

SPECIALIA

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces brèves communications. – Für die Kurzmitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed in the authors' brief reports. – Ответственность за короткие сообщения несёт исключительно автор. – El responsable de los informes reducidos, está el autor.

Über Peptidsynthesen, XLVI. Synthese kininliefernder Kininogensequenzen¹

Aus peptischem Rinderserumkininogen-Hydrolysat isolierte HABERMANN^{2,3} zwei kininliefernde Peptide (PKFL und PKFS)⁴, die direkt nur schwach auf glattmuskuläre Organe wirken. Für das zu 80–90% entstehende PKFL wurde nach Abbaustudien H-Met-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-Ser-Val-Gln-OH⁵ (I) für das PKFS H-Met-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-Ser-Val-Gln-Val-Met(?) -OH (II) als Aminosäuresequenz ermittelt^{6,7}.

Zur Bestätigung der von HABERMANN et al. publizierten Struktur haben wir PKFL auf 3 Wegen und PKFS auf einem Weg synthetisiert (vgl. ⁸). Während auf dem ersten Weg, einer Fragmentkondensation aus Di-BOC-Met-Lys-Bradykinin^{5,9} und Tri- beziehungsweise Tetrapeptid-tert. Butylester (11+3 beziehungsweise 11+4), Razemisierung am Arg¹¹-Rest eintrat und auf dem zweiten Weg für PKFL ausgehend vom C-terminalen Tripeptid-tert. Butylester auf der Stufe des Dodekapeptids die katalytische Hydrierung des eingebauten Arg(NO₂)¹¹-Restes nur äusserst unvollständig gelang, brachte der dritte Syntheseweg, die schrittweise Verlängerung um Dipeptideinheiten mit protonierten Arg-Resten, befriedigende Ergebnisse.

1. *Fragmentkondensation 11+3 beziehungsweise 11+4.* Cbo-Ser-Val-Azid wurde mit H-Gln-OtBu beziehungsweise H-Gln-Val-OtBu kondensiert und nach Hydrogenolyse mit Di-BOC-Met-Lys-Bradykinin-OH·2HCl⁹ nach der Carbodiimid-Methode in DMF umgesetzt (40–50% Überschuss Di- beziehungsweise Tripeptid). BOC-Abspaltung mit 95%iger Trifluoressigsäure, Chromatographie an Carboxymethylzellulose und präparative Elektrophorese lieferte elektrophoretisch einheitliches PKFL (Ia) beziehungsweise PKFS (IIa). Aminosäureanalyse (Hydrolyse 72 h, 105°): PKFL: Met_{0,79}, Lys_{1,00}, Arg_{1,73}, Pro_{3,22}, Gly_{0,99}, Phe_{2,00}, Ser_{1,53}, Val_{0,94}, Glu_{0,94}; PKFS: Met_{0,78}, Lys_{1,02}, Arg_{1,83}, Pro_{3,31}, Gly_{1,06}, Phe_{2,00}, Ser_{1,53}, Val_{1,39}, Glu_{0,88}. Nach enzymatischem Abbau (LAP, Tr, CPA) sind beide Produkte zu ca. 5% am Arg¹¹ razemisiert und enthalten ca. 20% Methioninsulfoxid.

2. *Synthesen über Dipeptideinheiten.* a) Mit geschützter Guanidinogruppe: Zur Synthese wurde H-Ser-Val-Gln-OtBu beziehungsweise H-Ser-Val-Gln-Val-OtBu mit BOC-Arg(NO₂)-OH¹⁰ kondensiert und nach BOC- und tert. Butylester-Abspaltung mit Trifluoressigsäure über Salzkupplung mit Cbo-Pro-Phe-NHNH₂¹¹, Cbo-Phe-Ser-NHNH₂^{11,12}, Cbo-Pro-Gly-NHNH₂¹³, Smp. 142–143°, $[\alpha]_D^{25} = -61^\circ$ ($c = 1,95$, AcOH) (Azidbildung mit tert. Butylnitrit)¹⁴ und schliesslich mit Cbo-Arg(NO₂)-Pro-OH¹⁵ nach der Anhydrid-Methode zum ω -geschützten Cbo-Bradykinin-Ser-Val-Gln-OH beziehungsweise -Ser-Val-Gln-Val-OH verlängert. Die Decarbobenzoxylie-

erfolgte jeweils durch HBr/Eisessig-Behandlung. Durch unvollständige katalytische Hydrierung des Arg(NO₂)¹¹-Restes im Dodeca- beziehungsweise Tridecapeptid-Derivat in Methanol/Eisessig/Wasser (6:1:1) mit Pd-Mohr wurden nach präparativer Elektrophorese nur ca. 10% Bradykinin-Ser-Val-Gln-OH (IIIb): Arg_{1,82m}, Pro_{2,98}, Gly_{1,03}, Phe_{2,00}, Ser_{1,50}, Val_{1,03}, Glu_{0,96}; $[\alpha]_D^{25} = -97,0^\circ$ ($c = 0,5$, H₂O) beziehungsweise ca. 3% Bradykinin-Ser-Val-Gln-Val-OH (IVb): Arg_{2,26}, Pro_{3,70}, Gly_{1,03}, Phe_{2,00}, Ser_{1,57}, Val_{1,52}, Glu_{0,84} in reiner Form isoliert.

Aus IIIb·2HCl und BOC-Met-Lys(BOC)-Azid⁹, Abspaltung der Schutzgruppen mit 95%iger Trifluoressigsäure unter N₂ und Carboxymethylzellulose-Säulenreinigung wurde einheitliches PKFL (Ib) erhalten: Met_{0,72}, Lys_{0,97}, Arg_{1,78}, Pro_{3,13}, Gly_{1,01}, Phe_{2,00}, Ser_{1,46}, Val_{0,98}, Glu_{0,86}; $[\alpha]_D^{25} = -98,7^\circ$ ($c = 0,5$, H₂O).

b) Mit freier Guanidinogruppe: Kondensation von Cbo-Arg(NO₂)-OCO₂C₂H₅ mit H-Ser-Val-Gln-OtBu und an-

¹ XLV. Mitt.: E. KIEGER, Justus Liebig's Ann. Chem., 724, 204 (1969).

² E. HABERMANN, Arch. exp. Path. Pharmacol. 251, 187 (1965).

³ E. HABERMANN und B. MÜLLER, Arch. exp. Path. Pharmacol. 253, 464 (1966).

⁴ PKF = Peptische kininliefernde Fragmente; PKF «L» bzw. «S»: bei Papierchromatographie langsamer bzw. schneller wandernde ininkliefernde Fraktion.

⁵ Alle Aminosäuren 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, ferner nach den Regeln der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 256 (1967).

⁶ E. HABERMANN, Arch. exp. Path. Pharmacol. 253, 474 (1966).

⁷ E. HABERMANN, G. BLENEMANN und B. MÜLLER, Arch. exp. Path. Pharmacol. 253, 444 (1966).

⁸ E. HABERMANN, in *Hypotensive Peptides*, Proceedings of the Internat. Symposium, 25–29 October 1965, Florence, Italy (Ed. E. G. ERDÖS, N. BACK, F. SICUTERI und A. F. WILDE; Springer Verlag, New York 1966), p. 116.

⁹ E. SCHRÖDER, Experientia 20, 39 (1964).

¹⁰ K. HOFMANN, W. HAAS, M. J. SMITHERS, R. D. WELLS, Y. WOLMAN, N. YANAIHARA und G. ZANETTI, J. Am. chem. Soc. 87, 620 (1965).

¹¹ E. SCHRÖDER und H. GIBIAN, Justus Liebig's Ann. Chem. 673, 176 (1964).

¹² R. A. BOISSONNAS, St. GUTTMANN und P.-A. JAQUENOUD, Helv. chim. Acta 43, 1349 (1960).

¹³ N. YANAIHARA und M. SEKIYA, Chem. Pharm. Bull. 15, 82 (1967).

¹⁴ J. HONZL und J. RUDINGER, Coll. Czech. chem. Commun. 26, 2333 (1961).

¹⁵ M. A. ONDETTI, J. med. Chem. 6, 10 (1963).

schliessende Hydrierung mit Pd-Mohr in Methanol/Eisessig/Wasser (6:1:1) lieferte H-Arg-Ser-Val-Gln-OtBu·Acetat. Nach Protonierung der freien Guanidinogruppe mit einem Äquivalent HCl lieferte eine stufenweise Kondensation von Dipeptideinheiten und nachfolgende Hydrogenolysen Bradykinin-Ser-Val-Gln-OtBu·HCl, das mit Cbo-Lys(BOC)-OH (DCCI/N-Hydroxysuccinimid) zum Tridecapeptid-Derivat und nach Hydrierung mit BOC-Met-Azid zum Di-BOC-Met-Lys-Bradykinin-Ser-Val-Gln-OtBu verlängert wurde: Met_{0,83}, Lys_{1,02}, Arg_{2,18}, Pro_{3,34}, Gly_{1,05}, Phe_{1,97}, Ser_{1,58}, Val_{1,00}, Glu_{1,03}; $[\alpha]_D^{25} = -129,5^\circ$ ($c = 0,5$, H₂O). Nach Entfernung der Schutzgruppen mit 95%iger Trifluoressigsäure unter N₂ und Reinigung durch präparative Elektrophorese bei pH 2

wurde einheitliches PKFL (Ic) isoliert; Ausbeute 60%. Met_{0,87}, Lys_{1,05}, Arg_{1,96}, Pro_{2,98}, Gly_{1,06}, Phe_{1,98}, Ser_{1,63}, Val_{1,01}, Glu_{1,00}; $[\alpha]_D^{25} = -93^\circ$ ($c = 0,5$, H₂O). Tert.-Butylester-Abspaltung von Bradykinin-Ser-Val-Gln-OtBu mit Trifluoressigsäure und Überführung in das Azetat lieferte freies Bradykinin-Ser-Val-Gln-OH (IIIc): Arg_{1,85}, Pro_{3,10}, Gly_{0,91}, Phe_{1,95}, Ser_{1,37}, Val_{1,00}, Glu_{0,90}; $[\alpha]_D^{25} = -89,5^\circ$ ($c = 0,5$, H₂O).

Von den synthetisierten Verbindungen Ia–c, IIa, IIb, c und IVb wurden direkt und nach Inkubation mit Trypsin, Crotalus-adamanteus-Gift, Pankreas-Kallikrein, Carboxypeptidase A die Aktivitätsäquivalente (γ Bradykinin/mg Peptid) am Meerschweinchenileum bestimmt, vgl. ⁸⁾ ¹⁶.

Summary. H-Met-Lys-bradykinin-Ser-Val-Gln-OH and H-Met-Lys-bradykinin-Ser-Val-Gln-Val-OH, sequences of bovine serum kininogen have been synthesized by different approaches. The natural and synthetic peptides were tested for their kinin liberating potency.

E. SCHRÖDER

unter Mitarbeit von M. LEHMANN

Hauptlaboratorium der Schering AG.,

D-1 Berlin-West (Deutschland), 14. Juli 1969.

Peptid	Trypsin	Crotalus-adamanteus-Gift	Pankreas-Kallikrein	CPA	Meerschweinchenileum (direkt)
Natürlich I	350	300	80	90	2
Ia	160	80	60	— ^a	3
Ib	— ^a	175	— ^a	— ^a	3
Ic	400	175	100	100	3
IIa	— ^a	40	— ^a	— ^a	3
IIb	— ^a	500	— ^a	— ^a	1,5
IIIc	500	500	500	600	0,5
IVb	— ^a	450	— ^a	— ^a	0,4

^a nicht getestet.

¹⁶ Herrn Prof. Dr. E. HABERMANN danken wir für die Ausführung der biologischen Tests.

Solid Phase Synthesis and Some Pharmacological Properties of 8-Glutamine-Oxytocin: a Possible Intermediate in the Evolution of the Neurohypophysial Hormones¹

It has been suggested that 8-glutamine-oxytocin could be an intermediate in the evolution of the neurohypophysial hormones². The isolation and characterization of an 8-glutamine substituted analog of oxytocin, glutitocin (4-Ser-8-Gln-oxytocin), from the elasmobranchs *Raia clavata*³, *R. batis*, *R. fullonica* and *R. naevus*⁴ gave further support to this hypothesis. Thus it had been suggested that an unidentified oxytocic principle, designated as EOP 1 (elasmobranch oxytocin-like principle 1)⁵ which has recently been shown not to be glutitocin⁶ might in fact be 8-glutamine-oxytocin⁷. To determine whether or not this might be the case, the synthesis of 8-glutamine-oxytocin was carried out by the MERRIFIELD solid phase method⁸ as applied to the synthesis of oxytocin⁹ and glutitocin¹⁰. The synthetic product has been pharmacologically evaluated by methods previously described^{5,11}. The results obtained together with the corresponding data for EOP 1 are presented in the Table.

The required protected nonapeptide amide intermediate was synthesized in a stepwise manner beginning with 3.0 g of t-butyloxycarbonylglycyl resin containing 0.591 mmole of glycine according to the general procedure of MERRIFIELD¹², using the modification previously described^{9,10}. 8 cycles of deprotection, neutralization and coupling were carried out with appropriate Boc-amino acids¹³ producing the protected nonapeptide esterified to the resin. Boc-amino acids with protected side chains were S-Bzl-Cys, and O-Bzl-Tyr. The final cysteine residue was added as the N-Carbobenzoxymethyl-S-Benzyl (N-Z-S-Bzl) derivative. All coupling reactions to form peptide

bonds were mediated by dicyclohexylcarbodiimide¹⁴ in methylene chloride except those involving the carboxyl groups of Asn and Gln, which were allowed to react in dimethylformamide (DMF) as their nitrophenyl esters¹⁵.

¹ (a) This work was supported in part by a Studentship (to J.W.M.B.) and a Grant (to M.M.) from the Medical Research Council of Canada, an award (to T.C.W.) from the Banting Research Foundation, a National Science Foundation Grant No. GB 4932 and a General Research Support Grant to Columbia University from the National Institutes of Health. (b) An abstract of this work was presented at the 5th Annual Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, July, 1968; M. MANNING, T. C. WU, J. W. M. BAXTER and W. H. SAWYERS, FEBS 1968 Meeting, Prague, Abstr. 824, p. 206.

² J. F. G. Vliegenthart and D. H. G. Versteeg, Proc. K. ned. Akad. Wet. B, 68, 131 (1965).

³ R. Acher, J. Chauvet, M. T. Chauvet and D. Crepy, Biochim. biophys. Acta 107, 393 (1965).

⁴ R. Acher, Angew. Chem. 5, 798 (1966).

⁵ W. H. Sawyer, Gen. comp. Endocrin. 5, 427 (1965).

⁶ W. H. Sawyer, M. Manning, E. Heinicke and A. M. Perks, Gen. comp. Endocrin. 12, 389 (1969).

⁷ W. H. Sawyer, Gen. comp. Endocrin. 9, 303 (1967).

⁸ R. B. Merrifield, J. Am. chem. Soc. 85, 2149 (1963); Science 150, 178 (1965).

⁹ M. Manning, J. Am. chem. Soc. 90, 1348 (1968).

¹⁰ M. Manning, T. C. Wu, J. W. M. Baxter and W. H. Sawyer, Experientia 24, 659 (1968).

¹¹ W. H. Sawyer, The Pituitary Glands (Ed. G. Harris and B. Donovan; Butterworths, London 1966), vol. 3, p. 288.

¹² R. B. Merrifield, Biochemistry 3, 1385 (1964); G. R. Marshall and R. B. Merrifield, Biochemistry 4, 2394 (1965).