

## Über Peptidsynthesen, XXXIII \*

## 3. Mitteilung über Angiotensin-Analoga \*\*

SYNTHESE VON LYS<sup>6</sup>-VAL<sup>5</sup>-, VON TYR<sup>3</sup>-VAL<sup>5</sup>-, VON TYR(ME)<sup>4</sup>-VAL<sup>5</sup>- UND VON TYR<sup>8</sup>-VAL<sup>5</sup>-ANGIOTENSIN II-ASP<sup>1</sup>-β-AMID

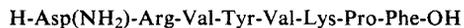
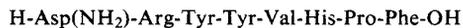
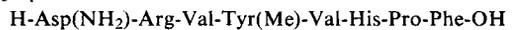
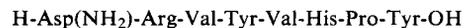
VON EBERHARD SCHRÖDER und REINHARD HEMPEL

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering AG, Berlin-West

Eingegangen am 27. Oktober 1964

Vier Analoga des Val<sup>5</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amids wurden nach der Anhydrid- und nach der Azid-Methode synthetisiert. Als Schutzgruppen dienten der Carbobenzoxy- und tert.-Butyloxycarbonyl-Rest, der tert.-Butylester und für die Hydroxylgruppe in einem Fall der *O*-tert.-Butylrest. Die biologische Aktivität der Oktapeptide wird diskutiert.

Als Ergänzung zu den von uns früher<sup>1)</sup> beschriebenen Val<sup>5</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amid-Analoga, die gegenüber dem Naturstoff in den Positionen 3, 4, 6 und 8 verändert waren (Tyr<sup>3</sup>-Val<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup>-, Phe<sup>4</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Val<sup>5</sup>- und Phe<sup>6</sup>-Val<sup>5</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amid) wurden die folgenden vier Analoga synthetisiert:

I: Lys<sup>6</sup>-Val<sup>5</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amid =II: Tyr<sup>3</sup>-Val<sup>5</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amid =III: Tyr(Me)<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amid =IV: Tyr<sup>8</sup>-Val<sup>5</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amid =

An Hand dieser Verbindungen sollte einerseits die als wesentlich angenommene Bedeutung des Histidinrestes in Position 6<sup>2)</sup>, andererseits die Bedeutung der phenolischen Hydroxylgruppe in Position 4 und die der aromatischen Reste in Position 4 und 8 untersucht werden.

\*) XXXII. Mitteilung: K. LÜBKE, R. HEMPEL und E. SCHRÖDER, *Experientia* [Basel], im Druck.

\*\*\*) 2. Mitt. über Angiotensin-Analoga: E. SCHRÖDER, *Liebigs Ann. Chem.* **680**, 142 (1964).

1) E. SCHRÖDER, *Liebigs Ann. Chem.* **680**, 142 (1964).

2) A. C. M. PAIVA und T. B. PAIVA, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **48**, 412 (1961).

Zur Synthese von I wurde Carbobenzoxy-L-valyl-*N*<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysinhydrazid<sup>3)</sup> mit L-Prolyl-L-phenylalanin-tert.-butylester<sup>4)</sup> umgesetzt, das substituierte *Tetrapeptid* katalytisch decarbenzoxyliert und mit Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosin<sup>4-6)</sup> nach der Anhydrid-Methode<sup>7)</sup> kondensiert. Katalytische Hydrierung lieferte den Oktapeptidester, von dem mit Trifluoressigsäure die *N*<sup>ε</sup>-tert.-Butyloxycarbonylgruppe und der tert.-Butylester-Rest entfernt wurde. Durch Chromatographie an Carboxymethylcellulose (Ammoniumacetatgradient 0.01–0.1 *m*, pH 5) wurde das freie *Oktapeptid* nach Gefriertrocknung als Diacetat-trihydrat isoliert.

Für II und III wurde das Aufbauschema 2 + 6 verwendet. Die aus Carbobenzoxy-L-tyrosyl-L-tyrosinazid bzw. Carbobenzoxy-L-valyl-*O*-methyl-L-tyrosinazid und L-Valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-tert.-butylester<sup>4)</sup> und anschließende katalytische Hydrierung zugänglichen Hexapeptidester wurden mit Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginin<sup>4-6)</sup> gekuppelt. Die Abspaltung der Schutzgruppen vom substituierten Oktapeptid und die Reinigung erfolgten wie für I beschrieben. II wurde als Monoacetat-tetrahydrat, III als Hemiacetat-tetrahydrat isoliert.

Durch Umsetzung von Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosin<sup>4-6)</sup> mit L-Valyl-L-histidyl-L-prolyl-*O*-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester<sup>1)</sup> nach der Anhydrid-Methode wurde das substituierte Tyr<sup>8</sup>-Val<sup>5</sup>-Analogon gewonnen. Hydrierung und Behandlung mit Trifluoressigsäure lieferte das freie Oktapeptid, das durch trägerfreie präparative Elektrophorese (Pheroplan<sup>®</sup>)<sup>8,9)</sup> in Pyridiniumacetatpuffer pH 5 gereinigt wurde. IV wurde als 1.5 Acetat-dihydrat isoliert.

Die Oktapeptide I und IV wurden durch *Leucinaminopeptidase* bis zum H-Lys-Pro-Phe-OH bzw. H-His-Pro-Tyr-OH abgebaut. Durch Carboxypeptidase A wird die C-terminale Aminosäure (Phe bzw. Tyr) entfernt. Mit *Chymotrypsin* findet eine Aufspaltung in die Sequenzen 1–4 und 5–8, mit *Trypsin* in die Sequenzen 1–2 und 3–8 statt. Die Lys-Pro-Bindung in I wird erwartungsgemäß nicht durch *Trypsin* hydrolysiert<sup>10)</sup>.

Alle Fermentreaktionen verliefen quantitativ, so daß die optische Reinheit weitgehend gesichert ist. Eine Racemisierung des Lys<sup>6</sup>- bzw. His<sup>6</sup>-Restes wird durch die Verwendung der Azid-Methode an dieser Stelle ausgeschlossen. Die Oktapeptide II und III verhielten sich gegenüber Carboxypeptidase A und Chymotrypsin normal, d. h. es erfolgte eine quantitative Abspaltung des C-terminalen Phe-Restes bzw.

3) K. STURM, R. GEIGER und W. SIEDEL, Chem. Ber. **96**, 609 (1963).

4) E. SCHRÖDER, Liebigs Ann. Chem. **680**, 132 (1964).

5) W. RITTEL, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER und R. SCHWYZER, Helv. chim. Acta **40**, 614 (1957).

6) R. PAUL und G. W. ANDERSON, J. org. Chemistry **27**, 2094 (1962).

7) R. A. BOISSONNAS, Helv. chim. Acta **34**, 874 (1951).

8) J. BARROLLIER, E. WATZKE und H. GIBIAN, Z. Naturforsch. **13b**, 754 (1958).

9) E. SCHRÖDER und S. MATTHES, J. Chromatography **17**, 189 (1965).

10) L. GRIMM und W. GRASSMANN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **337**, 161 (1964).

Spaltung der Tyr<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup>- bzw. Tyr(Me)<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup>-Bindung. Mit Trypsin wurde bei beiden Peptiden jedoch eine nur unvollständige Spaltung der Arg<sup>2</sup>-Tyr<sup>3</sup>- bzw. Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Bindung beobachtet; 5% des Oktapeptids blieben unhydrolysiert. Eine Racemisierung des Arg(NO<sub>2</sub>)-Restes bei der Kupplung *N*-geschützter Peptide mit *C*-terminalem Arg(NO<sub>2</sub>) wurde bereits beobachtet<sup>11,12)</sup>. Im Falle des von uns früher<sup>1)</sup> beschriebenen Phe<sup>6</sup>-Val<sup>5</sup>- und Tyr<sup>3</sup>-Val<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amids, die ebenfalls aus Cbo-Asp(NH<sub>2</sub>)-Arg(NO<sub>2</sub>)-OH synthetisiert wurden, waren die Endprodukte am Arg<sup>2</sup>-Rest nicht racemisiert. Offenbar gelang es hier, wie auch bei der Synthese von Tetrapeptiden des Typs Cbo-Asp(NH<sub>2</sub>)-Arg(NO<sub>2</sub>)-X-X-OH, die für ein Aufbauschema 4 + 4 verwendet wurden, im Laufe der Reinigungsoperationen bei den nachfolgenden Stufen diastereomere Anteile zu entfernen.

In Tabelle 1 (Seite 251) sind die in dieser Arbeit und die in der XXVII. Mitt. beschriebenen Angiotensin-Analoga mit ihren biologischen Aktivitäten zusammengestellt. Ein Ersatz des His<sup>6</sup>-Restes durch Phenylalanin oder Lysin führt beim Blutdruck der Ratte zu einem Wirkungsabfall auf 1% bzw. ~0.1%. Damit wird die wesentliche Bedeutung des His<sup>6</sup>-Restes, die auf Grund einer Inaktivierung des Angiotensins durch Photooxydation<sup>2)</sup> angenommen wurde, bestätigt.

Der sehr unterschiedliche Einfluß der Eliminierung oder Substitution einer funktionellen Gruppe wird durch das Tyr(Me)<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amid demonstriert. Während die Tyr(Me)-Verbindung mit ~0.2% praktisch inaktiv ist, wurden für ein Phe<sup>4</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amid<sup>13)</sup> noch 10% der Angiotensin-Wirkung ermittelt. Eine Verschiebung der Hydroxylgruppe von Position 4 nach 8 (d. h. eine Vertauschung des Tyr<sup>4</sup>- und Phe<sup>8</sup>-Restes im ursprünglichen Angiotensin II) liefert ebenfalls ein inaktives Derivat (~0.2%). Das zum Vergleich synthetisierte Tyr<sup>8</sup>-Val<sup>5</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amid besitzt noch 20% Aktivität. Demgegenüber ist beim Phe(Br)<sup>8</sup>-Val<sup>5</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amid die Wirkung nur auf 50% reduziert<sup>14,15)</sup>. Eine Vergrößerung des Abstandes vom Tyr<sup>4</sup>- zum Phe<sup>8</sup>-Rest, wie sie durch Vertauschung des Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Restes im Tyr<sup>3</sup>-Val<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amid vorgenommen wurde, hat einen starken Wirksamkeitsverlust zur Folge (<0.1%). Die wesentlich höhere Aktivität des Tyr<sup>3</sup>-Val<sup>5</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amids (12%) deutet wiederum auf die Notwendigkeit eines aromatischen Restes in Position 4. Wie wenig man jedoch die durch Veränderung einer Aminosäure-Position in einem Peptidwirkstoff erhaltene Wirksamkeitsänderung verallgemeinern darf, zeigen das Tyr(Me)<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amid (0.1%) und ein Ala<sup>4</sup>-Ileu<sup>5</sup>-Angiotensin II (3%)<sup>16)</sup>.

11) K. HOFMANN und S. LANDE, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 2286 (1961).

12) R. SCHWYZER und H. KAPPELER, *Helv. chim. Acta* **44**, 1991 (1961).

13) B. RINIKER und R. SCHWYZER, *Helv. chim. Acta* **44**, 677 (1961).

14) R. SCHWYZER und H. TURRIAN, *Vitamins and Hormones* **18**, 237 (1960).

15) R. SCHWYZER, *Helv. chim. Acta* **44**, 667 (1961).

16) J. H. SEU, R. R. SMEBY und F. M. BUMPUS, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 4948 (1962).

Die präparativen Arbeiten wurden von Herrn M. LEHMANN, die säulenchromatographischen und elektropheretischen Reinigungen mit Unterstützung von Herrn S. MATTHES, die enzymatischen Untersuchungen und quantitativen Aminosäurebestimmungen von Herrn G. KLOSS durchgeführt.

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Methodische Angaben über Schmelzpunkte, optische Drehungen, Papier- und Dünnschichtchromatogramme, Elektropherogramme und Anfärbemethoden vgl. XXVI. Mitteilung\*).

#### *Lys<sup>6</sup>-Val<sup>5</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amid*

*Carbobenzoxy-L-valyl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysinmethylester*. — 2.25 g *Carbobenzoxy-L-valin*<sup>17)</sup> in 10 ccm Tetrahydrofuran (THF) werden bei  $-10^{\circ}$  mit 1.24 ccm Triäthylamin + 0.86 ccm *Chlorameisensäureäthylester* versetzt. Nach 10–15 Min. bei  $-10^{\circ}$  wird mit 10 mMol *N<sup>ε</sup>-tert.-Butyloxycarbonyl-L-lysinmethylester*<sup>18)</sup> (aus 3.94 g *Carbobenzoxy-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysinmethylester*<sup>4, 18)</sup> durch Hydrierung erhalten) in 5 ccm Dimethylformamid (DMF) + 5 ccm THF vereinigt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur und mehrstündigem Stehenlassen wird wie üblich gereinigt. Aus Methanol/Wasser kristallisieren 2.9 g (66%) vom Schmp. 113.5–114° (Lit.<sup>3)</sup> 111–113°).  $[\alpha]_D^{25} = -22.4^{\circ}$  ( $c = 0.5$ , Methanol).

$C_{25}H_{39}N_3O_7$  (493.6) Ber. C 60.83 H 7.96 N 8.51 Gef. C 61.15 H 7.77 N 8.34

*Carbobenzoxy-L-valyl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysinhydrazid*. — 1.48 g *Methylester* in 10 ccm Methanol + 1.05 ccm *Hydrazinhydrat* werden 2 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach Einengen und Kristallisation aus Äthanol/Petroläther verbleiben 1.2 g (81%) vom Schmp. 182.5–183.5° (Lit.<sup>3)</sup> 180–182°).  $[\alpha]_D^{25} = -28.8^{\circ}$  ( $c = 0.5$ , Methanol).

$C_{24}H_{39}N_5O_6$  (493.6) Ber. C 58.40 H 7.96 N 14.19 Gef. C 58.23 H 7.95 N 14.00

*Carbobenzoxy-L-valyl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-phenylalanin-tert.-butylester*. — 1.48 g (3 mMol) *Carbobenzoxy-L-valyl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysinhydrazid* in 5 ccm DMF + 3 ccm HCl-haltigem Tetrahydrofuran (2.2*n*) werden bei  $-20^{\circ}$  mit 0.365 ccm *tert.-Butylnitrit* in das Azid übergeführt und 5 Min. bei  $-20^{\circ}$  belassen. Nach Verdünnen mit 10 ccm Essigester und Neutralisieren mit Triäthylamin wird mit 1.05 g (3.3 mMol) *L-Prolyl-L-phenylalanin-tert.-butylester*<sup>4)</sup> in 5 ccm Essigester 2 Tage bei  $0^{\circ}$  stehengelassen und anschließend i. Vak. eingeengt. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen, je 3 mal mit 10-proz. Citronensäure, gesätt. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und Wasser ausgeschüttelt, die Essigesterlösung über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingeengt. Aus Essigester/Hexan kristallisieren 1.65 g (70%) Nadeln vom Schmp. 99–99.5°;  $[\alpha]_D^{25} = -26.4^{\circ}$  ( $c = 0.5$ , DMF).

$C_{42}H_{61}N_5O_9$  (779.9) Ber. C 64.67 H 7.88 N 8.98 Gef. C 64.66 H 7.83 N 8.76

*L-Valyl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-phenylalanin-tert.-butylester*. — 1.64 g der voranstehenden Verbindung werden in Methanol mit 420 mg *Pd-Mohr* hydriert. Ausbeute 1.35 g (100%) vom Schmp. 62.5–65°;  $[\alpha]_D^{25} = -34.9^{\circ}$  ( $c = 0.5$ , DMF).

$C_{34}H_{55}N_5O_7$  (645.8) Ber. C 63.23 H 8.58 N 10.85 O 17.34

Gef. 63.10 8.56 10.74 17.51

\*) Siehe Lit.<sup>4)</sup>.

<sup>17)</sup> W. GRASSMANN und E. WÜNSCH, Chem. Ber. **91**, 462 (1958).

<sup>18)</sup> R. SCHWYZER und W. RITTEL, Helv. chim. Acta **44**, 159 (1961).

*Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-phenylalanin-tert.-butylester*. — 1.4 g (1.9 mMol) *Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosin*<sup>4-6)</sup> in 5 ccm DMF werden bei  $-10^{\circ}$  15 Min. mit 0.262 ccm Triäthylamin + 0.183 ccm *Chlorameisensäureäthylester* gerührt und mit 1.3 g (2 mMol) *L-Valyl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-phenylalanin-tert.-butylester* in 7 ccm THF versetzt. Nach einigen Stunden wird i. Vak. eingeeengt, der Rückstand in Butanol gelöst und wie üblich gereinigt. Nach Umfällen aus DMF/Wasser und DMF/Äther werden 1.85 g (71 %) vom Schmp.  $204^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D^{25} = -27.6^{\circ}$  ( $c = 0.5$ , DMF) erhalten.

$C_{66}H_{96}N_{14}O_{17}$  (1357.5) Ber. C 58.39 H 7.14 N 14.45 O 20.04  
Gef. 57.38 7.11 14.74 20.23

*L-Asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-phenylalanin-tert.-butylester*. — 1.63 g der voranstehenden Verbindung werden in Methanol/Eisessig/Wasser (5 : 1 : 1) mit 480 mg *Pd-Mohr* hydriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wird mit absol. Äther verrieben und aus Äthanol/Essigester/Äther umgefällt. Ausbeute 1.35 g (88 %) vom Schmp.  $182-182.5^{\circ}$ ;  $[\alpha]_D^{25} = -24.5^{\circ}$  ( $c = 0.5$ , DMF).

$C_{58}H_{91}N_{13}O_{13} \cdot 1.5 CH_3CO_2H \cdot 1 H_2O$  (1286.5)  
Ber. C 56.95 H 7.75 N 14.15 COCH<sub>3</sub> 5.02 H<sub>2</sub>O 1.40  
Gef. 57.13 7.96 14.26 5.29 0.94

*L-Asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-lysyl-L-prolyl-L-phenylalanin*. — 1.08 g der voranstehenden Verbindung werden 2 Stdn. bei Raumtemperatur mit 10 ccm *Trifluoressigsäure* behandelt, dann wird mit Äther gefällt und gut i. Vak. getrocknet. Die Endreinigung erfolgt durch Chromatographie an einer Carboxymethylcellulose-Säule. 750 mg (78 %) elektro-phoretisch einheitliches Lys<sup>6</sup>-Val<sup>5</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amid werden durch Lyophilisieren aus dem mit 0.1 m Ammoniumacetat (pH 5) erhaltenen Eluat isoliert.  $[\alpha]_D^{25} = -62.0^{\circ}$  ( $c = 0.5$ , Wasser).

$C_{49}H_{75}N_{13}O_{11} \cdot 2 CH_3CO_2H \cdot 3 H_2O$  (1196.4)  
Ber. C 53.21 H 7.50 N 15.22 COCH<sub>3</sub> 7.20 H<sub>2</sub>O 4.52  
Gef. 52.91 7.55 15.25 6.60 4.75

*Aminosäureanalyse* (Hydrolyse 72 Stdn.,  $105^{\circ}$ ): Asp<sub>1.02</sub>; Arg<sub>0.97</sub>; Val<sub>2.00</sub>; Tyr<sub>0.94</sub>; Lys<sub>1.04</sub>; Pro<sub>0.96</sub>; Phe<sub>1.00</sub>; NH<sub>3</sub> 0.92.

#### *Tyr<sup>3</sup>-Val<sup>5</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amid*

*Carbobenzoxy-L-tyrosyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-tert.-butylester*. 1.47 g (3 mMol) *Carbobenzoxy-L-tyrosyl-L-tyrosinhydrazid* [Schmp.  $244-245.5^{\circ}$  (Lit.<sup>19)</sup>  $246^{\circ}$ , Lit.<sup>20)</sup>  $246-248^{\circ}$ ];  $[\alpha]_D^{25} = -27.4^{\circ}$  ( $c = 1$ , DMF)] in 6 ccm DMF werden bei  $-20^{\circ}$  mit 3 ccm 2.2 n HCl in THF und 0.366 ccm *tert.-Butylnitrit* versetzt. Nach ca. 5 Min. wird mit 20 ccm Essigester verdünnt und mit Triäthylamin neutralisiert. Nach Absaugen des Triäthylammoniumchlorids wird das Filtrat mit 1.82 g (3.3 mMol) *L-Valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-tert.-butylester*<sup>4)</sup> vereinigt und 48 Stdn. bei  $0^{\circ}$  aufbewahrt. Nach Zugabe von

<sup>19)</sup> A. E. BARKDOLL und W. F. ROSS, J. Amer. chem. Soc. 66, 951 (1944).

<sup>20)</sup> H. R. ALMOND JR. und C. NIEMANN, Biochemistry 1, 12 (1962).

Essigester kristallisieren 2.75 g (88%) vom Schmp. 152–154° aus.  $[\alpha]_D^{25} = -43.7^\circ$  ( $c = 1$ , DMF).

$C_{55}H_{66}N_8O_{11} \cdot 1H_2O$  (1033.3) Ber. C 63.94 H 6.63 N 10.85 H<sub>2</sub>O 1.74  
Gef. 63.83 6.82 10.79 1.24

*L-Tyrosyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-tert.-butylester* – 2.06 g der voranstehenden Verbindung werden in 40 ccm Methanol mit *Pd-Mohr* hydriert. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels i. Vak. wird aus Äthanol/Äther umgefällt. Ausbeute 1.5 g (84%); Schmelzpunkt unscharf.  $[\alpha]_D^{25} = -42.8^\circ$  ( $c = 1$ , DMF).

$C_{47}H_{60}N_8O_9 \cdot 1H_2O$  (899.0) Ber. C 62.79 H 6.95 N 12.46 Gef. C 62.55 H 7.02 N 12.49

*Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginyl-L-tyrosyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-tert.-butylester*. – 0.934 g (2 mMol) *Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginin*<sup>4, 21, 22</sup> in 2 ccm DMF + 3 ccm THF werden bei –10° mit 0.276 ccm Triäthylamin + 0.192 ccm *Chlorameisensäureäthylester* und nach 1/4 Stde. mit 1.5 g (1.7 mMol) *L-Tyrosyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-tert.-butylester* in 3 ccm DMF + 7 ccm THF versetzt. Nach 20 Stdn. bei Raumtemperatur wird eingengt und der Rückstand mit gesätt. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung + Wasser verrieben. Aus Äthanol/DMF/Äther und Äthanol/DMF/Triäthylamin/Wasser erhält man 1.25 g (55%) vom Schmp. 158–161°.  $[\alpha]_D^{25} = -43.9^\circ$  ( $c = 0.5$ , DMF).

$C_{65}H_{83}N_{15}O_{16}$  (1330.4) Ber. C 58.68 H 6.29 N 15.79 O 19.24  
Gef. 58.61 6.35 15.50 19.35

*L-Asparaginylnitro-L-arginyl-L-tyrosyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-tert.-butylester*. – 1.2 g des voranstehenden *Carbobenzoxy-oktapeptidesters* werden in 24 ccm Methanol/Eisessig/Wasser (6:1:1) mit 800 mg *Pd-Mohr* hydriert. Nach Einengen i. Vak. wird mit Äther verrieben. Ausbeute 1.07 g (96%) vom Schmp. 152–154°.  $[\alpha]_D^{25} = -43.5^\circ$  ( $c = 0.5$ , DMF).

$C_{57}H_{78}N_{14}O_{12} \cdot 1CH_3CO_2H \cdot 2H_2O$  (1247.4)  
Ber. C 56.81 H 6.95 N 15.72 COCH<sub>3</sub> 3.45 H<sub>2</sub>O 2.89  
Gef. 56.65 7.01 15.28 3.38 1.83

*L-Asparaginylnitro-L-arginyl-L-tyrosyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin*. – 985 mg der voranstehenden Verbindung werden bei Raumtemperatur 1 Stde. in 9 ccm *Trifluoressigsäure* aufbewahrt. Das Produkt wird mit Äther ausgefällt und auf einer Carboxymethylcellulose-Säule gereinigt. 501 mg (51%) elektrophoretisch einheitliches Tyr<sup>3</sup>-Val<sup>5</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amid werden aus dem mit 0.1 *m* Ammoniumacetat erhaltenen Eluat nach 3 maligem Gefriertrocknen isoliert.  $[\alpha]_D^{25} = -41.7^\circ$  ( $c = 0.5$ , Wasser).

$C_{53}H_{70}N_{14}O_{12} \cdot 1CH_3CO_2H \cdot 4H_2O$  (1227.3)  
Ber. C 53.83 H 6.74 N 15.98 COCH<sub>3</sub> 3.51 H<sub>2</sub>O 5.87  
Gef. 53.74 6.73 15.97 3.52 6.44

*Aminosäureanalyse* (Hydrolyse 72 Stdn., 105°): Asp<sub>1.01</sub>; Arg<sub>0.98</sub>; Tyr<sub>1.83</sub>; Val<sub>0.99</sub>; His<sub>0.99</sub>; Pro<sub>0.94</sub>; Phe<sub>1.00</sub>; NH<sub>3</sub> 0.97.

<sup>21</sup>) W. RITTEL, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER und R. SCHWYZER, *Helv. chim. Acta* **40**, 614 (1957).

<sup>22</sup>) R. PAUL und G. W. ANDERSON, *J. org. Chemistry* **27**, 2094 (1962).

*Tyr(Me)<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amid*

*Carbobenzoxy-L-valyl-O-methyl-L-tyrosinmethylester*. — a) *Anhydrid-Methode*: 2.5 g (10 mMol) *Carbobenzoxy-L-valin*<sup>17)</sup> in 10 ccm THF werden wie üblich bei  $-10^{\circ}$  ins gemischte Anhydrid übergeführt und nach 10 Min. mit 11 mMol *O-Methyl-L-tyrosinmethylester* (aus 3.7 g Hydrochlorid<sup>23)</sup> + 1.52 ccm Triäthylamin) gekuppelt. Nach mehrstündigem Stehenlassen bei Raumtemperatur wird wie üblich gereinigt und aus Essigester/Petroläther umkristallisiert. Ausbeute 2.0 g (45%) vom Schmp.  $141-142^{\circ}$ .  $[\alpha]_D^{25} = -20.4^{\circ}$  ( $c = 0.5$ , Methanol).

$C_{24}H_{30}N_2O_6$  (442.5) Ber. C 65.14 H 6.84 N 6.33 Gef. C 65.14 H 6.94 N 6.43

b) *Carbodiimid-Methode*<sup>24)</sup>: 0.5 g (2 mMol) *Carbobenzoxy-L-valin* + 2.2 mMol *O-Methyl-L-tyrosinmethylester* in 3 ccm DMF + 5 ccm THF werden bei  $-10^{\circ}$  mit 440 mg (2.2 mMol) *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt und 2 Tage bei  $0^{\circ}$  stehengelassen. Es wird wie unter a) aufgearbeitet. Ausbeute 0.54 g (61%) vom Schmp.  $141-142^{\circ}$ .  $[\alpha]_D^{25} = -20.2^{\circ}$  ( $c = 0.5$ , Methanol).

*Carbobenzoxy-L-valyl-O-methyl-L-tyrosinhydrazid*. — 1.1 g *Methylester* in 15 ccm Methanol werden 3 Tage bei Raumtemperatur mit 0.88 ccm *Hydrazinhydrat* aufbewahrt. Nach Kristallisation aus Methanol/wenig DMF werden 1.05 g (95%) Nadeln vom Schmp.  $209$  bis  $209.5^{\circ}$  erhalten.  $[\alpha]_D^{25} = -18.6^{\circ}$  ( $c = 1$ , DMF).

$C_{23}H_{30}N_4O_5$  (442.5) Ber. C 62.42 H 6.83 N 12.66 Gef. C 62.76 H 7.15 N 12.89

*Carbobenzoxy-L-valyl-O-methyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-tert.-butylester*. — 0.88 g (2 mMol) *Carbobenzoxy-L-valyl-O-methyl-L-tyrosinhydrazid* in 2 ccm DMF + 2 ccm HCl-haltiges Tetrahydrofuran (2.2*n*) werden bei  $-20^{\circ}$  5 Min. mit 0.192 ccm *tert.-Butylnitrit* gerührt. Nach Verdünnen mit 10 ccm kaltem Essigester und Neutralisieren mit Triäthylamin wird 48 Stdn. mit 1.22 g (2.2 mMol) *L-Valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-tert.-butylester*<sup>4)</sup> in 8 ccm Essigester stehengelassen. Es wird eingeengt, aus Äthanol/Äther umgefällt und aus Äthanol/Wasser umkristallisiert. Ausbeute 1.35 g (70%) Nadeln vom Schmp.  $203-203.5^{\circ}$ . Die Analysenprobe wurde 2 mal aus Äthanol/Wasser umkristallisiert: Schmp.  $209-211^{\circ}$ .  $[\alpha]_D^{25} = -38.4^{\circ}$  ( $c = 5$ , DMF).

$C_{52}H_{68}N_8O_{10}$  (965.1) Ber. C 64.71 H 7.10 N 11.61 O 16.58  
Gef. 64.67 7.53 11.44 16.90

*L-Valyl-O-methyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-tert.-butylester*. — 1.16 g der voranstehenden Verbindung werden in Methanol mit *Pd-Mohr* hydriert. Aus Essigester/Äther erhält man 0.8 g (78%) *Monohydrat* vom Schmp.  $131-133^{\circ}$ .  $[\alpha]_D^{25} = -39.8^{\circ}$  ( $c = 0.5$ , DMF).

$C_{44}H_{62}N_8O_8 \cdot 1H_2O$  (849.0) Ber. C 62.24 H 7.59 N 13.20 Gef. C 62.33 H 7.63 N 13.14

*Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginyl-L-valyl-O-methyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanin-tert.-butylester*. — 515 mg (1.1 mMol) *Carbobenzoxy-L-asparaginylnitro-L-arginin*<sup>4, 21, 22)</sup> und 740 mg (0.9 mMol) *L-Valyl-O-methyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-*

<sup>23)</sup> W. SIEDEL, K. STURM und R. GEIGER, Chem. Ber. **96**, 1436 (1963).

<sup>24)</sup> J. C. SHEEHAN und G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1067 (1955).

*L-prolyl-L-phenylalanin-tert.-butylester* werden analog der Tyr<sup>3</sup>-Verbindung gekuppelt und gereinigt. Ausbeute 635 mg (53%) vom Schmp. 205°.  $[\alpha]_D^{25} = -34.9^\circ$  ( $c = 0.5$ , DMF).

$C_{62}H_{85}N_{15}O_{15} \cdot 3H_2O$  (1334.5) Ber. N 15.75 H<sub>2</sub>O 4.05 Gef. N 15.35 H<sub>2</sub>O 4.10

*L-Asparaginyll-L-arginyll-L-valyll-O-methyl-L-tyrosyll-L-valyll-L-histidyll-L-prolyll-L-phenylalanin-tert.-butylester*. — 522 mg der voranstehenden Verbindung werden in Methanol/Eisessig/Wasser (8 : 1 : 1) mit 1 g *Pd-Mohr* hydriert. Nach Filtration wird verdampft und mit Äther verrieben. Ausbeute 470 mg (95%) vom Schmp. 152–154°.  $[\alpha]_D^{25} = -33.3^\circ$  ( $c = 0.5$ , DMF).

$C_{54}H_{80}N_{14}O_{11} \cdot 2CH_3CO_2H \cdot 1H_2O$  (1239.4) Ber. C 56.20 H 7.32 COCH<sub>3</sub> 6.95 H<sub>2</sub>O 1.45  
Gef. 56.08 7.95 7.70 1.76

*L-Asparaginyll-L-arginyll-L-valyll-O-methyl-L-tyrosyll-L-valyll-L-histidyll-L-prolyll-L-phenylalanin*. — 396 mg des voranstehenden *Esters* werden 1 Stde. in 4 ccm *Trifluoressigsäure* aufbewahrt. Das mit Äther ausgefällte Rohprodukt wird in 15 ccm Wasser gelöst, auf eine Carboxymethylcellulose-Säule ( $\varnothing$  1.5 cm, Länge 1 m) gegeben und mit ansteigender Ammoniumacetatkonzentration (0.001–0.1 *m*; pH 5) eluiert. Aus dem Eluat mit 0.1 *m* Ammoniumacetat wurden 186 mg (51%) elektrophoretisch einheitliches, gefriergetrocknetes Pulver erhalten, das sich als *Hemiacetat-tetrahydrat* erwies.  $[\alpha]_D^{25} = -59.2^\circ$  ( $c = 0.5$ , Wasser).

$C_{50}H_{72}N_{14}O_{11} \cdot 0.5CH_3CO_2H \cdot 4H_2O$  (1147.3)

Ber. C 53.39 H 7.19 N 17.09 COCH<sub>3</sub> 1.88 H<sub>2</sub>O 6.28 OCH<sub>3</sub> 2.71

Gef. 53.27 7.08 16.88 2.05 6.86 2.76

*Aminosäureanalyse* (Hydrolyse 72 Std., 105°): Asp<sub>1.02</sub>; Arg<sub>0.99</sub>; Val<sub>1.96</sub>; Tyr<sub>0.81</sub>; His<sub>1.00</sub>; Pro<sub>0.96</sub>; Phe<sub>1.00</sub>; NH<sub>3</sub> 1.00.

### *Tyr<sup>8</sup>-Val<sup>5</sup>-Angiotensin II-Asp<sup>1</sup>-β-amid*

*Carbobenzoxy-L-asparaginyll-nitro-L-arginyll-L-valyll-L-tyrosyll-L-valyll-L-histidyll-L-prolyll-O-tert.-butyll-L-tyrosin-tert.-butylester*. — 883 mg (1.2 mMol) *Carbobenzoxy-L-asparaginyll-nitro-L-arginyll-L-valyll-L-tyrosin*<sup>21,22</sup> in 4 ccm DMF werden 10–15 Min. bei –10° mit 0.166 ccm Triäthylamin und 0.115 ccm *Chlorameisensäureäthylester* gerührt und mit 814 mg (1.3 mMol) *L-Valyll-L-histidyll-L-prolyll-O-tert.-butyll-L-tyrosin-tert.-butylester*<sup>4</sup>) in 5 ccm THF versetzt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur und mehrstündigem Stehenlassen wird eingeeengt, in Butanol aufgenommen, mit gesätt. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und Wasser ausgeschüttelt und aus DMF/Essigester und DMF/Triäthylamin/Wasser umgefällt. Ausbeute 800 mg (50%) vom Schmp. 165–168°.  $[\alpha]_D^{25} = -32.0^\circ$  ( $c = 0.5$ , DMF).

$C_{65}H_{91}N_{15}O_{16} \cdot 1H_2O$  (1356.5) Ber. C 57.55 H 6.91 N 15.49 O 20.05

Gef. 57.83 6.91 14.91 20.43

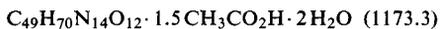
*L-Asparaginyll-L-arginyll-L-valyll-L-tyrosyll-L-valyll-L-histidyll-L-prolyll-O-tert.-butyll-L-tyrosyll-tert.-butylester*. — 745 mg der voranstehenden Verbindung in 24 ccm Methanol/Eisessig/Wasser (6 : 1 : 1) werden wie üblich *hydriert*. Ausbeute 680 mg (95%) vom Schmp. 175–177°.  $[\alpha]_D^{25} = -32.3^\circ$  ( $c = 0.5$ , DMF).

$C_{57}H_{86}N_{14}O_{12} \cdot 2CH_3CO_2H \cdot 1H_2O$  (1297.5)

Ber. C 56.47 H 7.47 N 15.11 COCH<sub>3</sub> 6.64 H<sub>2</sub>O 1.39

Gef. 56.60 7.86 14.45 7.85 0.96

*L-Asparaginyl-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-tyrosin.* — 610 mg Oktapeptidester werden in 6 ccm Trifluoressigsäure 2 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das Rohprodukt wird mit absol. Äther ausgefällt und durch trägerfreie präparative Elektrophorese (Pheroplan®)<sup>8,9</sup> in Pyridiniumacetat-Puffer pH 5 gereinigt. Ausbeute 210 mg (36% elektrophoretisch einheitliches, gefriergetrocknetes Pulver.  $[\alpha]_D^{25} = -56.0^\circ$  ( $c = 0.5$ , Wasser); weitere 116 mg (20%) enthielten Spuren einer Verunreinigung.



Ber. C 53.24 H 6.87 N 16.71 COCH<sub>3</sub> 5.50 H<sub>2</sub>O 3.07

Gef. 53.33 7.09 16.05 5.16 3.66

*Aminosäureanalyse* (Hydrolyse 72 Stdn., 105°): Asp<sub>0.99</sub>; Arg<sub>0.94</sub>; Val<sub>2.00</sub>; Tyr<sub>1.81</sub>; His<sub>1.01</sub>; Pro<sub>1.01</sub>; NH<sub>3</sub> 0.98.

Tabelle 1. Biologische Aktivität einiger Val<sup>5</sup>-Angiotensin II-Analoga

Verbindungen	Blutdruck *) nephrektomierte Ratte	Meer- schweinchen- Ileum **)	Ratten- Uterus **)
Val <sup>5</sup> -Angiotensin II-Asp <sup>1</sup> -β-amid	100 %	0.08—0.3 ng	0.15—0.3 ng
Tyr <sup>3</sup> -Val <sup>5</sup> -Angiotensin II-Asp <sup>1</sup> -β-amid	12	8 ng	0.8—3 ng
Tyr <sup>3</sup> -Val <sup>4</sup> -Val <sup>5</sup> -Angiotensin II-Asp <sup>1</sup> -β-amid	<0.1	~0.8—1.5 μg	~0.3—0.8 μg
Phe <sup>4</sup> -Tyr <sup>8</sup> -Val <sup>5</sup> -Angiotensin II-Asp <sup>1</sup> -β-amid	~0.2	~0.15 μg	0.15—0.3 μg
Tyr(Me) <sup>4</sup> -Val <sup>5</sup> -Angiotensin II-Asp <sup>1</sup> -β-amid	~0.2	0.15 μg	0.15—0.3 μg
Lys <sup>6</sup> -Val <sup>5</sup> -Angiotensin II-Asp <sup>1</sup> -β-amid	~0.1	>1.5 μg	>1.5 μg
Phe <sup>6</sup> -Val <sup>5</sup> -Angiotensin II-Asp <sup>1</sup> -β-amid	1	~0.8 μg	0.8 μg
Tyr <sup>8</sup> -Val <sup>5</sup> -Angiotensin II-Asp <sup>1</sup> -β-amid	10	~1.5—3 ng	8 ng

\*) Die Werte wurden aus der Dosis-Wirkungskurve (halblogarithmische Auftragung) im Bereich einer 20—60-proz. Blutdrucksteigerung ermittelt.

\*\*) Schwellendosen: Werte pro ccm TYRODE-Lösung.