

Pentaethylbenzoic acid was produced in good yield by saponification of the amide with 100% phosphoric acid, while under the same conditions pentamethylbenzamide was completely decarboxylated to pentamethylbenzene.

The cyclisation of o-(pentaethylbenzoyl)-benzoic acid yielded an alkaline soluble, yellow compound, the constitution of which is being further investigated.

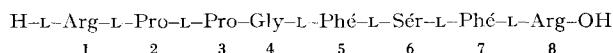
Technisch-chemisches Laboratorium
der Eidgenössischen Technischen Hochschule

183. Synthèse de la L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-L-arginine. Distinction entre cet octapeptide et la bradykinine¹⁾

par R. A. BOISSONNAS, St. GUTTMANN et P.-A. JAQUENOUD

(23. VI. 60)

La bradykinine obtenue par action de la trypsine sur le sang de bœuf a été isolée à l'état pur par ELLIOTT et coll.²⁾. Ces auteurs ont établi qu'il s'agissait d'un peptide auquel ils ont attribué la composition en acides aminés suivante: Arg₂Pro₂Phé₂Gly₁Sér₁. ZUBER & JAQUES³⁾ ont trouvé récemment la même composition en acides aminés pour la bradykinine obtenue par action du venin de serpent (*Bothrops Jararaca*) sur le sang de bœuf. Sur la base de dégradations d'EDMAN et d'attaques enzymatiques, ELLIOTT⁴⁾ a proposé récemment la structure provisoire suivante:



Dans le présent travail, nous décrivons trois synthèses de cet octapeptide, qui ont été effectuées selon le schéma de la page suivante⁵⁾.

Ces trois méthodes de synthèse ont conduit au même octapeptide protégé XXV à l'état analytiquement pur. La réduction catalytique a livré chaque fois le même octapeptide libre XXVI, dont l'homogénéité a été vérifiée par contre-courant, par chromatographie sur papier dans trois systèmes et par électrophorèse sur papier à six pH étages de 1,9 à 12,0.

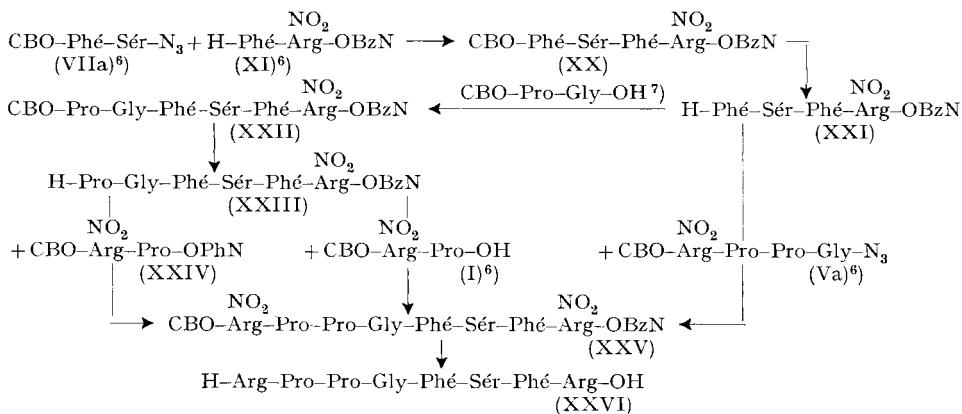
¹⁾ La synthèse et l'examen biologique de cet octapeptide ont déjà été mentionnés dans une communication préliminaire englobant également la synthèse et les propriétés biologiques de plusieurs autres analogues de la bradykinine (R. A. BOISSONNAS, St. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD, H. KONZETT & E. STÜRMER, *Experientia*, **16**, 326 (1960)).

²⁾ D. F. ELLIOTT, G. P. LEWIS & E. W. HORTON, *Biochem. J.* **74**, 15 P (1960); D. F. ELLIOTT, E. W. HORTON & G. P. LEWIS, *J. Physiology* **150**, 6 P (1960); D. F. ELLIOTT, *Polypeptides which affect smooth muscles and blood vessels*, Pergamon Press, p. 266 (1960).

³⁾ H. ZUBER & R. JAQUES, *Helv.* **43**, 1128 (1960).

⁴⁾ D. F. ELLIOTT, communication lue devant la «Biochemical Society (London)» le 8 avril 1960 (*Biochem. J.* **76**, 16 P (1960)). Nous remercions très vivement le Dr ELLIOTT de nous avoir communiqué peu avant publication le résultat de ses travaux sur la détermination de la structure de la bradykinine.

⁵⁾ CBO- = carbobenzoxy; -BzN = p-nitrobenzyle; -PhN = p-nitrophényle.



L'hydrolyse acide a fourni les acides aminés composants dans le rapport attendu.

Par réaction de cet octapeptide avec le 2,4-dinitrofluorobenzène selon SANGER et hydrolyse subséquente, nous avons obtenu la N-2,4-dinitrophényl-arginine. Aucune trace de dérivés 2,4-dinitrophénylés d'autres acides aminés n'a pu être décelée, ce qui indique qu'il s'est bien formé une chaîne peptidique normale.

Comme attendu, la leucine-aminopeptidase n'attaque pas l'extrémité N-terminale de la chaîne. La réduction catalytique du tétrapeptide intermédiaire XX donne de la H-Phé-Sér-Phé-Arg-OH (XXIa), qui est entièrement digérée par la leucine-aminopeptidase à partir de son extrémité N-terminale. Ce fait confirme que les acides aminés occupant les positions 5 à 8 sont bien de forme L. En outre, comme cette scission enzymatique est complète et donne de l'arginine exempte de toute trace de nitroarginine ou de produits de réduction intermédiaires de cette dernière, nous pouvons déduire que la réduction catalytique du groupe nitro fixé sur l'arginine se fait normalement. La pureté optique des acides aminés occupant les positions 1 à 3 ne peut pas être vérifiée par voie enzymatique conventionnelle; cependant, des études que nous avons effectuées avec des séquences partielles⁸⁾ ont montré qu'il ne devait y avoir ni racémisation, ni inversion dans nos conditions d'expérience. La forme L peut donc être attribuée à tous les acides aminés optiquement actifs présents dans la chaîne.

Nous avons également vérifié que le tétrapeptide XXI et l'hexapeptide XXIII ne contenaient pas de fluor, afin d'exclure la possibilité d'une éventuelle trifluoroacétylation de la sérine lors de la scission acidolytique du groupe CBO-.

Ces différents contrôles confirment que le produit obtenu possède bien la structure de l'octapeptide que nous nous étions proposé de synthétiser et dont la formule figure au début de ce travail.

Cependant les dosages biologiques¹⁾⁹⁾ nous ont révélé que cet octapeptide synthétique ne possède à aucun degré les activités caractéristiques de la bradykinine. Il

⁶⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN & P.-A. JAQUENOUD, Helv. 43, 1349 (1960).

⁷⁾ H. N. RYDON & P. W. G. SMITH, J. chem. Soc. 1956, 3642.

⁸⁾ ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, à publier.

⁹⁾ H. KONZETZ & E. STÜRMER, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy (sous presse).

est sans action sur l'iléum isolé de cobaye, sur la pression sanguine du rat et sur la bronchoconstriction expérimentale du cobaye¹⁰).

En outre, il diffère de la bradykinine par son comportement vis-à-vis de la chymotrypsine. En effet, cet enzyme scinde notre octapeptide synthétique plus rapidement entre les positions 5 et 6 qu'entre les positions 7 et 8. Il apparaît ainsi d'abord surtout un mélange formé du pentapeptide 1-5 et du tripeptide 6-8. Ce dernier se transforme peu à peu en arginine et en H-Sér-Phé-OH. Au contraire, la bradykinine soumise à l'action de la chymotrypsine ne donne d'abord naissance qu'à de l'arginine et à un nouveau peptide unique, qui n'est attaqué à son tour que plus lentement^{3,4}).

Ces faits nous portent à conclure que la bradykinine ne possède pas la structure provisoire proposée¹¹).

Note ajoutée à la correction: Il vient d'être établi par ELLIOTT et coll. ^{11bis}) que la bradykinine naturelle n'est pas un octapeptide, mais un nonapeptide possédant la structure dont nous avons précédemment décrit la synthèse^{1,6}).

Partie expérimentale¹²)

Pour le détail des abréviations et des méthodes générales utilisées voir travail précédent⁶).

N-CBO-L-Phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-nitro-L-arginate de p-nitrobenzyle (XX). On dissout 6,00 g (15 mmoles) de N-CBO-L-phénylalanyl-L-sérylhyclazide (VII)⁶) dans un mélange de 25 ml d'acide acétique glacial et de 25 ml de HCl 2N, refroidit à -5° et ajoute 3,2 ml de NaNO₂ 5N. Après 5 min, on ajoute 100 ml d'eau glacée et extrait le solide formé par trois portions de 50 ml d'acétate d'éthyle. On lave celui-ci par du K₂CO₃ 50% et séche sur du sulfate de sodium. On ajoute alors une solution de 6,7 g (13 mmoles) de L-phénylalanyl-nitro-L-arginate de p-nitrobenzyle dans 35 ml de diméthylformamide (préparée par agitation à -5° de 9,3 g (15 mmoles) de bromhydrate de L-phénylalanyl-nitro-L-arginate de p-nitrobenzyle (XI)⁶) dans un mélange de 100 ml d'acétate d'éthyle et de 150 ml de K₂CO₃ 20%, séparation de l'acétate d'éthyle, extraction par encore deux portions d'acétate d'éthyle, séchage et évaporation au vide des extraits organiques réunis, et reprise dans le diméthylformamide). On concentre jusqu'à un volume total de 100 ml par évaporation partielle de l'acétate d'éthyle au vide à 0°, laisse 16 h à 0° et 4 h à 20°, évapore au vide, triture le résidu avec 500 ml d'éther, décante l'éther et dissout le résidu dans 200 ml d'acétate d'éthyle bouillant. Après refroidissement, filtration, lavage à l'acétate d'éthyle et à l'éther, et séchage, on obtient 8,21 g (81%) de N-CBO-L-phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-nitro-L-arginate de p-nitrobenzyle cristallin de F. 170°, non modifié par recristallisation de l'acétate d'éthyle ou de l'éthanol. $[\alpha]_D^{21} = -13,3^\circ \pm 0,5^\circ$ (*c* = 1,0; diméthylformamide), -19,7° $\pm 0,5^\circ$ (*c* = 1,0; méthanol). Rf_M^a = 0,96; Rf_P^a = 0,68; Rf_A^a = 0,87; E_{1,9}^a = 0,8 Try; E_{5,8}^a = 0,7 Try (révélation par ninhydrine et chlore; homogène¹³)).

C ₄₂ H ₄₇ O ₁₂ N ₉	Calc. C 58,0	H 5,4	O 22,1	N 14,5 %
(869,9)	Tr. , 57,9	, 5,5	, 22,2	, 14,2 %

¹⁰) L'adjonction d'ions magnésium pendant ou après la réduction catalytique n'a provoqué aucune apparition d'activité.

¹¹) Une synthèse de cette même séquence, mais conduite selon une méthode différente de la nôtre, a été rapportée tout récemment par R. SCHWYZER et coll. dans une brève communication préliminaire (Helv. 43, 1130 (1960)). Ces auteurs ont également trouvé que leur produit synthétique ne possédait pas l'activité biologique de la bradykinine.

^{11bis}) D. F. ELLIOTT, G. P. LEWIS & E. W. HORTON, Biochemical & Biophysical Research Communications (sous presse).

¹²) Les microanalyses ont été effectuées dans notre Laboratoire microanalytique (Dr W. SCHÖNIGER).

¹³) La scission du groupe CBO- par le HBr dans l'acide acétique glacial provoque l'acétylation de l'hydroxyle de la sérine; cf. St. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, Helv. 41, 1852 (1958).

L-Phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-nitro-L-arginate de p-nitrobenzyle (XXI). On dissout 3,48 g (4,0 mmoles) de l'ester térapeptidique XX dans 50 ml d'acide trifluoracétique, fait passer un courant de HBr sec pendant 70 min à 0°, concentre à 10 ml au vide et précipite par l'éther. Par recristallisation dans un mélange acétone - isopropanol - éther, on obtient 3,1 g (95%) de bromhydrate de L-phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-nitro-L-arginate de p-nitrobenzyle de F. 214°. Celui-ci est dissous dans un mélange de 100 ml d'acétate d'éthyle et de 20 ml de Na₂CO₃ 1N. La phase organique est séparée rapidement, car la base libre commence à cristalliser. Après séjour à -5°, on filtre, lave à l'éther et sèche. Après recristallisation dans le mélange isopropanol - acétone - acétate d'éthyle, on obtient 2,62 g (88%) de L-phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-nitro-L-arginate de p-nitrobenzyle de F. 110° (déc.). $[\alpha]_D^{23} = -21,6^\circ \pm 1,0^\circ (c = 1,1; \text{ méthanol})$, $-23,0^\circ \pm 1,0^\circ (c = 1,0; \text{ diméthylformamide})$. E_{1,9}^o = 0,80 Try; Rf_M^o = 0,96; Rf_A^o = 0,80; Rf_P^o = 0,63 (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

C₃₄H₄₁O₁₀N₉.H₂O Calculé C 54,2 H 5,8 O 23,3 N 16,7%
(753,7) Trouvé „, 54,5 „, 5,8 „, 23,3 „, 16,7%

L-Phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-L-arginine (XXIa). On suspend 1,0 g de catalyseur d'hydrogénéation selon KUHN¹⁴⁾ dans 26 ml d'une mélange de méthanol et d'eau (3:1) et hydrogène pendant 30 min. On introduit alors 2,61 g (3,0 mmoles) de N-CBO-L-phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-nitro-L-arginate de p-nitrobenzyle (XX) dissous dans 100 ml du même mélange et hydrogène 20 h à pression ordinaire. On filtre sur Hyflo supercel, évapore à sec, redissout dans 5 ml de diméthylformamide et précipite avec de l'éther. On obtient ainsi 1,19 g (69%) de L-phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-L-arginine de F. 180° (déc.). $[\alpha]_D^{23} = -19^\circ \pm 1^\circ (c = 1,0; \text{ méthanol})$, $-21^\circ \pm 1^\circ (c = 1,0; \text{ diméthylformamide})$. Rf_M^o = 0,32; Rf_A^o = 0,36; Rf_P^o = 0,17; E_{1,9}^o = 1,0 Glu; E_{5,8}^o = 0,8 His (révélation par ninhydrine, chlore et SAKAGUCHI; homogène).

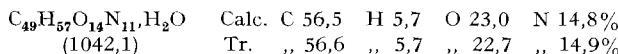
C₂₇H₃₇O₆N₇.H₂O Calc. C 56,5 H 6,9 O 19,5 N 17,1%
(573,7) Tr. „, 56,5 „, 7,2 „, 19,6 „, 17,0%

L'hydrolyse acide donne la composition Phé_{2,0}Sér_{0,9}Arg_{1,1}. — L'attaque par la leucine-peptidase au pH 9,0 provoque une apparition rapide de phénylalanine et un peu moins rapide de sérine, la disparition complète du térapeptide initial, et enfin la scission plus lente du dipeptide résiduel avec apparition de phénylalanine et d'arginine. — L'attaque par la chymotrypsine à pH 8,5 provoque l'apparition rapide de phénylalanine (E_{1,9} = 0,9 Glu) et d'un peptide (E_{1,9} = 1,2 Glu), avec disparition simultanée du térapeptide initial (E_{1,9} = 1,0 Glu). Le peptide de E_{1,9} = 1,2 Glu commence alors à disparaître à son tour, tandis qu'apparaissent de l'arginine (E_{1,9} = 1,8 Glu) et un peptide (E_{1,9} = 0,9 Glu) qui demeure malgré prolongement de l'attaque. Pendant l'attaque, on observe également l'apparition transitoire d'une petite quantité de peptide de E_{1,9} = 0,7 Glu (probablement H-Phé-Sér-Phé-OH provenant d'une faible attaque du peptide initial entre la phénylalanine et l'arginine). — L'attaque par la carboxypeptidase ne progresse que lentement, avec libération initiale d'arginine et de phénylalanine, et libération plus lente de sérine.

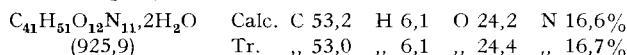
N-CBO-L-Prolyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-nitro-L-arginate de p-nitrobenzyle (XXII). On additionne une solution de 918 mg (3,0 mmoles) de N-CBO-L-prolyl-glycine⁷⁾ dans 10 ml d'acétonitrile à une solution de 2,26 g (3,0 mmoles) de L-phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-nitro-L-arginate de p-nitrobenzyle (XXI) dans 2 ml de diméthylformamide, refroidit à -10° et ajoute 824 mg (4,0 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide. Après 16 h à 20°, on ajoute 100 ml d'éther au mélange qui s'est pris en masse. On triture, filtre, lave le précipité à l'éther, le redissout dans 20 ml de pyridine, garde 2 h à -20° et sépare la dicyclohexylurée cristallisée par filtration. Le filtrat est concentré à 5 ml et additionné de 100 ml d'éther. L'hexapeptide brut précipité est séparé par filtration, redissous dans 100 ml d'un mélange dioxane - eau (4:1) et passé sur 10 ml de résine sulfonique sous forme acide (Dowex-50-x₄ W). On évapore à sec et redissout le résidu dans 100 ml d'un mélange bouillant de méthanol - eau (5:1). Par évaporation partielle du méthanol et séjour à 0°, il se forme des cristaux que l'on lave à l'eau et sèche. On obtient ainsi 2,30 g (75%) de N-CBO-L-prolyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-nitro-L-arginate de p-nitrobenzyle cristallisé de F. 192°. $[\alpha]_D^{22} = -28^\circ \pm 1^\circ (c = 1,0; \text{ méthanol})$, $-22^\circ \pm 1^\circ (c = 1,0; \text{ diméthyl-$

¹⁴⁾ R. KUHN & J. HAAS, Angew. Chem. 67, 785 (1955).

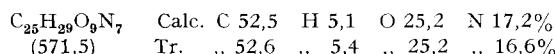
formamide). $Rf_M^a = 0,94$; $Rf_A^a = 0,83$; $Rf_P^a = 0,81$; $E_{1,9}^a = 0,65$ Try (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).



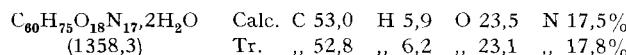
L-Proyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-nitro-L-arginate de p-nitrobenzyle (XXIII). On dissout 2,08 g (2,0 mmoles) de l'ester hexapeptidique XXII dans 25 ml d'acide trifluoracétique, refroidit à 0° et fait passer pendant 70 min un courant de HBr sec. On concentre à 10 ml, précipite avec de l'éther, triture, filtre, lave le précipité à l'éther et sèche au vide poussé sur KOH. On obtient ainsi 2,16 g de bromhydrate d'hexapeptide, qui sont dissous dans 50 ml de dioxane - eau (4:1). Après passage sur 5 ml de résine basique libre (Amberlite IRA-410), on évapore à sec, dissout dans 2 ml de diméthylformamide et précipite par de l'éther. Après séchage, on obtient 1,76 g (95%) de L-proyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-nitro-L-arginate de p-nitrobenzyle de F. 140° (déc.). $[\alpha]_D^{22} = -33^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol), $-20^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_M^o = 0,93$; $Rf_A^o = 0,80$; $Rf_P^o = 0,79$; $E_{1,9}^o = 0,62$ Try (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).



N-CBO-Nitro-L-arginyL-L-prolinate de p-nitrophényle (XXIV). On mélange à température ordinaire 901 mg (2,0 mmoles) de N-CBO-nitro-L-arginyL-L-proline (I)⁶), 600 mg (1,3 mmole) de tri-p-nitrophénol-phosphite¹⁵) et 2 ml de pyridine anhydre. Le tout passe en solution après 20 min d'agitation. On laisse encore 12 h à 20°, évapore à sec, redissout dans 30 ml d'acétate d'éthyle, lave par HCl 1N jusqu'à élimination de la pyridine, puis lave encore trois fois par NaHCO₃ 1N, en faisant suivre chacun de ces derniers lavages par un lavage à l'eau, sèche sur Na₂SO₄, évapore à sec, redissout dans 15 ml d'éthanol bouillant, laisse 1 j à 0°, décante le solvant et triture le résidu huileux dans l'éther jusqu'à formation d'un solide pulvérulent. On obtient 853 mg (75%) de N-CBO-nitro-L-arginyL-L-prolinate de p-nitrophényle de F. 60° (déc.). $[\alpha]_D^{23} = -62^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol).



N-CBO-Nitro-L-arginyL-L-proyl-L-proyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-nitro-L-arginate de p-nitrobenzyle (XXV). -a) A partir de XXIII et XXIV. On dissout 890 mg (0,96 mmole) de L-proyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-nitro-L-arginate de p-nitrobenzyle (XXIII) et 629 mg (1,1 mmole) de N-CBO-nitro-L-arginyL-L-prolinate de p-nitrophényle (XXIV) dans un mélange de 10 ml de dioxane et de 10 ml de diméthylformamide, maintient 60 h à 20° et 12 h à 50°, évapore le dioxane sous vide et précipite par 30 ml d'acétate d'éthyle et 15 ml d'éther de pétrole. On dissout le précipité dans un mélange de dioxane - eau (4:1), passe la solution sur 5 ml de résine sulfonique acide (Dowex-50-x₄W), évapore à sec et triture dans l'éther jusqu'à obtention d'un produit pulvérulent. Après suspension dans l'acétate d'éthyle et filtration, on obtient 845 mg (65%) de N-CBO-nitro-L-arginyL-L-proyl-L-proyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-nitro-L-arginate de p-nitrobenzyle de F. 160-170°. $[\alpha]_D^{23} = -44^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol), $-31^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,70$; $Rf_A^a = 0,72$; $Rf_P^a = 0,73$; $E_{1,9}^a = 0,75$ Glu (révélation par ninhydrine et chlore).



b) A partir de I⁶) et XXIII. On dissout 90 mg (0,20 mmole) de N-CBO-nitro-L-arginyL-L-proline (I)⁶) et 178 mg (0,19 mmole) de L-proyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-nitro-L-arginate de p-nitrobenzyle (XXIII) dans 0,5 ml de diméthylformamide, ajoute 1 ml d'accétonitrile, refroidit à -5°, ajoute 62 mg de dicyclohexyl-carbodiimide et laisse 16 h à 20°. On filtre, évapore l'accétonitrile au vide et précipite par adjonction d'éther. Après purification par

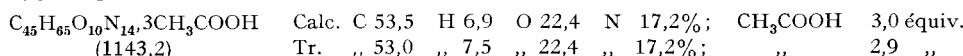
¹⁵⁾ W. STRECKER & CH. GROSSMANN, Ber. deutsch. chem. Ges. 49, 63 (1916); B. ISELIN, W. RITTEL, P. SIEBER & R. SCHWYZER, Helv. 40, 373 (1957).

passage sur résine et lavage à l'acétate d'éthyle comme ci-dessus, on obtient 142 mg (54%) de N-CBO-nitro-L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-nitro-L-arginate de p-nitrobenzyle présentant exactement les mêmes propriétés que le produit obtenu sous a).

c) A partir de V⁶) et de XXI. On dissout 155 mg (0,235 mmole) de N-CBO-nitro-L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycylhydrazide, HCl (V⁶) dans 1,5 ml de diméthylformamide et 0,2 ml de HCl 4N, refroidit à -5°, ajoute un mélange de 0,050 ml de nitrite de sodium 5N aqueux et 0,3 ml de diméthylformamide, agite 5 min à -5° et ajoute 0,3 ml de K₂CO₃ 25% aqueux. On agite encore 2 min, ajoute 1 ml d'acétate d'éthyle glacé et sèche rapidement sur Na₂SO₄. On filtre, lave par 1 ml de diméthylformamide, ajoute 173 mg (0,205 mmole) de L-phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-nitro-L-arginate de p-nitrobenzyle (XXI), évapore l'acétate d'éthyle sous vide et garde la solution 12 h à 0° et 3 h à 20°. On précipite avec de l'éther et triture avec de l'éther de pétrole jusqu'à obtention d'un produit pulvérulent. Les 233 mg ainsi obtenus sont dissous dans un mélange méthanol - eau (3:1) et passés sur 2 ml de résine sulfonique acide (Dowex-50-x₄ W). On évapore à sec, triture avec de l'éther et suspend le produit pulvérulent obtenu dans deux portions successives de 2 ml d'acétate d'éthyle à 40°. Après séchage on obtient 130 mg (47%) de N-CBO-nitro-L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-nitro-L-arginate de p-nitrobenzyle présentant exactement les mêmes propriétés que les produits obtenus sous a) et b).

L-Arginyl-*L*-protyl-*L*-protyl-glycyl-*L*-phénylalanyl-*L*-séryl-*L*-phénylalanyl-*L*-arginine (*XXVI*).

On dissout 500 mg (0,37 mmole) d'octapeptide protégé XXV dans 16 ml d'acide acétique glacial et 10 ml de HCl 0,2N, et hydrogène 30 h à 22° à pression ordinaire en présence de 350 mg de catalyseur d'hydrogénéation au palladium selon KUHN¹⁴), préalablement hydrogéné pendant 30 min dans un mélange acide acétique glacial - eau (2:1). Après centrifugation, la solution est évaporée à sec au vide. Le produit obtenu est soumis à un contre-courant de 200 transferts dans le système sec.-butanol / eau / acide trifluoracétique (120:160:1). Le contenu des tubes 80 à 100, correspondant au sommet pondéral ($K = 0,84$), est évaporé à sec au vide, redissous dans l'eau et passé sur résine basique (Amberlite IR.-45, sous forme d'acétate). Par évaporation à sec, dissolution dans 2 ml de méthanol et adjonction d'éther, on obtient 290 mg (69%) de triacétate de L-arginylin-L-proyl-L-proyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-L-arginine sous forme d'une poudre blanche hygroscopique. $[\alpha]_D^{22} = -60^\circ \pm 1^\circ (c = 0,8; \text{eau})$.



A l'*électrophorèse sur papier* le produit est homogène (révélation à la ninhydrine, au chlore, au bleu de bromophénol et au réactif de SAKAGUCHI) aux pH 1,9, 5,8, 8,5, 10,7, 11,7 et 12,0. $E_{1,9}^0 = 1,1$ Glu; $E_{5,8}^0 = 0,8$ His. A pH 12,0 le produit migre encore vers la cathode par rapport à la DNP-glucosamine. A la *chromatographie sur papier* le produit est homogène aux mêmes réactifs. $Rf_M^0 = 0,16$; $Rf_A^0 = 0,32$; $Rf_P^0 = 0,26$.

L'hydrolyse (16 h; 110°; HCl 6N) donne de l'arginine, de la proline, de la glycine, de la phénylalanine et de la sérine dans le rapport 2,1 : 2,0 : 0,9 : 2,0 : 0,9. La chromatographie montre qu'il n'y a aucun acide aminé de Rf supérieur à celui de la phénylalanine dans le mélange sec.-butanol/acide formique 85% / eau (75:15:10), ce qui permet d'exclure¹⁶ la présence d'hexahydrophénylalanine.

La réaction avec le dinitrofluorobenzène (2 mg de peptide + 50 mg de 2,4-dinitrofluorobenzène + 0,008 ml de triéthylamine dans 1,5 ml d'éthanol 65% agités 2,5 h à 22°), suivie, après extraction à l'éther, d'hydrolyse (16 h; 110°; HCl 6N) du contenu de la phase aqueuse, ne donne que de la DNP-arginine ($E_{5,8} = 0,1$ Glu) et un peu de DNP-OH ($E_{5,8} = 0,7$ Glu). Il n'y a pas de DNP-phénylalanine ($E_{5,8} = 0,4$ Glu), ni de DNP-sérine ($E_{5,8} = 0,6$ Glu).

L'attaque à la *carboxypeptidase* à pH 8,5 provoque la libération d'arginine et de phénylalanine accompagnée d'une libération un peu plus lente de sérine. Il n'apparaît pas de glycine. — L'attaque à la *leucine-aminopeptidase* à pH 9,0 ne provoque pas de libération initiale d'arginine. Si l'on prolonge le temps, il apparaît de la phénylalanine et de la sérine, puis de l'arginine¹⁷⁾. Même

¹⁶⁾ R. A. BOISSONNAS & G. PREITNER, Helv. 36, 875 (1953).

¹⁷) Nous n'avons pas encore pu établir si cette attaque au milieu de la chaîne entre la glycine⁴ et la phénylalanine⁵ était due à la leucine-aminopeptidase elle-même ou à une endopeptidase accessoire.

après un temps cent fois plus grand, il n'apparaît ni proline, ni glycine. – L'attaque à la *chymotrypsine* à pH 8,5 (9 mg d'octapeptide + 0,9 mg de chymotrypsine dans 0,32 ml de tampon à 22°) provoque en moins de 1 h la transformation complète de l'octapeptide ($E_{1,9} = 1,1$ Glu) en un peptide de $E_{1,9} = 1,0$ Glu qui demeure inchangé ensuite (H-Arg-Pro-Pro-Gly-Phé-OH!) et un peptide de $E_{1,9} = 1,2$ Glu (H-Sér-Phé-Arg-OH!) identique à celui produit intermédiairement par l'action de la chymotrypsine sur le tétrapeptide XXIa. Ce second peptide se transforme en quelques jours en arginine ($E_{1,9} = 1,8$ Glu) et en un peptide de $E_{1,9} = 0,9$ Glu (H-Sér-Phé-OH!) identique au produit final de l'action de la chymotrypsine sur le tétrapeptide XXIa, et négatif comme celui-ci au réactif de SAKAGUCHI.

Les déterminations d'*activité biologique* indiquent^{1) 9)} que l'octapeptide est sans action sur l'iléum isolé de cobaye jusqu'à une dose de $2,5 \cdot 10^{-6}$ g/ml. Il est également sans action sur la pression sanguine du rat et sur la bronchoconstriction expérimentale du cobaye.

SUMMARY

By condensing N-CBO-nitro-L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl azide or the corresponding p-nitrophenyl ester with L-phenylalanyl-L-seryl-L-phenylalanyl-nitro-L-arginine p-nitrobenzyl ester, N-CBO-nitro-L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-seryl-L-phenylalanyl-nitro-L-arginine p-nitrobenzyl ester has been obtained. The same protected octapeptide has also been prepared by condensing N-CBO-nitro-L-arginyl-L-proline with L-prolyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-seryl-L-phenylalanyl-nitro-L-arginine p-nitrobenzyl ester. Catalytic hydrogenation of the protected octapeptide affords L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-seryl-L-phenylalanyl-L-arginine, the identity of which has been checked by several methods. This octapeptide does not possess any of the biological properties of bradykinin; it also differs from the latter by its comportment toward chymotrypsin.

Laboratoires de chimie pharmaceutique SANDOZ, Bâle

184. Infrarot-Spektren der Cyclane und Cyclanone

VI. CH-stretching- und CH₂-bending-Schwingungen von Cyclanonen von Th. Bürer und Hs. H. Günthard

(24. VI. 60)

1. Einleitung

Bei früheren Untersuchungen^{1) 2)} der Infrarotspektren von Cyclanonen $C_nH_{2n-2}O$ in flüssiger und fester Phase konnten wir die CH-stretching- ($\nu(CH)$ -) und CH₂-bending-($\delta(CH_2)$ -)-Banden nicht näher diskutieren. Unter den damaligen Messbedingungen (Schichtdicke, Auflösungsvermögen), speziell bei tiefen Temperaturen, erwiesen sich die beobachteten Banden-Enveloppen als zu ungenau.

In dieser Arbeit berichten wir über die $\nu(CH)$ - und $\delta(CH_2)$ -Banden der Cyclanone mit $n = 5$ bis 15, welche an Lösungen in Tetrachlorkohlenstoff bei Zimmertemperatur mit Lithiumfluorid- resp. Calciumfluorid-Auflösung gemessen wurden. Da über die

¹⁾ TH. BÜRER & HS. H. GÜNTHERD, Helv. 40, 2054 (1957).

²⁾ TH. BÜRER, Dissertation ETH Zürich, 1958.