

259. Synthetische Analoge des Hypertensins.

VI. α -L-Asp(NH₂)¹-aza- α' -homo-Tyr⁴-Val⁵-Hypertensin II und β -L-Asp¹-aza- α' -homo-Tyr⁴-Val⁵-Hypertensin II¹⁾

von B. Riniker und R. Schwyzer²⁾

(15. X. 64)

Die Anwendung der Azidmethode zur Kondensation von Peptiden führt in vielen Fällen zur Bildung beträchtlicher Mengen von Nebenprodukten [1]³⁾. Zum grössten Teil sind diese auf CURTIUS-Umlagerungen zurückzuführen, wobei die primär aus den Säureaziden entstehenden Isocyanate nach verschiedenen Mechanismen weiterreagieren können [2].

Im Laufe unserer Arbeiten auf dem Gebiet der Peptidsynthese trafen wir wiederholt auf unsymmetrisch substituierte Harnstoffderivate als Nebenprodukte der Azidkupplung, entstanden durch Reaktion von Isocyanaten mit Aminosäure- oder Peptid-Estern. Die Isolierung solcher Harnstoffderivate aus Azidkondensationen wurde schon von verschiedenen Autoren beschrieben [3] [4]. Es scheint, dass je nach der Stabilität des aus der Carboxylkomponente gebildeten Azides sowie der Geschwindigkeit, mit der es mit der Aminokomponente unter Bildung der Peptidbindung weiterreagiert, sehr unterschiedliche Mengen dieser Nebenprodukte auftreten können. Unter ungünstigen Verhältnissen, wie beispielsweise bei den sterisch gehinderten Valinaziden [3], kann die Kondensation vorwiegend oder sogar ausschliesslich unter Bildung der Harnstoffderivate an Stelle der gewünschten Peptide verlaufen.

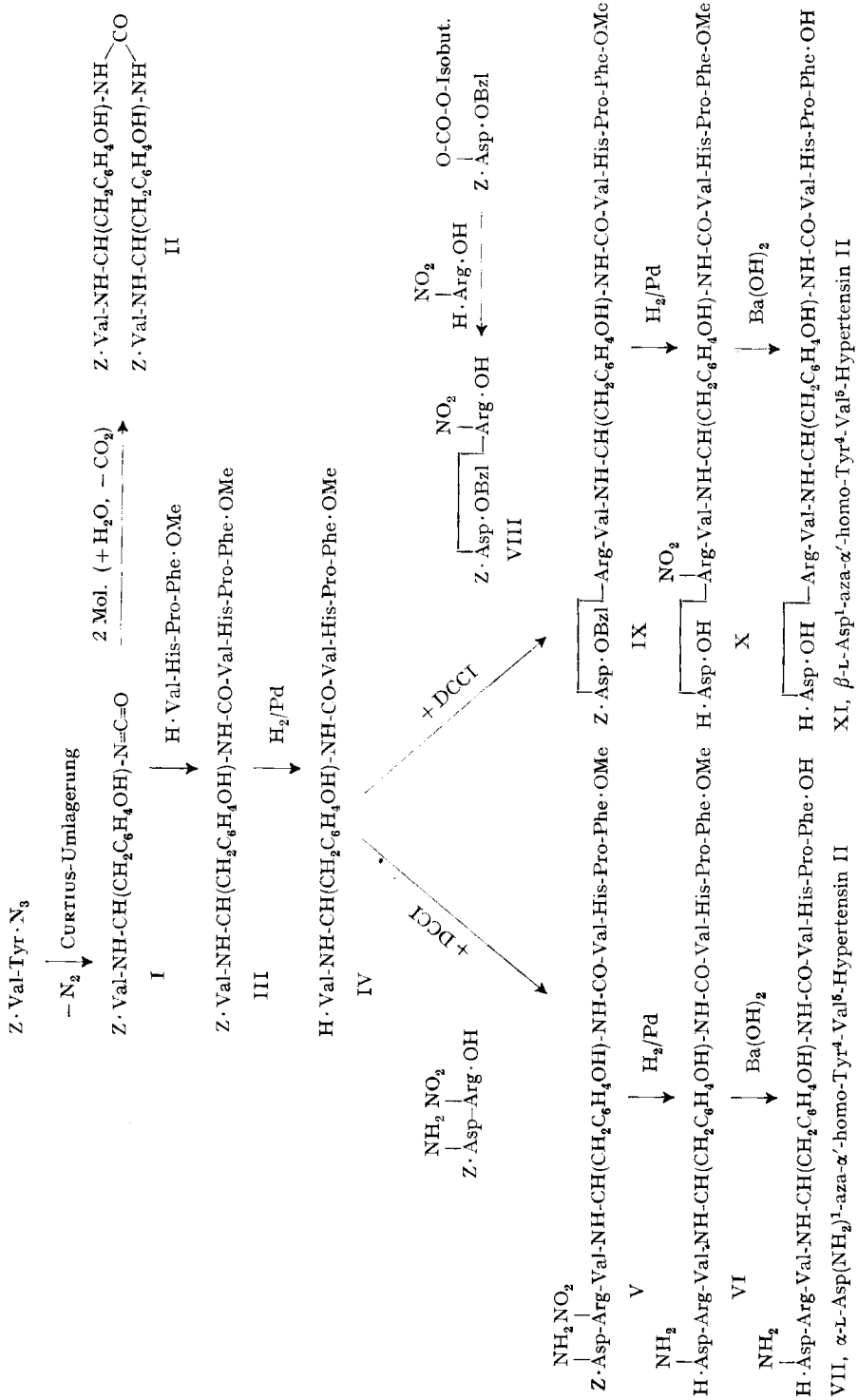
Bei den bisher in der Literatur erwähnten Beispielen handelt es sich um relativ niedrigmolekulare Verbindungen (Harnstoff-Analoge von Di- bis Pentapeptiden), die sämtliche dank ihrer kristallinen Eigenschaften isoliert werden konnten. Angesichts der geringen strukturellen Unterschiede – die Harnstoffderivate unterscheiden sich nur durch eine zusätzliche, in die Peptidkette eingeschobene NH-Gruppe von den entsprechenden Peptiden – stellten wir uns die Frage, ob auch bei etwas grösseren und nicht kristallisierbaren Peptiden die bei der Azidkondensation als Nebenprodukte entstandenen Harnstoffderivate noch mit Sicherheit nachgewiesen und abgetrennt werden können. Ferner wollten wir am Beispiel des Hypertensins untersuchen, in welcher Weise die Aktivität dieser biologisch hochspezifisch wirksamen Verbindung [5] durch eine Abänderung zum Harnstoffderivat beeinflusst würde.

In der vorliegenden Arbeit berichten wir über die Synthese von α -L-Asp(NH₂)¹-aza- α' -homo-Tyr⁴-Val⁵-Hypertensin II und von β -L-Asp¹-aza- α' -homo-Tyr⁴-Val⁵-Hypertensin II und den Vergleich dieser Harnstoffderivate mit den entsprechenden Oktapeptiden, α -L-Asp(NH₂)¹-Val⁵-Hypertensin II [6] [7] bzw. β -L-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II [8].

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. 2384.



Synthesen. Das auf die übliche Weise über das Hydrazid hergestellte Z-Val-Tyr-N₃ wurde mit Essigester extrahiert. Beim Stehenlassen dieser Azidlösung bei 0° trat bereits eine teilweise Umwandlung in das Isocyanat (I) ein, erkennbar an der Ausscheidung des schwerlöslichen symmetrischen Harnstoffderivates II. Dieses entsteht durch Hydrolyse einer Molekel Isocyanat zum Amin (+ CO₂) und Kondensation desselben mit einer weiteren Molekel Isocyanat. Am einfachsten lässt sich die CURTIUS-Reaktion im Infrarot verfolgen [9]. Wir fanden so, dass das Z-Val-Tyr-N₃, sowohl als Festsubstanz als auch in organischen Lösungsmitteln, bei 0° im Laufe einiger Tage und bei 40° bereits nach einer Stunde grösstenteils zum Isocyanat umgelagert ist. Die Konfiguration an dem der Azidgruppe benachbarten asymmetrischen C-Atom bleibt bei dieser Umlagerung nach den Untersuchungen von KENYON & YOUNG [10] vollständig erhalten.

Das Z-Val-Tyr-N₃ wurde in absoluter Dioxanlösung durch einstündiges Erwärmen auf 50° quantitativ in das Isocyanat I umgelagert. Kondensation mit H-Val-His-Pro-Phe-OMe ergab in rascher Reaktion⁴⁾ und guter Ausbeute das amorphe «Harnstoff-Hexapeptid» III, welches katalytisch zur Aminoverbindung IV reduziert wurde. Mit Z-Asp(NH₂)-Arg(NO₂)-OH und Dicyclohexylcarbodiimid als Kondensationsmittel wurde das «Harnstoff-Oktapeptid» V erhalten, das als Rohprodukt, zusammen mit ca. 20% unreaktiertem Dipeptid, hydriert und verseift wurde und nach Abtrennung der Verunreinigungen in einer multiplikativen Verteilung das α -L-Asp(NH₂)¹-aza- α' -homo-Tyr⁴-Val⁵-Hypertensin II (VII) in reiner Form ergab. Mit Trypsin liess sich die Verbindung quantitativ in H-Asp(NH₂)-Arg-OH und das freie «Harnstoff-Hexapeptid» spalten, was die sterische Einheitlichkeit (L-Form) des Arg² beweist.

Das geschützte β -Dipeptid VIII wurde durch Kondensation von Carbobenzyloxy-L-asparaginsäure- α -benzylester mit freiem Nitro-L-arginin nach der gemischten Anhydrid-Methode in kristalliner Form erhalten. Kondensation mit dem «Harnstoff-Hexapeptid» IV nach der Carbodiimid-Methode ergab das geschützte «Harnstoff- β -Oktapeptid» IX, das nach einer multiplikativen Verteilung in schlechter Ausbeute, jedoch in chromatographisch reiner Form, erhalten wurde. Die Schutzgruppen wurden wiederum durch Hydrierung und Verseifung entfernt und das freie Harnstoffderivat XI nochmals durch multiplikative Verteilung gereinigt. Im Unterschied zum α -L-Asp(NH₂)¹-Analogen VII blieben hier beim Inkubieren der chromatographisch und elektrophoretisch einheitlichen Verbindung mit Trypsin ca. 6% unspaltbares Material zurück, bestehend aus der D-Arg²-Verbindung.

Vergleichende Versuche. Wie Versuche mit den Verbindungen IV, VII und XI zeigten, sind diese Harnstoffderivate gegenüber Basen stabil unter Bedingungen, wo Methylestergruppen vollständig verseift werden. Mit Säure zerfallen die «Harnstoff-Oktapeptide» VII und XI in Tripeptidamid 1–3 und Carbamoyl-tetrapeptid 5–8 unter Bedingungen, bei denen gewöhnliche Peptidbindungen noch vollkommen stabil sind. Im Totalhydrolysat von VII und XI fehlte erwartungsgemäss das Tyrosin, und an seiner Stelle enthielten die Proben ein braunrotes, unlösliches Harz, entstanden aus dem bei der Hydrolyse primär freigesetzten *p*-Hydroxyphenyl-acetaldehyd.

⁴⁾ Bereits nach 5minütigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur zeigte die Reaktionsmischung im IR. keine Isocyanatbande mehr.

Währenddem α -L-Asp(NH₂)¹-Val⁵-Hypertensin II und β -L-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II mit Chymotrypsin rasch zu den Tetrapeptiden 1–4 und 5–8 gespalten werden [8], sind die entsprechenden Harnstoffderivate VII und XI vollkommen beständig. Interessanterweise wird auch der Angriff durch Trypsin, der 2 Aminosäurereste weiter entfernt von der zum Harnstoffderivat modifizierten Peptidbindung stattfindet, beeinflusst: Die Harnstoffverbindungen VII und XI werden durch Trypsin 3- bis 4-mal langsamer gespalten als die entsprechenden Oktapeptide.

Im experimentellen Teil sind bei den Angaben der chromatographischen und elektrophoretischen Daten von Harnstoffderivaten in eckigen Klammern die Werte für die entsprechenden normalen Peptide angegeben. Es fällt auf, dass im allgemeinen nur geringe Unterschiede auftreten. In vielen Chromatographiesystemen sind die Rf-Differenzen so klein, dass Verunreinigungen von «Harnstoff-Peptiden» in den ihnen verwandten normalen Peptiden kaum mehr festgestellt werden könnten. Bei der Elektrophorese sind infolge der identischen Ladungsverhältnisse praktisch gleiche Wanderungsstrecken zu erwarten.

Versuche zur Trennung eines künstlichen Gemisches von H-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OMe und dessen Harnstoff-Analogen IV durch fraktionierte Fällung aus verschiedenen Lösungsmittelsystemen zeigten, dass diese Methode wegen der geringen Selektivität zeitraubend und verlustreich wäre und wohl allgemein bei nicht kristallisierbaren grösseren Peptiden kaum in Frage kommen dürfte. Dagegen gelang die praktisch vollständige Auftrennung in einer multiplikativen Verteilung über 500 Stufen, wobei sich aus den beiden *K*-Werten ein Trennfaktor $\beta = 1,39$ ergab.

Die Leichtigkeit, mit der gewisse Peptidazide in die Isocyanate umlagern, und die Schwierigkeiten, die bei der analytischen Erfassung der aus den Isocyanaten entstandenen «Harnstoff-Peptide» und bei deren Abtrennung im präparativen Massstab auftreten können, sollten bei der Anwendung der Azidmethode berücksichtigt werden. Die Beachtung dieser Tatsachen ist besonders bei der Synthese von höheren Peptiden am Platze, da hier häufig die Kristallisation des Endproduktes nicht mehr möglich ist und die zu erwartenden physikalischen Unterschiede von Peptid und «Harnstoff-Peptid» mit steigender Molekülgrösse zunehmend kleiner werden.

Die *Bestimmung der biologischen Aktivität* der beiden Harnstoffderivate VII und XI im Blutdrucktest an der nierenlosen Ratte ergab folgende Resultate⁵⁾: Das α -L-Asp(NH₂)¹-Harnstoffderivat VII zeigte ca. 25% der Aktivität des als Standard verwendeten α -L-Asp(NH₂)¹-Val⁵-Hypertensins II, bei gleicher Wirkungsdauer von äquipressorischen Dosen; das β -L-Asp¹-Harnstoffderivat XI wies dagegen ca. 40% der Aktivität und ungefähr doppelte Wirkungsdauer von äquipressorischen Dosen auf beim Vergleich mit demselben Standard. Die stärkere und länger anhaltende Wirksamkeit des β -L-Asp¹-Harnstoffderivates XI gegenüber der α -L-Asp(NH₂)¹-Verbindung VII verläuft parallel zu den Verhältnissen, die auch in der Reihe der normalen Peptide bei der Gegenüberstellung von β -L-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II und α -L-Asp(NH₂)¹-Val⁵-Hypertensin II gefunden wurden [8].

Wir können gegenwärtig noch nicht entscheiden, ob die gegenüber den normalen Peptiden kleinere Aktivität der «Harnstoff-Peptide» durch die chemische Modifika-

⁵⁾ Die freundliche Überlassung der Prüfungsergebnisse verdanken wir Herrn Dr. H. BRUNNER von unserer biologischen Abteilung.

tion der Peptidkette selbst bewirkt wird oder lediglich sekundär bedingt ist durch die dadurch hervorgerufenen Änderungen der Lage der funktionellen Gruppen und Seitenketten der Molekel relativ zueinander.

Kürzlich berichteten HESS, MORELAND & LAUBACH [11] über die Synthese eines Val⁵-Hypertensin-II-Analogen, das an Stelle von Val³ den Carbazoylrest^{5a)} –NH–N[CH(CH₃)₂]-CO– enthält. Die biologische Aktivität dieses «Isosteren» betrug 0,5–1% derjenigen von α-L-Asp(NH₂)¹-Val⁵-Hypertensin II. Dieser Wert erscheint, beim Vergleichen mit der bedeutend höheren Wirksamkeit der beiden sowohl chemisch als auch sterisch modifizierten Harnstoffderivate VII und XI, unerwartet niedrig. Die Interpretation dieser Befunde ist jedoch bei unseren gegenwärtigen Kenntnissen über die Zusammenhänge zwischen Struktur und biologischer Aktivität der Hypertensin-Peptide noch recht mangelhaft und weitgehend auf Vermutungen angewiesen. Man erkennt jedoch, dass das «Peptidrückgrat» an sich für die biologische Wirkung von Polypeptiden nicht unbedingt nötig ist. Unser Augenmerk wird dadurch einmal mehr auf die durch die Seitenketten gebildete «Topographie» der Wirkstoffe gelenkt.

Experimenteller Teil⁶⁾

I: *Z-Val-NH-CH(CH₂C₆H₄OH)-N=C=O*, Isocyanat aus Carbobenzyloxy-L-valyl-L-tyrosin-azid. 5,15 g *Z-Val-Tyr-NHNH₂* [12] wurden in 25 ml 2N HCl und 50 ml Dimethylformamid gelöst und bei –15° mit 2,75 ml einer 5N NaNO₂-Lösung versetzt. Nach 5 Min. bei –10° gab man eine Lösung von 570 mg Ammoniumsulfamat in 0,5 ml H₂O zu, rührte nochmals während 2 Min. bei –10° und versetzte dann mit 400 ml Eiswasser. Das dabei ausgefällte, amorphe *Z-Val-Tyr-N₃*⁷⁾ wurde bei 0° abfiltriert, in Essigester gelöst, mit NaHCO₃-Lösung und dann mit H₂O gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Abfiltrieren des Trockenmittels und Stehenlassen des Filtrates bei 0° über Nacht hatte sich ein wenig gallertiges Harnstoffderivat II ausgeschieden, das wiederum abfiltriert wurde (200 mg). Die Lösung wurde nun bei 14 Torr zur Trockne eingengt und der weisse, amorphe Rückstand (Gemisch von ca. 80–90% Azid und ca. 10–20% Isocyanat) in 20 ml abs. Dioxan gelöst und zur vollständigen Umwandlung in das Isocyanat während 1 Std. auf 50° erwärmt. Das Lösungsmittel wurde anschliessend durch Gefriertrocknung entfernt und der amorphe, weisse Rückstand bei 0,02 Torr/40° nachgetrocknet. Man erhielt 4,47 g *Z-Val-NH-CH(CH₂C₆H₄OH)-N=C=O* (I) vom Smp. 200–205° (Zers.; sintert bei 155°). [α]_D = –58° ± 1° (c = 1,17 in abs. Dioxan). Charakterisierung mittels Chromatographie ist infolge der Zersetzung mit Feuchtigkeit und hydroxylhaltigen Lösungsmitteln nicht möglich.

| | | | | |
|---|---------------|---------|----------|-----------|
| C ₂₂ H ₂₅ O ₅ N ₃ | Ber. C 64,22 | H 6,12 | O 19,44 | N 10,21% |
| (411,44) | Gef. ,, 63,87 | ,, 6,08 | ,, 19,28 | ,, 10,34% |

Die Verbindung ist beim trockenen Aufbewahren stabil, zersetzt sich jedoch in Gegenwart von Luftfeuchtigkeit zum symmetrischen Harnstoffderivat II.

II: *N,N'-Bis-[1-(carbobenzyloxy-L-valyl-amino)-2-(p-hydroxyphenyl)-äthyl]-harnstoff*. 200 mg Isocyanat I wurden in 3 ml Dioxan-H₂O (9:1) gelöst und über Nacht bei 25° stehengelassen. Dabei bildete sich eine steife, gallertige Masse, die mit 10 ml H₂O homogenisiert, abfiltriert und bei 0,02 Torr/100° getrocknet wurde. Es resultierten 185 mg des Harnstoffderivates II vom Smp. 233–237° (Zers.), praktisch unlöslich in den meisten organischen Lösungsmitteln. UV.-Absorption in

^{5a)} Anmerkung der Redaktion: Der hier nach [11] zitierte Name Carbazoyl für den Rest H₂N–NH–CO– sollte nach den IUPAC-Regeln Hydrazinocarbonyl heissen.

⁶⁾ Als Einleitung zum experimentellen Teil siehe den entsprechenden Abschnitt der voranstehenden Arbeit [8].

⁷⁾ SCHWARZ, BUMPUS & PAGE [12] geben für diese Verbindung, nach dem Trocknen über P₂O₅, einen Smp. von 203–208° an. Bei diesem Wert handelt es sich jedoch um den Zersetzungspunkt des aus dem Azid beim Lagern oder Erwärmen entstandenen Isocyanates I.

Methanol-1N NaOH (9:1): λ_{max} 245 $m\mu$ ($\epsilon = 25200$); 294 $m\mu$ ($\epsilon = 4800$). DS: Rf = 0,74 (43A); 0,82 (52). Totalhydrolysat: enthält nur Valin; kein Tyrosin.

| | | | | |
|----------------------|---------------|---------|----------|-----------|
| $C_{43}H_{52}O_9N_6$ | Ber. C 64,81 | H 6,58 | O 18,07 | N 10,55% |
| (796,94) | Gef. ,, 64,60 | ,, 6,55 | ,, 18,11 | ,, 10,71% |

III: *Z-Val-NH-CH(CH₂C₆H₄OH)-NH-CO-Val-His-Pro-Phe-OMe, Carbobenzyloxy-L-valyl-aza- α' -homo-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester*. 2,05 g Isocyanat I wurden in 25 ml abs. Dioxan gelöst und 2,56 g H-Val-His-Pro-Phe-OMe [6] in fester Form zugefügt. Nach kurzem Rühren war alles klar gelöst, und man liess über Nacht bei 23° stehen. Dabei bildete sich eine gallertige Masse, die mit 50 ml Petroläther homogenisiert, abfiltriert, mit Petroläther gewaschen und bei 0,02 Torr/30° getrocknet wurde. Dieses Rohprodukt (4,1 g) enthielt noch ca. 10% unreakiertes Tetrapeptid sowie eine Verunreinigung mit hohem Rf (DS) und wurde durch je zweimaliges Umfällen aus Methanol-H₂O und Methanol-Essigester-Petroläther gereinigt. Man erhielt 2,9 g chromatographisch reines Harnstoffderivat III als farbloses, amorphes Pulver vom Smp. ca. 175–185° (Zers.). Zur Analyse wurde es 16 Std. bei 0,02 Torr/80° getrocknet. $[\alpha]_D = -50^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$ in Methanol). DS: Rf = 0,77 (43); 0,56 (52); 0,76 (100) [Hexapeptid: Rf = 0,80 (43); 0,54 (52); 0,84 (100)].

| | | | | |
|-------------------------|---------------|---------|----------|-----------|
| $C_{48}H_{61}O_{10}N_9$ | Ber. C 62,39 | H 6,65 | O 17,31 | N 13,65% |
| (924,09) | Gef. ,, 61,79 | ,, 6,75 | ,, 17,64 | ,, 13,44% |

IV: *H-Val-NH-CH(CH₂C₆H₄OH)-NH-CO-Val-His-Pro-Phe-OMe, L-Valyl-aza- α' -homo-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester*. 2,0 g Carbobenzyloxyverbindung III wurden in 60 ml 95-proz. Methanol unter Erwärmen gelöst und nach Zugabe von 0,6 g Palladiumkohle (10% Pd) in der Schüttelente unter Absorption des entstehenden CO₂ hydriert. Nach 2 Std. und einer H₂-Aufnahme von 52 ml war die Hydrierung beendet, und man dampfte die Lösung nach dem Abfiltrieren des Katalysators zur Trockne ein. Der Rückstand wurde einmal aus Äthanol-Petroläther umgefällt und ergab 1,51 g eines amorphen Produktes von unscharfem Zersetzungspunkt bei ca. 160–170°, das ca. 2–5% einer Verunreinigung mit höherem Rf (DS) enthielt. Es wurde in dieser Reinheit zur weiteren Verarbeitung verwendet. $[\alpha]_D = -47^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,03$ in Methanol). PC: Rf = 0,82 (40); 0,91 (45); 0,85 (54). DS: Rf = 0,36 (43); 0,17 (52); 0,29 (100). [Hexapeptid: PC: Rf = 0,84 (40); 0,91 (45); 0,80 (54). DS: Rf = 0,45 (43); 0,19 (52); 0,31 (100)].

| | | | | |
|----------------------|---------------|---------|----------|-----------|
| $C_{40}H_{55}O_8N_8$ | Ber. C 60,82 | H 7,02 | O 16,20 | N 15,96% |
| (789,94) | Gef. ,, 60,36 | ,, 7,09 | ,, 16,37 | ,, 15,59% |

Versuche zur Auftrennung eines Gemisches von *H-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OMe* [6] und dessen Harnstoff-Analogen IV. – a) *Fraktionierte Fällung*: Je 100 mg Hexapeptid-methylester und Harnstoffderivat IV wurden in einem Gemisch von Methanol und Essigester gelöst und durch Ausfällung mit steigenden Mengen Petroläther in 4 ungefähr gleich grosse Fraktionen zerlegt. Die erste zeigte ein Verhältnis von Hexapeptidester zu Harnstoffderivat = ca. 2:3, die letzte ca. 3:2 (geschätzt anhand der PAULY-Reaktion nach Auftrennung (DS) im System 43).

In einem zweiten Versuch wurden je 100 mg der beiden Verbindungen in Methanol gelöst und mit Wasser fraktioniert ausgefällt. Hier zeigte sich praktisch dasselbe Mengenverhältnis in allen 4 Fraktionen.

b) *Multiplikative Verteilung*: Ein Gemisch von je 200 mg Hexapeptidester und Harnstoffderivat IV wurde im System Methanol-0,1M Ammoniumacetat-Chloroform-Benzol (15:5:16:4) mit Phasenvolumina von je 10 ml multiplikativ verteilt. Nach 100 Stufen zeigte die photometrische Auswertung eine symmetrische, etwas verbreiterte Verteilungskurve in den Elementen Nr. 26–61 (Maximum bei 44). Im Laufe von weiteren 400 Stufen trat fast vollständige Auftrennung in 2 Maxima ein. Die Aufarbeitung erfolgte durch Einengen des Inhalts von je 5 Verteilungselementen zur Trockne, Wegsublimieren des Ammoniumacetates und Nachtrocknen der Rückstände im Hochvakuum. Zusammengefasst ergaben sich folgende Fraktionen: Nr. 181–215, 183 mg reiner Hexapeptidester (Max. = 199; $K = 0,66$); Nr. 216–220, 15 mg Gemisch, ca. 1:1; Nr. 221–255, 175 mg reines Harnstoffderivat IV (Max. = 240; $K = 0,92$).

Trennfaktor $\beta = 0,92/0,66 = 1,39$.

V: *Z-Asp(NH₂)-Arg(NO₂)-Val-NH-CH(CH₂C₆H₄OH)-NH-CO-Val-His-Pro-Phe-OMe, Carbobenzyloxy-L-asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-aza- α' -homo-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester*. 317 mg *Z-Asp(NH₂)-Arg(NO₂)-OH* [13] und 315 mg *H-Val-NH-*

CH(CH₂C₆H₄OH)-NH-CO-Val-His-Pro-Phe-OMe (IV) wurden in 2 ml abs. Dimethylformamid gelöst und dazu bei 0° 127 mg festes Dicyclohexyl-carbodiimid gegeben. Die klare Lösung wurde über Nacht bei 0° und 20 Std. bei 25° stehengelassen und dann bei 0° vom ausgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Durch Zugabe von 10 ml Essigester zum Filtrat fällte man das Rohprodukt als flockigen Niederschlag aus (524 mg) und reinigte es anschliessend durch Lösen in siedendem 95-proz. Methanol und Ausfällen bei 0°. Man erhielt so 349 mg Harnstoffderivat V, das noch ca. 20% unreactiertes Dipeptid sowie eine geringe Menge (< 5%) einer unbekanntes Verunreinigung enthielt. Es wurde in diesem Zustand weiterverarbeitet. DS: Rf = 0,65 (43); 0,39 (52); 0,69 (110). [Oktapeptid: Rf = 0,69 (43); 0,38 (52); 0,70 (110).]

VI: *H·Asp(NH₂)-Arg-Val-NH-CH(CH₂C₆H₄OH)-NH-CO-Val-His-Pro-Phe·OMe*, *L-Asparaginyll-L-arginyll-L-valyll-aza-α'-homo-L-tyrosyll-L-valyll-L-histidyll-L-prolyll-L-phenylalanin-methylester*. 345 mg geschütztes Harnstoffderivat V wurden in 10 ml Methanol, 2 ml Wasser und 0,3 ml Eisessig suspendiert und nach Zugabe von 200 mg Palladiumkohle (10% Pd) in der Schüttelente bis zum Aufhören der Wasserstoffabsorption (Dauer 20 Std.) bei Atmosphärendruck hydriert. Eine Probe der Lösung zeigte zuletzt die vollständige Abwesenheit der UV.-Absorption der Nitrogruppe bei 270 mμ, ε = 16000. Der Katalysator wurde abfiltriert, das Filtrat nach Zugabe von 10 ml H₂O auf ca. 3 ml eingengt und dann lyophilisiert und bei 0,05 Torr/45° nachgetrocknet. Man erhielt 342 mg Acetat des Methylesters VI, das wiederum das Dipeptid (H·Asp(NH₂)-Arg-OH) als hauptsächliches Nebenprodukt enthielt und direkt zur Verseifung verwendet wurde. DA: Rf = 0,55 (45); 0,75 (104). PC: Rf = 0,58 (45). [Oktapeptid: DA: Rf = 0,53 (45); 0,75 (104). PC: Rf = 0,58 (45).]

VII: *H·Asp(NH₂)-Arg-Val-NH-CH(CH₂C₆H₄OH)-NH-CO-Val-His-Pro-Phe·OH*, *α-L-Asp(NH₂)¹-aza-α'-homo-Tyr^A-Val⁵-Hypertensin II*. 340 mg roher Methylester VI wurden in 3 ml H₂O gelöst und nach Zugabe von 7 ml 0,4 N Ba(OH)₂ 10 Min. bei 25° stehengelassen (pH = 12,5). Die klare Lösung wurde sodann mit 1,44 ml 2,05 N H₂SO₄ neutralisiert (pH = 3,5), das BaSO₄ auf einer feinporigen Glasfritte abfiltriert und das Filtrat zur Entfernung der überschüssigen H₂SO₄ durch eine Säule (ϕ = 7 mm, l = 160 mm) von schwach basischem Ionenaustauscher (MERCK Nr. II) in der Acetatform filtriert. Das Eluat wurde bei 14 Torr/40° vorkonzentriert, lyophilisiert und bei 0,05 Torr/45° nachgetrocknet. Man erhielt 304 mg Rohprodukt, das zur Reinigung im System *n*-Butanol–0,3 M Ammoniumacetat (1:1) über 240 Stufen mit Phasenolumina von je 3 ml verteilt wurde. Durch Einengen der in Fraktionen von je 5 Verteilungselementen vereinigten Lösungen auf ein kleines Volumen, Lyophilisieren und Nachtrocknen bei 0,05 Torr/45° erhielt man aus Nr. 64–93 (Maximum bei 76; K = 0,465⁸) insgesamt 230 mg chromatographisch und elektrophoretisch reines Harnstoffderivat VII als weisses, amorphes Pulver von unscharfem Zersetzungspunkt bei ca. 200°. PC: Rf = 0,43 (45); 0,62 (54); 0,74 (56). DA: Rf = 0,43 (45); 0,58 (104). EP: –14,7 cm (pH 2,4, 16 Std., 2 V/cm); –11,6 cm (pH 5,0, 20 Std., 3,75 V/cm); –0,5 cm (pH 9,1, 24 Std., 3,75 V/cm). [Oktapeptid, α-L-Asp(NH₂)¹-Val⁵-Hypertensin II: PC: Rf = 0,39 (45); 0,60 (54); 0,71 (56). DA: Rf = 0,41 (45); 0,58 (104). EP: –15,3 cm (pH 2,4, 16 Std., 2 V/cm); –11,8 cm (pH 5,0, 20 Std., 3,75 V/cm); –0,4 cm (pH 9,1, 24 Std., 3,75 V/cm).]

Aminosäureanalyse⁹ des Totalhydrolysates, 20 Std. bei 115° in 6 N HCl: Asp 1,19; Arg 1,13; Val 2,00 (Bezugspunkt); Tyr 0,00; His 1,15; Pro 0,95; Phe 1,05; NH₃ 3,80.

VIII: *Z·Asp·OBzl*—*Arg(NO₂)·OH*, *Carbobenzyloxy-(α-benzyl)-β-L-aspartyll-nitro-L-arginin*. 7,14 g Z·Asp·OBzl¹⁰ und 3,08 ml Triäthylamin wurden in 60 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und bei –10° 2,63 ml Chlorameisensäure-isobutylester dazugetropt. Nach 15 Min. bei –10° wurde auf –30° abgekühlt und dann rasch eine auf 0° vorgekühlte Lösung von 6,57 g H·Arg(NO₂)·OH und 4,2 ml Triäthylamin in 66 ml H₂O zugegeben. Es entstand bald eine klare, homogene Lösung (pH ca. 7,5), die noch während 30 Min. bei 0° und 1 Std. bei 22° gerührt wurde. Zuletzt wurde mit 1 N HCl auf pH 6 gestellt, bei 14 Torr auf das halbe Volumen eingengt und nach Ansäuern mit 6 N HCl mit Essigester extrahiert. Durch Extraktion der Essigesterphase mit NaHCO₃-Lösung, Ansäuern der wässrigen Phase und erneute Extraktion mit Essigester wurde das Dipeptid abge-

⁸) Der *K*-Wert für das entsprechende Oktapeptid α-L-Asp(NH₂)¹-Val⁵-Hypertensin II beträgt in diesem Lösungsmittelsystem 0,33 [8]; Trennfaktor β = 0,465/0,33 = 1,41.

⁹) In freundlicher Weise von Herrn Dr. H. ZUBER ausgeführt nach der Methode von SPACKMANN, STEIN & MOORE [14] im Automaten der Firma BENDER & HOBEIN, München.

¹⁰) s. Fussnote ⁹) in der voranstehenden Arbeit [8].

trennt. Man erhielt so nach dem Eindampfen des Lösungsmittels 10,5 g amorphes Rohprodukt, das aus Aceton-Benzol in Nadelchen kristallisiert werden konnte. Zur Analyse wurde es nochmals aus heissem Acetonitril umkristallisiert (8,32 g, Smp. 100–106°) und 16 Std. bei 0,05 Torr/60° getrocknet. $[\alpha]_D = -7^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,9$ in Methanol). DS: Rf = 0,34 (43); 0,59 (52); 0,58 (100).

| | | | | |
|----------------------|---------------|---------|----------|-----------|
| $C_{25}H_{30}O_8N_6$ | Ber. C 53,76 | H 5,41 | O 25,78 | N 15,05% |
| (858,54) | Gef. ,, 53,16 | ,, 5,53 | ,, 25,84 | ,, 15,22% |

IX: $Z\text{-Asp}^1\text{-O}^2\text{Bz}^3\text{L}^4\text{-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Val-NH-CH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})\text{-NH-CO-Val-His-Pro-Phe-OMe}$, Carbobenzyl-oxy-(α -benzyl)- β -L-aspartyl-nitro-L-arginyl-L-valyl-aza- α' -homo-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester. 614 mg Dipeptid VIII und 550 mg «Harnstoff-hexapeptidester» IV wurden in 3,5 ml abs. Dimethylformamid gelöst und nach Zugabe von 215 mg Dicyclohexylcarbodiimid während 16 Std. bei 0° und 1 Tag bei 21° stehengelassen. Der auskristallisierte Dicyclohexylharnstoff wurde bei 0° abfiltriert, das Filtrat auf ca. 2 ml eingengt und daraus das Reaktionsprodukt durch Zugabe von 20 ml Essigester und 50 ml Petroläther ausgefällt. Man erhielt 1030 mg Rohprodukt, das laut DS noch grössere Mengen unreactiertes Dipeptid und 2 weitere Verunreinigungen enthielt. Es wurde zur Reinigung im System Methanol-0,1M Ammoniumacetat-Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff (4:2:3:3) über 200 Stufen mit Phasenvolumina von je 10 ml multiplikativ verteilt. Aus den Verteilungselementen Nr. 53–72 (Maximum bei 60; $K = 0,43$) erhielt man insgesamt 235 mg chromatographisch einheitliches Harnstoff-Derivat IX als amorphes Pulver vom Zersetzungspunkt ca. 170°. DS: Rf = 0,41 (43A); 0,57 (52). [Oktapeptid: Rf = 0,49 (43A); 0,53 (52).]

X: $H\text{-Asp}^1\text{-OH}^2\text{-Arg-Val-NH-CH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})\text{-NH-CO-Val-His-Pro-Phe-OMe}$, β -L-Aspartyl-L-arginyl-L-valyl-aza- α' -homo-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester. 234 mg geschütztes Harnstoffderivat IX wurden in 7 ml Methanol und 3 ml 2N Essigsäure gelöst und nach Zugabe von 100 mg Palladiumkohle (10% Pd) unter starkem Rühren hydriert. Nach 16 Std. war die UV.-Absorption der Nitrogruppe vollständig verschwunden, und die vom Katalysator abfiltrierte Hydrierlösung wurde nach Zugabe von 5 ml H₂O auf ca. 2 ml eingengt, lyophilisiert und im Hochvakuum bei 45° nachgetrocknet. Man erhielt dabei 236 mg Acetat des Methylesters X, das sich chromatographisch als nahezu einheitlich erwies. DA: Rf = 0,40 (45); 0,17 (104). PC: Rf = 0,55 (45). [Oktapeptid: DA: Rf = 0,38 (45); 0,16 (104). PC: Rf = 0,55 (45).]

XI: $H\text{-Asp}^1\text{-OH}^2\text{-Arg-Val-NH-CH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})\text{-NH-CO-Val-His-Pro-Phe-OH}$, β -L-Asp¹-aza- α' -homo-Tyr⁴-Val⁵-Hypertensin II. 235 mg Methylester X wurden mit 5,25 ml 0,365N Ba(OH)₂ verseift; für Details vgl. Verseifung des α -L-Asp(NH₂)¹-Analogen VI. Das Rohprodukt (194 mg) wurde im System *n*-Butanol-Methanol-0,1M Ammoniumacetat-0,6M Essigsäure (4:1:2:2) mit Phasenvolumina von je 3 ml über 260 Stufen verteilt. Aus den Röhrchen Nr. 78–102 (Maximum bei 91; $K = 0,54$) isolierte man durch Einengen zur Trockne und Wegsublimieren des Ammoniumacetates bei 0,02 Torr/45° insgesamt 149 mg chromatographisch und elektrophoretisch reines Harnstoffderivat XI als amorphes Pulver, Zers. ca. 210–220°. PC: Rf = 0,32 (45); 0,65 (54); 0,67 (56). DA: Rf = 0,30 (45); 0,11 (104). EP: -11,2 cm (pH 2,4, 16 Std., 2 V/cm); -9,5 cm (pH 5,0, 20 Std., 3,75 V/cm); +3,9 cm (pH 9,1, 24 Std., 3,75 V/cm). [Oktapeptid, β -L-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II: PC: Rf = 0,29 (45); 0,62 (54); 0,63 (56). DA: Rf = 0,22 (45); 0,11 (104). EP: -11,6 cm (pH 2,4, 16 Std., 2 V/cm); -9,5 cm (pH 5,0, 20 Std., 3,75 V/cm); +4,1 cm (pH 9,1, 24 Std., 3,75 V/cm).] Aminosäureanalyse⁹⁾ des Totalhydrolysates, 20 Std. bei 115° in 6N HCl: Asp 1,16; Arg 1,15; Val 2,00 (Bezugspunkt); Tyr 0,00; His 1,14; Pro 0,92; Phe 1,03; NH₃ 2,91.

Stabilität der Harnstoffderivate gegen Säuren und Basen. - a) Vom «Harnstoff-Hexapeptidester» IV wurden 2 Proben von je 1 mg in 0,05 ml 0,5N NaOH gelöst und während 10 Min. bzw. 2 Std. bei 25° stehengelassen. Zuletzt wurde durch Zugabe von 0,05 ml 0,5N HCl neutralisiert und von diesen Lösungen je 0,02 ml direkt chromatographiert (PC, Systeme 45, 54 und 56). Mit Ausnahme der vollständigen Verseifung der Methylestergruppe bei beiden Reaktionszeiten waren keine Veränderungen gegenüber den unbehandelten Proben feststellbar.

b) Je 1 mg der «Harnstoff-Oktapeptide» VII und XI sowie der beiden entsprechenden Oktapeptide α -L-Asp(NH₂)¹-Val⁵-Hypertensin II und β -L-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II wurden mit je 0,05 ml 0,2N HCl in Glasröhrchen eingeschmolzen und während verschiedenen Zeiten auf 50° er-

wärmt. Nach Neutralisation mit 0,05 ml 0,2 N NaOH wurden Proben von je 0,02 ml dieser Lösungen chromatographiert (PC, Systeme 45 und 54) und in der Elektrophorese (pH 5, 16 Std., 3 V/cm) mit synthetischen Di-, Tri- und Tetrapeptiden von bekannter Ladung verglichen. Nach 5 Std. bei 50° waren die beiden «Harnstoff-Oktapeptide» zu ca. 70%, nach 25 Std. quantitativ gespalten. Die entsprechenden Oktapeptide α -L-Asp(NH₂)¹- und β -L-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II hatten, ausser einer geringfügigen Hydrolyse der Asp¹- β -amidgruppe beim ersteren, unter diesen Bedingungen keine Veränderung erlitten.

Bei den Spaltprodukten der Harnstoffderivate dürfte es sich anhand der Farbreaktionen sowie des chromatographischen und vor allem elektrophoretischen Verhaltens um die Tripeptidamide H·Asp(NH₂)-Arg-Val-NH₂ bzw. H·Asp·OH—Arg-Val-NH₂ und das Carbamoyl-tetrapeptid NH₂-CO-Val-His-Pro-Phe-OH handeln.

Enzymatische Spaltungen. – *Trypsin.* a) Enzym: Substrat = 1:50. Je 1 mg der beiden «Harnstoff-Oktapeptide» VII und XI wurden in 0,1 ml 0,1 M Trispuffer (pH = 8) gelöst und nach Zugabe von 0,01 ml einer 0,2-proz. Trypsinlösung und eines Tröpfchens Toluol während 5 Std. und 10 Std. bei 38° inkubiert. Zuletzt wurde das Enzym durch Zugabe von 0,02 ml 2 N Essigsäure und Erhitzen während 5 Min. auf 100° inaktiviert und von diesen Lösungen je 0,02 ml zur Chromatographie (PC, Systeme 45 und 54) aufgetropft. Das Harnstoffderivat VII war schon nach 5 Std. vollständig in Dipeptid und «Harnstoff-Hexapeptid» gespalten, währenddem von der Verbindung XI bei beiden Inkubationszeiten 6 ± 1% ungespalten zurückblieben.

b) Vergleich der Spaltgeschwindigkeit der Harnstoffderivate mit den entsprechenden Peptiden; Enzym: Substrat = 1:1000. Ausführung der Inkubation und Auswertung siehe Angaben in [8]. Es wurden folgende Inkubationszeiten für 20% Spaltung in Dipeptid 1–2 und Hexapeptid 3–8, bzw. dessen Harnstoffderivat, gefunden:

| | |
|---|-----------|
| α -L-Asp(NH ₂) ¹ -aza- α' -homo-Tyr ⁴ -Val ⁵ -Hypertensin II | : 50 Min. |
| α -L-Asp(NH ₂) ¹ -Val ⁵ -Hypertensin II | : 17 Min. |
| β -L-Asp ¹ -aza- α' -homo-Tyr ⁴ -Val ⁵ -Hypertensin II | : 20 Min. |
| β -L-Asp ¹ -Val ⁵ -Hypertensin II | : 5 Min. |

Chymotrypsin. Die 4 obenstehenden Verbindungen wurden bei einem Verhältnis Enzym: Substrat = 1:50 während 30 Min. und 5 Std. inkubiert (Ausführung wie bei Trypsin). Währenddem die Oktapeptide schon nach 30 Min. vollständig zu den beiden Tetrapeptiden 1–4 und 5–8 gespalten waren, blieben die «Harnstoff-Oktapeptide», auch nach 5 Std., unangegriffen.

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

SUMMARY

The use of the CURTIUS azide method for the synthesis of peptides is known to produce urea derivatives as side-products due to partial rearrangement of the azide to an isocyanate. As model compounds for this type of reaction the two urea analogues of Val⁵-hypertensin II mentioned in the title have been synthesised.

The identification and separation of such urea derivatives is rendered difficult by the fact that these compounds closely resemble the corresponding normal peptides in physico-chemical behaviour (chromatography, electrophoresis, solubility).

In the blood pressure test in nephrectomised rats the two urea analogues VII and XI display approximately 25% of the activity of the corresponding octapeptides, α -L-Asp(NH₂)¹-Val⁵-hypertensin II and β -L-Asp¹-Val⁵-hypertensin II, respectively [8].

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel
Pharmazeutische Abteilung

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Zusammenfassung der in der Literatur erwähnten Nebenprodukte der Azidkondensation: E. SCHNABEL, *Liebigs Ann. Chem.* **659**, 168 (1962).
- [2] Überblick über die CURTIUS-Umlagerung: P. A. S. SMITH in *Organic Reactions* Bd. *III*, 337, John Wiley & Sons, New York 1946.
- [3] J. W. HINMAN, E. L. CARON & H. N. CHRISTENSEN, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 1620 (1950); M. A. NYMAN & R. M. HERBST, *J. org. Chemistry* **15**, 108 (1950); G. L. TRITSCH & D. W. WOOLLEY, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 2787 (1960).
- [4] K. C. HOOPER, H. N. RYDON, J. A. SCHOFIELD & G. S. HEATON, *J. chem. Soc.* **1956**, 3148; K. HOFMANN, T. A. THOMPSON, H. YAJIMA, E. T. SCHWARTZ & H. INOUE, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 3715 (1960).
- [5] R. SCHWYZER, *Helv.* **44**, 667 (1961).
- [6] R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* **41**, 1287 (1958).
- [7] B. RINIKER & R. SCHWYZER, *Helv.* **44**, 658 (1961).
- [8] B. RINIKER & R. SCHWYZER, *Helv.* **47**, 2357 (1964).
- [9] R. SCHWYZER & H. KAPPELER, *Helv.* **44**, 1991 (1961).
- [10] J. KENYON & D. P. YOUNG, *J. chem. Soc.* **1947**, 263.
- [11] H. J. HESS, W. T. MORELAND & G. D. LAUBACH, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 4040 (1963).
- [12] H. SCHWARZ, F. M. BUMPUS & I. H. PAGE, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 5697 (1957).
- [13] W. RITTEL, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER & R. SCHWYZER, *Helv.* **40**, 614 (1957).
- [14] D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN & S. MOORE, *Analyt. Chemistry* **30**, 1190 (1958).

260. Die Anwendung von Aktivitätsgradienten in der Dünnschichtchromatographie¹⁾

von C. G. Honegger

(15. X. 64)

Die Anwendung der Gradiententechnik, für verschiedene Trennverfahren sehr nützlich, hat sich in der Dünnschichtchromatographie relativ spät eingebürgert. Einen Konzentrations-Gradienten der mobilen Phase gebrauchte erstmals RYBICKA [1]²⁾ im Jahre 1962 zur Auftrennung von Glyceriden. Die von NIEDERWIESER & BRENNER [2] durch chromatographische Fliessmittelentmischung erreichte polyzonale Dünnschichtchromatographie kann ebenfalls als Gradiententechnik betrachtet werden. Neue Möglichkeiten wurden durch die Einführung von Gradienten innerhalb des Adsorbens eröffnet. BERGER *et al.* [3] verwendeten erstmals *zwei* Adsorbentien auf derselben Platte zur Dünnschichtchromatographie. Erst durch die Entwicklung eines neuen (GM = Gradienten-Misch-) Streichgerätes³⁾ durch STAHL [4] ergibt sich eine fast universelle Anwendung von Adsorbensgradienten (Mischung verschiedener Adsorbentien-, pH- und Imprägnationsgradienten). Eigene Versuche, die Dünnschichtchromatographie zu einer histochemischen Methode zu verwenden [5], machten die Einführung eines Gradienten wünschbar, um damit den Trennungsbereich zu erweitern. Wir unter-

1) Auszugsweise vorgetragen am UNILEVER Research Symposium, «Recent Advances in the Chromatography of Lipids», Cambridge, October 1964.

2) Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 2387.

3) Das GM-Streichgerät wird durch die Firma DESAGA, Heidelberg, in den Handel gebracht.