

On opère avec **12** comme pour **11**. Le produit brut est recristallisé dans 5 vol. d'éthanol, ce qui donne 70% de **16**, F. 158–161°. On recristallise une fois encore et, après séchage sous vide 16 h à 80°, on obtient le [méthyl-2'- α -(diéthoxycarbonyl-2'', 2''-propano)-1' β , 2' β -éthano]-8 α , 12 α -abièteène-13-oate-18 de méthyle (**16**): F. 160–161°; $[\alpha]_D = +38^\circ$ (3,47); SM.: M^+ à 542; IR. (CCl₄): 1727, 1635; RMN. (CCl₄): 0,62 (CH₃-10), 0,93 (CH₃-2'?), 1,05 et 1,10 (2 *d*, *J* ~ 7, isopropyle), 1,12 (CH₃-4), 1,18 et 1,25 (2 *t*, *J* = 7, CO₂CH₂CH₃), 3,62 (CO₂CH₃), 4,05 et 4,12 (2 qua., 4 H, *J* = 7, CO₂CH₂CH₃), 5,30 (H-14). C₃₃H₅₀O₆ Calc. C 73,03 H 9,29% Tr. C 72,85 H 9,36%

Les spectres de RMN., IR., UV., de masse proviennent des laboratoires spécialisés de l'Institut. Les compositions centésimales ont été déterminées dans le Service Central de Microanalyse du CNRS.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] N. LANGLOIS & B. GASTAMBIDE, C. r. hebd. Séances Acad. Sci. 264, 1878 (1967).
- [2] N. LANGLOIS & B. GASTAMBIDE, Bull. Soc. chim. France 1965, 2966.
- [3] N. LANGLOIS, Thèse Etat Reims Ao – 2091, 19 mars 1968.
- [4] N. LANGLOIS & B. GASTAMBIDE, Chimia 27, 593 (1967).
- [5] D. E. A. RIVETT, J. appl. Chemistry 7, 377 (1951).
- [6] N. LOZAC'H, «Monographies de Chimie Organique», Vol. VI, p. 20. Masson, Paris 1967.
- [7] W. A. AYER & C. E. McDONALD; J. B. STOTHERS, Canad. J. Chemistry 41, 1113 (1963).
- [8] W. L. MEYER & R. W. HUFFMAN, Tetrahedron Letters 1962, 691.
- [9] R. W. HUFFMAN, Diss. Abstr. B 25, 6232 (1965).
- [10] K. TORI, Y. TAKANO & K. KITAHONOKI, Chem. Ber. 97, 2798 (1964).
- [11] L. H. ZALKOW & D. R. BRANNON, J. chem. Soc. 1964, 5497.
- [12] M. VILKAS, Bull. Soc. chim. France 1959, 1401.
- [13] S. W. CHAIKIN & W. G. BROWN, J. Amer. chem. Soc. 71, 122 (1949).
- [14] L. P. KUHN, P. VON R. SCHLEYER, W. F. BAITINGER JR. & L. EBERSON, J. Amer. chem. Soc. 86, 650 (1964).
- [15] Organic Syntheses, Coll. Vol. II, 140, 368, 382 (1959).
- [16] W. SANDERMANN & K. STRIESON, Chem. Ber. 90, 693 (1957).
- [17] Organic Syntheses, Coll. Vol. IV, 944, note 1 (1963).
- [18] D. C. AYRES & R. A. RAPHAEL, J. chem. Soc. 1958, 1779.

234. Menschliches Calcitonin. IV¹⁾. Die Synthese von Calcitonin M

Vorläufige Mitteilung²⁾

von P. Sieber, M. Brugger, B. Kamber, B. Riniker und W. Rittel

Chemische Forschungslaboratorien des Departements Pharmazentika
der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel

(12. XI. 68)

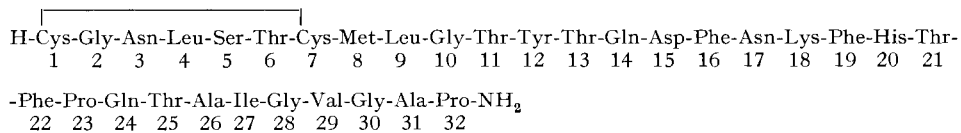
Summary. A preliminary account is given of the synthesis of calcitonin M (I), isolated from human C-cell tumour tissue [2] [3]. Identity of the synthetic and the natural hormone was established by thin-layer chromatography, thin-layer electrophoresis and conversion to oxidation products, as well as by reference to the pattern of tryptic degradation and by comparing the biological activity of the two hormones. The findings also afforded additional confirmation of the results of structural elucidation [1].

In the synthesis of I, use was made of methods described previously [4] for the preparation of porcine α -thyrocalcitonin, and also of a new method [5] which easily permits the formation of cyclic cystine peptides.

¹⁾ III: s. [1].

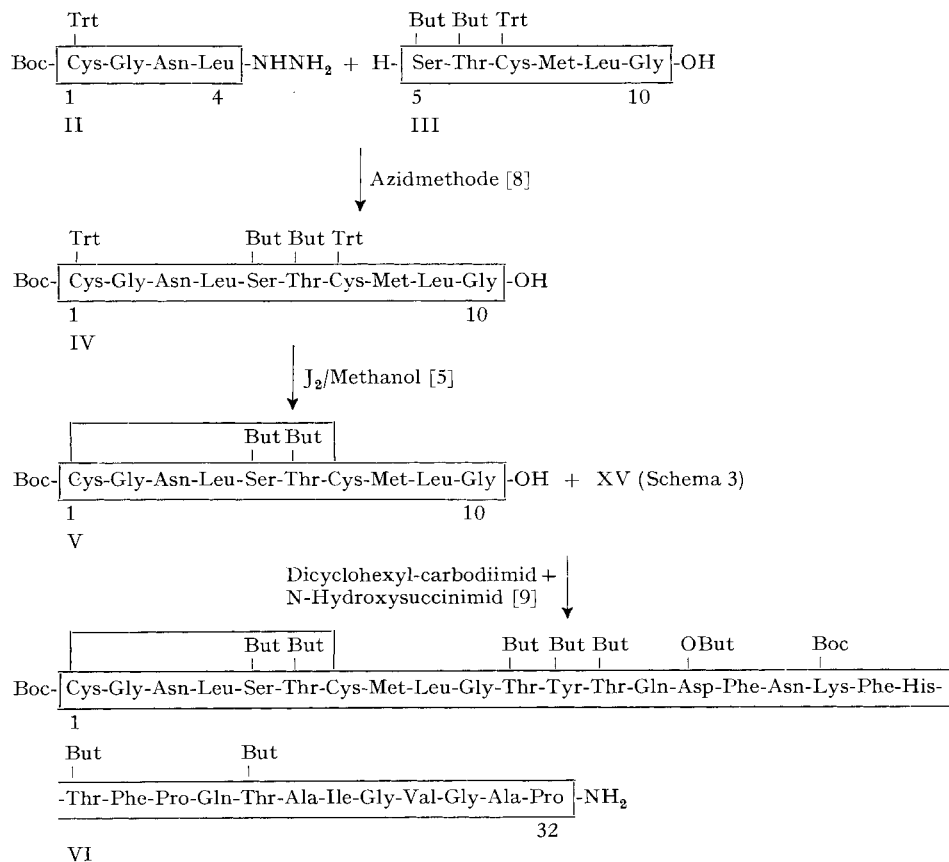
²⁾ Eine ausführliche Beschreibung soll später in dieser Zeitschrift erfolgen.

Calcitonin M (I) [1], ein aus menschlichem C-Zellen-Tumorgewebe isoliertes [2] [3] Hormon mit Plasma-Calcium-senkender Wirkung, besitzt wie Schweine- α -Thyrocalcitonin [6] eine Kette von 32 Aminosäuren mit einer Disulfidbrücke (vgl. Schema 1). Seine Aminosäuresequenz ist aber gegenüber derjenigen des α -Thyrocalcitonins überraschend stark verschieden.



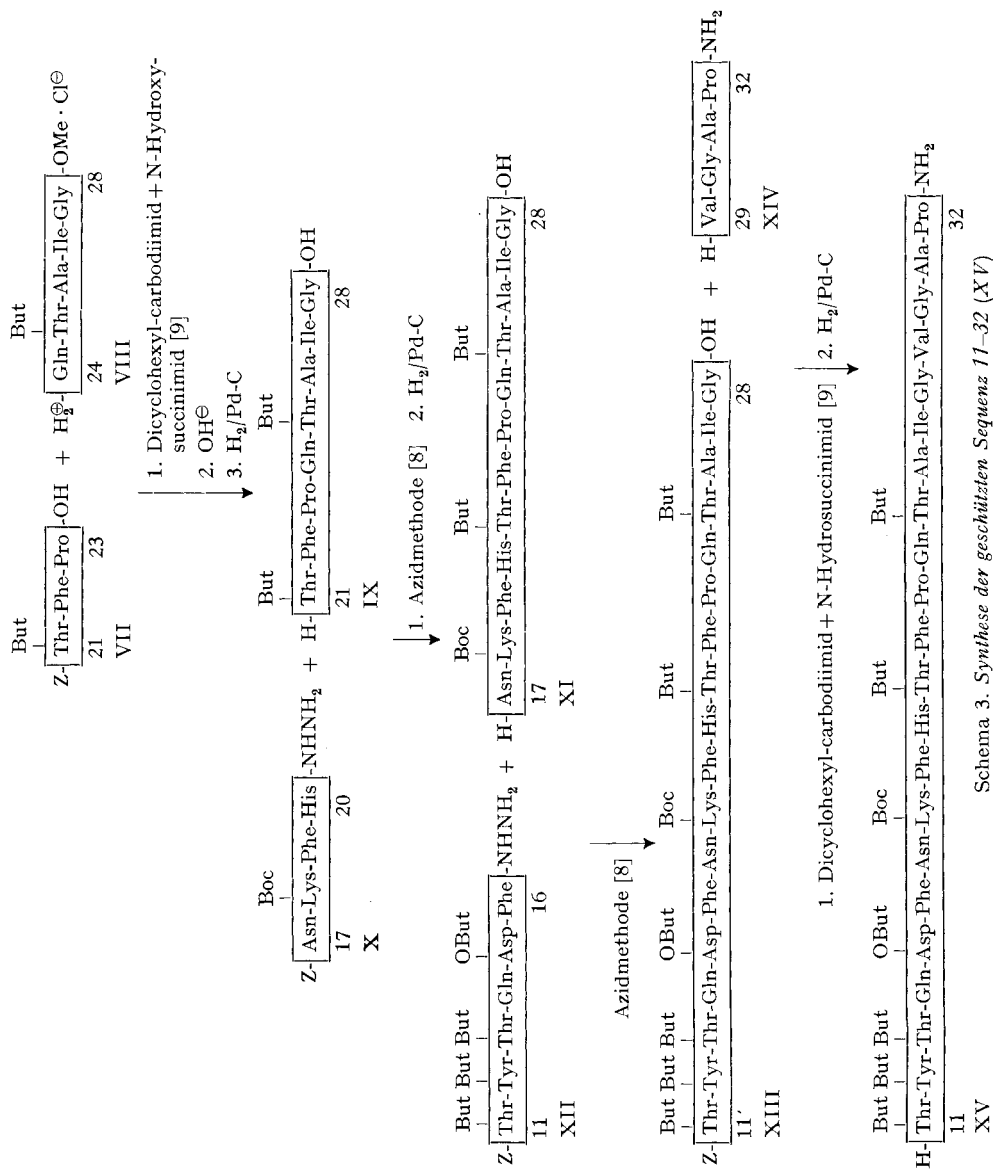
Schema 1. I, Aminosäuresequenz³⁾ von Calcitonin M

Um das aus menschlichem Gewebe nur in kleinen Mengen isolierbare Hormon für ausgedehntere biologische und klinische Versuche verfügbar zu machen, haben wir die im folgenden kurz beschriebene Synthese ausgeführt. Sie folgte im wesentlichen



Schema 2. Synthese des geschützten Calcitonin M-(1-32)-dotriacontapeptids (VI)

³⁾ Zu der in dieser Arbeit verwendeten, abgekürzten Schreibweise vgl. [7].



der früher [4] zur Synthese von α -Thyrocalcitonin entwickelten Methodik. Auf dem in den Schemata 2 und 3 angegebenen Weg bauten wir die geschützte Sequenz 1–32 (VI) auf.

Synthese des geschützten Calcitonin M-(1-32)-dotriacontapeptids (VI)

Zunächst wurden die Teilsequenzen 1–4 (II), 5–10 (III), 11–16 (XII), 17–20 (X), 21–23 (VII), 24–28 (VIII) und 29–32 (XIV) dargestellt. Aus diesen Fragmenten wurde VI gemäss den Schemata 2 und 3 aufgebaut. In allen Fällen gewährleisteten Verknüpfungsstellen und Kondensationsmethoden weitgehenden Ausschluss von Racemisierung.

Sequenz 1–10 (V) (vgl. *Schema 2*): Besonders einfach gelang die Herstellung des cyclischen Decapeptids V durch Oxydation von IV mit Jod in Methanol [5]. IV baute man durch Azidkondensation (modifiziert nach [8]) aus den Fragmenten II und III auf. Dank seiner Schwerlöslichkeit in Methanol konnte es leicht in reiner Form erhalten werden. III erhielt man aus Bpoc-Ser(But)-Thr(But)-Cys(Trt)-Met-Leu-Gly-OMe⁴) durch Abspalten der Bpoc-Gruppe mit 80-proz. Essigsäure und anschließende Verseifung mit NaOH in Methanol.

Sequenz 21–28 (IX) (*Schema 3*): Kondensation der Fragmente VII und VIII mittels der von WEYGAND, HOFFMANN & WÜNSCH [9] beschriebenen Modifikation der Carbo-diimid-Methode gab Z-Thr(But)-Phe-Pro-Gln-Thr(But)-Ala-Ile-Gly-OMe, das durch Kristallisation aus Isopropanol rein erhalten wurde. Verseifung mit NaOH in Methanol und anschließende katalytische Hydrierung führte zu IX.

Sequenz 17–28 (XI) (*Schema 3*): Verknüpfung von X und IX nach [8] ergab das N^α-Carbo-benzoxyderivat von XI, das durch Gegenstromverteilung im System Methanol-Puffer-Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff (5 + 2 + 3 + 1; Puffer: 29 ml Eisessig, 19 g Ammoniumacetat, 1 l Wasser) rein erhalten (Verteilungszahl $K = 0,36$) und in 80-proz. Essigsäure zu XI hydriert wurde.

Sequenz 11–28 (XIII) (*Schema 3*): Zum Aufbau von XIII setzte man nach [8] das Hexapeptidhydrazid XII mit XI um und reinigte das Produkt durch Umfällen aus Dimethylformamid-Essigester und Dimethylformamid-0,02N wässriger Salzsäure.

Sequenz 11–32 (XV) (*Schema 3*): Reaktion von XIII mit XIV nach [9] ergab das N^α-Carbo-benzoxyderivat von XV, das durch Gegenstromverteilung im System wie bei XI beschrieben (Verhältnis 10 + 3 + 5 + 6) gereinigt ($K = 0,3$) und dann in 80-proz. Essigsäure zu XV hydriert wurde. Das Produkt gab nach Totalhydrolyse das erwartete Aminosäureverhältnis. Vor weiterer Umsetzung befreite man es von Essigsäure durch Fällen aus Methanollösung mit 0,1N wässriger Sodalösung.

Geschützte Sequenz 1–32 (VI) (*Schema 2*): Man verknüpfte nach [9] die Sequenzen V und XV. Durch Gegenstromverteilung des Rohproduktes über 290 Stufen im Lösungsmittelsystem wie bei XI (Verhältnis 11 + 3 + 6 + 7) erhielt man reines VI ($K = 0,7$), das bei Dünnschichtchromatographie auf Silicagel $R_f = 0,38$ (*n*-Butanol-Essigsäure-Wasser = 67 + 10 + 23) und 0,35 (Äthylacetat-Pyridin-Essigsäure-Wasser = 62 + 21 + 6 + 11) zeigte.

Freies I, Calcitonin M. – In einem letzten Schritt wurden aus VI sämtliche 10 Schutzgruppen gleichzeitig durch Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure (10 Min. bei 0°) abgespalten. Nach dem Austausch der Chlorid- gegen Acetat-Ionen wurde das freie Calcitonin M folgendermassen charakterisiert:

Totalhydrolyse (20 Std., 110°, 6N HCl) und *Aminosäureanalyse* [12] ergab folgendes molares Aminosäureverhältnis (berechnete Werte in Klammern): Ala 1,93 (2); Asp 2,67 (3); $\frac{1}{2}$ (Cys)₂ 1,84 (2); Glu 1,96 (2); Gly 3,93 (4); His 1,01 (1); Ile 0,89 (1); Leu 1,91 (2); Lys 1,04 (1); Met 0,99 (1); Phe 2,88 (3); Pro 1,93 (2); Ser 0,91 (1); Thr 4,70 (5); Tyr 0,83 (1); Val (Bezugswert) 1,00 (1); NH₃ 5,55 (5).

*Biologische Aktivität*⁵⁾: Nach [13] geprüft besaßen I und hochgereinigtes, natürliches Calcitonin M die gleiche Wirksamkeit.

⁴⁾ Bpoc (früher [10] als Dpoc bezeichnet): 2-(*p*-Biphenyl)-isopropoxy-carbonyl-Gruppe. Es ist vorgesehen [11], die neue Bezeichnung, als den Nomenklaturregeln besser entsprechend, vorzuschlagen.

⁵⁾ Den Herren Dr. R. MAIER, B. ADAM und W. PIGNAT danken wir für diese Prüfung.

Identifizierung mit natürlichem Calcitonin M: Der Vergleich mit dem natürlichen Hormon erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie und Elektrophorese unter den bei [2] angegebenen Bedingungen. Zusätzlich wurden beide Peptide mit Wasserstoffperoxid zum Methionin⁸-sulfoxid- und mit Perameisensäure zum Dicysteinsäure^{4,7}, methionin⁸-sulfon-Derivat oxydiert, sowie mit Trypsin abgebaut. Stets verhielten sich die synthetischen Peptide genau wie die Vergleichssubstanzen aus natürlichem Calcitonin M.

Für sorgfältige, technische Mitarbeit sind wir den Herren R. BAUMANN, H. BRÜCKNER, H. R. KELLER, A. STAUFFER und M. WETLI sehr zu Dank verpflichtet. Dünnschichtchromatographien, Elektrophoresen und Aminosäureanalysen wurden in verdankenswerter Weise in unserem Chromatographie-Labor (Leiter: Herr E. VON ARX) durch Frau K. REIST, Frau M. RIST und die Herren D. FAUPEL und R. STEINER, ausgeführt.

Den Herren Dres. B. ISELIN und W. KESSLER danken wir für die Überlassung von Ausgangsmaterialien.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. NEHER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* *51*, 1900 (1968).
- [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] R. NEHER, B. RINIKER, R. MAIER, P. G. H. BYFIELD, T. V. GUDMUNDSSON & I. MACINTYRE, *Nature* (1968) (im Druck).
- [4] W. RITTEL, M. BRUGGER, B. KAMBER, B. RINIKER & P. SIEBER, *Helv.* *51*, 924 (1968).
- [5] B. KAMBER & W. RITTEL, *Helv.* *51*, 2001 (1968).
- [6] J. T. POTTS, H. D. NIALL, H. T. KEUTMANN, H. R. BREWER & L. J. DEFTOS, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* *59*, 1321 (1968); R. NEHER, B. RINIKER, H. ZUBER, W. RITTEL & F. W. KAHNT, *Helv.* *51*, 917 (1968); P. H. BELL, W. F. BARG, D. F. COLUCCI, M. C. DAVIES, C. DZIOBKOWSKY, M. E. ENGLERT, E. HEYDER, R. PAUL & E. H. SNEDEKER, *J. Amer. chem. Soc.* *90*, 2704 (1968).
- [7] IUPAC-IUB-Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochim. biophysica Acta* *121*, 1 (1966).
- [8] J. HONZL & J. RUDINGER, *Coll. czechoslov. chem. Commun.* *26*, 2333 (1961).
- [9] F. WEYGAND, D. HOFFMANN & E. WÜNSCH, *Z. Naturforsch.* *21b*, 426 (1966).
- [10] P. SIEBER & B. ISELIN, *Helv.* *51*, 622 (1968).
- [11] P. SIEBER & B. ISELIN, in Vorbereitung.
- [12] D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN & S. MOORE, *Analyt. Chemistry* *30*, 1190 (1958).
- [13] M. A. KUMAR, E. SLACK, A. EDWARDS, H. A. SOLIMAN, A. BAGHDIAZT, G. V. FOSTER & I. MACINTYRE, *J. Endocrinol.* *33*, 469 (1965).

235. Eine neue, einfache Methode zur Synthese von Cystinpeptiden

von B. Kamber und W. Rittel

Chemische Forschungslaboratorien des Departements Pharmazetika
der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel

(12. XI. 68)

Summary. A report is given on the conversion of S-trityl-cysteine-containing protected peptides to cystine peptides by a reaction with iodine in methanol. The new method permits the synthesis of symmetrical, open-chain unsymmetrical, and especially cyclic cystine peptides.

Beim Aufbau von Cystinpeptiden hat sich die Tritylgruppe zum intermediären Schutz der Mercaptofunktion von Cystein bewährt [1] [2] [3]. Zur Überführung in