

Die ^{13}C -NMR-Spektroskopie liefert somit als Ergebnis, daß von den mesomeren Grenzformen (1)–(4) des Ketens die Struktur (2) wesentlich zur Beschreibung des Grundzustandes beiträgt – in Übereinstimmung mit Messungen des molekularen g -Wertes und der paramagnetischen Suszeptibilität entlang der $\text{C}=\text{C}-\text{O}$ -Bindungsachse, wonach die $\text{C}-\text{O}$ -Bindung praktisch zylindrische Symmetrie besitzt^[6].

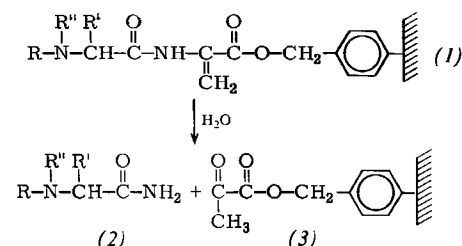
Eingegangen am 11. Mai 1973 [Z 851]

Festphasensynthese von Peptiden mit carboxyterminalen Amidgruppen – Thyrotropin-freisetzendes Hormon (TRF)^[**]

Von Erhard Gross, Kosaku Noda und Bruce Nisula^[*]

Herrn Professor Theodor Wieland zum 60. Geburtstag gewidmet

Die α,β -ungesättigte Aminosäure Dehydroalanin^[1] $\text{H}_2\text{C}=\text{CNHR}-\text{COOH}$, $\text{R}=\text{Acyl}$ oder Aminoacyl, kann auf verschiedene Weise zur Synthese von Peptiden an fester Phase^[4] herangezogen werden. Sie kann z.B. zur Verknüpfung des Peptids mit dem unlöslichen Träger dienen [siehe (1)] und/oder mit ihrem Stickstoff Amidgruppen bilden [siehe (2)]^[5]. Die letztere Reaktion läuft in saurer Lösung in Gegenwart von äquimolaren Mengen Wasser ab und wird dann durchgeführt, wenn die gewünschte Anzahl von Aminosäureresten der wachsenden Peptidkette hinzugefügt worden ist.



- (1a), $\text{R}=\text{Boc}$; $\text{R}'=\text{R}''=\text{H}$
 (1b), $\text{R}=\text{Boc-Leucylalanyl}$; $\text{R}'=\text{R}''=\text{H}$
 (1c), $\text{R}=\text{Boc}$; $\text{R}'-\text{R}''=-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
 (1d), $\text{R}=\text{Boc-Pyroglutamylhistidyl}$; $\text{R}'-\text{R}''=-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
 (2a), $\text{R}=\text{Leucylalanyl}$; $\text{R}'=\text{R}''=\text{H}$
 (2b), $\text{R}=\text{Pyroglutamylhistidyl}$; $\text{R}'-\text{R}''=-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$

Das Modellpeptid Leucylalanylglycinamid und das Thyrotropin-freisetzende Hormon (TRF oder TRH), Pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolinamid (L-5-Oxo-2-pyrrolidinylcarbonyl-L-histidyl-L-prolinamid)^[8,9], wurden synthetisiert, um das neue Verfahren zu prüfen.

Boc-Glycyldehydroalanin (Boc = tert.-Butyloxycarbonyl) [$\text{Fp}=157-159^\circ\text{C}$ (Zers.), $\lambda_{\text{max}}(\text{CH}_3\text{OH})=241\text{ nm}$ ($\epsilon=5560$); Gly 1.00, NH_3 1.03], in 84-proz. Ausbeute aus Boc-Glycyl-O-tosylserinmethylester durch β -Eliminierung hergestellt^[10], wurde an das chlormethylierte (1.25 mmol Cl/g) Copolymere aus Styrol und Divinylbenzol (2%)^[4]

in Dimethylformamid in Gegenwart von Triäthylamin (40°C ; 48 h) gekuppelt und gab das Peptidharz (1a) (0.41 mmol Boc-Dipeptid/g).

Das Boc-Leucylalanylglycyldehydroalaninharz (1b) wurde in zwei aufeinanderfolgenden Zyklen der Festphasensynthese^[4,11] (Boc-Schutz der Aminosäuren) und unter Einhaltung der in Tabelle 1 angegebenen Reaktionsbedingungen erhalten. Die Behandlung von (1b) in Gegenwart von 1 Äquivalent Wasser mit 1 N HCl in Eisessig (30 min, 50°C) resultierte a) in der Spaltung des Dehydroalaninrests unter Bildung des Amids (2a) und des Brenztraubensäureharzes (3); b) in der gleichzeitigen Entfernung der Boc-Schutzgruppe vom H_2N -Terminus.

Tabelle 1. Festphasensynthese der durch Dehydroalanin an den Träger gebundenen Peptide. Boc-Aminosäuren und DCC wurden in fünffachem Überschuß eingesetzt. Abkürzungen: TFA = Trifluoressigsäure; NEt_3 = Triäthylamin; Boc = tert.-Butyloxycarbonyl; DCC = Dicyclohexylcarbodiimid; EtOH = Äthanol, AA = Aminosäure.

Syntheseschritt	Zeit [min]
1. CH_2Cl_2 , Waschen ($4\times$)	1.5
2. 25% TFA- CH_2Cl_2 , Vorwaschen ($1\times$)	1.5
3. 25% TFA- CH_2Cl_2 , Schutzgruppenabspaltung ($1\times$)	30.0
4. CH_2Cl_2 , Waschen ($5\times$)	1.5
5. 10% NEt_3 - CH_2Cl_2 , Vorwaschen ($1\times$)	1.5
6. 10% NEt_3 - CH_2Cl_2 , Neutralisieren ($1\times$)	10.0
7. CH_2Cl_2 , Waschen ($5\times$)	1.5
8. Boc-AA- CH_2Cl_2 ($1\times$)	10.0
9. DCC- CH_2Cl_2 ($1\times$)	180.0
10. CH_2Cl_2 , Waschen ($3\times$)	1.5
11. EtOH, Waschen ($3\times$)	1.5

Leucylalanylglycinamid (2a) wurde durch Anreiben mit Äther verfestigt. Umkristallisieren aus Methanol/Äther gab ein Produkt (91% Ausbeute), das im Dünnschichtchromatogramm an Silicagel nur einen Fleck und die angegebenen R_f -Werte in den folgenden Lösungsmittelsystemen zeigte^[12]: A 0.14, B 0.62, C 0.35; Gly 1.00, Ala 0.98, Leu 1.00, NH_3 0.98. Die Elementaranalyse gab korrekte Werte.

Boc-Prolyldehydroalanin [$\text{Fp}=154-156^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{max}}(\text{CH}_3\text{OH})=240\text{ nm}$ ($\epsilon=5300$); Pro 1.00, NH_3 1.01], in 59-proz. Ausbeute aus Boc-Prolyl-O-tosylserinmethylester unter den Bedingungen der β -Eliminierung hergestellt^[10], wurde an das chlormethylierte (2.3 mmol Cl/g) Copolymere aus Styrol und Divinylbenzol (2%)^[4] unter den für (1a) angegebenen Bedingungen gekuppelt (25°C , 48 h) und gab das Boc-Prolyldehydroalaninharz (1c) (0.51 mmol Boc-Dipeptid/g).

Boc-Pyroglutamylhistidylprolyldehydroalaninharz (1d) wurde nach dem für (1b) angegebenen Verfahren unter Verwendung von Boc-geschützten Aminosäuren synthetisiert.

Pyroglutamylhistidylprolinamid (TRF) (2b) wurde nach Behandlung von (1d) mit 1 Äquivalent Wasser in 1 N HCl in Eisessig und Aufarbeitung gemäß (2a) isoliert. Eine geringfügige Verunreinigung wurde durch Verteilungschromatographie an Silicagel im Lösungsmittelsystem Chloroform/Methanol entfernt. Das gereinigte Tripeptidamid (TRF) zeigte im Dünnschichtchromatogramm jeweils nur einen Fleck und die angegebenen R_f -Werte in den folgenden Lösungsmittelsystemen^[12]: A 0.03, B 0.46, D 0.27, E 0.27; Glu 1.00, Pro 1.02, His 0.99, NH_3 1.00; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}=-45.1$ (c 0.25 Eisessig); Ausbeute 63%.

[*] Dr. E. Gross, Dr. K. Noda und Dr. B. Nisula
 Section on Molecular Structure
 Reproduction Research Branch
 National Institute of Child Health and Human Development
 National Institutes of Health
 Bethesda, Maryland 20014 (USA)

[**] Festphasensynthese mit α,β -ungesättigten Aminosäuren, 1. Mitteilung.

Die biologischen Aktivitäten von (2b) und einer Probe eines auf anderem Weg synthetisierten TRF^[13] (Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois) wurden im Mäuse-test verglichen^[14,15]. Die Wirkungsstärke wurde nach dem Verfahren von Brownlee^[16] abgeschätzt, die 95%-Vertrauensgrenzen (V.G.) nach Finney^[17] festgelegt. Ein Nanogramm des am Dehydroalaninharz synthetisierten TRF entsprach 1.2 Nanogramm (95% V. G. 0.67–2.20 ng) der Bezugssubstanz.

Eingegangen am 6. Juni 1973 [Z 861]

- [1] Dehydroalanin ist Bestandteil der natürlich vorkommenden hetero-
deten pentacyclischen Peptide Nisin [2] und Subtilin [3]; vgl. [2] und
[3] für Einzelheiten zur Chemie α,β -ungesättigter Aminosäuren.
[2] E. Gross u. J. L. Morell, J. Amer. Chem. Soc. 93, 4634 (1971).
[3] E. Gross, J. L. Morell u. L. C. Craig, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 62,
952 (1969).
[4] R. B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149 (1963).
[5] Eine Arbeitshypothese, die gegenwärtig geprüft wird, schreibt dem
Dehydroalanin eine analoge Rolle in der Biosynthese von Peptidaminen
zu [6,7].

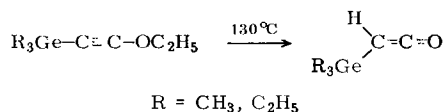
- [6] E. Gross in J. Meienhofer: Chemistry and Biology of Peptides;
Proceedings of the 3rd American Peptide Symposium. Ann Arbor
Science Publishers, Ann Arbor, Michigan, 1972, S. 671.
[7] R. S. Mecklenburg, K. Noda, Y. Miyachi, E. Gross u. M. B. Lipsett,
Endocrinology, im Druck.
[8] R. Burgus, T. F. Dunn, D. Desiderio u. R. Guillemin, C. R. Acad. Sci.
D269, 1870 (1969).
[9] C. Y. Bowers, A. V. Schally, F. Enzmann, J. Boler u. K. Folkers, Endo-
crinology 86, 1143 (1970).
[10] J. Photaki, J. Amer. Chem. Soc. 85, 1123 (1963).
[11] Alle Schritte der Festphasensynthese wurden in einem Beckman
Model 990 Peptide Synthesizer durchgeführt; Beckman Instruments, Inc.,
Spinco Division, Palo Alto, California.
[12] Lösungsmittelsysteme A) n-Butanol:Essig:Wasser=4:1:1; B)
n-Butanol:Essig:Pyridin:Wasser=15:3:10:12; C) n-Butanol:Pyridin
=2:1; D) Chloroform:Methanol=1:1; E) n-Butanol:Essig:Pyri-
din:Wasser=4:1:1:2.
[13] G. Flouret, J. Med. Chem. 13, 843 (1970).
[14] J. M. McKenzie, Endocrinology 63, 372 (1958).
[15] C. Y. Bowers, A. V. Schally, G. A. Reynolds u. W. D. Hawley, Endo-
crinology 81, 741 (1967).
[16] K. A. Brownlee: Statistical Theory and Methodology in Science
and Engineering. Wiley, New York 1960, S. 294.
[17] D. J. Finney: Statistical Methods in Biological Assay. Griffin,
London 1964, S. 370.

VERSAMMLUNGSBERICHTE

Silyl-, germyl- und stannyl- substituierte Ketene

Von S. V. Ponomarev^[*]

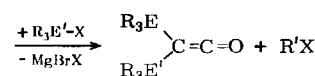
1965 wurde Trimethylsilylketen als erstes Ketten-Derivat,
in dem ein H-Atom durch ein Homologes von Kohlenstoff
ersetzt ist, synthetisiert^[1]. Bei der Untersuchung der Pyro-
lyse von Germyl- sowie Stannyl-alkoxyacetylenen unter-
schiedlich reagieren. So ergeben z. B. Germyl-äthoxyacety-
lene monosubstituierte Germylketene:



Hingegen entsteht bei der Pyrolyse von Trimethylstannyl-
äthoxyacetylen das Bis(trimethylstannyl)keten.

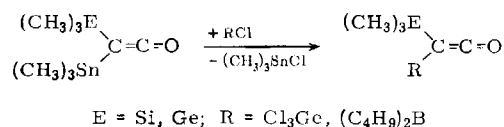
Wir haben eine variationsfähige Methode zur Darstellung
solcher Bis(organoelement)-Derivate von Ketenen entwik-
kelt; hierbei wird Alkoxyacetylmagnesiumbromid mit

Trialkylzinn- oder Trialkylgermanium-halogenid im Über-
schuß umgesetzt^[2]:



E = E' = Ge, Sn; R = Me, Et, Pr; R' = Et, Bu
E = Si, E' = Ge, Sn;

Die Stannyl-germyl- oder Stannyl-silyl-ketene reagieren
leicht mit Germyl- und Borylhalogeniden; dabei wird die
Stannyl-Gruppe gegen Germyl- bzw. Boryl-Gruppen aus-
getauscht^[3].



[*] Doz. Dr. S. V. Ponomarev [**]
Chemische Fakultät der Moskauer Staatlichen Universität
Moskau B-234 (UdSSR)

[**] Zur Zeit Gastdozent am Lehrstuhl für Organische Chemie der
Universität, 46 Dortmund, Postfach 500.

Mit wäßrigem Dioxan lassen sich Bis(organoelement)kete-
ne in die entsprechende Essigsäure überführen^[4].