

[8-Homoarginin](Luteinisierendes Hormon freisetzendes Hormon)

Rolf Geiger, Wolfgang König, Jürgen Sandow und Andrew V. Schally*

(Der Schriftleitung zugegangen am 17. August 1974)

Zusammenfassung: Synthese und LH-ausschüttende Wirkung von [8-Homoarginin]LH-RH werden beschrieben und im Zusammenhang mit anderen Analoga des LH-RH, die in Stellung 8 verändert sind, diskutiert. Obwohl im Homoarginin die positive Ladung der Guanidinogruppe gegenüber Arginin nur um etwa 1.54 Å verschoben ist, beträgt die

biologische Wirkung des [8-Homoarginin]LH-RH nur noch $\frac{1}{3}$ von der des LH-RH.

Es besteht eine überraschende Analogie zu ACTH, wo beim Austausch von 8-Arginin gegen Lysin, Ornithin und Homoarginin jeweils etwa derselbe Abfall in der biologischen Aktivität wie bei den entsprechenden LH-RH-Analoga gefunden wurde.

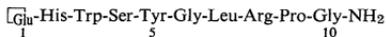
[8-Homoarginin](Luteinizing hormone releasing hormone)

Summary: The synthesis and LH-releasing activity of [8-homoarginine]LH-RH are described. Its biological activity is discussed in relation to that of other analogues with substitutions in position 8. Although in homoarginine the positive charge of the guanidino group of arginine is only displaced

by 1.54 Å, the LH-releasing activity is reduced to 20% of that of LH-RH.

There is a surprising analogy with ACTH. Replacing 8-arginine by lysine, ornithine, or homoarginine, nearly the same decrease in the biological activity has been found as with the corresponding analogues of LH-RH.

Das Hypothalamushormon LH-RH (I) gehört wenige Jahre nach seiner Entdeckung und Strukturauflösung^[1] zu den bestuntersuchten Peptiden.



LH-RH (I)

Im Zuge der systematischen Untersuchung der einzelnen Aminosäuren im LH-RH auf ihren Beitrag zur biologischen Wirkung galt unser Interesse auch

der Guanidinogruppe des Arginins. Diese Arbeiten waren zunächst durch die Frage angeregt worden, ob die Ausschüttung von Luteinisierendem Hormon (LH) und von Follikelstimulierendem Hormon (FSH) allein durch dieses Dekapeptid hervorgerufen wird, oder ob in Analogie zu den beiden Hormonen Ocytocin und Vasopressin bestimmte Partialstrukturen der bevorzugten Ausschüttung von LH bzw. FSH zuzuordnen sind.

Postanschrift: Dr. R. Geiger, Hoechst Aktiengesellschaft, Pharma Synthese G 838, D-623 Frankfurt (M) 80.

* Veterans Administration Hospital and Tulane University School of Medicine, New Orleans, La., U.S.A.

Abkürzungen:

LH-RH = Luteinisierendes-Hormon-freisetzendes Hormon.

Die Abkürzungen der Aminosäurereste entsprechen dem Vorschlag der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature; vgl. (1967) *diese Z.* **348**, 245–255, 256–261, 262–265; (1972) *Biochem. J.* **126**, 773–780.

Weitere in der vorliegenden Arbeit benützte Abkürzungen sind:

[C₆₀]: L-Pyrroglutaminsäure = 2-Pyrrolidon-5-carbonsäure; Har: Homoarginin; Z: Benzyloxycarbonyl-, Bu^t: tert.-Butyl-, DCCI: Dicyclohexylcarbodiimid, HOBT: 1-Hydroxybenzotriazol, Pcp: Pentachlorphenyl, Tcp: 2,4,5-Trichlorphenyl-, Mbh: 4,4'-Dimethoxybenzhydryl-, TosOH: *p*-Toluolsulfonsäure.

Da alle bisher synthetisierten Analoga LH und FSH in etwa demselben Verhältnis freisetzen, ist diese Fragestellung inzwischen in den Hintergrund getreten.

Der Ersatz von 8-Arginin durch Lysin^[2,3], Ornithin^[3], Histidin^[4], Norvalin^[4], Leucin und Glutamin^[5] wurde bereits von mehreren Seiten beschrieben. Die mitgeteilten biologischen Daten stimmen hinreichend mit den Werten überein, die wir an den von uns synthetisierten 8-Lysin-, 8-Ornithin- und 8-Leucin-Analoga fanden*.

Der Verlust der positiven Ladung im [Leu⁸]LH-RH verringert die biologische Wirkung drastisch. Auch beim Einsatz der stark basischen Guanidinogruppe durch eine schwächer basische Aminogruppe unter gleichzeitiger Strukturänderung des basischen Zentrums geht sie stark zurück.

Um zu klären, ob die biologische Wirkung unter Beibehaltung der Guanidinogruppe, aber Verlängerung um eine CH₂-Gruppe nach „außen“ ebenfalls zum Rückgang der Wirkung führt, wurde [8-Homoarginin]LH-RH ([Har⁸]LH-RH) (II) synthetisiert.

Ann. b. d. Korr. (30.11.1974): Nach Einsendung des Manuskripts erschien eine Kurzpublikation, in der einige Eigenschaften eines auf anderem Wege hergestellten [Har⁸]LH-RH beschrieben sind^[22].

Material und Methoden

1. Ausgangsstoffe

Aminosäure-Derivate für die Peptidsynthesen wurden im eigenen Laboratorium hergestellt und genügten den geforderten Reinheitskriterien (Dünnschichtchromatographie, Schmp., opt. Reinheit). Lösungsmittel der Qualitätsbezeichnung „zur Synthese“ und „reinst“ stammten von den Firmen E. Merck, Darmstadt, und Riedel-De Haen, Seelze. Hydrierungskatalysator war 10% Palladium auf Bariumsulfat der Fa. Engelhard, Hannover.

Für die biologischen Versuche wurden Reagentien p.a. der Firma E. Merck, Darmstadt, verwendet.

2. Peptide

Das Syntheschema für die Peptide V–VIII wird im Rahmen der Versuchsergebnisse erläutert, experimentelle Angaben zu den einzelnen Syntheseschritten finden sich in der Beschreibung der chemischen Versuche.

3. Biologische Wirkung

Die biologische Wirkung der in Stellung 8 variierten Analoga von LH-RH wurde in vivo durch Stimulierung der LH-Ausschüttung ovariectomierter Ratten, die mit Östrogen und Progesteron vorherbehandelt waren, be-

stimmt^[6–8]. LH wurde radioimmunologisch mit Anti-Rinder-Serum Nr. 15 von Dr. G. Niswender gemessen**^[9]. Die Blutserum-Spiegel von LH nach Gabe der Proben wurden mit denjenigen verglichen, die nach Injektion von physiologischer Kochsalzlösung und natürlichem LH-RH erhalten wurden^[6,7,10]. Die Erhöhung des LH-Spiegels nach Verabreichung der Probe über denjenigen nach Injektion von Kochsalz diente als Maß für die LH-RH-Aktivität. Natürliches LH-RH (AVS-77-33215-269) wurde als 100% angenommen. Jede Probe wurde dreimal gemessen.

Ergebnisse

1. Synthese

Das Peptid II wurde nach Schema 1 aufgebaut. Der Syntheseverlauf wich von dem unserer ersten LH-RH-Synthese ab^[11]. Das Pentapeptid III^[11] wurde zunächst durch Behandeln mit Trifluoressigsäure in IV übergeführt, dieses Derivat nach hydrogenolytischer Abspaltung der Benzyloxycarbonylgruppe (V) mit Z-His-N₃ zum Hexapeptid VI umgesetzt. Nach analoger Abspaltung der N^α-Schutzgruppe (VII) erhielt man mit Pyroglutaminsäure-pentachlorphenylester oder Pyroglutaminsäure-trichlorphenylester in Anwesenheit von 1-Hydroxybenzotriazol^[12] das Heptapeptid VIII.

Umsetzung mit dem Tripeptid IX nach der Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol-Methode^[13] ergab [Har⁸]LH-RH (II), das durch Verteilungschromatographie an Sephadex LH 20 im System n-Butanol/Essigsäure/Wasser 2:1:10 gereinigt wurde.

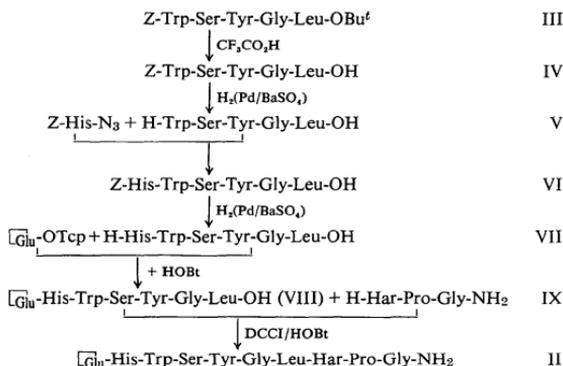
Die Synthesen von [Leu⁸]LH-RH, [Lys⁸]LH-RH und [Orn⁸]LH-RH, die hier nicht näher beschrieben werden sollen, waren noch nach dem früher angegebenen Schema 2 + 8 angelegt^[11].

Zur Herstellung des Heptapeptids VIII war noch ein zweiter Weg eingeschlagen worden (Schema 2). Er unterschied sich von dem in Schema 1 aufgezeigten dadurch, daß die Carboxylgruppe in den Zwischenprodukten X–XIII bis zur Stufe des Heptapeptids als tert.-Butylester geschützt und erst vor dem Umsatz mit IX zu II freigesetzt wurde.

Dieser Weg erwies sich jedoch als unvorteilhaft, denn VIII fiel so stark verunreinigt an, daß es erst nach Verteilungschromatographie an Sephadex im oben genannten System mit IX umgesetzt werden konnte.

** Wir danken Herrn Dr. G. Niswender für die freundliche Überlassung des Antiserums und Herrn Weldon H. Carter für experimentelle Unterstützung und statistische Berechnungen.

* Schally, A. V. & Sandow, J., unveröffentlicht.



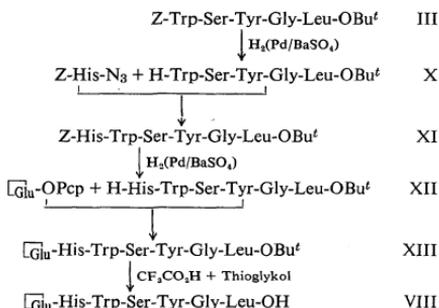
Schema 1. Synthese von [8-Homoarginin]LH-RH (II).

Zur Synthese des Tripeptids IX setzen wir nach Schema 3 zunächst das Dipeptidamid Z-Pro-Gly-NH₂ (XIV) mit 4,4'-Dimethoxybenzhydrol in Essigsäure, der eine katalytisch wirksame Menge konz. H₂SO₄ zugesetzt war, zum entsprechenden Benzhydrylamid XV um^[14]. Diese Amidschutzgruppe stabilisiert das Dipeptid und erleichtert die Reinigung des Tripeptidderivats XVII, das nach Abspaltung der Benzylloxycarbonylschutzgruppe aus XV durch Umsatz von XVI mit Z-Har(NO₂)-OH^[15] nach der Dicyclohexylcarbodiimid/Hydroxybenzotriazol-Methode^[13] erhalten wurde. Abspaltung der Benzhydryl-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure/Anisol führte zum geschützten Tri-

peptid XVIII, aus dem IX durch katalytische Hydrierung an Palladium auf Bariumsulfat erhalten wurde.

Biologische Wirkung

Die Tabelle gibt über die LH-Ausschüttung Auskunft, die durch die LH-RH-Analoga bewirkt wird. Die Übereinstimmung der in verschiedenen Laboratorien gefundenen Werte ist befriedigend, obwohl die Bestimmungsmethoden teilweise voneinander abweichen. Die biologische Wirkung der nicht in unserem Laboratorium (Hoechst) hergestellten Analoga Nr. 5–7^[4,5] wird bei der Diskussion der



Schema 2. Alternative Synthese des Heptapeptids VIII aus dem geschützten Pentapeptid III.

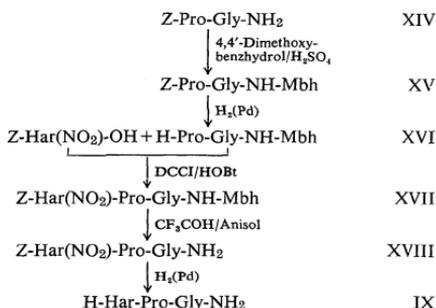
Schema 3. Synthese von H-Har-Pro-Gly-NH₂ (IX).

Tabelle. LH-Ausschüttung durch LH-RH-Analoga mit Aminosäureaustausch in Position 8 (LH-RH = 100).

Analogon	Biologische Wirkung in vivo (LH-RH = 100)	Vertrauensgrenze	Vergleichswerte aus der Literatur (LH-RH = 100)
1. [Har ⁸]LH-RH (II)	21.7 (8.46 – 127)	90%	25 – 50 ^[28]
2. [Lys ⁸]LH-RH	7.6 (3.5 – 14.6)	95%	11 – 28 ^[3]
3. [Orn ⁸]LH-RH	5.5 (2.75 – 9.4)	95%	6 – 12 ^[3]
4. [Leu ⁸]LH-RH	< 1	–	0.76 ^[5]
5. [Nva ⁸]LH-RH	–	–	< 1 ^[4]
6. [His ⁸]LH-RH	–	–	~ 1 – 2 ^[4]
7. [Gln ⁸]LH-RH	–	–	4.88 ^[5]

Struktur-Wirkungsbeziehung 8-substituierter LH-RH-Analoga in Betracht gezogen (vgl. Abb. 1).

Diskussion

Der weitgehende Verlust der biologischen Wirkung bei Eliminierung der positiven Ladung in Stellung 8 bei [Leu⁸]LH-RH^[5,*] weist auf deren große Bedeutung für die biologische Wirkung des Hormons hin. Andererseits besteht nur ein geringer Wirkungsunterschied zwischen dem basischen [Orn⁸]LH-RH und dem nichtbasischen [Gln⁸]LH-RH, wenngleich auf stark verringertem Aktivitätsniveau^[3,5,*]. In der Abbildung kommt ihre nahe strukturelle Verwandtschaft zum Ausdruck.

Daß strukturelle Bedingungen stark im Vordergrund stehen, unter die auch die Verschiebung einer vorhandenen Ladung fällt, ergibt sich aus dem beobachteten Wirkungsabfall bei [Har⁸]LH-RH (II) auf 22% der Aktivität von LH-RH (I). Hier ist

die Ladungsstärke gegenüber I unverändert und nur der Schwerpunkt des Elektronendefizits um etwa 1.54 Å nach „außen“ verschoben. In dieses Bild fügen sich auch die Lys⁸- und Leu⁸-Analoga ein. Beim ersteren ist zwar noch eine Ladung vorhanden, doch ist die Struktur gegenüber Arginin stark verändert. Beim letzteren fehlen beide für die biologische Wirkung bedeutsamen Merkmale; entsprechend sinkt die Aktivität auf < 1% (Tabelle).

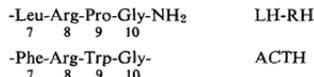


Abb. 2. Sequenzen 7–10 bei LH-RH und ACTH.

Tesser und Mitarb.^[16] haben bei Arginin in Stellung 8 des adrenocorticotropen Hormons ähnliche Verhältnisse gefunden (Abb. 2). Bei beiden Hormonen ist dieser Bereich für die biologische Wirkung notwendig^[17–20]. Ersatz von 8-Arginin durch

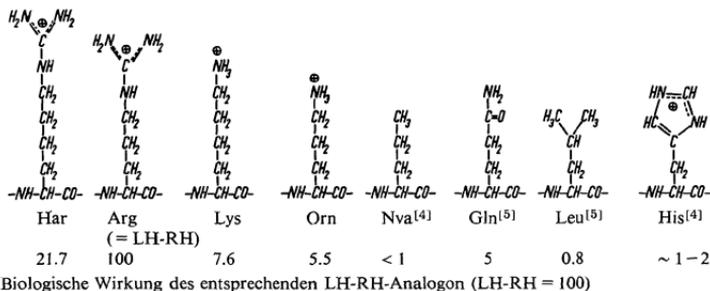


Abb. 1. Strukturvergleich von Aminosäuren, die gegen 8-Arginin in LH-RH ausgetauscht wurden.

* Schally, A. V. & Sandow, J., unveröffentlicht.

Homoarginin bewirkt beim ACTH einen Wirkungsabfall auf 25%, durch Ornithin und Lysin einen Abfall auf etwa 5%.

Die Frage, ob diese selbst in quantitativer Hinsicht verblüffende Übereinstimmung zufällig ist oder einem Strukturprinzip bei Rezeptoren für diese Hormone entspricht, muß offen bleiben.

Beschreibung der chemischen Versuche

Schmelzpunkte sind nicht korrigiert; sie wurden in offenen Kapillaren im Apparat nach Dr. Tottoli bestimmt. Die spezif. Drehwerte wurden im lichtelektrischen Polarimeter 141 der Firma Perkin Elmer gemessen, Aminosäureanalysen mit dem Analysator Uni-chrom der Fa. Beckman ausgeführt. pH-Werte wurden mit einem Autotitrator der Fa. Hillerkuus, Krefeld, gemessen bzw. konstant gehalten.

Zur chromatographischen Reinheitsprüfung dienten die üblichen Verfahren der Dünnschichtchromatographie (DC) auf Kieselgel-Fertigplatten „Merck“ (Dosierung: 20–100 µg Peptid). Als Laufmittel wurden benützt:

A. Methyläthylketon/Pyridin/Wasser/Eisessig
70:15:15:2

B. Butanol/Essigsäure/Wasser 2:1:1

C. *n*-Heptan/Pyridin/tert.-Butanol 5:1:1
 R_F (A) bedeutet R_F -Wert im Laufmittel A.

1. Z-Gly-Leu-OBu^t

42 g (0.224 mol) H-Leu-OBu^t und 46.8 g (0.224 mol) Z-Gly-OH werden mit 30.2 g (0.224 mol) 1-Hydroxybenzotriazol in 400 ml Tetrahydrofuran gelöst. Man gibt bei 0°C 49.2 g (0.238 mol) Dicyclohexylcarbodiimid in 100 ml Tetrahydrofuran zu und rührt 5 h bei Raumtemperatur. Dann filtriert man von ausgefallenem Dicyclohexylharnstoff ab und entfernt das Lösungsmittel im Vak. Der Rückstand wird in Essigester gelöst, die Essigesterlösung bei 0°C mit KHSO₄/K₂SO₄ (50 g KHSO₄+100 g K₂SO₄ pro l Wasser), dann mit 1N NaHCO₃ und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vak. eingedampft. Das zurückbleibende Öl nimmt man in 100 ml Äther auf und versetzt die ggf. filtrierte Lösung mit 1 l Petroläther. Der gallertige Niederschlag wird abzentrifugiert und mit Petroläther gewaschen. Ausb. 75.5 g (89% d. Th.).

$[\alpha]_D^{20}$: -30.1⁰ ($c=1$, in Methanol). Reinheitsprüfung durch DC in Heptan/Pyridin/tert.-Butanol 5:1:1.

C₂₀H₃₀N₂O₅ (378.5) Ber. C 63.46 H 7.99 N 7.40
Gef. C 63.7 H 8.1 N 7.4

2. H-Gly-Leu-OBu^t

75 g der Z-Verbindung werden in Methanol an Palladium hydriert, bis im Chromatogramm kein Ausgangsprodukt mehr zu erkennen ist. Nach Abdestillieren des

Methanols im Vak. bleibt ein Öl zurück. Ausb. 47 g (94% d. Th.).

3. Z-Trp-Ser-Tyr-OCH₃

Man löst 156.5 g (0.426 mol) Z-Trp-OH, 140 g (0.44 mol) H-Ser-Tyr-OCH₃×HCl*, 60 g (0.44 mol) 1-Hydroxybenzotriazol und 67 ml (0.53 mol) *N*-Äthylmorpholin in 1.3 l Dimethylformamid und gibt bei 0°C die Lösung von 100 g (0.484 mol) Dicyclohexylcarbodiimid in 150 ml Dimethylformamid zu. Man rührt 3 h bei Raumtemperatur und filtriert nach weiterem mehrstündigem Stehenlassen bei etwa 4°C von Dicyclohexylharnstoff ab. Dimethylformamid wird im Vak. abdestilliert, der Rückstand in Essigester aufgenommen, die Essigesterlösung mit 10proz. Zitronensäurelösung, 10proz. Sodaauslösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Eindampfen des Essigesters kocht man den Rückstand erneut mit 600 ml Essigester aus. Es tritt keine vollständige Lösung mehr ein, und beim Abkühlen beginnt die Kristallisation. Nach Kühlen im Eisbad werden die Kristalle abfiltriert. Ausb. 171 g (64.5% d. Th.).

$[\alpha]_D^{20}$: -6.2⁰ ($c=1$, in Dimethylformamid).

C₃₂H₃₄N₄O₈ (602.6) Ber. C 63.78 H 5.69 N 9.30
Gef. C 64.1 H 5.8 N 9.1

4. Z-Trp-Ser-Tyr-N₂H₃

83 g (0.138 mol) Z-Trp-Ser-Tyr-OCH₃ werden in 850 ml Methanol unter Erwärmen gelöst. Man kühlt auf Raumtemperatur und fügt 33.5 ml (0.67 mol) Hydrazinhydrat zu. Nach 24 h wird das ausgefallene Hydrazid abfiltriert, mit Methanol gewaschen und über H₂SO₄ im Vak. getrocknet.

Nach Pulverisieren des getrockneten Materials wird nochmals mit Methanol ausgekocht und auf gleiche Weise getrocknet. Ausb. 64.5 g (77% d. Th.), Schmp. 226–227°C.

$[\alpha]_D^{20}$: -14.3⁰ ($c=1$, in Dimethylformamid).

C₃₁H₃₄N₆O₇ (602.6) Ber. C 61.78 H 5.69 N 13.95
Gef. C 61.5 H 5.9 N 14.1

5. Z-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-OBu^t (III)

60.2 g (0.1 mol) Z-Trp-Ser-Tyr-N₂H₃ werden in 190 ml Dimethylformamid gelöst. Man gibt bei -10°C 40 ml (0.2 mol) 5N HCl zu und tropft dann bei dieser Temperatur unter starkem Rühren die Lösung von 7.25 g (0.105 mol) NaNO₂ in 15 ml Wasser ein. Nach 10 min Rühren bei -10°C gibt man einige Körnchen Harnstoff zu, nach weiteren 2 min 450 ml Essigester von -20°C und etwas NaCl. Die wäßrige Unterphase wird abgetrennt und noch zweimal mit 80 ml vorgekühltem Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterlösungen werden mit 10proz. NaCl-Lösung gewaschen, über vorge-

* Aus der Z-Verbindung⁽²¹⁾ durch katalyt. Hydrierung in Methanol in Anwesenheit der berechneten Menge HCl hergestellt.

kühltem Na_2SO_4 getrocknet und mit 26,8 g (0,11 mol) H-Gly-Leu-OBu^t versetzt. Nach 24 h (40°C) destilliert man im Vak. die Hauptmenge des Lösungsmittels ab, versetzt den Rückstand mit Äther und filtriert die feste Masse ab. Sie wird zur Reinigung mit 250 ml Methanol ausgekocht, abfiltriert und im Vak. getrocknet. Ausb. 54 g (66,5% d. Th.).

$[\alpha]_D^{25}$: -25,1° ($c=1$, in Methanol).

$\text{C}_{43}\text{H}_{54}\text{N}_6\text{O}_{10}$ (814,9) Ber. C 63,37 H 6,68 N 10,31
Gef. C 63,2 H 6,7 N 10,2

6. H-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-OBu^t × TosOH (X)

40,6 g (50 mmol) Z-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-OBu^t (III) werden in einer Mischung aus 800 ml Methanol und 200 ml Dimethylformamid katalytisch an Pd/BaSO₄ hydriert, wobei der pH-Wert durch Zutropfen von 2*N* *p*-Toluolsulfonsäure in Methanol bei 4 gehalten wird. Nach 2 h ist die Hydrierung beendet. Man filtriert über eine Klärschicht vom Katalysator ab und dampft das Filtrat im Vak. zur Trockene ein. Der harzige Rückstand wird beim Digerieren mit Äther fest. Nach Abfiltrieren, Waschen mit Äther und Trocknen über H₂SO₄ im Vak. ist die Ausbeute theoretisch. DC: R_F (A) 0,84 × Ausgangsverbindung.

7. Z-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-OBu^t (XI)

Man löst 59,3 g (197 mmol) Z-His-N₂H₃ in 590 ml 1*N* HCl bei 0°C und gibt 600 ml Essigester zu. Man tropft nun bei 0°C unter Rühren die Lösung von 14,5 g (210 mmol) NaNO₂ in 30 ml Wasser zu und rührt noch 5 min bei 0°C. Dann versetzt man mit 220 ml eiskalter 50proz. K₂CO₃-Lösung, schüttelt und trennt die Essigesterphase ab. Die wäßrige Phase wird noch zweimal mit je 100 ml Essigester bei 0°C extrahiert. Die vereinigten Essigesterlösungen werden über vorgekühltem Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und im Vak. bei 0°C Badtemperatur auf etwa 500 ml eingeeengt.

Diese Lösung gibt man zur Lösung von 85,5 g (0,1 mol) X in 500 ml Dimethylformamid. Man fügt 12,8 ml (0,1 mol) *N*-Äthylmorpholin zu, bewahrt 20 h bei +4°C auf und destilliert dann die Lösungsmittel im Vak. ab.

Der Rückstand wird in 300 ml Methanol gelöst und mit 500 ml 0,5*N* NaHCO₃ ausgefällt. Der harzige Niederschlag wird beim Verreiben mit Wasser fest. Man trocknet das Produkt über P₂O₅ im Vak., zuletzt bei 50°C, dann wird es gemörsert und zweimal mit Essigester ausgekocht. Es ist dann nahezu chromatographisch rein in den Laufmitteln A und B, in letzterem erkennt man aber noch 2 Verunreinigungen mit höherem und niedrigerem R_F-Wert, die durch das Fällen und Auskochen nicht vollständig entfernt wurden. Die Filtrate enthalten diese Verunreinigungen jedoch stark angereichert. Ausb. 87,4 g (82,7% d. Th.).

$\text{C}_{49}\text{H}_{81}\text{N}_9\text{O}_{11} \times 0,4 \text{ C}_7\text{H}_8\text{O}_3\text{S} \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (1057,0)

Ber. C 58,86 H 6,50 N 11,93 S 1,21
Gef. C 58,8 H 6,3 N 11,7 S 1,2

8. H-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-OBu^t × 2 TosOH (XII)

87 g (82 mmol) XI werden in 1 l Methanol gelöst und unter Zutropfen von 2*N* methanol. *p*-Toluolsulfonsäure bei pH 4,5 katalytisch hydriert. Nach beendeter Hydrierung filtriert man und destilliert das Lösungsmittel im Vak. ab. Der Rückstand wird mit Essigester/Äther 1:1 verrieben und über H₂SO₄ und KOH getrocknet. Ausb. 89,5 g (93,9% d. Th.).

$[\alpha]_D^{20}$: -18,5° ($c=1$, in Methanol).

$\text{C}_{41}\text{H}_{55}\text{N}_9\text{O}_9 \times 2 \text{ C}_7\text{H}_8\text{O}_3\text{S}$ (1162,3) Ber. N 10,84 S 5,52
Gef. N 10,8 S 5,2

Im DC erscheinen mehrere kleine Verunreinigungen, die aber an dieser Stelle nicht durch einfache Methoden abgetrennt werden konnten.

9. [Glu]-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-OBu^t (XIII)

46,5 g (40 mmol) XII werden in 600 ml Dimethylformamid gelöst und mit 18,1 g (48 mmol) [Glu]-OPcp und 10,24 ml (80 mmol) *N*-Äthylmorpholin versetzt. Man rührt über Nacht bei Raumtemperatur und destilliert dann das Lösungsmittel im Vak. ab. Der Rückstand wird in 200 ml Isopropanol in der Hitze gelöst. Man kühlt auf Raumtemperatur und fällt das Produkt mit Essigester aus. Die Fällung wird wiederholt. Ausbeute nach dem Trocknen 30,1 g (81% d. Th.).

$[\alpha]_D^{20}$: -22,7° ($c=1$, in Methanol).

Eine nicht gut stimmende Analyse zeigte an, daß die Substanz nicht völlig rein war. Dies wurde durch die DC bestätigt. Zwar ist überwiegend XIII vorhanden, in den Systemen A und B, besonders aber in C zeigten sich nach dem Anfärben (Reindl-Hoppe) mehrere Nebenflecken, darunter auch etwas Ausgangsprodukt XII. Weitere Versuche zur Reinigung der Verbindung durch Umfällen brachten keinen Erfolg.

10. [Glu]-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-OH (VIII)

30 g XIII werden in 120 ml Trifluoressigsäure gelöst, die 5% Thioglykol enthält. Nach 50 min fällt man mit Äther. Man filtriert den Niederschlag ab, wäscht ihn mit Äther, trocknet und behandelt ihn zur Entfernung restlicher Trifluoressigsäure mit Wasser und trocknet erneut über P₂O₅.

Die Verbindung ist nach DC uneinheitlich. Neben einem Hauptfleck treten in A und B zwei starke Nebenflecken und einige kleinere Verunreinigungen auf.

Die Verbindung war für weitere Synthesen in dieser Form nicht verwendbar. Da ihre Reinigung durch Umfällung und Extraktion nicht gelang, mußte sie durch Verteilungschromatographie an Sephadex LH 20 im System *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 2:1:10 gereinigt werden.

10 g LH-RH-(1-7)-heptapeptid VIII werden in 200 ml 5proz. Pyridin erwärmt. Man befreit von Ungelöstem durch Filtration über eine Klärschicht und destilliert das Lösungsmittel im Vak. ab. Der Rückstand wird in 25 ml Unterphase, der etwas Essigsäure zugegeben wird,

gelöst. Man bringt auf eine Säule 200×4 cm auf und eluiert mit Unterphase. Man vereinigt nach Kontrolle durch DC in den Systemen A und B alle Fraktionen, welche die reine, mit der nach 15. hergestellten Substanz chromatographisch identische Verbindung enthalten. Ausb. nach Gefriertrocknung und Trocknen über P_2O_5 im Vak. 2.5 g.

$C_{42}H_{52}N_{10}O_{11} \times 3 H_2O$ (926.5)

Ber.	C 54.45	H 6.31	N 15.12	Acetat 0
Gef.	C 54.2	H 6.2	N 15.3	Acetat < 0.3

11. Z-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-OH (IV)

40.8 g (0.05 mol) Z-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-OBu^t (III) werden in 120 ml Trifluoressigsäure 45 min bei Raumtemperatur aufbewahrt. Man destilliert dann die Trifluoressigsäure im Vak. ab und verreibt den Rückstand mehrmals mit Äther. Nach dem Trocknen wird mehrmals mit Wasser verrieben und im Vak. bei $50^\circ C$ über Natronkalk getrocknet. Ausb. quantitativ. DC: R_F (A) $0.88 \times$ Ausgangsverbindung.

$C_{30}H_{46}N_6O_{10} \times 2 H_2O$ (794.8)

Ber.	C 58.93	H 6.34	N 10.57
Gef.	C 59.0	H 6.3	N 10.7

12. H-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-OH (V)

20 g IV werden in 200 ml 90proz. Essigsäure gelöst. Man hydriert unter Durchleiten von H_2 3 h an Pd/BaSO₄, filtriert den Katalysator ab und bringt das Filtrat im Vak. zur Trockene. Der harzige Rückstand wird mit 100 ml Isopropanol ausgekocht, wobei nicht alles in Lösung geht. Man kühlt auf $4-5^\circ C$ ab. Der Niederschlag wird abfiltriert und im Vak. über P_2O_5 getrocknet. Ausb. 13.35 g. Chromatographisch nahezu einheitlich und frei von Ausgangsprodukt. Acetatgehalt < 0.3%.

13. Z-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-OH (VI)

Man stellt aus 13.3 g (44 mmol) Z-His-N₂H₃ analog 7. das Azid her, das in 100 ml Essigester enthalten ist, und vereinigt die Lösung mit der Lösung von 14.1 g (22 mmol) V in 100 ml Dimethylformamid und 24 ml Phosphorsäure-tris(dimethylamid), die 2.82 ml 22 mmol N-Äthylmorpholin enthält. Man läßt über Nacht bei $4^\circ C$ stehen, fällt mit Äther, digeriert den Niederschlag mit Äther und kocht ihn zweimal mit Essigester aus. Ausb. 17.4 g. Zur weiteren Reinigung wird in wenig Methanol gelöst und unter Rühren in 1proz. Essigsäure eingetropfelt. Der noch feuchte Niederschlag wird ohne Trocknung für die nächste Stufe verwendet. Zur Analyse wird eine Probe getrocknet und aus Isopropanol umkristallisiert. Schmp. $174-176^\circ C$ (Zers.).

$[\alpha]_D^{20}$: -8.90 ($c=1$, in 90proz. Essigsäure).

$C_{45}H_{53}N_9O_{11} \times C_3H_8O$ (956.0)

Ber.	C 60.30	H 6.43	N 13.19
Gef.	C 60.1	H 6.4	N 13.3

DC: Rein in den Systemen A und B; eine sehr geringe Verunreinigung mit niedrigerem R_F -Wert ist gerade noch zu erkennen.

14. H-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-OH (VII)

Das noch feuchte Produkt der vorangehenden Stufe wird in 100 ml 90proz. Essigsäure an Pd/BaSO₄ 3 h katalytisch hydriert. Man destilliert das Lösungsmittel im Vak. ab, löst den Rückstand in Methanol und filtriert über eine Klärschicht. Die klare, rosa gefärbte Lösung wird auf ein kleines Volumen eingengt. Man fällt mit Äther einen Niederschlag aus, der abfiltriert, mit Äther gewaschen und im Vak. über P_2O_5 und KOH getrocknet wird. Ausb. 10.7 g. DC: fast einheitlich. In System B Nebenflecken mit etwas höherem R_F -Wert, unter dem Hauptfleck undeutliche, schwache Spur zum Start.

15. $[\text{Glu}]_2$ -His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-OH (VIII)

4.8 g (5.36 mmol) VII werden in einer Mischung aus 25 ml Dimethylformamid und 5 ml Phosphorsäure-tris(dimethylamid) gelöst. Man gibt 2.47 g (8 mmol) $[\text{Glu}]_2$ -OTcp, 675 mg (5 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol und 0.6 ml (4.7 mmol) N-Äthylmorpholin zu, läßt 2 h bei Raumtemperatur stehen und fällt mit Äther 4.9 g Rohprodukt aus.

Zur Entfernung eines Nebenprodukts, bei dem $[\text{Glu}]_2$ vermutlich auch die OH-Gruppe des Tyrosins acylierte, wird in 20 ml Methanol gelöst. Man gibt 2.3 ml Hydrazinhydrat zu, versetzt nach 3 h mit 5.6 ml Aceton und fällt nach 2 min mit Äther. Der Niederschlag wird aus 100 ml Isopropanol umkristallisiert. Ausb. 2.1 g (40% d. Th.).

$[\alpha]_D^{20}$: -11.50 ($c=1$, in 90proz. Essigsäure).

DC: fast einheitlich, Verunreinigungen sind nur andeutungsweise zu erkennen. Die Verbindung ist mit der nach 10. hergestellten nach deren Reinigung identisch. Aminosäureanalyse korrekt.

In einem weiteren Versuch wurde ohne $[\text{Glu}]_2$ -OTcp-Überschuß gearbeitet. Das erwähnte Nebenprodukt trat dann nicht auf und die Reinigung durch Behandeln mit Hydrazinhydrat war nicht erforderlich. Ausb. nach Lösen in heißem Isopropanol und Abkühlen 2.9 g (56% d. Th.), identisch mit der oben erhaltenen Verbindung.

$C_{42}H_{52}N_{10}O_{11} \times C_3H_8O \times 2 H_2O$ (969.0)

Ber.	C 55.77	H 6.66	N 14.46
Gef.	C 55.3	H 6.7	N 14.6

16. Z-Pro-Gly-NH₂ (XIV)

125 g (0.5 mol) Z-Pro-OH und 55 g (0.5 mol) H-Gly-NH₂ \times HCl werden zusammen mit 64 ml (0.5 mol) N-Äthylmorpholin in 1 l Pyridin gelöst. Man kühlt auf $0^\circ C$, gibt 110 g (0.53 mol) Dicyclohexylcarbodiimid zu und rührt 5 h bei Raumtemperatur. Man filtriert ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, engt die Lösung im Vak. zur Trockene ein und nimmt den Rückstand in Methylenchlorid/Wasser auf. Die Wasserphase wird

nach Abfiltrieren von wenig restlichem Dicyclohexylharnstoff abgetrennt, die Methylchloridphase mit etwas Wasser gewaschen.

Die vereinigten Wasserphasen werden nochmals mit etwas Methylchlorid extrahiert, das Methylchlorid wird mit der Hauptmenge vereinigt.

Nun trocknet man die Lösung über Na_2SO_4 und destilliert das Lösungsmittel ab. Es bleibt ein Öl zurück, das man in 300 ml heißem Essigester löst. Beim Abkühlen fällt Z-Pro-Gly- NH_2 kristallin aus. Man wäscht die Kristalle mit Äther und trocknet im Vak. Ausb. 106 g (69% d. Th.), Schmp. 142–143°C.

$[\alpha]_D^{25}$: 38.9° ($c=1$, in Methanol).

$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$ (305.3) Ber. C 59.1 H 6.29 N 13.77
Gef. C 59.2 H 6.4 N 13.8

17. Z-Pro-Gly-NH-Mbh (XV)

Zu einer Lösung von 30.5 g (0.1 mol) Z-Pro-Gly- NH_2 und 24 g (0.1 mol) 4,4'-Dimethoxybenzhydrol in 200 ml Eisessig gibt man 0.5 ml konz. H_2SO_4 und läßt einen Tag bei Raumtemperatur stehen. Anschließend wird mit 850 ml Wasser ein Öl ausgefällt, das im Laufe von 24 h kristallisiert. Die Substanz wird abfiltriert und in Essigester gelöst. Die Essigesterlösung wird zweimal mit gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt, mit Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wird aus Essigester/Petroläther kristallisiert. Ausb. 46.3 g (87% d. Th.), Schmp. 108°C.

$[\alpha]_D^{20}$: -9.7° ($c=1$, in Dimethylacetamid).

$\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_6$ (531.6) Ber. C 67.78 H 6.26 N 7.91
Gef. C 67.4 H 6.4 N 8.1

18. H-Pro-Gly-NH-Mbh \times HCl (XVI)

45 g (84.7 mmol) Z-Pro-Gly-NH-Mbh werden in Methanol gelöst. Dazu gibt man Pd/BaSO₄-Katalysator und leitet unter Röhren Wasserstoff durch. Mit Hilfe eines Autotitrators wird durch Zugabe von 1N methanol. HCl ein pH-Wert von 4.5 gehalten. Nachdem keine Salzsäure mehr aufgenommen wird, filtriert man den Katalysator ab und engt das Filtrat ein. Der Rückstand wird mit Äther verrieben. Ausb. 33.7 g (91% d. Th.), Schmp. 233°C.

Eine Probe wurde zur Analyse aus Methanol/Äther umgefällt: Schmp. 236°C.

$[\alpha]_D^{25}$: -24.7° ($c=1$, in Dimethylacetamid).

$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4 \times \text{HCl}$ (433.9)
Ber. C 60.88 H 6.51 N 9.69
Gef. C 60.8 H 6.6 N 9.7

19. Z-Har(NO₂)-Pro-Gly-NH-Mbh (XVII)

3.67 g (10 mmol) Z-Har(NO₂)-OH^[10], 4.34 g (10 mmol) H-Pro-Gly-NH-Mbh \times HCl und 1.35 g (10 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol werden in 60 ml Dimethylformamid gelöst. Man gibt 1.28 ml (10 mmol) N-Äthylmorpholin und bei 0°C 2.2 g (10.6 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid zu, rührt 1 h bei 0°C und 3 h bei Raum-

temperatur. Dann filtriert man vom Harnstoff ab, nimmt nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels im Vak. den Rückstand in Essigester auf und wäscht nacheinander mit eiskalter 5proz. KHSO₄-Lösung, 1N NaHCO₃ und Wasser, trocknet über Na₂SO₄ und destilliert den Essigester ab. Der feste Rückstand wird mit Äther digeriert. Man saugt auf einer Nutsche trocken und erhält 7.1 g (95% d. Th.). Zur Analyse wird eine Probe aus Isopropanol umkristallisiert. Schmp. 118 bis 120°C.

$[\alpha]_D^{20}$: +7.8° ($c=1$, in Methanol).

$\text{C}_{37}\text{H}_{46}\text{N}_8\text{O}_9$ (746.8) Ber. C 59.4 H 6.21 N 15.0
Gef. C 59.4 H 6.4 N 14.0

20. Z-Har(NO₂)-Pro-Gly-NH₂ (XVIII)

5.9 g (7.9 mmol) XVII werden 2 h in 30 ml Trifluoressigsäure/Anisol (9+1) bei Raumtemperatur aufbewahrt. Man fällt mit Äther und fällt den Niederschlag aus Methanol/Äther um. Ausb. 3.3 g (80% d. Th.). Bis auf eine Spur einer ninhydrinpositiven Verbindung R_F (B) < 0.1; chromatographisch einheitlich.

$\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_8\text{O}_7$ (520.6) Ber. C 50.75 H 6.20 N 21.53
Gef. C 50.5 H 6.3 N 21.4

21. H-Har-Pro-Gly-NH₂ \times 2 TosOH (IX)

3.3 g (6.34 mmol) XVIII werden in 50 ml Methanol an Pd(BaSO₄) unter Zutropfen von 1N p-Toluolsulfonsäure in Methanol bei pH 4.5 katalytisch hydriert. Nach 4 $\frac{1}{2}$ h ist die theoret. Menge Toluolsulfonsäure verbraucht. Man filtriert vom Katalysator ab, bringt das Filtrat im Vak. zur Trockene und verreibt den Rückstand mit Äther. Ausb. 3.3 g (77% d. Th.). Bis auf eine sehr geringe ninhydrinpositive Verunreinigung mit etwas höherem R_F (A) chromatographisch einheitlich.

$\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_3 \times 2\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_3\text{S}$ (685.8) Ber. N 14.30 S 9.35
Gef. N 14.1 S 9.2

22. [Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Har-Pro-Gly-NH₂ \times TosOH (II)

435 mg (0.5 mmol) VIII und 412 mg (0.6 mmol) IX werden in 10 ml Dimethylformamid gelöst. Man gibt 135 mg (1 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol und 0.038 ml N-Äthylmorpholin zu und versetzt bei 0°C mit 165 mg (0.75 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in wenig Dimethylformamid. Man rührt 1 h bei 0°C und über Nacht bei Raumtemperatur, filtriert von etwas Harnstoff ab und bringt das Filtrat im Vak. zur Trockene. Der Rückstand wird mit Essigester und Äther digeriert und getrocknet. Rohausb. 975 mg. Die Reinigung erfolgt durch Verteilungschromatographie an Sephadex LH 20 im System n-Butanol/Eisessig/Wasser 2:1:10 in einer Säule 100 \times 4 cm analog Beispiel 10. Man erhält 240 mg (34% d. Th.) der reinen Verbindung als Tosylat.

$[\alpha]_D^{20}$: -47.3 \pm 2° ($c=0.6$, in 1proz. Essigsäure).

$\text{C}_{86}\text{H}_{177}\text{N}_{17}\text{O}_{13} \times \text{TosOH} \times 2\text{H}_2\text{O}$ (1404.6)
Ber. C 53.87 H 6.39 N 16.95 S 2.28
Gef. C 53.7 H 6.5 N 16.6 S 2.5

Literatur

- ¹ Matsuo, N., Baba, Y., Nair, R. M. G., Arimura, A. & Schally, A. V. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 1334–1339.
- ² Chang, J. K., Sievertsson, H., Currie, B. L., Bogen-toft, C., Folkers, K. & Bowers, C. Y. (1971) *J. Med. Chem.* **15**, 623–627.
- ³ Fujino, M., Kobayashi, S., Obayashi, M., Fukuda, T., Shinagawa, S., Yamazaki, I., Nakayama, R., White, W. F. & Rippel, R. H. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49**, 698–705.
- ⁴ Chang, J. K., Williams, R. A., Humphries, A. J., Johansson, N. G., Folkers, K. & Bowers, C. Y. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, 727–732.
- ⁵ Yanaihara, N., Yanaihara, C., Hashimoto, T., Kenmochi, Y., Kaneko, T., Oka, H., Saito, S., Schally, A. V. & Arimura, A. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49**, 1280–1291.
- ⁶ Schally, A. V., Arimura, A., Baba, Y., Nair, R. M. G., Matsuo, H., Redding, T. W., Debeljuk, L. & White, W. F. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 393–399.
- ⁷ Schally, A. V., Nair, R. M. G., Redding, T. W. & Arimura, A. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 7230–7236.
- ⁸ Ramirez, V. D. & McCann, S. M. (1963) *Endocrinology* **73**, 193–198.
- ⁹ Niswender, G. D., Midgley, A. R., Jr., Monroe, S. E. & Reichert, L. E., Jr. (1968) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **128**, 807–811.
- ¹⁰ Schally, A. V., Redding, T. W., Matsuo, H. & Arimura, A. (1972) *Endocrinology* **90**, 1561–1567.
- ¹¹ Geiger, R., König, W., Wissmann, H., Geisen, K. & Enzmann, F. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, 767–773.
- ¹² König, W. & Geiger, R. (1973) *Chem. Ber.* **106**, 3626–3635.
- ¹³ König, W. & Geiger, R. (1970) *Chem. Ber.* **103**, 788–798.
- ¹⁴ König, W. & Geiger, R. (1970) *Chem. Ber.* **103**, 2041–2051.
- ¹⁵ Arold, H. & Stibenz, D. (1970) *J. Prakt. Chem.* **312**, 1161–1174.
- ¹⁶ Tesser, G. I., Maier, R., Schenkel-Hulliger, L., Barthe, P. L., Kamber, B. & Rittel, W. (1973) *Acta Endocrinol. (Copenhagen)* **74**, 56–66.
- ¹⁷ Schwyzer, R., Schiller, P., Seelig, St. & Sayers, G. (1971) *FEBS Lett.* **19**, 229–231.
- ¹⁸ Geiger, R. (1971) *Angew. Chem.* **83**, 155–162; *Int. Ed. Engl.* **10**, 152–160.
- ¹⁹ Rivier, J., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Amoss, M., Blackwell, R. & Guillemin, R. (1973) *J. Med. Chem.* **16**, 545–549.
- ²⁰ Coy, D. H., Coy, E. J. & Schally, A. V. (1974) in *Structure Activity Relationship of the LH and the FSH Releasing Hormone in Methods in Neurochemistry* (Marks, N. & Rodnight, R., Hrsg.) Plenum Press, im Druck.
- ²¹ Guttmann, St. & Boissonnas, R. A. (1958) *Helv. Chim. Acta* **41**, 1852–1867.
- ²² Borvendég, J., Bajusz, S., Hermann, I. & Turán, A. (1974) *FEBS Lett.* **44**, 233–235.