

Synthetische Analoga des Corticotropins; Beitrag von 5-Glutaminsäure oder 5-Glutamin zur biologischen Wirkung

Rolf Geiger^{*) **)} und Jürgen Sandow

Hoechst Aktiengesellschaft,
D-6230 Frankfurt (Main)/Höchst

Eingegangen am 7. Juli 1976

Die polaren Carboxyl- und Carboxamidgruppen in Glu⁵ oder Gln⁵ von ACTH sind für die biologische Wirkung unerheblich. Ein analoges *N*-Ethoxycarbonylderivat der ACTH-Sequenz 6–17 übt dieselbe biologische Wirkung aus wie die entsprechende *N*-Glutaroylverbindung.

Synthetic Analogues of ACTH; Contribution of Glutamic Acid or Glutamine in Position 5 to the Biological Activity

The polar carboxyl and carboxamide groups in Glu⁵ or Gln⁵ of ACTH are irrelevant to its biological activity. An analogous *N*-ethoxycarbonyl derivative from the ACTH sequence 6–17 exhibits the same biological activity as the corresponding glutaroyl compound.

Vor einiger Zeit berichteten wir¹⁾ über die Verkürzung der Aminosäuresequenz des ACTH vom Amino- und Carboxylende her. Eine solche Verkürzung war bis zu einer Rumpfsequenz 5–17 unter Erhaltung einer beträchtlichen biologischen Wirkung möglich, wenn das Peptid *N*-terminal durch einen Acylrest, *C*-terminal durch ein Aminoalkylamid substituiert wurde. Als *N*-Acylrest wählten wir *n*-Butyloxycarbonyl (*n*Boc, **2**) das als Desamino-2-oxa-5-carbamethionyl aufgefaßt werden kann und damit der lipophilen Seitenkette des Methionylrests (**1**) in Position 4 entsprach.

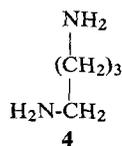
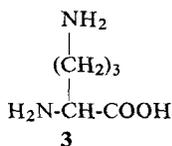


^{*)} Korrespondenz bitte an diesen Autor richten.

^{**)} Herrn Prof. Dr. phil. Dr. rer. nat. h. c. *Heinrich Ruschig* zum 70. Geburtstag gewidmet.

¹⁾ *R. Geiger* und *H.-G. Schröder*, in *Progress in Peptid Research (S. Lande)*, 1. Aufl., S. 273, Gordon & Breach, New York-London-Paris 1972.

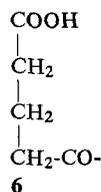
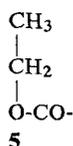
Die C-terminale Verkürzung der Kette unter gleichzeitigem Ersatz von 17-Arginin durch Lysin erwies sich als besonders günstig hinsichtlich der Verstärkung und Verlängerung der biologischen Wirkung *in vivo*. Der basische Substituent 1,5-Tetramethylendiamin (**4**) entsprach hierbei einem Decarboxyornithin (Decarboxy-3).



In der Aminosäuresequenz des natürlichen ACTH steht an dieser Stelle (Position 18) Arginin, dessen Ersatz durch Ornithin die biologische Wirkung nicht vermindert²⁾.

Beim weiteren Ersatz der *N*-terminalen 5-Glutaminsäure durch einen Ethoxycarbonylrest sank die biologische Wirkung stark ab¹⁾. Hier waren allerdings gleich zwei einschneidende Veränderungen vorgenommen worden: Neben dem lipophilen *N*-Acylrest in Position 4 fehlt auch die Carboxylgruppe von 5-Glutaminsäure. Die Glutaminsäure in dieser Position ist zwar ohne Wirkungsabfall durch Glutamin ersetzbar³⁾, doch kann der Verlust einer polaren Gruppe mit einer Verminderung der biologischen Wirkung verbunden sein.

Um zu entscheiden, welche der beiden Veränderungen in stärkerem Maße zur Einbuße an biologischer Wirkung beiträgt, ersetzten wir den Ethoxycarbonylrest (Etox, **5**) durch den Glutaroylrest (**6**).



Wie Tabelle 1 zeigt, kehrt die hohe ACTH-Wirkung von **1** durch diese Substitution nicht zurück. Wirkungsunterschiede zwischen **8** und **9** sind nicht signifikant. Die Ursache für den Abfall an biologischer Aktivität ist also im Fehlen der lipophilen Seitenkette des Methionins oder eines diese Seitenkette ersetzenden Acylrestes zu suchen.

Tabelle 1. Biologische Wirkung von ACTH-Analoga *in vivo*

Verbindung	Biolog. Wirkung ^{a)} [I. E./mg, s. c.]
Butyloxycarbonyl-[Lys ¹⁷]ACTH-(5-17)-tridekapeptid-4-aminobutylamid (7)	92 (70–120)
Ethyloxycarbonyl-[Lys ¹⁷]ACTH-(6-17)-dodekapeptid-4-aminobutylamid (8)	12 (9.4–14.5)
Glutaroyl-[Lys ¹⁷]ACTH-(6-17)-dodekapeptid-4-aminobutylamid (9)	2.9 (1.5–24.1)

^{a)} Modifizierter Sayers-Test (Messung nach 1 h) an der dexamethasonblockierten Ratte. Mittlere Aktivität mit 95proz. Vertrauensgrenze in Bezug auf den III. Internationalen ACTH-Standard (MRC 67/279).

²⁾ G. I. Tesser und J. T. Buis, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, **90**, 444 (1971).

³⁾ R. Schwyzer, W. Rittel, H. Kappler und B. Iselin, Angew. Chem. **72**, 915 (1960).

Zur Reinigung der Peptide 7–9 diente die Absorptionsgelchromatographie an Sephadex LH-20 in 1proz. Essigsäure. Bis zu 1 g Substanz wurde in einer Säule 2.5×400 cm aufgetrennt.

Wir danken Frl. E. Leiskau und Herrn F. Burow für experimentelle Hilfe.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert. — Die optischen Drehwerte wurden in einem lichtelektrischen Polarimeter 141 der Fa. Perkin-Elmer gemessen. Die Aminosäureanalysen wurden nach 24stdg. Hydrolyse in 6 N HCl bei 110°C mit einem Gerät LKB 3201 ausgeführt. Für die Dünnschichtchromatographie (DC) verwendeten wir von der Fa. Merck: A = Silicagel und Butanol/Essigsäure/Wasser (6:2:2); B = Silicagel und Ethylmethylketon/Essigsäure/Pyridin/Wasser (70:2:15:15); C = Cellulose und Butanol/Essigsäure/Pyridin/Wasser (15:3:10:12).

Succinimidooxyameisensäure-butylester (nBoc-ONSu): 11.5 g (0.11 mol) *N*-Hydroxysuccinimid werden in 100 ml wasserfreiem Ether suspendiert. Man kühlt mit Eis, gibt 14.35 ml (0.1 mol) Chlorameisensäure-butylester zu und läßt unter Eiskühlung und Rühren 8.1 ml (0.1 mol) Pyridin in 60 ml Ether zutropfen. Man rührt noch 1 h bei Raumtemp., kühlt mit Eis und gibt 50 ml eiskaltes Wasser zu. Die Etherphase wird mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abdestillieren des Ethers bleibt ein Öl zurück, das in dieser Form weiterverwendet wird. Ausb. 17 g (79%).

nBoc-Glu(OBu^t)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH·H₂O (10): 1.97 g (2 mmol) *H*-Glu(OBu^t)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH·CH₃COOH·2H₂O⁸⁾ werden in 30 ml Dimethylformamid mit 645 mg (3 mmol) nBoc-ONSu über Nacht bei Raumtemp. gerührt. Dann fällt man mit der 5fachen Menge Ether, zentrifugiert den sehr feinen Niederschlag ab, wäscht ihn mit Ether und trocknet ihn an der Luft. Das durch 2 Nebenprodukte verunreinigte Rohprodukt wird 2mal aus je 30 ml 70proz. Methanol umkristallisiert und bei 40°C/ca. 10 Torr über P₂O₅ getrocknet; es ist dann in der DC (A) bis auf wenig Begleitsubstanz mit höherem *R_F*-Wert rein. Ausb. 1.37 g (68%); $[\alpha]_D^{20} = -11.7^\circ$ ($c = 1$, in Dimethylformamid).

C₄₈H₆₈N₁₂O₁₂·H₂O (1005.2) Ber. C 57.35 H 6.82 N 16.72

Gef. C 57.2 H 7.0 N 16.4

nBoc-Glu(OBu^t)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc) Lys(Boc)-Lys(Boc)-NH-(CH₂)₄-NH-Boc: 782 mg (0.5 mmol) **13**-Tosylat-dihydrat⁶⁾ und 0.5 g (0.5 mmol) **10**-Monohydrat werden in 20 ml Dimethylformamid gelöst. Man gibt 135 mg (1 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol und ein Drittel der Lösung von 620 mg (3 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in Dimethylformamid zu. Nach 30min. Rühren wird das nächste Drittel, nach 2 h das letzte Drittel zugegeben. Man rührt über Nacht und fällt mit 250 ml Ether 796 mg Rohprodukt aus.

nBoc-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Lys-NH-(CH₂)₄-NH₂·5 CH₃COOH·4 H₂O (7): 796 mg des voranstehend beschriebenen Rohprodukts werden in 5 ml 90proz. Trifluoressigsäure, die 1% Thioglykolsäure enthält, 60min bei etwa 20°C gerührt. Man fällt mit 200 ml Ether 604 mg rohes **7** aus, das in 40 ml Wasser gelöst wird. Durch Einrühren von basischem Ionenaustauscher Amberlite IRA 45 stellt man auf pH 5, filtriert vom Austauscher ab, wäscht ihn mit 50proz. Methanol und engt die vereinigten Filtrate i. Vak. auf etwa 5 ml ein. Die Lösung wird auf einer Säule (400 × 2.5 cm) Sephadex LH-20 mit 0.1 N Essigsäure chromatographiert. Die Fraktionen, die reines **7** enthalten (Kontrolle durch DC, System C),

⁸⁾ R. Geiger, K. Sturm und W. Siedel, Chem. Ber. **96**, 1080 (1963).

werden gefriergetrocknet. Ausb. 240 mg. (Aus den Nebenfraktionen werden weitere 110 mg unreines **7** erhalten). Die reine Substanz ist in der DC (C) bei einem Auftrag von 10 μg (Anfärben mit Ninhydrin und nach Reindl-Hoppe) einheitlich; beim Auftragen von 20 μg zeigt sich ein sehr schwacher, kurz über dem Hauptfleck liegender Nebenfleck. $[\alpha]_D^{20} = -57.6^\circ$ ($c = 0.5$, in 1proz. Essigsäure). — Aminosäurenanalyse (ber.): 1.03 Glu (1), 2.00 Gly (2), 0.96 Pro (1), 0.97 Val (1), 1.01 Phe (1), 0.96 His (1), 3.91 Lys (4), 1.02 Arg (1). Tryptophan wurde UV-spektroskopisch zu 0.95 (ber. 1) bestimmt.

Acetat: Gef. 13.9

Ber. 14.5 für $5\text{CH}_3\text{COOH}$

Wasser: Gef. 3.2

Ber. 3.5 für $4\text{H}_2\text{O}$

$\text{C}_2\text{H}_5\text{-CO-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**11**): 2.4 g (30 mmol) H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH $\cdot\text{CH}_3\text{COOH}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ⁹⁾ rührt man mit 1.63 g (4.8 mmol) Kohlensäure-ethyl(pentachlorphenyl)ester¹⁰⁾ in 30 ml Dimethylformamid bei Raumtemp. über Nacht und fällt dann mit 300 ml Ether 2.22 mg rohes **7** aus, das mit 1 M Natriumhydrogencarbonat verrieben und zweimal aus 60proz. Methanol umkristallisiert wird. Ausb. 1.46 g (61.4%) bei der DC in den Systemen A und B fast einheitliches **11** mit $[\alpha]_D^{20} = -14.3^\circ$ ($c = 1$, in Dimethylformamid).

$\text{C}_{37}\text{H}_{47}\text{N}_{11}\text{O}_8\cdot\text{H}_2\text{O}$ (791.9) Ber. C 56.12 H 6.24 N 19.46

Gef. C 56.0 H 6.4 N 19.2

$\text{C}_2\text{H}_5\text{-CO-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Lys-NH-(CH}_2)_4\text{-NH}_2\cdot 6\text{CH}_3\text{COH}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**8**): 782 mg (0.5 mmol) **13**-Tosylat-dihydrat und 396 mg (0.5 mmol) **11**-Monohydrat werden analog der Synthese von **7** mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid und 1-Hydroxybenzotriazol kondensiert, wie für **7** beschrieben, von den Schutzgruppen befreit und an Sephadex LH-20 gereinigt. Ausb. über alle Stufen 230 mg; aus Nebenfraktionen wurden weitere 125 mg **8** geringerer Reinheit erhalten (Gesamtausb. 51%). Der Reinheitsgrad von **8** entsprach etwa dem von **7**. $[\alpha]_D^{20} = -55.5^\circ$ ($c = 0.5$; in 1proz. Essigsäure). — Aminosäurenanalyse (ber.): 2.00 Gly (2), 0.98 Pro (1), 1.01 Val (1), 1.03 Phe (1), 1.01 His (1), 4.02 Lys (4), 0.98 Arg (1). Tryptophan wurde UV-spektroskopisch zu 0.98 (ber. 1) bestimmt.

Acetat: Gef. 17.4

Ber. 17.6 für $6\text{CH}_3\text{COH}$

Wasser: Gef. 3.3

Ber. 3.5 für $4\text{H}_2\text{O}$

Glutarsäure-ethyl-tert-butylester: 80 g (0.5 mol) Glutarsäure-monoethylester¹¹⁾ werden in 1.2 l *tert*-Butylalkohol und 500 ml Pyridin gelöst. Unter kräftigem Rühren läßt man bei -5°C langsam 50 ml Phosphoroxchlorid zutropfen¹²⁾, rührt noch 1 h bei dieser Temp. und läßt über Nacht bei Raumtemp. stehen. Man destilliert i. Vak. zur Trockene, nimmt den Rückstand in Ether auf, wäscht die Etherphase mit 1 M Natriumhydrogencarbonat und Wasser, trocknet über Natriumsulfat und destilliert den Ether ab. Das zurückgebliebene Öl wird direkt verseift (s. unten).

Dicyclohexylammoniumsalz von Glutarsäure-mono-tert-butylester: Das voranstehend beschriebene Öl wird in 300 ml Dioxan/Wasser (14:6) gelöst und bei pH 13 mit 2 N NaOH verseift. Man neutralisiert mit 2 N HCl, destilliert das Dioxan i. Vak. ab und gibt zum Rückstand 150 ml Wasser. Beim Ansäuern mit 2 N HCl bei 4°C scheidet sich ein Öl ab. Man stellt das pH auf 2.3, nimmt das Öl in Essigester auf, extrahiert die Wasserphase noch 2 mal mit Essigester, wäscht die vereinigten Essigesterphasen zweimal mit 10proz. NaCl-Lösung, trocknet über Natriumsulfat und destilliert den Essigester ab. Der Rückstand wird in Ether gelöst. Man gibt

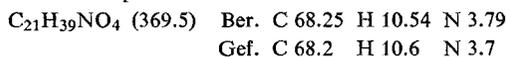
⁹⁾ K. Hofmann und S. Lande, J. Am. Chem. Soc. **83**, 2286 (1961).

¹⁰⁾ E. Barral, Bull. Soc. Chi. Fr. **23**, 818 (1900).

¹¹⁾ Markownikow, zitiert nach Beilstein, Handbuch der Organischen Chemie, Bd 2, S. 633, Springer, Berlin 1920.

¹²⁾ E. Taschner, Liebigs Ann. Chem. **646**, 123 (1961).

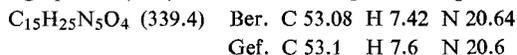
Dicyclohexylamin zu, bis eine Probe auf feuchtem pH-Papier stark alkalisch reagiert, kühlt und filtriert den Niederschlag ab. Ausb. 40.0 g (22%). Zur Analyse wurde eine Probe aus Essigester umkristallisiert. Schmp. 108–110°C.



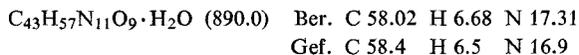
Glutarsäure-mono-tert-butylester: Das voranstehend beschriebene Dicyclohexylammoniumsalz wird in 100 ml Essigester und 60 ml Wasser suspendiert. Man gibt bei 0°C unter kräftigem Rühren so lange gesättigte wäßrige Citronensäure-Lösung zu, bis sich die Suspension gelöst hat. Der Essigester wird abgetrennt, die wäßrige Phase 2mal mit je 60 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterphasen werden über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. zur Trockene gebracht, wobei ein Öl zurückbleibt. Ausb. 19 g (93%).

Bu^tO-CO-(CH₂)₃-CO-His-OMe: 9.4 g (50 mmol) Glutarsäure-mono-tert-butylester werden unter Rühren in 200 ml Dimethylformamid nacheinander mit 10.6 g (44 mmol) H-His-OMe·2HCl, 6.75 g (50 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol, 11.25 ml (88 mmol) *N*-Ethylmorpholin und bei 0°C mit 9.7 g (47 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Man läßt über Nacht bei Raumtemp. stehen, filtriert den Harnstoff ab und bringt i. Vak. zur Trockene. Der Rückstand wird in einem Gemisch aus gleichen Volumenteilen 1 M Natriumhydrogencarbonat und Essigester aufgenommen. Man schüttelt, trennt die Phasen und extrahiert die wäßrige 3mal mit Essigester. Die vereinigten Essigesterphasen werden über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abdestillieren des Essigesters i. Vak. bleibt ein Öl zurück. Ausb. 13.4 g (79%). Nach DC (A,B) enthält die Verbindung mehrere Nebenprodukte in geringer Menge. Sie wird ohne weitere Reinigung für die nächste Stufe eingesetzt.

Bu^tO-CO-(CH₂)₃-CO-His-N₂H₃: 13.4 g (39 mmol) des voranstehend beschriebenen Esters werden in 150 ml Methanol mit 11.5 ml (240 mmol) 100proz. Hydrazin-hydrat 15 h bei 20°C aufbewahrt. Man engt auf ein kleines Volumen ein, hält 2 h bei 0°C, filtriert den ausgefallenen Niederschlag ab, wäscht ihn mit wenig eiskaltem Methanol und kristallisiert ihn aus Methanol um. Nach dem Trocknen i. Vak. über P₂O₅ und KOH liegen 6.6 g (49%) der dünnstichtchromatographisch (A,B) reinen Verbindung mit Schmp. 217–220°C (Zers.) vor.



Bu^tO-CO-(CH₂)₃-CO-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH·H₂O (12): 1.70 g (5 mmol) des voranstehend beschriebenen Hydrazids werden in 10 ml Dimethylformamid gelöst. Bei –30°C gibt man 3.7 ml (20 mmol) 5.4 N HCl in absol. Dioxan zu, wobei völlige Lösung eintritt. Bei derselben Temp. tropft man 5.8 ml (5 mmol) 10proz. *tert*-Butylnitrit in absol. Dioxan ein. Dann rührt man noch 20 min bei –10°C, kühlt auf –40°C und versetzt mit der Lösung von 2.57 g (4 mmol) H-Phe-Arg-Trp-Gly-OH·CH₃COOH·H₂O⁹⁾ in 15 ml Dimethylformamid. Man bringt durch Zugabe von etwa 2.8 ml *N*-Ethylmorpholin auf pH 8.5 und bewahrt 18 h bei 4°C auf. Nach 2–3 h wird das pH 8.5 mit wenig *N*-Ethylmorpholin erneut eingestellt. Nach beendeter Reaktion fällt man mit Essigester/Ether (1:1) 4.2 g Rohprodukt aus. Nach Umfällen aus Methanol/Essigester, Verreiben des getrockneten Niederschlags mit wenig Wasser und Trocknen i. Vak. über P₂O₅ erhält man 2.6 g (58%) chromatographisch (A,B) fast einheitliches **12**. Aminosäurenanalyse (ber.): 1.00 Gly (1), 1.03 Phe (1), 0.97 His (1), 1.01 Arg. (1). Tryptophan wurde UV-spektroskopisch zu 0.99 (ber. 1) bestimmt.



Bu^tO-CO-(CH₂)₃-CO-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-NH-(CH₂)₄-NH-Boc: 783 mg (0.88 mmol) **12** und 1.38 g (0.88 mmol) **13** werden in

10 ml Dimethylformamid gelöst. Man gibt 238 mg (1.76 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol und 0.113 ml (0.88 mmol) *N*-Ethylmorpholin zu und versetzt mit der Lösung von 680 mg (3.3 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid, gelöst in 8 ml Dimethylformamid, in Portionen zu je 2 ml im Abstand von jeweils 1 h. Dann rührt man noch 15 h bei Raumtemp., destilliert das Lösungsmittel weitgehend ab und fällt mit Ether/Petrolether (1:1) 3.04 g Rohprodukt aus, das noch Salze und 1-Hydroxybenzotriazol enthält. Es wird ohne weitere Reinigung weiterverarbeitet.

Glutaroyl-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Lys-NH-(CH₂)₄-NH₂·5CH₃COOH·4H₂O (9): 3 g der voranstehenden geschützten Verbindung werden 1 h in 15 ml 90proz. Trifluoressigsäure, die 1% Thioglykolsäure enthält, stehen gelassen. Dann fällt man mit 150 ml Ether 1.98 g Rohprodukt aus, das in 20 ml Methanol/Wasser (1:1) gelöst wird. Man rührt schwach basischen Ionenaustauscher Amberlite IR-45 ein, bis pH 5 erreicht ist, filtriert vom Ionenaustauscher ab und bringt das Filtrat i. Vak. zur Trockene. Ausb. 1.44 g Rohprodukt. Diese werden in 8 ml 0.5 proz Essigsäure gelöst und über eine Säule (4 × 200 cm) Sephadex LH 20 mit 0.5proz. Essigsäure chromatographiert. Die das reine Endprodukt enthaltende Fraktion ergibt nach dem Gefriertrocknen 454 mg 9. Die chromatographische Reinheit entspricht der der Verbindungen 7 und 8. $[\alpha]_D^{20} = -55.0^\circ$ ($c = 0.5$ in 1proz. Essigsäure). — Aminosäurenanalyse (ber.): 1.07 Pro (1), 2.00 Gly (2), 1.03 Val (1), 0.98 Phe (1), 1.03 His (1), 3.94 Lys (4), 0.97 Arg (1).

Acetat Gef. 14.4

Ber. 14.8 für 5CH₃COOH

Wasser Gef. 3.7

Ber. 3.6 für 4H₂O

[167/76]