

- [10] *V. A. Mironov, E. V. Sobolev & A. N. Elizarova*, *Tetrahedron* **19**, 1939 (1963).  
 [11] *R. B. Bates, M. J. Onore, S. K. Paknikar, C. Steelink & E. P. Blanchard*, *Chem. Commun.* **1967**, 1037.  
 [12] *M. B. Glaser*, *Ind. Engng. Chemistry* **51**, 703 (1959).  
 [13] *L. L. Miller & J. R. Johnson*, *J. org. Chemistry* **1**, 135 (1936); *R. N. Lacey*, Kapitel S.1169 in «The Chemistry of Alkenes», herausgeg. von *S. Patai*, Interscience, New York 1964.  
 [14] *H. Bestian & D. Günther*, *Angew. Chem.* **75**, 841 (1963).  
 [15] *J. C. Martin, P. G. Gott, V. W. Goodlett & R. H. Hasek*, *J. org. Chemistry* **30**, 4175 (1965).  
 [16] *J. J. Beereboom*, *J. org. Chemistry* **30**, 4230 (1965); *W. F. Erman*, *J. Amer. chem. Soc.* **89**, 3828 (1967).  
 [17] *A. Dieffenbacher, S. Roberts, M. Rey, U. Huber & A. S. Dreiding*, unveröffentlichte Arbeit.  
 [18] *S. Umezawa & M. Kinoshita*, *Bull. chem. Soc. Japan* **30**, 267 (1957) [*Chem. Abstr.* **52**, 4506c (1958)]; *M. M. Shemiakin, M. N. Kolosov, M. G. Karapecan & V. Y. Rodionov*, *Ž. obšč. Chim.* **28**, 2068 (1958) [*Chem. Abstr.* **53**, 2228e (1959)].  
 [19] *W. F. Erman*, private Mitteilung vom Februar 1967.  
 [20] *J. M. Conia & J. L. Ripoll*, *Bull. Soc. chim. France* **1963**, 768.  
 [21] *J. Krepinsky, Z. Samek, F. Sorm, D. Lamparsky, P. Ochsner & Y.-R. Naves*, *Tetrahedron* **22**, Supplement 8, 53 (1966).  
 [22] *P. D. Bartlett, L. K. Montgomery & B. Seidel*, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 616 (1964).  
 [23] *W. J. Gottstein & L. C. Cheney*, *J. org. Chemistry* **30**, 2072 (1965).

## 54. Die Synthese des corticotrop hochaktiven [1-D-Serin, 17, 18-dilysin]- $\beta$ -corticotropin-(1-18)-octadecapeptidamids<sup>1)</sup>

von **B. Riniker** und **W. Rittel**

Chemische Forschungslaboratorien des Departements Pharmazeutika  
der CIBA Aktiengesellschaft, Basel

(6. II. 70)

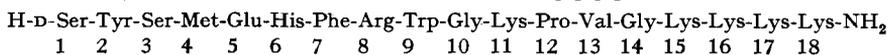
*Summary.* A synthesis is described of [1-D-serine, 17, 18-dilysin]- $\beta$ -corticotropin-(1-18)-octadecapeptide amide (I); a short chain ACTH analogue which has been found to possess in animals and also in man high and prolonged corticotropic activity. Synthesis was carried out by the fragment condensation approach involving, in the last build-up step, coupling of the protected sequences 1-10 and 11-18. From the protected octadecapeptide derivative 1-18 the free peptide was obtained in high yield by acidolysis.

Bei Versuchen, ACTH-Peptiden durch Abwandlung der Aminosäuresequenz erhöhte Wirkdauer zu verleihen, haben wir vor einigen Jahren die Beobachtung gemacht [2], dass der Ersatz von L- durch D-Serin in Stellung 1 des  $\beta$ -Corticotropin-(1-24)-tetracosapeptids [3] die corticotrope Wirkung dieses ACTH-Fragments um das 5-bis 10fache erhöht. Ein ähnlicher Befund ist auch von *Boissonnas* und Mitarbeitern beschrieben worden [4]. In der Folge zeigte sich, dass diese Strukturveränderung allgemein bei ACTH-Peptiden ganz verschiedener Kettenlänge zu entsprechender Wirkungsverstärkung führt [5]. Insbesondere aber liessen sich durch gleichzeitigen Ersatz von L-Serin 1 durch D-Serin, sowie der beiden Argininreste 17 und 18 durch Ornithin- oder Lysin-Reste, ACTH-Peptide gewinnen, die nicht nur erhöhte, sondern auch stark verlängerte Wirkung besaßen. Aus einer Reihe derart abgewandelter

<sup>1)</sup> Zu der verwendeten abgekürzten Schreibweise für Aminosäuren, Peptide und ihre Derivate vgl. [1]; es bedeuten: Boc-: *t*-Butyloxycarbonyl-; But-: *t*-Butyl-; Z-: Benzoyloxycarbonyl-.



Wirkstoffe erwies sich das [1-D-Serin, 17, 18-dilysin]- $\beta$ -corticotropin-(1–18)-octadecapeptidamid (I) als beim Menschen besonders aktiv [6] [7].



I: [D-Ser<sup>1</sup>, Lys<sup>17, 18</sup>]- $\beta$ -Corticotropin-(1–18)-octadecapeptidamid

Im Tierversuch besitzt I mehr als das dreissigfache der corticotropen Wirkung des von *Ramachandran, Chung & Li* [8] beschriebenen, unmodifizierten Octadecapeptidamids 1–18.

Im folgenden beschreiben wir Aufbau und Charakterisierung des Octadecapeptids I, über dessen pharmakologische Aktivität bereits an anderer Stelle [9] berichtet worden ist.

Zur Synthese diente die in unseren Laboratorien für den Aufbau von ACTH-Peptiden entwickelte und mehrfach beschriebene [10] Methodik. Auf dem im Formelschema angegebenen Weg stellte man die Aufbaufragmente 1–10 und 11–18 her und verknüpfte sie zum geschützten Octadecapeptid IX. In diesem waren alle Aminogruppen durch Boc-Reste [11] und die Seitenkettencarboxylgruppe des Glutaminsäurerestes durch die *t*-Butylester-(OBut)-Gruppierung [12] verschlossen. Die Arginin-guanidinofunktion blieb während der Kupplungsschritte durch Protonierung vor unerwünschter Reaktion gesichert; die funktionellen Gruppen der andern Aminosäuren, besonders des Histidins, waren ungeschützt.

*Aufbau der geschützten Octadecapeptidsequenz IX. – Sequenz 1–10 (VIII).* Zuerst wurde das Tetrapeptidderivat Boc-D-Ser-Tyr-Ser-Met-NHNH<sub>2</sub> (VI) aufgebaut, wobei man nach der von *Jselin & Schwyzer* [16] für das entsprechende L-Serin<sup>1</sup>-tetrapeptid angegebenen Vorschrift verfuhr. Das kristalline Hydrazid führte man nach *Honzl & Rudinger* [15] in das Azid über und setzte letzteres mit dem Hexapeptid VII, H-Glu(OBut)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH [14] zum Decapeptid 1–10 (VIII) um. Dieses wurde in Form seines schwerlöslichen, inneren Salzes durch Kristallisation aus Acetonitril-Wasser gereinigt.

*Sequenz 11–18 (V).* Aus Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OMe (II) [13] erhielt man durch Ammonolyse in Methanol und anschliessende katalytische Hydrierung das kristalline H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub> (III). Dieses kuppelte man mit dem aus dem Hexapeptidhydrazid IV bereiteten Azid zur kristallinen Octapeptidsequenz Z-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub>. Katalytische Hydrierung führte zum zwar amorphen, aber analysenreinen V.

*Geschützte Sequenz 1–18 (IX).* Zur Verknüpfung der Teilsequenzen V und VIII diente die Carbodiimid-Methode mit Zusatz von N-Hydroxysuccinimid [17], die hier merklich höhere Ausbeuten gab als Dicyclohexyl-carbodiimid allein. Das Rohprodukt unterwarf man einer Gegenstromverteilung; das reine IX fällt man aus den erhaltenen Fraktionen durch Ammoniumsulfat als schwerlösliches Hemisulfat aus; die Ausbeute betrug 72% berechnet auf eingesetztes Decapeptid VIII.

[D-Ser<sup>1</sup>, Lys<sup>17, 18</sup>]- $\beta$ -Corticotropin-(1–18)-octadecapeptidamid (I). Aus IX wurden die 7 Schutzgruppen gleichzeitig mittels 70 proz. Trifluoressigsäure abgespalten; das gebildete Trifluoracetat wurde durch Ionenaustausch in das Acetat übergeführt. Das dabei als amorphes Lyophilisat erhaltene I-Acetat zeigte nach Totalhydrolyse das erwartete Aminosäurenverhältnis; die analytischen Daten ergaben einen Gehalt von 78% Peptid, 6% Wasser und 14,5% oder 6,5 Äq. Essigsäure. Nach Dünnschichtchromatographie enthielt I eine Spur des Methionin<sup>4</sup>-sulfoxid-Derivates, dessen quantitative Bestimmung (Gehalt: 1,5%) leicht durch potentiometrische Titration des bei der Reaktion mit Kaliumjodid in konz. Salzsäure freigesetzten Jods gelang<sup>2)</sup>.

<sup>2)</sup> Wir danken Herrn *P. Sieber* für die Ausarbeitung dieser, gegenüber der ursprünglichen Vorschrift von *Toennies & Kolb* [18] etwas modifizierten Bestimmungsmethode.

Zur Charakterisierung des Sulfoxidderivates oxydierte man eine Probe von I mit  $H_2O_2$ . Das Produkt enthielt nach Dünnschichtchromatographie höchstens 1% unoxydiertes I, besass aber 1/10 dessen corticotroper Aktivität<sup>3)</sup>. Obwohl die Oxydation der Methionin-thioäthergruppe einen merklichen Abfall der corticotropen Aktivität bewirkt, besitzt das Sulfoxidderivat von I noch erhebliche Eigenaktivität. Sie kommt derjenigen von  $\beta$ -Corticotropin-(1–24)-tetracosapeptid [3] gleich, das in der gewählten Prüfungsanordnung ebenfalls etwa 1/10 der Aktivität von I besitzt.

### Experimenteller Teil

Die Smp. sind auf einem Apparat nach Dr. *Tottoli* (d. Fa. *Büchi*, Flawil) bestimmt und unkorrigiert.

Alle Rf-Werte beziehen sich auf *Dünnschichtchromatographien* auf folgenden Trägermaterialien:

S: Silicagel (Fertigplatten SL 254 der Fa. *Antec*, Birsfelden),

A: Aluminiumoxid (mit Zusatz von 12% Gips; D-O der Fa. *Camag*, Muttenz), und

C: Cellulose (Avicel-Fertigplatten 1440 der Fa. *Schleicher & Schüll*).

Fliessmittel (Angaben in Volumteilen):

|              |   |                  |
|--------------|---|------------------|
| System 43 A  | <i>t</i> -Amylalkohol-2-Propanol-Wasser | 67 + 26 + 7      |
| System 52    | 1-Butanol-Essigsäure-Wasser             | 71 + 7 + 22      |
| System 52 A  | 1-Butanol-Essigsäure-Wasser             | 67 + 10 + 23     |
| System 100   | Essigester-Pyridin-Essigsäure-Wasser    | 62 + 21 + 6 + 11 |
| System 101   | 1-Butanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser     | 38 + 24 + 8 + 30 |
| System 107   | Essigester-Pyridin-Wasser               | 20 + 10 + 11     |
| System 111 B | 1-Butanol-Pyridin-konz. Ammoniak-Wasser | 40 + 24 + 6 + 30 |

Die Anfärbung der Platten erfolgte mit *Reindel-Hoppe*-Reagens [20].

#### 1. H-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub> (V). –

1.1. *Z-Derivat von III*, *Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub>*: Eine Lösung von 35 g *Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OMe* [13] in 600 ml Methanol wurde bei 20° mit Ammoniakgas gesättigt und 46 Std. stehengelassen. Nach Einengen in der Kälte schied sich 29,9 g (87%) reines, kristallines *Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub>* aus, Smp. 165–166°;  $[\alpha]_D^{20} = -11^\circ$  ( $c = 2$  in Methanol); Rf(S) = 0,76 (43 A), 0,41 (Chloroform-Methanol 9:1).

$C_{30}H_{49}N_5O_8$  (607,7) Ber. C 59,29 H 8,13 N 11,52% Gef. C 59,41 H 8,22 N 11,72%

1.2. *H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub> (III)*: 6 g *Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub>* wurden in 60 ml Methanol suspendiert und mit 500 mg Pd-Kohle (10% Pd) unter Auffangen des entstehenden CO<sub>2</sub> bei 22°/840 Torr hydriert. Die anfänglich noch teilweise ungelöste Substanz ging rasch in Lösung. Nach beendeter H<sub>2</sub>-Aufnahme wurde vom Katalysator abfiltriert, im Vakuum eingeeengt und durch Zerreiben mit Hexan kristallisiert: 4,5 g (96% d. Th.) III, Smp. 112–115°. Zur Analyse wurde aus Essigester-Hexan umkristallisiert, Smp. 116–118°;  $[\alpha]_D^{20} = -28^\circ$  ( $c = 2$  in Chloroform); Rf(S) = 0,35 (43 A), 0,65 (52).

$C_{22}H_{43}N_5O_6$  (473,6) Ber. C 55,79 H 9,15 N 14,79% Gef. C 56,06 N 9,21 N 15,00%

1.3. *Z-Derivat von V*, *Z-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub>*: 7,7 g (6,98 mMol) *Z-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-NHNH<sub>2</sub>*<sup>4)</sup> wurden in 90 ml Dimethylformamid gelöst. Die auf –25° gekühlte Lösung wurde mit 14 ml 2N HCl (wässr.) sowie 1,46 ml 5N NaNO<sub>2</sub>-Lösung (7,3 mMol) versetzt. Man rührte 15 Min. bei –10°, gab dann eine auf –10° gekühlte Lösung von 3 g (6,33 mMol) III in 15 ml Dimethylformamid sowie 2,9 ml (20,7 mMol) Triäthylamin zu und liess die Mischung 20 Std. bei 0° stehen. Dann engte man im Hochvakuum auf ca. 50 ml ein und fällte durch Zugabe von 250 ml Wasser aus. Nach Abnutschen und Trocknen kristallisierte man aus Methanol-Wasser. Man erhielt 8,1 g (82%) geschütztes Octapeptid-Mono-

<sup>3)</sup> Die Prüfung verdanken wir Herrn Dr. *P. A. Desaulles*; sie erfolgte in der kürzlich [19] beschriebenen Versuchsanordnung.

<sup>4)</sup> Hergestellt aus *Z-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OMe* [21] durch Hydrazinolyse: Smp. 156–158° (aus *t*-Butanol-Wasser);  $[\alpha]_D^{25} = -52^\circ$  ( $c = 2$  in Methanol); vgl. auch [22].

hydrat in feinen Nadeln, Smp. 219–221°;  $[\alpha]_D^{20} = -38^\circ$  ( $c = 1$  in Methanol); Rf(S) = 0,75 (43 A), 0,47 (Chloroform-Methanol 9:1).

$C_{75}H_{128}N_{14}O_{20} \cdot H_2O$  (1563,9) Ber. C 57,60 H 8,38 N 12,54% Gef. C 57,65 H 8,21 N 12,47%

1.4. *H-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub>* (V): 5 g des unter 1.3. erhaltenen Octapeptidderivats wurden unter Erwärmen in 200 ml Methanol gelöst und mit 1 g Pd-Kohle (10% Pd) unter CO<sub>2</sub>-Absorption bei 22° und 840 Torr hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde das Filtrat auf ca. 20 ml eingengt und das Peptid durch Zugabe von Benzol und Petroläther gefällt. Zur Entfernung hydrophiler Nebenprodukte wurde aus Methanol-Wasser umgefällt, abgenutscht, getrocknet und dann mit Luftfeuchtigkeit äquilibriert; Ausbeute: 4,1 g (88%), Smp. ca. 220° (Zers.);  $[\alpha]_D^{20} = -33^\circ$  ( $c = 1$  in Methanol); Rf(S) = 0,28 (43 A), 0,55 (100), 0,63 (52). H<sub>2</sub>O-Best. nach *K. Fischer*: 2,8% entspr. 2,2 Äq. H<sub>2</sub>O.

$C_{67}H_{122}N_{14}O_{18} \cdot 2H_2O$  (1447,8) Ber. C 55,58 H 8,77 N 13,54% Gef. C 55,29 H 8,68 N 13,28%

2. **Boc-D-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBut)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH (VIII)**. – 3,05 g (5 mMol) Boc-D-Ser-Tyr-Ser-Met-NHNH<sub>2</sub><sup>5</sup>) (VI) wurden in 25 ml Dimethylformamid suspendiert und bei –10° langsam mit 6,25 ml 2N HCl in Essigester versetzt, wobei Lösung eintrat. Dann tropfte man 0,65 ml (5,5 mMol) *t*-Butylnitrit zu, rührte 10 Min. bei –10° und gab 1,75 ml (12,5 mMol) Triäthylamin zu. Die erhaltene Azidlösung, aus der sich Triäthylamin-hydrochlorid abgeschieden hatte, wurde in eine auf –10° gekühlte Lösung von 3,9 g (4 mMol) H-Glu(OBut)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH·HCl·3H<sub>2</sub>O (VII) [14] in 125 ml Dimethylformamid hineingefiltriert, dann wurde mit 0,7 ml (5 mMol) Triäthylamin versetzt und über Nacht bei 0° gerührt. Das gallertig abgeschiedene Decapeptid wurde abfiltriert, mit Dimethylformamid, Wasser, Acetonitril und Äther gewaschen, getrocknet und aus Acetonitril-Wasser (1:1) umkristallisiert. Man erhielt nach Trocknung und anschließendem Äquilibrieren mit Luftfeuchtigkeit 3,6 g (58%) Reinprodukt, Smp. 233–236° (Zers.),  $[\alpha]_D^{20} = -17^\circ$  ( $c = 1$  in Pyridin-H<sub>2</sub>O 1:1); UV. (in Methanol-1N NaOH 9:1):  $\lambda_{max} = 283$  (7600), 290 (7400) nm ( $\epsilon$ ); Rf(S) = 0,23 (52), 0,65 (101), 0,50 (107). H<sub>2</sub>O-Bestimmung nach *K. Fischer*: 5,5%, entspr. 4,6 Äq. H<sub>2</sub>O.

$C_{68}H_{94}N_{16}O_{18}S$ , 4,5H<sub>2</sub>O (1536,7) Ber. C 53,15 H 6,75 N 14,59% Gef. C 53,11 H 6,77 N 14,40%

3. **Boc-D-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBut)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub> (IX)**. – Zu einer Suspension von 2,86 g (1,86 mMol) VIII und 3,24 g (2,24 mMol) V in 95 ml Dimethylformamid wurden 0,53 ml 3,5N HCl in Essigester (1,86 mMol) und 428 mg (3,72 mMol) N-Hydroxy-succinimid gegeben, wobei fast vollständige Lösung eintrat. Dann setzte man 575 mg (2,79 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid zu, rührte 15 Std. bei 45° unter Stickstoff, kühlte auf 0°, nutschte vom ausgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff ab und fällte das Rohprodukt durch Eintropfen des Filtrates in 450 ml peroxidfreien Äther aus. Nach Abnutschen und Trocknen fällte man aus Dimethylformamid-Wasser um und unterwarf das getrocknete Produkt (5,7 g) einer Gegenstromverteilung im System Methanol-Puffer-Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff = 10:3:7:4 (Vol.-Teile; Puffer: 57,1 ml Eisessig + 7,7 g Ammoniumacetat in 950 ml H<sub>2</sub>O; Phasenvolumen je 25 ml). Nach 150 Verteilungsschritten befand sich das reine IX in den Verteilungselementen Nr. 58–77 (Verteilungszahl  $K = 0,79$ ). Man vereinigte diese Fraktionen, dampfte im Vakuum bis zur beginnenden Trübung ein und fällte dann das geschützte Octadecapeptid IX als Sulfat durch Zugabe von 60 ml 2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung aus. Nach 20 Std. bei 0° nutschte man ab, wusch den Rückstand mit Wasser frei von Ammoniumsulfat, trocknete ihn und äquilibrierte anschließend mit Luftfeuchtigkeit. Man erhielt 4,03 g (72%) IX als amorphes Pulver; Wassergehalt 4% (6,5 Äq.);  $[\alpha]_D^{20} = -28^\circ$  ( $c = 1$  in 90 proz. Essigsäure); UV. (in 90 proz. Essigsäure):  $\lambda_{max} = 280$  nm ( $\epsilon = 7100$ ); Rf(S) = 0,44 (52), 0,36 (100), 0,28 (Chloroform-Methanol 3:1).

$C_{135}H_{214}N_{30}O_{35}S$ , 6,5H<sub>2</sub>O, 0,5H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Ber. C 53,77 H 7,62 N 13,94%  
(3015,5) Gef. „ 53,90 „ 7,77 „ 13,69%

4. **H-D-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Lys-Lys-NH<sub>2</sub> (I)**. – Eine Lösung von 3,75 g (1,24 mMol) IX in 40 ml Trifluoressigsäure-Wasser 7:3 wurde 8 Std. bei 22° unter Stickstoff belassen. Dann kühlte man auf –30°, versetzte langsam mit 200 ml eiskaltem, peroxidfreiem Äther, rührte 15 Min. bei –15° und filtrierte die pulverige

<sup>5</sup>) Hergestellt analog dem L-Ser<sup>1</sup>-Tetrapeptid [16]; Smp. 150–153° (aus Methanol), 187–190° (aus Acetonitril-Wasser);  $[\alpha]_D^{20} = -6^\circ$  ( $c = 1$  in Methanol).

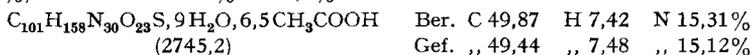
Fällung ab. Nach Waschen mit Äther und Trocknen löste man das Trifluoracetat (3,9 g) in 50 ml 0,1N Essigsäure und filtrierte über eine Säule (2,5 × 30 cm) von basischem Ionenaustauscher (Merck Nr. II, Acetatform). Man spülte mit 0,1N Essigsäure bis zur *Folin*-negativen Reaktion des Filtrats und lyophilisierte es. Den Rückstand äquilibrierte man mit Luftfeuchtigkeit und erhielt 3,24 g (95%) I als farbloses, amorphes, nicht hygroskopisches Pulver, das als Nebenprodukt 1,5% des Met-Sulfoxid-Derivates (Rf-Werte in eckigen Klammern) enthält; Rf(A) = 0,12 [0,06] (52A), 0,17 [0,12] (111B). Dünnschicht-Elektrophorese (C) bei pH 5,0 (Puffer: 0,1M Natriumacetat-Essigsäure): Laufstrecke in 1 Std. bei 20 V/cm 4,8 cm zur Kathode.  $[\alpha]_D^{20} = -65^\circ$  ( $c = 1$  in 1 proz. Essigsäure).

Zur Bestimmung des Sulfoxidgehalts übergoss man 87,5 mg I und 25 mg fein pulverisiertes KJ mit 1 ml analysenreiner, konz. Salzsäure, rührte schwach während genau 5 Min., verdünnte mit 5 ml Wasser und titrierte das ausgeschiedene Jod potentiometrisch<sup>6)</sup> mit 0,02N Natriumthiosulfatlösung, wobei man den mit KJ und Salzsäure allein erhaltenen Blindwert abzog. Verbrauch: 0,994  $\mu$ Mol Thiosulfat, entsprechend einem Gehalt von 1,1 mg bzw. 1,5% Sulfoxid-Derivat.

*Aminosäureanalyse* [23] nach Totalhydrolyse (6N HCl, 24 Std., 110°) (theor. Werte in Klammern): Lys 5,38 (5), His 1,03 (1), NH<sub>3</sub> 1,22 (1), Arg 0,99 (1), Ser 1,85 (2), Glu 0,99 (1), Pro 0,99 (1), Gly 2,06 (2), Val 1,05 (1), Met 0,99 (1), Tyr 0,99 (1), Phe 1,00 (1, Bezugswert).

Die Anwesenheit eines Tryptophan-Restes ergibt sich aus der UV.-Absorption: in 0,1N HCl:  $\lambda_{max} = 278$  nm ( $\epsilon = 6300$ ); in Methanol-1N Natronlauge (1:1):  $\lambda_{max} = 283$  (7000), 290 (6850) nm ( $\epsilon$ ); Verhältnis Tyr: Trp = 1,04 [24].

*Peptidgehalt*: a) aus Aminosäureanalyse: 76,9%, b) aus Titration der basischen Gruppen (bzw. ihrer CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>-Gegenionen) mit HClO<sub>4</sub> in Eisessig: 79%, c) aus Essigsäure-(14,5%) und Wassergehalt (6,0%): Differenz zu 100% = 79,5%.



*Sulfoxidderivat von I*: 250 mg I löste man in 30 ml 0,4% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 1 proz. Essigsäure. Nach 2 Std. bei Raumtemperatur war dünnschichtchromatographisch kein Ausgangsmaterial mehr feststellbar. Nach weiteren 4 Std. gab man etwas Platinmohr zu, filtrierte nach der Zersetzung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und lyophilisierte die Lösung. Das UV.-Spektrum des Rückstandes war gegenüber demjenigen von I unverändert (keine Zerstörung von Trp); anhand von Dünnschichtvergleichsproben enthielt das Präparat weniger als 1% I.

Herrn Dr. *B. Iselin* verdanken wir die Herstellung des geschützten Decapeptids VIII und die analytische Charakterisierung verschiedener Zwischenprodukte. Für sorgfältige, technische Mitarbeit danken wir den Herren *Hp. Roth*, *R. Schaub* und *A. Stauffer*. Dünnschichtchromatographien und -Elektrophoresen sowie die Aminosäureanalyse wurden in verdankenswerter Weise in unserem Chromatographie-Labor (Leitung: Herr *E. von Arx*) durch Frau *K. Reist* und Frau *M. Rist* sowie die Herren *D. Faupel* und *R. Steiner* ausgeführt. Mikroanalytische Bestimmungen und Spektren verdanken wir unseren Spezial-Laboratorien unter der Leitung der Herren Dr. *W. Padowetz* und Dr. *H. Hürzeler*.

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Tentative Rules, *Biochim. biophysica Acta* 121, 1 (1966); *Biochemistry* 6, 362 (1967).
- [2] *H. Kappeler*, *B. Riniker*, *W. Rittel*, *P.A. Desaulles*, *R. Maier*, *B. Schär* & *M. Staehelin*, in: «Peptides, Proc. 8th Europ. Peptide Symposium, 1966», S.214, North-Holland Publ. Co., Amsterdam 1967.
- [3] *H. Kappeler* & *R. Schwyzer*, *Helv.* 44, 1136 (1961).
- [4] *R.A. Boissonnas*, *S. Gutmann* & *J. Pless*, *Experientia* 22, 526 (1966).
- [5] *W. Rittel*, in: «Pharmacology of Hormonal Polypeptides and Proteins», S.35, Plenum Press, New York 1968.
- [6] *A. Walser*, *Helv. med. Acta* 34, Suppl. 48, 125 (1968).
- [7] *A. Walser* & *Th. Müller*, in: «Protein and Polypeptide Hormones», S.487, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam 1969.

<sup>6)</sup> Radiometer Titrigraph, ausgerüstet mit einer kombinierten Platin-Kalomel-Elektrode (der Fa. Ingold, Typ 4800-M8).

- [8] J. Ramachandran, D. Chung & C. H. Li, J. Amer. chem. Soc. 87, 2696 (1965).  
 [9] P. A. Desaulles, B. Riniker & W. Rittel, *op. cit.* [7], S. 489.  
 [10] R. Schwyzer & P. Sieber, Helv. 49, 134 (1966), und dort zitierte, frühere Arbeiten.  
 [11] F. C. McKay & N. F. Albertson, J. Amer. chem. Soc. 79, 4686 (1957); G. W. Anderson & A. C. McGregor, *ibid.* 79, 6180 (1957).  
 [12] R. W. Roeske, Chemistry & Ind. 1959, 1121; E. Taschner, B. Liberek, C. Wasielewsky & J. Bernal, Angew. Chem. 71, 743 (1959); G. W. Anderson & F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. 82, 3359 (1960).  
 [13] R. Schwyzer & W. Rittel, Helv. 44, 159 (1961).  
 [14] R. Schwyzer & H. Kappeler, Helv. 44, 1991 (1961).  
 [15] J. Honzl & J. Rudinger, Coll. czechoslov. chem. Commun. 26, 2333 (1961).  
 [16] B. Iselin & R. Schwyzer, Helv. 44, 169 (1961).  
 [17] F. Weygand, D. Hoffmann & E. Wünsch, Z. Naturforsch. 21b, 426 (1966).  
 [18] G. Toennies & J. J. Kolb, J. biol. Chemistry 128, 399 (1939).  
 [19] P. A. Desaulles & W. Rittel, in: «The Investigation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Function», S. 125, University Press, Cambridge (England) 1968.  
 [20] F. Reindel & W. Hoppe, Chem. Ber. 87, 1103 (1954).  
 [21] R. Schwyzer, W. Rittel & A. Costopanagiotis, Helv. 45, 2473 (1962).  
 [22] K. Hofmann, J. Rosenthaler, R. D. Wells & H. Yajima, J. Amer. chem. Soc. 86, 4991 (1964).  
 [23] D. H. Spackman, W. H. Stein & S. Moore, Analyt. Chemistry 30, 1190 (1958).  
 [24] G. H. Beaven & E. R. Holiday, Adv. Protein Chemistry 7, 319 (1952).

## 55. Push-pull-Cyclobutadiene<sup>1)</sup>

von M. Neuenschwander<sup>2)</sup> und A. Niederhauser

Institut für Organische Chemie der Universität Bern

(13. II. 70)

*Summary.* Two push-pull-cyclobutadienes **10b** and **10c** are prepared by reaction of two eq. of the corresponding acetylenes having electrondonating and electronaccepting groups (**4**) with one eq. of HBF<sub>4</sub> to cyclic cyanine salts, followed by elimination of HBF<sub>4</sub> with KOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. These cyclobutadienes, stable in crystalline form at room temperature respectively for a short time (**10b** R=CH<sub>3</sub>) or for several days (**10c** R=OCH<sub>3</sub>), are extremely reactive in solution towards various nucleophiles and electrophiles. Cleavage of the nascent cyclobutenes leads to butadienes. The cyclobutadienes **10** dimerise thermally to cyclooctatetraenes **18**.

**Einleitung.** – Um die Jahrhundertwende beschäftigten sich Perkin [2] und Willstätter [3] erstmals vergeblich mit der Synthese von Cyclobutadienen, doch wurden nach dem Bekanntwerden der Regel von Hückel lange keine Versuche zur Darstellung des energetisch ungünstigen 4  $\pi$ -Systems **1** mehr unternommen. Erst nach der Entdeckung hochreaktiver Dienophiler zum Abfangen empfindlicher Cyclopolyene und nach dem Aufkommen leistungsfähiger spektroskopischer Methoden setzten nach 1955 intensive Bemühungen auf dem Cyclobutadien-Gebiet ein, die – durch die frühzeitige Postulierung [4] und Isolierung [5] stabiler Cyclobutadien-Metall-Komplexe gefördert – im Nachweis von Cyclobutadien (**1**) als reaktiver Zwischenstufe durch Pettit [6] gipfelten. In den letzten Jahren wurden mehrere Vorläufer des Grundkörpers

<sup>1)</sup> Kurzmitteilung, s. [1].

<sup>2)</sup> Institut für Organische Chemie der Universität, 3000 Bern, Freiestrasse 3.