

Brèves communications – Kurze Mitteilungen – Brevi comunicazioni – Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Steroidal Peptides¹⁻³

All adrenocorticotrophic hormones⁴ of known structure, including human corticotropin⁵, contain an L-arginyl-L-arginine unit which appears necessary for high adrenocorticotrophic activity⁶. The isolated and double arginine segments of corticotropin are accompanied by phenylalanine, tryptophane, lysine and proline. The possibility that steroids bearing peptide side-chains might alter or otherwise interfere with established hormone production or be involved in steroid transport has led us to prepare a number of steroidal peptides based, initially, on the arginine and companion portions of ACTH.

We now wish to summarize experiments which have led to formation of the first⁷ synthetic steroidal peptides. Synthesis of protected dipeptides III and IV illustrate the general methods employed. Reaction (in acetonitrile at 25° for 24 h) between carbobenzoxy-L-proline and 3 β -hydroxy-17 β -amino-androst-5-ene (I, 4.6 g)⁸ in the presence of N-ethyl-5-phenylisoxazolium 3'-sulfonate⁹ (with triethylamine) led to hydroxy amide IIa (6.6 g, m.p. 194–196°, $[\alpha]_D^{25}$ –104°)¹⁰. Catalytic (palladium suspended in methanol) hydrogenolysis of the carbobenzoxy group afforded olefin IIb (62% yield, m.p. 225–226°). Preservation of nuclear unsaturation was verified by results of proton magnetic resonance and mass spectral studies. Repetition of the peptide-forming sequence using proline amide IIb (0.46 g) and N α -carbobenzoxy-

NG-tosyl-L-arginine^{9b} yielded dipeptide III monohydrate; 0.55 g, m.p. 126–130°, $[\alpha]_D^{20}$ –80.5°.

¹ Part XXIV of a series entitled *Steroids and Related Natural Products*. For the preceding contribution see: J. P. KUTNEY, W. CRETNEY, G. R. PETTIT, and J. C. KNIGHT, *Tetrahedron*, in press.

² A preliminary report of this study was presented (April 9, 1964) at the Third International Symposium on the Chemistry of Natural Products, Kyoto (Japan).

³ This investigation was supported by National Science Foundation Research Grant GB-249.

⁴ K. H. HOFMANN, *Pure appl. Chem.* **6**, 245 (1963).

⁵ T. H. LEE and A. B. LERNER, *J. Am. chem. Soc.* **81**, 6084 (1959).

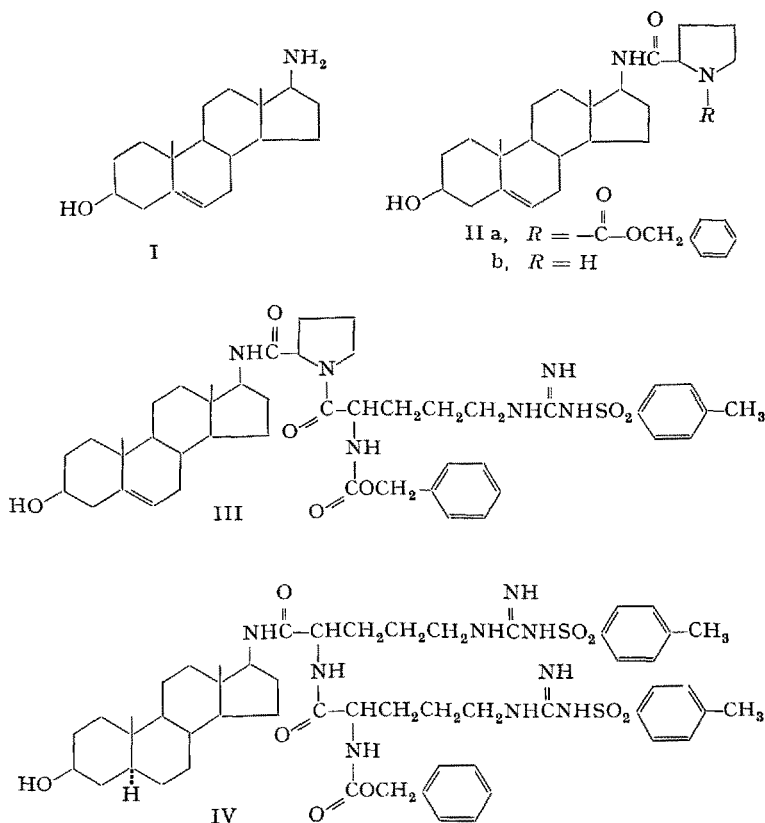
⁶ K. H. HOFMANN, T. LIU, H. YAJIMA, N. YANAIHARA, and S. LANDE, *J. Am. chem. Soc.* **83**, 2294 (1961). – F. SORM, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **26**, 1180 (1961).

⁷ Steroids of the glycolic and turocholic acid-type appear to have received the only prior study in this field: for example see, A. F. HOFMANN, *Acta chem. scand.* **17**, 173 (1963).

⁸ L. RUZICKA and M. W. GOLDBERG, *Helv. chim. Acta* **19**, 107 (1936). – P. DE RUGGIERI, C. GANDOLFI, and D. CHIARAMONTI, *Gazz. chim. ital.* **91**, 665 (1961).

⁹ (a) R. B. WOODWARD, R. A. OLAFSON, and H. MAYER, *J. Am. chem. Soc.* **83**, 1010 (1961). – (b) C. H. LI, B. GORUP, D. CHUNG, and J. RAMACHANDRAN, *J. org. Chem.* **28**, 178 (1963). – (c) R. SCHWYZER and H. KAPPELER, *Helv. chim. Acta* **46**, 1550 (1963).

¹⁰ Satisfactory elemental analyses were obtained for each new compound and, unless otherwise noted, optical rotation values were determined in chloroform solution.



Synthesis of the arginyl-arginine peptide IV was achieved as follows. Reduction of 3 β -acetoxy-17-oximino-5 α -androsterone¹¹ employing sodium in ethanol provided 3 β -hydroxy-17 β -amino-5 α -androsterone (m.p. 164–165°, $[\alpha]_D^{20} + 17^\circ$) and the 17 β -amino steroid (2.6 g) was allowed to react with N α -carbobenzoxycarbonyl-L-arginine as noted above. The resulting arginine amide (4.3 g, m.p. 215–216°, $[\alpha]_D^{20} - 17.4^\circ$ in dimethylformamide) was transformed to protected dipeptide IV, m.p. 75–80°, using the procedures developed for synthesis of dipeptide III.

Similar techniques have been utilized for synthesis of longer-chain peptides based on intermediates III and IV and related compounds. The steroidal peptides were generally purified by appropriate application of column and preparative thin-layer chromatographic procedures and removal¹² of the tosyl groups was accomplished by sodium in liquid ammonia. Construction of steroids with peptide side-chains at other positions (e.g. C-3) is presently under investigation.

Zusammenfassung. Es wird die Möglichkeit erwogen, dass Steroide mit geeignet gebauten Peptidseitenketten am Aufbau oder Transport von Hormonen beteiligt sein könnten. Über die erstmalige Darstellung von Steroidpeptiden wird berichtet. Als Beispiele werden die Synthesen der beiden geschützten Steroidpeptide III und IV beschrieben.

G. R. PETTIT, A. K. DAS GUPTA,
H. KLINGER, and J. OCCOLOWITZ

*Department of Chemistry, University of Maine, Orono
(Maine USA), May 19, 1964.*

¹¹ J. SCHMIDT-THOME, Chem. Ber. 88, 895 (1955).

Die Urokinase des Meerschweinchens

Bei Verwendung von Fibrinogen zur Messung des proteolytischen Potentials des Harnes finden sich weitaus höhere Aktivitäten als bei Verwendung anderer Substrate. Dies wird bedingt durch die Fibrinolysekinase des Harnes, welche das im Fibrinogen enthaltene Profibrinolytin aktiviert. Über die Herkunft der Fibrinolysekinase des Harnes, die auch als Urokinase bezeichnet wird, herrscht noch keine einheitliche Auffassung. Einige Autoren betrachten die Urokinase als eine Ausscheidungsform des im Plasma vorhandenen Profibrinolytinaktivators; andere Autoren sehen den Ursprung der Urokinase im Zelldebris der abführenden Harnwege¹.

Bei verschiedenen Säugetieren bestehen beträchtliche Unterschiede bezüglich der Eigenschaften der Urokinase². Die Urokinase einer Spezies aktiviert nur Profibrinolytin ganz bestimmter anderer Spezies. Das Profibrinolytin der ersten Spezies muss jedoch nicht unbedingt von der Urokinase der anderen Spezies aktiviert werden. Über die Urokinase des Menschen liegen ausführliche Untersuchungen vor³; ferner finden sich mehrere Arbeiten über die Urokinase von Rindern, Katzen, Hunden, Ratten, Kaninchen und Hamstern. Auffallend ist, dass sich bis auf einen kurzen Hinweis bei UNGAR und HAYASHI³ keinerlei Angaben über die Urokinase des Meerschweinchens finden.

Die proteolytische Theorie der Allergie beruht zum Teil auf dem Befund der bei allergischen Reaktionen erhöhten proteolytischen, beziehungsweise fibrinolytischen Aktivität in verschiedenen Körperflüssigkeiten⁴. Eine Erhöhung des fibrinolytischen Potentials des Meerschweinchenharnes findet sich beim anaphylaktischen Schock^{3,5}, beim Arthruschen Phänomen^{3,5} und beim allergischen Ekzem⁵. Diese Befunde beim Meerschweinchen sind von besonderem Interesse, da dieses Versuchstier bei allergischen Reaktionen die beste Vergleichbarkeit mit den Verhältnissen beim Menschen zeigt.

In eigenen Versuchsserien erfolgte die Bestimmung der proteolytischen Aktivität des Meerschweinchenharnes mit der Clot-Lyse-Methode⁶. Da die verwendete Fibrinogen-

präparation Profibrinolytin enthielt, erfolgte gleichzeitig eine Bestimmung der Urokinase. Es scheint nun von Interesse festzustellen, ob bei allergischen Reaktionen eine Erhöhung der Urokinaseausscheidung eintritt oder ob die Erhöhung des fibrinolytischen Potentials des Harnes nur auf eine Vermehrung tryptischer Fermente zurückzuführen ist; aus solchen Bestimmungen könnten auch weitere Hinweise über die Herkunft der Urokinase erlangt werden. Zu diesem Zwecke wurde versucht, die Urokinase des Meerschweinchens mit der caseinolytischen Methode nach v. KAULLA und RIGGENBACH⁶ zu bestimmen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Nachweis der caseinolytischen Wirkung des durch Urokinase aktivierten menschlichen Profibrinolytins.

Wenn sich auch im Einzelversuch eine lineare Korrelation zwischen Harnmenge und aktiviertem menschlichem Profibrinolytin feststellen liess, ergab die Verfolgung der Urokinaseausscheidung bei 10 Meerschweinchen über viele Wochen so stark schwankende Werte, dass Zweifel auftauchten, ob die caseinolytische Methode für die vorliegende Fragestellung geeignet sei. Es wurden deshalb Versuche angestellt, um die Wirksamkeit von Meerschweinchenurokinase auf Profibrinolytin des Menschen, des Kaninchens und des Meerschweinchens zu prüfen. Die Befunde zeigten eine hochgradige Artspezifität der Meerschweinchenurokinase: nur bei Einwirkung auf Meerschweinchenprofibrinolytin tritt eine konstante und gut reproduzierbare Aktivierung ein. Lässt man Meerschweinchenurokinase auf menschliches Profibrinolytin einwirken, findet nur eine schwache Aktivierung statt. Die

¹ E. KAISER und W. RAAB, Z. Vitamin-Hormon-Fermentforschung, im Druck (1964).

² S. R. MOHLER, D. R. CELANDER und M. M. GUEST, Am. J. Physiol. 192, 186 (1958).

³ G. UNGAR und H. HAYASHI, Ann. Allergy 16, 542 (1958).

⁴ W. RAAB und E. KAISER, Internist, im Druck (1964).

⁵ E. KAISER, W. RAAB und W. LEPIER, Arch. klin. exp. Dermat., im Druck (1964).

⁶ K. N. v. KAULLA und N. RIGGENBACH, Thromb. Diath. haem. 5, (162 1960).