

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *Ph. Catalfomo & C. H. Eugster*, Bull. on Narcotics 22, 33 (1970).
 [2] *Ph. Catalfomo & C. H. Eugster*, Helv. 53, 848 (1970).
 [3] *E. Schleusener & C. H. Eugster*, Helv. 53, 130 (1970).
 [4] *C. H. Eugster & E. Schleusener*, Helv. 52, 708 (1969).
 [5] *C. H. Eugster*, Fortschr. chem. org. Naturstoffe (*L. Zechmeister* Ed.) 27, 288 (1969).
 [6] *E. Hardegger & F. Lohse*, Helv. 40, 2383 (1957).
 [7] *M. H. Malone, R. C. Robichaud, V. E. Tyler jr. & L. R. Brady*, Lloydia 24, 204 (1961); 25, 231 (1962).
 [8] *W. A. Cowdrey, E. D. Hughes & C. K. Ingold*, J. chem. Soc. 1937, 1228.

136. Über die Bedeutung des Histidins im «Thyrotropin-releasing» Hormon (TRH)

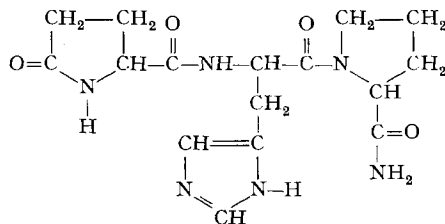
von **D. Gillessen¹⁾**, **F. Piva²⁾**, **H. Steiner³⁾** und **R. O. Studer¹⁾**

Forschungsabteilung der *F. Hoffmann-La Roche & Co., AG*, Basel,
 Istituto di Farmacologia e della Terapia, Università di Milano

(13. V. 71)

Summary. The syntheses and biological activities of 4 analogues of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) are described. In these analogues the histidine residue has been replaced by L-lysine, L- α , γ -diaminobutyric acid, β -(3-pyrazolyl)-L-alanine, and L-arginine. All analogues exhibited the characteristic biological responses of TRH. For the β -(3-pyrazolyl)-L-alanine analogue as well as for TRH the bioassays suggest an induction of a strong and rapid resynthesis of thyrotropin (TSH) in higher (μ g) concentrations.

In enger Zusammenarbeit zwischen der Gruppe von *Guillemin* und unserer Gruppe konnte kürzlich die Struktur des «Thyrotropin-releasing»-Hormons (TRH) des Schafs, eines Faktors, der im Hypothalamus vorkommt und die Sekretion von Thyrotropin (TSH) aus der Hypophyse stimuliert, aufgeklärt werden [1] [2] [3] [4] [5] (Formel 1).



«Thyrotropin-releasing» Hormon (I)

Über die Synthese [5] sowie über den Vergleich [4] [6] mit dem natürlichen Hormon wurde *in extenso* berichtet.

Fast gleichzeitig konnten *Schally* und Mitarbeiter durch systematischen Abbau zeigen, dass das aus dem *Hypothalamus* von Schweinen isolierte Hormon die gleiche

¹⁾ Chemische Forschungsabteilung der *F. Hoffmann-La Roche & Co. AG*, Basel.

²⁾ Istituto di Farmacologia e della Terapia, Dept. of experimental endocrinology, University Milano, Milano.

³⁾ Abteilung für experimentelle Medizin, *F. Hoffmann-La Roche & Co. AG*, Basel.

Struktur besitzt [7]. In Kurzmitteilungen berichteten *Schally* und Mitarbeiter über ein TRH-aktives synthetisches Präparat, das durch Umsetzung des Tripeptids L-Glutamyl-L-histidyl-L-prolin mit methanolischer Salzsäure und nachfolgende Behandlung mit methanolischem Ammoniak erhalten wurde und dem auf Grund der Reaktionsfolge ebenfalls diese Struktur zugeschrieben wurde [8].

Es scheint, dass auch das menschliche TRH diese Struktur besitzt [9], und es ist auf Grund der Tatsache, dass TRH ein einfaches Tripeptid ist, zu erwarten, dass keine oder höchstens minimale Speziesunterschiede vorhanden sind.

Die bei der Strukturaufklärung hergestellten Modellpeptide lassen erkennen, dass für die Aktivität die Sequenz Glu-His-Pro der drei im TRH vorkommenden Aminosäuren notwendig ist [1] [4] [5]. Zudem muss die N-terminale Glutaminsäure in Form der Pyroglutaminsäure vorliegen, da die freien und die acetylierten entsprechenden α - und γ -Glutamyl-peptide [4] [5] sowie das Glutaminy-peptid [10] keine Aktivität zeigen. Die Variationsmöglichkeiten am Carboxylende dagegen sind grösser, da sowohl die Säure als auch der Methylester, das N-Methylamid und das Amid aktiv sind und eine in dieser Reihenfolge steigende Aktivität besitzen [2] [4] [5] [11]. Zudem kann der C-terminale Prolinamidrest, allerdings unter starker Aktivitätseinbusse,

Physikalische Daten der freien Peptide

	Pyroglu-His- Pro-NH ₂ I (TRH)	Pyroglu-Lys- Pro-NH ₂ II	Pyroglu-Dab- Pro-NH ₂ III	Pyroglu- Pyr(3)ala- Pro-NH ₂ IV	Pyroglu- Arg- Pro-NH ₂ V
$[\alpha]_D^{25}$ ($c = 1, 1 \text{ N}$ Essigsäure)	- 69,2°	- 71,8°	- 73,1°	- 62,3°	- 66,3°
Rf-Werte ^{a)}	A 1,00	1,00	1,00	4,00	1,20
in diversen Laufmitteln ^{b)}	B 1,00	0,72	0,64	1,53	0,96
	C 1,00	0,72	0,72	1,08	0,68
	D 1,00	0,27	0,27	1,44	0,27
	E 1,00	0,33	0,33	2,18	0,44
	F 1,00	1,00	1,00	1,95	1,00

Elektrophoretische

Beweglichkeit^{c)}

bezogen auf

TRH(I) = 1

1,00 1,27 1,31 0,13 1,16

a) Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten (*Merck*). Anfärbung mit Chlor-Toluidin-Reagenz. Die Rf-Werte sind auf TRH(I) = 1 bezogen.

b) Die Laufmittel haben folgende Zusammensetzung: A: 1-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1); B: Chloroform-Methanol-38-proz. Essigsäure (6:4:2); C: Chloroform-Methanol-konz. Ammoniak (60:45:20); D: Äthanol-Wasser (7:3); E: 1-Propanol-Wasser (7:3); F: 2-Propanol-Methanol-0,07 M Phosphatpuffer (pH 6,5)-Wasser (40:140:20:15).

c) Papierelektrophoresen auf *Schleicher & Schüll*-Papier 20436 mg/l mit einer Hochspannungselektrophorese-Kammer der Firma *Camag, Muttenz* (Schweiz), in 0,05 M Pyridinacetat-Puffer pH 6,0 bei 120 V · cm⁻¹. Anfärbungen mit Ninhydrin, *Pauly*-Reagenz, *Sakaguchi*-Reagenz und Jod.

durch den Rest der Amide von L-Valin, L-Leucin, L-Alanin, L-Phenylalanin und Glycin ersetzt werden [11]. Die Einführung eines Benzylrests in den Imidazolring des Histidins führt ebenfalls zu einem starken Abfall der Aktivität [11].

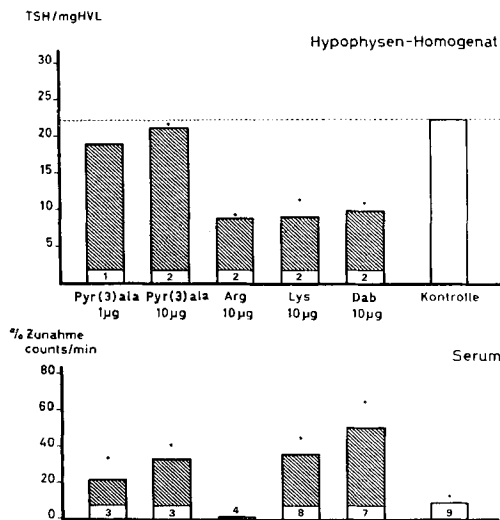


Fig.1. Verminderung des TSH-Gehaltes im Hypophysen-Vorderlappen (HVL) und Zunahme im Serum 15 Minuten nach intracarotischer Injektion von TRH-Analogen in männlichen Sprague-Dawley-Ratten⁴⁾

Hypophysenwerte ermittelt im 2 + 2-Punkt-Test nach Bliss [16] und verglichen mit NIH-TSH-S5-USP⁵⁾. Serumwerte angegeben als % Zunahme der Impulse pro Minute (counts/min) im γ -Spektrometer 2 Stunden nach Injektion der Testsubstanzen. Die Punkte oberhalb der Säulen bedeuten die Standardfehler der Mittelwerte, die Zahlen der unteren Säulen die Anzahl der Serumrezipienten, Zahlen an der Basis der oberen Säulen die Anzahl der statistisch validen Experimente

⁴⁾ Pro Experiment wird das Peptid in 0,2 ml 0,9-proz. NaCl-Lösung mit pH 7,0 in die freigelegte Carotis-Arterie von mindestens 4 *Sprague-Dawley*-Ratten injiziert. Zur Ausschaltung von Tagesschwankungen werden die Injektionen ausschliesslich zwischen 16.00 und 17.30 Uhr durchgeführt. 15 Min. später werden nach Dekapitation die Hypophysen-Vorderlappen (HVL) entfernt, gewogen und im Pool homogenisiert; gleichzeitig wird Serum gewonnen. Im zweiten Schritt wird der Überstand dieses Hypophysen-Homogenates in einer Dosis, die 0,1 mg bzw. 0,5 mg Hypophyse entspricht, in die Jugularvene von je 5 männlichen Ratten injiziert, welche 10 Tage jodarm ernährt und mit je 10 µC ¹³¹J i.p. und mit 2mal 10 µg L-Thyroxin s.c. vorbehandelt worden waren. In Parallelserien ist auch je 1 ml Pool-Serum pro gleichermaßen behandelter Ratte eingespritzt worden. Alle Substanzen werden bei der Verarbeitung auf 4° gehalten und hernach bis zum Gebrauch tiefgefroren.

Die Blutradoaktivität wird vor und 2 Std. nach Injektion der Homogenate oder der Seren gemessen und die Zunahme der Impulse pro Minute (counts/min.) in Prozent des Ausgangswertes vor der Injektion angegeben. Mit NIH-TSH-S5-USP als Standard wird im 2 + 2-Punkt-Test nach Bliss [16] die Aktivität verglichen, statistisch geprüft, und der TSH-Gehalt als Millieinheit (mU) pro mg HVL angegeben. Für die Seren kann aus technischen Gründen (zur Zeit) die Potenz noch nicht mit dem TSH-Standard korreliert werden. Deshalb wird deren TSH-Gehalt als prozentuale Zunahme der counts/min. 2 Stunden nach Injektion der Testsubstanz angegeben.

⁵⁾ Dem *National Institute of Health*, Bethesda, Maryland, USA, danken wir bestens für die Überlassung des TSH-Standards.

Im Zusammenhang mit den früher festgestellten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen [1] [4] [5] schien es interessant, das Histidin sowohl durch die körpereigenen Aminosäuren L-Arginin und L-Lysin als auch durch die körperfremden L- α , γ -Diaminobuttersäure und β -(3-Pyrazolyl)-L-alanin [12] zu ersetzen. β -(3-Pyrazolyl)-L-alanin ist isoster mit L-Histidin, jedoch sind die Säure-Basen-Eigenschaften des Pyrazolrings stark von denjenigen des Imidazolrings verschieden [12]. Die Synthesen von L-Pyroglutamyl-L-lysyl-L-prolinamid (Lys²-TRH, II), L-Pyroglutamyl-L- α , γ -diaminobutyryl-L-prolinamid (Dab²-TRH, III), L-Pyroglutamyl- β -(3-pyrazolyl)-L-alanyl-L-prolinamid (Pyr(3)ala²-TRH, IV) und L-Pyroglutamyl-L-arginyl-L-prolinamid (Arg²-TRH, V) folgen im Wesentlichen dem bereits beschriebenen Syntheseweg von TRH [5]. Über die Synthese des Pyr(3)ala²-TRH haben kürzlich auch *Hofmann & Bowers* [13] berichtet.

Die *biologische Aktivität* von TRH und den oben beschriebenen Analogen wurde mit der abgeänderten Hypophysen-Depletionsmethode von *Martini et al.* [14] gemessen. Die Bestimmung des TSH erfolgte nach der von *Guillemin et al.* [15] publizierten Methode.

Die Untersuchungsmethoden sowie die biologischen Resultate werden in dieser Arbeit nur zusammenfassend erwähnt. Eine ausführliche Diskussion der Ergebnisse erfolgt später.

Um die Dynamik der Sekretion von TSH vergleichen zu können, wurde zusätzlich zu den Analogen auch TRH in verschiedenen Konzentrationen in die Untersuchungen einbezogen. Pro Substanz und Konzentration wurden 2 bis 4 Experimente durch-

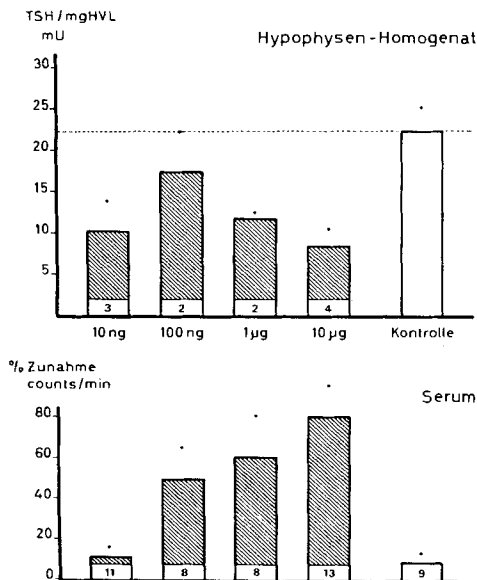


Fig. 2. Zunahme der TSH-Aktivität im Serum 15 Minuten nach i.c. Injektion von TRH, gemessen als Freisetzung von ¹³¹J aus der blockierten Schilddrüse und gleichzeitig Depletion im HVL

Zahlen und Symbole wie in Fig. 1. Potenz des Hypophysen-TSH verglichen mit NIH-TSH-S5-USP

geführt. Eine Ausnahme bildet das Pyr(3)ala-Analoge, mit nur einem Experiment in der Dosierung von 1 μg . Es sind nur statistisch gültige Resultate eingeschlossen.

In Fig. 1 ist der TSH-Gehalt graphisch dargestellt, welcher 15 Minuten nach Injektion der Testsubstanzen im Hypophysen-Homogenat bzw. im Serum gemessen wurde. Mit Ausnahme des Pyr(3)ala-Analogen bewirken alle Analogen eine ausgeprägte Verminderung des Gehaltes an TSH in der Hypophyse.

Erwartungsgemäss dagegen steigt der TSH-Gehalt im Serum für alle Testsubstanzen mit Ausnahme des Arg-Analogen deutlich an. Die Wirkung von Pyr(3)ala²-TRH, Lys²-TRH und Dab²-TRH ist mit derjenigen von TRH vergleichbar, wobei der Anstieg des TSH im Serum für das Letztere am deutlichsten ist (Fig. 2).

Das Pyr(3)ala-Analoge zeigt in Dosen von 1 μg und 10 μg nur eine unwesentliche Verminderung des TSH-Gehaltes der Hypophyse bei gleichzeitig deutlichem Anstieg im Serum. Dieses Resultat lässt die Vermutung aufkommen, dass neben der TSH-Ausschüttung auch eine TSH-Resynthese durch dieses Analogie ausgelöst wird.

Die gleiche Hypothese bietet sich auch zur Erklärung der Resultate mit TRH (Fig. 2) an. In einer Dosierung von 0,01 μg bewirkt TRH eine starke Abnahme des TSH-Gehaltes in der Hypophyse, wogegen eine Dosis von 0,1 μg nur zu einer geringen Abnahme führt. Andererseits jedoch ist im Serum eine dosisabhängige Zunahme von TSH nachzuweisen. Bei den höheren Dosen (1 μg und 10 μg) scheint die verstärkte Ausschüttung die Resynthese zu überwiegen, so dass der Nettogehalt an TSH in der Hypophyse vermindert ist. Die Geschwindigkeit, mit der die vermutete Resynthese auftritt, ist hervorzuheben.

Experimenteller Teil⁶⁾

1. L-Pyroglyutamyl-L-lysyl-L-prolinamid-acetat (II). – 1.1. L-Pyroglyutamyl-N^ε-Z-L-lysin-methylester (VI). Eine Lösung von 12,2 g (95 mMol) L-Pyroglytaminsäure (Fluka) und 28,0 g (95 mMol) N^ε-Z-L-lysin-methylester [18] in 100 ml Dimethylformamid wird auf 0° gekühlt, mit einer Lösung von 20,0 g (97 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid in 50 ml Dimethylformamid versetzt und 6 Std. bei 0° und weitere 15 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Der Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wird in Essigester gelöst, mit 0,5N HCl, Wasser, 10-proz. Na₂CO₃-Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingeeengt. Ausbeute: 28,2 g (73%) hochviskoses Öl. Zur Analyse wird eine Probe in Chloroform an Kieselgel chromatographiert⁷⁾. Der Dipeptidester wird mit Methanol/Chloroform (5:95) eluiert und aus Essigester/Petroläther kristallisiert: Smp. 109–112°. $[\alpha]_D^{25} = -9,6^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

C₂₀H₂₇N₃O₆ (405,44) Ber. C 59,24 H 6,71 N 10,37% Gef. C 59,53 H 6,98 N 10,18%

1.2. L-Pyroglyutamyl-N^ε-Z-L-lysin-hydrazid (VII). Eine Lösung von 12,8 g (31,6 mMol) rohem L-Pyroglyutamyl-N^ε-Z-L-lysin-methylester (VI) in 75 ml Methanol wird bei -10° mit 7,5 ml

⁶⁾ Die Smp. wurden auf einem Kofler-Block bestimmt und sind korrigiert. Die Drehungen wurden mit einem Polarimeter 141 der Firma Perkin-Elmer bestimmt, Fehlergrenze $\pm 1^\circ$. Die trägerfreien Hochspannungselektrophoresen wurden auf einer Elphor-VaP-Apparatur der Firma Bender & Hobein, München (Deutschland), durchgeführt. Zur Bestimmung des relativen Aminosäurenverhältnisses wurden die Substanzen in 6N HCl unter Vakuum bei 110° während 24 Std. hydrolysiert und nach Spackman, Stein & Moore [17] an einer Beckman-Unichrom-Apparatur analysiert. Der jeweilige Wert für Glutaminsäure wurde gleich 1 gesetzt.

Die freien Peptide wurden als Acetate isoliert. Die z. T. hygroskopischen Endprodukte verloren beim Trocknen zur Mikroanalyse teilweise die Essigsäure. Die Drehungen wurden an den lyophilisierten Peptiden direkt bestimmt.

Die Abkürzungen folgen den Vorschlägen des V. Europ. Peptidsymposiums, Pergamon Press, Oxford 1963. Z = Benzylloxycarbonyl. Für die sorgfältige Mitarbeit danken wir den Herren Ch. Opitz und H. D. Schmitz.

Hydrazinhydrat versetzt. Nach Stehen über Nacht im Eiskasten wird die Mischung mit 300 ml Äther verdünnt, das Hydrazid abfiltriert, aus Methanol/Äther umgefällt und getrocknet: 9,7 g (76%). Smp. 197–198°. $[\alpha]_D^{25} = -18,1^\circ$ ($c = 1$, Wasser).

$C_{19}H_{27}N_5O_5$ (405,46) Ber. C 56,28 H 6,71 N 17,27% Gef. C 55,87 H 6,93 N 17,17%

1.3. *L*-Pyroglutamyl-*L*-lysyl-*L*-prolinamid-acetat (II). 4,1 g (10 mMol) *L*-Pyroglutamyl-*N*⁶-*Z*-*L*-lysin-hydrazid (VII) werden bei 0° in einer Mischung aus 50 ml Dimethylformamid und 25 ml 2,5*N* HCl/Tetrahydrofuran gelöst. Nach Kühlen auf –20° werden 1,8 ml Isoamylnitrit zugegeben und 45 Min. bei ca. –20° gerührt. Bei –25° werden 8,7 ml (62,5 mMol) Triäthylamin zugetropft und eine auf –25° gekühlte Lösung von *L*-Prolinamid (hergestellt durch Hydrierung von 2,9 g (12 mMol) *Z*-*L*-Prolinamid [19]) in 20 ml Dimethylformamid zugesetzt. Die Mischung wird 30 Min. unterhalb –20° und weitere 30 Min. unterhalb 0° gerührt und 65 Std. im Eiskasten aufbewahrt. Das Salz wird abfiltriert, mit Dimethylformamid gewaschen und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wird in 200 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird mehrmals mit Äther und Essigester extrahiert und im Vakuum auf ein Volumen von 100 ml konzentriert. Diese Lösung wird mit 5 ml Eisessig versetzt und über Pd/C hydriert. Nach beendeter Hydrierung wird vom Katalysator abfiltriert, das Filtrat mehrmals mit Essigester extrahiert und dann bei 25° Badtemperatur eingedampft. Der Rückstand wird durch trägerfreie Hochspannungselektrophorese⁶⁾ in Pyridinacetat-Puffer pH 6,0 gereinigt. Ausbeute: 1,9 g (43%). Aminosäureanalyse⁶⁾: Glu:Lys:Pro:NH₃ (1:0,97:0,93:0,90). Physikalische Daten s. Tab.

$C_{16}H_{27}N_5O_4$, $C_2H_4O_2$, 1,5H₂O Ber. C 49,08 H 7,78 N 15,90 H₂O 6,13%
(440,50) Gef. „ 48,71 „ 7,84 „ 15,85 „ 5,98%

2. *L*-Pyroglutamyl-*L*- α , γ -diaminobutyryl-*L*-prolinamid-acetat (III). – 2.1. *L*-Pyroglutamyl-*N*⁷-*Z*-*L*- α , γ -diaminobuttersäure-methylester (VIII). Analog zu 1.1. werden 14,6 g (113 mMol) *L*-Pyroglutaminsäure mit 30,0 g (113 mMol) *N*⁷-*Z*-*L*- α , γ -diaminobuttersäure-methylester [20] gekuppelt. Ausbeute: 18,0 g (42%) Öl. Zur Analyse wird eine Probe (Elution mit Methanol/Chloroform (5:95) an Kieselgel chromatographiert⁷⁾. $[\alpha]_D^{25} = -18,5^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

$C_{18}H_{23}N_3O_6$ (377,40) Ber. C 57,28 H 6,14 N 11,14% Gef. C 57,55 H 6,36 N 11,06%

2.2. *L*-Pyroglutamyl-*N*⁷-*Z*-*L*- α , γ -diaminobuttersäure-hydrazid (IX). Analog zu 1.2. werden 3,0 g (8 mMol) *L*-Pyroglutamyl-*N*⁷-*Z*-*L*- α , γ -diaminobuttersäure-methylester (VIII) in das entsprechende Hydrazid übergeführt, das aus Methanol umkristallisiert wird: 2,3 g (76%). Smp. 223–225°. $[\alpha]_D^{25} = -24,5^\circ$ ($c = 1$, Wasser).

$C_{17}H_{23}N_5O_5$ (377,40) Ber. C 54,10 H 6,14 N 18,56% Gef. C 53,87 H 6,18 N 18,18%

2.3. *L*-Pyroglutamyl-*L*- α , γ -diaminobutyryl-*L*-prolinamid-acetat (III). Analog zu 1.3. werden 3,8 g (10 mMol) *L*-Pyroglutamyl-*N*⁷-*Z*-*L*- α , γ -diaminobuttersäure-hydrazid (IX) mit *L*-Prolinamid gekuppelt und das entsprechende Tripeptid hydriert und gereinigt. Ausbeute: 1,0 g (23%). Aminosäureanalyse⁶⁾: Glu:Dab:Pro:NH₃ (1:1,10:1,00:1,10). Physikalische Daten s. Tab.

$C_{14}H_{23}N_5O_4$, 1,5C₂H₄O₂, H₂O Ber. C 47,11 H 7,21 N 16,16 H₂O 4,16%
(433,46) Gef. „ 46,62 „ 7,39 „ 16,41 „ 3,90%

3. *L*-Pyroglutamyl- β -(3-pyrazolyl)-*L*-alanyl-*L*-prolinamid-acetat (IV). – 3.1. *L*-Pyroglutamyl- β -(3-pyrazolyl)-*L*-alanin-methylester (X). Analog zu 1.1. werden 1,9 g (15 mMol) *L*-Pyroglutaminsäure mit 2,5 g (15 mMol) β -(3-Pyrazolyl)-*L*-alanin-methylester [12] gekuppelt. Nach Abfiltrieren des Dicyclohexylharnstoffs und nach Abdestillieren des Dimethylformamids wird der Dipeptidester in Wasser gelöst, mit Chloroform extrahiert und die wässrige Phase eingedampft: 3,9 g (94%) Öl. Zur Analyse wird eine Probe in Methanol gelöst, auf Kieselgel aufgezogen, auf eine Kieselgelsäule gebracht und mit Chloroform und Chloroform-Methanol-Mischungen, die 3% Eisessig enthalten, chromatographiert⁷⁾. Der Dipeptidester wird mit Methanol/Chloroform/Eisessig (15:82:3) eluiert und kristallisiert nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels aus dem öligen Rückstand. Diese Kristalle konnten bisher nicht umkristallisiert werden; sie wurden deshalb mit

⁷⁾ Bei der Chromatographie wurden die Kieselgelsäulen in Chloroform bzw. einer Mischung aus Methanol/Chloroform entsprechend der Substanzlösung bereitet und nach Aufbringung der Substanzen mit Chloroform und Mischungen aus Methanol/Chloroform mit je nach den Erfordernissen steigenden Methanolkonzentrationen eluiert.

Äthanol verrieben, abfiltriert und bei Raumtemperatur getrocknet: Smp. 74–76°. $[\alpha]_D^{25} = -2,7^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

$C_{12}H_{16}N_4O_4 \cdot C_2H_5OH$ Ber. C 51,53 H 6,80 N 17,17%
(326,35) Gef. „ 51,24 „ 6,48 „ 17,15%

3.2. *L*-Pyroglutamyl- β -(3-pyrazolyl)-*L*-alanin-hydrazid (XI). Analog zu 1.2. werden 3,9 g (14 mMol) roher *L*-Pyroglutamyl- β -(3-pyrazolyl)-*L*-alanin-methylester (X) in das Hydrazid übergeführt, das aus Wasser/Methanol umkristallisiert wird. Ausbeute: 2,2 g (56%). Smp. 232–235°. $[\alpha]_D^{25} = -16,3^\circ$ ($c = 1$, Wasser).

$C_{11}H_{16}N_6O_3$ (280,30) Ber. C 47,14 H 5,75 N 29,99% Gef. C 46,88 H 5,73 N 29,90%

3.3. *L*-Pyroglutamyl- β -(3-pyrazolyl)-*L*-alanyl-*L*-prolinamid-acetat (IV). Analog zu 1.3. durch Kupplung von 1,6 g (5,7 mMol) *L*-Pyroglutamyl- β -(3-pyrazolyl)-*L*-alanin-hydrazid (XI) mit *L*-Prolinamid und entsprechende Reinigung: 1,9 g (84%). Aminosäureanalyse⁶). Glu:Pyr(3)ala:Pro:NH₃ (1:1,10:0,91:1,02). Physikalische Daten s. Tab.

$C_{16}H_{22}N_6O_4 \cdot 0,6C_2H_4O_2$ Ber. C 51,85 H 6,17 N 21,09%
(398,43) Gef. „ 51,38 „ 5,93 „ 21,34%

4. *L*-Pyroglutamyl-*L*-arginyl-*L*-prolinamid-acetat (V). – 4.1. *L*-Pyroglutamyl-*N*^G-nitro-*L*-arginin-methylester (XII). Analog zu 3.1. werden 6,5 g (50 mMol) *L*-Pyroglutaminsäure mit 13,5 g (50 mMol) *N*^G-Nitro-*L*-arginin-methylester-hydrochlorid [21] unter Zusatz von 8,6 ml (50 mMol) Äthyläisopropylamin gekuppelt und aufgearbeitet. Der Dipeptidester kristallisiert aus Wasser und wird aus Methanol/Wasser umkristallisiert: 9,0 g (52%), Smp. 195–197°. $[\alpha]_D^{25} = -27,8^\circ$ ($c = 1$, Wasser).

$C_{12}H_{20}N_6O_6$ (344,34) Ber. C 41,86 H 5,85 N 24,40% Gef. C 41,92 H 5,84 N 24,20%

4.2. *L*-Pyroglutamyl-*N*^G-nitro-*L*-arginin (XIII). Eine Lösung von 5,1 g (15 mMol) *L*-Pyroglutamyl-*N*^G-nitro-*L*-arginin-methylester (XII) in einer Mischung von 15 ml Wasser, 15 ml Methanol und 15 ml Dioxan wird mit 8,5 ml 2N NaOH versetzt und 1½ Std. bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird die Lösung bei 0° mit 8,5 ml 2N HCl versetzt und abgedampft. Der kristalline Rückstand wird aus Wasser umkristallisiert: 4,1 g (83%), Smp. 198–200°. $[\alpha]_D^{25} = -11,1^\circ$ ($c = 1$, Wasser).

$C_{11}H_{18}N_6O_6$ (330,31) Ber. C 40,00 H 5,49 N 25,44% Gef. C 40,09 H 5,53 N 25,61%

4.3. *L*-Pyroglutamyl-*L*-arginyl-*L*-prolinamid-acetat (V). 3,3 g (10 mMol) *L*-Pyroglutamyl-*N*^G-nitro-*L*-arginin (XIII), 1,1 g (10 mMol) *N*-Hydroxysuccinimid und *L*-Prolinamid (bereitet durch Hydrierung von 2,9 g (12 mMol) *Z*-*L*-Prolinamid) werden in einer Mischung aus 10 ml Dimethylsulfoxid und 15 ml Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wird bei –10° mit 2,2 g (11 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt und 3 Std. bei ca. –10°, 3 Std. bei 0° und 15 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Der Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert, das Filtrat abgedampft, der Rückstand in Wasser gelöst, der Dicyclohexylharnstoff nochmals abfiltriert und das Filtrat wieder abgedampft. Der Rückstand wird in 60 ml Eisessig gelöst; 45 ml dieser Lösung werden mit 4 ml 5N HCl versetzt und über Raney-Nickel hydriert. Dann wird vom Katalysator abfiltriert und das Filtrat lyophilisiert. Dieser Rückstand wird durch Chromatographie an Amberlite CG-50 (H⁺) vom Nickel befreit und durch trägerfreie Hochspannungselektrophorese⁶) in Pyridinacetat-Puffer pH 6,0 gereinigt. Ausbeute: 2,2 g (62%). Aminosäureanalyse⁶): Glu:Arg:Pro:NH₃ (1:1,01:1,07:1,08). Physikalische Daten s. Tab.

$C_{16}H_{27}N_7O_4 \cdot C_2H_4O_2 \cdot 1,9H_2O$ Ber. C 45,46 H 7,37 N 20,61 H₂O 7,20%
(475,72) Gef. „ 45,52 „ 7,37 „ 20,27 „ 6,94%

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. Burgus, T. F. Dunn, D. N. Ward, W. Vale, M. Amoss & R. Guillemin, C. r. hebd. Seances Acad. Sci. (Paris) 268, 2116 (1969).
- [2] R. Burgus, T. F. Dunn, D. Desiderio, W. Vale & R. Guillemin, C. r. hebd. Seances Acad. Sci. (Paris) 269, 226 (1969).
- [3] R. Burgus, T. F. Dunn, D. Desiderio & R. Guillemin, C. r. hebd. Seances Acad. Sci. (Paris) 269, 1870 (1969); R. O. Studer & I. Werner, Schweiz. med. Wschr. 100, 1086 (1970).

- [4] *R. Burgus, T. F. Dunn, D. Desiderio, D. N. Ward, W. Vale, R. Guillemin, A. M. Felix, D. Gillissen & R. O. Studer*, *Endocrinology* **86**, 573 (1970).
- [5] *D. Gillissen, A. M. Felix, W. Lergier & R. O. Studer*, *Helv.* **53**, 63 (1970).
- [6] *R. Burgus, T. F. Dunn, D. Desiderio, D. N. Ward, W. Vale & R. Guillemin*, *Nature* **226**, 321 (1970).
- [7] *R. M. G. Nair, J. F. Barrett, C. Y. Bowers & A. V. Schally*, *Biochemistry* **9**, 1103 (1970).
- [8] *K. Folkers, F. Enzmann, J. Bøler, C. Y. Bowers & A. V. Schally*, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **37**, 123 (1969); *J. Bøler, F. Enzmann, K. Folkers, C. Y. Bowers & A. V. Schally*, *ibid.* **37**, 705 (1969).
- [9] *C. Y. Bowers, A. V. Schally, A. Weil, G. A. Reynolds & K. Folkers*, *International Thyroid Conference, Vienna (Austria)*, June 22–26 (1970).
- [10] *K. Folkers, J. K. Chang, B. L. Currie, C. Y. Bowers, A. Weil & A. V. Schally*, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **39**, 110 (1970).
- [11] *C. Y. Bowers, A. Weil, J. K. Chang, H. Sievertsson, F. Enzmann & K. Folkers*, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **40**, 683 (1970).
- [12] *K. Hofmann & H. Bohn*, *J. Amer. chem. Soc.* **88**, 5914 (1966).
- [13] *K. Hofmann & C. Y. Bowers*, *J. med. Chemistry* **13**, 1099 (1970).
- [14] *M. Motta, F. Piva, F. Fraschini & L. Martini*, *Hypophysiotropic hormones of the hypothalamus. Assays and Chemistry*, p. 44, Ed. *J. Meites*, Williams & Wilkins, Co., Baltimore (1970).
- [15] *E. Yamazaki, E. Sakiz & R. Guillemin*, *Experientia* **19**, 480 (1963).
- [16] *C. I. Bliss*, *Biometrics* **12**, 491 (1956).
- [17] *D. H. Spackman, W. H. Stein & S. Moore*, *Analyt. Chemistry* **30**, 1190 (1958).
- [18] *M. Bergmann, L. Zervas & W. F. Ross*, *J. biol. Chemistry* **111**, 245 (1935).
- [19] *D. Hamer & J. P. Greenstein*, *J. biol. Chemistry* **193**, 81 (1951).
- [20] *N. Izumiya, H. Okazaki, I. Matsumoto & H. Takigushi*, *J. Biochemistry (Tokyo)* **46**, 1347 (1959); *K. Vogler & P. Lanz*, *Helv.* **43**, 270 (1960).
- [21] *H. O. van Orden & E. L. Smith*, *J. biol. Chemistry* **208**, 751 (1954).

137. Notiz zur Konstitution des Laurepukins¹⁾

8. Mitteilung über natürliche und synthetische Isochinolin-Derivate²⁾

von **Ek. Weiss** und **Karl Bernauer**

Chemische Forschungsabteilung der *F. Hoffmann-La Roche & Co., AG*, Basel,

und **A. Girardet**

Ecole de Pharmacie, Université de Lausanne

(15. V. 71)

Summary. The alkaloid (–)-laurepukine is shown to possess one of the epimeric N-oxide structures **4** or **5**. Oxidation of (–)-pukateine (**3**) by hydrogen peroxide gives (–)-laurepukine and, as a second product, 6-*epi*-laurepukine.

Für das Alkaloid (–)-Laurepukin aus *Laurelia novae-zelandiae* ist die Struktur **1** eines 1,2-Dihydroxy-10,11-methylenedioxy-aporphins vorgeschlagen worden; als – weniger wahrscheinliche – Alternativformel wurde **2** zur Diskussion gestellt [2]. Aporphine mit Sauerstoff-Funktionen in den Stellungen 1, 2, 10 und 11 sind in beträchtlicher Anzahl bekannt. Alle zeigen positive $[\alpha]_D$ -Werte $> 130^\circ$; einzige Aus-

1) Über die vorliegende Arbeit hat *K. Bernauer* am «*Third Natural Products Symposium*» in Kingston, Jamaica, am 6. Januar 1970 berichtet.

2) 7. Mitteilung: [1].