

Octapeptide(Alanine Angiotensin)의 合成

朴 元 吉*

(1960. 1. 4. 受理)

Synthesis of an Octapeptide (Alanine Angiotensin)

By Won Kil Park

Department of Biological Chemistry, College of Agriculture, Kyung Pook National University

We have shown that carboxy-peptidase destroys the biological activity of angiotensin octa- and decapeptides. Since Proline occurs as the seventh amino acid from the amino end of the chain and since carboxypeptidase does not cleave proline from a peptid chain, it is evident that the heptapeptid H₂asp-arg-val²-tyr-ileu-his-pro.OH is formed by this hydrolysis. This peptide must then be biologically inactive.

In order to determine whether the phenyl group of the C-terminal amino acid was the necessary requirement for biological activity of the octapeptide, ala⁸ angiotensin octapeptide(amino acids of peptides numbered from amino end) was synthesized.

For this synthesis the four dipeptides were prepared: carbo-benzoxy-L-prolyl-L-alanine-P-nitrobenzyl-ester, m.p. 134-135°C, carbobenzoxy-L-isoleucyl-imidazole benzyl-L-histidine methyl ester, m.p. 114-116°C, carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosine hydrazide and carbobenzoxy B-benzyl-L-aspartyl-nitro-L-arginine. The first three dipeptides were obtained as crystalline compounds. Imidazole-benzyl-L-histidine was used in the hope that it would block the histidine imidazole against side reactions in steps subsequent to the formation of the C-terminal tetrapeptide. Also, it was thought that the imidazole benzylated peptides would be easier to crystallize. This, however, was not the case. The tetrapeptide, carbobenzoxy-L-isoleucyl-L-im. benzyl-histidyl. L-prolyl-L-alanine-nitrobenzyl ester, was not obtained in a crystalline form. Neither could the mono- or dihydrobromide of the tetrapeptide free base be induced to crystallize.

Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosine azide was condensed with the tetra-peptide free base to yield the protected hexapeptide; carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-im. benzyl. histidyl-L-Prolyl-L-alanine-nitrobenzyl ester. Upon removal of the carbobenzoxy group with hydrogen bromide in acetic acid an amorphous free base hexapeptide ester was obtained. This compound gave the correct C, H, N analysis and contained the six amino acids in the correct ratio.

The octapeptide was obtained by condensing this hexapeptide with carbobenzoxy-B-benzyl-L-aspartyl-nitro-L-arginine using the mixed anhydride method of condensation. This amorphous product was proven to be homogenous by chromatography in two solvent systems and upon hydrolysis yielded the eight amino acids in correct ratio.

The five protecting groups were removed from the octapeptide by hydrogenolysis over palladium black catalyst. Biological assay of the free peptide indicated that it possessed less than 0.1 per cent of both pressor and oxytocic activity of the phenylalanine⁸ angiotensin. This suggests that the phenyl group is a point of attachment between angiotensin and its biological receptor site.

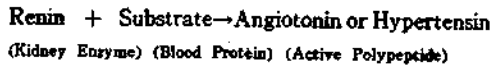
摘 論

1934년에 Goldblatt¹⁾氏가 腎臟抽出物中에 Renin(藥

乳酵素인 Rennin과 混同하지 말것.)라고 생각하는 것이 이 動脈을 收縮함으로서 血壓이 上昇한다고 하였다. 即 이 收縮은 血流中에서 Renin이 分離함으로서 일어난다고 生覺되었는데 그後 Page, Helmer²⁾,

* 慶北大學校 農科大學 農化學科 生物化學教室

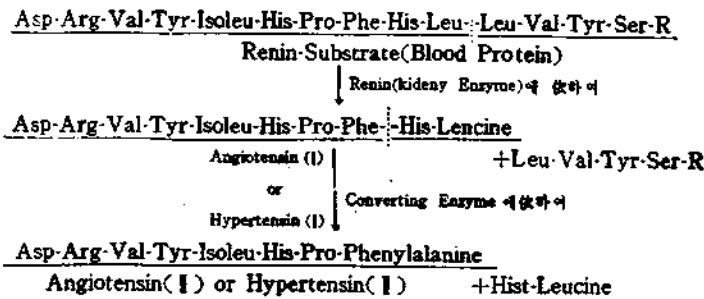
Braun, Menendez 등은 Renin 그 자체가 動脈을 收縮하는 것이 아니고⁴⁾, Renin에 依해서 生成하는 第2의 物質 即 Angiotonin(Hypertensin)이 分離하여, 이것의 作用때문이라는 것을 알게 되었다. 그 作用過程을 다음과 같이 表示했다.



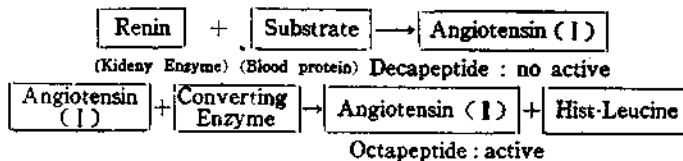
Angiotonin(現在는 Angiotensin 이라 稱함.)은 Polypeptide 이고, 透析性, 熱에 對해서 安全하고, 酸, 鹽基等に 加水分解되며, 蛋白質分解酵素인 Chymotrypsin, Carboxypeptidase, Leucinaminopeptidase, Trypsin, 그리고 Pepsin 에 依하여 完全히 分解된다. 1954年에는 部分的으로 純粹化하고 terminal amino acid도 發見했다⁵⁾.

W.S. Peart 는 牛膽에서 純粹한 狀態로 分離하고⁶⁾, 다음과 같은 decapeptide 란 것을 表示했다⁷⁾.

L-Asp-L-Arg-L-Val-L-Tyr-L-Val-L-His-L-Pro-L-Phe-L-His-L-Leucine, 即 Aspartic acid 가 N-Terminal 이고, Leucine 은 C-Terminal amino acid 란 것이다. 그러나 그後 Skeggs 와 그의 共同研究者들은⁸⁾ 馬膽에서 純粹하게 分離한 Angiotensin 은 第5番目 位置하고 있는 Valine 이 Isoleucine 이란 것을 發見하고, Blood Plasma 中에 있는 Converting Enzyme 란 Enzyme 가 decapeptide 에서 Histidyl-Leucine 을 分離시켜서, Octapeptide 가 되며, 即 이것이 動脈을 收縮해서 血壓을 上昇시킨다고 했다. Page, Bumpus 등⁹⁾은 豚血液에서 純粹하게 分離하고,¹⁰⁾ 또한 化學的 合成에 成功하고 또한 그構造와 作用過程을 다음과 같이 決定지었던 것이다.

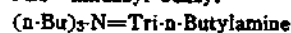
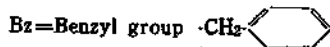
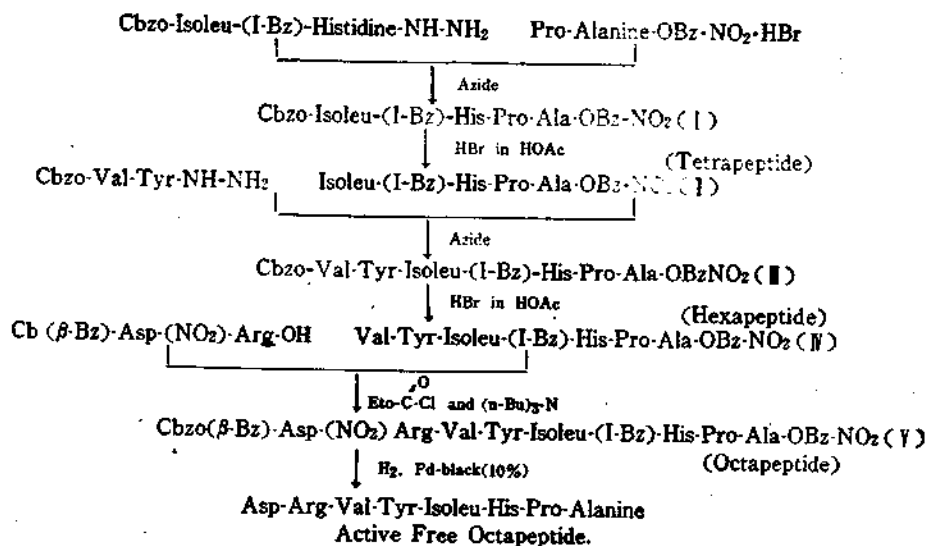


即 Angiotensin(I)인 Octapeptide 가 Active 이며, 다시 要約하면,



1959年에 本人은 C-Terminal amino acid 인 Phenylalanine 의 Phenyl group 이 絕對的으로 必要한 것인가? 또 從來의 Angiotensin 合成經路를 달리 하고, 또한 Protected group 特히 C-Terminal amino acid 의 COOH group 을 Methyl or Ethyl Ester 代身에

Para-nitrobenzyl Ester(略해서 ·OBz·NO₂로 表示함)로 하고, Phenylalanine 에서 Phenyl group 가 없는 Alanine 合成過程은 Dipeptide 基本單位로 했으며 圖示하면 다음과 같다.



實 驗

모든 合成된 Peptide 는 6-N-HCl, 105°C(Toluen-bath 에서) 24時間(物質에 따라서 이 以上 時間이 所要되었음.) 完全히 加水分解시킨 然後 Paperchromatography 에 依해서 그 peptide 가 構成된 各 Ammo Acid 의 檢査를 施行하고, 또 n-Butylalcohol-Acetic Acid-Water(4:1:5) Solvent 로서 純度を 確認했으며, 其他 Physical constants 도 調査했다. Amino Acid 및 Peptide 는 全部 L-form 이다.

Cbzo-Isoleucyl-(I-Bz)-Histidyl-prolyl-Alanine-OBz-NO₂(I) (Tetrapeptide)

Carbobenzoxy-L-Isoleucyl-(I-Bz)-Histidyl hydrazide 5.06g(10 m Mole), Acetic acid 20ml 및 2N-HCl 8ml 등을 Separating funnel 에서 溶解시킨다. 溫度는 0°C(이實驗은 2°C 程度의 cold room에서 實施했음) 여기에 2M-NaNO₂ 5ml 加해서 約 5分間 放置해둔다. 다음 cold 50% K₂CO₃ 로서 PH 約 8.5까지 調節하면

沈澱이 생긴다. 이때 Gas 가 發生하나 實驗操作에서 注意를 要한다. 여기서 生成된 沈澱을 水水로 洗滌한 後 Dioxane 과 Ethylacetate 의 混合液(2:1)으로서 溶解하여 MgCO₃ 로서 脫水한다. 이 溶液은 Cbzo-Isoleucyl (I-Bz)-Histidine 의 Azide 이다.

한편 攪拌裝置로 된 Erlenmyer 에 Prolyl-Alanine-Para-Nitro Benzyle Ester 의 Mono HBr 7.0g (8.8 m Mole)를 Dioxane 50ml, Tri-n-butylamine 2.16ml (9 m Mole)를 混合溶解시켜 둔다. 여기에 上記의 Azide Solution 을 注入시키고 cold room 에 約 30分間 攪拌시킨 다음 이것을 室溫에서 繼續攪拌, 一晝夜反應시킨다. 다음 이 反應液을 吸引 蒸發시키면 그 蒸發殘渣物은 油狀이며 이 油狀物質을 Ethylacetate 에 溶解시켜서 다음 順序로서 處理한다.

即 N-HCl, 5% KHCO₃, H₂O 등으로서 洗滌한 後 이 Ethylacetate 液을 無水 Na₂SO₄ 로서 脫水시켜 吸引下에 蒸發 乾潤시킨다. 이 蒸發殘渣物을 收得 7.5g (yield 94%)을 얻었다. 結晶物質은 얻지 못했으나

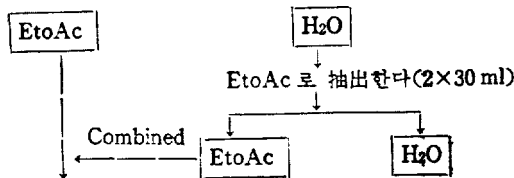
Paperchromatography test에서는 one spot를 表示
했으며, 6N-HCl로서 加水分解시킨 後 Paperchr.
omatography로서 各構成 Amino Acid가 含有된 것을
確認했다.

**Isoleucyl-(Imidazol benzyl)-Histidyl-Prolyl
-Alanine-P-nitrobenzyl Ester 2HBr (I)**
(Tetrapeptide 2HBr)

Cbzo-Isoleu-(I-Bz)-His-Pro-Ala-OBz-NO₂ 11.5 g.
(14.5m Mole), glacial acetic acid 中에 約 3N HBr 이
含有된 것 40ml를 CaCl₂ tube 가 附着된 Erlenmyer
中에서 溶解시켜서 室溫에서 間或 振動시키면서 約 40分
間 放置해둔다. 다음 여기에 無水 Ether를 多量 加하
면 沈澱이 생긴다. 이것을 濾別하여 이 沈澱物을 無水
Ether로서 數回 洗滌한다. 다음 이 沈澱物을 無水
Methyl alcohol에 溶解(이때 着色되었으면 活性炭으로
脫色함)시킨 다음 磁石에 蒸發 乾燥시킨다. 이러
한 操作을 3回 反覆한다. 이 蒸發乾燥物을 收集, 乾燥
한다. 11.0 g(yield 92.5%)을 얻었다.

**Carbobenzoxy-Valyl Tyrosyl-Isoleucyl-(I-Bz)
Histidyl-Prolyl-Alanine P-nitrobenzyl Ester
(II) (Cbzo-Hexapeptide-OBz-NO₂)**

合成方法은 Tetrapeptide 合成과 同一한 Azide Me-
thode 를 使用했다. 卽 Cbzo-Valyl-Tyrosine Hy-
drazide 5.15g. (12 m Mole)을 glacial acetic acid 30
ml 여기에 2N HCl 20ml를 Separating funnel에 溶
解시킨다. 室溫 0°C (cold room에서 實驗함). 다음
2M NaNO₂ 6ml를 加해서 約 5分間 放置해둔다. 後
여기에 H₂O 約 80ml와 Ethyl acetate 80ml를 加해서
잘 振動시킨 後 다음과 같이 水層部分과 Ethyl acetate
層部分으로 分離한다. 卽



다음과 같은 順序로서 處理한다.
Washed with H₂O (2×250 ml)
Washed with Saturated NaHCO₃ (2×40 ml)
Washed with H₂O (2×50 ml)
處理한 EtoAc 溶液을 無水 Na₂SO₄로 脫水한다. 卽
이것은 Cbzo-Val-Tyrosine의 Azide이다. 한편 攪拌裝
置(mag. Stir.로서)로 된 Erlenmyer에 Isoleucyl-(I-

Bz)-Histidyl-Prolyl-Alanine-OBz-NO₂·2HBr 8.24 g(10
m. Mole). D.M.F.(Dimethyl formamide) 35ml, Tri-
n-butylamine 5ml (21 m Mole)등을 混合溶解시킨다.
여기에 上記 Azide를 加해서 約 1時間 cold room에
서 繼續 攪拌시킨다. 다음 이것을 室溫에서 約 一晝夜
攪拌을 繼續하면서 反應시킨다. 다음 이 反應液을 吸
引下에서 蒸發 乾燥시키면 油狀物質이 남는다. 이 油狀
物質을 Methyl alcohol에 溶解시키고 여기에 約 2m의
Acetic acid를 加하고 다음 물 約 300ml를 加하면
沈澱이 생긴다. 이 沈澱을 濾過한 다음 물로서 (3×
50ml) 洗滌한다. 이 沈澱을 收集 乾燥시킨다. 4.5 g
(yield 42.93%) m.p.=192~196°C였다

**Valyl-Tyrosyl-Isoleucyl-(I-Bz)-Histidyl-Prolyl
-Alanine-P-nitrobenzyl Ester·2HBr (IV)**
(Hexapeptide 2HBr)

Cbzo-Valyl-Tyrosyl-Isoleucyl-(I-Bz)-Histidyl-Prolyl
-Alanine-OBz-NO₂ 5.0 g(4.77 m Mole)을 glacial
acetic acid 20ml 및 HBr(約 3N-HBr이 glacial acetic
acid에 溶解된 것임) 40ml 등을 CaCl₂ tube 가 附着된
Erlenmyer 中에 混合 溶解시켜서 室溫에서 約 30分間
反應시킨다. 다음 여기에 多量의 無水 Ether를 加하
면 沈澱이 생긴다. 이 沈澱을 濾別해서 다시 無水
Ether로서 數回 洗滌한다. 다음 이 沈澱物을 無水
Methyl alcohol에 溶解시켜서 吸引下에 蒸發 乾燥한다.
이와같은 操作을 3回 反覆한 後 이 蒸發乾燥物을 收集
乾燥한다. 4.8 g. (yield 92.48%)을 얻었다.

**Valyl-Tyrosyl-Isoleucyl-(I-Bz)-Histidyl-Prolyl-
Alanine-P-nitro-benzyl Ester (Hexapeptide-
OBz-NO₂)**

Val-Tyr-Isoleu-(I-Bz)-His-Pro-Ala-OBz-NO₂·2HBr
0.5 g(0.46 m Mole)을 물 3ml에 溶解시킨다(不溶解
物은 濾別함) 이 溶液의 PH를 8.0(冷 N-NaOH로
서)으로 하면 沈澱이 생긴다(ice-bath 中에서 施行함) 이
것을 Ethyl acetate로서 抽出함(3×20 ml). 다음 물로
서 洗滌(1×10ml)한 後 이 EtoAc을 無水 Na₂SO₄로
서 脫水한다. 이 脫水된 EtoAc液을 吸引下에 蒸發 乾
燥시키면 固形物이 남는다. 乾燥, 收集. 250 mg(yield
82%) R_f CH₂CN=0.80
H₂O

**Carbobenzoxy-(β-OBz)-Asp-(NO₂)-Arg-Val-
Tyr-Isoleu-(I-Bz)-His-Pro-Alanine-OBz-(NO₂)
(V) (Cbzo-Octapeptide-OBz-NO₂)**

Cbzo-(β-OBz)-Asp-(NO₂)-Arginine 0.73 g(1.3 m

Mole), Tetrahydrofuran(T.H.F.) 10 ml 및 Tri-n-butylamine 0.31 ml (1.3 m Mole)를 攪拌裝置(Mag. Stir. 로서)와 CaCl₂-tube가 附着한 Erlenmyer 에 混合 溶解시킨다. 溫度는 ice-salt-bath 로서 -20°C 로 함.

여기에 Ethylchloroformate(Eto- $\overset{\text{O}}{\text{C}}$ -Cl) 0.143 ml (1.3 m Mole)를 注入하고서 約 15分間 攪拌을 繼續한다. 다음 Val-Tyr-Isoleu-(I-Bz)-His-Pro-Alanine-OBz-NO₂ 1.0 g (1.13m Mole)을 Dimethyl formamide(D.M.F.) 12ml 에 溶解한 것을 上記 Erlenmyer 中の 混合溶解에 다가 加하여 攪拌을 繼續한다. 溫度는 -12°C, 時間은 約 20分間, 然後 이것을 室溫에서 約 3時間 繼續 攪拌 反應시킨다. 다음 이 反應液을 吸引下에서 蒸發 乾涸시키면 殘渣物은 油狀으로 된다. 이 油狀物質을 最少限의 ab.Methyl alcohol 에 溶解시켜서 여기에 EtoAc 를 加하여는 沈澱이 생긴다. 이것을 濾過, 收集, 乾燥, 1.53 g (yield 95%) mp.=170~175°. 이것을 Methanol 에 溶解시켜 再沈澱시켜서 精製한다. 1.5g. (yield 93.3%) m.p.=174~180° [α]_D=-41.7(c=1 in MeOH) 였다 이物質을 6N-HCl, 105°C. 約 30時間 加水分解해서 Paperchromatography 에서 (Solvent 는 n-butanol, Acetic acid, Water 4:1:5) 8개의 各 Amino Acid 를 確認했다. 結晶은 얻지 못하고 Amorphous 로서 얻었다.

結 論

本 Peptide 合成은 Dipeptide 부터 Hexapeptide 까지 는 Azide Methode 를 利用하고 마지막 Octapeptide 合成時만 Mixed anhydride Methode 를 使用했다. Azide Methode 에 있어서는 Peptide 의 Azide 가 低溫(大概 2°C~0°C)에서 불과 混合하지 않는 有機溶媒에 溶解하느냐에 따라서 그 yield 가 上昇하게 된다. 그리고 本合成에 있어서 그 中間體인 Tetrapeptide hydrobromide 를 純粹하게 얻기가 大端히 困難였는 것이다. 卽 이 物質은 結晶化하기 困難할 뿐만 아니라 Chromatography 에 있어서 1個以上(大概 2個이다)의 Spot 를 表示했다. 아마 이것은 Mono-HBr 와 Di-HBr 의 混合에 原因하는 것이 아닌가 思料된다.

따라서 直接 Hexapeptide 合成에 이것을 使用했던 것이다. Hexapeptide 에서는 1個의 Spot 와 이것의 完全加水分解(大概是 6N-HCl, 105°C, 24時間 處理했다)한 것은 그 構成 各 Amino acid 의 Spot 6個를 表示했다. 그리고 Free Octapeptide 는 Cbz-Octapeptide-OBz-NO₂를 Methyl alcohol과 Acetic acid 의 混合液에 溶解시켜서 10% Pd-black 을 觸媒로해서 H₂ gas 를 約 5時間(振動시키면서) 通過시켜서 그의 Paper Chromatography 와 Biological activity 등을 實驗했으나 本 論文에서는 省略하고 다음에 여기에 對하여 詳細한 結果를 報告하려고 한다.

本 研究에 있어서 Dr. F.M. Bumpus, Dr. H. Schwarz 諸氏等과 Mr. Jefferson Jones, Mr. Robert Russell 等の 協助에 對하여 感謝드린다. 또한 本 論文은 4293 年 11月 18, 19 兩日間에 걸친 第7回 大韓化學會에서 發表했던 것이다.

引 用 文 獻

- (1) Goldblatt, H., Lynch, J., Hanzel, R. F. and Summerville, W.W.: *J. Exp. Med.* 59, 347(1934)
- (2) Page, I. H. and Helmer, O. M.: *J. Am. Med. Assoc.*, 114, 614(1940)
- (3) Bumpus, F.M. and Page, I.H.: *Science*, 11, 819 (1954)
- (4) Peart, W.S.: *Biochem. J.*, 62, 520(1950)
- (5) Lentz, K.E., Skeggs, L.T., Woods, K.R., Kahn, J.R. and Shumway, N.P.: *J. Exp. Med.*, 104, 183(1956)
- (6) Bumpus, F.M., Schwarz, H. and Page, I.H.: *Circulation Res.* 4, 448(1956)
- (7) Bumpus, F.M., Schwarz, H. and Page, I.H.: *Science*, 125, 886(1957)
- (8) Schwarz, H., Bumpus, F.M. and Page, I.H.: *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 5697(1957)
- (9) Skeggs, L.T., Letz, K.E., Kahn, J.R. and Shumway, N.P.: *J. Exp. Med.* 108, 285(1958)
- (10) Schwarz, H. and Bumpus, F.M.: *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 890(1959)