

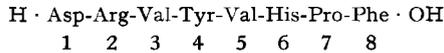
78. Synthetische Analoge des Hypertensins

III. Gly¹, Val⁵-Hypertensin II, Orn², Val⁵-Hypertensin II, Phe⁴, Val⁵-Hypertensin II, und Derivate¹)

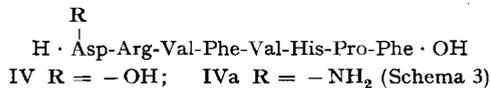
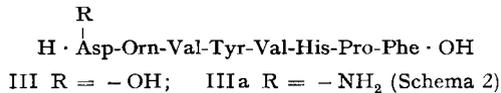
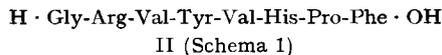
von B. Riniker und R. Schwyzer

(18. II. 61)

Die drei im Titel genannten Octapeptide sind Analoge des Val⁵-Hypertensins II (I) mit veränderten Aminosäuresequenzen. Das erste (II) enthält Glycin anstelle von Asparaginsäure, das zweite (III) Ornithin anstelle von Arginin und das dritte (IV) Phenylalanin anstelle von Tyrosin²).



I



Von den Octapeptiden III und IV wurden auch die entsprechenden Asp¹-β-amide (IIIa und IVa) hergestellt. Auf die pressorische Wirkung dieser Verbindungen, die von GROSS & TURRIAN³) bestimmt wurde, ist bereits andernorts hingewiesen worden⁴).

Zur Synthese von II, Gly¹, Val⁵-Hypertensin II (Schema 1), wurde Carbobenzoylglycyl-L-nitroarginin (1C 1–2)⁵)⁶) mittels der Carbodiimid-Methode⁷) über den betreffenden Methylester (1B 1–2) hergestellt und mit dem Hexapeptidester L-Valyl-L-

¹) Abhandlung II: B. RINIKER & R. SCHWYZER, *Helv.* **44**, 674 (1961).

²) Die hier verwendeten Abkürzungen lehnen sich an die von E. BRAND & J. T. EDSALL (*Annu. Rev. Biochemistry* **16**, 223 [1947]) vorgeschlagenen an. Symbole mit grossen Anfangsbuchstaben bedeuten die natürliche Form (L) des betr. Aminosäurerestes. Substituenten an den funktionellen Gruppen der Seitenketten der Aminosäurereste werden entweder über dem Symbol oder in Klammern, diesem nachfolgend, angegeben. Kristallin erhaltene Peptide und Derivate werden in den Aufbauschemata mit starker Unterlinierung bezeichnet. DCCI = Dicyclohexyl-carbodiimid, Z- = Carbobenzoyl-.

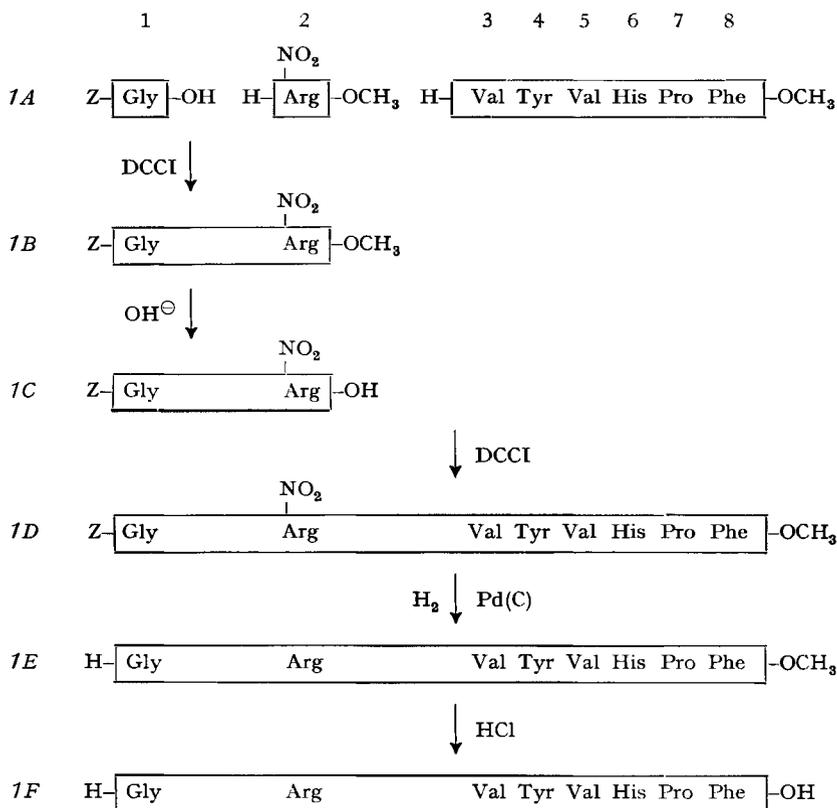
³) F. GROSS & H. TURRIAN in «Polypeptides which Affect Smooth Muscles and Blood Vessels», S. 137, Pergamon Press, London 1960.

⁴) R. SCHWYZER & H. TURRIAN in «Vitamins and Hormones» **18**, 237 (1960), Academic Press Inc., New York; R. SCHWYZER, *Helv.* **44**, 667 (1961).

⁵) M. BERGMANN, L. ZERVAS & H. RINKE, *Z. physiol. Chem.* **224**, 40 (1934).

⁶) K. HOFMANN, W. D. PECKHAM & A. RHEINER, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 238 (1956).

tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester (1A 3-8) ebenfalls unter Einwirkung von Dicyclohexyl-carbodiimid kondensiert. Der entstehende Carbobenzoxy-glycyl-L-nitroarginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-methylester (1D 1-8) war papierchromatographisch einheitlich (nach Abspaltung des Carbobenzoxy-Restes und Verseifung der Methylester-Gruppe). Er wurde deshalb nacheinander hydriert (Entfernung der Carbobenzoxy- und Nitro-Gruppen \rightarrow 1E 1-8) und mit konz. HCl verseift⁸⁾. Multiplikative Verteilung des Verseifungsproduktes (Acetat) im System n-Butanol-Wasser-Methanol (5:5:1 Volumenteile) ergab das reine Oktapeptid II (1F 1-8, $K = 0,26$) in guter Ausbeute (Schema 1).

Schema 1²⁾

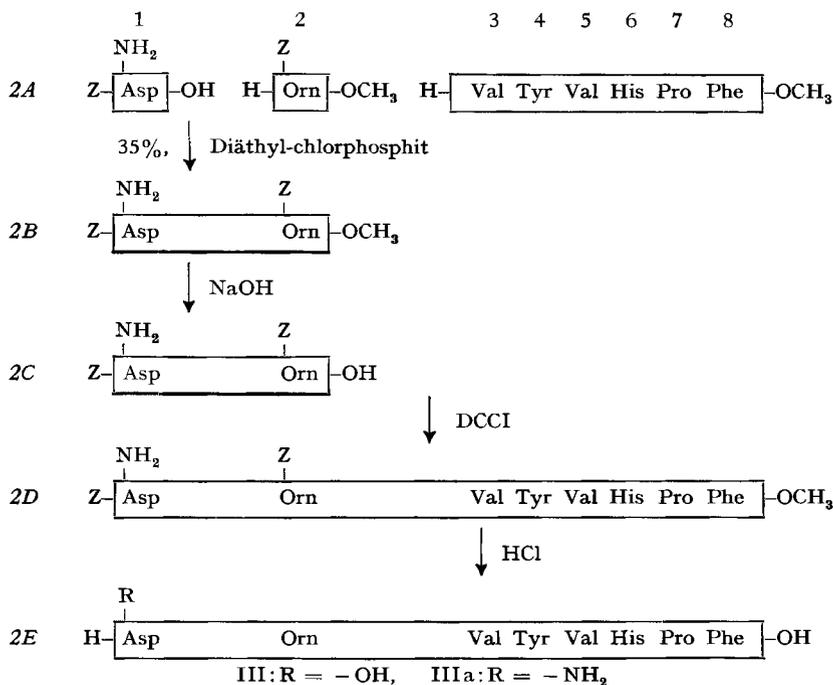
Die Synthese des Orn², Val⁵-Hypertensins II (III, 2E 1-8) und seines Asp¹- β -amids (IIIa, 2E 1-8) verliefen auf sehr ähnliche Weise (Schema 2) unter Benützung des Dipeptidderivates Carbobenzoxy-L-asparaginyln- δ -carbobenzoxy-L-ornithin (2C 1-2), welches aus Carbobenzoxy-L-asparagin (2A 1) und N⁶-Carbobenzoxy-L-ornithin-

⁷⁾ J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. 77, 1067 (1955).

⁸⁾ R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, Chimia 11, 335 (1957).

methylester (2A 2)⁹⁾ nach der Phosphitamid-Methode¹⁰⁾ über den betreffenden, polymorphen Methylester (2B 1–2, Smp. 155–157° und 173–174°) hergestellt wurde. Das bei der Kondensation mit dem Hexapeptidester (2A 3–8) entstehende Octapeptidderivat (2D 1–8) liess sich durch direkte Behandlung mit konzentrierter Salzsäure (40°, 1 Std.) in ein Gemisch von III und IIIa (2E 1–8) überführen. Multiplikative Verteilung nach CRAIG¹¹⁾ lieferte die beiden Komponenten in analytisch reiner Form.

Die Synthese der Phe⁴, Val⁵-Hypertensine (IV und IVa) erforderte den Aufbau einer neuen Hexapeptid-Komponente, wie im Schema 3 dargestellt. Im übrigen verlief die Synthese sehr ähnlich wie diejenige von III, bzw. IIIa. Carbobenzoxy-L-valyl-L-phenylalanin (3C 3–4) wurde über den Methylester (3B 3–4) aus den entsprechenden Aminosäurederivaten (3A 3 und 3A 4) hergestellt. Das Dipeptidderivat (3C 3–4) wurde mittels Dicyclohexylcarbodiimid⁷⁾ mit dem Tetrapeptid-methylester (3A 5–8) kondensiert. Das entstandene neue Hexapeptidderivat (3D 3–8) wurde, wie für Val⁵-Hypertensin II beschrieben¹²⁾, über Stufen 3E, 3F und 3G zu den Octapeptiden IV und IVa (3H 1–8) aufgebaut.

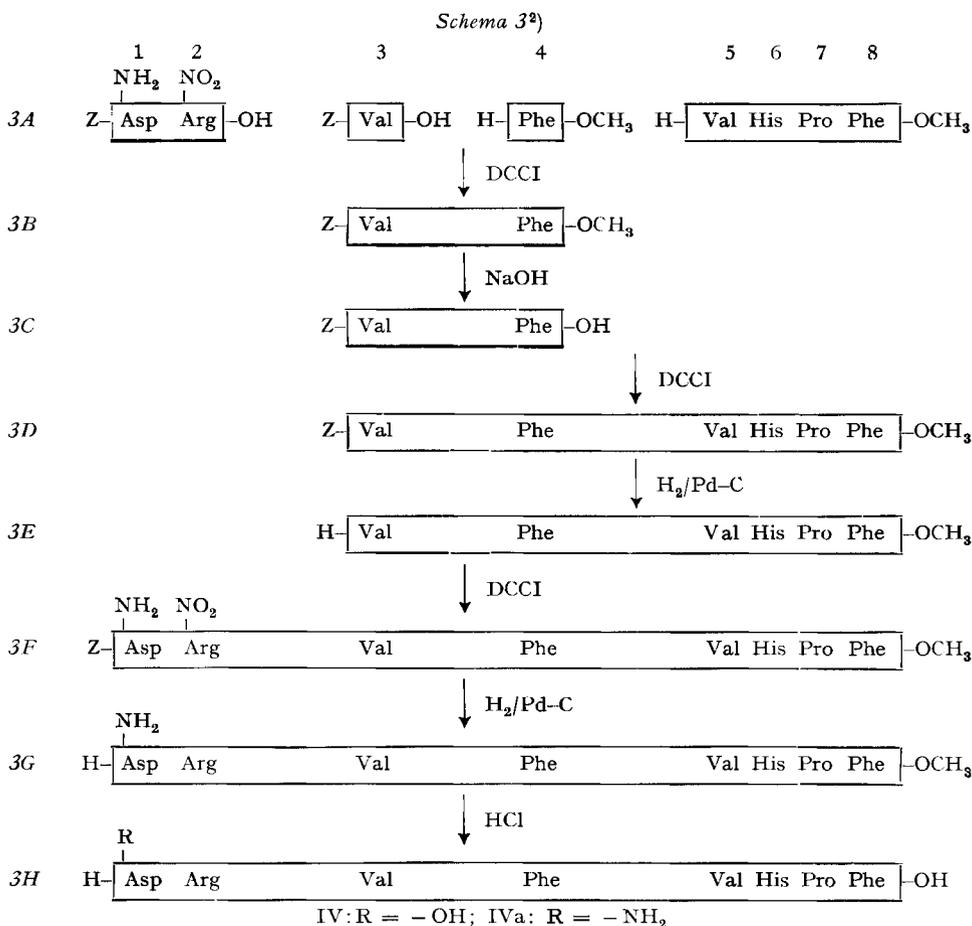
Schema 2²⁾

⁹⁾ R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.* **42**, 99 (1948).

¹⁰⁾ G. W. ANDERSON, A. D. WELCHER & R. W. YOUNG, *J. Amer. chem. Soc.* **73**, 501 (1951); G. W. ANDERSON, J. BLODINGER, R. W. YOUNG & A. D. WELCHER, *ibid.* **74**, 5304 (1952); J. BLODINGER & G. W. ANDERSON, *ibid.* **74**, 5514 (1952).

¹¹⁾ L. C. CRAIG, *Fortschr. chem. Forsch.* **1**, 291 (1950).

¹²⁾ R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* **41**, 1287 (1958).



Experimenteller Teil

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

Die 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 & STEIN¹³⁾ ausgeführt. Die hier angegebenen Zahlen bedeuten relative molare Mengen, wobei Histidin = 1 gesetzt wird.

Carboboxyderivate wurden vorgängig der Papierchromatographie mit konz. HCl bei 40° behandelt¹²⁾.

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), Triätylamin (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)

¹³⁾ S. MOORE, D. H. SPACKMAN & W. H. STEIN, *Analyt. Chemistry* **30**, 1185, 1190 (1958).

¹⁴⁾ W. RITTEL, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER & R. SCHWYZER, *Helv.* **40**, 614 (1957).

Z·Gly·Arg(NO₂)·OH (7C 1-2): 1,35 g (0,005 Mol) fein pulverisiertes H·Arg(NO₂)·OCH₃, HCl⁶) wurden in 7 ml Dimethylformamid suspendiert. Nach Zugabe von 1,21 ml (0,0051 Mol) Tributylamin wurde bis zur vollständigen Auflösung gerührt. Sodann gab man auf einmal 1,85 g (0,009 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid und 1,46 g (0,007 Mol) *Z·Gly·OH* in fester Form zu und liess bei 20° über Nacht stehen. Nach Zugabe von 0,5 ml Eisessig wurde nochmals 1 Std. stehen gelassen, dann vom auskristallisierten Dicyclohexylharnstoff (1,6 g) abfiltriert, im Hochvakuum nahezu zur Trockne eingedampft und in Essigester aufgenommen. Es wurde nun nacheinander mit 2N Salzsäure, 2N Soda (eiskalt) und Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Man erhielt 2,8 g rohen Methylester, der direkt verseift wurde.

Zur Lösung von 2,8 g *Z·Gly·Arg(NO₂)·OCH₃* in 10 ml Methanol wurden im Laufe von 1 Std. bei 20° 10 ml 1N wässrige Natronlauge getropft. Nach beendetem Zutropfen wurde noch 1/2 Std. weitergerührt, von ein wenig ungelöstem Material (Dicyclohexylharnstoff) abfiltriert und das Filtrat durch Zugabe von 10,5 ml 1N Salzsäure angesäuert. Die dabei ausfallende ölige Substanz wurde mit n-Butanol extrahiert, der Extrakt mit Wasser gewaschen und zur Trockne eingedampft. Beim Zerreiben mit Essigester trat Kristallisation ein. Man erhielt 1,3 g *Z·Gly·Arg(NO₂)·OH* vom Smp. 135–138°. Beim einmaligen Umkristallisieren aus heissem Methanol erhielt man 1,22 g Substanz vom Smp. 142–144°, $[\alpha]_D = +4,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,0$ in Eisessig); K. Hofmann *et al.* fanden Smp. 142–145°, $[\alpha]_D = +3,2^\circ$ ($c = 1,13$ in Eisessig)⁶.

Z·Gly·Arg(NO₂)·Val·Tyr·Val·His·Pro·Phe·OCH₃ (7D 7-8): Die Lösung von 775 mg (0,001 Mol) H·Val·Tyr·Val·His·Pro·Phe·OCH₃ und 474 mg (0,0023 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid in 2 ml Dimethylformamid und 10 ml Acetonitril wurde mit 820 mg (0,002 Mol) *Z·Gly·Arg(NO₂)·OH*, gelöst in 2 ml Dimethylformamid, versetzt und über Nacht bei 20° stehengelassen. Nach Zugabe von 0,2 ml Eisessig wurde nochmals eine Weile stehengelassen, dann mit Eis gekühlt und der auskristallisierte Dicyclohexylharnstoff (450 mg) abfiltriert. Das Filtrat dampfte man im Hochvakuum bei 40° soweit wie möglich ein, nahm dann in n-Butanol auf und wusch die organische Phase nacheinander mit Sodalösung (eiskalt) und Wasser. Ohne zu trocknen wurde nun bei 45° Badtemp. im Vakuum eingeeengt. Dabei fiel ein feinkörniger Niederschlag aus, der abfiltriert, mit Essigester gewaschen und bei 50° getrocknet wurde: 828 mg *Z·Gly·Arg(NO₂)·Val·Tyr·Val·His·Pro·Phe·OCH₃*, amorphes Pulver, Smp. ca. 160° (Zers.); im Papierchromatogramm (nach HCl-Behandlung) bereits einheitlich: Rf (50) = 0,34; Rf (54) = 0,50; Ninhydrin-Reaktion gelb.

Das Butanol-Filtrat ergab beim weiteren Einengen nur noch wenig und unreines Material.

H·Gly·Arg·Val·Tyr·Val·His·Pro·Phe·OCH₃ (7E 1-8): 828 mg *Z·Gly·Arg(NO₂)·Val·Tyr·Val·His·Pro·Phe·OCH₃* wurden in 10 ml Methanol und 4,2 ml 1N methanolischer Salzsäure gelöst und nach Zugabe von 300 mg Katalysator (10-proz. Pd-Kohle) unter Bindung des CO₂ hydriert. Nach 12 Std. (Aufnahme der berechneten Menge Wasserstoff) kam die Hydrierung zum Stillstand. Der Katalysator wurde abfiltriert, das Filtrat im Vakuum eingedampft und im Hochvakuum bei 40° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Man erhielt 763 mg eines amorphen Pulvers (Gemisch von Octapeptid-methylester-trihydrochlorid und Ammoniumchlorid), das direkt zur Hydrolyse verwendet wurde; Rf (50) = 0,74; Rf (54) = 0,43.

Gly¹·Val⁵·Hypertensin II (7F 1-8, II): 760 mg Methylester wurden in 5 ml konz. Salzsäure gelöst und 1 Std. auf 40° erwärmt. Nach Eindampfen zur Trockne im Hochvakuum erhielt man 750 mg eines pulverigen Hydrochlorides, das in wenig Wasser gelöst und durch einen schwach basischen Ionenaustauscher (MERCK II; $\varnothing = 12,5$ mm; $l = 120$ mm; Acetatform) filtriert wurde. Das Filtrat ergab beim Lyophilisieren 675 mg Rohprodukt, das durch multiplikative Verteilung (n-Butanol-Wasser-Methanol 5:5:1, Phasenvolumen je 10 ml) über 60 Stufen gereinigt wurde. Aus Röhrchen 6-19 ($r_{max} = 12$; $K = 0,26$) wurden 562 mg reines H·Gly·Arg·Val·Tyr·Val·His·Pro·Phe·OH (7F 1-8) als amorphes, leicht wasserlösliches Pulver, Smp. ca. 220° (Zers.), erhalten. Rf (45) = 0,50; Rf (50) = 0,51; Rf (54) = 0,65.

Aminosäureverhältnis im Totalhydrolysat: Gly 1,05; Arg 1,05; Val 2,09; Tyr 0,95; His 1,00; Pro 1,02; Phe 0,98.

Z·Asp(NH₂)·Orn(Z)·OCH₃ (2B 1-2): 2,0 g (0,0063 Mol) H·Orn(Z)·OCH₃, HCl⁹) wurden in 15 ml absolutem Dioxan suspendiert, 2,13 ml (= 1,54 g; 0,0153 Mol) Triäthylamin zugegeben und 2 Std. bei 30° gerührt. Unter Eiskühlung wurden sodann 1,01 ml (= 1,09 g; 0,0069 Mol) Diäthylchlorophosphit¹⁰), gelöst in 4 ml Dioxan, während 3 Min. zugetroppt. Nach 1 Std. bei 30° wurde

vom ausgeschiedenen Triäthylammoniumchlorid abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. Das zurückgebliebene farblose Öl wurde in 6 ml Diäthylphosphit gelöst, 1,68 g (0,0063 Mol) $Z \cdot \text{Asp}(\text{NH}_2) \cdot \text{OH}$ zugefügt und das Gemisch 100 Min. auf 85° erhitzt. Beim Stehenlassen über Nacht bei 0° entstand eine gallertige Fällung. Es wurde nun im Hochvakuum bei 45° das Lösungsmittel soweit wie möglich abgedampft, der Rückstand in je 60 ml Butanol und Wasser aufgenommen und die organische Phase mit 2N Salzsäure, 2N Soda (eiskalt) und Wasser gewaschen und eingedampft. Der Rückstand, der noch Diäthylphosphit enthielt, wurde mit Wasser zerrieben. Die dabei entstehende gallertige Fällung wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet: 2,4 g halbfestes Rohprodukt, das, zweimal aus Methanol-Essigester-Petroläther kristallisiert, 1,17 g (35%) Reinprodukt ergab; Smp. $173\text{--}174^\circ$ (Umwandlungspunkt unter teilweisem Schmelzen bei $155\text{--}157^\circ$). $[\alpha]_{\text{D}} = -13^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,1$ in Methanol).

$\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{N}_4$	Ber. C 59,08	H 6,10	O 24,22	N 10,60%
	Gef. „ 59,01	„ 6,03	„ 24,44	„ 10,44%

$Z \cdot \text{Asp}(\text{NH}_2)\text{-Orn}(\text{Z}) \cdot \text{OH}$ (2 C 1-2): Die Aufschwemmung von 528 mg (0,001 Mol) Methyl-ester (2 B 1-2) in 4 ml Tetrahydrofuran und 4 ml Methanol wurde nach Zugabe von 6 ml 0,2N NaOH bei 30° gerührt. Nach 10 Min. trat vollständige Lösung ein. Nach 50 Min. wurde durch Zugabe von 6,1 ml 0,2N HCl auf pH 5 neutralisiert. Aus der vorerst noch klaren Lösung schieden sich bald zu Büscheln vereinigte Kristallnadeln aus. Nach 2 Std. bei 0° wurde filtriert und der Rückstand mehrmals mit Wasser gewaschen, bis die Reaktion mit Silbernitrat negativ ausfiel. Beim Trocknen erhielt man 507 mg $Z \cdot \text{Asp}(\text{NH}_2)\text{-Orn}(\text{Z}) \cdot \text{OH}$, Smp. $182\text{--}184^\circ$. Zur Analyse wurde eine Probe aus Methanol umkristallisiert. Smp. $183\text{--}185^\circ$; $[\alpha]_{\text{D}} = +11^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,0$ in Eisessig); Rf (50) = 0,61.

$\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_8\text{N}_4$	Ber. C 58,36	H 5,88	O 24,88	N 10,89%
	Gef. „ 58,64	„ 6,12	„ 24,98	„ 11,02%

$Z \cdot \text{Asp}(\text{NH}_2)\text{-Orn}(\text{Z})\text{-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe} \cdot \text{OCH}_3$ (2 D 1-8): 580 mg (0,00075 Mol) $\text{H} \cdot \text{Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe} \cdot \text{OCH}_3$ ¹² und 248 mg (0,0012 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid wurden in 4 ml Dimethylformamid gelöst und dann auf einmal mit 514 mg (0,001 Mol) festem $Z \cdot \text{Asp}(\text{NH}_2)\text{-Orn}(\text{Z}) \cdot \text{OH}$ versetzt. Aus der zunächst erhaltenen klaren Lösung begannen sich nach 30 Min. feine Kristalle von Dicyclohexylharnstoff auszuschcheiden. Es wurde 20 Std. bei 25° gerührt, dann mit 0,1 ml Eisessig versetzt, kurze Zeit stehengelassen, 2 Std. auf 0° gekühlt, filtriert und mit wenig Dimethylformamid nachgewaschen (Rückstand: 125 mg Dicyclohexylharnstoff). Das Filtrat wurde mit 50 ml Essigester versetzt und der so ausgefällte gallertig-flockige Niederschlag abfiltriert und mit Essigester gewaschen. Nach nochmaligem Umfällen aus Dimethylformamid-Essigester erhielt man 498 mg eines schwach bräunlichen Pulvers vom Smp. $227\text{--}228^\circ$ (Zers.). Nach der HCl-Behandlung zeigte es im Papierchromatogramm die beiden Flecke von $\text{Orn}^2\text{-Val}^5\text{-Hypertensin II}$ (III) (Rf (50) = 0,28) und $\text{Orn}^2\text{-Val}^5\text{-Hypertensin II-Asp-}\beta\text{-amid}$ (III a) (Rf (50) = 0,42).

$\text{C}_{65}\text{H}_{82}\text{O}_{15}\text{N}_{12}, \text{H}_2\text{O}$	Ber. C 60,54	H 6,56	O 19,86	N 13,04%
	Gef. „ 60,10	„ 6,52	„ 19,54	„ 12,76%

$\text{Orn}^2\text{-Val}^5\text{-Hypertensin II und -Asp}^1\text{-}\beta\text{-amid}$ (2 E 1-8, III und III a): 400 mg $Z \cdot \text{Asp}(\text{NH}_2)\text{-Orn}(\text{Z})\text{-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe} \cdot \text{OCH}_3$ wurden mit 5 ml konz. Salzsäure in einem Glasrohr eingeschmolzen und bis zur vollständigen Auflösung (Dauer 10 Min.) bei 40° geschüttelt. Nach 50 Min. Stehen bei 40° wurde im Hochvakuum bei 30° zur Trockne eingedampft, der Rückstand pulverisiert und bis zur Gewichtskonstanz bei 30° getrocknet. Man erhielt 379 mg eines hygroskopischen Hydrochlorids, das zur Umwandlung ins Acetat an einer Säule ($\varnothing = 9,5$ mm, $l = 150$ mm) von schwach basischem Ionenaustauscher (MERCK II) in der Acetatform umgesetzt wurde. Das Filtrat ergab beim Lyophilisieren 313 mg Rohprodukt, die im System n-Butanol - 0,3M Ammoniumacetat über 102 Stufen (Phasenvolumina je 10 ml) verteilt wurden. Die Lagen der Maxima wurden am Schluss mit Tüpfelproben auf Papier durch Anfärbung mit PAULY-Reagens sichtbar gemacht. Die Aufarbeitung erfolgte durch Konzentration im Rotationsverdampfer bei 30° und Trocknen des Rückstandes (bzw. Wegsublimieren des Ammoniumacetates) im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz.

Es wurden im wesentlichen folgende Fraktionen erhalten:

Röhrchen 4–6: $r_{max} = 5$; $K = 0,055:25$ mg reines Orn²-Val⁵-Hypertensin II (2E 7–8, III); Rf (45) = 0,33; Rf (50) = 0,28; Rf (54) = 0,60. Totalhydrolysat: Asp 1,15; Orn 1,22; Val 2,21; Tyr 1,00; His 1,00; Pro 1,00; Phe 1,03.

Röhrchen 7–10: 28 mg, Gemisch.

Röhrchen 11–21: $r_{max} = 14,5$; $K = 0,17:170$ mg reines Orn²-Val⁵-Hypertensin II-Asp¹- β -amid (2E 7–8, IIIa); Rf (45) = 0,43; Rf (50) = 0,42; Rf (54) = 0,58. $[\alpha]_D = -61^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,83$ in 1N Essigsäure). Totalhydrolysat: Asp 0,97; Orn 1,13; Val 1,97; Tyr 0,92; His 1,00; Pro 0,96; Phe 0,99. –CONH₂ nach CONWAY: NH₃ gef. 1,58%; ber. 1,72%.

Z·Val-Phe·OCH₃ (3B 3–4): 4,32 g (0,021 Mol) H·Phe·OCH₃, HCl wurden in 20 ml absolutem Essigester suspendiert und nach Zugabe von 2,94 ml (0,021 Mol) Triäthylamin bei 20° 30 Min. gerührt. Es wurde sodann vom gebildeten Triäthylammoniumchlorid abfiltriert, mit wenig Essigester nachgewaschen und das Filtrat mit einer Lösung von 5,02 g (0,02 Mol) Z·Val·OH in 60 ml absolutem Acetonitril vereinigt. Nach Abkühlen auf 0° gab man 5,15 g (0,025 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid zu und rührte 3 Std. bei 0° und über Nacht bei 20°. Man filtrierte vom Dicyclohexylharnstoff ab, dampfte das Filtrat i. V. bei 30° zur Trockne ein und isolierte aus der amorphen Masse das Dipeptid durch Umfällen aus Essigester-Petroläther und aus Benzol-Petroläther. Man erhielt insgesamt 6,2 g kristallines Z·Val-Phe·OCH₃, Smp. 130–132°. Eine Probe wurde zur Analyse nochmals aus Benzol-Petroläther umkristallisiert: Smp. 132–134°, $[\alpha]_D = +14,7^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,1$ in Dioxan).

C₂₃H₂₈O₅N₂ Ber. C 66,97 H 6,84 N 6,79% Gef. C 66,80 H 6,92 N 7,06%

Z·Val-Phe·OH (3C 3–4): 2,1 g (0,0051 Mol) Z·Val-Phe·OCH₃ wurden in 10 ml Tetrahydrofuran gelöst und nach Zugabe von 5,6 ml 1N NaOH 90 Min. bei 25° gerührt. Beim langsamen Zufügen von 5,7 ml 1N HCl unter Rühren fiel ein krist. Niederschlag aus, der nach Kühlen auf 0° abfiltriert und getrocknet wurde: 2,04 g, Smp. 164–168°. Beim Umkristallisieren aus Essigester-Petroläther erhielt man 1,72 g, Smp. 172–174°, $[\alpha]_D = -13^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,0$ in Methanol).

C₂₂H₂₆O₅N₂ Ber. C 66,31 H 6,58 N 7,03% Gef. C 66,50 H 6,76 N 7,32%

Z·Val-Phe-Val-His-Pro-Phe·OCH₃ (3D 3–8): 2,15 g (0,0042 Mol) H·Val-His-Pro-Phe·OCH₃ und 1,46 g (0,0071 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid wurden in 10 ml Dimethylformamid gelöst und nach Abkühlen auf 0° mit 2,39 g (0,006 Mol) Z·Val-Phe·OH versetzt. Es wurde 5 Std. bei 0° und 10 Std. bei 25° gerührt, dann auf 0° gekühlt und vom gebildeten Dicyclohexylharnstoff (1,28 g) abfiltriert. Das Filtrat wurde im Hochvakuum bei 40° bis zu einer klebrigen Masse eingengt, in ein wenig Essigester gelöst und durch Zugabe des dreifachen Volumens Petroläther daraus ein weisser, pulveriger Niederschlag ausgefällt. Er wurde abfiltriert, mit Petroläther gewaschen und bei 45° i. V. getrocknet. Nach zweimaligem Umfällen aus Methanol-Essigester-Petroläther erhielt man 2,67 g reines Material als amorphes Pulver, Smp. 170–175°, $[\alpha]_D = -67^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,03$ in Methanol). Nach HCl-Behandlung: Rf (50) = 0,75; Rf (54) = 0,77.

C₄₈H₆₀O₉N₈, H₂O Ber. C 63,28 H 6,86 O 17,56 N 12,30%
Gef. „ 63,17 „ 7,08 „ 16,94 „ 12,29%

H·Val-Phe-Val-His-Pro-Phe·OCH₃ (3E 3–8): 2,3 g 3D 3–8 wurden in 15 ml Methanol und 4,2 ml 1,9N methanolischer Salzsäure suspendiert und nach Zugabe von 400 mg Pd-Kohle 10% unter Kohlendioxyd-Absorption hydriert. Die Reaktion kam nach 1 Std. und Aufnahme der ber. Menge Wasserstoff zum Stillstand. Der Katalysator wurde abfiltriert, das Filtrat i. V. bei 30° zur Trockne eingedampft, das Hydrochlorid in wenig Wasser gelöst und mit 2N Soda unter Eiskühlung alkalisch gemacht. Dabei fiel ein käsiger Niederschlag aus, der in n-Butanol aufgenommen wurde. Die neutralgewaschene Butanolphase ergab beim Eindampfen i. V. 2,07 g 3E 3–8 als amorphes Pulver, das sich im Papierchromatogramm als einheitlich erwies: Rf (50) = 0,96; Rf (54) = 0,79; $[\alpha]_D = -54^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,0$ in Methanol).

C₄₀H₅₄O₇N₈, H₂O Ber. C 61,83 H 7,27 O 16,47 N 14,44%
Gef. „ 61,99 „ 7,19 „ 15,83 „ 14,34%

Z·Asp(NH₂)-Arg(NO₂)-Val-Phe-Val-His-Pro-Phe·OCH₃ (3F 1–8): 1,518 g (0,002 Mol) H·Val-Phe-Val-His-Pro-Phe·OCH₃ und 906 mg (0,0044 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid wurden in 10 ml Dimethylformamid gelöst und auf 0° gekühlt. Nach Zugabe von 1,868 g (0,004 Mol) Z·Asp(NH₂)-Arg(NO₂)·OH¹⁴ wurde 10 Std. bei 0° und 12 Std. bei 25° gerührt. Zuletzt versetzte man mit 0,6 ml Eisessig, liess nochmals 1 Std. bei Zimmertemp. stehen und filtrierte nach Kühlen auf 0°

vom gebildeten Dicyclohexylharnstoff (820 mg) ab. Das Filtrat wurde im Hochvakuum bis zur zähen Konsistenz eingeengt und mit Essigester verrieben. Dadurch entstand eine pulverige Fällung die abfiltriert, mit Essigester und Petroläther gewaschen, und getrocknet wurde. Durch Umfällen aus Methanol-Wasser (9:1) und Aufarbeitung der Mutterlaugen erhielt man insgesamt 2,21 g reines $Z \cdot \text{Asp}(\text{NH}_2)\text{-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Val-Phe-Val-His-Pro-Phe} \cdot \text{OCH}_3$ als amorphes Pulver. Smp. 216° (Zers.). Nach HCl-Behandlung: Rf (49) = 0,72 ($\text{H} \cdot \text{Asp}(\text{NH}_2)\text{-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Val-Phe-Val-His-Pro-Phe} \cdot \text{OH}$); Rf (49) = 0,61 ($\text{H} \cdot \text{Asp}(\text{OH})\text{-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Val-Phe-Val-His-Pro-Phe} \cdot \text{OH}$).

$\text{C}_{58}\text{H}_{77}\text{O}_{14}\text{N}_{15}, \text{H}_2\text{O}$	Ber. C 56,80	H 6,49	O 19,57	N 17,14%
	Gef. „ 56,67	„ 6,45	„ 20,20	„ 17,09%

$\text{H} \cdot \text{Asp}(\text{NH}_2)\text{-Arg-Val-Phe-Val-His-Pro-Phe} \cdot \text{OCH}_3$ (3G 1-8): 1,40 g $Z \cdot \text{Asp}(\text{NH}_2)\text{-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Val-Phe-Val-His-Pro-Phe} \cdot \text{OCH}_3$ wurden in 40 ml Methanol und 4,5 ml 1,9N methanolischer HCl suspendiert und nach Zugabe von 300 mg Pd-Kohle (10-proz.) bis zur Sättigung hydriert (19 Std.). Der Katalysator wurde abfiltriert und das Filtrat zur Trockne eingedampft, wobei man 1,402 g Methylster-hydrochlorid (3G 1-8), vermischt mit 1 Mol Ammoniumchlorid, erhielt; Rf (49) = 0,83; Rf (54) = 0,64.

$\text{Phe}^4\text{-Val}^5\text{-Hypertensin II}$ und $\text{-Asp}^1\text{-}\beta\text{-amid}$ (3H 1-8, IV und IVa): 1,40 g rohes 3G 1-8 wurden mit 10 ml konz. HCl in einem dickwandigen Reagensglas eingeschmolzen und 1 Std. auf 45° erwärmt. Beim Eindampfen zur Trockne im Hochvakuum erhielt man 1,57 g hygroskopisches Hydrochlorid, das in 20 ml Wasser gelöst und durch eine Säule von schwach basischem Ionenaustauscher (MERCK II) in der Acetatform filtriert wurde. Beim Lyophilisieren des Filtrates erhielt man 1,24 g Rohprodukt, das im System n-Butanol - 0,3M Ammoniumacetat über 100 Stufen mit je 20 ml Phasenvolumen verteilt wurde. Bestimmung der Maxima und Aufarbeitung erfolgte wie beim Orn²-Val⁵-Hypertensin II.

Man erhielt folgende Hauptfraktionen:

Röhrchen 12-19: $r_{max} = 16$; $K = 0,20$: 186 mg reines $\text{Phe}^4\text{-Val}^5\text{-Hypertensin II}$ (3H 1-8, IV); Rf (45) = 0,47; Rf (50) = 0,42; Rf (54) = 0,65. $[\alpha]_D = -65^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,11$ in 1N Essigsäure). Totalhydrolysat: Asp 1,00; Arg 1,02; Val 1,98; Phe 1,95; His 1,00; Pro 0,98. $-\text{CONH}_2$ nach CONWAY: NH_3 gef. 0,25%; ber. 0%.

Röhrchen 20-24: 80 mg, Gemisch.

Röhrchen 25-39: $r_{max} = 31,5$; $K = 0,46$: 601 mg reines $\text{Phe}^4\text{-Val}^5\text{-Hypertensin II -Asp}^1\text{-}\beta\text{-amid}$ (3H 1-8, IVa); Rf (45) = 0,54; Rf (50) = 0,55; Rf (54) = 0,63. $[\alpha]_D = -68^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,09$ in 1N Essigsäure). Totalhydrolysat: Asp 0,99; Arg 1,02; Val 1,99; Phe 1,90; His 1,00; Pro 0,95. $-\text{CONH}_2$ nach CONWAY: NH_3 gef. 1,56%; ber. 1,68%.

Herrn Dr. W. PADOWETZ verdanken wir die Elementaranalysen und Mikro-CONWAY-Bestimmungen, Herrn von ARX die Ausführung der Papierchromatogramme.

SUMMARY

The syntheses of the five hypertensin analogues, $\text{H} \cdot \text{Gly-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe} \cdot \text{OH}$ (II), $\text{H} \cdot \text{Asp}(\text{R})\text{-Orn-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe} \cdot \text{OH}$ (III, R = $-\text{OH}$; IIIa, R = $-\text{NH}_2$), and $\text{H} \cdot \text{Asp}(\text{R})\text{-Arg-Val-Phe-Val-His-Pro-Phe} \cdot \text{OH}$ (IV, R = $-\text{OH}$; IVa, R = $-\text{NH}_2$), are described in detail (schemes 1, 2 and 3).

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel
Pharmazeutische Abteilung