

Über den Einfluss der Kettenlänge auf die biologische Aktivität eledoisinanaloger Verbindungen^{1,2}

Vor einiger Zeit konnten wir berichten, dass C-terminale Hexa- und Heptapeptide des Eledoisins eine erstaunlich hohe, zum Teil mit dem Eledoisin vergleichbare biologische Aktivität zeigen³. Inzwischen wurden auch von anderer Seite ähnliche Arbeiten publiziert^{4,5}. Wir haben nun den Einfluss der Kettenlänge auf die blutdrucksenkende Wirkung genauer untersucht. Als Verbindungen wurden das C-terminale Penta-, Hexa-, Hepta-, Okta-, Nona- und Dekapeptid des Asp(NH₂)⁶-Eledoisins verwendet. Die relativen molaren Aktivitäten bezogen auf Eledoisin = 100 wurden aus der graphischen Darstellung % Senkung = f(log Dosis), gemittelt über den Bereich einer 20- bis 40%igen Blutdrucksenkung, am Kaninchen bestimmt. Zur Sicherstellung des Bildes wurden ferner das Hexa-, Hepta-, Okta- und Nonapeptid des Gly⁶-Val⁸-Eledoisins und das Hexa-, Hepta- und Nonapeptid des Asp(NH₂)⁶-Val⁸-Eledoisins herangezogen.

Für das Asp(NH₂)⁶-Eledoisin ergab sich das folgende Bild: Die kürzeste noch wirksame Teilsequenz ist das C-terminale Pentapeptid H-Phe-Ileu-Gly-Leu-Met-NH₂ (0,2%)⁶. Der Übergang zum Hexapeptid H-Ala-Phe-Ileu-Gly-Leu-Met-NH₂ (10%) bedeutet eine Aktivitätssteigerung von mehr als einer Zehnerpotenz. Das Heptapeptid H-Asp(NH₂)-Ala-Phe-Ileu-Gly-Leu-Met-NH₂ (40%)

¹ Über Peptidsynthesen XXXII. 5. Mitt. über Eledoisin und Eledoisin-Analoga. 4. Mitt. siehe E. SCHRÖDER, K. LÜBKE und R. HEMPEL, Exper. 21, 70 (1965).
² Auszugsweise vorgetragen auf dem 7. Europäischen Peptidsymposium in Budapest (Sept. 1964).
³ E. SCHRÖDER und K. LÜBKE, Exper. 20, 19 (1964).
⁴ E. STÜRMER, ED. SANDRIN und R. A. BOISSONNAS, Exper. 20, 303 (1964).
⁵ L. BERNARDI, G. BOSISIO, F. CHILLEMI, G. DE CARO, R. DE CASTIGLIONE, V. ERSPAMER, A. GLAESSER und O. GOFFREDO, Exper. 20, 306 (1964).
⁶ B. CAMERINO, G. DE CARO, R. A. BOISSONNAS, ED. SANDRIN und E. STÜRMER, Exper. 19, 339 (1963).

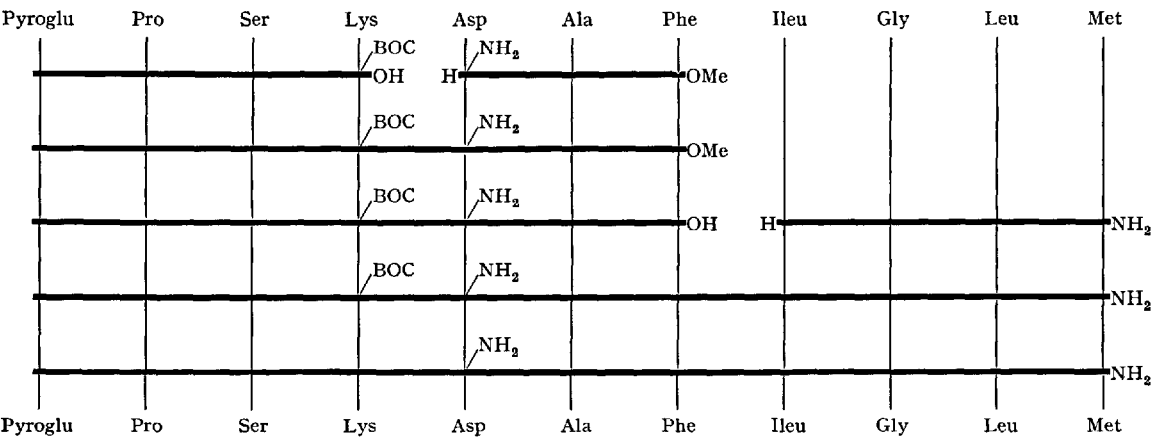


Fig. 1

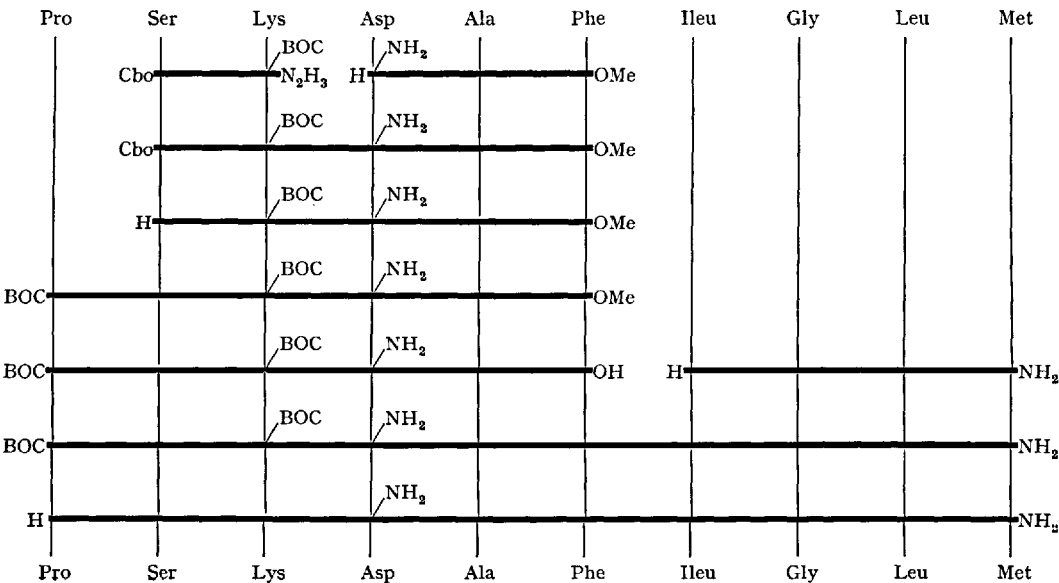


Fig. 2

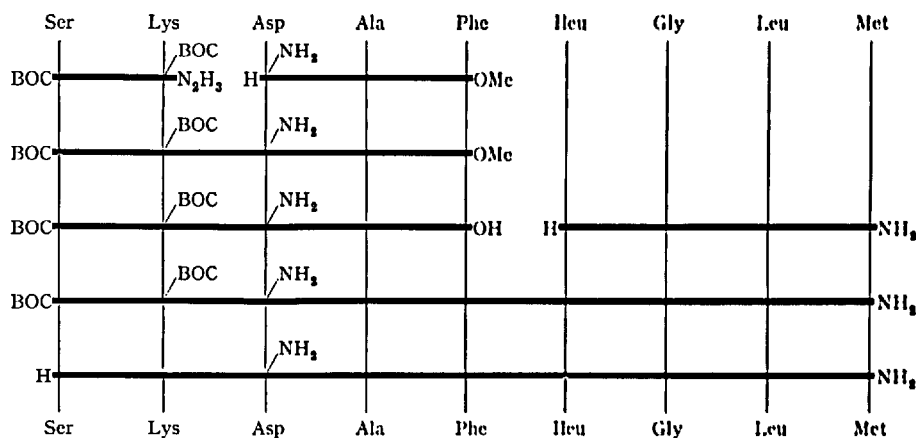


Fig. 3

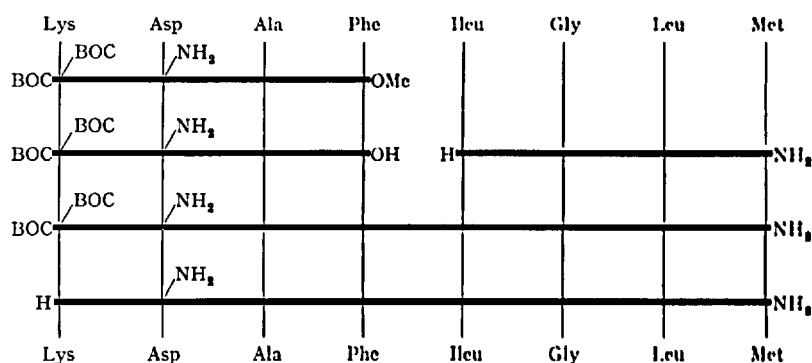


Fig. 4

zeigt bereits fast die Hälfte der Eledoisinaktivität. Eine weitere Verlängerung zum Oktapeptid H-Lys-Asp(NH₂)-Ala-Phe-Ileu-Gly-Leu-Met-NH₂ (250%), Nonapeptid H-Ser-Lys-Asp(NH₂)-Ala-Phe-Ileu-Gly-Leu-Met-NH₂ (250%) und Dekapeptid H-Pro-Ser-Lys-Asp(NH₂)-Ala-Phe-Ileu-Gly-Leu-Met-NH₂ (260%) führt zu Verbindungen, die mit mehr als der doppelten Eledoisinaktivität auch wirksamer sind wie das Asp(NH₂)⁶-Eledoisin selbst, für das eine Wirkung von 150% gefunden wurde.

Zu einem analogen Ergebnis führte der Vergleich der C-terminalen Teilsequenz des Gly⁶-Val⁸- und Asp(NH₂)⁶-Val⁸-Eledoisins. Auch hier wird das Maximum der biologischen Aktivität bereits bei verkürzter Kettenlänge erreicht. Vor kurzem wurde von BERNARDI et al.⁷ die dem originalen Eledoisin entsprechende Reihe vom Penta- bis Undekapeptid beschrieben. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen wird hier das Maximum erst beim Nonapeptid erreicht. Möglicherweise ist die Ursache dafür in den verschieden verwendeten Testobjekten (Kaninchen bzw. Hund) zu suchen.

In Tabelle I sind die relativen molaren Aktivitäten aller Verbindungen bezogen auf Eledoisin = 100 aufgeführt.

Die Synthese des Asp(NH₂)⁶-Eledoisins sowie der entsprechenden Dek-, Nona- und Oktapeptide erfolgte entsprechend Schema 1-4. Die Verseifung vor der Kupplung zum Endprodukt erfolgte enzymatisch⁷. Die Kupplung selbst wurde nach der Carbodiimid-Methode durchgeführt⁸. Das Undeka-, Dek- und Nonapeptid wurden durch Gegenstromverteilung, das Oktapeptid durch trägerfreie Elektrophorese gereinigt. Das C-terminale Penta-

Tabelle I. Relative molare Aktivitäten einiger Eledoisinanaloga und ihrer C-terminalen Teilsequenzen bezogen auf Eledoisin = 100

	Asp(NH ₂) ⁶ - Eledoisin	Gly ⁶ -Val ⁸ - Eledoisin	Asp(NH ₂) ⁶ - Val ⁸ - Eledoisin
Pentapeptid Teilsequenz 7-11	1,5	-	-
Hexapeptid Teilsequenz 6-11	10	8	6
Heptapeptid Teilsequenz 5-11	40	30	20
Oktapeptid Teilsequenz 4-11	250	100	-
Nonapeptid Teilsequenz 3-11	250	110	100
Dekapeptid Teilsequenz 2-11	260	-	-
Undekapeptid Eledoisinanalogen	150	80	60

⁷ G. KLOSS und E. SCHNÖDER, Hoppe-Seyler's Z. 336, 248 (1964).

⁸ Durch Spaltung mit Chymotrypsin konnte sichergestellt werden, dass in den isolierten Endprodukten der Phenylalaninrest nicht racemisiert ist.

Tabelle II

Verbindung	F.	$[\alpha]_D$	Analysen
$\begin{array}{c} \text{BOC} \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{BOC-Lys-Asp-Ala-Phe-OMe} \end{array}$	163–166° MeOH/Et ₂ O	– 8,5° c = 1; AcOH	Ber. N 12,16 O 23,16 Gef. 12,34 22,90
$\begin{array}{c} \text{BOC} \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{BOC-Lys-Asp-Ala-Phe-OH} \end{array}$ gefriergetrocknet, elektrophoretisch (pH 9) noch eine schwache Nebenbande (Ester) nachweisbar	—	—	—
$\begin{array}{c} \text{BOC} \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{BOC-Lys-Asp-Ala-Phe-Ileu-Gly-Leu-Met-NH}_2 \end{array}$	239–240°	– 26,4° c = 1; AcOH	Ber. C 56,15 H 7,84 N 14,12 Gef. 56,52 7,70 14,26
$\begin{array}{c} \text{BOC} \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{H-Lys-Asp-Ala-Phe-Ileu-Gly-Leu-Met-NH}_2 \cdot 1,2 \text{ AcOH} \cdot 9,5 \text{ H}_2\text{O} \end{array}$	—	—	Ber. N 13,57 H ₂ O 15,06 CH ₃ CO 4,55 Gef. 13,30 15,18 4,88 Aminosäureanalyse ¹¹ : Lys _{0,94} , Asp _{1,03} , Ala _{1,05} , Phe _{1,00} , Ileu _{0,97} , Gly _{0,90} , Leu _{1,02} , Met _{0,77}
$\begin{array}{c} \text{BOC} \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{BOC-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-OMe} \end{array}$	191–192° EtOH/Et ₂ O	– 16,4° c = 1; AcOH	Ber. C 55,43 H 7,37 N 12,57 Gef. 55,16 7,43 12,85
$\begin{array}{c} \text{BOC} \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{BOC-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-OH} \end{array}$ gefriergetrocknet, elektrophoretisch (pH 9) einheitlich	—	—	—
$\begin{array}{c} \text{BOC} \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{BOC-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ileu-Gly-Leu-Met-NH}_2 \cdot 1,5 \text{ H}_2\text{O} \end{array}$	245° (Z) DMF/AcOH	– 38,8° c = 1; AcOH	Ber. C 53,75 H 7,77 N 13,94 H ₂ O 2,24 Gef. 53,60 7,66 13,58 1,87
$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ileu-Gly-Leu-Met-NH}_2 \end{array}$ Gegenstromverteilung n-BuOH/H ₂ O/AcOH 4:5:1 48 Stufen. K = 0,10	242° (Z)	– 62,8° c = 1; H ₂ O	Aminosäureanalyse: Ser _{0,91} , Lys _{1,05} , Asp _{0,98} , Ala _{1,05} , Phe _{1,00} , Ileu _{0,94} , Gly _{0,93} , Leu _{0,98} , Met _{0,80}
$\begin{array}{c} \text{BOC} \\ \\ \text{Cbo-Ser-Lys-NHNH}_2 \end{array}$	186–188°	– 15,1° c = 1, AcOH	Ber. N 14,54 Gef. 14,50
$\begin{array}{c} \text{BOC} \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{Cbo-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-OMe} \end{array}$	207–210°	– 4,8° c = 1; AcOH	Ber. C 57,54 H 6,80 N 12,06 Gef. 56,89 7,10 12,12
$\begin{array}{c} \text{BOC} \quad \text{HN}_2 \\ \quad \\ \text{H-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-OMe} \end{array}$	Öl hygroskopisch	—	—
$\begin{array}{c} \text{BOC} \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{BOC-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-OMe} \end{array}$ vgl. ¹²	185–186°	– 19,8° c = 1; DMF	Ber. N 12,73 Gef. 13,01
$\begin{array}{c} \text{BOC} \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{BOC-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-OH} \cdot 2,5 \text{ H}_2\text{O} \end{array}$ gefriergetrocknet	—	– 26,3° c = 1; AcOH	Ber. C 52,90 H 7,43 N 12,48 H ₂ O 4,96 Gef. 52,43 7,46 13,18 4,86
$\begin{array}{c} \text{BOC} \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{BOC-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ileu-Gly-Leu-Met-NH}_2 \end{array}$ dünnstschichtchromatographisch nicht einheitlich, enthält noch N,N-Dicyclohexylharnstoff	—	—	—
$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ileu-Gly-Leu-Met-NH}_2 \end{array}$ Gegenstromverteilung n-BuOH/H ₂ O/AcOH 4:5:1 96 Stufen, K = 0,36	—	—	Aminosäureanalyse: Pro _{0,92} , Ser _{0,91} , Lys _{1,14} , Asp _{1,10} , Ala _{1,00} , Phe _{1,00} , Ileu _{0,81} , Gly _{0,89} , Leu _{0,91} , Met _{0,85}
$\begin{array}{c} \text{BOC} \\ \\ \text{BOC-Lys-Gly-Ala-Phe-OMe} \end{array}$	85–90° EtOAc/Pae	– 13,2° c = 1; MeOH	Ber. C 58,57 H 7,77 N 11,02 Gef. 58,35 7,84 10,81
$\begin{array}{c} \text{BOC} \\ \\ \text{BOC-Lys-Gly-Ala-Phe-NHNH}_2 \end{array}$	160–165° EtOH/Et ₂ O	– 23,6° c = 1; AcOH	Ber. C 56,68 H 7,77 N 15,42 Gef. 56,05 7,83 15,17

Tabelle II

Verbindung	F.	$[\alpha]_D$	Analysen
$\begin{array}{c} \text{BOC} \\ \\ \text{BOC-Lys-Gly-Ala-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH}_2 \end{array}$	238–240°	–33,4° c = 0,7; AcOH	Ber. C 56,42 H 7,89 N 13,72 Gef. 56,56 7,86 13,31 Aminosäureanalyse: Lys _{1,04} , Gly _{1,91} , Ala _{1,07} , Phe _{1,00} , Val _{1,01} , Leu _{1,08} , Met _{1,01}
$\begin{array}{c} \text{BOC} \\ \\ \text{H-Lys-Gly-Ala-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH}_2 \\ \text{Gegenstromverteilung } n\text{-BuOH/H}_2\text{O/AcOH 4:5:1} \\ \text{96 Stufen, } K = 0,24 \end{array}$			
$\begin{array}{c} \text{BOC} \\ \\ \text{BOC-Ser-Lys-Gly-Ala-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O} \end{array}$	206–211°	–37,0° c = 0,5; AcOH	Ber. C 53,20 H 7,84 N 12,70 H ₂ O 5,14 Gef. 52,70 7,89 13,26 4,65 Aminosäureanalyse: Ser _{0,85} , Lys _{0,99} , Gly _{1,00} , Ala _{1,00} , Phe _{1,00} , Val _{1,01} , Leu _{0,92} , Met _{0,88}
$\begin{array}{c} \text{BOC} \\ \\ \text{H-Ser-Lys-Gly-Ala-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH}_2 \\ \text{Gegenstromverteilung } n\text{-BuOH/H}_2\text{O/AcOH 4:5:1} \\ \text{96 Stufen, } K = 0,02 \end{array}$			
$\begin{array}{c} \text{BOC NH}_2 \\ \quad \\ \text{BOC-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH}_2 \\ \text{dünnschichtchromatographisch mehrere Nebenbanden,} \\ \text{ohne Identifizierung weiter umgesetzt} \end{array}$	—	—	
$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH}_2 \\ \text{Gegenstromverteilung } n\text{-BuOH/H}_2\text{O/AcOH 4:5:1} \\ \text{96 Stufen, } K = 0,30 \end{array}$			Aminosäureanalyse: Ser _{0,78} , Lys _{0,99} , Asp _{1,07} , Ala _{1,08} , Phe _{1,00} , Val _{0,97} , Gly _{0,97} , Leu _{1,04} , Met _{0,88}

und Hexapeptid wurde aus H-Ileu-Gly-Leu-Met-NH₂ durch Umsetzung mit BOC-Phe-OH bzw. mit BOC-Ala-Phe-NHNH₂ und Schutzgruppenabspaltung erhalten⁹. Das Heptapeptid wurde aus dem Hexapeptid mit BOC-Asp(NH₂)-OPhNO₂ synthetisiert. Auf gleichem Wege wurden das Hexa- und Heptapeptid des Asp(NH₂)⁸-Val⁸-Eledoisins und aus dem Heptapeptid durch Kupplung mit Pyroglu-Pro-Ser-Lys(BOC)-OH das Undekapeptid [Asp(NH₂)⁸-Val⁸-Eledoisin] erhalten. Das Nonapeptid wurde entsprechend Schema 3 hergestellt. Die Teilsequenzen des Gly⁸-Val⁸-Eledoisins waren jeweils aus dem C-terminalen Heptapeptid¹⁰ durch Umsetzung mit BOC-Lys(BOC)-OPhNO₂, BOC-Ser-Lys(BOC)-NHNH₂ bzw. Pyroglu-Pro-Ser-Lys(BOC)-OH zugänglich. Das Oktapeptid wurde ausserdem noch aus BOC-Lys(BOC)-Gly-Ala-Phe-NHNH₂ und H-Val-Gly-Leu-Met-NH₂ synthetisiert. Die Reinigung der Endprodukte erfolgte wieder durch Gegenstromverteilung.

Die analytischen Daten aller Verbindungen sind, sofern sie nicht als Zwischenstufen im Zusammenhang mit an-

deren Synthesen publiziert werden, in Tabelle II zusammengestellt.

Summary. The syntheses of Eledoisin analogues by shortening the peptide chain at the N-terminal moiety of the molecule are described. The influence of the chain length on the hypotensive activity is discussed.

K. LÜBKE, R. HEMPEL und E. SCHRÖDER

Hauptlaboratorium der Schering AG, Berlin-West (Deutschland), 5. Oktober 1964.

⁹ K. LÜBKE, E. SCHRÖDER, R. SCHMIECHEN und H. GIBIAN, *Liebigs Ann.* 679, 195 (1964).

¹⁰ K. LÜBKE und E. SCHRÖDER, *Liebigs Ann.*, im Druck.

¹¹ Die Aminosäureanalysen wurden in unserem Laboratorium von Herrn G. KLOSS ausgeführt.

¹² ED. SANDRIN und R. A. BOISSONNAS, *Helv. chim. Acta* 47, 417 (1964).

The Effect of Various Anions on the Contractility of the Guinea-Pig Papillary Muscle

Several inotropically acting substances influence the contraction of the heart and skeletal muscle in a different manner, independent of a change in the stimulation process. This indicates that there are differences in the mechanism of coupling between the depolarization process of the membrane and the shortening of the contractile proteins in both types of muscles. Epinephrine, for instance, increases the contractile force of the skeletal

muscle by prolonging the rising phase (peak time) without changing the steepness of the contraction curve¹. In the heart muscle, however, it increases the contraction steepness without prolonging the peak time².

Other substances, which in the skeletal muscle act inotropically by prolonging the rising phase of contraction, are the anions NO₃⁻, Br⁻ and I⁻ if they are added to the

¹ M. GOFFART and J. M. RITCHIE, *J. Physiol.* 116, 357 (1952).

² ST. KROP, *J. Pharmacol. exp. Therap.* 82, 48 (1944).