

Über Peptidsynthesen, XLIII. Darstellung einiger Oxytocin-Analoga¹

Im Rahmen unserer Synthesen von Peptidwirkstoffen haben wir eine Reihe von Oxytocin- und Vasopressin-Analoga synthetisiert. Über die Darstellung und biologischen Eigenschaften von

Cys-Phe-Ileu-Ser-Asp(NH₂)-Cys-Pro-Ileu-Gly-NH₂²
(I, Phe²-Ser⁴-Ileu⁸-Oxytocin; Phe²-Isotocin),

Cys-Tyr-Phe-Ser-Asp(NH₂)-Cys-Pro-Ileu-Gly-NH₂
(II, Phe²-Ser⁴-Ileu⁸-Oxytocin; Phe²-Isotocin),

Cys-Tyr-Ileu-Gly-Asp(NH₂)-Cys-Pro-Ileu-Gly-NH₂
(III, Gly⁴-Ileu⁸-Oxytocin; Gly⁴-Isotocin) und

Cys-Phe-Val-Glu(NH₂)-Asp(NH₂)-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂
(IV, Phe²-Val³-Oxytocin;) soll im folgenden berichtet werden.

Zur Synthese von I wurde Z-Cys(Bzl)-Phe-NHNH₂ [aus Z-Cys(Bzl)-Phe-OMe³ mit Hydrazin: Ausbeute: 89%; Schmp. 178–179° (90%ig. Äthanol), $[\alpha]_D^{25} = -36,9^\circ$ ($c = 1$, DMF), C₂₇H₄₀O₄N₄S (506,6), Ber. C 64,01, H 5,97, N 11,06 Gef. C 64,34, H 5,90, N 11,32] nach Überführung in das Azid mit H-Ileu-Ser-Asp(NH₂)-Cys(Bzl)-Pro-Ileu-Gly-NH₂⁴ umgesetzt und daraus das vollgeschützte I erhalten. Ausbeute: 86%, Schmp. 239–240° (DMF/Äthanol), $[\alpha]_D^{25} = -42,9^\circ$ ($c = 1$, DMF).

C₆₃H₈₃N₁₁O₁₃S₂ (1266,6) Ber. C 59,74, H 6,61, N 12,17;
Gef. 60,03, 6,48, 12,26.

Die Abspaltung sämtlicher Schutzgruppen mit Natrium in flüssigem Ammoniak, Oxydation mit Luft bei pH 6,6, Entsalzung an Amberlite XE64, präparative trägefreie Elektrophorese⁵ und Gefrieretrocknung lieferte elektrophoretisch einheitliches I. Aminosäureanalyse (Hydrolyse 48 h, 105°): Asp_{1,04}, Ser_{0,88}, Pro_{1,16}, Gly_{1,06}, Cys_{1,82}, Ileu_{2,04}, Phe_{1,00}, NH_{3 1,76}.

Durch Umsatz von Z-Cys(Bzl)-Tyr-Phe-ONP⁶ mit H-Ser-Asp(NH₂)-Cys(Bzl)-Pro-Ileu-Gly-NH₂⁴ gelangte man zum vollgeschützten II, Ausbeute: 82%; Schmp. 211 bis 213°; $[\alpha]_D^{25} = -42,4^\circ$ ($c = 0,5$, DMF); C₆₆H₈₁O₁₄N₁₁S₂ (1316,6),

Ber. C 60,21, H 6,20, N 11,70, S 4,87;
Gef. 60,02, 6,21, 11,36, 4,99

das nach Abspaltung der Schutzgruppen mit Natrium in flüssigem Ammoniak, Luftoxydation (bei pH 6,6), Entsalzung (mit Amberlite XE 64) und Reinigung an einer Carboxymethylcellulose-Säule mit Ammoniumacetatpuffer (Gradient 0,001 → 0,01 molar, pH 5,5) und Gefrieretrocknung das elektrophoretisch einheitliche II ergab. Aminosäureanalyse (Hydrolyse 48 h, 105°): Asp_{1,04}, Ser_{0,88}, Pro_{1,02}, Gly_{1,04}, Cys_{1,76}, Ileu_{1,02}, Tyr_{0,78}, Phe_{1,00}, NH_{3 1,80}.

III wurde wie folgt dargestellt: Z(OMe)-Ileu-ONP⁴ wurde mit H-Gly-OMe zum Z(OMe)-Ileu-Gly-OMe [Ausbeute: 85%; Schmp. 144–145° (Essigester/Petroläther); $[\alpha]_D^{25} = -22,7^\circ$ ($c = 1$, Methanol);

C₁₈H₂₆N₂O₆ (366,4) Ber. C 59,00, H 7,15, N 7,65;
Gef. 59,01, 7,28, 7,36

gekuppelt, daraus das Z(OMe)-Ileu-Gly-NHNH₂ [Ausbeute: 92%; Schmp. 177–178° (Äthanol); $[\alpha]_D^{25} = +7,0^\circ$ ($c = 1$, DMF); C₁₇H₂₈N₄O₅ (366,4) Ber. C 55,72, H 7,15, N 15,29; Gef. C 55,91, H 7,22, N 14,86] dargestellt und dieses nach Überführung in das Azid mit H-Asp(NH₂)-Cys(Bzl)-Pro-Ileu-Gly-NH₂⁴ zum Z(OMe)-Ileu-Gly-

Asp(NH₂)-Cys(Bzl)-Pro-Ileu-Gly-NH₂ [Ausbeute: 62%; Schmp. 221–222°; $[\alpha]_D^{25} = -42,2^\circ$ ($c = 0,5$, DMF); C₄₄H₆₂N₈O₁₁S · H₂O (944,1) Ber. C 55,97, H 6,94, N 13,35; Gef. 56,20, 7,00, 13,15]

umgesetzt. Letzteres ergab mit Trifluoressigsäure in Gegenwart von Anisol⁷ H-Ileu-Gly-Asp(NH₂)-Cys(Bzl)-Pro-Ileu-Gly-NH₂ · Trifluoracetat [Ausbeute: 93%; Schmp. 203–204°; $[\alpha]_D^{25} = -47,8^\circ$ ($c = 0,44$, 95%ig. Essigsäure); Aminosäureanalyse: Asp_{0,98}, Pro_{1,10}, Gly_{2,00}, Cys_{0,88}, Ileu_{2,00}, NH_{3 1,80}], das nach Kondensation mit Z-Cys(Bzl)-Tyr-N₃⁸ vollgeschütztes III lieferte. Ausbeute: 66%; Schmp. 213–215°; $[\alpha]_D^{25} = -58,4^\circ$ ($c = 0,5$, DMF). C₆₂H₈₁N₁₁O₁₃S₂ (1252,5) Ber. C 59,45, H 6,52, N 12,30; Gef. 59,10, 6,78, 12,06.

Aminosäureanalyse: Asp_{1,00}, Pro_{1,19}, Gly_{2,17}, Cys_{1,75}, Ileu_{2,12}, Tyr_{0,77}, NH_{3 2,10}. Nach Abspalten sämtlicher Schutzgruppen mit Natrium in flüssigem Ammoniak und weiterer Aufarbeitung wie bei I lag elektrophoretisch einheitliches III vor. Aminosäureanalyse (Hydrolyse 48 h, 105°): Asp_{1,05}, Pro_{1,07}, Gly_{2,0}, Cys_{1,87}, Ileu_{1,85}, Tyr_{0,64}, NH_{3 2,08}.

Die Synthese von IV nahm folgenden Verlauf: Z(OMe)-Glu(NH₂)-ONP⁹ wurde mit H-Asp(NH₂)-Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH₂¹⁰ [Schaum; $[\alpha]_D^{25} = -91,4^\circ$ ($c = 0,5$, Methanol);

C₂₇H₄₁N₇O₆S (591,7) Ber. N 16,57, S 5,42;
Gef. 16,23, 5,75]

in Z(OMe)-Glu(NH₂)-Asp(NH₂)-Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH₂ [Ausbeute: 94%; Schmp. 210–212°(Zers.); $[\alpha]_D^{25} = -55,2$ ($c = 1$, DMF);

C₄₁H₅₇N₈O₁₁S (884,0) Ber. C 55,70, H 6,50, N 14,26;
Gef. 55,52, 6,60, 14,14]

Oxytocische Aktivität (IE/mg)^a

Verbindung	Rattenuterus (isoliert)
I. Phe ² -Ser ⁴ -Ileu ⁸ -Oxytocin	37
II. Phe ² -Ser ⁴ -Ileu ⁸ -Oxytocin	7
III. Gly ⁴ -Ileu ⁸ -Oxytocin	7
IV. Phe ² -Val ³ -Oxytocin	40
Phe ² -Oxytocin	29 ^b

^a Im Vergleich zu Syntocinon®. ^b Literatur: 31,5 ± 2,4¹²; ~ 30¹⁸; 25¹⁴.

¹ XLII. Mitt.: E. SCHRODER, Justus Liebigs Annln Chem., im Druck.

² Alle Aminosäuren, mit Ausnahme von Glycin, haben L-Konfiguration. Abkürzungen nach dem «Report of the Committee on Nomenclature» in *Peptides* (Proc. 5th European Symp. Oxford 1962, Pergamon Press 1963), p. 261.

³ H. S. BACHELARD und V. M. TRIKOJUS, J. chem. Soc. 1958, 4541.

⁴ E. KLEIGER und E. SCHRODER, Tetrahedron Lett. 1965, 2067.

⁵ J. BARROLIER, E. WATZKE und H. GIBIAN, Z. Naturf. 13b, 754 (1958); E. SCHRODER und S. MATTHES, J. Chromat. 17, 189 (1965).

⁶ R. L. HUGUENIN und R. BOISSONNAS, Helv. chim. Acta 40, 1629 (1962).

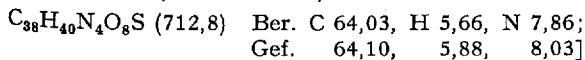
⁷ F. WEYGAND und K. HUNGER, Chem. Ber. 95, 1 (1962).

⁸ C. W. ROBERTS, J. Am. chem. Soc. 76, 6203 (1954).

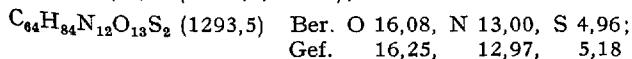
⁹ E. SCHRODER und E. KLEIGER, Justus Liebigs Annln Chem. 673, 196 (1964).

¹⁰ M. BODANSKY und V. DU VIGNEAUD, J. Am. chem. Soc. 81, 5688 (1959).

überführt, nachfolgend mit Trifluoressigsäure/Anisol⁷ die Aminoschutzgruppe abgespalten und das entstandene H-Glu(NH₂)-Asp(NH₂)-Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH₂·Trifluoracetat nach Entfernung des Säurerestes mit Z-Cys(Bzl)-Phe-Val-ONP [aus Z-Cys(Bzl)-Phe-OH⁸ und H-Val-ONP·HBr¹¹] – Schmp. 178–179° (Acetonitril); $[\alpha]_D^{25} = -45,3^\circ$ ($c = 1,0$, DMF);



zur Reaktion gebracht. Das so erhaltene vollgeschützte IV: Ausbeute: 77%; Schmp. 244–245° (DMF/Äthanol); $[\alpha]_D^{25} = -54,8^\circ$ ($c = 1,0$, DMF);



ergab nach Abspaltung der Schutzgruppen mit Natrium in flüssigem Ammoniak und Aufarbeitung analog II das elektrophoretisch einheitliche IV mit der Aminosäureanalyse (Hydrolyse 72 h, 105°): Asp_{1,00}, Glu_{1,08}, Pro_{1,09}, Gly_{1,14}, Val_{1,01}, Cys_{1,62}, Leu_{1,01}, Phe_{1,00}, NH₃_{2,44}¹⁵.

Summary. Four new analogues of oxytocin, i.e. Phe²-Ser⁴-Ileu⁸-oxytocin, Phe³-Ser⁴-Ileu⁸-oxytocin, Gly⁴-Ileu⁸-oxytocin and Phe²-Val³-oxytocin have been synthesized and their biological activities compared with those of oxytocin (Syntocinon®).

E. KLEIGER

Hauptlaboratorium der Schering AG., Berlin-West
(Deutschland), 13. März 1967.

¹¹ K. LÜBKE und E. SCHRÖDER, Z. Naturf. 16b, 765 (1961).

¹² P.-A. JAQUENOUD und R. A. BOISSONNAS, Helv. chim. Acta 42, 788 (1959).

¹³ M. BODANSKY und V. DU VIGNEAUD, J. Am. chem. Soc. 81, 6072 (1959).

¹⁴ K. JOŠT, J. RUDINGER und F. ŠORM, Colln Czech. chem. Commun. Engl. Edn 28, 1706 (1963).

¹⁵ Für die Durchführung der präparativen Arbeiten danke ich Fr. I. BAGANZ und Herrn P. NOWACK, für die biologischen Teste Herrn Dr. R. HEMPEL.

Die Veränderung des Stärke-, Protein- und RNS-Gehaltes von *Lemna minor* L. unter dem Einfluss von Kinetin (6-Furfurylaminopurin)

Kinetin vermag in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-8}$ M/ml Nährösung das Wachstum (Vermehrung der Gliederzahl) der Wasserlinse *Lemna minor* L. nahezu vollständig zu hemmen¹. Da die Photosynthese primär von der hemmenden Wirkung nicht betroffen wird, resultiert eine ungewöhnliche Stärkeanhäufung in den Chloroplasten, welche eine sekundäre Hemmung der CO₂-Fixierung verursacht und nach einiger Zeit zum Platzen der Chloroplasten führt².

Eine ähnliche Speicherung von Stärke, jedoch ohne sichtbare Zerstörung der Plastiden, wurde bei Stickstoffmangel^{3,4} und bei höheren CO₂-Konzentrationen (2%) und Beleuchtungsstärken (30 000–50 000 Lux) beobachtet². Es liegt die Vermutung nahe, dass die kinetininduzierte Stärkeanhäufung in den Gliedern der *Lemna minor* durch eine Störung des Stickstoff- bzw. Proteinmetabolismus bedingt ist.

Kinetin scheint vor allem in den Stoffwechsel der Proteine und Nucleinsäuren, namentlich der RNS einzugreifen^{5–7}. Wir hielten es deshalb für sinnvoll, die Veränderungen des Stärke-, Protein- und RNS-Gehaltes unserer Versuchspflanzen unter dem Einfluss von $3 \cdot 10^{-8}$ M Kinetin/ml Nährösung über eine gewisse Zeit zu verfolgen. Da Vorversuche eine rasche Kinetinwirkung andeuteten, ernteten wir im Unterschied zu den meisten bisher publizierten Untersuchungen mehrere Proben bereits im Laufe der ersten 60 min.

Methodik. Die auf einer mineralischen Nährösung «H₈»² unter konstanten Bedingungen (Dauerbelichtung mit Philips Fluoreszenzröhren TL 40W/33, 4700 ± 50 Lux und 27 ± 0,5°C auf der ganzen Kulturläche) aseptisch kultivierten Versuchspflanzen *L. minor* L. No. 1102 wurden 24 h vor Versuchsbeginn auf neue Nährösung (40 ml in 150 ml-Erlenmeyerkolben mit Schaumstoffte-

turen) überimpft. Zur Zeit 0 wurde der Hälfte der Kulturen Kinetin bis zur obigen Konzentration zugegeben. Nach 1/4, 1/2, 1, 2, 4, 8, 24 h und nach 2, 3 und 4 Tagen ernteten wir die Pflanzen von je 6–8 Kulturgefäßen aus der Kinetin- und Kontrollreihe, spülten kurz mit destilliertem Wasser und töteten das Material mit heißem 80%igem Methanol. Nach Abfiltrieren wurde der getrocknete Rückstand gewogen und zur Bestimmung des Stärke-, Protein- und RNS-Gehaltes verwendet. Die Filtrate der beiden Versuchsreihen zeigten in bezug auf die Menge der gelösten Stoffe keine Unterschiede. Die Extraktion geschah nach^{8,9}. Die RNS wurde spektralphotometrisch bei 260 nm bestimmt, wobei als Standard gleichbehandeltes Na-Nucleat purum Fluka diente. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration verwendeten wir die «Micro-tannic»-Methode¹⁰ und zur Bestimmung der Stärke einen modifizierten Anthrontest¹¹.

Resultate und Diskussion. Der Stärkegehalt der Kinetinkulturen steigt in der beobachteten Zeit sowohl absolut als auch relativ zu den Kontrollen ständig an (Figur 1),

¹ K. H. ERISMANN, in Vorbereitung.

² K. H. ERISMANN und F. WEGNER, Flora, Jena im Druck (1967).

³ A. MOYSE, in *Biochemistry of Chloroplasts* (Ed. T. W. GOODWIN; Academic Press London and New York 1967), p. 91.

⁴ J. RUFENER, Dissertation, Pflanzenphysiologisches Institut und Institut für Organische Chemie der Universität Bern (1966).

⁵ Y. OOTA, A. Rev. Pl. Physiol. 15, 17 (1964).

⁶ H. BRANDES und M. BOPP, Naturwissenschaften 52, 521 (1965).

⁷ A. SWEJKOWSKA und A. HANDSU, Acta Soc. Bot. Pol. 34, 73 (1965).

⁸ R. WOLLGIEHN und B. PARTHIER, Flora, Jena 154, 325 (1963).

⁹ N. W. PIRIE, in *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse* (Ed. K. PAECH und M. V. TRACEY; Springer Verlag Göttingen, 1955) vol. 4, p. 246.

¹⁰ W. MEJBbaum-KATZENELLENBOGEN, Acta biochim. pol. 2, 279 (1955).

¹¹ R. FLURI, Arch. Mikrobiol. 33, 195 (1959).