

ERICH WÜNSCH, HANS-GEORG HEIDRICH¹⁾
und WOLFGANG GRASSMANN

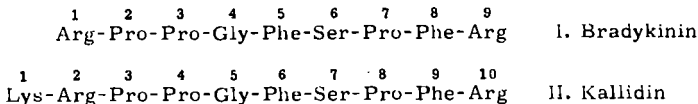
Synthese von Lys¹⁻⁹-Bradykinin und Lys²⁻¹⁰-Kallidin

Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München,
Abteilung für Peptidchemie

(Eingegangen am 4. Januar 1964)

Lys¹⁻⁹-Bradykinin bzw. Lys²⁻¹⁰-Kallidin werden durch Verknüpfung der synthetisch aufgebauten Bruchstücke Dicarbobenzoxy-lysyl-prolyl-prolyl-glycin und *N*^α-Carbobenzoxy-*N*^ε-BOC²⁾-lysyl-prolyl-prolyl-glycin bzw. *N*^α-Carbobenzoxy-*N*^ε-BOC-lysyl-*N*^ε-BOC-lysyl-prolyl-prolyl-glycin mit Phenylalanyl-seryl-prolyl-phenylalanyl-*N*^ε-carbobenzoxy-lysinbenzylester zum geschützten Nona- bzw. Decapeptid, darauffolgende Abspaltung der Schutzgruppen und anschließende Reinigung der Naturstoff-Analoga in der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese dargestellt.

Unter Kininen versteht man niedermolekulare Polypeptide, welche isolierte glattmuskuläre Organe erregen und den Blutdruck senken können. Die „klassischen“ Kinine der Säugetiere, Bradykinin und Kallidin, sind Substanzen, die aus Plasmaproteinen enzymatisch freigesetzt werden, und zwar in einem Mechanismus, der dem der Blutgerinnung ähnlich ist. Kininfreisetzende Enzyme sind die Gruppe der Kallikreine, Trypsin und einige Schlangengiftkomponenten. Die pharmakologische Wirkung der Kinine erstreckt sich auf die Reizung glattmuskulärer Organe, der Blutgefäße, auf die Hemmung der Diurese und auf die Auslösung schmerzähnlicher Reaktionen. Die Aminosäuresequenzen von Bradykinin (I)³⁾ und Kallidin (II)⁴⁾ unterscheiden sich nur durch ein zusätzliches Lysin am N-terminalen Ende des Kallidins:



Eine ausführliche Literaturübersicht über das Gebiet der Plasmakinine findet sich bei J. TRAUTSCHOLD und G. RÜDEL⁵⁾.

¹⁾ Teil der Dissertat. H.-G. HEIDRICH, Univ. München 1964.

²⁾ Folgende gebräuchliche Abkürzungen werden verwendet: BOC = tert.-Butyloxycarbonyl, Z = Carbobenzoxy, BZL = Benzyl, NP = *p*-Nitro-phenyl, DCD = Dicyclohexylcarbodiimid, TFE = Trifluoressigsäure.

³⁾ D. F. ELIOTT, G. T. LEWIS und E. W. HORTON, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **3**, 87 [1960].

⁴⁾ E. WERLE, J. TRAUTSCHOLD und G. LEYSATH, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **326**, 174 [1961]; J. V. PIERCE und M. E. WEBSTER, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **5**, 353 [1961].

⁵⁾ *Klin. Wschr.* **41**, 297 [1963].

Seit der Synthese von Bradykinin⁶⁾ und Kallidin⁷⁾ sind in der Literatur verschiedentlich synthetische Analoga dieser Peptide beschrieben worden⁸⁾, alle mit dem Ziel, durch Veränderungen im Molekül Aussagen über die spezifische Wirkungsweise gewisser Aminosäuren oder funktioneller Gruppen zu machen. Es erschien uns interessant, Kininanaloga herzustellen, in denen das Arginin durch Lysin ersetzt wurde, um eine evtl. Aussage über die Funktion der Guanidogruppe des Arginins zu machen. Beim Lys²-Angiotensin⁹⁾ führte das gleiche Experiment zu einem biologisch unwirksamen Produkt.

Die Synthese des Lys¹⁻⁹-Bradykinins (XXV) gelang auf folgendem Wege (Schema 1): Carbobenzoxy-prolyl-prolin (III)¹⁰⁾ wurde mit Hilfe von Carbodiimid mit Glycinbenzylester (IV)¹¹⁾ zu Carbobenzoxy-prolyl-prolyl-glycinbenzylester (V) verbunden und nach Abhydrieren der Schutzgruppen das freie Tripeptid (VIII) mit Dicarbobenzoxy-lysin-nitrophenylester (VI) bzw. mit *N*^ε-Carbobenzoxy-*N*^ε-BOC-lysin-nitrophenylester (VII) zum *N*-geschützten Tetrapeptid IX bzw. X verknüpft.

Zum Aufbau der zweiten Hälfte des Kininmoleküls wurde Carbobenzoxy-serin (XI)¹²⁾ mit Prolin-benzylester (XII)¹³⁾ nach der SHEEHAN-Methode zum Carbobenzoxy-dipeptidester (XIV) vereinigt, die Schutzgruppen hydrogenolytisch abgespalten und das erhaltene Seryl-prolin (XVII) mit BOC-Phenylalanin-nitrophenylester (XVI) umgesetzt. BOC-Phenylalanyl-seryl-prolin (XIX) lieferte nach üblichem Carbodiimid-Verfahren mit Phenylalanyl-*N*^ε-carbobenzoxy-lysinbenzylester (XX) — gewonnen aus BOC-Phenylalanin (XIII) und *N*^ε-Carbobenzoxy-lysinbenzylester (XV) mit nachfolgender Trifluoressigsäure-Spaltung und als Tosylat kristallin isoliert — den gewünschten BOC-Pentapeptidester XXI, der ohne nähere Charakterisierung protonensolvolytisch zum Phenylalanyl-seryl-prolyl-phenylalanyl-*N*^ε-carbobenzoxy-lysinbenzylester (XXII) entacyliert wurde. Diese Verbindung wurde als Tosylat kristallin isoliert. Die Verknüpfung der Acyltetrapeptide IX und X mit dem Pentapeptidester XXII erbrachte die geschützten Nonapeptidderivate XXIII und XXIV, die ohne Isolierung durch übliche Abspaltung der Carbobenzoxy-, BOC- und Benzylester-

6) R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD, H. KONZETT und E. STÜRMER, *Experientia* [Basel] **16**, 326 [1960]; R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN und P.-A. JAQUENOUD, *Helv. chim. Acta* **43**, 1349 [1960].

7) J. PLESS, E. STÜRMER, ST. GUTTMANN und R. A. BOISSONNAS, *Helv. chim. Acta* **45**, 394 [1960].

8) E. D. NICOLAIDES, H. A. DE WALD, P. G. SHORLEY und H. O. J. COLLIER, *Nature* [London] **187**, 773 [1960]; R. SCHWYZER, W. RITTEL, P. SIEBER, H. KAPPELER und H. ZUBER, *Helv. chim. Acta* **43**, 1130 [1960]; R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD, H. KONZETT und E. STÜRMER, *Experientia* [Basel] **16**, 326 [1960]; R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN und P.-A. JAQUENOUD, *Helv. chim. Acta* **43**, 1481 [1960]; ST. GUTTMANN und R. A. BOISSONNAS, ebenda **44**, 1713 [1961]; K. VOGLER, R. O. STUDER und W. LERGIER, ebenda **44**, 1495 [1961]; K. VOGLER, P. LANZ und W. LERGIER, ebenda **45**, 561 [1962]; M. BODANSZKY, J. T. SHEEHAN, M. A. ONDETTI und S. LANDE, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 991 [1963]; M. ONDETTI, *J. med. Chem.* **6**, 10 [1963]; E. SCHRÖDER, Vortrag 6. Europ. Peptidsymposium, Athen 1963; E. D. NICOLAIDES, H. A. DE WALD und M. K. CRAFT, *J. med. pharmac. Chem.* **6**, 739 [1963].

9) R. SCHWYZER, *Helv. chim. Acta* **44**, 671 [1961].

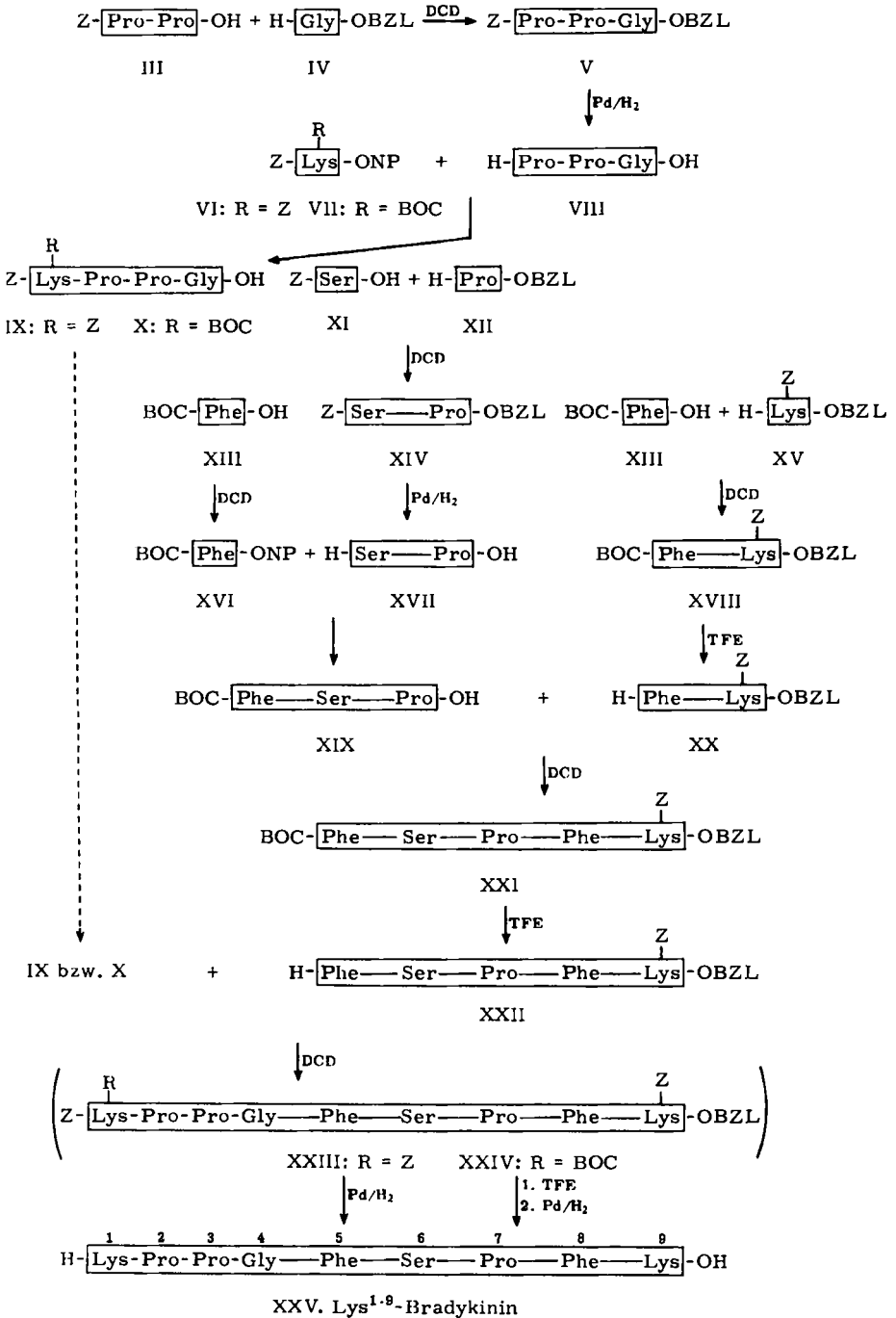
10) E. WÜNSCH, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **332**, 288 [1963].

11) L. ZERVAS, M. WINITZ und J. P. GREENSTEIN, *J. org. Chemistry* **22**, 1515 [1957].

12) ST. GUTTMANN und R. A. BOISSONNAS, *Helv. chim. Acta* **41**, 1852 [1958].

13) R. E. NEUMAN und E. L. SMITH, *J. biol. Chemistry* **193**, 108 [1951].

Schema 1



BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren bestimmt; sie sind nicht korrigiert. Die spezif. Drehwerte wurden im lichtelektrischen Polarimeter der Fa. Zeiss ermittelt, die Werte für die D-Linie berechnet. Die chromatographische Reinheitsprüfung wurde mit Hilfe des Dünnschichtverfahrens nach E. STAHL¹⁵⁾ auf Kieselgel G durchgeführt. Als Laufmittel wurden verwendet A: Butanol/Eisessig/Wasser (6:2:2), B: Butanol/Eisessig/Wasser (1:1:1), C: Hexan/Essigester/Eisessig (10:5:0.5), D: Heptan/tert.-Butylalkohol/Eisessig (3:2:1), E: Butanol/Eisessig/Wasser/Pyridin (30:6:24:20), F: tert.-Amylalkohol/Isopropylalkohol/Wasser (10:4:5.5), G: Chloroform/Methanol (9:1).

Lys¹⁻⁹-Bradykinin (XXV)

Carbobenzoxy-prolyl-prolyl-glycinbenzylester (V): Zu 103.9 g *Carbobenzoxy-prolyl-prolin* (III) (0.3 Mol)¹⁰⁾ und 87.9 g *Glycinbenzylester-tosylat* (entspr. IV)¹¹⁾ (0.3 Mol + 1.0 g), in 300 ccm Dimethylformamid und 1500 ccm Acetonitril unter Erwärmen gelöst, werden nach Abkühlen auf 0° 42.0 ccm *Triäthylamin* (0.3 Mol) unter Rühren gegeben. Dazu fügt man nach Abkühlen auf -15° 64.8 g *Dicyclohexylcarbodiimid* (0.3 Mol + 3 g) und läßt das Reaktionsgemisch einige Stdn. bei 0° und dann 24 Stdn. bei Raumtemperatur stehen. Nach erneutem Abkühlen saugt man ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, engt das Filtrat i. Vak. ein und nimmt den Rückstand in Essigester auf. Die Lösung wird mit 1 n HCl, KHCO₃-Lösung und Wasser wie üblich gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. eingedampft; dabei tritt Kristallisation ein. Aus Äthanol Schmp. 120–122°, $[\alpha]_D^{20}$: -115.06 ± 0.5° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -138.0° (c = 1, in Methanol), R_F (A) 0.75, R_F (E) 0.76, Ausb. 120.4 g (81.8% d. Th.).

C₂₇H₃₁N₃O₆ (493.5) Ber. C 65.7 H 6.33 N 8.59 Gef. C 65.4 H 6.41 N 8.9

Prolyl-prolyl-glycin (VIII): 20.0 g *Carbobenzoxy-prolyl-prolyl-glycinbenzylester (V)* in 100 ccm Isopropylalkohol + 5 ccm Wasser und einigen Tropfen Eisessig werden in Gegenwart von Palladiumschwarz als Katalysator ca. 7 Stdn. bei Normaldruck hydriert. Das Filtrat wird mit viel trockenem Äther versetzt und einige Tage bei -10° aufbewahrt, der gebildete Niederschlag abgesaugt, mit absol. Äther gewaschen und im Vak.-Exsikkator scharf getrocknet. Nach Umkristallisieren aus eiskaltem Methanol/Äther (1:1) Schmp. 112–114°, $[\alpha]_D^{20}$: -97.9 ± 0.5° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -117.0° (c = 1, in Methanol), R_F (A) 0.14, R_F (E) 0.24, Ausb. 10.8 g (100% d. Th.).

C₁₂H₁₉N₃O₄ · H₂O (287.3) Ber. C 50.2 H 7.4 N 14.6 Gef. C 50.01 H 7.29 N 14.4

Dicarbobenzoxy-lysin-nitrophenylester (VI): 41.4 g *Dicarbobenzoxy-lysin*¹⁶⁾ (0.1 Mol) und 15.3 g *p-Nitro-phenol* (0.11 Mol) in 300 ccm Essigester werden bei 0° mit 22.7 g *Dicyclohexylcarbodiimid* (0.11 Mol) versetzt, 1 Stde. bei 0° und 2 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abkühlen saugt man vom Dicyclohexylharnstoff ab, engt das Filtrat i. Vak. ein und nimmt den Rückstand in Essigester auf. Die erhaltene Lösung wird mit 0.1 n HCl, 0.5 m KHCO₃ und Wasser wie üblich gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. Der verbleibende Rückstand wird mit absol. Äther ausgekocht, abfiltriert, im Vak.-Exsikkator getrocknet (über P₂O₅) und gepulvert: Schmp. 75–77°, $[\alpha]_D^{20}$: -23.7 ± 0.5° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -29.5° (c = 1, in Methanol), R_F (A) 0.8, R_F (C) 0.42, Ausb. 44.1 g (82.1% d. Th.).

C₂₈H₂₉N₃O₈ (535.6) Ber. C 62.80 H 5.46 N 7.85 Gef. C 63.06 H 5.66 N 7.98

¹⁵⁾ E. STAHL, Z. analyt. Chem. **181**, 244 [1961].

¹⁶⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, R. L. HUGUENIN, P.-A. JAQUENOUD und ED. SANDRIN, Helv. chim. Acta **41**, 1878 [1958].

*N^α-Carbobenzoxy-N^ε-BOC-lysine-nitrophenylester (VII)*¹⁷⁾: 40.6 g *N^α-Carbobenzoxy-N^ε-BOC-lysine*¹⁸⁾ (0.105 Mol) — freigesetzt mit Citronensäure aus 60.0 g des Dicyclohexylammoniumsalzes (0.105 Mol), Schmp. 156–157°, $[\alpha]_D^{20}$: $+7.82 \pm 0.5^\circ$ ($c = 1$, in Äthanol) — und 15.6 g *p-Nitro-phenol* (0.11 Mol) in 600 ccm Essigester/Acetonitril (1:1) werden bei 0° mit 24.0 g *Dicyclohexylcarbodiimid* (0.11 Mol) versetzt, 1 Stde. bei 0° und 2 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abkühlen auf -5° wird abgeschiedener Dicyclohexylharnstoff abgetrennt, das Filtrat i. Vak. zur Trockne gebracht und der Rückstand in Essigester aufgenommen. Die Lösung wird unter Kühlung mit Citronensäurelösung, einem Gemisch aus 1 Tl. 0.5 *m* K₂CO₃ und 2 Tln. 0.5 *m* KHCO₃ und Wasser wie üblich gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. eingedampft. Aus Essigester/Äther Schmp. 88–90°, $[\alpha]_D^{20}$: $-17.2 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -20.5° ($c = 1$, in Aceton), R_F (A) 0.8, R_F (C) 0.75, Ausb. 52.9 g (93% d. Th.).

C₂₅H₃₅N₃O₁₀ (537.6) Ber. C 59.87 H 6.23 N 8.38 Gef. C 60.21 H 6.35 N 8.45

Dicarbomboxy-lysyl-prolyl-prolyl-glycine (IX): 11.4 g *Dicarbomboxy-lysine-nitrophenylester* (VI) (0.021 Mol) und 5.75 g *Prolyl-prolyl-glycine* (VIII) (0.021 Mol) in 150 ccm Chloroform/Essigester (1:1) werden mit 6 ccm *Triäthylamin* (0.042 Mol) versetzt und 24 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Eindampfen i. Vak. wird der Rückstand in 150 ccm 1 *n* KHCO₃ aufgenommen, die Lösung erschöpfend mit Essigester ausgezogen (Nitrophenol), mit Citronensäure angesäuert und mit Essigester ausgeschüttelt. Die Essigesterextrakte werden über Na₂SO₄ getrocknet, i. Vak. eingeengt und der Rückstand mit absol. Äther verrieben. Zers. ab 190°, $[\alpha]_D^{20}$: $-102.68 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -123.0° ($c = 1$, in Methanol), R_F (A) 0.64, R_F (E) 0.59, Ausb. 12.1 g (85.2% d. Th.).

C₃₄H₄₃N₅O₉ (665.8) Ber. C 61.14 H 6.51 N 10.51 Gef. C 60.79 H 6.46 N 10.53

N^α-Carbobenzoxy-N^ε-BOC-lysyl-prolyl-prolyl-glycine (X): 16.0 g *N^α-Carbobenzoxy-N^ε-BOC-lysine-nitrophenylester* (VII) (0.03 Mol) und 10.05 g *Prolyl-prolyl-glycine* (VIII) (0.035 Mol) in 300 ccm Chloroform/Essigester (1:1) werden in Gegenwart von 8.4 ccm *Triäthylamin* (0.06 Mol), wie für IX beschrieben, umgesetzt und aufgearbeitet. Der i. Vak. über P₂O₅ scharf getrocknete Rückstand wird nach Verreiben mit absol. Äther beim Stehenlassen im Kühlschrank fest. Zers. ab 170°, $[\alpha]_D^{20}$: $-109.3 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -131.25° ($c = 2$, in Methanol), R_F (A) 0.64, R_F (G) 0.13, Ausb. 18.5 g (96% d. Th.).

C₃₁H₄₅N₅O₉ · 1/2 H₂O (640.7) Ber. C 58.12 H 7.08 N 10.93

Gef. C 57.82 H 7.16 N 10.96

Carbobenzoxy-seryl-prolinbenzylester (XIV): Zu 11.9 g *Carbobenzoxy-serine* (XI) (0.05 Mol) und 11.3 g *Prolinbenzylester-hydrochlorid* (entspr. XII) (0.05 Mol)¹³⁾ in 100 ccm Acetonitril werden bei 0° 7 ccm *Triäthylamin* (0.05 Mol) und danach bei -10° 11.0 g *Dicyclohexylcarbodiimid* (0.053 Mol) gegeben. Nach 24 Stdn. bei -10° saugt man ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, dampft das Filtrat i. Vak. zur Trockne und nimmt den Rückstand in Essigester auf. Die Lösung wird wie üblich mit verd. Salzsäure, KHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. eingeengt. Aus Essigester/Petroläther Schmp. 105–107°, $[\alpha]_D^{20}$: $-77.28 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -93.0° ($c = 1$, in Methanol), R_F (A) 0.77, R_F (D) 0.59, Ausb. 18.5 g (87% d. Th.).

C₂₃H₂₆N₂O₆ (426.4) Ber. C 64.78 H 6.15 N 6.57 Gef. C 64.81 H 6.02 N 6.80

Seryl-prolin (XVII): 10.0 g *Carbobenzoxy-seryl-prolinbenzylester* (XIV) in Methanol/Wasser + einigen Tropfen Essigsäure werden in Gegenwart von Palladiumschwarz als

¹⁷⁾ E. WÜNSCH und A. ZWICK, Chem. Ber. (in Vorbereitung) mit gleichen analyt. Daten; R. SCHWYZER und W. RITTEL¹⁸⁾: Schmp. 88–91°, $[\alpha]_D^{20}$: $-14.8 \pm 1.0^\circ$ ($c = 1.13$, in Aceton).

¹⁸⁾ R. SCHWYZER und W. RITTEL, Helv. chim. Acta 44, 159 [1961]; K. STURM, R. GEIGER und W. SIEDEL, Chem. Ber. 96, 609 [1963].

Katalysator wie üblich hydriert. Beim Einengen i. Vak. und Versetzen mit Äthanol tritt Kristallisation ein. Nadeln aus Wasser/Äthanol, Schmp. 189° , $[\alpha]_D^{20}$: $-108.37 \pm 0.5^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -130.0° ($c = 1$, in Wasser), R_F (A) 0.17, R_F (E) 0.3, Ausb. 4.7 g (98% d. Th.).

$C_8H_{14}N_2O_4$ (202.2) Ber. C 47.52 H 6.79 N 13.85 Gef. C 47.21 H 7.08 N 13.73

BOC-Phenylalanin (XIII): 81.0 g *Phenylalaninmethylester* (0.45 Mol) — hergestellt aus 98 g *Phenylalaninmethylester-hydrochlorid* (0.45 Mol) nach G. HILLMANN¹⁹⁾ — werden mit 200.0 g *BOC-Azid*²⁰⁾ (1.35 Mol) 24 Stdn. bei $40-45^{\circ}$ aufbewahrt, überschüss. Azid i. Vak. abdestilliert und der verbleibende ölige Rückstand in Essigester aufgenommen. Die erhaltene Lösung wird wie üblich mit $KHCO_3$ -Lösung, Citronensäurelösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. eingengt: 110.0 g *BOC-Phenylalaninmethylester* (0.394 Mol) als gelbliches Öl.

Es wird in Dioxan/Wasser gelöst und mit 395 ccm *1 n NaOH* unter pH-Kontrolle mit Thymolphthalein verseift. Nach Entfernen des Lösungsmittels säuert man mit Citronensäure an und nimmt das abgeschiedene Öl mit Essigester auf. Nach Trocknen und Einengen der Lösung i. Vak. kristallisiert man den Rückstand aus absol. Äther/Petroläther um: Schmp. $83.5-85.5^{\circ}$, $[\alpha]_D^{20}$: $+23.85 \pm 0.5^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $+29.1^{\circ}$ ($c = 2$, in Äthanol)²¹⁾, R_F (A) 0.74, R_F (D) 0.6, Ausb. 81.2 g (68% d. Th.).

$C_{14}H_{19}NO_4$ (265.3) Ber. C 63.4 H 7.24 N 5.28 Gef. C 63.5 H 7.04 N 5.5

BOC-Phenylalanin-nitrophenylester (XVI): 39.8 g krist. *BOC-Phenylalanin* (XIII) (0.15 Mol) und 22.3 g *p-Nitro-phenol* (0.16 Mol) in 600 ccm Essigester werden bei -5° mit 33.0 g *Dicyclohexylcarbodiimid* (0.26 Mol) versetzt, eine Stde. bei 5° , dann eine Stde. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abkühlen auf -5° filtriert man Dicyclohexylharnstoff ab, engt die Lösung i. Vak. zur Trockne ein und nimmt den Rückstand in Essigester auf. Nach üblicher Aufarbeitung wird das Rohprodukt aus heißem Äthanol und wenig Petroläther umkristallisiert: Schmp. $126-127^{\circ}$, $[\alpha]_D^{20}$: $-19.82 \pm 0.5^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -25.0° ($c = 0.5$, in Methanol), R_F (A) 0.81, R_F (C) 0.75, Ausb. 45.5 g (78% d. Th.).

$C_{20}H_{22}N_2O_6$ (386.4) Ber. C 62.45 H 5.74 N 7.38 Gef. C 62.49 H 5.75 N 7.53

BOC-Phenylalanyl-seryl-prolin (XIX): Zu einer Lösung von 2.02 g *Seryl-prolin* (XVII) (0.01 Mol) in 20 ccm Wasser und 10 ccm *1 n NaOH* (0.01 Mol) gibt man 3.7 g *BOC-Phenylalaninnitrophenylester* (XVI) (0.01 Mol) in 40 ccm Dioxan und läßt bei Raumtemperatur unter Rühren, CO_2 -Ausschluß und unter Einhalten von pH 9.5 *1 n NaOH* zutropfen. (Innerhalb von 5–6 Stdn. werden 11 ccm *1 n NaOH* verbraucht). Die gelb gefärbte Lösung wird unter kräftigem Rühren und Eiskühlung vorsichtig mit 11 ccm *1 n HCl* versetzt, nach Abziehen des Dioxans i. Vak. mit Wasser verdünnt und zur Entfernung von *p-Nitrophenol* erschöpfend mit Äther ausgezogen. Die wäbr. Phase scheidet nach Ansäuern mit Citronensäure ein Öl ab, das in Essigester aufgenommen wird. Die über Na_2SO_4 getrocknete und i. Vak. eingedampfte Lösung hinterläßt ein festes Produkt, das nach Aufnehmen in heißem Essigester, Zugabe von Äther und schließlich (unter Eiskühlung und Rühren) von Petroläther amorph ausfällt. Nach längerem Rühren wird die Substanz kristallin. Aus heißem Essigester Schmp. $122-124^{\circ}$ (Zers.), $[\alpha]_D^{20}$: $-58.7 \pm 0.5^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -70.5° ($c = 1$, in Methanol), R_F (A) 0.66, R_F (D) 0.32, Ausb. 3.3 g (65.2% d. Th.).

$C_{22}H_{31}N_3O_7$ (449.5) Ber. C 58.78 H 6.94 N 9.35 Gef. C 59.26 H 7.18 N 9.34

¹⁹⁾ Z. Naturforsch. 1, 682 [1946].

²⁰⁾ L. A. CARPINO, J. Amer. chem. Soc. 79, 98 [1957].

²¹⁾ E. WÜNSCH und G. WENDELBERGER (Chem. Ber., in Vorbereitung) geben einen Schmp. $85-87^{\circ}$ und $[\alpha]_D^{20}$: $+24.74^{\circ}$ ($c = 1.5$, in Äthanol) bei Synthese der Verbindung über den Äthylester an.

N^ε-Carbobenzoxy-lysinbenzylester-hydrochlorid (entspr. XV): wurde in Anlehnung an die von B. F. ERLANGER und E. BRAND²²⁾ bzw. R. A. BOISSONNAS und Mitarbb.²³⁾ gegebenen Vorschriften (Benzyl- bzw. Methylester-hydrochlorid) dargestellt.

Zu einer Suspension von 155.3 g *Dicarbobenzoxy-lysin*¹⁶⁾ (0.375 Mol) in 750 ccm absol. Äther läßt man bei -10° unter Rühren innerhalb von 30 Min. 70 ccm *Thionylchlorid* tropfen, rührt 3 Stdn. bei Raumtemperatur, dann 3 Stdn. unter Rückfluß, wobei das *N*-Carbonsäure-Anhydrid ausfällt. Nach 2 Stdn. im Kühlschrank wird das Produkt abgesaugt, mit trockenem Äther gewaschen und i. Vak. bei Raumtemperatur getrocknet: Schmp. 98° .

Zu einer Aufschlammung des *N*-Carbonsäure-Anhydrids in 750 ccm absol. Äther läßt man unter Rühren 750 ccm absol. *Benzylalkohol* tropfen und rührt das Reaktionsgemisch 16 Stdn. Dabei erfolgt zunächst Lösung, dann Abscheiden kristallinen Esterhydrochlorids. Aus wenig heißem Wasser Schmp. $138-140^{\circ}$, $[\alpha]_D^{20}$: $-4.8 \pm 0.5^{\circ}$, $[\alpha]_{546}^{20}$: -7.03° ($c = 0.5$, in 0.1 *n* HCl), R_F (A) 0.69, R_F (E) 0.65, Ausb. 119.8 g (78.3% d. Th.).

$C_{21}H_{26}N_2O_4 \cdot HCl$ (406.9) Ber. C 61.99 H 6.69 N 6.89 Gef. C 62.05 H 6.68 N 6.85

BOC-Phenylalanyl-N^ε-carbobenzoxy-lysinbenzylester (XVIII): 26.53 g *BOC-Phenylalanin* (XIII) (0.1 Mol) und 40.7 g *N^ε-Carbobenzoxy-lysinbenzylester-hydrochlorid* (entspr. XV) (0.1 Mol) in 1000 ccm Acetonitril werden bei -10° unter Rühren mit 13.95 ccm *Triäthylamin* (0.1 Mol) und nach 15 Min. mit 20.7 g *Dicyclohexylcarbodiimid* (0.1 Mol) versetzt. Der Ansatz wird 24 Stdn. bei -10° , dann 24 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt, mit 400 ccm Dimethylformamid versetzt, nach Stehenlassen bei -10° auskristallisierter Dicyclohexylharnstoff wird abgetrennt. Das Filtrat dampft man bei Raumtemperatur/ca. 10^{-2} Torr ein und nimmt den Rückstand in Chloroform auf. Nach üblicher Aufarbeitung (Waschen mit Citronensäure-, $KHCO_3$ -Lösung und Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen i. Vak.) wird der feste Rückstand aus heißem Äthanol umkristallisiert: Schmp. $131-133^{\circ}$, $[\alpha]_D^{20}$: $-10.40 \pm 0.5^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -13.0° ($c = 1$, in Methanol), R_F (A) 0.87, R_F (D) 0.62, Ausb. 46.0 g (74.5% d. Th.).

$C_{35}H_{43}N_3O_7$ (617.7) Ber. C 68.05 H 7.02 N 6.89 Gef. C 68.26 H 7.13 N 7.00

Phenylalanyl-N^ε-carbobenzoxy-lysinbenzylester-tosylat (entspr. XX): 30.9 g *BOC-Phenylalanyl-N^ε-carbobenzoxy-lysinbenzylester* (XVIII) (0.05 Mol) werden mit 50 ccm eiskalter *Trifluoressigsäure* übergossen und 30 Min. bei Raumtemperatur belassen, wobei Lösung erfolgt. Überschüss. Trifluoressigsäure wird i. Vak. abgezogen, der Rückstand mit 1 *m* $KHCO_3$ und Essigester behandelt, die abgetrennte Essigesterphase mit NaCl-Lösung neutral gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. eingeeengt.

Die Lösung in absol. Äthanol wird mit 9.6 g *p-Toluolsulfonsäure* (0.05 Mol) versetzt; auf Zusatz von absol. Äther kristallisiert das *Peptidester-tosylat* aus: Schmp. $146-147.5^{\circ}$, $[\alpha]_D^{20}$: $-6.19 \pm 0.5^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -7.5° ($c = 1$, in Methanol), R_F (A) 0.27, R_F (D) 0.15, Ausb. 34.1 g (97% d. Th.).

$C_{37}H_{43}N_3O_8S$ (689.8) Ber. C 64.42 H 6.28 N 6.09 Gef. C 64.28 H 6.50 N 6.15

Phenylalanyl-seryl-prolyl-phenylalanyl-N^ε-carbobenzoxy-lysinbenzylester-tosylat (entspr. XXII): 6.57 g *BOC-Phenylalanyl-seryl-prolin* (XIX) (0.015 Mol) und 10.5 g *Phenylalanyl-N^ε-carbobenzoxy-lysinbenzylester-tosylat* (entspr. XX) (0.015 Mol) in 200 ccm Acetonitril werden bei 0° mit 2.1 ccm *Triäthylamin* (0.015 Mol) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt, bis alles in Lösung geht (15 Min.). Nach Zugabe von 3.3 g *Dicyclohexylcarbodiimid* (0.016 Mol) wird das Reaktionsgemisch 10 Stdn. bei 0° , danach 24 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt, mit 125 ccm Dimethylformamid versetzt und auf -5° abgekühlt. Die vom Dicyclohexylharn-

²²⁾ J. Amer. chem. Soc. 73, 4025 [1951].

²³⁾ R. A. BOISSONNAS und Mitarbb., Helv. chim. Acta 41, 1867 [1958], und zwar 1878.

stoff abgetrennte Lösung dampft man i. Vak. bei 10^{-2} Torr zur Trockne ein, nimmt den Rückstand in Essigester auf und wäscht die erhaltene Lösung wie üblich mit Citronensäure-, KHCO_3 -Lösung und Wasser. Nach Trocknen über Na_2SO_4 und Abdestillieren des Lösungsmittels i. Vak. wird ein fester Rückstand erhalten (BOC-Pentapeptidester), der, wie oben für BOC-Phenylalanyl-lysinbenzylester beschrieben, mit *Trifluoressigsäure* entacyliert wird. Der erhaltene Rückstand wird in 200 ccm absol. Isopropylalkohol gelöst, mit 2.9 g *p-Toluolsulfonsäure* (0.015 Mol) und schließlich bei -20° unter Rühren mit absol. Äther versetzt, wobei das Ester-tosylat ausfällt. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Isopropylalkohol/Äther ist das Produkt chromatographisch rein: Schmp. $136-138^\circ$, $[\alpha]_D^{20}$: $-36.97 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -44.5° ($c = 2$, in Methanol), R_F (A) 0.68, R_F (F) 0.7, Ausb. 12.5 g (81.5% d. Th.).

$\text{C}_{54}\text{H}_{64}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{S}$ (1021.2) Ber. C 63.41 H 6.32 N 8.23 Gef. C 62.98 H 6.30 N 8.29

Lysin^{1,9}-Bradykinin (XXV)

a) Zu 2.11 g *Dicarbobenzoxy-lysyl-prolyl-prolyl-glycin* (IX) (3 mMol) und 3.09 g *Phenylalanyl-seryl-prolyl-phenylalanyl-N^ε-carbobenzoxy-lysyl-benzylester-tosylat* (entspr. XXII) (3.03 mMol) in 10 ccm Dimethylformamid werden bei 0° unter Rühren 0.42 ccm *Triäthylamin* (3 mMol) gegeben, die resultierende Lösung mit 80 ccm Acetonitril verdünnt, 0.7 g *Dicyclohexylcarbodiimid* (3 mMol + 0.08 g) zugefügt, 2 Stdn. bei 0° und 4 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach kurzem Stehenlassen bei -5° wird vom Dicyclohexylharnstoff abgetrennt, das Filtrat i. Vak. zur Trockne eingengt, die Essigesterlösung des Rückstandes wie üblich mit Citronensäure-, KHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. eingengt. Der Rückstand (in der Hauptmenge Carbobenzoxy-nonapeptidester XXIII) wird in 50 ccm Methanol gelöst, mit 5 ccm Wasser und 5 ccm Eisessig versetzt und in Anwesenheit von Palladiumschwarz als Katalysator bei Normaldruck 24 Stdn. hydriert. Nach Einengen i. Vak. resultiert ein Rohprodukt, das in 40 ccm Pyridin/Eisessig-Puffer pH 4.9 gelöst und bei 2000 kV und 200 mA der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese¹⁴⁾ unterworfen wird (Ninhydrin-Test bei 565 μ):

1. Frakt. (22–30): R_F (A) 0.23, mit Spuren Hauptprodukt

2. Frakt. (31–36): R_F (A) 0.05, Hauptprodukt

3. Frakt. (37–42): R_F (A) 0.13, mit Spuren Hauptprodukt

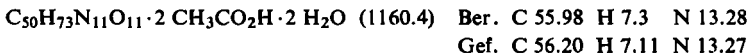
Die 2. Frakt. (31–36) dampft man i. Vak. bei möglichst tiefer Temperatur zur Trockne ein. Nach Entfernen des Puffers (Pyridinacetat) i. Hochvak. nimmt man den Rückstand in ca. 10 ccm *n* Essigsäure auf und lyophilisiert. Das i. Vak. über P_2O_5 getrocknete feste Produkt wird in absol. Methanol gelöst und unter Rühren bei -10° mit absol. Äther gefällt: Schmp. $145-149^\circ$, $[\alpha]_D^{20}$: $-66.88 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -80.0° ($c = 0.5$, in Methanol), R_F (B) 0.28, R_F (E) 0.38, Ausb. 1.2 g (52% d. Th.).

$\text{C}_{50}\text{H}_{73}\text{N}_{11}\text{O}_{11} \cdot 2\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1160.4)

b) 1.28 g *N^ε-Carbobenzoxy-N^ε-BOC-lysyl-prolyl-prolyl-glycin* (X) (2 mMol) und 2.06 g *Phenylalanyl-seryl-prolyl-phenylalanyl-N^ε-carbobenzoxy-lysinbenzylester-tosylat* (entspr. XXII) (2.02 mMol) werden, wie unter a) beschrieben, mit 0.45 g *Dicyclohexylcarbodiimid* (2 mMol + 0.05 g) zum *Carbobenzoxy-BOC-nonapeptidester* (XXIV) umgesetzt. Das i. Vak. zur Trockne eingengte Filtrat wird bei Raumtemperatur mit 50 ccm *Trifluoressigsäure* übergossen. Nach 1 stdg. Stehenlassen, wobei Lösung erfolgt, wird überschüss. Trifluoressigsäure i. Vak. abgezogen, der Rückstand in 20 ccm 70-proz. Methanol aufgenommen und die Lösung über eine kleine Säule mit Dowex II (Acetatform) gegeben. Das Eluat wird wie üblich innerhalb von 24 Stdn. bei Normaldruck hydrogenolytisch decarbobenzoxyliert und aufgearbeitet. Das erhaltene Rohprodukt wird, in 30 ccm Pyridin/Eisessig-Puffer pH 4.9 gelöst, wie unter a) der freien kontinuierlichen Elektrophorese unterworfen (Ninhydrin-Test bei 565 μ):

1. Frakt. (20—28): R_F (A) 0.21, mit Spuren Hauptprodukt
2. Frakt. (29—34): R_F (A) 0.05, Hauptprodukt
3. Frakt. (35—40): R_F (A) 0.12

Die 2. Frakt. (29—34) wird, wie unter a) beschrieben, aufgearbeitet: Schmp. 146—149°, $[\alpha]_D^{20}$: $-66.74 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -79.2° ($c = 0.5$, in Methanol), R_F (B) 0.29, R_F (E) 0.38, Ausb. 0.85 g (55% d. Th.).

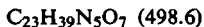


Aminosäureanalyse:

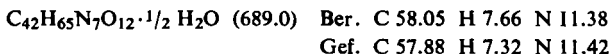
	Gly	Ser	Phe	Pro	Lys
Ber.	1	1	2	3	2
Gef.	1.0	1.0	2.0	2.99	2.0

Lys^{2,10}-Kallidin (XXIX)

N^ε-BOC-Lysyl-prolyl-prolyl-glycin (XXVI): 7 g *N^α-Carbobenzoxy-N^ε-BOC-lysyl-prolyl-prolyl-glycin* (X) in 50 ccm Methanol + einigen Tropfen Eisessig werden in Anwesenheit von Palladiumschwarz als Katalysator bei Normaldruck hydriert. Der nach Eindampfen i. Vak. erhaltene Rückstand wird mit absol. Äther verrieben; das Produkt (XXVI) ist für die weitere Umsetzung genügend rein. R_F (A) 0.31, Ausb. 5.5 g (100% d. Th.).



N^α-Carbobenzoxy-N^ε-BOC-lysyl-N^ε-BOC-lysyl-prolyl-prolyl-glycin (XXVII): Zu 2.5 g *N^α-Carbobenzoxy-N^ε-BOC-lysyl-nitrophenylester* (VII) (5 mMol) und 2.6 g *N^ε-BOC-Lysyl-prolyl-prolyl-glycin* (XXVI) (5 mMol Rohprodukt) in 15 ccm Tetrahydrofuran/Dioxan/Wasser (2:4:1) wird unter Rühren ein Gemisch von 1 n NaOH/Dioxan (1:1) so lange zugegeben, bis der pH-Wert der Lösung über einige Stdn. konstant bleibt. Nach weitgehender Entfernung der organischen Lösungsmittel i. Vak. wird die verbleibende wäbr. Lösung mehrmals mit Essigester extrahiert, mit Citronensäurelösung angesäuert und das abgeschiedene Öl in Essigester aufgenommen. Nach Auswaschen der Säure mit Wasser und Trocknen über Na_2SO_4 wird die Lösung i. Vak. zur Trockne gebracht, der erhaltene Rückstand in wenig tert.-Butylalkohol/Dioxan aufgenommen und in viel absol. Äther bei -20° unter Rühren infiltriert. Der abgesaugte Niederschlag wird i. Vak. über P_2O_5 getrocknet. Zers. ab 140° , $[\alpha]_D^{20}$: $-88.87 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -106.25° ($c = 2$, in Methanol), R_F (A) 0.68, R_F (E) 0.64, Ausb. 3.4 g (85.9% d. Th.).

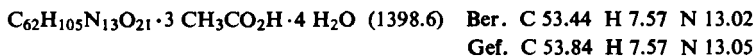


Lys^{2,10}-Kallidin (XXIX): 1.74 g *N^α-Carbobenzoxy-N^ε-BOC-lysyl-N^ε-BOC-lysyl-prolyl-prolyl-glycin* (XXVII) (2 mMol) und 2.4 g *Phenylalanyl-seryl-prolyl-phenylalanyl-N^ε-carbobenzoxy-lysinbenzylester-tosylat* (entspr. XXII) (2 mMol) in 10 ccm Dimethylformamid werden bei 0° unter Rühren mit 0.28 ccm *Triäthylamin* (2 mMol) versetzt, die resultierende Lösung mit 70 ccm Acetonitril verdünnt, 0.45 g *Dicyclohexylcarbodiimid* (2 mMol + 0.03 g) zugefügt, 2 Stdn. bei 0° und 4 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach kurzem Stehenlassen bei -5° wird vom Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Filtrat i. Vak. zur Trockne eingeeengt und die Essigesterlösung des Rückstandes wie üblich mit Citronensäurelösung, KHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. eingeeengt. Das gelbliche Rohprodukt wird mit 30 ccm *Trifluoressigsäure* übergossen und 1 Stde. bei Raumtemperatur bis zur Lösung stehengelassen. Überschüss. Trifluoressigsäure zieht man i. Vak. ab, nimmt den Rückstand in 20 ccm 70-proz. Methanol auf, gibt die Lösung über eine kleine Säule mit Dowex II (Acetat-form), versetzt das Eluat mit 5 ccm Eisessig und decarbobenzoyliert hydrogenolytisch (24

Stdn. bei Normaldruck). Das nach üblicher Aufarbeitung resultierende Rohprodukt wird in 20 ccm Pyridin/Eisessig-Puffer pH 4.9 gelöst und bei 2000 kV und 200 mA der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese unterworfen (Ninhydrin-Test bei 565 m μ):

1. Frakt. (22–28): R_F (B) 0.74
2. Frakt. (30–44): R_F (B) 0.21, Hauptprodukt
3. Frakt. (45): R_F (B) 0.21
 R_F (B) 0.42
4. Frakt. (46–47): R_F (B) 0.42

Die 2. Frakt. (30–44) wird lyophilisiert, der Rückstand in 10 ccm Wasser gelöst, mit 0.5 ccm Eisessig versetzt und nochmals lyophilisiert. Aus der methanol. Lösung fällt die Verbindung auf Zusatz von absol. Äther; sie wird abgesaugt und i. Vak. getrocknet: Schmp. unscharf bei 138°, $[\alpha]_D^{20}$: $-77.29 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -93.0° ($c = 0.5$, in Methanol), R_F (B) 0.21, R_F (E) 0.29, Ausb. 1.6 g (59% d. Th.).



Aminosäureanalyse:	Gly	Ser	Phe	Pro	Lys
Ber. 1	1	2	3	3	
Gef. 1.03	1.02	2.07	3.08	2.81	