

Über die Synthese eines im Gift von *Bombina variegata* vorkommenden Hexapeptid-diamids

Von

H. Nesvadba, H. Bachmayer und H. Michl

Aus dem Peptidlabor der Fa. Sanabo, Wien, und dem Chemischen Institut der
Hochschule für Bodenkultur, Wien

(Eingegangen am 20. April 1965)

Mittels der p-Nitrophenylestermethode wurde das Hexapeptid-diamid der Sequenz Ala—Glu—His—Phe—Ala—Asp(NH₂)₂, durchwegs L-Aminosäuren, stufenweise aufgebaut. Das synthetische Produkt war mit einem aus Unkengift (*Bombina variegata*) isolierten Peptid strukturell identisch.

Using the p-nitrophenylester method the hexapeptide diamide Ala—Glu—His—Phe—Ala—Asp(NH₂)₂ was synthesized from L-amino acids. This product was identical with a natural peptide, which had previously been isolated from the venom of *Bombina variegata*.

Die Hautdrüsen der Amphibien sind zu erstaunlichen Syntheseleistungen befähigt. Je nach der Gattung erzeugen sie eine Vielzahl organischer Verbindungen, angefangen von relativ einfachen biogenen Aminen bis zu cytotoxisch wirksamen Proteinen¹. Kürzlich wurden auch biologisch wirksame Peptide in Amphibiengiften aufgefunden. So wurde ein eledoisin-ähnliches Undecapeptid aus der südamerikanischen Pfeif-froschart *Physalaemus fuscumaculatus* aufgeklärt und synthetisiert². Im europäischen Grasfrosch (*Rana temporaria*) wurde Bradykinin gefunden³ und auch in anderen *Rana*-Arten dürften ähnlich gebaute Peptide vorkommen⁴.

¹ H. Michl und E. Kaiser, *Toxicon* [Oxford] **1**, 175 (1963).

² A. Anastasi, V. Erspamer und J. M. Cei, *Arch. Biochem. Biophys.* **108**, 341 (1964).

³ A. Anastasi, V. Erspamer und G. Bertaccini, *Comp. Biochem. Physiol.* [Oxford] **14**, 43 (1965).

⁴ V. Erspamer, G. Bertaccini und N. Urakawa, *Japan. J. Pharmacol.* **14**, 468 (1964).

Wie schon vorher gezeigt wurde^{5, 6}, enthält Unkengift eine Anzahl basischer Peptide. Die Isolierung einheitlicher Substanzen stieß auf erhebliche Schwierigkeiten, da die üblichen Trennmethode, wie Ionenaustauschchromatographie und „finger printing“ weitgehend versagten. Trotzdem gelang es, einzelne Peptide im mg-Maßstab zu isolieren und ihre primäre Struktur zu bestimmen. Die Synthese solcher Peptide liefert nicht nur einen zusätzlichen Beweis für ihre Struktur, sondern ermöglicht die Herstellung ausreichender Mengen reiner Substanz zum genaueren Studium ihrer Eigenschaften.

Vom chemischen Standpunkt scheint die Struktur eines von uns⁵ aufgeklärten Hexapeptids insofern interessant, als es einen endständigen Asparaginsäurerest enthält, dessen Carboxylgruppen als Säureamide vorliegen. Peptide mit Asparaginsäure-diamidstruktur sind unseres Wissens in natürlichem Material noch nicht aufgefunden worden. Zieht man die strukturelle Ähnlichkeit natürlicher Proteine in die weitere Betrachtung, so ist die Tripeptidsequenz Glu—His—Phe, die auch im adrenocorticotropen und in den melanophorenstimulierenden Hormonen vorliegt, besonders augenfällig.

Der Aufbau der dem Unkenpeptid zugrunde liegenden Hexapeptidsequenz Ala—Glu—His—Phe—Ala—Asp(NH₂)₂ wurde — unter Vermeidung von Racemisierung — von Asp(NH₂)₂* ausgehend, durch stufenweisen Anbau der einzelnen Aminosäuren⁷, vorwiegend nach der in der Peptidchemie üblichen p-Nitrophenylestermethode⁸, durchgeführt (s. Tab. 1). Das in der Literatur bereits beschriebene *Cbo*-Asp(NH₂)₂**⁹ (I) wurde auf einfachere Weise durch Umsetzung von *Cbo*-Asp(NH₂)-p-nitrophenylester¹⁰ mit verdünnter alkohol. NH₃-Lösung in 74% Ausbeute erhalten. Hydrierung mittels PdO₂¹¹ in Methanol gab das freie, kristallisierte, stark basische Asparaginsäurediamid (II), welches mittels *DCCI*¹²

* Die Aminosäuren liegen alle in der L-Konfiguration vor, weshalb die Bezeichnung L weggelassen wurde.

** Verwendete Abkürzungen: *Cbo* Carbobenzoxy-
DMFA Dimethylformamid
DCCI Dicyclohexylcarbodiimid
ONP p-Nitrophenoxy-
Bzl Benzyl-

⁵ G. Kiss und H. Michl, *Toxicon* [Oxford] **1**, 33 (1962).

⁶ H. Michl und H. Bachmayer, *Mh. Chem.* **94**, 814 (1963).

⁷ R. A. Boissonas, S. Guttmann, P. A. Jaquenoud und J. P. Wallner, *Helv. Chim. Acta* **38**, 1491 (1955).

⁸ Zusammenfassung bei M. Bodanszky, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **88**, 655 (1960).

⁹ E. Sondheimer und R. W. Holley, *J. Amer. Chem. Soc.* **76**, 2467 (1954).

¹⁰ M. Bodanszky und V. DuVigneaud, *J. Amer. Chem. Soc.* **81**, 5688 (1959).

¹¹ R. L. Shriner und R. Adams, *J. Amer. Chem. Soc.* **46**, 1683 (1924).

¹² J. C. Sheehan und G. P. Hess, *J. Amer. Chem. Soc.* **77**, 1067 (1955).

mit *Cbo*-Ala zu dem geschützten Dipeptid-diamid *Cbo*-Ala—Asp(NH₂)₂ (III) umgesetzt wurde. Nachfolgende Hydrierung zu Ala—Asp-diamid (IV) und Umsetzung mit *Cbo*-Phe-p-nitrophenylester¹³ führte in guter Ausbeute zu *Cbo*-Phe—Ala—Asp(NH₂)₂ (V). Der in der Literatur erwähnte, aber nicht weiter beschriebene Di-*Cbo*-His-p-nitrophenylester¹⁴ gab mit dem durch Hydrierung erhaltenen Phe—Ala—Asp(NH₂)₂ das geschützte Tetrapeptid-diamid Di-*Cbo*-His—Phe—Ala—Asp(NH₂)₂ (VI). Abspaltung der Schutzgruppen mittels HBr/Eisessig¹⁵ und Austausch des Anions an Amberlite IRA-45 (OH-Form) führte zu dem freien Tetrapeptid-diamid, welches mit *Cbo*-Glu- γ -benzylester- α -p-nitrophenylester¹⁶ zu dem geschützten Pentapeptid-diamid *Cbo*-Glu- γ -benzylester—His—Phe—Ala—Asp-diamid (VII) kondensiert wurde. Nach der nun folgenden Hydrierung wurde mit überschüssigem *Cbo*-Ala-p-nitrophenylester¹⁷ das geschützte Hexapeptid-diamid *Cbo*-Ala—Glu—His—Phe—Ala—Asp-diamid (VIII) erhalten. Hydrolytische Abspaltung der *Cbo*-Gruppe lieferte in fast quantitativer Ausbeute das gewünschte Hexapeptid-diamid der Sequenz Ala—Glu—His—Phe—Ala—Asp(NH₂)₂ (IX) (s. Tab. 1). Die quantitative Aminosäureanalyse in einer automatischen *Stein*- und *Moore*-Apparatur lieferte die erwarteten Werte. Enzymatische Spaltung mit Bakterienprotease und Vergleich der Abbaupeptide des synthetischen Ma-

Tabelle 1. Reaktionsschema der Synthese

1	2	3	4	5	6	
Ala	Glu	His	Phe	Ala	Asp(NH ₂) ₂	
					<i>Cbo</i> -Asp(NH ₂) ₂	(I)
				<i>Cbo</i> -Ala-ONP	HAsp(NH ₂) ₂	(II)
				<i>Cbo</i> -.....	diamid	(III)
			<i>Cbo</i> -Phe-ONP	H-.....	diamid	(IV)
			<i>Cbo</i> -.....	diamid		(V)
		Di- <i>Cbo</i> -His-ONP	H-.....	diamid		
		Di- <i>Cbo</i> -.....	diamid			(VI)
		<i>Cbo</i> -Glu-ONP	H-.....	diamid		
		OBzl				
		<i>Cbo</i> -.....	diamid			(VII)
<i>Cbo</i> -Ala-ONP	H-.....	diamid				
<i>Cbo</i> -.....	diamid					(VIII)
H-.....	diamid					(IX)
1	2	3	4	5	6	
Ala	Glu	His	Phe	Ala	Asp(NH ₂) ₂	

¹³ M. Bodanszky und V. DuVigneaud, J. Amer. Chem. Soc. **81**, 6072 (1959).¹⁴ J. Meienhofer, Chimia [Aarau] **16**, 385 (1962).¹⁵ D. Ben. Ishai und A. Berger, J. Org. Chem. **17**, 1564 (1952).¹⁶ G. Losse, H. Seschkei und W. Langenbeck, Chem. Ber. **96**, 204 (1963).¹⁷ M. Goodman und K. C. Stueben, J. Amer. Chem. Soc. **81**, 3980 (1959).

terials mit den aus Unkengift erhaltenen Peptiden durch Hochvoltelektrophorese ergab Identität (Tab. 2). Desgleichen lieferten Elektrophorese und Chromatographie des natürlichen und synthetischen Hexapeptides gute Übereinstimmung.

Das Hexapeptid-diamid ist im Blutdrucktest¹⁸ schwach positiv.

Tabelle 2. Vergleich der Abbauprodukte von natürlichem und synthetischem Peptid mit Bakterienprotease

(HVE in Pyridinacetatpuffer pH 4,7; S & S 2043 b-Papier, 40 V/cm; 10° C)

Abbaupeptide des natürlichen Hexapeptides	Abbaupeptide des synthetischen Hexapeptides	Farbe mit Ninhydrin	Sequenz
R_{Lys} 1,20	R_{Lys} 1,21	gelb	Asp(NH ₂) ₂
„ 0,88	„ 0,90	grauviolett	Ala—Asp(NH ₂) ₂
„ 0,60	„ 0,60	bräunlich	His—Phe
„ 0,11	„ 0,13	violett	Ala—Glu—His—Phe
R_{Asp} 0,44	R_{Asp} 0,45	violett	Ala—Glu

Experimenteller Teil

Abbau des natürlichen und synthetischen Hexapeptid-diamids

1,1 mg Peptid wurden in 0,1 ml Enzymlösung (0,2 mg Protease Fluka 57037 in 0,1 ml 0,01 *m*-Ammoniumacetatpuffer pH 7,8) gelöst und 20 Stdn. bei 37° bebrütet.

Blutdruckaktivität

Beim Blutdrucktest an Ratten¹⁸ wurde 1⁰/₁₀₀ der Aktivität von Vasopressin gefunden.

Schmelzpunkt und optische Drehung

Die Schmelzpunkte wurden auf einem *Kofler*-Mikroschmelzpunktsapparat bestimmt und sind korrigiert. Das optische Drehvermögen der Substanzen wurde in einem automatischen Polarimeter Modell Perkin-Elmer 161 in 95proz. Essigsäure gemessen. Die Fehlergrenze liegt bei ± 1° der spezif. Drehung.

Dünnschichtchromatographie der Synthesezwischenprodukte

Die Chromatographie erfolgte auf luftgetrockneten Kieselgel G-Schichten.

Als Laufmittel (*LM*) wurden verwendet:

LM1 n-Butanol—Eisessig—Wasser (3:1:1)

LM2 Phenol(vakuumdestilliert)—Wasser (3:1), Zusatz von *EDTA*.

LM3 n-Butanol—Eisessig—Wasser—Pyridin (15:3:12:10).

LM4 Methanol—Eisessig (6:1).

Die Sichtbarmachung der freien Peptide erfolgte mit Collidin—Essigsäuregepufferter äthanol. Ninhydrinlösung mit Kupferacetat-Zusatz. Im Text werden R_{Leu} -Werte angegeben.

¹⁸ Brit. Pharmacopea 1963, 1134.

Die geschützten Peptide wurden mit Chromschwefelsäure und nachfolgendem Erhitzen auf 200° sichtbar gemacht. Es werden die R_F -Werte angegeben.

Hochvoltektrophorese (HVE) der Abbauprodukte des natürlichen und synthetischen Peptides

Diese erfolgte in einer Apparatur mit festen Wärmeaustauschern in einem Pyridin—Essigsäurepuffer von pH 4,7 auf Schleicher & Schüll-Papier 2043 b.

Angegeben werden die auf Lysin (R_{Lys}) bzw. Asparaginsäure (R_{Asp}) bezogenen Wanderungsgeschwindigkeiten.

Hydrierung

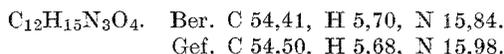
Die Hydrierung der in Methanol unlöslichen, geschützten Peptide erfolgte in Suspension mit PdO_2 . Aufgearbeitet wurden die nach der p-Nitrophenylmethode in *DMFA* hergestellten, geschützten Peptide durch Konzentrieren der *DMFA*-Lösung in einem Rotationsverdampfer bei 10° und 10⁻⁴ Torr. Zur Analyse wurde 1 Stde. bei 100° und 10 Torr getrocknet.

Durchführung der Synthese

Carbobenzoxy-asparaginsäure-diamid (I)

20 g Carbobenzoxy-asparagin-p-nitrophenylester wurden in 800 ml heißem Äthanol gelöst, 200 ml konz. wäßr. NH_3 nach dem Erkalten zugesetzt und mehrere Tage bei Zimmertemp. stehen gelassen. Nach dem Eindampfen der Lösung im Vak. wurde das Kristallisat abgesaugt, mit Äthanol gewaschen und aus *DMFA*—Äther umkristallisiert. Ausb. 10,35 g, d. s. 76% d. Th. Schmp. 208—214° C.

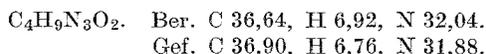
$$[\alpha]_D^{22} = + 14,3^\circ \quad R_F = 0,68 \text{ (LM3); } 0,78 \text{ (LM4).}$$



Asparaginsäure-diamid (II)

8,15 g I wurden in 300 ml Methanol mit 0,5 g PdO_2 über Nacht hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Abdampfen des Lösungsmittels bei 12 Torr kristallisierte das Asparaginsäure-diamid aus. Zur Analyse wurde ein Teil der Substanz aus Äthanol umkristallisiert. Ausb. 3,87 g, d. s. 96% d. Th. Schmp. 136—138°.

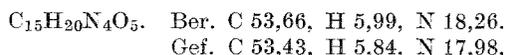
$$[\alpha]_D^{22} = + 13,4^\circ \quad R_{Leu} = 0,51 \text{ (LM1); } 0,82 \text{ (LM2); } R_{Lys} = 1,21 \text{ (HVE).}$$



Carbobenzoxy-alanyl-asparaginsäure-diamid (III)

Obige Substanz (II) wurde bei 0° in 85 ml *DMFA* mit 6,86 g Carbobenzoxy-alanin und 6,34 g *DCCI* umgesetzt und mehrere Tage bei Zimmertemp. stehen gelassen. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen Harnstoffes wurde die Lösung bei 10⁻³ Torr konzentriert und anschließend mit Äther gefällt. Nach dem Auskochen mit Methanol war die Ausb. 6,65 g, d. s. 67% d. Th. Schmp. 240—242°.

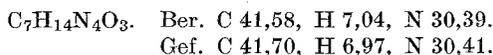
$$[\alpha]_D^{22} = - 10,8^\circ \quad R_F = 0,67 \text{ (LM 3); } 0,81 \text{ (LM 4).}$$



Alanyl-asparaginsäure-diamid (IV)

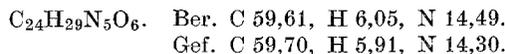
6,1 g Carbobenzoxy-alanyl-asparaginsäure-diamid wurden in 300 ml Methanol mit 0,3 g PdO₂ bis zur dünnschichtchromatographisch nachgewiesenen, vollständigen Abspaltung der Schutzgruppe hydriert, im Vak. eingedampft und ein Teil zur Analyse aus Äthanol umkristallisiert. Ausb. 3,42 g, d. s. 93,5% d. Th. Schmp. 184—186°.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = + 39,8^{\circ}; R_{\text{Leu}} = 0,42 \text{ (LM 1); } 0,68 \text{ (LM 2); } R_{\text{Lys}} = 0,90 \text{ (HVE)}.$$

*Carbobenzoxy-phenylalanyl-alanyl-asparaginsäure-diamid (V)*

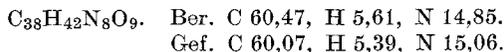
3,35 g des Dipeptid-diamids (IV) wurden in 80 ml DMFA mit 7,0 g Carbobenzoxy-phenylalanin-p-nitrophenylester mehrere Tage bei Zimmertemp. stehen gelassen; anschließend wurde die Lösung durch Abdampfen des Lösungsmittels im Hochvak. konzentriert und der Rückstand mit Äther gefällt. Es wurde aus siedendem Methanol umkristallisiert. Ausb. 7,35 g, d. s. 91,5% d. Th. Schmp. 231—233°.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = - 13,0^{\circ} R_{\text{F}} = 0,72 \text{ (LM3); } 0,72 \text{ (LM4)}.$$

*Di-carbobenzoxy-histidyl-phenylalanyl-alanyl-asparaginsäure-diamid (VI)*

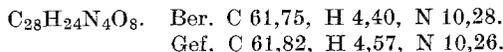
1,8 g geschütztes Tripeptid-diamid (V) wurden in 200 ml Methanol mit 0,1 g PdO₂ hydriert und die Lösung im Vak. eingedampft. Die aus Methanol—Äther erhaltliche amorphe Substanz war chromatographisch und elektro-phoretisch einheitlich und wurde mit 2,04 g Di-carbo-benzoxy-histidin-p-nitrophenylester* in 12 ml DMFA mehrere Tage stehen gelassen. Das durch Ätherfällung erhaltliche Rohprodukt schmilzt nach dem Auskochen mit Methanol bei 184—186°. Ausb. 2,6 g, d. s. 92,5% d. Th.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = - 12,0^{\circ}. R_{\text{F}} = 0,71 \text{ (LM3); } 0,90 \text{ (LM4)}.$$

*Carbobenzoxy-glutamyl-γ-benzylester-histidyl-phenylalanyl-alanyl-asparaginsäure-diamid (VII)*

1,95 g geschütztes Tetrapeptid-diamid (VI) wurden mit 20 ml 2,5 n HBr/Eisessig eine Stunde bei Zimmertemp. stehen gelassen. Das mit Äther gefällte Hydrobromid wurde nach dem Absaugen und Waschen in absol. Methanol gelöst und über eine Säule mit Amberlite IRA-45 (OH-Form) geschickt. Das stark basische Eluat wurde im Vak. zur Trockene gebracht und

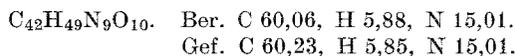
* Hergestellt durch Kondensation von p-Nitrophenol mit Di-Cbo-His in Essigester. Ausb. 30% d. Th. Schmp. 107—108° (aus Methanol umkrist.)



Die Substanz zersetzt sich bei Zimmertemp. innerhalb weniger Wochen unter Abspaltung von p-Nitrophenol.

erwies sich als elektrophoretisch (R_{Lys} 0,75) und dünn-schichtchromatographisch [$R_{\text{Leu}} = 0,22$ (LM 1); 1,05 (LM 2)] einheitlich. Da alle Versuche zur Kristallisation fehlschlagen, wurde mit 1 g Carbobenzoxy-glutamyl- γ -benzylester- α -p-nitrophenylester in 28 ml DMFA umgesetzt. Nach mehrtäg. Stehen wurde mit Äther gefällt, das so erhaltene Rohprodukt aus Eisessig—Äther umgefällt und anschließend mit Methanol ausgekocht. Ausb. 1,8 g, d. s. 83% d. Th. Schmp. 232—234°.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -12,6^{\circ}. R_F = 0,71 \text{ (LM3)}; 0,66 \text{ (LM4)}.$$



Carbobenzoxy-alanyl-glutamyl-histidyl-phenylalanyl-alanyl-asparaginsäure-diamid (VIII)

1,35 g geschütztes Pentapeptid-diamid (VII) wurde in einer Mischung von 200 ml Methanol und 15 ml Eisessig mit 0,26 g PdO₂ bis zur chromatograph. nachgewiesenen, vollständigen Abspaltung der Schutzgruppen hydriert. Nach Filtration und Eindampfen im Vak. wurde der elektrophoretisch ($R_{\text{Lys}} = 0,43$) und dünn-schichtchromatographisch [$R_{\text{Leu}} = 0,19$ (LM 1); 0,77 (LM 2)] einheitliche Rückstand mit 20 ml DMFA versetzt und das Lösungsmittel im Hochvak. abgedampft. Man nahm den Rückstand in 10 ml DMFA auf und versetzte mit 0,75 g Carbobenzoxy-alanyl-p-nitrophenylester, gab Triäthylamin bis zur schwach basischen Reaktion zu und ließ 48 Stdn. stehen. Schließlich wurde mit Äther gefällt und die Rohsubstanz mit Methanol ausgekocht. Ausb. 1,0 g, d. s. 76% d. Th. Schmp. 203—204°

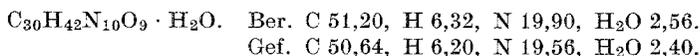
$$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -23,4^{\circ}. R_F = 0,59 \text{ (LM3)}; 0,67 \text{ (LM4)}.$$



Alanyl-glutamyl-histidyl-phenylalanyl-alanyl-asparaginsäure-diamid (IX)

0,35 g (VIII) wurden in einer Mischung von 200 ml Methanol—Wasser (1 : 1) mit 0,5 g PdO₂ hydriert. Nach dem Eindampfen im Vak. wurde der Rückstand in 12 ml H₂O aufgenommen, filtriert und lyophilisiert. Ausb. 0,29 g amorpher Substanz, d. s. 96,5% d. Th. Schmp. 150—152°.

$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -11,2^{\circ}$ ($c = 0,5$). $R_{\text{Leu}} = 0,15$ (LM1), 0,74 (LM2), $R_{\text{Lys}} = 0,40$ (HVE).



Aminosäureanalyse (Aminosäurereste berechnet auf 1 Mol Hexapeptid-diamid): 2,16 Ala; 0,98 Glu; 0,88 His; 0,98 Phe; 0,94 Asp.

Für die Durchführung der quantitativen Aminosäureanalyse danken wir Herrn Dr. M. Weiser, Chemisches Institut der Tierärztlichen Hochschule, Wien.

Die Mikroanalysen wurden in dankenswerter Weise von Herrn H. Bieler, Organ. Chemisches Institut der Universität Wien, durchgeführt.