

WALTER SIEDEL, KARL STURM und ROLF GEIGER

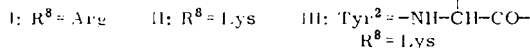
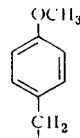
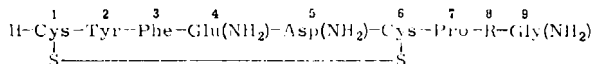
**Synthese eines vasopressorisch wirkenden Peptids:
[O-Methyl-tyrosin]²-Lysin⁸-Vasopressin (OMTLV)¹⁾**

Aus der Farbwerke Hoechst AG, vormals Meister Lucius & Brüning,
Frankfurt (M)-Höchst

(Eingegangen am 20. Dezember 1962)

Die Synthese des [O-Methyl-tyrosin]²-Lysin⁸-Vasopressins (OMTLV) (III) nach dem Schema 3 + 6 sowie die Reinigung des Peptidhormon-Analogons an Carboxymethylcellulose wird beschrieben. Das reine Peptid besitzt etwa ein Drittel der Pressoraktivität von Lysin-Vasopressin und — wie erwünscht und erwartet — keine Oxytocin-Aktivität, hemmt sogar die Oxytocinwirkung kompetitiv.

Seit der Strukturaufklärung der beiden blutdruckwirksamen Peptidhormone des Hypophysenhinterlappens, des Arginin-Vasopressins (I) und des Lysin-Vasopressins (II) durch V. DU VIGNEAUD und Mitarbb.²⁾, war es das Ziel verschiedener Arbeitskreise, vor allem um V. DU VIGNEAUD, R. A. BOISSONNAS und H. C. BEYERMAN, analog aufgebaute Peptide zu synthetisieren, die eine ähnliche physiologische Aktivität aufweisen wie die natürlichen Pressorhormone.



Bei der im folgenden beschriebenen Synthese des [O-Methyl-tyrosin]²-Lysin⁸-Vasopressins (III) gingen wir von dem Problem aus, ein Lysin-Vasopressin-Analoges aufzufinden, das nur reine Pressorwirkung aufweist, und keinerlei oxytocische Wirkung mehr besitzt. Das im Handel befindliche Vasopressin wie auch das synthetische Lysin⁸-Vasopressin zeigen am Rattenuterus, besonders aber am Meerschweinchenuterus eine meßbare Oxytocinwirkung.

Ein Lysin-Vasopressin-Analogon wählten wir, da ein solches allgemein leichter zu synthetisieren ist als ein Arginin-Vasopressin-Analoges, bei dem der Einbau des Arginins in den Peptidverband besondere Schwierigkeiten bereitet^{3,4)}, eine Tatsache,

¹⁾ Zum Dtsch. Bundes-Pat. angemeldet am 2. 6. 1960. — Vgl. auch l. c.¹⁴⁾.

²⁾ V. DU VIGNEAUD, H. C. LAWLER und E. A. POPENOE, J. Amer. chem. Soc. **75**, 4880 [1953].

³⁾ V. DU VIGNEAUD, D. T. GISH, P. G. KATSOYANNIS und G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. **80**, 3355 [1958].

⁴⁾ M. F. BARTLETT, A. JÖHL, R. ROESKE, R. J. STEDMAN, F. H. C. STEWART, D. N. WARD und V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. **78**, 2905 [1956].

die auch in der Zahl der bisher synthetisierten Analoga dieser Hormone zum Ausdruck kommt. Einem synthetischen Arginin-Vasopressin-Analagon⁵⁾ standen etwa achtzehn Lysin-Vasopressin-Analoga gegenüber⁶⁻⁸⁾, von denen (als wir unsere Untersuchungen begannen) nur eines, und zwar das Ileu³-Lys⁸-Vasopressin⁹⁾ eine dem Vasopressin vergleichbare biologische Aktivität zeigte. Aber auch diese Vasopressin-Variante besitzt neben der Pressoraktivität noch eine verhältnismäßig hohe Oxytocinaktivität.

Der Vergleich der Konstitutionsformeln des Oxytocins und des Vasopressins führte uns zu der Annahme, daß die Hydroxylgruppe des Tyrosins, die als funktionelle Gruppe in beiden Peptidhormonen an der gleichen Stelle steht, allgemein für die oxytocische Wirkung beider Hormone mitverantwortlich sein könnte und daß dementsprechend die Ausschaltung dieser Hydroxylgruppe im Vasopressin auch die oxytocische Wirkung beseitigen würde.

So wurde auf Grund dieser Überlegung die Synthese eines Lysin-Vasopressins durchgeführt, bei dem die Hydroxylgruppe des Tyrosin-Bausteins mit der Methylgruppe veräthert ist, also die Synthese eines [*O*-Methyl-tyrosin]²-Lysin⁸-Vasopressins (kurz bezeichnet als OMTLV).

Die Synthese des [*O*-Methyl-tyrosin]²-Lysin⁸-Vasopressins (III) erfolgte in Anlehnung an das von R. A. BOISSONNAS und R. L. HUGUENIN⁹⁾ ausgearbeitete Schema, wobei jedoch an die Stelle von Tyrosin das *O*-Methyl-tyrosin gesetzt wurde. Letzteres wurde in Anlehnung an Vorschriften von P. KARRER und Mitarbb.¹⁰⁾ und V. DU VIGNEAUD und C. E. MEYER¹¹⁾ über das Acetyl-L-tyrosin durch Methylieren mit Dimethylsulfat und saure Abspaltung der Acetylgruppe erhalten. Die Herstellung des *O*-Methyl-tyrosin-methylesters wurde nach M. BRENNER und W. HUBER¹²⁾ vorgenommen.

Das Dipeptid *N*-Carbobenzoxy-*S*-benzyl-cysteinyl-*O*-methyl-tyrosin-methylester wurde nach Verseifung der Estergruppe mit *L*-Phenylalanin-methylester mittels Dicyclohexylcarbodiimid zum Tripeptid *N*-Carbobenzoxy-*S*-benzyl-cysteinyl-*O*-methyl-tyrosyl-phenylalanin-methylester umgesetzt. Dieses Tripeptid wurde schließlich in Form seines Azids (aus dem Hydrazid hergestellt) mit dem Hexapeptid Glutaminyl-asparaginyll-*S*-benzyl-cysteinyl-prolyl-*N*-tosyl-lysyl-glycinamid⁹⁾ zum Nonapeptid *N*-Carbobenzoxy-*S*-benzyl-cysteinyl-*O*-methyl-tyrosyl-phenylalanyl-glutaminyl-asparaginyll-*S*-benzyl-cysteinyl-prolyl-*N*-tosyl-lysyl-glycinamid kondensiert. Aus diesem Nonapeptid wurden in der üblichen Weise mittels Natriums in flüssigem Ammoniak die Schutzgruppen abgespalten. Schließlich wurde durch Dehydrierung der beiden Sulfhydrylgruppen des Nonapeptids mittels Luft unter Bildung der Disulfidbrücke das [*O*-Methyl-tyrosin]²-Lysin⁸-Vasopressin (= OMTLV) (III) hergestellt.

⁵⁾ P. G. KATSOYANNIS und V. DU VIGNEAUD, *J. biol. Chemistry* **233**, 1352 [1958].

⁶⁾ Vgl. tabellarische Zusammenstellung von R. A. BOISSONNAS, *Experienta* [Basel] **17**, 377 [1961].

⁷⁾ J. MEIENHOFER und V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 142 [1961].

⁸⁾ H. C. BEYERMAN und J. S. BONTEKOE, *Recueil Trav. chim. Pays-Bas* **79**, 1050 [1960].

⁹⁾ R. A. BOISSONNAS und R. L. HUGUENIN, *Helv. chim. Acta* **43**, 182 [1961].

¹⁰⁾ P. KARRER, M. GISLER, E. HORLACHER, F. LOCHER, W. MÄDER und H. THOMANN, *Helv. chim. Acta* **5**, 482 [1922].

¹¹⁾ *J. biol. Chemistry* **98**, 305 [1932].

¹²⁾ *Helv. chim. Acta* **36**, 1109 [1953].

Die Pressoraktivität des Rohproduktes betrug 18 IE/mg. Durch Säulenchromatographie an Amberlite IRC 50 wurde sie auf 55 IE/mg und weiter durch Adsorption an Carboxymethylcellulose und Gradientenelution mit Ammoniumacetatpuffer auf 76 IE/mg erhöht. Das [O-Methyl-tyrosin]²-Lysin⁸-Vasopressin wurde aus dem Eluat durch wiederholtes Lyophilisieren als Acetat isoliert. Die Analysendaten entsprechen der Zusammensetzung $C_{47}H_{67}N_{13}O_{12}S_2 \cdot 2 CH_3CO_2H \cdot 3 H_2O$.

Die pharmakologische Untersuchung des OMTLV ist von den Herren G. VOGEL und J. HERGOTT¹³⁾ durchgeführt worden. Wie erwartet besitzt das OMTLV zum Unterschied vom natürlichen Lysin-Vasopressin nur noch eine ganz geringe Oxytocinwirkung. Es hemmt sogar im Gegenteil die Oxytocinwirkung am überlebenden Rattenuterus und am Hühnerblutdruck, wahrscheinlich in kompetitivem Sinne.

Weiter zeigt das OMTLV beim Vergleich mit Arginin-Vasopressin am Blutdruck des decapitierten Kaninchens eine Pressoraktivität von 76 IE/mg und damit eine wesentlich geringere pressorische Wirkung als das Stammhormon. Dagegen übertrifft es dieses in der antidiuretischen Wirkung, wie in Versuchen an der Ratte gezeigt werden konnte.

Ähnliche pharmakologische Befunde sind auch von dem Arbeitskreis von F. ŠORM, J. RUDINGER und M. ZAORAL¹⁴⁾ erhoben worden, von dem in der Zwischenzeit ebenfalls das O-Methyl-Analoge des Lysin-Vasopressins synthetisiert worden ist.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

*O-Methyl-tyrosin*¹⁵⁾: 150 g *L-Tyrosin* werden in 425 ccm 2*n* NaOH und 250 ccm Wasser gelöst. Unter Eiskühlung und starkem Rühren läßt man gleichzeitig 2 l 2*n* NaOH und 200 ccm *Acetanhydrid* zulaufen, rührt noch 1 Stde. bei Raumtemperatur und versetzt mit 840 ccm 6*n* H₂SO₄. Nach Stehenlassen im Kühlschrank und eventuellem Filtrieren wird die Reaktionslösung i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wird mehrmals mit 80-proz. Aceton extrahiert, das anschließend i. Vak. verdampft wird. Der ölige Rückstand wird in 400 ccm 30-proz. Natronlauge gelöst und unter intensivem Rühren langsam mit 190 g *Dimethylsulfat* versetzt. Nach weiterem 1/2stdg. Rühren bei 60° wird abgekühlt und mit verd. Schwefelsäure angesäuert. Das auskristallisierte *N-Acetyl-O-methyl-tyrosin* wird nochmals aus 350 ccm Wasser umkristallisiert. Ausb. 132 g (67% d. Th.). Schmp. 146–147°.

Diese 132 g Acetylverbindung werden mit 2.6 l 4*n* HCl 2 1/2 Stdn. zum Sieden erhitzt. Hierauf wird i. Vak. bis zur Bildung eines Kristallbreies eingeeengt. Nach Zusatz von einem etwa gleichen Volumen konz. Salzsäure wird auf 0° abgekühlt und das schwerlösliche *O-Methyl-tyrosin-hydrochlorid* abgesaugt. Die Kristallmasse wird in wenig heißem Wasser gelöst und die Lösung mit verd. Ammoniak auf pH 6 eingestellt. Die hierbei ausfallende Aminosäure wird abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Ausb. 89.0 g (82% d. Th.). Schmp. nach Umkristallisieren aus Wasser 243–244°.

¹³⁾ Arzneimittel-Forsch. (im Druck).

¹⁴⁾ F. ŠORM, *Pharmazie* 17, 268 [1962]; Z. BERÁNKOVÁ, K. JOŠT, I. RYCHLIK, J. RUDINGER und F. ŠORM, *Collect. czechoslov. chem. Commun.* 26, 2673 [1961]; M. ZAORAL, J. RUDINGER und F. ŠORM (im Druck; Privatmitteilung); — vgl. auch l.c.¹⁾

¹⁵⁾ Alle in dieser Veröffentlichung genannten Aminosäuren gehören der L-Reihe an.

O-Methyl-tyrosin-methylester: Die Veresterung des *O*-Methyl-tyrosins wird nach der Methode von M. BRENNER und W. HUBER¹²⁾ vorgenommen, die Überführung des dabei erhaltenen *O*-Methyl-tyrosin-methylester-hydrochlorids (Schmp. 179—181°; $[\alpha]_D^{25}$: $82 \pm 2^\circ$ ($c = 1$, Pyridin) in den freien Ester geschieht mit Hilfe von Ammoniak in Chloroform oder auch mittels wäßriger Alkalilösung und Ausschütteln mit Äther.

N-Carbobenzoxy-*S*-benzyl-cysteinyl-*O*-methyl-tyrosin-methylester: 34.6 g *N*-Carbobenzoxy-*S*-benzyl-cystein (0.1 Mol) und 21.3 g *O*-Methyl-tyrosin-methylester werden in 200 ccm Tetrahydrofuran gelöst. Dann gibt man bei -10° 22 g Dicyclohexylcarbodiimid (0.106 Mol) in 100 ccm Tetrahydrofuran zu, rührt noch 4 Stdn. bei -10° und läßt dann 24 Stdn. bei Raumtemperatur stehen. Nach Zugabe von 2 ccm Eisessig filtriert man 15 Min. später vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, bringt das Filtrat i. Vak. zur Trockene und verteilt den Rückstand zwischen 800 ccm Essigester und 500 ccm Wasser. Die Essigester-Phase wird nacheinander mit je 200 ccm 1 *n* HCl, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Beim Einengen i. Vak. fällt das Reaktionsprodukt kristallisiert aus. Ausb. 40.0 g (75% d. Th.), Schmp. 128—130°.

$C_{29}H_{32}N_2O_6S$ (536.6) Ber. C 64.9 H 6.0 N 5.2 Gef. C 65.1 H 6.3 N 5.0

N-Carbobenzoxy-*S*-benzyl-cysteinyl-*O*-methyl-tyrosin: 26.8 g vorstehender Verbindung werden in einer Mischung von 200 ccm Dioxan und 30 ccm Methanol gelöst. Nach Zugabe von 55.0 ccm 1 *n* NaOH rührt man 2 Stdn. bei Raumtemperatur, gibt dann 46.0 ccm 1 *n* HCl zu und engt die Lösung auf ein kleines Volumen ein. Die ausgefallenen Kristalle werden abgesaugt. Ausb. 23.4 g (89% d. Th.), Schmp. 156—158°.

$C_{28}H_{30}N_2O_6S$ (522.7) Ber. C 64.4 H 5.7 N 5.4 Gef. C 64.7 H 5.9 N 5.2

N-Carbobenzoxy-*S*-benzyl-cysteinyl-*O*-methyl-tyrosyl-phenylalanin-methylester: 26.2 g vorstehender Verbindung und 9.0 g Phenylalanin-methylester werden in einer Mischung von 50 ccm Dimethylformamid und 150 ccm Acetonitril gelöst. Dazu gibt man bei -10° die Lösung von 11.0 g Dicyclohexylcarbodiimid in 50 ccm Acetonitril. Man läßt das Reaktionsgemisch 24 Stdn. bei $+4^\circ$ stehen, gibt dann 2 ccm Eisessig zu und filtriert nach weiteren 15 Min. vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab. Nach Auswaschen desselben mit eiskaltem Dimethylformamid werden die vereinigten Filtrate zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird aus Äthanol umkristallisiert; Ausb. 26.0 g (76% d. Th.), Schmp. 167—168°.

$C_{38}H_{41}N_3O_7S$ (683.9) Ber. C 66.7 H 6.0 N 6.1 Gef. C 67.0 H 6.1 N 6.3

N-Carbobenzoxy-*S*-benzyl-cysteinyl-*O*-methyl-tyrosyl-phenylalanin-hydrazid: Man löst 6.84 g vorstehender Verbindung in 240 ccm heißem Äthanol, gibt 25 ccm 80-proz. Hydrazinhydrat hinzu und kocht 2 Stdn. unter Rückfluß. Beim langsamen Abkühlen und nachfolgenden 12stdg. Stehenlassen fällt das Hydrazid aus. Ausb. 6.0 g (87% d. Th.), Schmp. 219—220°.

$C_{36}H_{41}N_5O_6S$ (683.9) Ber. C 65.1 H 6.0 N 10.2 Gef. C 65.5 H 6.2 N 10.0

$[\alpha]_D^{20}$: -36.31° ($c = 1$, Dimethylformamid).

N-Carbobenzoxy-*S*-benzyl-cysteinyl-*O*-methyl-tyrosyl-phenylalanyl-glutaminy-asparaginy-*S*-benzyl-cysteinyl-prolyl-*N*-tosyl-lysyl-glycinamid (Nonapeptid): 1.37 g vorstehender Verbindung (2 mMol) werden unter gelindem Erwärmen in einer Mischung von 44 ccm Eisessig und 7 ccm 1 *n* HCl gelöst. In die auf $+5^\circ$ abgekühlte Lösung trägt man unter Eiskühlung und Rühren 2.3 ccm 1 *m* NaNO₂ innerhalb 1 Min. in drei Portionen ein, rührt die Mischung noch 5 Min. bei $+3^\circ$ und gießt sie dann in 150 ccm Eiswasser ein. Das amorph ausgeschiedene Azid wird abgesaugt, mit Eiswasser neutral gewaschen und dann lyophilisiert, bis das Gesamtgewicht 3.5—4.0 g beträgt. Das feuchte Azid und 2.22 g Glutaminy-asparaginy-*S*-benzyl-cysteinyl-prolyl-*N*-tosyl-lysyl-glycinamid (vgl. I. c.⁹⁾) (2.5 mMol) werden in 30 ccm Dimethylformamid bei Raumtemperatur unter Rühren in Lösung gebracht. Nach 2tägigem Auf-

bewahren bei Raumtemperatur filtriert man von wenig Ungelöstem ab, engt das hellgelbe Filtrat auf ein Drittel seines Volumens ein und schüttelt das Konzentrat mit 100 ccm Essigester durch. Die farblose Fällung wird abgesaugt, mit Essigester gewaschen und bei 60° getrocknet. Das Rohprodukt kocht man einige Minuten mit 10 ccm Methanol, saugt heiß von Ungelöstem ab, wäscht nacheinander mit 5 ccm Methanol und 50 ccm Essigester und trocknet dann bei 50° und 0.01 Torr über P₂O₅. Man erhält 1.10 g eines fast farblosen Pulvers (36% d. Th., bez. auf das Tripeptidhydrazid) vom Schmp. 211–213°. $R_F = 0.97$ (System A: n-Butanol/Äthylacetat/Pyridin/Wasser (30 : 6 : 20 : 24)). $[\alpha]_D^{20}$: $-39.2 \pm 2^\circ$ ($c = 1$, Dimethylformamid).

C₇₆H₉₃N₁₃O₁₆S₃ (1540.8) Ber. N 11.8 S 6.3 Gef. N 11.8 S 6.4

[*O*-Methyl-tyrosin]²-Lysin⁸-Vasopressin (OMTLV) (III): 1.55 g Nonapeptid (1 mMol) werden in 0.5 l über KOH destilliertem flüss. Ammoniak gelöst. In die Lösung wird bei der Siedetemperatur des Ammoniaks unter Rühren der Lösung ein auf einem Glasstab aufgespielter blanker Natriumwürfel eingetaucht, bis tiefblaue Färbung eintritt und diese Färbung 1 Min. beständig ist. Sofort anschließend gibt man 1.05 g Ammoniumchlorid zu, verdampft das überschüssige Ammoniak bei Raumtemperatur und zieht die letzten Spuren Ammoniak mit der Wasserstrahlpumpe ab. Der Rückstand wird mit 1.0 l 0.4-proz. Essigsäure aufgenommen und die Lösung mit 2*n* Ammoniak auf pH 8.0 eingestellt. Man leitet über eine Glasritze hierauf 3 Stdn. kohlendioxidfreie Luft durch die Lösung, filtriert dann von wenig Ungelöstem ab und stellt das Filtrat mit Eisessig auf pH 4 ein. Durch Lyophilisieren dieser Lösung erhält man 2.90 g eines farblosen, hygroskopischen, salzhaltigen Produktes. Die Pressoraktivität beträgt 18 IE/mg; Gesamtausb. 52200 IE. $R_F = 0.49$ (viel) und 0.73 (wenig) (System A, vgl. oben).

Das gesamte Rohprodukt wird in 20 ccm 0.5*m* wäßrigem Ammoniumacetatpuffer (im folgenden mit AP bezeichnet) gelöst und auf eine 2.8 × 50-cm-Säule von Amberlite IRC 50 (Röhm & Haas), der in die H[⊕]-Form übergeführt und dann mit 0.5 *m* AP äquilibriert wurde, aufgegeben. Man eluiert bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 50 ccm/Stde. mit insgesamt 2.0 l 0.5 *m* AP. Dieses Eluat enthält anorganische Salze und biologisch inaktive Peptide ($R_F = 0.09, 0.36$ und 0.82) (System A, vgl. oben). Das biologisch aktive Material wird anschließend mit 400 ccm einer Mischung von Pyridin/Eisessig/Wasser (30 : 4 : 66) eluiert und aus dieser Lösung durch Lyophilisieren als farbloses, schwach hygroskopisches, leicht wasserlösliches Pulver erhalten.

Die Ausbeute beträgt 656 mg mit einer Pressoraktivität von 55 IE/mg, entsprechend einer Gesamtausbeute von 36100 IE (69% der eingesetzten Aktivität).

200 mg dieses vorgereinigten Peptids werden in 10 ccm 0.01 *m* AP gelöst und auf eine mit 0.01 *m* AP vorbehandelte Säule von 12 g Carboxymethylcellulose (2.4 × 15 cm) aufgebracht. Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 50 ccm/Stde. eluiert man zunächst mit 500 ccm AP einer von 0.01 bis 0.04 linear ansteigenden Molarität. Das Eluat enthält auf Grund des UV-Spektrums kein OMTLV. Man setzt dann die Gradientenelution mit 500 ccm 0.06 bis 0.24 *m* AP fort. Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 40 ccm/Stde. werden 50-ccm-Fractionen abgenommen und deren Lichtabsorptionen bei 273 m μ gemessen. Maximale Absorption zeigt die Fraktion 5 (ca. 0.12 *m* an Ammoniumacetat). Durch Lyophilisieren dieser Lösung, Aufnehmen des Rückstandes mit 20 ccm Wasser, Filtration und erneutes Lyophilisieren des Filtrats erhält man 75 mg OMTLV als Diacetat-trihydrat. Das farblose Produkt besitzt eine Vasopressinaktivität von 76 IE/mg, λ_{\max} 273 m μ (Wasser), R_F 0.49 (System A, vgl. oben; $R_F = 0.37$ (System B: Methyläthylketon/Pyridin/Wasser (65 : 15 : 20)).

C₄₇H₆₇N₁₃O₁₂S₂ · 2 CH₃CO₂H · 3 H₂O (1244.3) Ber. N 14.6 S 5.2 H₂O 4.3 Essigsäure 9.6
Gef. N 14.4 S 5.3 H₂O 4.3 Essigsäure 9.8