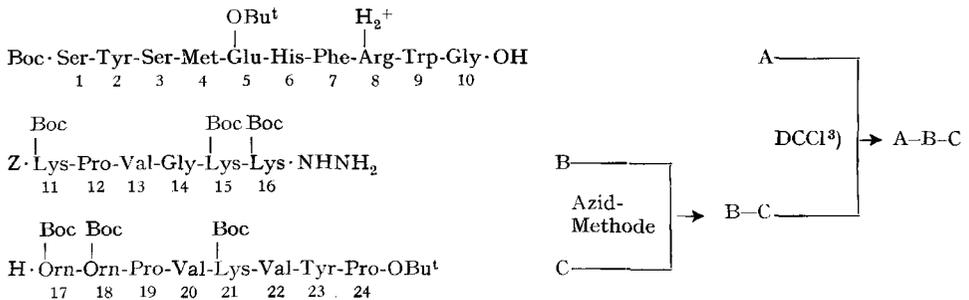


Arg \rightarrow Lys entspricht demjenigen von Arg \rightarrow Orn, indem in beiden Fällen die Guanidino-Funktion durch eine Aminogruppe ersetzt ist).

Das hier beschriebene 17,18-Diornithin- β -corticotropin-(1-24)-tetracosapeptid (III) besass überraschenderweise im *in-vitro*-Teste nach SAFFRAN & SCHALLY und *in vivo* bei subcutaner Applikation (Bedingungen und Lit. vgl. [1]) eine ebensostarke corticotrope Wirkung wie das Tetracosapeptid I. Die lipotrope Wirkung erwies sich als etwas schwächer, die Wirkung auf die Melanophoren der Froschhaut [1] war *in vitro* sogar 1-3mal stärker²⁾.

Anlage und Ausführung der Synthese. – Zum Aufbau des Tetracosapeptides III wurden die Methoden kombiniert, welche zur Synthese des β -Corticotropin-(1-24)-tetracosapeptids (I) [1] und des natürlichen Hormons, β -Corticotropin-(1-39)-nonatriacontapeptid [6] [7], entwickelt worden waren. In den Zwischenprodukten waren die Aminogruppen an Seitenketten sowie am N-Terminus (Ser¹) mit *t*-Butyloxy-carbonyl-Gruppen geschützt, währenddem die beiden Carboxylgruppen (Pro²⁴, β -COOH-Glu⁵) als *t*-Butylester vorlagen. Die Imidazolyl- und Hydroxyl-Gruppen (His⁶, Ser^{1,3}, Tyr^{2,23}) waren nicht geschützt, und der einzige Guanidylrest (Arg⁸) war protoniert. Die Unterteilung der Peptidsequenz in Zwischenprodukte ist im *Schema 1* angegeben.



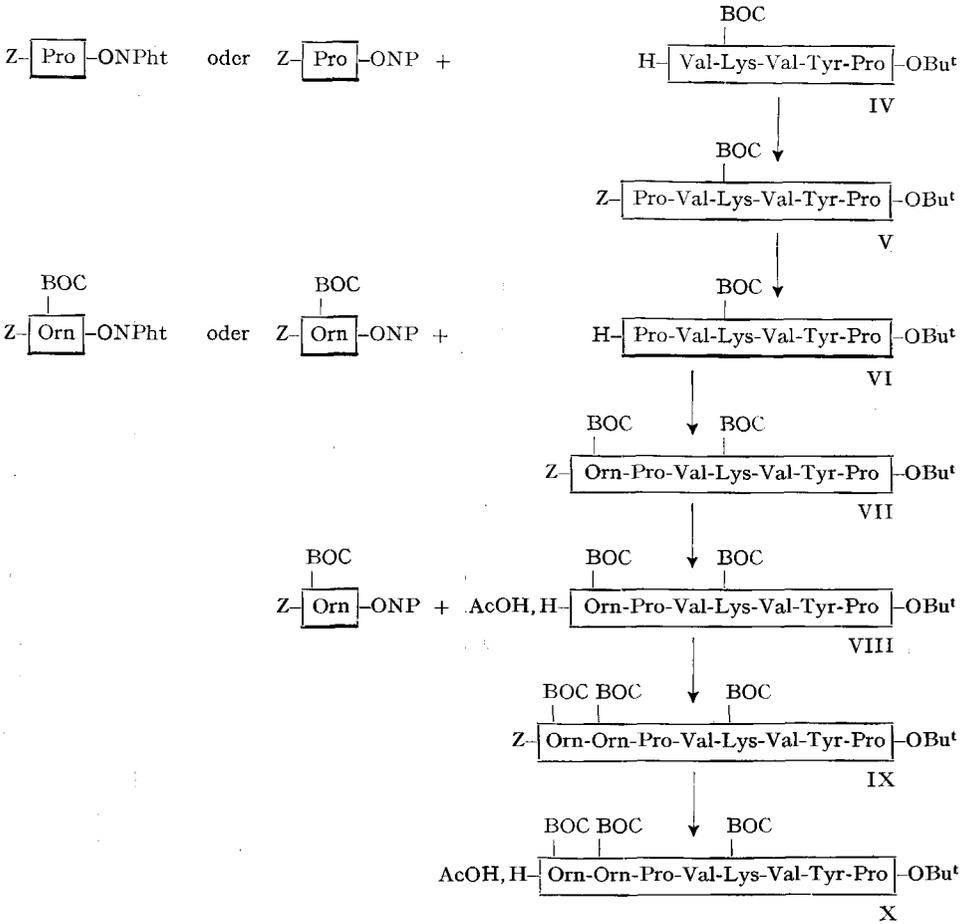
Schema 1. Zwischenprodukte und Prinzip des Aufbaues der Peptidkette von III

Die vorliegende Synthese erwies sich – offenbar wegen des Fehlens der beiden Amidinreste – als wesentlich einfacher als diejenige von I. Die Zwischenprodukte waren leicht rein zu erhalten, so dass lediglich das letzte, das völlig geschützte Tetracosapeptid XVI, der multiplikativen Verteilung unterworfen werden musste.

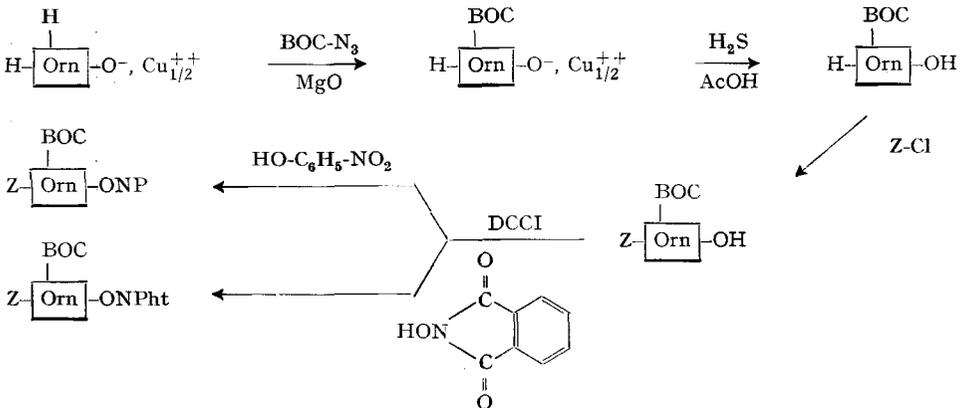
Schema 2: Aus dem Pentapeptidester IV [9] wurde durch stufenweise Kettenverlängerung gegen den N-Terminus hin das C-terminale β -Corticotropin-(17-24)-octapeptid-Derivat X hergestellt. Zur Kondensation wurden Nitrophenylester, bzw. Hydroxyphthalimidester [10] des Carbobenzoxy-L-prolins und des N^α-Carbobenzoxy-N^δ-*t*-butoxycarbonyl-L-ornithins (deren Synthese analog derjenigen der entsprechenden Lysin-Derivate [11] ausgeführt wurde; *Schema 3*) benutzt. Die mit den N-Hydroxyphthalimidestern erzielten Ergebnisse waren mit denen der *p*-Nitrophenylester-Methode vergleichbar und besaßen den Vorteil der viel kürzeren Reaktionsdauer (nur 15 Min.).

²⁾ Die Bestimmung der biologischen Wirkung verdanken wir Frau Dr. B. SCHÄR und den Herren Dres. P. DESAULLES und R. MAIER der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT.

³⁾ DCCl = Dicyclohexyl-carbodiimid; erste Anwendung zur Peptidsynthese vgl. [8].



Schema 2. Synthese des geschützten Orn^{17,18}-β-Corticotropin-(17-24)-octapeptids (X)



Schema 3. Synthese von N^α-Carbobenzoxy-N^ε-t-butoxycarbonyl-L-ornithin-p-nitrophenyl- und -N-hydroxyphthalimid-ester (Z = Carbobenzoxy-)

Der geschützte N^α -Carbobenzoxy-hexapeptidester V konnte zwar aus Acetonitril kristallisiert werden, doch zerfielen beim Trocknen die offenbar instabilen Solvat-Kristalle in Acetonitril und amorphes Peptid-Derivat. Dagegen konnte das Hexapeptid-Derivat VI – ohne Carbobenzoxygruppe – in stabiler, kristalliner Form erhalten werden.

Während der letzten Stufe der Synthese des geschützten Octapeptides (VIII \rightarrow IX) darf kein Triäthylamin zur Bindung von Säure zugegeben werden, da sonst in grosser Menge ein dünn-schichtchromatographisch nachweisbares Nebenprodukt entsteht, dessen Natur noch nicht aufgeklärt ist. Es könnte sich um ein diastereomeres Octapeptid-Derivat (N^α -Carbobenzoxy- N^ϵ -*t*-butoxycarbonyl-D-ornithin am N-Terminus) handeln, oder aber um eine Verbindung mit mehr als zwei Ornithinresten (die Aminosäurenanalyse des unreinen Octapeptid-Derivates zeigt 2,5 Orn-Reste an).

Schema 4: Das geschützte β -Corticotropin-(11–16)-hexapeptid-hydrazid (XI)⁴ wurde in Dimethylformamid bei tiefer Temperatur mittels Salzsäure und Natriumnitrit in Azid XII umgewandelt und *in situ* mit dem Octapeptidester X umgesetzt. Bei Anwendung eines 20-proz. Überschusses an Azid konnte eine fast quantitative Ausbeute an analysenreinem Tetradecapeptid-Derivat XIII erhalten werden. Die Hydrierung (Entfernung der N-terminalen Carbobenzoxygruppe) von XIII zu XIV verlief glatt bei Atmosphärendruck in Methanol mit Essigsäure unter Verwendung von Pd-Kohle-Katalysator. Der Austausch der Acetat-Anionen gegen Toluolsulfonat Ionen wurde wie üblich [12] mittels *p*-Toluolsulfonsäure in Pyridin vorgenommen.

Die Kondensation des Decapeptid-Derivates XV [13] mit XIV wurde mit Dicyclohexyl-carbodiimid in Pyridin ausgeführt [1]. Das geschützte Tetracosapeptid XVI wurde mittels multiplikativer Verteilung gereinigt und (durch Verwendung eines Acetatpuffers im Verteilungssystem) gleichzeitig in das Acetat übergeführt.

Die Abspaltung der Schutzgruppen mittels 90-proz. Trifluoressigsäure [14] lieferte in quantitativer Ausbeute chromatographisch und elektro-phoretisch einheitliches Material (III; insbesondere ist das Oxydationsprodukt, Methioninsulfoxid⁴- β corticotropin-(1–24)-tetracosapeptid, welches ebenfalls hergestellt und dünn-schicht chromatographisch identifiziert wurde, ausgeschlossen).

Experimenteller Teil

Smp. wurden mit Heiztisch-Mikroskop (LEITZ) bestimmt und sind nicht korr. Drehung des polarisierten Lichtes wurde mittels ZEISS-Winkel-Polarimeter bestimmt. Dünn-schichtchromatogramme wurden auf Schichten von Kieselgel G (als «DS» bezeichnet) oder von Aluminiumoxid G («DA») mit den folgenden Laufmitteln ausgeführt:

System	41	<i>t</i> -BuOH, <i>n</i> -BuOH, H ₂ O (4:3:3 Vol.)
	43a	<i>t</i> -Amylalkohol, Isopropanol, H ₂ O (100:40:10)
	43c	<i>t</i> -Amylalkohol, Isopropanol, H ₂ O (100:40:55)
	45	<i>sec</i> -BuOH, gesättigt mit 3-proz., wässrigem NH ₃
	52	<i>n</i> -BuOH, Eisessig, H ₂ O (100:10:30)
	54	<i>sec</i> -BuOH, Isopropanol, Monochloressigsäure, H ₂ O (70 ml : 10 ml : 3 g : 40 ml)
	100	Essigester, Pyridin, Eisessig, H ₂ O (62:21:6:11)
	101	<i>n</i> -BuOH, Pyridin, Eisessig, H ₂ O (30:20:6:24)

⁴) Hergestellt aus dem entsprechenden Hexapeptid-methylester [2] nach Angaben von Herrn Dr. W. RITTEL.

Trocknung zur Analyse bei 0,01 Torr und 60° während 4 Std. Elektropherogramme auf Papier wurden in einer gekühlten Apparatur ausgeführt und mit Ninhydrin entwickelt.

Die Ausführung von Papier- und Dünnschichtchromatogrammen verdanken wir dem Chromatographielaboratorium (Dr. R. NEHER und E. VON ARX), diejenige der Mikroanalysen dem Mikroanalytischen Laboratorium (Dr. W. PADOWETZ) der CIBA AKTIENGESSELLSCHAFT. Quantitative Aminosäureanalysen wurden in freundlicher Weise von Herrn Dr. H. ZUBER (CIBA) ausgeführt.

Schema 3. – *Kupfer(II)-Salz von N^δ-t-Butyloxycarbonyl-L-ornithin*: Es wurde die Methode von SCHWYZER & RITTEL [11] für das entsprechende Derivat des L-Lysins genau befolgt, nur wurde anstelle des L-Lysins die entsprechende Menge L-Ornithin eingesetzt. 500 mg des entstandenen Kupfer(II)-Komplexes wurden in einem Gemisch von je 20 ml Methanol und Wasser gelöst; durch langsames Abdestillieren i. V. wurde das Komplexsalz kristallisiert.

$C_{20}H_{38}O_8N_4Cu$ (526,08) Ber. C 45,66 H 7,29 N 10,64% Gef. C 45,33 H 7,36 N 10,74%

N^δ-t-Butyloxycarbonyl-L-ornithin: 32,5 g (61,8 mMol) des oben beschriebenen Cu-Salzes wurden in einem Gemische von 250 ml 6-proz. Essigsäure, 500 ml Wasser und 250 ml Methanol suspendiert. Nun hat man das Gemisch mit Schwefelwasserstoff gesättigt und dann während 4 Std. unter H₂S gerührt. Das CuS wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde i. V. stark eingeeengt und dann der Gefriertrocknung unterworfen: Rückstand 28,7 g weisses Pulver, welches nach Elektrophorese bei pH = 1,9 und nach DS 41,45 und 54 noch ca. 2% unsubstituiertes Ornithin enthielt. Dieses Produkt hat man direkt zur Herstellung des N^α-Carbobenzoxy-N^δ-t-butoxycarbonyl-L-ornithins verwendet, da man das letztere durch Kristallisieren leicht reinigen kann (Probe: vollständige Freilegung der N^δ-Aminogruppe durch kurze Behandlung mit CF₃COOH).

Zur Analyse wurde eine Probe in 50-proz. Methanol gelöst und durch Eindengen i. V. umkristallisiert; dadurch wurde das freie Ornithin vollständig entfernt. DS: Rf = 0,35 (41); 0,28 (45); 0,51 (54). Smp. 180° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = +6,1^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,34$ in 2N Ammoniak).

$C_{10}H_{20}O_4N_2$ (232,28) Ber. C 51,70 H 8,68 N 12,06% Gef. C 51,46 H 8,78 N 11,71%

Sollten grössere Mengen Ornithin anwesend sein, so können diese vorteilhaft entfernt werden durch Auflösen des Produktes in heissem Methanol unter tropfenweisem Zusatz von soviel Wasser, dass die Hauptmenge der Substanz gelöst wird, das Ornithin aber ungelöst bleibt, Abfiltrieren und Filtrat Verdampfen.

N^α-Carbobenzoxy-N^δ-t-butyloxycarbonyl-L-ornithin: 26 g (112 mMol) N^δ-t-Butyloxycarbonyl-L-ornithin (Rohprodukt) wurden in üblicher Weise mit einem kleinen Überschuss von Carbobenzoylchlorid nach SCHOTTEN-BAUMANN umgesetzt. Ansäuern auf pH = 3 mit Zitronensäure (0°), Extraktion mit Äther von 37,8 g (92%) eines farblosen Öls.

Dicyclohexylaminsalz: 1 g dieses Öls wurde in 5 ml Äther gelöst und mit 600 mg Dicyclohexylamin zur Kristallisation gebracht. Waschen mit Äther: 1,28 g (85%), Smp. 133°. Umkristallisieren aus Toluol, Smp. unverändert. $[\alpha]_D^{23} = +5,4^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 5,03$ in Methanol).

$C_{30}H_{49}O_6N_3$ (547,72) Ber. C 65,78 H 9,02 N 7,67% Gef. C 65,67 H 9,12 N 7,65%

Freie Säure: Der Hauptanteil des Öls kristallisierte nach Auflösen in 100 ml warmem Diisopropyläther und Kühlen: Smp. 99°. Umkristallisieren aus 100 ml Diisopropyläther unter Zugabe von 20 ml Essigester: Smp. 101°. $[\alpha]_D^{21} = -3,2^\circ \pm 0,6^\circ$ ($c = 2,45$ in abs. Methanol).

$C_{15}H_{26}O_6N_2$ (366,40) Ber. C 59,00 H 7,15 N 7,65% Gef. C 58,91 H 7,17 N 7,84%

5 mg des analytisch reinen Materials wurden in 0,1 ml Trifluoressigsäure gelöst und nach 30 Min. bei Z. T. i. V. verdampft. Im Rückstand waren im Dünnschichtchromatogramm höchstens Spuren von Ornithin nachweisbar, im Elektropherogramm (pH = 1,9) gar keines.

N^α-Carbobenzoxy-N^δ-t-butyloxycarbonyl-L-ornithin-p-nitrophenylester: 14,6 g Z-Orn(Boc)-OH (obiges Präparat; 40 mMol) wurden zusammen mit 6,6 g p-Nitrophenol in 100 ml Essigester gelöst, auf 0° gekühlt und mit einer Lösung von 8,24 g (40 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid in 50 ml Essigester versetzt. Aufbewahren 2 Std. bei 0°, 20 Std. bei Z. T.; Filtration von Dicyclohexylharnstoff (8,0 g = 93%); Verdampfen des Filtrats i. V. zu dickem Sirup; Kristallisation aus 75 ml Äthanol; mit Diisopropyläther gewaschen: 13,4 g (71%) analysenreiner Ester. Smp. 104°; $[\alpha]_D^{22} = -26,7^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 5,6$ in Methanol). Gut löslich in Dimethylformamid, Aceton und Methylen

chlorid, etwas weniger in Äthanol, Acetonitril, Essigester und Äther, fast unlöslich in Diisopropyläther und Petroläther.

$C_{24}H_{29}O_8N_3$ (487,50) Ber. C 59,12 H 6,00 N 8,62% Gef. C 59,21 H 6,14 N 8,72%

N^α-Carbobenzoxy-N^δ-t-butylloxycarbonyl-L-ornithin-hydroxyphthalimidester: 3,66 g (10 mMol) Z-Orn(Boc)-OH wurden in 5 ml trockenem Pyridin gelöst, auf -10° gekühlt und mit einer Lösung von 2,06 g (10 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid in 5 ml Pyridin versetzt. Nach 5 Min. wurden 1,96 g (12 mMol) N-Hydroxyphthalimid zugegeben und das Gemisch 16 Std. bei 0° aufbewahrt. Filtration von Dicyclohexylharnstoff; Filtrat i. V. bei 40° zur Trockne verdampft, mit *sec*-Butanol versetzt und wieder verdampft. Kristallisation aus Äther bei -8° : 4,5 g (88%); Smp. 125–127°. Lösen in Acetonitril, Filtration von wenig Dicyclohexylharnstoff und N-Hydroxyphthalimid; Kristallisation durch Zugabe von Diisopropyläther zum Filtrat: 3,12 g (61%) reines Produkt. Zur Analyse wurden 250 mg aus 2 ml Isopropanol umkristallisiert. Smp. 129° ; $[\alpha]_D^{27} = -25,7^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$ in Methanol).

$C_{26}H_{29}O_8N_3$ (511,52) Ber. C 61,05 H 5,71 N 8,22% Gef. C 60,76 H 5,89 N 8,33%

Schema 2. – *Z-Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-OBu^t (V)*. – a) *Nach der p-Nitrophenylester-Methode*: 5,14 g (6,75 mMol) H-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-OBu^t, CH₃COOH (IV) wurden zusammen mit 3,01 g (8,15 mMol) Carbobenzoxy-L-prolin-*p*-nitrophenylester [15] in 10 ml Dimethylformamid gelöst. Nach 20 Std. bei Z. T. wurde mit 100 ml Essigester verdünnt und mit 50 ml Wasser, viermal mit 25 ml 1M K₂CO₃-Lösung und zweimal mit 25 ml Wasser gewaschen. Die Essigesterschicht wurde bei 0° zweimal mit je 25 ml 1-proz. Zitronensäure-Lösung gewaschen. Neutralwaschen mit Wasser und Trocknen mit Na₂SO₄. Fälln aus Essigester mit Äther. Versetzte man eine konzentrierte Lösung in Methanol, die noch etwas Acetonitril enthielt, mit Äther bis kaum zur beginnenden Trübung und bewahrte man 20 Std. bei 0° auf, so schieden sich grobe Kristalle aus, die man rasch abnutschte. Nach Entfernung der Lösungsmittel verliefen die Kristalle auf der Nutsche; die Substanz wurde aus Essigester-Äther umgefällt und als amorphes Pulver erhalten: Ausbeute 97%. DS-einheitlich: Rf = 0,97 (Methanol); 0,26 (HCCl₃-Methanol, 95:5); 0,69 (43a); 0,47 (Benzol-Aceton, 1:1). Smp. 156–180°; $[\alpha]_D^{21} = -94,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,09$ in Methanol); $-46,4^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,01$ in Dimethylformamid).

$C_{52}H_{77}O_{12}N_7$ (992,19) Ber. C 62,94 H 7,82 N 9,88% Gef. C 62,67 H 7,96 N 9,91%

b) *Nach der Hydroxyphthalimidester-Methode*: 7,61 g (10 mMol) H-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-OBu^t, CH₃COOH (IV) wurden in 15 ml Dimethylformamid und 1,4 ml (10 mMol) Triäthylamin gelöst. Bei -10° wurden 12 mMol (4,73 g) Carbobenzoxy-L-prolin-hydroxyphthalimidester [10] zugegeben. Das Reaktionsgemisch färbte sich alsbald dunkelrot und es wurde, sobald sich aller aktiver Ester gelöst hatte (ca. 15 Min.), aufgearbeitet. Verdünnen mit Essigester, Waschen mit NaHCO₃-Lösung. Fälln des Produktes mit viel Petroläther: 9,83 (99%) chromatographisch reines Hexapeptidderivat V, identisch mit dem oben beschriebenen Produkt.

H-Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-OBu^t (VI): 6,5 g (6,55 mMol) Z-Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-OBu^t (V) wurden in 150 ml Methanol in Gegenwart von 1,3 g 10-proz. Palladiumkohle während 23,5 Std. mit Wasserstoff geschüttelt. Nach Filtration vom Katalysator wurde eingeengt und kristallisiert: 4,66 g (83%) nadelförmige Kristalle. Smp. 174–176°; $[\alpha]_D^{20} = -91^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,87$ in Methanol). Löslich in Methanol, Aceton und Dimethylformamid, weniger löslich oder unlöslich in Essigester, Äther und Petroläther.

$C_{44}H_{71}O_{10}N_7$ (858,06) Ber. C 61,59 H 8,32 N 11,43% Gef. C 61,59 H 8,38 N 11,21%

Z-Orn(Boc)-Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-OBu^t (VII). – a) *Nach der Nitrophenylester-Methode*: 2,3 g (2,5 mMol) H-Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-OBu^t (als Acetat) wurden in 5 ml Dimethylformamid gelöst und mit 1,71 g (3,5 mMol) Z-Orn(Boc)-ONp versetzt. Nach 24 Std. bei Z. T. wurde das Reaktionsprodukt mit 200 ml Äther ausgefällt: 2,73 g (90%), DS-einheitlich: Rf = 0,37 (Benzol-Aceton, 1:1); 0,47 (CHCl₃-Methanol, 9:1); 0,77 (43a); 0,92 (52). Smp. 142–145°; $[\alpha]_D^{20} = -38,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,061$ in Dimethylformamid); $-90^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,970$ in Methanol). Analysenpräparat aus Methanol-Essigester umgefällt. Gut löslich in Dimethylformamid, Aceton, Eisessig, Methanol, Äthanol; schwerer löslich in Acetonitril, unlöslich in Essigester, Äther, Petroläther.

$C_{62}H_{95}O_{15}N_9$ (1206,45) Ber. C 61,72 H 7,94 N 10,44% Gef. C 61,85 H 7,93 N 10,30%

b) *Nach der Hydroxyphthalimidester-Methode*: 429 mg (0,5 mMol) H-Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-OBu^t (VI) wurden in 2 ml Dimethylformamid gelöst und mit 305 mg (0,6 mMol) N^α-Carboxybenzoxymethyl-*N*-butyloxycarbonyl-L-ornithin-*N*-hydroxyphthalimidester [Z-Orn(Boc)·ONPht] versetzt. Es wurde 0,14 ml (1 mMol) Triäthylamin zugegeben (Rotfärbung). Nach 15 Min. wurde das Reaktionsprodukt wie oben mit Äther ausgefällt: 536 mg chromatographisch einheitliches Produkt (VII), identisch mit dem sub a) beschriebenen.

H-Orn(Boc)-Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-OBu^t, AcOH (VIII): Hydrierung von 1 g (0,83 mMol) Z-Orn(Boc)-Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-OBu^t (VII) in 25 ml 80-proz. Essigsäure mit Pd-Kohle ergab 956 mg (100%) dünnstichtchromatographisch reines Produkt (Rf-Werte gleich wie beim unten beschriebenen, acetatfreien Peptidderivat). $[\alpha]_D^{20} = -87^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,028$ in Methanol); $-27^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,095$ in 80-proz. Essigsäure).

Das acetatfreie H-Orn(Boc)-Pro-Val-Lys(Boc)-Bal-Tyr-Pro-OBu^t wurde durch Hydrierung von 1 g VII mittels Pd-Kohle in Methanol erhalten. DS-einheitlich, Rf = 0,68 (52); 0,13 (Methanol-HCCl₃, 90:10); 0,22 (43a); 0,00 (Benzol-Aceton, 1:1). Totalhydrolyse und Aminosäureanalyse ergab: 2,04 Pro, 2,00 Val, 0,98 Tyr, 1,06 Orn, 1,08 Lys.

Z-Orn(Boc)-Orn(Boc)-Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-OBu^t (IX): 2,69 g (2,38 mMol) Heptapeptidester-acetat VIII in 5 ml Dimethylformamid wurden mit 1,4 g (2,86 mMol) N^α-Carboxybenzoxymethyl-*N*-butyloxycarbonyl-L-ornithin-*p*-nitrophenylester über Nacht bei 20° aufbewahrt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 0,01 Torr eingengt und mit 100 ml Acetonitril versetzt. Die farblose Fällung wurde nach 3 Std. bei 0° abgenutscht und mit Acetonitril gewaschen: 3,15 g (93%), Smp. 152–154°, $[\alpha]_D^{21} = -83,3^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,05$ in Methanol). DS-einheitlich: Rf = 0,54 (HCCl₃-Methanol, 95:5); 0,56 (Benzol-Aceton, 1:1). Eine Probe wurde aus Methanol-Acetonitril umgefällt, wobei sich die Eigenschaften nicht veränderten. Gut löslich in Dimethylformamid, Eisessig, Methanol und Äthanol, schwerlöslich in Acetonitril, Essigester und Äther.

C₇₂H₁₁₃O₁₈N₁₁ (1420,71) Ber. C 60,86 H 8,02 N 10,84% Gef. C 60,91 H 8,27 N 10,70%

Aus einem Ansatz, der neben einem erheblich grösseren Überschuss von aktiviertem Ester auch noch Triäthylamin enthielt, wurde ein uneinheitliches Endprodukt isoliert. Es zeigte im DS-Chromatogramm zwei dicht nebeneinanderliegende, offensichtlich gleich starke Flecke. Im Gemisch wurde das Verhältnis Orn:Lys zu 2,45:1 bestimmt. Daraus kann geschlossen werden, dass ein etwa 1:1-Gemisch von zwei Substanzen mit respektive zwei und drei Ornithylresten vorliegt (Ornithyl an der OH-Gruppe des Tyrosins?).

H-Orn(Boc)-Orn(Boc)-Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-OBu^t, AcOH (X): Hydrierung von IX in 80-proz. Essigsäure ergab, nach Filtration, Verdampfen des Lösungsmittels (Badtemperatur höchstens 30°, sonst treten im Chromatogramm Nebenflecke auf!) und Fällen aus Methanol-Äther, DS-einheitliches X: Rf = 0,06 (HCCl₃-Methanol, 95:5); 0,22 (HCCl₃-Methanol, 90:10). $[\alpha]_D^{25} = -49,4^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,942$ in Dimethylformamid); $-85,6^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,266$ in Methanol).

Das acetatfreie Octapeptidderivat wurde durch entsprechende Hydrierung in Methanol gewonnen. Verhalten im DS-Chromatogramm genau wie X-Acetat. Smp. 142–144°; $[\alpha]_D^{25} = -51,8^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,247$ in Dimethylformamid); $-87,7^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,079$ in Methanol).

Schema 4. - *Z-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Orn(Boc)-Orn(Boc)-Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-OBu^t (XIII)*: 900 mg (0,80 mMol) Z-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-NHNH₂ (XI), hergestellt⁴⁾ aus dem beschriebenen Methyl ester [2], wurden in 9 ml reinem Dimethylformamid gelöst und die Lösung auf -10° gekühlt. Nach Zusatz von 1,6 ml 2N HCl und 0,18 ml 5N NaNO₂-Lösung wurde 10 Min. bei -10° gerührt, worauf eine Lösung von 900 mg (0,67 mMol) Octapeptidester-acetat X in 9 ml Dimethylformamid zugesetzt wurde. Nach Zugabe von 0,53 ml (4,0 mMol) Triäthylamin wurde das Reaktionsgemisch 18 Std. bei 0° belassen. Die trübe gewordene Lösung wurde hierauf eingedampft und der Rückstand mit Acetonitril verrieben. Das unlösliche Tetradecapeptidderivat wurde abgenutscht und dreimal mit je 25 ml Acetonitril gewaschen: 1,554 g (98%) schwach gelbliches Pulver. DS-chromatographisch war neben dem Hauptprodukt eine Spur eines Nebenproduktes, aber keines der beiden Ausgangsmaterialien erkennbar. DS: Rf = 0,31 (HCCl₃-Methanol, 95:5); 0,76 (Dioxan-Wasser, 95:5). Das Produkt war amorph, hatte aber einen scharfen Smp. 192–194°. $[\alpha]_D^{25} = -37,8^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,050$ in Dimethylformamid). Zur Analyse wurde aus heissem Methanol umgefällt [7] und während 15 Std. bei 100° und 0,02 Torr von stark anhaftenden Spuren von Methanol befreit.

C₁₁₇H₁₉₂O₃₀N₂₀ (2358,87) Ber. C 59,57 H 8,20 N 11,88% Gef. C 59,33 H 8,36 N 11,72%

H-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Orn(Boc)-Orn(Boc)-Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-OBu^t, Tos-OH (XIV): 2,36 g (1 mMol) des geschützten Tetradecapeptids XIII wurden in etwa 250 ml Methanol und 1 ml Eisessig unter Zusatz von 1 g Pd-Kohle-Katalysator (10% Pd) hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Verdampfen des Lösungsmittels verblieb das Hydrierungsprodukt als Acetat; dünnschichtchromatographisch war kein XIII mehr nachweisbar. Zur Umwandlung ins Tosylat wurde das Acetat in wenig Pyridin gelöst und mit einer Lösung von 190 mg (1 mMol) *p*-Toluolsulfonsäure-monohydrat in 5 ml Pyridin versetzt. Mehrmaliges Verdampfen mit Pyridin (i. V.) entfernte alle Essigsäure und das Wasser. Rückstand mit Äther verreiben: 1,98 g Tosylat XIV. DS-einheitlich, Rf = 0,49 (43c); 0,61 (52). $[\alpha]_D^{25} = -65,4 \pm 1^\circ$ ($c = 1,980$ in Pyridin). Smp. 179–181°.

$C_{116}H_{194}O_{31}N_{20}S$ (2396,94) Ber. N 11,69% Gef. N 11,56%

Boc-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OBu^t)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Orn(Boc)-Orn(Boc)-Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr-Pro-OBu^t, AcOH (XVI): 720 mg (0,3 mMol) Tetradecapeptidester-monotosylat XIV und 480 mg geschütztes Decapeptid XV wurden zusammen während $\frac{1}{2}$ Std. in 6 ml Pyridin gerührt. Dann hat man 220 mg (1,07 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid [8] zugesetzt und das Reaktionsgemisch während 3 Tagen bei Z. T. gerührt, wobei es sehr zähflüssig wurde. Nach Zusatz von weiteren 10 ml Pyridin wurden 65 mg Dicyclohexylharnstoff abgetrennt, die Lösung i. V. eingengt und der Rückstand mit 100 ml Essigester verrieben. Unlösliches: 1180 mg.

Zur Reinigung und gleichzeitigen Umwandlung ins Acetat hat man dieses Produkt in drei Verteilungselemente einer automatischen Verteilungsapparatur nach CRAIG (mit je 10 ml Ober- und Unterphase) eingefüllt und im Lösungsmittelsystem Methanol-Pufferlösung-Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff (10:3:6:4 Vol.) (Pufferlösung = 28,5 ml Eisessig + 19,25 g Ammoniumacetat, mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt) über 300 Stufen multiplikativ verteilt⁵⁾. Die Lage des Verteilungsmaximums wurde ermittelt durch Auftropfen genau gemessener Mengen der Unterphasen auf Papier und Ausführung der PAULY-Reaktion: $r_{max} = \text{Nr. 75}$; $K = 0,33$. Die Elemente 63–89 enthielten DS-einheitliches Material (650 mg), Rf = 0,64 (43c); 0,50 (52). DA: Rf = 0,47 (100). Smp. 195–200°; $[\alpha]_D^{20} = -55 \pm 3^\circ$ ($c = 0,51$ in Methanol).

$C_{178}H_{282}O_{47}N_{36}S$ (3722,48) Ber. C 57,75 H 7,64 S 0,86% Gef. C 57,21 H 7,74 S 0,90%

H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Orn-Orn-Pro-Val-Lys-Lys-Tyr-Pro-OH (Hexa-acetat?) (II): 420 mg des geschützten Tetracosapeptids XVI wurden 30 Min. bei 20° mit 10 ml 90-proz. Trifluoressigsäure behandelt. Darauf hat man im Rotationsverdampfer bei 40° Badtemperatur und 10 Torr au fca. 2 ml eingengt, 10 ml Wasser zugefügt, nochmals auf 5 ml eingedampft und dann lyophilisiert: 510 mg Trifluoressigsäure. Dieses hat man zur Umwandlung ins Acetat in 5 ml Wasser gelöst und durch eine kurze Säule von schwach basischem Ionenaustauscher in der Acetatform filtriert. Lyophilisieren ergab 390 mg chromatographisch und elektrophoretisch einheitliches 17,18-Diornithin- β -corticotropin-(1–24)-tetracosapeptid (III) als farbloses, im Wasser leichtlösliches Pulver. DA: Rf = 0,43 (101). Hochspannungselektrophorese (25 V/cm, pH = 6,2, 2 Std.): einzelner Fleck, 11,5 cm gegen Kathode gewandert.

Aminosäurebestimmung im Totalhydrolysat (20 Std., 115°, 20% HCl): 1,0 His; 4,35 Lys; 2,15 Orn; 1,05 Arg; 1,6 Ser; 0,9 Glu; 3,45 Pro; 1,8 Gly; 3,0 Val (Bezugswert); 0,95 Met; 1,95 Tyr; 1,0 Phe.

SUMMARY

β -Corticotropin (ACTH) possesses a striking sequence of basic amino-acids -Lys-Lys-Arg-Arg- (No. 15–18) which is apparently necessary for the corticotropic activity: synthetic N-terminal peptides containing this sequence are active, those lacking for example the two arginines as in the hexadecapeptide II [2] [3] [4] are essentially inactive. We have synthesized 17,18-diornithine- β -corticotropin-(1–24)-

⁵⁾ Die Ausführung der Verteilung auf einen fahrbaren Automaten der Fa. WILLY SCHMID, Glas-techn. Werkstätte, Basel, verdanken wir Herrn Dr. B. RINIKER.

tetracosapeptide (III), an analogue of the highly active β -corticotropin-(1-24)-tetracosapeptide (I), in which the arginine residues 17 and 18 are replaced by ornithine. Quite unexpectedly this analogue is as highly potent *in vitro* (SAFFRAN & SCHALLY) and *in vivo* (s.c. application, SAYERS test) as the tetracosapeptide with the 'natural' sequence. This equal potency holds also for lipotropic and melanotropic activity. We may conclude that the two guanidino groups of the arginines in pos. 17 and 18 are not essential for biological activity, but that they may be replaced by amino groups, as in ornithine. Due to the replacement of the guanidino groups by the more easily protectable amino group, the diornithine analogue III is more readily synthesized than the original diarginine polypeptide I.

Laboratorium für Molekularbiologie chemischer Richtung,
Eidg. Technische Hochschule, Zürich
und
Organisch-chemisches Laboratorium,
Katholische Universität in Nijmegen, Holland

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. SCHWYZER & H. KAPPELER, *Helv.* **46**, 1550 (1963).
- [2] R. SCHWYZER, W. RITTEL & A. COSTOPANAGIOTIS, *Helv.* **45**, 2473 (1962).
- [3] R. SCHWYZER, *Ergebnisse der Physiologie* **53**, 1 (1963).
- [4] J. RAMACHANDRAN, D. CHUNG & C. H. LI, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 2696 (1965).
- [5] M. BODANSZKY, M. A. ONDETTI, C. A. BIRKHIMER & P. L. THOMAS, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 4452 (1964).
- [6] R. SCHWYZER & P. SIEBER, *Nature (London)* **199**, 172 (1963).
- [7] R. SCHWYZER & P. SIEBER, *Helv.* **49**, 134 (1966).
- [8] J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 1067 (1955).
- [9] R. SCHWYZER, B. RINIKER & H. KAPPELER, *Helv.* **46**, 1541 (1963).
- [10] G. H. L. NEFKENS, G. I. TESSER & R. J. F. NIVARD, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* **87**, 683 (1962).
- [11] R. SCHWYZER & W. RITTEL, *Helv.* **44**, 159 (1961).
- [12] R. SCHWYZER, A. COSTOPANAGIOTIS & P. SIEBER, *Helv.* **46**, 870 (1963).
- [13] R. SCHWYZER & H. KAPPELER, *Helv.* **44**, 1991 (1961).
- [14] R. SCHWYZER & P. SIEBER, *Helv.* **40**, 624 (1957); R. SCHWYZER, W. RITTEL, H. KAPPELER & B. ISELIN, *Angew. Chem.* **72**, 915 (1960).
- [15] M. BODANSZKY & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 5688 (1959).