

152. Synthese von All-D-Val⁵-Angiotensin II-Asp¹-β-Amid¹⁾

von K. Vogler, R. O. Studer, W. Lergier und P. Lanz

(25. VI. 65)

Antipoden von natürlich vorkommenden Polypeptid-Wirkstoffen sind bis vor ganz kurzer Zeit²⁾ nicht synthetisiert und biologisch geprüft worden. Der Grund dafür mag wohl darin liegen, dass einzelne D-Aminosäuren, wie z. B. D-Prolin, nicht in beliebigen Mengen zugänglich sind.

In der Reihe der Polyaminosäuren hingegen sind All-D-Polymerisate seit langem bekannt [3], und es scheint auch gelungen zu sein [4], von Polyglutaminsäure-γ-methylester ein Antipodenpaar (Durchschnittspolymerisationsgrad 2900) herzustellen, das sich auch in Lösung als «echtes» Racemat verhält. Untersuchungen über das Verhalten von Racematen an Polypeptid-Hormonen sind nun prinzipiell möglich geworden, und wir haben im Sinn, auf diese physikalisch-chemischen Gesichtspunkte zurückzukommen.

Seit einiger Zeit haben wir uns mit der Frage beschäftigt, ob Polypeptid-Wirkstoffe prinzipiell durch ihre Antipoden gehemmt werden können. Eine solche Hemmung könnte man sich vorstellen durch eine Konkurrenzreaktion am Rezeptor einerseits, oder durch eine Inaktivierung des Wirkstoffes durch Racematbildung in Lösung.

Das attraktivste Objekt zur Prüfung dieser Problemstellung schien uns All-D-Angiotensin, weil ein Angiotensinhemmer wohl interessante praktische Aspekte haben dürfte.

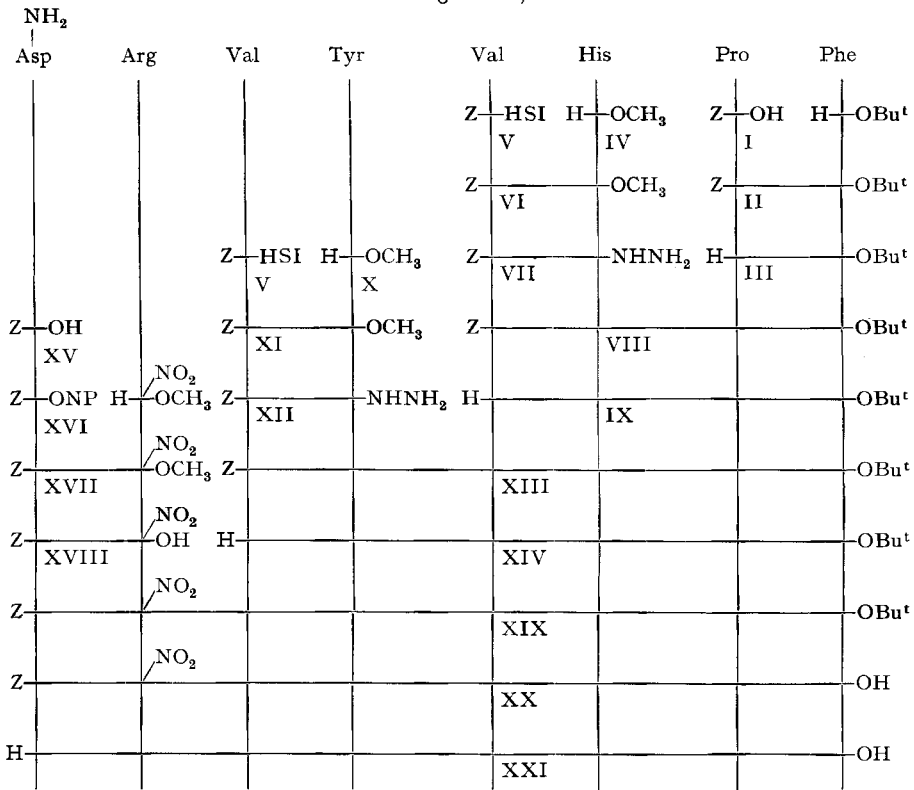
Durch die Beobachtung von HANO *et al.* [5], dass ein Pentapeptid-Bruchstück des α-Melanophoren-stimulierenden Hormons (D-His → D-Phe → D-Arg → D-Try → Gly) imstande sein soll, das Naturprodukt sowie das All-L-Pentapeptid zu hemmen, sind unsere Versuche aktiviert worden.

Als Angiotensin-Antipoden wählten wir All-D-Val⁵-Angiotensin II-Asp¹-β-Amid für unsere chemischen und biologischen Versuche, weil die entsprechende All-L-Vergleichssubstanz [6] als Hypertensin CIBA[®] zur Verfügung stand. Diese letztere wurde zuerst von SCHWYZER *et al.* [7] ausgehend vom Aminoende über die Zwischenstufen Di-, Tetra- und Hexapeptid aufgebaut. Die Verwendung der *t*-Butylester am C-Ende war dann noch eine, wenn auch bereits publizierte [8] und von uns benutzte Verbesserung. Die einzelnen Verfahrensschritte sind dem Aufbauschema (Schema 1) zu entnehmen, das zur Erläuterung des experimentellen Teiles dient. In Anbetracht der vielen, bereits beschriebenen [6–10] Aufbauschemata kann auf eine ausführliche Beschreibung der Synthese verzichtet werden.

¹⁾ Die Abkürzungen für die Nomenklatur folgen den Vorschlägen des V. Europ. Peptidsymposiums, Pergamon Press, Oxford 1963; Z = Benzyloxycarbonyl, ONP = *p*-Nitrophenylester, HSI = Hydroxysuccinimidester, OBut^t = *t*-Butylester, DMF = Dimethylformamid.

²⁾ Wir hatten uns die Aufgabe gestellt, diese Lücke vorerst in der Bradykinin-Reihe [1] zu schliessen, doch haben STEWART & WOOLLEY [2] inzwischen eine Synthese von All-D-Bradykinin publiziert. In einer späteren Mitteilung soll im weiteren Rahmen darauf näher eingegangen werden.

Schema 1. *Aufbauschema von All-D-Val⁵-Angiotensin II-Asp¹-β-amid* (alle Aminosäuren in der D-Konfiguration)



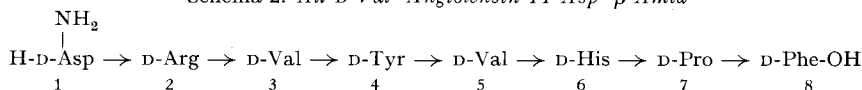
Von den schwerer zugänglichen D-Aminosäuren sei erwähnt, dass D-Arginin aus D-Glutaminsäure nach ZAORAL & RUDINGER [11] hergestellt wurde, während D-Prolin [12] aus dem racemischen Amid mittels Schweinenieren-Amidase zugänglich ist.

Das rohe Synthese-Endprodukt wurde vorerst einer multiplikativen Verteilung im System *n*-Butanol/0,4M Ammoniumacetat-Lösung [7] unterworfen, lyophilisiert, ins Trihydrochlorid überführt, wieder lyophilisiert und als Hydrat analysiert. Elektrophoretisch und dünnschichtchromatographisch verhielt sich das Endprodukt in mehreren Lösungsmitteln als einheitliche Substanz (Schema 2). $[\alpha]_D^{25} = +61,7^\circ$ ($c = 0,946$, in Wasser).

Besondere Sorgfalt wurde auf die Analyse der sterischen Einheitlichkeit im Hinblick auf die biologischen Teste gelegt. Dabei kamen natürlich die Erfahrungen, die beim All-L-Angiotensin [13] gemacht wurden, sehr zustatten. Mittels D- bzw. L-Aminosäureoxydase konnte die sterische Einheitlichkeit des Hexapeptid-Zwischenproduktes XIII nach Totalhydrolyse sichergestellt werden. Einwirkung von Trypsin auf das Endprodukt ergab eine geringe Spaltung (ca. $\leq 2\%$) von D-Arg² \rightarrow D-Val³ (Carbodiimid), was auf die Möglichkeit einer geringen Racemisierung am Arginylrest hindeutet. Einwirkung von Pepsin ergab keinen Angriff auf D-Val³ \rightarrow D-Tyr⁴. Chymotrypsin war nicht imstande, D-Tyr⁴ \rightarrow D-Val⁵ anzugreifen, und Carboxypepti-

dase setzte kein endständiges Phe frei. Die experimentelle Prüfung der letzten drei enzymatischen Abbaureaktionen relativ zu Hypertensin CIBA® konnte mit einer Empfindlichkeit von ca. 1%, bezogen auf das eingesetzte Substrat, sichergestellt werden. Die Anwesenheit des All-L-Antipoden kann praktisch ausgeschlossen werden, während kleinere Mengen $\leq 2\%$ von Diastereomeren vorhanden sein können.

Schema 2. All-D-Val^b-Angiotensin II-Asp¹- β -Amid



Die biologische Prüfung *in vitro* (Meerschweinchen-Ileum) und *in vivo* (Spinalkatze) zeigte bis zu einer Konzentration von 10^{-3} resp. einer Dosis von 3 mg/kg keine Angiotensinwirkung³⁾. Ebenfalls wurde kein antagonistischer Effekt gegen das Naturprodukt beobachtet.

Wie im Falle von All-D-Bradykinin [1], [2] erwies sich somit auch All-D-Angiotensin nicht als Antagonist der All-L-Wirksubstanz.

Experimenteller Teil⁴⁾

1. Z-D-Prolin (I). wird durch Carbobenzoxylierung von D-Prolin nach der für das L-Isomere [14] beschriebenen Vorschrift hergestellt. Smp. 76–77°; $[\alpha]_D^{25} = +61,2^\circ$ ($c = 5,3$, Eisessig).

$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{N}$ (249,3) Ber. C 62,64 H 6,07 N 5,64% Gef. C 62,94 H 5,94 N 5,60%

2. Z-D-Prolyl-D-phenylalanin-t-butylester (II). 5 g (0,02 Mol) Z-D-Prolin werden in 20 ml Tetrahydrofuran und 2,76 ml (0,02 Mol) Triäthylamin gelöst, auf -10° gekühlt, mit 1,92 ml (0,02 Mol) Chlorameisensäure-äthylester versetzt und 10 Min. bei -10° gerührt. 5 g (0,02 Mol) D-Phenylalanin-t-butylester-hydrochlorid [15] werden in 20 ml Tetrahydrofuran suspendiert, mit 2,76 ml (0,02 Mol) Triäthylamin versetzt und 10 Min. bei Raumtemperatur gerührt. Darauf wird abgenutscht und das Filtrat mit dem gemischten Anhydrid vereinigt. Die Lösung wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach ca. 15 Std. wird abfiltriert, das Filtrat zur Trockne verdampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen und nacheinander mit eiskalter 5-proz. Zitronensäure, 5-proz. NaHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird der Essigester verdampft und der Rückstand aus Hexan kristallisiert. Ausbeute 7,5 g (83%). Smp. 69°; $[\alpha]_D^{25} = +34,4^\circ$ ($c = 1$, Chloroform). (L-Form vgl. [8]).

$\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_5\text{N}_2$ (452,2) Ber. C 69,00 H 7,13 N 6,19% Gef. C 69,18 H 7,42 N 6,27%

3. D-Prolyl-D-phenylalanin-t-butylester (III). 42 g (0,093 Mol) Z-D-Prolyl-D-phenylalanin-t-butylester (II) werden in 500 ml Methanol gelöst und über Pd-Kohle hydriert. Nach beendeter Hydrierung wird vom Katalysator abgenutscht und zur Trockne verdampft. Der ölige Rückstand wird aus Methanol/Äther umkristallisiert. Ausbeute 26,5 g (90%). Smp. 61°; $[\alpha]_D^{24} = +25,4^\circ$ ($c = 1$, Methanol). (L-Form vgl. [8]).

$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{N}_2$ (318,4) Ber. N 8,80% Gef. N 8,97%

4. D-Histidin-methylester-dihydrochlorid (IV). 15,5 g (0,1 Mol) D-Histidin-monohydrochlorid werden 3mal mit je 200 ml 2N HCl/Methanol während 1 Std. unter Rückfluss erhitzt und jeweils zur Trockne verdampft. Der anfallende Kristallbrei wird aus Methanol/Äther umkristallisiert. Ausbeute 20,4 g (85%). Smp. 206–208°; $[\alpha]_D^{25} = -14,3^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

$\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N}_3\text{Cl}_2$ (241,1) Ber. C 34,72 H 5,41 N 17,36% Gef. C 34,90 H 5,51 N 17,06%

5. Z-D-Valin-N-hydroxysuccinimidester (V) wurde analog hergestellt wie die entsprechende L-Verbindung [16]. Smp. 113–115°; $[\alpha]_D^{25} = +27,0^\circ$ ($c = 1$, Dioxan).

$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{N}_2$ (348,3) Ber. C 58,61 H 5,79 N 8,04% Gef. C 58,69 H 5,80 N 8,09%

³⁾ Die biologische Prüfung verdanken wir Herrn Dr. med. W. HAEFELY von unserer Medizinischen Forschungsabteilung.

⁴⁾ Die Smp. wurden auf einem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert.

6. *Z-D-Valyl-D-histidin-methylester* (VI). 3,48 g (0,01 Mol) *Z-D-Valin-N-hydroxysuccinimid-ester* (V) werden zusammen mit 1,7 g (0,01 Mol) freiem *D-Histidin-methylester* (hergestellt aus dem Dihydrochlorid IV nach [17]) in 20 ml DMF gelöst und 3 Std. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Darauf wird mit Eiswasser gefällt abgenutscht und aus Methanol/Wasser umgefällt. Ausbeute 3,5 g (83%). Smp. 164–165°; $[\alpha]_D^{23} = +22,1 \pm 2^\circ$ ($c = 2$, Äthanol). (L-Form vgl. [18].)
 $C_{20}H_{26}O_5N_4$ (402,4) Ber. C 59,69 H 6,51 N 13,92% Gef. C 59,74 H 6,57 N 13,70%

7. *Z-D-Valyl-D-histidin-hydrazid* (VII). 4 g (0,01 Mol) *Z-D-Valyl-D-histidin-methylester* (VI) werden in 20 ml Methanol gelöst, mit 1 ml Hydrazinhydrat versetzt und 1 Std. unter Rückfluss erhitzt. Darauf wird zur Trockne verdampft und der Rückstand aus Äthanol umkristallisiert. Ausbeute 3,6 g (90%). Smp. 199°, $[\alpha]_D^{23} = +13,0^\circ$ ($c = 1$, DMF). (L-Form vgl. [18].)
 $C_{19}H_{26}O_4N_6$ (402,4) Ber. C 56,70 H 6,51 N 20,88% Gef. C 56,56 H 6,75 N 21,21%

8. *Z-D-Valyl-D-histidyl-D-prolyl-D-phenylalanyl-t-butylester* (VIII). 5,2 g (0,013 Mol) *Z-D-Valyl-D-histidin-hydrazid* (VII) werden in 39 ml (0,39 Mol) 1N HCl eiskalt gelöst, mit 910 mg (0,013 Mol) $NaNO_2$ in 5 ml Wasser versetzt und darauf mit 100 ml eiskaltem Essigester überschichtet. Die Mischung wird 5 Min. bei 0° gerührt, darauf mit gesättigter Sodalösung gegen Phenolphthalein alkalisch gestellt und das Azid mit Essigester ausgezogen. Die Essigesterlösung wird mit Eiswasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und zu einer eiskalten Lösung von 4,5 g (0,014 Mol) *D-Prolyl-D-phenylalanin-t-butylester* (III) in 20 ml DMF filtriert. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht im Eiskasten aufbewahrt, von wenig Niederschlag abfiltriert, das Filtrat mit 5-proz. Sodalösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird aus Essigester/Äther/Petroläther gefällt. Ausbeute 7,7 g (85%). Smp. 102–105°; $[\alpha]_D^{24} = +52,4^\circ$ ($c = 2$, Äthanol). (L-Form vgl. [8].)
 $C_{37}H_{48}O_7N_6$ (688,8) Ber. C 64,51 H 7,02 N 12,20% Gef. C 64,61 H 7,19 N 12,27%

9. *D-Valyl-D-histidyl-D-prolyl-D-phenylalanin-t-butylester* (IX). 9 g (0,013 Mol) Tetrapeptid VIII werden in 100 ml Methanol gelöst und über Pd-Kohle hydriert. Nach beendeter Hydrierung wird zur Trockne verdampft und der Rückstand aus Essigester/Petroläther gefällt. Ausbeute 6,8 g (92%). Smp. 92–96° (Sintern ab 86°); $[\alpha]_D^{23} = +46,5 \pm 2^\circ$ ($c = 1$, Äthanol). (L-Form vgl. [8].)
 $C_{29}H_{42}O_5N_6$ (554,7) Ber. C 62,79 H 7,63% Gef. C 62,99 H 8,01%

10. *D-Tyrosin-methylester-hydrochlorid* (X). *D-Tyrosin* wird mit methanolischer Salzsäure wie das entsprechende *L-Tyrosin* [19] [20] verestert. Ausbeute 88%. Smp. 190–192°; $[\alpha]_D^{23} = -78^\circ$ ($c = 1$, Pyridin).
 $C_{10}H_{14}O_3NCl$ (231,67) Ber. C 51,85 H 6,09 N 6,04% Gef. C 51,79 H 6,16 N 6,07%

11. *Z-D-Valyl-D-tyrosin-methylester* (XI). 3,48 g (0,01 Mol) *Z-D-Valin-N-hydroxysuccinimid-ester* (V) und 2,3 g (0,01 Mol) *D-Tyrosin-methylester-hydrochlorid* (X) werden in 20 ml DMF gelöst, auf 0° gekühlt und mit 1,4 ml (0,01 Mol) Triäthylamin versetzt. Nach 3stdg. Stehen bei Raumtemperatur wird mit Eiswasser verdünnt und mit Äther extrahiert. Die ätherische Lösung wird mit 2N HCl, 5-proz. $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und anschliessend zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird aus Methanol/Essigester/Petroläther umkristallisiert. Ausbeute 3,1 g (73%). Smp. 153°; $[\alpha]_D^{23} = -12,5 \pm 2^\circ$ ($c = 5$, Pyridin). (L-Form vgl. [19].)
 $C_{23}H_{28}O_6N_2$ (428,5) Ber. C 64,47 H 6,58 N 6,54% Gef. C 64,77 H 6,68 N 6,58%

12. *Z-D-Valyl-D-tyrosin-hydrazid* (XII). 4,3 g (0,01 Mol) *Z-D-Valyl-D-tyrosin-methylester* (XI) werden in 20 ml Methanol gelöst und mit 1 ml Hydrazinhydrat versetzt. Die Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Darauf wird mit Eiswasser gefällt, abgenutscht und aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Ausbeute 3,8 g (80%). Smp. 240°; $[\alpha]_D^{24} = +13,7 \pm 2^\circ$ ($c = 3$, DMF). (L-Form vgl. [19].)
 $C_{22}H_{28}O_5N_4$ (428,5) Ber. C 61,67 H 6,59 N 13,07% Gef. C 61,52 H 6,50 N 13,04%

13. *Z-D-Valyl-D-tyrosyl-D-valyl-D-histidyl-D-prolyl-D-phenylalanin-t-butylester* (XIII). 4,5 g (0,01 Mol) *Z-D-Valyl-D-tyrosin-hydrazid* (XII) werden in 30 ml Eisessig und 5 ml 6N HCl gelöst, auf 0° gekühlt und mit 0,69 g (0,01 Mol) $NaNO_2$ in 5 ml Wasser versetzt. Nach 10 Min. Rühren bei 0° wird auf Eiswasser gegossen und das Azid mit eiskaltem Essigester extrahiert. Die Essigester-Lösung wird mit eiskalter 5-proz. $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4

getrocknet und zu einer eiskalten Lösung von 5,5 g (0,01 Mol) D-Valyl-D-histidyl-D-prolyl-D-phenylalanin-*t*-butylester (IX) in 40 ml DMF gegeben. Die Lösung wird über Nacht im Eiskasten aufbewahrt, darauf mit Essigester verdünnt und mit eiskalter 5-proz. NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird 1mal aus Essigester/Petroläther und 1mal aus Äthanol/Wasser umgefällt. Ausbeute 6,9 g (73%). Smp. 164–165°; $[\alpha]_D^{23} = +35,2^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1$, DMF). (L-Form vgl. [8].)

C₅₁H₈₆O₁₀N₈ (951,1) Ber. C 64,40 H 6,99 N 11,78% Gef. C 64,28 H 7,16 N 11,90%

14. D-Valyl-D-tyrosyl-D-valyl-D-histidyl-D-prolyl-D-phenylalanin-*t*-butylester (XIV). 4,75 g (0,005 Mol) Hexapeptid XIII werden in 100 ml Methanol gelöst und über Pd-Kohle hydriert. Nach beendeter Hydrierung wird vom Katalysator abfiltriert und zur Trockne verdampft. Durch Umfällen aus Äthanol/Äther erhält man ein Produkt vom Smp. 149–154°; $[\alpha]_D^{23} = +35,8^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1$, DMF). (L-Form vgl. [8].)

C₄₃H₆₀O₈N₈ (816,9) Ber. C 63,21 H 7,40 N 13,73% Gef. C 62,91 H 7,28 N 13,62%

15. Z-D-Asparagin (XV) wird auf gleichem Wege synthetisiert wie die entsprechende L-Verbindung [20]. Smp. 165–167°; $[\alpha]_D^{23} = -8^\circ$ ($c = 1$, Eisessig).

C₁₂H₁₄O₅N₂ (266,25) Ber. C 54,12 H 5,30 N 10,52% Gef. C 54,22 H 5,43 N 10,62%

16. Z-D-Asparagin-*p*-nitrophenylester (XVI) wird nach der von BODANSZKY & DU VIGNEAUD [21] angegebenen Methode für die entsprechende L-Verbindung hergestellt. Smp. 164–166°; $[\alpha]_D^{23} = +30,5^\circ$ ($c = 2$, DMF).

C₁₈H₁₇O₇N₃ (387,3) Ber. C 55,81 H 4,42 N 10,80% Gef. C 55,52 H 4,44 N 10,87%

17. Z-D-Asparaginylnitro-D-arginin-methylester (XVII) wird aus Z-D-Asparagin-*p*-nitrophenylester (XVI) und Nitro-D-arginin-methylester [22] hergestellt. Smp. 178–179°; $[\alpha]_D^{23} = -6,5^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 2$, Eisessig). (L-Form vgl. [23] [8].)

C₁₉H₂₇O₈N₇ (481,4) Ber. C 47,40 H 5,62 N 20,37% Gef. C 47,21 H 5,71 N 20,29%

18. Z-D-Asparaginylnitro-D-arginin (XVIII) wird aus dem Dipeptidester XVII nach der Vorschrift zur Verseifung der entsprechenden L-Verbindung [23], [8] erhalten. Ausbeute 80%. Umkristallisation aus Acetonitril. Smp. 96–100°; $[\alpha]_D^{23} = -9^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1$, Eisessig).

C₁₈H₂₅O₈N₇ (467,4) Ber. C 46,25 H 5,39 N 20,98% Gef. C 46,18 H 5,60 N 20,62%

19. Z-D-Asparaginylnitro-D-arginyl-D-valyl-D-tyrosyl-D-valyl-D-histidyl-D-prolyl-D-phenylalanin-*t*-butylester (XIX). 4,1 g (0,0049 Mol) Hexapeptid XIV werden in 10 ml DMF gelöst und mit 1,5 g (0,0072) Mol Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach vollständiger Lösung wird in Eis gekühlt und mit einer eiskalten Lösung von 3,4 g (0,0073 Mol) Z-D-Asparaginylnitro-D-arginin (XVIII) in 10 ml DMF vereinigt. Die Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt, darauf vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abgenutscht und abgedampft. Der Rückstand wird mit Essigester verrieben und abgenutscht. Anschliessend wird 10 Min. mit 50 ml heissem Aceton unter Rückfluss erhitzt, noch warm abgenutscht, mit Aceton gewaschen und getrocknet. Dieser Prozess wird nochmals wiederholt. Zum Schluss wird aus DMF-Aceton gefällt. Ausbeute 3 g (48%). Smp. 206–208°; $[\alpha]_D^{23} = +31,4^\circ$ ($c = 1,3$, DMF). (L-Form vgl. [8].)

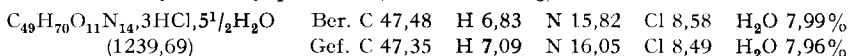
C₆₁H₈₃O₁₅N₁₅ (1266,4) Ber. C 57,85 H 6,60 N 16,59% Gef. C 57,91 H 6,74 N 16,43%

20. Z-D-Asparaginylnitro-D-arginyl-D-valyl-D-tyrosyl-D-valyl-D-histidyl-D-prolyl-D-phenylalanin (XX). 2 g geschützter Octapeptidester XIX werden unter Feuchtigkeitsausschluss mit 7 ml Trifluoressigsäure 20 Min. bei Raumtemperatur gerührt, wobei vollständige Lösung erfolgt. Dann wird in Eis gekühlt und mit eiskaltem Äther ausgefällt, abgenutscht, mit Äther gewaschen und getrocknet. Die Substanz wird aus DMF/Alkohol umgefällt. Ausbeute 1,8 g (92%). Smp. 216–218°; $[\alpha]_D^{23} = +20,8^\circ$ ($c = 1,8$, DMF).

C₅₇H₇₅O₁₅N₁₅ (1210,3) Ber. C 56,56 H 6,25 N 17,36% Gef. C 56,32 H 6,23 N 16,94%

21. D-Asparaginylnitro-D-arginyl-D-valyl-D-tyrosyl-D-valyl-D-histidyl-D-prolyl-D-phenylalanin (XXI). 2 g (0,00165 Mol) Octapeptid XX werden in 30 ml Eisessig, 7 ml Wasser und 0,5 ml konz. HCl gelöst und über Pd-Kohle hydriert. Nach vollständiger Hydrierung wird vom Katalysator abgenutscht und bei 30° im Vakuum zur Trockne verdampft.

22. *Reinigung und Charakterisierung des Endproduktes.* Das Rohprodukt wurde in Wasser gelöst, mit 1N NaOH auf pH 7,0 gestellt und lyophilisiert. Das neutralisierte Rohprodukt (2,7 g) wurde multiplikativ über 383 Stufen im System *n*-Butanol/0,4M Ammoniumacetatlösung 1:1 (v/v) [7] verteilt. Die Kontrolle der Verteilung erfolgte spektrophotometrisch mit FOLIN-DENIS-REAGENS [24] und durch Tüpfelreaktionen mit Echtblausalz (Diazo-Reagens [25]). Das Maximum der symmetrischen FOLIN-Kurve im Röhrchen 115 fiel mit der optimalen Färbung der Diazosalz-Probe zusammen. Die vereinigten Gläscheninhalte mit der Gipffraktion ($K = 0,43$) wurden im Hochvakuum bei Raumtemperatur eingedampft, 3mal aus Wasser lyophilisiert und von eventuell noch vorhandenem Ammoniumacetat im Hochvakuum bei 40° befreit. Es resultierten ca. 900 mg eines farblosen, stark hygroskopischen Pulvers. Dieses verhielt sich dünn-schicht- und papierchromatographisch sowie hochspannungselektrophoretisch unter verschiedenen Bedingungen vollkommen einheitlich (Anfärbung mit Ninhydrin-, Echtblausalz- und SAKAGUCHI-Reagens). Die Mikroanalyse stimmte jedoch nicht (weder nach Äquilibrierung mit Luftfeuchtigkeit noch nach scharfer Trocknung) auf das beim all-L-Isomeren beschriebene Monoacetat [7], sondern wies eher auf ein Di- bis Triacetat hin. Das Acetat wurde daher durch Gefriertrocknung mit drei Äquivalenten HCl in das Hydrochlorid übergeführt. Es resultierte ein «kristallwasserhaltiges» Trihydrochlorid. Analyse des Lyophilisates (ohne Trocknung):



$[\alpha]_D^{25} = +61,7^\circ$ ($c = 0,946$, in Wasser). ($[\alpha]_D^{25}$ des all-L-Isomeren = $-58,0^\circ$, $c = 1,0$, in Wasser, Monoacetat-pentahydrat [7]).

Das analysenreine Endprodukt verhielt sich dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgel- und Cellulose-Schichten in verschiedenen Laufmitteln und nach Anfärbung mit Ninhydrin- und Echtblausalz-Reagens einheitlich:

Kieselgel G, <i>n</i> -Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24	Rf = 0,57
Cellulose D, <i>n</i> -Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24	Rf = 0,75
Cellulose D, <i>s</i> -Butanol/3-proz. Ammoniak 120:44 [7]	Rf = 0,52

Hochspannungspapier-elektrophoretisch (250 μg) konnten nach Anfärbung mit Ninhydrin-, SAKAGUCHI- und Diazosalz-Reagens ebenfalls keine Verunreinigungen nachgewiesen werden. Papier: SCHLEICHER & SCHÜLL 2043b mgl; Feldstärke: 65 U cm^{-1} ; Elektrolyten: a) 2N Essigsäure pH 2,5, b) Pyridinacetat (25 ml Pyridin + 2,5 ml Eisessig in 4 l Wasser) pH 6,0. Die relativen Wanderungsstrecken, bezogen auf His = 1,0, betragen in Puffer a) 0,70 His und in Elektrolyt b) 0,64 His.

Aminosäureanalyse. 3 μMol Octapeptid wurden mit 1 ml 6N HCl 24 Std. bei 110° hydrolysiert und das Totalhydrolysat nach Entfernung der Salzsäure in 0,2 ml Wasser gelöst. Zur Auftrennung der Aminosäuren wurden 5–20 μl strichförmig auf SS-2043b (gewaschen) im Laufmittel *n*-Propanol/Wasser 7:3 chromatographiert; die Auswertung erfolgte spektrophotometrisch nach Angaben von FISCHER & DÖRFEL [26] und RÖWE *et al.* [27] gegen eine mitchromatographierte, äquimolare Aminosäure-Vergleichslösung. Die auf dem Papier nicht getrennten Aminosäuren Arg und His konnten im gleichen Laufmittel durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel getrennt werden.

Ber. Arg + His 2,0 Asp 1,0 Val 2,0 Tyr 1,0 Pro 1,0 Phe 1,0

Gef. Arg + His 2,0 Asp 1,2 Val 2,0 Tyr 1,0 Pro 0,8 Phe 1,1 ($\pm 20\%$)

23. *Sterische Einheitlichkeit.* – a) *Einwirkung von D- bzw. L-Aminosäureoxydase auf das Hexapeptid XIII.* Die optische Reinheit der beiden Val, sowie des Tyr, His, Pro und Phe konnte bereits am geschützten Hexapeptidester Z-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OBu^t (XIII) durch Totalhydrolyse und Inkubation mit D- resp. L-Aminosäureoxydase bewiesen werden: 4 mg Hexapeptid wurden in 0,5 ml 6N HCl 24 Std. bei 120° hydrolysiert, im Vakuum über KOH zur Trockne verdampft, in 0,4 ml Wasser gelöst und vier aliquote Teile von je 0,1 ml erneut im Vakuum eingedampft, Ein Pröbchen wurde in 0,1 ml Pyrophosphatpuffer pH 8,4 nach BENDER & KREBS [28], ein zweites in 0,1 ml pH 8,0-Puffer (0,05M NaHCO₃ + 0,05M Ammoniumacetat) gelöst und (ohne Enzym) als Kontrolllösungen mitgenommen. Die beiden ändern aliquoten Teile wurden analog in Pyrophosphat- resp. Hydrogenbicarbonat-Puffer gelöst und mit 1000 μg D-Aminosäureoxydase (FLUKA, Rohprodukt), resp. 100 μg L-Aminosäureoxydase (SIGMA, Typ III) unter O₂ 24 Std. bei

37° inkubiert. Eine dem hydrolysierten Z-Hexapeptidester äquimolare künstliche D-Aminosäuremischung durchlief als Vergleichslösung dieselben Operationen. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung aller Lösungen (2–6 μ l) im System Phenol/Wasser 75 + 25 g/g) ergab folgendes: In der mit D-Aminosäureoxydase inkubierten Hexapeptidprobe und der analog inkubierten D-Aminosäure-Vergleichslösung wurden Phe, Pro, Tyr und Val quantitativ oxydiert, während His in beiden Proben intakt blieb. Es ist bekannt, dass D-His von D-Aminosäureoxydase nicht (oder nur sehr schwer) angegriffen wird [29]. In der mit L-Aminosäureoxydase inkubierten Peptidhydrolysatlösung konnten alle Aminosäuren, wie in den Kontroll- und Vergleichslösungen, unverändert wiedergefunden werden. Da L-His durch L-Aminosäureoxydase abgebaut wird [29], liegt auch das His im Hexapeptid vollständig in der D-Form vor. Die optische Reinheit des His kann zudem nach dem Syntheseweg als gesichert gelten (Azidmethode).

b) *Einwirkung von Trypsin (krist., BOEHRINGER) auf das Endprodukt.* 2 mg Peptid wurden in 0,2 ml pH 8,6-Puffer gelöst und nach Zugabe von 0,016 ml einer 0,25-proz. Trypsinlösung 16 Std. bei 25° inkubiert (Enzym: Substrat = 1 : 50, Gewichtsverhältnis). Ein analoger Ansatz wurde mit der all-L-Verbindung (Hypertensin CIBA®, Ampullenware) durchgeführt. Die Einwirkung wurde dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel-G- und Cellulose-D-Schichten im System *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24, unter Anfärbung mit Ninhydrin-, SAKAGUCHI- und Echtblausalz-Reagens, untersucht: Die Spaltung der all-L-Verbindung (CIBA) erfolgte wie erwartet [13] rasch und quantitativ zwischen den Aminosäureresten Arg² und Val³ in das Dipeptid H · Asp(NH₂)-Arg-OH (Rf Cellulose 0,15, Kieselgel 0,20; Ninhydrin: gelb-braun, SAKAGUCHI positiv) und das Hexapeptid H · Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OH (Rf 0,78 resp. 0,65; Ninhydrin: violett, SAKAGUCHI: negativ, Diazosalz: positiv). Im Trypsinat von all-D-Angiotensin konnten die beiden oben beschriebenen Spaltprodukte in kleinen Mengen ebenfalls nachgewiesen werden; durch semiquantitativen Farbvergleich wurde der Spaltungsgrad auf < 2% geschätzt. Eine geringe partielle Racemisierung in Arg²-Stellung ist demnach wahrscheinlich.

c) *Einwirkung von Pepsin krist.* (Spaltung der Val³-Tyr⁴-Bindung nur bei all-L-Angiotensin).

d) *Einwirkung von Chymotrypsin 3mal krist.* (quantitative Spaltung zwischen den Aminosäureresten Tyr⁴ und Val⁵ bei all-L-Isomeren).

e) *Einwirkung von Carboxypeptidase 5mal krist.* (entfernt sehr schnell das C-terminale Phe im all-L-Angiotensin).

Die experimentelle Durchführung der Abbaureaktionen 3 bis 5 erfolgte weitgehend nach [13]. Das all-D-Octapeptid verhielt sich dabei vollkommen stabil (die Versuchsanordnung hätte noch eine Spaltung von 1%, bezogen auf das eingesetzte Substrat, erkennen lassen).

SUMMARY

The synthesis of all-D-Val⁵-Angiotensin II-Asp¹- β -Amide (Scheme 2), the antipode of the active principle of Hypertensin CIBA®, is carried out according to known schemes in the L-series. It showed neither inhibitory nor angiotensin-like effects up to concentrations of 10⁻³.

Chemische Forschungsabteilung der
F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] K. VOGLER, *Biochem. Pharm.* 14 (1965) (im Druck).
- [2] J. D. STEWART & D. W. WOOLLEY, *Nature* 206, 619 (1965).
- [3] M. SELA & E. KATCHALSKI, *Advances Protein. Chem.* 14, 392 (1959).
- [4] TOICHI YOSHIDA, SETSUJI SAKURAI, TÔRU OKUDA & YASUO TAKAGI, *J. Amer. chem. Soc.* 84, 3590 (1962).
- [5] K. HANO, M. KOIDA, K. KUBO & H. YAJMA, *Biochim. Biophysica Acta* 90, 201 (1964).
- [6] R. SCHWYZER & H. TURRIAN, *Chemistry and Pharmacology of Angiotensin*, in «Vitamins and Hormones», edited by R. S. HARRIS and K. V. THIEMANN, Academic Press Inc., New York 1960, vol. 18, 237.
- [7] R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* 41, 1287 (1958).

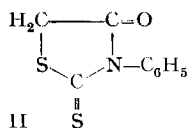
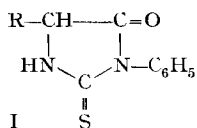
- [8] E. SCHRÖDER, *Liebigs Ann. Chem.* **680**, 132 (1964).
 [9] St. GUTTMANN, *Helv.* **44**, 721 (1961).
 [10] G. W. ANDERSON, *Ann. New York Acad. Sci.* **88**, 676 (1960).
 [11] M. ZAORAL & J. RUDINGER, *Collect. czechoslov. chem. Commun.* **24**, 1993 (1959).
 [12] D. HAMER & J. P. GREENSTEIN, *J. biol. Chemistry* **193**, 81 (1954).
 [13] R. SCHWYZER, *Circulation* **25**, 175 (1962); B. RINIKER & R. SCHWYZER, *Helv.* **44**, 658 (1961).
 [14] W. GRASSMANN & E. WÜNSCH, *Chem. Ber.* **91**, 462 (1958).
 [15] K. VOGLER, R. O. STUDER, P. LANZ, W. LERGIER & ERIKA BÖHNI, *Helv.* **48**, 1161 (1965).
 [16] G. W. ANDERSON, J. E. ZIMMERMANN & M. F. CALLAHAN, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 1839 (1964).
 [17] R. B. MERRIFIELD & D. W. WOOLLEY, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 4646 (1956).
 [18] R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER & H. ZUBER, *Helv.* **41**, 1273 (1958).
 [19] H. SCHWARZ, F. MERLIN BUMPUS & I. H. PAGE, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 5697 (1957).
 [20] R. A. BOISSONNAS, St. GUTTMANN, P. A. JAQUENOUD & J. P. WALLER, *Helv.* **38**, 1491 (1955).
 [21] M. BODANSZKY & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 5688 (1959).
 [22] H. GIBIAN & E. SCHRÖDER, *Liebigs Ann. Chem.* **642**, 145 (1961).
 [23] W. RITTEL, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER & R. SCHWYZER, *Helv.* **40**, 614 (1957).
 [24] D. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARN & ROSE J. RANDALL, *J. biol. Chemistry* **193**, 265 (1951).
 [25] *Dünnschichtchromatographie*, herausgegeben von E. STAHL, Springer Verlag 1962, S. 504.
 [26] F. G. FISCHER & H. DÖRFEL, *Biochem. Z.* **324**, 544 (1953).
 [27] K. RÖWE, E. FERBER & H. FISCHER, *Z. physiol. Chem.* **313**, 174 (1958).
 [28] A. E. BENDER & H. A. KREBS, *Biochem. J.* **46**, 210 (1950).
 [29] J. P. GREENSTEIN & M. WINITZ, *Chemistry of the Amino Acids*, John Wiley and Sons, Inc., New York 1961, p. 1786.

153. Sur la réaction de l'acide β -mercaptopropionique, du β -diéthylamino-éthylmercaptan et de la cystéine avec divers isothiocyanates

par Emile Cherbuliez, A. Buchs, J. Marszalek et J. Rabinowitz

(19 VI 65)

Nous avons déjà décrit des méthodes permettant d'obtenir des phénylthiohydantoïnes I d'acides aminés (PTH) très pures, méthodes que nous avons appliquées à des PTH connues ainsi qu'au dérivé obtenu, toujours par la même voie, à partir de la cystéine et auquel nous avons attribué la structure I (avec $R = C_6H_5-NH-C(S)-SCH_2-$) de la phénylthiohydantoïne dérivée de la S-(phénylthiocarbamyl)-cystéine [1]. Nous avons également décrit la réaction entre isothiocyanate de phényle et l'acide thio-glycolique, qui conduit à une thiazolidine II.



Dans ce mémoire, nous étudierons la réaction entre, d'une part acide β -mercaptopropionique, β -diéthylamino-éthylmercaptan et quelques acides aminés, notamment la cystéine, et de l'autre, divers isothiocyanates aromatiques ou araliphatiques. Ces derniers ont été obtenus dans le commerce ou préparés selon des méthodes citées antérieurement [2].