抗レニン活性ペプチドの合成 (第 I 報)

井手明雄,^{1a)} 重実桂助, 重実 鈴, 溝口富茂, 斎藤清一田辺製薬株式会社有機化学研究所¹⁾

Synthesis of Antirenin Active Peptides. I.

AKIO IDE,^{1a)} KEISUKE SHIGEZANE, SUZU SHIGEZANE, TOMISHIGE MIZOGUCHI
and SEIICHI SAITOOrganic Chemistry Research Laboratories, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.¹⁾

(Received February 28, 1970)

In order to find competitive inhibitors of renin, 35 peptides having phenylalanyl-histidyl or leucyl-leucyl bond at the C-terminal, in the middle position or at the N-terminal of the peptide chain, were synthesized and leucylleucylvalyltyrosine methyl ester and leucyl-leucylvalylphenylalanine methyl ester were found to be active.

腎性高血圧, 特に腎血管性高血圧の血圧上昇の成因の1つとして, renin-angiotensin 系機構が明らかにされている。²⁾ すなわち, 血漿 α_2 -globulin 分画中の蛋白質 angiotensinogen の leucyl-leucine 結合に蛋白質分解酵素 renin が作用して angiotensin I (不活性型)³⁾ を生じ, さらに converting enzyme の作用を受けてその phenylalanyl-histidine 結合が加水分解され, angiotensin II (活性型) になる。⁴⁾ この物質は既知物質中, 最強の昇圧作用を有するといわれている。⁵⁾

Chart にその機構をまとめた。

Chart Mechanism of Formation of Angiotensin in Renin-Angiotensin System

Skeggs らは, renin は leucyl-leucine を加水分解せず,⁶⁾ leucyl-leucine 結合を中心に持つ合成ペプチドの中, octapeptide, prolylphenylalanylhystidylleucylleucylvalyltyrosylserine にいたり初めてわずかに加水分解すると報告した。⁷⁾ また, converting enzyme も angiotensin I の phenylalanyl-histidine 結合は加水分解するが,

- 1) Location: Kawagishi, Toda-shi, Saitama; a) Present address: Faculty of Agriculture, Ehime University, Tarumi-cho, Matsuyama-shi, Ehime.
- 2) I.H. Page, F.M. Bumpus, *Physiol. Rev.*, **41**, 331 (1961).
- 3) A.A. Plentl, I.H. Page, W.W. Davis, *J. Biol. Chem.*, **147**, 143 (1943); A.A. Green, F.M. Bumpus, *ibid.*, **210**, 281 (1954).
- 4) W.F. Ganong, P.J. Mulrow, *Nature*, **190**, 1115 (1961); P.J. Mulrow, W.F. Ganong, G. Cera, A. Kuljian, *J. Clin. Invest.*, **41**, 505 (1962).
- 5) J.O. Davis, C.C.J. Carpenter, C.R. Ayers, J.E. Holman, R.C. Bahn, *J. Clin. Invest.*, **40**, 684 (1961); J.O. Davis, C.R. Ayers, C.C.J. Carpenter, A. Casper, E. Cavanaugh, *ibid.*, **40**, 1466 (1961).
- 6) 荒川規矩男, “蛋白質核酸酵素 7 巻,” 共立出版, 東京, 1962, p. 615.
- 7) L.T.Jr. Skeggs, “Polypeptide which affect Smooth Muscles and Blood Vessels,” Bergmon Press, Oxford, 1960, p. 120.

C-末端 leucine を欠く nonapeptide の phenylalanyl-histidine 結合は加水分解しないといわれる。著者らは種々の leucyl-leucine, または, phenylalanyl-histidine 結合を有するペプチド誘導体が, renin あるいは converting enzyme の作用を競争的に阻害し, angiotensin II の生体内での産出を抑制できないかと考え, その構造-活性相関を検討すべく, これらペプチド類の合成を行なった。

まずわれわれは, phenylalanyl-histidine 結合を持つ小ペプチド類, 次いで, leucyl-leucine 結合を C-末端側, N-末端側またはペプチド鎖中に有する hexapeptide までの主として angiotensinogen と同一アミノ酸結合順序を持つ多数の誘導体を合成して生物活性試験に供した。

アミノ基およびカルボキシル基の保護はそれぞれカルボベンゾキシ基,⁸⁾ メチルエステルを用い, 縮合反応はニトロフェニルエステル法,⁹⁾ ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCCD) 法,¹⁰⁾ アジド法,¹¹⁾ アルキルクロロホルメートを使用する混酸無水物法を¹²⁾ 適宜使用した。なお, formylleucylleucine (XXI) およびその diastereoisomer の合成において, XXI は, leucyl-leucine (XX) のギ酸-無水酢酸法によるホルミル化で得た。N-ホルミルアミノ酸とアミノ酸エステルとの縮合には, DCCD 法で比較的好収率, かつラセミ化も起りにくいといわれている。¹³⁾ この方法で得た formyl-D-leucyl-D-leucine (XXVII) は, $[\alpha]_D^{25} + 66.2^\circ$ ($c=1.0$, ethanol) であり, XXI は, $[\alpha]_D^{25} - 65.3^\circ$ ($c=1.0$, ethanol) であることからラセミ化していないことが確かめられた。

生物試験

山村, 国府らによって生物試験が行なわれた。¹⁴⁾ すなわち, 合成ペプチドを家兎腎より抽出した renin, renin 基質として正常兎の血漿および 0.9%-食塩水の反応系に加え, インキュベート後, 沸とう水浴中で加熱して反応をとめ, その上清中の angiotensin 量をネブタール麻酔, ペントリニウム処理したラットを用い血圧測定によって測定した。血圧測定は, 直接法により, その結果は Table I, II, III および IV のごとくである。

試験された合成ペプチドの内, leucylleucylvalyltyrosine methyl ester-hydrochloride (XLVII), leucylleucylvalylphenylalanine methyl ester-hydrochloride (I) は, *in vitro* で活性があり, renin による angiotensin の生成を競争的に阻害することが証明された。

TABLE I. Peptide Derivatives having Phe-His Bond

Peptides	mp(°C)	Formula	Analysis (%)				Inhibition of renin-angiotensin system
			C	H	N	Cl	
H-Phe-His-OH-HCl (III)	176	$C_{15}H_{18}O_3N_4 \cdot HCl \cdot H_2O$	Calcd. 50.46	5.93	15.70	9.93	—
			Found 50.20	5.57	15.91	10.05	
H-Phe-His-Leu-OH (V)	222—223 ^{a)}	$C_{21}H_{29}O_4N_5 \cdot H_2O$	Calcd. 58.18	7.21	16.16		—
			Found 58.32	6.96	15.98		
Cbz-Pro-Phe-His-Leu-OH (VIII)	—						— ^{b)}
Cbz-Phe-His-Leu-Leu-OH (XIII)	201—202	$C_{35}H_{46}O_7N_6$	Calcd. 63.42	7.00	12.68		—
			Found 62.92	6.83	12.26		
Cbz-Pro-Phe-His-Leu-Leu-OH (XVIII)	—						— ^{b)}

Cbz: benzyloxycarbonyl

a) decomp.

b) Tested in the form of sodium salt.

- 8) M. Bergmann, L. Zervas, *Chem. Ber.*, **65**, 1192 (1932).
- 9) M. Bodanszky, *Nature*, **175**, 685 (1955).
- 10) J.C. Sheehan, G.P. Hass, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1067 (1955).
- 11) T. Curtius, *Chem. Ber.*, **35**, 3226 (1902).
- 12) R.A. Boissonnas, *Helv. Chim. Acta*, **34**, 874 (1951); T. Wieland, H. Bernhard, *Ann.*, **572**, 190 (1951); J.R. Vaughan, Jr., R.L. Osato, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 676 (1952).
- 13) J.C. Sheehan, D-D. H. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1154 (1958); K. Vogler, P. Lanz, *Helv. Chim. Acta*, **43**, 270 (1960).
- 14) T. Kokubu, E. Ueda, S. Fujimoto, K. Hiwada, A. Kato, H. Akutsu, Y. Yamamura, S. Saito, T. Mizoguchi, *Nature*, **217**, 456 (1968); 第 41 回日本生化学会大会で発表, 東京, 1968 年 10 月。

TABLE II. Peptide Derivatives having Leu-Leu Bond at C-Terminal

Peptides	mp(°C)	Formula		Analysis (%)			Inhibition of renin-angiotensin system
				C	H	N	
Cbz-Leu-Leu-OH (XIX) ¹⁹⁾	95—96						—
H-Leu-Leu-OCH ₃ -HCl (X) ²⁰⁾	175—177						—
H-Leu-Leu-OH (XX) ²²⁾	265—266						—
CHO-Leu-Leu-OH (XXI)	159—160	C ₁₃ H ₂₄ O ₄ N ₂	Calcd. 57.33 8.88 10.29 Found 57.64 8.56 10.48				— ^{a)}
CHO-Leu-D-Leu-OH (XXV)	197—198 ^{b)}	C ₁₃ H ₂₄ O ₄ N ₂	Calcd. 57.33 8.88 10.29 Found 57.44 8.53 10.27				—
CHO-D-Leu-Leu-OH (XXVI)	197—198 ^{b)}	C ₁₃ H ₂₄ O ₄ N ₂	Calcd. 57.33 8.88 10.29 Found 57.70 8.55 10.48				—
CHO-D-Leu-D-Leu-OH (XXVII)	159—160	C ₁₃ H ₂₄ O ₄ N ₂	Calcd. 57.33 8.88 10.29 Found 57.32 8.34 10.41				—
H-His-Leu-Leu-OCH ₃ -(CO ₂ H) ₂ (XV)	219 ^{b)}	C ₂₁ H ₃₅ O ₅ N ₄	Calcd. 51.90 7.26 14.41 Found 51.51 7.18 14.40				— ^{c)}
Cbz-Leu-Leu-NHNH ₂ (XXVIII) ²⁶⁾	152—153	C ₂₀ H ₃₂ O ₄ N ₄	Calcd. 61.20 8.22 14.28 Found 61.32 7.97 13.91				— ^{d)}

a) Showed pressor activity not due to the inhibition of renin.

b) decomp.

c) Tested in the form of dihydrochloride.

d) Tested in the form of hydrochloride.

TABLE III. Peptide Derivatives having Leu-Leu Bond at N-Terminal

Peptides	mp(°C)	Formula		Analysis (%)				Inhibition of renin-angiotensin system
				C	H	N	Cl	
Cbz-Leu-Leu-Val-OH (XXX)								— ^{a, b)}
H-Leu-Leu-Val-OCH ₃ -HCl (XXXI) ²⁶⁾	238 ^{c)}							—
Tos-Leu-Leu-Val-OH (XXXIII)	205	C ₂₄ H ₃₉ O ₆ N ₃ S•H ₂ O	Calcd. 55.90 8.01 8.15 6.22 Found 55.94 7.92 8.15 6.06				S	—
CHO-Leu-Leu-Val-OH (XXXIV)	174	C ₁₈ H ₃₃ O ₅ N ₃	Calcd. 58.20 8.95 11.31 Found 58.26 8.92 11.22					—
C ₂ H ₅ OCO-Leu-Leu-Val-OH (XXXV)	162—164	C ₂₀ H ₃₇ O ₆ N ₃	Calcd. 57.81 8.98 10.11 Found 57.47 8.50 10.03					—
Cbz-Leu-Leu-Gly-OH-DCHA (XXXVI) ²⁸⁾	168—169	C ₃₄ H ₅₆ O ₆ N ₄	Calcd. 66.20 9.15 9.08 Found 67.05 8.74 9.31					— ^{a)}
Cbz-Leu-Leu-Leu-OH-DCHA (XXXVII)	102	C ₃₈ H ₆₄ O ₆ N ₄	Calcd. 67.84 9.59 8.33 Found 68.09 9.19 8.13					— ^{a)}
Cbz-Leu-Leu-Phe-OH-DCHA (XXXVIII)	167—168	C ₄₁ H ₆₁ O ₆ N ₄	Calcd. 69.65 8.84 7.93 Found 69.78 8.59 8.20					— ^{a)}
Cbz-Leu-Leu-Lys-OH-DCHA (XXXIX)	144—145	C ₄₆ H ₇₀ O ₈ N ₅	Calcd. 67.29 8.59 8.54 Found 67.50 8.34 8.68					— ^{a)}
Cbz-Leu-Leu-Val-Gly-OH (XLII)								— ^{a)}
H-Leu-Leu-Val-Gly-OCH ₃ -HBr (XLIII)	225—227	C ₂₀ H ₃₈ O ₅ N ₄ •HBr	Calcd. 48.42 7.93 11.31 16.13 Found 48.19 7.58 11.29 15.83				Br	—
Cbz-Leu-Leu-Val-Tyr-OH (XLVI)								— ^{a)}
H-Leu-Leu-Val-Tyr-OCH ₃ -HCl (XLVII)	244—246	C ₂₇ H ₄₄ O ₆ N ₄ •HCl	Calcd. 58.21 8.14 10.06 6.37 Found 58.31 7.95 9.80 6.59					+
Cbz-Leu-Leu-Val-Phe-OH (XLIX)								— ^{a)}
H-Leu-Leu-Val-Phe-OCH ₃ -HCl (L)	250 ^{c)}	C ₂₇ H ₄₄ O ₅ N ₄ •HCl•CH ₃ OH	Calcd. 58.59 8.62 9.74 6.19 Found 58.56 8.26 10.19 6.49					+

Tos: *p*-toluenesulfonyl

DCHA: dicyclohexylamine

a) Tested in the form of sodium salt.

b) Showed pressor activity not due to the inhibition of renin.

c) decomp.

TABLE IV. Peptide Derivatives having Leu-Leu Bond in the Middle of Peptide Chain

Peptides	mp (°C)	Formula	Analysis (%)			Inhibition of renin- angiotensin system
			C	H	N	
Cbz-His-Leu-Leu-Val-OH (LIII)						— ^{a)}
Cbz-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-OH (LV)						— ^{a)}
H-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-OH (LVI)	240—241 ^{b)}	$C_{37}H_{56}O_6N_8 \cdot \frac{1}{2}H_2O$	Calcd. 59.26 Found 59.32	7.66 7.58	14.94 14.62	—
Cbz-His-Leu-Leu-Val-Tyr-OH (LVIII)						— ^{a)}
Cbz-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-OH (LX)						— ^{a)}
H-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-OH (LXI)	263 ^{b)}	$C_{41}H_{58}O_5N_8 \cdot 3H_2O$	Calcd. 58.28 Found 58.18	7.63 7.26	13.26 13.01	—

^{a)} Tested in the form of sodium salt.^{b)} decomp.実験の部¹⁵⁾

Benzyloxycarbonylphenylalanylhistidine Methyl Ester (I)¹⁶⁾ Histidine methyl ester·dihydrochloride 2.4 g を $CHCl_3$ に懸濁し、氷冷下、 Et_3N 3.0 g を加え、さらに benzyloxycarbonylphenylalanine *p*-nitrophenyl ester 4.2 g を加え、室温に一夜反応する。 $CHCl_3$ 層を 2N NH_4OH および水で各 3 回洗滌し、芒硝乾燥す。 $CHCl_3$ を留去し、残渣にエーテルを加えると結晶化す。結晶をろ取、 $AcOEt$ より再結晶し、無色針状晶 4.2 g (93.3%) を得る。mp 119—120°, $[\alpha]_D^{20} -15.1^\circ$ ($c=1.0$, $EtOH$). Lit.¹⁶⁾ mp 155—160°.

Benzyloxycarbonylphenylalanyllhistidine (II)^{16,17)} I 4.96 g を $MeOH$ 100 ml にとかし、氷冷下、1N $NaOH$ ($f=0.968$) 13.6 ml を 20 min で滴下後室温に 2 hr 反応し、 $AcOH$ 27 ml を加えて pH 4.6 とし、減圧濃縮し、水 200 ml を加え冷所に 1 夜放置し、結晶をろ取、水洗乾燥す。

$EtOH$ より再結晶し、無色針状晶 3.4 g (70.3%) を得る。mp 202° (decomp.), $[\alpha]_D^{25} -22.1^\circ$ ($c=1.9$, 1N HCl ($f=1.013$)). Lit.¹⁶⁾ mp 205—207°. Lit.¹⁷⁾ mp 198—200° (decomp.).

Phenylalanylhistidine Hydrochloride (III) II 1.0 g を $MeOH$ 20 ml にとかし、1N HCl 3 ml と 10% $Pd-C$ 0.1 g を加え、室温で常圧接触還元し、触媒ろ去、母液を減圧濃縮し、残渣を $EtOH$ -エーテルより再結晶し、無色鱗片状晶 0.45 g (74.8%) を得る。mp 176°, $[\alpha]_D^{19} +35.6^\circ$ ($c=0.5$, $EtOH$).

Benzyloxycarbonylhistidylleucine Methyl Ester (IV)¹⁸⁾ Benzyloxycarbonylhistidinehydrazide 5.0 g を水 THF 50 ml に懸濁、 -10° にて、conc. HCl 5 ml, $CHCl_3$ 50 ml を加え、 -10° 以下で攪拌下、 $NaNO_2$ 1.3 g の 3 ml 溶液を滴下する。15 min 後、 $NaHCO_3$ 16 g を加えて中和、leucine methyl ester·hydrochloride 3.6 g と Et_3N 2.0 g を加え、 -10° に 5 hr、室温に 1 夜攪拌す。不溶物をろ去後、 $CHCl_3$ 層を 5% K_2CO_3 液、次に水で洗滌し、 $MgSO_4$ で乾燥。 $CHCl_3$ を留去、残渣にエーテルを加えて結晶化。ろ取し、30% アセトン-水より再結晶し、無色針状晶 5.3 g (77.2%) を得る。mp 124—126°, $[\alpha]_D^{20.5} -25.2^\circ$ ($c=1.0$, $EtOH$). Lit.¹⁸⁾ mp 125—128°, $[\alpha]_D^{25} -25.5^\circ$ ($c=1$, $EtOH$).

Benzyloxycarbonylphenylalanylhistidylleucine Methyl Ester (V) IV 5.0 g を $MeOH$ 120 ml にとかし、これに 1N HCl 24ml, 10% $Pd-C$ 1.0 g を加え、室温で常圧接触還元し、触媒ろ去後、減圧濃縮、残渣を水にとかし、水層を $AcOEt$ で振盪洗滌し、10% K_2CO_3 液を加えてアルカリ性とし、 $CHCl_3$ 抽出、水洗、乾燥後の母液に、benzyloxycarbonylphenylalanine *p*-nitrophenyl ester 4.5 g を加え、室温に一夜放置す。 $CHCl_3$ 層を 2N NH_4OH , 水で各 3 回洗滌、乾燥後、減圧濃縮し残渣を $MeOH$ より再結晶し、無色針状晶 2.2 g (40.6%) を得る。mp 192—193°, $[\alpha]_D^{20} -39.6^\circ$ ($c=1.0$, $EtOH$).

Anal. Calcd. $C_{30}H_{37}O_6N_5$: C, 63.92; H, 6.62; N, 12.43. Found: C, 63.55; H, 6.48; N, 12.29.

Phenylalanylhistidylleucine (VI) V 1.0 g を $MeOH$ 30 ml にとかし、1N HCl 6 ml, 10% $Pd-C$ 0.2 g を加え、室温で常圧接触還元し、触媒をろ去、母液に 1N $NaOH$ 8.2 ml を加え、室温に 30 min 反応後、 $AcOH$ を加えて pH 5.0 にすると結晶析出、ろ取し、90% $EtOH$ より再結晶し、無色針状晶 0.3 g (40.7%) を得る。mp 222—223°, $[\alpha]_D^{20} +1.0^\circ$ ($c=0.4$, 1N HCl).

15) 融点は全て未補正。特に記載のない限り、アミノ酸は全て L-型。

16) G. Losse, G. Mueller, *Chem. Ber.*, **94**, 2768 (1961).

17) D. Theodoropoulos, L.C. Craig, *J. Org. Chem.*, **20**, 1169 (1955).

18) R.W. Holley, E. Sondheimer, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1326 (1954).

Benzyloxycarbonylprolylphenylalanylhistidylleucine Methyl Ester (VII) V 1.9 g を MeOH 50 ml にとかし, 1N HCl 10 ml, 10% Pd-C 0.4 g を加え, VI と同様に接触還元す. 常法後処理し得られた粗製 phenylalanyl-histidylleucine methyl ester dihydrochloride 1.19 g の内, 0.94 g を CHCl_3 20 ml に懸濁し, 冷却下, Et_3N 0.42 g および benzyloxycarbonylproline *p*-nitrophenyl ester 0.76 g を加え, 3 日間室温に反応後, CHCl_3 層を 5% NH_4OH , 水で各 3 回洗滌, 乾燥後, 減圧濃縮し, 残渣を chromatography 精製 (silica gel; 展開溶媒, MeOH: エーテル (1: 9, v/v)), さらにアセトン-エーテルより再結晶し, 無色針状晶 0.42 g (34.0%) を得る. mp 154—156° (decomp.), $[\alpha]_D^{25.5} - 72.2^\circ$ ($c=1.0$, MeOH). Anal. Calcd. $\text{C}_{35}\text{H}_{44}\text{O}_7\text{N}_6$: C, 63.62; H, 6.71; N, 12.71. Found: C, 63.81; H, 6.42; N, 12.52.

VII 0.34 g を MeOH 10 ml にとかし, 冷却下に, 1N NaOH 0.5 ml を加え, 室温に 2 hr 反応し, 減圧濃縮し, 残渣を水にとかし, 炭末処理後, 汙液を凍結乾燥し, benzyloxycarbonylprolylphenylalanylhistidylleucine (VIII) の Na 塩を得る. 本品を生物試験に供した.

Benzyloxycarbonylleucylleucine Methyl Ester (IX)¹⁹⁾ Benzyloxycarbonylleucine 26.5 g を CHCl_3 200 ml にとかし, 0° 以下で Et_3N 9.5 g, isobutylchloroformate 13.7 g を加え, 15 min 後, leucine methyl ester (塩酸塩水溶液を K_2CO_3 でアルカリ性にし, エーテル抽出し, 減圧蒸留す. bp 63—68° (8 mmHg) 14.5 g を CHCl_3 50 ml にとかした液を加え, 室温に 1 夜放置す. CHCl_3 層を 5% HCl, satd. NaHCO_3 solution, 水で洗滌, 芒硝で乾燥後, 減圧濃縮し, 残渣を AcOEt-n-hexane より再結晶し, 無色鱗片状晶 17.4 g (43.6%) を得る. mp 95—97°, $[\alpha]_D^{25} - 34.7^\circ$ ($c=1.0$, EtOH). Lit.¹⁹⁾ mp 97.5—98.5°, $[\alpha]_D^{25} - 33.8^\circ$ ($c=1$, EtOH).

Leucylleucine Methyl Ester Hydrochloride (X)²⁰⁾ IX 5.7 g を MeOH 50 ml にとかし, 1N HCl 14 ml, 10% Pd-C 0.5 g を加え, 常圧接触還元し, 汙液を減圧濃縮し, 残渣をアセトン-*n*-hexane より再結晶し, 無色針状晶 3.8 g (88.7%) を得る. mp 175—177°, $[\alpha]_D^{25} - 6.05^\circ$ ($c=1.0$, EtOH). Lit.²⁰⁾ mp 180—181°, $[\alpha]_D^{25} - 10.2^\circ$.

Benzyloxycarbonylphenylalanylhistidine Hydrazide (XI) I 4.0 g を EtOH 20 ml にとかし, 80% hydrazine hydrate 1.2 g を加え, 室温に 1 夜放置後, 析出結晶を汙取, MeOH より再結晶し, 無色針状晶 1.7 g (32.6%) を得る. mp 177—178°, $[\alpha]_D^{25} - 39.3^\circ$ ($c=1.0$, 0.1 N HCl). Anal. Calcd. $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{N}_6$: C, 61.32; H, 5.82; N, 18.66. Found: C, 61.32; H, 5.63; N, 18.87.

Benzyloxycarbonylphenylalanylhistidylleucylleucine Methyl Ester (XII) XI 5.3 g を AcOEt 100 ml に懸濁し, 1N HCl 42 ml を加え, 0—5° で攪拌下, NaNO_2 0.82 g の水 2 ml 溶液を滴下し, 10 min 後, 冷 50% K_2CO_3 20 ml で振とうし, AcOEt 層を芒硝乾燥. この AcOEt 溶液に, 冷却下, X 3.5 g と Et_3N 1.1 g を加え, 室温に 1 夜反応し, AcOEt 層を 10% K_2CO_3 , 水で洗滌, 芒硝乾燥後, 減圧濃縮し, 残渣を AcOEt-n-hexane より再結晶し, 無色針状晶 2.2 g (19.4%) を得る. mp 179—180°, $[\alpha]_D^{25} - 42.1^\circ$ ($c=1.0$, EtOH). Anal. Calcd. $\text{C}_{36}\text{H}_{48}\text{O}_7\text{N}_6$: C, 63.88; H, 7.15; N, 12.48. Found: C, 63.83; H, 6.89; N, 12.31.

Benzyloxycarbonylphenylalanylhistidylleucylleucine (XIII) XII 1.2 g を MeOH 10 ml にとかし, 1N NaOH 1.7 ml を加え, 室温に 2 hr 反応後, AcOH を加えて酸性とし析出する結晶を汙取, 水洗後, MeOH-水より再結晶し, 無色針状晶 0.6 g (51.0%) を得る. mp 201—202°, $[\alpha]_D^{25} - 16.4^\circ$ ($c=1.0$, 0.1N NaOH).

Benzyloxycarbonylhistidylleucylleucine Methyl Ester (XIV) Benzyloxycarbonylhistidine hydrazide 3.03 g の THF 20 ml, CHCl_3 20 ml 懸濁液に 1N HCl 40 ml を加え, NaNO_2 0.76 g の水 2 ml 溶液を -10° で滴下す. 後処理は, XII の合成に準ず. アセトン-水より再結晶し, 3.65 g (68.9%) を得る. mp 174—175°, $[\alpha]_D^{25.5} - 49.8^\circ$ ($c=1.0$, MeOH). Anal. Calcd. $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{O}_6\text{N}_5$: C, 61.23; H, 7.43; N, 13.22. Found: C, 61.13; H, 7.02; N, 13.07.

Histidylleucylleucine Methyl Ester-hemioxalate (XV) XIV 3.0 g の MeOH 溶液に, 1N HCl 15 ml, 10% Pd-C 1 g を加え常圧接触還元し, 触媒汙去, 減圧濃縮, 残渣を MeOH-エーテルより再結晶し, histidylleucylleucine methyl ester dihydrochloride 2.25 g (88.0%) を得る. mp 154—156°, $[\alpha]_D^{19.5} - 29.2^\circ$ ($c=1.0$, MeOH). 本品を生物試験に供し, 一部を hemioxalate (XV) に変えた. mp 219° (decomp.), $[\alpha]_D^{19} - 32.6^\circ$ ($c=0.58$, MeOH).

Benzyloxycarbonylprolylphenylalanine *p*-Nitrophenyl Ester (XVI) Benzyloxycarbonylprolylphenylalanine 12.0 g と *p*-nitrophenol 5.0 g の CHCl_3 100 ml 溶液に, DCCD 6.2 g の CHCl_3 30 ml 溶液を滴下, 室温に 1 夜反応, 汙過後, 汙液を減圧濃縮, 残渣を EtOH より再結晶し, 11.5 g (73.3%) を得る. mp 153—154°, $[\alpha]_D^{25} - 58.4^\circ$ ($c=1.0$, CHCl_3). Anal. Calcd. $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{O}_7\text{N}_3$: C, 64.98; H, 5.26; N, 8.12. Found: C, 65.35; H, 4.86; N, 8.01.

Benzyloxycarbonylprolylphenylalanylhistidylleucylleucine Methyl Ester (XVII)²¹⁾ XV 1.85 g を CHCl_3 20 ml に懸濁し, -10° で Et_3N 0.8 g と XVI 2.0 g を加え, 徐々に室温に戻しながら, 3 日間反応させ, CHCl_3 層を 5% NH_4OH , 水で各 3 回洗滌, 乾燥後, 減圧濃縮し, 残渣をアセトン-エーテルより再結晶し, 2.41 g (78.8%) を得る. mp 185—187°, $[\alpha]_D^{25} - 45.4^\circ$ ($c=1.0$, MeOH). Anal. Calcd. $\text{C}_{41}\text{H}_{55}\text{O}_8\text{N}_7$: C, 63.63; H, 7.16; N, 12.67. Found: C, 63.46; H, 6.86; N, 12.60. Lit.²¹⁾ mp 114—119°.

19) E.L. Smith, D.H. Spackman, W.J. Polglase, *J. Biol. Chem.*, **199**, 801 (1952).

20) A. Fontana, F. Marchiori, L. Moroder, *Ric. Sci.*, **36**, 261 (1966) [*C.A.*, **65**, 3959^d].

21) M. Roth, A. Reinharz, *Helv. Chim. Acta*, **49**, 1903 (1966).

XVII 1.0 g を MeOH 10 ml にとかし, 1N NaOH 1.3 ml を加えて室温に 1 夜反応させた後, 濃縮し, 残渣を水にとかし, 炭末処理, 凍結乾燥後, benzyloxycarbonylprolylphenylalanylhistidylleucylleucine (XVIII) の Na 塩を得る. 本品を生物試験に供した.

Benzyloxycarbonylleucylleucine (XIX)¹⁹⁾ IX 10 g をアセトンにとかし, 1N NaOH (28 ml) でケン化, 5% HCl で酸性, 析出結晶をアセトン-*n*-hexane より再結晶, 無色プリズム晶 (7.6 g) を得る. mp 95—96°, $[\alpha]_D^{25} - 24.5^\circ$ ($c=1.0$, EtOH). Lit.¹⁹⁾ mp 98—101°, $[\alpha]_D^{25} - 24.7^\circ$ ($c=1$, EtOH).

Leucylleucine (XX)²²⁾ XIX 2.7 g を MeOH 30 ml にとかし, AcOH 1.5 ml, 水 1.5 ml および 10% Pd-C 0.4 g を加え, 常圧接触還元を行なう. 触媒を濾去, 減圧濃縮し, 残渣を 60% EtOH より再結晶し, 無色針状晶 6.9 g (96.1%) を得る. mp 265—266°, $[\alpha]_D^{25} + 5.9^\circ$ ($c=1.7$, H₂O). Lit.²²⁾ mp 266°, $[\alpha]_D^{25} + 6.5^\circ$ ($c=1.7$, H₂O).

Formylleucylleucine (XXI) XX 0.3 g を 99% HCO₂H 1 ml にとかし, 5° で HCO₂H 1 ml と Ac₂O 1 ml との混液を滴下し, 10° に 2 hr 反応させ, 反応液を氷水に加え, 減圧濃縮し, 析出結晶を濾取, 水より再結晶し, 0.2 g (60%) を得る. mp 159—160°, $[\alpha]_D^{25} - 65.3^\circ$ ($c=1.0$, EtOH).

Formylleucyl-D-leucine Methyl Ester (XXII), Formyl-D-leucylleucine Methyl Ester (XXIII), Formyl-D-leucyl-D-leucine Methyl Ester (XXIV) Formylleucine (L 系あるいは D 系²³⁾) 9.0 g, leucine methyl ester (L 系²⁴⁾ あるいは D 系²⁵⁾) 9.2 g を DMF にとかし, dicyclohexylcarbodiimide 11.7 g を加え, 1 夜室温に反応す.

Urea を濾去, 濾液を氷水に注加, 油状物を AcOEt 抽出, 5% NaHCO₃, 5% クエン酸および水で各 3 回ずつ洗滌し, 芒硝乾燥. 減圧濃縮し, 無色油状物を得る. これらのものは, いずれも結晶しなかった. XXII 15.7 g (86.5%), XXIII 16.0 g (88.2%), XXIV 15.0 g (82.7%).

Formylleucyl-D-leucine (XXV), Formyl-D-leucylleucine (XXVI), Formyl-D-leucyl-D-leucine (XXVII)

XXII, XXIII および XXIV 各々 9.0 g をアセトン 50 ml にとかし, 1N NaOH 32.5 ml を滴下し, 室温に 1 hr 反応し, 反応中に析出する不溶物を濾去し, 濾液を 1N クエン酸で中和し, 析出する結晶を濾取し, 80% EtOH より再結晶し, XXV 4.2 g (48.8%), mp 197—198° (decomp.), $[\alpha]_D^{25} - 39.5^\circ$ ($c=1.0$, EtOH); XXVI 3.6 g (41.8%), mp 197—198° (decomp.), $[\alpha]_D^{25} + 40.7^\circ$ ($c=1.0$, EtOH); XXVII 2.0 g (23.3%), mp 159—160°, $[\alpha]_D^{25} + 66.2^\circ$ ($c=1.0$, EtOH) を得る.

Benzyloxycarbonylleucylleucine Hydrazide (XXVIII)²⁶⁾ IX 11.7 g を EtOH 20 ml にとかし, 100% NH₂NH₂·H₂O 15 ml を加え, 室温に 5 hr 反応させ, 反応液に水 200 ml を加え, 氷室に放置後, 析出結晶を濾取, EtOH-H₂O より再結晶し, 無色針状晶 10.8 g (92.2%) を得る. mp 152—153°, $[\alpha]_D^{25} - 56.0^\circ$ ($c=1.0$, MeOH). Lit.²⁶⁾ mp 152—154°, $[\alpha]_D^{25} - 47.1^\circ$ ($c=1.19$, EtOH).

Benzyloxycarbonylleucylleucylvaline Methyl Ester (XXIX) XXVIII 15.3 g を THF 50 ml, CHCl₃ 50 ml にとかし, -10° に冷却下, conc. HCl 39 ml を加え, 攪拌下, NaNO₂ 3.0 g の水 10 ml 溶液を滴下し, 15 min の後, NaHCO₃ 45 g で中和し, さらに valine methyl ester·hydrochloride 7.2 g と Et₃N 4.5 g の CHCl₃ 30 ml 懸濁液を滴下し, -10° に 2 hr, さらに室温に 1 夜反応す. 不溶物を濾去し, 濾液を 5% HCl, 水, dil. NaHCO₃ solution および水で洗滌, 乾燥後, 減圧濃縮し, 残渣をエーテル-石油エーテルより再結晶し, 無色針状晶 13.6 g (70.6%) を得る. mp 123—124°, $[\alpha]_D^{15.5} - 54.0^\circ$ ($c=1.0$, MeOH). Anal. Calcd. C₂₆H₄₁O₆N₃: C, 63.52; H, 8.41; N, 8.55. Found: C, 63.58; H, 8.17; N, 8.45.

XXIX 0.98 g を MeOH 10 ml にとかし, 1N NaOH 2 ml を加え, 室温に 1 夜放置し, 反応液を減圧濃縮し, 残渣を水にとかし, 炭末処理後, 濾液を凍結乾燥し, benzyloxycarbonylleucylleucylvaline (XXX) の Na 塩を得る. 本品を生物試験に供した.

Leucylleucylvaline Methyl Ester·Hydrochloride (XXXI)²⁶⁾ XXIX 13.0 g を MeOH 70 ml にとかし, 1N HCl 32 ml, 10% Pd-C 2 g を加え, 常圧接触還元す. 触媒濾去, 濾液を減圧濃縮, 残渣を MeOH-エーテルより再結晶し, 無色針状晶 8.8 g (84.6%) を得る. mp 238° (decomp.), $[\alpha]_D^{15.5} - 25.0^\circ$ ($c=1.0$, EtOH). Lit.²⁶⁾ mp 218—220°, $[\alpha]_D^{25} - 71^\circ$ ($c=0.99$, MeOH).

Leucylleucylvaline (XXXII) XXIX 10 g に AcOH 5 ml を加え, 32% HBr/AcOH 50 g を加え, 2 hr 反応後, 濃縮, 残渣にエーテルを加え, 析出結晶を MeOH-iso-Pr₂O より再結晶し, leucylleucylvaline methyl ester·hydrobromide 8.5 g を得る. この内, 7.6 g を MeOH 30 ml にとかし, 1N NaOH ($f=1.11$) 39 ml を滴下し, 室温に 3.5 hr 反応させ, 1N HCl ($f=1.21$) 19.9 ml を加えて析出する結晶を 70% EtOH で再結晶し, 無色針状晶 6.4 g (XXIX より, 91.2%) を得る. mp 195°, $[\alpha]_D^{25} - 19.4^\circ$ ($c=1.0$, 1N HCl). Anal. Calcd. C₁₇H₃₃O₄N₃·3/2 H₂O: C, 55.18; H, 9.81; N, 11.36. Found: C, 55.12; H, 9.48; N, 11.58.

p-Toluenesulfonylleucylleucylvaline (XXXIII) XXXII 1.0 g を水 10 ml, THF 5 ml および Et₃N 1.0 g にとかし, 攪拌下, 10° で *p*-toluenesulfonylchloride 0.85 g を少量ずつ加え, 2 hr 反応後, 低温で減圧濃縮し,

22) M.A. Nyman, R.M. Herbst, *J. Org. Chem.*, **15**, 108 (1950).

23) E. Fischer, O. Warburg, *Chem. Ber.*, **38**, 3997 (1905).

24) M. Brenner, W. Huber, *Helv. Chim. Acta*, **36**, 1109 (1953).

25) C.S. Simth, A.E. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 2605 (1941).

26) L.T.Jr. Skeggs, K.E. Lentz, J.R. Kahn, H. Hochstrasser, *J. Exp. Med.*, **128**, 13 (1968).

残渣に水を加え、エーテルで水層を洗い、水層を 5% HCl で酸性にし、析出する結晶を濾取し、MeOH-H₂O より再結晶し、0.7 g (48.0%) を得る。mp 205°, $[\alpha]_D^{20} - 108.6^\circ$ ($c=1.0$, MeOH).

Formylleucylleucylvaline (XXXIV) XXXII 1.0 g を HCO₂H 12 ml にとかし、10° 以下で Ac₂O 4.2 ml を滴下し、2 hr 反応し、反応液を氷水に注入し、減圧濃縮し、残渣をよく乾燥後、EtOH-エーテルより再結晶し、0.4 g (37.0%) を得る。mp 174°, $[\alpha]_D^{25} - 41.6^\circ$ ($c=1.4$, MeOH).

Ethoxycarbonylleucylleucylvaline (XXXV) XXXII 2.0 g を 1N NaOH 6 ml にとかし、激しく攪拌下、ethyl chlorocarbonate 0.63 g と 1N NaOH 6 ml を同時に滴下し、2 hr 反応後、反応液を CHCl₃ で洗滌し、10% HCl で酸性にして析出する結晶を濾取、AcOEt-*n*-hexane より再結晶し、2.0 g (83.0%) を得る。mp 162—164°, $[\alpha]_D^{20} - 58.7^\circ$ ($c=1.0$, MeOH).

Benzylloxycarbonylleucylleucylglycine-Dicyclohexylamine Salt (XXXVI)²⁷⁾ XXVIII 3.9 g を THF 30 ml, CHCl₃ 30 ml にとかし、conc. HCl 10 ml を加え、XXIX の合成法に準じ、NaNO₂ 0.8 g の水溶液を滴下、NaHCO₃ で中和後、glycine ethyl ester·hydrochloride 1.4 g, Et₃N 1.1 g の CHCl₃ 懸濁液を滴下、反応、常法後処理し、benzylloxycarbonylleucylleucylglycine ethyl ester 3.72 g (80%) を得る。mp 120—122°. このエステル 1.4 g を MeOH 20 ml にとかし、1N NaOH ($f=1.11$) 3.25 ml を加えて、室温に 2 hr 反応し、Amberlite IRA-400 (OH 型) で精製、凍結乾燥し、0.84 g の Na 塩を得る。一部を dicyclohexylamine salt とし、mp 168—169°, $[\alpha]_D^{20} - 77.7^\circ$ ($c=1.0$, MeOH) を得る。Lit.²⁷⁾ mp 180—181°, $[\alpha]_D^{25} - 38.0^\circ \pm 0.8^\circ$ ($c=1.3$, 40% aqueous EtOH).

Benzylloxycarbonylleucylleucylleucine-Dicyclohexylamine Salt (XXXVII) XXXVI の合成法に準じ、XXVIII 3.6 g と leucine methyl ester·hydrochloride 1.82 g より、benzylloxycarbonylleucylleucylleucine methyl ester 4.34 g (85%) を得る。このエステルを常法通り、MeOH にとかし、1N NaOH でケン化して、収率 36% にて Na 塩を得る。一部を dicyclohexyl amine salt とし、mp 102°, $[\alpha]_D^{20} - 95.8^\circ$ ($c=1.0$, MeOH) を得る。

Benzylloxycarbonylleucylleucylphenylalanine Dicyclohexylamine Salt (XXXVIII) XXXVI の合成法に準じ、XXVIII 3.9 g と phenylalanine methyl ester·hydrochloride 2.14 g とを azide 法で縮合し、benzylloxycarbonylleucylleucylphenylalanine methyl ester 3.02 g (56%), mp 150—151° を得る。このエステルを常法通り、MeOH にとかし、1N NaOH でケン化し、収率 40% にて Na 塩を得る。一部を dicyclohexylamine salt とし、mp 167—168°, $[\alpha]_D^{20} - 17.7^\circ$ ($c=1.0$, MeOH) を得る。

Benzylloxycarbonylleucylleucyl- ϵ -benzylloxycarbonyllysine Dicyclohexylamine Salt (XXXIX) XXXVI の合成法に準じ、XXVIII 3.9 g と ϵ -benzylloxycarbonyllysine methyl ester·hydrochloride 3.3 g とを azide 法で縮合し、benzylloxycarbonylleucylleucyl- ϵ -benzylloxycarbonyllysine methyl ester 5.32 g (81.4%), mp 106° を得る。このエステルを常法通り、MeOH にとかし、1N NaOH でケン化し、収率 42% にて Na 塩を得る。一部を dicyclohexylamine salt とし、mp 144—145°, $[\alpha]_D^{20} - 45.9^\circ$ ($c=1.0$, MeOH) を得る。

Benzylloxycarbonylleucylleucylvaline Hydrazide (XL) XXIX 48 g を EtOH 250 ml にとかし、98% NH₂NH₂·H₂O 96 g を加え、XXVIII の合成法に準じて反応させ、EtOH より再結晶し、37 g (77.0%) を得る。mp 220°, $[\alpha]_D^{20} - 30.2^\circ$ ($c=1.0$, DMF).

Benzylloxycarbonylleucylleucylvalylglycine Methyl Ester (XLI) XL 15 g を THF 75 ml, CHCl₃ 75 ml に懸濁し、conc. HCl 24 ml を加え、-10° で NaNO₂ 2.2 g を水 10 ml に溶した液を滴下し、20 min 後、反応液を分液、水層を CHCl₃ で 2 回抽出、合した CHCl₃ を 5% NaHCO₃, 水で洗滌、芒硝乾燥し、濾液に glycine methyl ester·hydrochloride 3.7 g と Et₃N 3.0 g を加え、0° で 2 日間反応す。ゲル状の反応液に、CHCl₃ を加えてとかし、5% HCl, 5% NaHCO₃, 水で洗滌し、芒硝乾燥後、濾液を減圧濃縮して得た残渣を MeOH より再結晶し、14 g (85.0%) を得る。mp 178—180°, $[\alpha]_D^{20} - 30.2^\circ$ ($c=1.0$, DMF). Anal. Calcd. C₂₈H₄₄O₇N₄: C, 61.29; H, 8.08; N, 10.21. Found: C, 61.49; H, 7.85; N, 10.62.

XLI 2.74 g を MeOH にとかし、1N NaOH ($f=1.10$) 4.55 ml を加え、常法通りケン化し、benzylloxycarbonylleucylleucylvalylglycine (XLII) の Na 塩 1.39 g を得る。本品を生物試験に供した。

Leucylleucylvalylglycine Methyl Ester-Hydrobromide (XLIII) XLI 2.2 g の AcOH 10 ml 溶液に、32% HBr/AcOH 10 g を加え、室温に 1 hr 反応後、エーテルを加えて析出する結晶をエーテルで洗滌後、MeOH-エーテルより再結晶し、無色針状晶 1.8 g (80%) を得る。mp 225—227°, $[\alpha]_D^{20} - 76.9^\circ$ ($c=1.0$, MeOH).

Valyltyrosine Methyl Ester-Hydrobromide (XLIV)²⁸⁾ Benzylloxycarbonylvalyltyrosine methyl ester 21.4 g の MeOH 300 ml 溶液に、40% HBr 14 ml, 水 30 ml および Pd-black 1 g を加え、常圧接触還元す。触媒を濾去し、濾液を減圧濃縮し、残渣をアセトンで洗い、MeOH-エーテルより再結晶し、無色針状晶 14.6 g (78.1%) を得る。mp 205—206°, $[\alpha]_D^{25} + 30.8^\circ$ ($c=1.0$, MeOH). Lit.²⁸⁾ mp 208—209° (decomp.), $[\alpha]_D^{25} + 31 \pm 4^\circ$ ($c=1.08$, MeOH).

Benzylloxycarbonylleucylleucylvalyltyrosine Methyl Ester (XLV) XXIX の合成に準じ、XXVIII 5.2 g, NaNO₂ 1.02 g より azide となし、NaHCO₃ で中和、XLIV 5.0 g, Et₃N 1.4 g を加えて反応す。不溶物を濾去、濾液を減圧濃縮して、析出する結晶を濾取、水洗、乾燥後、MeOH より再結晶して、無色針状晶 7.3 g (84.0%)

27) P.M. Hardy, G.W. Kenner, R.C. Sheppard, *Tetrahedron*, **19**, 95 (1963).

28) W. Rittel, B. Iselin, H. Kappeler, B. Riniker, R. Schwyzler, *Helv. Chim. Acta*, **40**, 614 (1957).

を得る. mp 213°, $[\alpha]_D^{25.5} - 55.0^\circ$ ($c=1.0$, MeOH). *Anal.* Calcd. $C_{35}H_{50}O_8N_4$: C, 64.20; H, 7.70; N, 8.56. Found: C, 63.79; H, 7.40; N, 8.46.

XLV を MeOH にとかし, 当量の 1N NaOH を加え, 室温に 5 hr 放置した後, 減圧濃縮し, 残渣を水にとかし, 炭末処理後, 母液を凍結乾燥し, benzyloxycarbonylleucylleucylvalyltyrosine (XLVI) の Na 塩を得る. 本品を生物試験に供した.

Leucylleucylvalyltyrosine Methyl Ester Hydrochloride (XLVII) XLV 2.0 g を AcOH 10 ml, dioxane 10 ml にとかし, conc. HCl 0.5 ml, 水 1.5 ml および 10% Pd-C 0.5 g を加え, 常圧接触還元す. 触媒母液を, 減圧濃縮し, 残渣を MeOH-エーテルより再結晶し, 無色針状晶 1.6 g (93.8%) を得る. mp 244—246°, $[\alpha]_D^{25.5} - 26.2^\circ$ ($c=1.0$, MeOH).

Benzyloxycarbonylleucylleucylvalylphenylalanine Methyl Ester (XLVIII) XXIX の合成法に準じ, XXVIII 2.75 g, $NaNO_2$ 0.54 g より azide を合成し, $NaHCO_3$ で中和後, valylphenylalanine methyl ester hydrochloride²⁹⁾ 2.21 g, Et_3N 0.71 g を加えて反応し, XLV に準じて後処理後, AcOEt より再結晶し, 無色針状晶 2.65 g (59.3%) を得る. mp 209.5—210°, $[\alpha]_D^{20} - 25.4^\circ$ ($c=1.0$, DMF). *Anal.* Calcd. $C_{35}H_{50}O_7N_4$: C, 65.80; H, 7.89; N, 8.77. Found: C, 66.01; H, 7.49; N, 8.88.

XLVI の合成の場合と同様に, XLVIII の MeOH 溶液を当量の 1N NaOH でケン化し, 凍結乾燥して, benzyloxycarbonylleucylleucylvalylphenylalanine (XLIX) の Na 塩を得る. 本品を生物試験に供した.

Leucylleucylvalylphenylalanine Methyl Ester Hydrochloride (L) XLVIII 1.0 g を XLVII の合成と同様に反応させて, MeOH-エーテルより再結晶し, 無色針状晶 0.71 g (84.0%) を得る. mp 250° (decomp.), $[\alpha]_D^{20} - 69.8^\circ$ ($c=1.0$, MeOH).

Benzyloxycarbonylhistidylleucylleucylvaline Methyl Ester (LI) Benzyloxycarbonylhistidine hydrazide 3.03 g, $NaNO_2$ 0.76 g および XXXI 3.94 g, Et_3N 1.1 g より, IV の合成法に準じ反応させ, AcOEt-MeOH より再結晶し, 無色の粉末 4.6 g (63.5%) を得る. mp 198—199°, $[\alpha]_D^{25.5} - 54.7^\circ$ ($c=1.0$, MeOH). *Anal.* Calcd. $C_{32}H_{48}O_7N_6$: C, 61.12; H, 7.70; N, 13.37. Found: C, 60.79; H, 7.49; N, 13.13.

LI の MeOH 溶液に, 当量の 1N NaOH を加えてケン化し, 炭末処理後, 母液を凍結乾燥し, benzyloxycarbonylhistidylleucylleucylvaline (LII) の Na 塩を得る. 本品を生物試験に供した.

Histidylleucylleucylvaline Methyl Ester Dihydrochloride (LIII) LI 3.0 g の MeOH 20 ml 溶液に, 1N HCl 11.4 ml, 10% Pd-C 1.0 g を加え, 常圧接触還元す. 触媒母液を, 母液を減圧濃縮し, 残渣を MeOH-アセトン-エーテルより再結晶し, 無色粉末 2.05 g (62.4%) を得る. mp 223° (decomp.), $[\alpha]_D^{25} - 49.6^\circ$ ($c=1.0$, MeOH).

Benzyloxycarbonylprolylphenylalanylhistidylleucylleucylvaline Methyl Ester (LIV) LIII 0.2 g を $CHCl_3$ 15 ml に懸濁し, 冷時, Et_3N 0.08 g を加え, 次に XVI 0.18 g の $CHCl_3$ 15 ml 溶液を加え, 室温に 2 日間反応す. 反応液を 3% NH_4OH , 水で洗滌, 芒硝乾燥, 減圧濃縮後, 残渣を AcOEt-エーテルより再結晶し, 0.2 g (66.0%) を得る. mp 162—163°. さらに, silica gel column chromatography (solvent: BuOH: AcOH: $H_2O=4:1:1$, v/v) で精製し, 溶出液を減圧濃縮し, 残渣を MeOH-エーテルより再結晶し, 無色粉末 0.08 g を得る. mp 169—170°, $[\alpha]_D^{20} - 67.8^\circ$ ($c=1.0$, MeOH). *Anal.* Calcd. $C_{46}H_{64}O_9N_8$: C, 63.28; H, 7.39; N, 12.84. Found: C, 63.06; H, 7.30; N, 12.72.

LIV を MeOH にとかし, 当量の 1N NaOH を加え, 室温に 1 夜放置し, 減圧濃縮し, 残渣を水にとかして, 炭末処理後, 母液を凍結乾燥し, benzyloxycarbonylprolylphenylalanylhistidylleucylleucylvaline (LV) の Na 塩を得る. 本品を生物試験に供した.

Prolylphenylalanylhistidylleucylleucylvaline (LVI) LIV 1.0 g を MeOH 20 ml にとかし, 1N HCl 3 ml および 10% Pd-C 0.5 g を加え, 常圧接触還元し, 触媒母液を, 減圧濃縮し, 残渣を MeOH 20 ml にとかし, 1N NaOH 3.5 ml を加え, 室温に 24 hr 放置後, 1N HCl で酸性にし, AcONa で中和し, 氷室に放置後, 析出する結晶を母液より取り出し, さらに, 少量の 1N HCl にとかし, AcONa を次に MeOH を加えて, 析出する結晶を母液より取り出し, 0.56 g (59.0%) を得る. mp 240—241° (decomp.), $[\alpha]_D^{25.5} - 63.0^\circ$ ($c=1.0$, 1N HCl).

Benzyloxycarbonylhistidylleucylleucylvalyltyrosine Methyl Ester (LVII) Benzyloxycarbonylhistidine hydrazide 1.65 g, $NaNO_2$ 0.41 g および XLVII 3.0 g, Et_3N 1.09 g より, XII の合成法に準じて反応し, 不溶物を母液より取り出し, 母液を水洗, 芒硝乾燥後, 減圧濃縮し, 残渣を MeOH- H_2O より再結晶し, 2.02 g (47.5%) を得る. mp 233° (decomp.), $[\alpha]_D^{25.5} - 24.0^\circ$ ($c=0.5$, MeOH).

LVII の MeOH 溶液に, 当量の 1N NaOH を加え, 室温に 1 夜放置後, 減圧濃縮し, 残渣を水にとかし, 炭末処理した母液を凍結乾燥し, benzyloxycarbonylhistidylleucylleucylvalyltyrosine (VLIII) の Na 塩を得る. 本品を生物試験に供した.

Benzyloxycarbonylphenylalanylhistidylleucylleucylvalyltyrosine Methyl Ester (LIX) LVII 1.2 g の MeOH 30 ml 溶液に, 1N HCl 3.7 ml および 10% Pd-C 0.4 g を加え, 常圧接触還元す. 触媒母液を, 母液を減圧濃縮し, 残渣を母液より取り出し, エーテル洗滌後, histidylleucylleucylvalyltyrosine methyl ester dihydrochloride 1.02 g (92.0%)

29) L. Zervas, D. Borovas, E. Gazis, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3660 (1963).

を得る。

この内、0.92 g を DMF 30 ml にとかし、Et₃N 0.19 g、次に、benzyloxycarbonylphenylalanine *p*-nitrophenyl ester 0.58 g を加え、室温に 3 日間反応す。反応液を氷水に注入し、析出物を集め、MeOH-AcOEt より再結晶し、無色の粉末 0.9 g (75.8%) を得る。mp 228—229°, $[\alpha]_D^{20} -45.4^\circ$ ($c=1.0$, MeOH). *Anal.* Calcd. C₅₀H₆₆O₁₀N₈: C, 63.95; H, 7.08; N, 11.93. Found: C, 64.33; H, 6.82; N, 11.79.

LIX の MeOH 溶液に当量の 1N NaOH を加え、室温に 1 日放置後、減圧濃縮し、残渣を水にとかし、炭末処理後、汙液を凍結乾燥し、benzyloxycarbonylphenylalanylhistidylleucylleucylvalyltyrosine (LX) の Na 塩を得る。本品を生物試験に供した。

Phenylalanylhistidylleucylleucylvalyltyrosine (LXI) LIX 0.61 g を MeOH 20 ml にとかし、1N HCl 1.6 ml および 10% Pd-C 0.1 g を加え、常圧接触還元す。触媒汙去、減圧濃縮し、残渣にアセトンを加えて析出する結晶を汙取し、phenylalanylhistidylleucylleucylvalyltyrosine methyl ester dihydrochloride 0.4 g を得る。mp 235—237° (decomp.). このエステルを MeOH 10 ml にとかし、1N NaOH 2.4 ml を加え、室温に 1 夜放置す。反応液を減圧濃縮し、残渣を水にとかし、1N HCl で pH 6.5 に調整して析出する結晶を集め、さらに 1N HCl にとかし、1N NaOH で pH 6.5 に調整して析出する結晶を集め、0.29 g (53.4%) を得る。mp 263° (decomp.), $[\alpha]_D^{25} -32.2^\circ$ ($c=1.21$, 0.5N HCl/MeOH).

謝辞 本研究に際し、生物試験をしてくださった大阪大学医学部 山村雄一教授、国府達郎講師に厚くお礼申し上げます。種々御鞭撻賜わった杉本典夫博士、岩尾順一博士、当山崎道雄所長に深謝します。また、元素分析を担当された分析室の諸氏に感謝します。