

## Festphasensynthese von 2-L- und 3-D-Pipecolinsäure-bradykinin

Von

K. Neubert\*, L. Balásperi und G. Losse

Aus der Sektion Chemie der Technischen Universität Dresden, DDR  
und dem Institut für Organische Chemie der Universität Szeged, Ungarn

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 8. November 1971)

### *Solid Phase Synthesis of 2-L- and 3-D-Pipecolic Acid-Bradykinin*

2-L- and 3-D-Pipecolic acid-bradykinin were synthesized using the general procedure of *Merrifield* and the adsorption coupling method of *Esko* and *Karlsson*. Acetic anhydride, 3-nitrophthalic anhydride, and N-acetylimidazole were compared with respect to their efficiency as blocking agents for unreacted amino groups. 2-L-pipecolic acid-bradykinin was biologically active.

2-L- und 3-D-Pipecolinsäure-Bradykinin wurden nach der üblichen *Merrifield*-Technik bzw. nach dem „Adsorptionskupplungs-Verfahren“ von *Esko* und *Karlsson* dargestellt. Dabei wurde die Eignung von Essigsäureanhydrid, 3-Nitrophthalsäureanhydrid und N-Acetylimidazol für die Blockierung während der Synthese freigebliebener Aminogruppen verglichen. 2-L-Pipecolinsäure-bradykinin war biologisch aktiv.

Der Austausch der Prolinreste in Position 2 und 3 im Bradykininmolekül durch andere proteinogene Aminosäuren beeinträchtigt die biologische Aktivität nur geringfügig<sup>1</sup>.

Im Rahmen von Struktur-Wirkungs-Untersuchungen interessierte der Austausch von Prolin in Position 2 und 3 gegen die nicht-proteino-gene L- bzw. D-Pipecolinsäure („Homoprolin“).

In der Literatur sind bisher drei Arbeiten über den Austausch von L-Prolin gegen L-Pipecolinsäure, nämlich im Bradykinin<sup>2</sup>, Oxytocin<sup>3</sup> und Angiotensin II<sup>4</sup> bekannt. Das von *Nicolaidis* und Mitarb. synthetisierte 3-L-Pipecolinsäure-Bradykinin war biologisch inaktiv<sup>2</sup>.

\* Gegenwärtige Adresse: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Sektion Biowissenschaften, Fachbereich Biochemie, DDR-402 Halle (Saale).

Abkürzungen entspr. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. *J. biol. Chem.* **241**, 527, 2491 (1966); *Pipec*: Pipecolinsäure, *DCCI*: N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, *Boc*: tert. Butyloxycarbonyl.

Zum Aufbau der beiden Analoga wurde die Festphasen-Methode<sup>5, 6</sup> herangezogen. Ein wichtiges Problem bei dieser Technik ist ein quantitativer Umsatz auf jeder Kupplungsstufe, um Rumpf- und Fehlsequenzen<sup>7, 8</sup> zu vermeiden. Da selbst ein mehrfacher Überschuß an Acylierungsreagens keine Garantie für eine vollständige Kupplung darstellt<sup>9-12</sup>, sind in der Literatur eine Reihe von Methoden zur Blockierung noch freier Aminogruppen vorgeschlagen worden<sup>5, 13-17</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige Blockierungsreagentien auf ihre Wirksamkeit untersucht. Nach jedem Peptidknüpfungsschritt wurden die freigebliebenen Aminogruppen bei der Synthese von 2-L-Pipecolinsäurebradykinin (I) mit Essigsäureanhydrid<sup>5, 13, 17</sup>, beim 3-D-Pipecolinsäurebradykinin (II) mit 3-Nitrophthalsäureanhydrid<sup>15</sup> und N-Acetylimidazol<sup>16</sup> umgesetzt.

Die für beide Synthesen verwendeten Aminosäure-Derivate, *Boc-Arg*(NO<sub>2</sub>), *Boc-Phe*, *Boc-Pro*, *Boc-Gly*, *Boc-Ser*(Bzl), *Boc-L-* und *Boc-D-Pipec* waren dünnstichtchromatographisch in mehreren Systemen einheitlich, Schmelzpunkte und Drehwerte entsprachen den Literaturwerten<sup>18, 19</sup>.

O-Benzyl-Serin war nur über das aufwendige Racemat-Spaltungsverfahren nach<sup>20</sup> zugänglich.

Versuche einer direkten O-Benzylieerung von *Boc-Serin* (anschließende Verseifung der Benzylesterbindung) bzw. dessen 2,4-Dinitrophenylester mit Benzyljodid in Dioxan in Gegenwart von Triton B oder Bariumoxid lieferten die gewünschten Produkte in etwa 15% Ausbeute. Dabei bereitete die Abtrennung unerwünschter Nebenprodukte Schwierigkeiten.

Bei beiden Ketten wurde von 5 g mit 2% Divinylbenzol vernetztem Polystyrol (Chlormethylierungsgrad 1,13 mÄq. Chlor/g Harz) ausgegangen, welches mit äquivalenten Mengen *Boc-N<sup>G</sup>-Nitroarginin* und Triäthylamin in Äthanol bis zu 1,75 mMol Aminosäure beladen wurde (Methode 2, Tab. 1: Beladungsgrad auf 1 g Harz bezogen).

Tabelle 1. Aminosäurebeladung des Trägers

Methode	mMol Aminosäure/g subst. Harz
1. Chlor, Differenz vor und nach der Veresterung (potent. Titration nach <i>Eschka</i> -Aufschluß) . . . . .	0,47
2. Chloridtitration nach <i>Boc</i> -Abspaltung und Behandlung mit Triäthylamin . . . . .	0,35
3. Ninhydrin-Kolorimetrie <sup>28</sup> (515 nm) nach Totalhydrolyse mit 6 <i>n</i> -wäBr. HCl/Eisessig (24 Std.) . . . . .	0,36
4. Ninhydrin-Kolorimetrie (515 nm) nach HBr/ <i>TFA</i> -Einwirkung (1 Stde.) . . . . .	0,25

Die relativ große Diskrepanz der gefundenen Werte für die Aminosäurebeladung am Träger könnte so interpretiert werden, daß Methode 1 die gesamte gebundene Aminosäure am Harz bestimmt; Methode 2 und 3 den zur Kettenverlängerung nutzbaren und 4 den nach Endabspaltung verfügbaren Aminosäure- (bzw. Peptid)-Anteil.

Die Abspaltung der *Boc*-Schutzgruppe wurde mit *n*-HCl/Eisessig (Einwirkungsdauer 40 Min.) vorgenommen; anschließend wurde mit 10proz. Triäthylamin in *DMF* neutralisiert.

Durch potentiometrische Titration des im Eluat befindlichen Triäthylaminhydrochlorids wurden die für den nächsten Syntheseschritt zur

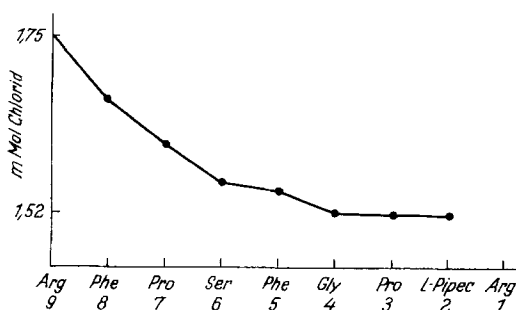


Abb. 1. Titration von Triäthylaminhydrochlorid im Verlauf der Synthese von 2-L-Pipec-Bradykinin

Verfügung stehenden freien Aminogruppen bestimmt (Abb. 1; im Falle des 3-D-Pipec-Bradykinins ergab sich eine völlig analoge Kurve).

Danach ergibt sich eine Verringerung an freien Aminogruppen um 0,23 (I) bzw. 0,25 (II). Für den anfangs besonders hohen Abfall könnten Stabilitätsunterschiede (acidolytische Selektierung) in der als Ankergruppe dienenden Benzylesterbindung (Stellung innerhalb der Polymerkette; o,p-Substitution) verantwortlich sein. Tatsächlich fanden wir, wie schon früher<sup>21</sup>, nach Entfernen der *Boc*-Gruppe vom Nitroarginin unter obigen Acidolysebedingungen im Filtrat eine Benzylesterspaltung von 1—2% (Ninhydrin-Kolorimetrie), bei 3stdg. Einwirkung über 4%.

Der Kettenaufbau erfolgte bei 2-L-Pipecolinsäure-Bradykinin (I) nach der *Merrifield*-Technik<sup>6</sup>, bei 3-D-Pipecolinsäure-Bradykinin (II) nach dem Adsorptionskupplungs-Verfahren von *Esko* und *Karlsson*<sup>22</sup>. Um nahezu vollständigen Umsatz zu erreichen, wurde in beiden Fällen jeder Peptidknüpfungsschritt unter gleichen Bedingungen wiederholt. Schließlich wurden freigebliebene Aminogruppen\* am Harz bei (I) mit

\* *Dorman*-Analytik<sup>23</sup>.

Tabelle 2. mMol freie Aminogruppen im Verlauf der Synthese von 2-L-Pipecolinsäure-Bradykinin (bez. auf 5 g Harz)

Kupplungs-/ Blockierungs- methode	1 <i>Arg(NO<sub>2</sub>)</i>	2 <i>L-Pipec</i>	3 <i>Pro</i>	4 <i>Gly</i>	5 <i>Phe</i>	6 <i>Ser(Bzl)—Pro—Phe</i>	7	8	9 <i>Arg(NO<sub>2</sub>)</i>
Merrifield-Technik, 4 Äq. <i>Boc</i> -Aminosäure, $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1 h; 4 Äq. <i>DCCI</i> 12 h	0,30	0,20	0,17	0,13	0,19		0,14		0,07
Nachkupplung, gl. Bedingungen	0,29	0,18	0,14	0,13	0,13		—		
$\text{Ac}_2\text{O}/\text{Et}_3\text{N}$ , 10 Äq., $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 2 h	0,27	0,17	0,14	0,13	0,12		0,12		

Tabelle 3. mMol freie Aminogruppen im Verlauf der Synthese von 3-D-Pipecolinsäure-Bradykinin (bez. auf 5 g Harz)

Kupplungs-/ Blockierungs- methode	1 <i>Arg(NO<sub>2</sub>)</i>	2 <i>Pro</i>	3 <i>D-Pipec</i>	4 <i>Gly</i>	5 <i>Phe</i>	6 <i>Ser(Bzl)—Pro—Phe</i>	7	8	9 <i>Arg(NO<sub>2</sub>)</i>
Adsorptions- Kupplung 5 Äq. <i>Boc</i> - Aminosäure, $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 5 h (abgesaugt, nachgewaschen); 2 Äq. <i>DCCI</i> $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 2 h	0,32	0,21	0,20	0,15	0,23		0,13		0,07
Nachkupplung, gl. Bedingungen	0,28	0,18	0,17	0,14	0,14		—		
3-Nitrophthal- säureanhydrid/ Triäthylamin 10 Äq., <i>DMF</i> , 2 h	0,28	0,18	0,16	0,14	0,12		0,11		
N-Acetylimidazol 10 Äq., $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 2 h	0,22	0,17	0,16	0,13	0,11		0,11		

Essigsäureanhydrid, bei (II) mit 3-Nitrophthalsäureanhydrid und N-Acetylimidazol blockiert (Tab. 2, 3).

Die Ergebnisse zeigen, daß die Methode der Adsorptionskupplung und die *Merrifield*-Technik vergleichbare Werte liefern. Bei beiden Verfahren bereitet die Anknüpfung von *Boc-Arg* ( $\text{NO}_2$ ) an Prolin bzw. Pipecolinsäure besondere Schwierigkeiten. Da auch eine Nachkupplung auf keiner Stufe quantitativen Umsatz brachte, muß gefolgert werden, daß die Guanidino-gruppen des Nitroarginins bei der *Dorman*-Methode zusätzlich Protonen binden und Restaminogruppen vortäuschen. Tatsächlich wurden von einer Probe *Boc-Arg*( $\text{NO}_2$ )-Polymeres nach Behandlung mit Pyridinhydrochlorid durch Triäthylamin 0,014 mMol Chlorid/g Harz eluiert. Auch unter Berücksichtigung dieses Fehlbetrages ergeben sich aber für die einzelnen Peptidknüpfungsschritte unvollständige Umsätze.

Der Einsatz der drei hier untersuchten Acetylierungsreagentien brachte zwar eine Verminderung, aber keine völlige Blockierung freier Amino-gruppen. Dabei erwies sich N-Acetylimidazol wirksamer als  $\text{Ac}_2\text{O}$  oder 3-Nitrophthalsäureanhydrid.

Beide Bradykininanaloga wurden vom Träger mit  $\text{HBr}/\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  abgespalten und anschließend die Nitrogruppen des Arginins mit wasserfr.  $\text{HF}^{24, 25}$  unter Zusatz von Anisol entfernt.

2-L-Pipecolinsäure-Bradykinin fiel in 47proz., 3-D-Pipecolinsäure-Bradykinin in 52proz. Ausbeute, bezogen auf 1,75 mMol harzgebundenes Nitroarginin, an.

Diese Produkte wiesen bei der Dünnschichtchromatographie in drei Laufmitteln (*D*, *E*, *F*) eine (I) bzw. zwei (II) Verunreinigungen auf. Nach Reinigung durch Ionenaustauschchromatographie<sup>26, 27</sup> an einem schwach sauren Kationenaustauscher (Gradientenelution mit Essigsäure; Verunreinigungen wurden vorher eluiert) betrug die Ausbeute, bez. auf trägergebundenes Nitroarginin, für 2-L-*Pipec*- 31% und für 3-D-*Pipec*-Bradykinin 28% (Physikal. Konstanten: Tab. 4).

Die biologische Aktivität der Bradykinin-Analoga wurde am isolierten Meerschweinchenileum geprüft. Die statistische Auswertung erfolgte

Tabelle 4. Physikalische Konstanten der Bradykinin-Analoga

	Schmp., °C	$[\alpha]_D^{20}$ 1m-AcOH	Aminosäureverhältnis						N-Analyse** Ber.: 16,8
			Arg	Pro	Pipec*	Gly	Ser	Phe	
2-L- <i>Pipec</i> - Bradykinin	183—187	—74,2° ( <i>c</i> = 0,44)	1,9	2,0	0,9	1,0	0,9	2,2	Gef.; 16,5
3-D- <i>Pipec</i> - Bradykinin	192—196	—57,2° ( <i>c</i> = 0,35)	1,8	1,8	0,8	1,1	1,0	2,1	Gef.: 17,1

\* Bezogen auf Pipecolinsäure als Standard.

\*\*  $\text{C}_{51}\text{H}_{75}\text{N}_{15}\text{O}_{11} \cdot 3 \text{CH}_3\text{COOH}$  (1254,3).

nach der Varianzanalyse. Die Testung gegen Standard „Bradykinin BRS 640“, SANDOZ (Schweiz) (Aktivität = 100%) ergab folgende Ergebnisse:

2-L-*Pipec*-Bradykinin  $4,6 \pm 6\%$

3-D-*Pipec*-Bradykinin inaktiv.

Unser Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. *Wieggershausen*, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Rostock, für die biologischen Aktivitätsuntersuchungen und Frau Dr. I. *Marquardt*, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. H. *Hanson*) für die Ausführung der Aminosäureanalysen. Herrn Dr. R. *Schwarz*, VEB Berlin-Chemie, danken wir für die Bereitstellung der Fluorwasserstoff-Apparatur.

#### Beschreibung der Versuche

Alle Lösungsmittel waren absolut wasserfrei und destilliert. Für die Dünnschichtchromatographie dienten folgende Laufmittel:

A:  $\text{CHCl}_3$  :  $\text{CH}_3\text{OH}$  : Eisessig = 85 : 10 : 5 (*v/v/v*)

B:  $\text{CHCl}_3$  : Eisessig = 95 : 5

C: 1-Butanol : Eisessig :  $\text{H}_2\text{O}$  = 67 : 16,5 : 16,5

D: 2-Butanol :  $\text{HCOOH}$  :  $\text{H}_2\text{O}$  = 75 : 13,5 : 11,5

E: 2-Butanol : 10proz.  $\text{NH}_3$  = 85 : 15

F: 1-Butanol : Eisessig : Pyridin :  $\text{H}_2\text{O}$  = 50 : 12,5 : 12,5 : 25.

Die opt. Drehung wurde mit einem Zeiss-Kreispolarmeter (Genauigkeit  $\pm 0,05^\circ$ ) gemessen.

#### Darstellung der Aminosäure-Derivate

Alle *Boc*-Aminosäuren wurden nach der „pH-Stat“-Methode von *Schnabel*<sup>18</sup> synthetisiert. Sie waren dünnschichtchromatographisch in den Laufmitteln A, B, C einheitlich und wurden über  $\text{P}_2\text{O}_5/\text{KOH}$  im Vak. getrocknet.

Aminosäure-Derivat	Schmp., °C, korr.	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$	Ausb., %
<i>Boc-Arg</i> ( $\text{NO}_2$ )	118—120	— $6^\circ$ ( $c = 2$ ; DMF)	79
<i>Boc-Phe</i>	87—88	— $4,2^\circ$ ( $c = 4$ ; Eisessig)	84
<i>Boc-Ser</i> (Bzl)			
aus dem $\triangleq$ <i>DCHA</i> -Salz	Öl	+ $19,6^\circ$ ( $c = 2$ ; Äthanol 80%)	74
<i>Boc-Gly</i>	88—90		83
<i>Boc-Pro</i>	136—138	— $70^\circ$ ( $c = 1$ ; Eisessig)	95
<i>Boc-Pipec</i>	124—125	— $56^\circ$ ( $c = 1$ ; Eisessig)	77
<i>Boc-D-Pipec</i>	123—124	+ $57^\circ$ ( $c = 1$ ; Eisessig)	80

*Chlormethylierung des Harzes*

50 g Styrol/2% DVB-Copolymerisat (Hersteller: Chemie-Kombinat Bitterfeld, DDR), Teilchendurchmesser 40–80  $\mu$ , wurden unter Rühren mit Dioxan, Methanol, Methanol/HCl<sub>konz.</sub> (5 : 1), Wasser, Dioxan und Methanol gewaschen und im Vak. bei 90° C getrocknet.

25 g dieses Materials werden in 150 ml Monochlordimethyläther (etwa 85proz.) 90 Min. gequollen und nach *Merrifield*<sup>27</sup> chlormethyliert; das Harz wurde mit 400 ml Dioxan/Wasser (3 : 1); 400 ml Dioxan/3*n*-HCl (3 : 1); 200 ml Dioxan/Wasser (1 : 1); 500 ml Wasser; 200 ml Dioxan/Wasser (1 : 1); 400 ml Dioxan; 200 ml Dioxan/Methanol (1 : 3); 400 ml Methanol gewaschen, bei 80° C im Vak. getrocknet und nach *Eschka*-Aufschluß potentiometrisch titriert. Beladung: 1,13 mÄq. Chlor/g Harz  $\hat{=}$  4% Chlor.

*Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-O-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-Polymer (Veresterung)*

In eine Lösung von 7,2 g (22,6 mMol) *Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)* und 3,15 ml (22,6 mMol) *Et<sub>3</sub>N* in 40 ml Äthanol werden 20 g Chlormethylharz (22,6 mMol Cl) suspendiert und 60 Stdn. bei 75° C gerührt.

Das Harz wird abgesaugt, mit Äthanol, Wasser, Methanol gewaschen und im Vak. bei 40° C getrocknet. Zur Bestimmung des Nitroarginin-Gehaltes wurde die *Boc*-Schutzgruppe mit *n*-HCl/Eisessig entfernt, das Hydrochlorid mit Triäthylamin zersetzt und im Filtrat Cl<sup>-</sup> potentiometrisch bestimmt: 0,35 mMol/g Harz; Ninhydrin/Hydrindantin-Kolorimetrie<sup>28</sup> bei 515 nm ergab nach Totalhydrolyse einer Harzprobe mit 6*n*-wäßr. HCl/Eisessig (1:1) durch 24stdg. Kochen unter Rückfluß 0,36 mMol/g Harz.

*Aufbau von Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Piphec-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-Polymer*

5 g *Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Polymer* [1,75 mMol *Arg(NO<sub>2</sub>)*] wurde in einem 100-cm<sup>3</sup>-Reaktionsgefäß nach *Merrifield*<sup>6</sup> 8mal den in Tab. 5 aufgeführten Reaktionsschritten eines Verlängerungszyclus unterworfen.

In den Waschlösungen der Schritte 6 und 7 wurde nach Ansäuern mit *n*-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> das eluierte Chlorid potentiometrisch bestimmt.

Nach jedem Synthesecyclus wurde das Harz mit 25 ml 0,3*m*-Lösung von Pyridinhydrochlorid in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 10 Min. behandelt, 4mal mit jeweils 35 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Äthanol und *DMF* nachgewaschen, anschließend 10 Min. 2,5 ml Triäthylamin in 25 ml *DMF* einwirken gelassen und 4mal mit 35 ml *DMF* gewaschen. Das im Eluat enthaltene Chlorid wurde nach Ansäuern potentiometrisch titriert.

Nach Waschen des Harzes mit Äthanol wurde der Peptidknüpfungsschritt (Reaktionsschritte 8–14, Tab. 5) wiederholt.

*Blockierung freier Aminogruppen mit Ac<sub>2</sub>O/Et<sub>3</sub>N*<sup>5, 13, 14</sup>

Man schüttelt das Harz mit einer Lösung von je 10 Äq. (17,5 mMol) Essigsäureanhydrid (1,79 g) und Triäthylamin (2,45 ml) in 25 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 2 Stdn. bei Raumtemp. Danach wird 4mal mit 35 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und Äthanol gewaschen.

Tabelle 5. Schema eines Verlängerungszyclus nach Merrifield

Reaktionsschritte		Reagens	ml	Wiederholung	Min., je
Abspaltung d. Boc-Gruppe	1	Eisessig	35	4	5
	2	<i>n</i> -HCl/Eisessig	35	—	40
	3	Eisessig	35	4	5
	4	Äthanol	35	4	5
	5	<i>DMF</i>	35	4	5
Freisetzen d. Aminogruppe	6	<i>DMF</i> /Triäthylamin	35+3,5	—	15
	7	<i>DMF</i>	35	4	5
	8	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	35	3	5
Peptid-Knüpfung	9	7 mMol Boc-Aminosäure in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> *	25—30	—	60
	10	7 mMol <i>DCCI</i> ; CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5	—	12 Std.
	11	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	35	4	5
	12	Äthanol	35	3	5
	13	<i>DMF</i>	35	3	5
	14	Äthanol	35	3	5

\* *Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)* wurde in *DMF* eingesetzt.

Aufbau von Boc—Arg(NO<sub>2</sub>)—Pro—D—Piphec—Gly—Phe—Ser(Bzl)—Pro—Phe—Arg(NO<sub>2</sub>)—O—CH<sub>2</sub>—C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>—Polymer

Mit 5 g *Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)*-Polymer [1,75 mMol *Arg(NO<sub>2</sub>)*] wurden bis auf den Peptidknüpfungsschritt die gleichen Operationen wie bei der Synthese von 2-L-Pipicolinsäure-Bradykinin beschrieben, ausgeführt. Im Reaktionsschritt 9 (Tab. 5) wurde das Harz mit 8,75 mMol *Boc-Aminosäure* in 30 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 5 Stdn. geschüttelt, abgesaugt und 3mal mit 25 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gewaschen (Filtrat enthielt durchschnittlich 5 mMol eingesetztes Aminosäure-Derivat).

Danach wurden 3,5 mMol *DCCI* in 30 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> zugegeben, 2 Stdn. geschüttelt, abgesaugt und gewaschen.

#### Blockierung freier Aminogruppen mit 3-Nitro-phthalsäureanhydrid<sup>15</sup>

Das Polymere wurde mit 10 Äq. (17,5 mMol  $\underline{\underline{=}}$  3,38 g) Blockierungsreagens in 30 ml *DMF* zunächst 20 Min. nach Zugabe von 2,45 ml (17,5 mMol) Triäthylamin 2 Stdn. geschüttelt und 4mal mit jeweils 35 ml *DMF*, Dioxan und Äthanol nachgewaschen.

#### Blockierung freier Aminogruppen mit *N*-Acetylimidazol<sup>16</sup>

10 Äq. Acetylierungsmittel (17,5 mMol  $\underline{\underline{=}}$  1,93 g) werden in 30 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> mit dem Harz und 2 Stdn. geschüttelt. Anschließend wird 4mal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und Äthanol (jeweils 35 ml) gewaschen.



*Abspaltung der Nonapeptide vom Träger*

Das Peptidharz wird in der für die Synthese benutzten Apparatur in 40 ml Trifluoressigsäure suspendiert und unter Schütteln 50 Min. HBr (sorgfältig über Tetralin und Phenol/Eisessig gereinigt; hergestellt aus Tetralin und Brom) durchgeleitet. Nach Absaugen und 4maligem Waschen mit 25 ml *TFA* wurden die Filtrate im Vak. bei 20 °C eingedampft, der Rückstand mit Äther verrieben, abfiltriert, mit Äther gewaschen und im Vak. über  $P_2O_5/KOH$  getrocknet. Da beide Sequenzen nur in etwa 40% Ausbeute anfielen, wurde die Abspaltung unter gleichen Bedingungen wiederholt.

Gesamtausbeute, bezogen auf 1,75 mMol harzgebundenes Nitroarginin für 2-L-*Pipec*-Bradykinin 1,0 g (47% d. Th.) und 3-D-*Pipec*-Bradykinin 1,11 g (52% d. Th.).

Bei dieser Behandlung wird gleichzeitig die O-Benzylschutzgruppe vom Serin entfernt.

*Abspaltung der N<sup>G</sup>-Nitrogruppen von Arginin*

Die Entfernung der N<sup>G</sup>-Nitro-Schutzgruppen des Arginins erfolgte in der von *Sakakibara*<sup>24, 25</sup> beschriebenen Apparatur mit wasserfr. Fluorwasserstoff in Gegenwart von Anisol bei 20 °C innerhalb von 30 Min. Der Rückstand wurde mit Äther verrieben, abfiltriert, mit Äther gewaschen und über  $P_2O_5/KOH$  im Vak. getrocknet; Einsatz jeweils 610 mg (0,5 mMol), Ausb., bez. auf eingesetztes Produkt, etwa 98%.

*Reinigung der Bradykinin-Analoga mittels Ionenaustauschchromatographie*

Die Reinigung erfolgte am schwach sauren Kationenaustauscher Wofatit CP. 115 mg (0,1 mMol) Rohpeptid, gelöst in 1,2 ml 1*m*-Essigsäure wurde auf eine Säule (1,6 × 100 cm), äquilibriert mit 1*m*-Essigsäure, aufgetragen und bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 15 ml/Stde. mit 100 ml 6proz., 250 ml 12proz., 250 ml 20proz., 200 ml 30proz., 200 ml 35proz., 200 ml 40proz. und 200 ml 45proz. Essigsäure eluiert.

Die Detektion erfolgte durch Ultraviolettabsorption bei 254 nm gegen 1*m*-Essigsäure sowie spektralphotometrisch nach Anfärbung aliquoter Teile (0,3 ml) durch die *Sakaguchi*-Reaktion<sup>29</sup> bei 515 nm.

Die Fraktionen (jeweils 5 ml) zwischen 0,92 und 1,13 l wurden gesammelt und bei 25 °C im Vak. eingeeengt, der Rückstand mit Äther gewaschen und über  $P_2O_5/KOH$  im Vak. getrocknet.

Ausb., bezogen auf eingesetztes Rohpeptid, für 2-L-*Pipec*-Bradykinin 74 mg (59% d. Th.)  $\underline{\underline{\geq}}$  31%; für 3-D-*Pipec*-Bradykinin 68 mg (55% d. Th.)  $\underline{\underline{\geq}}$  28% (bez. auf 1,75 mMol harzgeb. Nitroarginin).

**Literatur**

<sup>1</sup> *E. Schröder* und *K. Lübke*, *The Peptides*, Vol. II, New York-London: Academic Press. 1966.

<sup>2</sup> *E. D. Nicolaidis*, *H. A. DeWald* und *M. K. Craft*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **104**, 15 (1963).

<sup>3</sup> *Ž. D. Bešpalova*, *O. A. Kairov*, *U. F. Martinov*, *V. U. Natoški*, *M. I. Titov* und *E. I. Sachmatova*, *Vest. Leningrad. Univ., Ser. Fiz. Chim.* **21**, 157 (1966).

- <sup>4</sup> N. C. Chaturvedi, W. K. Park, R. R. Smeby und F. M. Bumpus, *J. Med. Chem.* **13**, 177 (1970).
- <sup>5</sup> R. B. Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* **85**, 2149 (1963).
- <sup>6</sup> R. B. Merrifield, *Adv. Enzymol.* **32**, 221 (1969).
- <sup>7</sup> E. Bayer, H. Hagenmaier, G. Jung und W. König, in: *Peptides*, S. 162 (E. Bricas, Hrsg.). Amsterdam: North-Holland Publ. Co. 1968.
- <sup>8</sup> E. Bayer, H. Eckstein, K. Hägele, W. König, W. Brünning, H. Hagenmaier und W. Parr, *J. Amer. Chem. Soc.* **92**, 1735 (1970).
- <sup>9</sup> F. Weygand und R. Obermeier, *Z. Naturforsch.* **23b**, 1390 (1968).
- <sup>10</sup> H. Klostermeyer, *Chem. Ber.* **101**, 2823 (1968).
- <sup>11</sup> M. C. Khosla, N. C. Chaturvedi, R. R. Smeby und F. M. Bumpus, *Biochem. [Washington]* **7**, 3417 (1968).
- <sup>12</sup> S. Sano und M. Kurihara, *Z. Physiol. Chem.* **350**, 1183 (1969).
- <sup>13</sup> H. Hagenmaier, *Tetrahedron Letters* **1970**, 283.
- <sup>14</sup> J. Blake und C. H. Li, *J. Amer. Chem. Soc.* **90**, 5882 (1968).
- <sup>15</sup> Th. Wieland, Chr. Birr und H. Wissenbach, *Angew. Chem.* **81**, 782 (1969).
- <sup>16</sup> L. D. Markley und L. C. Dorman, *Tetrahedron Letters* **1970**, 1787.
- <sup>17</sup> H. Wissmann und R. Geiger, *Angew. Chem.* **82**, 937 (1970).
- <sup>18</sup> E. Schnabel, *Ann. Chem.* **702**, 188 (1967).
- <sup>19</sup> L. Balásipiri, B. Penke, J. Petres und K. Kovács, *Mh. Chem.* **101**, 1177 (1970).
- <sup>20</sup> E. Wünsch und H. Zwick, *Chem. Ber.* **97**, 2497 (1964).
- <sup>21</sup> G. Losse und K. Neubert, *Z. Chem.* **8**, 228 (1968).
- <sup>22</sup> K. Esko und S. Karlsson, *Acta Chem. Scand.* **24**, 1415 (1970).
- <sup>23</sup> L. C. Dorman, *Tetrahedron Letters* **1969**, 2319.
- <sup>24</sup> S. Sakakibara, Y. Shimonishi, M. Okada und Y. Kishida, *Peptides* 1966, S. 44 (H. C. Beyerman, Hrsg.), Amsterdam: North-Holland Publ. Co. 1967.
- <sup>25</sup> S. Sakakibara, Y. Shimonishi, Y. Kishida, M. Okada und H. Sugihara, *Bull. Chem. Soc. Japan* **40**, 2164 (1967).
- <sup>26</sup> St. Guttman und R. Boissonnas, *Helv. Chim. Acta* **42**, 1257 (1959).
- <sup>27</sup> R. B. Merrifield, *Biochem. [Washington]* **3**, 1385 (1964).
- <sup>28</sup> S. Moore und W. H. Stein, *J. biol. Chem.* **211**, 907 (1954).
- <sup>29</sup> C. J. Weber, *J. biol. Chem.* **86**, 217 (1930).