

260. Synthese von [D-Alanin¹, 4'-azido-3',5'-ditritio-L-phenylalanin², norvalin⁴]α-melanotropin als «Photoaffinitätsprobe» für Hormon-Rezeptor-Wechselwirkungen

von Alex Eberle und Robert Schwyzer¹⁾

Institut für Molekularbiologie und Biophysik
Eidgenössische Technische Hochschule
CH-8093 Zürich

(25. VIII. 76)

Synthesis of [D-alanine¹, 4'-azido-3',5'-ditritio-L-phenylalanine², norvaline⁴]α-melanotropin as a 'photoaffinity probe' for hormone-receptor interactions. – *Summary.* The synthesis of an α-MSH derivative containing 4'-azido-3',5'-ditritio-L-phenylalanine is described: Ac · D-Ala-Pap(³H₂)-Ser-Nva-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val · NH₂. This hormone analogue is being used for specific photoaffinity labelling of receptor molecules. The synthesis was performed in a way to minimize the number of radioactive steps and to introduce the radioactive and the photoaffinity label exclusively into position 2. The dipeptide N(α)-acetyl-D-alanyl-(4'-amino-3',5'-diiodo)-L-phenylalanine was tritiated and transformed into the azido compound, N(α)-acetyl-D-alanyl-(4'-azido-3',5'-ditritio)-L-phenylalanine which was then condensed with H · Ser-Nva-Glu(O^tBu)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(BOC)-Pro-Val · NH₂ to the tridecapeptide. The α-MSH analog displayed a specific activity of 11 Ci/mmol, and a biological activity of about 4 · 10⁹ U/mmol (10% of α-MSH).

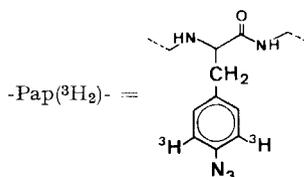
Einleitung. – Das Hormon α-Melanotropin (α-MSH) ist ein lineares Tridecapeptid der *Pars intermedia* der Hypophyse. Es spielt eine wichtige Rolle für die Pigmentierung der Haut, besitzt daneben aber eine Anzahl weiterer regulierender Funktionen im Zusammenhang mit dem Verhalten (Lernfähigkeit und Aufmerksamkeit), der Sebum-Sekretion, dem fötalen Wachstum, der Somatotropin-Sekretion u. a. m. (Übersicht [2]).

Für die Übertragung der hormonalen Information auf die Erfolgszellen und damit für die Auslösung der genannten Wirkungen sind spezifische Rezeptoren verantwortlich. Ihre chemische Natur ist noch weitgehend unbekannt [3]. Die Hormone scheinen reversible Komplexe mit ihren Rezeptoren zu bilden (typische Assoziationskonstanten ca. 10⁹ l · mol⁻¹ [4]). Könnte man ein Hormon oder ein biologisch aktives Hormonderivat nach Einstellung des Gleichgewichtes so aktivieren, dass es an Ort und Stelle mit seinem Rezeptor zu einer kovalenten Verbindung reagieren würde, so hätte man die Möglichkeit, die Rezeptoren selektiv zu substituieren und aufgrund der

¹⁾ Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt. Nomenklatur und Abkürzungen vgl. [1]. Phenylalanin-Derivate werden hier wie folgt abgekürzt: Phe(NO₂) = 4'-Nitro-phenylalanin; Phe(NH₂) = 4'-Amino-phenylalanin; Pap = 4'-Azido-phenylalanin; Phe(NH₂, I₂) = 4'-Amino-3',5'-dijodo-phenylalanin; Pap(³H₂) = 4'-Azido-3',5'-ditritio-phenylalanin. Kleinschreibung in der Drei-Buchstaben-Abkürzung bedeutet D-Konfiguration. Weitere Abkürzungen: BOC = *t*-Butoxycarbonyl; BZL = Benzyl; DMF = Dimethylformamid; DCCI = *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid; DCH = *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff; HOBT = 1-Hydroxybenzotriazol; MTP = 4-Methylthio-phenyl; MSP = 4-Methylsulfonyl-phenyl; NP = 4-Nitrophenyl; Z = Benzyloxycarbonyl; i. V. = im Vakuum (ca. 10–20 Torr); HV. = «Hochvakuum» (ca. 0,1–0,01 Torr); RT. = Raumtemperatur.

Markierung zu isolieren. Als geeignete Methode bietet sich hier die sogenannte Photoaffinitätsmarkierung an [5].

Zur Photoaffinitätsmarkierung von α -MSH-Rezeptoren benötigen wir Hormonderivate, die zugleich radioaktive Nuclide als auch eine durch Licht aktivierbare Gruppe enthalten. Als besonders geeignete Gruppe erweist sich das *p*-Azido-phenylalanin [6]. Es ist äusserlich dem Tyrosin sehr ähnlich und lässt sich durch Licht von 365 nm ins entsprechende reaktionsfähige Nitren verwandeln. Es eignet sich – in Peptide eingebaut – zur Photoaffinitätsmarkierung von Chymotrypsin [7]. Zudem ist es leicht als Tritiumderivat erhältlich: 4'-Azido-3',5'-ditritio-phenylalanin [2] [8]. Wir beschreiben hier die Synthese eines radioaktiven «Photoaffinitäts-Melanotropins», des [D-Alanin^1 , 4'-azido-3',5'-ditritio-L-phenylalanin 2 , norvalin 4] α -melanotropins



Allgemeine Überlegungen. – Der Ort und die Art der Substitution in der α -MSH-Molekel muss so gewählt werden, dass die biologische Aktivität erhalten bleibt. Folgende Überlegungen waren bei der Wahl massgebend: Zwar ist die Aminosäuresequenz von α -MSH identisch mit derjenigen des *N*-terminalen Teils von ACTH (Adrenocorticotropin), doch unterscheiden sich die beiden Hormone bezüglich ihrer Informationsorganisation. Während ACTH nur eine Befehlssequenz besitzt (-Glu-His-Phe-Arg-Trp-), weist α -MSH deren zwei auf (-Glu-His-Phe-Arg-Trp- und -Gly-Lys-Pro-Val \cdot NH $_2$), die sowohl unabhängig als auch kooperativ die Wirkung auslösen können [9]. Bei der Herstellung von Derivaten sollten also diese Aminosäuresequenzen intakt gelassen werden. Nur die potenzierende Sequenz Ac \cdot Ser-Tyr-Ser-Met- darf also – in gewissen Grenzen – verändert werden.

Markierung

↓ ↓

Ac \cdot Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val \cdot NH $_2$

Potenzierung

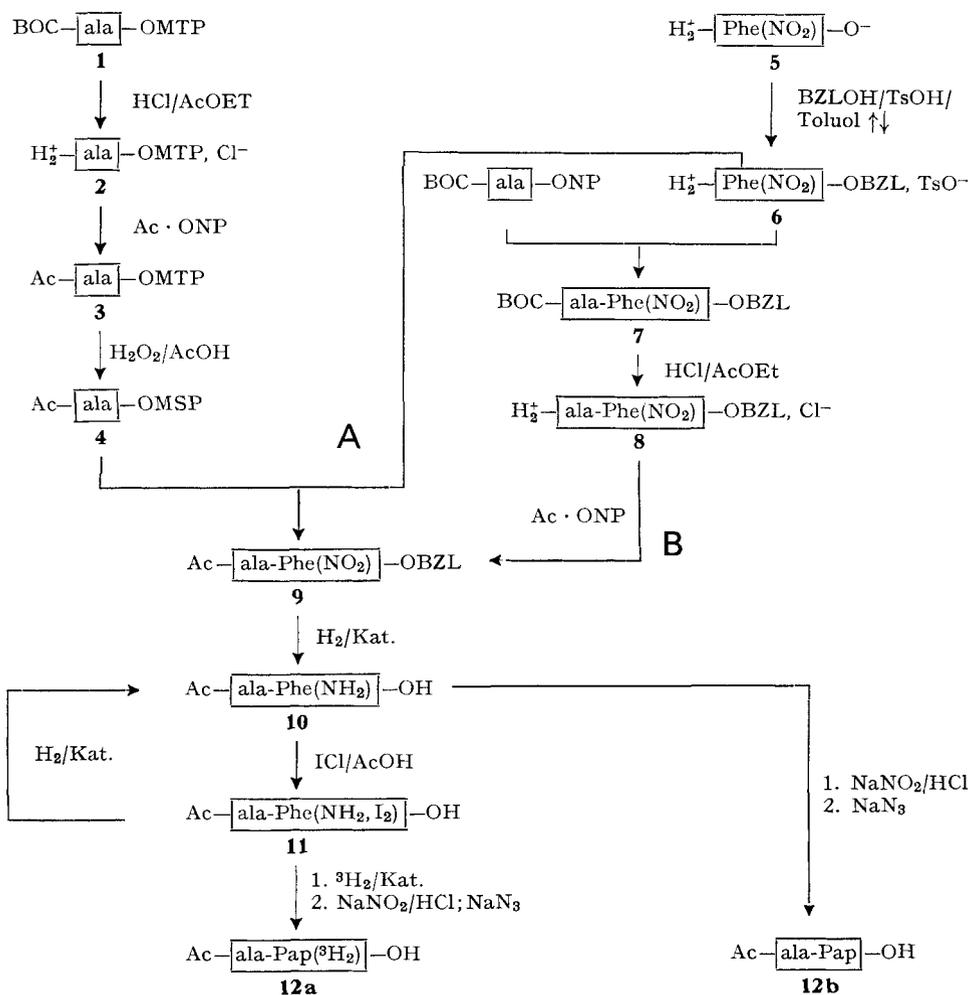
Befehlssequenz 1

Befehlssequenz 2

Wir haben zunächst «Affinitäts»- und «Photoaffinitäts-Melanotropine» hergestellt, die Veränderungen des Acetylrestes (Bromacetyl-, Diazoacetyl-) und des Tyrosinrestes (3',5'-Dijodtyrosin; 3',5'-Ditritiotyrosin; 4'-Azido-phenylalanin und 4'-Azido-3',5'-ditritio-phenylalanin) aufweisen [2]. Zur Verhinderung interner Reaktionen und des enzymatischen Abbaus wurde nun bei etlichen Derivaten Serin(1) durch $\text{D-Alanin}(1)$ ersetzt, wobei allerdings ein gewisser Verlust an biologischer Aktivität hingenommen werden musste. Eine weitere Vereinfachung brachte der Ersatz von Methionin(4) durch Norvalin(4), Nva (vgl. unten).

Synthese von *N*(α)-Acetyl-D-alanyl-[4'-azido-3', 5'-ditritio]-L-phenylalanin (Schema 1). - Strategie und Taktik der Synthese von [ala¹, Pap(³H)₂, Nva⁴] α -MSH wurden so gewählt, dass die Anzahl radioaktiver und photolysegefährdeter Stufen möglichst klein bleibt und dass die beiden markierenden Gruppen (³H und -N₃) wirklich selektiv eingebaut werden können. Die Einführung der Azidgruppe in das Phenylalanin darf deshalb erst nach der Tritiierung erfolgen und ist nur innerhalb eines geeigneten Fragmentes möglich, welches leicht isolierbar, d.h. möglichst in kristalliner Form herstellbar sein sollte. Das Tridecapeptid wurde deshalb in die Sequenzteile (1-2) und (3-13) zerlegt, und das Dipeptid so aufgebaut, dass es sich in fertiger Form (*N*(α)-acetyliert, tritiert, als Azid) mit dem grösseren Fragment kon-

Schema 1. Synthese von Acetyl-D-alanyl-(4'-azido-3', 5'-ditritio)phenylalanin (Ac · ala-Pap(³H₂) · OH) und seinem nicht radioaktiven Analogen (Ac · ala-Pap · OH)



densierte und das geschützte α -MSH-Derivat dann in einem einzigen Schritt seiner Schutzgruppen entledigt werden konnte.

Als Ausgangsprodukt für die Tritiierung diente $\text{Ac} \cdot \text{ala-Phe}(\text{NH}_2, \text{I}_2) \cdot \text{OH}$ (**11**), das über die beiden Vorstufen **9** und **10** aufgebaut wurde. Das $N(\alpha)$ -acetylierte Dipeptid $\text{Ac} \cdot \text{ala-Phe}(\text{NO}_2) \cdot \text{OBZL}$ (**9**) wurde auf zwei Wegen hergestellt, nämlich *a*) durch Kondensation des optisch aktiven $N(\alpha)$ -Acetyl-D-alanin-[4-(methylsulfonyl)phenyl]-esters (**4**) mit 4'-Nitrophenylalanin-benzylester (**6**) bzw. *b*) durch Acetylierung von D-Alanyl-4-nitrophenylalanin-benzylester (**8**) mit Essigsäure-*p*-nitrophenylester. Der Syntheseweg *b*) lieferte die bessere Ausbeute, vor allem deshalb, weil die 4-(Methylsulfonyl)phenylester-Gruppe (MSP) [10] eine bedeutend schlechtere Aminolysefähigkeit besitzt als der entsprechende *p*-Nitrophenylester (z.B. liess sich Diazoacetyl-alanin als MSP-Ester nicht mit einem Derivat des (2–13)- α -MSH-Teils kondensieren, wohl aber als entsprechender *p*-Nitrophenylester). Katalytische Hydrierung von **9** entfernte die Ester-Schutzgruppe und reduzierte die Nitro- zur Aminogruppe; das entstandene Dipeptid **10** war ausserordentlich photolabil und oxydationsempfindlich, weshalb die Hydrierung und alle weiteren Schritte ausschliesslich unter Natriumdampf-Beleuchtung ausgeführt wurden. Die Jodierung von **10** zu **11** erfolgte mit Jodmonochlorid [11] und verlief in 20 Min. bei Raumtemperatur quantitativ. Katalytische Hydrierung von **11** lieferte zu 90–95% wieder **10**. Diazotierung von **10** mit Natriumnitrit in 1N HCl und anschliessende Substitution mit Natriumazid [6] lieferte **12b**, das aus der Reaktionslösung auskristallisierte.

Die Tritiierung von **11** erfolgte in einer Spezialapparatur [12] mit einem Gemisch von 5proz. Pd/C und 5proz. Rh/CaCO₃ [11] und lieferte zu 58% das Ditratio- und zu 42% das Monojodo-monotritio-Derivat. Das letztere blieb nach dem Diazotierungsschritt in Lösung und konnte so abgetrennt werden. Die spezifische Aktivität des Dipeptides **12a** betrug 11,1 Ci/mmol.

Synthese von [ala¹, Pap(t₂)², Nva⁴] α -MSH und seinem nicht radioaktiven Analogon (Schema 2). – Neben dem Ersatz von Serin(1) durch D-Alanin wurde auch Methionin(4) gegen Norvalin ausgetauscht, insbesondere um eine möglichst komplikationsfreie Kondensation des radioaktiven Fragments (1–2) mit der Sequenz (3–13) zu erreichen. Letztere wurde so aufgebaut, dass **13** und **14** mittels Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) zum Nonapeptid **15** verbunden wurden und dann – nach Abspaltung der $N(\alpha)$ -Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe – das Dipeptid **18** durch eine Azidkupplung angehängt wurde. Das Undecapeptid **19** wurde durch Verteilungschromatographie bzw. Ausschlusschromatographie auf Sephadex LH-20 in reiner Form isoliert. Die Benzyloxycarbonyl-Gruppe wurde dann durch katalytische Hydrierung entfernt, und das entstandene Undecapeptid **20** mit **12a** bzw. **12b** kondensiert, wobei das Dipeptid jeweils in einem Überschuss von 30% vorlag, um eine vollständige Umsetzung des Undecapeptids zu gewährleisten. Überschüssiges **12a** bzw. **12b** wurde mittels Chromatographie über Sephadex LH-20 wieder abgetrennt und das Tridecapeptid in reiner Form isoliert. Die Abspaltung der BOC- und *Ot*Bu-Gruppen gelang mit 90proz. Trifluoressigsäure bzw. mit 0,12N HCl in Ameisensäure. Die spezifische Aktivität des α -MSH-Derivates **22a** entsprach derjenigen des Dipeptides **12a**. (11,0 Ci/mmol), d.h. es ist kein Tritiumverlust eingetreten. Die

melanotropen Aktivitäten von **22a** und **22b** waren identisch und erreichten 10% derjenigen von α -MSH. Die Bestimmung der melanotropen Aktivitäten wurde allerdings bei Normalbeleuchtung durchgeführt (photolytische Zerstörung?), weshalb die Potenz von **22a** und **22b** eventuell sogar höher ist ($\sim 4 \cdot 10^9$ U/mmol).

Experimenteller Teil

Allgemeines. Smp. wurden in offenen Kapillaren bestimmt und sind uncorr. Die Elementaranalysen verdanken wir Herrn *Manser*, Laboratorium für organische Chemie der ETHZ. Die Aminosäuren-Analysen wurden im Laboratorium von Prof. Dr. *H. Zuber* durch Frau *Zanivan* nach *Stein & Moore* auf Apparaten der Fa. *Beckman*, Modelle 120B und 121, ausgeführt. NMR.-Spektr. (δ in ppm) wurden mit einem *Varian* T60 Spektrometer, IR.-Spektr. ($\tilde{\nu}$ in cm^{-1}) mit einem *Beckman* IR 33 und die optischen Drehungen mit einem *Perkin-Elmer* 141 Polarimeter bestimmt. UV.-Spektr.: Angabe von λ_{max} in nm, ϵ in Klammern. Zur Dünnschichtchromatographie (DC.) wurden *Merck* Silicagel-Platten (S) und folgende Fließmittel verwendet: BEW 1 = 2-Butanol/Eisessig/Wasser 72:7:21 (v:v), BEW 2 = 1-Butanol/Eisessig/Wasser 67:10:23, BPEW 1 = 1-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 50:12:12:25, BPEW 2 = 1-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 42:24:4:30, CME = Chloroform/Methanol/Eisessig 95:5:3, EBPEW = Essigester/1-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 42:24:21:6:10, EPAW = Essigester/Pyridin/Ameisensäure/Wasser 63:21:10:6. Dünnschichtelektrophoresen (DE.) wurden auf *Merck* Cellulose-Fertigplatten in einer Apparatur der Firma *Camag* mit folgenden Puffersystemen durchgeführt: pH 3,6: Eisessig/Pyridin/Wasser 100:10:890 (v:v) und pH 5,6: Eisessig/Pyridin/Wasser 6:23:970. Die Platten wurden jeweils mit Jod, Ninhydrin und *Reindel-Hoppe*-Reagens entwickelt; radioaktive Dünnschichtplatten wurden auf einem Dünnschicht-Scanner Actigraph III (*Nuclear Chicago*) analysiert.

Übliche Aufarbeitung bedeutet: Aufnehmen in einem in Wasser schwerlöslichen organischen Lösungsmittel, Waschen mit verd. Säure (5proz. KHSO_4 -Lösung/5proz. K_2SO_4 -Lösung 1:2), 5proz. NaHCO_3 - und ges. NaCl-Lösung, Trocknen der organischen Phase mit Natriumsulfat (wasserfrei) und Verdampfen der organischen Phase im RV. unter Wasserstrahl-Vakuum.

BOC · ala · OMTP (1). 2,85 g (15 mmol) *BOC · D-Ala · OH* [2] löste man zusammen mit 2,13 g (15 mmol) 4-(Methylthio)phenol (*Fluka, puriss.*) in 60 ml Methylenchlorid, kühlte auf 0° und versetzte die Lösung mit 3,40 g (16,5 mmol) DCCI. Nach 2 Std. bei 0° und 16 Std. bei RT. wurde der DCH abfiltriert, das Methylenchlorid i.V. verdampft, der Rückstand in 400 ml Essigester gelöst und wie üblich aufgearbeitet. Kristallisation aus Essigester/Petroläther bei 0° (24 Std.) ergab 2,65 g (85%) **1**, Smp. 88–89°, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 53,7^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC. einheitlich: Rf (S) 0,71 (BEW 2), 0,75 (CME), 0,76 (BEW 1).

$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_4\text{S}$	Ber. C 57,86	H 6,80	N 4,50	S 10,30%
(311,40)	Gef. „ 57,80	„ 6,86	„ 4,65	„ 10,11%

H · ala · OMTP, HCl (2). 3,11 g (10 mmol) **1** wurden durch Einwirkung von 100 ml 1N HCl in Essigester (30 Min. bei RT.) ihrer BOC-Schutzgruppe entledigt. Kristallisation bei 0° aus Essigester/Äther und Trocknen über NaOH lieferte 2,10 g (85%) **2**, Smp. 171–172°, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -5,6^\circ$ ($c = 1$, Methanol). Im DC. je nach Laufmittel nicht stabil: Rf(S) 0,49 (BEW 1), 0,52 (BEW 2).

$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{ClNO}_2\text{S}$ (247,74)	Ber. C 48,48	H 5,70	N 5,65%	Gef. C 48,48	H 5,71	N 5,69%
------------------------------------------------------------	--------------	--------	---------	--------------	--------	---------

Ac · ala · OMTP (3). 1,72 g (7 mmol) **2**, 0,81 g (7 mmol) *N*-Äthylmorpholin und 1,27 g (7 mmol) Essigsäure-*p*-nitrophenylester (*Merck*) wurden in 20 ml DMF gelöst und 24 Std. bei RT. gerührt. Das DMF wurde i.HV. verdampft und der Rückstand in 100 ml Essigester gelöst. Nach 3 Std. Stehenlassen kristallisierten ca. 0,3 g Edukt wieder aus; es wurde abfiltriert, die Essigesterphase auf 250 ml verdünnt und wie üblich aufgearbeitet. Nach dem Verdampfen des Essigesters i.V. löste man das zurückbleibende Öl in Äther, worauf **3** quantitativ auskristallisierte (nach einigen Std. wurde noch wenig Pentan hinzugegeben): 1,27 g (72%), Smp. 114°, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 96,5^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,52 (CME), 0,68 (BEW 1), 0,69 (BEW 2); Chlorplatinssäure-Reagens [13]: Schwefel positiv \rightarrow Thiogruppe). – IR. (CHCl_3 und Nujol): keine Ban-

den bei 1140 und 1300 (\rightarrow kein $-\text{SO}_2-$). – NMR. (CDCl_3): 1,6/*d* (CH_3 , Ala), 2,0/*s* (CH_3 , Acetyl), 2,5/*s* (CH_3 , Thiomethyl), 4,8/*m* (CH), 6,9–7,4 (4 Signale, $AA'BB'$ -System der Phenyl-Protonen).

$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{S}$	Ber. C 56,91	H 5,97	N 5,53	S 12,66%
(253,32)	Gef. ,, 56,71	,, 6,04	,, 5,62	,, 12,75%

Ac · *ala* · *OMSP* (**4**). 0,78 g (3,1 mmol) **3** wurden in 30 ml Eisessig gelöst und mit 3 ml 30 proz. Wasserstoffperoxid-Lösung versetzt. Eine DC.-Kontrolle nach 12 Std. ergab, dass das Edukt je etwa zur Hälfte zum Sulfoxid (Rf(S) 0,22 (CME)) und zum Sulfon **4** (Rf(S) 0,33 (CME)) oxydiert worden war. Nach weiteren 18 Std. bei RT. war die Oxydation zu **4** quantitativ abgelaufen. Die Essigsäure wurde i.V. verdampft, der Rückstand mehrmals in Äthanol/Benzol gelöst und wieder eingedampft. Kristallisation aus 2-Propanol/Diisopropyläther: 0,65 g (74%) pilzförmige Nadeln, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 79,4^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,33 (CME), 0,73 (BEW 1), 0,74 (BEW 2) (negativ mit Chlorplatin säure-Reagens \rightarrow kein Sulfid mehr vorhanden). – IR. (Chloroform): 1140, 1300 *s* ($-\text{SO}_2-$). – NMR. (CDCl_3): 1,5/*d* (CH_3 , Ala), 2,0/*s* (CH_3 , Acetyl), 3,0/*s* (CH_3 , Sulfonylmethyl), 4,6/*m* (CH), 6,9–7,8 (4 Signale, $AA'BB'$ -System der Phenyl-Protonen).

$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_5\text{S}$	Ber. C 50,52	H 5,30	N 4,91	S 11,24%
(285,32)	Gef. ,, 49,94	,, 5,28	,, 4,72	,, 11,26%

H · *Phe*(NO_2) · *OBZL*, *TsOH* (**6**). 21,0 g (100 mmol) 4'-Nitrophenylalanin (**5**) [14] und 20,0 g (105 mmol) *p*-Toluolsulfonsäuremonohydrat (*Fluka*, puriss.) wurden in 300 ml Toluol gelöst und 50 ml Benzylalkohol (*Fluka*, puriss.) hinzugegeben. Dann wurde das Gemisch 12 Std. bei 130° unter Rückfluss in einem mit Wasserabscheider und Kühler versehenen Kolben gekocht. Nach Beendigung der Reaktion fiel beim Abkühlen ein Teil des Produktes aus. Das Ganze wurde zur Trockene eingedampft, der Rückstand in Methanol gelöst, Unlösliches aus der heissen Lösung abfiltriert (= Edukt), Äther zur methanolischen Lösung hinzugegeben und diese zur Kristallisation von **5** in die Kälte gestellt. Das Kristallisat wurde abfiltriert, erneut in Methanol gelöst, mit wenig Aktivkohle gekocht und durch einen Mikrofilter filtriert. Kristallisation aus Methanol/Äther: 28 g (59%) filzige Nadeln, Smp. 186°, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -10,0^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,52 (BEW 1), 0,81 (BPEW 1).

$\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$	Ber. C 58,46	H 5,12	N 5,93	S 6,78%
(472,52)	Gef. ,, 58,24	,, 5,10	,, 5,89	,, 6,89%

BOC · *ala-Phe*(NO_2) · *OBZL* (**7**). Zu 9,4 g (20 mmol) **6** und 2,3 g (20 mmol) *N*-Äthylmorpholin, gelöst in 100 ml DMF, gab man 6,2 g (20 mmol) *BOC* · *p*-Ala · *ONP* [2], rührte 3 Std. bei 0° und 20 Std. bei RT., verdampfte das DMF i.HV. und arbeitete in Chloroform wie üblich auf. Kristallisation ($3\times$) aus 2-Propanol/Diisopropyläther \rightarrow filzige Nadeln. Trocknen über P_2O_5 : 6,4 g (68%) **7**, Smp. 133°, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 1,3^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,78 (BEW 1), 0,80 (BPEW 1).

$\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{H}_3\text{O}_7$ (471,52)	Ber. C 61,14	H 6,20	N 8,91%	Gef. C 61,21	H 6,18	N 8,75%
-----------------------------------------------------------	--------------	--------	---------	--------------	--------	---------

H · *ala-Phe*(NO_2) · *OBZL*, *HCl* (**8**). 6,0 g (13 mmol) **7** wurden in 80 ml Essigester gelöst und mit 30 ml 3,8N HCl in Essigester versetzt. Nach 1 Std. bei RT. wurde das Gemisch mit Äther versetzt und zur Kristallisation in die Kälte gestellt. Das Kristallisat wurde abfiltriert, getrocknet und $1\times$ aus 2-Propanol/Diisopropyläther umkristallisiert: 4,5 g (99%) **8**, Smp. 182°, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -15,0^\circ$ ($c = 1$, Äthanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,50 (BEW 1), 0,62 (BPEW 1).

$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}_5$ (407,85)	Ber. C 55,95	H 5,44	N 10,30%	Gef. C 55,85	H 5,40	N 10,18%
-------------------------------------------------------------	--------------	--------	----------	--------------	--------	----------

Ac · *ala-Phe*(NO_2) · *OBZL* (**9**). – *a*) 143 mg (0,5 mmol) **4** und 236 mg (0,5 mmol) **6** löste man in 6 ml DMF, fügte 53 mg (0,5 mmol) *N*-Äthylmorpholin hinzu und liess über Nacht bei RT. reagieren. Nach Verdampfen des DMF wurde der Rückstand in CHCl_3 gelöst und wie üblich aufgearbeitet. Das ölige **9** wurde nun in wenig 2-Propanol gelöst, mit der 9fachen Menge Diisopropyläther versetzt und 24 Std. bei 4° aufbewahrt. Es resultierte ein pilzförmiges Kristallisat: 105 mg (61%) **9**, Smp. 178°, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 5,0^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,70 (BEW 1), 0,69 (BPEW 1). – UV. (Äthanol): 269 (10300).

$\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6$ (413,43)	Ber. C 61,01	H 5,61	N 10,16%	Gef. C 61,06	H 5,66	N 10,11%
-----------------------------------------------------------	--------------	--------	----------	--------------	--------	----------

b) 4,0 g (13 mmol) **8** wurden mit 1,51 g (13 mmol) *N*-Äthylmorpholin und 2,54 g (14 mmol) Essigsäure-*p*-nitrophenylester in 40 ml DMF analog *a*) umgesetzt, aufgearbeitet und kristallisiert: 3,55 g (66%) **9**, Smp. 179–180°, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 4,7^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC. einheitlich, identisch mit *a*).

Ac · ala-Phe(NH₂) · OH (10). 0.83 g (2 mmol) **9** wurden in 12 ml abs. Methanol gelöst, mit 150 mg 10proz. Pd/C *Fluka*) versetzt und – wegen der Photosensibilität des entstehenden **10** – unter Lichtausschluss (bzw. unter Natriumdampfplicht) 2 Std. unter leicht erhöhtem Druck hydriert. Der Katalysator wurde über *Celite* abfiltriert, das Lösungsmittel i.V. eingengt und das Produkt mit Äther ausgefällt: 530 mg (90%) **10**, Smp. 204–205°, $[\alpha]_D^{25} = 67,0^\circ$ ($c = 0,5$, Äthanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,25 (BEW 1), 0,43 (EBPEW). – UV. (Äthanol): 240 (18400), 291 (1200).

C₁₄H₁₉N₃O₄ (293,32) Ber. C 57,33 H 6,53 N 14,33% Gef. C 57,18 H 6,43 N 14,11%

Ac · ala-Phe(NH₂, I₂) · OH (11). Zu 220 mg (0,8 mmol) **10** in 5 ml Eisessig wurden (ebenfalls unter Lichtausschluss bzw. Na-Licht) 520 mg (3,2 mmol) ICl (*Fluka*, prakt.) gegeben. Noch 20 Min. bei RT. wurde das Gemisch i.RV. zur Trockene eingedampft, der Rückstand mehrmals in Methanol aufgenommen und wieder eingedampft (Entfernung von Spuren von Essigsäure). Lösen in Chloroform, Ausfällen mit Petroläther, und Umkristallisieren aus Chloroform/Petroläther ergab 380 mg (87%) **11**, Smp. 228–229° (Zers.), $[\alpha]_D^{25} = 9,8^\circ$ ($c = 0,5$, DMF). DC. einheitlich: Rf(S) 0,51 (BPEW 1), 0,52 (BEW 1), 0,57 (EBPEW) – UV. (Äthanol): 305 (450).

C₁₄H₁₅I₂N₃O₄ Ber. C 30,85 H 3,14 N 7,71 I 46,56%
(545,12) Gef. „ 30,65 „ 3,03 „ 7,51 „ 46,32%

27 mg (50 μmol) **11** wurden in 1 ml DMF gelöst, mit je 25 mg 5proz. Pd/C und 5proz. Rh/CaCO₃ (*Engelhard*) versetzt und während 1 Std. bei leichtem Unterdruck (ca. 550 Torr) hydriert. Das Hydrierungsprodukt wurde im DC. mit **10** und **11** verglichen: etwa 90–95% des diiodierten **11** sind zu **10** reduziert worden.

Ac · ala-Pap(³H₂) · OH (12a). (Durchführung der Tritiierung ausschliesslich unter Natriumdampfplicht bzw. – bei heiklen Manipulationen – unter Glühlampenlicht) 33 mg (60 μmol) **11** wurden in 1 ml abs. DMF gelöst, unter Feuchtigkeitsausschluss mit je 30 mg Pd/C und Rh/CaCO₃ (wie oben) versetzt, das Reaktionsgefäss an die Tritiierapparatur [12] angeschlossen und mit 10 Ci Tritiumgas (98%) tritiert. Der Katalysator wurde über *Celite* abfiltriert, das DMF i.HV. verdampft und der Rückstand mehrmals in Methanol/Wasser aufgenommen und wieder eingedampft (Austausch lose gebundener Tritiumatome). Der trockene Rückstand (20,5 mg) wurde im DC. analysiert (UV. und Radioaktivität): 58% der Radioaktivität entfiel auf das 3',5'-ditritiierte **10** und 42% auf das 3',5'-Monojodo-monotritio-Analoge. Somit ergaben sich 11,9 mg **10** (Ausbeute: 67%); Rf(S) 0,19 in BEW 1) und 8,6 mg des monoiodierten Nebenproduktes Rf(S) 0,48 in BEW 1).

Das Gemisch der beiden tritierten Dipeptide wurde bei 0° in 200 μl 1N HCl gelöst, mit 6 mg (1,2 Äqu.) Natriumnitrit versetzt, 10 Min. bei 0° gerührt und entgast. Dann wurden 7 mg (1,4 Äqu.) Natriumazid hinzugefügt und das Gemisch während 30 Min. ebenfalls bei 0° reagieren gelassen. Dabei kristallisierte **12a** in feinen Nadelchen aus. Es wurde auf einer tarierten Nutsche abfiltriert, mit wenig eiskalter 0,01N HCl gewaschen und über KOH getrocknet: 4,1 mg (32% bezüglich Azidbildung; 21% bezüglich **11**) **12a**. Im DC. vollkommen einheitlich: Rf(S) 0,54 (BEW 1), 0,78 (BPEW 2). Spezifische Aktivität: 36 mCi/mg bzw. 11,1 Ci/mmol ± 5%. Das Produkt wurde in der Nutsche aufbewahrt und für den nächsten Schritt mit DMF herausgelöst.

Die spezifische Aktivität unmittelbar nach der Aufarbeitung der Tritiierung lag bei 126 mCi/mg ± 5%. Dies entspricht einer spezifischen Aktivität von 160 mCi/mg bzw. 53,8 Ci/mmol für das 3',5'-Ditritio-Analoge von **10**. Somit sind 2,5 Ci oder rund ein Viertel des angebotenen Tritiums in das Dipeptid eingebaut worden. Tritium-Wasserstoff-Austausch während der Azidbildung (1 Std. in 1N HCl): ~ 80%.

Ac · ala-Pap · OH (12b). Zu 98 mg (0,33 mmol) **10** in 1 ml 1N HCl wurden bei 0° 28 mg (0,40 mmol) NaNO₂ (*Merck*, puriss.) gegeben. Das Gemisch wurde 15 Min. gerührt, i.V. entgast, mit 32 mg (0,50 mmol) NaN₃ (*Fluka*, puriss.) versetzt und weitere 30 Min. bei 0° gerührt. Das ausgefallene **12b** wurde abfiltriert, mit 0,01N HCl gewaschen und über KOH getrocknet: 61 mg (58%), Smp. 176–177° (Zers.), $[\alpha]_D^{25} = 61,9^\circ$ ($c = 0,33$, Äthanol). (Eine Essigesterextraktion der wässrigen Phase ergab weitere 20 mg (20%) Produkt.) DC. einheitlich: Rf(S) 0,53 (BEW 1), 0,62 (EBPEW), 0,74 (BPEW 2). – UV. (Äthanol): 253 (12900).

C₁₄H₁₇N₅O₄ (319,32) Ber. C 52,66 H 5,37 N 21,93% Gef. C 52,44 H 5,18 N 21,68%

Z · Glu(OtBu)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(BOC)-Pro-Val · NH₂, HCl (15). 1057 mg (1 mmol) *Z · Glu(OtBu)-His-Phe-Arg-Trp-Gly · OH, HCl 13*, 650 mg (1,05 mmol) *H · Lys(BOC)-Pro-Val · NH₂*, TsOH (**14**) und 121 mg (1,05 mmol) *N*-Äthylmorpholin wurden in 15 ml DMF gelöst, mit 270 mg (2 mmol) HOBT und 227 mg (1,1 mmol) DCCI versetzt. Nach 36 Std. bei RT. wurde in die Kälte gestellt, das ausgefallene DCH abfiltriert und das DMF i.HV. verdampft. Der Rückstand wurde in Methanol gelöst, mit Äther ausgefällt, abzentrifugiert, mit Äther gewaschen, erneut in wenig Methanol gelöst und durch eine Sephadex-LH-20-Säule chromatographiert. Die sauberen Fraktionen wurden vereinigt, eingengt und das Produkt wieder mit Äther ausgefällt: 1360 mg (92%) festes, amorphes Produkt, $[\alpha]_D^{25} = -42,9^\circ$ ($c = 0,33$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,62 (BPEW 1), 0,65 (BPEW 2). – UV. (Methanol): 280 (5050), 289 (4270).

Aminosäuren-Analyse: Glu 1,05 His 0,96 Phe 1,01 Arg 1,05 Trp 0,87
Gly 1,02 Lys 1,04 Pro 1,06 Val 1,00 (Bezugswert)

H · Glu(OtBu)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(BOC)-Pro-Val · NH₂, 2HCl (16). 1333 mg (0,9 mmol) **15** in 20 ml 80proz. Essigsäure wurden über 300 mg 10proz. Pd/C (*Fluka*) 45 Min. im Durchfluss hydriert. Nach Filtration durch *Celite*, Verdampfen der Essigsäure i.V., mehrmaligem Aufnehmen in Methanol und Eindampfen wurde der ölige Rückstand erneut in 10 ml Methanol gelöst, mit 2,2 Äquiv. HCl versetzt, zur Trockene eingedampft und aus Methanol/Äther kristallisiert: 1190 mg (96%) **16**, $[\alpha]_D^{25} = -33,9^\circ$ ($c = 0,33$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,54 (BPEW 2), 0,57 (BPEW 1). – UV. (Methanol): 280 (5050), 289 (4270).

Aminosäuren-Analyse: Glu 1,08 His 0,98 Phe 0,99 Arg 1,03 Trp 0,89
Gly 1,00 Lys 1,05 Pro 1,05 Val 1,00 (Bezugswert)

Z · Ser-Nva · OMe (17). 4,78 g (20 mmol) *Z · Ser · OH*, 3,33 g (20 mmol) *H · Nva · OMe*, HCl (Smp. 109–110°; $[\alpha]_D^{25} = 21,2^\circ$ ($c = 1$, MeOH); Rf(S) 0,56 (BEW 1)) und 2,30 g (20 mmol) *N*-Äthylmorpholin wurden in 50 ml abs. Pyridin gelöst, auf 0° gekühlt und mit 5,40 g (40 mmol) HOBT und 4,54 g (22 mmol) DCCI versetzt. Nach 2 Std. bei 0° wurde langsam auf RT. erwärmt und 15 Std. lang weitergeführt. Die gelbe Lösung wurde mit wenig Eisessig versetzt, abgekühlt, zur Abtrennung des ausgefallenen DCH durch eine Nutsche filtriert und eingedampft. Der Rückstand wurde in Essigester wie üblich aufgearbeitet. Kristallisation aus Essigester/Petroläther: 6,1 g (87%) **17**, Smp. 83–84°, $[\alpha]_D^{25} = -26,2^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,40 (CME), 0,67 (EPAW), 0,75 (BEW 2).

C₁₇H₂₄N₂O₆ (352,39) Ber. C 57,95 H 6,87 N 7,96% Gef. C 58,19 H 6,92 N 8,07%

Z · Ser-Nva · NHNH₂ (18). 1,59 g (4,5 mmol) **17** wurden in 25 ml Methanol gelöst und 0,80 ml (15 mmol) Hydrazinhydrat hinzugegeben. Nach 16 Std. Reaktion bei RT. wurde das ausgefallene **18** abgenutzt, mit Methanol und Äther gründlich gewaschen und über H₂SO₄ getrocknet: 1,40 g (88%), Smp. 227–228°, $[\alpha]_D^{25} = 6,0^\circ$ ($c = 0,5$, DMF). DC. einheitlich: Rf(S) 0,90 (EBPEW).

C₁₆H₂₄N₄O₅ (352,39) Ber. C 54,53 H 6,86 N 15,91% Gef. C 54,35 H 6,84 N 15,57%

Z · Ser-Nva-Glu(OtBu)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(BOC)-Pro-Val · NH₂, HCl (19). 88 mg (0,25 mmol) **18** wurden in 2 ml DMF suspendiert und mit 0,16 ml (0,62 mmol) 3,8*N* HCl in Dioxan versetzt, wobei sich das Hydrazid klar löste. Nach Abkühlen des Gefäßes auf –20° wurden 36 µl (0,3 mmol) *t*-Butylnitrit hinzugefügt und die Lösung 15 Min. bei –15° geführt. Daneben wurden 346 mg (0,25 mmol) **16** und 112 mg *Hünig*-Base in 1,5 ml DMF gelöst und langsam zum Gemisch getropft (Feuchtigkeitsausschluss, pH-Kontrolle). Nach 1 Std. bei –15° wurde langsam auf 0° erwärmt und die Lösung 16 Std. bei dieser Temp. belassen. Nun wurde das DMF i.HV. verdampft und das Produkt über Sephadex LH-20 gereinigt (Eluierungsmittel; DMF/Wasser 9:1). Die sauberen Fraktionen wurden vereinigt, das Eluierungsmittel i.HV. eingengt und das Produkt mit Äther ausgefällt: 363 mg (87%) **19**, Smp. 190–193°, $[\alpha]_D^{25} = -35,4^\circ$ ($c = 0,33$, AcOH). DC. einheitlich: Rf(S) 0,68 (BPEW 2), 0,70 (BPEW 1). – UV. (5proz. AcOH): 280 (5280), Schulter bei 289 (4400).

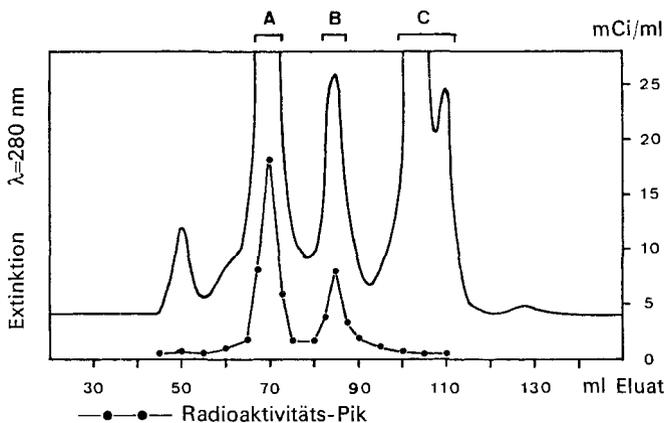
Aminosäuren-Analyse: Ser 0,94 Nva 0,98 Glu 1,06 His 0,96 Phe 1,02 Arg 1,03
Trp 0,86 Gly 1,01 Lys 1,03 Pro 1,04 Val 1,00 (Bezugswert)

H · Ser-Nva-Glu(OtBu)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(BOC)-Pro-Val · NH₂, 2HCl (20). 333 mg (0,2 mmol) **19** in 6 ml 80proz. Essigsäure wurden über 60 mg 10proz. Pd/C (*Fluka*) 1 Std. im Durchfluss hydriert. Der Katalysator wurde über *Celite* abfiltriert, die Essigsäure i.V. verdampft,

der Rückstand 2× in Methanol/Wasser gelöst und wieder eingedampft und anschliessend in 30 ml DMF gelöst. Diese Lösung wurde mit 4 Äquiv. Pyridiniumchlorid versetzt und i.HV. wieder eingedampft. Kristallisation aus DMF/Äther: 251 mg (80%) **20**, Smp. 174–175°, $[\alpha]_D^{25} = -50,2^\circ$ ($c = 0,33$, 1N AcOH). DC. einheitlich: Rf(S) 0,51 (BPEW 2), 0,58 (BPEW 1). DE.: R(Arg) 0,42 (pH 3,6). – UV. (1N AcOH): 280 (5285), Schulter bei 289 (4500).

Aminosäuren-Analyse: Ser 0,93 Nva 0,99 Glu 1,05 His 0,95 Phe 0,99 Arg 1,03
Trp 0,82 Gly 1,02 Lys 1,04 Pro 1,05 Val 1,00 (Bezugswert)

Ac · ala-Pap(³H₂)-Ser-Nva-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val · NH₂, 2AcOH (22a). 4,1 mg (13 μmol; 148 mCi) **12a** wurden mit 2,5 ml DMF aus der Nutsche direkt in einen 5 ml Rundkolben ausgelöst und das Lösungsmittel i.HV. verdampft (sämtliche Arbeiten unter Na-Licht!). Der Rückstand wurde in 200 μl DMF aufgenommen, in welche man zuvor 16 mg (10 μmol) **20** und 1,1 mg (10 μmol) *N*-Äthylmorpholin eingewogen und gelöst hatte. Das Gemisch wurde bei 0° nacheinander mit 2,7 mg (20 μmol) HOBT und 4 mg (20 μmol) DCCI versetzt, einige Std. bei 0° und über Nacht bei RT. gerührt und dann direkt auf eine Sephadex-LH-20-Kolonnen (2×80 cm) aufgetragen, wobei gleichzeitig der DCH durch Wattefiltration (in Pasteurpipette) entfernt wurde. Das Produkt wurde mit DMF/Wasser 9:1 eluiert: Eluierungskurve s. Figur. Die sauberen Fraktionen wurden vereinigt und i. HV. eingedampft. Das überschüssige **12a** (ca. 1,2 mg; 44 mCi) wurde



Eluierungsprofil der Chromatographie von 21a auf Sephadex LH-20 (vgl. Text). A: reines 21a, B: zurückgewonnenes 12a, C: niedermolekulare Anteile (HOBT, DCH etc.)

zurückgewonnen (Aufbewahrung bei -196° in DMF/Wasser 9:1 mit 2% Äthanol). Das geschützte **21a** wurde in 1 ml 90proz. Trifluoressigsäure gelöst, 15 Min. bei RT. belassen und i. HV. eingedampft. Mehrmaliges Aufnehmen in Wasser/Methanol und Eindampfen entfernte Säurereste und tauschte unspezifisch gebundenes Tritium aus. Der Rückstand wurde in 2 ml 1proz. Essigsäure gelöst, die Lösung durch einen schwach basischen Ionentauscher (Ionentauscher II, *Merck*) filtriert und i.V. eingedampft: 15,1 mg (86%) **22a**, DC. völlig einheitlich: Rf(S) 0,33 (BPEW 1), 0,35 (BPEW 2). DE.: R(Arg) 0,57 (pH 3,6). – UV. (0,01N NaOH): 254 (17650), Schulter bei 380 (8900).

Aminosäuren-Analyse: Ala 1,03 Pap (nicht bestimmt) Ser 0,92 Nva 0,99 Glu 1,09
His 0,98 Phe 1,01 Arg 1,05 Trp 0,83 Gly 1,03 Lys 1,06
Pro 1,06 Val 1,00 (Bezugswert).

22a wurde in wenig 1proz. Essigsäure gelöst, mit Wasser (bidest.) und 0,5 ml Äthanol auf ein Totalvolumen von 25 ml gebracht und auf 25 Ampullen verteilt (Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff, -196°). Spezifische Aktivität: 6,2 mCi/mg bzw. 11,0 Ci/nmol $\pm 5\%$.

Ac · ala-Pap-Ser-Nva-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val · NH₂, 2HCl (22b). Die Lösung von 16 mg (50 μmol) **12b** und 58 mg (50 μmol) **20** in 1 ml DMF wurde zunächst mit 6 mg (50 μmol)

N-Äthylmorpholin und nach Abkühlen auf 0° mit 13,5 mg (100 μ mol) HOBT und 12 mg (60 μ mol) DCCI versetzt. Nach 3 Std. bei 0° liess man die Temp. über Nacht langsam auf 0° steigen und rührte noch 8 Std. weiter. Nach Entfernung des DCH wurde die Lösung auf einer Sephadex-LH-20-Säule (2,5 \times 100 cm, Eluierungsmittel: DMF/Wasser 9:1) chromatographiert, die sauberen Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel i.HV. verdampft. Rf(S) des geschützten Tridecapeptid-Derivates **21b**: 0,73 (BPEW 1). Der Rückstand wurde in 5 ml 0,13N HCl/HCOOH gelöst, 15 Min. bei RT. belassen und die Säure i.V. wieder verdampft. Die vollständige Entfernung der Säure erfolgte durch mehrmaliges Aufnehmen in Wasser/Methanol und anschliessendem Verdampfen i.V. Der säurefreie Rückstand wurde in 4 ml DMF gelöst und mit Äther wieder ausgefällt: 68 mg (83%) **22b**, $[\alpha]_D^{25} = -65,3^\circ$ ($c = 0,33$, 1N AcOH). DC. einheitlich: Rf(S) 0,33 (BPEW 1), 0,35 (BPEW 2). DE.: R(Arg) = 0,57 (pH 3,6), UV. (0,01N NaOH): 254 (17300), Schulter bei 280 (9100).

Aminosäuren-Analyse: Ala 0,99 Pap (nicht bestimmt) Ser 0,95 Nva 1,01 Glu 1,06
His 0,96 Phc 0,99 Arg 1,04 Trp 0,82 Gly 1,05 Lys 1,02
Pro 1,06 Val 1,00 (Bezugswert).

Melanotrope Aktivitäten der Peptide **22a** und **22b** wurden mit dem modifizierten reflektometrischen Testsystem [9] nach *Shizume, Lerner & Fitzpatrick* [15] an der isolierten Haut des Leopardenfrosches *Rana pipiens* bestimmt.

Wir danken Herrn *Willy Hübscher* für ausgezeichnete technische Hilfe bei den Synthesen, Fräulein *Ruth Kuhn* für das Schreiben des Manuskriptes.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *E. Wünsch*, «Synthese von Peptiden», Bd. 15, *Houben-Weyl*, «Methoden der organischen Chemie», E. Müller, Herausgeber, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974.
- [2] *A. Eberle*, «Untersuchungen über die Organisation der Information in α -Melanotropin und Synthese von spezifisch markierten Analogen zur Rezeptorisolierung», Dissertation ETH 5735, Zürich 1976.
- [3] *P. Cuatrecasas*, Membrane Receptors, *Ann. Rev. Biochemistry* **43**, 169 (1974).
- [4] *U. Lang, G. Karlaganis, R. Vogel & E. Schwyzer*, *Biochemistry* **13**, 2626 (1974).
- [5] *J. Knowles*, *Accounts chem. Res.* **5**, 155 (1972).
- [6] *R. Schwyzer & M. Caviezel*, *Helv.* **54**, 1395 (1971).
- [7] *E. Escher & R. Schwyzer*, *FEBS Letters* **46**, 347 (1974).
- [8] *W. Fischli, M. Caviezel, A. Eberle, E. Escher & R. Schwyzer*, *Helv.* **59**, 878 (1976).
- [9] *A. Eberle & R. Schwyzer*, *Helv.* **58**, 1528 (1975); *idem*, *Clin. Endocrin.* **5**, Suppl. 41s (1976).
- [10] *R. Schwyzer & P. Sieber*, *Helv.* **41**, 2190 (1958); *B. J. Johnson & P. M. Jacobs*, *Chem. Commun.* **1968**, 73.
- [11] *D. E. Brundish & R. Wade*, *J. chem. Soc. Perkin I* **1973**, 2875.
- [12] *R. Schwyzer & G. Karlaganis*, *Liebigs Ann. Chem.* **1973**, 1298.
- [13] *F. F. Wong*, *J. Chromatogr.* **59**, 448 (1971); *G. Toennies & J. J. Kolb*, *Analyt. Chemistry* **23**, 823 (1951).
- [14] *F. Bergel & J. A. Stock*, *J. chem. Soc.* **1959**, 90.
- [15] *K. Shizume, A. B. Lerner & T. B. Fitzpatrick*, *Endocrinology* **54**, 553 (1954).