

Notiz über die Synthese von N-terminalen Peptiden des 3,4-Dihydroxyphenylalanins

Von GÜNTER LOSSE, ALFRED BARTH und KLAUS JASCHE

Inhaltsübersicht

Durch Umsetzung von Phthalyl-DL-3,4-Dihydroxyphenylalanin mit DL-Aminosäure-äthylestern werden nach verschiedenen Syntheseverfahren N-terminale Peptide des 3,4-Dihydroxyphenylalanins dargestellt.

Während das 3,4-Dihydroxyphenylalanin selbst frei in pflanzlichem und tierischem Material¹⁾ vorkommt, konnten Peptide des DOPA bisher in der Natur noch nicht aufgefunden werden. Diese Aminosäure hat deshalb in der Peptidsynthese nur wenig Beachtung gefunden²⁾.

Für biochemische Untersuchungen³⁾ benötigten wir eine Reihe von DOPA-Peptiden, die wir ausgehend von N-Phthalyl-DL-DOPA, also unter Verzicht auf den Schutz der phenolischen Hydroxylgruppen und unter Anwendung der Methode der gemischten Anhydride, der aktivierten Ester

Tabelle 1

Ausbeuten an Phth-DL-DOPA-dipeptidestern nach verschiedenen Synthesemethoden

Phth-peptidester	POCl ₃ ⁴⁾ (Ausbeute%)	Dicyclohexyl- carbodiimid ⁵⁾ (Ausbeute %)	weitere Methoden (Ausbeute %)
Phth-DL-DOPA-GlyOEt	34,0	80,2	—
Phth-DL-DOPA-DL-AlaOEt	35,5	56,3	—
Phth-DL-DOPA-DL-LeuOEt	50,1	71,0	—
Phth-DL-DOPA-DL-PheOEt	51,5	81,3	47,7 (Diäthyl- cyanamid ⁶⁾)
Phth-DL-DOPA-DL-Phe-OH	—	—	62,6 (Thiophenyl- ester in Eisessig ⁷⁾)
Phth-DL-DOPA-DL-TyrOEt	59,7	84,8	—
Phth-DL-DOPA-DL-MetOEt	—	76,0	—
Phth-DL-DOPA-DL-MetOH	—	—	29,1 (Thiophenyl- ester in Eisessig ⁷⁾)

¹⁻⁷⁾ s. S. 33.

sowie mittels Dicyclohexylcarbodiimid und Diäthylcyanamid aufgebaut haben.

Aus den N-Phth-dipeptidestern wurden durch saure Hydrolyse die N-geschützten Peptide, hieraus die freien Peptide durch Entphthalylierung mittels Hydrazinhydrat gewonnen⁸⁾.

Tabelle 2
Charakteristik der DOPA-Peptide und -Peptidderivate

Phth-Peptid	Schmp.	R _T -Wert*)	Peptid	Schmp.	R _T -Wert*)
Phth-DL-DOPA-GlyOH	132–134°	0,68	DL-DOPA-GlyOH	232–235°	0,32
Phth-DL-DOPA-DL-AlaOH	—**)	0,83	DL-DOPA-DL-AlaOH	235–237°	0,42
Phth-DL-DOPA-DL-LeuOH	—	0,86	DL-DOPA-DL-LeuOH	233–236°	0,60
Phth-DL-DOPA-DL-PheOH	178–180°	0,82	DL-DOPA-DL-PheOH	275–276°	0,62
Phth-DL-DOPA-DL-TyrOH	—	0,74	DL-DOPA-DL-TyrOH	245–246°	0,49
Phth-DL-DOPA-DL-MetOH	210–214°	0,84	DL-DOPA-DL-MetOH	222–225°	0,52

*) Die R_T-Werte wurden in n-Propanol/Wasser (7:3) bei 22° auf Schleicher-Schüll-Papier 2043 b bestimmt. Entwicklung mit diazotierter Sulfanilsäure.

**) amorph.

Im Gegensatz zur Phthalylgruppe⁹⁾ verlief die Einführung des Cbo-¹⁰⁾ oder p-Nitro-Cbo-Restes¹¹⁾ als N-Schutzgruppe des Dihydroxyphenylalanins nur unter mäßigen Ausbeuten, da sich hier wie bei allen ähnlichen Operationen die leichte Autoxydierbarkeit dieser Aminosäure in alkalischer Lösung störend bemerkbar macht.

¹⁾ T. TORQUATI, Arch. d. Farmacol. sperim. **15**, 214 (1913); GUGGENHEIM, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **88**, 276 (1913); E. R. MILLER, J. biol. Chem. **44**, 481 (1920); H. SCHMALFUSS u. H. P. MÜLLER, Biochem. Z. **183**, 362 (1927); H. PRZIBRAM u. H. SCHMALFUSS, Biochem. Z. **187**, 467 (1927); I. LISS, Flora **151**, 351 (1961).

²⁾ S. LISSITZKI, M. ROQUES u. M. T. BENEVENT, Compt. rend. soc. biol. **151**, 352 (1957); J. O'NEILL, F. P. VEITCH u. T. WAGNER-JAUREGG, J. org. Chem. **21**, 363 (1956).

³⁾ G. LOSSE, A. BARTH u. W. LANGENBECK, Chem. Ber. **95**, 918 (1962).

⁴⁾ TH. WIELAND u. B. HEINKE, Liebigs Ann. Chem. **599**, 70 (1956).

⁵⁾ J. C. SHEEHAN, M. GOODMAN u. G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. **78**, 1367 (1956).

⁶⁾ G. LOSSE u. H. WEDDIGE, Liebigs Ann. Chem. **636**, 144 (1960).

⁷⁾ F. WEYGAND u. W. STEGLICH, Chem. Ber. **93**, 2983 (1960); F. WEYGAND u. J. KÄELICKE, Chem. Ber. **95**, 1031 (1962).

⁸⁾ J. C. SHEEHAN, D. W. CHAPMAN u. R. W. ROTH, J. Amer. chem. Soc. **74**, 3822 (1962).

⁹⁾ J. C. SHEEHAN u. V. S. FRANK, J. Amer. chem. Soc. **71**, 1856 (1949); D. A. KIDD u. F. E. KING, Nature (London) **162**, 776 (1948).

¹⁰⁾ M. BERGMANN u. L. ZERVAS, Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 1192 (1931).

¹¹⁾ F. H. CARPENTER u. D. T. GISH, J. Amer. chem. Soc. **74**, 3818 (1952); **75**, 950 (1953).

Beschreibung der Versuche

1. Darstellung der Ausgangsstoffe

a) Darstellung von DL-3,4-Dihydroxyphenylalanin

α) Di-3-acetoxy-4-methoxy-benzalglycinanhydrid. Die Verbindung wurde nach K. HIRAI¹²⁾ aus Vanillin und Glycinanhydrid¹³⁾ gewonnen. Ausbeute 73% d. Th., Schmp. 310–315° (Zers.).

β) DL-DOPA ließ sich hieraus in Abänderung der Vorschrift von C. R. HARRINGTON und W. McCARTNEY¹⁴⁾ darstellen: 222 g Di-3-acetoxy-4-methoxy-benzalglycinanhydrid, 110 g roter Phosphor, 2,3 kg Jodwasserstoffsäure ($D = 1,70$) wurden in einer Wasserstoffatmosphäre am Rückfluß erhitzt. Unter Schäumen begann nach kurzer Zeit die Entmethylierung, die äußerst stürmisch verlief. Das entstandene Methyljodid wurde abdestilliert und danach 8 Stunden am Rückfluß gekocht. Nach dem Erkalten mußte der rote Phosphor abgenutscht werden. Das dunkelrote Filtrat wurde im Vakuum unter Durchziehen von Wasserstoff eingedampft, wobei eine braunrote zähflüssige Masse hinterblieb. Diese mußte zur Beseitigung letzter Reste anhaftender Jodwasserstoffsäure in wenig Wasser gelöst und dann im Vakuum wieder unter Wasserstoffatmosphäre eingengt werden. Dieser Prozeß wurde nochmals wiederholt, dann der zähe Rückstand in etwa 250 ml destilliertem Wasser in der Wärme vorsichtig gelöst. Unter ständigem Rühren wurde sodann mit 40proz. Natronlauge bis zum pH 4,0–4,3 neutralisiert, bei dem das in wäßriger Lösung schwer lösliche DOPA auszufallen begann; geringe Mengen $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ schufen eine reduzierende Atmosphäre. Nach 2stündigem Stehen wurde das ausgefallene DOPA abgesaugt, mit wenig Eiswasser, Methanol und Äther nacheinander gewaschen. Das DL-3,4-Dihydroxyphenylalanin konnte so als fast farbloses und beständiges Produkt erhalten werden.

Das rohe DOPA wurde zur weiteren Reinigung aus Wasser umkristallisiert; um eine Autoxydation, die sich durch eine Dunkelfärbung der Lösung zeigte, auszuschließen, wurde stets soviel Dithionit zugegeben, daß die Lösung farblos blieb. Die kochende Lösung wurde von ungelösten Verunreinigungen abfiltriert und mit wenig Xylol überschichtet zur Kristallisation stehengelassen. Ausbeute: 73% d. Th.; Schmp. 265° (Zers.).

$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N}$ (197,1) ber.: C 54,85; H 5,58; N 7,11;
gef.: C 54,20; H 5,42; N 7,05.

b) N-Cbo-DL-3,4-Dihydroxyphenylalanin¹⁰⁾

3,0 g (0,015 Mol) DL-DOPA wurden in einem Dreihalskolben, der mit Rührer, Tropftrichter und einer Gaszuleitung versehen war, nach vollständiger Entfernung von Luft durch einen H_2 -Strom in 15 ml 2 n NaOH gelöst. Nach dem Kühlen der Lösung auf 0°C wurden im Verlauf von 1 Stunde 3 ml Cbo-chlorid¹⁵⁾ (0,02 Mol) gelöst in 5 ml Äther zu der schwach rot gefärbten alkalischen Lösung zugetropft. Danach wurde noch eine weitere Stunde bei 0°C und eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurde nach Abstellen des H_2 -Stromes die alkalische Lösung zur Beseitigung von überschüssigem Cbo-chlorid schnell ausgeäthert. Beim Ansäuern der alkalisch-wäßrigen Lösung mit halbkonzentrierter Salzsäure bis zur deutlich sauren Reaktion schied sich ein dunkelbraunes Öl ab.

¹²⁾ K. HIRAI, *Biochem. Z.* **114**, 70 (1921).

¹³⁾ E. FISCHER, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **39**, 2930 (1906).

¹⁴⁾ C. R. HARRINGTON u. W. McCARTNEY, *Biochem. J.* **21**, 855 (1927).

¹⁵⁾ A. C. FARTHING, *J. chem. Soc. (London)* **1950**, 3215.

Das ölige Cbo-DOPA wurde in Essigester aufgenommen, die Lösung mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum das Lösungsmittel abgedampft.

Ausbeute: 42% d. Th.

DCHA-Salz¹⁶⁾), Schmp. 153–154°.

$\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{N}_2$ (512,6) ber.: N 5,47; gef.: N 5,39.

c) N-p-Nitro-Cbo-DL-3,4-dihydroxyphenylalanin¹¹⁾ wurde analog aus 3,0 g DL-DOPA in 15 ml 2 n NaOH und 4,3 g p-Nitro-Cbo-chlorid¹⁸⁾ in 20 ml Dioxan unter Eiskühlung und im Wasserstoffstrom dargestellt. Ausbeute: 26,5% d. Th., Schmp. 146–148°. DCHA-Salz¹⁶⁾, Schmp. 116–118°.

$\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{O}_8\text{N}_3$ (557,6) ber.: N 7,54; gef.: N 7,70.

d) Phthalyl-DL-3,4-dihydroxyphenylalanin⁹⁾

6,0 g (0,03 Mol) DL-DOPA und 5,18 g (0,035 Mol) Phthalsäureanhydrid wurden gut durchmischt und unter Rühren im Ölbad auf 180–185° erhitzt. Unter Rotfärbung und Schäumen trat nach einiger Zeit Reaktion ein, die am Abdestillieren von Wasser erkenntlich war. Nach etwa 10 Minuten erstarrte das Reaktionsprodukt allmählich. Der Kolben wurde dann nach weiteren 5 Minuten aus dem Ölbad genommen. Nach mehrmaligem Auskochen des Kolbeninhalts mit Wasser wurde das zurückbleibende Phthalyl-DOPA in 25 ml 96proz. Alkohol in der Hitze gelöst und nach Filtration mit Wasser ausgefällt.

Ausbeute: 6,4 g, Schmp. 231–235°.

$\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{O}_6\text{N}$ (327,3) ber.: C 62,24; H 4,00; N 4,28;
gef.: C 61,92; H 4,08; N 4,26.

DCHA-Salz, Schmp. 220°.

$\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_6\text{N}_2 \cdot 2 \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (600,7) ber.: C 65,98; H 8,05; N 4,66;
gef.: C 65,87; H 7,98; N 4,95.

e) Phthalyl-DL-3,4-dihydroxyphenylalanin-äthylester

2,3 g (0,007 Mol) Phthalyl-DL-DOPA wurden in 100 ml absolutem Äthanol gelöst und 5 Minuten ein kräftiger HCl-Strom in diese Lösung eingeleitet. Dann wurde 4 Stunden am Rückfluß erhitzt. Im Vakuum bei 40° konnte anschließend der Alkohol abdestilliert werden. Es wurde darauf erneut mit äthanolischer Salzsäure 4 Stunden erhitzt. Zur Aufarbeitung wurde der Alkohol im Vakuum abgedampft und der Rückstand in Essigester aufgenommen. Nicht verestertes Phthalyl-DOPA ließ sich durch Ausschütteln mit Bicarbonat extrahieren. Die mit Wasser neutral gewaschene und mit Na_2SO_4 getrocknete Essigesterlösung hinterließ beim Eindampfen im Vakuum ein öliges Produkt, das in wenig absolutem Äther aufgenommen und in ungefähr 200 ml Petroläther gegossen wurde. Ausbeute: 32% d. Th., Schmp. 108–109°.

$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{O}_6\text{N}$ (355,4) ber.: C 64,22; H 4,82; N 3,94;
gef.: C 64,00; H 4,77; N 4,15.

¹⁶⁾ E. Klieger, E. Schröder u. H. GIBIAN, Liebigs Ann. Chem. **640**, 157 (1961).

¹⁷⁾ O. WALLACH, Liebigs Ann. Chem. **343**, 61 (1905).

¹⁸⁾ F. H. CARPENTER u. D. T. GISEH, J. Amer. chem. Soc. **74**, 3818 (1952).

f) Phthalyl-DL-3,4-dihydroxyphenylalanin-thiophenylester

Zu 3,27 g (0,01 Mol) Phthalyl-DL-DOPA, die zusammen mit 1,10 g = 1,21 ml (0,01 Mol) Thiophenol in 30 ml absolutem THF gelöst waren, wurden unter Eiskühlung 2,06 g (0,01 Mol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI)⁵⁾ gegeben. Bereits nach kurzer Zeit fiel der bei der Umsetzung sich bildende N,N'-Dicyclohexylharnstoff unlöslich aus. Nach 5stündiger Reaktion wurde vom ausgefallenen Harnstoff abfiltriert, dieser mit wenigen Millilitern THF ausgewaschen und das Filtrat im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 50 ml Essigester aufgenommen und mit verdünnter Essigsäure, Bicarbonatlösung und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der Lösung mit Na₂SO₄ und Einengen im Vakuum auf etwa 10 ml wurde der Phthalyl-DL-DOPA-thiophenylester mit Petroläther gefällt, wobei er nach einiger Zeit kristallin wurde.

Schmp. 151–153°.

C₂₃H₁₇O₅NS (419,5) ber.: C 65,86; H 4,09; N 3,34;
gef.: C 65,84; H 3,96; N 3,60.

2. Darstellung von Phthalyl-DL-3,4-DOPA-Peptiden

a) Nach der POCl₃-Methode⁴⁾ (allgemeine Vorschrift)

0,01 Mol Phthalyl-DL-DOPA wurden mit 0,01 Mol Aminosäureäthylester-hydrochlorid¹⁹⁾ in 35 ml absolutem THF und 25 ml absolutem Dimethylformamid (DMF) gelöst und zu der auf –15° gekühlten Lösung 0,03 Mol absolutes Triäthylamin unter Rühren gegeben. Zur gekühlten und vor Einwirkung von Luftfeuchtigkeit gut geschützten Reaktionsmischung wurden im Verlaufe von 40–60 Minuten 0,92 ml POCl₃ in 5 ml THF aus einem Tropftrichter ebenfalls unter gutem Rühren zugetropft. Danach wurde zweckmäßig noch eine weitere Stunde bei Zimmertemperatur gerührt.

Zur Aufarbeitung wurde zum Ansatz 20 ml H₂O gegeben; beim Abdampfen des THF und DMF im Vakuum hinterblieb ein Öl, das in 50 ml Essigester aufgenommen, mit Bicarbonat und Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet wurde. Nach Abdestillieren des Essigesters resultierte ein Öl, das durch mehrfaches Umfällen aus Essigester/Petroläther zur Kristallisation gebracht wurde.

b) Nach der Carbodiimid-Methode⁵⁾

0,01 Mol Phthalyl-DL-DOPA wurden in 35 ml absolutem Dioxan gelöst und danach 0,015 Mol Aminosäureäthylester zugegeben. Nach Zusatz von 0,01 Mol N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) fiel bald der sich bei der Reaktion bildende N,N'-Dicyclohexylharnstoff kristallin aus.

Nach 8stündigem Stehen und Abtrennung des Harnstoffes wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen und mit verdünntem HCl, Bicarbonatlösung und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der Essigesterphase und Einengen blieb der Phthalyl-dipeptidester ölig zurück und konnte durch Umfällen aus Essigester/Petroläther kristallin erhalten werden.

c) Nach dem Cyanamid-Verfahren⁶⁾

Zu einer Lösung von 0,005 Mol Phthalyl-DL-DOPA und 0,01 Mol Diäthylcyanamid²⁰⁾ in 30 ml absolutem Dioxan wurden im Verlaufe von 2 Stunden 0,005 Mol Aminosäure-

¹⁹⁾ E. FISCHER, Ber. dtsh. chem. Ges. **34**, 433 (1901).

²⁰⁾ O. WALLACH, Ber. dtsh. chem. Ges. **32**, 1872 (1899).

äthylester, verdünnt mit 5 ml absolutem Dioxan zugetropft. Die Mischung wurde auf 90° erhitzt und nach der Esterzugabe noch weitere 2 Stunden auf dieser Temperatur gehalten. Nach Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in wenig Essigester aufgenommen, mit verdünnter Salzsäure und Bicarbonatlösung gewaschen und nach dem Trocknen und Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum aus Essigester-Petroläther umkristallisiert.

d) Nach dem Thiophenylester-Eisessig-Verfahren⁷⁾

0,007 Mol Phthalyl-DOPA-thiophenylester wurden in 10 ml Eisessig unter Feuchtigkeitsausschluß im Ölbad auf 125° erhitzt und während des 2stündigen Erhitzens 0,07 Mol Aminosäure in 3 Portionen zugegeben. Nach dem Abkühlen mußten zur Aufarbeitung der Eisessig und das frei gewordene Thiophenol im Vakuum abdestilliert werden. Der Rückstand wurde mit Essigester versetzt und mit gesättigter Bicarbonatlösung behandelt, wobei die überschüssige Aminosäure und das entstandene Phthalylpeptid in Lösung ging. Die Essigesterschicht wurde mehrmals mit Wasser gewaschen und das Waschwasser mit der Bicarbonatlösung vereinigt und angesäuert. Durch Extrahieren mit Essigester konnte das ausgefallene Phthalylpeptid von der überschüssigen Aminosäure abgetrennt werden. Nach dem Trocknen der Essigesterlösung und anschließendem Abdampfen des Essigesters im Vakuum hinterblieb das Phthalyl-dipeptid, das nochmals aus Essigester umkristallisiert wurde.

e) Verseifung der Phthalyl-DL-DOPA-Dipeptidester (allgemeine Vorschrift)

0,005 Mol Phthalyl-dipeptidäthylester wurden zur Verseifung in 30 ml Aceton gelöst, 11 ml Wasser und 6 ml konz. HCl zugegeben und 2 Stunden auf dem Wasserbad am Rückfluß erhitzt. Danach wurde das Aceton im Vakuum aus der Mischung abdestilliert und das Verseifungsprodukt mit Essigester extrahiert. Die Essigesterphase wurde 5mal mit je 5 ml Bicarbonatlösung ausgeschüttet, um das bei der Verseifung entstandene Peptid herauszulösen, die wäßrigen Bicarbonatauszüge sofort angesäuert und wieder mit Essigester extrahiert. Nach Waschen der Essigesterlösung mit Wasser und Trocknen mit Natriumsulfat und Vertreiben des Essigesters im Vakuum hinterblieb ein öliges Produkt, das aus Essigester/Petroläther kristallisiert wurde.

Phth-DL-DOPA-GlyOH	Schmp. 132–134°	C ₁₉ H ₁₆ O ₇ N ₂ (384,4) ber.: N 7,29; gef.: N 7,29
Phth-DL-DOPA-DL-AlaOH		C ₂₀ H ₁₈ O ₇ N ₂ (398,4) ber.: N 7,03; gef.: N 7,10
Phth-DL-DOPA-DL-LeuOH		C ₂₃ H ₂₄ O ₇ N ₂ (440,5) ber.: N 6,36; gef.: N 6,20
Phth-DL-DOPA-DL-PheOH	Schmp. 178–180°	C ₂₆ H ₂₂ O ₇ N ₂ (474,5) ber.: N 5,90; gef.: N 6,22
Phth-DL-DOPA-DL-TyrOH		C ₂₆ H ₂₂ O ₈ N ₂ (490,5) ber.: N 5,71; gef.: N 5,49
Phth-DL-DOPA-DL-MetOH	Schmp. 210–214°	C ₂₂ H ₂₂ O ₇ N ₂ S (444,5) ber.: N 6,30; gef.: N 6,42

3. Entphthalylisierung zu den freien Peptiden

Die Abspaltung der N-Schutzgruppe aus dem Phthalyl-dipeptiden erfolgte nach J. C. SHEEHAN, G. W. CHAPMAN und D. W. ROTH⁸⁾.

DL-DOPA-GlyOH	Ausbeute 63% d. Th. Schmp. 232–235°	$C_{11}H_{14}O_5N_2$ (254,3) ber.: N 11,02; gef.: N 11,30
DL-DOPA-DL-AlaOH	Ausbeute 33% d. Th. Schmp. 235–237°	$C_{12}H_{16}O_5N_2$ (268,3) ber.: N 10,44; gef.: N 10,73
DL-DOPA-DL-LeuOH	Ausbeute 28% d. Th. Schmp. 233–236°	$C_{15}H_{22}O_5N_2$ (310,4) ber.: N 9,03; gef.: N 9,34
DL-DOPA-DL-PheOH	Ausbeute 16% d. Th. Schmp. 275–276°	$C_{18}H_{20}O_5N_2$ (344,4) ber.: N 8,13; gef.: N 8,42
DL-DOPA-DL-TyrOH	Ausbeute 18,5% d. Th. Schmp. 245–246°	$C_{18}H_{20}O_6N_2$ (360,4) ber.: N 7,77; gef.: N 7,75
DL-DOPA-DL-MetOH	Ausbeute 56% d. Th. Schmp. 222–225°	$C_{14}H_{20}O_5N_2S$ (328,4) ber.: N 8,53; gef.: N 8,86

Halle (Saale), Institut für Organische Chemie der Martin-Luther-Universität.

Bei der Redaktion eingegangen am 14. Dezember 1962.