

228. Hormon-Rezeptor-Wechselwirkungen. Synthese von α -Melanotropin und von informationstragenden Teilsequenzen unter Verwendung alkalilabiler Schutzgruppen

von Alex Eberle, Jean-Luc Fauchère, Godefridus Ignatius Tesser
und Robert Schwyzer¹⁾

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

(22. VIII. 75)

Hormone-Receptor Interactions. Syntheses of α -Melanotropin and of Informational Sequences thereof with the Aid of Alkali-Labile Protecting Groups. *Summary.* The aim of this investigation was to prepare α -melanotropin and partial sequences thereof for biological investigations in as pure a state as possible. Classical synthesis in solution was chosen as the general approach, because it allows for extensive purification and identification of all intermediates, thus warranting the chemical identity of the products (in contrast to the solidphase methods). The scheme of protection was as follows: for the N α -amino groups mostly *t*-butoxycarbonyl (BOC-), sometimes benzyloxycarbonyl (Z-), for the N ϵ -amino group of lysine-(11) 2-(methylsulfonyl)-ethoxycarbonyl (MSOC-), and for the carboxylic acid group of C-terminal glycine-(10) 2-(4-tolylsulfonyl)-ethoxy (-OTSE). This provides for facile and mild *selective* deprotection of either the α -amino groups by acidolysis or of the ϵ -amino group (α -carboxyl group) by β -elimination in alkali. A slight molar excess of 0.12N HCl in HCOOH proved to be the method of choice for removing BOC-; MSOC- is stable in acid (even for 30 min in liquid HF) and easily removed in a few minutes by 0.05–0.1N Ba(OH)₂; -OTSE is removed similarly. Condensation of amino-acid and peptide derivatives (formation of the peptide link) was performed using active esters (-ONP; -OSU), dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) with or without 1-hydroxy-benzotriazole (HOBT), or carboxylic acid azides wherever histidine was the carboxylic component.

More than 50 compounds are described. Those characterized by arabic numerals served to prove that α -MSH contains *two message sequences* that are able to trigger melanocyte response: one in the central region -His-Phe-Arg-Trp-, the other in the C-terminal portion -Gly-Lys-Pro-Val-NH₂ of the molecule [3].

Einleitung. – α -Melanotropin (α -melanophorenstimulierendes Hormon, α -MSH, 1) ist ein Polypeptidhormon des Hypophysen-Vorderlappens und chemisch nahe verwandt mit dem Adrenocorticotropin (ACTH). Es unterscheidet sich von diesem durch seine geringere Länge (13 gegenüber 39 Aminosäureresten) und dadurch, dass seine

¹⁾ Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für finanzielle Unterstützung dieser Arbeit, welche einen Teil der Dissertation von A.E. darstellt; praktisch die ganze experimentelle Arbeit wurde (mit nur wenigen Ausnahmen – J.L.F. und G.I.T.) von A.E. ausgeführt. Nomenklatur und Abkürzungen entsprechen den in der Peptid- und Proteinchemie üblichen Normen, vgl. E. Wunsch [1] (Drei-Buchstaben-Symbolik) und Margaret O. Dayhoff [2] (Ein-Buchstaben-Symbolik). Die beiden Systeme korrelieren folgendermassen: Ala = A, Arg = R, Asn = N, Asp = D, Cys = C, Gln = Q, Glu = E, Gly = G, His = H, Ile = I, Leu = L, Lys = K, Met = M, Phe = F, Pro = P, Ser = S, Thr = T, Trp = W, Tyr = Y, Val = V.

N-terminale α -Aminofunktion acetyliert und die C-terminale α -Carboxylgruppe als Amid vorliegt:



Seine am besten untersuchte biologische Funktion ist die Steuerung der Hell-Dunkel-Adaptation der Amphibienhaut: α -MSH bewirkt eine Ausbreitung des Melanins in den Melanocyten (Dunkelfärbung), sein Gegenspieler Melatonin bewirkt eine Agglomeration (Hellfärbung). Die chemische Information für die *Auslösung* der α -MSH-Wirkung ist im zentralen Heptapeptid -MEHFRWG- gespeichert. Diese Sequenz ist auch im ACTH wirkungsauslösend (Steroidogenese, Lipolyse); dagegen ist im ACTH die Sequenz -KPVGKKRR- für die *Zellspezifität* bestimmend, ohne eine andere Wirkung zu zeigen. In Analogie dazu könnte beim α -MSH die Tripeptidsequenz -KPV · NH₂ ebenfalls eine solche *Adress-Sequenz* sein, welche für die spezifische Wechselwirkung des Hormons mit Rezeptoren der Melanocyten verantwortlich wäre.

Zur Klärung dieser noch offenen Frage der sychnologischen Informationsorganisation hat man verschiedene Teilsequenzen des α -MSH synthetisiert und sie an der überlebenden Froschhaut *in vitro* untersucht. Es stellte sich überraschenderweise heraus, dass -KPV · NH₂ keine reine Adress-Sequenz ist, sondern – neben MEHFRWG – eine zweite *Befehlssequenz* darstellt (Auslösung der Hormonwirkung). Damit hat man erstmals das Vorhandensein zweier unabhängiger Befehlssequenzen in ein und demselben Hormon demonstriert. Dieser Befund ist nicht nur für die Analyse von Struktur-Wirkungs-Beziehungen beim α -MSH wichtig, sondern er wirft auch ganz neue Fragen bezüglich der molekularen Evolution von Hormon-Rezeptor-Beziehungen auf. Eine detaillierte Darstellung der biologischen Versuche findet sich bei *Eberle & Schwyzer* [3].

Wir beschreiben im folgenden die chemische Synthese der für die biologischen Experimente benötigten Peptide. Weil die Reinheit der Produkte sehr wichtig war, verzichteten wir auf die «Festkörper-Peptidsynthese» nach *Merrifield* [1] und verwendeten den klassischen Aufbau: nur dieser erlaubt die Isolierung und Charakterisierung von Zwischenprodukten und gewährleistet damit die chemische Identität der Endprodukte. Die hier beschriebenen Verbindungen und ihre chemischen Eigenschaften sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengestellt, wobei die auf ihre Hormonwirkung geprüften Peptide wie in der biologischen Arbeit [3] mit arabischen Zahlen, alle Zwischenprodukte aber mit römischen gekennzeichnet sind.

Synthese von Peptiden, die mit der C-terminalen α -MSH-Sequenz KPV · NH₂ verwandt sind (Schemata 1 und 2). – Der Schutz von Seitenkettenfunktionen mit säurelabilen, mild abspaltbaren Gruppen (BOC- und *t*BuO-) hat viele komplizierte Polypeptide der Synthese erstmals zugänglich gemacht [4], vgl. [1]. Die Vorteile der Kombination solcher Gruppen mit andern, die mit milder Alkalibehandlung entfernbar wären, wurden schon früh erkannt. *Schwyzzer, Costopanagiotis & Sieber* [5] verwendeten daher die Phthalylgruppe (PHT=) für den Schutz der Lysin¹¹-Seitenkette bei einer α -MSH-Synthese, die zum Ziel hatte, entweder die α -Aminogruppe von Serin¹ oder die ϵ -Aminogruppe von Lysin¹¹ selektiv freizulegen. Weil die Abspaltung der

Tabelle 1. *Analytische Befunde (Angaben über analysierte Salze in der ersten Kolonne; ** = unscharfer Smp., *** = Zersetzung; bei $[\alpha]_D$ Angabe von c und Lösungsmittel, ausser wenn c = 1 und Lsgm. = Methanol)*

Verb. No.	Smp. °C	$[\alpha]_D^{25}$ (c) (Lsgm.)	Mol.-Gew. Ber.	Elementaranalyse:				Anzahl Atome		Aminosäurenanalyse Molverhältnis, Gef., Bezugswert
				C	H	N	O	% Ber. % Gef.	O	
II	102		289,27	10	11	1	7	1		
				41,52	3,83	4,84				
				41,46	3,86	4,81				
III (DCHA-Salz)	135	-2,4 1,22 MeOH	577,79	27	51	3	8	1		
				56,13	8,90	7,27			5,55	
				56,14	8,95	7,25			5,50	
IV	94-96	-23,6	517,56	21	31	3	10	1		
				48,74	6,04	8,12			6,20	
				48,85	6,16	7,99			6,07	
V	262-263	33,7	152,63	5	13	2	1	1		
				39,35	8,59	18,35			23,23	
				39,44	8,52	18,16			22,96	
VI	108-109	-82,1	313,40	15	27	3	4			
				57,48	8,68	13,41				
				57,58	8,66	13,49				
20	244-245	-53,2	249,75	10	20	3	2	1		
				48,09	8,07	16,83				
				48,01	8,04	16,63				
VII	88-90	-57,9	593,73	25	45	5	9	1		K7,00 P1,01 V0,99
				50,74	7,67	11,84			5,43	
				50,74	7,76	11,56			5,29	
VIII	92**	-38,1	528,08	20	38	5	7	1	1	
				45,49	7,25	13,26			6,07	
				45,29	7,24	13,04			6,13	
23 (2 AcOH)	***	-43,7 0,5 MeOH								
										K7,00 P1,02 V0,98

IX	164-166	-58,6	533,65	22	39	5	8	1	
				49,52	7,37	13,12		6,01	
				49,38	7,29	12,80		5,95	
24 (AcOH)	***	-67,6	443,55	20	37	5	6		K1,00/P1,05/V0,98
				54,16	8,41	15,79			
				54,08	8,37	15,54			
X	80-85	-16,8 0,5 MeOH	361,40	18	23	3	5		
				59,82	6,41	11,62			
				59,62	6,69	11,22			
XI	***		833,99	38	57	8	11	1	W0,79/G1,05/K0,99/P1,05/V1,00
25 (HCl)	125-130	-22,8 0,33 MeOH	662,22	31	46	8	6	1	W0,74/G1,02/K0,94/P0,97/V1,00
XII	142	1,6	379,46	13	29	3	5		
				60,14	7,70	11,07			
				60,17	7,68	11,06			
XIII (HCl)	211	10,8	315,80	14	22	3	3		
				53,25	7,02	13,31			
				53,16	6,90	13,15			
XIV	148	-1,8	321,38	16	23	3	4		
				59,80	7,21	13,07			
				59,71	7,18	12,95			
22 (AcOH)	Öl	-8,8 0,85 MeOH	247,30	10	21	3	4		
				48,57	8,56	16,99			
				48,47	8,50	17,05			
XV	103-104	-32,8	434,45	21	26	2	8		
XVI	107-108	-11,6	488,54	24	32	4	7		
				59,00	6,60	11,47			
				59,03	6,54	11,32			
XVII	137-139	-21,5	488,53	23	32	6	6		
				56,54	6,60	17,20			
				56,38	6,65	17,10			

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Verb. No.	Smp. °C	[α] _D ²⁵ (c) (L/gm.)	Mol.-Gew. Ber.	Elementaranalyse:				Anzahl Atome			Aminosäureanalyse Molverhältnis, Gef., Bezugswert	
				C	H	N	O	% Ber.	% Gef.	O		S
XVIII	148-158 **	-4,5	421,50	20	31	5	5	5				
				56,99	7,41	16,62						
				56,75	7,48	16,37						
XIX (2 AcOH)	***		441,49	19	31	5	7					
BOC · G · OTSE	73		357,43	16	23	1	6	1				
				53,77	6,49	3,92						
				53,86	6,48	3,78						
H · G · OTSE (HCl)	148		293,78	11	16	1	4	1	1			
				44,97	5,49	4,77						
				44,75	5,52	4,80						
XX	129-130	-11,1	543,67	27	33	3	7	1				
				59,60	6,12	7,73						
				59,45	6,14	7,54						
XXI	110-115	19,3	479,98	22	26	3	5	1	1			
				55,06	5,46	8,75						
				54,89	5,47	8,58						
XXII	140-145	-12,5	884,47	42	56	8	9	1	1			
				57,04	6,38	12,67						
				57,21	6,53	12,39						
XXIII	148**	-3,5	820,82	37	49	8	7	1	2			F1,00/RO,93/WO,89/G1,02
				54,14	6,02	13,65						
				54,04	6,11	13,47						
XXVII	95	9,7	406,94	17	27	2	5	1	1			
				50,17	6,67	6,88						
				50,25	6,77	6,93						

XXVIII	116-118	-24,8	810,41	37	56	7	9	1	1	
				54,84	6,97	12,10				
				54,62	6,82	12,04				
XXIX	195	-17,5	746,76	32	49	7	7	1	2	
				51,47	6,61	13,12				
				51,51	6,71	12,95				
6	***	-5,6	535,65	25	41	7	6			F0,95/R1,04/L1,00/G1,01
4	***	-19,2 0,33 1% AcOH	624,70	30	40	8	7			F1,00/R0,99/W0,86/G1,03
5		-41,0 0,1 1% AcOH	643,15	30	39	8	6	1		F1,00/R0,97/W0,88/G1,00
XXX	172-175	-44,3 0,3 1N AcOH	1116,74	50	74	13	12	1	1	F0,98/R0,95/W0,89/G1,04/K1,02/ P1,06/V1,00
				53,78	6,67	16,31				
				53,55	6,50	16,01				
27	***	-45,5 0,33 1% AcOH	1050,23	50	75	13	12			F1,00/R1,04/W0,92/G1,01/K1,06/ P1,02/V1,00
XXXI	152-160	-42,7	1531,11	71	100	17	17	1	1	E1,00/H0,96/F0,98/R0,98/W0,86/ G1,00/K0,99/P1,03/V0,98
				55,66	6,58	15,32				
				55,39	6,58	15,05				
XXXII	160-165	-36,0	1397,1	63	94	17	15	1	1	E1,02/H0,99/F0,98/R1,01/W0,97/ G1,00/K0,99/F0,99/V1,00
				54,00	6,76	17,03	2,31			
				53,83	6,87	16,85	2,30			
XXXIII	***	-37,0 0,5 MeOH	1377,4	59	87	17	15	1	2	E1,08/H1,05/F0,97/R0,97/W0,91/ G1,02/K1,06/P1,07/V1,00
28a	***	-42,3 0,31 MeOH	1380,5	61	95	17	19			E1,04/H1,02/F1,02/R1,03/W0,94/ G0,98/K1,01/P1,02/V1,00
				53,07	6,64	17,24				
				52,93	6,75	17,07				
28	***	-43,3 0,31 MeOH	1388,1	61	97	17	20			E1,03/H0,97/F1,03/R1,00/W0,94/ G1,01/K1,00/P0,99/V1,00
				52,80	7,04	17,15				
				53,05	6,75	17,07				

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Verb. No.	Smp. °C	[α] _D ²⁰ (c) (Lsgm.)	Mol.-Gew. Ber.	Elementaranalyse:				Aminosäurenanalyse				
				C	H	N	O	S	Cl	Molverhältnis, Gef., Berzgswert		
				% Ber.	% Gef.							
XXXIV	***	-36,9 0,33 MeOH	1508,6	64	96	18	16	2	2		M0,92/E0,98/H0,96/F0,95/R1,08/ W0,90/G1,01/K1,03/P1,10/V1,00	
29	***	-48,5 0,26 1% AcOH	1446,7	66	98	18	17	1	1		M0,96/E0,97/H1,01/F0,96/R1,08/ W1,02/G0,95/K0,99/P1,03/V1,00	
XXXV	***	-39,3 0,33 MeOH	1490,6	65	98	18	16	1	2		L'1,00/E0,94/H0,95/F0,97/R1,01/ W0,85/G0,96/K1,05/P1,01/V1,00	
29a	***	-45,4 0,28 H ₂ O	1429,6	67	100	18	17				L'1,01/E0,95/H1,02/F0,99/R1,03/ W0,99/G1,00/K1,04/P1,04/V1,04	
XXXVI	198-201	-28,5 0,2 AcOH	1965,04	88	130	21	24	2	1		S1,77/Y1,00/M1,00/E0,99/H1,02/ F1,03/R1,03/W0,98/G1,00/K1,07/ P1,06/V0,96	
XXXVII			1813,90	79	115	21	22	2	2			
XXXVIII		-32,0 0,25 83% AcOH	1851,53	81	116	21	23	2	1		S1,82/Y0,99/M0,92/E1,08/H0,97/ F0,99/R1,03/W0,89/G1,01/K1,04/ P1,05/V1,00	
1		-63,2 0,38 1% AcOH	1785,03	81	117	21	23	1	1		S1,86/Y0,98/M0,94/E1,07/H0,99/ F0,98/R1,00/W0,93/G0,99/K1,03/ P1,02/V1,00	

PHT-Gruppe nicht immer mit befriedigenden Ausbeuten verläuft, haben wir – nach unsern günstigen Erfahrungen mit der β -Eliminierung der 2-(4-Tolylsulfonyl)-äthoxygruppe (-OTSE) [6] – eine einfachere, nach demselben Mechanismus entfernbare Schutzgruppe gesucht. G. I. Tesser hat denn auch während seines z. T. vom *Schweizerischen Nationalfonds* finanzierten Gastaufenthaltes bei uns mit der Untersuchung der 2-(Methylsulfonyl)-äthoxy-carbonylgruppe (MSOC-) begonnen und gefunden, dass sie sich vorzüglich dazu eignet [7]. Unabhängig von *van Nispen* [8] haben wir in dieser Arbeit die MSOC-Gruppe mit sehr gutem Erfolg für den Seitenkettenschutz des Lysins verwendet. Die Gruppe verleiht den geschützten Peptiden bessere Löslichkeits-eigenschaften; sie lässt sich durch sehr kurze Behandlung mit NaOH oder Ba(OH)₂ entfernen.

Die Schlüsselverbindung III (*Schema 1*), N^α-*t*-Butoxycarbonyl-N^ε-[2-(methylsulfonyl)-äthoxycarbonyl]-L-lysin, BOC · Lys(MSOC) · OH, wurde aus N^α-*t*-Butoxycarbonyl-L-lysin [5] durch Umsatz mit O-[2-(methylsulfonyl)-äthoxycarbonyl]-*p*-nitrophenol, II, in kristallisierter Form hergestellt. Wegen seiner zu guten Löslichkeit wurde III zusätzlich als Dicyclohexylaminsalz charakterisiert. Verbindung III konnte entweder direkt (Weg A) mit Dicyclohexyl-carbodiimid (DCCI) oder über den aktiven Ester IV (Weg B) mit Prolyl-valinamid **20** [5] zum vollständig geschützten Tripeptid-derivat {N^α-*t*-Butoxycarbonyl-N^ε-[2-(methylsulfonyl)-äthoxycarbonyl]-lysyl}-prolyl-valinamid (VII) umgesetzt werden. Die beiden Produkte waren identisch; der Weg B ergab die bessere Ausbeute im Schritt der Peptid-Verknüpfung, was sich – obwohl vielleicht die Gesamtausbeute über den Aktivester nicht grösser ist – doch für die Reinigung des Endproduktes von Vorteil erwies. Die folgende Abspaltung der *t*-Butoxycarbonylgruppe zu VIII wurde mittels 0,1N HCl in Ameisensäure [9] vorgenommen. Diese Methode verwendeten wir in der Folge fast ausschliesslich; sie erwies sich als schnell, mild und praktisch frei von Nebenreaktionen, besonders bei tryptophanhaltigen Peptiden.

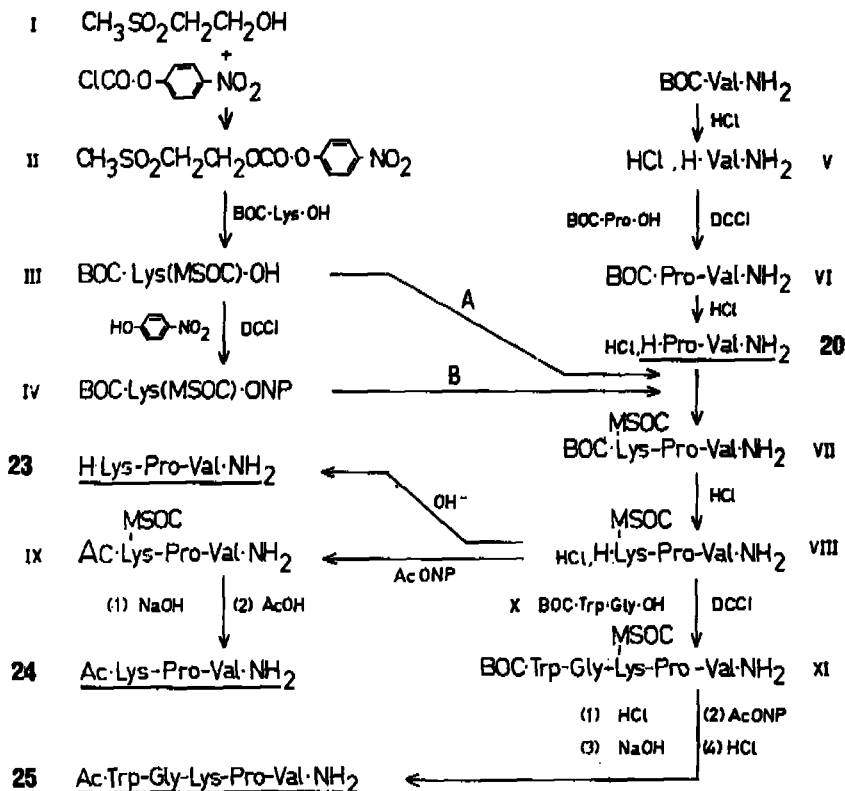
Die 2-(Methylsulfonyl)-äthoxycarbonyl-Gruppe (MSOC-) ist unter solchen sauren Bedingungen sehr stabil. Sie wurde aus {N^ε-[2-(Methylsulfonyl)-äthoxycarbonyl]-lysyl}-prolyl-valinamid-hydrochlorid (VIII) mittels 0,1N NaOH in Dioxan/Methanol/Wasser 2:1:1 (*v/v*) bei Raumtemperatur in 30 Sek. eliminiert, wobei man das freie Lysyl-prolyl-valinamid (**23**) erhielt. Es erwies sich als identisch mit den Produkten, die man aus Z · Lys(BOC)-Pro-Val · NH₂ [5] und aus BOC · Lys(Z)-Pro-Val · NH₂ herstellte (im *Schema 1* nicht aufgeführt). Andererseits ergab die Acetylierung von VIII N^α-Acetyl-N^ε-MSOC-lysyl-prolyl-valinamid (IX), welches alkalisch in N^α-Acetyl-lysyl-prolyl-valinamid (**24**) übergeführt wurde. Zur Kontrolle wurde **24** auch über N^α-*t*-Butoxycarbonyl-N^ε-benzyloxycarbonyl-lysyl-prolyl-valinamid durch acidolytische Abspaltung der BOC-Gruppe, Acetylierung am freien N^α und hydrogenolytische Entfernung der Benzyloxycarbonyl-Gruppe hergestellt (im *Schema 1* nicht aufgeführt). Die auf den verschiedenen Wegen erhaltenen Produkte waren identisch.

Die Synthese des Pentapeptidderivates **25** verlief im Prinzip gleich und ohne besondere Schwierigkeiten nach *Schema 1*.

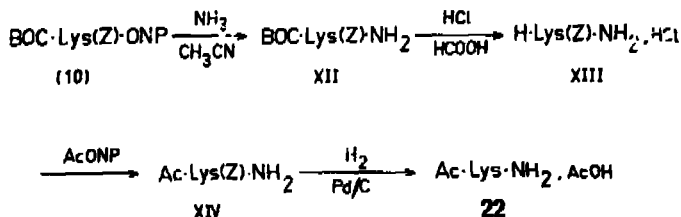
N^α-Acetyl-L-lysinamid (**22**) wurde nach *Schema 2* aus dem differentiell geschützten Aktivester N^α-*t*-Butoxycarbonyl-N^ε-benzyloxycarbonyl-L-lysin-*p*-nitrophenylester [10] über die kristallinen Lysinamid-Derivate XII, XIII und XIV hergestellt. Das Endprodukt **22** ist als Acetat ein dickes Öl.

BOC · Gly · OTSE	0,94	0,73	0,74			
H · Gly · OTSE	0,48	0,54				
XX		0,77	0,31			
XXI		0,58				
XXII	0,56	0,61		0,64		
XXIII		0,55				
		0,30				
4		0,59				0,71
		0,35				0,60
5		0,49		0,43		0,30
			0,30			
XXVI						
XXVII	0,59	0,60				
XXVIII	0,56	0,66				
XXIX	0,35	0,57				
		0,32				
6		0,60				0,83
		0,37		0,50		
		0,65		0,54		
27		0,53		0,40		
		0,58		0,66		
		0,49		0,41		
		0,35		0,43		
28a		0,28		0,33		
28		0,32		0,40		
		0,39				
29	0,24	0,39				
		0,35		0,22		
		0,45		0,52		
29a		0,39		0,49		
		0,63		0,79		
		0,56		0,44		
		0,44		0,49		
1		0,35		0,37		
						0,58
						0,62
						0,06
						0,58
						0,61
						0,69
						0,90
						0,70
						0,20
						0,24
						0,56
						0,12
						0,63
						0,83

Schema 1. Synthese von Tri- und Pentapeptidderivaten der C-terminalen α -MSH-Sequenzen 11–13 und 9–13 unter Verwendung der Schutzgruppe 2-(Methylsulfonyl)-äthoxycarbonyl-(MSOC-)



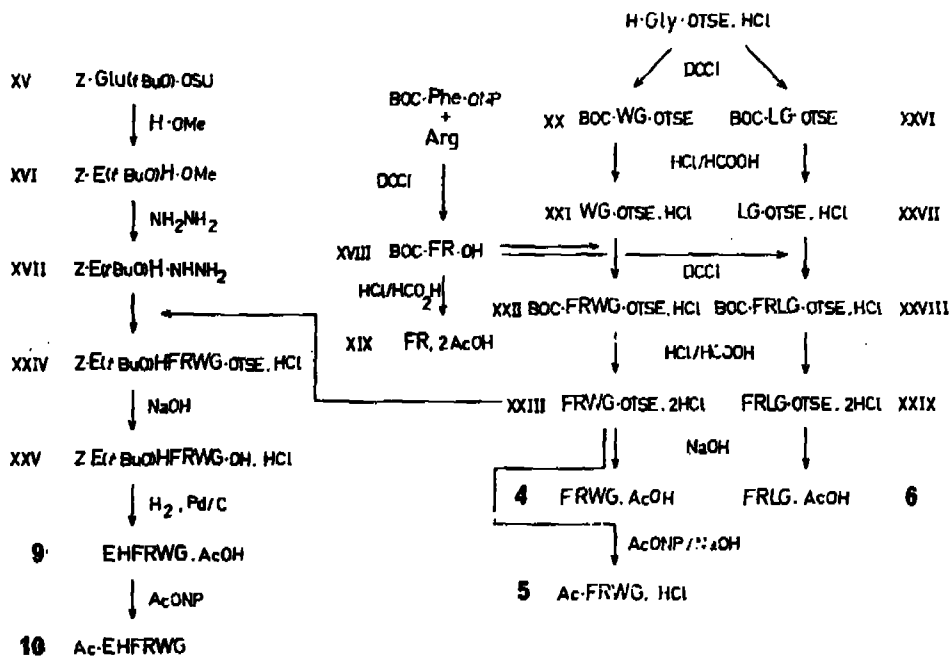
Schema 2 Synthese von N^α -Acetyl-L-lysinamid (22)



Synthese von Peptiden der zentralen Befehlssequenz MEHFRWG des α -MSH (Schema 3). Der Übersicht zuliebe wurde im Schema 3 die Ein-Buchstaben-Symbolik nach Fussnote 1 verwendet, und zwar in gleicher Weise wie die Drei-Buchstaben-Abkürzungen: links N-Terminus und N^α -Schutzgruppen, in Klammern, rechts vom Symbol bei basischen, sauren, thiol- und hydroxylhaltigen Aminosäuren die Schutzgruppen der Seitenkettenfunktionen. Die Buchstaben der Schutzgruppen und Amid-Funktionen wurden – um Verwechslungen mit Aminosäurensymbolen zu vermeiden – mit Punkten abgegrenzt und sind kleiner als die Buchstaben der Ein-Buchstaben-Symbolik.

Als Carboxylschutz des C-terminalen Glycinrestes (No. 10 in der α -MSH-Sequenz) wurde die Veresterung mit 2-(4-Tolylsulfonyl)-1-hydroxy-äthan (TSE · OH) [11] (verbesserte Synthese s. exper. Teil) gewählt, weil die β -Eliminierung mit Alkali so milde verläuft, dass Racemisierung von α -Aminosäureresten in Peptiden praktisch ausgeschlossen werden kann [6]. Der hier beschriebene Weg zum Aufbau von Sequenzen dieses Teils von α -MSH und ACTH war bereits zur Synthese von Peptiden mit *ar*-Pentafluoro-L-phenylalanin [12] anstelle von Phc⁷ verwendet worden²⁾.

Schema 3. Synthese von Peptiden der zentralen Befehlssequenz MEHFRWG des α -MSH



Schwierigkeiten bietet nach wie vor die Einführung von Arginin. Man wählte den Weg der Kondensation von *t*-Butoxycarbonyl-L-phenylalanin-*p*-nitrophenylester mit freiem Arginin in Dimethylformamid und erhielt das partiell geschützte Dipeptid VIII in 95proz. Ausbeute. Dieses wurde einerseits mit HCl in Ameisensäure seiner BOC-Gruppe entledigt und in Essigsäure mit einem schwach basischen Ionenaustauscher ins Dipeptid-diacetat XIX übergeführt (inzwischen als 3a biologisch getestet und als schwach aktiv befunden [3]), andererseits zum Aufbau der Tetrapeptidderivate XXII und XXVIII eingesetzt. Hier wurden die Reaktionsbedingungen nach König & Geiger [14] so gewählt, dass die Racemisierung des Arginins voraussichtlich minimal war. Die Kristallisation von XXII und XXIX dürfte eventuelle kleine Mengen (<5%) der Diastereomeren (L-D-L) mit den Mutterlaugen entfernt haben. Jedenfalls gaben die Dünnschichtchromatogramme keine Hinweise auf solche Verun-

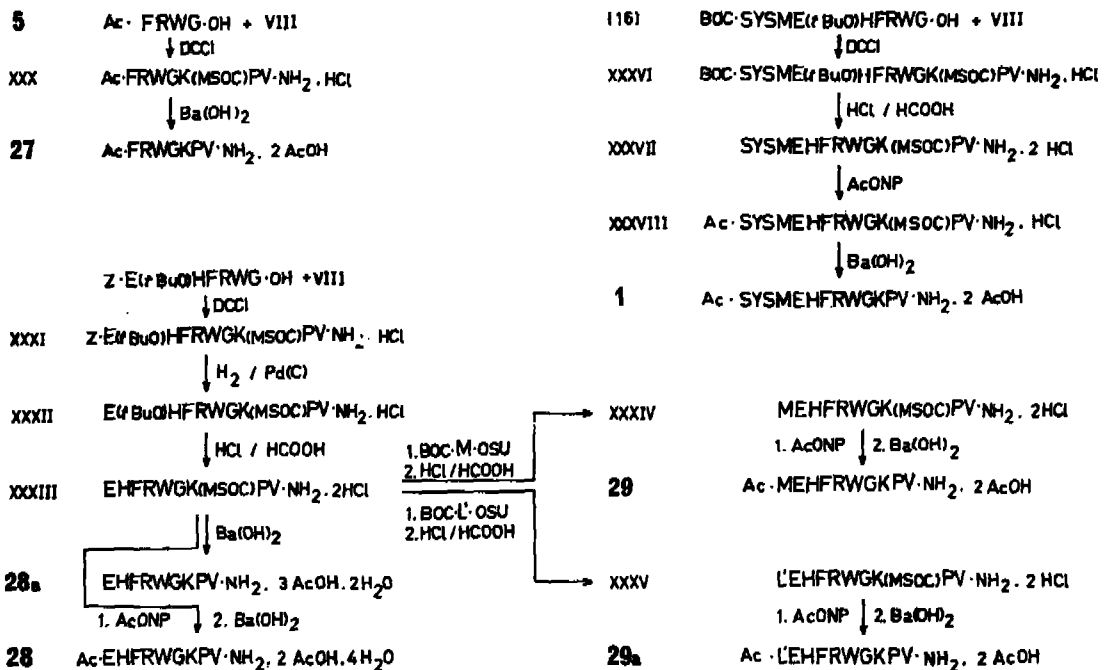
²⁾ Im Gegensatz zu FRWG (4) erwies sich das Pentafluoro-phenylalanin-Analogon als vollkommen inaktiv im Froschhaut-Test, was auf eine entscheidende Rolle des Phenylalanins hinweist. Darüber wird später eingehender berichtet werden; vgl. [13]).

reinigungen in den Tetrapeptid-Zwischen- und Endprodukten, XXII, XXIII, 4, 5, XXVIII, XXIX und 6.

Die Synthese des Hexapeptid-Derivates **9** führte vom Tetrapeptidester XXIII durch Kondensation mit dem aus dem geschützten Dipeptid-Hydrazid XVII gewonnenen Azid über das geschützte Hexapeptid XXIV. Dieses wurde zuerst in üblicher Weise durch kurze Alkalibehandlung von der TSE-Gruppe befreit und das entstandene partiell geschützte Peptid XXV durch HCl in HCOOH, Hydrogenolyse und Ionenaustausch in **9** übergeführt. Acetylierung mit Essigsäure-*p*-nitrophenylester ergab **10**. Dieser letzte Ast der Synthese (XXIV → XXV → **9** → **10**) soll in anderem Zusammenhang, mit den entsprechenden Leucin⁹- (anstelle von Tryptophan⁹) Analogen, im Detail veröffentlicht werden. Ebenso sollen **16** (Ac-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly · OH) und **17** (H · Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly · OH [3]) in anderem Zusammenhang beschrieben werden.

Synthese von α -MSH und Analogen mit verkürztem N-Terminus über N⁶-[2-(Methylsulfonyl)-äthoxycarbonyl]-L-lysin-Derivate (Schema 4). - Als Ausgangsmaterial für diese Synthesen diente das partiell geschützte, N-terminale Tripeptidamid-Derivat VIII, N⁶-[2-(Methylsulfonyl)-äthoxycarbonyl]-L-lysyl-L-prolyl-L-valinamid-hydrochlorid. Es wurde nach der DCCI-Hydroxybenztriazol-Methode von König & Geiger [14] mit geeigneten, N-terminal gelegenen Peptidderivaten verbunden, wobei - wegen der Kondensationsstelle zwischen Glycin und Lysin - keine Racemisierung zu befürchten ist [4].

Schema 4. Synthese von α -MSH und Analogen mit verkürztem N-Terminus über N⁶-[2-(Methylsulfonyl)-äthoxycarbonyl]-L-lysin-Derivate (L' = Norleucin)



Kondensation von VIII mit 5 (N^{α} -Acetyl-phenylalanyl-arginyl-tryptophyl-glycin) führte über XXX, dessen 2-(Methylsulfonyl)-äthoxycarbonyl-Gruppe mit Barytlauge (0,1N, 3 Min., 20°) eliminiert wurde, zum Heptapeptid 27 (N^{α} -Acetyl-phenylalanyl-arginyl-tryptophyl-glycyl-lysyl-prolyl-valin-amid).

Kondensation von VIII mit N^{α} -Benzyloxycarbonyl-(COOH $^{\gamma}$ -*t*-butyl)-glutamyl-histidyl-phenylalanyl-arginyl-tryptophyl-glycin [15] ergab *via* XXXI, XXXII und XXXIII die Nonapeptide 28 und 28a.

Aus XXXIII wurden die Decapeptide N^{α} -Acetyl-methionyl-glutamyl-histidyl-phenylalanyl-arginyl-tryptophyl-glycyl-lysyl-prolyl-valinamid (29) – der natürlichen Sequenz entsprechend – und N^{α} -Acetyl-norleucyl-glutamyl-histidyl-phenylalanyl-arginyl-tryptophyl-glycyl-lysyl-prolyl-valinamid (29a) – Ersatz von Methionin durch Norvalin – hergestellt. In beiden Fällen wurde die N-terminale Aminosäure als Hydroxysuccinimidester ankondensiert. Acetylierung und Entfernung der Schutzgruppen verlief nach *Schema 4* über die Zwischenprodukte XXIV oder XXV.

Für die Synthese des Tridecapeptids α -MSH (1) wurde VIII mit N^{α} -*t*-Butoxycarbonyl-seryl-tyrosyl-seryl-(COOH $^{\gamma}$ -*t*-butyl)-glutamyl-histidyl-phenylalanyl-arginyl-tryptophyl-glycin [16] kondensiert. Abspaltung von BOC-, Acetylierung der nunmehr freien N-terminalen α -Aminogruppe, Eliminierung von MSOC- mit Barytlauge und Überführung in das Diacetat von 1 verliefen ohne besondere Schwierigkeiten.

Experimenteller Teil

Allgemeines. Die Reinheit der Produkte wurde mit mehreren Dünnschichtchromatographic (DC.-) Systemen geprüft, um bei Peptiden und ihren Derivaten möglichst auch diastereomere Verbindungen ausschliessen zu können. Diese Prüfung wurde bei extrem wasserlöslichen Verbindungen durch die Dünnschichtelektrophorese (DE.) ergänzt. Die Identifizierung wurde elementaranalytisch und durch Aminosäurenanalyse vorgenommen; sie wurde oft für spezielle Fragen durch UV-IR.- und $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie ergänzt (letztere auf einem Spektrometer *VarianXL 100* mit Tetramethylsilan als interner Referenz; die chemischen Verschiebungen sind in δ (ppm) angegeben). Der weiteren Charakterisierung dienten Smp. (offene Kapillare; unkorrt.) und optische Drehung. Alle Verhältnis-Angaben beziehen sich auf Volumenteile.

Übliche Aufarbeitung bedeutet: Aufnehmen in einem in Wasser schwerlöslichen organischen Lösungsmittel (ca. 25–100facher Überschuss), Waschen mit verd. Säure (5proz. KHSO_4 /5proz. K_2SO_4 1:2), 5proz. NaHCO_3 - und ges. NaCl -Lösung (Verhältnis organische Phase/Wasserphase je nach Wasserlöslichkeit 5:1 bis 2:1), Trocknen der organischen Phase mit Natriumsulfat oder Magnesiumsulfat (beide wasserfrei) und Verdampfen der organischen Phase im Rotationsverdampfer unter Wasserstrahl- oder Hoch-Vakuum.

Elektrophoresen (Tabelle 2) wurden auf *Merck*-Cellulose-Fertigplatten in einer Apparatur der Firma *Camag* mit folgenden Puffersystemen durchgeführt: pH 1,6, Ameisensäure/Essigsäure/Wasser 100:100:800; pH 2,4, Essigsäure/Wasser 60:940; pH 3,6, Essigsäure/Pyridin/Wasser 100:10:890; pH 5,6, Essigsäure/Pyridin/Wasser 6:23:970. Dauer gewöhnlich 1 Std. bei 500 V (25 V/cm).

Dünnschichtchromatographie (Tabelle 2): Als Träger verwendete man DC.-Fertigplatten F 254 der Firma *Merck AG*, Darmstadt, mit Kieselgel- (S) oder Aluminiumoxid- (A) Beschichtung. Fließmittel: AC: Aceton/Chloroform 70:30; BADW: 1-Butanol/Aceton/Diäthylamin/Wasser 40:40:8:20; BEW 1: 2-Butanol/Essigsäure/Wasser 72:7:21; BEW 2: 1-Butanol/Essigsäure/Wasser 67:10:23; BPEW 1: 1-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser 50:12:12:25; BPEW 2: 1-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser 42:24:4:30; BPEW 3: 1-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser 38:24:8:30; BPW: 1-Butanol/Pyridin/Wasser 22:10:11; BN: 2-Butanol/Ammoniak(3proz.) 100:44; CME: Chloroform/Methanol/Essigsäure 95:5:3; CMP: Chloroform/Methanol/Pyridin 50:10:10; EBPEW: Essigester/1-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser 42:24:21:6:10; EPAW: Essigester/

Pyridin/Ameisensäure/Wasser 63:21:10:6; M: Methylenchlorid; MMP: Methylenchlorid/Methanol/Pyridin 90:5:5.

Die Platten wurden jeweils mit Jod, Ninhydrin, *Reindel-Hoppe*-Reagens sowie je nach Peptid auch mit *Pauli*- und *Sahaguchi*-Reagens entwickelt.

Bekannte Aminosäurenderivate und Peptide wurden, wenn nicht anders angegeben, nach [1] und der dort zitierten Literatur hergestellt.

Abkürzungen: DMF = Dimethylformamid; DMSO = Dimethylsulfoxid; DCCI = N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid; DCH = N,N'-Dicyclohexyl-harnstoff; DCHA = Dicyclohexylamin; HOBT = 1-Hydroxybenzotriazol; V. = Vakuum (ca. 10–20 Torr); HV. = «Hochvakuum» (ca. 0,1–0,001 Torr); RT. = Raumtemperatur; RV. = Rotationsverdampfer.

2-(4-Tolylsulfonyl)-äthanol (TSE · OH). Die Originalvorschrift [11] (s. auch Dissertation U. Ludescher, ETH-Z) wurde insofern modifiziert, als das Rohprodukt auf einer Silicagelsäule mit Essigester chromatographiert und anschliessend aus Essigsäure-*n*-butylester kristallisiert wurde. Man erhielt so völlig reines TSE · OH in 40% Ausbeute, Smp. 54°.

2-(Methylsulfonyl)-äthanol (I). Zu 92,1 g (1 mol) (2-Hydroxy-äthyl-methylsulfid (*Fluka*, purum) in 100 ml Wasser gab man 1 g Na₂WO₄, 2 H₂O (*Fluka*, puriss.) in 25 ml Wasser. Unter intensivem Rühren wurden 110 g 9,05M H₂O₂ (1 mol) zugegossen, wobei die Temperatur der stark exothermen Reaktion durch Kühlen zwischen 55° und 60° gehalten wurde. Man wiederholte die Zugabe von 1 mol Wasserstoffperoxid bei 80°, rührte 3 Std. bei RT. weiter und verdampfte nun das Wasser i. V. Der ölige Rückstand wurde mehrmals in Äthanol/Benzol 1:1 aufgenommen und die Lösung jeweils im RV. wieder eingedampft (nicht lösliche Anteile wurden abgetrennt). So konnte alles Wasser und Spuren von Peroxid vollständig entfernt werden. Nach gutem Trocknen i. V. wurde das Öl in der 3fachen Menge 2-Propanol gelöst und die Lösung zur Kristallisation bei –25° aufbewahrt. Nach einem Tag war die Kristallisation quantitativ; das schneeweisse Kristallat wurde in der Kälte abgenutscht, mit wenig eiskaltem 2-Propanol und mit Äther gewaschen und in der Kälte getrocknet. Ausbeute: 112 g (90%). Das Produkt ist ausserordentlich hygroskopisch. Smp. 26°. – NMR. ((CD₃)₂SO): 2,9 s (CH₃); 3,1 t (CH₂); 3,7 t (CH₂); 4,9 s (OH). – IR. (CHCl₃): 1130, 1300 cm⁻¹ (Sulfon-Stretch-Schwingung).

2-(Methylsulfonyl)-äthyl-p-nitrophenyl-carbonat (MSOC · ONP) (II). 31,04 g (0,25 mol) I wurden in 140 ml abs. Pyridin gelöst, dazu unter gutem Rühren und Kühlen 50,40 g (0,25 mol) Chlorameisensäure-*p*-nitrophenylester (frisch zubereitet) gegeben und die klare Lösung über Nacht stehen gelassen. Das Pyridin wurde nun i. V. verdampft und der sirupöse Rückstand in 1N HCl aufgenommen, wobei das Produkt allmählich kristallisierte. Es wurde abgenutscht und nacheinander mit 1,5 l Wasser und 4mal mit 20 ml 2-Propanol gewaschen. Nach gutem Trocknen löste man das Kristallat in 200 ml heissem Essigester, gab zur klaren Lösung 200 ml Methanol hinzu und liess sie bei RT. stehen. Dabei kristallisierte das Produkt in farblosen rhomboedrischen Plättchen. Ausbeute: 49 g (68%), DC. – einheitlich. – NMR. (CD₃)₂CO: 3,0 s (CH₃); 3,6 t (CH₂); 5,7 t (CH₂); 7,4–8,4 (4 Signale, AA'BB'-System der Phenyl-Protonen).

BOC · Lys(MSOC) · OH (III). 4,93 g (20 mmol) BOC · Lys · OH und 5,80 g (20 mmol) II in 40 ml DMF suspendiert, wurden über Nacht bei RT. gerührt, wobei alles klar in Lösung ging. Das DMF wurde i. HV. verdampft; zum Rückstand gab man 80 ml Wasser und so viel ges. NaHCO₃-Lösung, bis sich alles klar löste. Die gelbe Lösung überschichtete man mit Äther, leitete CO₂-Gas durch die Mischphase und entfernte so das *p*-Nitrophenol aus der Wasserphase. Nachdem diese farblos geworden war, trennte man sie vom Äther ab, kühlte mit Eis, säuerte mit 2N H₂SO₄ auf pH 2 an und extrahierte 3mal mit 150 ml Essigester. Die Essigesterphase wurde mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und der Essigester i. V. verdampft. Man gewann so 7,4 g (93%) farbloses Öl, das DC.-einheitlich war, sich aber nur schlecht kristallisieren liess. (Bei langem Stehenlassen unter Äther kristallisierte es ganz langsam, Smp. 83–86°, DCHA-Salz (Tabelle 1) 135°, DC.-einheitlich. – IR. (flüssig): 1120(s), 1280–1300 cm⁻¹ (–SO₂–).

BOC · Lys(MSOC) · ONP (IV). 4,04 g (10,2 mmol) III wurden zusammen mit 1,43 g (10,2 mmol) *p*-Nitrophenol in 20 ml frisch dest. Pyridin gelöst, die Lösung auf 0° abgekühlt, 2,30 g (11 mmol) DCCI hinzugefügt und das Gemisch 3 Std. bei 0° und über Nacht bei RT. belassen. Das DCH wurde abfiltriert, das Pyridin i. V. verdampft und der Rückstand in 400 ml Essigester gelöst. Übliche Aufarbeitung mit Essigester. Kristallisation des zurückbleibenden Öls aus Äther. Ausbeute: 4,0 g (80%), DC.-einheitlich.

H · Val · NH₂ · HCl (V). 43,26 g (200 mmol) *BOC · Val · NH₂* [5] wurden in 1200 ml Essigester gelöst, mit 400 ml 4*N* HCl in Essigester versetzt, 0,5 Std. bei RT. belassen und dann zur Kristallisation in die Kälte gestellt; abnutschen und trocknen über NaOH. Es resultierten 30,52 g (100%) Produkt in Form feinsten Nadeln, DC.-einheitlich.

BOC · Pro-Val · NH₂ (VI). 15,26 g (100 mmol) V wurden zusammen mit 11,52 g (100 mmol) *N*-Äthylmorpholin in 100 ml DMF gelöst und zu einer Lösung von 21,52 g (100 mmol) *BOC · Pro · OH* in 200 ml DMF gegeben. Zur gekühlten Lösung (0°) gab man 27,10 g (200 mmol) HOBT und nach einigen Min. 21,66 g (105 mmol) DCCI in 80 ml DMF. Nach 1 Std. bei 0° liess man über Nacht bei RT. weiterreagieren. Das ausgefallene DCH wurde abfiltriert, das DMF i. HV. verdampft, der Rückstand in Essigester gelöst und wie üblich aufgearbeitet. Das Produkt wurde mit Äther ausgefällt und aus 2-Propanol/Diisopropyläther umkristallisiert; farblose Nadeln, Ausbeute: 16,5 g (53%), DC.-einheitlich.

H · Pro-Val · NH₂ · HCl (20). a) 13,0 g (41,5 mmol) VI wurden in 300 ml Essigester gelöst, mit 100 ml 4*N* HCl in Essigester versetzt, 0,5 Std. bei RT. reagieren lassen und zur Kristallisation in den Kühlschrank gestellt. Vollständige Ausfällung mit Äther, Filtration, waschen mit Äther. Ausbeute: 10,0 g (96%); sehr hygroskopisches Kristallisat, Rf (S) (BPEW 1) 0,44; bei 0,36 zeigte sich ein kleines Nebenprodukt (ca. 5–10%). Dieses war im Unterschied zum Hauptprodukt in heissem 2-Propanol gut löslich. So wurde die Substanz in 50 ml 2-Propanol suspendiert, erhitzt und heiss filtriert; DC.-einheitlich.

b) 16,0 g (51 mmol) VI wurden in 900 ml 0,12*N* HCl in Ameisensäure gelöst und 15 Min. bei RT. belassen. Das Lösungsmittel wurde dann i.V. verdampft, der Rückstand mehrmals in Methanol aufgenommen und die Lösung jeweils wieder eingedampft. Kristallisation aus Methanol/Äther: 11,8 g (92%), DC.-einheitlich, identisch mit 20a.

BOC · Lys(MSOC)-Pro-Val · NH₂ (VII). a) 12,35 g (31,2 mmol) III wurden in 200 ml abs. Pyridin gelöst, auf –10° gekühlt, mit 8,38 g (62 mmol) HOBT und nach 20 Min. mit 7,00 g (34 mmol) DCCI in 20 ml Pyridin versetzt. 1 Std. bei –5° belassen, dann mit einer Lösung von 7,77 g (31,2 mmol) 20 und 3,58 g (31,2 mmol) *N*-Äthylmorpholin in 20 ml Pyridin vereinigt und schliesslich 2 Std. bei 0° und über Nacht bei RT. gehalten. Das Pyridin wurde nach dem Abfiltrieren des DCH i.V. verdampft und der Rückstand in Chloroform wie üblich aufgearbeitet. Das ölige Produkt wurde in Essigester aufgenommen, unlösliche Nebenprodukte abgetrennt und der Essigester im RV. entfernt. Kristallisation aus 2-Propanol/Diisopropyläther: 12,5 g (68%) festes, amorphes Produkt, DC.-einheitlich. – IR. (Nujol): 1140s, 1300s cm⁻¹ (–SO₂–).

b) 1,83 g (7,3 mmol) 20 wurden zusammen mit 0,84 g (7,3 mmol) *N*-Äthylmorpholin in 20 ml DMF gelöst und nacheinander mit 1,48 g (11 mmol) HOBT und 3,78 g (7,3 mmol) IV versetzt. Man liess über Nacht bei RT. reagieren. Die Reaktion war dann beendet (DC.-Kontrolle); das DMF wurde i. HV. verdampft und der Rückstand in Chloroform wie üblich aufgearbeitet. Das erhaltene Öl wurde in 2-Propanol aufgenommen und mit Diisopropyläther ausgefällt. Es resultierte ein festes, amorphes Tripeptid-Derivat, welches in kaltem Wasser fast nicht, dagegen in heissem Wasser löslich ist; DC.-einheitlich, identisch mit VIIa.

H · Lys(MSOC)-Pro-Val · NH₂ · HCl (VIII). 2,97 g (5 mmol) VII wurden in 100 ml 0,12*N* HCl in Ameisensäure gelöst. Nach 15 Min. bei RT. wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand mehrmals in Methanol gelöst und die Lösung jeweils wieder eingedampft. Das zurückbleibende Öl wurde unter Äther zu einem feinen Pulver verrieben, Ausbeute: 2,20 g (84%), DC.-einheitlich, hygroskopisch. – IR. (Nujol): 1140s, 1300s cm⁻¹.

H · Lys-Pro-Val · NH₂ · 2 AcOH (23). a) 157 mg (0,3 mmol) VIII wurden in 3 ml Wasser gelöst und mit einer Lösung von 102 mg (0,33 mmol) Ba(OH)₂ · 8 H₂O in 3 ml Wasser versetzt. Nach 5 Min. gab man 1,1 ml 0,2*N* Schwefelsäure hinzu (pH 3–4) und zentrifugierte vom Bariumsulfat. Die Lösung wurde nun durch eine schwach basische Ionenaustauscher-Säule (0,8 × 12 cm, Ionenaustauscher Merck II, Elutionsmittel 0,1*N* Essigsäure) durchgetropft und die vereinigten reinen Fraktionen lyophilisiert. Kristallisation aus Methanol/Äther ergab ein farbloses, äusserst hygroskopisches, an der Luft sofort zerfliessendes Produkt: 110 mg (80%), DC.-einheitlich.

b) 61 mg (0,1 mmol) *H · Lys(BOC)-Pro-Val · NH₂*, TOS · OH (vgl. [5], Rf(S) 0,27 (BEW 1); 0,41 (BEW 2); $[\alpha]_D^{25} = -36,8^\circ$ ($c = 1$, MeOH)) wurden in 2 ml 0,12*N* HCl in HCOOH gelöst, 15 Min. bei RT. belassen und das Gemisch dann zur Trockne eingedampft. Man löste den Rückstand in wenig Methanol und verdampfte dieses wieder (Entfernung überschüssiger Säure). Das Produkt

löste man in 1 ml 0,1N Essigsäure und filtrierte es durch eine *Dowex-3*-Säule (0,8 × 10 cm). Ausbeute 40 mg (87%), DC.-identisch mit **23a**.

Ac · Lys(MSOC)-Pro-Val · NH₂ (IX). 528 mg (1 mmol) VIII und 115 mg (1 mmol) N-Äthylmorpholin wurden zusammen in 6 ml Pyridin gelöst, mit 271 mg (1,5 mmol) *p*-Nitrophenylacetat versetzt und das Gemisch 15 Std. bei RT. belassen. Das Pyridin wurde i.V. verdampft und der Rückstand mehrmals mit Äther verrieben. Das feste Produkt wurde nun in 300 ml Chloroform gelöst und mit ca. 20 ml halbgesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Trocknen der organischen Phase mit Natriumsulfat. Nach dem Einengen der Chloroform-Phase wurde das Produkt mit Äther ausgefällt. Ausbeute: 400 mg (75%), DC.-einheitlich. Das Peptid ist gut wasserlöslich.

Ac · Lys-Pro-Val · NH₂. *AcOH* (**24**). a) 215 mg (0,4 mmol) IX wurden in 2 ml Dioxan + 1 ml Methanol gelöst, mit 1 ml 0,4N Natronlauge versetzt und das Gemisch nach 30 Sek. mit 0,1N Salzsäure neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde verdampft, der Rückstand in 1 ml 0,1N Essigsäure gelöst und über *Dowex-3* in die Acetatform übergeführt. Anschliessend wurde das Produkt auf einer *Sephadex G-15*-Säule entsalzt (Säulendimensionen 2 × 60 cm; Eluierungsmittel 0,1N Essigsäure). Die Wasserphase wurde lyophilisiert und das zurückbleibende Harz unter Äther zu einem Pulver verrieben. Das Produkt konnte nicht kristallisiert werden; es ist ausserordentlich hygroscopisch und verölt sehr rasch. Ausbeute: 138 mg (78% d. Th.), DC.-einheitlich.

b) 510 mg (1 mmol) H · Lys(Z)-Pro-Val · NH₂ · HCl. 115 mg (1 mmol) N-Äthylmorpholin und 271 mg (1,5 mmol) *p*-Nitrophenylacetat wurden nacheinander in 6 ml Pyridin gelöst und über Nacht bei RT. stehen gelassen. Das Pyridin wurde verdampft und das zurückbleibende Öl gut mit Äther extrahiert (Entfernung des Nitrophenols). Das feste, amorphe Produkt (Rf in BEW 2 0,70) wurde in 8 ml 80proz. Essigsäure gelöst, mit 80 mg 10proz. Pd/C versetzt und 45 Min. im Durchfluss hydriert. Nach dieser Zeitspanne war die Benzyloxycarbonyl-Gruppe vollständig abgespalten. Die Essigsäurelösung wurde über *Celite* filtriert und im RV. eingedampft. Die DC.-Reinheitskontrolle ergab, dass noch ca. 5–10% eines Nebenproduktes vorlag, welches dem freien, nicht acetylierten Tripeptid entsprach: Rf = 0,25 (BPEW 1). Die Abtrennung gelang nur auf einer Trockensäule mit BPEW 1 als Laufmittel. Anschliessend wurde das Produkt noch über eine *Sephadex-LH-20*-Säule chromatographiert (Abtrennung von anorganischen Anteilen). Die sauberen Fraktionen wurden vereinigt, das Methanol entfernt, das Öl in 15 ml 0,1N Essigsäure gelöst, lyophilisiert und unter Äther zu einem DC.-einheitlichen Pulver verrieben.

BOC · Trp-Gly · OH (X). 272 mg (0,5 mmol) BOC · Trp-Gly · OTSE (XX) wurden in 5 ml Dioxan gelöst und mit 5 ml 0,2N Natronlauge versetzt. Nach 5 Min. säuerte man in der Kälte mit verd. Schwefelsäure auf pH 2 an und schüttelte sofort mit Essigester gut durch. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, i.V. eingedampft, der Rückstand in 2-Propanol gelöst und mit Diisopropyläther/Pentan ausgefällt. Ausbeute: 142 mg (80%), DC.-einheitlich.

BOC · Trp-Gly-Lys(MSOC)-Pro-Val · NH₂ (XI). 36 mg (0,1 mmol) X und 53 mg (0,1 mmol) VIII wurden zusammen mit 12 mg (0,1 mmol) N-Äthylmorpholin in 4 ml DMF gelöst, mit 27 mg (0,2 mmol) HOBT und 25 mg (0,12 mmol) DCCI versetzt und das Gemisch 24 Std. bei RT. gerührt. Das ausgefallene DCH wurde abfiltriert, das DMF i. HV. entfernt und der Rückstand mehrmals mit Essigester extrahiert; das zurückbleibende XI war DC.-einheitlich. Ausbeute: 69 mg (83%).

Ac · Trp-Gly-Lys-Pro-Val · NH₂ · HCl (**25**). 68 mg XI wurden in 2 ml 0,12N HCl in Amciscensäure gelöst und 10 Min. bei RT. belassen. Das Lösungsmittel wurde verdampft und der Rückstand gut über NaOH getrocknet, Rf(S) 0,51 (BPEW 1). Dann wurde das N₁-ungeschützte Pentapeptid in 2 ml Pyridin mit 23 mg (0,12 mmol) *p*-Nitrophenylacetat umgesetzt und nach Aufarbeitung die MSOC-Schutzgruppe mit 3 ml Dioxan/0,1N NaOH 1:1 abgespalten. Zur Reinigung wurde das Endprodukt auf einer *Sephadex-LH-20*-Kolonnen in Methanol/Wasser 9:1 chromatographiert, die sauberen Fraktionen vereinigt, das Lösungsmittel i.V. entfernt, der Rückstand in ganz wenig Methanol gelöst und das Produkt mit Äther ausgefällt. Ausbeute: 33 mg (65%), DC.- und DE.-einheitlich. – UV. (0,1N NaOH): λ_{\max} = 280 nm (ϵ = 5100; Ber. 5225), 288 nm (ϵ = 4400; Ber. 4450).

BOC · Lys(Z) · NH₂ (XII). In einem 250-ml-Sulfierkolben, versehen mit Rührer, Gascinleitungsrohr und einem mit KOH gefüllten Trockenrohr löste man in 100 ml trockenem Acetonitril 6 g (12 mmol) BOC · Lys(Z) · ONP ([10], Rf(S) 0,52 (CME); 0,80 (BEW 1); $[\alpha]_D^{25}$ = –25,8° (c = 1, MeOH). Nun leitete man während 30 Min. unter heftigem Rühren Ammoniakgas (über Na getrocknet) durch die Lösung, wobei das Produkt auszukristallisieren begann. Die Lösung wurde ein-

geengt und das Produkt mit Äther quantitativ auskristallisiert. Ausbeute: 3,9 g (87%), DC.-einheitlich.

H · Lys(Z) · NH₂ · HCl (XIII). 3,8 g (10 mmol) XII wurden in 100 ml 0,12*N* HCl in HCOOH gelöst und 15 Min. bei RT. belassen. Aufarbeitung wie bei 23b, aber 3mal mit MeOH behandelt. Ausbeute: 2,9 g (92%), DC.-einheitlich.

Ac · Lys(Z) · NH₂ (XIV). 200 mg (0,64 mmol) XIII wurden in 3 ml abs. Pyridin + 1 ml abs. DMF gelöst und nacheinander mit 74 mg (0,64 mmol) N-Äthylmorpholin und 174 mg (0,96 mmol) Essigsäure-*p*-nitrophenyl-ester versetzt. Nach 16 Std. bei RT. verdampfte man das Lösungsmittel bei ca. 0,1 Torr, löste den Rückstand in HCCl₃ und schüttelte die Lösung mehrmals mit ges. NaHCO₃-Lösung aus. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet, eingedampft und das Produkt aus Äther kristallisiert. Ausbeute: 145 mg (71%), DC.-einheitlich.

Ac · Lys · NH₂ · AcOH (22). 500 mg (1,55 mmol) XIV wurden in 10 ml 80proz. Essigsäure gelöst, mit 60 mg 10proz. Pd/C (nach Engelhard) versetzt und 60 Min. unter Durchperlen von Wasserstoff hydriert. Filtration durch *Celite* und Verdampfen der Lösung. Das Verdampfen wurde nach Zugabe von Methanol 2mal wiederholt und der Rückstand bei 0,1 Torr getrocknet. Öl, Ausbeute 310 mg (81%), DC.-einheitlich.

Z · Glu(tBuO) · OSU (XV) (Herstellung analog [17]). 5,0 g (14,8 mmol) *Z · Glu(tBuO) · OH* (*Fluka*, puriss.) wurden in 50 ml Essigester gelöst, mit 1,80 ml N-Äthylmorpholin versetzt (14,8 mmol) und im Kryostat auf -15° abgekühlt. Dann wurden zunächst 1,93 ml (14,8 mmol) Chlorameisensäureisobutylester (*Fluka*) und nach einer Aktivierungsdauer von 30 Sek. sofort 1,87 g (16,8 mmol) N-Hydroxysuccinimid (*Chemspec*) hinzugefügt. Die Temp. wurde während 5 Min. kontinuierlich von -15° auf 0° erhöht. Um die Reaktion zu vervollständigen, wurde der Kolben während 2 Min. in ein Wasserbad von 40° und danach in einem zweiten Bad von 15° während 5 bis 10 Min. stehengelassen. Die Lösung wurde filtriert und das Filtrat eingedampft; der ölige Rückstand wurde in Äther gelöst und der Aktivester durch langsame Zugabe von Petroläther kristallisiert. Ausbeute: 5,6 g (88%), DC.-zersetzlich. Die spezifische Drehung ist 2,9° grösser als die in [18] angegebene.

Z · Glu(tBuO) · His · OMe (XVI) (analog [1] hergestellt). 1,69 g (10 mmol) Histidinmethylester (frisch hergestellt, als Dihydrochlorid kristallisiert und in ammoniakalischem Chloroform freigesetzt) wurden in 40 ml Acetonitril gelöst und mit 0° 4,34 g (10 mmol) XV versetzt. Das Gemisch wurde über Nacht bei RT. belassen, danach das Acetonitril i.V. verdampft, das zurückbleibende Öl in 400 ml Chloroform aufgenommen und die Chloroform-Phase 2mal mit 100 ml ges. NaHCO₃-Lösung, einmal mit ges. NaCl-Lösung gut durchgeschüttelt, mit Magnesiumsulfat getrocknet und auf 50 ml eingeeengt. Nach Zugabe von 200 ml Äther und so viel Pentan, dass die Lösung auf dem Wasserbad gerade noch klar blieb, kristallisierte bei 4° das Produkt quantitativ aus. Es wurde abgeseiht und über P₂O₅ getrocknet. Ausbeute: 4,0 g (82%), DC.-einheitlich.

Z · Glu(tBuO) · His · NHNH₂ (XVII) (analog [1] hergestellt). 2,5 g (5,1 mmol) XVI wurden in 25 ml Methanol gelöst und die Lösung mit 1 ml Hydrazinhydrat versetzt. Man liess über Nacht bei RT. stehen und fällte das Hydrazid durch Zugabe der 5fachen Menge Äther aus. Umkristallisation aus Methanol/Äther. Nach gutem Trocknen i.V. wurden 2,1 g (84%) eines Produktes mit einer kleinen, im DC. langsamer wandernden Verunreinigung (Smp. 120°) erhalten. Zur weiteren Reinigung wurde das Produkt in 10 ml Methanol gelöst und 120 ml Wasser zugegeben, wobei die Lösung milchig-trüb wurde. Nachdem die Lösung auf ca. 15 ml Volumen eingeeengt wurde, kristallisierte das Hydrazid langsam durch. Ausbeute: 2,0 g (80%), DC.-einheitlich.

BOC · Phe-Arg · OH (XVIII). 3,65 g (21 mmol) Arginin (freie Base) wurden in 120 ml DMF suspendiert, mit 8,90 g (23 mmol) BOC · Phe · ONP versetzt und 16 Std. bei ca. 35° gerührt. Die Lösung war nun völlig klar (gelb) geworden, enthielt aber nach DC. noch ganz wenig Edukt. Man liess die Reaktion weitere 24 Std. bei RT. laufen, wobei das überschüssige Arginin sich wieder abschied. Die Lösung wurde filtriert und das DMF i. HV. verdampft. Der Rückstand wurde in Natriumhydrogencarbonatlösung aufgenommen, die gelbe Wasserphase im Scheidetrichter mit Äther überschichtet und das Nitrophenol auf die übliche Weise entfernt, indem man CO₂-Gas durch die Mischphase hindurchleitete. Die Wasserphase wurde eingedampft, der Rückstand in 2-Propanol gelöst und Unlösliches (anorganische Salze) abgetrennt. Umkristallisation 2mal aus 2-Propanol/Äther. Ausbeute: 8,4 g (95%), DC.-einheitlich.

H · Phe-Arg · OH · 2 AcOH (XIX) (Das Hydrogensulfat-Salz wurde früher schon hergestellt [1]). 421 mg (1 mmol) XVIII wurden in 20 ml 0,12*N* HCl in Ameisensäure gelöst und das Lösungs-

mittel nach einer Reaktionsdauer von 15 Min. verdampft. Das Produkt wurde 2mal in 10 bis 20 ml Methanol gelöst und dieses wieder verdampft (Entfernung von überschüssigem HCl). Nun löste man den öligen Rückstand in 1proz. Essigsäure und tauschte die Chloridionen auf einer schwach basischen Ionentauschersäule (0,8 × 12 cm, Ionentauscher *Merck* II, schwach basisch) gegen Acetationen aus. Das Produkt wurde lyophilisiert (es liess sich im Gegensatz zum Hydrogensulfat nicht kristallisieren); Ausbeute: 350 mg (80%), sehr hygroskopisches Pulver, DC.-einheitlich.

BOC · Gly · OTSE, 8,76 g (50 mmol) *BOC · Gly · OH* wurden zusammen mit 10,01 g (50 mmol) 2-(*p*-Toluylsulfonyl)-äthanol in 150 ml Pyridin gelöst, 10,83 g (52,5 mmol) DCCI hinzugefügt und das Gemisch über Nacht bei RT. gerührt. Das ausgefallene DCH wurde abfiltriert, das Pyridin im RV. entfernt und das Produkt in 300 ml Essigester wie üblich weitergearbeitet. Nach Verdampfen des Essigesters kristallisierte das Produkt durch Kratzen unter Petroläther aus. Rekristallisation aus frischem Petroläther. Ausbeute: 14,8 g (83%), DC.-einheitlich.

H · Gly · OTSE · HCl, 12,0 g (33,6 mmol) *BOC · Gly · OTSE* wurden in 125 ml Essigester gelöst und mit 25 ml 6,5N HCl in Dioxan versetzt. Nach 1 Std. bei RT. stellte man das Gemisch zur vollständigen Kristallisation in die Kälte. Das Produkt wurde dann abgenutscht, mit Äther gewaschen und über NaOH gut getrocknet; 8,60 g (88%) reines *H · Gly · OTSE · HCl*; DC.-einheitlich.

BOC · Trp · Gly · OTSE (XX), 3,95 g (13 mmol) *BOC · Trp · OH* und 3,82 g (13 mmol) *H · Gly · OTSE · HCl* wurden in 35 ml DMF gelöst, die Lösung auf 0° gekühlt und hintereinander mit 1,49 g (13 mmol) *N*-Äthylmorpholin, 3,52 g (26 mmol) HOBT und – nachdem sich alles klar gelöst hatte – mit 2,90 g (14,5 mmol) DCCI versetzt. Das Gemisch wurde 8 Std. bei 0° und 12 Std. bei RT. belassen. Das ausgefallene DCH wurde abfiltriert, das DMF i. HV. verdampft und das Dipeptid in Chloroform wie üblich aufgearbeitet. Das Lösungsmittel wurde im RV. verdampft und das zurückbleibende Öl unter Petroläther zu einem Festkörper verrieben. Kristallisation aus Essigester/Petroläther. Ausbeute: 5,8 g (82%), DC.-einheitlich.

H · Trp · Gly · OTSE · HCl (XXI), 5,44 g (10 mmol) *XX* wurden in 120 ml 0,1N HCl in Ameisensäure (12 mmol HCl) gelöst und die Lösung 10 Min. bei RT. belassen. Dann wurde die Ameisensäure in der Kälte abdestilliert, der Rückstand 2mal in Methanol gelöst und das Lösungsmittel verdampft. Das ölige Produkt kristallisierte durch Kratzen unter Äther vollständig durch. Umkristallisation einmal aus 2-Propanol/Disisopropyläther. Ausbeute: 4,75 g (97%), DC.-einheitlich.

BOC · Phe · Arg · Trp · Gly · OTSE · HCl (XXII), 1,92 g (4 mmol) *XXI* und 1,69 g (4 mmol) XVIII wurden in 30 ml DMF gerührt, bis sich alles klar gelöst hatte (Protonierung der -COO-Gruppe von XVIII). Die Lösung wurde auf 0° abgekühlt, mit 1,08 g (8 mmol) HOBT und 0,93 g (4,5 mmol) DCCI versetzt und 3 Std. bei dieser Temp. gehalten. Dann langsam auf RT. erwärmen lassen und 16 Std. weitergerührt. Mit einem Tropfen Eisessig wurde überschüssiges DCCI inaktiviert, das Gemisch für 1 Std. in die Kälte gestellt und das ausgefallene DCH abfiltriert. Nach Verdampfen des DMF wurde der Rückstand in 400 ml Chloroform gelöst, in der üblichen Weise aufgearbeitet, die Chloroform-Phase eingengt und das Produkt durch Zugabe von Pentan ausgefällt. Ausbeute: 2,9 g (82%). Das Tetrapeptid wurde durch Chromatographie auf einer *Sephadex*-LH-20-Säule (90 × 4 cm) mit Methanol/Wasser 9:1 als Eluierungsmittel in zwei Portionen von je 1,2 g gereinigt. Die sauberen Fraktionen wurden vereinigt, das Eluierungsmittel verdampft und das Peptid aus 2-Propanol/Äther kristallisiert (amorphes Produkt). 2,4 g Rohprodukt ergaben 1,9 g (80%) *XXII*, DC.-einheitlich.

H · Phe · Arg · Trp · Gly · OTSE · 2 HCl (XXIII), 2,83 g (3,2 mmol) *XXII* wurden in 40 ml 0,1N HCl in Ameisensäure (4 mmol HCl) gelöst und 15 Min. bei RT. belassen. Die Säure wurde im RV. entfernt, das zurückbleibende Öl mehrmals in wenig Methanol aufgenommen und das Lösungsmittel jeweils wieder verdampft. Schliesslich fällt man das Produkt aus der methanolischen Lösung mit einem grossen Überschuss an Äther aus; mehrmaliges Umfällen aus Methanol/Äther, Ausbeute: 2,0 g (74%), DC.-einheitlich. – UV. (Äthanol): $\lambda_{\max} = 273 \text{ nm}$ ($\epsilon = 5566$) und 280 nm ($\epsilon = 5556$).

H · Phe · Arg · Trp · Gly · OH · AcOH (4), 164 mg (0,2 mmol) *XXIII* wurden in 8 ml 0,1N NaOH gelöst und nach 3 Min. mit 0,1N HCl wieder neutralisiert. Das weitere Vorgehen ist identisch mit dem für **6** beschriebenen. Ausbeute 102 mg (82%), DC.- und DE.-einheitlich. – UV. (0,01N NaOH): $\lambda_{\max} = 280 \text{ nm}$ ($\epsilon = 5295$), Schulter bei 288 nm ($\epsilon = 4560$).

Ac · Phe-Arg-Trp-Gly · OH, HCl (5). 820 mg (1 mmol) XXIII wurden in 6 ml abs. DMF + 1 ml abs. Pyridin gelöst, nacheinander mit 115 mg (1 mmol) N-Äthylmorpholin und 220 mg (1,2 mmol) Essigsäure-*p*-nitrophenylester (*Merck*) versetzt und 24 Std. gerührt. Nun wurde die Lösung auf ~2 ml eingengt, das Produkt durch Zugabe von abs. Äther ausgefällt, dann abgetrennt und gut mit Äther gewaschen. Man gewann so 800 mg acetylierten Tetrapeptidester, $R_f = 0,75$ (BPEW 1).

Das Produkt wurde sofort weiterverarbeitet: Abspaltung der OTSE-Gruppe durch β -Eliminierung. Die Lösung von 800 mg Tetrapeptid-ester in 8 ml Dioxan wurde mit wenig Wasser versetzt, ihr pH im pH-Stat auf 11,5 gebracht und die pH bei fortschreitender Reaktion durch Titrieren mit 0,1N NaOH bei 11,5–12,0 gehalten. Nach 40 Min. war die Abspaltung quantitativ (Aufnahme eines Äquivalentes Base); die Lösung wurde dann mit 0,1N HCl neutralisiert, das Lösungsmittel im RV. entfernt, der Rückstand in 5 ml Methanol/Wasser 1:1 gelöst und über *Sephadex*-LH-20 chromatographiert (Kolonne 4 × 80 cm; Elutionsmittel Methanol/Wasser 1:1). Die sauberen Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in Äthanol gelöst und mit 1,2 Äquiv. Pyridiniumhydrochlorid versetzt (quantitative Überführung in die Hydrochlorid-Form). Nach Verdampfen des Äthanol wurde das Produkt aus 0,1N Essigsäurelösung lyophilisiert (Kristallisation lieferte ein ausserordentlich hygroskopisches Produkt). Ausbeute: 515 mg (80%), DC.- und DE.-einheitlich. – UV. (0,01N NaOH): $\lambda_{max} = 280$ nm ($\epsilon = 5255$), Schulter bei $\lambda = 288$ nm ($\epsilon = 4444$).

H · Leu-Gly · OTSE, HCl (XXVII). 2,32 g (10 mmol) BOC · Leu · OH und 2,94 g (10 mmol) H · Gly · OTSE, HCl wurden zusammen in 35 ml Acetonitril gelöst, mit 1,15 g (10 mmol) N-Äthylmorpholin versetzt und die Lösung auf 0° abgekühlt. Dem Gemisch wurden hintereinander 2,70 g (20 mmol) HOBT und 2,27 g (11 mmol) DCCI zugefügt; nach 2 Std. bei 0° liess man die Temp. langsam auf 20° steigen und rührte 16 Std. bei dieser Temp. weiter. Das ausgefallene DCH wurde abfiltriert, das Lösungsmittel i. V. verdampft und der Rückstand in Chloroform wie üblich aufgearbeitet. Das Chloroform wurde verdampft und das Dipeptid unter Äther zu einem sehr hygroskopischen Festkörper verrieben, der bei Luftzutritt augenblicklich zerfloss; DC.-einheitlich.

Das Dipeptid XXVI wurde ohne weitere Charakterisierung sofort weiterverarbeitet: Es wurde in 20 ml Essigester gelöst und mit 10 ml 6N HCl in Dioxan versetzt. Nach 1 Std. verdampfte man das Lösungsmittel im RV. und verrührte das zurückbleibende Öl mit Äther. Das Produkt kristallisierte nach intensivem Kratzen vollständig durch. Es wurde abfiltriert, mit Äther gut gewaschen und über NaOH und P₂O₅ lange getrocknet. Ausbeute: 3,34 g (83% über beide Stufen), DC.-einheitlich.

BOC · Phe-Arg-Leu-Gly · OTSE, HCl (XXVIII). 2,10 g (5 mmol) XVIII und 2,03 g (5 mmol) in 50 ml DMF wurden 10 Min. bei RT. gerührt, die Lösung auf 0° abgekühlt und nacheinander mit 1,35 g (10 mmol) HOBT und 1,13 g (5,5 mmol) DCCI versetzt. Das Gemisch wurde 3 Std. bei 0° gehalten, anschliessend langsam auf RT. erwärmt und noch 16 Std. weitergerührt. Die DC.-Kontrolle ergab, dass die Reaktion beendet war (kein Edukt mehr vorhanden). Die Lösung wurde dann mit 2 Tropfen Eisessig versetzt, 2 Std. in die Kälte gestellt und hierauf vom ausgefallenen DCH filtriert. Das DMF wurde bei 0,1 Torr abgedampft, der ölige Rückstand in 400 ml Chloroform aufgenommen und wie üblich aufgearbeitet. Das ölige Tetrapeptid-Derivat XXVIII wurde in wenig 2-Propanol aufgenommen und mit Diisopropyläther ausgefällt. Mehrmaliges Umfällen aus 2-Propanol/Diisopropyläther lieferte ein praktisch sauberes Produkt: 3,1 g (77% d. Th.), DC.-einheitlich.

H · Phe-Arg-Leu-Gly · OTSE, 2 HCl (XXIX). 4,65 g (6 mmol) XXVIII wurden in 73 ml 0,1N HCl in HCOOH (7,3 mmol HCl) gelöst. Nach 15 Min. wurde die Säure i. V. verdampft und der Rückstand unter Äther zu einem Festkörper verrieben. Durch Kristallisation aus 2-Propanol/Äther konnte ein kleines Nebenprodukt nicht eliminiert werden, weshalb das Produkt auf einer *Sephadex*-LH-20-Säule (150 × 6 cm) in Methanol/Wasser 9:1 weiter gereinigt wurde. Die sauberen Fraktionen wurden vereinigt, das Eluierungsmittel verdampft und das Produkt aus 2-Propanol/Äther kristallisiert. Ausbeute: 3,6 g (80%), DC.-einheitlich.

H · Phe-Arg-Leu-Gly · OH, AcOH (6). 150 mg (0,2 mmol) XXIX wurden in 8 ml 0,1N NaOH gelöst (0,8 mmol Base: 0,4 mmol zur Neutralisation des Dihydrochlorids + 0,4 mmol (= doppelter Überschuss) für die β -Eliminierung) und nach 3 Min. mit 0,1N HCl wieder neutralisiert. Der pH wurde mit verd. Essigsäure auf 4,5 eingestellt, die wässrige Phase langsam durch eine *Dowex*-3-

Säule (0,8 × 12 cm) durchgetropft und mit 0,1N Essigsäurelösung eluiert (Austausch der Chlorid- gegen Acetat-Ionen). Die wässrige Phase wurde im RV. eingedampft, das Produkt erneut in 0,1N Essigsäurelösung aufgenommen und über einer *Sephadex-G-15*-Kolonnie (2 × 60 cm) chromatographiert. Die sauberen Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Ausbeute: 92 mg (84%), DC.-einheitlich.

Ac · Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(MSOC)-Pro-Val · NH₂ · HCl (XXX). 193 mg (0,3 mmol) 5 und 109 mg (0,3 mmol) VIII wurden zusammen mit 35 mg (0,3 mmol) N-Äthylmorpholin in 3 ml abs. DMF gelöst, anschließend nacheinander mit 81 mg (0,6 mmol) HOBT und 72 mg (0,35 mmol) DCCI versetzt und 24 Std. geführt. Das ausgefallene DCH wurde abfiltriert, das DMF im HV. verdampft und der Rückstand in 3 ml Methanol/Wasser 2:1 aufgenommen und durch eine *Sephadex-LH-20*-Kolonnie (4 × 80 cm) chromatographiert. (Eluierungsmittel: Methanol/Wasser 2:1). Die nach DC. sauberen Fraktionen wurden vereinigt, das Eluierungsmittel verdampft, der Rückstand in wenig Methanol gelöst und das Produkt mit Äther ausgefällt und über P₂O₅ getrocknet: 280 mg (84%), DC.-einheitlich. - UV. (1N AcOH): λ_{\max} = 280 nm (ϵ = 5850), Schulter bei λ = 288 nm (ϵ = 4900).

Ac · Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val · NH₂ · 2 AcOH (27). 112 mg (0,1 mmol) XXX wurden in 2,4 ml 0,1N Bariumhydroxydlösung gelöst, 3 Min. bei RT. belassen und hierauf das Gemisch mit 2,4 ml 0,1N Schwefelsäure neutralisiert. Der pH wurde nach Abzentrifugation des Bariumsulfats mit 0,1N Essigsäure auf 4,5 eingestellt und die Lösung nun durch eine *Dowex-3*-Säule (0,8 × 12 cm) durchgetropft (Eluierungsmittel: 0,1N Essigsäure). Die vereinigten Fraktionen wurden lyophilisiert. Ausbeute: 95 mg (90%), DC.-einheitlich. - UV. (0,01N NaOH): λ_{\max} = 280 nm (ϵ = 5310), Schulter bei λ = 288 nm (ϵ = 4390).

Z · Glu(tBuO)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(MSOC)-Pro-Val · NH₂ · HCl (XXXI). 1057 mg (1 mmol) Z · Glu(tBuO)-His-Phe-Arg-Trp-Gly · OH, HCl und 555 mg (1,05 mmol) VIII wurden zusammen mit 121 mg (1,05 mmol) N-Äthylmorpholin in 15 ml DMF gelöst, mit 270 mg (2 mmol) HOBT und - nachdem sich alles klar gelöst hatte - mit 227 mg (1,1 mmol) DCCI in 2 ml DMF versetzt; 36 Std. bei RT. reagieren lassen und hierauf in die Kälte gestellt. Das ausgefallene DCH wurde abfiltriert und das DMF i. HV. verdampft. Der Rückstand wurde in Methanol gelöst und mit Äther ausgefällt, abzentrifugiert und nochmals mit Äther gewaschen. Man löste erneut in wenig Methanol und chromatographierte in zwei Teilen durch eine *Sephadex-LH-20*-Säule (90 × 4 cm) in Methanol. Die sauberen Fraktionen (DC.) wurden vereinigt, eingengt und das Produkt wieder mit Äther ausgefällt: 1410 mg (92%) festes, amorphes Produkt, DC.-einheitlich. - UV. (Äthanol): λ_{\max} = 280 nm (ϵ = 5840), Schulter bei 290 nm (ϵ = 4950).

H · Glu(tBuO)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(MSOC)-Pro-Val · NH₂ · HCl (XXXII). 1400 mg (915 μ mol) XXXI wurden in 25 ml Methanol gelöst und dazu 120 mg 10proz. Pd/C in 2,5 ml Wasser gegeben. Man hydrierte 12 Std. im Durchfluss, gab erneut 60 mg Pd-Katalysator hinzu und hydrierte unter leichtem Druck während 12 Std. weiter: vollständige Abspaltung der Z-Gruppe. (Die Abspaltung geht bei Zusatz von 5proz. Essigsäure wesentlich schneller (ca. 10 Std.); man erhält dann allerdings das Produkt in der Acetatform). Der Katalysator wurde durch Filtration über *Celite* entfernt und das Filtrat i. V. eingedampft. Der Rückstand wurde in 30 ml Wasser aufgenommen, die Lösung durch Watte filtriert und lyophilisiert. Ausbeute: 1160 mg (91%), DC.-einheitlich. - UV. (Äthanol): λ_{\max} = 280 nm (ϵ = 5390), Schulter bei 290 nm (ϵ = 4505).

H · Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(MSOC)-Pro-Val · NH₂ · 2 HCl (XXXIII). 252 mg (180 μ mol) XXXII wurden in 4,5 ml 0,12N HCl in Ameisensäure gelöst, 15 Min. bei RT. reagieren lassen, auf 0° abgekühlt und die Lösung i. V. eingedampft. Der Rückstand wurde in einigen ml Methanol gelöst und durch eine *Sephadex-LH-20*-Kolonnie chromatographiert. Das Eluierungsmittel wurde im RV. i. V. entfernt und das Produkt aus Wasser lyophilisiert. Ausbeute: 200 mg (81%) XXXIII, das aber noch ca. 2-3% Nebenprodukt enthielt: R_f (Nebenprodukt) 0,70 (BPEW 2). Das UV.-Spektrum in Äthanol zeigt, dass keine Formylierung von Trp eingetreten ist: λ_{\max} = 280 nm (ϵ = 5330), Schulter bei 290 nm (ϵ = 4505).

H · Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val · NH₂ · 3 AcOH · 2 H₂O (28a). 69 mg (50 μ mol) XXXIII wurden in 1 ml Wasser gelöst und dazu 33 mg (100 μ mol) Ba(OH)₂ · 8 H₂O in 1 ml Wasser gegeben. Das Gemisch wurde 3 Min. bei RT. belassen und hierauf mit 1 ml 0,1M Schwefelsäure auf pH 3-4 gestellt. Das ausgefallene Bariumsulfat wurde abzentrifugiert, das Wasser im Exsikkator

verdampft und der Rückstand in 3 ml 0,01M Ammoniumacetatpuffer pH 4,5 gelöst. Diese Lösung wurde auf eine mit diesem Puffer gut gewaschene CM-Sephadex-C-25-Säule (1,2 × 30 cm) aufgetragen und mit einem Ammoniumacetatpuffer pH 6,5 (Konzentrationsgradient linear 0,01–1,0M) chromatographiert. Eine zweite Chromatographie mit einem flacheren Gradienten (0,4M–1,0M) lieferte ein nach DC. und DE. völlig reines Peptid (das Produkt wurde bei einer Pufferkonzentration von etwa 0,7–0,8M aus der Säule ausgewaschen). Die sauberen Fraktionen wurden jeweils lyophilisiert und das Ammoniumacetat bei ca. 50° i. HV. absublimiert. Das Produkt wurde anschliessend nochmals in 1proz. Essigsäure gelöst und nochmals lyophilisiert. Ausbeute: 38 mg (60%). - UV. (0,01N NaOH): $\lambda_{\max} = 280 \text{ nm}$ ($\epsilon = 5140$), Schulter bei 288 nm ($\epsilon = 4360$).

Ac · Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val · NH₂. 2 AcOH. 4 H₂O (28). 69 mg (50 μmol) XXXIII wurden in 2 ml Pyridin gelöst und dazu 6 mg (50 μmol) N-Äthylmorpholin und 18 mg (100 μmol) Essigsäure-nitrophenylester gegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei RT. belassen, hierauf das Pyridin i. V. verdampft und der Rückstand mehrmals mit Essigester extrahiert. Es resultierten 60 mg (85%) festes, acetyliertes Nonapeptid; es enthält noch ganz wenig Ausgangsprodukt. Rf(S) 0,42 (BPEW 1); 0,56 (BPEW 2).

Das Produkt wurde in 1 ml Wasser gelöst und dazu 20 mg Ba(OH)₂ · 8 H₂O (60 μmol) in 1 ml Wasser gefügt. Nach 5 Min. bei RT. wurden 600 μl 0,1M Schwefelsäure hinzugegeben (pH auf ca. 4 gestellt), der Niederschlag abzentrifugiert und das Wasser im Exsikkator verdampft. Nun folgte eine Reinigung auf CM-Sephadex-C-25 mit einem linearen Gradienten von 0,01–1,0M Ammoniumacetatpuffer pH 6,5 (vgl. Vorschrift für 28a). Das Produkt wurde bei einer Pufferkonzentration von ca. 0,5M aus der Säule eluiert. Lyophilisation, Sublimation des Ammoniumacetats (um dieses völlig zu entfernen, muss das Lyophilisat über Nacht bei 45°–50° i. HV. belassen werden) und erneute Lyophilisation aus 1proz. Essigsäure. Ausbeute (über beide Stufen): 35 mg (57%). - UV. (0,01N NaOH): $\lambda_{\max} = 280 \text{ nm}$ ($\epsilon = 5150$), Schulter bei 289 nm ($\epsilon = 4370$).

H · Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(MSOC)-Pro-Val · NH₂. 2 HCl (XXXIV). 140 mg (100 μmol) XXXIII wurden zusammen mit 43 mg (125 μmol) BOC · Met · OSU in 5 ml Pyridin gelöst und das Gemisch über Nacht bei RT. gerührt; eine DC.-Kontrolle ergab, dass sämtliches Edukt umgesetzt war. Das Pyridin wurde i. V. verdampft und das geschützte Decapeptid unter Essigester gut verrieben. Man erhielt so ein sauberes Produkt (Rf(S) 0,49 (BEW 1), 0,58 (BPEW 1)), welches gleich weiterverarbeitet wurde: Das Produkt wurde in 3 ml 0,12N HCl in HCOOH gelöst, die Lösung 15 Min. bei RT. belassen, dann auf 0° gekühlt und die Säure i. V. verdampft. Der Rückstand wurde in wenig Methanol gelöst und auf einer Sephadex-LH-20-Kolonnen mit Methanol/Wasser 9:1 als Eluierungsmittel chromatographiert. Die sauberen Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel eingedampft und das Produkt aus Wasser lyophilisiert. Ausbeute: 102 mg (68%), DC.-einheitlich. - UV. (0,01N NaOH): $\lambda_{\max} = 280 \text{ nm}$ ($\epsilon = 5400$) und 289 nm ($\epsilon = 4540$).

Ac · Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val · NH₂. 2 AcOH (29). 45 mg (30 μmol) XXXIV wurden in 1,5 ml DMF gelöst, mit 15 mg (75 μmol) Essigsäure-p-nitrophenylester in 1,5 ml Pyridin versetzt, 36 Std. bei RT. stehen gelassen, das Lösungsmittel dann i. HV. abdestilliert und der Rückstand gut mit Essigester verrieben (möglichst quantitative Entfernung des Nitrophenols) und hierauf getrocknet. Zur Abspaltung der MSOC-Gruppe am Lys⁴ wurde der unlösliche Rückstand in 1,5 ml 0,1N Bariumhydroxydlösung gelöst, die Lösung 3 Min. bei RT. belassen und hierauf durch Zugabe von 1,5 ml 0,1N Schwefelsäure neutralisiert (pH ca. 4,5). Das Bariumsulfat wurde abzentrifugiert und die Lösung auf eine CM-Sephadex-C-25-Säule (1 × 30 cm) aufgetragen, welche zuvor mit einem 0,01M Ammoniumacetatpuffer pH 4,5 äquilibriert worden war. Die Chromatographie erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0,1–1,0M Ammoniumacetat, pH 6,5. Die DC.-einheitlichen Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Dann wurde das Ammoniumacetat bei einer Badtemperatur von 45–50° i. HV. absublimiert und der Rückstand erneut lyophilisiert. Zur vollständigen Entsalzung wurde das Produkt noch durch eine Sephadex-G-25(medium)-Kolonnen (1,2 × 35 cm) mit 1proz. Essigsäure als Eluierungsmittel filtriert und nochmals lyophilisiert. Ausbeute: 25 mg (58%), DC.- und DE.-einheitlich. - UV. (0,01N NaOH): $\lambda_{\max} = 280 \text{ nm}$ ($\epsilon = 5300$).

H · Nle-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(MSOC)-Pro-Val · NH₂. 2 HCl (XXXV). 140 mg (100 μmol) XXXIII wurden in 5 ml abs. Pyridin gelöst. Dazu gab man 40 mg (120 μmol) BOC · Nle · OSU (hergestellt nach der üblichen Methode; Smp. 98°, $[\alpha]_D^{25} = -41,7^\circ$ ($c = 1$, Methanol)) und rührte das Gemisch über Nacht bei RT. Eine DC.-Kontrolle ergab, dass alles Edukt umgesetzt

war. Das Pyridin wurde i. V. verdampft und der Rückstand mehrmals mit Essigester extrahiert; Rf(S) 0,45 (BPEW 1).

Das geschützte Decapeptid (160 mg) wurde sofort weiterverarbeitet: Man löste es in 3 ml 0,12N HCl in HCOOH und belies es 10 Min. bei RT. Dann wurde die Säure i. V. entfernt, das Produkt zunächst über NaOH gut getrocknet, dann in 2 ml Methanol gelöst und durch eine *Sephadex*-LH-20-Kolonnen (4×90 cm) chromatographiert (Eluierungsmittel Methanol/Wasser 9:1). Die DC.-einheitlichen Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel verdampft, der Rückstand in 20 ml Wasser gelöst und lyophilisiert. Ausbeute: 106 mg (71%). – UV. (0,01N NaOH): $\lambda_{\max} = 280$ nm ($\epsilon = 5440$) und 289 nm ($\epsilon = 4680$).

Ac · Nle-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val · NH₂, 2 *AcOH* (29a). 45 mg (30 μ mol) XXXV wurden in 1 ml DMF gelöst und mit 18 mg (100 μ mol) AcONP in 1 ml Pyridin versetzt. Nach 24 Std. Reaktionsdauer bei RT. wurde das Lösungsmittel i. HV. entfernt und der Rückstand 2mal mit Essigester gut verrichten und anschliessend getrocknet. Das Produkt wurde nun in 1,5 ml 0,1N Bariumhydroxydlösung gelöst und nach 2 Min. mit 1,5 ml 0,1N Schwefelsäure neutralisiert. Das Bariumsulfat wurde abzentrifugiert, der pH der Lösung auf 4,5 gebracht und diese nun auf eine *CM-Sephadex*-C-25-Säule (1×25 cm) (äquilibriert mit 0,01M Ammoniumacetatpuffer pH 4,5) aufgetragen. Die Säule wurde mit dem gleichen Puffer gut durchgewaschen, dann mit einem linear ansteigenden Gradienten von 0,1–1,0M Ammoniumacetat pH 6,5 entwickelt. Das Produkt wurde bei einer Pufferkonzentration von 0,5M aus der Säule eluiert. Lyophilisation, Sublimation und erneute Lyophilisation, Ausbeute: 30 mg (70%), DC.- und DE.-einheitlich. – UV. (0,01N NaOH): $\lambda_{\max} = 280$ nm ($\epsilon = 5200$) und 289 nm ($\epsilon = 4500$).

BOC · Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(tBuO)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(MSOC)-Pro-Val · NH₂, *HCl* (XXXVI), 728 mg (0,5 mmol) *BOC · Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(tBuO)-His-Phe-Arg-Trp-Gly · OH* [16] und 290 mg (0,55 mmol) VIII wurden in 10 ml abs. DMF suspendiert und so lange gerührt, bis alles klar gelöst war. Nun fügte man hintereinander 135 mg (1 mmol) HOBT und 124 mg (0,6 mmol) DCCI hinzu, belies das Gemisch 36 Std. bei 45–50°, stellte es über Nacht in den Kühlschrank, filtrierte das ausgefallene DCH ab und chromatographierte das Produkt in zwei Portionen über eine *Sephadex*-LH-20-Säule ($2,5$ cm \times 100 cm, Eluierungsmittel: DMF/Wasser 9:1). Dadurch konnten die niedermolekularen Anteile angetrennt werden. Weitere Reinigung durch Gegenstromverteilung: Das Produkt wurde in je 30 ml Ober- und Unterphase des Systems 1proz. Essigsäure/*n*-Butanol gelöst und über 225 Schritte verteilt. Die Fraktionen 106–120 waren DC.-einheitlich. Sie wurden vereinigt, das Lösungsmittel i. V. verdampft, der Rückstand in wenig DMF gelöst und mit peroxylfreiem Äther ausgefällt: 685 mg (70%) weisses Pulver, DC.-einheitlich. – UV. (in 10% AcOH): $\lambda_{\max} = 280$ nm ($\epsilon = 6410$).

H · Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(MSOC)-Pro-Val · NH₂, 2 *HCl* (XXXVII). 590 mg (0,3 mmol) XXXVI wurden in 12 ml 0,12N HCl in Ameisensäure gelöst, 20 Min. bei RT. belassen und im RV. i. V. (in der Kälte) wieder eingedampft. Der Rückstand wurde mehrmals in Wasser/Methanol gelöst und die Lösung jeweils wieder eingedampft. Dann wurde das Produkt in 25 ml 1proz. Essigsäure gelöst und lyophilisiert. Ausbeute: 505 mg (93%), DC.-einheitlich.

Ac · Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(MSOC)-Pro-Val · NH₂, *HCl* (XXXVIII). 544 mg (0,3 mmol) wurden in 4 ml DMF gelöst, mit 1 ml abs. Pyridin und mit 35 mg (0,3 mmol) *N*-Äthylmorpholin versetzt. Nach Zugabe von 91 mg (0,5 mmol) Essigsäure-*p*-nitrophenylester wurde das Gemisch 30 Std. bei RT. belassen. Hierauf wurde das Lösungsmittel i. V. verdampft, der Rückstand in ca. 3 ml DMF/H₂O 9:1 gelöst und mit demselben Eluierungsmittel über eine *Sephadex*-LH-20-Kolonnen (5×100 cm) chromatographiert. Die DC.-einheitlichen Fraktionen wurden vereinigt, das Eluierungsmittel im RV. entfernt und der Rückstand in 30 ml 0,1N Essigsäure gelöst und lyophilisiert. Ausbeute: 505 mg (91%), DC.- und DE.-einheitlich. – UV. (in 1N AcOH): $\lambda_{\max} = 280$ nm ($\epsilon = 6700$).

α -MSH, 2 *AcOH* (1). 185 mg (0,1 mmol) XXXVIII wurden in 5 ml H₂O suspendiert und tropfenweise mit 5 ml 0,1N Bariumhydroxydlösung versetzt, wobei das Produkt vollständig in Lösung ging. Nach 6 Min. totaler Reaktionsdauer bei 18° wurde die wässrige Lösung durch Zugabe von 5 ml 0,1N Schwefelsäure (im Eisbad) neutralisiert, das ausgefallene Bariumsulfat abzentrifugiert, der Überstand mit konz. Essigsäure auf pH 4,5 gebracht und nun auf eine *CM-Sephadex*-C-25-Säule ($1,5 \times 30$ cm) aufgetragen. Die Säule wurde gut mit 0,01M Ammoniumacetatpuffer pH 4,5 gewaschen (Äquilibrierungspuffer); das Produkt wurde anschliessend mit einem Konzen-

trationsgradienten von 0,1M bis 1,0M Ammoniumacetat pH 6,5 eluiert (tot. Eluierungsvolumen: 250 ml; Eluierungskonzentration des Puffers für α -MSH: 0,4M). Die DC.-einheitlichen Fraktionen wurden vereinigt, lyophilisiert, das Ammoniumacetat über Nacht bei 45° sublimiert, der Rückstand erneut in 1proz. AcOH gelöst und nochmals lyophilisiert und das α -MSH nun in 6 ml Wasser gelöst, mit 110 mg frisch dest. Thioglykolsäure versetzt (20 Äquiv.) und 5 Std. bei RT. inkubiert (Reduktion von Methionin-sulfoxid). Erneutes Lyophilisieren der wässrigen Lösung und Schlusschromatographie auf *Sephadex-LH-20*-Säule (2,5 × 100 cm) mit DMF/H₂O 9:1 als Eluierungsmittel. Die sauberen Fraktionen wurden vereinigt, eingeengt und das Produkt mit Äther ausgefällt: 103 mg (58%) in DC. und DE. sehr sauberes α -MSH, welches nur eine ganz geringe Spur (~1%) oxydiertes Material enthält. - UV. (in 0,1N NaOH) $\lambda_{\max} = 281 \text{ nm}$ ($\epsilon = 6860$, Ber. 6800), 289 nm ($\epsilon = 6550$, Ber. 6507).

$$\frac{M_{\text{Tyr}}}{M_{\text{Tro}}} = \frac{0,592D_{284,4} - 0,263D_{280}}{0,263D_{280} - 0,170D_{284,4}} = 0,96$$

Wir danken Herrn *Willy Hübscher* für seine ausgezeichnete Hilfe als Laborant. Analytische Arbeiten verdanken wir Herrn *W. Manser*, Laboratorium für organische Chemie der ETH-Z, Herrn Prof. Dr. *H. Zuber*, Prof. Dr. *K. Wüthrich* und P. D. Dr. *H. G. Weder* in diesem Institut.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *E. Wünsch*: «Synthese von Peptiden», Bd. 15, «*Houben-Weyl*, Methoden der organischen Chemie», *E. Müller*, Herausgeber, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974.
- [2] *Margaret O. Dayhoff*: «Atlas of Protein Sequence and Structure», Vol. 5, National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Maryland, U.S.A., 1972.
- [3] *A. Eberle & R. Schwyzer*, *Helv.* 58, 1528 (1975).
- [4] *R. Schwyzer*, *Naturwiss.* 53, 1528 189 (1966).
- [5] *A. Costopanagiotis, P. Sieber & R. Schwyzer*, *Helv.* 46, 870 (1963).
- [6] *U. Ludescher & R. Schwyzer*, *Helv.* 55, 2052 (1972).
- [7] *J. W. van Nispen & G. I. Tesser*, *Intern. J. Peptide Protein Research* 7, 57 (1975).
- [8] *J. W. F. M. van Nispen*: «Synthesis and Properties of some ACTH and α -MSH Analogues», Doctoral Thesis, Catholic University of Nijmegen, The Netherlands 1974.
- [9] *M. Ohno, S. Tsukamoto & N. Isumiya*, *Chem. Commun.* 1972, 663.
- [10] *A. E. Lanzilotti, E. Benz & L. Goldman*, *J. Amer. chem. Soc.* 86, 1880 (1964).
- [11] *A. T. Kader & C. J. M. Stirling*, *Soc.* 1964, 258.
- [12] *J.-L. Fauchere & R. Schwyzer*, *Helv.* 54, 2078 (1971).
- [13] *A. Eberle & R. Schwyzer*, *J. Clin. Endocrin. suppl.* (1975), im Druck.
- [14] *W. König & R. Geiger*, *Chem. Ber.* 103, 788 (1970).
- [15] *H. Kappeler & R. Schwyzer*, *Helv.* 43, 1453 (1960).
- [16] *R. Schwyzer & H. Kappeler*, *Helv.* 44, 1991 (1961).
- [17] *G. W. Anderson, F. M. Callahan & J. P. Zimmermann*, *J. Amer. chem. Soc.* 89, 187 (1967).
- [18] *J. Beacham, G. Dupuis, F. M. Finn, H. T. Storey, C. Yanaihara, N. Yanaihara & K. Hofmann*, *J. Amer. chem. Soc.* 93, 5526 (1971).