

128. Synthese von lipophil substituierten ACTH-Peptiden

von M. Brugger

Chemische Forschungslaboratorien der Division Pharmazeutika der CIBA-GEIGY AG., Basel

(20. IV. 71)

Summary. With a view to rendering ACTH peptides absorbable by the oral route, a series of such peptides with increased lipophilic character was built up. This paper describes the synthesis of eleven derivatives of the ACTH peptide [D-Ser¹, Lys^{17,18}]- β -corticotrophin-(1–19)-nonadecapeptide, containing lipophilic alkyl substituents of different kinds and sizes, bound to the carboxyl of terminal proline either by ester or amide linkage.

The unsubstituted peptide [D-Ser¹, Lys^{17,18}]- β -corticotrophin-(1–19)-nonadecapeptide, and its C-terminal amide were also synthesized.

Das ACTH und seine physiologisch aktiven Abkömmlinge weisen einen ihre Verwendungsmöglichkeit einschränkenden Nachteil auf: Sie werden nicht in genügendem Mass enteral resorbiert und damit auf peroralem Weg für therapeutische Zwecke nicht ausreichend vom menschlichen Organismus aufgenommen¹⁾. Dafür können hauptsächlich zwei Gründe verantwortlich gemacht werden: 1. Die Polypeptidmolekeln werden im gastro-intestinalen Trakt enzymatisch abgebaut, bevor oder während sie die Darmwand passieren; 2. sie können ihrer ausgeprägt hydrophilen Natur wegen die Darmwand nicht durchdringen. Angesichts der zunehmenden therapeutischen Bedeutung synthetischer Peptidhormone rechtfertigt sich die auf die Möglichkeit der peroralen Applikation gezielte chemische Bearbeitung dieses Problemkreises.

Zur Abwehr enzymatischer Abbaureaktionen des Magen-Darm-Traktes wurde vorgeschlagen, schützende Hilfsstoffe beizumengen (z. B. Enzyminhibitoren [1]). Bei den Peptidhormonen hat dieser Weg jedoch nicht über erste Ansätze hinausgeführt. Mehr Erfolg versprechen Versuche, die Peptidmolekeln selbst dermassen abzuwandeln, dass sie gegen Enzymabbau resistent werden. Denkbar sind zu diesem Zweck verschiedene Varianten chemischer Veränderung, so beispielsweise Austausch von L-Aminosäuren durch deren D-Enantiomere, Einsatz von N-Methylaminosäuren, Schutz des Carboxylendes durch die Carboxamidgruppe oder Decarboxylierung.

ACTH-Molekeln mit solchen Abwandlungen sind bereits bekanntgeworden [2] [3] [4]. Ihre erhöhte Resistenz gegen enzymatischen Abbau manifestierte sich in einer verlängerten Wirkungs-dauer bei parenteraler Applikation. Gerade bei ACTH-Peptiden dürften jedoch für eine vollständige Resistenz gegen Peptidasen chemische Modifikationen im «aktiven Bereich» [5] notwendig sein. Dabei ist mit einer gravierenden Beeinträchtigung der biologischen Aktivität zu rechnen.

Die zweite Voraussetzung für die perorale Anwendbarkeit von Peptidhormonen ist deren Fähigkeit, die Darmwand durchdringen zu können. Die Permeationsfähigkeit durch die Darmwand hängt allgemein stark von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Pharmaka ab (vgl. Übersichten bei [6] [7]).

Fettlösliche Stoffe werden normalerweise mittels passiver Diffusion durch die Darmepithelzellen resorbiert. Fettlöslichkeit und Ionisationsgrad sind dabei wichtige Faktoren. Lipophile, ungeladene Stoffe werden rascher resorbiert als hydrophile, ionische. In homologen Reihen (z. B. bei alkylsubstituierten Barbituraten, s. *Schanke* [8]), ist mehrfach eine ausgezeichnete Korrelation

¹⁾ Auf Grund von Untersuchungen der medizinischen Abteilung der CIBA-GEIGY AG., Basel. Herrn Dr. R. Deguillaume sei für die Information bestens gedankt.

zwischen Absorptionsgeschwindigkeit und Verteilungskoeffizient zwischen lipoider und wässriger Phase beobachtet worden.

Hydrophilen, lipoidunlöslichen Stoffen steht daneben der «wässrige» Weg durch wasserführende Poren in der Darmwand offen. Im Vergleich zur Stoffaufnahme durch die lipoiden Membran hat der wässrige Weg eine wesentlich geringere Kapazität, vor allem für Pharmaka hohen Molekulargewichts. Auch diese Penetration ist eine passive Diffusion (auf aktive Transportvorgänge soll hier nicht eingegangen werden). In diesem Zusammenhang mag die beobachtete geringe enterale Resorption von *Insulin* bei Ratten interessieren ([9]).

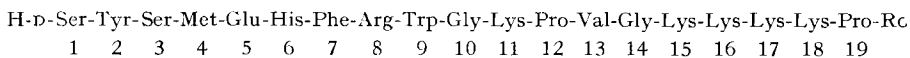
Es wurde nun versucht, die enterale Resorptionsfähigkeit von ACTH-Peptiden durch Erhöhung ihres lipophilen Charakters zu fördern. Dies erschien auf einfache Weise durch Einführen von lipophilen Alkylresten realisierbar.

In der vorliegenden Arbeit wird die Synthese von Peptiden beschrieben, welche aus einer speziellen Aminosäuresequenz des ACTH mit einem am Carboxylende²⁾ eingeführten, verschiedentlich variierten Alkylrest bestehen. Gleichzeitig wurde das gewählte Grundpeptid in seiner unsubstituierten Form und als C-terminales Amid synthetisiert.

Als Modell wurde die synthetisch eindeutig zugängliche [D-Ser¹, Lys^{17,18}]- β -Corticotropin-(1-19)-nonadecapeptid-Sequenz³⁾ (XI, Ro = OH) gewählt (Schema 1). Dies einerseits darum, weil das zugrundeliegende Neunzehnerpeptidamid mit der natürlichen Sequenz 1-19 bereits praktisch volle nebennierenstimulierende Aktivität aufweist [11]. Andererseits haben verschiedene Autoren darauf hingewiesen, dass der Ersatz von L- durch D-Serin in Stellung 1 an synthetischen ACTH-Fragmenten verschiedener Kettenlänge, deren Wirkung erheblich verstärkt [2] [12] [13]. Diese verstärkte Wirkung wurde noch erhöht und verlängert durch den gleichzeitigen Ersatz der beiden Argininreste in Stellung 17 und 18 durch Lysin [4] [14]. Das dem Modell zugrunde liegende [D-Ser¹, Lys^{17,18}]- β -Corticotropin-(1-19)-nonadecapeptid XIh, (XI, Ro = OH) und sein entsprechendes C-terminales Amid XIa (XI, Ro = NH₂) sind dementsprechend corticotrop hochaktiv⁴⁾.

Die gewählte Nonadecapeptidsequenz eignet sich dieser hohen Aktivität wegen vorzüglich für die geplanten Versuche, können doch so noch mit kleinen Mengen resorbierten Wirkstoffs messbare biologische Effekte erzielt werden.

Schema 1. [D-Ser¹, Lys^{17,18}]- β -Corticotropin-(1-19)-nonadecapeptid-Ro (XI, Ro = -OAlkyl oder -NHAlkyl)



Da *a priori* keine Voraussagen über die für die gewünschte Wirkung erforderlichen Eigenschaften von lipophilen Substituenten gemacht werden konnten, wurden diese innerhalb gewisser Grenzen variiert. Aus der Palette einfach zugänglicher Alkylreste verschiedener Länge wählte man gerad- und ungeradzahlige, sowie normale und verzweigte Ketten mit primären oder sekundären Verknüpfungsstellen. Diese Alkylreste wurden amid- oder esterartig mit dem C-terminalen Prolin des Peptids verbunden (Substituenten Ro, s. Tabelle 1).

²⁾ Über ACTH-Peptide mit an anderen Stellen eingeführten Alkylresten soll später berichtet werden.

³⁾ Nomenklatur und Abkürzungen: Siehe [10].

⁴⁾ Nicht veröffentlichte Resultate.

Tabelle 1. Zusammenstellung der eingeführten Alkylsubstituenten -Ro

Amid-Ro	Ester-Ro
a = $-\text{NH}_2$	h = $-\text{OH}$ ($-\text{OBut}$ für Zwischenprodukte)
b = $-\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$	i = $-\text{O}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$
c = $-\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$	k = $-\text{O}(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$
d = $-\text{NH}(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$	l = $-\text{O}(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$
e = $-\text{N}[(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3]_2$	m = $-\text{O}(\text{CH}_2)_{23}\text{CH}_3$
f = $-\text{NH}(\text{CH}_2)_{23}\text{CH}_3$	n = $-\text{OCH}[(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3]_2$
g = $-\text{NHCH}[(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3]_2$	

Biologische Aktivität⁵⁾. – Die Prüfung der nebennierenstimulierenden Aktivität erfolgte an hypophysectomierten Ratten *in vivo* nach einer kürzlich beschriebenen Versuchsanordnung [16]. Nach peroraler Verabreichung in hohen Dosen war bei verschiedenen Derivaten (vor allem bei XI d, XI k und XI l) corticotrope Aktivität eindeutig nachweisbar. Hingegen zeigte sich eine Aktivität ähnlicher Grössenordnung auch beim nicht lipophilisierten Referenzpeptid XI h.

Dieses Ergebnis ist in zweierlei Hinsicht bemerkenswert: Erstens zeigt es, dass ACTH-Peptide mit hohem Molekulargewicht (die untersuchten Derivate haben ein Molekulargewicht von ca. 2300) von der Rattendarmwand resorbiert werden können. Zweitens haben die Alkylsubstituenten in der verwendeten Testieranordnung keinen messbaren Einfluss auf die Resorptionsfähigkeit ausgeübt, obwohl die physikalisch-chemischen Eigenschaften der alkylsubstituierten Derivate deutlich zeigten, dass der lipophile Charakter durch die Substitution erhöht wurde (vgl. Figur). Der Schluss liegt nahe, dass der Permeationsweg für diese Peptide in wässrigem Medium verläuft (wasserführende Poren zwischen den Darmepithelzellen, vgl. [6]) und sich die Permeationsgeschwindigkeit demnach durch Erhöhung der Fettlöslichkeit der permeierenden Molekeln nicht beeinflussen lässt.

Bei subcutaner Gabe zeichnen sich einige der hergestellten Derivate (besonders XI d und XI k) durch eine hohe und stark verlängerte Aktivität aus. Ob diese Wirkungsverlängerung auf einer echten Vergrößerung der biologischen Halbwertszeit (s. [17]) der Molekel in Zirkulation oder auf einer langsamen sukzessiven Freisetzung des aktiven Wirkstoffs (innere Depotform) beruht, bleibe dahingestellt (*Bernardi et al.* haben einen ähnlichen Effekt bei substituierten *Eledoisin*-Peptiden gefunden [18]).

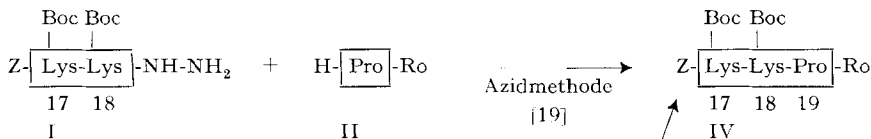
Synthese. – Die neuen Verbindungen wurden alle nach dem Schema 3 synthetisiert, und zwar mit Hilfe bekannter, schon früher mit Erfolg zum Aufbau von ACTH-Peptiden entwickelter Methoden [4] [13]. Aus dem bekannten Teilstück 11–16 (VI) [4] und den die Alkylgruppe am Carboxylende tragenden Tripeptidderivaten 17–19 (Va–n) stellte man die Fragmente 11–19 (IX a–n) her, welche mit der früher beschriebenen Sequenz 1–10 (VIII) [12] gekuppelt wurden. Auf diese Weise erhielt man die geschützten Nonadcapeptide (Xa–n). In diesen waren die α -Amino- und die Seitenketten-Aminogruppen der Lysinreste durch die Boc-Gruppe, die β -Carboxylgruppe des Glutaminsäurerestes sowie die endständige Carboxylgruppe bei Derivat X h als *t*-Butylester ($-\text{OBut}$) [10] und die Guanidinogruppe des Arginins durch Protonierung ge-

⁵⁾ Die Ergebnisse der biologischen Auswertung werden in Kürze im Detail andernorts veröffentlicht (siehe auch [15]). Wir danken den Herren Dres. *P. A. Desaulles*, *P. Barthe* und *D. Raps* bestens für die Durchführung der biologischen Prüfungen.

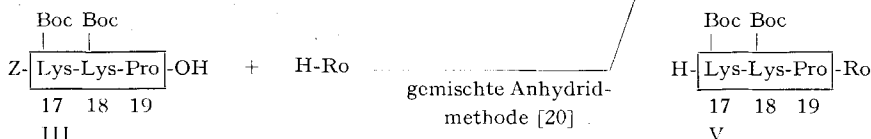
schützt. Alle übrigen Seitenketten blieben ungeschützt. Die Alkylreste wurden bei der Reihe der Ester IIh–n und bei IIc und II d auf der Stufe des Prolins eingeführt (Methode A), bei den übrigen Vertretern der Amidreihe jedoch direkt an das Tripeptidderivat III ankondensiert (Methode B; s. Schema 2).

Schema 2. *Synthese der geschützten Sequenz 17–19*

Methode A:



Methode B:



Aufbau der geschützten Nonadecapeptidsequenz X. – *Sequenz 17–19 (V)* (Schema 2), *Methode A*: Das aus dem entsprechenden Methylester [23] erhaltene, kristalline Hydrazid Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-NHNH₂ (I) wurde nach *Honzl & Rudinger* [19] in das Azid übergeführt und mit H-Pro-Ro (II, vgl. Tabelle 1) zu den geschützten Tripeptiden IVc,d,h-n umgesetzt. Katalytische Hydrierung führte zu Vc,d,h-n. Die Prolinester IIi-n erhielt man durch säurekatalysierte Veresterung von L-Prolin mit den entsprechenden Alkanolen, die Prolinalkylamide IIc und II d wurden durch Umsatz von Z-Pro-OH mit Decyl- bzw. Hexadecylamin nach der Carbodiimid-Methode und anschließende katalytische Hydrierung gewonnen.

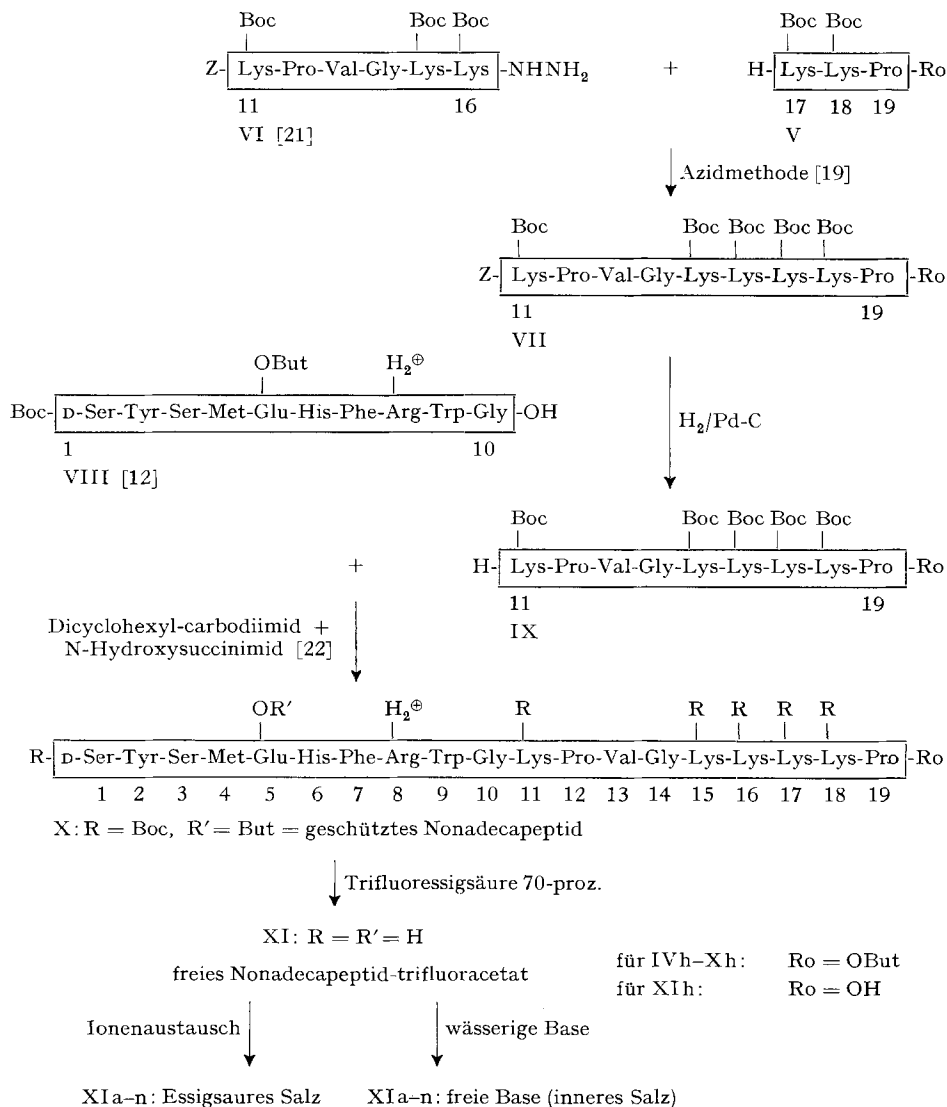
Methode B: Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-OH (III), welches aus dem Azid von I und freiem Prolin in wässrig-organischem Milieu hergestellt werden konnte, wurde mit den entsprechenden Alkylaminen H-Ro a,b und e–g nach der Methode der gemischten Anhydride zu den geschützten Tripeptid-N-alkylamiden IV kondensiert, und diese durch katalytische Hydrierung von der Benzyloxycarbonylgruppe befreit.

Sequenz 11–19 (IX): Wie in Schema 3 dargestellt, wurde das Hexapeptidhydrazid VI [4] [12] [21] nach der Azidmethode [19] mit den Tripeptidderivaten V zu der geschützten Nonapeptidsequenz VII, die nun am Carboxylende die verschiedenen Alkylreste trug, umgesetzt. Die Fragmente VII wurden durch Umfällen aus Methanol-Wasser-Gemischen oder durch Säulenchromatographie gereinigt, wobei die meisten in kristalliner Form analysenrein gewonnen wurden. Katalytische Hydrierung ergab die dünnschichtchromatographisch einheitlichen Derivate IX, welche meist mit einem durch Trocknen im Hochvakuum bei 50° nicht entfernbaren Äquivalent Wasser kristallisierten.

Geschützte Sequenz 1–19 (X): Die Fragmente 1–10 (VIII) [12] und 11–19 (IX) wurden mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von N-Hydroxysuccinimid [22] zu den geschützten Nonadecapeptid-Alkylderivaten X kondensiert. Diese wurden durch multiplikative Verteilung gereinigt.

[D-Ser¹, Lys^{17,18}]-β-Corticotropin-(1–19)-nonadecapeptid-alkylester und -alkylamide XI. – Die Boc- und -OBut-Schutzgruppen von X wurden gleichzeitig mit 70-proz. Trifluoressigsäure abgespalten; anschliessend wurden die Trifluoracetat-Anionen gegen Acetat-Anionen ausgetauscht. Auf diese Weise erhielt man alle Nonadecapeptidderivate XIa–n als essigsäure Salze in Form amorpher Lyophil-

Schema 3. *Synthese der Nonadecapeptid-alkylderivate XIa-n*

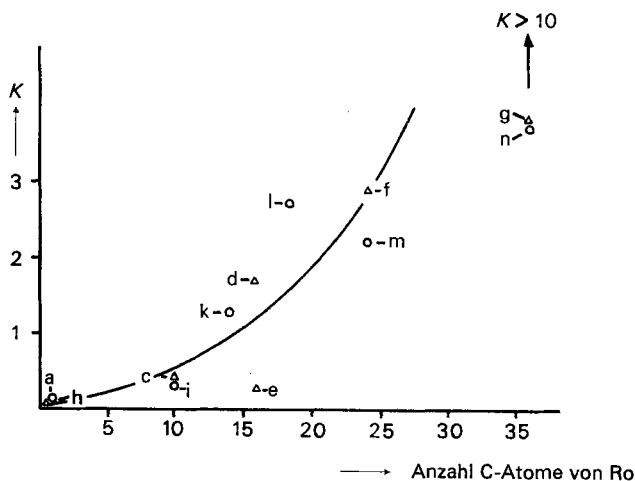


sate. Diese waren ausnahmslos gut löslich in Wasser (1% und mehr). Die Derivate mit einem Alkylrest von 10 C-Atomen und mehr (mit Ausnahme des Dioctylamids XIe) liessen sich aus ihrer wässrigen Lösung durch Zusatz von Base (z.B. verd. wässr. Ammoniak oder verd. Soda) ausfällen und bildeten dann amorphe, extrem wasserunlösliche Pulver, in denen mittels Gas-Chromatographie⁶⁾ keine Essigsäure mehr nachweisbar war. Die unlöslichen Formen dieser Peptide müssen demnach als freie Amine, bzw. innere Salze (Glu⁵-Arg⁸) vorliegen.

⁶⁾ Zur Technik vgl. [24], S. 1071, Fussnote 10.

Die analytischen Daten von XIa–n stimmten gut mit den angenommenen Strukturen überein. Die Aminosäureanalysen der Totalhydrolysate ergaben die erwarteten molaren Verhältnisse; die UV.-Spektren zeigten die Anwesenheit je eines Tyrosin- und Tryptophan-Restes an.

Der mit zunehmender Alkylkettenlänge verstärkte lipophile Charakter der Peptide XIb–g und XIi–n liess sich anhand der Verteilungskoeffizienten K im System n -Butanol/wässriger Puffer (Ammoniumacetatpuffer vom pH 6,9; dies ist der im Rattendünndarm gemessene pH-Wert) demonstrieren. Diese waren bei den unsubstituierten Peptiden XIa und XIh sehr klein und nahmen mit zunehmender Länge des Restes R_0 kontinuierlich zu (s. Figur). Die Verstärkung des lipophilen Charakters



Verteilungskoeffizienten K der Nonadecapeptide XIa–n im System n -Butanol/wässriger Ammoniumacetatpuffer vom pH 6,9 bei 24°

Δ = Amide \circ = Ester

zeigte sich auch in den zunehmenden Wanderungstrecken bei dünnenschichtchromatographischem Vergleich (s. Tab. 6).

Bei der Dünnschichtchromatographie auf Sephadex nahmen die Wanderungstrecken mit zunehmender Grösse des unverzweigten Alkylrestes kontinuierlich ab (s. Tab. 6). Dieser Effekt ist schwer zu erklären und nicht vom Molekulargewicht abhängig. Zudem lässt er sich bei dichotomer Verzweigung des Alkylsubstituenten nicht beobachten (vgl. Beispiel XIe, g, n).

Experimenteller Teil

Allgemeines. – Die *Smp.* sind auf einem Apparat nach Dr. Tottoli (d. Fa. Büchi, Flawil) im offenen Röhrchen bestimmt und sind unkorrigiert; Sinter- und Umwandlungspunkte sind in Klammern gesetzt.

«*Übliche Aufarbeitung*» bedeutet: Aufnehmen im betr. Lösungsmittel, Waschen (mit Eiszugabe) mit verd. Zitronensäurelösung, verd. Sodalösung, halbgesättigter Kochsalzlösung, Trocknen über Natriumsulfat, Filtrieren und Eindampfen.

Katalytische Hydrierungen zur Entfernung der Z-Gruppe unter «üblichen Bedingungen» bedeutet: Schütteln der im betr. Lösungsmittel gelösten Substanz mit 10–20 Gew.-% Pd-Kohle

(10% Pd) in H₂-Atmosphäre (25°/~840 Torr). Das entstehende CO₂ wurde dabei in einem zweiten, mit KOH gefüllten Hydriergefäss aufgefangen. Nach Beendigung der H₂-Aufnahme wurde filtriert und eingedampft.

Für die *Gegenstromverteilungen* verwendete man eine automatische, nach dem *Craig*-Prinzip arbeitende Apparatur. Gearbeitet wurde mit gleich grossen Ober- wie Unterphasenvolumina im thermostatierten Raum bei 21–22°. Definitionen von *K*- und *r*-Werten s. [25].

Chromatographische Reinheitskontrollen: Alle Rf-Werte beziehen sich auf *Dünnschichtchromatographien*. Es fanden folgende Trägermaterialien Verwendung:

- S: Kieselgel (Fertigplatten SL 254 der Fa. *Antec*, Birsfelden)
 A: Aluminiumoxid: (D-O der Fa. *Camag*, Muttenz, mit Zusatz von 8% Gips) und
 C: Cellulose (Avicel-Fertigplatten 1440 der Fa. *Schleicher & Schüll* oder DC-Fertigplatten Cellulose der Fa. *Merck*)
 Se: Sephadex® G-25 superfine (der Fa. *Pharmacia*, Uppsala). Fliessmittel für Sephadex-Platten: 0,1M Ameisensäure, Entwicklung in absteigender Technik in geschlossener Kammer.

Die nachstehenden Lösungsmittelsysteme dienten als Fliessmittel (Verhältnisse in Volumenteilen):

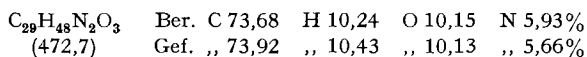
37:	1-Butanol-Pyridin-Wasser	46 + 31 + 23
40:	1-Butanol-Äthanol-Wasser	40 + 40 + 20
43 A:	<i>t</i> -Amylalkohol-2-Propanol-Wasser	67 + 26 + 7
43 C:	<i>t</i> -Amylalkohol-2-Propanol-Wasser	51 + 21 + 28
45:	2-Butanol-3-proz. wässr. Ammoniak	70 + 30
52:	1-Butanol-Essigsäure-Wasser	71 + 7 + 22
52 A:	1-Butanol-Essigsäure-Wasser	67 + 10 + 23
89:	Essigester-Aceton-Wasser	72 + 24 + 4
100:	Essigester-Pyridin-Essigsäure-Wasser	62 + 21 + 6 + 11
101:	1-Butanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser	38 + 24 + 8 + 30
102 A:	Essigester-2-Butanon-Ameisensäure-Wasser	50 + 30 + 10 + 10
102 E:	Essigester-2-Butanon-Essigsäure-Wasser	50 + 30 + 10 + 10
104:	Chloroform-Methanol-17-proz. Ammoniak	20 + 20 + 9
108:	Toluol-Aceton-Methanol-Essigsäure	70 + 5 + 20 + 5
111 B:	1-Butanol-Pyridin-konz. Ammoniak-Wasser	40 + 24 + 6 + 30
121:	2-Propanol-konz. Ammoniak-Wasser	70 + 10 + 20
121 A:	2-Propanol-konz. Ammoniak-Wasser	85 + 5 + 10

A: Aceton; Ae: Äthanol; C: Chloroform; Cy: Cyclohexan; E: Essigsäure-äthylester; M: Methanol; T: Toluol.

Die Anfärbung der Platten erfolgte mit *Reindel-Hoppe*-Reagens [26] oder mit spezifischen Farbreaktionen nach [27].

1. Beschreibung der Synthese von [D-Ser¹, Lys^{17,18}]-β-Corticotropin-(1-19)-nona-decapeptid-hexadecylamid [XI d] als Beispiel. Die übrigen Analogen XI a-c, e-n wurden nach derselben Vorschrift, nur in Details abweichend, aufgebaut.

1.1. *Z-Pro-NH(CH₂)₁₅CH₃* (*Z-II d*): 10,0 g (40,1 mMol) *Z-Pro-OH* und 9,2 g (38,2 mMol) Hexadecylamin wurden in 175 ml Methylchlorid bei 0° mit 8,7 g (42,2 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid in 25 ml desselben Lösungsmittels vermischt. Nach 1 Std. bei 0° und 21 Std. bei 24° gab man 1 ml Essigsäure zu und filtrierte nach 2 weiteren Stunden bei 0° vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab. Übliche Aufarbeitung des Filtrates in Essigester und Umkristallisation aus Methanol ergab 11,4 g (63% d. Th.) *Z-II d* vom Smp. 87–88°; $[\alpha]_D^{20} = -19^\circ$ ($c = 2,1$ in Dimethylformamid): Rf(S) = 0,65 (43C), 0,68 (45); IR. ($\tilde{\nu}$ Nujol) u. a.: 3270 (–NH), 1720 (Urethan), 1630 (Amid I), 1545 (Amid II) cm⁻¹.



1.2. *H-Pro-NH(CH₂)₁₅CH₃* (*II d*): 9,63 g (20,4 mMol) *Z-Pro-NH(CH₂)₁₅CH₃* wurden in 400 ml Methanol wie üblich hydriert. Das Rohprodukt (97%) liess sich aus 150 ml Hexan im Kühlschrank kristallisieren: 5,61 g (81%) kristallines *II d*; Smp. 56,8–57,3°.

IId-Hydrochlorid: Smp. 111–115°; $[\alpha]_D^{20} = -30^\circ$ ($c = 2,1$ in Dimethylformamid): Rf(S) = 0,49 (45), 0,48 (102A).

$C_{21}H_{42}N_2O$ (338,5) Ber. C 74,49 H 12,50 N 8,28% Gef. C 74,63 H 12,52 N 8,15%

1.3. *Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-NH(CH₂)₁₅CH₃* (IVd), nach Methode A: 6,81 g (10,9 mMol) *Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-NH-NH₂* (I⁷) wurden in 100 ml abs. Dimethylformamid bei –18° langsam mit 22 ml 2N wässriger Salzsäure versetzt. Nach Zugabe von 852 mg (12,3 mMol) in 5 ml Wasser frisch gelöstem Natriumnitrit spülte man mit 5 ml Wasser und rührte 10 Min. bei –10°. Zu der wasserklaren Lösung liess man 3,42 g (10,1 mMol) *H-Pro-NH(CH₂)₁₅CH₃* und 4,5 ml (32,4 mMol) Triäthylamin in 70 ml Chloroform einlaufen und nach einer Viertelstunde weitere 1,6 ml (11,5 mMol) Triäthylamin in 60 ml Chloroform. Man rührte über Nacht bei 24°, engte im Vakuum ein und arbeitete in Essigester wie üblich auf. Nach Filtration in Essigester durch Silicagel wurde eingedampft. Es verblieben 9,0 g (96%) klares Öl, welches durch Säulenchromatographie an Silicagel gereinigt wurde. Elution mit Toluol-Essigester 1:1 und Essigester lieferte das dünnschichtchromatographisch einheitliche IVd (61%), welches sich nun auch aus Hexan kristallisieren liess. Analytische Daten s. Tabelle 2, S. 1270.

$C_{51}H_{88}N_6O_9$ (929,3) Ber. C 65,92 H 9,55 N 9,04% Gef. C 66,20 H 9,69 N 9,22%

1.4. *H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-NH(CH₂)₁₅CH₃* (Vd): 8,8 g (9,4 mMol) *Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-NH-(CH₂)₁₅CH₃* wurden in 300 ml Methanol wie üblich hydriert. Man erhielt 6,4 g (86%) farbloses Öl, welches als solches in die nächste Kondensation eingesetzt wurde. Rf-Werte, s. Tabelle 2, S. 1270.

1.5. *Z-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-NH-(CH₂)₁₅CH₃* (VIId): 4,12 g (3,73 mMol) *Z-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-NH-NH₂* [21] wurden in 40 ml Dimethylformamid unter Stickstoff bei –16° mit 13 ml 1N Salzsäure tropfenweise versetzt. Dazu gab man 0,82 ml einer frisch bereiteten 5N Natriumnitritlösung und rührte 10 Min. bei –10 bis –12°. Zu der klaren Lösung gab man 3,12 g (3,92 mMol) *H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-NH-(CH₂)₁₅CH₃* und 1,81 ml (13 mMol) Triäthylamin in 60 ml Chloroform. Nach drei Std. bei 0° wurde über Nacht bei Zimmertemperatur weitergerührt, anschliessend im Vakuum eingengt und in Essigester wie üblich aufgearbeitet. Das Rohprodukt, ein dickes Öl, wurde an Silicagel chromatographiert. Die reinen Fraktionen liessen sich mit Essigester-Methanol 9:1 eluieren. Durch Versetzen der ca. 40°-warmen, methanolischen Lösung des Produkts mit Wasser bis zur Trübung und anschliessendes langsames Abkühlen auf 0° fiel das reine Nonapeptidderivat in fester, amorpher Form aus. Ausbeute 58%; analytische Daten siehe Tabelle 3, S. 1271.

1.6. *H-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-NH-(CH₂)₁₅CH₃* (IXd): 1,62 g (0,86 mMol) *Z-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-NH-(CH₂)₁₅CH₃* (VIIId) wurden in 200 ml 95-proz. Essigsäure wie üblich hydriert. Nach Beendigung der Wasserstoffaufnahme und Filtration vom Katalysator wurde im Vakuum eingedampft, getrocknet und der Rückstand in 50 ml Methanol aufgenommen. Dazu gab man 2 ml Triäthylamin und versetzte die Lösung mit Wasser bis zur Trübung. Nach längerem Stehenlassen im Kühlschrank wurde das ausgefallene Produkt als farbloses Pulver in reiner Form gefasst: 1,43 g (95%); analytische Daten s. Tabelle 4, S. 1272.

1.7. *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)-Pro-NH-(CH₂)₁₅CH₃* (Xd): 160 mg (0,10 mMol) *Boc-D-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBut)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH* [12] wurden feingepulvert in 2,5 ml Dimethylformamid bei 24° unter Stickstoff aufgeschlämmt und mit 49 μ l 2,3N Chlorwasserstoff in Essigester versetzt. Nach 5 Min. gab man 185 mg (0,10 mMol) *H-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-NH-(CH₂)₁₅CH₃* (IXd) in 4 ml Dimethylformamid gelöst zu, rührte 5 Min. und fügte 17,5 mg N-Hydroxysuccinimid und 36 mg Dicyclohexyl-carbodiimid bei. Dann wurde 1 Std. bei 24° und 16 Std. bei 40–45° gerührt, wobei eine klare Lösung entstand, aus der nach dreistündigem Stehen im Kühlschrank Dicyclohexylharnstoff kristallin ausfiel. Man filtrierte diesen ab und

⁷) I wurde aus dem entsprechenden Methylester [23] durch Reaktion mit Hydrazinhydrat in Methanol erhalten. Smp. 121–123°: $[\alpha]_D^{20} = -8^\circ$ ($c = 2,2$ in Dimethylformamid): Rf(S) = 0,14 (Chloroform-Aceton 7:3)

$C_{30}H_{50}N_6O_8$ (622,75) Ber. C 57,86 H 8,09 N 13,50% Gef. C 58,00 H 8,00 N 13,67%

rührte das Filtrat in 200 ml Toluol ein. Die Fällung wurde abgenutscht und einer *Craig*-Verteilung unterworfen, woraus 268 mg (78%) reines, geschütztes Nonadecapeptid isoliert wurden, dessen analytische Daten in Tabelle 5 (S. 1273) angegeben sind.

1.8. *H-D-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Lys-Lys-Pro-NH(CH₂)₁₅CH₃* (XI d). – 1.8.1. *Acetat-Salz*: 143 mg des geschützten Nonadecapeptidderivates Xd wurden mit 30 ml eiskalter 70-proz. Trifluoressigsäure übergossen, und die zu Beginn leicht trübe Lösung 16 Std. bei 24° unter Stickstoff stehengelassen. Die etwas blässliche gewordene Lösung wurde dann auf – 15° gekühlt und in 150 ml peroxidfreien Äther eingerührt. Die Fällung wurde filtriert, mit Äther gewaschen, in 5 ml Wasser gelöst und an einer Säule (1,4 × 10 cm) Amberlite CG-45 in Acetatform in das essigsäure Salz übergeführt. Das mittels eines UV-Durchflussanalysators (Uvicord) kontrollierte Eluat wurde lyophilisiert; siehe Tabelle 6, S. 1273.

1.8.2. *Freie Base, inneres Salz*: 414 mg des erhaltenen Acetat-Salzes XI d wurden in 40 ml Wasser gelöst und bei 0° und unter Stickstoff mit 5 ml 1,5 N wässrigem Ammoniak versetzt. Es bildete sich ein feiner Niederschlag, der abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Hochvakuum getrocknet wurde. Ausbeute 334 mg eines cremefarbenen, wasserunlöslichen Pulvers, welches in 1 N Essigsäure langsam in Lösung ging und dann dünnschichtchromatographisch und elektro-phoretisch vom essigsauren Salz nicht unterscheidbar war.

2. Tripeptidderivate III, IV und V (s. Schema 2). – 2.1. *Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-OH* (III)⁸⁾: 1,87 g (3 mMol) *Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-NH-NH₂* (I) wurden in 10 ml Dimethylformamid (DMF) bei – 25° mit 2,7 ml 3,35 N (9 mMol) Chlorwasserstoff in Dioxan und 0,66 ml 5 N Natriumnitritlösung in Wasser versetzt und 10 Min. bei – 10° gerührt. Dann gab man die Lösung von 629 mg L-Prolin in 1,4 ml Wasser und 2,8 ml DMF und 2,06 ml N, N-Diisopropyl-äthylamin zu und rührte bei 0° über Nacht. Man nahm in Wasser-Essigester 1:1 (180 ml) auf, stellte mit 2 N HCl auf pH 2–3, wusch mit Wasser neutral, extrahierte den Essigester mit mehreren Portionen verd. Ammoniak und säuerte diesen wieder mit verd. HCl auf pH 2–3 an. Nach Rückextraktion mit Essigester wurde eingedampft, in Wasser gelöst und lyophilisiert. Man erhielt 1,93 g (92%) eines weissen Lyophilisates, welches laut Dünnschichtchromatogramm noch geringe Mengen einer rascher laufenden Verunreinigung enthielt: $[\alpha]_D^{20} = -37^\circ$ ($c = 1,8$ in Eisessig); $Rf(S) = 0,34$ (45), 0,52 (43 A).

$C_{35}H_{55}N_5O_{10}$ (705,8) Ber. C 59,55 H 7,85 N 9,92% Gef. C 59,35 H 7,92 N 9,86%

2.2. *Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-NH₂* (IV a): 4,23 g (6,1 mMol) *Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-OH* (III) wurden in 60 ml Tetrahydrofuran mit 0,87 ml (6,4 mMol) Triäthylamin gelöst und bei – 10° mit 0,79 ml (6,1 mMol) Chlorameisensäure-isobutylester während 10 Min. gerührt. Dann gab man 12 ml ca. 1 N Ammoniak in Tetrahydrofuran zu und belies 18 Std. bei 0°. Nach Eindampfen des Lsm. wurde in Essigester normal aufgearbeitet. Man erhielt 3,5 g Rohprodukt, welches aus Äther umkristallisiert wurde. Ausbeute 3,2 g (74%); analytische Daten s. Tabelle 2.

$C_{28}H_{56}N_6O_9$ (704,8) Ber. C 59,64 H 8,01 N 11,92% Gef. C 59,62 H 8,12 N 11,84%

2.3. *Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-NH(CH₂)₁₅CH₃* (IV d): Beispiel für *Methode A* (s. Seite 1268).

2.4. *Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-NHCH[(CH₂)₁₆CH₃]₂* (IV g): Beispiel für *Methode B*:

2.4.1. *18-Aminopentatriacontan*: 5,53 g (10,6 mMol) 18-Pentatriacontanonoxim [28] wurden in 140 ml Äthanol bei gelindem Sieden allmählich mit 12,2 g Natrium in kleinen Stücken versetzt. Nach 2 Std. Kochen unter Rückfluss wurde kalt filtriert, der Rückstand mit Chloroform und Wasser gewaschen und das Produkt aus Äthanol umkristallisiert: 4,75 g (88%); Smp. 59,0–60,5°; $Rf(S) = 0,10$ (Cyclohexan-Essigester 1:1), 0,46 (Chloroform-Methanol 4:1)

$C_{35}H_{73}N$ (507,9) Ber. C 82,76 H 14,49 N 2,76% Gef. C 82,98 H 14,37 N 2,86%

2.4.2. *Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-NHCH[(CH₂)₁₆CH₃]₂* (IV g): 2,68 g (3,8 mMol) *Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-OH* (III) wurden in 27 ml Tetrahydrofuran mit 0,55 ml Triäthylamin gelöst und bei – 18° mit 0,50 ml Pivaloylchlorid versetzt. Nach 10 Min. gab man 1,83 g (3,6 mMol) 18-Aminopentatriacontan in 15 ml Tetrahydrofuran zu und nach 15 Min. 0,52 ml Triäthylamin. Anschliessend wurde 2 Std. bei 0° und 23 Std. bei Raumtemperatur gerührt, in Chloroform wie üblich aufgearbeitet und aus Äthanol kristallisiert: 3,5 g (81%); analytische Daten s. Tabelle 2, S. 1270.

$C_{70}H_{126}N_6O_9$ (1195,8) Ber. C 70,31 H 10,62 N 7,03% Gef. C 70,33 H 10,37 N 6,89%

⁸⁾ Herrn P. Sieber sei für die Mitbearbeitung dieser Stufe gedankt.

Tabelle 2. Analytische Daten der Tripeptidderivate IV und V

Substanz	Method	Dünnschichtchromatographie Rf auf Kieselgel	Bemerkungen	Substanz	Dünnschichtchromatographie Rf auf Kieselgel
IV a	B	0,58 (C/M 4:1), 0,66 (45)	Smp. 85-110° [α] _D ²⁰ = -42° (c = 1,8 in MeOH)	V a	0,24 (C/M 4:1), 0,50 (45)
b	B	0,45 (C/M 95:5), 0,60 (43 A)		b	0,17 (C/M 9:1), 0,25 (43 A)
c	A	0,71 (C/M (4:1), 0,75 (45)	Öl	c	0,45 (C/M 4:1), 0,66 (45)
d	A	0,75 (45), 0,76 (89), 0,28 (C/A 7:3)	Smp. 75-76° [α] _D ²⁰ = -23° (c = 2,1 in DMF)	d	0,12 (89), 0,68 (45), 0,65 (102 A)
e	B	0,82 (C/M 85:15), 0,57 (108)	Öl	e	0,59 (C/M 85:15), 0,33 (102 E)
f	B ⁹⁾	0,46 (C/M 95:5), 0,67 (43 A)	Smp. 70-74°	f	0,29 (C/M 9:1), 0,34 (43 A)
g	B	0,18 (Cy/E 1:1), 0,79 (89)	Smp. 107-111° [α] _D ²⁰ = -18° (c = 2,3, DMF)	g	0,61 (C/M 4:1), 0,35 (89)
i	A	0,79 (C/M 4:1), 0,82 (45)	Öl	i	0,57 (C/M 4:1), 0,70 (45)
k	A	0,83 (C/M 4:1), 0,79 (45)	Öl	k	0,59 (C/M 4:1), 0,37 (102 E)
l	A	0,88 (C/M 4:1), 0,69 (89)	Öl [α] _D ²⁰ = -19° (c = 1,6 DMF)	l	0,46 (C/M 85:15), 0,26 (89)
m	A	0,86 (45), 0,80 (89)	zerfliesslich	m	0,29 (89), 0,39 (102 E)
n	A	0,82 (C/M 4:1), 0,81 (89)	[α] _D ²⁰ = -16° (c = 1,8 DMF)	n	0,60 (C/M 85:15), 0,45 (89), 0,44 (102 E)

3. Neue Prolinderivate II und Z-II. - 3.1. *Z-Pro-NH(CH₂)₉CH₃ (Z-IIc)*: Nach Vorschrift 1.1; Smp. 82,5-84,0°; [α]_D²⁰ = -22° (c = 2,1 in Dimethylformamid); Rf(S) = 0,28 (45), 0,62 (121). IR. ($\tilde{\nu}$ Nujol, cm⁻¹) u. a.: 3350 (-NH), 1720, 1699 (Urethan), 1657 (Amid I), 1565 (Amid II).

C₂₃H₃₆N₂O₃ (388,5) Ber. C 71,10 H 9,34 N 7,21% Gef. C 71,20 H 9,31 N 7,40%

3.2. *H-Pro-NH(CH₂)₉CH₃-hydrochlorid (IIc)*: Öl, Rf(S) = 0,18 (102E), 0,67 (45), 0,25 (Chloroform-Methanol 4:1).

Die *Proilm-alkylester-hydrochloride* wurden durch mit *p*-Toluolsulfonsäure katalysierte Veresterung aus Prolin und dem entsprechenden Alkohol in siedendem Toluol und anschliessende Überführung ins Hydrochlorid dargestellt.

3.3. *H-Pro-O(CH₂)₉CH₃-hydrochlorid (IIi)*: Öl, Rf(S) = 0,45 (Chloroform-Methanol 9:1) 0,75 (45), 0,24 (102E).

3.4. *H-Pro-O(CH₂)₁₃CH₃-hydrochlorid (IIk)*: Smp. 79,5-80,5°, glimmerartige Blättchen, [α]_D²⁰ = -22° (c = 1,9 in Dimethylformamid); Rf(S) = 0,23 (Toluol-Aceton 1:1), 0,27 (102E), 0,76 (45).

C₁₉H₃₇NO₂, HCl Ber. C 65,58 H 11,01 N 4,03 Cl 10,19%
(347,9) Gef. „ 65,50 „ 11,14 „ 4,09 „ 10,44%

⁹⁾ *Tetracosylammonium-acetat* wurde hergestellt durch Reduktion von Tetracosansäureamid [29] mit Lithiumaluminiumhydrid in Tetrahydrofuran. Smp. 89-90°; Äq-Gew. durch Titration mit Perchlorsäure in Eisessig: 430 (ber. 413,5); Rf(S) = 0,31 (108), 0,35 (45).

C₂₆H₅₅NO₂ (413,5) Ber. C 75,48 H 13,40 N 3,39% Gef. C 76,00 H 13,47 N 3,52%

3.5. *H-Pro-O(CH₂)₁₇CH₃-hydrochlorid (III)*: Smp. 89–90°, Blättchen, $[\alpha]_D^{20} = -20^\circ$ ($c = 0,5$ in Dimethylformamid); Rf(S) = 0,50 (Chloroform-Methanol 9:1), 0,77 (45), 0,29 (102 E).

C₂₃H₄₅NO₂, HCl Ber. C 68,37 H 11,47 N 3,47 Cl 8,77%
(404,1) Gef. „ 68,20 „ 11,36 „ 3,60 „ 8,63%

3.6. *H-Pro-O(CH₂)₂₃CH₃-hydrochlorid (IIm)¹⁰*: Smp. 95–96,5°; Rf(S) = 0,28 (Toluol-Aceton 1:1), 0,81 (45), 0,30 (102 E). IR. (ν Nujol, cm⁻¹) u. a.: 2710–2500 Multipllett (–NH₃⁺), 1740 (C=O Ester).

C₂₉H₅₇NO₂, HCl Ber. C 71,34 H 11,97 N 2,87 Cl 7,26%
(488,2) Gef. „ 71,08 „ 12,02 „ 2,92 „ 7,27%

3.7. *H-Pro-O-CH[(CH₂)₁₆CH₃]₂ (IIn)¹¹*: Kristallisiert als freie Base aus 96-proz. Alkohol; Smp. 39,5–40,5°, $[\alpha]_D^{20} = -14^\circ$ ($c = 1,9$ in Eisessig); Rf(S) = 0,88 (45), 0,48 (102 E), 0,48 (Chloroform-Methanol 9:1).

C₄₀H₇₉NO₂ (606,0) Ber. C 79,27 H 13,14 N 2,31% Gef. C 79,08 H 13,12 N 2,18%

Herrn Dr. *W. Rüttel* verdanke ich die Anregung zu dieser Arbeit sowie viele wertvolle Diskussionen. Für sorgfältige, technische Mitarbeit danke ich Herrn *R. Baumann*. Dünnschicht-Chromatographien und -Elektrophoresen und Aminosäureanalysen wurden in verdankenswerter Weise in unserem Chromatographie-Labor (Leitung: Herr *E. von Arx*) durch Frau *K. Reist*, Frau *M. Rist* und Fräulein *Keller* sowie die Herren *D. Faupel* und *R. Steiner* ausgeführt. Mikroanalytische Bestimmungen, Spektren und optische Drehungen verdanke ich unseren Spezial-Laboratorien unter der Leitung der Herren Dr. *W. Padowetz*, Dr. *W. Hürzeler* und Dr. *R. Zürcher*.

4. Tabellarische Übersicht der analytischen Daten von Zwischen- und Endprodukten.

Tabelle 3. Analytische Daten der geschützten Nonapeptidderivate VII

Smp.	$[\alpha]_D^{20}$	Konz. % in DMF	Dünnschicht- chromatographic Rf auf Kieselgel	Analyse 1. Zeile Ber. 2. Zeile Gef.	C%	H%	N%
VIIa	168–182°	– 52° 1,3 ¹³	0,57 (C/M 8:2), 0,73 (45)	C ₈₀ H ₁₃₅ N ₁₅ O ₂₁ (1643,0)	58,48	8,28	12,79
b	188–192°	– 35° 1,8	0,41 (C/M 9:1), 0,65 (43 A)	C ₈₅ H ₁₄₅ N ₁₅ O ₂₁ (1713,2)	58,33	8,07	12,77
c	190–193°	– 35° 1,8	0,70 (C/M 85:15), 0,39 (89), 0,73 (45)	C ₉₀ H ₁₅₅ N ₁₆ O ₂₁ (1783,3)	59,44	8,58	12,05
d	184–186°	– 33° 2,1	0,60 (C/M 85:15), 0,46 (89), 0,79 (121 A)	C ₉₆ H ₁₆₇ N ₁₅ O ₂₁ (1867,5)	60,52	8,60	11,57
e	180–183°	– 28° 2,1	0,64 (C/M 85:15), 0,54 (89)	C ₉₆ H ₁₆₇ N ₁₅ O ₂₁ (1867,5)	67,74	9,01	11,25
f	128–134°		0,61 (C/M 85:15), 0,50 (89)		61,71	8,97	11,07
g	179–182°	– 28° 2,0	0,73 (89), 0,81 (40)	C ₁₁₅ H ₂₀₅ N ₁₅ O ₂₁ (2133,9)	61,75	9,01	11,25
h ¹²	– 64° 0,8 ¹³	0,48 (C/M 9:1), 0,50 (T/A 4:1)		C ₂₄ H ₁₄₂ N ₁₄ O ₂₂ (1700,1)	61,86	9,00	11,12

¹⁰) *Tetracosanol-(I)* wurde durch Reduktion von Tetracosansäure (*Fluka, puriss.*) mit Lithiumaluminiumhydrid in Tetrahydrofuran hergestellt. Smp. 68,0–69,5° (Lit.: 75,2–75,5 [30]).

¹¹) *Pentatriacontanol-(I8)* wurde hergestellt durch Reduktion des entsprechenden Ketons (Stearon) mit Lithiumaluminiumhydrid. Smp. 84–86° (Lit.: 89,5–90° [31]); IR. (ν Nujol cm⁻¹) u. a.: 3300 (–OH), 1800–1495 leer.

C₃₅H₇₂O (508,9) Ber. C 82,60 H 14,26% Gef. C 82,40 H 14,41%

¹²) Herr Dr. *M. H. Greven*, Firma *Organon*, Oss (Holland), hat uns dieses Peptidfragment zur Verfügung gestellt, wofür wir ihm zu hohem Dank verpflichtet sind.

¹³) In Methanol.

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Smp.	$[\alpha]_D^{20}$	Konz. % in DMF	Dünnschicht- chromatographie Rf auf Kieselgel	Analyse	1. Zeile Ber. 2. Zeile Gef.			
					C%	H%	N%	
i	160–162°	– 32°	2,1	0,77 (C/M 85:15), 0,49 (89)	C ₉₀ H ₁₅₄ N ₁₄ O ₂₂ (1784,3)	60,58 60,17	8,70 8,77	10,99 10,85
k	162–164°	– 35°	2,1	0,87 (C/M 4:1)	C ₉₄ H ₁₆₂ N ₁₄ O ₂₂ (1840,4)	61,35 61,22	8,87 9,16	10,66 10,73
l	155–158°	– 29°	2,0	0,62 (C/M 85:15), 0,55 (89)	C ₉₆ H ₁₇₀ N ₁₄ O ₂₂ (1896,5)	62,07 61,92	9,04 9,01	10,34 10,31
m	160–162°	– 27°	2,1	0,76 (C/M 4:1), 0,50 (89)	C ₁₀₄ H ₁₈₂ N ₁₄ O ₂₂ , H ₂ O (1998,7)	62,50 62,60	9,28 9,60	9,81 10,01
n	151–158°	– 24°	2,1	0,66 (C/M 85:15), 0,64 (89), 0,80 (102 E)	C ₁₁₅ H ₂₀₄ N ₁₄ O ₂₂ (2134,9)	64,70 64,72	9,63 9,44	9,19 9,23

Tabelle 4. Analytische Daten der partiell geschützten Nonapeptidderivate IX

Smp.	$[\alpha]_D^{20}$	Konz. % in DMF	Dünnschicht- chromatographie Rf auf Kieselgel	Analyse	1. Zeile Ber. 2. Zeile Gef.			
					C%	H%	N%	
IXa			0,19 (C/M 8:2) 0,55 (45)					
b	176–181°		0,21 (43 A), 0,45 (52), 0,59 (100)					
c	171–178°	– 28°	1,1	0,33 (C/M 85:15), 0,71 (45), 0,20 (102 E)	C ₈₂ H ₁₄₈ N ₁₅ O ₁₉ (1649,2)	59,72 59,74	9,11 9,33	12,74 12,74
d	163–166°	– 31°	2,1	0,39 (C/M 85:15), 0,74 (45), 0,22 (102 E)	C ₈₈ H ₁₆₁ N ₁₅ O ₁₉ , H ₂ O (1751,3)	60,35 60,58	9,38 9,42	12,00 12,07
e	149–155°	– 25°	1,8	0,40 (C/M 85:15), 0,72 (45), 0,26 (102 E)	C ₈₈ H ₁₆₁ N ₁₅ O ₁₉ , H ₂ O (1751,3)	60,35 60,49	9,38 9,28	12,00 12,01
f			0,43 (C/M 85:15), 0,75 (45), 0,25 (102 E)					
g	149–155°	– 25°	2,0	0,13 (89), 0,50 (102 E)	C ₁₀₇ H ₁₉₉ N ₁₅ O ₁₉ , H ₂ O (2017,8)	63,69 63,88	10,04 10,05	10,41 10,40
h			0,15 (C/M 9:1), 0,05 (T/A 4:1)					
i	159–163°	– 32°	1,8	0,26 (C/M 85:15), 0,63 (40), 0,72 (45), 0,38 (102 E)	C ₈₂ H ₁₄₈ N ₁₄ O ₂₀ , H ₂ O (1668,2)	59,04 58,94	9,06 9,04	11,76 11,72
k	154–157°	– 34°	2,1	0,45 (C/M 4:1), 0,64 (40), 0,28 (102 E)	C ₉₆ H ₁₅₆ N ₁₄ O ₂₀ , H ₂ O (1724,3)	59,91 59,71	9,24 9,27	11,37 11,37
l	153–156°	– 28°	2,3	0,45 (43 C), 0,51 (52), 0,59 (102 A)	C ₉₀ H ₁₅₄ N ₁₄ O ₂₀ , H ₂ O (1780,4)	60,72 60,78	9,40 9,49	11,01 11,27
m	147–150°	– 36°	1,8 ¹⁴⁾	0,45 (C/M 4:1), 0,31 (102 E)	C ₉₆ H ₁₇₆ N ₁₄ O ₂₀ (1846,5)	62,44 62,47	9,61 9,51	10,62 10,61
n	155–157°	– 24°	2,1	0,49 (C/M 85:15), 0,65 (40), 0,78 (45)	C ₁₀₇ H ₁₉₈ N ₁₄ O ₂₀ (2000,8)	64,23 64,00	9,98 9,81	9,80 9,81

¹⁴⁾ In Eisessig.

Tabelle 5. Analytische Daten der geschützten Nonadeca-peptidderivate X

K-Wert (20°)	System ¹⁵⁾	Dünnschicht-chromatographie Rf auf Kieselgel	K-Wert (20°)	System ¹⁵⁾	Dünnschicht-chromatographie Rf auf Kieselgel
Xa 2,0	7	0,50 (45), 0,61 (43 C)	Xh 0,29	6	0,34 (43 A), 0,35 (C/M 3:1)
b 0,26	4	0,35 (43 A), 0,45 (52), 0,56 (100)	i		0,58 (43 C), 0,48 (102 A)
c 0,33	2	0,56 (52), 0,33 (102 A)	k 0,32	5	0,69 (43 C), 0,52 (52), 0,39 (102 A)
d 0,37	1	0,84 (37), 0,18 (102 E), 0,65 (108)	l 0,52	2	0,52 (43 C), 0,42 (52), 0,40 (102 A)
e		0,62 (43 C), 0,26 (102 E), 0,44 (121 A)	m 0,09	2	0,80 (43 C), 0,86 (52), 0,68 (102 E)
f 0,30	5	0,38 (43 A), 0,64 (52), 0,59 (100)	n 0,09	2	0,56 (43 C), 0,57 (52), 0,24 (102 E)
g 0,10	3	0,61 (43 C), 0,43 (45), 0,15 (108)			

Tabelle 6. Analytische Daten der Endprodukte XI

Nr.	Dünnschichtchromatographie					Elektrophorese ¹⁷⁾		Löslichkeit der freien Base ¹⁸⁾	Bcm. ¹⁹⁾
	Rf(A) 52 A	101	104	Rf(C) 101	Rf(Se) 16)	C	M		
XIa ²²⁾	0,11	0,23	0,24	0,24	1,52	8,1		gut	20)
b ²³⁾	0,54	0,66	0,52	0,47	1,44	8,0	6,5	gut	
c	0,55	0,71	0,62	0,53	1,40	7,5	6,4	schlecht	20) 21)
d	0,58	0,71	0,67	0,55	1,24	6,8	6,0	schlecht	20)
e	0,63	0,73	0,71	0,54	1,41	7,1	6,2	gut	20)
f ²³⁾	0,62	0,73	0,70	0,72	0,85	5,4	5,2	schlecht	21)
g	0,68	0,75	0,77	0,60	1,80	6,7	5,1	schlecht	20)
h ²²⁾	0,07	0,20	0,07	0,26		7,2		gut	20)
i	0,56	0,71	0,67	0,53	1,45	7,7	6,5	gut	20)
k	0,58	0,71	0,68	0,55	1,25	7,2	6,3	schlecht	20) 21)
l	0,58	0,71	0,70	0,57	1,10	6,3	5,8	schlecht	20) 21)
m	0,62	0,72	0,72	0,72	0,89	5,4	5,5	schlecht	20) 21)
n	0,66	0,74	0,77	0,60	1,83	6,7	5,1	schlecht	20)

¹⁵⁾ Lösungsmittelsysteme für *Craig*-Verteilungen (Angabe in Volumenteilen): Methanol-Puffer-Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff (Puffer = 19,3 g Ammoniumacetat, 28,6 ml Eisessig, 1 l Wasser): 1 = 10 + 3 + 8 + 3; 2 = 10 + 2,5 + 8 + 6; 3 = 8 + 2 + 5 + 4; 4 = 10 + 2,15 + 10 + 6; 5 = 8 + 2 + 4 + 4; 6 = 10 + 3 + 7 + 4; Methanol-Puffer (wie oben)-Chloroform-Toluol: 7 = 10 + 3 + 7 + 4.

¹⁶⁾ Rf auf Sephadex G-25 superfine; Laufstrecke bezogen auf Prolin = 1.

¹⁷⁾ Wanderungsstrecken in Richtung Kathode in cm: C: Auf Celluloseplatten, pH 1,9 (Puffer: 476 ml Eisessig + 132,5 ml Ameisensäure auf 5 l), 10 V/cm, 1,5 Std. M: Auf Membranfolie S + S, pH 2,7 (Puffer: 95,2 ml Eisessig + 26,5 ml Ameisensäure mit Wasser auf 1 l + 660 ml Formamid), 10 V/cm, 50 Min.

¹⁸⁾ Löslichkeit in Wasser: schlecht = weniger als 0,1%; gut = besser als 1% löslich.

¹⁹⁾ Aus den UV.-Spektren (in 0,1 N NaOH) ist bei allen Derivaten XIa–XI n ein molares Verhältnis Trp:Tyr von ca. 1 ableitbar [32].

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *H. M. Christensen*, Brit. Pat. 957 020 [Chem. Abstr. 61, 4161 a (1964)].
- [2] *R. A. Boissonnas, St. Guttman & J. Pless*, *Experientia* 22, 526 (1966).
- [3] *K. Inouye, A. Tanaka & H. Otsuka*, *Bull. chem. Soc. Japan* 43, 1163 (1970).
- [4] *B. Riniker & W. Rittel*, *Helv.* 53, 513 (1970).
- [5] *K. Hofmann, W. Wingender & F. M. Finn*, *Proc. nat. Acad. Sci.* 67, 829 (1970); *R. Geiger*, *Angew. Chem.* 83, 155 (1971).
- [6] *W. Vogt*, *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* 250, 210 (1965).
- [7] *T. B. Binns*, «Absorption and Distribution of Drugs», E. & S. Livingstone Ltd., London 1964; *T. H. Wilson*, «Intestinal Absorption», S. 283, W. B. Saunders Co., 1959; *J. Raaflaub*, *Experientia* 26, 457 (1970).
- [8] *L. S. Schanker*, *J. Pharmacol. exp. Therap.* 126, 283 (1959); *J. med. pharmac. Chem.* 2, 343 (1960).
- [9] *J. K. Wales, P. Bradley & F. W. Wolff*, *Nature* 211, 88 (1966); *G. L. Haberland, J. Pütter & W. Puls*, *Med. Pharmacol.* 14, 297 (1966).
- [10] *IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature*, Tentative Rules, *Biochim. biophys. Acta* 121, 1 (1966); *Biochemistry* 6, 362 (1967).
- [11] *J. Ramachandran, D. Chung & C. H. Li*, *J. Amer. chem. Soc.* 87, 2696 (1965).
- [12] *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.
- [13] *W. Rittel*, in «Pharmacology of Hormonal Polypeptides and Proteins», S. 35, Plenum Press, New York 1968.
- [14] *St. Guttman, J. Pless & R. A. Boissonnas*, *Acta chim. Acad. Sci. Hung.* 44, 141 (1965).
- [15] *R. Jaques & M. Brugger*, *Pharmacology* 2, 361 (1969); *R. Jaques & L. Riesterer*, *ibid.* 4, 1 (1970).
- [16] *P. A. Desaulles & W. Rittel*, in «The Investigation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Function», *Memoirs of the Soc. for Endocrinology* Nr. 17, S. 125, University Press, Cambridge 1968.
- [17] *F. Moncloa, J. Velazco & L. Beteta*, *Acta endocrinol.* 52, 337 (1966).
- [18] *L. Bernardi, R. de Castiglione, G. B. Fregnan & A. H. Glässer*, *J. Pharm. Pharmacol.* 19, 95 (1967).
- [19] *J. Honzl & J. Rudinger*, *Coll. czechoslov. chem. Commun.* 26, 2333 (1961).
- [20] *T. Wieland & H. Bernhard*, *Liebigs Ann. Chem.* 572, 190 (1951); *R. A. Boissonnas*, *Helv.* 34, 874 (1951); *J. R. Vaughan Jr.*, *J. Amer. chem. Soc.* 73, 3547 (1951).
- [21] *K. Sturm, R. Geiger & W. Siedel*, *Chem. Ber.* 96, 609 (1963); *K. Hofmann, J. Rosenthaler, R. D. Wells & H. Yajima*, *J. Amer. chem. Soc.* 86, 4991 (1964).
- [22] *F. Weygand, D. Hoffmann & E. Wünsch*, *Z. Naturforsch.* 21 b, 426 (1966).
- [23] *R. Schwyzer & W. Rittel*, *Helv.* 44, 159 (1961).
- [24] *B. Riniker, M. Brugger, B. Kamber, P. Sieber & W. Rittel*, *Helv.* 52, 1058 (1969).
- [25] *E. Hecker*, «Verteilungsverfahren im Laboratorium», Verlag Chemie (Weinheim/Bergstrasse), 1955.
- [26] *F. Reindel & W. Hoppe*, *Chem. Ber.* 87, 1103 (1954).
- [27] *E. von Arx & R. Neher*, *J. Chromatogr.* 12, 329 (1963).
- [28] *H. Reinboldt & M. Dewald*, *Liebigs Ann. Chem.* 455, 300 (1927); *Ad. Grün, E. Ulbrich & F. Kvežil*, *Z. Angew. Chem.* 39, 423 (1926).
- [29] *A. W. Weitkamp*, *J. Amer. chem. Soc.* 67, 448 (1945).
- [30] *W. Bleyberg & H. Ulrich*, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 64, 2512 (1935).
- [31] *V. I. Komarewsky & J. R. Coley*, *J. Amer. chem. Soc.* 63, 3269 (1941).
- [32] *G. H. Beaven & E. R. Holiday*, *Adv. Protein Chemistry* 7, 319 (1952).

²⁰⁾ Die Aminosäureanalyse (*Beckman* Unichrome Amino Acid Analyzer) ergab gute Übereinstimmung mit den erwarteten Werten.

²¹⁾ Gas-chromatographisch ist in freier Base keine Essigsäure nachweisbar [24].

²²⁾ Die Bearbeitung von Peptid XIa und XIh erfolgte durch Herrn Dr. *Rittel*, dem ich sehr zu Dank verpflichtet bin.

²³⁾ Die Bearbeitung von Peptid XIb und XIi erfolgte durch Herrn Dr. *Riniker*, dem ich hier ebenfalls bestens danken möchte.