

## 217. Chemisch-spezifische Kopplung von Adrenocorticotropin- und Angiotensin-II-Derivaten an Polymerträger für die Affinitätschromatographie<sup>1)</sup>

von Jean-Luc Fauchère und Glatgen-Mario Pelican

Institut für Molekularbiologie und Biophysik  
Eidgenössische Technische Hochschule  
CH-8049 Zürich

(11. VIII. 75)

**Specific covalent attachment of adrenocorticotropin and angiotensin II derivatives to polymeric matrices for use in affinity chromatography.** *Summary.* The purpose of this investigation was to prepare polymer-supported forms of adrenocorticotropin and angiotensin II with unique points of covalent attachment and presumably low rates of hormone detachment, making them potentially useful for affinity chromatography. Conventional chemical synthesis provided the peptides cysteinyl-ACTH (5-24) ([4-cysteine]-adrenocorticotropin-(4-24)-hencikosipeptide) and cysteinyl-angiotensin II amide ([1-N<sup>α</sup>-cysteinyl-asparagine, 5-valine]-angiotensin II). Strategies were devised to bind these hormone derivatives either in the protected form to polyacrylamide or in the deprotected form to sepharose beads. The obtained high degree of matrix substitution suggests a general applicability of these methods.

**Einführung.** - Die Isolierung von Polypeptidhormon-Bindungsproteinen ist eine ausserordentlich aufwendige Aufgabe, die bis heute nur in wenigen Fällen gelungen ist. Die extrem geringen Mengen von Rezeptorprotein in biologischen Geweben erfordern hohe Reinigungsfaktoren, die in den Grössenordnungen von 10<sup>5</sup> bis 10<sup>6</sup> liegen können. Erst die Einführung von hochspezifischen Isolierungsmethoden wie die Affinitätschromatographie ermöglichte derartige Leistungen (vgl. [1]).

Für die spezifische Wirkungsweise der Bioaffinitätschromatographie, das heisst, für das Erkennen des am Träger fixierten Polypeptidhormons (Ligand) durch das Bindungsprotein, spielt bestimmt die Topographie des Liganden eine wesentliche Rolle. Diese ist bestimmt durch die Beschaffenheit der Matrix, die Eigenschaften des Bindegliedes oder «Spacers» (zwischen Matrix und Ligand) sowie die Anzahl und die Lage der Kupplungsstellen im Polypeptid-Liganden.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von allgemeinen Methoden für eine chemisch eindeutige Kopplung von Polypeptidhormonen an Polymerträger.

Bis heute wurden Peptide meistens durch statistisch in der Sequenz verteilte reaktive Gruppen an Polymer-Gele chemisch gebunden, was zu einer inhomogenen Population der Liganden und einer nicht reproduzierbaren Verteilung der chemischen und biologischen Eigenschaften führte. So wurde porcines Adrenocorticotropin (ACTH) als ungeschütztes Peptid an diazotiertes 1-[7-(Agarosyl-oxy-carbonimidoyl-

<sup>1)</sup> Teil der Dissertationsarbeit von G. M. P. Nomenklatur und Abkürzungen entsprechen den in der Peptid- und Proteinchemie üblichen Normen, vgl. E. Wunsch: «Synthese von Peptiden», Bd. 15 von Houben-Weyl, «Methoden der organischen Chemie», E. Müller, Herausgeber Georg-Thieme Verlag, Stuttgart 1974.

amino)-4-azaheptylcarbonyl]-4-aminobenzol gekoppelt und auf seine pharmakologischen Eigenschaften geprüft [2]. Ebenso setzte man unmodifiziertes [Asn<sup>1</sup>, Val<sup>6</sup>]-Angiotensin II mit durch Bromcyan aktivierter Sepharose um und verwendete das substituierte Gel als Immunoadsorbens [3]. Solche chemisch nicht eindeutig definierte Affinitätschromatographie-Materialien können ihren Zweck erfüllen: So hat die Anwendung eines Polyacrylamid-Gels, an welches Lysin teils durch die  $\epsilon$ -, teils durch die  $\alpha$ -Aminofunktion gebunden war, z.B. die Isolierung von plasminfreiem Plasminogen aus Plasma erlaubt [4]. Das vorwiegend über das N-terminale Histidin an Sepharose gebundene Glucagon sowie das vorwiegend über das N-terminale Phenylalanin der B-Kette gebundene Insulin führten auch zu sehr hohen Anreicherungen von Bindungsproteinen aus dem Rohextrakt [1].

Dennoch könnte ein Polymerisat, an welches alle Peptidligand-Molekeln durch das gleiche, gut definierte Atom kovalent gebunden sind, gegenüber solchen Präparaten viele Vorteile aufweisen: 1. Das Material wäre chemisch homogen und seine Herstellung reproduzierbar; 2. die Kopplungsstelle am Peptidhormon könnte so gewählt werden, dass die biologischen Eigenschaften möglichst wenig modifiziert werden; 3. die Stabilität der Bindung des Liganden an die Matrix könnte chemisch exakt untersucht werden, weil diese über wohl definierte kovalente Bindungen erfolgt.

So wurde gefunden (Beachtung von Punkt 3), dass solvolytische Prozesse in wässrigen Lösungen oberhalb pH 5 eine Abspaltung der mittels Bromcyanaktivierung an Sepharose gebundenen Liganden bewirken [5]. Die vorgeschlagene Erhöhung der Stabilität durch Heranziehen von mehreren Aminogruppen für die Bindung an das Polymer führt aber auch zu einem chemisch undefinierten Material, wo die Anzahl Bindungsstellen pro Peptidmolekül variiert [6].

**Methoden.** – Für die gezielte chemische Synthese von an Polymerträger gebundenen Polypeptiden ist man gewöhnlich gezwungen, Schutzgruppen anzuwenden: Das Vorkommen nur einer einzigen freien reaktiven Gruppe (z.B. die  $\gamma$ -Carboxylgruppe in [1-Desamino-homocystin, 4-Glutaminsäure]-oxytocin), durch welche das Hormon an Sepharose gekoppelt werden kann, ist ein Spezialfall [7]. Die Abspaltung konventioneller Schutzgruppen müsste aber meistens unter Bedingungen erfolgen, die mit den Stabilitätseigenschaften der Agarose-Matrizen nicht kompatibel sind.

In Anbetracht dieser Tatsachen werden hier drei allgemeine Strategien zur Lösung des Problems vorgeschlagen:

1. *Strategie I: Synthetische Einführung in das Peptidhormon einer mit der Matrix selektiv reagierenden Thiolgruppe.* Die Thiolgruppe wird durch Kondensation des Derivates BOC-Cys(ACM)-OSU mit der  $\alpha$ -Aminogruppe des Polypeptides eingeführt. Die Schutzgruppenabspaltung erfolgt vor der Kopplung an die Polymermatrix. Die Matrix wird mit dem bifunktionellen Bindeglied 6-Maleinimidocaprinsäure nach Keller & Rudinger [8] substituiert, dessen freie Maleinimidogruppe selektiv Cystein-Thiolgruppen addiert (vgl. Schema 1). Möschler & Schwyzer [9] demonstrierten die Brauchbarkeit dieser Methode im Falle der Verknüpfung von Cysteinyl-angiotensin II-amid mit Sepharose. In der vorliegenden Arbeit wird sie für die Kopplung von ACTH-Derivaten an Sepharose- und an Polyacrylamid-Perlpolymerisate ausgedehnt. Ihre Anwendbarkeit ist auf Polypeptide beschränkt, die sonst keine frei zugängliche Thiolgruppe aufweisen.

2. *Strategie II: Umsetzung des selektiv geschützten Peptids mit der Matrix und anschließende Abspaltung der Schutzgruppen am trägergebundenen Peptid.* Dieser zweite Weg stützt sich einerseits auf die bekannten Methoden der Peptidsynthese, die durch selektive Abspaltung einer Schutzgruppe die Herstellung eines Derivates mit einer einzigen reaktiven Funktion ermöglichen, andererseits auf die Entwicklung von neuen Polyacrylamidmatrizen, die unter den sauren Bedingungen der Schutzgruppenabspaltung stabil bleiben. Gute Beladungen der Matrix hat man erhalten durch die Anwendung von drei Perlpolymerisaten auf Acrylamid-Basis. Diese aktivierten Träger werden



saure Behandlung hervorgerufene Veränderung des Perlpolymerisates. Totale Hydrolyse der substituierten Harze und anschliessende Aminosäureanalyse des Überstandes ergaben den Substitutionsgrad der Gelle.

Die Stabilität der Peptidkopplung an die Matrix wurde nicht systematisch untersucht. Während im Falle der substituierten Sepharose der limitierende Faktor in der Unstabilität des Isoharnstoff-Derivates liegt [5], weisen die hier verwendeten Polyacrylamidmatrizen als labilste Stellen eine Ester- bzw. eine Äther-Bindung auf. Die Art dieser kovalenten Bindungen lässt eine höhere Beständigkeit als im Falle der durch BrCN aktivierten Sepharose erwarten (vgl. Fig. 1 und 2).

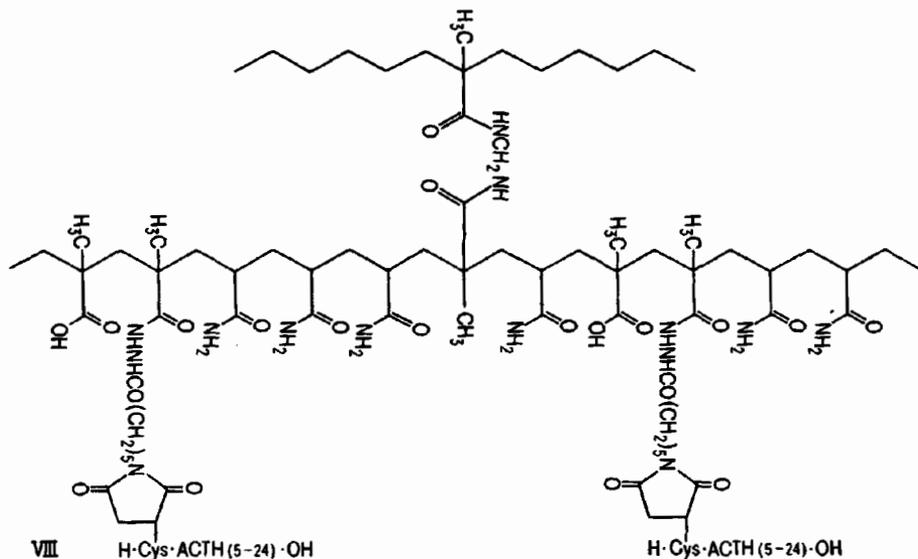


Fig. 1. Harzgebundene ACTH-Derivate nach Strategien I und II

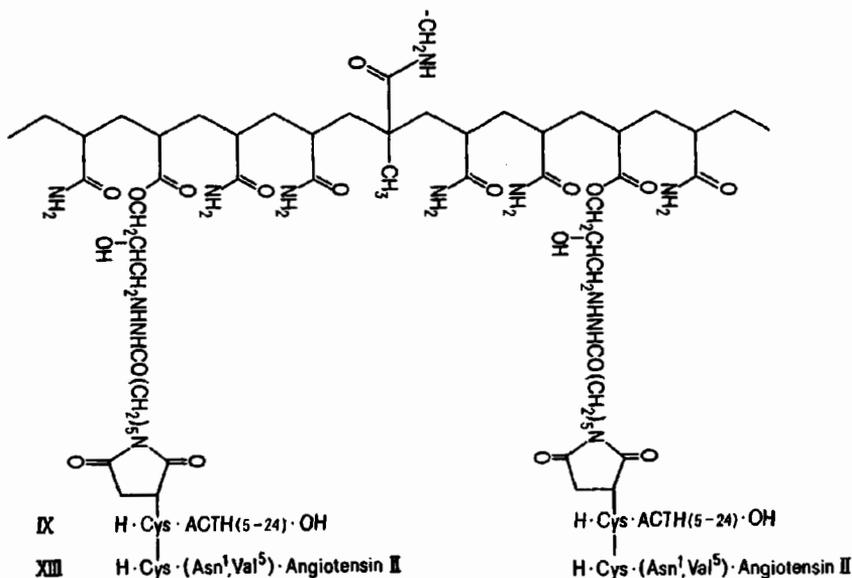


Fig. 2. Polyacrylamidharzgebundenes ACTH-Derivat nach Strategie III

3. *Strategie III*: Eine Kombination der Strategien I und II wurde dort verwendet, wo die Cysteinyl-Derivate des Angiotensin-II-amids und des ACTH an eine Polyacrylamidmatrix statt an Sepharose gekoppelt wurden. Sie hat den Vorteil, dass dadurch das Bindeglied (*Spacer*) zwischen Polyacrylamidträger und Ligand noch verlängert wird (vgl. Fig. 2 und 3).

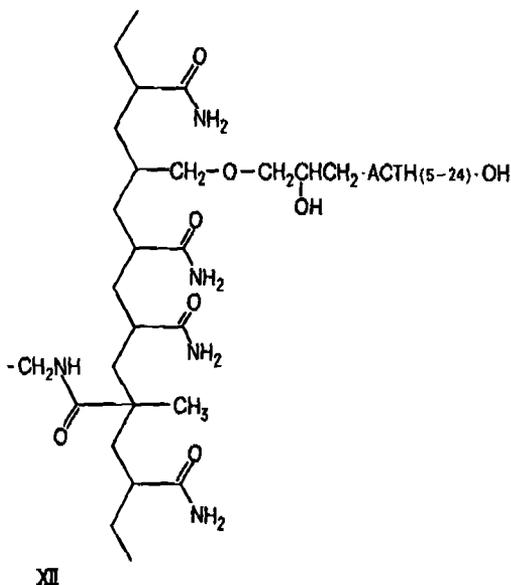
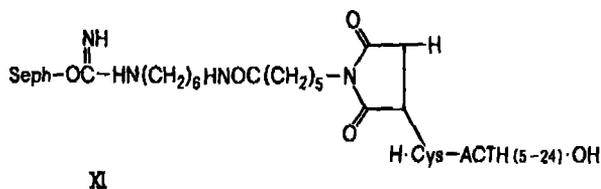


Fig. 3. Polyacrylamidharzgebundene ACTH- und Angiotensin-II-Derivate nach Strategie III

**Resultate und Diskussion.** - Die Bindegliedmolekel 6-Maleinimidocapronsäurehydrazid wurde unter Abänderung des Syntheseweges von *Keller & Rudinger* [8] aus Maleinimidocapronsäure und *t*-Butylcarbazat durch die peptidsynthetische Methode der gemischten Anhydride [14] erhalten, wobei anschliessend die *t*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch 0,1 M HCl in Ameisensäure abgespalten wurde.

Die Synthese des Cysteinyl-angiotensin-II-amid-Derivates ist beschrieben worden [9]. Diejenige des ACTH-Analogen erfolgte nach der allgemeinen Methode von *Schwyzler & Kappeler* [15]. Der Aufbau der Sequenz 4-24 ist im *Schema 2* angegeben und die neuen Verbindungen werden im experimentellen Teil beschrieben.

Die Kopplung der Maleinimidocapronsäure an Sepharosyl-oxycarbimino-amino-hexylamin (AH-Sepharose) erfolgte über den N-Hydroxysuccinimidester [8] [9] [16]. Sie ergab hohe Beladungen der Matrix mit der Bindegliedmolekel. Der zum Teil niedrigere Substitutionsgrad der Polyacrylamidträger dürfte weitgehend durch ihre erhöhte chemische Stabilität kompensiert werden. Die hergestellten Produkte und die Werte der Gel-Beladungen sind tabellarisch zusammengefasst. Diese Werte sind in  $\mu\text{mol}$  Peptid pro g trockenes Harz sowie in  $\mu\text{mol}$  Peptid pro ml gepacktes Gel an-



gegeben, um den verschiedenen Quellungsgraden Rechnung zu tragen. Die Strukturformeln der Produkte sind in den Fig. 1, 2 und 3 aufgeführt.

Diese Arbeit, die sich auf die Beschreibung von neuen chemisch spezifischen Wegen zur Beladung von Polymermatrizen mit Peptidhormonen beschränkt, beweist die Brauchbarkeit der Strategien I, II und III für komplexe Polypeptide. Die biologische Anwendbarkeit dieser Materialien ist bis jetzt nur zum Teil erwiesen [9]. Es steht noch nicht fest, ob die Geschwindigkeit der Hormonabspaltung unter der Schwelle für die Stimulierbarkeit von Adenylcyclase- oder Lipase-Systemen durch ACTH liegt, womit relevante Messungen der pharmakologischen Eigenschaften des am Gel gebundenen Peptids möglich würden. Man verfolgt zurzeit affinitätschromatographische Experimente mit Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus Nebenierenrinde (Rind). Dieses Enzym zeigt Affinität für die Harz-ACTH-Präparate und wird als Modell eines ACTH-Bindungsproteins [17] verwendet.

### Experimenteller Teil

*Smp.* wurden in offenen Kapillaren gemessen und sind unkorrigiert. *Dünnschichtchromatographie* (DC.) wurde auf käuflichen Kiesolgelplatten *Merck F 254* mit Fluoreszenzindikator (S) oder auf Aluminiumoxidplatten DS-O der Firma *Camag*, Muttenz, mit Zusatz von 12% Gips (A) durchgeführt. Zusammensetzung der Fließmittel (Volumenteile): BEW = 2-Butanol/Eisessig/Wasser 67:10:23; BPEW = *n*-Butanol/Pyridin/Ameisensäure/Wasser 42:24:4:30; EPAW: Äthylacetat/Pyridin/Ameisensäure/Wasser 63:21:10:6; CM: Chloroform/Methanol 50:50. *NMR-Spektren* wurden mit einem Spektrometer *Varian T-60* (60 MHz) oder *Varian HR 220* (220 MHz) mit Tetramethylsilan (TMS) als interne Referenz gemessen. Die *Aminosäureanalysen* wurden auf einem Apparat der Firma *Beckman*, Modell 121 nach *Moore & Stein* ausgeführt [18]. AH-Sepharose war ein käufliches Produkt von *Pharmacia Fine Chemicals*, Uppsala, während die aktivierten Polyacrylamid-Perlpolymerisate uns freundlicherweise von der Firma *Röhm Pharma*, Darmstadt, zur Verfügung gestellt wurden.

Die Numerierung der Peptidverbindungen ist im *Schema 2*, diejenige der harzgebundenen Produkte in den Fig. 1, 2 und 3 definiert.

*Verbindung III.* 408,4 mg (0,4 mmol) des geschützten Hexapeptids Z-Glu(*t*BuO)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH (I) wurden in 8 ml DMF suspendiert und bei 0° durch Zugabe von 0,44 ml 1 M Salzsäure gelöst. Die Lösung wurde bei R.T. mit 872 mg (0,4 mmol) des Tetradekapeptides H-Lys(BOC)-Pro-Val-Gly-Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg-Arg-Pro-Val-Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro-*t*BuO (II) in 7 ml DMF versetzt. Nach Zugabe von 108 mg (0,8 mmol) 1-Hydroxy-benzotriazol und Erhöhung der Temperatur auf 45° fügte man 124 mg (0,6 mmol) DCCI hinzu und rührte während 20 Std. bei 45°. Danach wurde auf 0° abgekühlt, vom Harnstoff abfiltriert und das Filtrat durch Eintropfen in eiskalten, peroxidfreien Äther gefällt. Das mit Äther gewaschene Rohprodukt reinigte man über 270 Schritte durch multiplikative Verteilung im System Methanol/Puffer/Chloroform/Tetrachlorkohlenstoff 8:4:5:2 (Puffer: 14,3 ml Eisessig + 9,62 g Ammoniumacetat + 480 ml Wasser). Die Fraktionen, die reines Produkt enthielten, wurden unter Zusatz von einigen Tropfen Octanol i. V. bei 45° eingedampft. Das noch vorhandene Ammoniumacetat wurde bei 45° absublimiert und der Rückstand in 30 ml *t*-Butylalkohol/Wasser 1:1 aufgenommen und lyophilisiert. Ausbeute 892 mg (67%) amorphes weisses Produkt. DC.: Rf (A) 0,58 (EPAW); 0,74 (BPEW), Rf (S) 0,65 (BEW). Aminosäureanalyse (Hydrolyse 24 Std., 110°, 6 M HCl), berechnete Werte in Klammern: Arg 2,96 (3), Glu 1,03 (1), Gly 2,05 (2), His (Bezugswort) 1,00 (1), Lys 4,01 (4), Phe 0,97 (1), Pro 3,20 (3), Trp 0,96 (1), Tyr 0,96 (1), Val 2,98 (3).

*Verbindung IV.* 330 mg (0,1 mmol) Eikosipeptid III wurden in 20 ml 90% Essigsäure gelöst und in Gegenwart von 50 mg 10proz. Pd/C 6 Std. bei R.T. hydriert [19]. Dann wurden nochmals 25 mg Katalysator beigelegt und die Hydrierung über Nacht weiter laufen gelassen. Anschliessend wurde der Katalysator unter Stickstoff abfiltriert und die Lösung i. V. eingecngt. Nach Wasserzugabe und anschliessendem Lyophilisieren erhielt man 270 mg amorphes, DC.-einheitliches Produkt. Rf (A) 0,63 (BPEW), 0,38 (EPAW), Rf (S) 0,45 (BEW), 0,65 (BPEW).

*Eigenschaften der hormonsubstituierten Matrizen*

Derivat	Matrix	Strategie	Aktive Gruppe	Labilste Bindung	Beladung	
					$\mu\text{mol/g}$	$\mu\text{mol/ml}$
H-Cys-(Asn <sup>1</sup> , Val <sup>5</sup> )-Angiotensin II	Sepharose	I	Maleimid	Isoharnstoff	1,0	0,25
H-Cys-(Asn <sup>1</sup> , Val <sup>5</sup> )-Angiotensin II	Polyacrylamid	III	Maleimid	Ester	0,4	0,06
H-Cys-ACTH(5-24)-OH	Sepharose	I	Maleimid	Isoharnstoff	3,2	0,8
BOC-Cys-(ACTH(5-24) (O-tBu) (BOC) <sub>4</sub> )-O-tBu	Polyacrylamid	III	Anhydrid	Ester	3,8	0,56
BOC-Cys-(ACTH(5-24) (O-tBu) (BOC) <sub>4</sub> )-O-tBu	Polyacrylamid	III	Epoxid	Ester	0,2	0,03
H-(ACTH(5-24) (O-tBu) (BOC) <sub>4</sub> )-O-tBu	Polyacrylamid	II	Epoxid	Ather	0,33	0,03

*Verbindung V.* 482 mg (0,15 mmol) geschütztes Elkosipeptid IV wurden in 7 ml DMF gelöst, 40 mg (0,3 mmol) 1-Hydroxy-benzotriazol hinzugefügt und das pH mit Triäthylamin auf den Wert 9 eingestellt. Hierauf wurden 98 mg (0,25 mmol) BOC-Cys(ACM)-OSU [20] zugegeben. Nach 16 Std. Rühren bei RT. wurde die Lösung in 100 ml Essigester hincingetroppt, 30 Min. stehengelassen und dann filtriert. Der Niederschlag wurde mit Essigester gewaschen und i. V. getrocknet. Ausbeute: 500 mg. Multiplikative Verteilung des Rohproduktes im gleichen System wie für die Reinigung von III und gleiche Aufarbeitung ergaben ein DC.-einheitliches Produkt. Rf (A) 0,70 (BPEW), 0,55 (EPAW). Ausbeute: 305 mg (60%) Aminosäurenanalyse: 1. Nach Oxydation mit Perameisensäure [21]: Glu 1,06 (1), Pro 3,09 (3), Gly 1,92 (2), Val 2,75 (3), Tyr 0,96 (1), Phe 1,02 (1), His 1,17 (1), Lys 4,80 (4), Arg 3,13 (3), Cystoinsäure 0,90 (1), Trp nicht bestimmt. 2. Hydrolyse ohne Oxydation: Glu 1,06 (1), Pro 3,21 (3), Gly 1,89 (3), Val 2,73 (3), Tyr 0,95 (1), Phe 0,98 (1), His 1,04 (1), Lys 4,80 (4), Arg 2,97 (3), Trp 0,95 (1), Cys nicht bestimmt.

*Verbindung VI.* Zur Abspaltung der Acetamidomethyl-Schutzgruppe wurden 40 mg V in 6 ml DMF/Wasser 1:5 aufgelöst und die Lösung bei pH 4 mit 32 mg Quecksilber(II)acetat versetzt [20]. Nach zwei Std. bei RT. wurde das Gemisch mit 10 ml Wasser verdünnt und mit H<sub>2</sub>S gesättigt. Die durch Abzentrifugieren nicht ganz von HgS befreite Lösung wurde lyophilisiert, es resultierten 30 mg Produkt, die man direkt für die nächste Stufe verwendete. DC. (BEW) zeigte eine vollständige Umsetzung des Eduktes an.

*6-Maleinimidocapronsäurehydrazid-hydrochlorid (VIII).* Zu der Lösung von 422 mg (2 mmol) 6-Maleinimidocapronsäure [8] in 10 ml Essigester/Tetrahydrofuran 1:1 wurden bei -5° 0,19 ml (2 mmol) Chlorameisensäureäthylester und 0,28 ml (2 mmol) Triäthylamin gegeben. Nach 10 Min. wurde das voraktivierte Gemisch mit 264 mg (2 mmol) *t*-Butylcarbazat 1 Std. bei -5°, dann 16 Std. bei RT. stehengelassen. Das Gemisch wurde dann in 50 ml Essigester aufgenommen und 3mal mit ges. Hydrogencarbonatlösung, mit 0,1 M Salzsäure und mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Die eingedampfte organische Phase ergab ein Öl, das DC.-einheitlich war: Rf 0,65 (CM). Ausbeute: 430 mg (66%). 81,3 mg des Rohproduktes wurden mit 3 ml (0,3 mmol) 0,1 M Salzsäure in Ameisensäure 15 Min. lang bei RT. behandelt. Die Reaktion wurde durch Verdünnung mit Diäthyläther unterbrochen und das Hydrochlorid durch Abzentrifugieren isoliert. Suspendieren des Rückstandes in Äther und Abzentrifugieren wurden 3mal wiederholt. Das Produkt wurde anschliessend aus Methanol/2-Propanol umkristallisiert. Ausbeute: 92%, Smp. 141°. DC.: Rf 0,41 (BEW), 0,55 (CM). Die freie Hydrazidgruppe liess sich mit dem Barton-Farbraagens [22] nachweisen sowie die Maleoylgruppe durch aufeinanderfolgendes Besprühen der DC.-Platte mit dem Natriumsalz der Mercaptoäthylsulfonsäure und dem Hillman-Reagens [23] [8]. NMR. in deuteriertem Pyridin bei 60 MHz:  $\delta$  (ppm) = 1,0/2,0 (3 CH<sub>2</sub>); 2,2/2,4 (CH<sub>2</sub>); 3,35/3,45 (CH<sub>2</sub>); 6,8 (2 CH); 9,1/9,5 (NH, NH<sub>2</sub>).

*Verbindung VIII.* 40 mg des Perlpolymerisates aus Acrylamid und Methacrylsäureanhydrid wurden in 10 ml trockenem DMF 4 Std. bei 95° gequollen. Hierauf wurden 68 mg des festen Hydrazid-Hydrochlorids VII sowie 36  $\mu$ l Triäthylamin der Harzsuspension zugegeben. Nach 24 Std. Rühren bei RT. wurde das Gemisch abfiltriert und so lange mit DMF gewaschen, bis sich VII im Filtrat nicht mehr nachweisen liess. 10 mg VI wurden dann in 6 ml Wasser/DMF 5:1 aufgelöst und der Harzsuspension in 5 ml DMF zugegeben. Das Gemisch wurde bei pH 6 und bei RT. über Nacht geführt. Abfiltrieren. Waschen mit DMF, Wasser und einem Phosphatpuffer (pH 7). Eine Probe wurde getrocknet und 24 Std. einer vollständigen Hydrolyse durch 6 M HCl bei 110° unterworfen. Nach Eindampfen des Lösungsmittels und Aufnehmen des Rückstandes in einen Natriumcitrat-Puffer (pH 2,2) entfernte man den Harzniederschlag durch Abzentrifugieren. Ein Aliquot des Überstandes wurde auf sein Gehalt an Aminosäuren geprüft. Bezugswert: (Glu + Phe + Tyr)/3 = 1,0. Die Harz-ACTH-Verbindung enthielt 4,1  $\mu$ mol Peptid pro g trockenes Harz. Zur Schutzgruppenabspaltung wurde das substituierte Harz mit 1 ml 0,1 M Salzsäure in Ameisensäure 20 Min. lang bei RT. behandelt. Abfiltrieren. Waschen mit Wasser, DMF und Phosphatpuffer (pH 7,5). Das Harz wurde in diesem Puffer aufbewahrt. Aminosäurenanalyse: Arg 2,98 (3), Lys 4,00 (4), His 1,03 (1), Phe 0,96 (1), Tyr 0,91 (1), Val 3,12 (3), Glu 1,20 (1), Gly 2,39 (2), Pro 3,27 (3), Cys und Trp nicht ausgewertet. Substitutionsgrad: vgl. Tabelle.

*Verbindung IX.* 40 mg des Perlpolymerisates aus Acrylamid und Glycidylacrylat wurden in 4 ml DMF suspendiert und mit 40 mg des festen Hydrazid-Hydrochlorids VII sowie mit 21  $\mu$ l

Triäthylamin versetzt. Nach 24 Std. Rühren bei RT. wurde das Gemisch abfiltriert und gründlich mit DMF gewaschen, bis der *Barton*-Test des Filtrates negativ war. Die Suspension des Harzes in 6 ml DMF/Wasser 1:1 wurde mit der Lösung von 10 mg des Heneikosipeptids VI in 6 ml Wasser/DMF 5:1 versetzt. Umsetzung: 16 Std. bei pH 7 und RT. Abfiltrieren. Waschen mit DMF und mit einem Phosphatpuffer (pH 7). Aminosäurenanalyse: Bezugswert: (Glu + Phe + Tyr)/3 = 1,0. Am Harz waren 0,28  $\mu$ mol ACTH-Derivat pro g trockenes Harz gebunden. Das substituierte Harz wurde dann mit 0,1 M Salzsäure in Ameisensäure 20 Min. bei RT. behandelt. Das Harz wurde darauf abfiltriert, mit Wasser und DMF gewaschen und anschliessend in einem Phosphatpuffer bei pH 7 aufbewahrt. Eine Probe wurde auf ihren Gehalt an Aminosäuren geprüft: Arg 2,56 (3), Lys 3,58 (4), His 1,13 (1), Phe 1,0 (1), Tyr 0,96 (1), Val 3,12 (3), Glu 1,13 (1), Gly 2,39 (2), Pro 3,20 (3), Cys und Trp nicht ausgewertet. Substitutionsgrad: vgl. Tabelle.

[Cys<sup>4</sup>]-ACTH (4-24) (X). 67 mg des geschützten Heneikosipeptids V wurden in 3,2 ml 0,1 M Lösung von Chlorwasserstoff in Ameisensäure versetzt. Nach 15 Min. Umsetzung bei RT. wurde die Lösung in 30 ml Äther getropft, der Niederschlag abzentrifugiert und wieder in Äther aufgenommen. Die Reinigung in Äther wurde 3mal wiederholt. Es resultierten 52 mg (90%) weisses pulveriges Produkt. DC.-einheitlich: Rf 0,13 (BPEW). NMR.-Spektroskopie zeigte eine vollkommene Abspaltung der tBuO- und BOC-Schutzgruppen: die Protonenresonanz des Eduktes bei  $\delta = 1,40$  ppm TMS, 220 MHz) war nicht nachweisbar. Zur Abspaltung der ACM-Schutzgruppe wurde das Produkt in 5 ml Wasser aufgelöst und bei pH 4 mit 80 mg Quecksilber(II)acetat versetzt [20]. Nach 2 Std. bei RT. wurde das Gemisch mit Wasser verdünnt und mit H<sub>2</sub>S gesättigt. Abzentrifugieren und Abfiltrieren des Quecksilbersulfids ergaben ein nicht ganz farbloses Filtrat, das anschliessend lyophilisiert wurde. Ausbeute 61 mg. Positiver *Elman*-Test.

Die Abtrennung der Quecksilber-Ionen durch die H<sub>2</sub>S-Behandlung ist nicht notwendig, wenn das Produkt mit Sepharose gekoppelt wird. Jene werden nachträglich beim Waschen der substituierten Sepharose entfernt.

*Verbindung XI.* 2 g Sepharosyl-oxycarbimino-aminohexylamin (AH-Sepharose, *Pharmacia Chemicals*) wurden mit 616 mg 6-Maleinimidocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester [8] in 10 ml DMF suspendiert und über Nacht bei RT. vorsichtig gerührt. Das substituierte Harz wurde gründlich mit DMF und einem Acetatpuffer (pH 5,9) gewaschen. Der Trinitrobenzolsulfonat-Test der freien Aminogruppen [24] war negativ. Zu der Suspension des Harzes in 10 ml Acetatpuffer wurden dann 77 mg des freien [Cys<sup>4</sup>]-ACTH(4-24) (X) zugegeben. Nach 16 Std. Stehen bei RT. wurde die substituierte Sepharose gründlich mit dem Acetatpuffer gewaschen, bis im Eluat kein ACTH mehr nachgewiesen werden konnte. Eine Probe wurde hydrolysiert und der Aminosäurenanalyse unterworfen, um den Substitutionsgrad zu bestimmen (vgl. Tabelle).

*Verbindung XII.* 400 mg des Perlpolymerisates aus Acrylamid und Allylglycidyläther wurden in 10 ml DMF mit 35 mg des partiell geschützten Peptids IV versetzt und 72 Std. im Dunkeln bei 25° belassen. Nach langem Waschen mit DMF behandelte man das filtrierte Gel mit 7 ml einer 0,1 M Lösung von HCl in Ameisensäure 20 Min. lang bei RT. Das Gel, das in diesem Gemisch quillt, wurde anschliessend in 200 ml Äther suspendiert, dann, nach Abfiltrieren, mit 1 l eines 0,2 M Phosphatpuffers (pH 9) und 500 ml eines Acetatpuffers (0,1 M, pH 5) gewaschen. Der Überstand der Suspension enthielt kein freies ACTH-Derivat mehr. Substitutionsgrad: vgl. Tabelle.

*Verbindung XIII.* 100 mg trockenes aus Acrylamid und Glycidylacrylat durch Polymerisation erhaltenes Harz wurde mit 100 mg VII umgesetzt (vgl. Herstellung von IX). Das substituierte Harz wurde hierauf in 10 ml DMF suspendiert und mit der Lösung von 6,5 mg [N<sup>α</sup>-(N-t-Butyloxycarbonyl-cysteinyl)- asparagin<sup>1</sup>, Valin<sup>6</sup>]-angiotensin II [9] in 2 ml DMF versetzt. Nach 18 Std. wurde das Gemisch filtriert und der Rückstand mit DMF gründlich gewaschen. Hierauf behandelte man das Gel mit 2 ml einer 0,1 M Lösung von HCl in Ameisensäure während 20 Min. bei RT. Anschliessend wurde das Gel mit Äther, dann mit DMF und mit einem Phosphat-Puffer (pH 7) gewaschen. Prüfen des Überstandes auf Angiotensin-II-Anwesenheit ergab dann ein negatives Resultat.

Wir sprechen Herrn Prof. Dr. R. Schwyzer unseren speziellen Dank für die Anregung dieser Arbeit aus. Besonderer Dank gebührt auch Herrn Dr. D. Krümer der Firma Röhm Pharma, Darmstadt, für die freundliche Überlassung der Polyacrylamid-Perlpolymerisate, Herrn Arno Bundi

für die Aufnahme der NMR.-Spektron, Frau *Zlathka Zanivan* für die Durchführung der Aminosäureanalysen, sowie Fräulein *Theresia Zeier* für ihre wertvolle technische Assistenz.

Eine vorläufige Mitteilung von *J. L. Fauchère et al.* [25] ist kürzlich erschienen.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *P. Cuatrecasas*, Ann. Rev. Biochemistry 44, 180 (1974); *F. Krug, B. Desbuquois & P. Cuatrecasas*, Nature new Biology 234, 268 (1971).
- [2] *R. Selinger & M. Civen*, Biochem. biophys. Res. Commun. 43, 793 (1971).
- [3] *E. Hurwitz, F. Dietrich & M. Sela*, European J. Biochemistry 17, 273 (1970).
- [4] *E. Rieckli & P. Cuendet*, Biochim. biophys. Acta 250, 447 (1971).
- [5] *G. I. Tesser, H. U. Fisch & R. Schwyzer*, E.E.B.S. Letters 23, 56 (1972); *G. I. Tesser, H. U. Fisch & R. Schwyzer*, Helv. 57, 1718 (1974).
- [6] *M. Wilchek*, F.E.B.S. Letters 33, 70 (1973); *T. C. Gribnau & G. I. Tesser*, Experientia 30, 1228 (1974).
- [7] *B. M. Ferrier & L. A. Branda*, Canad. J. Biochemistry 53, 21 (1975).
- [8] *O. Keller & J. Rudinger*, Helv. 58, 531 (1975).
- [9] *H. J. Möschler & R. Schwyzer*, Helv. 57, 1576 (1974).
- [10] *D. M. Krämer, K. Lehmann, H. Plainer, W. Reisner & B. G. Sprössler*, J. Polymer. Sci. 47, 77 (1974); *D. M. Krämer, K. Lehmann, H. Pennewiss & H. Plainer*, (1975) Proceedings XXIII Colloquium Protides of the Biological Fluids, Pergamon Press, im Druck.
- [11] *L. Sundberg & J. Porath*, J. Chromatog. 90, 87 (1974).
- [12] *R. Schwyzer*, Naturwissenschaften 53, 189 (1966).
- [13] *M. Ohno, S. Tsukamoto & N. Izumiya*, Chem. Commun. 1972, 663, und Bull. chem. Soc. Japan 45, 2852 (1966).
- [14] *T. Wieland, W. Schäfer & E. Bokelmann*, Liebigs Ann. Chem. 573, 99 (1951).
- [15] *R. Schwyzer & H. Kappeler*, Helv. 46, 1550 (1963).
- [16] *G. Anderson, J. Zimmerman & F. Callahan*, J. Amer. chem. Soc. 89, 5012 (1967).
- [17] *P. W. Schiller & R. Schwyzer*, Peptides 354. 1973, North Holland Publishing Company Amsterdam.
- [18] *S. Moore & W. Stein* in «Methods of Enzymology» (Colowick & Kaplan ed.) 6, 1963, 819 Academic Press New York.
- [19] *H. Kappeler*, Helv. 44, 476 (1961).
- [20] *D. Veber, J. Milkowski, S. Varga, R. Denkwaller & R. Hirschmann*, J. Amer. chem. Soc. 94, 5456 (1972).
- [21] *C. H. Hirs*, J. biol. Chemistry 219, 611 (1956).
- [22] *G. Barton, R. Evans & J. Gardner*, Nature 170, 249 (1952).
- [23] *G. Ellman*, Arch. Biochemistry & Biophys. 82, 70 (1959).
- [24] *P. Cuatrecasas*, J. biol. Chemistry 245, 3059 (1970).
- [25] *J. L. Fauchère, G. M. Pelican, H. J. Möschler, G. I. Tesser & R. Schwyzer*, Biochem. Soc. Trans. 2, 1322 (1974).