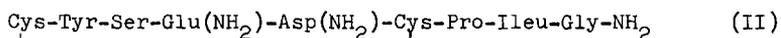
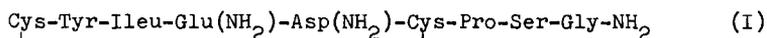


SYNTHESE VON SER³-ILEU⁸-OXYTOCIN UND
DESAMINO-SER⁴-ILEU⁸-OXYTOCIN (DESAMINO-ISOTOCIN)¹⁾

E. Klieger und E. Schröder
Schering AG, Hauptlaboratorium
Berlin-West

(Received 26 April 1965)

Untersuchungen der Neurohypophyse verschiedener Elasmobranch-
arten ergaben Hinweise auf das Vorhandensein eines oder mehrerer
oxytocinartiger Prinzipien, die strukturell dem Oxytocin ähnlich,
jedoch nicht mit ihm identisch sind ^{2,3)}. Kürzlich gelang es nun
Perks und Sawyer ⁴⁾ aus der Elasmobranch-Art "Raia ocellata" ein
Nonapeptid zu isolieren, für das die Struktur eines Ser⁸-Oxytocins
(I) oder eines Ser³-Ileu⁸-Oxytocin(II) diskutiert wird.



1 2 3 4 5 6 7 8 9

Die Sequenz II wird jedoch auf Grund chemischer und biologischer
Eigenschaften sowie von Struktur-Aktivitätsbeziehungen an bisher
bekannten Oxytocin-Analoga als die wahrscheinlichste angesehen.

Das Nonapeptid II wurde von uns nach dem in Fig.1 angegebene-
nen Reaktionsschema synthetisiert: Carbobenzoxy-L-isoleucyl-glycin-
p-nitrobenzylester wurde nach der Anhydrid-Methode gewonnen [Aus-

beute: 66 %; m.p. 142-143° (Äthanol); $[\alpha]_D^{22} - 21,9^\circ$ (c= 1; Methanol); Analyse berechnet für $C_{23}H_{27}N_3O_7$: C 60,38; H 5,95; N 9,19; Gefunden: C 60,12; H 5,95; N 8,97]. Der nach Behandlung mit HBr/Eisessig erhaltene hygroskopische L-Isoleucyl-glycin-p-nitrobenzylester·HBr (Analyse berechnet für $C_{15}H_{21}N_3O_5 \cdot HBr$: N 10,39; Gefunden: 10,09) wurde mit Carbobenzoxy-L-prolin-p-nitrophenylester zum Carbobenzoxy-L-prolyl-L-isoleucyl-glycin-p-nitrobenzylester kondensiert [Ausbeute: 61 %; m.p. 115-117° (Essigester/Petroläther); $[\alpha]_D^{22} - 75,9^\circ$ (c= 1; Methanol); Analyse berechnet für $C_{28}H_{34}N_4O_8$: C 60,64; H 6,18; N 10,10; Gefunden: C 60,93; H 5,92; N 10,18] und anschließend zum Carbobenzoxy-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamid amidiert [Ausbeute: 96 %; m.p. 180-181°; $[\alpha]_D^{23} - 65,9^\circ$ (c=1; Methanol)]. Nach Decarbenzoxylierung wurde das L-Prolyl-L-isoleucyl-glycinamid [Ausbeute: 94 %; m.p. 168-169° (Lit.⁵) 118°; $[\alpha]_D^{23} - 67,0^\circ$ (c= 2; Eisessig)] mit N-Carbenzoxy-S-benzyl-L-cystein-p-nitrophenylester und dann mit Carbobenzoxy-L-asparagin-p-nitrophenylester zum L-Asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamid verlängert (vgl. Lit.⁶); [Analyse berechnet für $C_{27}H_{42}N_7O_6S$: C 54,70; H 7,14; Gefunden: C 54,52; H 6,99]. Von dem durch weitere Umsetzung mit p-Methoxycarbenzoxy-L-glutamin-p-nitrophenylester⁷) zugänglichem p-Methoxycarbenzoxy-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamid [Ausbeute: 98 %; m.p. 217-218°; $[\alpha]_D^{22} - 45,2^\circ$ (c= 0,5; Dimethylformamid); Analyse berechnet für $C_{41}H_{57}N_9O_{11}S$: C 55,70; H 6,50; N 14,26; Gefunden: C 55,99; H 6,75; N 14,07] wurde die Methoxycarbenzoxygruppe mit Trifluoressigsäure in Gegenwart von Anisol⁸)

entfernt und das L-Glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamid Trifluoracetat [Ausbeute 91 %; $[\alpha]_D^{22} -66,8^\circ$ ($c = 0,5$; Eisessig); Analyse berechnet für $C_{32}H_{49}N_9O_8S \cdot CF_3COOH$; F 6,84; N 15,12; S 3,85; Gefunden: F 7,10; N 14,56; S 3,96] mit p-Methoxycarbobenzoxy-serinazid [aus p-Methoxycarbobenzoxy-serinhydrazid, m.p. 174-175° (Äthanol); $[\alpha]_D^{22} +10,0^\circ$ ($c = 1$; Dimethylformamid); Analyse berechnet für $C_{12}H_{17}N_3O_5$; C 50,80; H 6,05; N 14,85; Gefunden: C 50,49; H 5,95; N 14,75;] zum p-Methoxycarbobenzoxy-L-seryl-L-glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamid kondensiert [Ausbeute: 80 %; m.p. 217-218°; $[\alpha]_D^{25} -39,2^\circ$ ($c = 0,5$; Dimethylformamid); Analyse berechnet für $C_{44}H_{62}N_{10}O_{13}S$: C 54,42; H 6,44; N 14,43; Gefunden: C 54,61; H 6,58; N 14,48;]. Das aus dem substituierten Heptapeptid erhaltene L-Seryl-L-glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamid Trifluoracetat [Ausbeute: 89 %; m.p. 198-200°; $[\alpha]_D^{25} -75,2^\circ$ ($c = 0,5$; 95 %ig. Essigsäure); Analyse berechnet für $C_{35}H_{54}N_{10}O_{10}S \cdot CF_3COOH$; F 6,19; N 15,20; S 3,48; Gefunden: F 6,50; N 14,92; S 3,68;] wurde schließlich mit N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosinhydrazid ⁹⁾ zum N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamid gekuppelt [Ausbeute: 71 %; m.p. 234-235°; $[\alpha]_D^{25} -46,4^\circ$ ($c = 0,5$; Dimethylformamid); Analyse berechnet für $C_{62}H_{80}N_{12}O_{15}S_2$: C 57,39; H 6,21; N 12,96; S 4,94; Gefunden: C 57,38; H 6,45; N 12,93; S 4,99;].

Eine Abspaltung sämtlicher Schutzgruppen mit Natrium in flüssigem Ammoniak, Oxydation mit Luft bei pH 6,6, Entsalzung an Amberlite

XE 64 und 400stufige Gegenstromverteilung in sek. Butanol/Wasser/Essigsäure 100:120:1 lieferte Ser³-Ileu⁸-Oxytocin; [Analyse berechnet für C₄₀H₆₀N₁₂O₁₃S₂·0,75 CH₃COOH·3,5 H₂O: C 45,76; H 6,48; N 15,43; CH₃CO 2,96; H₂O 5,79; Gefunden: C 46,62; H 6,64; N 15,14; CH₃CO 2,70; H₂O 6,26. Das Produkt zeigt eine korrekte quantitative Aminosäureanalyse], das sich im Elektropherogramm (n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:12 und Äthanol/Pyridin/Wasser 80:4:20) sowie im Papierchromatogramm (n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:12) als einheitlich zeigte.

Da sich die Desamino-Verbindungen der Hypophysenhinterlappenhormone (Desamino-Oxytocin^{10,11,12}), Desamino-Lys⁸-Vasopressin¹³) und Desamino-Arg⁸-Vasopressin¹⁴) als hochwirksame bzw. spezifisch wirksamere Analoga der natürlichen Hormone erwiesen haben, wurde in unserem Laboratorium das bisher nicht bekannte Desamino-Iso-tocin (Desamino-Ser⁴-Ileu⁸-Oxytocin) auf folgendem Weg synthetisiert: Durch Umsetzung des oben beschriebenen L-Asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamids mit p-Methoxycarbobenzoxy-L-serinazid entstand zunächst p-Methoxycarbobenzoxy-L-seryl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamid [Ausbeute: 90 %; m.p. 208-210°; [α]_D²¹-42,3° (c= 0,5; Dimethylformamid); Analyse berechnet für C₃₉H₅₄N₈O₁₁S: C 55,57; H 6,46; N 13,29; S 3,80; Gefunden: C 55,56; H 6,36; N 13,28; S 3,91;] und mit Trifluoressigsäure durch Abspaltung der p-Methoxycarbobenzoxygruppe das L-seryl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamid Trifluoracetat [Ausbeute: 100 %;

$[\alpha]_D^{25} -76,6^\circ$ (c= 0,5; 95 %ig.Essigsäure); Analyse berechnet für $C_{30}H_{46}N_8O_8S \cdot CF_3COOH$: F 7,19; N 14,14; S 4,04; Gefunden: F 7,36; N 13,48; S 4,03]. Aus dem Hexapeptidamid wurde mit p-Methoxycarbobenzoxyl-L-Isoleucin-p-nitrophenylester [m.p. 56° (Äthanol/Äther/Petroläther)]; $[\alpha]_D^{23} -16,8^\circ$ (c= 1; Methanol); Analyse berechnet für $C_{21}H_{24}N_2O_7$: C 60,57; H 5,81; N 6,73; Gefunden: C 60,55; H 5,87; N 6,51;] das p-Methoxycarbobenzoxyl-L-isoleucyl-L-seryl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamid [Ausbeute: 82 %; m.p. $216-218^\circ$; $[\alpha]_D^{24} -34,3^\circ$ (c= 0,5; Dimethylformamid); Analyse berechnet für $C_{45}H_{65}N_9O_{12}S$: C 56,53; H 6,85; N 13,19; O 20,08; Gefunden: C 56,35; H 6,80; N 12,99; O 20,19;] erhalten und durch Abspaltung der Aminoschutzgruppe L-Isoleucyl-L-seryl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamid Trifluoracetat [Ausbeute: 100 %; m.p. $198-200^\circ$ $[\alpha]_D^{22} -53,1^\circ$ (c=1; 95 %ig.Essigsäure): Analyse berechnet für $C_{36}H_{57}N_9O_9 \cdot CF_3COOH$: F 6,29; N 13,92; S 3,54; Gefunden: F 6,08; N 13,87 S 3,45;] Das für die weitere Kettenverlängerung benötigte S-Benzyl- β -mercaptopropionyl-L-tyrosinhydrazid [Ausbeute: 81 %; m.p. $194-195^\circ$ (Äthanol); $[\alpha]_D^{22} + 5,9^\circ$ (c= 1; Eisessig): Analyse berechnet für $C_{19}H_{23}N_3O_3S$: C 61,10; H 6,21; N 11,25; Gefunden: C 61,02; H 6,28; N 11,35;] wurde aus S-Benzyl- β -mercaptopropionsäure-N-hydroxysuccinimidester [Ausbeute: 62 %; Analyse berechnet für $C_{14}H_{15}N O_4S$: C 57,32; H 5,16; S 10,93; Gefunden: C 56,95; H 5,37; S 10,86;] und L-Tyrosinmethylesterhydrochlorid und anschließende Hydrazinolyse des S-Benzyl- β -mercaptopropionyl-L-tyrosinmethylester [Ausbeute: 87 %; m.p. $91-92^\circ$

(Äthanol/Äther/Petroläther): $[\alpha]_D^{25} + 32,2^\circ$ (c= 1; 95 %ig.Essigsäure); Analyse berechnet für $C_{20}H_{23}N_4S$: C 64,32; H 6,21; S 8,58; Gefunden: C 63,88; H 6,22; S 8,84;] hergestellt. Die Umsetzung des Hydrazids mit obigem Heptapeptidamid lieferte schließlich S-Benzyl- β -mercaptopropionyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-seryl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamid [Ausbeute: 76.%; m.p. 222-223^o; $[\alpha]_D^{24} - 34,1^\circ$ (c= 0,5; Dimethylformamid): Analyse berechnet für $C_{55}H_{76}N_{10}O_{12}S_2$: C 58,29; H 6,76; N 12,36; O 16,94; Gefunden: C 57,99; H 6,80; N 12,16; O 16,98;]. Nach Abspaltung der Schutzgruppen mit Natrium in flüssiger Ammoniak und Oxydation bei pH 6,6 wurde das Desamino-Isotocin nach Chromatographie an Sephadex G-25 im System n-Butanol/n-Propanol/0,2n Essigsäure 2:1:3¹⁴⁾ als einheitliche Substanz isoliert. Die Verbindung zeigt eine korrekte quantitative Aminosäureanalyse. Über die biologische Aktivität der synthetisierten Verbindungen wird an anderer Stelle berichtet.

Für die Unterstützung bei den präparativen Arbeiten danken wir Frä. I.Baganz und Herrn P.Nowak.

References

1. XXXVIII.Mitt. Über Peptidsynthesen. XXXVII.Mitt. Über Peptidsynthesen = 4.Mitt. über Angiotensin-Analoga
E.Schröder, Liebigs Ann.Chem. im Druck
2. A.M.Perks und M.H.I.Dodd, Gen.Comp.Endocrinol. 3, 286 (1963)

3. A.M. Perks und M.H.I. Dodd, Gen.Comp.Endocrinol. 3, 184 (1963)
4. A.M. Perks und W.H. Sawyer, Nature(London) 205, 154 (1965)
5. P.-A. Jaquenoud und R.A. Boissonnas, Helv.Chim.Acta 44, 113 (1961)
6. St. Guttman, Helv.Chim.Acta 45, 2622 (1962)
7. E. Schröder und E. Klieger, Liebigs Ann.Chem. 673, 196 (1964)
8. F. Weygand und K. Hunger, Chem.Ber. 95, 1 (1962)
9. C.W. Roberts, J.Amer.Chem.Soc. 76, 6203 (1954)
10. D.B. Hope, V.V.S. Murti und V. du Vigneaud, J.Biol.Chem. 237, 1563 (1962)
11. J. Gotlibow und V. du Vigneaud, Proc.Soc.Exptl.Med. 112, 218 (1963)
12. W.Y. Chan und V. du Vigneaud, Endocrinol. 71, 977 (1962)
13. R.D. Kimbrough, Jr., W.D. Cash, L.A. Branda, W.Y. Chan und V. du Vigneaud, J.Biol.Chem. 238, 1411 (1963)
14. R.L. Huguenin, E. Stürmer, R.A. Boissonnas und B. Berde, Experientia 21, 68 (1965)
15. D. Yamashiro, Nature(London) 201, 76 (1964)

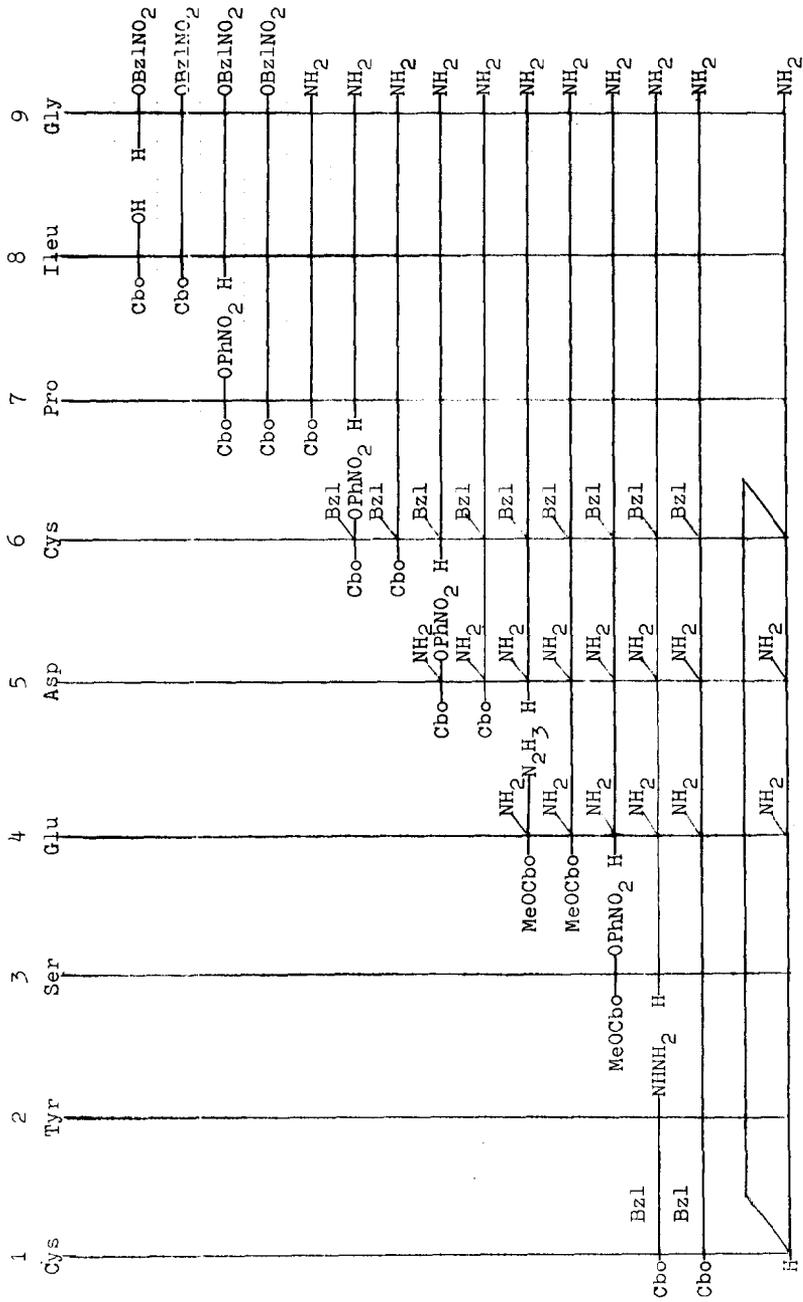


Fig. 1 Synthese von Ser³-Ileu⁸-Oxytocin