

Such a conclusion is supported by the recently published findings of GORMAN and NEUSS that dihydrocatharanthine or coronaridine in acetic acid do not de-carboxylate, but are each converted to a mixture of the two bases; the isomerization again proceeding *via* a tetracyclic immonium salt intermediate⁷. Such a cleavage does not occur during methiodide salt formation in acetonitrile solution, hence the observed differences between RMF and pK_a values of iboga bases.

The experimental conditions for running the rates on 3 mg of each of the bases in 10 ml of acetonitrile and 1 ml of methyl iodide at 25° have already been described in detail^{8,10}.

Résumé. Il est démontré que la vitesse de réaction pour la quaternisation des alcaloïdes du type iboga est une fonction de la stéréochimie du groupe éthyle.

M. SHAMMA and H. E. SOYSTER

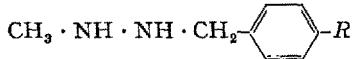
Department of Chemistry, The Pennsylvania State University, University Park (Pennsylvania, U.S.A.), June 18, 1963.

⁹ M. SHAMMA and H. E. SOYSTER, Exper. 19, 460 (1963).

¹⁰ Acknowledgments. The authors wish to thank Eli Lilly and Co., CIBA Pharmaceutical Co., J. R. Geigy S.A., and Dr. A. SANDOVAL for generous samples of iboga alkaloids.

Cytostatischer Wirkungsmechanismus der Methylhydrazine

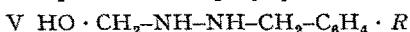
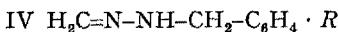
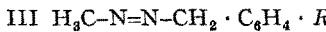
ZELLER, BOLLAG et al.^{1,2} fanden, dass Derivate des *Methylhydrazins* tumorhemmend wirken. Aus einer grossen Zahl geprüfter Verbindungen wählten sie die hochwirksamen Benzylderivate I und II für klinische Versuche aus¹.



I: R = -CONH-CH(CH₃)₂ · HCl
II: R = -CONH-CO-NH₂ · HBr

Diese Methylhydrazinderivate autoxydieren leicht unter Bildung von H₂O₂¹. Die Autoren¹⁻⁴ vermuten daher, dass der cytostatische Effekt auf der Freisetzung von H₂O₂ beruht, welches direkt oder indirekt DNS-Schädigungen herbeiführt. Dass Methylhydrazine in die Mitose-Vorgänge eingreifen, Chromatidbrüche auslösen und die Viscosität wässriger Lösungen von Desoxyribonucleinsäure vermindern, liess sich nachweisen^{3,4}.

Bei der Untersuchung der Methylhydrazine I und II⁵ in verschiedenen Testsystemen (ausführliche Publikation siehe⁶) kamen wir zu folgender Deutung des *Wirkungsmechanismus der Methylhydrazine*: Durch die Bildung von H₂O₂ entsteht als primäres Oxydationsprodukt der Methylhydrazine I und II der Azokörper III, der infolge seiner bekannten Neigung zur Isomerisierung⁷ u.a. in das Hydrazon IV übergehen kann. Ein derartiges Hydrazon (Azomethin) steht in wässriger Lösung im Gleichgewicht mit seiner hydratisierten Form, der N-Hydroxymethyl-Verbindung V. Es ist bekannt, dass N-Methyolverbindungen nach Art von V in wässriger Lösung labil sind und einer partiellen Spaltung in Formaldehyd und Amin- bzw. Hydrazinderivat unterliegen (VI).



Zur Erklärung des cytostatischen Wirkungsmechanismus der Methylhydrazine können die Reaktionsstufen IV, V und VI herangezogen werden. Denn Azomethine IV und die in Wasser aus ihnen entstehenden N-Hydroxymethyl-Verbindungen V besitzen tumorhemmende Eigenschaften auf Grund ihrer Fähigkeit zur *Aminomethylierung*, einer speziellen, cytostatisch wirksamen Alkylierungsreaktion^{8,9}. Auch der nach VI entstehende Formaldehyd, dessen mutagene Wirkung schon länger bekannt

ist¹⁰, wirkt im Tierversuch tumorhemmend⁸. Zudem erscheint es möglich, dass der gebildete Formaldehyd (VI) mit dem primär entstandenen H₂O₂ über Hydroxymethyl-hydroperoxyd zu Bis-hydroxymethyl-peroxyd VII (HO-CH₂ · OO · CH₂OH) zusammentritt. Damit käme es zur Bildung eines organischen Peroxyds, dessen hohe tumorhemmende Wirksamkeit ebenfalls bewiesen ist¹¹.

Eine solche, auf den Reaktionsstufen IV-VI beruhende Hypothese des cytostatischen Wirkungsmechanismus verlangt den Nachweis, dass Methylhydrazinderivate unter milden Bedingungen Formaldehyd abspalten können. Gelingt dieser Nachweis, so ist damit zugleich das Vorhandensein der Muttersubstanzen des Formaldehyds, der N-Hydroxymethyl-Verbindung V und des Azomethins IV bewiesen.

Wir unterwarfen die Methylhydrazine I und II einer beschleunigten Dehydrierung mit Kaliumhexacyanoferrat (äquimolar, schwach sauer, 25°) und gaben nach 1 h wässrige 0,4prozentige Dimedonlösung hinzu. Der entstandene Niederschlag lieferte nach fraktionierter Extraktion mit 96prozentigem Äthanol die kristalline *Formaldehyd-Dimedon-Verbindung*, Schmp. 188-189°, Misch-Schmp. 189°.

C₁₇H₂₄O₄ (292,4) Ber. C 69,83 H 8,27. Gef. C 69,69 H 8,08 (Methylhydrazin I). Gef. C 69,67 H 8,14 (Methylhydrazin II). Die so erhaltenen Formaldehydmengen entsprechen 15-25% der theoretischen Ausbeute. Im Parallelversuch ohne Methylhydrazin trat mit Dimedon kein Niederschlag auf.

¹ P. ZELLER, H. GUTMANN, B. HEGEDÜS, A. KAISER, A. LANGEMANN und M. MÜLLER, Exper. 19, 129 (1963).

² W. BOLLAG und E. GRUNBERG, Exper. 19, 130 (1963).

³ A. RUTISHAUSER und W. BOLLAG, Exper. 19, 131 (1963).

⁴ K. BERNEIS, M. KOFLER, W. BOLLAG, A. KAISER und A. LANGEMANN, Exper. 19, 132 (1963).

⁵ Für Überlassung der Substanzen danken wir der Firma Hoffmann-LaRoche (Basel), insbesondere den Herren Dr. ZELLER und Dr. BOLLAG.

⁶ G. WEITZEL, F. SCHNEIDER, A. FRETZDORFF, K. SEYNSCHE und H. FINGER, Hoppe-Seylers Z., im Druck.

⁷ H. WIELAND, *Die Hydrazine* (Ferdinand-Enke-Verlag, Stuttgart 1913), p. 41.

⁸ G. WEITZEL, F. SCHNEIDER, A. FRETZDORFF, K. SEYNSCHE und H. FINGER, Hoppe-Seylers Z. 334, 1 (1963); Z. Naturforsch. 18b, Heft 12 (1963).

⁹ G. WEITZEL, F. SCHNEIDER, K. SEYNSCHE und H. FINGER, Hoppe-Seylers Z. 335, im Druck (1963).

¹⁰ F. SOBELS, Exper. 12, 318 (1956).

¹¹ G. WEITZEL, E. BUDDECKE, F. SCHNEIDER und H. PFEIL, Hoppe-Seylers Z. 325, 65 (1961).

Neben der Bildung von Hydrogenperoxyd dürften somit an der cytostatischen Wirksamkeit der Methylhydrazine *Aminomethylierungen* durch die gebildeten Azomethin- und N-Hydroxymethylderivate sowie *Hydroxymethylierungen* durch freigesetzten Formaldehyd beteiligt sein. Als tumorhemmende Verbindungsgruppe nehmen die Methylhydrazine daher insofern eine Sonderstellung ein, als sie im Zellstoffwechsel zugleich oxydierend und über verschiedene Reaktionswege alkylierend wirken können. Nach ZELLER, BOLLAG et al.^{1,2} wirken nur die Derivate des *Methyl*-hydrazins tumorhemmend. Dieser Befund stützt die oben vorgelegte Hypothese; denn die cytostatisch aktiven Reaktionsprodukte IV-VII können nur aus *methyl*-substituierten Hydrazinen entstehen.

Summary. Cytostatic active methylhydrazine derivatives split off formaldehyde after mild dehydrogenation with potassium hexacyanoferrate (III). It is suggested that the primary formed *azomethines* and *N-hydroxymethyl-derivatives* participate in cytostatic efficacy by their alkylating ability (aminomethylation). Formaldehyde alone and its condensation products with hydrogen peroxide especially bis-hydroxymethylperoxide may exert cytostatic effects too.

G. WEITZEL, F. SCHNEIDER
und ANNA-MARIA FRETZDORFF

*Physiologisch-chemisches Institut der Universität
Tübingen (Deutschland), 17. September 1963.*

Über Peptidsynthesen. Synthese von Methionyl-Lysyl-Bradykinin, einem Kinin aus Rinderblut¹

Kürzlich berichteten ELLIOTT, LEWIS und SMYTH² über die Bildung einer die glatte Muskulatur stimulierenden Substanz durch Inkubation der säurebehandelten Pseudoglobulinfraktion aus Rinderblut bei pH 7,5 in Abwesenheit von Trypsin. Abbaustudien führten zur Struktur eines Methionyl-lysyl-arginylin-prolyl-prolyl-glycyl-phenylalanyl-seryl-prolyl-phenylalanyl-arginin (I, Methionyl-Lysyl-Bradykinin). Eine von uns durchgeföhrte Synthese des Undekapeptids nahm folgenden Verlauf: Durch Kondensation von tert.-Butyloxycarbonyl(BOC)-L-methioninhydrazid³ mit N^ε-BOC-L-lysins-methylester⁴ wurde mit 71% Ausbeute BOC-L-methionyl-N^ε-BOC-L-lysins-methylester [C₂₂H₄₁N₃O₇S₁] (491,63), F. 93–94° (Nadeln aus Essigester/Petroläther), [α]_D²² = −17,3° (c = 1, Methanol); Ber. C 53,73 H 8,41 N 8,55 – Gef. C 53,64 H 8,55 N 8,62] und aus diesem durch 72 h Behandlung mit Hydrazinhydrat in Methanol bei 25°C BOC-L-methionyl-N^ε-BOC-L-lysins-hydrazid (II) erhalten (98%) [C₂₁H₄₁N₅O₆S₁] (491,64); F. 123–124° (Nadeln aus Essigester/Petroläther), [α]_D²⁴ = −21,8° (c = 0,5, Dimethylformamid); Ber. C 51,31 H 8,40 N 14,25 – Gef. C 50,99 H 8,45 N 13,96].

Reaktion von II in 2,2*n* salzaurem Tetrahydrofuran mit tert.-Butylnitrit bei −20°, Neutralisation mit Triäthylamin und Zugabe von Bradykinin-dihydrochlorid in Dimethylformamid lieferte nach 2tätigem Stehen bei 0°, Einengen und Verreiben mit Essigester mit 85%iger Ausbeute BOC-L-methionyl-N^ε-BOC-L-lysyl-bradykinin (III) Monohydrochlorid Trihydrat [C₇₁H₁₁₆N₁₈O₁₀S₁Cl₁] (1593,3); F. 170–174° (Zers.), [α]_D²⁴ = −49,9° (c = 0,5, Dimethylformamid); Ber. C 53,52 H 7,34 Cl 2,22 N 15,83 O 19,08 = Gef. C 52,33 H 7,36 Cl 2,44 N 15,74 O 18,84] als elektrophoretisch praktisch einheitliche Substanz. Eine vollständige Reinigung gelang durch präparative trägefreie Elektrophorese⁵ in Pyridiniumacetatpuffer pH 5,5. Zur Abspaltung der beiden BOC-Gruppen aus dem rohen III wurde 1 h bei Raumtemperatur mit Trifluoressigsäure behandelt und das Undekapeptid durch präparative Elektrophorese (pH 5,5) in einheitlicher Form isoliert (75% bezogen auf III) [α]_D²⁶ = −86,5° (c = 0,5, Wasser). C₆₁H₉₄N₁₈O₁₃S₁ · 2CH₃COOH · 6H₂O (1547,8). Ber. C 50,44 H 7,42 N 16,29 CH₃CO 5,56 H₂O 6,99 = Gef. C 49,61 H 7,35 N 15,84 CH₃CO 5,99 H₂O 7,21. Methionyl-Lysyl-Bradykinin zeigt bei pH 5 (0,1 mol Pyridiniumacetat + 10% Propylenglykol) eine elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit, die zwischen Bradykinin

und Kallidin liegt (Ornithin = 1; Bradykinin = 0,55; Met-Lys-Bradykinin = 0,65; Kallidin = 0,68).

Durch Einwirkung von Leucinaminopeptidase (Ferment-Substrat-Verhältnis 1:10000; 15 h; pH 8,6; 37°) wird Methionyl-Lysyl-Bradykinin quantitativ in Methionin, Lysin und Bradykinin aufgespalten. Mit Trypsin (Ferment-Substrat-Verhältnis 1:100; 15 h; pH 8,6; 37°) wird das Undekapeptid zu Methionyl-Lysin und Bradykinin hydrolysiert.

Methionyl-Lysyl-Bradykinin besitzt folgende biologische Eigenschaften (Schwellendosen): Meerschweinchenileum: 3 ng/ml; Rattenuterus: 0,3 ng/ml; Kaninchenblutdruck: 2–5 ng/kg; (Bradykinin^{6,7}: 1 ng/ml; 0,1 ng/ml bzw. 50 ng/kg). Ein quantitativer Vergleich von Methionyl-Lysyl-Bradykinin mit Bradykinin am Kaninchenblutdruck bei Dosen von 10, 20, 50, 100, 200, 500 ng, 1 und 2 γ ergab, dass das Undekapeptid doppelt so wirksam ist wie Bradykinin. Für BOC-Methionyl-N^ε-BOC-Lysyl-Bradykinin wurden als Schwellendosen ermittelt: Meerschweinchenileum: >150 ng/ml; Rattenuterus: 15 ng/ml; Kaninchenblutdruck: 5–10 γ⁸.

Summary. The synthesis and the pharmacological actions of methionyl-lysyl-bradykinin, a new kinin from ox blood, are described.

E. SCHRÖDER

Hauptlaboratorium der Schering AG, Berlin-West (Deutschland), 14. August 1963.

¹ Über Peptidsynthesen XXI. 4. Mitt. über Bradykinin- und Kallidin-Analoga. XX. Mitt. über Peptidsynthesen, 3. Mitt. über Bradykinin- und Kallidin-Analoga: E. SCHRÖDER, Liebigs Ann., im Druck.

² D. F. ELLIOTT, G. P. LEWIS und D. G. SMYTH, Biochem. J. 87, 21P (1963).

³ ST. GUTTMANN und R. A. BOISSONAS, Helv. chim. Acta 41, 1852 (1958).

⁴ R. SCHWYZER und W. RITTEL, Helv. chim. Acta 44, 159 (1961).

⁵ J. BARROUILLIER, E. WATZKE und H. GIBIAN, Z. Naturforsch. 13b, 754 (1958).

⁶ E. SCHRÖDER, Liebigs Ann., im Druck.

⁷ A. CERLETTI, E. STÜRMER und H. KONZETT, Deut. Med. Wschr. 86, 678 (1961).

⁸ Für die Durchführung der präparativen Arbeiten bin ich Herrn M. LEHMANN, für die biologischen Teste Herrn Dr. R. HEMPEL zu Dank verpflichtet.