

K-Salz von Penicillin G, 5,5-Dimethyl-thiazolidin-4-carbonsäure (II) und N-Hip-puryl-thiazolidin-4-carbonsäure (V) wurden uns in freundlicher Weise von der *CIBA Aktiengesellschaft* zur Verfügung gestellt, wofür an dieser Stelle den Herren Dr. K. *Miescher* und Dr. A. *Marxer* bestens gedankt sei. Die Mikroanalysen verdanken wir dem mikroanalytischen Laboratorium der *CIBA Aktiengesellschaft* (Dr. H. *Gysel*). Für die Durchführung der biologischen Prüfung der Verbindung VI danken wir der pharmakologischen Abteilung der *CIBA Aktiengesellschaft*.

Den Herren J. *Hostýnek* und H. P. *Müller* danken wir für ihre Mithilfe bei den Verteilungsmessungen an Ionenaustauschern.

SUMMARY.

Penicillin has been found to chelate Cu^{2+} although the chelating power of corresponding acylated aminoacids is very small. For comparison, the capacity of binding Cu^{2+} of a few structural analogues of penicillin has been determined by an ion exchange method described in a previous publication.

Anstalt für anorganische Chemie der Universität Basel.

81. Synthese eines hochwirksamen Hypertensin II-amids (L-Asparaginyll-L-arginyll-L-valyll-L-tyrosyll- L-isoleucyll-L-histidyll-L-prolyll-L-phenylalanin)

von W. *Rittel*, B. *Iselin*, H. *Kappeler*, B. *Riniker* und R. *Schwyzler*.

(23. II. 57.)

Hypertensin II aus Pferdeserum (mit Schweine-Renin freigesetzt) besitzt die Konstitution eines Octapeptides mit der Aminosäure-reihenfolge H·Asp-Arg-Val-Tyr-Ileu-His-Pro-Phe·OH¹⁾ und kann als Ileu⁵-Hypertensin II bezeichnet werden²⁾. Wie bereits kurz berichtet²⁾, konnten wir feststellen, dass synthetisches, hochgereinigtes H·Asp(NH₂)-Arg-Val-Tyr-Ileu-His-Pro-Phe·OH (Ileu⁵-Hypertensin II-Asp.β-amid) an der Ratte eine blutdrucksteigernde Wirkung besitzt, welche qualitativ und quantitativ den besten durch Isolierung hergestellten Hypertensinpräparaten vergleichbar ist, bzw. sie übertrifft³⁾.

In der vorliegenden Mitteilung sollen die Einzelheiten der Synthese bekanntgegeben werden. Aufbauprinzip (s. Schema): die Aminosäuren 1 bis 8 wurden in den Synthesestufen A bis H zum Endprodukt zusammengesetzt. Der betreffende Aminosäure- oder Peptidrest ist durch einen waagerechten Balken dargestellt, der sich unter den Nummern

¹⁾ K. E. *Lentz*, L. T. *Skeggs*, K. R. *Woods*, J. R. *Kahn* & N. R. *Shumway*, Journ. exper. Med. **104**, 183 (1956).

²⁾ W. *Rittel*, B. *Iselin*, H. *Kappeler*, B. *Riniker* & R. *Schwyzler*, Angew. Chem. **69**, 179 (1957).

³⁾ W. S. *Peart*, Biochem. Journ. **62**, 520 (1956).

der darin enthaltenen Aminosäurereste hinzieht. Substituenten an der α -Aminogruppe stehen links (Z bedeutet den Carbobenzoxy-rest, $C_6H_5CH_2OCO-$), solche am Carboxylrest, $R-CO-$, befinden sich rechts, während Substituenten an funktionellen Gruppen der Aminosäureseitenketten oben angebracht sind⁴).

Aus geeigneten Aminosäurederivaten A 1 bis A 8 wurden in der Synthesestufe A \rightarrow B die vier Dipeptidderivate B 1-2, B 3-4, B 5-6 und B 7-8 hergestellt. Die Herstellung von Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-argininmethylester (B 1-2) bot beträchtliche Schwierigkeiten. Als besonders brauchbar erwies sich schliesslich die Herstellung des N^α -Diäthylphosphit-amids⁵) des Nitro-L-argininmethylesters mit anschliessender Kondensation mit Carbobenzoxy-L-asparagin, wobei das gesuchte Dipeptidderivat in einer Ausbeute von 30–34% als gut kristallisierte Verbindung entstand. Kondensation von Carbobenzoxy-L-valin mit L-Tyrosinmethylester unter dem Einfluss von Dicyclohexylcarbodiimid⁶) ergab den kristallisierten Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosinmethylester (B 3-4) in guter Ausbeute. Kristallisiertes Carbobenzoxy-L-isoleucyl-L-histidinmethylesterhydrochloridmonohydrat (B 5-6) wurde nach derselben Methode hergestellt, währenddem Carbobenzoxy-L-prolyl-L-phenylalaninmethylester nach der Gemischten-Anhydrid-Methode⁷) hergestellt wurde und nur als Öl isoliert werden konnte.

In der Synthesestufe B \rightarrow C wurden diese Dipeptid-Derivate in eine für die weitere Kondensation zu den Tetrapeptid-Derivaten D 1-4 und D 5-8 geeignete Form gebracht. Durch alkalische Verseifung entstand aus B 1-2 kristallisiertes Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginin (C 1-2); Umsatz von B 5-6 mit Hydrazin ergab Carbobenzoxy-L-isoleucyl-L-histidinhydrazid (C 5-6), ebenfalls als kristallisierte Verbindung. B 3-4 und B 7-8 wurden vom Carbobenzoxyrest befreit, worauf die beiden Dipeptidester L-Valyl-L-tyrosinmethylester (C 3-4) und L-Prolyl-L-phenylalaninmethylester (C 7-8) als kristallisierte Hydrochloride isoliert wurden.

Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosinmethylester (D 1-4) wurde durch Kondensation von C 1-2 und C 3-4 mittels Dicyclohexylcarbodiimid hergestellt; durch mehrfaches Umfällen aus heissem Methanol wurde die Verbindung in analysenreiner Form als in Methanol und Aceton schwerlösliches Pulver in einer Ausbeute von 33% erhalten. Vorsichtige alkalische Verseifung lieferte die freie Säure Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosin (E 1-4).

⁴) Vgl. auch die Darstellungsweise von R. A. Boissonnas, St. Guttman, J.-P. Waller & P.-A. Jaquenoud, *Experientia* **12**, 446 (1956).

⁵) Methode von G. W. Anderson, J. Blodinger, R. W. Young & A. D. Welcher, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 5304 (1952).

⁶) Methode von J. C. Sheehan & G. D. Hess, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 1067 (1955).

⁷) Methode vgl. R. A. Boissonnas, *Helv.* **34**, 874 (1951); Th. Wieland & H. Bernhard, *Liebigs Ann. Chem.* **572**, 190 (1951); J. R. Vaughan, *J. Amer. chem. Soc.* **73**, 3547 (1951).

Carbobenzoxy-L-isoleucyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester (D 5–8) wurde durch Kondensation des Säureazids aus C 5–6 mit C 7–8 erhalten und durch multiplikative Verteilung gereinigt. Aus dem reinen Produkt wurde durch Einwirkung von Bromwasserstoffsäure in Eisessig das Dihydrobromid von L-Isoleucyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester (E 5–8) hergestellt und dieses ohne besondere Reinigung in den freien Ester übergeführt.

Dieser (E 5–8) wurde mit E 1–4 unter dem Einflusse von 1-Cyclohexyl-3-(morpholinyl-äthyl)-carbodiimid⁸⁾ kondensiert. Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester (F 1–8) ist in analysenreinem Zustande eine ausser in Dimethylformamid und verdünnter Säure in üblichen Lösungsmitteln schwer lösliche Substanz. Durch katalytische Hydrierung in Methanol-Salzsäure wurden Carbobenzoxy- und Nitrogruppen entfernt. Das Gemisch aus Octapeptid-methylester (G 1–8) und Ammoniumchlorid (aus der Nitrogruppe entstanden, durch Freisetzen von Ammoniak mittels Pottaschelösung nachgewiesen) wurde in 66-proz. Methanol mit 0,1-n. Natronlauge vorsichtig verseift. Die Isolierung des L-Asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanins (H 1–8) erfolgte durch Extraktion mit n-Butanol bei pH = 9. Die Verbindung wurde als farbloses, feinkörniges Pulver erhalten, welches sich in mehreren Lösungsmittelsystemen als papierchromatographisch einheitlich erwies. Mittels multiplikativer Verteilung wurde das Produkt weiter gereinigt, wobei das Fortschreiten des Reinigungsprozesses anhand der Steigerung der Wirksamkeit auf den Blutdruck der Ratte verfolgt wurde. Nach zweimaliger, 32-stufiger Verteilung im System n-Butanol-Wasser ($G = 0,89$) zeigten die Spitzenfraktionen in Dosen von 0,1–0,2 γ ebenso grosse Wirksamkeit auf den Blutdruck der Ratte (in der Versuchsanordnung nach Peart⁹⁾) wie 1 γ /kg Noradrenalin¹⁰⁾. Eine weitere multiplikative Verteilung im System n-Butanol- 4-proz. Essigsäure ergab ein gleich stark wirksames Präparat; die Einheitlichkeit des Produkts zeigte sich in der Übereinstimmung der experimentell gefundenen mit der theoretisch berechneten Verteilungskurve. Das reine L-Asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin ist somit etwa 2–4 mal stärker wirksam als die besten natürlichen Hypertensin-Präparate³⁾.

Experimenteller Teil.

Zur Analyse wurden die Substanzen in der Regel 5–10 Std. bei 60° und 10⁻² mm Hg über P₂O₅ getrocknet.

⁸⁾ J. C. Sheehan & J. J. Hlavka, J. org. Chemistry **21**, 439 (1956).

⁹⁾ W. S. Peart, Biochem. J. **59**, 300 (1955).

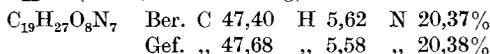
¹⁰⁾ Die pharmakologische Testierung der Präparate verdanken wir den Herren Dres. Gross und Turrian von unserer biologischen Abteilung.

Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-argininmethylester (B 1-2): a) 10,0 g Nitro-L-argininmethylesterhydrochlorid¹¹⁾ (0,0371 Mol) werden fein pulverisiert, einige Std. bei 60° im Hochvakuum getrocknet und in 100 ml absolutem Dioxan suspendiert. Nach Zusatz von 9,0 g (0,089 Mol) Triäthylamin rührt man 2 Std. bei Raumtemp., kühlt auf +10° ab und tropft dazu 7,1 g (0,0408 Mol) Diäthylchlorphosphit (ca. 98-proz.)⁵⁾, gelöst in 20 ml Dioxan. Nach 1 Std. Rühren bei Raumtemp. wird das gebildete Triäthylammoniumchlorid abfiltriert, mit wenig Dioxan nachgewaschen und das Filtrat bei 80° im Vakuum eingedampft. Der gelbliche, zähe Rückstand wird mit 40 ml Diäthylphosphit und 9,85 g (0,0371 Mol) gut getrocknetem Carbobenzoxy-L-asparagin¹²⁾ 2 Std. bei 80° gehalten (homogene Lösung). Zuletzt wird das Lösungsmittel bei ca. +50° im Hochvakuum abgedampft, der ölige Rückstand, der immer noch ca. 5 g Diäthylphosphit enthält, in 60 ml 2-n. Salzsäure aufgenommen und dreimal mit je 600 ml Essigester extrahiert. Die Essigester-Extrakte werden nacheinander noch zweimal mit 2-n. Salzsäure, zweimal mit gesättigtem Natriumhydrogencarbonat und zweimal mit Wasser gewaschen (Volumen der wässrigen Lösungen je 60 ml, immer mit Natriumsulfat gesättigt). Nach Trocknen mit festem Natriumsulfat und Eindampfen im Vakuum erhält man 9,9 g einer grösstenteils kristallinen Masse. Sie wird mit 100 ml heissem Wasser zerrieben, erkalten gelassen und filtriert. Der Rückstand wiegt nach Trocknen im Hochvakuum bei 80° 5,95 g (33% d. Th.) und weist einen Smp. von 150—165° auf.

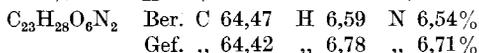
b) Modifikation: Die Kondensation kann auch in Dioxan, ohne Gegenwart von Diäthylphosphit, ausgeführt werden. Das bei der Bildung des Diäthylphosphitamides von Nitro-L-argininmethylester entstandene Triäthylammoniumchlorid wird abfiltriert und das Filtrat direkt mit Carbobenzoxy-L-asparagin kondensiert: Das Gemisch wird 2 Std. unter Rückfluss erhitzt, wobei ein Teil der Substanz als ölige Bodenschicht ungelöst bleibt.

Die Ausbeute beträgt, bei gleichen Mengen wie unter a), 6,10 g Dipeptid vom Smp. ca. 145—160° (34%).

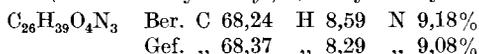
Zur Analyse wurde aus Wasser umkristallisiert; Nadeln, Smp. 170—173° (5,4 g; ~ 30%). $[\alpha]_D^{25} = +5^{\circ} \pm 2^{\circ}$ (c = 1,996 in Eisessig).



Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosinmethylester (B 3-4): Eine Lösung von 68,1 g (0,275 Mol) Carbobenzoxy-L-valin¹³⁾ und 50,9 g (0,261 Mol) L-Tyrosinmethylester¹⁴⁾ in 1 l Tetrahydrofuran wird mit 59,2 g 1,3-Dicyclohexylcarbodiimid⁶⁾ versetzt und 16 Std. bei 21° belassen. Hierauf wird der ausgeschiedene Dicyclohexylharnstoff abgenutscht (46,0 g entspr. 77%) (Smp. 218—224°) und das Filtrat zur Trockne verdampft. Der Rückstand (zähes Öl) wird mit 300 cm³ heissem Petroläther zerrieben, bis Kristallisation eintritt. Die Kristalle werden abgenutscht und mit viel heissem Petroläther gewaschen. Umkristallisation aus Aceton-Äther ergibt insgesamt 91 g (81%) Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosinmethylester; Nadeln, Smp. 144—147°, $[\alpha]_D^{25} = +54^{\circ} \pm 4^{\circ}$ (c = 1,077 in Chloroform); +13° ± 4° (c = 1,110 in Aceton).



Aus der Petroläther-Lösung sowie aus der Mutterlauge obiger Kristalle werden insgesamt 17 g eines Nebenproduktes gewonnen, Smp. 128—130° (aus Petroläther). Es handelt sich dabei um 1-(Carbobenzoxy-L-valyl)-1,3-dicyclohexylharnstoff.



¹¹⁾ K. Hofmann, W. D. Peckham & A. Rheiner, J. Amer. chem. Soc. **78**, 238 (1956).

¹²⁾ M. Bergmann & L. Zervas, Ber. deutsch. chem. Ges. **65**, 1192 (1932).

¹³⁾ R. L. M. Synge, Biochem. J. **42**, 99 (1948).

¹⁴⁾ Herstellung des Hydrochlorides nach R. A. Boissonnas, St. Guttman, P.-A. Jaquenoud & J.-P. Waller, Helv. **38**, 1491 (1955).

Carbobenzoxy-L-isoleucyl-L-histidin-methylester-hydrochlorid-mono-hydrat (B 5-6): Zu einer Lösung von 44,0 g (0,26 Mol) L-Histidin-methylester¹⁵) in 50 ml Acetonitril werden 55,5 g (0,27 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid⁶), gelöst in 100 ml Essigester, und 71,5 g (0,27 Mol) Carbobenzoxy-L-isoleucin¹⁶), gelöst in 700 ml Essigester, zugefügt. Es tritt sofort leichte Erwärmung und bald darauf Abscheidung von kristallinem Dicyclohexyl-harnstoff ein. Es wird kurze Zeit mit Eis gekühlt, so dass die Temperatur nicht über ca. +30° steigt. Nach einigen Min. entsteht aus dem Gemisch eine gallertige Masse, die über Nacht bei Raumtemp. belassen wird.

Das Gemisch wird filtriert, der Rückstand noch zweimal mit je 50 ml Essigester zerrieben, abgesaugt und bei 90° im Vakuum getrocknet. Aus dem so erhaltenen Gemenge von Dipeptid und Dicyclohexyl-harnstoff wird ersteres mit einer Lösung von 25 ml konz. Salzsäure in 20 ml Wasser und 80 ml Methanol als Hydrochlorid herausgelöst, wobei der Rückstand noch zweimal mit je 2 ml konz. Salzsäure in 10 ml Wasser und 20 ml Methanol nachgewaschen wird. Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum zur Trockne eingedampft und aus Methanol-Essigester kristallisiert. Man erhält 52,6 g Dipeptid-Hydrochlorid (44,6%) vom Smp. 170—172° (Zers.). Aus den Mutterlauge werden durch weiteres Eindampfen und Verdünnen mit Essigester noch 39,1 g Hydrochlorid (33,1%) vom Smp. 160—165° (Zers.) gewonnen.

Zur Analyse wurde aus Methanol-Essigester umkristallisiert und 15 Std. bei 60° und 0,05 mm Hg über P₂O₅ getrocknet. Smp. 174—175° (Zers.). $[\alpha]_D^{25} = -34 \pm 4^\circ$ (c = 1,010 in H₂O).

C ₂₁ H ₂₆ O ₅ N ₄ Cl·H ₂ O	Ber. C 53,55	H 6,64	N 11,90	Cl 7,53%
	Gef. „ 53,47	„ 6,44	„ 11,95	„ 7,64%

Carbobenzoxy-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester (B 7-8): Zur Lösung von 1 g (0,004 Mol) kristallinem¹⁷) Carbobenzoxy-L-prolin¹⁸) in 15 ml absolutem Tetrahydro-furan gibt man bei -10° 0,61 ml (0,0044 Mol) Triäthylamin und nach 5 Min. bei der gleichen Temp. 0,42 ml (0,0044 Mol) Chlorameisensäure-äthylester. Das Triäthylamin-hydrochlorid fällt sofort als weisser kristalliner Niederschlag aus.

Eine gleichzeitig bereitete und vom Triäthylamin-hydrochlorid filtrierte Lösung von L-Phenylalanin-methylester (aus 1,1 g (0,0051 Mol) Phenylalanin-methylester-hydrochlorid und 0,71 ml (0,0055 Mol) Triäthylamin) wird ebenfalls auf -10° gekühlt und zur Lösung des gemischten Anhydrids gegeben. Nach zweistündigem Stehen bei Zimmertemp. filtriert man vom Niederschlag ab und verdampft das Lösungsmittel im Vakuum bei 40—45°. Den wasserklaren Rückstand nimmt man in Essigester auf, wäscht viermal mit je 5 ml 1-n. HCl-Lösung, zweimal mit Wasser, viermal mit je 2 ml 2-n. Natriumhydrogencarbonatlösung und zum Schluss mit Wasser neutral. Die Essigesterlösung hinterlässt nach Eindampfen und Trocknen 1,8 g gelbliches Öl, das noch wenig Lösungsmittel enthält und nach einiger Zeit erstarrt, aber aus Lösungsmitteln nicht kristallin erhalten wurde. Zur Analyse wurde 5 Std. bei 60° und 0,01 mm Hg über P₂O₅ getrocknet.

C ₂₃ H ₂₆ O ₅ N ₂	Ber. C 67,30	H 6,39	O 19,49	(O)CH ₃ 3,66%
	Gef. „ 67,28	„ 6,69	„ 19,49	„ 3,86%

Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginin (C 1-2): 4,74 g (0,0099 Mol) Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginin-methylester vom Smp. 165—170° wird mit 11,0 ml 1-n. Natronlauge versetzt und bei 22° 1 Std. geschüttelt. Nach ca. 15 Min. ist die Hauptmenge gelöst. Nach weiteren 15—20 Min. beginnt Abscheidung eines voluminösen Niederschlages (Natriumsalz). Der Niederschlag wird zum Schluss durch Zugabe von 20 ml Wasser gelöst, von einer Spur ungelöstem Material abfiltriert und dann CO₂ eingeleitet bis das pH der Lösung = 8,5 ist.

¹⁵) E. Fischer & L. H. Cone, Liebigs Ann. Chem. **363**, 107 (1908).

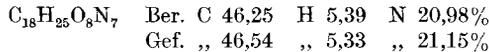
¹⁶) In üblicher Weise hergestellt, Öl, C₁₄H₁₉O₄N, Ber. C 63,38, H 7,22 N 5,28%, Gef. C 63,16, H 7,13, N 5,55%.

¹⁷) Aus Äther-Petroläther, Smp. 70—72°.

¹⁸) Vgl. E. Abderhalden & H. Nienburg, Fermentforschung **13**, 573 (1933).

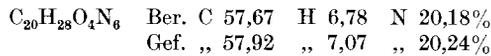
Die wässrige Phase wird sodann zweimal mit je 80 ml Essigester gewaschen und die Essigesterlösungen werden einmal mit wenig Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen.

Die wässrige Phase und die Wasch-hydrogencarbonatlösung werden vereinigt und mit 2-n. Salzsäure auf pH = 1 gebracht, wobei sich amorphes Material abscheidet. Letzteres wird durch viermaliges Ausziehen mit je 250 ml Essigester in Lösung gebracht; die Essigesterlösungen werden zweimal mit wenig Natriumsulfatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und geben beim Eindampfen 4,46 g teilweise kristallinen Rückstand. Durch Kristallisation aus Acetonitril werden insgesamt 3,26 g Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginin in Nadeldrusen vom Smp. 98—101° erhalten (71%). Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Acetonitril Smp. 98—101°; $[\alpha]_D^{25} = +10^{\circ} \pm 4^{\circ}$ ($c = 1,4$ in Methanol), $+9^{\circ} \pm 4^{\circ}$ ($c = 1,0$ in Eisessig). Löslich in Methanol, Dimethylformamid, heissem Acetonitril und heissem Wasser, schwer löslich in kaltem Wasser und Acetonitril, Essigester, Tetrahydrofuran, Aceton; leicht löslich in verdünnter Natriumbicarbonatlösung.



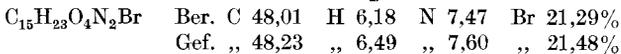
Bei der multiplikativen Verteilung im System n-Butanol-Wasser über 18 Verteilungsschritte verhielt sich die Substanz einheitlich ($G = 3,22$; Maximum im Rohr 14); Smp. 98—103°; $[\alpha]_D^{25} = +7^{\circ} \pm 2^{\circ}$ ($c = 2,042$ in MeOH).

Carbobenzoxy-L-isoleucyl-L-histidinhydrazid (C 5-6); 2,5 g (0,0053 Mol) Carbobenzoxy-L-isoleucyl-L-histidin-methylester-hydrochlorid-monohydrat werden in 10 ml abs. Methanol mit 1,5 ml Hydrazinhydrat 1 Std. am Rückfluss gekocht. Das Lösungsmittel wird im Vakuum weitgehend abgedampft und der Verdampfungsrückstand mit 100 ml Eiswasser versetzt. Die anfänglich ölige Ausfällung kristallisiert nach kurzem Stehen bei 0°. Das Carbobenzoxy-dipeptidhydrazid wird abfiltriert, mit viel Wasser gewaschen und im Vakuum über Phosphorpentoxyd und Schwefelsäure getrocknet. Rohausbeute 1,82 g (83%), einmaliges Umkristallisieren aus siedendem Wasser ergibt 1,6 g analysenreine, hygroskopische Kristalle, Smp. 186—187°. $[\alpha]_D^{25} = -51^{\circ} \pm 4^{\circ}$ ($c = 1,327$ in 1-n. Salzsäure); $-22^{\circ} \pm 4^{\circ}$ ($c = 0,558$ in Methanol).



Die Verbindung ist leicht löslich in Methanol, Äthanol, Aceton, Essigester und 1-n. Salzsäure, schwer löslich in heissem Wasser und unlöslich in Benzol, Äther und Petroläther.

L-Valyl-L-tyrosin-methylester (C 3-4): 20,0 g (0,0468 Mol) Carbobenzoxy-L-valyl-L-tyrosin-methylester werden in 200 cm³ 1,1-n. HBr in Eisessig gelöst. Nach 1 Std. bei 21° wird das Gemisch im Vakuum bei 45° Badtemperatur zur Trockne eingedampft und das hinterbleibende Öl mit viel Äther verrieben, wobei es erstarrt. Der Rückstand wird mit Äther gewaschen; man erhält 17,26 g (98%) L-Valyl-L-tyrosin-methylesterhydrobromid; Smp. 206—208°. Beim Umkristallisieren aus Methanol-Äther werden Stäbchen vom Smp. 208—209° (Zers.) erhalten; $[\alpha]_D^{25} = +31^{\circ} \pm 4^{\circ}$ ($c = 1,08$ in Methanol).



5,63 g (15 mMol) Hydrobromid werden in 80 cm³ Essigester suspendiert und mit 2,1 cm³ (15 mMol) Triäthylamin versetzt. Die ausgefallenen Kristalle von Triäthylaminhydrobromid werden nach 10 Min. abgenutscht (2,68 g entspr. 99%) und das Filtrat zur Trockne verdampft. Der zurückbleibende L-Valyl-L-tyrosin-methylester (Harz; 4,61 g) wird sofort weiterverwendet.

L-Prolyl-L-phenylalanin-methylester (C 7-8): 2,46 g (0,006 Mol) Carbobenzoxy-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester werden in 40 ml Methanol gelöst, mit 6 Äquivalenten methanolischer Salzsäure und 0,6 g Palladiumkohle (10% Pd) versetzt und bei Raumtemp. und Normaldruck hydriert (gebildetes CO₂ in NaOH absorbiert).

Nach Aufnahme von etwas mehr als der berechneten Menge Wasserstoff kommt die Hydrierung zum Stillstand. Die vom Katalysator abfiltrierte Lösung wird im Vakuum eingedampft und der Rückstand in wenig Aceton aufgenommen. Bei Zugabe von Äther scheidet sich das Hydrochlorid des L-Prolyl-L-phenylalanin-methylesters kristallin aus; Ausbeute: 1,62 g (86%). Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Aceton-Äther, Smp. 157—158°; $[\alpha]_D^{23} = -41^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($c = 4,15$ in H_2O).

$C_{15}H_{21}N_2O_3Cl$ Ber. N 8,96 Cl 11,34% Gef. N 8,73 Cl 11,08%

Zur Überführung in den freien Ester wird eine Lösung von 1,10 g (0,0035 Mol) Hydrochlorid in 1 ml Wasser mit Essigester überschichtet und bei 0° unter kräftigem Schütteln mit gesättigter Kaliumcarbonat-Lösung versetzt. Der Essigester-Auszug wird getrocknet, im Vakuum eingedampft und der Rückstand bei 0,1 mm Hg getrocknet. Der erhaltene L-Prolyl-L-phenylalanin-methylester (0,98 g in Wasser und Äther leicht lösliches Öl) wird sofort weiterverwendet.

Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosin-methylester (D 1-4): 3,72 g (13 mMol) frisch bereiteter L-Valyl-L-tyrosin-methylester und 5,47 g (11,8 mMol) Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginin werden in 35 cm³ Dimethylformamid gelöst und mit 2,52 g (12,3 mMol) 1,3-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach 24 Std. bei 21° wird der ausgeschiedene Dicyclohexylharnstoff abgenutscht und das Filtrat bei 0,1 mm Hg und 45° Badtemperatur vollständig vom Dimethylformamid befreit. Das hinterbleibende Öl wird zuerst mit Petroläther, dann unter Eiskühlung mit verdünnter Hydrogencarbonat-Lösung, Wasser, verdünnter Salzsäure und Wasser gewaschen, wobei das anfänglich ölige Produkt langsam körnig wird. Das Rohprodukt (8,79 g) wird zur weiteren Reinigung aus heissem Methanol umgefällt und das in Methanol unlösliche Pulver mit heissem Aceton verrieben. Dabei werden 2,91 g (33%) Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosin-methylester vom Smp. 202—206° (Zers.) erhalten; $[\alpha]_D^{23} = -4^{\circ} \pm 4^{\circ}$ ($c = 0,94$ in Dimethylformamid).

$C_{33}H_{45}O_{11}N_9$ Ber. C 53,29 H 6,10 N 16,95 (O)CH₃ 2,02%
Gef. „ 53,13 „ 6,26 „ 16,96 „ 2,16%

Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosin (E1-4): 2,58 g (2,5 mMol) Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosin-methylester werden in 30 cm³ Dimethylformamid gelöst und innerhalb 15 Min. mit insgesamt 100 cm³ 0,1-n. Natronlauge in mehreren Anteilen versetzt, wobei darauf geachtet wird, dass das pH der Lösung 11 nicht überschreitet. Nach Zugabe der Lauge wird weitere 15 Min. bei pH = 11 belassen, dann durch Zugabe von festem CO₂ auf pH = 8 gebracht und die Lösung zuerst bei 11 mm und 45° Badtemp. vom Wasser, dann bei 0,1 mm vom Dimethylformamid befreit. Der Rückstand wird in 30 cm³ Wasser gelöst, von einer Spur Flocken abfiltriert und das klare Filtrat unter Kühlung mit 2-n. Salzsäure angesäuert. Das ausgeschiedene, zähe Produkt wird beim Verreiben (unter Eiskühlung) fest. Das Rohprodukt (2,14 g) wird in heissem Methanol gelöst und durch Zugabe von Acetonitril ausgefällt. Es werden 1,77 g (70%) Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosin als Pulver erhalten. Smp. ca. 165—170° (Aufschäumen); $[\alpha]_D^{23} = 0^{\circ} \pm 4^{\circ}$ ($c = 0,4$ in Methanol).

$C_{32}H_{43}O_{11}N_9$ Ber. C 52,67 H 5,94 N 17,28%
Gef. „ 52,42 „ 6,19 „ 17,26%

Die Substanz wurde durch multiplikative Verteilung im System n-Butanol-Methanol-Wasser-Chloroform (1 : 1 : 1) über 11 Stufen (Craig-Grundprozess) weitergereinigt; $G = 0,26$ (Maximum im 2. Rohr), es konnten nur sehr kleine Mengen schneller wandernde Verunreinigungen abgetrennt werden.

Carbobenzoxy-L-isoleucyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester (D 5-8): Die Lösung von 1,49 g (0,035 Mol) Carbobenzoxy-L-isoleucyl-L-histidin-hydrazid in 15 ml 1-n. Salzsäure wird einmal mit wenig Essigester extrahiert und die Essigesterphase nochmals mit 3 ml 1-n. Salzsäure gewaschen; die vereinigten salzsauren Lösungen werden im Scheidetrichter mit Essigester überschichtet und mit Eis

auf 0° abgekühlt. Hierauf werden langsam 275 mg (0,004 Mol) Natriumnitrit in 5 ml Eiswasser zugegeben. Nach 3 Min. wird die salzsaure Azidlösung mit 3 ml gesättigter Kaliumcarbonatlösung Phenolphthalein-alkalisch gestellt. Die wässrige Lösung wird noch zwei weitere Male unter Eiskühlung mit viel Essigester extrahiert; die organischen Phasen werden mit Wasser neutral gewaschen.

Die eiskalte, über Natriumsulfat getrocknete Azidlösung wird in die frisch bereitete, auf 0° gekühlte und vom Triäthylamin-hydrochlorid abfiltrierte Lösung von L-Prolyl-L-phenylalanin-methylester (hergestellt aus 1,24 g [0,004 Mol] L-Prolyl-L-phenylalanin-methylester-hydrochlorid und 0,55 ml [0,004 Mol] Triäthylamin in 15 ml abs. Essigester) eingefiltriert.

Nach 18 Std. bei 0—5° und 2 Std. bei Zimmertemp. wird die Lösung bei 40° im Vakuum auf die Hälfte eingedampft und mit 1-n. Salzsäure, eiskalter 2-n. Sodalösung und mit Wasser neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und verdampft.

Es werden 2 g (85%) gelblich amorpher Carbobenzoxy-tetrapeptidester erhalten. Die 36-stufige Verteilung zwischen 80-proz. Methanol und Chloroform: Tetrachlorkohlenstoff = 1 : 1 : 1 ergibt 1,6 g reinen Carbobenzoxy-L-isoleucyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester (G = 0,33). Die Analysenfraction schmilzt nach einmaligem Umfällen aus Methanol-Wasser bei 105—110°; $[\alpha]_D^{25} = -56^{\circ} \pm 4^{\circ}$ (c = 0,971 in Methanol). Die Verbindung ist in den meisten organischen Lösungsmitteln, ausser Äther und Petroläther, gut löslich.

$C_{35}H_{44}O_7N_6$ Ber. C 63,62 H 6,71 N 12,72 (O)CH₃ 2,27%
Gef. „ 63,69 „ 6,90 „ 12,95 „ 2,41%

L-Isoleucyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester (E 5-8): a) Dihydrobromid: 1,72 g (2,61 mMol) Carbobenzoxy-L-isoleucyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester werden mit 8,3 cm³ 1,1-n. Bromwasserstoff in Eisessig versetzt, worauf alsbald Lösung eintritt. Nach zweistündigem Stehen bei 21° wird der Eisessig bei 0,1 mm Hg und 25° vollständig abdestilliert und das zurückbleibende Harz mit Äther verrieben, wobei es körnig wird. Das rohe L-Isoleucyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester-dihydrobromid wiegt 1,79 g, Smp. 130—140°. $[\alpha]_D^{25} = +18^{\circ} \pm 4^{\circ}$ (c = 0,974 in Methanol).

$C_{27}H_{40}O_5N_6Br_2$ Ber. Br. 23,21% Gef. 22,66%

b) Freier Ester: 1,96 g (2,85 mMol) L-Isoleucyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester-dihydrobromid werden in wenig Wasser gelöst. Die Lösung wird von einer geringen Trübung durch Waschen mit etwas Essigester befreit, mit 50 cm³ Chloroform und dann unter Eiskühlung mit gesättigter Pottaschelösung versetzt, bis das pH der wässrigen Phase = 10 ist. Der ausgeschiedene Ester löst sich beim Umschütteln glatt in der Chloroformphase. Die Chloroformlösung wird einmal mit wenig gesättigter Natriumsulfatlösung gewaschen; Pottasche- und Natriumsulfatlösung werden mit weitem 30 cm³ Chloroform nachgewaschen. Die Chloroformlösungen hinterlassen nach Trocknen mit Natriumsulfat und Eindampfen 1,31 g (88%) L-Isoleucyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester als Harz, das sofort weiterverarbeitet wird.

Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester (F 1-8): 1,88 g (2,58 mMol) Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosin und 1,31 g (2,50 mMol) frisch bereiteter L-Isoleucyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester werden in 15 cm³ Dimethylformamid gelöst und mit einer Lösung von 0,62 g (2,62 mMol) 1-Cyclohexyl-3-(morpholinyläthyl)-carbodiimid versetzt. Die Lösung wird 21 Std. bei 20° belassen, hierauf wird das Dimethylformamid im Hochvakuum entfernt und das zurückbleibende Öl mit Wasser unter Eiskühlung verrieben, wobei es allmählich körnig wird. Das Pulver wird mehrmals mit Wasser, dann mit verdünnter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen und getrocknet. Das Rohprodukt (3,70 g) wird zur weiteren Reinigung mit Aceton und Methanol gewaschen und ergibt 0,68 g Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester. Nach Umfällen aus Dimethylformamid-Äther, Smp. 190—205°;

$[\alpha]_D^{23} = -29^{\circ} \pm 4^{\circ}$ ($c = 0,52$ in Dimethylformamid). Das Produkt ist schwerlöslich in den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln ausser in Dimethylformamid; löslich in sehr verdünnter Salzsäure.

$C_{69}H_{70}O_{15}N_{15}$ Ber. O 19,38 (O)CH₃ 2,50% Gef. O 19,59 (O)CH₃ 2,56%

L-Asparaginyll-L-arginyll-L-valyll-L-tyrosyll-L-isoleucyll-L-histidyll-L-prolyll-L-phenylalanin-methylester (G 1-8): 370 mg (0,3 mMol) Carbobenzoxy-L-asparaginyll-nitro-L-arginyll-L-valyll-L-tyrosyll-L-isoleucyll-L-histidyll-L-prolyll-L-phenylalanin-methylester werden in 15 cm³ Methanol suspendiert und durch Zugabe von 1,0 cm³ 1,24-n. (4 Äq.) Salzsäure in Methanol in Lösung gebracht. Eine Spur Flocken wird durch Filtration entfernt und die Lösung in Gegenwart von 100 mg Palladiumkohle (10% Pd) bei Zimmertemp. und Normaldruck hydriert (unter Verwendung eines zweiten, mit verdünnter Natronlauge gefüllten Hydriergefässes zur Absorption des entwickelten CO₂). Die Hydrierung ist nach 13 Std. unter Aufnahme von etwas mehr als der berechneten Menge Wasserstoff beendet. Die Lösung wird hierauf vom Katalysator abfiltriert und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand (Harz) wiegt 310 mg (berechnet für ein Gemisch aus äquimolaren Mengen Trihydrochlorid und Ammoniumchlorid: 360 mg). Das Produkt wird ohne Reinigung weiterverarbeitet. Es ist leicht löslich in Wasser aber schwerlöslich in wässrigem Alkali; löslich in Methanol, unlöslich in Äther.

L-Asparaginyll-L-arginyll-L-valyll-L-tyrosyll-L-isoleucyll-L-histidyll-L-prolyll-L-phenylalanin (H 1-8): Zur Lösung von 256 mg (0,25 m Mol) L-Asparaginyll-L-arginyll-L-valyll-L-tyrosyll-L-isoleucyll-L-histidyll-L-prolyll-L-phenylalanin-methylester in 12,0 cm³ 66-proz. Methanol wird in mehreren Anteilen 0,1-n. Natronlauge zugegeben, bis der pH-Wert der Lösung während 20 Min. bei 10,5–11,0 bleibt (total 18 cm³ 0,1-n. Natronlauge zugegeben). Nach insgesamt 30 Min. wird durch Zugabe von etwas festem CO₂ auf pH = 8 gebracht, eine flockige Fällung (25 mg) durch Filtration entfernt und das Filtrat im Vakuum von Methanol befreit. Die wässrige Lösung (Volumen 15 cm³) wird mit einigen cm³ verdünnter Sodalösung versetzt und bei pH = 9 viermal mit je 100 cm³ wassergesättigtem n-Butanol ausgeschüttelt. Die Butanol-Auszüge werden einmal mit 8 cm³ verdünnter Natriumsulfatlösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft: 195 mg Rohprodukt. Dieses wird dreimal mit je 5 cm³ trockenem n-Butanol gewaschen, wodurch sich 30 mg leichter lösliche Anteile entfernen lassen. Die Hauptmenge (135 mg) L-Asparaginyll-L-arginyll-L-valyll-L-tyrosyll-L-isoleucyll-L-histidyll-L-prolyll-L-phenylalanin ist in trockenem Butanol schwerlöslich und wird in Form eines farblosen, feinkörnigen Beschlages erhalten. Das Produkt ist löslich in Wasser und Methanol.

Das Rohprodukt (135 mg) wird einer 32-stufigen multiplikativen Verteilung (Craig-Grundprozess) im System n-Butanol-Wasser unterworfen. Die Hauptmenge (75 mg) des wirksamen Materials befindet sich in den Fraktionen 9–21 mit einem Maximum bei Fraktion 15 ($G = 0,89$). Die Fraktionen 0–8 enthalten 45 mg einer langsamer wandernden, inaktiven Verunreinigung; die Fraktionen 22–32 enthalten ca. 20 mg inaktives Material. Eine Probe der Substanz aus Fraktion 15 wirkt an der Ratte in der Versuchsanordnung von *Pearl*⁹) zweimal so stark wie Noradrenalin (0,25 γ /kg in 0,1 cm³ physiologischer Kochsalz-Lösung intravenös entsprechen 0,5 γ Noradrenalin).

Das Material aus den Fraktionen 9–21 wird vereinigt und nochmals gleich wie oben verteilt. Aktivität findet sich wiederum in den Fraktionen 9–22, welche insgesamt 32 mg Material enthalten (Maximum in Fraktion 16). Die Fraktionen 0–8 enthalten noch 20 mg inaktives Material, die Fraktionen 23–32 noch ca. 15 mg inaktives Material.

Eine Probe der Substanz aus Fraktion 16 ist im obigen Test 5–10mal stärker wirksam als Noradrenalin.

Das Material aus den Fraktionen 9–22 wird wieder vereinigt und im System n-Butanol-4-proz. Essigsäure in 30 Schritten verteilt (Craig-Grundprozess). Nach Bendingung des 30. Verteilungsschrittes wird das pH aller Fraktionen durch Zugabe von etwas methanolischem Ammoniak auf 5,5–6,0 gebracht, die Lösungen werden bei 40°

und vermindertem Druck zur Trockne verdampft und die Eindampfrückstände zur Entfernung von Ammoniumacetat 8 Std. bei 50°/0,01 mm Hg getrocknet. Die Fraktionen 0-6 enthalten insgesamt 30 mg Substanz (Maximum bei Fraktion 1, $G = 0,051$); die Fraktionen 7-30 enthalten keine wägbaren Anteile. Die experimentell gefundene Gewichtsverteilungskurve in den Fraktionen 0-6 stimmt mit der theoretisch berechneten überein. Eine Probe der Substanz aus Fraktion 1 zeigt im oben angegebenen Test von *Peart*⁹⁾ eine fünfmal stärkere Wirksamkeit als Noradrenalin. Das so gereinigte L-Asparaginyll-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin wird als farbloses Pulver erhalten (Acetat?); Smp. (nach Trocknen im Hochvakuum) 195—205^{0,19)} (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -44^{\circ} \pm 6^{\circ}$ ($c = 0,558$ in Wasser). Im Papierchromatogramm zeigt es in den Systemen Äthanol-n-Butanol-H₂O-Diäthylamin (100:100:50:20), n-Butanol-Aceton-H₂O-Diäthylamin (100:100:50:20), Äthanol-n-Butanol-H₂O (100:100:50), n-Butanol-Eisessig-H₂O (100:10, ges. mit H₂O) und sek. Butanol-3-proz. NH₃ (120:44) auf *Whatman*-Papier Nr. 1 die Rf-Werte 0,37; 0,31; 0,18; 0,15 und 0,24. Die Flecken zeigen die *Pauly*-Reaktion: auf dem Papier sind keine ninhydrinpositiven Substanzen nachweisbar.

Die Analysen wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium unter der Leitung von Herrn D. H. *Gysel* ausgeführt.

SUMMARY.

The synthesis of Ileu⁵-hypertensin II-Asp- β -amide, L-Asparaginyll-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanine, is described. The highly purified octapeptide is 5 to 10 times as active as noradrenaline on the blood pressure of the rat in the experimental set-up of *Peart*⁹⁾, and 2 to 4 times as active as Val⁵-hypertensin I, isolated from bovine plasma³⁾.

Forschungslaboratorien der *CIBA Aktiengesellschaft*, Basel,
Pharmazeutische Abteilung.

¹⁹⁾ Auf einem *Fisher-Johns*-Smp.-Apparat bestimmt.

82. Die Synthese von Gramacidin S

von R. Schwyzer¹⁾ und P. Sieber.

(9. III. 57.)

Gramacidin S wird in reiner, kristallisierter Form als Dihydrochlorid aus den Kulturfiltraten von *Bacillus brevis* var. *Gause-Brazhnikova* gewonnen²⁾. Es ist das erste cyclische Peptid-Antibiotikum, dessen Konstitution mit einigermaßen grosser Sicherheit aufgeklärt werden konnte. Nach den Untersuchungen von R. L. M. *Synge*³⁾, F. *Sanger*⁴⁾,

¹⁾ Diese Arbeit ist meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. P. *Karrer*, in Dankbarkeit gewidmet.

²⁾ G. F. *Gause* & M. G. *Brazhnikova*, *Lancet* **247**, 715 (1944).

³⁾ *Biochem. J.* **39**, 363 (1945).

⁴⁾ *Biochem. J.* **40**, 261 (1946).