

285. Synthese von radioaktiv markierten Bromoacetyl- und Diazoacetyl- α -melanotropin-Derivaten zum Studium von kovalenten Hormon-Makromolekül-Komplexen¹⁾

von Alex Eberle, Willy Hübscher und Robert Schwyzer

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

(3.X.77)

Synthesis of radioactive α -melanotropin derivatives containing a bromoacetyl or diazoacetyl group for studies of covalent hormone-macromolecule complexes

Summary

α -Melanotropin derivatives and fragments covalently bound to human serum albumin through their *N*-terminal end exhibit almost the same biological activity as the corresponding free *N* ^{α} -acetylated peptides [6]. The preparation of such complexes requires derivatives with a 'reactive' *N*-terminal acetyl group. We describe here the synthesis of three α -melanotropin fragments and of two specifically tritiated α -melanotropin derivatives containing *N* ^{α} -bromoacetyl or *N* ^{α} -diazoacetyl groups: BrCH₂CO · Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val · NH₂, BrCH₂CO · Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly · OH, BrCH₂CO · Trp-Gly-Lys-Pro-Val · NH₂, BrCH₂CO · D-Ala-Tyr(³H₂)-Gly-Nva-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val · NH₂, and N₂=CHCO · Gly-Tyr(³H₂)-Ser-Nva-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val · NH₂. The latter two analogues displayed a specific radioactivity of about 20 and 36 Ci/mmol, and a biological activity of 2 · 10⁹ and 6 · 10⁹ U/mmol respectively. They are also being used for affinity and photoaffinity labelling of receptor molecules and antibody combining sites.

Einleitung. - Struktur-Wirkungs-Untersuchungen einer grossen Zahl von α -Melanotropin-(α -MSH)-Analogen und -Fragmenten haben einen recht guten

¹⁾ Der Ausdruck «Komplex» wird in diesem Zusammenhang, wie oft in der biochemischen Literatur, zur Bezeichnung künstlicher Verbindungen zwischen verschiedenen Proteinen und Peptiden verwendet (vgl. z. B. «Komplexantigen»). Nomenklatur und Abkürzungen vgl. [1]. Tyrosin-Derivate werden hier wie folgt abgekürzt: Tyr(I₂) = 3',5'-Dijod-tyrosin; Tyr(³H₂) = 3',5'-Ditritio-tyrosin. Kleinschreibung in der Dreibuchstaben-Abkürzung bedeutet D-Konfiguration. Weitere Abkürzungen: Ac = Acetyl; BOC = *t*-Butoxycarbonyl; DMF = N,N-Dimethylformamid; DCCI = N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid; DCH = N,N'-Dicyclohexylharnstoff; HOBT = 1-Hydroxybenzotriazol; MSOC = 2-(Methyl-sulfonyl)-äthoxycarbonyl; NP = 4-Nitrophenyl; TSE = 2-(4-Tolylsulfonyl)-1-hydroxy-äthan; Z = Benzylloxycarbonyl; i.V. = im Vakuum (ca. 10-20 Torr); HV. = «Hochvakuum» (ca. 0,1-0,01 Torr); RT. = Raumtemperatur.

Einblick in die Organisation der Information innerhalb dieses Tridecapeptides ermöglicht [2]. Es hat sich insbesondere gezeigt, dass für die Stimulierung der verschiedenen MSH-sensitiven Gewebe den einzelnen strukturellen Elementen des Hormons eine unterschiedliche Bedeutung zufällt [3]. So sind z. B. für die Auslösung der Dunkeladaptation der Froschhaut zwei Befehlssequenzen verantwortlich, die sowohl unabhängig als auch kooperativ die Wirkung auszulösen vermögen [4]. Dabei blieb es zunächst aber noch unklar, ob die Stimulierung durch diese Teilsequenzen über denselben Membranrezeptor verläuft wie beim natürlichen Hormon [5], oder ob eine Penetration dieser kleinen Peptide durch die Zellmembran notwendig ist. In der Folge zeigte es sich, dass an Albumin kovalent gebundene Hormonderivate und -Fragmente eine fast identische biologische Aktivität besitzen wie die entsprechenden freien Peptide, was beweist, dass die Wirkungsauslösung an der Membran zustande kommt [6].

Für biologische Experimente mit kovalenten Hormon-Protein-Komplexen werden Peptidderivate benötigt, die sich uniform über eine genau definierte Verknüpfungsstelle an das Protein ankondensieren lassen. Die für die biologische Aktivität wichtigen Sequenzteile sollten dabei möglichst nicht tangiert werden, d. h. im Fall von α -Melanotropin erfolgt die Verankerung am besten am *N*-terminalen Ende. Damit wird das Peptid maximal exponiert und kann somit leichter mit dem Rezeptor in Wechselwirkung treten. Als Kupplungsreaktion eignet sich besonders eine Alkylierung von Thiolgruppen entsprechend modifizierter Proteine durch Haloacetyl- oder Diazoacetyl-Peptidderivate. Solche «reaktive» Hormonanaloge lassen sich zudem als Affinitätsproben zur Markierung von Rezeptor- oder Antikörperbindungsstellen einsetzen und können deshalb als Antagonisten der natürlichen Hormone in Frage kommen [7]. Solche Bindungsstellen erfüllen keine katalytische Aufgabe, besitzen wahrscheinlich selten sehr nukleophile Gruppen und lassen sich deshalb durch Alkylierungsreagentien im Gegensatz zu *Enzyme Active Sites* (vgl. [8]) nur in Ausnahmefällen markieren. Doch gerade beim α -Melanotropin-Rezeptor von Melanophoren scheinen nukleophile Gruppen eventuell eine Rolle zu spielen [9]. Trotzdem bietet sich auch hier als breiter anwendbare Methode die Photoaffinitätsmarkierung an [10], weil dabei das Hormon erst nach der Assoziation mit seinem Rezeptor photolytisch aktiviert wird. In diesem Zusammenhang haben wir kürzlich die Synthese eines radioaktiven «Photoaffinitäts-Melanotropins» beschrieben [11]. Gegenwärtig ist eine vergleichende Studie der verschiedenen Markierungsmöglichkeiten des α -Melanotropin-Rezeptors in Bearbeitung.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Synthese von zwei radioaktiven α -Melanotropin-Analogen, deren *N*-terminale Acetylgruppe durch Bromacetyl bzw. Diazoacetyl ersetzt worden ist: [N^{α} -Bromacetyl-D-alanin¹, 3',5'-ditritio-L-tyrosin², glycyl³, L-norvalin⁴] α -melanotropin und [N^{α} -Diazoacetyl-glycyl¹, 3',5'-ditritio-L-tyrosin², L-norvalin⁴] α -melanotropin. Das zweite Derivat lässt sich analog dem [D-Alanin¹, 4'-azido-3',5'-ditritio-L-phenylalanin², L-norvalin⁴] α -melanotropin [11] für die Photoaffinitätsmarkierung einsetzen. Ferner wird die Synthese der drei nicht radioaktiven N^{α} -Bromacetyl- α -melanotropin-Fragmente (5-13)-Nonapeptid, (5-10)-Hexapeptid und (9-13)-Pentapeptid für die Herstellung von kovalenten Hormon-Protein-Komplexen beschrieben.

Synthese von [N^{α} -Bromacetyl-D-alanin¹, 3',5'-ditritio-L-tyrosin², glycin³, L-norvalin⁴] α -MSH, von seinem nicht radioaktiven Analogen sowie von N^{α} -Bromacetyl- α -MSH-(5-13)-nonapeptid, -(5-10)-hexapeptid und -(9-13)-pentapeptid (Schemata 1 und 2). - Zur Herstellung von kovalenten Hormon-Protein-Komplexen und vor allem auch zur (Photo-)Affinitätsmarkierung von Rezeptoren werden Peptidhormonderivate mit möglichst hoher spezifischer Radioaktivität benötigt. Wegen seiner langen Halbwertszeit und seines relativ geringen radiolytischen Schadens eignet sich als Nuklid für Hormone wie Adrenocorticotropin und α -Melanotropin besonders Tritium, das bisher in diese beiden Peptide entweder durch katalytische Reduktion einer Doppelbindung (Allylglycin \rightarrow 4,5-Ditritio-norvalin [12]) oder durch katalytischen Halogen-Tritiumaustausch [13] meist als letzter Syntheseschritt selektiv und in guter Ausbeute eingebaut worden ist. Sind nun aber gleichzeitig hydrierbare Affinitätsmarkergruppen anwesend, so muss die Tritiiierung einer geeigneten Präkursormolekel vor deren Einführung erfolgen, wie dies im Fall von [D-Alanin¹, 4'-azido-3',5'-ditritio-L-phenylalanin², L-norvalin⁴]- α -MSH am Beispiel des Dipeptides N^{α} -Acetyl-D-alanyl-[4'-amino-3',5'-dijodo]-L-phenylalanin geschah [11]. In der vorliegenden Synthese wurde Tyrosin(2) durch 3',5'-Dijodtyrosin(2) ersetzt, dieses sukzessiv in das Tridecapeptid eingebaut und nun - vor der Bromacetylierung - katalytisch tritiiert. Die Eigenschaften von 3',5'-Dijodtyrosin bei verschiedenen Kupplungsbedingungen und Schutzgruppen-Abspaltungen wurden zuvor anhand der Synthese von [D-Serin¹, 3',5'-dijodtyrosin²] α -MSH genau untersucht [2]. Dabei zeigte es sich, dass diese Aminosäure im Gegensatz zu Tyrosin auch mit ungeschützter Hydroxyl-Funktion keine Nebenreaktionen eingeht, weil die beiden ortho-ständigen Jodid-Substituenten eine *O*-Acylierung praktisch verunmöglichen.

Die Substitution der *N*-terminalen Acetylgruppe von α -MSH durch Bromacetyl bedingte einen Ersatz sowohl des Serin(1) durch D-Alanin(1) als auch des Methionin(4) durch Norvalin(4), und zwar zur Vermeidung interner Reaktionen der Bromacetylgruppe mit der Hydroxylfunktion des Serin(1) bzw. mit der Thioätherseitenkette des Methionin(4). Ferner wurde Serin(3) gegen Glycin(3) ausgetauscht, weil man sich dadurch für die *N*-terminalen Reste eine etwas erhöhte konformationelle Freiheit und damit einen grösseren «Aktionsradius» der Bromacetylgruppe bei der Affinitätsmarkierung erhoffte. Allerdings musste wegen dieser drei Substitutionen ein gewisser Verlust an biologischer Aktivität hingenommen werden.

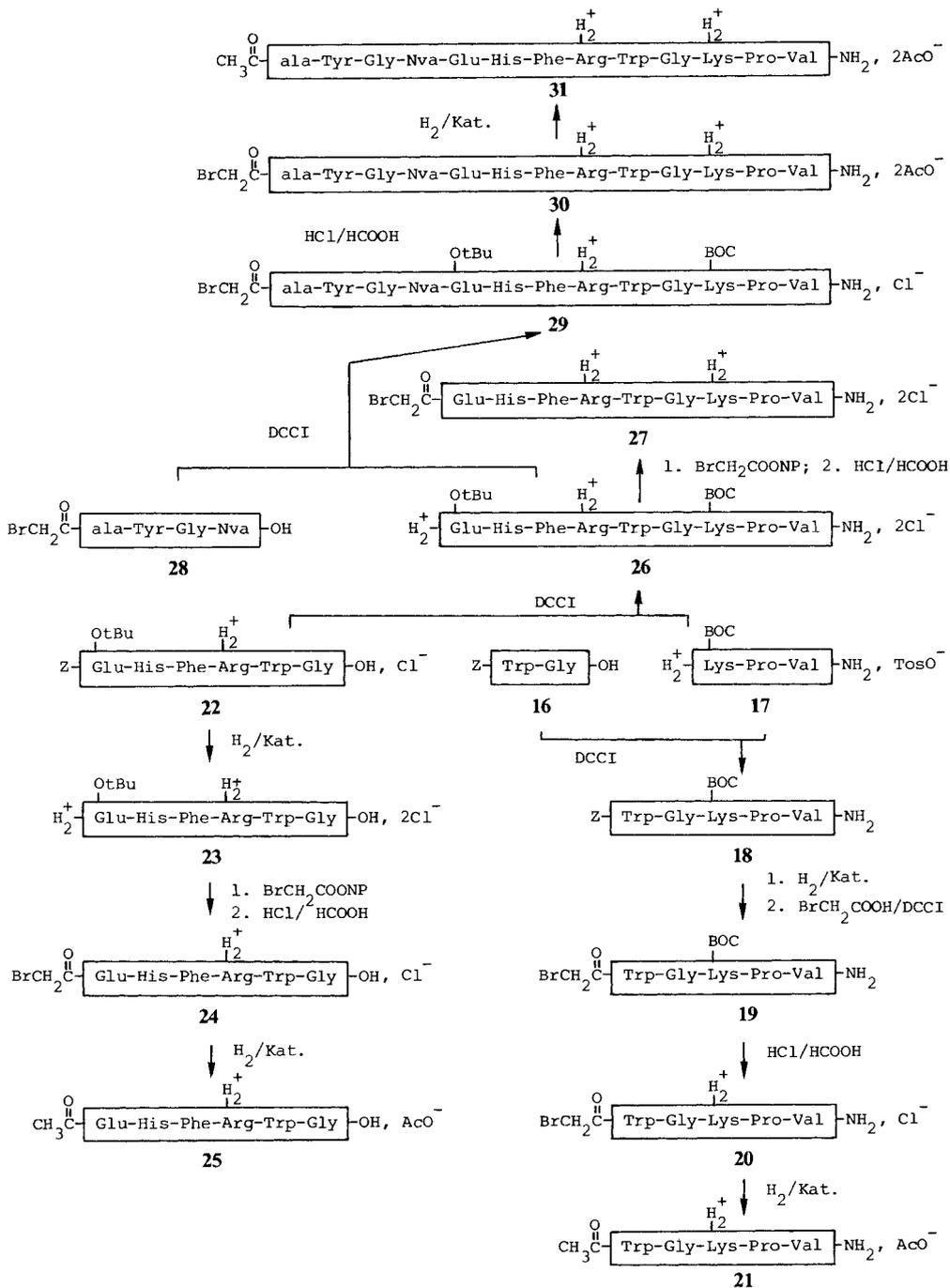
Die Synthese von [BrCH₂CO · ala¹, Tyr(³H₂)², Gly³, Nva⁴] α -MSH (15) ist in Schema 1 dargestellt. Seine geschützte Vorstufe 12 erhielt man durch Kondensation des Nonapeptidderivates 11 [14] mit dem *N*-terminalen Tetrapeptid BOC · ala-Tyr(I₂)-Gly-Nva · OH (10), dessen Aufbau schrittweise vom *C*-Terminus her erfolgte. Analog dem Glycin(10) bei früheren α -MSH-Synthesen [14] wurde die *C*-terminale Norvalin-Einheit mit 2-(4-Tolylsulfonyl)-1-hydroxy-äthan (TSE · OH) [15] geschützt und nun durch eine DCCI-Kupplung mit BOC · Gly · OH zum Dipeptid 3 verknüpft. In gleicher Weise wurde nach Entfernung der BOC-Schutzgruppe das reine, kristalline 4 durch DCCI/HOBT-Kondensationen [16] in hohen Ausbeuten und ohne eine Spur von Nebenproduktbildung über 7 und 8 zum geschützten Tetrapeptid 9 aufgebaut. Die Abspaltung der TSE-Gruppe verlief bei

pH 13 sehr rasch (~ 3 Minuten), während sie bei pH 11 etwa 2 Stunden dauerte, wobei die Endprodukte eine identische spezifische Drehung aufwiesen (→ keine Racemisierung). Die Synthese des analogen Tetrapeptides $\text{BrCH}_2\text{CO} \cdot \text{ala-Tyr-Gly-Nva} \cdot \text{OH}$ (**28**) (*Schema 2*) erfolgte im wesentlichen gleich und ist bei [2] im Detail beschrieben. Das geschützte Tridecapeptid **12** (*Schema 1*) wurde nach der Kondensation von **10** mit **11** durch Ausschusschromatographie auf Sephadex LH-20 gereinigt, mittels HCl/HCOOH seiner BOC- und *Or*Bu-Gruppen entledigt (**13**) und nun in einer Spezialapparatur [12] mit einem Gemisch von 5proz. Pd/C und 5proz. Rh/CaCO₃ [17] katalytisch tritiiert. Eine geringe Menge von nicht umgesetztem **13** konnte durch Chromatographie auf Sephadex LH-20 vom radioaktiven **14a** getrennt werden. Nach der Acetylierung der *N*^α-Aminofunktion durch Bromessigsäure-*p*-nitrophenylester wurde die MSOC-Schutzgruppe in 0,1*N* Ba(OH)₂ innerhalb 0,5–2 Minuten vollständig abgespalten. Unter diesen Bedingungen ist eine allfällige Substitution des Broms durch Hydroxylionen vernachlässigbar klein [18], was sowohl analytisch als auch durch Austesten der Reaktionsfähigkeit des Hormonderivates mit Thiolverbindungen nachgewiesen werden konnte. Die Endprodukte **15a** und **15b** wurden durch Chromatographie über Sephadex LH-20 in reiner Form isoliert (ein Reinigungsversuch auf *CM-Sephadex* C-25 brachte sehr grosse Verluste (~ 50%), wahrscheinlich durch kovalente Anheftung an den Träger). Die spezifische Aktivität des *α*-MSH-Derivates **15a** betrug 19,7 Ci/mmol bzw. 11,3 mCi/mg.

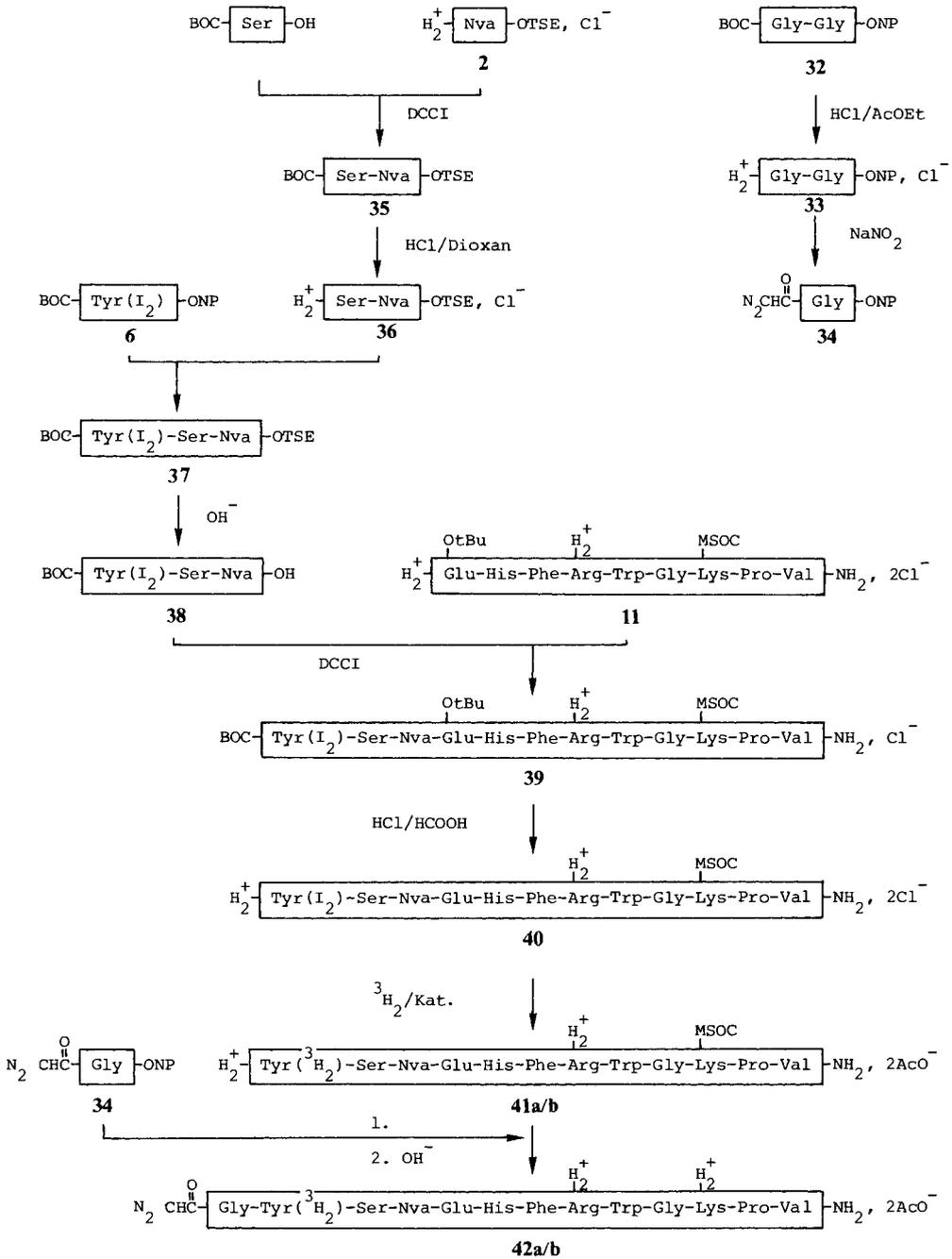
Die Synthese von $[\text{BrCH}_2\text{CO} \cdot \text{ala}^1, \text{Gly}^3, \text{Nva}^4]\alpha\text{-MSH}$ (**30**) und von den drei Fragmenten **20**, **24** und **27** mit Hilfe von säurelabilen Schutzgruppen für den Seitenkettenschutz wurde nach dem *Schema 2* vollzogen. Das geschützte Pentapeptid **18** erhielt man durch Kondensation von **16** mit **17**; nach Entfernung der Benzylloxycarbonyl-Schutzgruppe wurde es mit *p*-Nitrophenylbromoacetat in das geschützte, kristalline **19** überführt, dessen BOC-Schutzgruppe nun mit HCl/HCOOH abgespalten werden konnte. Zur Kontrolle des Endproduktes **20** wurde die Bromacetyl- durch katalytische Hydrierung in eine Acetylgruppe umgewandelt: **21** war identisch mit dem bereits früher auf einem anderen Weg hergestellten *α*-MSH-(9–13)-pentapeptid [14]. Ausgehend von **22** [19] gelangte man auf ähnliche Weise über **23** zu **24** und – ebenso problemlos – von **26** [11] zu **27**. Die Kondensation von **26** mit **28** ergab in hoher Ausbeute und Reinheit das geschützte Tridecapeptid **29**; Behandlung mit HCl/HCOOH lieferte zu 93% das Endprodukt **30**, das identisch war mit **15b**. Die biologische Aktivität betrug sowohl bei **15a** und **15b** als auch bei **30** $2 \cdot 10^9$ U/mmol und entsprach somit derjenigen von **31** [3]. Erste Experimente mit dem Bromacetyl-*α*-MSH-Derivat haben ergeben, dass dieses Peptid keinen irreversiblen Inhibitor von *α*-MSH darstellt. Doch bedarf es noch weiterer Experimente mit anderen Zellsystemen (Melanoma-Zellen, isolierten Melanozyten), um diese Frage endgültig beantworten zu können.

Synthese von $[\text{N}^\alpha\text{-Diazaoacetyl-glycin}^1, 3',5'\text{-Ditritio-L-tyrosin}^2, \text{L-norvalin}^4]\alpha\text{-MSH}$ und von seinem nicht radioaktiven Analogen (*Schema 3*). – Für die Synthese des Diazaoacetyl-*α*-MSH-Analogen wurde im Prinzip dieselbe Synthesestrategie und -taktik benutzt wie für das entsprechende Bromacetylderivat: a) möglichst späte Tritiierung (und damit möglichst wenig radioaktive Stufen) und b) selektive

Schema 2. Synthese von $BrCH_2CO\text{-ala-Tyr-Gly-Nva-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val}\cdot NH_2$ und drei Fragmenten mit Hilfe von säurelabilen Schutzgruppen für den Seitenkettenschutz



Schema 3. Synthese von $N_2\text{CHCO} \cdot \text{Gly-Tyr}(\text{}^3\text{H}_2)\text{-Ser-Nva-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val} \cdot \text{NH}_2$ und seinem nicht radioaktiven Analogen
 a: Tyr(3',5'-ditritio); b: Tyr(3',5'-dihydro)



Einführung der Affinitätsmarkiergruppen über einen aktiven Ester. Im Fall von Diazoacetat erwiesen sich aber sowohl der *p*-Nitrophenyl- [20] als auch der *N*-Hydroxysuccinimidester bei «normalen» Acylierungen als viel zu wenig reaktiv, obwohl sich der erste in speziellen Fällen ausgezeichnet geeignet hat, Enzymaktivitätszentren zu markieren [21]. Aus diesem Grund musste hier der *N*-terminale Rest als Diazoacetyl-Aminosäure-Aktivester in das zuvor radioaktiv markierte Derivat der Sequenz (2-13) eingeführt werden. Um Nebenreaktionen auszuschliessen, wurde das Serin (1) durch Glycin (1) ersetzt.

N^α-Diazoacetyl-glycin-[4-nitrophenyl]-ester (34) wurde durch Diazotierung von 33 in sauberer, kristalliner Form erhalten. Der Aufbau des Tripeptides 37 verlief problemlos über die Zwischenprodukte 35 und 36. Nach β-Eliminierung der TSE-Schutzgruppe liess sich das Endprodukt 38 aus Aceton/Wasser kristallisieren; es wurde nach der Methode von König & Geiger [16] mit dem Nonapeptidderivat 11 zum geschützten Tridecapeptid 39 kondensiert. Einwirkung von HCl/HCOOH ergab 40, das durch Chromatographie auf *CM-Sephadex* C-25 in reinster Form isoliert wurde. Die Tritiumierung erfolgte analog 14a mit 10 Ci Tritiumgas, was eine spezifische Aktivität des 41a (und des 42a) von 36 Ci/mmol ergab. Die Diazoacetyl- α -MSH-Derivate 42a und 42b erhielt man durch Reaktion von 34 mit 41a bzw. 41b und nachfolgender basischer Eliminierung der MSOC-Schutzgruppe. Die melantropische Aktivität (bei Normalbeleuchtung) betrug in beiden Fällen 4-6 · 10⁹ U/mmol; da hier wahrscheinlich eine partielle photolytische Zerstörung des Peptids wegen der Versuchsanordnung nicht zu vermeiden ist, dürfte die eigentliche Potenz des reinen Präparates noch etwas grösser sein.

Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt.

Experimenteller Teil

Allgemeines. Smp. wurden in offenen Kapillaren bestimmt und sind unkorrt. Die Elementaranalysen verdanken wir Herrn W. Manser, Laboratorium für organische Chemie der ETHZ. Die Aminosäureanalysen wurden im Laboratorium von Prof. Dr. H. Zuber durch Frau Z. Zanivan nach Stein & Moore auf Apparaten der Fa. Beckman, Modelle 120B und 121, ausgeführt. NMR.-Spektren (δ in ppm) wurden mit einem Varian T60 Spektrometer, IR.-Spektren ($\bar{\nu}$ in cm⁻¹) mit einem Beckman IR33, UV.-Spektren (λ_{\max} in nm, ϵ in Klammern) mit einem Beckman Acta V und die optischen Drehungen mit einem Perkin-Elmer 141 Polarimeter bestimmt. Zur Dünnschichtchromatographie (DC.) wurden Merck Silicagel-Platten und folgende Fließmittelsysteme verwendet: AC = Aceton/Chloroform 7:3 (v/v), BEW1 = 2-Butanol/Eisessig/Wasser 72:7:21, BEW2 = 1-Butanol/Eisessig/Wasser 67:10:23, BPEW1 = 1-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 50:12:12:25, BPEW2 = 1-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 42:24:4:30, CME = Chloroform/Methanol/Eisessig 95:5:3, CMP = Chloroform/Methanol/Pyridin 5:1:1, 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 Fa. Camag mit folgenden Puffersystemen durchgeführt: pH 1,6: Ameisensäure/Eisessig/Wasser 100:100:800 (v/v), pH 3,6: Eisessig/Pyridin/Wasser 100:10:890 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. KHSO₄-Lösung/5proz. K₂SO₄-Lösung 1:2), 5proz. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung, Trocknen der organischen Phase mit Natriumsulfat (wasserfrei) und Verdampfen der organischen Phase im Rotationsverdampfer (RV.) unter Wasserstrahlpumpen-Vakuum (V.).

BOC · Nva · OTSE (1). 37,2 g (171 mmol) *BOC · Nva · OH* [2] wurden zusammen mit 36,0 g (180 mmol) 1-Hydroxy-2-(4-tolylsulfonyl)-äthan [14] in 250 ml abs. Pyridin gelöst, bei 0° mit 37,1 g (180 mmol) DCCI (gelöst in 50 ml Pyridin) versetzt und 2 Std. bei 0° und 16 Std. bei RT. belassen. Der ausgefallene DCH wurde aus der kalten Lösung abfiltriert, das Pyridin i.V. verdampft und der Rückstand in Essigester wie üblich aufgearbeitet. Das ölige Produkt wurde in Äther gelöst, und unlösliche Nebenprodukte wurden abfiltriert. Nach Verdampfen des Äthers blieb ein farbloses Öl zurück, das nicht kristallisiert werden konnte. Ausbeute: 65,0 g (95%). $[\alpha]_D^{25} = -14,4^\circ$ ($c = 1,8$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,54 (Essigester), 0,63 (CME), 0,85 (CMP). - IR. (flüssig): 1140, 1320s (-SO₂-).

H · Nva · OTSE, HCl (2). 9,4 g (23,5 mmol) **1** wurden in 100 ml Essigester gelöst, mit 40 ml 4N HCl in Essigester versetzt und 30 Min. bei RT. und über Nacht bei 4° belassen, wobei das Produkt zum grössten Teil auskristallisierte. Vollständige Kristallisation durch Zugabe von Äther. Umkristallisation aus 2-Propanol/Diisopropyläther. Trocknen über NaOH. Ausbeute: 7,3 g (92%). Smp. 125-126°. $[\alpha]_D^{25} = 1,2^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,19 (CME), 0,69 (CMP). - IR. (Nujol): 1140, 1300s (-SO₂-).

C₁₄H₂₂ClNO₄S (335,84) Ber. C 50,07 H 6,60 N 4,17% Gef. C 49,97 H 6,68 N 4,09%

BOC · Gly-Nva · OTSE (3). 6,72 g (20 mmol) **2** und 3,50 g (20 mmol) *BOC · Gly · OH* [1] wurden zusammen mit 2,30 g (20 mmol) *N*-Äthylmorpholin in 40 ml abs. Pyridin gelöst, 4,13 g (22 mmol) DCCI hinzugefügt, der ausgefallene DCH nach 15 Std. abfiltriert, das Pyridin i.V. verdampft und der Rückstand in Essigester wie üblich aufgearbeitet. Es resultierte ein nicht kristallisierbares, farbloses Öl: 7,8 g (86%). $[\alpha]_D^{25} = -9,9^\circ$ ($c = 1,56$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,52 (CME), 0,74 (BPEW1), 0,80 (CMP). - IR. (flüssig): 1140, 1320s (-SO₂-).

H · Gly-Nva · OTSE, HCl (4). 3,90 g (8,5 mmol) **3** wurden in 60 ml Essigester gelöst, mit 20 ml 4N HCl in Essigester versetzt und eine halbe Std. bei RT. belassen. Nach Zugabe von Äther wurde das weisse Kristallinat abfiltriert und aus 2-Propanol/Diisopropyläther umkristallisiert: 3,1 g (92%). Smp. 147-148°. $[\alpha]_D^{25} = -16,2^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,40 (CME), 0,59 (BPEW1). - IR. (Nujol): 1140, 1300s (-SO₂-).

C₁₆H₂₅ClN₂O₅S (392,91) Ber. C 48,91 H 6,41 N 7,13% Gef. C 48,75 H 6,37 N 6,95%

BOC · Tyr(I₂) · OH (5). 35,63 g (76 mmol) 3',5'-Dijodtyrosin, 2 H₂O (*Fluka, purum*) wurden in 125 ml Wasser + 125 ml Dioxan suspendiert und nach der Methode von *Schnabel* [22] im Autotitrator bei pH 9,8 mit 11,90 g (83 mmol) *t*-Butoxycarbonylazid [23] und 4N NaOH umgesetzt. Nach 24 Std. wurde die Lösung 2mal mit 150 ml Äther extrahiert, i.RV. eingengt, auf pH 2 eingestellt und nun 3mal mit je 250 ml Essigester extrahiert. Nach Trocknen mit Natriumsulfat und Einengen der Lösung wurde das Produkt mit Petroläther ausgefällt und 2mal aus Essigester/Petroläther umkristallisiert: 30,5 g (70%). Smp. 165° (Zers.). $[\alpha]_D^{25} = 16,1^\circ$ ($c = 2$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,35 (CME). - UV. (Äthanol): 220 (15730), 288 (2850), Schulter bei 296 (2580). - NMR. (DMSO-d₆): 1,2/s (BOC); 2,8/m (CH₂); 4,0/m (CH); 7,0/d (NH); 7,6/s (Phenyl-Protonen).

C₁₄H₁₇I₂NO₅ Ber. C 31,54 H 3,21 N 2,63 I 47,61%
(533,10) Gef. ,, 31,69 ,, 3,31 ,, 2,73 ,, 47,61%

BOC · Tyr(I₂) · ONP (6). 5,33 g (10 mmol) **5** wurden in 20 ml abs. Pyridin gelöst und mit 3,40 g (10,5 mmol) Di-*p*-nitrophenylsulfid (hergestellt nach [24]) versetzt. Nach 16 Std. bei RT. wurde das Pyridin i.RV. abgedampft und das Produkt in 300 ml Essigester wie üblich aufgearbeitet. Kristallisation aus Äther: 4,91 g (75%). Smp. 102°. $[\alpha]_D^{25} = -16,9^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,70 (CME), 0,88 (BPEW1). - NMR. (DMSO-d₆): 1,2/s (BOC); 3,0/m (CH₂); 4,4/m (CH); 6,9/d (NH); 7,6/s (Phenyl-Protonen); 7,4-8,4 (4 Signale, AA', BB'-System der Phenyl-Protonen der *p*-Nitrophenylestergruppe).

C₂₀H₂₀I₂N₂O₇ Ber. C 36,72 H 3,08 I 38,80 N 4,28%
(654,20) Gef. ,, 36,58 ,, 3,15 ,, 38,77 ,, 4,17%

BOC · Tyr(I₂) · Gly-Nva · OTSE (7). Zu einer Suspension von 5,89 g (15 mmol) **4** und 7,99 g (15 mmol) **5** wurden bei 0° nacheinander 1,73 g (15 mmol) *N*-Äthylmorpholin, 4,05 g (30 mmol) HOBT und 3,40 g (16,5 mmol) DCCI gegeben. Das Gemisch wurde 3 Std. bei 0° und über Nacht bei RT. stehen gelassen, dann erneut auf 0° abgekühlt und der ausgefallene DCH abfiltriert. Das DMF wurde i.HV. verdampft und der Rückstand in Essigester wie üblich aufgearbeitet. Kristallisation aus 2-

Propanol/Diisopropyläther als weisser, amorpher Niederschlag: 9,10 g (70%). Smp. 92-94°. $[\alpha]_D^{25} = -12,4^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,48 (CME), 0,78 (AC), 0,82 (BPEW1).

$C_{30}H_{39}I_2N_3O_9S$	Ber. C 41,65	H 4,51	I 29,13	N 4,82%
(871,54)	Gef. „ 41,58	„ 4,55	„ 28,88	„ 4,74%

H-Tyr(I_2)-Gly-Nva · OTSE, HCl (8). 9,10 g (10,4 mmol) **7** wurden in 75 ml Essigester gelöst und mit 25 ml 4N HCl in Essigester versetzt, 30 Min. bei RT. belassen und über Nacht bei 4° aufbewahrt. Das weisse Kristallinat wurde nach Ausfällung mit Äther abfiltriert und über NaOH getrocknet. 7,13 g (85%). Smp. 184-185° (Zers.). $[\alpha]_D^{25} = 4,7^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,71 (BPEW1), 0,74 (CMP).

$C_{25}H_{32}ClI_2N_3O_7S$	Ber. C 37,16	H 3,99	I 31,42	N 5,20%
(807,88)	Gef. „ 37,01	„ 4,00	„ 31,38	„ 5,26%

BOC · ala-Tyr(I_2)-Gly-Nva · OTSE (9). 1,62 g (2 mmol) **8**, 0,38 g (2 mmol) BOC · ala · OH [2] und 0,23 g (2 mmol) *N*-Äthylmorpholin wurden in 10 ml DMF bei 0° gelöst, nacheinander mit 0,54 g (4 mmol) HOBT und 0,44 g (2,2 mmol) DCCI versetzt, 3 Std. bei 0° gehalten und über Nacht bei RT. belassen. Der ausgefallene DCH wurde abfiltriert, das DMF i.HV. abgedampft und der Rückstand wie üblich in Essigester aufgearbeitet und 2mal aus 2-Propanol/Diisopropyläther umkristallisiert: 1,50 g (80%). Smp. 152-154°. $[\alpha]_D^{25} = 5,4^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,56 (CME), 0,77 (BPEW1, CMP), 0,81 (AC). - IR. (Nujol): 1140, 1320s (-SO₂-).

Aminosäuren-Analyse: Ala 1,00; Gly 1,01; Nva 1,01; Tyr 1,00 (Bezugswert).

$C_{33}H_{46}I_2N_4O_{10}S$	Ber. C 41,96	H 4,91	I 26,87	N 5,93%
(944,63)	Gef. „ 41,87	„ 4,81	„ 26,85	„ 5,98%

BOC · ala-Tyr(I_2)-Gly-Nva · OH (10). 1,89 g (2 mmol) **9** wurden in 10 ml Wasser + 10 ml Dioxan suspendiert und durch Titration mit 0,2N NaOH im Autotitrator bei pH 11,5 einer β -Eliminierung der TSE-Gruppe unterworfen. Nach 2 Std. war die Abspaltung quantitativ (DC.-Kontrolle); NaOH-Verbrauch: 2 mmol. Die Lösung wurde mit Eis gekühlt, der pH auf 2,0 eingestellt und nun 3mal mit 150 ml Essigester extrahiert. Trocknen der organischen Phase mit Natriumsulfat, Einengen i.RV. und Ausfällen des Produktes mit Äther ergaben 0,95 g (65%). Smp. 166°. $[\alpha]_D^{25} = 10,6^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,13 (CME), 0,36 (CMP), 0,68 (BPEW1). - UV. (Methanol): 218 (10000), 282 (2500). - IR. (Nujol): Banden bei 1140 und 1320 fehlen.

Aminosäuren-Analyse: Ala 1,00; Gly 1,00; Nva 1,00 (Bezugswert); Tyr 1,01.

$C_{24}H_{34}I_2N_4O_8$	Ber. C 37,91	H 4,51	I 33,38	N 7,37%
(760,37)	Gef. „ 37,65	„ 4,61	„ 33,20	„ 7,18%

BOC · ala-Tyr(I_2)-Gly-Nva-Glu(OtBu)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(MSOC)-Pro-Val · NH₂, HCl (12). 560 mg (0,4 mmol) **11** [14] und 355 mg (0,44 mmol) **10** wurden in 15 ml abs. DMF gelöst und nacheinander mit 108 mg (0,8 mmol) HOBT und 103 mg (0,5 mmol) DCCI versetzt. Nach drei Tagen bei RT. wurde die Lösung auf 0° abgekühlt, der ausgefallene DCH abzentrifugiert und das DMF i.HV. verdampft. Der Rückstand wurde 2mal mit Chloroform verrieben, um niedermolekulare Anteile möglichst zu entfernen. Nach Trocknen i.V. resultierten 755 mg (88%) rohes **12**, das einzig in DMF löslich war. Es wurde deshalb durch Chromatographie auf Sephadex LH-20 mit DMF als Eluierungsmittel gereinigt. **12** fällt als amorpher Niederschlag aus DMF/Äther aus: 670 mg (78%). Smp. 225-230° (Zers.). $[\alpha]_D^{25} = -27,6^\circ$ ($c = 0,42$, 20proz. AcOH). DC. einheitlich: Rf(S) 0,56 (EBPEW), 0,68 (EPAW), 0,70 (BPEW2), 0,84 (BPEW1). - UV. (10proz. AcOH): 280,5 (6801).

Aminosäuren-Analyse: Ala 1,00 (Bezugswert); Tyr 1,06; Gly 2,09; Nva 0,99; Glu 1,06; His 1,04; Phe 1,03; Arg 1,06; Trp 0,95; Lys 1,00; Pro 0,99; Val 0,95.

$C_{87}H_{126}ClI_2N_{21}O_{22}S, 2 H_2O$	Ber. C 47,48	H 6,02	N 13,52%
(2175,41)	Gef. „ 47,29	„ 5,97	„ 13,39%

H-ala-Tyr(I_2)-Gly-Nva-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(MSOC)-Pro-Val · NH₂, 2 HCl (13). 230 mg (0,11 mmol) **12** wurden in 5 ml 0,12N HCl in HCOOH gelöst, die Lösung während 15 Min. bei RT. belassen und das Produkt durch Zugabe von Äther ausgefällt. Der amorphe Niederschlag wurde mehrmals in Äther suspendiert und wieder abzentrifugiert, um alle Säurereste vollständig zu entfernen. Nach Lyophilisierung aus verd. Essigsäure ergaben sich 185 mg (83%) rohes **13**, das analog **12** auf

Sephadex LH-20 weiter gereinigt wurde. Ausfällung als amorphes, weisses Pulver aus DMF/Äther: 150 mg (68%). Smp. 189-193°. $[\alpha]_D^{25} = -40,5^\circ$ ($c=0,4$, 10proz. AcOH). DC. einheitlich: Rf(S) 0,24 (EPAW), 0,33 (EBPEW), 0,51 (BPEW1). - UV. (10proz. AcOH): 280,5 (6833).

Aminosäuren-Analyse: Ala 1,02; Tyr 1,05; Gly 2,17; Nva 1,03; Glu 1,08; His 0,98; Phe 1,04; Arg 0,95; Trp 0,90; Lys 1,03; Pro 1,03; Val 1,00 (Bezugswert).

$C_{78}H_{111}Cl_2I_2N_{21}O_{20}S$ (2020,65) Ber. I 12,57% Gef. I 12,94%

H·ala-Tyr(³H₂)-Gly-Nva-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(MSOC)-Pro-Val·NH₂, 2 HCl (14a). 50 mg (25 μmol) **13** wurden unter leichtem Erwärmen in 1 ml abs. DMF gelöst. Gleichzeitig wurden je 50 mg 5proz. Pd/C und Rh/CaCO₃ (Engelhard) unter Feuchtigkeitsausschluss in das Reaktionsgefäss eingewogen, die Lösung unter N₂ hinzupipettiert und das Gefäss an die Tritiumapparatur [12] angeschlossen. Die Lösung wurde i.V. durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen vollständig entgast und nun mit 10 Ci Tritiumgas (98%) tritiiert (60 Min. bei RT., p~570 Torr; Details siehe bei [2]). Der Katalysator wurde über *Celite* abfiltriert, das DMF i.HV. verdampft und der Rückstand 4mal in DMF/Wasser aufgenommen und wieder eingedampft (Austausch lose gebundener Tritiumatome). Zur Reinigung wurde das rohe **14a** in 2,5 ml DMF/Wasser 9:1 gelöst und über eine *Sephadex*-LH-20-Kolonnen (2×80 cm) filtriert; Eluierungsdiagramm vgl. [2]. Die sauberen Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel i.HV. verdampft: 33,5 mg (76%). DC. einheitlich: Rf(S) 0,40 (BPEW2), 0,54 (BPEW1), identisch mit **14b**.

H·ala-Tyr-Gly-Nva-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(MSOC)-Pro-Val·NH₂, 2 HCl (14b). 182 mg (90 μmol) **13** wurden unter leichtem Erwärmen in 4 ml abs. DMF gelöst, unter Feuchtigkeitsausschluss mit je 120 mg Pd/C und Rh/CaCO₃ (wie oben) versetzt und in einer Hydrierapparatur während 90 Min. bei etwa 800 Torr und bei RT. hydriert. Der Katalysator wurde über *Celite* abfiltriert und das rohe **14b** auf einer *Sephadex*-LH-Kolonnen (3×100 cm) mit DMF/Wasser 9:1 chromatographiert. Die sauberen Fraktionen wurden vereinigt, i.RV. auf ein kleines Volumen eingengt, mit Wasser verdünnt, eingefroren und lyophilisiert. Ausbeute: 115 mg (72%). $[\alpha]_D^{25} = -47,0^\circ$ ($c=0,27$, 1N AcOH). DC. einheitlich: Rf(S) 0,40 (BPEW2), 0,54 (BPEW1). - UV. (1N AcOH): 280 (6750), Schulter bei 290 (5020).

Aminosäuren-Analyse: Ala 0,98; Tyr 0,98; Gly 2,11; Nva 1,00 (Bezugswert); Glu 1,02; His 0,98; Phe 0,90; Arg 1,06; Trp 0,82; Lys 0,96; Pro 1,08; Val 0,95.

BrCH₂CO·ala-Tyr(³H₂)-Gly-Nva-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val·NH₂, 2 AcOH (15a). 35 mg (20 μmol) **14a** und 2,3 mg (20 μmol) *N*-Äthylmorpholin wurden in 1,6 ml DMF gelöst, mit 9 mg (35 μmol) Bromessigsäure-*p*-nitrophenylester [2] versetzt und über Nacht bei RT. belassen. Die Lösung wurde auf eine *Sephadex*-LH-20-Kolonnen (2×80 cm) aufgetragen und das Produkt mit DMF eluiert (Eluierungsdiagramm vgl. [2]). Die DC.-einheitlichen Fraktionen wurden vereinigt und das DMF i.HV. verdampft; Ausbeute: 25 mg (71%). Zur Abspaltung der MSOC-Schutzgruppe wurden 12 mg davon innerhalb 60 Sek. in 1 ml 0,1N Ba(OH)₂ gelöst und die klare Lösung während 30 Sek. bei RT. belassen. (Die restlichen 13 mg des geschützten Zwischenproduktes wurden in 26 ml DMF+1 ml Äthanol gelöst, auf 27 Ampullen verteilt und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.) Nach Neutralisation mit 0,1N H₂SO₄ wurde das ausgefallene Bariumsulfat durch Filtration über *Celite* entfernt und der pH der Lösung mit 2N HCl auf etwa 5 eingestellt. Das Wasser wurde i.V. verdampft; Ausbeute: 7,0 mg (70%). DC. einheitlich: Rf(S) 0,40 (BPEW1), 0,50 (BPEW2). DE. einheitlich: R(Arg) 0,56 (pH 5,6). - UV. (0,1N NaOH): 280 (6850, Ber. 6800) Schulter bei 289 (6500, Ber. 6507); M_{Tyr}/M_{Trp} [14]=0,99.

Aminosäuren-Analyse: Ala 0,99; Tyr 0,93; Gly 1,95; Nva 1,00 (Bezugswert); Glu 1,09; His 0,91; Phe 0,99; Arg 1,00; Trp 0,72; Lys 1,03; Pro 1,02; Val 0,92.

15a wurde in 18 ml Wasser und 0,5 ml Äthanol gelöst und auf 18 Ampullen verteilt (Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff, -196°). Spezifische Aktivität: 11,3 mCi/mg bzw. 19,7 Ci/mml ± 5%.

BrCH₂CO·ala-Tyr-Gly-Nva-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val·NH₂, 2 AcOH (15b). 62 mg (35 μmol) **14b** wurden zusammen mit 4 mg (35 μmol) *N*-Äthylmorpholin gelöst, die Lösung mit 16 mg (62 μmol) Bromessigsäure-*p*-nitrophenylester [2] versetzt und über Nacht bei RT. belassen. Das DMF wurde i.HV. verdampft, der Rückstand mehrmals mit Essigester gründlich verrieben (Entfernung niedermolekularer Anteile) und im Exsikkator getrocknet. DC. nicht ganz einheitlich: Rf(S) 0,60 (BPEW1), 0,61 (BPEW2). Das feste, amorphe Produkt wurde in einem Zentrifugenglas innerhalb 1 Min. in 2 ml 0,1N Ba(OH)₂ gelöst (ca. 6facher Überschuss) und die klare Lösung nach weiteren 30 Sek.

mit 2 ml 0,1N H₂SO₄ neutralisiert (pH ~ 4,5). Das Bariumsulfat wurde abzentrifugiert, die wässrige Lösung auf 1 ml eingengt, mit 1 ml DMF verdünnt und über *Sephadex* LH-20 mit DMF/Wasser 1:1 chromatographiert. Lyophilisierung aus verd. Essigsäure. Ausbeute: 54 mg (85%). $[\alpha]_D^{25} = -54,6^\circ$ ($c = 0,17$, 1proz. AcOH). DC. einheitlich: Rf(S) 0,40 (BPEW1), 0,50 (BPEW2). DE. einheitlich: R(Arg) 0,56 (pH 5,6), 0,72 (pH 3,6), 0,80 (pH 1,6). - UV. (0,1N NaOH): 280 (6900), Schulter bei 289 (6500). $M_{Trp}/M_{Trp} = 0,92$.

Aminosäuren-Analyse: Ala 0,94; Tyr 0,95; Gly 1,99; Nva 1,00 (Bezugswert); Glu 0,92; His 1,03; Phe 0,93; Arg 0,92; Trp 0,92; Lys 0,99; Pro 1,03; Val 0,97.

C₈₀H₁₁₄BrN₂₁O₂₁ (1785,85) Ber. Br 4,47% Gef. Br 5,15%

Um die Reaktivität der Bromacetylgruppe von **15b** zu testen, wurden 1 mg in 50 µl 1N NaHCO₃ gelöst, worin man zuvor 0,1 mg Thioglykolsäure (*Fluka*, frisch destilliert) zugeben hatte, 20 Min. bei RT. belassen und dann im DC. und in der DE. mit **15b** verglichen: Rf(S) 0,35 (BPEW 1), 0,47 (BPEW 2); R(Arg) 0,51 (pH 5,6). Die deutlich tieferen Rf-Werte sind in Übereinstimmung mit der erhöhten Polarität am *N*-terminalen Ende durch die Einführung einer Carboxylgruppe.

Z · Trp · Gly · OH (**16**). 1,23 g (3 mmol) Z · Trp · Gly · OMe [25] wurden in 25 ml Dioxan gelöst, langsam mit 25 ml 0,2N NaOH versetzt und 8 Min. bei RT. belassen. Das Dioxan wurde i.RV. abdestilliert, die wässrige Phase auf pH 1 angesäuert und 3mal mit 150 ml Chloroform extrahiert. Trocknen der organischen Phase mit Natriumcarbonat und Kristallisation von **16** aus Methanol/Äther als amorphes Pulver ergaben 1,05 g (89%). Smp. 128-132°. $[\alpha]_D^{25} = -23,0^\circ$ ($c = 0,5$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,66 (BEW 1, BPEW 1).

C₂₁H₂₁N₃O₅ (395,42) Ber. C 63,79 H 5,35 N 10,63% Gef. C 63,66 H 5,37 N 10,42%

Z · Trp · Gly · Lys (BOC) · Pro · Val · NH₂ (**18**). 791 mg (2 mmol) **16**, 956 mg (2 mmol) **17** [26] und 230 mg (2 mmol) *N*-Äthylmorpholin wurden in 20 ml DMF gelöst und bei 0° mit 540 mg (4 mmol) HOBt und 455 mg (2,2 mmol) DCCI versetzt. Nach 3 Std. bei 0° und 16 Std. bei RT. wurde der ausgefallene DCH abfiltriert, das DMF i.HV. verdampft und der Rückstand in Chloroform wie üblich aufgearbeitet. Kristallisation aus Methanol/Äther ergab 1,49 g (91%). Smp. 121-124°. $[\alpha]_D^{25} = 46,5^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,70 (BEW 1), 0,77 (BPEW 1).

C₄₂H₅₈N₈O₉ (818,98) Ber. C 61,60 H 7,14 N 13,68% Gef. C 61,48 H 7,21 N 13,39%

BrCH₂CO · Trp · Gly · Lys (BOC) · Pro · Val · NH₂ (**19**). 819 mg (1 mmol) **18** wurden in 15 ml Methanol + 0,8 ml Eisessig gelöst und über Nacht mit 180 mg 10proz. Pd/C (*Fluka*) im Durchfluss hydriert. Nach Filtration über *Celite* und Verdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in wenig Äthanol gelöst, mit 1 mmol Pyridiniumchlorid versetzt und die Lösung i.RV. eingedampft. Der Rückstand wurde aus Methanol/Äther kristallisiert: 577 mg (80%). DC. einheitlich: Rf(S) 0,38 (BPEW 1). 577 mg (0,8 mmol) H · Trp · Gly · Lys (BOC) · Pro · Val · NH₂, HCl wurden zusammen mit 138 mg (1 mmol) Bromessigsäure (*Fluka*) und 92 mg (0,8 mmol) *N*-Äthylmorpholin in 8 ml DMF gelöst und mit 206 mg (1 mmol) DCCI versetzt. Nach 8 Std. bei RT. wurde der ausgefallene DCH aus der gekühlten Lösung abfiltriert, das DMF i.HV. verdampft und das Pentapeptidderivat **19** mehrmals aus Methanol/Äther als amorphes Pulver umgefällt. Ausbeute: 567 mg (88%). Smp. 130-133°. $[\alpha]_D^{25} = 36,4^\circ$ ($c = 0,5$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,69 (BEW 1), 0,75 (BPEW 1).

C₃₆H₅₃BrN₈O₈ Ber. C 53,66 H 6,63 Br 9,92 N 13,91%
(805,78) Gef. „ 53,72 „ 6,78 „ 9,80 „ 13,72%

BrCH₂CO · Trp · Gly · Lys · Pro · Val · NH₂, HCl (**20**). 343 mg (0,4 mmol) **19** wurden unter N₂ in 4 ml 0,12N HCl in HCOOH gelöst, 10 Min. bei RT. belassen, i.RV. wieder eingedampft, in verd. Essigsäure gelöst und lyophilisiert. Ausbeute: 288 mg (97%). $[\alpha]_D^{25} = -40,0^\circ$ ($c = 0,5$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,32 (BEW 1), 0,62 (BPEW 1).

Aminosäuren-Analyse: Trp 0,79; Gly 1,02; Lys 1,03; Pro 1,08; Val 1,00 (Bezugswert).

C₃₁H₄₆BrClN₈O₆ (742,12) Ber. Br 10,77% Gef. Br 10,58%

Ac · Trp · Gly · Lys · Pro · Val · NH₂, HCl (**21**, vgl. [14]). 15 mg (20 µmol) **20** wurden analog **19** in Methanol/Eisessig hydriert und nach Verdampfen des Lösungsmittels aus Methanol/Äther kristallisiert. Ausbeute: 12 mg (91%). DC. einheitlich: Rf(S) 0,48 (BPEW 1); identisch mit **25** aus [14].

$BrCH_2CO \cdot Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly \cdot OH, HCl$ (**24**). Die geschützten Hexapeptidderivate **22** und **23** wurden nach [19] hergestellt und waren analytisch rein [2]. 95 mg (0,1 mmol) **23** und 11,5 mg (0,1 mmol) *N*-Äthylmorpholin wurden in 1 ml DMF gelöst, mit 36 mg (0,14 mmol) *p*-Nitrophenylbromoacetat versetzt und 24 Std. bei RT. gerührt. Das DMF wurde i.HV. verdampft und der Rückstand mehrmals aus Methanol/Äther umgefällt: 90 mg (87%) weisses, amorphes **24**. $[\alpha]_D^{25} = 28,4^\circ$ ($c = 0,5$, 1N AcOH). DC. einheitlich: Rf(S) 0,36 (BPEW1), 0,40 (BPEW2).

Aminosäuren-Analyse: Glu 1,08; His 0,97; Phe 1,01; Arg 1,05; Trp 0,82; Gly 1,00 (Bezugswert).

$Ac \cdot Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly \cdot OH$ (**25**, vgl. [2]). 10 mg (10 μ mol) **24** wurden analog **21** katalytisch hydriert und nach der Aufarbeitung aus verd. Essigsäure lyophilisiert. Ausbeute: 9 mg (93%). $[\alpha]_D^{25} = 30^\circ$ ($c = 0,1$, 1N AcOH). DC. einheitlich: Rf(S) 0,34 (BPEW1), 0,38 (BPEW2); identisch mit **99** aus [2]. - UV. (0,1N NaOH): 280 (5520), 289 (5170).

Aminosäuren-Analyse: Glu 1,05; His 0,96; Phe 0,99; Arg 1,05; Trp 0,83; Gly 1,00 (Bezugswert).

$BrCH_2CO \cdot Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val \cdot NH_2, 2 HCl$ (**27**). 70 mg (50 μ mol) **26** [11] wurden analog **15b** mit 20 mg (75 μ mol) *p*-Nitrophenylbromoacetat und 6 mg (50 μ mol) *N*-Äthylmorpholin umgesetzt und aufgearbeitet. Nach Reinigung über *Sephadex* LH-20 (Eluierungsmittel: DMF/Wasser 9:1) wurden die BOC- und *Ot*Bu-Gruppen durch Einwirkung von 2 ml 0,12N HCl in HCOOH (20 Min.) abgespalten und das Produkt aus verd. Essigsäure lyophilisiert. Ausbeute: 55 mg (82%). $[\alpha]_D^{25} = -41,5^\circ$ ($c = 0,4$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,36 (BPEW1), 0,43 (BPEW2).

Aminosäuren-Analyse: Glu 1,11; His 0,96; Phe 0,97; Arg 0,99; Trp 0,80; Gly 1,03; Lys 1,05; Pro 1,09; Val 1,00 (Bezugswert).

$BrCH_2CO \cdot ala-Tyr-Gly-Nva-Glu(OtBu)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(BOC)-Pro-Val \cdot NH_2, HCl$ (**29**). 40 mg (75 μ mol) **28** [2] und 105 mg (75 μ mol) **26** [11] wurden in 2 ml abs. DMF gelöst, bei 0° nacheinander mit 9 mg (75 μ mol) *N*-Äthylmorpholin, 20 mg (150 μ mol) HOBT und 21 mg (100 μ mol) DCCI versetzt und 5 Std. bei 0° und 20 Std. bei RT. belassen. Nach Zugabe eines Tropfens Eisessig und Kühlung auf 0° wurde der ausgefallene DCH abfiltriert und das rohe **29** über *Sephadex* LH-20 (Eluierungsmittel: DMF/Wasser 9:1) chromatographiert. Die sauberen Fraktionen wurden vereinigt, eingengt und **29** mit Äther als weisser, amorpher Niederschlag ausgefällt. Ausbeute: 120 mg (86%). Smp. 162-165°. $[\alpha]_D^{25} = -23,2^\circ$ ($c = 0,25$, AcOH). DC. einheitlich: Rf(S) 0,68 (BPEW1, BPEW2). - UV. (1N AcOH): 275 (7440), Schulter bei 288 (5980).

Aminosäuren-Analyse: Ala 1,02; Tyr 1,01; Gly 2,07; Nva 0,98; Glu 1,09; His 0,95; Phe 0,99; Arg 1,04; Trp 0,88; Lys 0,99; Pro 0,98; Val 1,00 (Bezugswert).

$C_{85}H_{123}BrClN_{21}O_{19}$ (1858,41) Ber. Br 4,30% Gef. Br 4,10%

$BrCH_2CO \cdot ala-Tyr-Gly-Nva-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val \cdot NH_2, 2 AcOH$ (**30**). 111 mg (60 μ mol) **29** wurden in 3 ml 0,12N HCl/HCOOH gelöst und 15 Min. bei RT. belassen. Verdampfen der Säure i.V. und Austauschen der Chlorid- gegen Acetationen auf einer *Dowex*-3-Säule (0,8 \times 15 cm; Eluierungsmittel: 1proz. Essigsäure) ergaben 100 mg (93%). $[\alpha]_D^{25} = -52,3^\circ$ ($c = 0,15$, 1N AcOH). DC. einheitlich: Rf(S) 0,41 (BPEW1); identisch mit **15b**.

Aminosäuren-Analyse: Ala 0,95; Tyr 0,97; Gly 2,10; Nva 1,01; Glu 1,12; His 0,98; Phe 1,01; Arg 1,03; Trp 0,81; Lys 1,05; Pro 1,08; Val 1,00 (Bezugswert).

$Ac \cdot ala-Tyr-Gly-Nva-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val \cdot NH_2, 2 AcOH$ (**31**). 5 mg **30** wurden analog **14** mit 5 mg 10proz. Pd/C (*Engelhard*) in 1 ml DMF während 60 Min. hydriert, das DMF i.HV. verdampft, das Peptid in 1 ml 1N Essigsäure gelöst, über *Dowex* 3 (Eluierungsmittel: 1N Essigsäure) filtriert und lyophilisiert. DC. einheitlich: Rf(S) 0,36 (BPEW1).

$BOC \cdot Gly-Gly \cdot ONP$ (**32**). Durch Kondensation von BOC $\cdot Gly-Gly \cdot OH$ und *p*-Nitrophenol nach den üblichen Vorschriften [1] mittels DCCI wurde **32** aus Essigester/Pentan als weisses Kristallisat in 95% Ausbeute erhalten. Smp. 111-112°. DC. einheitlich: Rf(S) 0,49 (CME), 0,77 (BEW1), 0,79 (BEW2).

$C_{15}H_{19}N_3O_7$ (353,33) Ber. C 50,99 H 5,42 N 11,89% Gef. C 51,12 H 5,55 N 11,77%

$H \cdot Gly-Gly \cdot ONP, HCl$ (**33**). 353 mg (1 mmol) **32** wurden in 15 ml Essigester gelöst, mit 5 ml 4N HCl in Essigester versetzt, 30 Min. bei RT. aufbewahrt, i.RV. eingengt und mit Äther verdünnt.

Das kristalline **33** wurde abfiltriert und über KOH getrocknet. Ausbeute: 285 mg (98%). Smp. 160–161°. DC. einheitlich: 0,13 (BEW2), 0,18 (BEW1).

$C_{10}H_{12}ClN_3O_5$ (289,68) Ber. C 41,46 H 4,18 N 14,51% Gef. C 41,32 H 4,31 N 14,37%

$N_2CHCO \cdot Gly \cdot ONP$ (**34**). Wegen der Lichtempfindlichkeit und leichten Zersetzbarkeit von Diazoacetyl-glycin-(4-nitrophenyl)-ester wurden jeweils nur kleine Mengen kurz vor der Weiterverarbeitung wie folgt hergestellt: 145 mg (0,5 mmol) **33** wurden in 2,5 ml 2N Natriumacetatlösung gelöst, mit 0,25 ml Eisessig und bei 0° mit 69 mg (1 mmol) Natriumnitrit (*Merck*) versetzt. Nach 15 Min. bei 0° wurde das ausgefallene **34** abfiltriert, im Exsikkator über NaOH getrocknet und aus Chloroform/Äther kristallisiert. Ausbeute: 70 mg (53%). Smp. 106–108°. DC. einheitlich: Rf(S) 0,39 (CME), 0,85 (AC). - IR. (Nujol): 2100s ($-\text{CH}=\text{N}^+=\text{N}$).

$C_{10}H_8N_4O_5$ (264,20) Ber. C 45,46 H 3,05 N 21,21% Gef. C 45,19 H 3,30 N 19,90%

$BOC \cdot Ser \cdot Nva \cdot OTSE$ (**35**). Zu einer Lösung von 4,10 g (20 mmol) BOC · Ser · OH [22], 6,72 g (20 mmol) **2** und 2,30 g (20 mmol) *N*-Äthylmorpholin in 40 ml DMF wurden bei 0° nacheinander 5,40 g (40 mmol) HOBT und 4,53 g (22 mmol) DCCI (gelöst in je 15 ml DMF) gefügt. Die Lösung wurde 3 Std. bei 0° und 16 Std. bei RT. gehalten, der DCH abfiltriert, das DMF i.HV. verdampft und der Rückstand in 400 ml Essigester wie üblich aufgearbeitet. Nach Einengen des Essigesters wurde das Produkt mit Petroläther ausgefällt und 2mal aus Essigester/Petroläther umkristallisiert. Ausbeute: 8,0 g (82%). Smp. 102–103°. $[\alpha]_D^{25} = -17,3^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,24 (CME), 0,71 (BEW1), 0,73 (BEW2). - IR. (Nujol): 1120, 1310s ($-\text{SO}_2-$).

$C_{22}H_{34}N_2O_8S$ (486,54) Ber. C 54,31 H 7,04 N 5,76% Gef. C 54,32 H 7,08 N 5,82%

$H \cdot Ser \cdot Nva \cdot OTSE, HCl$ (**36**). 7,77 g (16 mmol) **35** wurden in 125 ml Essigester gelöst und mit 25 ml 6N HCl in Dioxan versetzt. Nach 30 Min. bei RT. wurden langsam 300 ml Äther hinzuge tropft und die Lösung zur Kristallisation für 2 Std. in die Kälte gestellt. Der schneeweiße Niederschlag wurde abfiltriert, mit Äther gründlich gewaschen, über NaOH getrocknet und aus 2-Propanol/Äther umkristallisiert. Ausbeute: 6,45 g (95%). Smp. 159–160°. $[\alpha]_D^{25} = -9,2^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,41 (BEW2), 0,43 (BEW2). - IR. (Nujol): 1140, 1320s ($-\text{SO}_2-$).

$C_{17}H_{27}ClN_2O_6S$ (422,93) Ber. C 48,28 H 6,46 N 6,62% Gef. C 48,20 H 6,42 N 6,44%

$BOC \cdot Tyr(I_2) \cdot Ser \cdot Nva \cdot OTSE$ (**37**). 4,23 g (10 mmol) **36** und 1,15 g (10 mmol) *N*-Äthylmorpholin wurden in 30 ml DMF gelöst, bei 10° gerührt und mit 6,54 g (10 mmol) **6** in 20 ml DMF tropfenweise versetzt. Nach einer Stunde bei 10° liess man während 24 Std. weiterreagieren. Das DMF wurde nun i.HV. verdampft, der Rückstand in 800 ml Essigester aufgenommen und wie üblich aufgearbeitet. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde das Produkt in 100 ml Methanol gelöst und durch ganz langsames Verdünnen mit Äther kristallisiert. Nach Filtration und Trocknen über Phosphorpentoxid war das Tripeptidderivat **37** in Methanol nur noch sehr schwer löslich. Ausbeute: 7,70 g (84%). Smp. 179° (Zers.). $[\alpha]_D^{25} = 7,4^\circ$ ($c = 1$, DMF). DC. einheitlich: Rf(S) 0,29 (CME), 0,75 (BEW2), 0,79 (BEW1). - IR. (Nujol): 1125, 1310s ($-\text{SO}_2-$).

$C_{31}H_{42}I_2N_3O_{10}S$ Ber. C 41,41 H 4,58 I 28,18 N 4,66%
(901,55) Gef. ,, 41,79 ,, 4,68 ,, 27,78 ,, 4,43%

$BOC \cdot Tyr(I_2) \cdot Ser \cdot Nva \cdot OH$ (**38**). 1,37 g (1,5 mmol) **37** wurden unter leichtem Erwärmen in 30 ml Dioxan gelöst und mit 30 ml Wasser verdünnt. Der pH wurde mit verd. NaOH-Lösung auf 12–13 eingestellt. Innerhalb 3 Min. wurden dann 1,5 ml 1N NaOH hinzuge tropft, wobei der pH immer zwischen 12 und 13 konstant gehalten wurde; nach einer weiteren Minute bei RT. wurde die Lösung in der Kälte mit 0,1N H_2SO_4 neutralisiert (DC.-Kontrolle ergab, dass die Reaktion nach 3 Min. zu 90% und nach 4 Min. quantitativ abgelaufen war). Die wässrige Phase wurde mit 5proz. K_2SO_4 -Lösung/5proz. $KHSO_4$ -Lösung 2:1 auf pH ~ 2 gebracht und sukzessiv mit 300 ml, 200 ml und 100 ml Essigester extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, i.RV. eingeengt und das Produkt mit Petroläther ausgefällt. Kristallisation aus Aceton/Wasser. Ausbeute: 1,02 g (95%). Smp. 154–155°. $[\alpha]_D^{25} = 10,2^\circ$ ($c = 1$, Methanol). DC. einheitlich: Rf(S) 0,07 (CME), 0,71 (BEW2), 0,73 (BEW1). - IR. (Nujol): Banden bei 1140 und 1320 fehlen.

Aminosäuren-Analyse: Tyr 0,95; Ser 0,92; Nva 1,00 (Bezugswert).

$C_{22}H_{31}I_2N_3O_8$ Ber. C 36,74 H 4,34 I 35,29 N 5,84%
(719,31) Gef. ,, 36,87 ,, 4,37 ,, 35,13 ,, 5,67%

BOC · Tyr(I₂)-Ser-Nva-Glu(OtBu)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(MSOC)-Pro-Val · NH₂, *HCl* (**39**). 700 mg (0,5 mmol) **11** [14] und 360 mg (0,5 mmol) **38** wurden in 8 ml abs. DMF gelöst, bei 0° mit 135 mg (1 mmol) HOBT und 125 mg (0,6 mmol) DCCI versetzt, während 2 Tagen bei RT. gerührt und nun analog **12** aufgearbeitet und gereinigt. Ausbeute: 850 mg (81%). Smp. 177–180°. $[\alpha]_D^{25} = -30,0^\circ$ ($c = 0,33$, 1N AcOH). DC. einheitlich: Rf(S) 0,66 (BPEW1), 0,77 (BPEW2). - UV. (1N AcOH): 280 (6995), Schulter bei 289 (6660).

Aminosäuren-Analyse: Tyr 1,05; Ser 0,90; Nva 1,01; Glu 1,10; His 0,95; Phe 0,99; Arg 1,08; Trp 0,82; Gly 1,02; Lys 1,04; Pro 0,98; Val 1,00 (Bezugswert).

H · Tyr(I₂)-Ser-Nva-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(MSOC)-Pro-Val · NH₂, *2 HCl* (**40**). 840 mg (0,4 mmol) **39** wurden in 15 ml 0,12N HCl/HCOOH gelöst, nach 15 Min. i.RV. eingengt und das Produkt mit abs. Äther ausgefällt. Trocknen über KOH und Lyophilisierung aus verd. Essigsäure ergaben 770 mg (97%). DC. nicht einheitlich (ca. 5–10% Nebenprodukte). Eine Chromatographie auf *Sephadex* LH-20 (Eluierungsmittel: DMF/Wasser 9:1) ergab keine Reinigung. Deshalb wurde das rohe **40** in verd. Essigsäure gelöst, auf eine *CM-Sephadex-C-25*-Säule (1,2 × 30 cm) aufgetragen und mit Ammoniumacetatpuffer pH 6,5 (linearer Gradient von 0,1–1,0M) eluiert (Eluierungsdiagramm vgl. [2]); Eluierungskonzentration für **40**: 1M. Lyophilisierung und Sublimierung des Ammoniumacetats bei 50° über Nacht. Zur Restentsalzung wurde das reine **40** über eine *Sephadex*-LH-20-Kolonnen filtriert (Eluierungsmittel: Methanol/Wasser 9:1) und erneut aus verd. Essigsäure lyophilisiert. Ausbeute: 510 mg (65%). $[\alpha]_D^{25} = -39,0^\circ$ ($c = 0,33$, 1N AcOH). DC. einheitlich: Rf(S) 0,45 (BPEW1), 0,62 (BPEW2). - UV. (1N AcOH): 280 (7500).

Aminosäuren-Analyse: Tyr 1,03; Ser 0,93; Nva 0,98; Glu 1,05; His 0,96; Phe 1,01; Arg 1,04; Trp 0,89; Gly 1,04; Lys 1,06; Pro 1,10; Val 1,00 (Bezugswert).

H · Tyr(³H₂)-Ser-Nva-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(MSOC)-Pro-Val · NH₂, *2 HCl* (**41a**). 30 mg (15 µmol) **40** wurden in 1 ml abs. DMF gelöst und analog **14a** mit je 30 mg Pd/C und Rh/CaCO₃ versetzt und mit 10 Ci Tritiumgas (98%) tritiert. Nach Aufarbeitung wurde der Rückstand zum Austausch lose gebundener Tritiumatome mehrmals in Wasser/Methanol aufgenommen, wieder eingedampft und anschließend in 1N Essigsäure über eine *Dowex-3*-Säule (1,2 × 20 cm) filtriert. Die Essigsäurelösung wurde i.V. verdampft und das Produkt im Exsikkator über NaOH getrocknet. Ausbeute: 21 mg (81%). DC. und DE. einheitlich: Rf(S) 0,42 (BPEW2), R(Arg) 0,58 (pH 3,6).

H · Tyr-Ser-Nva-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(MSOC)-Pro-Val · NH₂, *2 HCl* (**41b**). 120 mg (60 µmol) **40** wurden in 3 ml DMF gelöst und mit je 60 mg Pd/C und Rh/CaCO₃ wie **14b** 90 Min. katalytisch hydriert. Nach der Aufarbeitung wurde das Produkt in 1N Essigsäure über eine *Dowex-3*-Säule (1,2 × 30 cm) filtriert und dann lyophilisiert. Ausbeute: 94 mg (90%). $[\alpha]_D^{25} = -49,5^\circ$ ($c = 0,33$, 1N AcOH). DC. und DE. einheitlich: Rf(S) 0,41 (BPEW1), 0,42 (BPEW2), R(Arg) 0,58 (pH 3,6). - UV. (1N AcOH) 280 (6620), Schulter bei 289 (5070).

Aminosäuren-Analyse: Tyr 1,03; Ser 0,93; Nva 1,02; Glu 1,07; His 0,97; Phe 1,02; Arg 1,09; Trp 0,89; Gly 1,01; Lys 1,06; Pro 1,05; Val 1,00 (Bezugswert).

N₂=CHCO · Gly-Tyr(³H₂)-Ser-Nva-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val · NH₂, *2 HCl* (**42a**). 21 mg (12 µmol) **41a** wurden zusammen mit 1,4 mg (12 µmol) *N*-Äthylmorpholin in 0,4 ml abs. DMF gelöst, unter Ausschluss von Tages- oder Leuchtstoffröhrenlicht mit 5 mg (19 µmol) **34** versetzt, 36 Std. bei RT. belassen und auf einer *Sephadex*-LH-20-Säule (2 × 80 cm; Eluierungsmittel: DMF/Wasser 9:1; Fraktionensammler ohne UV.-Detektor!) chromatographiert. Die DC.-einheitlichen Fraktionen (Rf(S) 0,79 (BPEW2)) wurden vereinigt und i.HV. eingedampft; die MSOC-Schutzgruppe wurde nun durch Einwirkung von 1 ml 0,1N Ba(OH)₂ abgespalten (3 Min. bei RT.; vgl. **14a**). Ausbeute: 16,5 mg (80%). DC. und DE. einheitlich: Rf(S) 0,37 (BPEW1), 0,40 (BPEW2), R(Arg) 0,61 (pH 3,6). - UV. (0,1N NaOH): 280 (6100), Schulter bei 289 (4520).

Aminosäuren-Analyse: Tyr 1,03; Ser 0,92; Nva 0,98; Glu 1,07; His 0,93; Phe 1,02; Arg 0,99; Trp 0,89; Gly 2,08; Lys 1,00; Pro 1,04; Val 1,00 (Bezugswert).

42a wurde in 32 ml bidest. Wasser aufgenommen und unter Zusatz von 2proz. Äthanol auf 32 Ampullen verteilt und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Spezifische Aktivität: 21,1 mCi/mg bzw. 36 Ci/mmol ± 5%.

N₂=CHCO · Gly-Tyr-Ser-Nva-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val · NH₂, *2 HCl* (**42b**). 86 mg (50 µmol) **41b** wurden wie oben mit 6 mg (50 µmol) *N*-Äthylmorpholin und 20 mg (75 µmol) **34** in 1 ml

DMF umgesetzt und gereinigt. Abspaltung der MSOC-Schutzgruppe mit 2 ml 0,1N Ba(OH)₂ und Lyophilisierung aus Wasser ergaben 84 mg (80%). $[\alpha]_D^{25} = -66.6^\circ$ ($c=0.15$, 1N AcOH). DC. und DE. einheitlich: Rf(S) 0,37 (BPEW1), 0,40 (BPEW2), R(Arg) 0,61 (pH 3,6). - UV. (0,1N NaOH): 280 (6600), Schulter bei 289 (5080). - IR. (Nujol): 2060 ($-\text{CH}=\text{N}=\text{N}$).

Aminosäuren-Analyse: Tyr 1,00; Ser 0,91; Nva 1,01; Glu 1,08; His 0,95; Phe 1,01; Arg 1,05; Trp 0,88; Gly 2,04; Lys 1,02; Pro 1,03; Val 1,00 (Bezugswert).

Melanotrope Aktivitäten der Peptide **15a**, **15b**, **30**, **31**, **42a** und **42b** wurden mit dem modifizierten reflektometrischen Testsystem [4] nach *Shizume, Lerner & Fitzpatrick* [27] an der isolierten Haut des Leopardenfrosches *Rana pipiens* bestimmt.

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] *A. Eberle & R. Schwyzer*, 'Surface Membrane Receptors', Nato Advanced Study Institute Series, Bd. 10, R.A. Bradshaw et al., Herausgeber, Plenum Press, New York und London 1976.
- [4] *A. Eberle & R. Schwyzer*, *Helv.* 58, 1528 (1975); *Clin. Endocrin.* 5, Suppl., 41s (1976).
- [5] *V.M. Kriwaczek, A. Eberle, H.-J. Vollenweider & R. Schwyzer*, *Experientia* 33, 822 (1977).
- [6] *A. Eberle, V.M. Kriwaczek & R. Schwyzer*, *FEBS Letters* 80, 246 (1977).
- [7] *R. Walter, I.L. Schwartz, O. Hechter, T. Douša & P.L. Hoffman*, *Endocrinology* 91, 39 (1972).
- [8] *G.M. Hass & H. Neurath*, *Biochemistry* 10, 3535 (1971); *M. Ganguly & J. Warren*, *J. biol. Chemistry* 246, 3646 (1971); *J. Yariv, K.J. Wilson, J. Hildesheim & S. Blumberg*, *FEBS Letters* 15, 24 (1971).
- [9] *A.B. Lerner & Y. Takahashi*, *Recent Progr. Hormone Res.* 12, 303 (1956); *S.B. Horowitz*, *Exp. Cell Res.* 13, 400 (1957); *R.B. Potter & M.E. Hadley*, *Experientia* 26, 536 (1970).
- [10] *J. Knowles*, *Accounts chem. Res.* 5, 155 (1972).
- [11] *A. Eberle & R. Schwyzer*, *Helv.* 59, 2421 (1976).
- [12] *R. Schwyzer & G. Karlaganis*, *Liebigs Ann. Chem.* 1973, 1298.
- [13] *D.E. Brundish & R. Wade*, *Biochem. J.* 129, 23P (1972); *K. Nikolics, I. Teplán & K. Medzihradzsky*, *J. Labelled Compounds Radiopharm.* 12, 163 (1975).
- [14] *A. Eberle, J.-L. Fauchère, G.I. Tesser & R. Schwyzer*, *Helv.* 58, 2106 (1975).
- [15] *A.T. Kader & J.M. Stirling*, *J. chem. Soc.* 1964, 258.
- [16] *W. König & R. Geiger*, *Chem. Ber.* 103, 788 (1970).
- [17] *D.E. Brundish & R. Wade*, *J. chem. Soc. (Perkin I)* 1973, 2875.
- [18] *P. Petrenko-Kritschenko*, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 61, 845 (1928).
- [19] *R. Schwyzer & H. Kappeler*, *Helv.* 44, 1991 (1961).
- [20] *J. Frank & R. Schwyzer*, *Experientia* 26, 1207 (1970).
- [21] *Y. Stefanovsky & F.H. Westheimer*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 1132 (1973).
- [22] *E. Schnabel*, *Liebigs Ann. Chem.* 702, 188 (1967).
- [23] *L.A. Carpino*, *J. Amer. chem. Soc.* 79, 4427 (1957).
- [24] *B. Iselin, W. Rittel, P. Sieber & R. Schwyzer*, *Helv.* 40, 373 (1957).
- [25] *K. Hofmann, M.E. Woolner, G. Spühler & E.T. Schwartz*, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 1486 (1958); *H. Kappeler*, *Helv.* 44, 476 (1961).
- [26] *R. Schwyzer, A. Costopanagiotis & P. Sieber*, *Helv.* 46, 870 (1963).
- [27] *K. Shizume, A.B. Lerner & T.B. Fitzpatrick*, *Endocrinology* 54, 553 (1954).