

OEHME et al.¹⁴ fanden für C-terminale Eledoisinpeptide durch Einbau von Hydrazidbindungen, dass diese Wirkungszunahme bei Störung der normalen Polyamidstruktur ausbleibt. Bei allen Analogen des El und Ph stimmen hypotensiver Effekt und glattemuskuläre Wirkung hinsichtlich ihrer Grössenordnung gut überein¹⁵, so dass zur Prüfung der Sequenzabhängigkeit der Wirksamkeit auch Befunde am Meerschweinchen-Ileum aussagefähig sind.

Material und Methoden. Die SP-Sequenzen wurden durch schrittweise Anknüpfung der Boc-Aminosäuretrichlorphenylester bzw. bei Boc-Gln und Boc-Arg(NO₂) über die gemischten Anhydride aufgebaut. 3-Lys wurde über Bpoc-Lys(Boc)-OTcp, 2-Pro als Bpoc-Pro-OTcp und 1-Arg als Boc-Arg(NO₂) angekuppelt. Die Aminoschutzgruppen wurden mit HCl, die NO₂-Gruppe mit HF abgespalten. Alle Peptide waren nach Reinigung elektrophoretisch und chromatographisch einheitlich. Sie zeigten die erwarteten Aminosäureanalysen. Die Synthese ist als Schema in Figur 2 dargestellt. Eine ausführliche Veröffentlichung darüber ist in Vorbereitung¹⁶. Zur biologischen Methodik und Versuchsauswertung vgl. OEHME et al.^{17,18}. Die Penta- bis Undekapeptide wurden in dieser Arbeit am Organ stets mit einem Lys-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH₂-Standard verglichen.

Ergebnisse und Diskussion. In der Tabelle sind die relativen Aktivitäten der freien Peptide 5b bis 11c sowie einige analytische Daten zusammengestellt. Die relativen Aktivitäten (Verhältnis der ED₅₀-Werte) wurden auf SP = 100 bezogen. Die ED₅₀ für SP wurde am Meerschweinchen-Ileum in vitro mit 5×10^{-9} M ermittelt. SP-Sequenzen zeigen wie bei El und Ph, dass die Wirksamkeit bei 8 bis 9 Aminosäureresten ein Maximum durchläuft. Die Abhängigkeit der Wirkung von der Kettenlänge ist für diese 3 Peptide in Figur 3 dargestellt.

Der Gang der biologischen Aktivität weist eine grössere Ähnlichkeit zwischen den entsprechenden SP- und Ph-Sequenzen gegenüber El auf, was durch die grösseren Gemeinsamkeiten im C-terminalen Bereich in Position 8 (vgl. Figur 1) zu erklären ist.

Interpretiert man die mit schrittweiser Sequenzverlängerung auftretende Wirkungssteigerung als Verstärkereffekt und bezieht auf die essentielle C-terminale Pentapeptidsequenz (wie auch aus der Tabelle, Spalte 5, hervorgeht), so ergibt sich für SP ein ähnliches Bild der Wirkungsverstärkung wie für El und Ph-Sequenzen (vgl. auch¹⁴). Das spricht für einen gleichen Wirkungsmechanismus der 3 Peptide. Man kann somit Eledoisin- und Physalaeminpeptide, die bisher als unphysiologische Peptidwirkstoffe anzusehen waren, als Strukturanaloga der bei Warmblütlern vorkommenden und möglicherweise Regulationsfunktionen ausübenden SP betrachten.

Summary. Substance P has been synthesized by stepwise coupling of trichlorophenyl esters or mixed anhydrides of Boc- or Bpoc-protected amino acids. In the guinea-pig ileum the contractions of N-terminal shortened substance P peptides are estimated and discussed in relation to the chain length. The octapeptide is the most effective, similar to what is known of eledosin and physalaemin C-terminal sequences.

J. BERGMANN, M. BIENERT, H. NIEDRICH,
B. MEHLIS und P. OEHME²⁰

Zentralinstitut für Molekularbiologie der Akademie der Wissenschaften der DDR, Bereich Wirkstoffforschung, Wilhelmstrasse 4, DDR-1136 Berlin-Friedrichsfelde (DDR), 3. September 1973.

¹⁶ M. BIENERT, J. prakt. Chem., in Vorbereitung.

¹⁷ P. OEHME, J. BERGMANN, H. NIEDRICH, F. JUNG und G. MENZEL, Acta biol. med. germ. 25, 613 (1970).

¹⁸ P. OEHME, J. BERGMANN, M. FALCK, J. G. REICH, W. E. VOGT, H. NIEDRICH, J. PIRRWITZ, CH. BERSECK und F. JUNG, Acta biol. med. germ. 28, 109 (1972).

¹⁹ E. SCHNABEL und A. OBERDORF, in *Protein and Polypeptide Hormones*, Proc. Int. Sympos., Liège 1968 (Ed. MARGOULIS; Excerpta Med. Int. Congress Series, No. 101) p. 224.

²⁰ Für zuverlässige Assistenz sei den Mitarbeiterinnen M. EICHSTÄDT, M. KÜHLER und M. RUDEL herzlich gedankt.

The Effects of Some Tetracycline Derivates on Ehrlich Ascites Carcinoma and HeLa Cells in vitro

In our screening program of microbial metabolites as the potential cancerostatics, we are interested in the effects of some derivatives of tetracycline (TC) on Ehrlich ascites carcinoma (EAC) and HeLa cells. VDOVICENKO studied the effect of TC on respiration or on the absorption of oxygen by EAC cells, and he found that TC

inhibited the endogenous respiration of cancer cells¹⁻³. From the other substances with tetracycline character, 6-demethyl-6-desoxytetracycline suppressed the growth of mammary adenocarcinoma 755, sarcoma 180, Ehrlich ascites carcinoma and lymphocytic leukemia L 1210⁴. Ekatetron and ekatetron triacetate inhibited the incor-

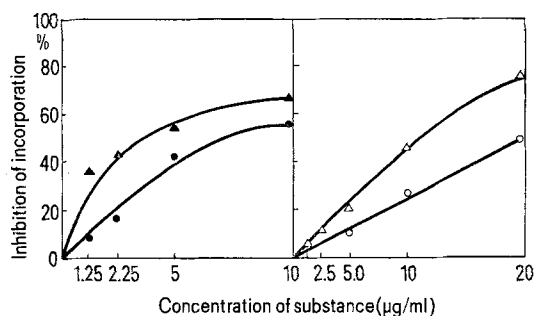


Fig. 1. Inhibition of incorporation of ¹⁴C-labelled precursors of proteo and nucleic acids synthesis in EAC cells by anhydrotetracycline. ●, adenine; ▲, L-valine; ○, thymidine; Δ, uridine.

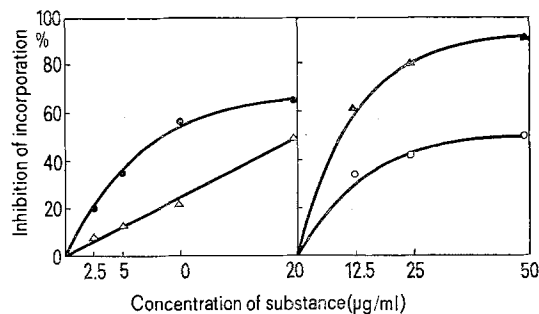


Fig. 2. The effect of 12a-deoxydimethylaminotetracycline on the incorporation of ¹⁴C-labelled precursors into EAC cells. ●, adenine; ▲, L-valine; ○, thymidine; Δ, uridine.

poration of ^{14}C -labelled precursors of proteins and nucleic acids synthesis into the cold TCA-insoluble fractions of EAC cells⁵. In the present paper, the cytoinhibitory effects of some TC derivatives were evaluated in vitro. These derivatives can arise in the course of biosynthesis of TC⁶, or as the degradation product in the process of the isolation of TC⁷, or as the products of chemical degradation of TC^{8,9}.

Material and methods. In our experiments we used TC. HCl provided by Biotika, Slovenská Lupča (ČSSR); anhydro TC, 12 α -deoxydedimethylamino TC and 4 α , 12 α -anhydrodedimethylamino TC were prepared by the degradation of TC^{8,9}. We evaluated the cytoinhibitory effect of given substances on EAC cells in vitro by the method based on inhibition of incorporation of ^{14}C -labelled precursors into the cold TCA-insoluble fractions of EAC cells¹⁰. As the precursors adenine-8- ^{14}C sulphate (0.187 $\mu\text{Ci}/1.02 \mu\text{g}$), L-valine- $^{14}\text{C}/\text{U}$ (0.165 $\mu\text{Ci}/2.64 \mu\text{g}$), uridine- $^{14}\text{C}/\text{U}$ (0.160 $\mu\text{Ci}/2.2 \mu\text{g}$) and thymidine-2- ^{14}C (2.2 $\mu\text{Ci}/12 \mu\text{g}$) were used. The incorporation of added precursors into EAC cells was measured in a precipitate obtained after filtration. The radioactivity of the dried precipitate was determined on a flow-type counter TESLA NZR 601 (ČSSR), using a propane-butane-argon mixture as the carrier gas.

The substances were dissolved in a pure DMSO. From basic solution of each substance (10 mg/ml), a number of appropriate dilutions were prepared, from which always 1% (v/v) was added into 1 ml of cells suspension.

Results and discussion. First we evaluated the effect of TC on EAC cells. The substance added in concentration 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ into the reaction mixture slightly inhibited the incorporation of adenine, L-valine and uridine, but the

incorporation of thymidine was not influenced when the substance was present in concentration 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. It can be concluded that TC in concentration 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and less was without effect on cancer cells.

Of the 3 TC derivatives studied, the anhydro TC is the most nearly related to TC. Anhydro TC inhibited the incorporation of all added precursors, but the synthesis of proteins – judging from the inhibition of L-valine incorporation – was the most influenced (Figure 1). The same substance decreased the growth of HeLa cells in concentrations 10 times less (Table). The substance 12 α -deoxydedimethylamino TC in equal measure influenced the incorporation of L-valine and adenine. Concentration of 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of substance caused 50% inhibition. From precursors of nucleic acids synthesis, uridine was more expressly inhibited than thymidine (Figure 2). The cytotoxic effect of this substance is shown in the Table.

The most effective of the tested derivatives of TC was 4 α , 12 α -anhydrodedimethylamino TC. As well as the TC and its 2 given derivatives also this substance influenced above all the incorporation of L-valine, i.e. proteo-synthesis (in concentration 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and the RNA synthesis in approximately double the concentration (Figure 3). The given substance suppressed, in 50 times smaller concentration, the growth of HeLa cells, comparing it with TC effect (Table). From the results obtained it can be concluded that all 3 tested derivatives of TC influenced the proteo or RNA synthesis in EAC cells in the first place, as well as TC in bacteria. Anhydro TC arises quickly from TC in water solution at pH 1–2 in the course of the isolation of the pure TC. It can be supposed that the substance can arise also in macro-organisms when it is administered per os, and can cause relatively higher cytotoxicity of TC preperates.

Zusammenfassung. In-vitro-Nachweis der Hemmung der Proteo- und Nukleosynthese in den EAC-Zellen, sowie des Wachstums der HeLa-Zellen mit folgenden Derivaten des Tetracyklins: Anhydrotetracyklin, 4 α , 12 α -Anhydrodedimethylaminotetracyklin und 12 α -Deoxydedimethylaminotetracyklin.

J. FUSKA, M. PODOJIL¹², ALŽBETA FUSKOVÁ and Z. VANĚK¹²

Department of Microbiology and Biochemistry, Faculty of Chemistry, Slovak Polytechnical University, Jánka 1, Bratislava (Czechoslovakia), 20 August 1973.

The effect of tetracycline and its derivatives on the growth of HeLa cells

Substance	Inhibition of growth of HeLa cells	
	ED ₅₀	ED ₁₀₀
	(μg/ml)	
Tetracycline · HCl	30.0	50.0
Anhydrotetracycline	2.5	5.0
4 α , 12 α -anhydrodedimethylaminotetracycline	0.43	1.0
12 α -deoxydedimethylaminotetracycline	1.4	10.0

The growth of HeLa cells was evaluated by the modified method of OYAMA and EAGLE¹¹.

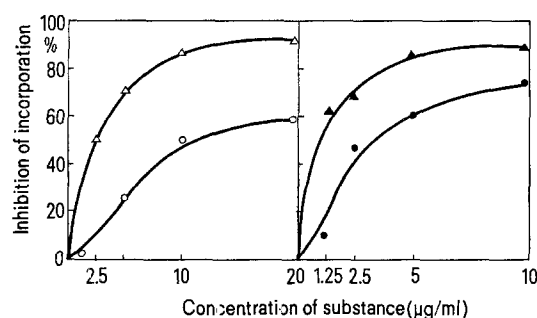


Fig. 3. The influence of 4 α , 12 α -anhydrodedimethylaminotetracycline on the incorporation of ^{14}C -labelled precursors into EAC cells. ●, adenine; ▲, L-valine; ○, thymidine; △, uridine.

¹ V. I. VDOVIČENKO, Antibiotiki 14, 18 (1969).

² V. I. VDOVIČENKO, Antibiotiki 15, 15 (1970).

³ V. I. VDOVIČENKO, Antibiotiki 15, 50 (1970).

⁴ J. KENNT, US patent No. 3326761.

⁵ J. FUSKA, M. PODOJIL, A. FUSKOVÁ and Z. VANĚK, Symposium on Mechanisms of Action of Cytostatic Agents (Abstract Book, Budapest 1972), p. 24.

⁶ J. R. D. MCCORNICK, P. A. MILLER, S. JOHNSON, N. H. ARNOLD and N. O. SJOLANDER, J. Am. chem. Soc. 84, 3023 (1962).

⁷ R. C. EWANS, The Technology of the Tetracyclines (Quadrangle Press, New York 1968), p. 350.

⁸ R. BROSHARD and G. KRUPKA, US patent No. 2744931.

⁹ A. GREEN, R. C. WILKINSON and J. H. BOOTHE, J. Am. chem. Soc. 82, 3946 (1960).

¹⁰ J. FUSKA, M. MIKO, P. NEMEC and Ľ. DROBNICA, Neoplasma 18, 631 (1971).

¹¹ V. I. OYAMA and H. EAGLE, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 91, 305 (1956).

¹² Institute of Microbiology, Czechoslovak Academy of Sciences, Praha.