

Die  $^{13}\text{C}$ -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 C–C–O-Bindungssachse, wonach die C–O-Bindung praktisch zylindrische Symmetrie besitzt<sup>[6]</sup>.

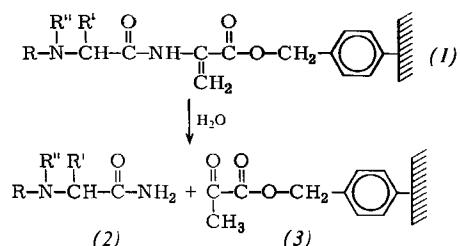
Eingegangen am 11. Mai 1973 [Z 851]

## Festphasensynthese von Peptiden mit carboxyterminalen Amidgruppen – Thyrotropin-freisetzendes Hormon (TRF)<sup>[\*\*]</sup>

Von *Erhard Gross, Kosaku Noda und Bruce Nisula* (†)

*Herrn Professor Theodor Wieland zum 60. Geburtstag gewidmet*

Die  $\alpha, \beta$ -ungesättigte Aminosäure Dehydroalanin<sup>[1]</sup>  $\text{H}_2\text{C}=\text{CNHR}-\text{COOH}$ , R=AcyI oder Aminoacyl, kann auf verschiedene Weise zur Synthese von Peptiden an fester Phase<sup>[4]</sup> 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)]<sup>[5]</sup>. 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), R = Boc; R' = R'' = H  
 (1b), R = Boc-Leucylalanyl; R' = R'' = H  
 (1c), R = Boc; R'-R'' = -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-  
 (1d), R = Boc-Pyroglutamylhistidyl; R'-R'' = -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-  
 (2a), R = Leucylalanyl; R' = R'' = H  
 (2b), R = Pyroglutamylhistidyl; R'-R'' = -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-

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

Boc-Glycyldehydroalanin (Boc = tert.-Butyloxycarbonyl) [Fp = 157–159 °C (Zers.),  $\lambda_{\text{max}}(\text{CH}_3\text{OH}) = 241 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 5560$ ); Gly 1.00, NH<sub>3</sub> 1.03], in 84-proz. Ausbeute aus Boc-Glycyl-*O*-tosylserinmethylester durch  $\beta$ -Eliminierung hergestellt<sup>[10]</sup>, wurde an das chlormethylierte (1.25 mmol Cl/g) Copolymeren aus Styrol und Divinylbenzol (2 %)<sup>[14]</sup>

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<sup>[4,11]</sup> (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<sub>2</sub>N-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<sub>3</sub> = Triäthylamin; Boc = tert-Butyloxycarbonyl; DCC = Dicyclohexylcarbodiimid; EtOH = Äthanol, AA = Aminosäure.

Syntheseschritt	Zeit [min]
1. $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Waschen (4 x)	1.5
2. 25% TFA— $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Vorwaschen (1 x)	1.5
3. 25% TFA— $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Schutzgruppenabspaltung (1 x)	30.0
4. $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Waschen (5 x)	1.5
5. 10% $\text{NEt}_3$ — $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Vorwaschen (1 x)	1.5
6. 10% $\text{NEt}_3$ — $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Neutralisieren (1 x)	10.0
7. $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Waschen (5 x)	1.5
8. Boc—AA— $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1 x)	10.0
9. DCC— $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1 x)	180.0
10. $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Waschen (3 x)	1.5
11. EtOH, Waschen (3 x)	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<sup>[12]</sup>: A 0.14, B 0.62, C 0.35; Gly 1.00, Ala 0.98, Leu 1.00, NH<sub>3</sub> 0.98. Die Elementaranalyse gab korrekte Werte.

Boc-Prolyldehydroalanin [ $F_p = 154-156^\circ C$ ;  $\lambda_{max}(\text{CH}_3\text{OH}) = 240 \text{ nm } (\epsilon = 5300)$ ; Pro 1.00,  $\text{NH}_3 1.01$ ], in 59-proz. Ausbeute aus Boc-Prolyl-*O*-tosylserinmethylester unter den Bedingungen der  $\beta$ -Eliminierung hergestellt<sup>[10]</sup>, wurde an das chlormethylierte (2.3 mmol Cl/g) Copolymeren aus Styrol und Divinylbenzol (2%)<sup>[4]</sup> 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<sub>f</sub>-Werte in den folgenden Lösungsmittelsystemen<sup>[1,2]</sup>: A 0.03, B 0.46, D 0.27, E 0.27; Glu 1.00, Pro 1.02, His 0.99, NH<sub>3</sub> 1.00;  $[\alpha]_D^{20} = -45.1$  (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  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Aminosäuren, 1. Mitteilung.

Die biologischen Aktivitäten von (2b) und einer Probe eines auf anderem Weg synthetisierten TRF<sup>[13]</sup> (Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois) wurden im Mäuse- test verglichen<sup>[14,15]</sup>. Die Wirkungsstärke wurde nach dem Verfahren von Brownlee<sup>[16]</sup> abgeschätzt, die 95%-Ver- trauensgrenzen (V.G.) nach Finney<sup>[17]</sup> 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 heterodeten pentacyclischen Peptide Nisin [2] und Subtilin [3]; vgl. [2] und [3] für Einzelheiten zur Chemie  $\alpha, \beta$ -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 Peptidamiden 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. D 269, 1870 (1969).

[9] C. Y. Bowers, A. V. Schally, F. Enzmann, J. Boler u. K. Folkers, Endocrinology 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: Eisessig: Wasser = 4:1:1; B) n-Butanol: Eisessig: Pyridin: Wasser = 15:3:10:12; C) n-Butanol: Pyridin = 2:1; D) Chloroform: Methanol = 1:1; E) n-Butanol: Eisessig: Pyridin: 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, Endocrinology 81, 741 (1967).

[16] K. A. Brownlee: Statistical Theory and Methodology in Science and Engineering. Wiley, New York 1960, S. 294.

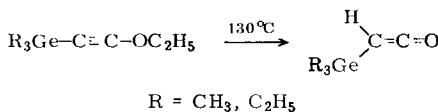
[17] D. J. Finney: Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, London 1964, S. 370.

## VERSAMMLUNGSBERICHTE

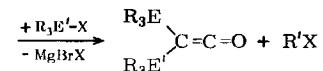
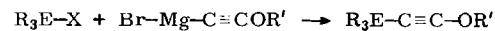
### Silyl-, germyl- und stannyl- substituierte Ketene

Von S. V. Ponomarev<sup>[\*]</sup>

1965 wurde Trimethylsilylketen als erstes Keten-Derivat, in dem ein H-Atom durch ein Homologes von Kohlenstoff ersetzt ist, synthetisiert<sup>[1]</sup>. Bei der Untersuchung der Pyrolyse von Germyl- sowie Stannyl-alkoxyacetylenen fanden wir, daß die Germyl- und Stannyl-Verbindungen unterschiedlich reagieren. So ergeben z. B. Germyl-äthoxyacetylene monosubstituierte Germylketene:

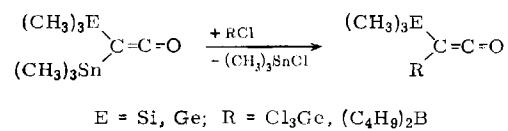


Trialkylzinn- oder Trialkylgermanium-halogenid im Überschuß umgesetzt<sup>[2]</sup>:



$\text{E} = \text{E}' = \text{Ge}, \text{Sn}$ ;  $\text{R} = \text{Me}, \text{Et}, \text{Pr}$ ;  $\text{R}' = \text{Et}, \text{Bu}$   
 $\text{E} = \text{Si}, \text{E}' = \text{Ge}, \text{Sn}$ ;

Die Stannyl-germyl- oder Stannyl-silyl-ketene reagieren leicht mit Germyl- und Borylhalogeniden; dabei wird die Stannyl-Gruppe gegen Germyl- bzw. Boryl-Gruppen ausgetauscht<sup>[3]</sup>.



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

Wir haben eine variationsfähige Methode zur Darstellung solcher Bis(organoelement)-Derivate von Keten entwickelt; hierbei wird Alkoxyacetyl-magnesiumbromid mit

[\*] 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)ketene in die entsprechende Essigsäure überführen<sup>[4]</sup>.