

- [33] T. REICHSTEIN, *Angew. Chem.* **74**, 887 (1962); T. REICHSTEIN & EK. WEISS, *Advances Carbohydrate Chem.* **17**, 65 (1962).
- [34] Ausführung nach LETTRÉ-INHOFFEN-TSCHESCHE: *Über Sterine, Gallensäuren und verwandte Naturstoffe I*, S. 6, F. Enke Verlag, Stuttgart 1954.
- [35] M. S. BHARUCHA, EK. WEISS & T. REICHSTEIN, *Helv.* **45**, 103 (1962).
- [36] W. ARNOLD, R. BÜHRER, J. V. EUW, E. LÜSCHER, O. SCHINDLER, K. STICH, P. ZOLLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **46**, 178 (1963).
- [37] E. HEILBRONNER, H. U. DÄNIKER & PL. A. PLATTNER, *Helv.* **32**, 1723 (1949); F. A. ASKEW, *J. chem. Soc.* **1935**, 509; J. C. BARDHAN & R. N. ADHYA, *ibid.* **1956**, 260.
- [38] R. D. HAWORTH, *J. chem. Soc.* **1932**, 1125.
- [39] R. D. HAWORTH, C. R. MAVIN & G. SHELDRIK, *J. chem. Soc.* **1934**, 460, geben Smp. 44–45°.
- [40] B. G. ENGEL, A. RONCO, K. BÉRSE, PL. A. PLATTNER & L. RUZICKA, *Helv.* **32**, 1713 (1949), geben Smp. 54–55°.
- [41] L. F. FIESER & CH. C. PRICE, *J. Amer. chem. Soc.* **58**, 1838 (1936).
- [42] T. REICHSTEIN, *Helv.* **9**, 799 (1926).
- [43] M. PHILLIPS & G. L. KEENAN, *J. Amer. chem. Soc.* **53**, 1924 (1931).
- [44] H. LICHTI, M. KUHN & A. V. WARTBURG, *Helv.* **45**, 868 (1962), frühere Lit. daselbst.

258. Synthetische Analoge des Hypertensins.

V. α -L-, β -L-, α -D- und β -D-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II; Desamino-Val⁵-Hypertensin II¹)

von B. Riniker und R. Schwyzer²)

(15. X. 64)

In der Mitteilung IV über synthetische Analoge des Hypertensins [1]³) berichteten wir über die Labilität der Amid-Seitenkette im Hypertensin II und stellten fest, dass sich, neben einer teilweisen Abspaltung von Asparaginsäure und Bildung von Heptapeptid, das Val⁵-Hypertensin II-Asp¹- β -amid (I, in dieser Arbeit als α -L-Asp(NH₂)¹-Val⁵-Hypertensin II bezeichnet) beim Aufbewahren in wässriger Lösung bei 50° zu 90% in «Val⁵-Hypertensin II» umwandelt. Wir konnten vorerst das so erhaltene Peptid von dem aus der gleichen Verbindung durch Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure gewonnenen Produkt nicht unterscheiden. Später zeigte sich aber, dass es sich bei dem durch Hydrolyse in neutralem Milieu erhaltenen Material um ein Gemisch von hauptsächlich β -Asp¹-Val⁵-Hypertensin II (IV) neben wenig α -Verbindung (III) handelte [2]. Desgleichen bewirkte auch das Stehenlassen einer wässrigen Lösung von α -L-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II (II) während 6 Monaten bei 50° eine weitgehende Umwandlung in die β -Form (IV), was beweist, dass diese Transpeptidierungsreaktion nicht an das Vorhandensein der Amidgruppe in der Seitenkette des Asparagins gebunden ist. Für die zur Bildung von Asparaginsäure und Heptapeptid führende Hydrolyse wurde ein cyclisches Imid⁴) als Zwischenprodukt vorgeschlagen. Die hier be-

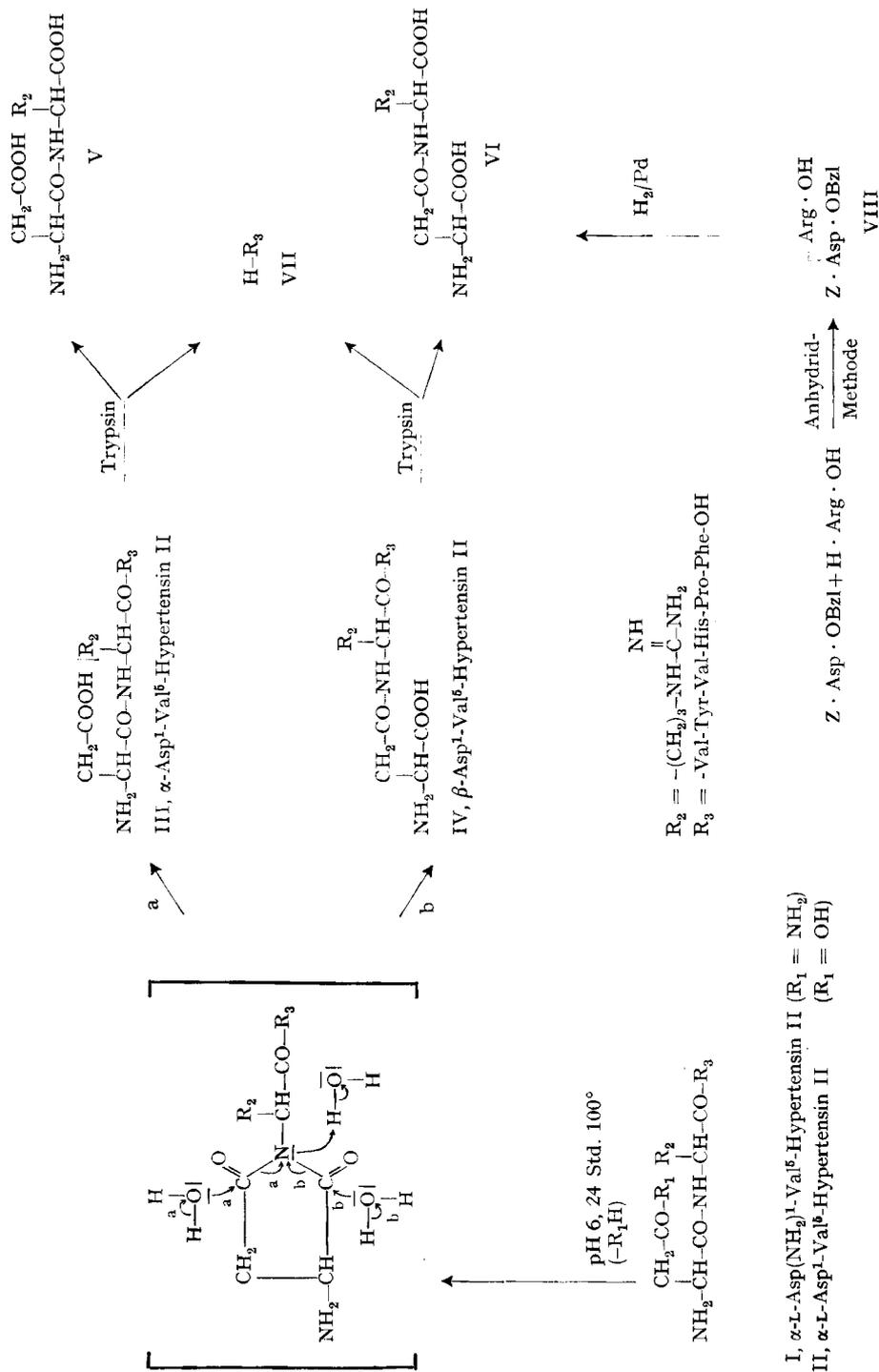
¹) Auszugsweise vorgetragen (B.R.) an der BROOK LODGE Conference on Proteins and Polypeptides vom 7.–9. X. 1963 in Kalamazoo, Michigan.

²) Gegenwärtig Prof. für Molekulare Biologie chemischer Richtung an der ETH in Zürich.

³) Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 2374.

⁴) Schema 4 in [1]; in den Schemata 3–5 ist irrtümlicherweise der Argininrest weggelassen worden.

Schema 1



beschriebene Transpeptidierungsreaktion dürfte über ein ähnliches cyclisches Imid (Schema 1) verlaufen, das vorzugsweise nach Weg b zum β -Peptid IV gespalten wird.

Analoge Imidbildungen und Umlagerungen finden sehr leicht bei der Alkalibehandlung von Peptiden statt, deren Asparaginsäure- (und Glutaminsäure-) Seitenketten verestert sind [3]. Sie schliessen die basische Verseifung von Estergruppen in der Seitenkette dieser Aminosäuren als Methode der synthetischen Peptidchemie in allen jenen Fällen aus, wo sich der betreffende Aminosäurerest im Innern oder am Aminoende einer Peptidkette befindet.

Transpeptidierungsreaktionen dieser Art sind aber auch in neutralem Milieu bei Asparaginyll- und, in geringerem Ausmass, bei Aspartylpeptiden (mit freier β -Carboxylgruppe) möglich, und wir müssen bei jedem längeren Stehenlassen solcher Verbindungen in wässriger Lösung bei höheren Temperaturen (z. B. einige Std. bei 100°) mit ihrem Eintreten rechnen. Besonders bei grösseren Peptiden besteht die Möglichkeit, dass die α - und β -Formen durch Chromatographie nur sehr schwer voneinander differenzierbar sind. Zur Charakterisierung der Einheitlichkeit solcher Verbindungen sind wir dann unbedingt auch auf die Analyse mittels Elektrophorese in verschiedenen pH-Bereichen angewiesen (S. 2363).

Im vorliegenden Falle des Hypertensins konnten wir mit keinem der für die Papierchromatographie untersuchten Fließmittelsysteme eine genügende Trennung des α -Peptides (III) von der daraus durch Umlagerung entstandenen β -Form (IV) erreichen. Erst die Anwendung von Aluminiumoxid als Trägermaterial für die Dünnschichtchromatographie, in Kombination mit basischen Fließmitteln, ermöglichte eine saubere Auftrennung. Durch Übertragung dieser Analysenmethode in den präparativen Maßstab fanden wir eine einfache Methode zur Trennung grösserer Mengen von α - und β -Hypertensin: Aus einer Säule von neutralem Aluminiumoxid wird beim Eluieren mit einem Gemisch von Methanol und 2N Ammoniak (1:1) das α -Asp¹-Val⁵-Hypertensin II rascher desorbiert, währenddem die β -Form erst in den späteren Fraktionen erscheint.

Auf diese Weise wurde ein aus α -L-Asp(NH₂)¹-Val⁵-Hypertensin II (I, Schema 1) durch 24-stündiges Kochen in Wasser erhaltenes Gemisch aufgetrennt und beide Komponenten einzeln mit Trypsin gespalten. Aus dem in ca. 65% Ausbeute gewonnenen und an der Aluminiumoxidsäule langsamer eluierten β -Oktapeptid IV wurde dabei das Dipeptid β -Aspartyl-L-arginin (VI) erhalten, das mit der synthetisch gewonnenen Verbindung anhand der Elektrophorese und Ninhydrinreaktion⁵⁾ identifiziert wurde und sich deutlich von dem aus dem α -Oktapeptid III gewonnenen α -Aspartyl-L-arginin (V) unterschied. Die Synthese von β -L-Aspartyl-L-arginin (VI) verlief in guter Ausbeute durch Umsetzung von Carbobenzyloxy-L-asparaginsäure- α -benzylester nach der gemischten Anhydrid-Methode mit freiem L-Arginin und katalytischer Reduktion des so erhaltenen geschützten Dipeptides VIII.

Bei der Bildung der Oktapeptide III und IV über das in Schema 1 formulierte cyclische Zwischenprodukt schienen die Voraussetzungen gegeben, dass dabei der Asparaginsäurerest teilweise oder vollständig racemisieren würde. Der oben erwähnte Vergleich des aus dem β -Okta-

⁵⁾ In Übereinstimmung mit den von YOUNG und Mitarbeitern [4] [5] festgestellten Unterschieden zwischen α - und β -Aspartyl-dipeptiden fanden wir für sämtliche in dieser Arbeit beschriebenen α -Aspartylpeptide mit freier β -Carboxylgruppe eine violette, für die β -Aspartylpeptide dagegen eine graublauere Ninhydrinreaktion auf Papier.

peptid IV erhaltenen Dipeptides mit dem synthetisch gewonnenen β -L-Aspartyl-L-arginin konnte eine solche Möglichkeit nicht ausschliessen: Die Auswertung der optischen Aktivität war infolge der relativ grossen Fehlerbreite und wegen des unbekanntes Drehungsbeitrages des Argininrestes nicht brauchbar, und die Isolierung der Asparaginsäure aus dem HCl-Totalhydrolysat ergab wegen der nicht quantitativen Ausbeute an kristallinem Material ebenfalls ein ungenaues Resultat.

Eine Möglichkeit zur Bestimmung der Racemisierung war uns erst später gegeben, als wir das β -D-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II (XVI, S. 2362) ebenfalls mit Trypsin abbauten und das dabei entstandene β -D-Aspartyl-L-arginin vom synthetisch gewonnenen β -L-Aspartyl-L-arginin in der Papierchromatographie zu unterscheiden lernten. Beim Vergleich dieser beiden Verbindungen mit dem aus dem β -Asp¹-Val⁵-Hypertensin II (IV) durch Trypsinabbau erhaltenen und im Papierchromatogramm in seine beiden diastereoisomeren Komponenten aufgetrennten Dipeptid konnte dessen Gehalt an D-Asparaginsäure aus der Intensität der Ninhydrinreaktion zu ca. 15% ermittelt werden.

In welchem Ausmass auch das aus dem α -L-Asp(NH₂)¹-Val⁵-Hypertensin II (I) beim Verkochen mit Wasser entstehende α -Asp¹-Val⁵-Hypertensin II (V) racemisiert wird, wurde bisher noch nicht untersucht.

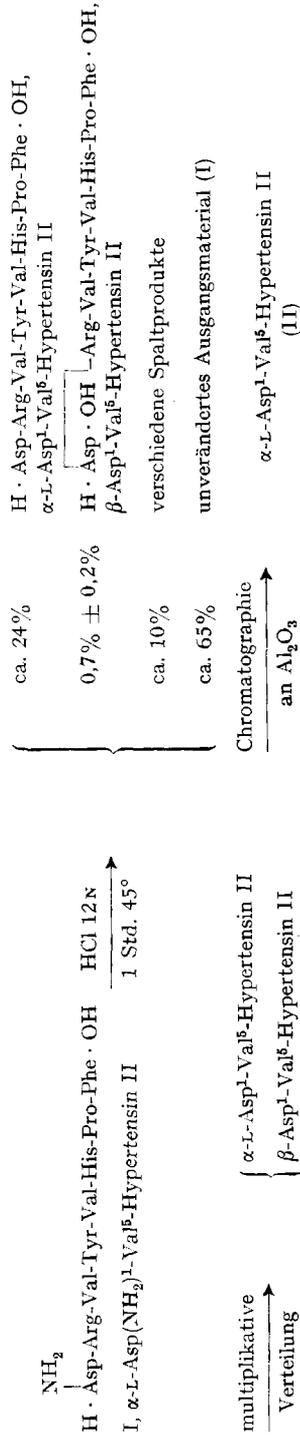
Die 4 isomeren bzw. stereoisomeren Verbindungen α -L-, β -L-, α -D- und β -D-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II unterscheiden sich voneinander lediglich durch die Lage der Aminogruppe in der Kohlenstoffkette der Asparaginsäure. Die allen zugrunde liegende Stammverbindung ohne N-terminale Aminogruppe ist das Desamino-Val⁵-Hypertensin II. Zur Abklärung der Frage, welche Bedeutung der Lage dieser Aminogruppe, bzw. deren Vorhandensein überhaupt, für die Entfaltung der biologischen Aktivität [6] sowie für das Verhalten des Peptides gegenüber verschiedenen Enzymen [7] zukommt, entschlossen wir uns für die im folgenden beschriebene Reindarstellung aller 5 Verbindungen.

Synthesen der verschiedenen Val⁵-Hypertensin II-Analogen. – 1) α -L-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II. Die Herstellung dieser Verbindung, ausgehend von α -L-Asp(NH₂)¹-Val⁵-Hypertensin II, beschrieben wir schon vor längerer Zeit [8]. Unter den von uns üblicherweise angewandten Bedingungen für die saure Hydrolyse der Asp- β -amidgruppe (1 Std. bei 40–45° mit konz. HCl) tritt jedoch, wenn auch in sehr geringem Ausmass, das entsprechende β -Oktapeptid als Nebenprodukt auf. Solche Transpeptidierungen unter stark sauren Bedingungen wurden bereits von SANGER und Mitarbeitern als Nebenreaktionen bei der Partialhydrolyse (z. B. 2 Tage bei 37° mit konz. HCl) von Aspartylpeptiden beobachtet, gleichzeitig mit den bei dieser Umlagerung als Zwischenprodukte auftretenden cyclischen Imiden [9].

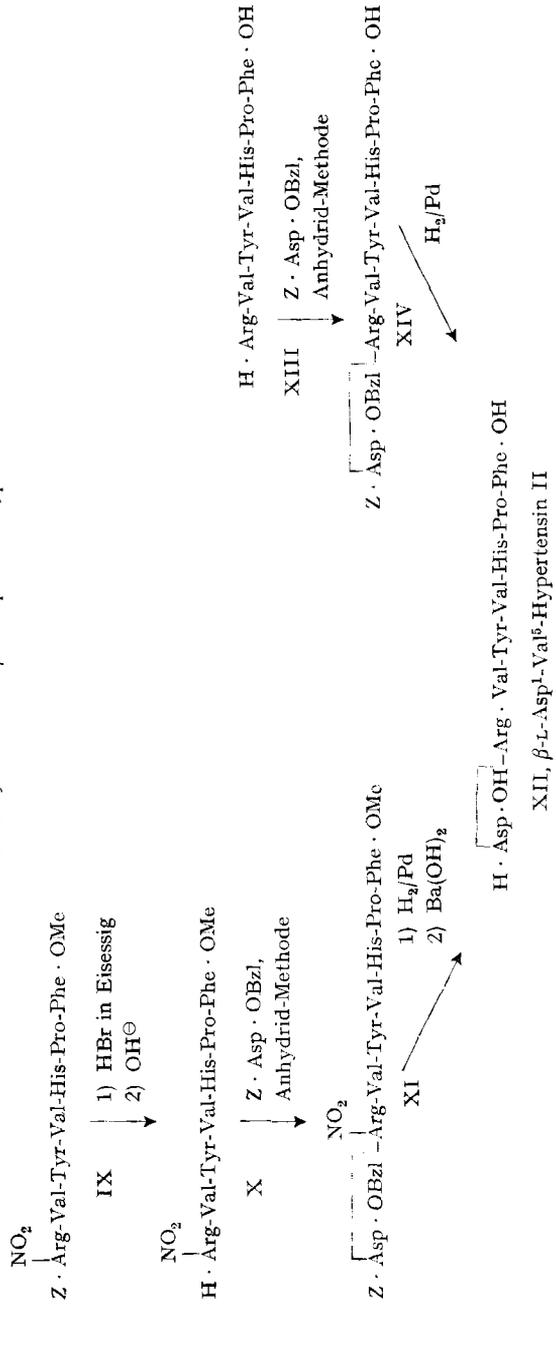
Das unter milden Bedingungen mit konzentrierter Salzsäure aus dem α -L-Asp(NH₂)¹-Val⁵-Hypertensin II erhaltene Gemisch, das neben dem gewünschten α - und Spuren von β -Oktapeptid noch viel Ausgangsmaterial sowie ca. 10% verschiedener Spaltprodukte enthielt (Schema 2), wurde durch multiplikative Verteilung gereinigt. Aus dem so von den übrigen Komponenten abgetrennten Gemisch von α - und β -Hypertensin wurde durch Säulenchromatographie an Aluminiumoxid das α -L-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II als einheitliche Verbindung erhalten.

2) β -L-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II (Schema 3). – a) Der in [1] als Rohprodukt beschriebene Carbobenzyloxy-heptapeptid-methylester IX wurde durch Umfällen aus organischen Lösungsmittelgemischen weiter gereinigt und dann die Carbobenzyloxygruppe mittels HBr in Eisessig abgespalten. Der dabei entstandene freie Heptapeptidester X wurde mit Carbobenzyloxy-L-asparaginsäure- α -benzylester nach der gemischten Anhydrid-Methode zum geschützten Oktapeptid XI kondensiert. Durch katalyti-

Schema 2: Herstellung von α -L-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II aus dem α -L-Asp(NH₂)¹-Derivat



Schema 3: 2 Synthesen von β -L-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II



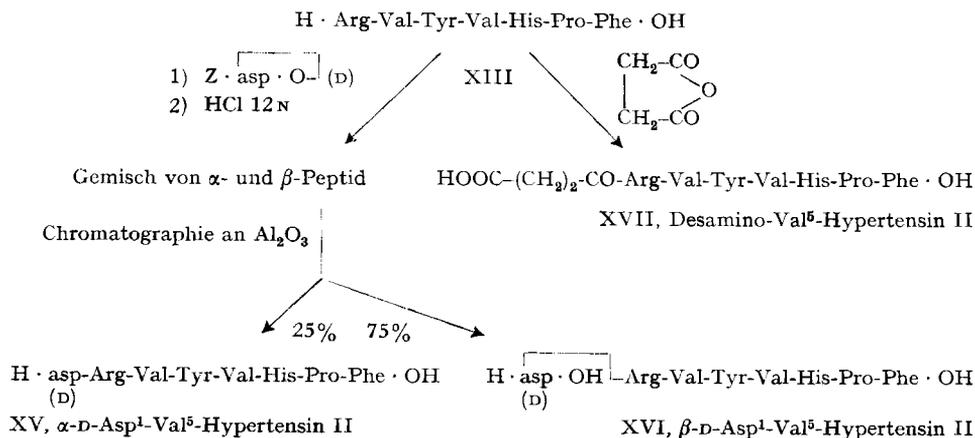
sche Hydrierung wurden gleichzeitig die Carbobenzyloxy-, die Benzylester- und die Nitro-Gruppe entfernt, und zum Schluss die C-terminale Methylestergruppe basisch verseift. Das so erhaltene β -L-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II (XII) wurde wie üblich durch multiplikative Verteilung gereinigt und als chromatographisch und elektrophoretisch einheitliche Fraktion isoliert.

b) Ein etwas kürzerer Weg ergab sich bei der Verwendung des bereits früher dargestellten Heptapeptides XIII [1] zur Kondensation mit Carbobenzyloxy-L-asparaginsäure- α -benzylester nach der Anhydrid-Methode in Tetrahydrofuran-Wasser als Lösungsmittel. Durch Hydrierung des dabei entstandenen Zwischenproduktes XIV wurde direkt das freie β -Oktapeptid XII erhalten, allerdings in schlechterer Gesamtausbeute als auf dem ersten Wege.

3) α -D- und β -D-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II. Carbobenzyloxy-L-asparaginsäure-anhydrid reagiert mit Aminosäureestern unter Bildung eines Gemisches von α - und β -Dipeptiden [5]. In analoger Weise kondensierten wir Carbobenzyloxy-D-asparaginsäure-anhydrid mit dem freien Heptapeptid XIII, wobei wir ein Gemisch von ca. 25% α - und 75% β -Oktapeptid erhielten. Nach der Abspaltung der Carbobenzyloxygruppe mit konzentrierter Salzsäure und Umwandlung in das Acetat erfolgte die Aufspaltung in α - und β -Oktapeptid an einer Aluminiumoxidsäule. (Schema 4.) Das letztere (XVI) resultierte dabei in reiner Form, währenddem das α -Peptid (XV) zusammen mit unreaktiertem Heptapeptid im Eluat erschien und zur endgültigen Reinigung noch eine multiplikative Verteilung durchlaufen musste.

4) Desamino-Val⁵-Hypertensin II. Von ARAKAWA, SMEBY & BUMPUS [10] wurde durch Kondensation von Bernsteinsäureanhydrid mit Nitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-*p*-nitrobenzylester und nachfolgende Hydrierung der Nitro- und *p*-Nitrobenzylester-Gruppen das Desamino-Ile⁵-Hypertensin II hergestellt. In unserer Synthese des Val⁵-Analogen wählten wir die direkte Kondensation von Bernsteinsäureanhydrid mit dem freien Heptapeptid XIII, wobei wir in einheitlicher Reaktion und mit guter Ausbeute das Desamino-Val⁵-Hypertensin II (XVII) erhielten (Schema 4).

Schema 4: Synthese von α -D-Asp¹-, β -D-Asp¹- und Desamino-Val⁵-Hypertensin II



Differenzierung mittels Chromatographie und Elektrophorese

Bei der Gegenüberstellung der chromatographischen und elektrophoretischen Eigenschaften der 4 isomeren Oktapeptide sowie der Desamino- und der α -L-Asp(NH₂)¹-Verbindung war ein Vergleich mit den entsprechenden N-terminalen Dipeptiden erwünscht. Diese wurden, zusammen mit dem Hexapeptid H·Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OH, aus den Oktapeptiden durch Inkubation mit Trypsin erhalten. Zur Chromatographie bzw. Elektrophorese wurden diese Gemische von Di- und Hexapeptid direkt verwendet, wobei jedoch selektiv nur die Dipeptide durch Besprühen mit SAKAGUCHI-Reagens nachgewiesen wurden.

Die Rf-Werte der Papier- und Dünnschicht-Chromatographie ebenso wie die in der Papierelektrophorese ermittelten Wanderungsstrecken sind erfahrungsgemäss beträchtlichen Schwankungen unterworfen. Eine hohe Genauigkeit der im folgenden diskutierten Werte relativ zueinander wurde aber dadurch gewährleistet, dass sämtliche zu vergleichenden Substanzproben in wiederholter Weise und auf demselben Papierbogen nebeneinanderliegend untersucht wurden.

Papierchromatographie. Die Rf-Werte der 4 isomeren Okta- bzw. Dipeptide sowie der α -L-Asp(NH₂)¹- und Desamino-Verbindungen in 5 verschiedenen Fließmittelsystemen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die 4 isomeren Oktapeptide weisen unter sich keine sehr grossen Unterschiede auf; das gleiche gilt auch für die Gruppe der 4 isomeren Dipeptide. Bemerkenswert sind jedoch die beiden folgenden Inversionen:

a) Im System 87 weist das α -L-Oktapeptid den kleineren Rf-Wert als die α -D-Form auf, währenddem das α -L-Dipeptid den grösseren Rf-Wert als das α -D-Dipeptid besitzt.

b) Im System 40 hat das β -L-Oktapeptid den kleineren Rf-Wert als die β -D-Form, und wiederum verhalten sich die beiden Dipeptide umgekehrt.

Dünnschichtchromatographie. In Tabelle 1 ist nur die bereits erwähnte Chromatographie auf Aluminiumoxid in den beiden basischen Lösungsmittelsystemen 45 und 104 aufgeführt, wo eine gute Auftrennung der α -Oktapeptide von den isomeren β -Oktapeptiden erreicht werden kann. Die übrigen von uns untersuchten Kombinationen von Adsorbens und Elutionsmittel ergaben schlechtere oder keine Trennung der Isomeren.

Die Unterschiede zwischen den stereoisomeren Formen (α -L gegenüber α -D und β -L gegenüber β -D) sind bedeutend weniger ausgeprägt, doch weisen in beiden Systemen die D-Formen etwas höhere Rf-Werte als die L-Formen auf.

Papierelektrophorese (Tab. 2). Im neutralen pH-Bereich sind die 4 isomeren Oktapeptide erwartungsgemäss nicht zu unterscheiden. Im sauren und alkalischen Bereich treten jedoch hauptsächlich zwischen den beiden α -Formen einerseits und den β -Formen andererseits Unterschiede zutage, die durch die unterschiedlichen pK-Werte der Amino- und Carboxyl-Gruppen der α - und β -Asparaginsäurereste bedingt sind. Analoge Verhältnisse wurden von SWALLOW und Mitarbeitern [11] schon früher an den beiden Formen von N^ε-(L-Aspartyl)-L-lysin beobachtet und analysiert.

Die kleineren Unterschiede, welche sich – mit Ausnahme der beiden β -Formen bei pH 2,4 – zudem im sauren und basischen Bereich auch zwischen den stereoisomeren Formen zeigen, widerspiegeln die Abhängigkeit der pK-Werte von sterischen Einflüssen [12].

Die aus den Oktapeptiden durch Spaltung mit Trypsin entstandenen N-terminalen Dipeptide weisen in der Papierelektrophorese ein den ersteren in jeder Hinsicht paralleles Verhalten auf.

Tabelle 1. *R_f-Werte der freien Okta- und Dipeptide*

	Papierchromatographie				Dünnschichtchromatographie auf Al ₂ O ₃	
	40	45	52	56	87 ^{a)}	45 104 ^{a)}
II, α -L-Asp ¹ -Val ² -Hypertensin II	0,095	0,310	0,141	0,613	0,445	0,345
XV, α -D-Asp ¹ -Val ² -Hypertensin II	0,158	0,310	0,158	0,642	0,477	0,370
XII, β -L-Asp ¹ -Val ² -Hypertensin II	0,102	0,289	0,146	0,627	0,430	0,220
XVI, β -D-Asp ¹ -Val ² -Hypertensin II	0,144	0,289	0,132	0,642	0,424	0,234
I, α -L-Asp(NH ₂) ¹ -Val ² -Hypertensin II	0,16/0,31 ^{b)}	0,385	0,114	0,713	0,373	0,414
XVII, Desamino-Val ² -Hypertensin II	0,328	0,340	0,444	0,697	0,750	0,384
α -L-Aspartyl-L-arginin	0,021	0,043	0,034	0,242	0,186	
α -D-Aspartyl-L-arginin	0,026	0,043	0,034	0,242	0,143	
β -L-Aspartyl-L-arginin	0,022	0,041	0,032	0,221	0,127	
β -D-Aspartyl-L-arginin	0,018	0,041	0,025	0,211	0,109	
α -L-Asparaginy ¹ -L-arginin	0,042	0,075	0,029	0,298	0,113	
Desamino-aspartyl-L-arginin	0,084	0,055	0,230	0,272	0,565	

^{a)} Zusammensetzung der Lösungsmittelsysteme siehe exper. Teil.

^{b)} Bildung eines langgestreckten, zweipoligen Flecks.

Tabelle 2. *Papierelektrophorese der freien Okta- und Dipeptide^{a)}*

	pH 2,4 ^{b)} 16 Std. 2 V/cm	pH 5,0 ^{c)} 20 Std. 3,75 V/cm	pH 9,1 ^{d)} 24 Std. 3,75 V/cm
II, α -L-Asp ¹ -Val ⁶ -Hypertensin II	-13,5	-9,5	+ 8,1
XV, α -D-Asp ¹ -Val ⁶ -Hypertensin II	-12,7		+ 7,7
XII, β -L-Asp ¹ -Val ⁶ -Hypertensin II	-11,6		+ 4,1
XVI, β -D-Asp ¹ -Val ⁶ -Hypertensin II			+ 4,6
I, α -L-Asp(NH ₂) ¹ -Val ⁶ -Hypertensin II	-15,3	-11,8	- 0,4
XVII, Desamino-Val ⁶ -Hypertensin II	-10,7	- 7,0	+ 8,3
α -L-Aspartyl-L-arginin	-15,2	- 7,7	+17,2
α -D-Aspartyl-L-arginin	-13,2		+15,0
β -L-Aspartyl-L-arginin	-10,8		+ 4,1
β -D-Aspartyl-L-arginin			+ 4,8
α -L-AsparaginyL-L-arginin	-18,1	-14,1	- 0,7
Desamino-aspartyl-L-arginin	-10,5	- 1,7	+20,2

a) Zahlenangaben in cm, unkorrigiert für Elektrosmose usw.

b) 1 M Essigsäure.

c) 0,1 M Ammoniumacetat, mit 2 M Essigsäure auf pH 5 eingestellt.

d) 12,12 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan + 10 ml 1 N HCl, mit H₂O auf 1000 ml aufgefüllt.

Enzymatische Versuche. – In einer früheren Arbeit berichteten wir über das Verhalten von α -L-Asp(NH₂)¹-Val-Hypertensin II gegenüber verschiedenen proteolytischen Enzymen [7]. Gemäss ihrer Spezifität für basische bzw. aromatische Aminosäuren spalten Trypsin die Bindung Arg²-Val³ und Chymotrypsin Tyr⁴-Val⁵. Leucinaminopeptidase spaltet die ersten 5 Aminosäuren ab und lässt das C-endständige Tripeptid H-His-Pro-Phe-OH intakt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit interessierte es uns, welchen Einfluss die verschiedenen Formen der N-endständigen Asparaginsäure auf das Verhalten des Oktapeptides gegenüber den 3 genannten Enzymen ausüben würde.

Trypsin. Die 6 Varianten von Val⁵-Hypertensin II wurden unter identischen Bedingungen mit stark verdünnter Trypsinlösung inkubiert und das Ausmass der Spaltung nach verschiedenen Zeiten chromatographisch bestimmt. In Tabelle 3 sind die für eine 20-prozentige Spaltung erforderlichen Inkubationszeiten aufgeführt. Der starke Einfluss der verschiedenen Modifikationen am Aminoende ist an den bis zum Faktor 30 (α -L gegenüber β -L) voneinander differierenden Werten ersichtlich. *Über-raschenderweise wird gerade die dem natürlichen Hypertensin entsprechende α -L-Form mit grossem Abstand am langsamsten gespalten.*

Chymotrypsin. Die in gleicher Weise wie mit Trypsin durchgeführten Versuche ergaben nur undeutliche Unterschiede für die zur 20-prozentigen Spaltung notwendigen Inkubationszeiten. Dieser Umstand dürfte in erster Linie auf die grössere Distanz des modifizierten Asparaginsäureesters vom Ort des Enzymangriffs zurückzuführen sein.

Leucinaminopeptidase. Dieses Enzym ist erwartungsgemäss nicht imstande, die 3 unnatürlichen Isomeren α -D, β -L und β -D anzugreifen; das gleiche gilt auch für das Desamino-Hypertensin.

Von den beiden Oktapeptiden mit der α -L-Konfiguration wird dasjenige mit der freien β -Carboxylgruppe sehr viel langsamer angegriffen als die Asp¹- β -amid-Verbindung. In beiden Fällen waren ausser dem resistenten Tripeptid H-His-Pro-Phe-OH auf den Papierchromatogrammen keine weiteren durch partiellen Abbau entstandene Peptide sichtbar, ein Hinweis dafür, dass Asparagin und Asparaginsäure von Leucinaminopeptidase wesentlich langsamer abgespalten werden als die nachfolgenden Aminosäuren.

Im Gegensatz zu diesen Versuchen mit Leucinaminopeptidase sind die Resultate, die wir bei der Inkubation mit menschlichem Plasma, Rattenserum und Nierenextrakt erhielten [13]: Der Abbau, der bei den beiden α -L-Verbindungen hauptsächlich vom Aminoende her erfolgte, zeigte nur geringe Unterschiede zwischen α -L-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II und dessen Asp¹- β -amid, und zudem wurde Asparaginsäure bzw. Asparagin mit ähnlicher Geschwindigkeit wie die nachfolgenden Aminosäuren abgespalten. Dies führte zur Annahme, dass die am biologischen Abbau von Hypertensin massgebend beteiligte Amino-peptidase verschieden von Leucinaminopeptidase sein müsse. Aus anderen Überlegungen kamen auch KHAIRALLAH und Mitarbeiter [14] zur gleichen Schlussfolgerung. Sie schlagen vor, das möglicherweise mit der von GLENNER, McMILLAN & FOLK [15] aus Rattenleber isolierten Amino-peptidase A identische Enzym als Angiotensinase A zu bezeichnen.

Biologische Aktivitäten. – Die Prüfung an der nierenlosen Ratte⁶⁾ (kurzdauernder, durch Gefässkontraktion bedingter Blutdruckanstieg nach intravenöser Injektion) ergab für die 3 Formen α -D, β -L und β -D eine um ca. 50% höhere Aktivität beim Vergleich mit dem natürlichen α -L-Hypertensin und dessen Asp¹- β -amid. Bei Injek-

⁶⁾ Die freundliche Überlassung der Prüfungsergebnisse verdanken wir Herrn Dr. H. BRUNNER von unserer biologischen Abteilung.

Tabelle 3. *Enzymatische Abbaugeschwindigkeiten der Hypertensin-II-Analogen*

	Trypsin 1:1000 Zeit für 20% Spaltung	Chymotrypsin 1:1000 Zeit für 20% Spaltung	Leucinaminopeptidase 1:12,5 Spaltung nach 5 Std.	
II, α -L-Asp ¹ -Val ⁵ -Hypertensin II	150 Min.	6–10 Min.	2 ± 1%	
XV, α -D-Asp ¹ -Val ⁵ -Hypertensin II	10 Min.		keine Spaltung	
XII, β -L-Asp ¹ -Val ⁵ -Hypertensin II	5 Min.			
XVI, β -D-Asp ¹ -Val ⁵ -Hypertensin II	20 Min.		90 ± 5%	
I, α -L-Asp(NH ₂) ¹ -Val ⁵ -Hypertensin II	17 Min.			keine Spaltung
XVII, Desamino-Val ⁵ -Hypertensin II	22 Min.			

Trypsin Chymotrypsin

↓ ↓

H·Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OH

↑ ↑ ↑ ↑ ↑

Leucinaminopeptidase

tion von äquipressorischen Dosen zeigten die 3 genannten Verbindungen zudem eine ca. 2- bis 3-fach verlängerte Wirkung. Diese Verstärkung und Verlängerung der Wirksamkeit ist wahrscheinlich auf die Resistenz gegenüber Aminopeptidasen zurückzuführen, was einerseits aus den Versuchen mit Leucinaminopeptidase, andererseits aus der chromatographischen Auswertung der Inkubationen mit Plasma, Rattenserum und Nierenextrakt hervorgeht [13].

Die Desaminoverbindung, die ebenfalls gegen Aminopeptidasen resistent ist, zeigte nur eine halb so starke pressorische Aktivität wie α -L-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II⁷), oder nur ein Drittel, wenn es mit den 3 unnatürlichen Aspartyl-Isomeren verglichen wurde. Dies beweist, dass die Gegenwart der N-endständigen Aminogruppe für die Entfaltung der vollen biologischen Aktivität notwendig ist. Der Befund, dass die 3 Isomeren α -D, β -L und β -D unter sich gleich aktiv sind, zeigt aber, dass die Stellung dieser Aminogruppe innerhalb des Asparaginsäurerestes ohne Bedeutung ist. Wird die Desaminoverbindung in äquipressorischer Dosis mit den übrigen Verbindungen verglichen, so zeigt sich auch hier wieder infolge der Aminopeptidaseresistenz eine gegenüber dem natürlichen α -L-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II 2 bis 3-fach verlängerte Wirkungsdauer.

Experimenteller Teil

Die Smp. wurden in einer offenen Kapillare bestimmt und sind nicht korrigiert.

Abkürzungen: PC: absteigende Chromatographie auf WHATMAN-Papier Nr. 1; DA: Dünnschichtchromatographie auf Aluminiumoxid Typ D 5 (FLUKA); DS: Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G nach STAHL (MERCK); EP: Niederspannungselektrophorese auf Papierbogen SCHLEICHER & SCHUELL Nr. 2043b, in der Apparatur der Firma LKB, Stockholm.

Der Nachweis auf Chromatogrammen und Papierselektrophoresen erfolgte mit Ninhydrin, PAULY-, REINDEL-HOPPE- oder SAKAGUCHI-Reagens.

Die Chromatogramme wurden mit folgenden Lösungsmittelsystemen ausgeführt (Zahlenangaben in Volumenteilen, wo nicht anders angegeben): 40 = *n*-Butanol, Äthanol, H₂O (100:100:50); 43 = *t*-Amylalkohol, Isopropanol, H₂O (100:40:55); 43 A = *t*-Amylalkohol, Isopropanol, H₂O (100:40:10); 45 = *s*-Butanol, 3% NH₃ in H₂O (100:44); 52 = *n*-Butanol, Eisessig, H₂O (100:10:30); 54 = *s*-Butanol, Isopropanol, Monochloressigsäure, H₂O (70 ml:10 ml:3 g:40 ml); 56 = *s*-Butanol, Isopropanol, 0,71% Natrium-diäthylbarbiturat in H₂O (100:15:70); 87 = Isopropanol, Ameisensäure, H₂O (100:5:25); 100 = Äthylacetat, Pyridin, Eisessig, H₂O (62:21:6:11); 104 = Chloroform, Methanol, 17% NH₃ in H₂O (20:20:9); 110 = Äthylacetat, *n*-Butanol, Pyridin, Eisessig, H₂O (80:40:40:12:19).

Trispuffer ist aus Tris-hydroxymethyl-aminomethan und HCl hergestellt.

Die freien Oktapeptide sind amorphe Verbindungen von unscharfem Schmelzpunkt (unter Zersetzung), die je nach Trocknungsbedingungen wechselnde Mengen von Wasser und Essigsäure (bei Isolierung aus Ammoniumacetat enthaltenden Lösungen) einschliessen. Der spektrophotometrisch bestimmte Peptidgehalt (nach Trocknung bei 40–45° im Hochvakuum) beträgt für die 4 isomeren Aspartyl-Hypertensine 85–90%, für die Asparaginyilverbindung 80–85%. Bei höherer Temperatur getrocknete Oktapeptide weisen wohl einen höheren Peptidgehalt auf, sind dann aber hygroscopisch. Elementaranalysen sind zur Charakterisierung solcher Verbindungen wenig sinnvoll, hingegen wurde deren Reinheit durch einheitliches chromatographisches Verhalten in verschiedenen Systemen (Tab. 1), sowie anhand der Elektrophorese bei verschiedenem pH (Tab. 2) geprüft.

Neutrale Hydrolyse von α -L-Asp(NH₂)¹-Val⁵-Hypertensin II. 6,0 g Oktapeptid-diacetat (I) mit einem Peptidgehalt von 83% wurden in 300 ml H₂O gelöst (pH ca. 6) und 24 Std. unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Eindampfen im Vakuum auf 20 ml und Lyophilisieren erhielt man 5,6 g Hydrolysegemisch, das in eine multiplikative Verteilung über 300 Stufen im System 0,3M Ammonium-

⁷) Dieses Resultat steht in Übereinstimmung mit dem Verhältnis, das ARAKAWA, SMEBY & BUMPUS [10] beim Vergleich der entsprechenden Verbindungen der Ile⁵-Reihe fanden.

acetat-*n*-Butanol-Methanol (4:4:1) eingesetzt wurde. Das Phasenvolumen betrug je 25 ml. Der Inhalt der Verteilungselemente wurde zuletzt, in Fraktionen von je 5 bis 6 Einheiten vereinigt, auf ein kleines Volumen eingengt, lyophilisiert und bei 0,02 Torr/40° bis zum konstanten Gewicht nachgetrocknet. Aus den Elementen Nr. 90–118 (Maximum bei 104; $K = 0,53$) erhielt man insgesamt 4160 mg eines Gemisches von ca. 9 Teilen β -Asp¹-Val⁵-Hypertensin II und ca. 1 Teil α -Asp¹-Val⁵-Hypertensin II⁸). Nr. 138–161 ergaben 710 mg reines Heptapeptid H·Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OH (Maximum bei 149; $K = 0,99$). Der Rest der Substanz bestand aus 3 bis 4 mengenmässig unbedeutenden Verbindungen (eine davon konnte als Hexapeptid H·Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OH identifiziert werden) und wurde verworfen.

III: α -Asp¹-Val⁵-Hypertensin II. Zur Auftrennung von α - und β -Oktapeptid wurden 3,39 g von Fraktion 90–118 der obigen Verteilung in 25 ml einer Mischung von 2N NH₃ und Methanol (1:1, Volumenteile) unter leichtem Erwärmen gelöst und auf eine im gleichen Lösungsmittelgemisch äquilibrierte Säule von neutralem Al₂O₃ aufgetragen ($\varnothing = 3$ cm, $l = 40$ cm). Eluiert wurde in 12 Fraktion von je 100 ml 2N NH₃-Methanol 1:1. Zur Isolierung der Peptide wurde im Vakuum auf ungefähr die Hälfte eingengt, 2 ml 2N Essigsäure zugegeben, bis auf ca. 4 ml weiterkonzentriert, lyophilisiert und bei 0,02 Torr/45° nachgetrocknet. Die Fraktionen 3 und 4 ergaben insgesamt 380 mg chromatographisch reines α -Oktapeptid, das jedoch noch ca. 20% anorganische Begleitstoffe enthält. (Na₂SO₄, K₂SO₄ und (NH₄)₂SO₄, aus der Al₂O₃-Säule eluiert.) Das reine α -Asp¹-Val⁵-Hypertensin II wurde daraus durch Aussalzen der in wenig Wasser gelösten Probe mit konzentrierter Ammoniumacetatlösung, Abfiltrieren und Trocknen bei 0,02 Torr/50° isoliert. Man erhielt so 240 mg eines amorphen Pulvers vom Zersetzungspunkt ca. 225°. $[\alpha]_D = -59,4^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,9$ in 0,5N NaOH); $-65,4^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$ in 0,5N HCl). DA: Rf = 0,35 (45); 0,40 (104). EP: $-13,5$ cm (pH 2,4, 16 Std., 2 V/cm); $-9,5$ cm (pH 5,0, 20 Std., 3,75 V/cm); $+8$ cm (pH 9,1, 24 Std., 3,75 V/cm). Ninhydrinreaktion violett.

IV: β -Asp¹-Val⁵-Hypertensin II. Die Eluate Nr. 6 bis 11 der Fraktionierung an Al₂O₃ ergaben total 3130 mg chromatographisch reines β -Oktapeptid, mit 5–10% anorganischen Begleitstoffen. Zur Abtrennung wurde unter Erwärmen in 15 ml H₂O gelöst, mit 30 ml heissem Methanol versetzt und auf 0° abgekühlt. Das so gefällte Oktapeptid wurde abfiltriert, mit wenig eiskaltem Methanol-H₂O-Gemisch (3:1) gewaschen und bei 0,02 Torr/50° getrocknet. Man erhielt 2090 mg reines β -Asp¹-Val⁵-Hypertensin II als amorphes Pulver, Zers. ca. 235°. $[\alpha]_D = -65,9^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$ in 0,5N NaOH); $-70,7^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$ in 0,5N HCl). DA: Rf = 0,22 (45); 0,11 (104). EP: $-11,5$ cm (pH 2,4, 16 Std., 2 V/cm); $-9,5$ cm (pH 5,0, 20 Std., 3,75 V/cm); $+4$ cm (pH 9,1, 24 Std., 3,75 V/cm). Ninhydrinreaktion graublau.

VI: β -Aspartyl-L-arginin aus IV. 1,04 g β -Asp¹-Val⁵-Hypertensin II (IV) wurden in 50 ml 0,1M Ammoniumacetatlösung gelöst, das pH mit 2N NH₃ auf 8 eingestellt und nach Zugabe von 2,3 ml einer 1-proz. Lösung von Trypsin während 1 Std. bei 38° inkubiert. Zur Denaturierung des Enzyms wurde zum Schluss mit 2N Essigsäure angesäuert und während 5 Min. auf 100° erhitzt. Eine Probe zeigte bei der chromatographischen Kontrolle die vollständige Spaltung zu Di- und Hexapeptid. Die Lösung wurde nun auf 5 ml konzentriert, lyophilisiert und bei 0,02 Torr/60° nachgetrocknet. Das Rohprodukt wurde im System 0,4M Ammoniumacetat-*n*-Butanol-Methanol (10:10:3) über 90 Stufen mit je 10 ml Phasenvolumen verteilt. Aus den Röhrchen Nr. 3–12 (Maximum bei 7–8; $K = 0,095$) isolierte man durch Einengen zur Trockne und Absublimieren des Ammoniumacetates bei 0,05 Torr/80° 297 mg reines β -Dipeptid-monoacetat als amorphes, stark hygroskopisches Pulver. Zur Analyse wurde es in wenig H₂O aufgenommen, lyophilisiert und 16 Std. bei 0,05 Torr/100° nachgetrocknet. $[\alpha]_D = -3^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,9$ in 0,2N NaOH); $+3^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,9$ in 0,2N HCl). EP: $-10,5$ cm (pH 2,4, 16 Std., 2 V/cm); $-7,5$ cm (pH 5,0, 20 Std., 3,75 V/cm); $+4$ cm (pH 9,1, 24 Std., 3,75 V/cm). Ninhydrinreaktion graublau.

$C_{12}H_{28}O_7N_5$	Ber. C 41,26	H 6,64	N 20,05%
(Monoacetat; 349,34)	Gef. „ 40,45	„ 6,80	„ 19,68%

V: α -Aspartyl-L-arginin aus III. 10 mg α -Asp¹-Val⁵-Hypertensin II (III) wurden in 0,5 ml 0,1M Ammoniumacetat gelöst und bei pH 8 mit 0,02 ml einer 1-proz. Trypsinlösung während 1½ Std. bei 38° inkubiert. Nach Zugabe von 0,05 ml 2N Essigsäure wurde 5 Min. auf 100° erhitzt,

⁸) Die 5 Fraktionen des Substanzmaximums in Nr. 90–118 zeigten unter sich keine deutlichen Unterschiede des Verhältnisses von α - zu β -Oktapeptid, d. h. die beiden Verbindungen weisen in dem hier verwendeten Verteilungssystem nahezu denselben K -Wert auf.

lyophilisiert und bei 0,02 Torr/40° nachgetrocknet. Das so erhaltene Gemisch von Di- und Hexapeptid wurde direkt in der Elektrophorese analysiert, wobei das Dipeptid selektiv mittels SAKAGUCHI-Reagens nachgewiesen wurde. EP: -14,5 cm (pH 2,4, 16 Std., 2 V/cm); -7,5 cm (pH 5,0, 20 Std., 3,75 V/cm); +17 cm (pH 9,1, 24 Std., 3,75 V/cm). Ninhydrinreaktion violett.

VIII: $Z\cdot Asp\cdot OBzI\text{---}Arg\cdot OH$, Carbobenzyloxy-(α -benzyl)- β -L-aspartyl-L-arginin. 3,57 g $Z\cdot Asp\cdot OBzI$ ⁹⁾ und 1,54 ml Triäthylamin wurden in 40 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und auf -10° gekühlt. Dazu liess man bei -10° 1,32 ml Chlorameisensäure-isobutylester tropfen und rührte während 15 Min. bei -10°. Nach Abkühlen auf -15° versetzte man rasch mit einer auf 0° gekühlten Lösung von 2,61 g L-Arginin in 20 ml H₂O und rührte die homogene Lösung 20 Min. bei 0° und 90 Min. bei 22° (pH = 7-8). Zuletzt engte man auf 20 ml ein, wobei ein halbester Niederschlag ausfiel. Dieser wurde bei 0° abfiltriert, mit H₂O gewaschen und getrocknet. Das Rohprodukt wurde einmal aus Methanol-H₂O und einmal aus Methanol-Essigester-Petroläther umgefällt und ergab 3,77 g Reinprodukt vom Smp. 182-183° (Zers.). Zur Analyse wurde nochmals aus Methanol-H₂O umkristallisiert und über Nacht bei 0,02 Torr/60° getrocknet: Feine Nadelchen vom Smp. 182-184° (Zers.). [α]_D = -7,3° ± 1° (c = 0,95 in 90-proz. Methanol). DS: Rf = 0,43 (52); 0,25 (100).

C₂₅H₃₁O₇N₅ (513,54) Ber. C 58,47 H 6,08 N 13,64% Gef. C 58,20 H 6,00 N 13,68%

VI: β -L-Aspartyl-L-arginin aus VIII. 1,026 g $Z\cdot Asp\cdot OBzI\text{---}Arg\cdot OH$ wurden in 25 ml Methanol-H₂O 1:1 suspendiert und mit 300 mg Palladiumkohle (10% Pd) unter CO₂-Absorption in der Schüttelente bei Normaldruck hydriert. Die H₂-Aufnahme (96 ml) war in 2 Std. beendet. Nach 3 Std. wurde filtriert, das Filtrat auf ca. 3 ml vorkonzentriert und lyophilisiert. Man erhielt nach dem Trocknen bei 0,05 Torr/80° 569 mg chromatographisch reines VI als amorphes Pulver, Zers. ca. 205°.

C₁₀H₁₉O₅N₅ (289,29) Ber. C 41,52 H 6,62 N 24,21% Gef. C 41,51 H 6,65 N 24,03%

Zur Umwandlung des freien Dipeptides in das Acetat wurden 240 mg VI in 1 ml 2N Essigsäure gelöst, lyophilisiert und der stark hygroskopische Rückstand zur Analyse über Nacht bei 0,02 Torr/100° nachgetrocknet. [α]_D = -4,9° ± 1° (c = 1 in 0,2N NaOH); +6,1° ± 1° (c = 1 in 0,2N HCl). Für PC- und EP-Angaben siehe Tabellen 1 und 2. Ninhydrinreaktion graublau.

C₁₂H₂₃O₇N₅ Ber. C 41,26 H 6,64 N 20,05%
(Monoacetat; 349,34) Gef. „ 41,52 „ 6,71 „ 19,82%

II: α -L-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II. 1,5 g α -L-Asp(NH₂)¹-Val⁵-Hypertensin II (I, Peptidgehalt 83%) wurden in einem Glasrohr zusammen mit 15 ml konz. HCl eingeschmolzen und während 1 Std. auf 45° erwärmt. Das Reaktionsgemisch wurde sodann zur Trockne eingengt, pulverisiert und bei 0,05 Torr/60° nachgetrocknet. Man erhielt 1,51 g Hydrochlorid-Gemisch, das zur Umwandlung in das Acetat langsam durch eine Säule (\varnothing = 13 mm, l = 250 mm) von schwach basischem Ionenaustauscher (MERCK II) in der Acetatform filtriert wurde. Das Eluat wurde auf ca. 10 ml eingengt und dann lyophilisiert. Das so gewonnene Acetat-Gemisch (1,49 g) wurde zur Vorreinigung einer multiplikativen Verteilung im System *n*-Butanol - 0,3M Ammoniumacetat (1:1) über 250 Stufen mit Phasenvolumina von je 10 ml unterworfen. Aus den Verteilungselementen Nr. 20-40 (Maxima bei 30; K = 0,14) resultierten beim Eindampfen zur Trockne 320 mg α -L-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II mit Spuren von β -Verbindung als Verunreinigung, währenddem aus den Elementen Nr. 54-69 (Max. bei 62; K = 0,33) 980 mg praktisch reines Ausgangsmaterial (I) zurückgewonnen wurden. Die übrigen Verteilungselemente enthielten verschiedene, durch Ketten-spaltung entstandene Hydrolyseprodukte in kleinen Mengen und wurden nicht aufgearbeitet.

Zur Abtrennung des β -Hypertensins wurden die 320 mg Rohprodukt aus Nr. 20-40 an Al₂O₃ chromatographiert: Eine Säule (\varnothing = 14 mm, l = 200 mm) von neutralem Al₂O₃ wurde zur Vorbereitung so lange mit einem Gemisch von Methanol und 2N NH₃ (1:1) durchgewaschen, bis im Eluat keine anorganischen Salze mehr nachweisbar waren (Dauer ca. 30 Std.). Die Substanz, ge-

⁹⁾ Hergestellt nach [16]. Der gleichzeitig entstehende β -Benzylester kann durch mehrmaliges Kristallisieren aus Essigester-Hexan quantitativ abgetrennt werden. Seine Gegenwart ist am einfachsten chromatographisch (DS, System 110) nachzuweisen: $Z\cdot Asp\cdot OBzI$, Rf = 0,84; $Z\cdot Asp(OBzI)\cdot OH$, Rf = 0,78. Die Überlassung von vollständig isomerenfreiem α -Benzylester verdanken wir Herrn J. STUTZ von unserer Betriebsabteilung.

löst in 3 ml Methanol – 2N NH₃, wurde nun auf die Säule gebracht und in Fraktionen zu je 6 ml cluiert. Fraktion 5 und 6 enthielten 250 mg reines α -L-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II (II), währenddem die späteren Eluate aus Gemischen von α - und β -Peptid bestanden. Das reine II wurde durch Lösen in 2 ml 1N Essigsäure, Lyophilisieren und Nachtrocknen bei 0,02 Torr/45° in das Acetat übergeführt. $[\alpha]_D = -53^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$ in 0,5N NaOH); $-58,7^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$ in 0,5N HCl). Für PC-, DA- und EP-Angaben siehe Tabellen 1 und 2.

XII: β -L-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II. – a) *Ausgehend vom geschützten Heptapeptid IX*: Das in [1] beschriebene Z·Arg(NO₂)-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OMe enthielt ungefähr 20% eines unbekanntes Nebenproduktes. Dieses konnte durch mehrmaliges Umfällen aus Methanol-Acetonitril und aus Methanol-Essigester entfernt werden. Das so gereinigte amorphe Heptapeptid IX wies einen Smp. von 213–215° (Zers.) auf und war chromatographisch einheitlich. $[\alpha]_D = -65^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$ in Methanol). DS: Rf = 0,73 (43); 0,50 (52).

C₅₄H₇₁O₁₃N₁₃ (1110,24) Ber. C 58,42 H 6,45 N 16,40% Gef. C 58,19 H 6,43 N 16,26%

Zur Abspaltung der Carbobenzyloxygruppe wurden 3 g geschütztes Heptapeptid IX in 15 ml abs. Eisessig unter leichtem Erwärmen gelöst, bei 20° mit 15 ml 5N HBr in Eisessig versetzt und während 20 Min. stehengelassen. Die klare, gelbe Lösung wurde sodann bei 14 Torr auf ca. 15 ml eingengt, wobei das Heptapeptidester-hydrobromid als schmieriger Niederschlag ausfiel. Durch Zugabe von 50 ml abs. Äther und Zerreiben bei 0° wurde die Fällung pulverisiert und dann abfiltriert und mit abs. Äther gewaschen. (Trihydrobromid von X; Ber. Br 19,7%, Gef. 20,4%.) Ohne weitere Trocknung wurde in 15 ml H₂O gelöst, mit Na₂CO₃ bei 0° alkalisch gemacht und mit *n*-Butanol extrahiert. Die Butanolphase wurde mit H₂O neutralgewaschen und bei 14 Torr/50° eingengt, bis eine breiige Fällung entstand. Nach Zugabe von Petroläther wurde abfiltriert, mit Petroläther gewaschen und bei 0,02 Torr/45° getrocknet. Man erhielt 2,15 g H·Arg(NO₂)-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OMe (X) als amorphes Pulver vom Smp. ca. 150–160°. $[\alpha]_D = -59^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,94$ in Methanol). DS: Rf = 0,35 (43); 0,12 (52).

C₄₆H₆₅O₁₁N₁₃ (976,11) Ber. C 56,60 H 6,71 N 18,65% Gef. C 56,60 H 6,84 N 17,69%

714 mg Z·Asp·OBzl und 0,307 ml Triäthylamin wurden in 6 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und dazu bei –12° während 2 Min. 0,264 ml Chlorameisensäure-isobutylester getropft. Nach weiteren 15 Min. bei –12° wurde eine auf –10° vorgekühlte Lösung von 1,952 g Heptapeptidester X in 5 ml abs. Dimethylformamid zugegeben und 10 Min. bei –10°, 1 Std. bei 0° und 2 Std. bei Zimmertemperatur weitergerührt. Zuletzt wurde das ausgeschiedene Triäthylammoniumchlorid abfiltriert und das Filtrat bis zur Bildung einer klebrigen Masse eingengt. Diese wurde in wasser-gesättigtem *n*-Butanol aufgenommen und mit 2N Na₂CO₃-Lösung, 2N Essigsäure und Wasser gewaschen und ohne Trocknung direkt auf ein kleines Volumen eingengt. Die dabei einsetzende Ausscheidung des Oktapeptides wurde durch Zugabe von Petroläther vervollständigt, das Produkt abfiltriert und zur weiteren Reinigung noch zweimal aus Methanol-Essigester-Petroläther umgefällt. Man erhielt so 1,70 g chromatographisch reines Z·Asp·OBzl-Arg(NO₂)-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OMe (XI) vom Smp. ca. 175–180° (Zers.). $[\alpha]_D = -61^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$ in 90-proz. Methanol). DS: Rf = 0,76 (43); 0,53 (52).

C₉₅H₈₂O₁₆N₁₄ (1315,45) Ber. C 59,35 H 6,28 N 14,91% Gef. C 58,69 H 6,26 N 14,52%

1,87 g geschütztes Oktapeptid XI wurden in 41 ml Methanol und 7,5 ml 1N HCl gelöst und nach Zugabe von 350 mg Palladiumkohle (10% Pd) in der Schüttelente bei Normaldruck hydriert, unter Absorption des entstehenden CO₂ in einer zweiten Schüttelente mit KOH-Lösung. Die Wasserstoffaufnahme kam nach 13 Std. zum Stillstand, und nach insgesamt 16 Std. wurde der Katalysator abfiltriert und das Filtrat auf ca. 5 ml eingengt. Eine Probe dieser Lösung zeigte im UV. die vollständige Abwesenheit des Absorptionsmaximums von Nitroarginin bei 270 m μ , $\epsilon = 16000$. Zur Verseifung des Methylrestes wurden 5 ml H₂O und 36,6 ml 0,36N Ba(OH)₂ zugefügt (pH = 12,5) und nach 10-minütigem Stehenlassen bei 22° durch Zugabe von 7,4 ml 1,87N H₂SO₄ neutralisiert (pH = 2,3). Das BaSO₄ wurde auf einer feinporigen Glasfritte abfiltriert und das Filtrat zum Austausch der Chlorid- und überschüssigen Sulfat-Ionen gegen Acetat langsam durch eine Säule ($\varnothing = 15$ mm, l = 160 mm) von schwach basischem Ionenaustauscher (MERCK II) in der Acetatform filtriert. Das Eluat wurde auf 10 ml eingengt, lyophilisiert und bei 0,02 Torr/50° nachgetrocknet: 1,62 g Rohprodukt. Dieses wurde durch eine multiplikative Verteilung über 250 Stufen im

System *n*-Butanol – Methanol – 0,1M Ammoniumacetat – 0,6M Essigsäure (8:1:4:4) mit Phasen-volumina von je 10 ml gereinigt. Aus den Verteilungselementen Nr. 31–50 (Maximum bei 40; $K = 0,19$) isolierte man durch Einengen auf ein kleines Volumen, Lyophilisieren und Nachtrocknen bei 0,02 Torr/45° insgesamt 1,27 g reines β -L-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II (XII). $[\alpha]_D = -60,3^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$ in 0,5N NaOH); $-61,7^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$ in 0,5N HCl). Für PC-, DA- und EP-Angaben siehe Tabellen 1 und 2.

b) *Ausgehend von freiem Heptapeptid XIII*: 714 mg Z-Asp-OBzl und 0,307 ml Triäthylamin wurden in 8 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und nach Kühlen auf -10° mit 0,264 ml Chlorameisensäure-isobutylester, gelöst in 2 ml Tetrahydrofuran, tropfenweise versetzt. Man rührte während 15 Min. bei -10° und gab dann eine auf 0° gekühlte Lösung von 2,074 g Heptapeptid-diacetat XIII [1] und 0,921 ml Triäthylamin in 12 ml Tetrahydrofuran-H₂O (1:1) zu. Das nunmehr zweiphasige Gemisch wurde intensiv während 20 Min. bei 0° , 1 Std. bei 23° und 30 Min. bei 40° gerührt, dann bei 14 Torr/40° auf ca. 5 ml eingengt und das ausgefallene schmierige Material nach Zugabe von 100 ml H₂O und Kühlen auf 0° pulverisiert. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit kaltem H₂O gewaschen und bei 0,05 Torr/60° bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Das Rohprodukt wurde noch zweimal aus Methanol-Essigester-Petroläther umgefällt und ergab 2,1 g eines amorphen Pulvers (Smp. ca. 200° , Zers.), das neben anderen Verunreinigungen noch schätzungsweise 40% Heptapeptid XIII enthielt. Es wurde direkt weiterverarbeitet.

2,05 g des rohen Carbobenzyloxy-oktapeptid-benzylesters XIV wurden in 50 ml Methanol-H₂O (7:3) nach Zugabe von 1 ml Eisessig gelöst und mit 300 mg Palladiumkohle (10% Pd) in einer Schüttelente bei Normaldruck und unter Absorption des sich bildenden Kohlendioxids hydriert. Die H₂-Aufnahme kam nach 15 Std. zum Stillstand. Man filtrierte den Katalysator ab, engte das Filtrat auf 5 ml ein und lyophilisierte. Das Rohprodukt (1,906 g) wurde in einer multiplikativen Verteilung über 184 Stufen im System 0,3M Ammoniumacetat-*n*-Butanol-Methanol (4:4:1) gereinigt. Durch Einengen des Inhaltes der Röhren Nr. 57–81 (Maximum bei 70; $K = 0,61$), Lyophilisieren und Nachtrocknen bei 0,02 Torr/45° erhielt man 618 mg reines β -L-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II (XII), identisch mit dem nach Weg a) erhaltenen Produkt.

XV: α -D-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II. 3,24 g Heptapeptid-diacetat XIII wurden in 30 ml abs. Dimethylformamid unter Erwärmen gelöst und auf 20° abgekühlt, wobei das Peptid teilweise wieder ausfiel. Nach Zugabe von 0,875 ml Triäthylamin und 778 mg Carbobenzyloxy-D-asparaginsäure-anhydrid entstand sofort eine klare Lösung, die während 6 Std. bei 25° gerührt wurde. Das Reaktionsprodukt wurde zuletzt durch Zugabe von 150 ml abs. Äther ausgefällt, bei 0° abfiltriert, mit Äther gewaschen und bei 0,02 Torr/45° getrocknet. Man erhielt 4,01 g eines weissen amorphen Pulvers vom Smp. ca. 190° (Zers.), das ein Gemisch der α - und β -Form von Carbobenzyloxy-D-aspartyl-oktapeptid sowie Carbobenzyloxy-D-asparaginsäure und Heptapeptid XIII enthielt.

Zur Abspaltung der Carbobenzyloxygruppe wurden 5,15 g dieses Gemisches mit 125 ml konz. HCl während 30 Min. auf 40° erwärmt. Die trübe Lösung wurde sodann zur Trockne eingengt, der Rückstand pulverisiert und bei 0,02 Torr/40° nachgetrocknet. Das Hydrochlorid (5,66 g) wurde in 15 ml H₂O gelöst und durch Umsetzung an einer Säule ($\varnothing = 22$ mm, $l = 200$ mm) von schwach basischem und mit 2N Essigsäure vorbehandelten Ionenaustauscher (MERCK II) in das Acetat umgewandelt. Das Eluat wurde auf ein kleines Volumen eingengt und lyophilisiert und ergab 4,78 g eines Gemisches der freien Peptide in der Acetatform.

Zur Abtrennung des β -Oktapeptides wurde an Al₂O₃ chromatographiert: Eine in einer Mischung von 2N NH₃ und Methanol (1:1) eingefüllte Säule ($\varnothing = 50$ mm, $l = 450$ mm) von neutralem Al₂O₃ wurde so lange mit diesem Lösungsmittelgemisch gewaschen bis praktisch keine anorganischen Salze mehr im Eluat erschienen. Die 4,78 g Peptidgemisch wurden dann in 20 ml 2N NH₃ – MeOH (1:1) gelöst, auf die Säule aufgetragen und mit dem gleichen Lösungsmittel unter Auffangen von Fraktionen zu je 40 ml chromatographiert. Die Fraktionen 25–30 ergaben beim Eindampfen zur Trockne 1,61 g eines Gemisches aus α -D-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II (XV) und Heptapeptid XIII, das zur Auftrennung in die beiden Komponenten in eine multiplikative Verteilung über 90 Stufen im System *n*-Butanol – 0,3M Ammoniumacetat (1:1) eingesetzt wurde (Phasenvolumen je 20 ml). Aus den Verteilungselementen Nr. 6–16 (Maximum bei 11; $K = 0,145$) erhielt man nach Einengen, Lyophilisieren und Nachtrocknen bei 0,02 Torr/45° 836 mg reines α -D-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II (XV). $[\alpha]_D = -57,8^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$ in 0,5N NaOH); $-66,8^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$ in 0,5N HCl). Für PC-, DA- und EP-Angaben siehe Tabellen 1 und 2.

XVI: β -D-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II. Die Fraktionen 35–62 der oben beschriebenen Chromatographie an Al₂O₃ ergaben beim Eindampfen und Trocknen bei 0,02 Torr/40° direkt 2,34 g reines β -D-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II (XVI). $[\alpha]_D = -53,3^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$ in 0,5 N NaOH); $-67,8^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$ in 0,5 N HCl). Für PC-, DA- und EP-Angaben siehe Tabellen 1 und 2.

XVII: *Desamino-Val⁵-Hypertensin II*. 1,037 g Heptapeptid-diacetat XIII und 0,28 ml Triäthylamin wurden in 9 ml abs. Dimethylformamid suspendiert und dazu 100 mg Bernsteinsäureanhydrid in fester Form zugegeben. Nach 30-minütigem Rühren bei 22° entstand eine klare Lösung. Nach 6 Std. wurde das Reaktionsprodukt durch Zugabe von 40 ml abs. Äther ausgefällt, bei 0° abfiltriert und bei 0,02 Torr/45° getrocknet. Man erhielt 1,085 g Rohprodukt, das im System *n*-Butanol–0,3 M Ammoniumacetat über 150 Stufen mit Phasenvolumina von je 10 ml multiplikativ verteilt wurde. Aus den Röhrchen Nr. 20–46 (Maximum bei 34; $K = 0,3$) isolierte man durch Einengen, Lyophilisieren und Nachtrocknen bei 0,02 Torr/45° insgesamt 749 mg reines Desamino-Val⁵-Hypertensin II (XVII). $[\alpha]_D = -57,8^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$ in 0,5 N NaOH); $-64^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$ in 0,5 N HCl). Für PC-, DA- und EP-Angaben siehe Tabellen 1 und 2.

Abspaltung der Dipeptide aus den Oktapeptiden mit Trypsin. Je 10 mg α -L-, α -D-, β -L-, β -D- und Desamino-Val⁵-Hypertensin II wurden in 0,25 ml H₂O gelöst und durch Zugabe von 2 N NH₃ das pH auf 8 gestellt. Nach Zugabe von 0,25 ml 0,2 M Ammoniumacetatpuffer vom pH 8 und 0,01 ml einer 1-proz. Trypsinlösung wurde während 3 Std. bei 38° inkubiert, dann das Enzym durch Zuzugabe von 0,05 ml 2 N Essigsäure und 5-minütiges Erhitzen auf 100° denaturiert und die Lösung lyophilisiert. Der etwas klebrige und hygroskopische Rückstand wurde bei 0,01 Torr/60° nachgetrocknet. Es resultierte in allen Fällen ein äquimolares Gemisch von Dipeptid (α -L-, α -D-, β -L-, β -D- und Desamino-aspartyl-L-arginin) und Hexapeptid, das direkt chromatographisch und elektro-phoretisch analysiert wurde. Die Dipeptide wurden selektiv mit SAKAGUCHI-Reagens angefärbt, PC- und EP-Werte siehe Tabellen 1 und 2. Das aus dem β -L-Oktapeptid erhaltene Dipeptid erwies sich erwartungsgemäss als identisch mit dem synthetisch hergestellten β -L-Aspartyl-L-arginin.

Vergleich von β -Aspartyl-L-arginin aus IV mit β -L- und β -D-Aspartyl-L-arginin. Die Auftrennung eines Gemisches von β -L- und β -D-Aspartyl-L-arginin in zwei vollständig voneinander abgetrennte Flecke war mit den üblicherweise verwendeten analytischen Methoden (PC und EP) infolge der nur geringen Unterschiede der Wanderungstrecken nicht möglich. Dagegen gelang die gewünschte Auftrennung mittels PC beim mehrtagigen Laufenlassen nach der Durchflussmethode: 0,01 ml einer 1-proz. Lösung wurde auf WHATMAN-Papier Nr. 1 aufgetropft und im System 40 während 120 Std. absteigend chromatographiert. Anfärbung mit Ninhydrin. β -L-Aspartyl-L-arginin: Laufstrecke 11,0 cm; β -D-Aspartyl-L-arginin: Laufstrecke 8,6 cm.

Nach dieser Methode analysiert, erwies sich das aus dem β -Oktapeptid IV isolierte Dipeptid als Gemisch, bestehend aus $85 \pm 3\%$ β -L-Aspartyl-L-arginin und $15 \pm 3\%$ β -D-Aspartyl-L-arginin. Die Bestimmung erfolgte durch visuellen Vergleich mit Mischungen der beiden diastereoisomeren Dipeptide von bekanntem Verhältnis.

Reaktionsgeschwindigkeiten von Trypsin und Chymotrypsin mit den Oktapeptiden. Je 1 mg Oktapeptid wurde in 0,1 ml 0,1 M Trispuffer (pH = 8) gelöst und nach Zugabe von 0,01 ml einer 0,01-proz. Trypsin- bzw. Chymotrypsin-Lösung (Enzym: Substrat = 1:1000) während verschiedener Zeiten bei 38° inkubiert (1, 3, 10, 30 und 90 Min., 6 Std., 24 Std.). Die während 6 und 24 Std. inkubierten Proben enthielten zusätzlich ein Tröpfchen Toluol als Schutz gegen Abbau durch Bakterien). Zur Beendigung der Hydrolyse fügte man 0,02 ml 2 N Essigsäure hinzu und erhitze während 5 Min. im siedenden Wasserbad. Von den so erhaltenen Lösungen wurden je 0,02 ml auf Papier aufgetropft und in den Systemen 45 und 54 chromatographiert. Nach Anfärbung mit Ninhydrin und PAULY-Reagens wurde visuell durch Vergleichen mit bekannten Mengen der Ausgangs- und Endprodukte das Ausmass der Spaltung abgeschätzt. Die Mittelwerte der 4 Bestimmungen (2 PC-Systeme, 2 Indikatoren) wurden graphisch als Funktion der Zeit dargestellt und aus dieser Kurve die für eine 20-prozentige Spaltung notwendige Zeit abgelesen (Fehlergrenze ca. $\pm 10\%$, relativ). Zahlenwerte siehe Tabelle 3.

Inkubation mit Leucinaminopeptidase. Zur Aktivierung wurden 1,25 mg Leucinaminopeptidase (WORTHINGTON) in 0,25 ml 0,2 M Trispuffer (pH = 8,5) gelöst, dazu 0,0025 ml 1,5 M MgCl₂ und ein Tropfen Toluol gegeben und während 2 Std. bei 38° inkubiert.

Je 1 mg Oktapeptid wurde in 0,08 ml 0,2 M Trispuffer (pH = 8,5) gelöst und mit 0,02 ml der aktivierten Enzymlösung (Enzym: Substrat = 1:12,5) und einem Tröpfchen Toluol während

5 bzw. 25 Std. bei 38° inkubiert. Zuletzt wurde 5 Min. auf 100° erhitzt und dann je 0,015 ml dieser Lösungen auf Papier im System 45 chromatographiert und mit Ninhydrin und PAULY-Reagens angefärbt. Die Resultate sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Bei den 4 gegen Leucaminopeptidase resistenten Verbindungen waren in den 25-stündigen Hydrolysaten lediglich Spuren von Spaltprodukten sichtbar, die auf eine geringe Verunreinigung des Enzyms mit Chymotrypsin und Carboxypeptidase zurückzuführen waren.

Für die Ausführung spezieller analytischer Arbeiten danken wir den Herren Dres. HÜRZELER, NEHER und PADOWETZ sowie Herrn E. VON ARX.

SUMMARY

The preparation of the 4 isomeric octapeptides α -L-, β -L-, α -D-, and β -D-Asp¹-Val⁵-hypertensin II, and of their parent compound, desamino-Val⁵-hypertensin II, is described.

These octapeptides, as well as the dipeptides α -L-, β -L-, α -D-, β -D-, and desamino-aspartyl-L-arginine prepared from the octapeptides by reaction with trypsin, are compared with each other in respect of their chromatographic and electrophoretic behaviour.

Upon degradation with trypsin, the various octapeptides display different rates of reaction, whereas with chymotrypsin they all react at a similar rate. The unnatural isomers (α -D, β -L, β -D) and the desamino compound are completely resistant to leucine-aminopeptidase.

In the blood-pressure test in nephrectomised rats the 3 unnatural octapeptides are approximately 50% more active than α -L-Asp¹-Val⁵-hypertensin II, and the duration of their effect is 2–3 times longer. The desamino compound is only half as active, though the duration of its effect is similarly prolonged.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel
Pharmazeutische Abteilung

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] B. RINIKER & R. SCHWYZER, *Helv.* **44**, 685 (1961).
- [2] B. RINIKER, H. BRUNNER & R. SCHWYZER, *Angew. Chem.* **74**, 469 (1962).
- [3] A. R. BATTERSBY & J. C. ROBINSON, *J. chem. Soc.* **1955**, 259; E. SONDEHEIMER & R. W. HOLLEY, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 2467 (1954); S. A. BERNHARD, A. BERGER, J. H. CARTER, E. KATCHALSKI, M. SELA & Y. SHALITIN, *ibid.* **84**, 2421 (1962); B. ISELIN & R. SCHWYZER, *Helv.* **45**, 1499 (1962).
- [4] W. D. JOHN & G. T. YOUNG, *J. chem. Soc.* **1954**, 2870.
- [5] W. J. LE QUESNE & G. T. YOUNG, *J. chem. Soc.* **1952**, 24.
- [6] R. SCHWYZER, *Helv.* **44**, 667 (1961).
- [7] B. RINIKER & R. SCHWYZER, *Helv.* **44**, 658 (1961).
- [8] R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* **41**, 1287 (1958).
- [9] M. A. NAUGHTON, F. SANGER, B. S. HARTLEY & D. C. SHAW, *Biochem. J.* **77**, 149 (1960).
- [10] K. ARAKAWA, R. R. SMEBY & F. M. BUMPUS, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 1424 (1962).
- [11] D. L. SWALLOW, I. M. LOCKART & E. P. ABRAHAM, *Biochem. J.* **70**, 359 (1958).
- [12] E. ELLENBOGEN, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 5198 (1952).
- [13] D. REGOLI, B. RINIKER & H. BRUNNER, *Biochem. Pharmacol.* **12**, 637 (1963).
- [14] P. A. KHAIRALLAH, F. M. BUMPUS, I. R. PAGE & R. R. SMEBY, *Science* **140**, 672 (1963).
- [15] G. G. GLENNER, P. J. McMILLAN & J. E. FOLK, *Nature* **194**, 867 (1962).
- [16] M. BERGMANN, L. ZERVAS & L. SALZMANN, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **66**, 1288 (1933).