

Methoden. – 1. *Oxydationen mit Perameisensäure.* Als Perameisensäurelösung diente eine frisch hergestellte Mischung von 0,1 ml Wasserstoffperoxid (30-proz.) und 1,9 ml Ameisensäure (98-proz.), die man vor Gebrauch 1 Std. bei 25° stehen liess. Proben von je 1 mg Peptid wurden in 150 μ l dieser Mischung gelöst, und nach 10 Min. wurden die Lösungen im Vakuum über Kaliumhydroxid getrocknet. Die glasigen Rückstände wurden in 50 μ l Wasser gelöst und lyophilisiert.

2. *Umwandlung dimerer Peptide in monomere.* Lösungen von 50 μ g Calcitonin D bzw. je 100 μ g von dessen Trypsin-Hydrolysaten in 50 μ l 1N Ammoniak wurden 1 Std. auf 45° erwärmt. Zur dünn-schichtchromatographischen und elektrophoretischen Untersuchung wurden die Proben zur Trockne gebracht und die Rückstände in 20 μ l 0,01N Essigsäure gelöst; von diesen Lösungen wurden je 3 μ l aufgetropft.

3. *Spaltung von Calcitonin M und D mit Trypsin sowie von Tr_I und Tr_{II} mit Chymotrypsin.* Lösungen von je 100 μ g Peptid in 50 μ l 0,01N Essigsäure wurden durch Zugabe von 40 μ l 0,2M Ammoniumacetatpuffer (pH = 8,3) auf pH ca. 7 gestellt. Dazu fügte man 10 μ l einer 0,02 bis 0,2-proz. wässrigen Enzymlösung (Trypsin, Lot 71871, bzw. α -Chymotrypsin, Lot 71429, CALBIOSCHEM) und inkubierte bei 38°. Nach verschiedenen Zeiten (10 Min. bis 10 Std.) wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 μ l 5N Essigsäure unterbrochen und die Lösungen im Vakuum über Kaliumhydroxid getrocknet. Die Rückstände wurden in je 20 μ l 0,01N Essigsäure gelöst und davon je 3 μ l dünn-schichtchromatographisch und elektrophoretisch untersucht.

4. *Isolierung der tryptischen Fragmente von Calcitonin M.* 50 mg Calcitonin M, das 5–10% Sulfoxid enthielt, wurden in 25 ml 0,01N Essigsäure gelöst und mit 20 ml 0,2M Ammoniumacetatpuffer (pH = 8,3) versetzt, wobei sich ein pH-Wert von ca. 7 einstellte. Dazu gab man 5 ml einer 0,04-proz. Trypsinlösung in Wasser und inkubierte die klare Lösung 2 Std. bei 38°. Zum Schluss wurde die Lösung mit 0,3 ml Eisessig angesäuert, auf ca. 2 ml konzentriert und lyophilisiert. Der Rückstand wurde zur Entfernung des Ammoniumacetates im Hochvakuum bei 45° getrocknet und anschliessend im Lösungsmittelsystem *n*-Butanol-Puffer (1:1; Puffer = 28,6 ml Eisessig + 19,3 g Ammoniumacetat, gelöst in 960 ml Wasser) in einer automatischen Apparatur mit 140 Verteilungselementen und Phasenvolumina von je 3 ml über 360 Stufen mit folgendem Ergebnis verteilt:

| | Verteilungselement Nr. | r_{max} | Verteilungskoeffizient | Menge | Reinheit |
|------------------|------------------------|-----------|------------------------|-------|----------|
| C ₂ | 0– 3 | ca. 1 | ~0 | 5 mg | ca. 90% |
| Tr _I | 38– 57 | 47 | 0,15 | 6 mg | ca. 85% |
| Tr _{II} | 93–132 | 112 | 0,45 | 17 mg | 100% |
| C ₁ | | | 1,47 | 7 mg | ca. 97% |

Währenddem die ersten 3 Verbindungen nach 360 Stufen aus den angegebenen Verteilungselementen isoliert wurden, erhielt man das lipophilste Fragment C₁ aus den zwischen 210 und 260 Verteilungsschritten aus der Apparatur austretenden Oberphasen. Die Peptide wurden nach dem Absublimieren des Puffers im Hochvakuum als amorphe, zum Teil hygroskopische Substanzen isoliert, die noch unterschiedliche Mengen Wasser und Essigsäure einschlossen. Die Fragmente C₁, C₂ und Tr_{II} wurden in dieser Form zur Sequenzanalyse eingesetzt.

5. *Bestimmung von Aminosäuresequenzen mit Citrus-Carboxypeptidase (Carboxypeptidase C) [5].* Zur Methodik vgl. [4].

Abbau des Oxydationsproduktes von C₁: 1,5 mg C₁ wurden mit Perameisensäure oxydiert und anschliessend in 350 μ l 0,1M Natriumcitratpuffer (pH 5,3) mit 150 μ l einer Carboxypeptidaselösung²⁾ inkubiert. Nach 10, 30, 60 und 300 Min. entnahmen wir je 80 μ l zur Aminosäureanalyse.

Abbau von C₂: 1 mg Peptid wurde wie oben angegeben inkubiert; die Probenahme erfolgte nach 30, 120 und 300 Min.

6. *EDMAN-Abbau* und Identifizierung der sukzessive freigelegten N-terminalen Aminosäuren als *PTH-Derivate* und *Dansyl-Derivate* wurden wie früher beschrieben [4] unter leichter Variation der Lösungsmittelvolumina ausgeführt.

²⁾ Proteolyt. Koeffizient = 2,4.

7. *Dünnschichtchromatographie und Elektrophorese.* Träger, Fließmittel, Puffer und Nachweisreaktionen wie in [2] und [4] angegeben; Laufstrecken von Tr_I und Tr_{II} vgl. [2]. Für die hier erstmals erwähnten Fragmente C_1 und C_2 wurden folgende Daten gefunden:

| | auf Alox Rf(52) | auf Cellulose Rf(45) | auf Cellulose Rf(101 A) | Elektrophorese auf Cellulose, pH 1,9 |
|--------------|--------------------|-------------------------|----------------------------|---|
| C_1 | 0,55 | 0,52 | 0,73 | – 2,6 cm |
| C_2 | 0,02 | 0,12 | 0,14 | – 6,4 cm |

Resultate und Diskussion. – *Enzymatische Spaltung von Calcitonin M.* Anhand von Vorversuchen mit Substanzmengen von je 50–100 μg , die chromatographisch, elektrophoretisch und mit Hilfe spezifischer Farbreaktionen ausgewertet wurden, erhielten wir vorerst einen Überblick über das Verhalten von Calcitonin M gegenüber Trypsin und Chymotrypsin. Trypsin führte in relativ rascher Reaktion zu den beiden ersten Fragmenten Tr_I und Tr_{II} , einem Octadeca- und einem Tetradecapeptid. Das von uns verwendete Enzym, das möglicherweise eine bei früheren Versuchen nicht beobachtete, chymotryptische aktive Verunreinigung enthielt, hydrolysierte jedoch Tr_I langsam weiter zum Dodecapeptid C_1 und dem Hexapeptid C_2 . Diese beiden Fragmente wurden nämlich bei der Inkubation von Tr_I mit Chymotrypsin in sehr rascher Reaktion gebildet. Dieses Enzym spaltete C_1 zu nicht näher identifizierten Fragmenten weiter, während C_2 stabil blieb. Das Tetradecapeptid Tr_{II} wurde erst bei höherer Chymotrypsinkonzentration langsam in ein Gemisch mehrerer, teilweise sich überlappender Komponenten gespalten. Da jedoch der EDMAN-Abbau mit Tr_{II} ohne Komplikationen bis zum C-terminalen Prolinamid führte, konnte auf eine Auftrennung und Charakterisierung dieses chymotryptischen Gemisches verzichtet werden.

Im Hauptversuch wurden 50 mg Calcitonin M mit Trypsin unter Bedingungen gespalten, die auf Grund der Vorversuche eine gute Ausbeute der Fragmente C_1 , C_2 und Tr_{II} erwarten liessen. Dieses Gemisch trennten wir durch multiplikative Verteilung in die einzelnen Komponenten, die als Ausgangsstoffe für die folgenden Sequenzanalysen dienten. Die Reinigung der Spaltprodukte wurde dadurch etwas erschwert, dass neben einem gewissen Anteil von ungespaltenem Tr_I auch bereits Spuren von Spaltprodukten aus C_1 sowie geringe Mengen von Sulfoxiden der methioninhaltigen Peptidsequenzen vorhanden waren. Das sehr hydrophile Hexapeptid C_2 wurde lediglich in einer Reinheit von ca. 90% isoliert, was jedoch für die Sequenzbestimmung dieses kleinen Fragmentes durchaus genügte.

Die Aminosäureanalysen von Tr_I und Tr_{II} teilten wir bereits in der ersten Arbeit dieser Reihe mit [2]. C_1 enthielt Asp, Thr₂, Ser, Gly₂, (Cys)₂, Met, Leu₂ und Tyr, während in C_2 der Rest von Tr_I , nämlich Lys, Asp₂, Thr, Glu und Phe gefunden wurde.

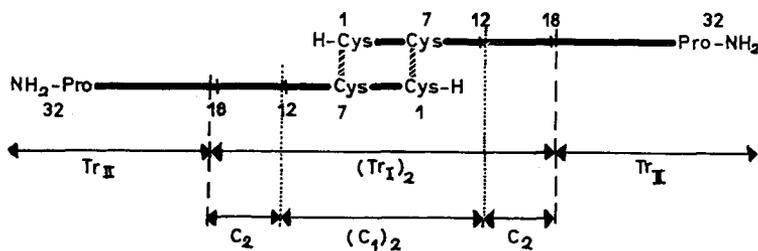
Die Reihenfolge der Fragmente Tr_I bzw. C_1 , C_2 und Tr_{II} ergab sich auf Grund der Trypsinspezifität, des Aminosäuregehaltes und der Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren zwangsläufig. Das Lysin-haltige Tr_I , welches wie das intakte Calcitonin M kein definiertes Dansyl-Aminosäurederivat lieferte, muss das N-terminale Fragment der Molekel bilden; aus den gleichen Gründen muss das Lysin-haltige C_2 das Carboxyl- und C_1 das Amino-Ende von Tr_I darstellen. Es ergab sich somit folgende Anordnung: C_1 - C_2 - Tr_{II} ; hierbei ermittelten wir Threonin und Phenylalanin als N-terminale Aminosäuren von C_2 bzw. Tr_{II} .

Sequenz des Dodecapeptides C₁. Der EDMAN-Abbau von 1,1 μ Mol C₁ selbst und seines mit Perameisensäure oxydierten Produktes (1,0 μ Mol) führten unter den analogen Voraussetzungen wie bei Tr^I des α -Thyrocalcitonins und seines Oxydationsproduktes [4] zu der im Formelbild angegebenen Sequenz 1–12. Die auch hier in Stellung 1 und 7 befindlichen Halbcystinreste waren im oxydierten C₁ als PTH- und Dansyl-cysteinsäure gut nachweisbar. Ein Abbau von C₁ selbst mit *Citrus*-Carboxypeptidase war wegen der Schwerlöslichkeit dieses Fragmentes nicht möglich. Die Sequenzanalyse gelang jedoch mit dem Perameisensäure-Oxydationsprodukt und ergab für 8–12 ebenfalls die erwähnte Reihenfolge. Das Methioninsulfon in Stellung 8 wurde nur noch sehr langsam, der Cysteinsäurerest in Stellung 7 überhaupt nicht mehr freigesetzt.

Sequenz des Hexapeptides C₂. Durch EDMAN-Abbau (1,3 μ Mol) vom Aminoende und Einwirkung von *Citrus*-Carboxypeptidase von Rest 18 her ergab sich eindeutig die Sequenz der Aminosäuren 13–18; C₂ ist dasjenige Fragment von Calcitonin M, das im Rest 15 die einzige freie Carboxylseitenkette aufweist; diese machte sich auch in der Elektrophorese von C₂ bei pH-Werten von 5 und höher deutlich bemerkbar.

Sequenz des Tetradecapeptides Tr_{II}. Hier führte allein der EDMAN-Abbau von 1,0 μ Mol in eindeutiger Weise zur Sequenz 19–32; Carboxypeptidase griff dieses Bruchstück nicht an. Das C-terminale Prolinamid wurde als Dansylderivat nachgewiesen.

Tryptische Spaltung von Calcitonin D (vgl. Fig.). Die zur tryptischen Spaltung von Calcitonin M analoge Spaltung des dimeren Calcitonin D führte zum gleichen Tetradecapeptid Tr_{II}, nicht aber zu Tr_I, sondern dessen Dimeren (Tr_I)₂. Zu Beginn der In-



Schematische Darstellung von Calcitonin D als antiparallel dimerisiertes Calcitonin M

Tr: Tryptische Bruchstücke; C: chymotryptische Bruchstücke

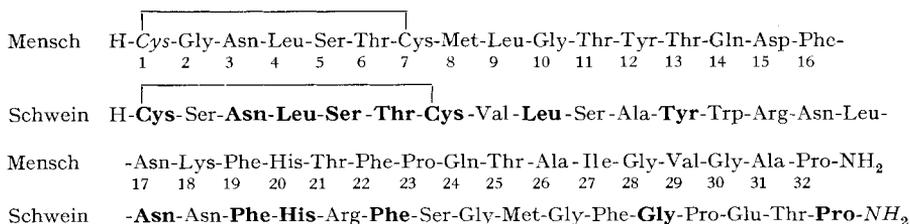
kubation trat noch ein Zwischenprodukt auf, das rasch zu (Tr_I)₂ und Tr_{II} weiter abgebaut wurde. Es dürfte sich dabei um das Peptid (1–32 + 1–18) handeln, bei dem an nur einer der beiden Ketten von Calcitonin D die Sequenz 19–32 durch Trypsin abgespalten wurde. Bei längerer Inkubationsdauer zerfiel (Tr_I)₂ langsam in das bekannte Hexapeptid C₂ und in das Dimere (C₁)₂. Die dimeren Formen Calcitonin D, (Tr_I)₂ und (C₁)₂ weisen alle in den von uns verwendeten dünnenschichtchromatographischen Systemen kleinere Rf-Werte auf als die entsprechenden monomeren Peptide Calcitonin M, Tr_I und C₁.

Aminosäuresequenz von Calcitonin D. Da die tryptischen Fragmente C₂ und Tr_{II} aus Calcitonin M mit jenen aus D identisch waren, konnte sich die Strukturaufklärung auf den Bereich der Fragmente (Tr_I)₂ bzw. (C₁)₂ beschränken. Wie wir bereits früher

zeigen konnten [1], lässt sich das dimere Calcitonin D durch *alkalische Behandlung* in das monomere Calcitonin M umwandeln. Eine analoge Basenbehandlung der oben erwähnten dimeren Fragmente $(Tr_1)_2$ und $(C_1)_2$ ergab nun ebenfalls die monomeren Formen, welche mit Tr_1 und C_1 aus Calcitonin M identisch waren. Auf diese Monomer-Dimer-Beziehung zwischen Calcitonin M und D wies bereits der Befund hin, dass *beide* Peptide mit Perameisensäure zum gleichen *Dicysteinsäure-methioninsulfon-peptid-(1-32)* oxydiert werden können [2]. Als zusätzlichen Strukturbeweis bauten wir das mit Perameisensäure oxydierte Calcitonin D nach EDMAN bis zum Aminosäurerest 16 ab; dabei ergab sich erwartungsgemäss eine mit Calcitonin M identische Sequenz.

Im Calcitonin D kann das monomere Calcitonin M parallel oder antiparallel dime­risiert sein. Nur die parallele Form sollte nach Dansylierung und saurer Hydrolyse zu Bis-dansyl-cystin führen, während letzteres aus dem antiparallelen Dimeren und aus dem Monomeren nicht entstehen kann. Unter Reaktionsbedingungen, welche im Kontrollversuch mit symmetrischen Cystinpeptiden³⁾ und einem Oxytocin-Dimeren den eindeutigen Nachweis von Bis-dansylcystin gestatteten, konnten wir im Versuch mit Calcitonin D kein Bis-dansylderivat identifizieren. Wir schliessen daraus, dass Calcitonin D als antiparalleles Dimeres vorliegt (s. Fig.). Es scheint uns bemerkenswert, dass die dimere Form die gleiche biologische Aktivität aufweist wie die monomere.

Struktureller Vergleich von menschlichem Calcitonin M und Schweine- α -Thyrocalcitonin



Die beiden im *Ratten*-Test annähernd gleich wirksamen Peptide [2] aus Mensch und Schwein weisen immerhin eine bemerkenswert ähnliche Struktur in ihren ersten 7 Aminosäureresten auf und besitzen den gleichen C-Terminus; es ist aber doch überraschend, dass von den 32 Aminosäuren nur 14 (fett gedruckt im Formelbild des α -Thyrocalcitonins) eine identische Position einnehmen, während 18 z. T. ihre Stellungen vertauscht haben oder durch andere Aminosäuren ersetzt sind. Die längste und fast einzige identische Sequenz umfasst das Pentapeptid 3–7. Bemerkenswert ist das Fehlen von zwei Argininresten und Tryptophan in Calcitonin M, welches seinerseits als neue Aminosäuren je ein Lysin und Isoleucin enthält. Damit ist auch die Anzahl der positiven Ladungen von Calcitonin M um eine Einheit geringer. Methionin, das im α -Thyrocalcitonin Stellung 25 nahe dem C-Terminus einnimmt, befindet sich in Calcitonin M unmittelbar neben der Disulfidbrücke in Stellung 8. Es mag vielleicht diesem Umstand zuzuschreiben sein, dass die Sulfoxide von Calcitonin M und D im Gegensatz zu α -Thyrocalcitoninsulfoxid praktisch unwirksam sind.

³⁾ Wir verdanken Proben dieser neuen Peptide $(\text{H-Cys-Asn-OH})_2$ und $(\text{H-Cys-Gly-Glu-OH})_2$ Herrn Dr. B. KAMBER, CIBA Aktiengesellschaft.

Der grosse strukturelle Unterschied zwischen den beiden Peptidhormonen lässt erwarten, dass sie immunologisch nicht gleichwertig sind. Diese wichtige, vorläufig noch strittige Frage [6] wird sich nun beantworten lassen, da auch Calcitonin M in genügender Menge durch Totalsynthese zugänglich geworden ist [7].

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. NEHER, B. RINIKER, R. MAIER, P. G. H. BYFIELD, T. V. GUDMUNDSSON & I. MACINTYRE, *Nature* (Lond.) (1968) im Druck.
 [2] B. RINIKER, R. NEHER, R. MAIER, F. W. KAHNT, P. G. H. BYFIELD, T. V. GUDMUNDSSON, L. GALANTE & I. MACINTYRE, *Helv. 51*, 1738 (1968).
 [3] G. V. FOSTER, I. MACINTYRE & A. G. E. PEARSE, *Nature* (Lond.) *203*, 1029 (1964); A. G. E. PEARSE, *Proc. R. Soc. B.* *164*, 478 (1966); G. BUSSOLATI & A. G. E. PEARSE, *J. Endocrinol.* *37*, 205 (1967); A. G. E. PEARSE & A. F. CARVALHEIRA, *Nature* (Lond.) *214*, 929 (1967).
 [4] R. NEHER, B. RINIKER, H. ZUBER, W. RITTEL & F. W. KAHNT, *Helv. 51*, 917 (1968).
 [5] H. ZUBER, *Nature* *201*, 613 (1964).
 [6] A. H. TASHJIAN, JR. & P. L. MUNSON, *Endocrinology* *77*, 520 (1965); L. J. DEFTOS, M. R. LEE & J. T. POTTS, JR., *Proc. nat. Acad. Sci.* *60*, 293 (1968).
 [7] P. SIEBER, M. BRUGGER, B. KAMBER, B. RINIKER & W. RITTEL, *Helv. 51*, 2057 (1968).

221. Substitution der 6-Aminopenicillansäure am Kohlenstoffatom 6

von R. Reiner und P. Zeller

Chemische Forschungsabteilung der F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co., A.G., Basel

(5. X. 68)

Summary. The hydroxyalkylation of the penicillin nucleus at C-6 with benzaldehyde and formaldehyde is reported. 6-aminopenicillanic acid (6-APA) (**2**) was used as starting material. Protection of the functional groups and activation of the C-6 position were effected by converting 6-APA successively into the Schiff base **13**, the methyl ester **14** and the copper complex **15**. The latter gave with benzaldehyde the C-6 monosubstituted complex **17**, and with formaldehyde the disubstituted complex **18**. The direct α -hydroxybenzylation of 6-APA at C-6 was also carried out with an excess of benzaldehyde at pH 7,5 leading to the SCHIFF base **19**. Mild hydrolysis of **19** gave 6-amino-6-(α -hydroxybenzyl)-penicillanic acid (**21**). Phenylacetylation of the latter yielded the penicillin G analogue **22**. Direct reaction of 6-APA with formaldehyde took place only in the presence of salicylaldehyde, giving the oxazolidine **24**, from which the amino acid **25** could not be obtained. The new compounds showed only weak antibacterial activity as compared with penicillin G.

Einführung. – Im letzten Jahrzehnt sind α -Alkyl-aminosäuren als potentielle Antimetabolite der entsprechenden nicht alkylierten Aminosäuren intensiv bearbeitet worden [1]. Die interessanten biologischen Eigenschaften solcher Substanzen gaben den Anstoss, dass wir uns mit der Synthese von (C-6)-alkylierten Penicillinen **1** befassten. Der Grundkörper der Penicilline – die 6-Aminopenicillansäure (**2**) – ist als

