	Bedingungen	Ausbeute
$\begin{array}{c} \text{H}_2^+ \text{H}_2^+ \quad \text{BOC} \\ \quad \quad \\ \text{Z} - \boxed{\text{Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro}} - \text{OBu}', \text{SO}_4^{-2} \end{array}$	XXXI	CF_3COOH , 1 Std. 20°	
$\begin{array}{c} \text{H}_2^+ \text{H}_2^+ \quad \text{H}_3^+ \\ \quad \quad \\ \text{Z} - \boxed{\text{Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro}} - \text{OH}, \text{SO}_4^{-2}, \text{CF}_3\text{COO}^- \end{array}$	XXXII	<i>t</i> -Butyl-formazat, DMF(5), H_2O (1), NEt_3	96%
$\begin{array}{c} \text{H}_3^+ \text{H}_3^+ \quad \text{BOC} \\ \quad \quad \\ \text{Z} - \boxed{\text{Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro}} - \text{O}^-, \frac{1}{2} \text{SO}_4^{-2} \end{array}$	XXXIII	0,1 N HCl in <i>t</i> -BuOH	92%
$\begin{array}{c} \text{H}_2^+ \text{H}_2^+ \quad \text{BOC} \\ \quad \quad \\ \text{Z} - \boxed{\text{Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro}} - \text{OH}, \frac{1}{2} \text{SO}_4^{-2}, \text{Cl}^- \end{array}$	XXXIV	Amberlite IRA-400 (Cl ⁻), <i>t</i> -BuOH, 50%	100%
$\begin{array}{c} \text{H}_2^+ \text{H}_2^- \quad \text{BOC} \\ \quad \quad \\ \text{Z} - \boxed{\text{Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro}} - \text{OH}, 2 \text{Cl}^- \end{array}$	XXXV		100%

Schemm 4. Aufß an des geschützten β -Corticosterpin-(25-39)-pentaacetylides (XXX) zum geschützten β -Corticotropin (XII).

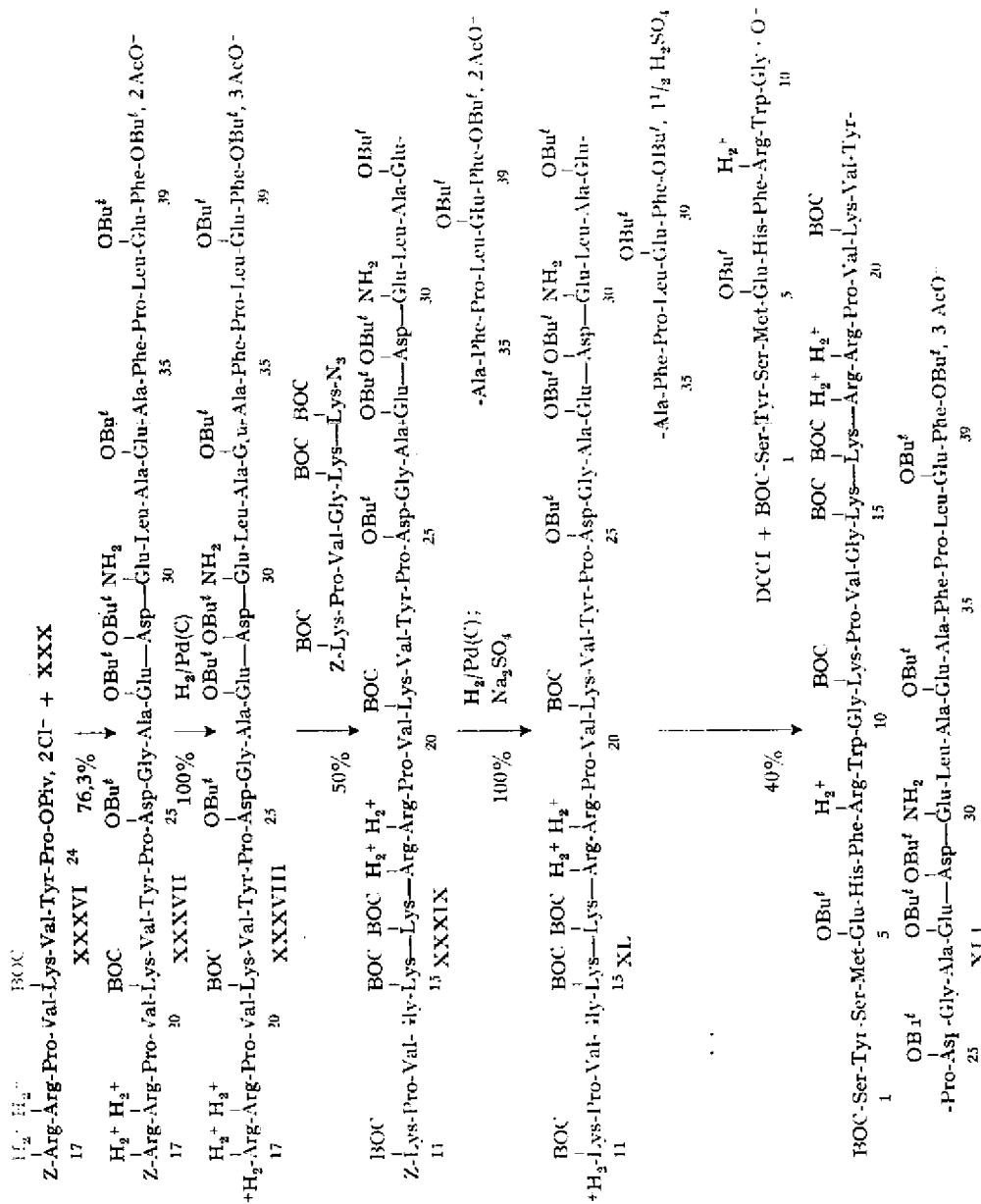


Tabelle III. Einige Eigenschaften von Zwischenprodukten der Synthese von β -Corticotropin, ausgehend von β -Corticotropin-(25-39)-pentadecapeptid

Nr.	Zahl Aggregat- AS- Reste	Aggregat- zustand	Elementarformel (Ber.)	M.-Gew.	Analyse		Dünnschichtchromatogramm				
					Elementar-	Aminosäuren	Mat.	System	Rf	Nachw.	Menge
XXXII	8	fest	$C_{33}H_{65}O_{12}N_{15}$, H_2SO_4 , F_3CCOOH	1148,4			DS	12	0,57	JRH, NE	30 γ
XXXIII	8	krist.	$C_{90}H_{93}O_{14}N_{13}$, $\frac{1}{3} H_2SO_4$	1297,5	Ber. N 16,19	S 1,24%	DS	12	0,72	JRH,	20 γ
XXXV	8	fest	$C_{90}H_{90}O_{14}N_{15}$, 2HCl	1321,5	Gef. „ 16,06	„ 1,27%	DS	13	0,55	JRH	20 γ
XXXVII	23	fest	$C_{158}H_{340}O_{40}N_{51}$, 2AcOH	3339	Alle Aminosäuren vorhanden		DS	14	0,35	JRH	20 γ
XXXVIII	23	fest	$C_{150}H_{289}O_{38}N_{51}$, 3AcOH	3264,8	Lys 1,05 (1); Arg 1,77 (2); NH_3 2,30 (1); Asp 2,12 (2); Glu 3,77 (4); Pro 3,39 (3); Gly 1,28 (1); Ala 2,85 (3); Val 2,00 (2); Leu 1,98 (2); Tyr 0,90 (1); Phe 1,96 (2)		DS	12	0,68	JRH, NE	20 γ
XXXIX	29	fest	$C_{203}H_{324}O_{63}N_{40}$, 2AcOH	4277,1			DS	14	0,53	JRH	20 γ
XL	29	fest	$C_{186}H_{318}O_{60}N_{40}$, $\frac{1}{2} H_2SO_4$	4170	Lys 3,84 (4); Arg 2,05 (2); NH_3 1,23 (1); Asp 2,18 (2); Glu 3,92 (4); Pro 4,44 (4); Gly 2,01 (2); Ala 2,99 (3); Val 3,00 (3); Leu 2,10 (2); Tyr 0,94 (1); Phe 2,01 (2)		DS	14	0,25	JRH	20 γ
XLI	39	fest	$C_{283}H_{419}O_{67}N_{56}$, S, 3 AcOH	5640,7	His 1,00 (1); Lys 4,00 (4); Arg 3,30 (3); NH_3 1,80 (1); Asp 2,14 (2); Ser 1,91 (2); Glu 5,20 (5); Pro 3,76 (4); Gly 2,87 (3); Ala 3,00 (3); Val 3,00 (3); Met 1,07 (1); Leu 1,95 (2); Tyr 2,13 (2); Phe 2,80 (3)		DA	14	0,48	JRH, Faulf	15 γ 45 γ

Lösungsmittelsysteme für Dünnschichtchromatographie:

- 12 *n*-BuOH (30), Py (20), AcOH (6), H_2O (24)
 13 *i*-PrOH (400), HCOOH (20), H_2O (100)
 14 EtOAc (60), Py (20), AcOH (6), H_2O (11)
 15 EtOAc (80), *n*-BuOH (40), Py (40), AcOH (12), H_2O (19)
 16 *n*-BuOH (100), AcOH (10), H_2O (bis gesättigt; ca. 30)

Aus dem Reaktionsprodukt liess sich die überschüssige Decapeptidkomponente infolge ihrer Schwerlöslichkeit in einem Chloroform-Methanol-Wasser-Gemisch leicht abtrennen. Das rohe, geschützte Nonatriacontapeptidderivat musste durch multiplikative Verteilung (Fig. 8) gereinigt werden (Analyse: Tab. III). Das Produkt enthielt kein Sulfoxid-Peptid (Exp. Teil).

Die Abspaltung sämtlicher Schutzgruppen liess sich durch 15minütige Einwirkung von konzentrierter Trifluoressigsäure bei Zimmertemperatur leicht bewerkstelligen. Eine nennenswerte Oxydation des Methioninschwefels zum Sulfoxid, wie etwa beim β -MSH [32], konnte nicht beobachtet werden. Bei der Ionenaustauschchromatographie (Fig. 9) und bei der Dünnschichtchromatographie verhielt sich das synthetische Nonatriacontapeptid wie eine einheitliche Substanz (weitere Charakterisierung siehe Anfang dieser Arbeit).

Experimenteller Teil

Einleitung und Anmerkungen siehe [10] auf S. 1566. Wir verdanken unsern Speziallaboratorien (Dr. W. PADOWETZ, Dr. R. NEHER und E. VON ARX) die Ausführung von Mikroanalysen, Spektren und Dünnschichtchromatogrammen.

Abkürzungen: DMF = Dimethylformamid; THF = Tetrahydrofuran; i.V. = im Vakuum (meist 10–14 Torr); u.Z. = unter Zersetzung; JRH = REINDEL-HOPPE-Reagens; NE = Ninhydrin in Essigsäure; MCS = Methylcellosolve.

Hemisulfat von Carbobenzoxy-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valyl-L-(N^t-t-butoxycarbonyl)-lysyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-prolin (XXXII). – 5 g Z-Arg-Arg-Pro-Val-Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro-OBu^t, H₂SO₄ (XXXI, C₆₄H₁₀₁O₁₄N₁₅, H₂SO₄, M.-Gew. 1402,6) wurden wie üblich in 65 ml Trifluoressigsäure gelöst und 1 Std. bei ca. 20° aufbewahrt, um die *t*-Butoxycarbonyl- und *t*-Butylestergruppen zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde i.V. verdampft; beim Verreiben mit Äther wurde der Rückstand sofort fest; 4,6 g XXXI, Carbobenzoxy-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valyl-L-lysyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-prolin-sulfat-trifluoacetat (M.-Gew. 1350, ber. für C₅₅H₈₅O₁₂N₁₅, H₂SO₄, HCl; Ausbeute 96%). Von diesem Produkt, welches dünnschichtchromatographisch fast einheitlich war (DS, Rf 12 = 0,2; 40%, JRH+, NE+), wurden 3,8 g in 25 ml DMF und 5 ml H₂O unter Zusatz von 1,4 ml *t*-Butylformazat bei 45–50° gerührt und innert 6 Std. tropfenweise mit einer Lösung von 2,1 ml NE₃ in 2,5 ml DMF versetzt. Nach weiteren 10 Std. wurden langsam 20 ml H₂O zugegeben und die Mischung kurz auf 0° gekühlt. Die Fällung wurde genutscht, 2mal mit H₂O-MeOH (9:11) und 3mal mit H₂O gewaschen und bei 60° i.V. getrocknet; 3,0 g (92%). Das Material XXXIII wurde in 18 ml MeOH + 3 ml H₂O bei Siedehitze gelöst, bei 60° mit 15 ml H₂O versetzt und sehr langsam (im Dewargefäss) auf 20° abkühlen gelassen. Waschen mit MeOH-H₂O (2:8) und Wasser. Es wurden 2,54 g des Materials in kristallisierter Form wiedergewonnen: DS einheitlich, Rf 12 = 0,72; Rf 13 = 0,55 20%, JRH+, NE-. Zur Analyse wurde eine Probe aus 50-proz. THF unkristallisiert und 2 Std. bei 100°/0,005 Torr getrocknet; Smp. 238° u.Z.

C₆₆H₉₃O₁₄N₅, 1/2 H₂SO₄ (1297,5) Ber. N 16,19 S 1,24% Gef. N 16,06 S 1,27%

Dihydrochlorid von Carbobenzoxy-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valyl-L-(N^t-t-butoxycarbonyl)-valyl-L-tyrosyl-L-prolin (XXXV). – Die Verbindung XXXIII erwies sich für Kondensationsreaktionen als zu unloslich; mit überschüssiger Salzsäure (bis pH = 2,1) kann sie in *t*-BuOH gelöst werden. Sie bleibt in Lösung auch nach Zugabe von soviel Lauge, wie nötig ist, um die Salzsäuremenge auf 1 Äquivalent zu reduzieren; 1,11 g XXXIII wurden in 25 ml *t*-BuOH suspendiert und unter Rühren und Zerreiben langsam mit 10,6 ml 0,1 N HCl versetzt, wobei die Verbindung gelöst wurde (End-pH = 2,7). Nun wurden langsam 2,1 ml 0,1 N NaOH zugetropft, eine leichte Fällung mit einem Glasfilter G4 abgenutscht und das Filtrat verdampft. DS einheitlich, Rf12 = 0,72, JRH+, NE neg., also keine Abspaltung von BOC-Gruppen. Papierelektrophoretisch ebenfalls einheitlich, 15¹/₂ Std., 7 V/cm, 50-proz. AcOH, ein Fleck (Sakaguchi) bei -14,7 cm. Die Verbindung enthält noch Sulfat-Ionen und ist vermutlich XXXIV. Das Produkt kann nun mit Leichtigkeit in 50-proz. *t*-BuOH gelöst werden und mittels Amberlite IRA-400 (Cl⁻) ins sulfatfreie Dihydrochlorid (XXXV) verwandelt werden. DS einheitlich (Rf wie vorhergehende Verbindungen

XXIII und XXXIV). Potentiometrische Titration in 80-proz. MCS ergab einen Gehalt von 85% Peptid. (Rest: Lösungsmittel und NaCl.)

Diacetat von Carbobenzoxy-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valyl-L-(N^ε-t-butoxycarbonyl)-lysyl-L-valyl-L-tyrosinyl-L-prolyl-L-(β-t-butylester)-aspartyl-glycyl-L-alanyl-L-(γ-t-butylester)-glutamyl-L-(β-t-butylester)-aspartyl-L-glutaminyl-L-leucyl-L-alanyl-L-(γ-t-butylester)-glutamyl-L-alanyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-leucyl-L-(γ-t-butylester)-glutamyl-L-phenylalanin-t-butylester (XXXVII). – 640 mg Z-Arg-Arg-Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-OH, 2HCl (XXXV) wurden in 10 ml abs. DMF gelöst und, nach Abdestillieren der Hälfte des Lösungsmittels i.V. (um Wasser zu entfernen), mit 51 μl Pivaloylchlorid und 57 μl Triäthylamin bei –10° versetzt. Nach genau 3 Minuten (wartet man 10 Min., so entstehen mehr Nebenprodukte, die nur die Aminosäuren des Octapeptides enthalten) wird rasch eine trockene Lösung von 530 mg Pentadecapeptidderivat XXX in 3,5 ml DMF zugegeben. Nach 30 Min. bei –10 bis –5° wurde die Lösung in viel abs. Äther eingetrofft: 1070 mg Rohprodukt, Verteilung wie in Fig. 6 angegeben. Die Röhre 105–130 enthielten 561 mg (66,5%) dünnstichchromatographisch reinstes XXXVII. Aus den Elementen 100–105 und 130–140 konnten noch 83 mg (9,8%) schwach verunreinigtes Material gewonnen werden.

Triacetat von H-Arg-Arg-Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-Asp(OBu^t)-Gly-Ala-Glu(OBu^t)-Asp(OBu^t)-Gln-Leu-Ala-Glu(OBu^t)-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t (XXXVIII). – 1110 mg XXXVII wurden in 330 ml 80-proz. Essigsäure mit 1,5 g 10-proz. Palladium-Kohle in Gegenwart von Wasserstoff durch Schütteln bei Zimmertemperatur aushydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde das Lösungsmittel i.V. entfernt. Der Rückstand stellt das reine Tricosapeptidderivat XXXVII dar (vgl. Tab. III).

Diacetat von Z-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg-Arg-Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-Asp(OBu^t)-Gly-Ala-Glu(OBu^t)-Asp(OBu^t)-Gln-Leu-Ala-Glu(OBu^t)-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t (XXXIX). – 323 mg Z-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-NHNH₂ (294 μMol.) wurden in 3,6 abs. DMF gelöst und bei –15° zuerst mit 1,06 ml 1 N HCl (1060 μMol.), dann mit 0,353 ml 1 N NaNO₂ (353 μMol.) versetzt. Nach 10 Min. bei –7° wurde eine Lösung von 476 mg Tricosapeptid-triacetat XXXVIII (147 μMol.) in 4,5 ml DMF und 0,158 ml Triäthylamin (1140 μMol.) zugefügt. Nach 3 Std. bei 0° wurde der Überschuss des Azids mit 72 μl (600 μMol.) Cyclohexylamin zerstört, und nach einer weiteren halben Stunde wurde das Reaktionsprodukt durch Eingiessen in 200 ml Äther gefällt: 815 mg. Dieses Rohprodukt wurde nach Fig. 7 multiplikativ verteilt, zuerst über 190 Schritte, um die Hauptverunreinigungen abzutrennen, dann in Kreislauf über 410 Schritte, wobei aus den Elementen 45–74 221 mg (35,2%) sehr reines Nonicosapeptidderivat XXXIX erhalten wurden. Elemente 35–45 plus 75–85 lieferten nochmals 102 mg (16,2%) schwach verunreinigtes Material (Tab. III).

Sesquisulfat von H-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg-Arg-Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-Asp(OBu^t)-Gly-Ala-Glu(OBu^t)-Asp(OBu^t)-Gln-Leu-Ala-Glu(OBu^t)-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t (XXXIX). – 345 mg XXXIX wurden in 100 ml 80-proz. Essigsäure und 400 mg 10-proz. Palladium-Kohle aushydriert. Das Hydrierungsprodukt wurde zur Reinigung in 5 ml 90-proz. MeOH gelöst und mit 1 ml 2 N Na₂SO₄ ins Sesquisulfat übergeführt, welches als feste Substanz aus der Lösung ausfiel. Die Fällung wurde mit Wasser vervollständigt und das Produkt (XL) mit Wasser sulfatfrei gewaschen (Tab. III). Titration in 80-proz. MCS ergibt 3 Protonen/Molekel.

Triacetat von Boc-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBu^t)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg-Arg-Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-Asp(OBu^t)-Gly-Ala-Glu(OBu^t)-Asp(OBu^t)-Gln-Leu-Ala-Glu(OBu^t)-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t (XLI). – 280 mg Boc-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBu^t)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH [27] (190 μMol.) wurden in 1,2 ml abs. Pyridin suspendiert und mit 0,125 ml 1 N HCl (125 μMol.) unter Rühren versetzt. Nach 1¹/₄ Std. war eine dicke, kaum rührbare Masse entstanden. Unter Zerkleinern mit dem Spatel gab man nun 265 mg Nonicosapeptid-sesquisulfat (XL) (63,5 μMol.) und 0,2 ml abs. Pyridin zur Mischung, worauf die Masse wieder mechanisch gerührt werden konnte. Bei den vorliegenden Verhältnissen von Decapeptid, Nonicosapeptid und HCl ist zu erwarten, dass im wesentlichen Argininsseitenketten protoniert sind und die α-Carboxylgruppe des Decapeptides und die α-Aminogruppe des Nonicosapeptides hingegen teilweise unprotoniert vorliegen. Nun wurden 26 mg Dicyclohexylcarbodiimid (127 μMol.) und 0,15 ml Pyridin zugegeben und die Mischung unter Rühren auf 50° erwärmt. Nach 1, 21 und 46 Std. erfolgte die Zugabe von gleichen Mengen Dicyclohexylcarbo-

diimid und Pyridin (Total 508 μ Mol. des ersteren). Nach insgesamt 93 Std. bei 50° wurde der Ansatz zusammen mit zwei weiteren gleichen Ansätzen aufgearbeitet.

Fällen mit Äther ergab 2,2 g Rohprodukt. Dieses wurde mit einem Gemisch von CHCl_3 , MeOH und H_2O (10:10:1) 3mal extrahiert und vom Unlöslichen (nach Dünnschichtbromatogramm = Decapeptid; 343 mg) abzentrifugiert. Der lösliche Anteil, der nur noch kleine Mengen Decapeptid enthält, wurde in 7 Elemente einer automat. Verteilungsapparatur mit 10 ml Unterphase eingefüllt und, wie in Figur 8 angegeben, verteilt. Aminosäuren-Analyse siehe Tabelle III.

Oxydation einer Probe mit H_2O_2 ergab das entsprechende Sulfoxid, welches sich dünnschichtchromatographisch leicht erkennen lässt; DA 14: Rf = 0,32 (XLI = 0,48), JRH, Pauli.

Synthetisches β -Corticotropin (I). - 412 mg Nonatriacontapeptidderivat XLI wurden in 20 ml konz. Trifluoressigsäure gelöst und 15 Min. bei Z.T. stehen gelassen. Dann wurde das Lösungsmittel i.V. schnell verdampft und der Rückstand noch 2mal mit wenig Wasser gelöst und eingedampft. Nun wurde der Rückstand in 20 ml Wasser gelöst und durch eine Säule von 90 ml Amberlite IRA-400 (Acetatform) filtriert (in einigen Versuchen wurde die Lösung vorgängig des Ionenaustausches mit Thioglykolsäure (2% in H_2O) 15 Std. bei 50° unter N_2 behandelt (ohne dass sich eine wesentliche Veränderung des Endproduktes gezeigt hätte). Das Eluat wurde verdampft und getrocknet (20 Std./25°/0,001 Torr). Spuren von sehr fein verteiltem Dicyclohexylharnstoff, die manchmal bis zu dieser Stufe mitgeschleppt werden, lassen sich durch Zentrifugation in wässriger Lösung bei ca. 10000 U./Min. innert 10 Min. entfernen.

Aminosäuren-Analyse (dest. HCl, 24 Std., 110°). - His 1,07 (1) Lys 4,05 (4) Arg 3,12 (3) NH_3 2,53 (1) Asp 1,95 (2) Ser 1,46 (2) Glu 4,71 (5) Pro 3,88 (4) Gly 2,66 (3) Ala 2,77 (3) Val 3,00 (3) Met 0,99 (1) Leu 1,98 (2) Tyr 2,03 (2) Phe 3,01 (3) [Trp 0,94 (1) aus UV-Absorption, Fig. 1, berechnet].

Absolute Menge: 1,0 μ Mol. His auf 1,01 μ Mol. Peptid, M.-Gew. zu 5528,04 angenommen. $\text{C}_{314}\text{H}_{386}\text{O}_{93}\text{N}_{56}\text{S}$, 10 CH_3COOH , 20 H_2O , Formelgewicht 5528,04.

Ber. C 49,87 H 7,18 O 28,07 N 14,19% Gef. C 49,72 H 6,96 O 27,92 N 14,13%
DS 12: Rf = 0,43 (10 u. 30 %), JRH, Pauli).

SUMMARY

The synthesis of the nonatriacontapeptide β -corticotropin (porcine adrenocorticotrophic hormone, ACTH) is described in detail. This represents the first chemical synthesis of a polypeptide chain of such complexity and length. Chemical, physico-chemical and biological data prove the identity of the synthetic and the natural hormone.

A special feature of the approach (which otherwise resembles our previous syntheses of β -corticotropin-(1-24)-tetracosapeptide, of α -MSH and of β -MSH) is the synthesis of the C-terminal pentadecapeptide in a stepwise manner, beginning with the C-terminal unit and adding one amino acid (as active ester) after the other. Besides being a rapid method for the synthesis of this peptide, it offers the special advantages of excellent yields (starting with 1 g of the C-terminal unit, one obtains more than 0,6 g of the protected β -corticotropin-25-39-pentadecapeptide) and facile purification plus check of purity at each stage.

Wissenschaftliche Laboratorien der CIBA A.G., Basel
Pharmazeutische Abteilung

und

Eidg. Technische Hochschule, Zürich
Laboratorium für Molekularbiologie chemischer Richtung

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. SCHWYZER & P. SIEBER, *Nature* **199**, 172 (1963).
- [2] P. H. BELL, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 5565 (1954); R. G. SHEPHERD, K. S. HOWARD, P. H. BELL, A. R. CACCIOLA, R. G. CHILD, M. C. DAVIES, J. P. ENGLISH, B. M. FINN, J. H. MEISENHEIMER, A. W. MOYER & J. VAN DER SCHEER, *ibid.* **78**, 5051 (1956), und nachfolgende Arbeiten.
- [3] Übersicht bei: R. SCHWYZER, *Ergebnisse der Physiologie* **53**, 1 (1963).
- [4] R. SCHWYZER & P. SIEBER, *Helv.* **40**, 624 (1957).
- [5] R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* **41**, 1273 (1958).
- [6] R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* **41**, 1287 (1958).
- [7] R. SCHWYZER, A. COSTOPANAGIOTIS & P. SIEBER, *Chimia* **16**, 295 (1962); *Helv.* **46**, 870 (1963).
- [8] R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* **46**, 1975 (1963).
- [9] R. SCHWYZER, «Protides of the Biological Fluids», Ed. H. PEETERS, S. 27 (Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1961).
- [10] R. SCHWYZER & H. KAPPELER, *Helv.* **46**, 1550 (1963).
- [11] R. SCHWYZER, B. ISELIN & M. FEURER, *Chimia* **8**, 264 (1954); *Helv.* **38**, 69 (1955).
- [12] M. BODANSZKY, *Nature* **175**, 685 (1955).
- [13] R. SCHWYZER & P. SIEBER, *Angew. Chem.* **68**, 518 (1956); B. ISELINK, W. RITTEL, P. SIEBER & R. SCHWYZER, *Helv.* **40**, 374 (1957).
- [14] P. BARTHE, P. A. DESAULLES, B. SCHÄR & M. STAEHELIN, *Nature* **202**, 908 (1964).
- [15] R. S. YALOW, S. M. GLICK, J. ROTH & S. A. BERSON, *J. Clinical Endocrinol. & Metabolism* **24**, 1219 (1964).
- [16] S. J. H. ASHCROFT, A. VILLANUEVA & J.-P. FELBER, *Chimia* **18**, 283 (1964); J.-P. FELBER, 2nd Meet. Fed. Europ. Biochem. Soc., Wien, 1965, B. 8; J.-P. FELBER, A. J. MOODY, A. VILLANUEVA & A. VANOTTI, *Bull. Acad. Suisse Sci. Méd.* **27**, 261 (1965); J.-P. FELBER, in «Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung», S. 368, Bd. VI, 1965, München & Berlin, ed. FELLINGER & HÖFER; J.-P. FELBER, A. J. MOODY & A. VANOTTI, *Schweiz. med. Wschr.* **95**, 757 (1965).
- [17] D. H. SPACKMANN, W. H. STEIN & S. MOORE, *Analyt. Chemistry* **30**, 1190 (1958).
- [18] E. DE JAGER, J. D. HOMAN & D. DE WIED, *Canad. J. Biochemistry & Physiol.* **41**, 1455 (1963).
- [19] R. A. BROWN, M. DAVIES, M. ENGLERT & H. R. COX, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 5077 (1956).
- [20] B. ISELIN, M. FEURER & R. SCHWYZER, *Helv.* **38**, 1508 (1955); M. BODANSZKY & C. A. BIRKHIMER, *Chimia* **14**, 368 (1960); M. BODANSZKY, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1960**, 655; B. LIBEREK, *Tetrahedron Letters* **1963**, 925.
- [21] R. SCHWYZER, M. FEURER & B. ISELIN, *Helv.* **38**, 83 (1955).
- [22] G. G. GLENNER, P. J. McMILLAN & D. E. FOLK, *Nature* **194**, 867 (1962).
- [23] D. G. SMYTH, W. H. STEIN & S. MOORE, *J. biol. Chemistry* **238**, 227 (1963).
- [24] B. RINIKER & R. SCHWYZER, *Helv.* **44**, 658 (1961).
- [25] K. HOFMANN, R. D. WELLS, H. YAJIMA & J. ROSENTHALER, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 1546 (1963).
- [26] H. KAPPELER & R. SCHWYZER, *Helv.* **43**, 1453 (1960).
- [27] R. SCHWYZER & H. KAPPELER, *Helv.* **44**, 1991 (1961).
- [28] H. KAPPELER, *Helv.* **44**, 476 (1961).
- [29] R. B. MERRIFIELD, *Federation Proc.* **24**, 412 (1962); *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 2149 (1963); *ibid.* **86**, 304 (1964).
- [30] R. L. LETSINGER & M. J. KORNET, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 3045 (1963); R. L. LETSINGER, M. J. KORNET, V. MADADDEVAN & D. M. JERINA, *ibid.* **86**, 5163 (1964); R. L. LETSINGER & V. MADADDEVAN, *ibid.* **87**, 3526 (1965).
- [31] E. TASCHNER, J. F. BIERNAT, B. RZESZOTARSKA & C. WASIELEWSKI, *Liebigs Ann. Chem.* **646**, 123 (1961).
- [32] R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* **46**, 1975 (1963).
- [33] M. BODANSZKY & V. DU VIGNEAUD, *Nature* **183**, 1324 (1959); *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 5688 (1959).