

molecule usually result in a more or less pronounced decrease or loss of activity. Certain amino-acid residues seem to be more responsible for activity than others. These and other results (in the field of bradykinin) are taken as evidence against the postulation of an abnormally low biological specificity of peptides as compared with other classes of biologically active compounds.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel
Pharmazeutische Abteilung
und
Org.-Chemisches Institut der Universität Zürich

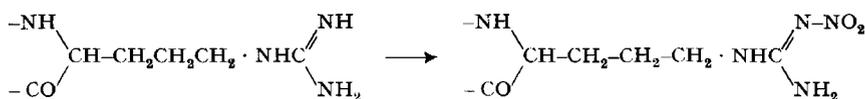
77. Synthetische Analoge des Hypertensins

II. Arg(NO₂)², Val⁵-Hypertensin II-Asp¹-β-amid und Val⁵-Hypertensin II-Asp¹-β, Phe⁸-diamid¹)

von B. Riniker und R. Schwyzer

(18. II. 61)

Die beiden im Titel erwähnten, funktionellen Derivate des Val⁵-Hypertensins II²⁾, L-Asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin (I, H·Asp(NH₂)-Arg(NO₂)-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OH) und L-Asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalaninamid (II, H·Asp(NH₂)-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·NH₂) zeigten ein unerwartetes pressorisches Verhalten an der nephrektomierten Ratte^{1,3)}. Ersatz der Guanidgruppe des Arginrestes durch die Nitroguanidgruppe (Verb. I):



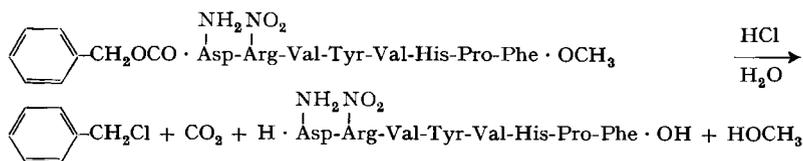
führt zu einer erstaunlich kleinen Verringerung der Wirkung auf den Blutdruck (um nur 50%), obwohl durch diese Substitution der basische Charakter des Guanidrestes stark vermindert wird. Die Verbindung II dagegen besitzt nur noch ca. 3% der Wirkung des Val⁵-Hypertensins II oder seines Asp¹-β-amids²⁾; die freie, C-terminale Carboxylgruppe ist also für die volle Wirkung wichtig (H·Asp(NH₂)-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe·OCH₃ besitzt noch 10% Aktivität), dagegen ist es unwesentlich, ob die β-Carboxylgruppe des Asp¹ in freier Form oder in Form des Amids vorliegt.

Die Synthese der Verbindung I erfolgte in einfacher Weise durch partielle Hydrolyse von Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-hi-

¹⁾ Abhandlung I: R. SCHWYZER, *Helv.* 44, 667 (1961).

²⁾ R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* 41, 1287 (1958).

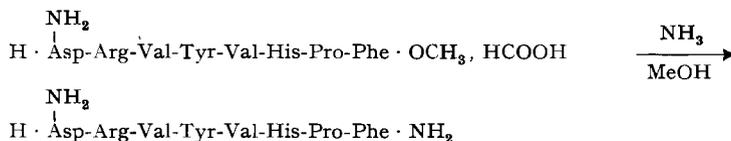
stidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester²⁾) mittels konz. Salzsäure bei 40°, wobei u. a. Benzylchlorid entstand:



I

Aus dem Reaktionsgemisch wurde I mittels Gegenstromverteilung abgetrennt. Die Nitrogruppe ist an der UV.-Absorption bei 271 m μ erkennbar (siehe exp. Teil⁴⁾).

Verbindung II wurde durch Ammonolyse des ameisen-sauren Salzes von L-Asparaginyll-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester²⁾) mittels methanolischen Ammoniaks und anschliessender Gegenstromverteilung erhalten:



II

Bei der Analyse der Verbindung I wurde beobachtet, dass Nitroarginin unter den üblichen Bedingungen der Totalhydrolyse mit Salzsäure zu Arginin und Ornithin abgebaut wird. Bei Gegenwart von Nitroarginin wird Tyrosin unter denselben Bedingungen weitgehend zerstört; dabei ist es gleichgültig, ob Nitroarginin und Tyrosin peptidisch gebunden sind oder als freie Aminosäuren vorliegen.

Experimenteller Teil

Die Analysenpräparate wurden 15 Std. bei 80° und ca. 10⁻² Torr getrocknet.

Elementaranalysen der Endprodukte (freie Peptide) sind nicht sehr aufschlussreich, da diese als amorphe Substanzen und infolge der Isolierung aus Ammoniumacetat enthaltenden Lösungen wechselnde Mengen von Wasser und Essigsäure enthalten. Es wurde deshalb die Aminosäure-Zusammensetzung des Totalhydrolysates quantitativ bestimmt. Diese Analysen wurden in dankenswerter Weise von den Herren Dr. R. WEBER und Prof. Dr. M. BRENNER, Org.-Chem. Anstalt der Universität Basel, nach der Methode von MOORE, SPACKMAN & STEIN⁵⁾ ausgeführt. Die hier angegebenen Zahlen bedeuten relative molare Mengen, wobei Histidin = 1 gesetzt wird.

Papierchromatogramme wurden auf WHATMAN Nr. 3 mit folgenden Systemen ausgeführt:

(45) = sek.-Butanol (100 ml), 3% NH₃ in Wasser (44 ml).

(50) = t-Amylalkohol (100 ml), Triäthylamin (0,8 ml), Veronal (1,8 g), Wasser (50 ml), Isopropanol (40 ml).

(54) = sek.-Butanol (70 ml), Monochloressigsäure (3 ml), Wasser (40 ml), Isopropanol (10 ml).

Arg(NO₂)², Val⁵-Hypertensin II-Asp¹ β -amid (I): 400 mg Z · Asp(NH₂)-Arg(NO₂)-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe · OCH₃¹⁾ wurden zusammen mit 4 ml konz. Salzsäure in einem dickwandigen Reagensglas eingeschmolzen. Beim Schütteln und Erwärmen auf 40° trat im Laufe von 20 Min.

¹⁾ F. GROSS & H. TURRIAN in «Polypeptides which Affect Smooth Muscles and Blood Vessels», S. 137, Pergamon Press, London 1960.

⁴⁾ Nitroguanidin besitzt ein Absorptionsmaximum bei 265 m μ ($\epsilon = 15300$), W. A. SCHROEDER, P. E. WILCOX, K. N. TRUEBLOOD & A. O. DEKKER, *Analyt. Chemistry* **23**, 1740 (1951).

⁵⁾ S. MOORE, D. H. SPACKMAN & W. H. STEIN, *Analyt. Chemistry* **30**, 1185 (1958).

vollständige Lösung der Festsubstanz ein, unter gleichzeitiger Abscheidung von öligen Tröpfchen (Benzylchlorid). Es wurde nun noch während weiteren 40 Min. auf 40° erwärmt und dann im Hochvakuum bei 30° Badtemp. zur Trockne eingengt. Man erhielt 413 mg eines pulverigen, hygroskopischen Hydrochlorids, das nach Auflösen in 10 ml Wasser durch eine Säule ($\varnothing = 9,5$ mm; $l = 120$ mm) von schwach basischem Ionenaustauscher (MERCK II) in der Acetatform filtriert wurde. Das wässrige Filtrat (70 ml) wurde lyophilisiert und ergab 361 mg Rohprodukt. Die Reinigung erfolgte mit Hilfe einer CRAIG-Verteilung über 90 Stufen im System sek.-Butanol – 0,6% Essigsäure (Phasenvol. je 10 ml). Nach beendigem Verteilungsprozess wurde in Portionen zu je 3 Röhrchen vereinigt, im Wasserstrahlvakuum bei 30° Badtemp. bis auf ein kleines Volumen konzentriert und zuletzt lyophilisiert. Aus Röhrchen 12–20 ($r_{max} = 18$, $K = 0,26$) erhielt man 168 mg einer reinen Hauptfraktion als weisses Pulver. Röhrchen 9–11 und 21–23 lieferten noch 19 mg bzw. 59 mg weniger reines Material, Reinheitsgrad je ca. 70%. Die Verbindung zeigt, im Gegensatz zu den argininhaltigen Hypertensin-Varianten, eine negative Reaktion mit SAKAGUCHI-Reagens und ist bedeutend weniger leicht wasserlöslich.

UV.-Absorption: $\lambda_{max} = 271$ m μ ; $\epsilon = 16800$ (Äthanol). Rf(45) = 0,50; Rf(50) = 0,48; Rf(54) = 0,66. $[\alpha]_D = -61,5^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,75$ in 1N Essigsäure).

Totalhydrolysat: Asp 0,98; Arg 0,95; Val 1,91; Tyr 0,20; His 1,00; Pro 1,29; Phe 1,08; Orn 0,27.

–CONH₂ nach CONWAY: NH₃ gef. 1,99%; ber. 1,58%.

Nitroarginin wird unter den Bedingungen der Totalhydrolyse zu Arginin und Ornithin abgebaut. Tyrosin wird bei Gegenwart von Nitroarginin grösstenteils zerstört.

Val^B-Hypertensin II-Asp¹- β , Phe⁸-diamid (II): 175 mg H · Asp(NH₂)-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe · OCH₃ · HCOOH²) wurden in 1,2 ml abs. Methanol unter Erwärmen gelöst und dazu 4 ml bei 20° mit Ammoniak gesättigtes Methanol gegeben. Man liess während 4 Tagen bei 20° stehen und dampfte dann im Vakuum zur Trockne ein. Nach Trocknung im Hochvakuum bei 40° erhielt man 165 mg eines leicht bräunlichen Pulvers, das sich papierchromatographisch fast einheitlich verhielt. Zur Reinigung wurde nach CRAIG im System n-Butanol – 0,4M Ammoniumacetat (pH 7,1) über 60 Stufen mit je 10 ml Phasenvolumen verteilt. Aus Röhrchen 35–47 ($r_{max} = 41,5$, $K = 2,2$) wurden nach Eindampfen auf ein kleines Volumen, Lyophilisieren und Trocknen im Hochvakuum bei 45° bis zur Gewichtskonstanz insgesamt 126 mg reines H · Asp(NH₂)-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe · NH₂ als amorphes, leicht wasserlösliches Pulver isoliert.

Rf(45) = 0,52; Rf(50) = 0,66; Rf(54) = 0,58. $[\alpha]_D = -65^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,88$ in 1N Essigsäure).

–CONH₂ nach CONWAY: NH₃ gef. 2,88%; ber. 3,30%.

Herrn Dr. W. PADOWETZ verdanken wir die Mikro-CONWAY-Bestimmungen.

SUMMARY

The syntheses of H · Asp(NH₂)-Arg(NO₂)-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe · OH (I) and of H · Asp(NH₂)-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe · NH₂ (II), functional derivatives of hypertensin II (angiotensin II), are described. On total acid hydrolysis, nitroarginine and peptides thereof are degraded to arginine and ornithine; tyrosine is destroyed to a great extent under the conditions of total acid hydrolysis when nitroarginine is present. Nitroarginine displays a characteristic UV. absorption at 271 m μ .

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel
Pharmazeutische Abteilung