

- [32] R. C. Fuson & N. Rabjohn, *Org. Synth.* 25, 65 (1945).  
 [33] E. G. Knowles & J. B. Cloke, *J. Amer. chem. Soc.* 54, 2028 (1939).  
 [34] K. V. Levshina & S. I. Sergievskaya, *Z. obšč. Chim.* 22, 2189 (1952).  
 [35] J. W. Wilt, J. M. Kosturik & R. C. Orłowski, *J. org. Chemistry* 30, 1052 (1965).  
 [36] F. Nobs, Diploma Thesis, ETH Zürich 1970.  
 [37] F. M. Furman, J. H. Thelin, D. W. Hein & W. B. Hardy, *J. Amer. chem. Soc.* 82, 1450 (1960).  
 [38] F. W. McLafferty, *Analyt. Chemistry* 34, 16 (1962).  
 [39] G. I. M. van der Kerk, I. G. Noltes & J. G. A. Luijten, *J. appl. Chemistry* 7, 366 (1957).

## 88. Hormon-Rezeptor-Beziehungen: Synthese und Eigenschaften von N<sup>ε</sup>-Dansyllysine<sup>21</sup>-adrenocorticotropin-(1–24)-tetrakosipeptid

von R. Schwyzer und P. W. Schiller

Institut für Molekularbiologie und Biophysik,  
Eidgenössische Technische Hochschule, 8049 Zürich

(22. II. 71)

*Summary.* We are investigating interactions between hormones and their potential receptor molecules by means of biologically active, synthetic hormone derivatives. The substituents are so chosen that they can supply quantitative information about specific contacts or convert the hormone to an 'affinity marker'. We describe the synthesis of N<sup>ε</sup>-dansyllysine<sup>21</sup>-adrenocorticotropin-(1–24)-tetrakosipeptide. In fat cells and in adrenal cells of the rat the dansyl substituent does not seem to impair the interaction between the peptide moiety and its biological receptors. It allows for affinity studies by fluorescence depolarisation and for measurement of intramolecular and intermolecular distances by means of energy transfer (fluorescence sensibilisation).

*Potentielle Rezeptormolekeln.* Das gängige Konzept der Hormonwirkung über zelluläre Rezeptoren ruft nach Identifizierung von Rezeptormolekeln und nach Aufklärung des chemischen Mechanismus der Hormon-Rezeptor-Wechselwirkung [1]. Weder das eine noch das andere ist bisher gelungen. Zur Zeit untersuchen wir diesen Problemkreis mittels synthetischer Derivate von Peptid- und andern Hormonen (z. B. Diazoacetylcholin [2]). Wir gehen dabei von folgenden Annahmen aus: eine Rezeptormolekel muss imstande sein

1. ihr Hormon spezifisch zu erkennen (sog. Diskriminatorwirkung), und als Folge davon

2. ein physikalisches oder chemisches Signal erzeugen (sog. «Transducer»-Wirkung), welches die erste einer ganzen Serie biochemischer Reaktionen auslöst, die zur bekannten physiologischen Wirkung des Hormons führt.

Jede in der Erfolgswelle vorhandene (Makro-)Molekel, die imstande ist, ein Hormon spezifisch zu binden, könnte im Prinzip zur Unterscheidung zwischen verschiedenen Hormonen und somit als Diskriminator dienen: sie ist eine *potentielle Rezeptormolekel*. Ob sie auch tatsächlich eine Rezeptormolekel ist, hängt von ihrer Fähigkeit ab, das oben erwähnte Signal zu erzeugen. Unser Vorgehen zielt darauf hin, durch Bindungsstudien potentielle Rezeptoren aufzufinden und danach durch Signalstudien zu versuchen, sie als tatsächliche Rezeptoren zu identifizieren oder auszuschliessen.



nierenrindenzell-Membranen ist sie qualitativ und quantitativ gleich, bei isolierten Fettzellen, isolierten Nebennierenrindenzellen und Nebennierengewebe der Ratte ist sie qualitativ gleich, aber quantitativ etwa 5-bis 20 mal schwächer. In erster Näherung nehmen wir an, dass mindestens ein Teil der Rezeptorenpopulation von beiden Agonisten in gleicher Weise beeinflusst wird.

Herr Dr. *Peter Bally* (Pharmakologisches Institut der Universität Bern) hat bei isolierten Fettzellen der Ratten-Epididymis die Freisetzung von Fettsäuren und von Glycerin gemessen. Die (log) Dosis-Wirkungskurven weisen dieselbe sigmoide Form und dieselbe maximale Wirkung auf wie bei Synacthen<sup>®</sup>, nur sind sie zu etwa 20mal höheren Konzentrationen des Derivates verschoben<sup>3)</sup>.

Herr Prof. *George Sayers* (School of Medicine, Dept. of Physiology, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio) fand bei isolierten Nebennierenrindenzellen [6], dass, in Bezug auf Corticosteron-Freisetzung, der maximale Effekt von **1** gleich gross ist wie derjenige von Synacthen<sup>®</sup>. Auch hier sind aber die Dosis-Wirkungskurven verschoben, und zur Erzeugung des halbmaximalen Effektes braucht man etwa 5mal mehr Derivat als freies Tetrakosipeptid (498 anstelle von 100 Picogramm/ml)<sup>3)</sup>.

Herr Dr. *Jürg Müller* (Steroidlabor der Med. Universitätsklinik, Kantonsspital Zürich) hat die Freisetzung von Corticosteron in Nebennieren von Ratten *in vitro* untersucht (modifizierte Technik von *Saffran & Schally* [7] unter Verwendung von radioaktivem Corticosteron). Er fand eine Wirkung von 8 I.E. pro mg, d. h. etwa 7–8 Prozent derjenigen des internationalen Standards<sup>3)</sup>.

Im Gegensatz zu diesen Versuchen, bei denen Transportphänomene eine gewisse Rolle spielen könnten (zu den Zellen, in die Zellen, unspezifische Adsorption?), ergaben Experimente mit dem Adenyl-Cyclase-System von isolierten Membranen von Fett- und Nebennierenrinden-Zellen eine volle Wirkung in den Konzentrationsbereichen  $10^{-7}$  (Fett-Z.) und  $10^{-6}$  molar (NN.-Z.), identisch mit derjenigen von Synacthen<sup>®</sup> (Versuche von *Theodor Braun* und *Oscar Hechter*, Institute for Biomedical Research, Chicago, Ill.)<sup>3)</sup>.

Das Derivat **1** haben wir dazu verwendet, um eine spezifische Bindung an kristallisierte Glucose-6-phosphat-dehydrogenase aus Nebennierenrinde (D-Glucose-6-phosphat: NADP<sup>+</sup>-oxido-reductase, E.C. 1.1.1.49) [8] mit einer Assoziationskonstante von  $1,5 \cdot 10^6 \text{ l} \cdot \text{Mol}^{-1}$  mit Hilfe der *Fluoreszenz-Depolarisation* nachzuweisen. Mittels *Energieübertragung* (Fluoreszenz-Sensibilisierung) konnten wir ferner zeigen, dass in der Verbindung **1** sowohl in Wasser und in Phosphatpuffer bei 25 und 70 °C als auch in denaturierenden Medien (6 M Guanidin-hydrochlorid und 8 M Harnstoff) der mittlere, intramolekulare Abstand zwischen dem Indolring des Tryptophan<sup>9</sup> und der Dansylgruppe sich im engen Bereiche von 20 bis 26 Å bewegt [9].

Diese Resultate zeigen nicht nur die spezifische Anwendbarkeit der Verbindung **1** für unsere Zwecke, sondern lassen vermuten, dass auch andere Derivate mit Substituenten am Lysin Nr. 21 biologisch aktiv und prinzipiell für Untersuchungen von potentiellen Rezeptoren geeignet sein könnten. Solche Verbindungen werden z. Zt. in unserem Laboratorium hergestellt.

*Anlage und Verlauf der Synthese.* Es wurde im Prinzip die Methode der Fragmentkondensation und des Seitenkettenschutzes von Lysin und Glutaminsäure mittels *t*-Butoxycarbonyl- (Boc-) und *t*-Butylester (-OBu<sup>t</sup>) verwendet, wie sie schon früher von unserem Arbeitskreise entwickelt worden war [10]. Wir benützen im wesentlichen dieselben Zwischenprodukte wie für die Synthese des Corticotropin-(1–24)-tetrakosipeptids [5], nämlich die geeignet geschützten Fragmente mit den Sequenzen 1–10 und 11–19. Im Unterschied zu jener Synthese mussten wir anstelle des dort beschriebenen

<sup>3)</sup> Persönliche Mitteilung, für die wir bestens danken.

Fragmentes 20–24 das entsprechende Fragment mit bereits eingebauter Dansylgruppe, H·Val-Lys(DNS)-Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup> (**6**) einsetzen, da sich die Dansylgruppe später nicht mehr selektiv einführen lässt (Dansylierung aller Aminogruppen und Tyrosin-Hydroxyle).

Schema 1 zeigt den Aufbau dieses Dansyl-Pentapeptides. N<sup>α</sup>-Benzyloxycarbonyl-N<sup>ε</sup>-dansyl-L-lysin (**2**) wurde aus Dansylchlorid und Z·Lys·OH hergestellt und als amorphe Substanz erhalten. Als ebenfalls amorph erwiesen sich alle folgenden Produkte. Kondensation des Lysinderivates **2** mit H·Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup> [11] unter Verwendung von Dicyclohexyl-carbodiimid (DCCI) ergab das Tetrapeptidderivat Z·Lys(DNS)-Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup> (**3**), welches durch neutrale, katalytische Hydrierung in **4** übergeführt wurde. Dessen Kondensation zum vollständig geschützten Pentapeptidderivat **5**, Z·Val-Lys(DNS)-Val-Tyr-Pro·OBu<sup>t</sup>, erfolgte mittels *t*-Butoxycarbonyl-valin-*p*-nitrophenylester; die Benzyloxycarbonylgruppe zu **6** wurde wiederum hydrogenolytisch abgespalten.

Schema 1. Aufbau der Pentapeptidsequenz 20–24

	Smp. °	Analyse ber./gef.				Spektrum (Alkohol)	
		C	H	N	S	$\lambda_{max}$ (nm)	$\epsilon$
<b>2</b> Z·Lys(DNS)·OH	115–117	60,81 60,59	6,08 5,91	8,18 8,09		335	4300
<b>3</b> Z·Lys(DNS)-Val-Tyr-Pro·OBu <sup>t</sup>	127–129			9,05 9,04	3,45 3,36	335	4360
<b>4</b> H·Lys(DNS)-Val-Tyr-Pro·OBu <sup>t</sup>	120–123	61,94 61,74	7,35 7,36	10,57 10,33	4,03 4,11	335	4380
<b>5</b> Z·Val-Lys(DNS)-Val-Tyr-Pro·OBu <sup>t</sup>	120–122	63,07 62,80	7,16 7,19	9,54 9,61	3,12 3,12	335	4320
<b>6</b> H·Val-Lys(DNS)-Val-Tyr-Pro·OBu <sup>t</sup>	118–121	61,79 61,02	7,55 7,53	10,97 10,96	3,59 3,67	335	4360

Schema 2 zeigt den Aufbau der Tetrakosipeptid-Sequenz ausgehend von **6**. Das geschützte Nonapeptid 11–19 **7** wurde aus dem Säureazid Z·Lys(Boc)-Pro-Val Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)·N<sub>3</sub>, welches zur Vermeidung der Racemisierung weder isoliert noch mit alkalischen Reagenzien behandelt worden war [12] [13], und dem Tripeptidderivat H·Arg-Arg-Pro·OH, HCl hergestellt. Die Kondensation des erhaltenen Nonapeptidderivates 11–19 **7** mit dem Pentapeptidderivat 20–24 **6** zu **8** erfolgte unter Verwendung von DCCI und – um die Ausbeute zu steigern – N-Hydroxysuccinimid [14]. Die Benzyloxycarbonylgruppe wurde selektiv mittels katalytischer Hydrierung abgespalten. Zur analytischen Kontrolle und um ein für die Energieübertragungsversuche wichtiges Produkt zu erhalten (**9a** – mit dem Dansylrest, aber ohne Tryptophan) wurde das erhaltene, geschützte Tetradekapeptid 11–24 **9** mittels Trifluoressigsäure von den restlichen Schutzgruppen befreit; **9a** ist dünnschichtchromatographisch und spektroskopisch rein und gibt eine richtige Aminosäureanalyse. Das aus **9** mit Boc·Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBu<sup>t</sup>)-His-Phe-Arg-Trp-Gly·OH [15] gewonnene, vollständig geschützte Tetrakosipeptid **10** wurde mittels Gegenstromverteilung gereinigt. Dabei zeigte es sich, dass die Dansylgruppe leicht oxydativ zerstört wird, falls man nicht unter

Stickstoff und in der Dunkelheit arbeitet. Aus den reinen Fraktionen von **10** wurden die Schutzgruppen mit Trifluoressigsäure [10] entfernt. Das N<sup>ε</sup>-Dansyllysin<sup>21</sup>-adrenocorticotropin-(1–24)-tetrakosipeptid (**1**) wurde (nach Austausch von Trifluoressigsäure gegen Essigsäure) als reines Hexaacetat erhalten. Sowohl **10** als auch **1** konnten in die entsprechenden Sulfoxide übergeführt werden: diese erwiesen sich als verschieden von den Photooxydationsprodukten.

Schema 2. Aufbau der Sequenz 1–24

		Aminosäurenanalyse <sup>4)</sup>			
<b>7</b>	Z·Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)- 11 Arg-Arg-Pro-OH, HCl 17 19	Arg 2,00 (2) Pro 1,96 (2)	Gly 0,90 (1) Val 0,84 (1)	Lys 3,63 (3)	
<b>8</b>	Z·Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg- 11 Arg-Pro-Val-Lys(DNS)-Val-Tyr-Pro-OBu <sup>t</sup> , 2HCl 19 20 24				
<b>9</b>	H·Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg- 11 Arg-Pro-Val-Lys(DNS)-Val-Tyr-Pro-OBu <sup>t</sup> , 2HCl 24				
<b>9a</b>	H·Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val- 11 Lys(DNS)-Val-Tyr-Pro-OH, 5 CH <sub>3</sub> OOH 24	Arg 2,03 (2) Pro 2,95 (3)	Gly 1,00 (1) Val 3,00 (3)	Lys 3,21 (3) Tyr 0,95 (1)	NH <sub>3</sub> 0,88 (0)
<b>10</b>	Boc·Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBu <sup>t</sup> )-His-Phe-Arg- 1 Trp-Gly-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)- 10 Arg-Arg-Pro-Val-Lys(DNS)-Val-Tyr-Pro-OBu <sup>t</sup> , 20 24 3HCl				
<b>1</b>	H·Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly- 1 10 Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val- 20 Lys(DNS)-Val-Tyr-Pro-OH, 6 CH <sub>3</sub> COOH 24	Arg 3,00 (3) His 0,89 (1)	Glu 1,00 (1) Lys 3,12 (3) Pro 2,92 (3) Val 2,96 (3)	Gly 1,92 (2) Met 0,91 (1) Ser 1,71 (2)	6 CH <sub>3</sub> COOH 10,4% (11,4%)

### Experimenteller Teil

Smp. wurden auf einem Automaten der Firma *Mettler* (Modell FP 1) gemessen und sind unkorrigiert. Analysen verdanken wir den Analytischen Laboratorien und dem Chromatographie-labor der *CIBA-Aktiengesellschaft*, Basel (Leitung: Dr. *W. Padowetz* und Herr *E. von Arx*).

*Dünnschichtchromatographische Reinheitskontrollen.* – Träger:

- S: Kieselgel (Fertigplatten Kieselgel F 254 der Firma *Merck AG.*, Darmstadt);
- A: Aluminiumoxid (D-0 der Firma *CAMAG*, Muttenz, mit Zusatz von 12% Gips);
- C: Cellulose (Avicel Fertigplatten 1440 der Firma *Schleicher & Schuell*).

<sup>4)</sup> Bezugsamino-säure *kursiv*; ber. Werte in Klammern; Hydrolyse 20 Std., 110°, 6 N HCl; Essigsäure gas-chromatographisch bestimmt.

Zusammensetzung der Fliessmittel (Volumenteile):

CM 1	Chloroform-Methanol	9 + 1
BEW 1	2-Butanol-Essigsäure-Wasser	67 + 10 + 23
EPW 1	Essigester-Pyridin-Wasser	20 + 10 + 11
BPEW 1	1-Butanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser	38 + 24 + 8 + 30
BPEW 2	1-Butanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser	42 + 24 + 4 + 30
BPEW 3	1-Butanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser	30 + 20 + 6 + 24
EPAW 1	Essigester-Pyridin-Ameisensäure-Wasser	63 + 21 + 10 + 6
EPEW 1	Essigester-Pyridin-Essigsäure-Wasser	62 + 21 + 6 + 11
EBPEW 1	Essigester-1-Butanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser	42 + 24 + 21 + 6 + 10

Die Platten wurden mit *Reindel-Hoppe*-, *Sakaguchi*-, *Pauly*- und *Ninhydrin*-Reagens angefärbt.

Die *Ultraviolett-Spektren* wurden mit einem Spektrophotometer *Beckman*, Modell DK 2A, aufgenommen.

**2.** – 2,80 g (10 mMol) Z-Lys-OH wurden in 50 ml H<sub>2</sub>O gelöst und das pH mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung auf 9 gestellt. Zu dieser Lösung wurde bei Raumtemperatur eine Lösung von 6,75 g (25 mMol) Dansylchlorid in 50 ml Aceton im Verlaufe von 5 Min. getropft. Nachdem sich anfänglich orange, zähflüssige Klumpen gebildet hatten, resultierte nach 2 Std. eine hellgelbe Suspension, die noch 15 Std. bei Raumtemperatur gerührt wurde. Das ganze Gemisch wurde dann eingedampft und der Rückstand in 100 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Lösung wurde mit 2N HCl auf pH 6 gebracht und dreimal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterextrakte wurden mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Das erhaltene Produkt wurde aus Benzol-Petroläther umgefällt: 4,15 g (81% d. Th.) **2**, amorph, Rf (S) = 0,60 (BPEW 1).

**3.** – Eine Lösung von 617 mg (1,2 mMol) **2** und 520 mg (1,2 mMol) H-Val-Tyr-Pro-OBu<sup>t</sup> [11] in 5 ml Acetonitril wurde mit 297 mg (1,44 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt und zunächst 30 Min. bei 0° und dann 16 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Kühlen auf 0° wurde vom Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Filtrat abgedampft und der amorphe Rückstand an der 60fachen Menge Kieselgel chromatographiert, wobei das Tetrapeptidderivat **3** sich mit Chloroform-Methanol 19 + 1 (Vol.-Tl.) eluieren liess. Das ebenfalls amorphe, dünn-schichtchromatographisch einheitliche Produkt wurde aus Essigester-Petroläther umgefällt: 722 mg (65%). Rf (S) = 0,61 (CM 1); 0,80 (BPEW 3).

**4.** – Eine Lösung von 4,7 g (5,06 mMol) **3** in 20 ml Methanol wurde nach Zugabe von 900 mg Palladium-Kohle (10% Pd) in der Schüttelante unter Absorption des gebildeten CO<sub>2</sub> 5 Std. lang hydriert. Hierauf wurde vom Katalysator abfiltriert, das Filtrat abgedampft und der Rückstand (3,35 g) an der 70fachen Menge Kieselgel chromatographiert, wobei **4** mit Chloroform-Methanol 19 + 1 (Vol.-Tl.) eluiert wurde. Nach zweimaliger Umfällung aus Essigester-Petroläther erhielt man 1,76 g (44%) amorphes, aber dünn-schichtchromatographisch einheitliches Produkt: Rf (S) = 0,21 (CM 1); 0,66 (BPEW 3).

**5.** – 1,20 g (1,51 mMol) **4** und 0,675 g (1,81 mMol) Z-Val-ONp wurden in 6 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst. Nach 15 Std. Rühren bei Raumtemp. wurde die Lösung im Vakuum auf 1 ml eingengt und mit Äther im Überschuss versetzt. Die erhaltene Fällung wurde abgenutscht und wiederholt mit Äther verrieben: 1,32 g **5** (85%), amorph. Rf (S) = 0,62 (CM 1); 0,87 (BPEW 3).

**6.** – 1,046 g **5** wurden in 50 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 400 mg Palladiumkohle (10% Pd) während 4 Std. hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert, das Filtrat abgedampft und der Rückstand zweimal mit Äther verrieben: 808 mg (91% **6**, amorph. Rf (S) = 0,32 (CM 1); 0,76 (BPEW 3).

**7.** – 4,55 g (4,12 mMol) Z-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-NHNH<sub>2</sub> [12] wurden bei Raumtemperatur in 40 ml DMF gelöst. Die klare Lösung wurde bei – 15° unter gutem Rühren innerhalb von 10 Min. mit 8,25 ml (16,5 mMol) eiskalter 2N HCl versetzt. Hierauf liess man bei – 10° 0,91 ml (4,55 mMol) 5N NaNO<sub>2</sub>-Lösung zutropfen und rührte noch 15 Min. weiter. Die Azidlösung wurde darauf mit einer Lösung von 1,60 g (3,45 mMol) H-Arg-Arg-Pro-OH, 2HCl [16] in 50 ml DMF-Wasser (5:1) bei – 10° vereinigt. Zu dieser Mischung wurden 2,65 ml (18,9 mMol) Triäthylamin getropft. Nach 16 Std. bei 0° wurde die Lösung im Hochvakuum abgedampft. Der Rückstand wurde mit 50 ml Essigester verrieben und dann portionenweise abgenutscht, wobei

jeweilen sofort mit Äther nachgewaschen wurde. Das amorphe Produkt wurde in 15 ml Chloroform aufgenommen. Nach Abfiltrieren von 300 mg unlöslicher Substanz und Einengen auf 5 ml wurde die klare Lösung an der 50fachen Menge Kieselgel chromatographiert, wobei sich das Nonapeptid mit Chloroform-Methanol 4:1 eluieren liess: 3,36 g (63%) amorphes **7**, dünn-schichtchromatographisch einheitlich. Rf (S) = 0,52 (EPW 1); 0,36 (BEW 1).

**8.** – 230 mg (0,150 mMol) **7** wurden in 1 ml DMF gelöst. Nach Zutropfen von 0,15 ml 1N HCl wurden 98 mg (0,11 mMol) **6** und 21,5 mg (0,187 mMol) N-Hydroxysuccinimid zugegeben. Die Mischung wurde dann auf 10° gekühlt und mit 47,5 mg (0,232 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt. Nach 8stdg. Rühren bei 40° wurde in der Kälte vom ausgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Filtrat im Hochvakuum eingengt und mit Äther im Überschuss gefällt. Das amorphe Rohprodukt wurde an der 50fachen Menge Kieselgel chromatographiert, wobei nach gründlichem Waschen mit Chloroform das Tetradecapeptid-Derivat mit Chloroform-Methanol 4:1 eluiert wurde: 156 mg (58%) amorphes, dünn-schichtchromatographisch einheitliches **8**. Rf (S) = 0,39 (EPEW 1); 0,54 (BEW 1); 0,52 (EPW 1).  $\lambda_{max}$  = 335 nm,  $\epsilon$  = 4180 (EtOH).

**9.** – 280 mg (0,115 mMol) **8** wurden in 20 ml Methanol gelöst und in Gegenwart von 50 mg 10-proz. Pd-Kohle 5 Std. bei Raumtemp. hydriert (Auffangen des CO<sub>2</sub> über Kalilauge). Hierauf wurden nochmals 30 mg Katalysator beigefügt und während 3 Std. weiterhydriert. Anschliessend filtrierte man die Lösung und dampfte sie im Vakuum ein. Der Rückstand wurde einmal aus DMF-Äther umgefällt: 252 mg (95%) amorphes Produkt, welches nach Dünn-schichtchromatogramm noch eine geringe Spur von unverändertem Ausgangsprodukt **8** enthielt. Durch Chromatographie an Sephadex LH 20 mit Methanol konnte das Hydrierungsprodukt **9** vom Ausgangsmaterial getrennt werden: 234 mg (88%) amorphes, dünn-schichtchromatographisch einheitliches Produkt. Rf (S) = 0,19 (EPEW 1); 0,45 (BEW 1).  $\lambda_{max}$  = 335 nm,  $\epsilon$  = 4100 (EtOH).

**9a.** – 20 mg (0,009 mMol) **9** wurden in 0,5 ml 90-proz. Trifluoressigsäure gelöst. Nach 25 Min. Stehen bei Raumtemperatur wurde mit Äther im Überschuss gefällt. Die Fällung wurde abzentrifugiert, zweimal mit Äther gewaschen, in 1-proz. Essigsäure gelöst und die Lösung durch eine Ionenaustauschersäule (Merck II, schwach basisch) in der Acetatform filtriert. Das Filtrat wurde direkt lyophilisiert: 17 mg (90%) dünn-schichtchromatographisch einheitliches **9a**: Rf (A) = 0,53 (BPEW 1), 0,41 (BPEW 2); Rf (C) = 0,50 (BPEW 1). Elektrophorese auf «Avicel Fertigplatten 1440» (1 Std./300 V), Laufstrecken: – 6,0 cm (pH 1,9), – 4,2 cm (pH 6,5), – 3,7 cm (pH 9,1).  $\lambda_{max}$  = 327 nm,  $\epsilon$  = 3790 (H<sub>2</sub>O), Peptidgehalt: 84% (aus UV.-Spektrum berechnet).

**10.** – Zu einer Suspension von 265 mg (0,182 mMol) geschütztem Decapeptid-Derivat 1–10 [15] in 3 ml entgastem DMF wurden bei 0° 0,19 ml 1N HCl getropft. Die gebildete klare, leicht gelbliche Lösung wurde mit einer Lösung von 300 mg (0,125 mMol) reinem Tetradecapeptid-Derivat **9** in 3 ml DMF bei Raumtemperatur versetzt. Nach Zugabe von 27 mg (0,200 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol [17] hat man die Temp. auf 45° erhöht und dann 56 mg (0,273 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid zugesetzt. Nach 17stdg. Rühren bei 45° wurde in der Kälte vom Harnstoff abfiltriert, das Filtrat im Hochvakuum stark eingengt und schliesslich mit einem Überschuss von eiskaltem, peroxidfreiem Äther gefällt. Das Rohprodukt wurde durch multiplikative Verteilung im System Methanol-Puffer-Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff (8:4:5:2 Vol; Puffer: 14,3 ml Eisessig + 9,62 g Ammoniumacetat + 480 ml Wasser) unter Ausschluss von Licht bei ständiger Stickstoffzufuhr über 380 Schritte gereinigt. Nach Dünn-schichtchromatographie enthielten die Elemente 75–90 reines Produkt ( $K$  = 0,22). Diese Phasen wurden vereinigt und nach Zugabe von wenigen Tropfen Octanol im Vakuum bei 40° eingedampft. Anschliessend wurde das noch vorhandene Ammoniumacetat bei 40° im Hochvakuum wegsublimiert, der Rückstand in *t*-Butylalkohol aufgenommen und diese Lösung lyophilisiert: 218 mg (43%) amorphes, hellgelbes Produkt.  $\lambda_{max}$  = 335 nm,  $\epsilon$  = 4020 (EtOH). Rf (A) = 0,71 (EPAW 1), 0,37 (EBPEW 1).

*Oxydationsprodukt von 10*: Behandlung mit 30-proz. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung in CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (5:10:1) lieferte das *Met*<sup>4</sup>-sulfoxid-Derivat von **10**. Dünn-schichtchromatographisch einheitlich: Rf (A) = 0,60 (EPAW 1), 0,21 (EBPEW 1).

**1.** – 210 mg (0,055 mMol) reines, geschütztes Tetrakosipeptid-Derivat **10** wurden in 3 ml frisch zubereiteter 90-proz. Trifluoressigsäure gelöst und 20 Min. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Hierauf wurde mit eiskaltem, peroxidfreiem Äther im Überschuss gefällt. Die abzentrifugierte Fällung, in 1-proz. Essigsäure gelöst, wurde durch eine Ionenaustauschersäule (Merck II, schwach

basisch) in der Acetatform filtriert. Das Filtrat wurde lyophilisiert und der Rückstand bis zur Gewichtskonstanz an der Luft stehengelassen: 175 mg (91%) **1** als hellgelbes Pulver:  $\lambda_{max} = 327$  nm,  $\epsilon = 3850$  (H<sub>2</sub>O). Peptidgehalt: 84,5% (aus UV.-Spektrum berechnet). Dünnschichtchromatographisch einheitlich: Rf (A) = 0,47 (BPEW 2), 0,58 (EBPEW 1); Rf (C) = 0,61 (EPEW1). Elektrophorese auf «Avicel-Fertigplatten 1440» (1 Std./300 V), Laufstrecken: – 5,6 cm (pH 1,9), – 2,5 cm (pH 6,5), – 0,8 cm (pH 9,1).

*Oxydationsprodukt von 1*: Das *Met<sup>4</sup>-sulfoxid-Derivat von 1* wurde in gleicher Weise wie dasjenige von **10** erhalten: Rf (A) = 0,45 (BPEW 2), 0,57 (EBPEW 1); Rf (C) = 0,59 (EPEW 1).

Diese Arbeit wurde vom *Schweiz. Nationalfonds* (Ges. Nr. 4883) unterstützt; sie ist ein Teil der Dissertation von *P. Schiller*. Herrn Dr. *W. Rittel*, *CIBA-GEIGY AG.*, Basel, danken wir für die gewährte Gastfreundschaft während einzelner Phasen der Experimente.

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *R. Schwyzer* in «Proc. First Internat. Pharmacol. Meeting» 7, 203, Pergamon, Oxford 1963.
  - [2] *J. Frank & R. Schwyzer*, *Experientia* 26, 1207 (1970); *P. G. Waser, A. Hofmann & W. Hopff*, *ibid.* 26, 1342 (1970).
  - [3] *B. R. Baker*, «Design of Active-Site-Directed Irreversible Enzyme Inhibitors», John Wiley, New York 1967; *S. J. Singer*, *Advances Protein Chemistry* 22, 1 (1967).
  - [4] *R. Schwyzer*, *Ergebn. Physiol.* 53, 1 (1963); *Annu. Rev. Biochem.* 33, 259 (1964); *Excerpta Medica*, Intern. Congr., Ser. No. 161, 201 (1968); *J. mond. Pharmac. 1968*, 254; *Proc. Fourth. Intern. Congr. on Pharmacology*, Vol. 5, 196 (1970).
  - [5] *R. Schwyzer & H. Kappeler*, *Helv.* 46, 1550 (1963).
  - [6] *R. L. Swallow & G. Sayers*, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 131, 1 (1969).
  - [7] *M. Saffran & A. V. Schally*, *Canad. J. Biochem. Physiol.* 33, 408 (1955).
  - [8] *P. G. Squire*, *Int. J. Protein Res.* 1, 141 (1969).
  - [9] *R. Schwyzer & P. W. Schiller* in «Proc. of the Colloquium on the Role of Adenyl Cyclase and Cyclic 3',5'-AMP in Biological Systems», John E. Fogarty Intern. Center for Advanced Studies in the Health Sciences, Bethesda, Md., USA, Nov. 18–19, 1969; *R. Schwyzer*, *Experientia* 26, 577 (1970); *P. W. Schiller & R. Schwyzer*, *Chimia* 24, 458 (1970).
  - [10] *R. Schwyzer, W. Rittel, H. Kappeler & B. Iselin*, *Angew. Chem.* 72, 915 (1960); *R. Schwyzer & P. Sieber*, *Helv.* 49, 134 (1966); *R. Schwyzer*, *Naturwiss.* 53, 189 (1966).
  - [11] *R. Schwyzer, B. Riniker & H. Kappeler*, *Helv.* 46, 1541 (1963).
  - [12] *G. I. Tesser & R. Schwyzer*, *Helv.* 49, 1013 (1966).
  - [13] *D. S. Kemp, Z. Bernstein & J. Rebek, jr.*, *J. Amer. chem. Soc.* 92, 4756 (1970).
  - [14] *F. Weygand, D. Hoffmann & E. Wünsch*, *Z. Naturforsch.* 21b, 426 (1966); *E. Wünsch & F. Drees*, *Chem. Ber.* 99, 110 (1966); *J. E. Zimmermann & G. W. Anderson*, *J. Amer. chem. Soc.* 89, 7151 (1967).
  - [15] *R. Schwyzer & H. Kappeler*, *Helv.* 44, 1991 (1961).
  - [16] *W. Rittel*, *Helv.* 45, 2465 (1962), und persönliche Mitteilungen.
  - [17] *W. König & R. Geiger*, *Chem. Ber.* 103, 788 (1970).
-