

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *Chimia* 19, 294 (1965).  
 [2] P. S. MANCHAND, R. RÜEGG, U. SCHWIETER, P. T. SIDONS & B. C. L. WEEDON, *J. chem. Soc.* 1965, 2019.  
 [3] F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Schweiz. Pat. 365371 (1962), 376096 (1964), 377334 (1964).  
 [4] O. ISLER, W. HUBER, A. RONCO & M. KOFLER, *Helv.* 30, 1911 (1947).  
 [5] H. LINDLAR, *Helv.* 35, 446 (1952).  
 [6] D. H. WADSWORTH, O. E. SCHUPP, E. J. SEUS & J. A. FORD, *J. org. Chemistry* 30, 680 (1965).  
 [7] a) O. ISLER, H. LINDLAR, M. MONTAVON, R. RÜEGG & P. ZELLER, *Helv.* 39, 249 (1956); b) O. ISLER, H. GUTMANN, H. LINDLAR, M. MONTAVON, R. RÜEGG, G. RYSER & P. ZELLER, *Helv.* 39, 463 (1956); c) R. RÜEGG, M. MONTAVON, G. RYSER, G. SAUCY, U. SCHWIETER & O. ISLER, *Helv.* 42, 854 (1959).  
 [8] G. WITTIG & U. SCHÖLLKOPF, *Chem. Ber.* 87, 1318 (1954).  
 [9] L. HORNER, H. HOFFMANN, W. KLING, H. ERTEL & V. G. TOSCANO, *Chem. Ber.* 95, 581 (1962).  
 [10] O. ISLER, W. GUX, R. RÜEGG, G. RYSER, G. SAUCY, U. SCHWIETER, M. WALTER & A. WINTERSTEIN, *Helv.* 42, 864 (1959).  
 [11] R. RÜEGG, H. LINDLAR, M. MONTAVON, G. SAUCY, S. F. SCHAEREN, U. SCHWIETER & O. ISLER, *Helv.* 42, 847 (1959).  
 [12] H. POMMER & W. SARNECKI, *Deutsch. Pat.* 1068709 (1959).  
 [13] H. J. BESTMANN & O. KRATZER, *Deutsch. Pat.-Auslegeschrift* 1148542 (1963).  
 [14] W. SARNECKI, A. NÜRRENBACH & W. REIF, *Deutsch. Pat.* 1155126 (1963).  
 [15] M. YAMAGUSHI, *Bull. chem. Soc. Japan* 30, 979 (1957); 37, 51 (1958).  
 [16] R. KUHN & C. GRUNDMANN, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 65, 1880 (1932).  
 [17] P. KARRER & W. JAFFÉ, *Helv.* 22, 69 (1939).  
 [18] P. KARRER & H. KÖNIG, *Helv.* 23, 460 (1940).  
 [19] H. H. INHOFFEN, O. ISLER, G. VON DER BEY, G. RASPÉ, P. ZELLER & R. AHRENS, *Liebigs Ann. Chem.* 580, 7 (1953).  
 [20] R. AHMAD & B. C. L. WEEDON, *J. chem. Soc.* 1953, 3286.  
 [21] P. MILDNER & B. C. L. WEEDON, *J. chem. Soc.* 1953, 3294; H. H. INHOFFEN & G. VON DER BEY, *Liebigs Ann. Chem.* 583, 100 (1963).  
 [22] G. EWART, D. S. PAYNE, A. L. FORTE & A. P. LANDE, *J. chem. Soc.* 1962, 3984.

### 43. Synthesen von Bradykinin-Analogen mit D-Aminosäuren (all-D-Bradykinin und all-D-retro-Bradikinin<sup>1)</sup> <sup>2)</sup>

von K. Vogler, P. Lanz, W. Lergler und W. Haefely

(8. X. 65)

Unsere Untersuchungen über all-D-Polypeptide [1] haben wir nun auch auf die Bradykinin-Reihe ausgedehnt und sowohl all-D-Bradykinin<sup>3)</sup> wie auch all-D-retro-Bradykinin synthetisch gewinnen können. Im folgenden berichten wir über diese

<sup>1)</sup> Abgekürzt wird nach den allgemeinen Regeln der Peptid-Chemie, vgl. V. Europ. Peptid-symposium, Pergamon Press, Oxford 1963; Z = Benzyloxycarbonyl, ONB = *p*-Nitrobenzyl-ester usw.

<sup>2)</sup> Die vorliegenden Resultate wurden auszugsweise am «International Symposium on Hypotensive Polypeptides», 25.–29. 10. 65, Florenz, vorgetragen.

<sup>3)</sup> Mit ähnlichen biologischen Zielen haben STEWART & WOLLEY [2] die Synthese von all-D-Bradykinin nach MERRIFIELDS Technik [3] als Kurzmitteilung publiziert.

Arbeiten, wobei von einer stereochemischen Betrachtung, die auch die entsprechenden L-Antipoden miteinschliesst, ausgegangen wird.

**A. Stereochemische Einleitung.** - Um die sterischen Verhältnisse der im folgenden beschriebenen stereoisomeren Nonapeptide der Bradykinin-Reihe zu dif-

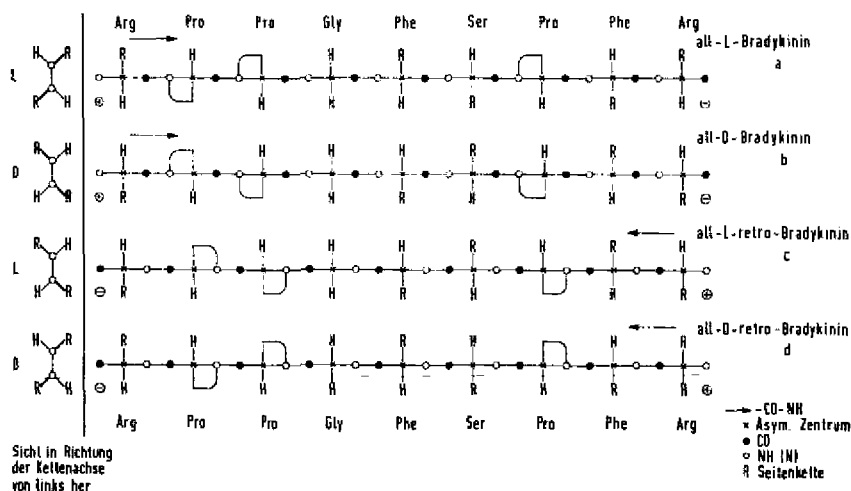


Fig. 1. Projektionsschema der stereoisomeren Bradykinine

ferenzieren, ist es von Vorteil, diese Oligopeptide nach einem einheitlichen Schema (Fig. 1), das die Lage der Aminosäure-Seitenketten besonders aufzeigt, darzustellen.

Danach werden die gestreckten Polypeptidketten so projiziert, dass die Asymmetriezentren ( $\times$ ), die NH- bzw.  $\text{NH}_2$ -Gruppen ( $\circ$ ) und die CO- bzw. COOH-Gruppen ( $\bullet$ ) in eine Ebene senkrecht zur Papierebene zu liegen kommen und die Seitenketten (R) sowie die H-Atome (H) dann entweder rechts oder links dieser Ebene stehen. Senkrecht zu dieser Ebene gesehen, bilden demnach die Asymmetriezentren, die CO- und NH-Gruppen eine Zickzacklinie und nehmen abwechselungsweise die Stellungen  $\circ$  ein, wie sie aus der «Sicht in Richtung der Kettenachse von links her» am linken Ende der Fig. 1 angedeutet werden. Die genaue Lage der Seitenketten (R) sowie diejenige der Wasserstoffatome der Asymmetriezentren (H) ist ebenfalls dieser Darstellung zu entnehmen.

Aus Fig. 1 folgt nun, dass die Seitenketten von a und d sowie von b und c (mit Ausnahme des Prolins) die gleiche räumliche Lage einnehmen. Die Richtung der CO-NH-Bindung ist in diesen Paaren entgegengesetzt. Prinzipiell stellt z. B. das Paar a und d ein System dar, an Hand dessen man die Frage aufwerfen könnte, ob im biologischen Geschehen der «Unfall» eintritt, dass eine Polypeptidkette «rückwärts gelesen» wird. Die all-D-retro-Form müsste dann biologische Aktivität aufweisen, wenn wir annehmen können, dass die Seitenketten eines Polypeptid-Wirkstoffes auf die Aktivität einen grösseren Einfluss ausüben als etwa das CO-NH-Gerüst oder dessen Orientierung. Leider weist unser System gerade beim Bradykinin schwerwiegende Mängel auf, indem drei Prolin-Molekeln darin vorkommen. In dieser Amino-

säure enthält die Seitenkette den Amidstickstoff als Ringglied, was ihr einen zusätzlichen Richtungssinn (siehe Fig. 1) in der Polypeptidkette einträgt.

Im allgemeinen ist wohl auch anzunehmen, dass die polaren Endgruppen eines Peptid-Wirkstoffes, deren Orientierung eine Folge des Richtungssinnes der CO-NH-Kette darstellt, die Orientierung der Bindung an den Rezeptor vorbestimmen. Bei falcher Orientierung könnte nun eine Aktivität ebenfalls in Frage gestellt sein. Ob dies allerdings beim Bradykinin mit seinen stark basischen Kettenenden zutrifft, könnte man wieder etwas bezweifeln angesichts der Beziehungen, die SCHRÖDER [4] auf Grund des Tatsachenmaterials der bis heute bekannten Analoga dieses Wirkstoffes ableitet. Beim Angiotensin hingegen scheint das freie Carboxylende einen entscheidenden Einfluss auszuüben [5].

Um das Resultat der vorliegenden Arbeit gerade vorwegzunehmen, muss nun gesagt werden, dass all-D-retro-Bradykinin keinerlei Wirkung auf den Blutdruck oder auf die glatte Muskulatur aufweist, und dass es zum mindesten in dieser Reihe nicht gelungen ist, die Natur auf Grund der geschilderten stereochemischen Überlegungen zu «überlisten».

Von all-D-Bradykinin hätte man andererseits, auf Grund von Beobachtungen, die an einem all-D-Pentapeptidfragment des  $\alpha$ -Melanophoren-stimulierenden Hormons [6] sowie in der Eledoisin-Reihe [7] gemacht wurden, eine antagonistische Wirkung erwarten dürfen. Diese Spekulation hat sich in unserem Falle, wie auch von anderer Seite [2] festgestellt wurde, ebenfalls nicht erfüllt.

Trotz der experimentell eindeutigen Antwort auf unsere Hypothese wäre es vielleicht doch noch reizvoll, den aufgeworfenen Fragenkomplex der all-D-retro-Form an einem Prolin-freien System, das zudem noch blockierte Endgruppen aufweist, nochmals nachzuprüfen. Ein solches System wäre vielleicht Gramacidin A bzw. B [8] mit den entsprechenden Isomeren. Da diese Antibiotika in ihren natürlich vorkommenden Formen abwechslungsweise D- und L-Aminosäuren enthalten, wären wohl auch proteolytische Enzymreaktionen, die allenfalls in den Wirkungsmechanismus eingreifen könnten, zum vorneherein ausgeschaltet.

**B. Herstellung der Ausgangsmaterialien.** – Von den D-Aminosäuren haben wir D-Arginin durch Partialsynthese ausgehend von D-Glutamin, Überführung in sein  $\gamma$ -Nitril, Hydrierung zu Ornithin und Guanidierung nach ZAORAL & RUDINGER [9], hergestellt. D-Prolin scheint kommerziell nicht erhältlich zu sein. Man kann es aus dem racemischen Amid mittels Schweinenieren-Amidase [10] gewinnen. Wir haben indessen ein viel ausgiebigeres Verfahren zur Spaltung von DL-Prolin aufgefunden, über welches gesondert berichtet wird. Die Beschaffung von D-Phenylalanin und D-Serin ist kein Problem.

**C. Synthese von all-D-Bradykinin.** – All-D-Bradykinin haben wir im Gegensatz zu unsern amerikanischen Kollegen [2] auf konventionelle Weise gewonnen, und zwar nach dem Schema der Fig. 2. Danach werden an ein Core-Heptapeptid IX an beiden Kettenenden die noch fehlenden Argininreste mittels Dicyclohexyl-carbodiimid [11] angebracht, wobei das bereits von BOISSONNAS *et al.* [12] in der L-Reihe beschriebene geschützte Nonapeptid XX resultiert, aus dem durch Hydrogenolyse all-D-Bradykinin gewonnen werden kann. Dieses Verfahren der Einführung von D-Arginin in der Schlussphase drängte sich im Hinblick darauf auf, dass die Gewinnung

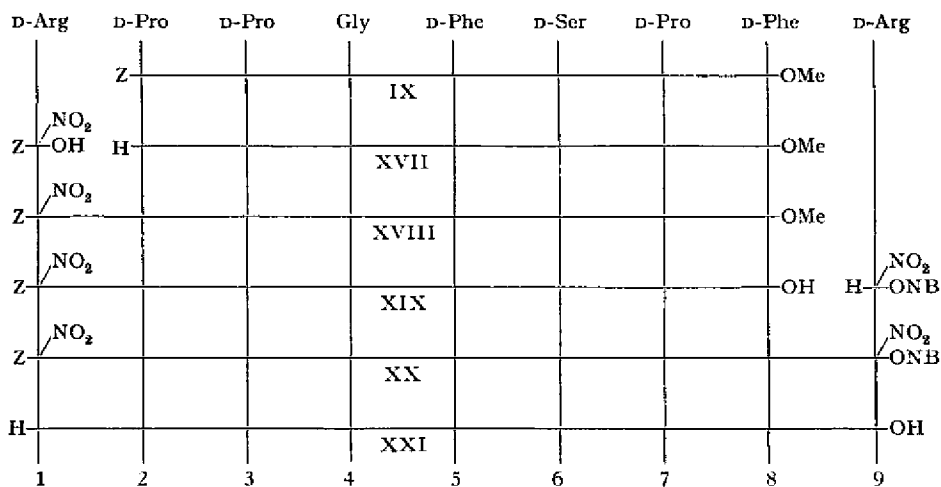


Fig. 2. Aufbauschema für all-D-Bradykinin

von letzterem nach der beschriebenen Methode in der D-Reihe noch einen kostspieligen Prozess darstellt.

Das Core-Heptapeptid IX wurde auf zwei Wegen der Fig. 3 und 4 erhalten. Nach Fig. 3 liess sich das Dipeptid I, das in der entsprechenden L-Reihe [13] seit langem bekannt war, über die aktivierte Ester-Methode [14] gewinnen, und seine Verlängerung zu II mit Dicyclohexyl-carbodiimid wurde ebenfalls nach dem Schema der L-Reihe [15] durchgeführt. Auch die Gewinnung des Dipeptidesters III bzw. dessen Hydrazids IV war in der L-Reihe bereits vorgezeichnet [12]. Letzteres wurde über die CURTIUS-Azid-Methode [16] zu V verlängert und das entsprechende Hydrazid VI

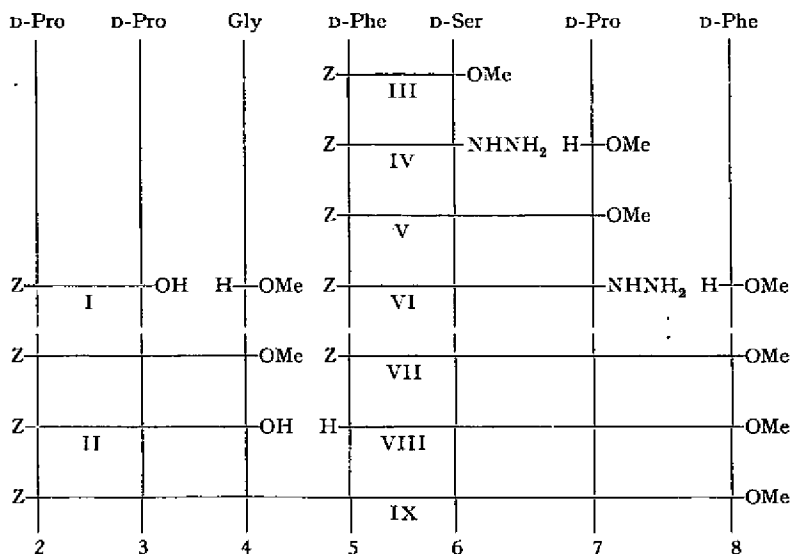


Fig. 3. Erstes Aufbauschema des geschützten Heptapeptides IX

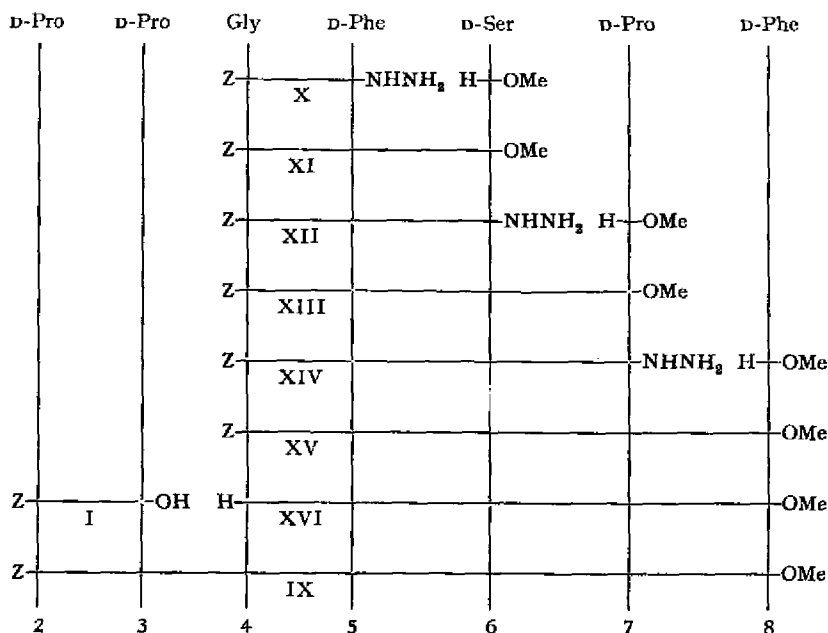


Fig. 4. Zweites Aufbauschema des geschützten Heptapeptides IX

mit D-Phe-OMe zu VII kondensiert. Hydrogenolyse mit Pd entfernte den N-endständigen Benzoyloxycarbonylrest [17] unter Gewinnung des Tetrapeptidesters VIII, der mit dem Imidazolid [18] von II zum geschützten Heptapeptid IX gekuppelt wurde.

Nach dem zweiten Schema (Fig. 4) lässt sich letzteres auch gewinnen, indem Z-Gly-OH und D-Phe-OMe mittelst Dicyclohexyl-carbodiimid kondensiert werden und man den Dipeptidester direkt ins kristalline Hydrazid X verwandelt. Letzteres wird über drei nachfolgende Azidkupplungen über XII, XIII und XIV zum Penta-peptidester XV verlängert, aus dem durch Hydrogenolyse XVI entsteht. Kondensation von XVI mit I über die SHEEHAN-Methode [11] führt zu IX, das sich mit dem Endprodukt IX der Fig. 3 als identisch erwies.

Das nach dem Schema der Fig. 2 erhaltene und bereits beschriebene rohe all-D-Bradykinin wurde vorerst über 420 Stufen im System *sek.*-Butanol/0,1N HCl 1:1 multiplikativ verteilt, die Hauptfraktion mit der Verteilungszahl 0,25 isoliert, lyophilisiert und aus abs. Äthanol/Essigester umgefällt. Auf diese Weise konnte ein sehr reines all-D-Bradykinin-trihydrochlorid isoliert werden.  $[\alpha]_D^{25} = +101,7^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 1,10$ , in Wasser). Dieses verhielt sich dünnschichtchromatographisch und elektrophoretisch einheitlich und gleich wie sein L-Antipode. Gegenüber Chymotrypsin und Carboxypeptidase A + B war es völlig stabil.

**D. Synthese von all-D-retro-Bradykinin.** — Die Synthese von all-D-retro-Bradykinin wurde nach Fig. 5, d. h. dem Weg der Synthese des entsprechenden, biologisch inaktiven L-Antipoden c [19] (Fig. 1), durchgeführt. Dieser ist auch von LANDE [20] beschrieben worden. In Anbetracht der ausführlichen Behandlung des

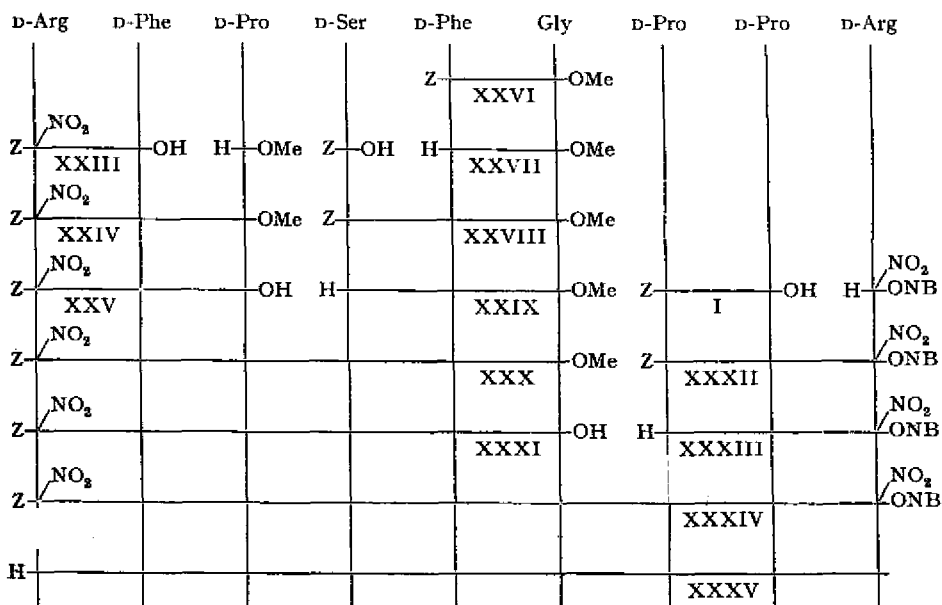


Fig. 5. Aufbauschema für all-D-retro-Bradykinin

L-Antipoden [19] kann darauf verzichtet werden, die einzelnen Schritte der all-D-retro-Verbindung im Detail darzulegen.

Auch all-D-retro-Bradykinin konnte in sehr reiner Form als Trihydrochlorid isoliert werden;  $[\alpha]_D^{25} = +107,5^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 0,98$ , in Wasser). Die Reinheitskriterien sind die gleichen wie diejenigen des all-D-Bradykinins. Die scheinbaren Ionenbeweglichkeiten sind für alle vier Stereoisomeren der Fig. 1 identisch.

**E. Biologische Ergebnisse.** – Die biologische Aktivität von all-D-Bradykinin und all-D-retro-Bradykinin wurde an zwei charakteristischen Bradykininwirkungen untersucht: am glattmuskelstimulierenden Effekt am isolierten Dünndarm (Ileum) des Meerschweinchens und an der blutdrucksenkenden Wirkung an der narkotisierten Katze.

In beiden Versuchsanordnungen waren all-D-Bradykinin und all-D-retro-Bradykinin praktisch ohne Wirkung, d.h. die biologische Aktivität betrug weniger als 1/10000 derjenigen von all-L-Bradykinin.

Die Prüfung auf antagonistische Beeinflussung der Wirkungen von all-L-Bradykinin erfolgte in der gleichen Versuchsanordnung. All-D-Bradykinin und all-D-retro-Bradykinin wurden in einem weiten Konzentrationsbereich, und entweder in verschiedenen Zeitintervallen vor oder gleichzeitig mit L-Bradykinin der Badeflüssigkeit zugesetzt. Eine sichere Beeinflussung der glattmuskelstimulierenden Wirkung des natürlichen Bradykinins durch all-D-Bradykinin und all-D-retro-Bradykinin wurde selbst in Konzentrationen von 100  $\mu$ /ml nicht gefunden. An der narkotisierten Katze wurden all-D-Bradykinin und all-D-retro-Bradykinin in verschiedenen Dosen intravenös vor Testdosen von L-BRADYKININ verabreicht; beide waren bis zu Dosen von 10 mg/kg ohne Einfluss auf die blutdrucksenkende Wirkung des natürlichen Polypeptids.

Experimenteller Teil<sup>4)</sup>

## A. All-D-Bradykinin. – Aufbau des Core-Heptapeptides IX nach Figur 3

1. *Z-D-Pro-D-Pro-OH (I)*. Eine Suspension von 36,4 g (0,22 Mol) D-Pro-OMe-hydrochlorid [21] in 200 ml Tetrahydrofuran wird bei 0° 10 Min. mit 38,8 ml Triäthylamin geschüttelt und vom Triäthylamin-hydrochlorid abgenutscht. Im Filtrat löst man bei -5° 74 g (0,2 Mol) Z-D-Pro-p-nitrophenylester [22] und lässt 48 Std. bei -5° stehen. Das Tetrahydrofuran wird im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in Essigester gelöst, mit 1N HCl, H<sub>2</sub>O, 5-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (bis farblos) und 10-proz. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingedampft. Man erhält 58,3 g (81%) Öl, das in 300 ml Methanol gelöst und mit einer Lösung von 7,8 g NaOH in 80 ml Wasser über Nacht verseift wird. Die Lösung wird im Vakuum bei 40° auf ca. 1/4 eingedampft, mit 100 ml Wasser verdünnt, filtriert und mit konz. HCl angesäuert. Nach 2 Std. wird abgenutscht, mit Wasser gewaschen und aus Alkohol umkristallisiert. Ausbeute 44,8 g (80%). Smp. 191–193°.  $[\alpha]_D^{25} = +82,6^\circ$ .

C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub> (346,37) Ber. C 62,41 H 6,40 N 8,09% Gef. C 62,49 H 6,54 N 7,96%

2. *Z-D-Pro-D-Pro-Gly-OH (II)*. 15,4 g (0,11 Mol) Glycin-äthylester-hydrochlorid werden in 120 ml Dimethylformamid und 15,4 ml (0,11 Mol) Triäthylamin 15 Min. bei 0° geschüttelt, vom Triäthylamin-hydrochlorid abgenutscht und im Filtrat 34,6 g (0,1 Mol) Z-D-Pro-D-Pro-OH (I) gelöst. Diese Lösung wird mit 400 ml Acetonitril verdünnt, auf -10° abgekühlt, mit einer Lösung von 20,7 g Dicyclohexyl-carbodiimid in 30 ml Dimethylformamid versetzt und 20 Std. bei -5° aufbewahrt. Der Dicyclohexylharnstoff wird abgenutscht, das Filtrat im Vakuum bei 70° eingedampft, das Öl in Essigester mit 1N HCl, 5-proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 10-proz. NaCl-Lösung neutralgewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingedampft. Man trennt von einer kleinen Menge Dicyclohexylharnstoff ab und trocknet das Öl im Vakuum. Ausbeute 32,5 g (78%). Der Tripeptidester wird in 140 ml Methanol mit 22 ml 4N NaOH während 1 1/2 Std. verseift. Die Lösung wird mit 150 ml Wasser verdünnt, mit Essigester extrahiert, die wässrige Phase mit konz. HCl angesäuert, mit Essigester extrahiert, mit 10-proz. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingedampft. Das Harz kristallisiert bei 0° aus Essigester-Petroläther. Ausbeute 23,6 g (75%). Smp. 99–102°, ab 80° wachsartig.  $[\alpha]_D^{25} = +83,6^\circ$ .

C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub> (403,42) Ber. C 59,54 H 6,24 N 10,42% Gef. C 59,52 H 6,38 N 10,30%

3. *Z-D-Phe-D-Ser-OMe (III)*. Herstellung gemäss Vorschrift von R. A. BOISSONNAS *et al.* [12] für den Antipoden Z-L-Phe-L-Ser-OMe. Smp. 126–127°.  $[\alpha]_D^{25} = +6^\circ$ .

C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub> (400,42) Ber. C 62,99 H 6,04 N 6,99% Gef. C 63,07 H 5,99 N 6,98%

4. *Z-D-Phe-D-Ser-NH-NH<sub>2</sub> (IV)*. Herstellung gemäss Vorschrift von R. A. BOISSONNAS *et al.* [12] für den Antipoden Z-L-Phe-L-Ser-NH-NH<sub>2</sub>. Smp. 188–190°.  $[\alpha]_D^{25} = +8^\circ$  (c = 1, in Eisessig).

C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>N<sub>4</sub> (400,42) Ber. C 59,98 H 6,04 N 13,99% Gef. C 59,83 H 6,13 N 13,95%

5. *Z-D-Phe-D-Ser-D-Pro-OMe (V)*. 28 g (0,07 Mol) Z-D-Phe-D-Ser-NH-NH<sub>2</sub> (IV) werden in 250 ml 60-proz. Essigsäure, 350 ml Essigester und 18,2 ml konz. HCl gelöst, bei -10° unter Rühren tropfenweise mit einer Lösung von 4,84 g (0,07 Mol) NaNO<sub>2</sub> in 30 ml H<sub>2</sub>O versetzt und 15 Min. bei -10° weitergerührt. Das gebildete Azid wird bei 0° mit Essigester extrahiert, mit eiskalter 5-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralgewaschen, bei 0° über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, dann mit einer vorgekühlten Lösung von 10,9 g (0,084 Mol) D-Prolin-methylester [21] in 30 ml Essigester versetzt und 48 Std. bei -5° aufbewahrt. Die Lösung wird mit 1N HCl, H<sub>2</sub>O, 5-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und H<sub>2</sub>O neutralgewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, im Vakuum eingedampft und aus Essigester-Äther kristallisiert. Ausbeute 28,6 g (82%). Smp. 123–125°.  $[\alpha]_D^{25} = +48,4^\circ$ .

C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub> (497,53) Ber. C 62,76 H 6,28 N 8,45% Gef. C 63,00 H 6,40 N 8,42%

<sup>4)</sup> Die Smp. sind nicht korrigiert und wurden auf dem Schmelzpunktbestimmungsapparat nach TORROL der Firma BÜCHI, Flawil (Schweiz), bestimmt. Die Analysenmuster wurden 16 Std. über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bei 0,01 Torr und, wenn nichts anderes angegeben, zwischen 60 und 100° getrocknet. Die Drehungen wurden bei c = 2 und, wenn nichts anderes erwähnt, in Dimethylformamid (DMF) bestimmt. Der Messfehler beträgt ca. ± 2°.

6. *Z-D-Phe-D-Ser-D-Pro-NH-NH<sub>2</sub>* (VI). 27,4 g (0,055 Mol) *Z-D-Phe-D-Ser-D-Pro-OMe* (V) werden in 60 ml Dimethylformamid gelöst, mit 14 ml 100-proz. Hydrazinhydrat versetzt und 24 Std. bei 25° aufbewahrt. Die Kristallisation wird durch Wasserzusatz vervollständigt, worauf man nach dem Abnutschen aus Dimethylformamid-Alkohol umkristallisiert. Ausbeute 26,6 g (97%). Smp. 215–217°.  $[\alpha]_D^{25} = +34,5^\circ$ .

$C_{25}H_{31}O_8N_5$  (497,54) Ber. C 60,35 H 6,28 N 14,08% Gef. C 60,15 H 6,29 N 13,72%

7. *Z-D-Phe-D-Ser-D-Pro-D-Phe-OMe* (VII). 24,9 g (0,05 Mol) *Z-D-Phe-D-Ser-D-Pro-NH-NH<sub>2</sub>* (VI) werden in 250 ml 60-proz. Essigsäure, 13 ml konz. HCl und 400 ml Essigester unter Rühren gelöst, bei –10° tropfenweise mit einer Lösung von 3,46 g (0,05 Mol) NaNO<sub>2</sub> in 20 ml Wasser versetzt und 15 Min. bei –10° weitergerührt. Das Azid wird bei 0° mit Essigester extrahiert, mit 5-proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung neutralgewaschen, bei 0° über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, mit 9,85 g (0,055 Mol) *D*-Phenylalanin-methylester in 30 ml Essigester versetzt und 48 Std. bei –5° aufbewahrt. Die Lösung wird mit 1N HCl, H<sub>2</sub>O, 5-proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und mit H<sub>2</sub>O neutralgewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, eingedampft und aus Alkohol-Äther kristallisiert. Ausbeute 24,2 g (72%). Smp. 115–117°.  $[\alpha]_D^{25} = +38,6^\circ$ .

$C_{36}H_{40}O_8N_4$  (644,70) Ber. C 65,20 H 6,25 N 8,69% Gef. C 65,17 H 6,26 N 8,70%

8. *H-D-Phe-D-Ser-D-Pro-D-Phe-OMe* (VIII). 16,1 g (0,025 Mol) *Z-D-Phe-D-Ser-D-Pro-D-Phe-OMe* (VII) werden in 150 ml Eisessig mit 2,5 g 5-proz. Pd-Kohle bis zum Stillstand der H<sub>2</sub>-Aufnahme hydriert, vom Katalysator abgetrennt und im Vakuum bei 50° eingedampft. Das Öl wird in Essigester aufgenommen, mit überschüssigem 3N Ammoniak und Wasser ausgeschüttelt, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, im Vakuum bei 50° eingedampft und getrocknet. Man erhält 10,5 g (82%) eines Harzes, das bisher nicht kristallisiert werden konnte. Dünnschichtchromatographisch verhält es sich einheitlich in folgenden Systemen: Butanol-Pyridin-Eisessig-Wasser-(90:60:18:72) und Butanol-Eisessig-Wasser-(4:1:1). Dieses Rohprodukt wird sofort für die Herstellung des geschützten Hexapeptides IX eingesetzt.

9. *Z-D-Pro-D-Pro-Gly-D-Phe-D-Ser-D-Pro-D-Phe-OMe* (IX). 8,3 g (20,6 mMol) *Z-D-Pro-D-Pro-Gly-OH* (II) in 85 ml Tetrahydrofuran werden bei –10° mit 3,44 g (20,6 mMol) Carbonyldiimidazol versetzt und unter CaCl<sub>2</sub>-Verschluss 1 Std. bei –10° gerührt. Zu dieser Lösung tropft man innerhalb 15 Min. eine vorgekühlte Lösung des rohen *H-D-Phe-D-Ser-D-Pro-D-Phe-OMe* (VIII) in 50 ml Tetrahydrofuran, rührt während 4 Std. bei –10° weiter und lässt über Nacht bei –5° stehen. Das Tetrahydrofuran wird im Vakuum abdestilliert, das Harz in Essigester aufgenommen, mit 1N HCl, H<sub>2</sub>O, 5-proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und H<sub>2</sub>O neutralgewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, im Vakuum eingedampft und der Rückstand 2mal aus Essigester unter Eintropfen und Rühren in Petroläther ausgefällt, abgenutscht, mit Petroläther gewaschen und im Vakuum bei 60° getrocknet. Ausbeute 9,6 g (52%).  $\epsilon$  bei 258 nm = 582 (Feinsprit, 70 mg %), ber. 582.  $[\alpha]_D^{25} = +54,8^\circ$ , dünn-schichtchromatographisch einheitlich. Die Substanz enthält noch 1,7% Wasser.

$C_{47}H_{57}O_{11}N_7$  (895,98) Ber. C 63,00 H 6,41 N 10,94% Gef.\* C 63,05 H 6,38 N 11,11%  
\* (umgerechnet auf H<sub>2</sub>O-freie Substanz).

**Aufbau des Core-Heptapeptides IX nach Figur 4.** – 10. *Z-Gly-D-Phe-NH-NH<sub>2</sub>* (X). 31,4 g (0,15 Mol) *Z-Gly-OH* und 26,9 g (0,15 Mol) *D-Phe-OMe* werden in 70 ml Dimethylformamid gelöst, bei –10° mit einer Lösung von 31 g (0,15 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid in 40 ml Acetonitril versetzt und 24 Std. bei 0° aufbewahrt. Der Harnstoff wird abgenutscht, das Filtrat mit 1 l Essigester verdünnt, nach dem Neutralwaschen mit 1N HCl, H<sub>2</sub>O, 5-proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und H<sub>2</sub>O über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingedampft. Das Öl wird in Äther gelöst, von etwas Harnstoff abfiltriert und im Vakuum zur Trockne verdampft. Ausbeute 31,9 g (86%) Harz. Es wird in 150 ml Alkohol gelöst, mit 32 ml 100-proz. Hydrazinhydrat versetzt, 2 Std. unter Rückfluss gekocht und über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die teilweise kristallisierte Reaktionsmischung wird 1 Std. mit 1 l Wasser verrührt, abgenutscht, mit Wasser gewaschen und zuerst bei 80°, dann bei 100° getrocknet. Hierbei steigt der Smp. von 80° auf 140–142°, Sintern bei 110°. Ausbeute 27,8 g (87%). Zur Analyse wird aus Alkohol umkristallisiert und im Hochvakuum bei 110° über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet. Smp. 150–151°.  $[\alpha]_D^{25} = -6,1^\circ$  ( $c = 2$ , in 0,5N HCl).

$C_{19}H_{22}O_4N_4$  (370,40) Ber. C 61,61 H 5,98 N 15,13% Gef. C 61,53 H 6,10 N 15,04%

11. *Z-Gly-D-Phe-D-Ser-OMe* (XI). 29,6 g (0,08 Mol) *Z-Gly-D-Phe-NH-NH<sub>2</sub>* (X) werden in 120 ml 60-proz. Essigsäure, 21 ml konz. Salzsäure und 250 ml Essigester gelöst, bei –10° unter



Rühren tropfenweise mit einer Lösung von 5,53 g (0,08 Mol)  $\text{NaNO}_2$  in 20 ml Wasser versetzt, 20 Min. bei  $-10^\circ$  weitergerührt und die Azidlösung bei  $0^\circ$  mit Wasser und 5-proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung neutralgewaschen. Die Essigesterlösung wird nach Zusatz von 30 ml Dimethylformamid bei  $0^\circ$  über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, filtriert, auf  $-10^\circ$  abgekühlt, mit einer Lösung von 9,5 g (0,8 Mol) D-Ser-OME in 20 ml Essigester versetzt und 48 Std. bei  $-10^\circ$  aufbewahrt. Nach Neutralwaschen mit 1N HCl,  $\text{H}_2\text{O}$ , 5-proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und  $\text{H}_2\text{O}$  wird über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und im Vakuum bis zur reichlichen Kristallbildung eingedampft, mit Äther vermischt, abgenutscht, mit Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute 27,5 g (75%). Smp. 146–148°.  $[\alpha]_D^{25} = 0^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{25} = -12,5^\circ$  ( $c = 2$ , in Eisessig).

$\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{O}_7\text{N}_3$  (457,47) Ber. C 60,38 H 5,95 N 9,19% Gef. C 60,59 H 6,21 N 9,16%

12. Z-Gly-D-Phe-D-Ser-NH-NH<sub>2</sub> (XII). 27,4 g (0,06 Mol) Z-Gly-D-Phe-D-Ser-OME (XI) werden in 100 ml Dimethylformamid gelöst, mit 30 ml 100-proz. Hydrazinhydrat versetzt und 24 Std. bei  $25^\circ$  aufbewahrt. Die Lösung wird während 1 Std. in 1 l Wasser verührt, abgenutscht, mit viel Wasser gewaschen und im Vakuum bei  $70^\circ$  getrocknet. Ausbeute 24,4 g (89%). Smp. 188–190°. Zur Analyse aus Dimethylformamid/Alkohol ausgefällt und im Hochvakuum bei  $110^\circ$  über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet. Smp. 189–191°.  $[\alpha]_D^{25} = +3,5^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{25} = -7,2^\circ$  ( $c = 2$ , in Eisessig).

$\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{N}_3$  (457,48) Ber. C 57,76 H 5,95 N 15,31% Gef. C 57,55 H 6,00 N 15,35%

13. Z-Gly-D-Phe-D-Ser-D-Pro-OME (XIII). 27,4 g (0,06 Mol) Z-Gly-D-Phe-D-Ser-NH-NH<sub>2</sub> (XII) werden in 120 ml 60-proz. Essigsäure, 15,6 ml konz. Salzsäure und 250 ml Essigester gelöst, bei  $-10^\circ$  langsam mit einer Lösung von 4,2 g (0,06 Mol)  $\text{NaNO}_2$  in 15 ml Wasser versetzt und 20 Min. bei  $-10^\circ$  weitergerührt. Das ausgefallene Azid wird bei  $0^\circ$  abgenutscht, mit eiskalter 5-proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und Eiswasser gewaschen, in 200 ml vorgekühltem Dimethylformamid gelöst und bei  $-10^\circ$  aufbewahrt. Unterdessen wird die Essigesterphase des Azides bei  $0^\circ$  mit 5-proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und Wasser neutralgewaschen, mit der Dimethylformamid-Lösung des auskristallisierten und abgenutschten Azides vereinigt und bei  $0^\circ$  über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Zu dieser Lösung gibt man eine Lösung von 9,3 g (0,72 Mol) H-D-Pro-OME in 20 ml Essigester und bewahrt 3 Tage bei  $-10^\circ$  auf. Die Reaktionslösung wird mit 1 l Essigester verdünnt, mit 1N HCl, 5-proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und 10-proz. NaCl-Lösung neutralgewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingedampft. Das Harz wird in Essigester gelöst, unter Eintropfen und Rühren in Petroläther ausgefällt, über Nacht bei  $0^\circ$  aufbewahrt, abgenutscht und getrocknet. Man erhält 24,8 g (73%) amorphen Z-Tetrapeptidester, der bisher noch nicht kristallisiert werden konnte. Das Rohprodukt wird direkt zum Hydrazid umgesetzt.

14. Z-Gly-D-Phe-D-Ser-D-Pro-NH-NH<sub>2</sub> (XIV). 22,6 g (0,4 Mol) Z-Gly-D-Phe-D-Ser-D-Pro-OME (XIII) (Rohprodukt) werden in 30 ml Dimethylformamid unter Erwärmen gelöst, mit 12 ml 100-proz. Hydrazinhydrat versetzt, über Nacht stehengelassen, mit Alkohol vermischt, 3 Std. im Eisschrank aufbewahrt, abgenutscht, mit Alkohol gewaschen und bei  $80^\circ$  im Vakuum getrocknet. Ausbeute 19,9 g (88%). Smp. 225–228°. Zur Analyse aus Dimethylformamid/Alkohol umkristallisiert. Smp. 228–230°.  $[\alpha]_D^{25} = +27,2^\circ$ .

$\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_7\text{N}_6$  (554,59) Ber. C 58,47 H 6,18 N 15,15% Gef. C 58,40 H 6,41 N 15,05%

15. Z-Gly-D-Phe-D-Ser-D-Pro-D-Phe-OME (XV). 19,5 g (0,035 Mol) Z-Gly-D-Phe-D-Ser-D-Pro-NH-NH<sub>2</sub> (XIV) werden in 110 ml 60-proz. Essigsäure, 9,1 ml konz. Salzsäure und 200 ml Essigester gelöst, bei  $-10^\circ$  langsam mit einer Lösung von 2,42 g (0,035 Mol)  $\text{NaNO}_2$  in 8 ml Wasser versetzt, 20 Min. bei  $-10^\circ$  weitergerührt, dann bei  $0^\circ$  mit Wasser, 5-proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und Wasser neutralgewaschen und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Zur Azidlösung gibt man bei  $-10^\circ$  eine Lösung von 6,5 g (0,055 Mol) H-D-Phe-OME in 20 ml Essigester und lässt 3 Tage bei  $-10^\circ$  stehen. Die Lösung wird mit 1N HCl,  $\text{H}_2\text{O}$ , 5-proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und  $\text{H}_2\text{O}$  neutralgewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, im Vakuum bis zur beginnenden Kristallisation eingedampft, mit Äther vermischt und nach 2 Std. abgenutscht. Ausbeute 18,4 g (75%). Smp. 106–108°. Zur Analyse aus Essigester umkristallisiert. Smp. 109–111°.  $[\alpha]_D^{25} = +31,8^\circ$ .

$\text{C}_{37}\text{H}_{45}\text{O}_9\text{N}_5$  (701,75) Ber. C 63,32 H 6,18 N 9,98% Gef. C 63,05 H 6,34 N 10,04%

16. H-Gly-D-Phe-D-Ser-D-Pro-D-Phe-OME (XVI). 17,5 g (0,025 Mol) Z-Gly-D-Phe-D-Ser-D-Pro-D-Phe-OME (XV) werden in einer Mischung von 200 ml Alkohol und 20 ml Eisessig gelöst und nach Zusatz von 2 g 5-proz. Pd-Kohle bis zum Stillstand der  $\text{H}_2$ -Aufnahme hydriert. Der Katalysator wird abgetrennt und das Filtrat im Vakuum bei  $45^\circ$  eingedampft. Der Sirup wird mit Chloro-

form vermischt, mit überschüssigem 3N Ammoniak ausgeschüttelt, die Chloroformlösung über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingedampft. Ausbeute 11,8 g (83%) kristalliner Rückstand. Smp. 148–150°. Zur Analyse aus Alkohol/Äther umkristallisiert. Smp. 148–150°.  $[\alpha]_D^{25} = +32,7^\circ$ .  $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{O}_7\text{N}_5$  (567,63) Ber. C 61,36 H 6,57 N 12,34% Gef. C 61,62 H 6,62 N 12,28%

17. *Z-D-Pro-D-Pro-Gly-D-Phe-D-Ser-D-Pro-D-Phe-OMe (IX)*. 6,9 g (0,02 Mol) *Z-D-Pro-D-Pro-OH (I)* werden in 70 ml Dimethylformamid gelöst, auf  $-10^\circ$  abgekühlt, mit 3,34 g (0,02 Mol) Carbonyldiimidazol versetzt und 1 Std. bei  $-10^\circ$  gerührt. Dazu tropft man innerhalb 10 Min. eine vorgekühlte Lösung von 11,35 g (0,02 Mol) *H-Gly-D-Phe-D-Ser-D-Pro-D-Phe-OMe (XVI)* in 25 ml Dimethylformamid, rührt 2 Std. bei  $-10^\circ$  weiter und bewahrt dann während 48 Std. bei  $-5^\circ$  auf. Die Lösung wird im Vakuum eingedampft, der Rückstand in viel Essigester mit 1N HCl,  $\text{H}_2\text{O}$ , 5-proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und  $\text{H}_2\text{O}$  neutralgewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird 2mal unter Rühren aus Essigester durch langsames Eintropfen in Petroläther gefällt, abgenutscht und getrocknet. Ausbeute 14,4 g (80%).  $[\alpha]_D^{25} = +53,8^\circ$ . Der geschützte Hexapeptidester ist identisch mit dem nach Fig. 3 auf anderem Weg erhaltenen Hexapeptidester (vgl. [9]).

**Aufbau von all-D-Bradykinin nach Fig. 2.** – 18. *H-D-Pro-D-Pro-Gly-D-Phe-D-Ser-D-Pro-D-Phe-OMe (XVII)*. 26,9 g (0,03 Mol) *Z-D-Pro-D-Pro-Gly-D-Phe-D-Ser-D-Pro-D-Phe-OMe (Fig. 2, IX)* werden in 240 ml Eisessig mit 4 g 5-proz. Pd-Kohle bis zum Stillstand der  $\text{H}_2$ -Aufnahme hydriert, vom Katalysator abgetrennt und im Vakuum bei  $45^\circ$  eingedampft. Man löst das Harz in Wasser, versetzt mit überschüssigem Ammoniak, extrahiert mit Chloroform, wäscht mehrmals mit Wasser, trocknet über  $\text{MgSO}_4$  und destilliert das Chloroform im Vakuum ab. Der Rückstand wird in Chloroform gelöst, durch Eintropfen in Petroläther unter Rühren ausgefällt, abgenutscht und getrocknet. Ausbeute 18,9 g (82%) Rohprodukt, das ohne weitere Reinigung zur Kupplung mit *Z-(G-NO<sub>2</sub>)-D-Arg-OH* eingesetzt wird.

19. *Z-(G-NO<sub>2</sub>)-D-Arg-D-Pro-D-Pro-Gly-D-Phe-D-Ser-D-Pro-D-Phe-OMe (XVIII)*. 11,65 g (33 mMol) *Z-(G-NO<sub>2</sub>)-D-Arg-OH* und 18,9 g (30 mMol) *H-D-Pro-D-Pro-Gly-D-Phe-D-Ser-D-Pro-D-Phe-OMe (XVII, Rohprodukt)* werden in 40 ml Dimethylformamid gelöst, mit 40 ml Acetonitril verdünnt, auf  $-10^\circ$  abgekühlt, mit einer Lösung von 6,73 g (33 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid in 20 ml Acetonitril versetzt, 30 Std. bei  $-10^\circ$  und 18 Std. bei  $25^\circ$  aufbewahrt. Man gibt 10 ml 50-proz. Essigsäure zu und trennt nach 1 Std. den Dicyclohexylharnstoff ab. Die Lösung wird im Vakuum auf ein Volumen von ca. 20 ml eingedampft, mit viel Chloroform verdünnt, mit 1N HCl,  $\text{H}_2\text{O}$ , 5-proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in Chloroform gelöst, von etwas Harnstoff abfiltriert, durch Eintropfen in Äther unter Rühren ausgefällt, nochmals in gleicher Weise umgefällt und getrocknet. Ausbeute 23,4 g (71%) Rohprodukt, das offensichtlich noch Spuren von Dicyclohexylharnstoff enthält und nicht analyserein erhalten werden konnte. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung verseift, da sich hierbei der Dicyclohexylharnstoff besser abtrennen lässt.

20. *Z-(G-NO<sub>2</sub>)-D-Arg-D-Pro-D-Pro-Gly-D-Phe-D-Ser-D-Pro-D-Phe-OH (XIX)*. 23,4 g (21 mMol) *Z-(G-NO<sub>2</sub>)-D-Arg-D-Pro-D-Pro-Gly-D-Phe-D-Ser-D-Pro-D-Phe-OMe Rohprodukt (XVIII)* werden in 250 ml Methanol gelöst und mit 42 ml 1N NaOH während 3 Std. unter Rühren verseift. Die Lösung wird im Vakuum bei  $40^\circ$  auf ein Volumen von ca. 40 ml eingedampft, mit 150 ml Wasser verdünnt, von einer geringen Spur Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und mit 1N HCl sauer gestellt. Man extrahiert mit Chloroform, wäscht mit Wasser neutral, trocknet über  $\text{MgSO}_4$  und destilliert das Chloroform im Vakuum ab. Der Rückstand wird in Chloroform gelöst, durch Eintropfen in Äther unter Rühren ausgefällt, abgenutscht, mit Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute 17,5 g (77%). Für die Analyse wird eine Probe in Methanol gelöst, mit Essigester bis zu ganz schwacher Trübung versetzt und im Vakuum bis zur beginnenden Kristallisation eingedampft, abgenutscht und getrocknet.  $[\alpha]_D^{25} = +53,5^\circ$ ,  $\epsilon$  bei 268 nm = 15670 (5 mg% Feinsprit), ber. 15791. Die Substanz enthält 0,95% Wasser; die nachfolgenden Analysenwerte sind umgerechnet auf  $\text{H}_2\text{O}$ -freie Substanz.

$\text{C}_{52}\text{H}_{66}\text{O}_{14}\text{N}_{12}$  Ber. C 57,66 H 6,14 N 15,52  $\text{OCH}_3$  0%  
(1083,14) Gef. „ 57,56 „ 6,35 „ 15,36 „ 0%

21. *Z-(G-NO<sub>2</sub>)-D-Arg-D-Pro-D-Pro-Gly-D-Phe-D-Ser-D-Pro-D-Phe-(G-NO<sub>2</sub>)-D-Arg-ONB (XX)*. 17,3 g (16 mMol) *Z-(G-NO<sub>2</sub>)-D-Arg-D-Pro-D-Pro-Gly-D-Phe-D-Ser-D-Pro-D-Phe-OH (XIX)* und

62 g (17,6 mMol) H-(G-NO<sub>2</sub>)-D-Arg-ONB werden in 70 ml Dimethylformamid gelöst, auf -10° abgekühlt, mit einer vorgekühlten Lösung von 3,3 g (16 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid in 45 ml Acetonitril versetzt, 4 Std. bei -10° und 24 Std. bei 25° aufbewahrt. Nach Zusatz von 10 ml 50-proz. Essigsäure lässt man 1 Std. bei 25° stehen, nutscht dann den Dicyclohexylharnstoff ab und destilliert im Vakuum das Lösungsmittel beinahe vollständig ab. Der Rückstand wird in 400 ml Chloroform gelöst, mit 1N HCl, H<sub>2</sub>O, 5-proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 10-proz. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum auf 100 ml eingedampft. Diese Lösung wird durch Eintropfen in 2l Essigester unter Rühren ausgefällt, abgenutscht, mit Essigester und Petroläther gewaschen und getrocknet. Ausbeute 18,1 g (80%), ε bei 268 nm = 39000 (1 mg% Eisessig). Dieses schon ziemlich reine Rohprodukt gibt bei der Dünnschichtchromatographie im System Butanol-Eisessig-Wasser-(4:1:1) einen einzigen Fleck mit schwachen vor- und nachlaufenden kleinen Schweifen. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung der Hydrierung unterworfen.

22. H-D-Arg-D-Pro-D-Pro-Gly-D-Phe-D-Ser-D-Pro-D-Phe-D-Arg-OH (XXI). 18 g Z-(G-NO<sub>2</sub>)-D-Arg-D-Pro-D-Pro-Gly-D-Phe-D-Ser-D-Pro-D-Phe-(G-NO<sub>2</sub>)-D-Arg-ONB (XX) werden in 250 ml Eisessig gelöst, mit 60 ml Wasser, 4,2 ml konz. Salzsäure und 5 g 5-proz. Pd-Kohle versetzt und bis zum Stillstand der H<sub>2</sub>-Aufnahme (nach 24 Std.) hydriert. Der Katalysator wird abgetrennt, die Lösung im Vakuum bei 35° eingedampft und mehrmals mit Wasser und zuletzt mit Methanol abgedampft. Man löst den Rückstand in Methanol und fällt die Lösung durch Eintropfen in Essigester unter Rühren aus. Nach dem Abnutschen, Waschen mit Essigester und Petroläther und Trocknen erhält man 14,5 g Rohprodukt.

23. *Reinigung und analytische Charakterisierung.* - a) *Multiplikative Verteilung.* 7 g Rohprodukt (aus der Hydrierung) werden multiplikativ über 420 Stufen im System sek.-Butanol/0,1N HCl-(1:1) (Vol.-Verhältnisse) verteilt. Die Verteilung wird spektrophotometrisch mit FOLIN-DENIS-Reagens [23] und mittels der quantitativen SAKAGUCHI-Reaktion nach ALBANESE *et al.* [24] verfolgt. Die Hauptfraktion mit einer Verteilungszahl  $K = 0,25$  (Gläschen Nr. 65-95) wird bei Raumtemperatur im Hochvakuum eingedampft und anschliessend 3mal aus Wasser lyophilisiert; es resultieren ca. 3,2 g eines leicht gelbstichigen Pulvers.

b) *Umfällen.* Die obige Fraktion wird 3mal aus abs. Äthanol/Essigester umgefällt, zuletzt mit Wasser vom Filter gelöst und wieder lyophilisiert. Man erhält 2 g analysenreines Nonapeptid-trihydrochlorid in Form eines weissen feinkörnigen Pulvers (aus den vereinigten Mutterlaugen können noch ca. 800 mg Substanz gewonnen werden).  $[\alpha]_D^{25} = +101,7^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 1,10$ , in Wasser).

$C_{59}H_{79}O_{11}N_{15}Cl_3$	Ber. C 51,34	H 6,55	N 17,97	Cl 9,09%	
(1169,59)	Gef. „ 51,13	„ 6,61	„ 17,84	„ 9,12	H <sub>2</sub> O 4,84%

(wasserfreies Trihydrochlorid).

Das Nonapeptid verhält sich dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel-G- und Cellulose-C-Schichten in verschiedenen Laufmitteln und Anfärbung mit Ninhydrin-, SAKAGUCHI- und Cyanamid-Reagens Nr. 113 [25] einheitlich.  $R_f = 0,50$  (Kieselgel G, *n*-Butanol-Pyridin-Eisessig-Wasser-(30:20:6:24)). - Bei der Hochspannungs-Papiererelektrophorese (40 Min., 65 V cm<sup>-1</sup>, SS 2043b) beträgt die Laufstrecke bei pH 2,5 ca. 100 mm und bei pH 6,5 ca. 30 mm. Verunreinigungen konnten hier keine beobachtet werden. - All-D-Bradykinin verhält sich chromatographisch und elektrophoretisch gleich wie all-L-Bradykinin.

Totalhydrolyse des Peptids, papierchromatographische Trennung und photometrische Bestimmung der Aminosäureverhältnisse erfolgten in gleicher Weise wie früher beschrieben [26]:

Pro 2,0	Tyr 2,0	Ile 3,0	Ser 1,0	Gly 1,0
Gef. „ 2,0	„ 2,1	„ 2,6	„ 0,9	„ 1,0

c) *Abbaureaktionen.* Gegenüber der Einwirkung von Chymotrypsin und Carboxypeptidase A+B verhält sich das Nonapeptid vollständig stabil. Die experimentelle Durchführung erfolgte analog wie früher beschrieben [27].

## B. All-D-retro-Bradykinin. - Aufbau nach Fig. 5

1. *Synthese des all-D-retro-Bradykinins.* Die Herstellung des all-D-retro-Bradykinins erfolgte genau nach der Vorschrift für das all-L-retro-Bradykinin [19]. Es werden daher nachfolgend nur die Konstanten der einzelnen Synthesestufen angegeben.

2. *Z-(G-NO<sub>2</sub>)-D-Arg-D-Phe-OH (XXIII)*. Herstellung analog dem entsprechenden L-Antipoden [19]. Smp. 130–131°.  $[\alpha]_D^{23} = +8,2^\circ$  ( $c = 1$ , in Methanol).

$C_{24}H_{30}O_7N_6$  (514,53) Ber. C 56,02 H 5,88 N 16,33% Gef. C 55,65 H 6,08 N 16,54%

3. *Z-(G-NO<sub>2</sub>)-D-Arg-D-Phe-D-Pro-OMe (XXII)*. Ausbeute 69%. Smp. 118–121°.  $[\alpha]_D^{23} = +28,6^\circ$ .

$C_{39}H_{37}O_8N_7$  (611,64) Ber. C 56,98 H 6,10 N 16,03% Gef. C 56,60 H 6,04 N 16,21%

4. *Z-(G-NO<sub>2</sub>)-D-Arg-D-Phe-D-Pro-OH (XXV)*. Ausbeute 84%. Smp. 124–126° (Zers.).  $[\alpha]_D^{23} = +30,4^\circ$ .  $\epsilon$  bei 268 nm = 16000 (2 mg% Feinsprit).

$C_{28}H_{35}O_8N_7$  (597,62) Ber. C 56,27 H 5,90 N 16,41% Gef. C 56,02 H 6,01 N 16,17%

5. *Z-D-Phe-Gly-OMe (XXVI)*. Ausbeute 84%. Smp. 120–121°.  $[\alpha]_D^{23} = +23,5^\circ$ .

$C_{20}H_{22}O_5N_2$  (370,39) Ber. C 64,85 H 5,99 N 7,56% Gef. C 64,90 H 6,32 N 7,77%

6. *H-D-Phe-Gly-OMe (XXVII)*. Ausbeute 82%, Honig.

7. *Z-D-Ser-D-Phe-Gly-OMe (XXVIII)*. Ausbeute 80%. Smp. 143–145°.  $[\alpha]_D^{23} = +8,3^\circ$ .

$C_{23}H_{27}O_7N_3$  (457,47) Ber. C 60,38 H 5,95 N 9,26% Gef. C 60,78 H 6,07 N 9,29%

8. *H-D-Ser-D-Phe-Gly-OMe (XXIX)*. Ausbeute 90%. Smp. 130–133°.  $[\alpha]_D^{23} = -2^\circ$ .  $\epsilon$  bei 258 nm = 189 (60 mg% Feinsprit), ber. 187 [28].

$C_{15}H_{21}O_5N_3$  (323,34) Ber. C 55,72 H 6,55 N 13,00% Gef. C 55,99 H 6,88 N 12,77%

9. *Z-(G-NO<sub>2</sub>)-D-Arg-D-Phe-D-Pro-D-Ser-D-Phe-Gly-OMe (XXX)*. Ausbeute 54%.  $[\alpha]_D^{23} = +25,8^\circ$ . Bei der entsprechenden L-Verbindung [19] fanden wir  $[\alpha]_D^{23} = -18,7^\circ$ .  $\epsilon$  bei 268 nm = 16250 (3 mg% Feinsprit).

$C_{43}H_{54}O_{12}N_{10}$  (902,94) Ber. N 15,51% Gef. N 15,29%

10. *Z-(G-NO<sub>2</sub>)-D-Arg-D-Phe-D-Pro-D-Ser-D-Phe-Gly-OH (XXXI)*. Ausbeute 81%.  $[\alpha]_D^{23} = +26^\circ$ .  $\epsilon$  bei 268 nm = 16090 (3 mg% Feinsprit).

$C_{42}H_{52}O_{12}N_{10}$  (888,92) Ber. C 56,68 H 5,90 N 15,76% Gef. C 56,57 H 6,22 N 15,72%

11. *Z-D-Pro-D-Pro-OH (I)*. Ausbeute 70%. Smp. 191–193°.  $[\alpha]_D^{23} = +82,6^\circ$ .

$C_{18}H_{22}O_5N_2$  (346,37) Ber. C 62,41 H 6,40 N 8,09% Gef. C 62,49 H 6,54 N 7,96%

12. *Z-D-Pro-D-Pro-(G-NO<sub>2</sub>)-D-Arg-ONB (XXXII)*. Ausbeute 73%.  $[\alpha]_D^{23} = +54,5^\circ$ . Die bei [19] zitierte Drehung sollte heissen  $[\alpha]_D^{20} = -51,7^\circ$ .  $\epsilon$  bei 268 nm = 24800 (1 mg% Feinsprit).

$C_{31}H_{38}O_{10}N_8$  (682,68) Ber. N 16,42% Gef. N 16,67%

13. *H-D-Pro-D-Pro-(G-NO<sub>2</sub>)-D-Arg-ONB (XXXIII)*. Ausbeute 86% Rohprodukt.

14. *Z-(G-NO<sub>2</sub>)-D-Arg-D-Phe-D-Pro-D-Ser-D-Phe-Gly-D-Pro-D-Pro-(G-NO<sub>2</sub>)-D-Arg-ONB (XXXIV)*. Ausbeute 52% Rohprodukt.

15. *H-D-Arg-D-Phe-D-Pro-D-Ser-D-Phe-Gly-D-Pro-D-Pro-D-Arg,3HCl (XXXV)*. Ausbeute 90% Rohprodukt.

16. *Reinigung des Endproduktes.* - a) *Multiplikative Verteilung.* 2,5 g Rohprodukt XXXV werden über 460 Stufen im System *n*-Butanol-Pyridin-Eisessig-Wasser (8:2:1:9) (Vol.-Verhältnisse) verteilt. Die Verteilung wird spektrophotometrisch mit der quantitativen SAKAGUCHI-Reaktion nach ALBANESE *et al.* [24] verfolgt. Die Hauptfraktion mit einer Verteilungszahl  $K = 0,24$  wird bei Raumtemperatur im Vakuum eingedampft und abschliessend 3mal aus Wasser lyophilisiert. Es resultieren ca. 1,1 g eines farblosen Pulvers.

b) *Umfällen.* Die Hauptfraktion aus der Verteilung (1,1 g) wird 2mal aus abs. Äthanol/Essigester umgefällt, in 0,1N HCl gelöst, 2mal lyophilisiert und zum Schluss noch 1mal als Hydrochlorid aus Äthanol/Essigester umgefällt. Man erhält ca. 600 mg analysenreines Nonapeptid-trihydrochlorid in Form eines weissen, leicht hygroskopischen Pulvers.  $[\alpha]_D^{26} = +107,5^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 0,98$ , in Wasser).

$C_{50}H_{78}O_{11}N_{15}Cl_3$  Ber. C 51,34 H 6,55 N 17,97 Cl 9,09%  
(1169,59) Gef. „ 51,60 „ 6,88 „ 17,81 „ 9,07 H<sub>2</sub>O 6,74%

Das Nonapeptid verhält sich dünn-schichtchromatographisch und hochspannungspapier-elektrophoretisch, unter den beim all-D-Bradykinin angegebenen Bedingungen, einheitlich. Rf-

Werte und scheinbare Ionenbeweglichkeiten sind beim all-D-retro-Bradykinin, all-L-retro-Bradykinin, all-D-Bradykinin und all-L-Bradykinin identisch.

Totalhydrolyse des Peptids, papierchromatographische Trennung und photometrische Bestimmung der Aminosäuren erfolgten in gleicher Weise wie früher beschrieben [26]:

Ber. Arg	2,0	Phe	2,0	Pro	3,0	Ser	1,0	Gly	1,0
Gef. ..	2,0 <sub>0</sub>	..	2,2 <sub>8</sub>	..	2,5 <sub>7</sub>	..	1,0 <sub>8</sub>	..	1,2 <sub>0</sub>

c) *Abbaureaktionen*. Das Nonapeptid ist vollständig resistent gegenüber der Einwirkung von Chymotrypsin und Carboxypeptidase A + B. Die experimentelle Durchführung erfolgte nach [27].

Die Mikroanalysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung unter der Leitung von Herrn Dr. A. DIRSCHERL ausgeführt.

#### SUMMARY

The stereochemical relationship of peptide chains having all-L- and all-D-configuration in the constituent amino-acids in the normal as well as in the retro-series of bradykinin is outlined. Some biological speculations are made concerning activity and spatial arrangements of the amino-acid side chains and the direction of the peptide bonds. Due to the presence of three proline residues the all-D-retro-bradykinin molecule represents an unsuitable model for investigating the question whether peptides may be «read» by biological systems in the reverse direction.

The synthesis of all-D-bradykinin, as well as of all-D-retro-bradykinin, by conventional methods is reported. Both products can be obtained in a high state of purity.

The *in vitro* activity of all-D-bradykinin and all-D-retro-bradykinin has been tested on the isolated guinea-pig ileum. Both substances are devoid of bradykinin-like smooth muscle stimulating activity up to final bath concentrations  $10^4$  times higher than those necessary for a maximal effect of all-L-bradykinin. All-D-bradykinin has practically no antagonistic effect against contractions produced by all-L-bradykinin. *In vivo* neither product has a bradykinin-like hypotensive action in the anaesthetized cat. In the same animal no antagonistic effect against all-L-bradykinin has been observed<sup>5</sup>).

Forschungsabteilung der

F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. A.G., Basel.

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] K. VOGLER, R. O. STUDER, W. LERGIER & P. LANZ, *Helv.* **48**, 1407 (1965).
- [2] J. M. STEWART & D. W. WOLLEY, *Nature* **206**, 619 (1965).
- [3] R. B. MERRIFIELD, *Biochemistry* **3**, 1385 (1964).
- [4] E. SCHRÖDER & R. HEMPEL, *Experientia* **20**, 529 (1964).
- [5] R. SCHWYZER & H. TURRIAN, *Vitamins and Hormones* **18**, 276 (1960), Academic Press, New York.
- [6] KOTBUKI HANO, MASAO KOIDA, KAZUO KUBO & HAMAKI YAJIMA, *Biochim. Biophysica Acta* **90**, 201 (1964); H. YAJIMA & K. KUBO, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 2039 (1965).
- [7] E. SCHRÖDER, *Experientia* **21**, 10 (1965).
- [8] S. H. ISHII & B. WITKOP, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 1848 (1964); R. SANGER & B. WITKOP, *ibid.* **86**, 1861, 1862 (1964).
- [9] M. ZAORAL & J. RUDINGER, *Collect. czechoslov. chem. Commun.* **24**, 1993 (1959).
- [10] D. HAMER & J. P. GREENSTEIN, *J. biol. Chemistry* **193**, 81 (1954).
- [11] J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 1067 (1955).

<sup>5</sup> Nach Abfassung unseres Manuskriptes erschien eine Arbeit (G. FLOURET & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 3775 (1965)), über die Synthese von all-D-Oxytocin. Auch dieser Antipode erwies sich nicht als Oxytocinhemmer.

- [12] R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN & P. A. JAQUENOUD, *Helv.* **43**, 1349 (1960).  
 [13] E. ABDERHALDEN & A. NIENBURG, *Fermentforschung* **13**, 513 (1933); K. HEVNS & G. LEGLER, *Z. physiol. Chem.* **327**, 161 (1960).  
 [14] M. BODANSZKY, *Nature* **175**, 685 (1955).  
 [15] ST. GUTTMANN, J. PLESS & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **45**, 170 (1962).  
 [16] TH. CURTIUS, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **35**, 3226 (1902).  
 [17] M. BERGMANN & L. ZERVAS, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **65**, 1192 (1932).  
 [18] G. W. ANDERSON, *Ann. New York Acad. Sci.* **88**, 676 (1960).  
 [19] K. VOGLER, P. LANZ & W. LERGIER, *Helv.* **45**, 561 (1962).  
 [20] S. LANDE, *J. org. Chemistry* **27**, 4528 (1962).  
 [21] Analog der L-Form gewonnen, vgl. B. F. ERLANGER, H. SACHS & E. BRAND, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 1806 (1954).  
 [22] Analog der L-Form gewonnen, vgl. M. BODANSZKY & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 5688 (1959).  
 [23] O. H. LOWRY *et al.*, *J. biol. Chemistry* **193**, 265 (1951).  
 [24] A. A. ALBANESE & I. E. FRANKSTON, *J. biol. Chemistry* **159**, 185 (1945).  
 [25] *Dünnschichtchromatographie*, herausgegeben von E. STAHL, Springer Verlag 1962.  
 [26] F. G. FISCHER & H. DERFEL, *Biochem. Z.* **324**, 544 (1953); für die Hydrolyse siehe [19].  
 [27] K. VOGLER *et al.*, *Helv.* **44**, 1495 (1961).  
 [28] K. VOGLER, J. WÜRSCH, R. O. STUDER & P. LANZ, *Chimia* **14**, 379 (1960).

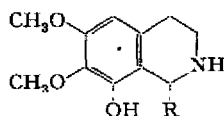
#### 44. Synthesen in der Isochinolinreihe

**Zur Darstellung 6,7,8-Hydroxy-dimethoxy-substituierter 1,2,3,4-Tetrahydroisochinoline aus 3-Benzoyloxy-4,5-dimethoxy-phenäthylamin und Bericht über die Resultate der pharmakologischen Prüfung von Anhalamin, Anhalidin, *rac.* Anhalonidin und *rac.* Pellotin**

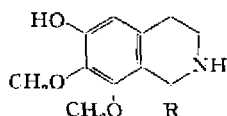
von A. Brossi, F. Schenker, R. Schmidt, R. Banziger und W. Leimgruber

(8. X. 65)

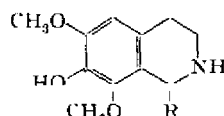
Für den Vergleich mit einer in anderem Zusammenhang erhaltenen phenolischen Tetrahydroisochinolinbase [1]<sup>1)</sup> benötigten wir das bisher unbekannte 6-Hydroxy-tetrahydroisochinolinderivat XI. Einige charakteristische Eigenschaften dieser zu *rac.* Anhalonidin (X) [2] und dem 7-Hydroxyisochinolin XII [1] isomeren Base sind inzwischen an anderer Stelle publiziert worden [3].



X R = -CH<sub>3</sub>  
 XV R = -H



XI R = -CH<sub>3</sub>  
 XVI R = -H



XII R = -CH<sub>3</sub>  
 XVII R = -H

Im folgenden soll über die Synthese des Tetrahydroisochinolins XI aus dem bekannten Phenäthylamin II [4] [5] berichtet werden. Letzteres ist aus dem verschie-

<sup>1)</sup> Dieses phenolische Tetrahydroisochinolin, für das wir seinerzeit die Konstitution XI in Betracht gezogen haben, besitzt, wie inzwischen gezeigt werden konnte, eine andere Konstitution [3].