

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird der Konstitutionsbeweis für eine Reihe von Abbausubstanzen erbracht, die im Verlaufe von jüngst veröffentlichten Untersuchungen über den Ozonabbau von 3,16-Di-O-acetylgitoxigenin erhalten worden waren.

Pharmazeutisches Institut
der Universität Basel

19. Nouvelle synthèse de la Bradykinine

par St. Guttman, J. Pless et R. A. Boissonnas

(1 XII 61)

Nous avons rapporté précédemment une première synthèse de la bradykinine¹⁾²⁾, synthèse qui avait pour but essentiel d'éclaircir rapidement la structure exacte de cette « hormone tissulaire » pour laquelle une structure provisoire avait été proposée peu auparavant³⁾. Dans le présent travail, nous décrivons une nouvelle synthèse de la bradykinine, qui présente sur la précédente le double avantage d'être plus simple et de fournir de meilleurs rendements.

Le nouveau schéma de synthèse que nous avons suivi (v. p. 171) se distingue de celui de la synthèse précédente par un emploi plus large des esters *p*-nitrophényliques pour la formation des liaisons peptidiques, par l'utilisation du groupe tosyle au lieu du groupe nitro pour la protection des fonctions guanido, ainsi que par le fait que le groupe carboxylique de l'arginine C-terminale a été laissé libre pendant toute la synthèse, et par celui que les groupes protecteurs ont été enlevés à la fin de la synthèse par réduction au sodium dans l'ammoniac liquide⁴⁾.

La N-CBO-G-tosyl-L-arginine⁵⁾ a été convertie par le tri-(*p*-nitrophényl)-phosphite⁶⁾ additionné de *p*-nitrophénol en N-CBO-G-tosyl-L-arginate de *p*-nitrophényle (I) (rdt 90%). Il se forme également dans cette réaction une petite quantité de N-CBO-G-tosyl-anhydro-L-arginine⁵⁾ qui peut être enlevée par purification plus poussée, mais qu'il est cependant plus pratique de n'éliminer que plus tard.

Par condensation de la N-CBO-G-tosyl-L-arginine avec le chloracétonitrile en présence de triéthylamine, nous avons obtenu le N-CBO-G-tosyl-L-arginate de cyano-

¹⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD, H. KONZETT & E. STÜRMER, *Experientia* **16**, 326 (1960); H. KONZETT & R. A. BOISSONNAS, *Experientia* **16**, 456 (1960); H. KONZETT & E. STÜRMER, *Brit. J. Pharmacol.* **15**, 544 (1960); *Nature* **188**, 998 (1960); R. A. BOISSONNAS, First international pharmacological meeting (Stockholm, 22-25 August 1961); cf. résumé N° 583 dans *Biochem. Pharmacol.* **8**, 177 (1961).

²⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN & P.-A. JAQUENOUD, *Helv.* **43**, 1349 (1960).

³⁾ D. F. ELLIOTT, G. P. LEWIS & E. W. HORTON, communication lue devant la « Biochemical Society (London) » le 8 avril 1960 (*Biochem. J.* **76**, 16P (1960)).

⁴⁾ E. D. NICOLAIDES & H. A. DE WALD (*J. org. Chemistry* **26**, 3872 (1961)) viennent de publier une synthèse de la bradykinine, dans laquelle le groupe nitro est utilisé pour la protection des fonctions guanido comme dans notre première synthèse²⁾.

⁵⁾ E. SCHNABEL & C. H. LI, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 4576 (1960).

⁶⁾ B. ISELIN, W. RITTEL, P. SIEBER & R. SCHWYZER, *Helv.* **40**, 373 (1957).

N-CBO-L-phénylalaninate de *p*-nitrophényle¹⁰) en N-CBO-L-phénylalananyl-G-tosyl-L-arginine (VIII) (rdt 92 %). La scission du groupe CBO- de cette dernière par l'acide bromhydrique dans l'acide acétique a fourni la L-phénylalananyl-G-tosyl-L-arginine (IX) (rdt. 97 %), qui a été condensée à pH 9,0⁹) avec le N-CBO-L-prolinate de *p*-nitrophényle¹⁰)¹¹) en N-CBO-L-prolyl-L-phénylalananyl-G-tosyl-L-arginine (X) (rdt 80 %). L'hydrogénation catalytique de celle-ci a fourni la L-prolyl-L-phénylalananyl-G-tosyl-L-arginine (XI) (rdt 84 %), qui a été condensée en présence de triéthylamine avec le N-CBO-L-phénylalananyl-L-sérylazide²) en N-CBO-L-phénylalananyl-L-séryl-L-prolyl-L-phénylalananyl-G-tosyl-L-arginine (XII) (rdt 69 %), dont l'hydrogénation catalytique a donné la L-phénylalananyl-L-séryl-L-prolyl-L-phénylalananyl-G-tosyl-L-arginine (XIII) (rdt 94 %). Ce pentapeptide a été condensé en présence de triéthylamine avec l'ester tétrapeptidique VI en N-CBO-G-tosyl-L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phénylalananyl-L-séryl-L-prolyl-L-phénylalananyl-G-tosyl-L-arginine (XIV) (rdt 71 %). Par scission des groupes protecteurs de ce nonapeptide protégé, au moyen du sodium dans l'ammoniac liquide, suivie de l'éloignement des ions sodiques par adsorption du nonapeptide libre sur un échangeur d'ions à groupes carboxyliques et élution par l'acide acétique à 50 %¹²), nous avons obtenu le triacétate de L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phénylalananyl-L-séryl-L-prolyl-L-phénylalananyl-L-arginine (XV) (rdt 85 %). Ce nonapeptide s'est révélé homogène à la chromatographie et à l'électrophorèse sur papier, ainsi qu'à la distribution en contre-courant. Dans ces divers examens physiques, il s'est comporté exactement comme la bradykinine synthétique que nous avons obtenue précédemment¹)²). L'analyse élémentaire et l'analyse en acides aminés ont donné les valeurs attendues. Les dosages biologiques, qui ont été effectués par le Dr E. STÜRMEER¹³), ont montré que la bradykinine préparée par cette nouvelle synthèse avait exactement la même activité que la bradykinine obtenue par notre première synthèse et que la bradykinine naturelle¹⁴).

Partie expérimentale¹⁵)

Les F. sont corrigés (précision $\pm 1^\circ$). Les séchages au vide ont été effectués sous 10^{-2} à 10^{-3} Torr (16 h à 60° pour les analyses). Les évaporations sous vide ont été conduites dans l'évaporateur rotatif de CRAIG¹⁶).

Les chromatographies sur papier ont été effectuées selon la méthode ascendante (20–23 cm) sur papier «SCHLEICHER & SCHUELL 2040 lavé». Rf_M dans le mélange méthyléthylcétone/pyridine/eau (65:15:20); Rf_A dans le mélange alcool isoamylique/pyridine/eau (35:35:30); Rf_P dans le mélange *n*-butanol/acide acétique/eau (70:10:20). Rf^a après scission préliminaire du groupe CBO- par séjour de 40 min à 20° dans une solution de HBr à 20% dans l'acide acétique glacial, évaporation au vide et reprise dans le solvant de chromatographie ou d'électrophorèse; Rf^b sans traitement préalable.

Les électrophorèses sur papier ont été effectuées dans l'appareil à électrophorèse sous haute tension de WIELAND & PFLEIDERER¹⁷): au pH 1,9 ($E_{1,9}$) dans le mélange acide formique/acide

¹⁰) M. GOODMAN & K. C. STUEBEN, J. Amer. chem. Soc. 87, 3980 (1959).

¹¹) M. BODANSZKY & V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. 87, 5688 (1959).

¹²) H. B. F. DIXON, Biochim. Biophysica Acta 34, 251 (1959).

¹³) Département pharmacologique SANDOZ (Dir.: Dr A. CERLETTI), Bâle.

¹⁴) Nous remercions vivement le Dr G. P. LEWIS de nous avoir envoyé un échantillon de bradykinine naturelle pure.

¹⁵) Les microanalyses ont été effectuées dans notre laboratoire microanalytique (Dr W. SCHÖNIGER).

¹⁶) L. C. CRAIG, J. C. GREGORY & W. HAUSMANN, Analyt. Chemistry 22, 1462 (1950).

¹⁷) TH. WIELAND & G. PFLEIDERER, Angew. Chem. 67, 257 (1955).

acétique/eau (15:10:75); au pH 5,8 ($E_{5,8}$) dans le mélange pyridine/acide acétique/eau (9:1:90). $E_{1,9} = 0,8$ His indique qu'à pH 1,9 la substance migre 0,8 fois la distance que migre l'histidine. Les exposants a et 0 ont la même signification que pour les chromatogrammes.

Les réactifs utilisés pour la révélation des chromatogrammes et phérogrammes ont été décrits précédemment¹⁸).

N-CBO-G-Tosyl-L-arginate de p-nitrophényle (I). On dissout 4,62 g (10 mmoles) de N-CBO-G-tosyl-L-arginine⁶) dans 10 ml de pyridine anhydre, évapore à sec, puis répète ces deux opérations encore une fois. On ajoute ensuite 10 ml de pyridine, 1,38 g (10 mmoles) de *p*-nitrophénol et 3,0 g de tri-*(p*-nitrophényl)-phosphite⁶), agite 12 h à 20° et évapore à sec. On redissout le résidu dans 100 ml d'acétate d'éthyle, lave par HCl 1N, NaHCO₃ 1N et eau, sèche sur Na₂SO₄, évapore à sec et triture dans l'éther jusqu'à pulvérisation complète. On obtient ainsi 5,25 g (90%) de N-CBO-G-tosyl-L-arginate de *p*-nitrophényle qui contient des traces de lactame. Le produit obtenu peut être utilisé sans autre purification pour la suite de la synthèse car la petite quantité de lactame qu'il contient peut être éliminée plus tard sans difficultés. Pour l'obtention d'un produit pur, on dissout le produit brut dans 60 ml de benzène bouillant, refroidit la solution (séparation d'une huile) et décante. On triture le résidu huileux dans l'éther jusqu'à transformation complète en un produit pulvérulent, filtre et sèche. On obtient ainsi 3,55 g (61%) de produit tout à fait pur de F. 50–60° (déc.). $[\alpha]_D^{23} = -19,1^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol); $-13,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,2$; diméthylformamide); $-13,8^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%). $E_{1,9}^a = 1,0$ Try (révélation par ninhydrine, chlore et ammoniac; homogène). Le produit est également homogène à la chromatographie sur couche mince de silicagel dans les systèmes chloroforme/méthanol (9:1) et (7:3) et acétone/benzène (1:2) (révélation par chlore et ammoniac).

$C_{27}H_{28}O_8N_5S$	Calc. C 55,5	H 5,0	O 21,9	N 12,0	S 5,5%
(583,6)	Tr. ,, 55,6	,, 5,2	,, 22,0	,, 12,4	,, 5,6%

N-CBO-G-Tosyl-L-arginate de cyanométhyle (II). On dissout 4,62 g (10 mmoles) de N-CBO-G-tosyl-L-arginine⁶) dans 10 ml de chloracétonitrile et 2,5 ml (18 mmoles) de triéthylamine, chauffe 4 h à 80°, puis évapore à sec. On reprend le résidu dans 100 ml d'acétate d'éthyle, ajoute 20 ml d'eau, sépare les phases, lave la phase organique par HCl 1N, NaHCO₃ 1N et eau, sèche, évapore à sec et triture le résidu dans l'éther. On dissout le produit pulvérulent obtenu dans 60 ml de benzène bouillant, refroidit à 10°, décante et triture le résidu huileux dans l'éther jusqu'à pulvérisation totale. On obtient ainsi 4,56 g (89%) de N-CBO-G-tosyl-L-arginate de cyanométhyle sans F. bien déterminé. $[\alpha]_D^{23} = -10,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $-9,1^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; acide acétique 95%); $-16,9^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; méthanol). Le groupe protecteur ne peut pas être scindé sans transformation partielle du groupe nitrile. Par contre, sans scission préalable, le produit est homogène à la chromatographie sur couche mince de silicagel dans le système chloroforme/méthanol (9:1).

$C_{23}H_{27}O_8N_5S$	Calc. C 55,1	H 5,4	O 19,1	N 14,0	S 6,4%
(501,6)	Tr. ,, 55,4	,, 5,4	,, 19,2	,, 13,7	,, 6,4%

N-CBO-L-Prolyl-L-prolyl-glycine (III). On dissout 2,90 g (18 mmoles) de chlorhydrate de glycinate d'éthyle, 6,25 g (21 mmoles) de N-CBO-L-prolyl-L-proline⁷) et 2,8 ml (20 mmoles) de triéthylamine dans un mélange de 20 ml de diméthylformamide et 100 ml d'acétonitrile, refroidit à -15° , ajoute 4,66 g (23 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide et agite 16 h à 20°. On sépare la dicyclohexylurée par filtration, évapore le filtrat à sec, reprend le résidu dans 100 ml d'acétate d'éthyle, lave par HCl 1N, NaHCO₃ et eau, sèche sur Na₂SO₄ et évapore à sec. On obtient ainsi 7,50 g (96%) de N-CBO-L-prolyl-L-prolyl-glycinate d'éthyle huileux, qui est homogène à l'électrophorèse: $E_{1,9}^a = 1,0$ Glu; $E_{5,8}^a = 0,9$ His (révélation par ninhydrine, isatine et chlore). On dissout 7,50 g (18 mmoles) d'ester tripeptidique ainsi obtenu dans 20 ml d'éthanol, ajoute 5,0 ml de NaOH 4N, maintient pendant 1 h à 20°, ajoute 100 ml d'eau, lave par l'acétate d'éthyle, refroidit à 0°, acidifie à pH 1,0 par H₂SO₄ 1N, extrait le précipité huileux par l'acétate d'éthyle, sèche, évapore à sec et triture le résidu dans l'éther de pétrole jusqu'à transformation complète en un produit pulvérulent. On obtient ainsi 6,45 g (89%) de N-CBO-L-prolyl-L-prolyl-glycine sans F. bien déterminé. $[\alpha]_D^{23} = -120,9^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol); $-129^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,9$; acide acétique 95%);

¹⁸) St. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, Helv. 43, 200 (1960).

$-75,2^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,06$; $Rf_A^a = 0,20$; $Rf_B^a = 0,30$; $E_{1,9}^a = 1,0$ Glu; $E_{6,8}^a = 0,6$ Glu (révélation par ninhydrine, isatine et chlore; homogène).

$C_{20}H_{28}O_8N_3$	Calc.	C 59,5	H 6,2	O 23,8	N 10,4%
(403,4)	Tr.	„ 59,0	„ 6,6	„ 24,2	„ 10,5%

L-Prolyl-L-prolyl-glycine (IV). On dissout 5,15 g (12,8 mmoles) d'acide tripeptidique III dans 200 ml d'un mélange méthanol/eau (7:3) et hydrogène à pression ordinaire en présence de 1,30 g de catalyseur d'hydrogénation selon KUHN¹⁹). Après élimination du catalyseur par centrifugation et évaporation de la solution à sec, on recristallise le résidu dans un mélange éthanol/éther (1:1), filtre et sèche. On obtient ainsi 3,30 g (95%) de *L-prolyl-L-prolyl-glycine* très hygroscopique de F. 109–111°. $[\alpha]_D^{23} = -144,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $-88,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,1$; méthanol). $Rf_M^a = 0,07$; $Rf_A^a = 0,19$; $Rf_B^a = 0,30$; $E_{1,9}^a = 1,0$ Glu; $E_{6,8}^a = 0,0$ (révélation par ninhydrine, isatine et chlore; homogène).

$C_{12}H_{19}O_4N_3 + H_2O$	Calc.	C 50,2	H 7,4	O 27,8	N 14,6%
(287,3)	Tr.	„ 49,9	„ 8,2	„ 27,7	„ 14,9%

N-CBO-G-Tosyl-L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycine (V). On dissout 1,80 g (6,7 mmoles) de tripeptide IV et 3,50 g (6,0 mmoles) d'ester I dans 35 ml de mélange chloroforme/acétate d'éthyle (6:1), ajoute 1,4 ml (10 mmoles) de triéthylamine et maintient la solution ainsi obtenue pendant 24 h à 20°. On évapore à sec, dissout le résidu dans 20 ml de $NaHCO_3$ 1N, lave la solution aqueuse par l'acétate d'éthyle, acidifie à pH 1,0 par H_2SO_4 2N et extrait le précipité huileux par 3×50 ml de chloroforme. On sèche sur Na_2SO_4 , évapore à sec, triture le résidu dans l'éther jusqu'à pulvérisation complète, filtre et sèche. On obtient ainsi 3,85 g (90%) de *N-CBO-G-tosyl-L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycine* de F. env. 90° (déc.). $[\alpha]_D^{23} = -71,2^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol); $-53,1^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,9$; diméthylformamide); $-72,3^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%). $Rf_M^a = 0,30$; $Rf_A^a = 0,45$; $Rf_B^a = 0,45$; $E_{1,9}^a = 0,9$ Try; $E_{6,8}^a = 0,0$ (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{33}H_{43}O_9N_7S$	Calc.	C 55,5	H 6,1	O 20,2	N 13,7	S 4,5%
(713,8)	Tr.	„ 55,3	„ 6,2	„ 20,3	„ 13,8	„ 4,5%

N-CBO-G-Tosyl-L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycinate de p-nitrophényle (VI). On dissout 3,07 g (4,3 mmoles) d'acide tétrapeptidique V et 600 mg (4,3 mmoles) de *p*-nitrophénol dans 10 ml de pyridine, évapore cette solution sous pression réduite, reprend le résidu dans 4,0 ml de pyridine anhydre, ajoute 1,30 g (2,9 mmoles) de tri-(*p*-nitrophényl)-phosphite⁶) et agite le tout pendant 16 h à 20°. On ajoute 50 ml d'acétate d'éthyle, lave par HCl 1N, $NaHCO_3$ 1N, eau et NaCl 30%, sèche sur Na_2SO_4 , évapore à sec, triture le résidu dans l'éther jusqu'à pulvérisation complète, puis sèche. On obtient ainsi 3,29 g (92%) de *N-CBO-G-tosyl-L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycinate de p-nitrophényle* de F. 122° (déc.). $[\alpha]_D^{23} = -87,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol); $-54,3^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; diméthylformamide); $-79,3^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%). $Rf_B^a = 0,55$; $E_{1,9}^a = 0,8$ Try (révélation par ninhydrine, chlore et NH_3). Sans scission préalable, le produit donne une tache unique à la chromatographie sur couche mince de silicagel dans les systèmes chloroforme/méthanol (9:1) et (7:3) (révélation par iode-amidon et par NH_3).

$C_{39}H_{46}O_{11}N_8S$	Calc.	C 56,1	H 5,6	O 21,1	N 13,4	S 3,8%
(834,9)	Tr.	„ 56,0	„ 5,3	„ 21,4	„ 13,3	„ 4,0%

G-Tosyl-L-arginine (VII). On dissout 44,4 g (96 mmoles) de *N-CBO-G-tosyl-L-arginine*⁵) dans 800 ml d'un mélange de méthanol/eau/acide acétique (7:3:1), ajoute 10,0 g de catalyseur d'hydrogénation selon KUHN¹⁹) et hydrogène à pression ordinaire. Après la fin de l'absorption d'hydrogène, on élimine le catalyseur par filtration, évapore le filtrat à sec, redissout le résidu huileux dans 250 ml d'eau bouillante, refroidit à 0°, sépare le produit amorphe qui se dépose et sèche sur P_2O_5 sous pression réduite. On obtient ainsi 25,3 g (80%) de *G-tosyl-L-arginine* sans F. bien déterminé. $[\alpha]_D^{23} = -6,1^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol); $+3,2^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $+4,6^\circ \pm 1,0^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%). $Rf_M^a = 0,48$; $Rf_A^a = 0,46$. $E_{1,9}^a = 0,9$ Try; $E_{6,8}^a = 0,0$ (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{13}H_{20}O_4N_4S$	Calc.	C 47,5	H 6,1	O 19,5	N 17,1	S 9,8%
(328,4)	Tr.	„ 47,2	„ 6,3	„ 19,8	„ 17,0	„ 9,8%

¹⁹) R. KUHN & H. J. HAAS, Angew. Chem. 67, 785 (1955).

N-CBO-L-Phénylalanyl-G-tosyl-L-arginine (VIII). On agite une suspension de 25,8 g (78,5 mmoles) de G-tosyl-L-arginine (VII) et 26,4 g (63,0 mmoles) de N-CBO-L-phénylalaninate de *p*-nitrophényle¹⁰⁾ dans 300 ml d'un mélange dioxanne/eau (1:1) et maintient le pH à 8,5 en ajoutant un mélange dioxanne/NaOH 1N (1:1) à l'aide d'un titrateur automatique. Après environ 24 h à 20° la consommation de NaOH est terminée, et on obtient une solution limpide fortement colorée en jaune. On lave plusieurs fois par l'acétate d'éthyle, puis acidifie la phase aqueuse par H₂SO₄ 1N, extrait le précipité huileux par l'acétate d'éthyle, sèche sur Na₂SO₄, évapore à sec et triture le résidu dans l'éther jusqu'à obtention d'un produit blanc pulvérulent. Après filtration et séchage, on obtient 35,3 g (92%) de N-CBO-L-phénylalanyl-G-tosyl-L-arginine. $[\alpha]_D^{25} = 1,9^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,9$; méthanol); $-1,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,9$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,60$; $Rf_A^a = 0,65$. $E_{1,9}^a = 0,9$ Try; $E_{5,8}^a = 0,0$ (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{30}H_{35}O_7N_5S$	Calc.	C 59,1	H 5,8	O 18,4	N 11,5	S 5,2%
(609,7)	Tr.	„ 59,2	„ 6,0	„ 18,7	„ 11,8	„ 5,4%

L-Phénylalanyl-G-tosyl-L-arginine, HBr (IX). On dissout 30,0 g (49 mmoles) d'acide dipeptidique VIII dans 250 ml d'HBr 3,6N dans l'acide acétique glacial, maintient pendant 60 min à 20°, ajoute 2,5 l d'éther, sépare le précipité par filtration, lave à l'éther et sèche au vide poussé. On obtient 28,1 g (97%) de bromhydrate de L-phénylalanyl-G-tosyl-L-arginine de F. 153-160°. $[\alpha]_D^{25} = +3,7^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; méthanol); $+1,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $+9,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; acide acétique 95%). $Rf_M^0 = 0,60$; $Rf_A^0 = 0,61$. $E_{1,9}^0 = 0,9$ Try (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{22}H_{23}O_8N_5S + 1\frac{1}{2}HBr$	Calc.	C 44,3	H 5,1	O 13,4	N 11,7	S 5,4	Br 20,1%
(596,9)	Tr.	„ 43,3	„ 5,3	„ 13,0	„ 11,5	„ 5,6	„ 19,9%

N-CBO-L-Prolyl-L-phénylalanyl-G-tosyl-L-arginine (X). A une solution de 3,70 g (10 mmoles) de N-CBO-L-prolinate de *p*-nitrophényle^{12) 13)} et de 5,40 g (9,1 mmoles) de dipeptide IX dans 25 ml d'un mélange tétrahydrofuranne/dioxanne/eau (2:2:1) on ajoute, sous forte agitation et à l'aide d'un titrateur automatique, un mélange NaOH 1N/dioxanne (1:1) afin de maintenir le pH à 9,0. Après 16 h, la réaction est terminée. On lave par l'acétate d'éthyle, acidifie la phase aqueuse par H₂SO₄ 1N, extrait le précipité huileux par l'acétate d'éthyle, sèche sur Na₂SO₄, évapore à sec, triture le résidu dans l'éther, filtre, lave le précipité par l'éther et sèche. On obtient ainsi 5,17 g (80%) de N-CBO-L-prolyl-L-phénylalanyl-G-tosyl-L-arginine de F. 90° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -34,8^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,9$; méthanol); $-30,9^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $-25,3^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,67$; $Rf_A^a = 0,68$; $Rf_B^a = 0,72$. $E_{1,9}^a = 0,82$ Try; $E_{5,8}^a = 0,0$ (révélation par ninhydrine, isatine et chlore; homogène).

$C_{35}H_{42}O_8N_6S$	Calc.	C 59,5	H 6,0	O 18,1	N 11,9	S 4,5%
(706,8)	Tr.	„ 59,0	„ 6,1	„ 18,1	„ 12,1	„ 4,7%

L-Prolyl-L-phénylalanyl-G-tosyl-L-arginine (XI). On dissout 18,0 g (25,4 mmoles) d'acide tripeptidique X dans 400 ml d'un mélange de méthanol/acide acétique/eau (7:3:1) et hydrogène à pression ordinaire en présence de catalyseur d'hydrogénation selon KUHN¹⁹⁾. On élimine le catalyseur par filtration, évapore le filtrat à sec, redissout le résidu dans 125 ml d'eau bouillante, refroidit à 0° et maintient la solution limpide pendant 12 h à cette température. Le tripeptide qui précipite est séparé par filtration, lavé par l'eau et séché sur P₂O₅ au vide poussé. On obtient 12,2 g (84%) de L-prolyl-L-phénylalanyl-G-tosyl-L-arginine de F. 150° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -5,8^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $-6,3^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; diméthylformamide). $Rf_M^0 = 0,60$; $Rf_A^0 = 0,65$; $Rf_B^0 = 0,67$. $E_{1,9}^0 = 0,9$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,0$ (révélation par ninhydrine, isatine et chlore; homogène).

$C_{27}H_{36}O_8N_6S$	Calc.	C 56,6	H 6,3	O 16,8	N 14,7	S 5,6%
(572,7)	Tr.	„ 55,8	„ 6,5	„ 16,7	„ 14,8	„ 5,7%

N-CBO-L-Phénylalanyl-L-séryl-L-prolyl-L-phénylalanyl-G-tosyl-L-arginine (XII). On dissout 9,20 g (23 mmoles) de N-CBO-L-phénylalanyl-L-sérylhydrazide²⁾ dans 32 ml d'acide acétique glacial, ajoute 16 ml de HCl 4N, refroidit à -5° et ajoute sous forte agitation 1,73 g (25 mmoles) de nitrite de sodium dissous dans 16 ml d'eau. Après 5 min on sépare l'azide tripeptidique cristallin par filtration, lave par NaHCO₃ et essore soigneusement. On dissout ensuite l'azide dans un mélange de 8,0 ml de diméthylformamide, 16 ml de dioxanne et 8 ml d'eau, ajoute 12,0 g (21 mmoles)

de tripeptide XI, puis 3,24 ml de triéthylamine et agite le mélange ainsi obtenu à 20°. Au bout de 16 h on obtient une solution limpide, qu'on évapore à sec. On reprend le résidu dans un mélange de 250 ml d'acétate d'éthyle et de 250 ml d'eau, obtient trois phases, dont on élimine la phase contenant l'acétate d'éthyle. On lave encore une fois par l'acétate d'éthyle, puis, après l'élimination de ce dernier, on acidifie le résidu par H₂SO₄ 1N, extrait le précipité huileux par du chloroforme, sèche la solution obtenue, puis évapore à sec. On reprend le résidu dans 50 ml d'acétonitrile bouillant, élimine une petite partie insoluble par décantation et évapore la solution limpide à sec. Après trituration du résidu dans l'éther, filtration et séchage, on obtient 13,6 g (69%) de N-CBO-L-phénylalanyl-L-séryl-L-prolyl-L-phénylalanyl-G-tosyl-L-arginine. $[\alpha]_D^{23} = -37,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,9$; méthanol); $-22,1^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,9$; diméthylformamide); $-34,6^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%). $Rf_M^a = 0,73$; $Rf_A^a = 0,73$; $Rf_P^a = 0,77$. $E_{1,9}^a = 0,69$ Try; $E_{8,8}^a = 0,0$ (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{47}H_{86}O_{11}N_8S$	Calc.	C 60,1	H 6,0	O 18,7	N 11,9	S 3,4%
(941,0)	Tr.	59,8	6,2	18,9	11,6	3,5%

L-Phénylalanyl-L-séryl-L-prolyl-L-phénylalanyl-G-tosyl-L-arginine (XIII). On dissout 4,82 (5,1 mmoles) d'acide pentapeptidique XII dans 200 ml d'un mélange méthanol/eau/acide acétique (7:3:1) et hydrogène à pression ordinaire en présence de 600 mg de catalyseur d'hydrogénation selon KUHN¹⁹), élimine le catalyseur par filtration et évapore le filtrat à sec. On dissout le résidu dans 30 ml d'eau bouillante, refroidit à 0°, centrifuge pour séparer le précipité huileux, qui, par trituration dans l'éther, se transforme en un produit pulvérulent. Après séchage, on obtient 3,90 g (94%) de L-phénylalanyl-L-séryl-L-prolyl-L-phénylalanyl-G-tosyl-L-arginine de F. 160–175°. $[\alpha]_D^{23} = -49,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol); $-38,6^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $-28,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; acide acétique 95%). $Rf_M^a = Rf_A^a = 0,73$; $Rf_P^a = 0,77$. $E_{1,9}^a = 0,7$ Try; $E_{8,8}^a = 0,0$ (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{39}H_{50}O_9N_8S$	Calc.	C 58,1	H 6,1	O 17,9	N 13,9	S 4,0%
(806,9)	Tr.	58,0	6,2	18,0	13,6	4,0%

N-CBO-G-Tosyl-L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-séryl-L-prolyl-L-phénylalanyl-G-tosyl-L-arginine (XIV). On suspend 1,82 g (2,2 mmoles) d'ester tétrapeptidique VI et 1,84 g (2,3 mmoles) de pentapeptide XIII dans 20 ml de dioxanne anhydre, évapore à sec, répète cette opération encore trois fois, puis dissout le résidu dans 16 ml de chloroforme, ajoute 0,35 ml (2,5 mmoles) de triéthylamine et 2 ml d'acétate d'éthyle et maintient la solution obtenue pendant 48 h à 20°. On évapore à sec, triture le résidu dans l'acétate d'éthyle, filtre, lave le précipité par l'eau, puis on le dissout dans 40 ml de dioxanne/eau (4:1) et laisse passer la solution à travers 20 ml d'échangeur d'ions à groupes sulfoniques (Dowex-50; cycle acide), évapore à sec, redissout le résidu dans 10 ml de chloroforme et précipite par adjonction de 20 ml d'acétate d'éthyle. Après filtration et séchage, on obtient 2,33 g (71%) de N-CBO-G-tosyl-L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-séryl-L-prolyl-L-phénylalanyl-G-tosyl-L-arginine de F. 170° (déc.). $[\alpha]_D^{23} = -60,2^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,9$; méthanol); $-40,8^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $-61,6^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,9$; acide acétique 95%). $Rf_M^a = 0,68$; $Rf_A^a = 0,70$; $Rf_P^a = 0,82$. $E_{1,9}^a = 0,6$ Try; $E_{8,8}^a = 0,0$ (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{72}H_{91}O_{17}N_{15}S$	Calc.	C 57,6	H 6,1	O 18,1	N 14,0	S 4,3%
(1502,7)	Tr.	57,4	6,4	18,4	13,7	4,4%

L-Arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-séryl-L-prolyl-L-phénylalanyl-L-arginine (Bradykinine) (XV). On dissout 2,0 g (1,33 mmole) de nonapeptide protégé XIV dans 500 ml d'ammoniac liquide et introduit sous forte agitation du sodium métallique jusqu'à persistance de la couleur bleue; on ajoute 3,5 g d'acétate d'ammonium, évapore l'ammoniac sous pression réduite et sèche le résidu au vide poussé jusqu'à la disparition de l'odeur de NH₃. On dissout le résidu dans 200 ml d'acétique 1N, passe sur 300 ml d'échangeur d'ions à groupes carboxyliques (IRC-50; cycle acide) pour adsorber le nonapeptide, lave le résidu par 3 l d'acide acétique 1N afin d'éliminer les sels inorganiques¹²), puis élue le nonapeptide par l'acide acétique à 50%. La quantité d'acide acétique à 50% nécessaire pour cette élution (dont la fin est marquée par l'absence d'une réaction positive à la ninhydrine) est d'environ 4000 ml. La solution peptidique est évaporée à sec, le résidu est repris dans 20 ml d'eau et la solution obtenue est lyophilisée. On redissout le résidu dans 5 ml de méthanol, précipite par adjonction d'éther, filtre et sèche. On

obtient 1,39 g (85%) de triacétate de L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-séryl-L-prolyl-L-phénylalanyl-L-arginine. $[\alpha]_D^{25} = -36,1^\circ \pm 1,0^\circ$ ($c = 0,8$; diméthylformamide); $-51,8^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,9$; acide acétique 95%); $-65^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,9$; acide acétique 1N). $Rf_M^0 = 0,14$; $Rf_A^0 = 0,25$; $Rf_B^0 = 0,28$. $E_{1,9}^0 = 1,1$ Glu; $E_{5,8}^0 = 0,8$ His (révélation par ninhydrine, chlore, bleu de bromophénol et SAKAGUCHI; homogène). Par répartition en contre-courant dans le système *sec.*-butanol/eau/acide trifluoracétique (120:160:1) on obtient un sommet unique correspondant à la courbe théorique pour $K = 0,9$. L'hydrolyse acide totale (HCl 6N; 110° ; 16 h) donne de l'arginine, de la glycine, de la phénylalanine et de la sérine, dans le rapport 2,06:0,94:2,08:1,00 (la proline est présente mais elle n'a pas été déterminée). La quantité d'ornithine décelable dans cet hydrolysate est inférieure à 1% de la quantité d'arginine présente.

$C_{50}H_{73}O_{11}N_{15}$ (1240,4)	$3CH_3CO_2H$	Calc. C 54,2	H 6,9	O 21,9	N 17,0%	CH_3CO_2H 3,0 équiv.
		Tr. „ 54,1	„ 7,9	„ 22,1	„ 17,3%	„ 2,9 „

SUMMARY

An improved synthesis of Bradykinin is described. N-CBO-G-tosyl-L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycine *p*-nitrophenyl ester and L-phenylalanyl-L-seryl-L-prolyl-L-phenylalanyl-G-tosyl-L-arginine are prepared and condensed together to N-CBO-G-tosyl-L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-seryl-L-prolyl-L-phenylalanyl-G-tosyl-L-arginine. Removal of the protective groups by sodium in liquid ammonia affords directly pure Bradykinin in high yield.

Laboratoires de Chimie Pharmaceutique
SANDOZ, Bâle

20. Über die Ermittlung der Struktur eines bei der Herstellung von 1-[N-Methylpiperidyl-(4')]-3-phenyl-4-benzyl-pyrazol-5-on auftretenden Isomers als 1-[N-Methylpiperidyl-(4')]-4-benzyl-5-phenyl-pyrazol-3-on

1. Mitteilung über RÖNTGEN-Strukturanalyse

von H. G. Leemann und K. Antenen

(I. XII. 61)

1. Einleitung. – Bei der Fabrikation von 1-[N-Methylpiperidyl-(4')]-3-phenyl-4-benzyl-pyrazol-5-on $C_{22}H_{25}ON_3$ (I)¹⁾ entsteht in kleinen Mengen ein Isomer. Entsprechend dem Syntheseverlauf sind die Strukturen II–VI dafür denkbar.

Da das Nebenprodukt bei der Jodmethylierung lediglich ein monoquaternäres Salz liefert, können auf Grund dieser Tatsache die Strukturen IV und VI von vornherein ausser Betracht gelassen werden. Verschiedene physikalisch-chemische Messungen erhärteten die Vermutung, dass dem Nebenprodukt die Strukturformel II zukommen muss. Eine RÖNTGEN-Strukturanalyse des Jodmethylats des Nebenprodukts bestätigte endgültig für das Nebenprodukt die Konstitution des stellungsisomeren 1-[N-Methylpiperidyl-(4')]-4-benzyl-5-phenyl-pyrazol-3-ons (II)²⁾.

¹⁾ Schweiz. Pat. 346886, Zusatz zum Hauptpatent Nr. 342578; A. EBNÖTHER, E. JUCKER & A. LINDENMANN, *Helv.* 42, 1201 (1959); E. JUCKER & A. LINDENMANN, *Helv.* 44, 1249 (1961).

²⁾ Für die Herstellung des 1-[N-Methylpiperidyl-(4')]-4-benzyl-5-phenyl-pyrazol-3-on-jodmethylats danken wir Herrn Dr. A. LINDENMANN bestens. Die Verbindung wurde mehrmals aus Methanol umkristallisiert und zeigt einen Smp. von $284-286^\circ$ (Zers.).