

## 126. Die Synthese von menschlichem adrenocorticotropem Hormon ( $\alpha_h$ -ACTH) mit revidierter Aminosäuresequenz

von P. Sieber, W. Rittel und B. Riniker

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

(30. III. 72)

*Summary.* We demonstrated recently that the amino acid sequence of human ACTH ( $\alpha_h$ -ACTH<sup>1</sup>) differs in four positions from the structure reported in 1961 by Lee and coworkers. The synthesis of the revised sequence and a method of verifying the identity of the synthetic peptide with the naturally occurring hormone are described. The two preparations can most readily be compared by examining the mixture of fragments obtained upon degradation with trypsin. In this mixture, fragments 22–39 of natural  $\alpha_h$ -ACTH and of the synthetic peptide are identical and easily distinguishable from the corresponding synthetic fragment of the previously postulated sequence. This is demonstrated by thin layer-chromatography and -electrophoresis as well as by reference to the rate of deamidation under alkaline conditions.

Lee *et al.* [3] schlugen 1961 für ACTH aus menschlichen Hypophysen die Aminosäuresequenz **2** vor (vgl. Schema 1), in der sie die Lage der Seitenkettenamidgruppe(n) nicht mit Sicherheit festlegen konnten. Sequenz **2** wurde im Jahre 1967 von Bajusz *et al.* [4] synthetisiert, ohne dass aber das synthetische mit dem schwer zugänglichen natürlichen Hormon verglichen wurde. Kürzlich haben wir zeigen können [5], dass die vorgeschlagene Sequenz **2** in vier Positionen korrigiert werden muss, und dass menschlichem ACTH die Formel **1** zukommt.

Im Folgenden beschreiben wir die Synthese der Nonatriacontapeptidsequenz **1** und ihre Identifizierung mit dem aus menschlichen Hypophysen isolierten  $\alpha_h$ -ACTH<sup>2</sup>).

*Synthese von 1.* Der Aufbau von **1** folgte in bezug auf Schutzgruppen, Unterteilung in Fragmente und Kupplungsmethoden weitgehend dem von Schwyzler & Sieber [6] beschriebenen Weg.

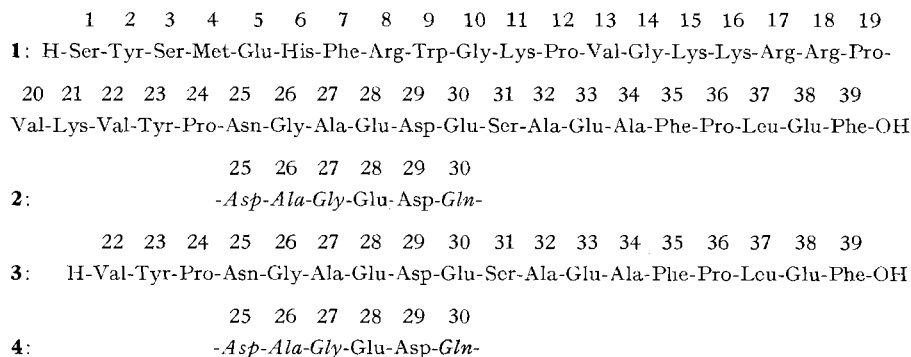
Aus H-Ala-Glu(OBut)-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu(OBut)-Phe-OBut [6] wurde stufenweise, den Vorschriften von [6] genau folgend, die Sequenz 25–39, Z-Asn-Gly-Ala-Glu(OBut)-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Ser-Ala-Glu(OBut)-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu(OBut)-Phe-OBut (**5**) aufgebaut. Wegen des artspezifischen Unterschieds zwischen Schweine- $\beta$ -Corticotropin und **1** unterscheiden sich die dabei erhaltenen Zwischenprodukte von denen der früheren Synthese [6]. Ihre Eigenschaften sind in Tab. 1 (vgl. exp. Teil) zusammengefasst. Nach Einführung des Serinrestes 31 mit freier Hydroxylgruppe traten bei den nachfolgenden Umsetzungen mit aktiven Estern lipophile Nebenprodukte auf. Sie wurden auf einigen Stufen durch milde Hydrazinolyse entfernt. Wir nehmen an, dass es sich dabei um Ser<sup>31</sup>-O-Acylderivate handelt. Bei der geschützten Sequenz **5** verzichtete man wegen der Alkalilabilität [5] auf die Behandlung mit Hydrazin. Man entfernte die Z-Gruppe durch katalytische Hydrierung und kuppelte mit der Sequenz 17–24, Z-Arg-Arg-Pro-Val-Lys(Boc)-

1) Bezeichnung nach C. H. Li [1]; zu der in dieser Arbeit verwendeten, abgekürzten Schreibweise für Aminosäuren, Peptide und ihre Derivate vgl. [2]; ferner bedeuten: Boc-: *t*-Butyloxycarbonyl-; DCCI: Dicyclohexylcarbodiimid; HOBt: 1-Hydroxybenzotriazol; -OBut: *t*-Butyloxy-; Z-: Benzylloxycarbonyl-.

2) Den Herren Dres. E. de Jager und W. Hondius Boldingh, N. V. Organon, Oss, Holland, sei für die grosszügige Überlassung dieses Materials bestens gedankt.

Val-Tyr-Pro-OH (**6**) (als Dihydrochlorid, vgl. [6]) mittels DCCI und HOBT [7]. Man erhielt dabei die Sequenz 17–39, Z-Arg-Arg-Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu(OBut)-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Ser-Ala-Glu(OBut)-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu(OBut)-Phe-OBut (**7**), die durch Gegenstromverteilung gereinigt wurde. Aus **7** entfernte man die Z-Gruppe wieder durch katalytische Hydrierung und kondensierte nach der Azidmethode mit dem aus der Sequenz 11–16, Z-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-NHNH<sub>2</sub> (**8**), bereiteten Azid. Die erhaltene Sequenz 11–39, Z-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg-Arg-Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu(OBut)-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Ser-Ala-Glu(OBut)-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu(OBut)-Phe-OBut (**9**) reinigte man durch Gegenstromverteilung und entfernte die Z-Gruppe durch katalytische Hydrierung. Hierauf kuppelte man mit dem geschützten Fragment 1–10, Boc-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBut)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH (**10**) [8] mit DCCI und HOBT [7]. Die erhaltene geschützte Sequenz 1–39, Boc-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBut)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg-Arg-Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu(OBut)-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Ser-Ala-Glu(OBut)-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu(OBut)-Phe-OBut (**11**), wurde durch Gegenstromverteilung gereinigt. Dann entfernte man alle Schutzgruppen aus **11** acidolytisch mittels Trifluoressigsäure, reinigte das freie **1** wiederum durch Gegenstromverteilung in einem trifluoressigsäurehaltigen Lösungsmittelgemisch und führte es durch Ionenaustausch in das essigsaure Salz über.

Schema 1. **1**: revidierte Aminosäuresequenz für  $\alpha_h$ -ACTH [5]. **2**: ursprünglicher Strukturvorschlag für  $\alpha_h$ -ACTH [3] (Sequenz 1–24 und 31–39 wie in **1**). **3**: Trypsinfragment 22–39 aus **1**. **4**: Trypsinfragment 22–39 aus synthetischer Teilsequenz 17–39 entsprechend Strukturvorschlag **2** (Sequenz 22–24 und 31–39 wie in **3**).



*Charakterisierung des synthetischen  $\alpha_h$ -ACTH (1).* – **1** wurde nach Gegenstromverteilung in hoher Reinheit erhalten; in mehreren Dünnschichtchromatographie-systemen (vgl. z. B. Fig. 1) zeigte es einen mit natürlichem  $\alpha_h$ -ACTH identischen Hauptfleck und einen schwachen Nebenfleck des Met<sup>4</sup>-Sulfoxidderivates. Durch Wasserstoffperoxid wurden synthetisches und natürliches **1** quantitativ in die dünn-schichtchromatographisch wiederum identischen Met<sup>4</sup>-Sulfoxidderivate übergeführt; beim Abbau mit Trypsin lieferten beide Präparate das gleiche Gemisch der Frag-mente 1–8, 9–15, 16–21, 17–21, 18–21 und 22–39 (Fig. 1).

Zum exakten Nachweis der Identität von natürlichem und synthetischem **1** und zur Unterscheidung von der falschen Sequenz **2** [(Asp<sup>25</sup>, Ala<sup>26</sup>, Gly<sup>27</sup>, Gln<sup>30</sup>)-Analoges] dienten die C-terminalen Trypsinfragmente 22–39. Dazu baute man natürliches und synthetisches **1** durch dieses Enzym ab und gewann die Fragmente 22–39 (**3**) durch Gegenstromverteilung. Zur Herstellung des Fragmentes 22–39 mit falscher Amino-säuresequenz (**4**) baute man die synthetische Teilsequenz 17–39 auf, welche die

Formel 2 entsprechende Struktur besitzt<sup>3)</sup>, hydrolysierte sie mittels Trypsin und isolierte 4 durch Gegenstromverteilung.

Die Identität von 3 aus synthetischem und natürlichem 1 ergab sich aus dem übereinstimmenden Verhalten in der Gegenstromverteilung sowie bei der Dünnschicht-Chromatographie und -Elektrophorese. Das Trypsinfragment 4 unterschied sich nach allen drei Kriterien deutlich von 3. Zudem ist es gegen Basen stabil unter Bedingungen, unter denen synthetisches und natürliches 3 quantitativ verändert werden (Fig. 2) (Desamidierung der Asn<sup>25</sup>-Seitenkette unter Bildung eines Gemisches von  $\alpha$ - und (vorwiegend)  $\beta$ -Peptid (Schema 2).)

Schema 2. Umlagerung der Asn<sup>25</sup>-Gly<sup>26</sup>-Sequenz unter basischen Bedingungen.

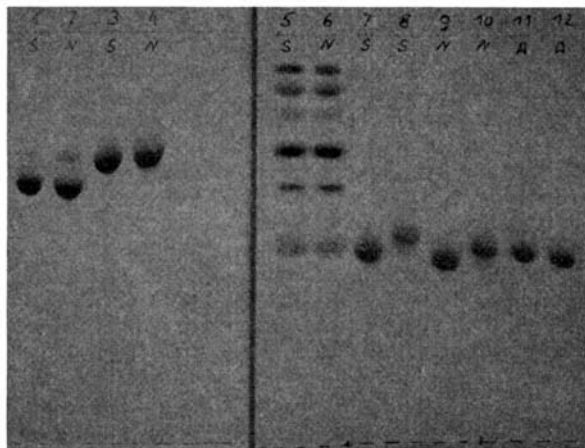
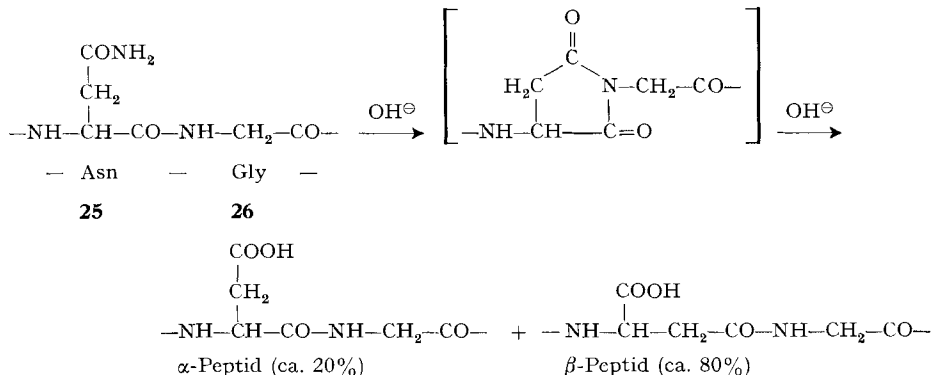


Fig. 1. Dünnschichtchromatographische Identifizierung von synthetischem und natürlichem  $\alpha_n$ -ACTH (System 101, auf Celluloseplatte)

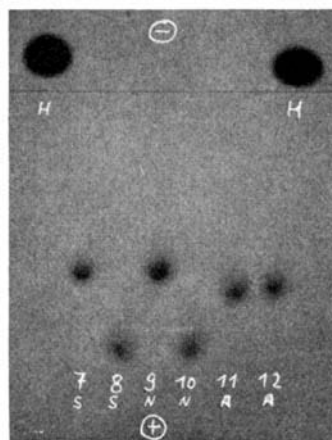


Fig. 2. Elektrophoretischer Vergleich der Trypsin-Fragmente 22–39. (Pyridinacetatpuffer, pH 5, 1 Std. 6 V/cm, auf Celluloseplatte)

<sup>3)</sup> Zur Synthese dieses Peptids stellte man, wie im exp. Teil für 7 beschrieben, die geschützte Sequenz 17–39, Z-Arg-Arg-Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-Asp(OBut)-Ala-Gly-Glu(OBut)-Asp(OBut)-Gln-Ser-Ala-Glu(OBut)-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu(OBut)-Phe-OBut, dar und entfernte die Z-Gruppe durch katalytische Hydrierung und die übrigen Schutzgruppen durch Einwirkung von 90proz. Trifluoressigsäure.

S = synthetisch; N = natürlich; A = (Asp<sup>25</sup>, Ala<sup>26</sup>, Gly<sup>27</sup>, Gln<sup>30</sup>)-Analoges; H = Harnstoff. Nr. 1 und 2: intaktes  $\alpha_h$ -ACTH; Nr. 3 und 4: nach Oxydation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Nr. 5 und 6: nach Spaltung mittels Trypsin (Fragmente 16–21, 17–21, 18–21, 9–15, 1–8 und 22–39, in Richtung steigenden Rf); Nr. 7, 9 und 11: Fragmente 22–39; Nr. 8, 10 und 12: Fragmente 22–39 nach NH<sub>3</sub>-Behandlung.

*Biologische Aktivität.* – Das synthetische **1** zeigte, wie zu erwarten, grössenordnungsmässig vergleichbare steroidogenetische Wirkung<sup>4)</sup> wie synthetisches Schweine- $\beta$ -Corticotropin (Testierung nach [10]). Über die ausführliche biologische Evaluierung wird andernorts berichtet werden [11].

### Experimenteller Teil<sup>5)</sup>

*Hydrogenolysen.* Man hydrierte in 80proz. Es in Gegenwart von Palladium-Kohle (10% Pd); das bei der Abspaltung der Z-Gruppe freiwerdende CO<sub>2</sub> wurde in einem zweiten Schüttelgefäss in Natronlauge absorbiert.

Zu *Dünnschichtchromatographien* dienten folgende Trägermaterialien: S: Kieselgel (Fertigplatten SL 254 der Fa. Antec, Birsfelden); A: Aluminiumoxid (45 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> der Fa. Camag, Muttenz, + 3,5 g Gips; Schichtdicke 0,3 mm); C: Cellulose (Fertigplatten der Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland).

Die als Fliessmittel verwendeten Lösungsmittelsysteme hatten folgende Zusammensetzung (Angaben in Volumteilen):

(1) = Chlf/Aceton 1:1, (2) = Chlf/MeOH 9:1, (3) = Chlf/MeOH/Es 45:4:1, (4) = Chlf/MeOH/Trifluoräthanol 93:5:2, (52) = 1-Butanol/Es/W 71:7:22, (96) = 2-Butanol/Es/W 67:10:23, (100) = Eg/Py/Es/W 62:21:6:11, (100 E) = Eg/Py/Es/W 60:21:8:11, (101 A) = 1-Butanol/Py/Es/W 42:24:4:30, (112 B) = 1-Butanol/Py/Ameisensäure/W 40:24:6:30, (115) = Eg/Py/Ameisensäure/W 63:21:10:6.

Der Nachweis der Substanzen auf den Platten erfolgte mit *Reindel-Hoppe*-Reagens in der Ausführungsform nach [12].

**Synthese von 1.** – *Geschützte Sequenz 25–39 (5).* Ausgehend von H-Ala-Glu(OBut)-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu(OBut)-Phe-OBut wurde der Aufbau nach [6] durch stufenweisen Umsatz mit aktivierten Estern unter Zusatz von 0,7 Äqu. N-Methylmorpholin und nachfolgende katalytische Hydrierung durchgeführt. Die Eigenschaften der Produkte sind in Tab. 1 zusammengefasst.

*Geschützte Sequenz 17–39 (7).* 950 mg (0,47 mMol) **5** (Acetatform) wurden zur Entfernung von Es in 30 ml 90proz. *t*-Butanol gelöst, mit 0,47 ml 1 N Salzsäure versetzt und lyophilisiert. Dann löste man in 20 ml DMF und gab 790 mg (0,61 mMol) **6** (als Dihydrochlorid, vgl. [6]), 190 mg HOBT und 194 mg DCCI zu und rührte 18 Std. bei 25°. Man fällte mit Ae und reinigte durch Gegenstromverteilung im System Chlf/CCl<sub>4</sub>/MeOH/Puffer 2:1:3:1 (Puffer: 29 ml Es, 19 g Ammoniumacetat, 960 ml W). Nach 290 Verteilungsschritten wurde das reine **7** aus den Röhren 63–90 (K  $\sim$  0,35) isoliert (780 mg = 50% d. Th., ber. als Diacetat); Rf (S) = 0,35 (52); 0,25 (100).

*Geschützte Sequenz 11–39 (9).* 210 mg (63  $\mu$ Mol) **7** wurden in 20 ml 80proz. Es mit 200 mg Katalysator wie üblich hydriert. Man erhielt 208 mg Produkt [Rf(S) = 0,55 (101 A)], das man in 2 ml DMF und 55  $\mu$ l N-Methylmorpholin löste. Dazu gab man bei –15° die aus 144 mg (130  $\mu$ Mol) **8** in 1,4 ml DMF nach *Honzl & Rudinger* [13] bereitete Azidlösung. Nach Stehenlassen bei 5° während 18 Std. fällte man mit Ac und reinigte durch Gegenstromverteilung im System Chlf/CCl<sub>4</sub>/MeOH/Puffer (7:6:15:5; Puffer wie oben) über 600 Stufen. Die reine Substanz befand sich in den Elementen 68–116 (K  $\sim$  0,16); man erhielt 223 mg **9** (82%). Rf(S) = 0,4 (52); 0,35 (100).

*Geschützte Sequenz 1–39 (11).* 218 mg (51  $\mu$ Mol) **9** wurden in 60 ml 80proz. Es mit 200 mg Katalysator wie üblich hydriert. Das erhaltene Produkt wurde in 3 ml 90proz. MeOH gelöst, mit 0,6 ml 1 M Ammoniumsulfat und 10 ml W gefällt, abgenutscht und mit W sulfatfrei gewaschen. Man erhielt 195 mg (92%) als Sesquisulfat, Rf(S) = 0,15 (100); 0,45 (96). 190 mg (46  $\mu$ Mol) davon, 84 mg (55  $\mu$ Mol) **10** [8] (inneres Salz), 8,4 mg HOBT und 14  $\mu$ l 1 N Salzsäure wurden in 1 ml DMF

<sup>4)</sup> Den Herren Dres. P. Barthe und P. A. Desaulles danken wir für die Testierungsergebnisse.

<sup>5)</sup> Verwendete Lösungsmittel: Ae: Äther; Chlf: Chloroform; DMF: Dimethylformamid; Eg: Essigester; Es: Essigsäure; MeOH: Methanol; Py: Pyridin; W: Wasser.

Tabelle 1. Eigenschaften der Zwischenprodukte beim Aufbau der geschützten Sequenz 25–39 (5)<sup>a)</sup>

Sequenz	Reinigung aus	Ausbeute %	Dünnschicht- chromatogramm	
			System	Rf (S)
Z-31-39-OBut <sup>b)</sup>	1. DMF/Ae 2. Acetonitril	87	1	0,35
H-31-39-OBut		>95	2	0,5
Z-30-39-OBut	DMF/Ae	93	2	0,2
H-30-39-OBut		>95	1	0,35
Z-29-39-OBut <sup>c)</sup>	DMF/Ae	84	2	0,45
H-29-39-OBut		>95	1	0,2
Z-28-39-OBut	DMF/Ae	92	2	0,4
H-28-39-OBut		>95	2	0,48
Z-27-39-OBut <sup>c)</sup>	1. DMF/W 2. Acetonitril/W 4:1	80	2	0,35
H-27-39-OBut		96	4	0,25
Z-26-39-OBut <sup>c)</sup>	1. DMF/W 2. Acetonitril/W 4:1	73	2	0,35
H-26-39-OBut		>95	4	0,4
Z-25-39-OBut	DMF/W	>95	2	0,15
H-25-39-OBut		93	2	0,25
			100	0,45

a) Carboxylgruppen von Glu<sup>28,30,33,38</sup>, Asp<sup>29</sup> und Phe<sup>39</sup> als –OBut-derivate, Ser<sup>31</sup>–OH ungeschützt.

b) Mit Z-Ser-OPcp hergestellt.

c) Das als Nebenprodukt vorhandene Ser<sup>31</sup>–O-amino-acyl-derivat entfernte man durch Lösen in DMF oder MeOH, Zugabe von 5 Vol% Hydrazinhydrat und Ausfällung, nach 15 Min. bei 25°, mit W.

15 Min. bei 45° unter Stickstoff gerührt. Nach Zugabe von 47 mg DCCI wurde noch 2 Std. bei 45° gerührt, dann mit Ae gefällt. Das Rohprodukt wurde durch Gegenstromverteilung im System Chlf/CCl<sub>4</sub>/MeOH/Puffer (6:4:10:3,5; Puffer wie oben) gereinigt. Nach 800 Stufen wurde die reine Substanz aus den Elementen 314–371 (K = 0,8) isoliert. Man erhielt 129 mg (50%) **11**; Rf(A) = 0,5 (100E); (S) = 0,35 (115). Das Met<sup>4</sup>-Sulfoxidderivat von **11** befand sich in den Elementen 380–410 (K = 1,0).

*Freies α<sub>n</sub>-ACTH (1)*. 119 mg (21 μMol) **11** wurden in 3 ml 90proz. Trifluoressigsäure 30 Min. bei 25° belassen. Dann fällte man mit Ae und reinigte durch Gegenstromverteilung im System *t*-Butanol/2proz. wssr. Trifluoressigsäure/Chlf/Toluol (10:10:1:1). Nach 400 Verteilungsschritten vereinigte man den Inhalt der Rohre 55–90 (K ~ 0,2), engte auf ein Volumen von 10 ml ein und filtrierte über eine Säule von Amberlite JR-45 (Acetatform). Man lyophilisierte das Eluat und äquilibrierte mit Luftfeuchtigkeit; man erhielt 89 mg **1** [Peptidgehalt 80% (Mittel aus UV- und Aminosäureanalyse), entspr. 71 mg 100% Peptid (74% Ausbeute)].

*UV-Absorption*:  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 17,7$  ( $\lambda_{\text{max}} = 276$  nm in 0,1N Salzsäure).

*Aminosäureverhältnisse* nach Totalhydrolyse, a) saure Hydrolyse (6N HCl, 24 Std. 110°), b) enzymatische Hydrolyse<sup>6)</sup>, berechnete Werte in Klammern: Trp a) 0,81, b) 1,07 (1), Lys a) 3,70, b) 4,14 (4), His a) 1,02 b) 1,05 (1), Arg a) 3,28 b) 3,12 (3), Asp a) 2,12 (2) b) 0,92 (1), Ser a) 2,42 b) 3,04 (3), Glu a) 4,77 b) 5,09 (5), Pro a) 3,93 b) 4,08 (4), Gly a) 2,95 b) 3,03 (3), Ala a) 3,13 b) 3,10 (3), Val a), b) 3,00 (Bezugswert, 3), Met a) 1,13 b) 0,95 (1), Leu a) 1,06 b) 1,02 (1), Tyr a) 2,14 b) 1,93 (2), Phe a) 3,17 b) 3,06 (3), Asn b) 0,99 (1).

6) Hydrolysiert mit einem Gemisch von Sepharose-gebundenen Peptidasen nach Bennett *et al.* [14]. Wir danken diesen Autoren bestens für die Überlassung der Hydrolysresultate.

*Dünnschichtchromatographie*:  $R_f(C) = 0,39$  [0,32] (101); 0,58 [0,54] (112B); die Werte in eckigen Klammern beziehen sich auf das Met<sup>4</sup>-Sulfoxidderivat.

*Optische Rotationsdispersion*<sup>7)</sup>: Messung in 0,02-proz. Essigsäure, pH = 3,6; Konzentration  $c$ , korrigiert auf 100% Peptidgehalt:  $17,8 \cdot 10^{-3}$  mg/ml von 200–235 nm, bzw.  $178 \cdot 10^{-3}$  mg/ml von 240–340 nm; Instrument: Cary 60.  $\lambda_{\min} = 208$  nm; Nulldurchgang = 196 nm;  $[\alpha]_{\min} = -8400 \pm 600^\circ$ .

*Zirkulardichroismus*<sup>7)</sup>: Messung in 0,02-proz. Essigsäure;  $c$  (korrigiert) =  $8,9 \cdot 10^{-3}$  mg/ml; Instrument: Cary 61.  $\lambda_{\min} = 198$  nm;  $[\theta]_{\min} = -5,8 \cdot 10^5$  Grad  $\cdot$  cm<sup>2</sup>  $\cdot$  Dezimol<sup>-1</sup>.

**Isolierung der Fragmente 22-39 (3 und 4) durch Trypsinspaltung und Gegenstromverteilung**. – a) **3** aus synthetischem  $\alpha_h$ -ACTH: 20 mg synthetisches **1** wurden in 5 ml 0,2M Ammoniumacetatpuffer (pH 8,2) gelöst und nach Zugabe von 0,25 ml 0,2proz. Trypsinlösung (Calbiochem, Chymotrypsinfrei) während 40 Min. bei 38° inkubiert. Nach Zugabe von 0,25 ml Es engte man zur Trockne ein und lyophilisierte aus 95proz. Es. Der Rückstand wurde im Lösungsmittelsystem 1-Butanol/Es/W (4:1:5) über 200 Stufen mit Phasenvolumina von je 0,7 ml verteilt. Aus den Verteilungselementen Nr. 102–134 ( $r_{\max} = 120$ ;  $K = 1,5$ ) isolierte man insgesamt 8,8 mg chromatographisch reines **3**.  $R_f(C) = 0,57$  (101); 0,69 (112 B); 0,45 (52). Elektrophorese (Bedingungen s. Fig. 2): Laufstrecke + 5,0 cm. Nach Basenbehandlung, 3 Std. bei 40. in 1N NH<sub>3</sub>: Hauptkomponente = Asp<sup>25</sup>- $\beta$ -Peptid;  $R_f(C) = 0,54$  (101); 0,68 (112 B); 0,47 (52). Elcktophorese: Laufstrecke + 7,1 cm.

b) **3** aus natürlichem  $\alpha_h$ -ACTH: Ca. 25 mg natürliches **1**<sup>2)</sup> wurden wie unter a) mit Trypsin gespalten und über 250 Stufen verteilt. Aus den Elementen Nr. 140–170 ( $r_{\max} = 155$ ,  $K = 1,6$ ) isolierte man 8,5 mg des Fragmentes **3**. Die dünnschichtchromatographischen und elektrophoretischen Werte decken sich mit den unter a) aufgeführten.

c) **4** aus synthetischem Asp<sup>25</sup>, Ala<sup>26</sup>, Gly<sup>27</sup>, Gln<sup>30</sup>. ACTH<sup>17–39</sup> <sup>3)</sup>: 45 mg dieses Tricosapeptides wurden wie unter a) mit Trypsin gespalten und über 400 Stufen verteilt. Aus den Elementen Nr. 268–300 ( $r_{\max} = 285$ ;  $K = 2,5$ ) isolierte man 24 mg des Fragmentes **4**.  $R_f(C) = 0,54$  (101); 0,67 (112 B); 0,45 (52 A). Elektrophorese (Bedingungen s. Fig. 2): Laufstrecke + 5,7 cm. Nach Basenbehandlung wie bei a): unveränderte Werte.

Für wertvolle technische Mitarbeit danken wir Frau V. von Arx und den Herren D. Good und A. Stauffer.

Aminosäureanalysen, Dünnschicht-Chromatographien und -Elektrophoresen wurden in verdankenswerter Weise in unserem Chromatographie-Laboratorium (Leiter: Herr E. von Arx) durch Fräulein J. Keller, Frau K. Reist und die Herren D. Faupel und W. Morgenthaler ausgeführt.

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] C. H. Li, *Science* **129**, 969 (1959).
- [2] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochim. Biophys. Acta* **121**, 1 (1966).
- [3] T. H. Lee, A. B. Lerner & V. Buettner-Janusch, *J. Biol. Chem.* **236**, 2970 (1961).
- [4] S. Bajusz, Z. Paulay, Z. Lang & K. Medzihradsky, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **52**, 335 (1967).
- [5] B. Riniker, P. Sieber, W. Rittel & H. Zuber, *Nature New Biology* **235**, 114 (1972).
- [6] R. Schwyzer & P. Sieber, *Helv.* **49**, 134 (1966).
- [7] W. König & R. Geiger, *Chem. Ber.* **103**, 788 (1970).
- [8] R. Schwyzer & H. Kappeler, *Helv.* **44**, 1991 (1961).
- [9] D. M. Shotton & B. S. Harlley, *Nature* **225**, 802 (1970).
- [10] P. A. Desaulles & W. Rittel in «The Investigation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Function», V. H. T. James & J. Landon, Eds., S. 125, University Press, Cambridge 1968.
- [11] L. Schenkel-Hulliger, P. Barthe & P. A. Desaulles, in Vorbereitung.
- [12] E. von Arx & R. Neher, *J. Chromatogr.* **12**, 329 (1963).
- [13] J. Honzl & J. Rudinger, *Coll. czech. Chem. Commun.* **26**, 2333 (1961).
- [14] H. P. J. Bennett, D. F. Elliott, P. J. Lowry & C. McMartin, *Biochem. J.* **125**, 80P (1971).

7) ORD.- und CD.-Spektren wurden in verdankenswerter Weise von Herrn Dr. P. Moser aufgenommen.