

180. Synthese eines Heptapeptides mit starker CRF-Wirkung¹⁾

von H. Kappeler und R. Schwyzter

(2. VI. 60)

Schon bei der Aufklärung der Struktur der Melanophoren-stimulierenden Hormone (α - und β -MSH) ist eine eigenartige Verwandschaft dieser beiden Verbindungen untereinander und mit dem Adrenocorticotropin (ACTH) aufgefallen²⁾. Sie besteht – vereinfacht ausgedrückt – in dem Vorkommen einer und derselben Sequenz von sieben Aminosäureresten in allen drei Hypophysenhormonen. Diese Verhältnisse sind im Schema 1 wiedergegeben.

Schema 1

ACTH	OH																		—OH
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	... 39			
α -MSH	OH																		—NH ₂
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13						
β -MSH ³⁾	OH																		—OH
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	

«gemeinsame Sequenz»

Auf die mögliche biologische Bedeutung dieser Sequenz für die adrenocorticotrope, bzw. Melanophoren-stimulierende Wirkung der Hormone wurde schon hingewiesen²⁾⁴⁾. Eine Reihe verwandter, relativ kleiner Peptide, die diese Sequenz ganz oder teilweise umfassen, sind bereits synthetisch zugänglich gemacht und biologisch untersucht worden (Schema 2). Alle diese kleinen Peptide weisen, soweit sie geprüft wurden, keine ACTH-Wirkung, dagegen eine geringe MSH-Wirkung auf⁵⁾. Das Heptapeptid mit der zur Diskussion stehenden, «gemeinsamen» Sequenz ist jedoch bis heute nicht synthetisiert worden – wohl wegen gewisser technischer Schwierigkeiten. Am nächsten an diese Sequenz kommen die synthetischen Peptide IV und V

1) CRF = Corticotropin Releasing Factor, vgl. H. KAPPELER & R. SCHWYZTER, sowie M. P. DE GARILHE, CL. GROS, J. PORATH & E.-B. LINDNER, Experientia, im Druck.

2) Zusammenfassung siehe C. H. LI, Advances Protein Chemistry 12, 288 (1957).

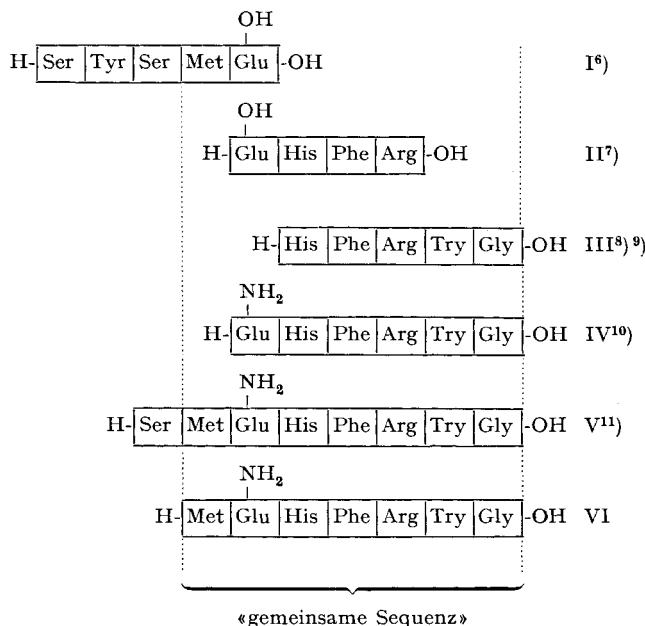
3) Die hier wiedergegebene Sequenz bezieht sich auf das β -MSH des Rindes: I. I. GESCHWIND, C. H. LI & L. BARNAFI, J. Amer. chem. Soc. 79, 1003, 6394 (1957); vgl. auch ¹²⁾.

4) J. I. HARRIS & P. ROOS, Biochem. J. 71, 434 (1959).

5) Zusammenstellung bei R. SCHWYZTER: «Synthese von hormonaktiven Peptiden», IUPAC-Kongressbericht, B II/2, 1960 (R. Oldenbourg, München, im Druck).

(Schema 2) heran, die in vorläufigen Mitteilungen bereits publiziert worden sind. Eine genaue Beschreibung des Hexapeptides IV gibt KAPPELER¹⁰).

Schema 2: Kleinere, synthetische, mit der «gemeinsamen Sequenz» verwandte Peptide



Im Verlaufe unserer Untersuchungen zur Synthese von β -MSH und verwandten Peptiden¹²) haben wir die Gelegenheit benutzt, um aus z. T. vorhandenen Zwischenprodukten das Heptapeptid H·Met-Glu(NH₂)·His-Phe-Arg-Try-Gly·OH (VI), welches alle Aminosäuren der gemeinsamen Sequenz umfasst, herzustellen. Anstelle der Glutaminsäure wurde vorerst Glutamin eingebaut. Der Verlauf der Synthese ist in Schema 3 (S. 1458) dargestellt.

Als Ausgangsstoffe dienten N-t-Butyloxy-carbonyl-methionin (*A* 7)¹³), das Dipeptidderivat *A* 2-3 und das Tetrapeptidderivat *A* 4-7. Die beiden Peptidderivate – gut kristallisierte Verbindungen – waren Zwischenprodukte unserer Synthese des Hexapeptides H·Glu(NH₂)·His-Phe-Arg-Try-Gly·OH⁹)¹⁰.

Das Dipeptidderivat *A* 2-3 wurde durch Hydrierung in salzsaurer Lösung in das Hydrochlorid des Dipeptidesters (*A* 2-3, H statt Z) ohne Schwierigkeiten übergeführt. Dieser amorphe

⁶⁾ K. HOFMANN, A. JÖHL, A. E. FURLENMEIER & H. KAPPELER, J. Amer. chem. Soc. 79, 1636 (1957).

⁷⁾ K. HOFMANN, H. KAPPELER, A. E. FURLENMEIER, M. E. WOOLNER, E. T. SCHWARTZ & TH. A. THOMPSON, J. Amer. chem. Soc. 79, 1641 (1957).

⁸⁾ K. HOFMANN, M. E. WOOLNER, G. SPÜHLER & E. T. SCHWARTZ, J. Amer. chem. Soc. 80, 1486 (1958).

⁹⁾ R. SCHWYZER & C. H. LI, Nature 182, 1669 (1958).

¹⁰⁾ H. KAPPELER, vorgesehen für Helv., vgl. Fussnote in ⁹).

¹¹⁾ K. HOFMANN, TH. A. THOMPSON & E. T. SCHWARTZ, J. Amer. chem. Soc. 79, 6087 (1957).

¹²⁾ R. SCHWYZER, H. KAPPELER, B. ISELIN, W. RITTEL & H. ZUBER, Helv. 42, 1702 (1959).

¹³⁾ R. SCHWYZER, P. SIEBER & H. KAPPELER, Helv. 42, 2622 (1959).

Stoff ergab durch Kondensation mit *A* 1 (mittels Carbonyl-diimidazol¹⁴⁾) in 53-proz. Ausbeute das kristallisierte Tripeptidderivat *B* 1-3 (R = -OCH₃). Zur weiteren Charakterisierung wurde das ebenfalls kristalline Hydrazid hergestellt (*B* 1-3, R = -NHNH₂: Smp. 172-173°, $[\alpha]_D^{28} = -30,9 \pm 0,4^\circ$, c = 2,559 in MeOH). Verseifung in Dioxan-Wasser mit Barytlauge ergab die ebenfalls kristallisierte Säure (*B* 1-3, R = -OH). Das Tetrapeptidderivat *A* 4-7 wurde durch katalytische Hydrierung gleichzeitig von der Nitrogruppe und der Carbobenzoxygruppe befreit¹⁰⁾. Das entstandene, amorphe Dihydrochlorid des Esters wurde durch Umsatz mit Triäthylamin in Dimethylformamid und Filtration vom ausgeschiedenen Triäthylamin-hydrochlorid in das Mono-hydrochlorid *B* 4-7 übergeführt.

In der Stufe *B* → *C* erfolgte die Kondensation mittels Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI)¹⁵⁾ in Dimethylformamid-Lösung. Das entstandene Kondensationsprodukt wurde durch multiplikative Verteilung über 90 Stufen von unumgesetztem Material (*B* 1-3 und *B* 4-7) getrennt und durch Kristallisation rein erhalten.

Die Verseifung von *C* 1-7 zu *D* 1-7 erfolgte in 50-proz. Dioxan unter langsamer Zugabe von NaOH bei einem pH zwischen 10,5 und 11,2. Nach multiplikativer Verteilung in einem n-BuOH/Ammoniumacetat-System über 150 Stufen liess sich das reine BOC-Heptapeptid aus 50-proz. Methanol kristallisieren.

In der letzten Stufe (*D* → *E*) wurde die t-Butyloxycarbonyl-Gruppe durch Einwirkung von Trifluoressigsäure entfernt. Zur Reinigung wurde wiederum die multiplikative Verteilung herangezogen, worauf sich das reine Heptapeptid *E* 1-7 aus Wasser-Äthanol kristallisierten liess. Papierchromatographische Analyse, Hochspannungselektrophorese, Abbau mit Leucinaminopeptidase und quant. Aminosäure-Analyse nach MOORE, SPACKMAN & STEIN¹⁶⁾ zeigten, dass es sich bei dem erhaltenen Produkt tatsächlich um das (auch optisch) einheitliche Heptapeptid *E* 1-7 handelt, und dass keine mit diesen Methoden nachweisbare Verunreinigungen mehr vorhanden sind.

Herr Prof. Dr. W. SCHULER von unserer biologischen Abteilung fand, dass die Verbindung im SAYERS-Test¹⁷⁾ keine ACTH-Wirkung aufweist. Auch die MSH-Wirkung in der isolierten Froschhaut, die von Prof. Dr. C. H. LI und Dr. I. I. GESCHWIND im Hormone Research Laboratory der Universität Kalifornien (Berkeley, Calif.) bestimmt wurde¹⁸⁾, erwies sich als sehr klein ($2,8 \times 10^5$ U/g). Dagegen wurde eine, verglichen mit angereichertem natürlichen Material sehr bedeutende CRF-Wirkung¹⁹⁾ *in vitro* gefunden. Diese Bestimmung wurde in freundlicher Weise (neben der Untersuchung einiger anderer synthetischer Peptide) von Dr. M. P. DE GARILHE und Mlle CL. GROS im Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université de Paris nach der Methode von SAFFRAN & SCHALLY¹⁹⁾ durchgeführt. Jene Autoren berichteten bereits über die Ergebnisse ihrer CRF-Prüfungen²⁰⁾.

Mit diesen Befunden beginnt sich die schon lange vermutete, zentrale Stellung der zur Diskussion stehenden Heptapeptidsequenz in der Biochemie der adrenocorticotropen und der Melanophoren-stimulierenden Hormone etwas klarer abzu-

¹⁴⁾ G. W. ANDERSON & R. PAUL, J. Amer. chem. Soc. 80, 4423 (1958); H. A. STAAB, Angew. Chem. 71, 194 (1959).

¹⁵⁾ J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. 77, 1067 (1955).

¹⁶⁾ S. MOORE, D. H. SPACKMAN & W. H. STEIN, Analyt. Chemistry 30, 1185, 1190 (1958); die Analysen wurden in freundlicher Weise von den Herren Prof. Dr. M. BRENNER und Dr. R. WEBER (Org.-chemische Anstalt der Universität Basel) ausgeführt und ausgewertet. Dafür möchten wir auch an dieser Stelle bestens danken.

¹⁷⁾ M. A. SAYERS, G. SAYERS & L. A. WOODBURY, Endocrinology 42, 379 (1948).

¹⁸⁾ K. SHIZUME, A. B. LERNER & T. B. FITZPATRICK, Endocrinology 54, 553 (1954); für die Ausführung möchten wir auch an dieser Stelle bestens danken.

¹⁹⁾ M. SAFFRAN, A. V. SCHALLY & B. G. BENFEY, Endocrinology 57, 399 (1957).

²⁰⁾ M. P. DE GARILHE, CL. GROS, J. PORATH & E.-B. LINDNER, Experientia, im Druck, vgl. auch H. KAPPELER & R. SCHWYZER, Experientia, im Druck.

zeichnen. Es wird noch zu eruieren sein, ob solche Sequenzen als Vorläufer bei der Biosynthese dieser Hormone fungieren und ob sie strukturell mit dem oder den Trägern der CRF-Aktivität des Hypothalamus und der Hypophyse²¹⁾ verwandt sind.

Experimenteller Teil

Smp. wurden in der Kapillare bestimmt und sind nicht korr. Folgende Lösungsmittelsysteme wurden bei der papierchromatographischen Analyse verwendet (Zahlen ohne weitere Angabe bedeuten Volumina in ml):

System 43: t-Amylalkohol/Isopropanol/Wasser (100:40:55)

System 45: sec-Butanol/3-proz. Ammoniak (100:44)

System 50: t-Amylalkohol/Isopropanol/Triäthylamin/Veronal/Wasser (100:40:0,8:1,8 g:50)

System 54: sec-Butanol/Isopropanol/Monochloressigsäure/Wasser (70:10:3 g:40)

Die Angabe Rf 43 bedeutet z. B. den Rf-Wert im System 43 auf WHATMAN-Papier Nr. 3 (dieses wurde durchwegs verwendet).

1. *t-Butyloxycarbonyl-L-methionyl-L-glutaminyl-L-histidinmethylester* (B 1-3, R = OCH_3): In 15 ml abs. Dimethylformamid wurden 2,4 g (6,5 mMol) Glutaminyl-histidinmethylester-dihydrochlorid, welches durch Hydrogenolytische Spaltung des entsprechenden Carbobenzoxyderivates¹⁰⁾ in Gegenwart von 2,2 Äquivalenten HCl erhalten wurde, gelöst und unter Rühren bei 0° mit 2,0 ml (14,4 mMol) Triäthylamin reagieren gelassen. Nach 30 Min. wurde das ausgeschiedene Triäthylamin-hydrochlorid abfiltriert (1,65 g; 91%). Hierauf versetzte man die klare Lösung mit 2 ml Benzol und dampfte einige ml des Lösungsmittels bei 20–30° im Hochvakuum ab.

Gleichzeitig löste man 1,6 g (7,2 mMol) 75-proz. Carbonyl-diimidazol¹⁴⁾ in 5 ml Dimethylformamid, gab 1,8 g (7,2 mMol) BOC-Methionin dazu und liess 15 Min. bei Zimmertemperatur reagieren.

Die beiden Lösungen wurden unter Eiskühlung vereinigt und 15 Std. bei Zimmertemperatur reagieren gelassen.

Das Lösungsmittel wurde bei 40° im Vakuum abgedampft und der Ester mit viel Essigester ausgefällt: 3,24 g, Smp. 185–187°, 2,9 g des Rohesters wurden aus 35 ml Methanol kristallisiert: 1,85 g (53%) B 1-3 (R = OCH_3), Smp. 192–193°. Analyse nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Methanol.

$\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_7\text{N}_6\text{S}$ (528,64) Ber. C 49,98 H 6,86 S 6,05% Gef. C 49,68 H 7,02 S 6,05%

Im Papierchromatogramm zeigte B 1-3 (R = OCH_3) mit PAULY-Reagens und Platinchlorwasserstoffsäure/KJ positive Reaktion; Rf 43 = 0,88; Rf 54 = 0,82.

2. *t-Butyloxycarbonyl-L-methionyl-L-glutaminyl-L-histidinhydrazid* (B 1-3, R = -NHNH_2): 1,2 g (2,25 mMol) B 1-3 (R = OCH_3) wurden unter Erwärmen in 16 ml Dimethylformamid gelöst; die auf Zimmertemperatur abgekühlte Lösung wurde mit 1 ml Hydrazinhydrat versetzt und bei 20° gelassen. Nach 18 Std. wurde das Reaktionsprodukt mit viel Äther ausgefällt, abfiltriert, gut mit Äther nachgewaschen und im Hochvakuum über P_2O_5 und Schwefelsäure getrocknet. Das rohe Hydrazid wurde aus 12 ml Methanol umkristallisiert: 840 mg (70%) reines B 1-3 (R = -NHNH_2).

Zur Analyse wurde nochmals aus Methanol umkristallisiert:

(528,65) Gef. C 47,71 H 6,86 N 21,20 S 6,07%

$\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O}_6\text{N}_8\text{S}$ Ber. „, 47,42 „, 6,84 „, 21,00 „, 6,14%

Der Verteilungskoeffizient für das System Methanol: Wasser:Chloroform:Tetrachlorkohlenstoff (8:2:5:5) betrug 5,4.

Im Papierchromatogramm zeigte die Verbindung in den Systemen 43, 50 und 54 mit Platinchlorwasserstoffsäure/KJ und PAULY-Reagens nur je 1 Fleck; Rf 43 = 0,86; Rf 50 = 0,81; Rf 54 = 0,72.

²¹⁾ Vgl. R. GUILLEMIN, W. R. HEARN, W. R. CHEEK & D. H. HOUSEHOLDER, Endocrinology 60, 488 (1957); A. V. SCHALLY, M. SAFFRAN & B. ZIMMERMANN, Biochem. J. 70, 97 (1958); A. V. SCHALLY & R. GUILLEMIN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 100, 138 (1959); Biochim. biophys. Acta 31, 252 (1959); CL. GROS & M. P. DE GARILHE, C. r. hebdo. Séances Acad. Sci. 249, 2234 (1959); P. C. ROYCE & G. SAYERS, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 103, 447 (1960); M. LINGUETTE, G. BISERTE, P. FOSSATI & M. BENOIT, C. r. Séances Soc. Biol. 153, 1358 (1959).

3. *t-Butyloxycarbonyl-L-methionyl-L-glutaminyl-L-histidin* (B 1-3), $R = -OH$: 1,0 g (1,9 mMol) B 1-3 ($R = -OCH_3$) wurden in 19 ml 50-proz. Dioxan heiss gelöst, die wieder auf Zimmertemperatur abgekühlte Lösung wurde unter Stickstoff mit 4,45 ml 0,47 N Bariumhydroxydlösung versetzt und 30 Min. bei Zimmertemperatur gehalten. Unter Eiskühlung wurde die Lösung mit 2,1 ml 1N Schwefelsäure neutralisiert (End-pH = 5,7) und anschliessend das Lösungsmittel bei 40° im Vakuum verdampft. Der amorphe Rückstand wurde in 25 ml kaltem Wasser aufgenommen und durch Celit vom Bariumsulfat abfiltriert. Nach dem Verdampfen des Wassers wurden 970 mg (99%) amorphes B 1-3 ($R = -OH$) erhalten; Rf 43 = 0,65; Rf 50 = 0,55.

Das Analysenpräparat wurde wiederholt aus einem Gemisch von Methanol und Essigester umkristallisiert.

(514,62)	Gef. C 49,01	H 6,66	N 15,99	S 6,23%
$C_{21}H_{34}O_7N_6S$	Ber. „	48,80	„ 6,80	„ 16,33 „ 6,05%

4. *t-Butyloxycarbonyl-L-methionyl-L-glutaminyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-methylester-acetet* (C 1-7): 3,8 g (5,4 mMol) Phenylalanyl-arginyl-tryptophyl-glycinmethylester-dihydrochlorid (noch mit ungef. 1 Äquivalent Ammoniumchlorid verunreinigt)¹⁰⁾ in 18,5 ml Dimethylformamid wurden 40 Min. bei 0° mit 0,83 ml (5,9 mMol) Triäthylamin gerührt. Das gebildete Triäthylamin-hydrochlorid wurde abgetrennt und das überschüssige Triäthylamin im Hochvakuum während 10 Min. bei 30° abgedampft.

Die wieder auf 0-5° gekühlte Lösung wurde mit der vorgekühlten Lösung von 2,5 g B 1-3 ($R = -OH$) in 18,5 ml Dimethylformamid versetzt und anschliessend mit 28 ml Acetonitril verdünnt. Darauf wurden 1,11 g (5,4 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid, in 5,4 ml Dimethylformamid/Acetonitril (1:2) gelöst, zugegeben und die Lösung 48 Std. bei 0° aufbewahrt. Der ausgeschiedene Harnstoff (0,85 g, 78%) wurde abgetrennt, mit wenigen ml eines Gemisches von Dimethylformamid/Essigester (1:1) nachgewaschen und das rohe Reaktionsprodukt mit viel Essigester ausgefällt.

Der rohe, noch mit Ausgangsmaterial verunreinigte BOC-Heptapeptidester wurde abfiltriert, auf der Nutsche mit viel Essigester und Petroläther gewaschen und im Hochvakuum bei 40° getrocknet: 5,6 g amorphes Material. Das Papierchromatogramm (System 43-50) zeigte neben der Hauptmenge BOC-Heptapeptidester mit den Rf -Werten 0,75 und 0,85 noch wenig B 1-3 ($R = -OH$) (Rf 43 = 0,66; Rf 50 = 0,59).

9,43 g roher, geschützter Ester (aus 2 in gleicher Weise ausgeführten Versuchen) wurden in einer Verteilungsapparatur mit 100 ml Unterphasenvolumen zwischen n-Butanol/0,1M Ammoniumacetat (pH = 7,1) über 90 Stufen verteilt.

Die Tests mit diazotierter Sulfanilsäure und Ninhydrin zeigten in den Elementen 24-38 zur Hauptsache B 1-3 ($R = -OH$), in den Elementen 64-82 ein Gemisch aus B 4-7 mit wenig C 1-7, während sich in den Fraktionen 83-91 7,37 g papierchromatographisch reines C 1-7 befanden; Rf 43 = 0,43; Rf 54 = 0,75. Zur Analyse wurde eine Probe aus 50-proz. Dioxan umkristallisiert. Trocknen 8 Std./80°/P₂O₅/10⁻³ Torr. Die getrocknete Substanz ist stark hygroskopisch.

$C_{52}H_{76}O_{14}N_{14}S$	Ber. C 54,15	H 6,64	N 17,00	CH ₃ (AcOH) 1,31%
(1153,36)	Gef. „	54,06	„ 6,47	„ 16,96 „ 1,19%

5. *t-Butyloxycarbonyl-L-methionyl-L-glutaminyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin* (D 1-7): 980 mg (0,93 mMol) reines C 1-7 wurden in 50-proz. Dioxan während 43 Min. mit 0,5 N Natronlauge versetzt. Das pH wurde zwischen 10,5 und 11,2 gehalten. Totaler Verbrauch: 4,6 ml. Dann wurde mit 0,4 ml 2 N Salzsäure und wenigen Tropfen Eisessig pH 5 eingestellt. Unter Zusatz von 5 Tropfen Nonan-5-ol wurde darauf das Lösungsmittel bei 40° i. V. abgedampft; 1,0 g noch mit Salz verunreinigtes rohes Verseifungsprodukt. Das Material wurde zwischen n-Butanol/0,1M Ammoniumacetat (pH = 7) über 150 Stufen verteilt. Die Hauptmenge des papierchromatographisch reinen D 1-7 befand sich in den Elementen 128-140. Nach dem Verdampfen der Phasen und Absublimieren des Ammoniumacetates bei 40° im Hochvakuum wurden 600 mg reines D 1-7 gewonnen. Zur Analyse wurde eine Probe aus 50-proz. Methanol umkristallisiert, Rf 43 = 0,70; Rf 45 = 0,70. Trocknen 15 Std./60°/P₂O₅/10⁻³ Torr. Bei der Einwaage nahm die Substanz ca. 25 µg Feuchtigkeit pro Min. auf.

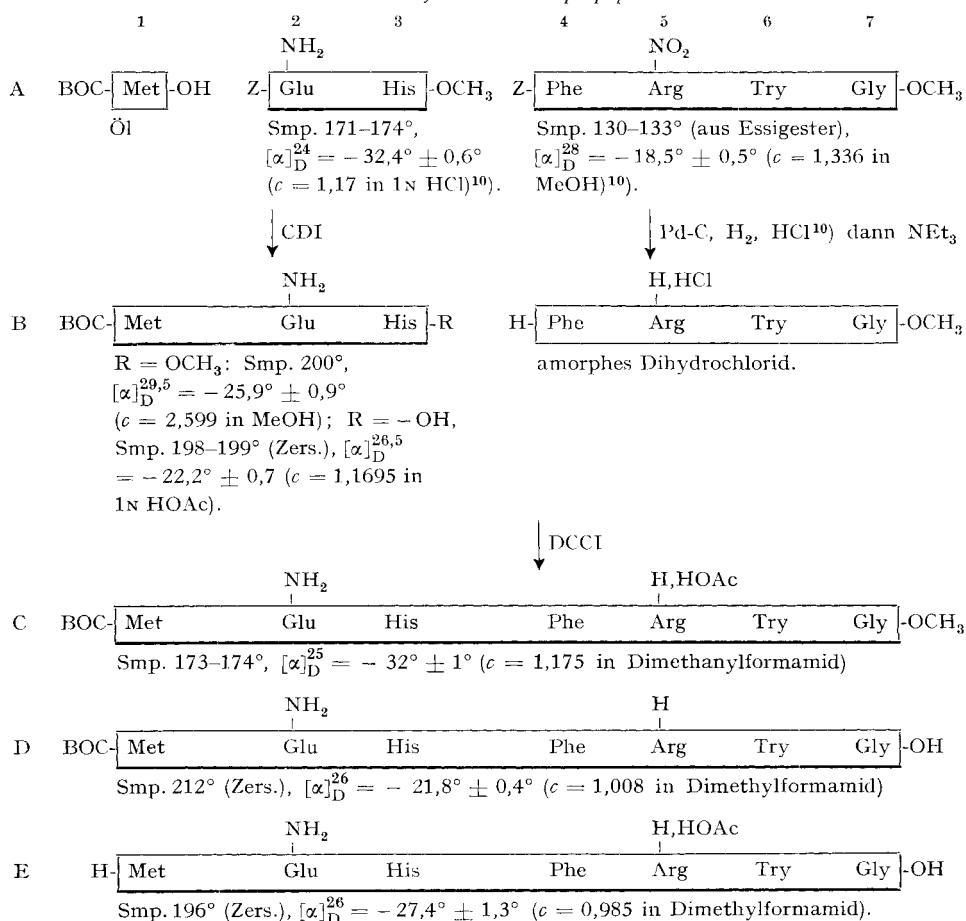
$C_{49}H_{68}O_{11}N_{14}S$	Ber. C 55,46	H 6,46	N 18,48%
(1061,26)	Gef. „	55,67	„ 6,67 „ 18,63%

6. *L-Methionyl-L-glutaminyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-acetat* (*E* 1-7): 1,1 g (1 mMol) *D* 1-7 wurden mit 8,5 ml Trifluoressigsäure 1 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das Reaktionsgemisch verfärbte sich dabei dunkelviolett. Der grösste Teil der Trifluoressigsäure wurde im Vakuum abgedampft und das Trifluoracetat des Heptapeptides mit viel Äther ausgefällt. Das körnige Rohprodukt wurde wiederholt mit abs. Äther verrieben und die leicht grau gefärbte Verbindung im Hochvakuum getrocknet; 1,33 g.

Zur Reinigung wurden obige 1,33 g zwischen n-Butanol und 0,3 M Ammoniumacetatpuffer (pH = 7,1) in 2 Verteilungselementen (20 ml Unterphasenvolumen) eingefüllt und anschliessend über 70 Stufen verteilt. Der Test mit PAULY-Reagens und Ninhydrin ergab in den Verteilungselementen 14-34 übereinstimmende, positive Reaktion. Das papierchromatographisch reine Heptapeptid befand sich in den Elementen 20-28, deren Inhalt vereinigt und bei 40° i. V. zur Trockene eingedampft wurde. Das Ammoniumacetat wurde im Hochvakuum bei 40° absublimiert, 670 mg Rückstand.

Einmaliges Umkristallisieren aus Wasser/Äthanol ergab 436 mg reines *L-Methionyl-L-glutaminyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin-monoacetat*, *E* 1-7. Zur Ana-

Schema 3. Synthese des Heptapeptides



Abkürzungen: BOC- = t-Butyloxy-carbonyl-; Z = Carbobenzoxy-;
CDI = Carbonyl-diimidazol; DCCI = Dicyclohexyl-carbodiimid.

Starke untere Linie bei der Formel bedeutet *kristalline* Verbindung.

lyse wurde nochmals umkristallisiert und getrocknet, 12 Std./70°/P₂O₅/10⁻³ Torr. Bei der Einwaage werden ca. 36 µg Feuchtigkeit pro Min. aufgenommen.

C₄₄H₆₀O₉N₁₄S Ber. C 54,10 H 6,32 N 19,20 OH₃ (AcOH) 1,45%
(1021 19) Gef., „ 53,71 „ 6,42 „ 19,51 „ „ 1,55%

Die Rf-Werte in den Systemen 45 und 54 sind 0,51 bzw. 0,59. [α]_D²⁶ = -25,3° ± 0,7; (c = 1,108 in Dimethylformamid).

Mit Leucinaminopeptidase wurde das Heptapeptid vollständig zu den Aminosäuren abgebaut.

Die quantitative Aminosäurebestimmung nach der Methode von MOORE & STEIN (Totalhydrolyse mit HCl) ergab folgende Aminosäurezusammensetzung¹⁶: Met¹; Glu¹; His¹; Phe¹; Arg¹; Gly¹; NH₃^{1,1} (Tryptophan wurde durch die Hydrolyse zerstört).

Die Hochspannungselektrophorese, 45 Volt/cm bei pH 1,9, ergab auf Papier nur 1 Band, das sich sowohl mit PAULY-Reagens und mit Ninhydrin als auch mit SAKAGUCHI-Reagens anfärben liess. Der zurückgelegte Weg betrug nach 60 Min. 15 cm.

SUMMARY

The synthesis of the heptapeptide H·Met-Glu(NH₂)-His-Phe-Arg-Try-Gly·OH (acetate) (VI) comprising the sequence of seven amino acid residues common to ACTH and α- and β-MSH is described in detail. The compound shows a very weak MSH-activity, no ACTH-activity, but a very pronounced CRF-activity (corticotropin releasing activity) *in vitro*.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel
Pharmazeutische Abteilung

181. Synthesen in der Isochinolinreihe

Halogensubstituierte 1-(ω-Phenylalkyl)-1,2,3,4-tetrahydro- -isochinoline als Analgetica

von A. BROSSI, H. BESENDORF, B. PELLMONT, M. WALTER und O. SCHNIDER

(14. V. 60)

Im Verlaufe unserer Arbeiten in der Morphinan- und später in der Benzo[a]-chinolizin-Reihe hatten wir verschiedentlich 1-Methyl-3,4-dihydro-isochinoline (z. B. I) in den Händen. Diese lassen sich, wie wir gefunden haben, in präparativ ergiebiger Weise in 2-(β-Acetamidoäthyl)-acetophenone (z. B. III) überführen^{1,2}). Beim Kochen mit verdünnten Mineralsäuren oder durch Behandlung mit Phosphoroxychlorid können letztere wieder in die ursprünglichen 3,4-Dihydroverbindungen zurückgeführt werden. Diese Ringöffnung ist interessant, weil die Acetophenonderivate vor dem Ringschluss noch weiteren Reaktionen unterworfen werden können. So stellen sie, wie im folgenden gezeigt wird, wertvolle Zwischenprodukte zur Synthese von 1-(β-Phenäthyl)-tetrahydro-isochinolinen dar. Nichthalogenierte Vertreter dieser Körperfamilie sind schon früher als analgetisch wirksam beschrieben worden³). Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob in dieser

¹) A. BROSSI, J. WÜRSCH & O. SCHNIDER, Chimia 12, 114 (1958).

²) J. GARDENT, C. r. hebd. Séances Acad. Sci. 247, 2010 (1958).

³) Vgl. Deutsche Reichspatente der TROPONWERKE Köln-Mülheim aus den Jahren 1936–1940.