

Synthese von Polypeptid-Wirkstoffen¹

Von R. SCHWYZER

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung
und Chemisches Institut der Universität Zürich

Einleitung

Zu den *Polypeptiden* werden gewöhnlich diejenigen Verbindungen gezählt, welche bei der Hydrolyse in mehrere Aminosäuremoleküle zerfallen und – im Gegensatz

zu den Proteinen – durch Zellophanmembrane hindurch dialysieren. Die obere Grenze der Molekulargewichte liegt somit in der Gegend von 10000, was etwa 80 bis 90 Aminosäuren in peptidischer Bindung entspricht. Die kleinsten Polypeptide mit nur etwa 3 oder 4 Aminosäureresten sind oft Stoffe mit durchaus normalen Eigenschaften; mit zunehmendem Molekulargewicht – etwa um 700 bis 1000 herum – ändern sich diese zusehends:

¹ Nach Vorträgen vor der Berner Chemischen Gesellschaft am 6. Dezember 1956 und der gemeinsamen Tagung der deutschen und schweizerischen physiologischen Chemiker in Basel am 26. September 1957.

die normale Löslichkeit und Kristallisationsfähigkeit nimmt ab, und die Tendenz, Begleitstoffe stark zu adsorbieren, nimmt zu. Die Isolierung, Reindarstellung und chemische Bearbeitung solcher natürlicher und synthetischer Polypeptide ist mit den klassischen Methoden der organischen Chemie daher kaum mehr möglich.

Seit den bekannten ersten Erfolgen von EMIL FISCHER, THEODOR CURTIUS und MAX BERGMANN ist es deshalb in Kreisen von organischen Chemikern relativ still um diese lebenswichtige Klasse von Naturstoffen geworden – wenigstens was Vertreter mit mehr als drei Aminosäureresten betrifft. Erst die Entdeckung der Verteilungschromatographie vor etwa zehn Jahren und die Entwicklung der Methoden der multiplikativen Verteilung, der Ionenaustauschchromatographie und der Träger-elektrophorese vermochten die schwierige Sachlage etwas zu mildern, indem sie die Isolierung und Bausteinanalyse auch sehr geringer Mengen von Polypeptiden ermöglichten. In der Folge sind bereits eine ganze Reihe natürlich vorkommender Polypeptide mit zum Teil außerordentlich starken biologischen Wirkungen entdeckt und konstitutionell soweit geklärt worden, daß ihre Aminosäurereihenfolge heute genau angegeben werden kann.

Unter diesen Polypeptiden befinden sich Hormone, Antibiotika und Toxine, deren einfacher Aufbau aus gewöhnlichen Aminosäureresten ihre Spezifität und hohe Wirksamkeit kaum vermuten ließe. Einige Hypertensinpeptide mit nur 8 Aminosäureresten sind z. B. an gewissen Tieren mehr als 100 mal wirksamer als Noradrenalin auf molekularer Basis und wirken erhöhend auf den Blutdruck noch in Verdünnungen von 1 g Hypertensin im Inhalt von mehr als 500 Eisenbahn-Zisternenzügen. Es ist deshalb leicht verständlich, daß in den letzten Jahren die Aufmerksamkeit von Medizinern, Biologen, Biochemikern, Chemikern und Physikochemikern vermehrt auf diese Stoffklasse gelenkt wurde. Zurzeit befindet sich besonders die chemische Bearbeitung in stürmischer Entwicklung.

Von der synthetischen Forschungsrichtung, die wegen besonderer Schwierigkeiten chemischer und technischer Art erst in jüngster Zeit gewisse Anfängerfolge auf dem Polypeptidgebiet zeitigen konnte, wird besonders viel erwartet. Abgesehen von der Bestätigung der auf analytischem Wege gewonnenen Konstitutionsformeln und der Bereitstellung größerer Mengen der durch Isolierungsverfahren nur sehr schwer und in kleinen Mengen zugänglichen Wirkstoffe für andere Forschungsgebiete, dürfte sie besonders viel zur Frage *Konstitution und Wirkung* bei Polypeptiden beizutragen haben.

Es lassen sich mehrere Möglichkeiten erkennen, welche zur Verschlüsselung biologischer Information in einer Polypeptidmolekel dienen können. So kann die Anordnung der Reste der etwa 20 zur Verfügung stehenden Aminosäuren mit der Anordnung von Buchstaben in einem kurzen Satze verglichen werden: wie bei der Sprache, wäre der Sinn in der Sequenz festgelegt. Es stellt sich dann sofort die Frage, inwiefern «Druck-

fehler», bestehend aus Umstellung, Fallenlassen und Austausch von Aminosäureresten und dergleichen mehr, die biologische Wirkung verändern oder vom Organismus übersehen werden. Die Natur scheint sich aber noch andere Möglichkeiten zur Ausstattung von Polypeptiden mit spezifischen Wirkungen offenzuhalten. Erstens können in die Peptidkette Elemente eingebaut werden, welche keine Aminosäuren sind. Im Gegensatz zu den sogenannten *homöomeren* Peptiden, welche bei der Hydrolyse ausschließlich Aminosäuren liefern, werden nach FROMAGEOT² solche Polypeptide *heteromer* genannt.

Eine zweite Möglichkeit besteht darin, weiter voneinander entfernte Atome einer Peptidkette mit covalenten Bindungen zu verknüpfen. Dabei entstehen *zyklische* Peptide. Ist die neue Bindung wiederum peptidartig, so besteht der Ring aus lauter Aminosäuren in peptidischer Bindung, und man wird von einem *homodeten* – einem gleichartig verknüpften – zyklischen Peptid sprechen. Ist die neue covalente Bindung aber keine Peptidbindung, sondern eine andere, z. B. eine Disulfid- oder Esterbindung, so besteht der Ring nicht ausschließlich aus peptidisch verknüpften Aminosäuren, und man spricht von einem *heterodeten* zyklischen Polypeptid³.

Eine dritte Möglichkeit endlich, von der der lebende Organismus höchst wahrscheinlich ebenfalls (besonders bei höhern Polypeptiden und Proteinen – man denke an die Antikörperbildung) Gebrauch macht, ist die Veränderung der räumlichen Gestalt der Polypeptidmolekel durch Nebenvalenzkräfte. Die Form einer solchen Molekel ist nämlich durch die Aminosäuresequenz und Zahl der Peptidbindungen nicht eindeutig bestimmt, sondern kann durch relativ schwache intra- und intermolekulare Bindungskräfte entscheidend beeinflußt werden. Eine bedeutende Rolle spielen dabei die Wasserstoffbrücken, welche Imid- und Oxogruppen verschiedener Peptidbindungen nebenvalenzartig verbinden. Je nachdem, ob die Wasserstoffbrücken zwischen näher oder weiter voneinander entfernten Gruppen derselben oder verschiedener Ketten liegen, wird die Molekel eine andere Gestalt, eine andere Konstellation annehmen.

Von der Lösung solcher Fragen aber, wie derjenigen nach dem Zusammenhang zwischen Konstitution und Wirkung und zwischen Konstellation und Wirkung, sind wir noch weit entfernt. Die bisher vollendeten Synthesen natürlicher Polypeptidwirkstoffe lassen sich bequem an den Fingern abzählen, und dennoch beginnen sich, dank der synthetischen Polypeptidchemie, bereits Beobachtungen anzusammeln, welche uns dem Ziel näher bringen. Davon soll in den nächsten beiden Kapiteln die Rede sein.

Polypeptidwirkstoffe bekannter Konstitution

Bevor wir die Synthesen näher betrachten, wird es nützlich sein, uns die Aminosäuresequenzen einiger Polypeptidwirkstoffe noch einmal zu vergegenwärtigen. Es

² E. BRICAS und C. FROMAGEOT, *Advances Protein Chem.* 8 (1953) 1.

³ R. SCHWYZER, B. ISELIN, W. RITTEL und P. SIEBER, *Helv. Chim. Acta* 39 (1956) 872.

β -MSH																					
Asp	Ser	Gly	Pro	Tyr	Lys	Met	Glu	His	Phe	Arg	Try	Gly	Ser	Pro	Pro	Lys	Asp	Rind			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18				
Asp	Glu	Gly																Schwein			
α -MSH																					
R · Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Try	Gly	Lys	Pro	Val	-NH ₂					Schwein			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13									
ACTH																					
Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Try	Gly	Lys	Pro	Val	Gly	Lys	Lys	Arg	Arg				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18				
Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Asp	Gly	Ala	Glu	Asp	Glu	Leu	Ala	Glu	Ala	Phe	Pro	Leu	Glu	Phe	
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
												Ala	Ser	Glu							Schwein Schaf

Abb. 1. Aminosäuresequenzen der Intermedine (α - und β -MSH) und Corticotropine (ACTH) aus Hypophysen verschiedener Säugetiere

ist hier nicht der Ort, auf die Methoden der Konstitutionsaufklärung einzugehen⁴, sondern ich möchte mich damit begnügen, auf einige konstitutionelle und biologische Eigenschaften hinzuweisen.

Da die Darstellung der Struktur größerer Polypeptide mit den üblichen Strukturformeln außerordentlich platzraubend und unübersichtlich wäre, wird gewöhnlich eine abgekürzte Schreibweise gewählt⁵, bei der die Aminosäurereste durch die ersten Buchstaben ihres Trivialnamens wiedergegeben werden. Ein Kettenende mit freier Aminogruppe erscheint im folgenden immer links in der Formel, ein solches mit freier Carboxylgruppe immer rechts. Wenn nötig werden an diesen Enden Bezeichnungen für eventuelle Substituenten angebracht, sonst seien hier die Elemente des Wassers, H- und OH-, welche zur Vervollständigung der Formel nötig sind, vorausgesetzt. Ebenso wird die natürliche L-Form der Bausteine vorausgesetzt, wo dies nicht zutreffen sollte, wird das besonders vermerkt. Bei der Darstellung zyklischer Peptide liegt die -CO-NH-Reihenfolge der Peptidbindungen im Uhrzeigersinn.

a) Offenkettige Polypeptide

Eine Gruppenaherwandter offenkettiger Polypeptide bilden die Hypophysenhormone Corticotropin (ACTH) und die Intermedine (α - und β -MSH) (Abb. 1)^{6,7}. Die adrenocorticotropen Hormone stimulieren die Hormonausscheidung der Nebennierenrinde, die melanophoren-

stimulierenden Hormone rufen bei Amphibien eine «Ausbreitung der Melanophoren» und somit eine Dunkelfärbung der Haut hervor. Diese Eigenschaft besitzen auch die Corticotropine in geringem Ausmaße. Das mag daran liegen, daß diese Hormone ähnliche Aminosäuresequenzen besitzen. α -MSH und ACTH besitzen gleiche Sequenz der ersten 13 Aminosäuren; beim α -MSH scheint das aminendständige Serin durch einen, eventuell zwei Acetylreste substituiert zu sein, das carboxylendständige Valin liegt als Säureamid vor. Eine Sequenz von 18 Aminosäuren besitzt das β -MSH; von dieser folgen nur 7 Bausteine der α -MSH und ACTH-Sequenz. Artunterschiede zwischen den β -Hormonen aus Schwein und Rind drücken sich in der Natur der Aminosäure Nr. 2 aus, beim ACTH mit seiner aus 39 Bausteinen zusammengesetzten Kette erst näher am Carboxylende, in der Sequenz 31 bis 33. Die Artunterschiede scheinen rein struktureller Art zu sein und kommen biologisch kaum zum Ausdruck. Das kürzeste Abbauprodukt des ACTH, welches noch die spezifische Wirkung des Hormons zeigt, wurde durch peptische Hydrolyse gewonnen und umfaßt das gesamte Aminende bis zur Aminosäure Nr. 24. In diesem Abschnitt liegen alle basischen Aminosäuren, was für die Wirkung von entscheidender, nicht näher bekannter Bedeutung sein dürfte.

⁴ Vgl. z. B. die Übersicht von G. BRAUNITZER, *Angew. Chem.* 69 (1957) 189.

⁵ Diese Darstellung geht im wesentlichen auf Vorschläge von E. BRAND und J. T. EDSALL, *Annu. Rev. Biochem.* 16 (1947) 224, zurück.

⁶ Eine Reihe von Corticotropin-Peptiden wurde aus unhydrolysierten Hypophysen von Schweinen und Schafen isoliert und zum Teil konstitutionell geklärt: W. F. WHITE, *J. Amer. Chem. Soc.* 75 (1953) 503. W. F. WHITE und W. A. LANDMANN, *ibid.* 76 (1954) 4193, 77 (1955) 771, 1711 (Corticotropin A, Schwein). P. H. BELL und Mitarbeiter, *J. Amer. Chem. Soc.* 76 (1954) 5565, 77 (1955) 3419, 78 (1956) 5051 (β -Corticotropin, Schwein). C. H. LI, I. I. GESCHWIND, A. L. LEVY, J. I. HARRIS, J. S. DIXON, N. G. PON und J. O. PORATH, *Nature*

173 (1954) 251. J. I. HARRIS und C. H. LI, *J. Amer. Chem. Soc.* 76 (1954) 3607. C. H. LI, I. I. GESCHWIND, R. D. COLE, I. D. RAACKE, J. I. HARRIS und J. S. DIXON, *Nature* 176 (1955) 687 (α -Corticotropin, Schaf). Die verschiedenen Corticotropin-Peptide ein und derselben Gattung scheinen sich durch den Grad der Amidierung der Carboxylgruppen in den Seitenketten der Glu- und Asp-Reste zu unterscheiden, vgl. C. H. LI, *Advances Protein Chem.* 11 (1956) 148.

⁷ J. I. HARRIS und P. ROOS, *Nature* 178 (1956) 90. I. I. GESCHWIND, C. H. LI und L. BARNAFI, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 4494 (β -MSH, Schwein). I. I. GESCHWIND, C. H. LI und L. BARNAFI, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 1003 (β -MSH, Rind). J. I. HARRIS und A. B. LERNER, *Nature* 179 (1957) 1346 (α -MSH, Schwein).

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Ser	Arg	Val	Ala	Glu	Asp				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21				
																	Phe	Val	Glu	Try	Leu	Met	Asp	Thr
																	22	23	24	25	26	27	28	29

Abb. 2. Aminosäuresequenz des Glukagons

Das *Glukagon* (Abb. 2), 29 Aminosäurereste umfassend⁸, kommt, wie sein Gegenspieler Insulin, in der Pankreas vor. Die stark basische Dipeptidsequenz Arginylarginyl des ACTH ist hier ebenfalls vertreten – merkwürdigerweise gleich weit vom Aminende entfernt. Im isolierten Glukagon lagen alle Glutaminsäurereste sowie der Asparaginsäurerest 28 in Form der γ - bzw. β -Amide

Rennin). Es entsteht das Hypertensin I, ein Dekapeptid, welches *in vitro* auf Blutkapillaren nicht verengernd wirkt. Erst der enzymatische Abbau unter dem Einflusse des Hypertensin-Umwandlungs-Enzyms ergibt das – auch *in vitro* wirksame – Oktapeptid Hypertensin II. Über die eigentliche physiologische Bedeutung des Renin-Hypertensin-Systemes ist man sich noch nicht im klaren

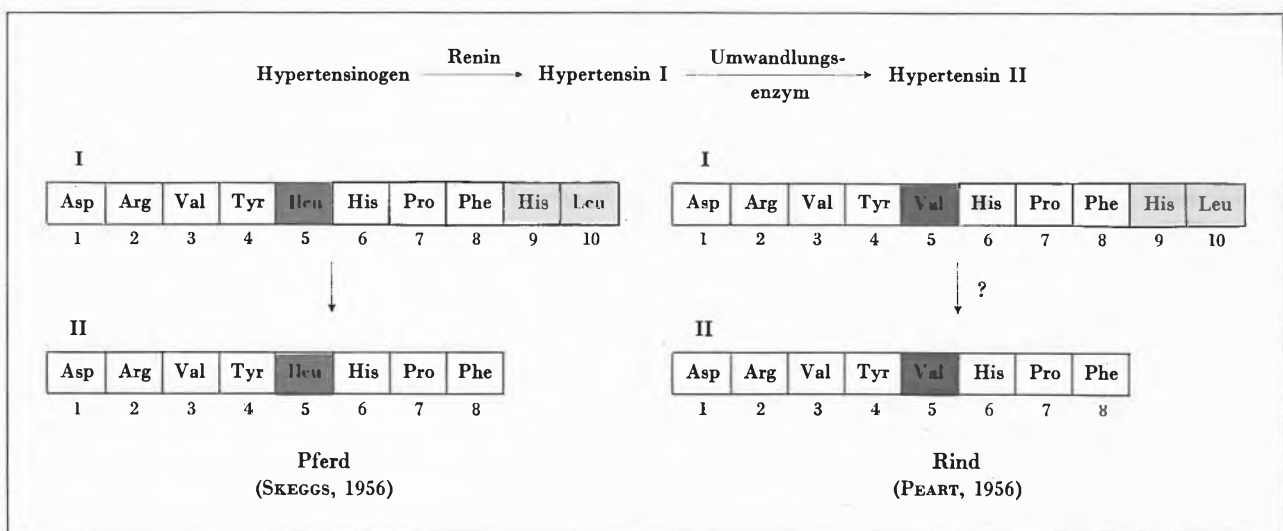


Abb. 3. Hypertensin (Angiotonin)

vor, was nach den Erfahrungen am ACTH, wo verschieden stark amidierete Ketten isoliert werden konnten, und unsern Erfahrungen an synthetischem Hypertensin für die biologische Wirkung nicht von entscheidender Bedeutung sein dürfte.

Das *Hypertensin* oder *Angiotonin* (Abb. 3)⁹ ist einer der wirksamsten bekannten, blutdrucksteigernden Stoffe. Die Wirkung ist von kurzer Dauer und derjenigen des Noradrenalins vergleichbar, nur – wie in der Einleitung gesagt – viel stärker. Hypertensin entsteht als sogenanntes «Gewebshormon» aus einer Globulinfraktion des Blutplasmas, dem Hypertensinogen, unter der Einwirkung eines in den Nieren vorkommenden Fermentes, des Rennins (nicht zu verwechseln mit dem Labferment

– denkbar wäre eine Beteiligung an einem den Blutdruck automatisch regulierenden Mechanismus.

Aus Pferdeserum konnten von SKEGGS und Mitarbeitern¹⁰ nach Einwirkung von Schweinerenin das Ileu⁵-Hypertensin I¹¹ und das Ileu⁵-Hypertensin II isoliert werden; das im Serum vorhandene Umwandlungsenzym spaltet aus dem Dekapeptid I die carboxylendständige Dipeptidsequenz Histidyl-leucin ab, wobei das Oktapeptid II entsteht.

⁸ W. W. BROMER, L. G. SINN, A. STAUB und O. K. BEHRENS, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 3856. W. W. BROMER und Mitarbeiter, *ibid.* 79 (1957) 2794, 2798, 2801, 2805, 2807.

⁹ E. BRAUN-MENENDEZ, J. C. FASCILOLO, L. F. LELLOIR und J. M. MUNOZ, *Rev. Soc. Argentina Biol.* 15 (1939) 420. I. H. PAGE und O. M. HELMER, *Proc. Central Soc. Clin. Res.* 12 (1939) 17; *J. Exp. Med.* 71 (1940) 29.

¹⁰ L. T. SKEGGS, W. H. MARSH, J. R. KAHN und N. P. SHUMWAY, *J. Exp. Med.* 100 (1954) 363. L. T. SKEGGS, J. R. KAHN und N. P. SHUMWAY, *ibid.* 103 (1956) 301. L. T. SKEGGS, W. H. MARSH, J. R. KAHN und N. P. SHUMWAY, *ibid.* 102 (1955) 435. K. E. LENTZ, L. T. SKEGGS, K. R. WOODS, J. R. KAHN und N. P. SHUMWAY, *ibid.* 104 (1956) 183. L. T. SKEGGS, K. E. LENTZ, J. R. KAHN, N. P. SHUMWAY und K. R. WOODS, *ibid.* 104 (1956) 193.

¹¹ Im Hypertensinogen ist die Hypertensin-I-Sequenz mit ihrem Carboxylende an die Sequenz –Leu–Val–Tyr–Ser– angeschlossen, was durch Isolierung des entsprechenden Tetradekapeptides aus Trypsinhydrolysaten des Hypertensinogens und dessen Abbau zu Hypertensin I durch Renin bewiesen wurde. Das Renin spaltet spezifisch die Leu–Leu–Bindung im Asp–Arg–Val–Tyr–Ileu–His–Pro–Phe–His–Leu–Leu–Val–Tyr–Ser, vgl. L. T. SKEGGS, J. R. KAHN, K. E. LENTZ und N. P. SHUMWAY, *J. Exp. Med.* 106 (1957) 439.

grün bezeichnet). Über diesen Ring ist eine heterodete Brücke geschlagen (heterodete Bindungen sind gelb bezeichnet). Man kann sie sich als durch oxydative Kondensation der Mercaptangruppe des Cysteins mit dem Indolrest des Tryptophans zustande gekommen denken. Außer bekannten Aminosäuren (Alanin, Threonin, allo-Oxyprolin, Cystein und Tryptophan) enthält das Phalloidin eine bisher unbekannte, das α -Hydroxy-leucenin.

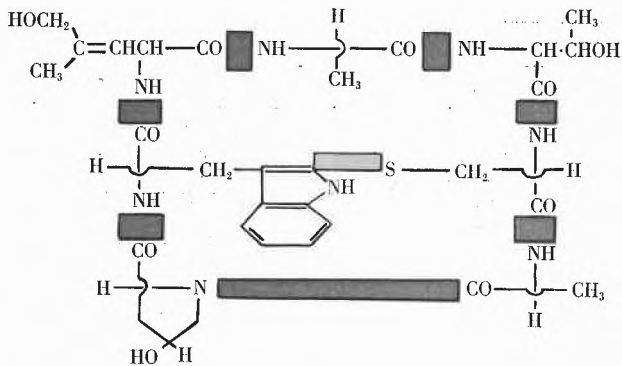


Abb. 5. Phalloidin

Einige Mutterkornalkaloide, z. B. Ergotamin und Ergocristin (Abb. 6), sind als heteromere Polypeptide zu bezeichnen, weil sie außer Aminosäureresten den Lyserg-

säurerest enthalten. Dieser ist amidartig an die Amino-Gruppe einer α -Hydroxy- α -aminosäure geknüpft, welche ihrerseits wahrscheinlich Glied eines heterodet zyklischen Tripeptides ist. Dieses enthält zwei Peptidbindungen und eine Esterbindung. Formell durch transannulare Anlagerung einer Imid- an die Ester-carbonylgruppe scheint eine Brücke über den Hauptring geschlossen zu sein¹⁶.

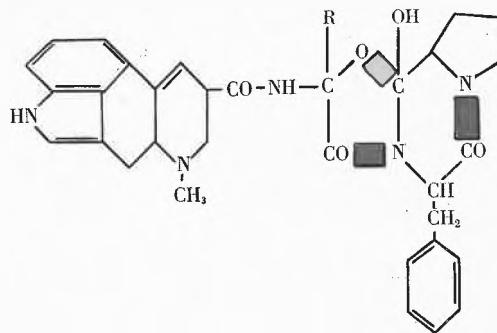


Abb. 6. Mutterkornalkaloide
z. B. Ergotamin R = -CH₃
Ergocristin R = -CH(CH₃)₂

Von Fusarien und Streptomyceten werden eigenartige, heterodet zyklische, heteromere Polypeptide mit anti-

¹⁶ A. STOLL, A. HOFMANN und TH. PETRZILKA, *Helv. Chim. Acta* 34 (1951) 1544. Zusammenfassung bei A. L. GLENN, *Quart. Rev.* 8 (1954) 192.

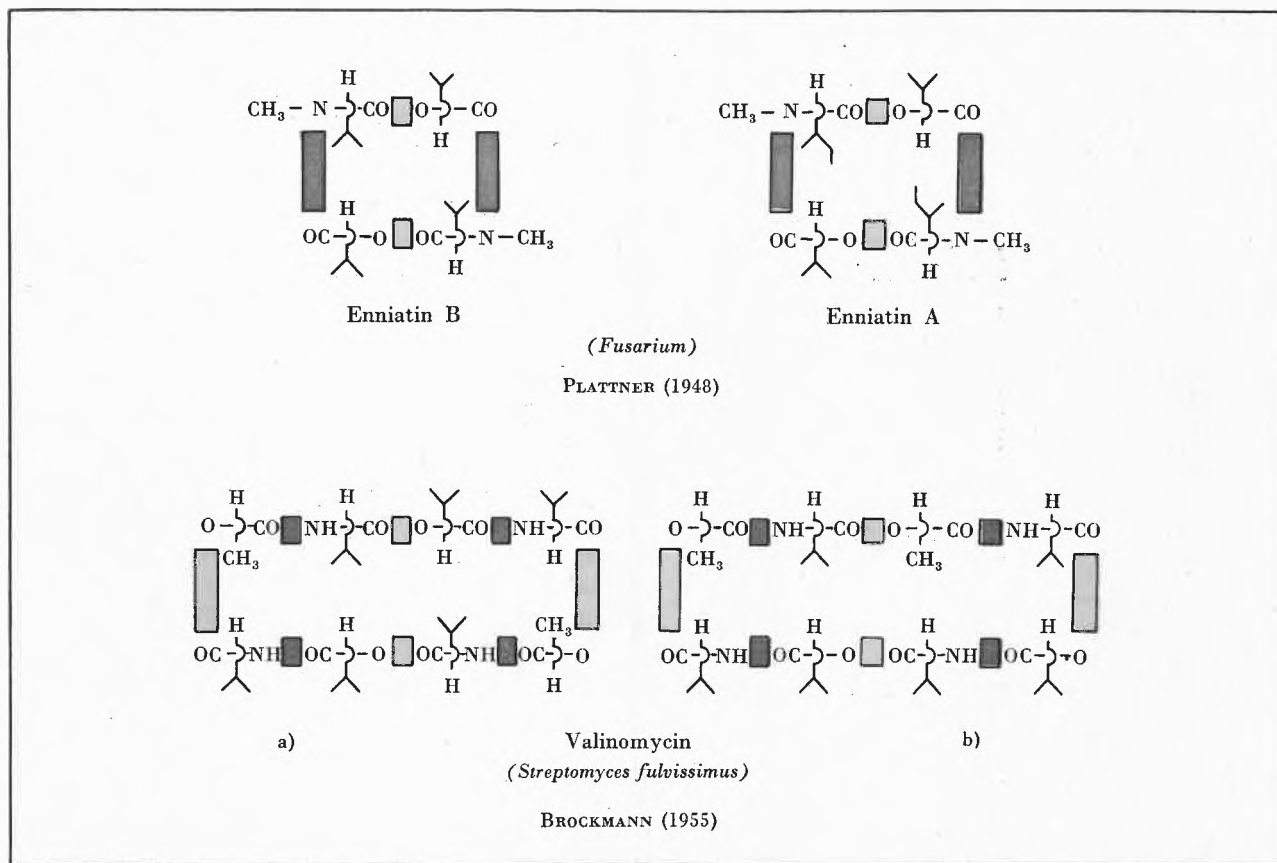


Abb. 7

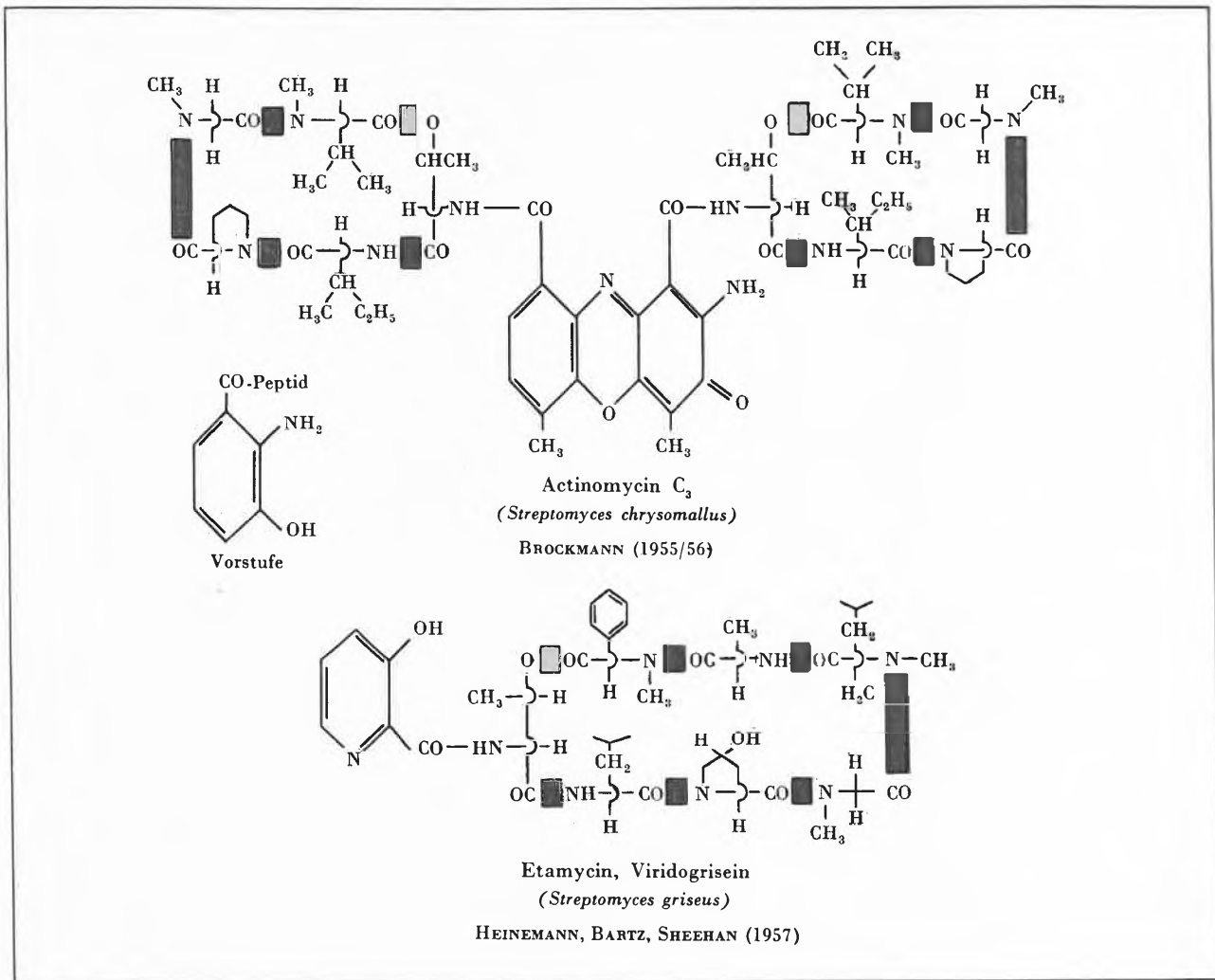


Abb. 8

biotischen Eigenschaften gebildet, die *Enniatine A* und *B* und das *Valinomycin* (Abb. 7)*. Sie enthalten außer den Resten der 4 α -Aminosäuren N-Methyl-L-valin, N-Methyl-L-isoleucin, L-Valin und D-Valin Reste von α -Oxysäuren: D- α -Oxy-isovaleriansäure und L-Milchsäure. Die Ringe sind heterodet aus Peptid- und Esterbindungen aufgebaut. Die beiden Enniatine mit 12gliedrigem Ring wurden von PLATTNER¹⁷ aufgeklärt. Sie unterscheiden sich nur in der Art der Aminosäure, N-Methyl-L-isoleucin beim Enniatin A und N-Methyl-L-valin beim Enniatin B. Für das Valinomycin kommt eine der beiden abgebildeten Formeln (a oder b) in Betracht¹⁸. Bei der Hydrolyse zerfällt die Verbindung leicht in L-Lactyl-L-valin und D- α -Hydroxy-isovaleryl-D-valin. Das Molekulargewicht entspricht einem zyklischen Oktapeptid.

* Kürzlich wurde von L. C. VINING und W. A. TABER (*Canad. J. Chem.* 35 [1957] 1109) das gegen Hefen wirksame Amidomycin beschrieben. Es enthält abwechselungsweise je 4 Reste des D-Valins und der D- α -Hydroxy-isovaleriansäure in einen 24gliedrigen Ring.

¹⁷ P. A. PLATTNER und U. NÄGER, *Helv. Chim. Acta* 31 (1948) 665, 2192.

¹⁸ H. BROCKMANN und G. SCHMIDT-KASTNER, *Liebigs Ann. Chem.* 603 (1957) 216.

Es müssen also je zwei Moleküle der beiden Abbauprodukte miteinander kondensiert sein, was – wie angegeben – abwechslungsweise oder in gleichartigen Gruppen geschehen kann.

Streptomyces chrysomallus und *Streptomyces griseus* produzieren zwei strukturell interessante Antibiotika: *Actinomycin C₃*¹⁹ und *Etamycin* (oder synonym *Viridogrisein*)²⁰ (Abb. 8). Sie beide enthalten heterozyklische Carbonsäurereste: im ersten Falle eine substituierte Phenoxazon-dicarbonsäure, welche mit den Ommochromen der Insektenaugen²¹ verwandt ist und wie diese aus einer ähnlichen Vorstufe durch Oxydation hervorgehen dürfte, im zweiten Falle die 3-Hydroxypicolinsäure. Diese Reste sind amidartig mit dem Threoninrest eines zyklischen Peptides verknüpft. Beim Actinomycin ist dies ein heterodet zyklisches Pentapeptid mit der Sequenz L-Threonyl-D-alloisoleucyl-L-

¹⁹ H. BROCKMANN und Mitarbeiter, *Angew. Chem.* 68 (1956) 66–71, 9 Arbeiten.

²⁰ J. C. SHEEHAN, H. G. ZACHAU und W. B. LAWSON, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 3933.

²¹ A. BUTENANDT, *Angew. Chem.* 69 (1957) 16.

prolyl-sarkosyl-L-valin. Vom Valin zum Threoninhydroxyl führt die heterodete Esterbindung. Beim Etamycin ist der Peptidanteil ein heterodet zyklisches Heptapeptid mit der Sequenz L-Threonyl-D-leucyl-D-alloxyprolyl-sarkosyl-L-dimethylleucyl-L-alanyl-L- α -phenylsarkosyl, mit einer ähnlichen heterodeten Bindung zum Threoninhydroxyl. Die Stereochemie ist noch nicht ganz sicher, besonders was die ungewöhnlichen Aminosäuren Dimethylleucin und Phenylsarkosin betrifft.

c) Homodet zyklische Peptide

Von vier homodet zyklischen Peptiden sind die Strukturen genau bekannt, vom Gramacidin S²², von den Tyrocidinen A und B²³ und vom Gramacidin J²⁴ (Abb. 9). Es sind sämtlich von Bazillen produzierte Antibiotika.

Gramacidin S wurde von GAUSE²⁵ aus einer russischen Varietät von *Bacillus brevis* isoliert; der Name wurde

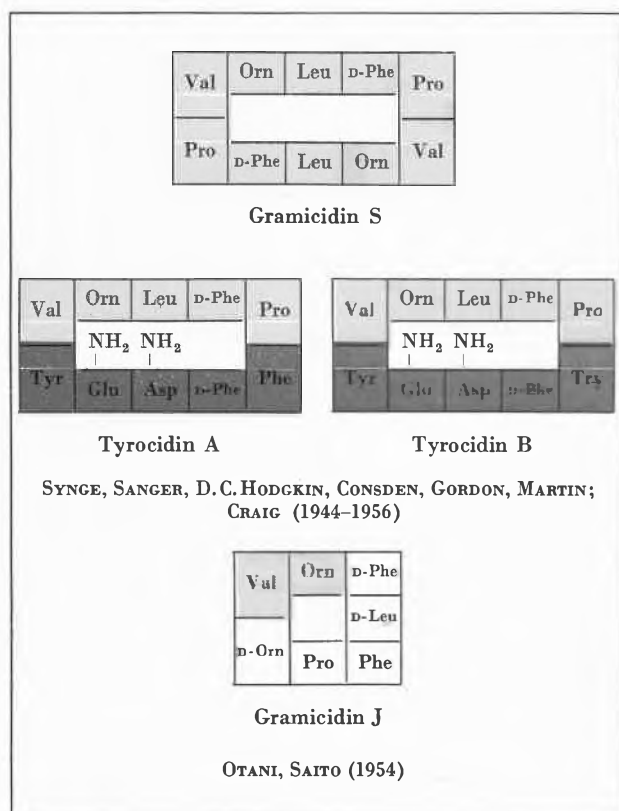


Abb. 9

²² R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.* 39 (1945) 363. F. SANGER, *ibid.* 40 (1946) 261. R. CONSDEN, A. H. GORDON, A. J. P. MARTIN und R. L. M. SYNGE, *ibid.* 40 (1946) XLIII, 41 (1947) 596. A. R. BATTERSBY und L. C. CRAIG, *J. Amer. Chem. Soc.* 73 (1951) 1887. D. C. HODGKIN, *Cold Spring Harbor Symposia* 14 (1949) 65. G. M. J. SCHMIDT, D. C. HODGKIN und B. M. OUGHTON, *Biochem. J.* 65 (1957) 744. Eine etwas andere Formulierung wird von N. J. GAVRILOV, N. A. PODDUBNAJA, L. N. AKIMOVA und E. M. GRIGOR'EVA, *J. allg. Chem. (russisch)* 26 (1956) 2029, vertreten.

²³ A. PALADINI und L. C. CRAIG, *J. Amer. Chem. Soc.* 76 (1954) 688. T. P. KING und L. C. CRAIG, *J. Amer. Chem. Soc.* 77 (1956) 6627.

²⁴ S. OTANI und Y. SAITO, *Proc. Japan. Acad. Sci.* 30 (1954) 991; *Chem. Abstr.* 49 (1955) 13362.

²⁵ G. F. GAUSE und M. G. BRAZHNKOVA, *Lancet* 247 (1944) 715. G. F. GAUSE, *ibid.* 251 (1946) 46.

mit dem Buchstaben «S» versehen, um es als echte sowjetrussische Entdeckung zu kennzeichnen und vom Gramacidin von DUBOS²⁶ zu unterscheiden, welches neben den beiden Tyrocidinen ein Bestandteil des Antibiotikumgemisches *Tyrothricin* ist. Dieses wird von einer amerikanischen Varietät von *Bacillus brevis* produziert. Nach den Untersuchungen von SYNGE und seinen englischen und amerikanischen Kollegen²² ist das Gramacidin S ein 30gliedriges, homodet zyklisches Dekapeptid, welches die Sequenz L-Valyl-L-ornithyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolyl enthält. Daß diese Sequenz zweimal im Molekül vorkommt, konnte endgültig erst durch Synthese bewiesen werden²⁷. Die beiden von CRAIG strukturell aufgeklärten²³ Tyrocidine enthalten ebenfalls diese Sequenz, daneben aber noch eine andere: im Falle des Tyrocidin A L-Phenylalanyl-D-phenylalanyl-L-asparaginyll-L-glutaminyll-L-tyrosyl. Tyrocidin B besitzt anstelle von L-Phenylalanin L-Tryptophan.

Neuerdings ist auch ein Gramacidin J beschrieben worden²⁴, ein japanisches Gramacidin, welches nach OTANI und SAITO als 21gliedriges, homodetes c-Heptapeptid aufzufassen ist. Dieses Peptid besitzt nur die Valyl-ornithyl-Sequenz gemeinsam mit Gramacidin S, sonst ist wenig Ähnlichkeit vorhanden. Auffallend ist der Gehalt an D-Ornithin.

Weitere homodet zyklische Polypeptide, deren Konstitutionen nur teilweise bekannt sind, sind die Antibiotika Polymyxin B₁ aus *Bacillus polymyxa* und das *Bacitracin* aus *Bacillus subtilis* (Abb. 10).

Das Polymyxin ist vielleicht ein c-Okta- oder ein c-Heptapeptid mit einer Seitenkette²⁸. Auffallend ist sein hoher Gehalt an Diaminobuttersäure (6 von 10 Aminosäureresten). Die Seitenkette, entweder ein Di- oder ein Tripeptid, schließt wahrscheinlich an eine γ -Aminogruppe eines Diaminobuttersäurerestes an. Sie ist am Aminende mit dem Rest einer optisch aktiven Methyl- α -Oktansäure verbunden.

Beim Bacitracin²⁹ besteht ebenfalls noch eine gewisse Unsicherheit betreffend die Größe des homodeten Ringes. Es ist nicht entschieden, ob der eine Asparagylrest exozyklisch mit der β -Carboxylgruppe des andern verbunden ist (gelb), oder ob er ebenfalls im Ringe liegt. Im ersten Falle würde der Ring aus 6, im zweiten aus 7 Aminosäureresten bestehen. Die Seitenkette aus 5 Aminosäureresten ist an die α -Aminogruppe des Lysins angeschlossen und besitzt eine auffallende Besonderheit: die aminendständige Sequenz L-Isoleucyl-L-cysteyl (grün) ist in Wirklichkeit als Thiazolinderivat zu formulieren. Dieses wäre durch Anlagerung der Mer-

²⁶ R. D. HOTCHKISS und R. J. DUBOS, *J. Biol. Chem.* 132 (1940) 791, 136 (1940) 803.

²⁷ R. SCHWYZER und P. SIEBER, *Angew. Chem.* 68 (1956) 518; *Chimia* 10 (1956) 265; *Helv. Chim. Acta* 40 (1957) 624.

²⁸ W. HAUSMANN, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 3663. G. BISERTE und M. DAUTREVAUX, *C. R. Acad. Sci.* 242 (1956) 1801; *Bull. Soc. Chim. Biol.* 39 (1957) 795.

²⁹ J. R. WEISINGER, W. HAUSMANN und L. C. CRAIG, *J. Amer. Chem. Soc.* 77 (1955) 731, 3123.

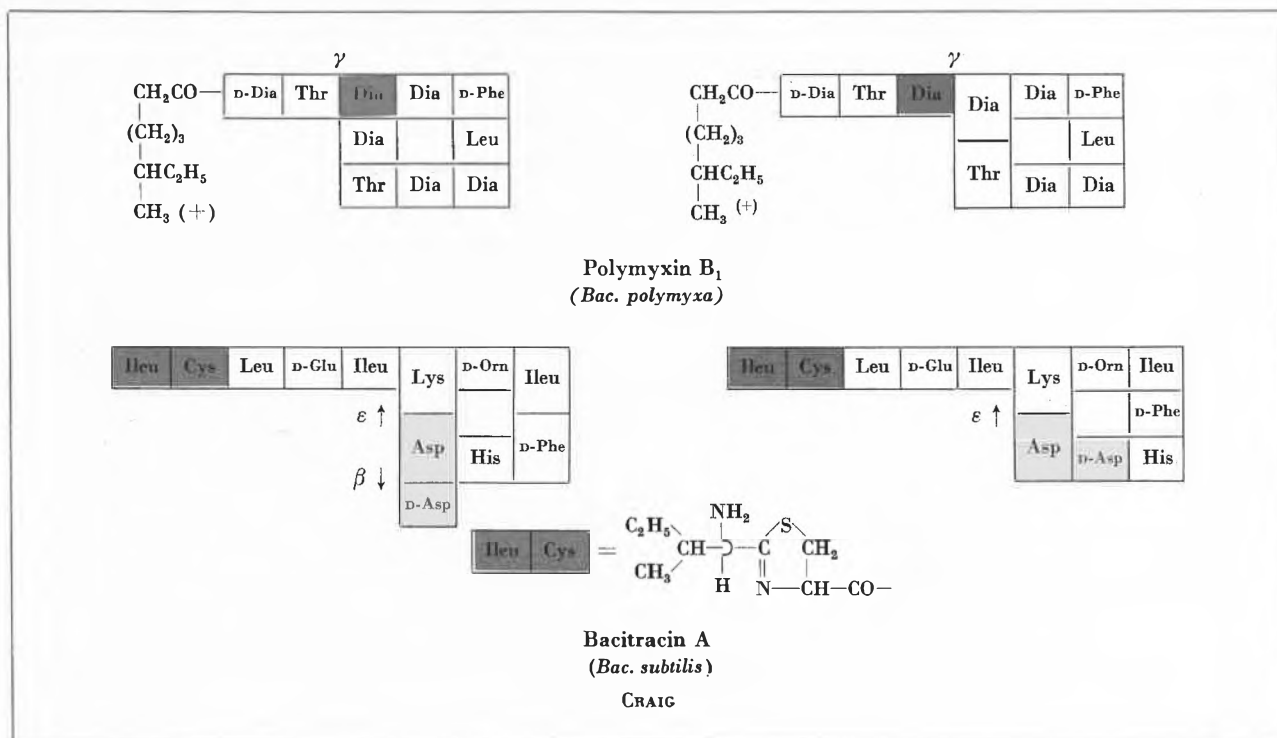


Abb. 10

captogruppe des Cysteinrestes an die Carbonylfunktion der Peptidbindung mit nachfolgender Wasserabspaltung entstanden.

Synthesen von Polypeptidwirkstoffen

a) Methoden der synthetischen Polypeptidchemie

Durch die Vielfalt der Struktur der eben beschriebenen Wirkstoffe ist für die synthetische Forschung auf diesem Gebiete das methodische Programm vorgezeichnet. So gilt es, aus Aminosäuren offenkettige, heterodet zyklische und homodet zyklische Polypeptide aufzubauen. Die Grundlage aller Synthesen ist die Herstellung offener Polypeptidketten; zur Herstellung zyklischer Peptide wird die offene Kette nachträglich durch spezielle Maßnahmen zum Ring geschlossen.

Für die *Synthese offenkettiger Polypeptide* aus Aminosäuren stehen uns heute eine große Zahl von Methoden zur Verfügung, welche in ausgezeichneten Übersichten von FRUTON³⁰, TH. WIELAND³¹ und W. GRASSMANN³², um nur einige zu nennen, zusammengestellt worden sind. Die Methoden zerfallen in solche, welche zum selektiven und reversiblen Schutz von Amino-, Hydroxy-, Mercapto- und Carboxylgruppen dienen, und solche, mit deren Hilfe die Peptidbindung hergestellt werden kann. Überfliegt man die heute bekannten Synthesen von Polypeptidwirkstoffen, so fällt auf, wie wenige nur von allen zur Verfügung stehenden Methoden Verwendung ge-

³⁰ J. S. FRUTON, *Advances Protein Chem.* 5 (1949) 1.

³¹ TH. WIELAND, *Angew. Chem.* 63 (1951) 7, 66 (1954) 507. TH. WIELAND und B. HEINKE, *ibid.* 69 (1957) 362.

³² W. GRASSMANN und E. WÜNSCH, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* (Wien) 13 (1956) 444.

funden haben – und auch diese wenigen vermögen niemanden, der sich mit der Materie beschäftigt hat, voll zu befriedigen.

Als Schutzgruppen haben sich außer der klassischen Benzylloxycarbonylgruppe (C₆H₅CH₂OCO–, abgekürzt mit Z–) von MAX BERGMANN³³ besonders *p*-Toluolsulfo-(CH₃C₆H₄SO₂–, Tos–)³⁴, Trityl-([C₆H₅)₃C–, T–)³⁵ und die Benzylgruppe (B–)³⁶, letztere besonders für Mercaptogruppen, bewährt. Die Guanidinogruppe des Arginins wurde gewöhnlich durch Nitrierung geschützt³⁷. Wo ein besonderer Schutz für die Carboxylgruppe nötig war, wurden meistens die Methyl-, Äthyl- und Benzylester (–B) verwendet.

Zur Knüpfung der Peptidbindung wurden neben der klassischen, CURTIUSSchen Verwendung von Säureaziden³⁸, welche neuerdings wieder vermehrt in wäßrigem Medium erfolgt³⁹, gemischte Anhy-

³³ M. BERGMANN und L. ZERVAS, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 65 (1932) 1192.

³⁴ R. SCHÖNHEIMER, *Z. physiol. Chem.* 154 (1926) 203. V. DU VIGNEAUD und O. K. BEHRENS, *J. Biol. Chem.* 117 (1937) 27.

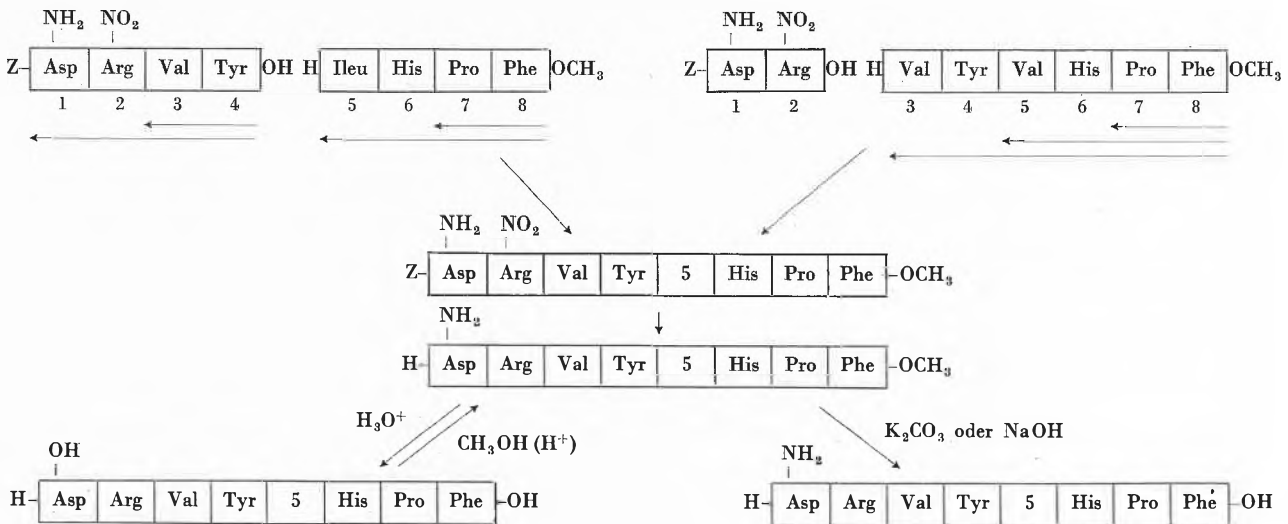
³⁵ G. AMIARD, J. ANATOL, R. HEYMÈS, V. TORELLI und L. VELLUZ, *Bull. Soc. Chim. France* 1954, 1012, 1446, 1449, 1955, 191, 201, 1283, 1464, 1956, 97; und spätere Arbeiten, z. B. G. AMIARD und B. GOFINET, *Bull. Soc. Chim. France* 1957, 1133.

³⁶ H. S. LORING und V. DU VIGNEAUD, *J. Biol. Chem.* 111 (1935) 385. J. L. WOOD und V. DU VIGNEAUD, *ibid.* 130 (1939) 109.

³⁷ M. BERGMANN, L. ZERVAS und H. RINKE, *Z. physiol. Chem.* 224 (1934) 40.

³⁸ T. CURTIUS, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 35 (1902) 3226.

³⁹ K. HOFMANN, H. KAPPELER, A. E. FURLENMEIER, M. E. WOONER, E. T. SCHWARTZ und TH. A. THOMPSON, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 1641. K. HOFMANN, A. JÖHL, A. E. FURLENMEIER und H. KAPPELER, *ibid.* 79 (1957) 1636. K. HOFMANN und A. JÖHL, *ibid.* 77 (1955) 2914. K. HOFMANN, TH. A. THOMPSON und E. T. SCHWARTZ, *ibid.* 79 (1957) 6087.

Abb. 12. Synthesen von Ileu⁵- und Val⁶-Hypertensin II und deren Asp- β -amide

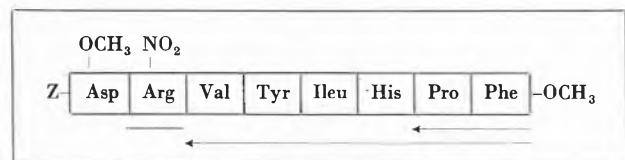
Val⁵-Hypertensin II, welches in Rinderserum als Abbau-
produkt des entsprechenden Dekapeptides vorkommen
dürfte, wurde auf verschiedene Arten durchgeführt⁴⁸
(Abb. 12).

Aus den beiden Tetrapeptidderivaten Carbobenzoxy-
asparaginylnitro-arginyl-valyl-tyrosin und Isoleucyl-
histidyl-prolyl-phenylalanin-methylester, welche beide
ihrerseits aus Dipeptidderivaten aufgebaut worden wa-
ren, wurde das geschützte Oktapeptid zusammengesetzt.
Im Falle des Val⁶-Oktapeptides wurde dieses Zwischen-
produkt aus dem Dipeptidderivat Carbobenzoxy-aspa-
raginylnitro-arginin und dem Methylester des Hexa-
peptides 3-8 aufgebaut. Das Hexapeptidderivat wurde
unter Verwendung der Carbobenzoxy- und Carbodiimid-
Methoden aus Dipeptidderivaten vom Carboxylende her
synthetisiert.

Wie beim Dekapeptid gelang die Abspaltung der Car-
bobenzoxy- und Nitrogruppen durch katalytische Hy-
drierung. Die freien Peptid-amide wurden durch vor-
sichtige alkalische Verseifung gewonnen, die Hydrolyse
sowohl der Carbomethoxy- als auch der Carbamid-
gruppen gelang durch Einwirkung von Salzsäure. Die
entstandenen Hypertensinpeptide wurden durch multi-
plikative Verteilung und durch Chromatographie an
einer Cellulosekolonne gereinigt; es ließen sich dann durch
Papierchromatographie in den verschiedensten Lösungs-
mittelsystemen keine Verunreinigungen mehr feststel-
len. Die Aktivität der reinen Verbindungen erreichte,
am Blutdruck der nierenlosen Ratte gemessen, einen
konstanten Wert von 20 mal Noradrenalin auf Gewichts-
basis, etwas verschieden von Tier zu Tier⁴⁹.

⁴⁹ Professor GOLDBLATT und Dr. DEODHAR, Western Reserve
University, Cleveland, Ohio, bestimmten die Aktivität von synth.
Val⁶-Hypertensin-II-Asp- β -amid zu 3,5 Goldblatt-Einheiten pro μg ,
was der 2,5- bis 3fachen Aktivität ihrer besten isolierten Präparate
von Ileu⁵-Hypertensin II entspricht.

Gleichzeitig ist von PAGE und Mitarbeitern⁵⁰ das Ileu⁵-
Hypertensin II (in vorerst 50prozentiger Reinheit) eben-
falls hergestellt worden (Abb. 13). Ihre Synthese zielte
direkt auf das Peptid mit zwei freien Carboxylgruppen
ab und ließ eine Gewinnung des Monoamids nicht zu.
Aus dem Carbobenzoxy-tetrapeptid 3-6 und dem Di-
peptidester 7-8 stellten diese Autoren das Carbobenzo-
oxy-hexapeptid 3-8 her, spalteten hydrogenolytisch die

Abb. 13. Synthese von Ileu⁵-Hypertensin II
(BUMPUS, SCHWARZ und PAGE)

Carbobenzoxygruppe ab und kuppelten den Hexapeptid-
ester mit dem gemischten Anhydrid des Carbobenzoxy-
asparagyl-nitroarginin- β -methylester mit Kohlensäure-
äthylester. Verseifung und Reduktion ergab ein Produkt
mit etwa der Hälfte der erwarteten Wirkung, was viel-
leicht auf eine partielle Razemisierung des Argininrestes
zurückzuführen ist. Das Material wurde nachträglich
auf die gleiche Reinheitsstufe wie unsere Präparate ge-
bracht⁵¹.

Der Unterschied in der 5. Aminosäure bei den Hyper-
tensinen aus Rinder- und Pferdeblut veranlaßte uns,
noch weitere Analoge herzustellen⁴⁸ (Abb. 14). Einfüh-

⁵⁰ F. M. BUMPUS, H. SCHWARZ und I. H. PAGE, *Science* 125 (1957)
886.

⁵¹ F. M. BUMPUS, H. SCHWARZ und I. H. PAGE, *Abstracts of Papers
of the 132nd Meeting of the American Chemical Society, New York,
September 8th-13th, 1957*, S. 17 O. H. SCHWARZ, F. M. BUMPUS und
I. H. PAGE, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 5697.

rung von Leucin anstelle von Valin oder Isoleucin als 5. Aminosäure vermindert die Wirkung auf den Blutdruck auf etwa die Hälfte; die β -Verzweigung in der Seitenkette der aliphatischen Aminosäure Nr. 5 scheint also für eine maximale Wirkung von einer gewissen Bedeutung zu sein.

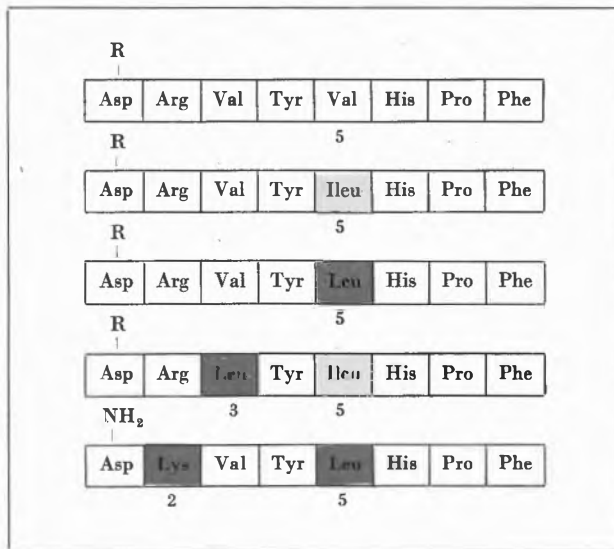


Abb. 14. Val⁵- und Ileu⁵-Hypertensin II-Peptide und Analoge (R = -NH₂ und -OH)

Einführung von Leucin anstelle von Valin in Stellung 3 wirkt sich dagegen kaum aus: Leu³-Ileu⁵-Hypertensin II ist voll aktiv, sowohl in Form des Amids als auch der Dicarbonsäure. Ersatz von Arginin durch eine andere basische Aminosäure, Lysin, bewirkt eigenartigerweise eine starke Reduktion der Wirksamkeit um mehr als eine Zehnerpotenz. Was wir schon beim ACTH angedeutet sahen, scheint sich hier zu bestätigen: daß nämlich die Wirkung stark von der Natur der basischen Seitenketten abhängt.

Auf dem Gebiete der offenkettigen Wirkstoffe sind zurzeit keine vollständigen Synthesen mehr zu verzeichnen. BOISSONNAS⁵² reihte in einer bemerkenswerten Arbeit die ersten zwanzig Aminosäuren des ACTH aneinander (vgl. Abb. 1). Im Endprodukt, einem Eikosapeptidmethylester, welcher bereits eine schwache ACTH-Wirkung im Test nach SAFFRAN und SCHALLY⁵³ aufwies, ließ sich leider die Carbomethoxygruppe nicht ohne prohibitive Komplikationen spalten. In diesem Zusammenhange sind auch die Versuche von K. HOFMANN und Mitarbeitern³⁹ zu erwähnen, welche zur Synthese der Peptidsequenzen 1-5, 5-8 und 3-10 des Corticotropins führten.

Ein Pentapeptid H·Ser-His-Leu-Val-Glu·OH, welches durch saure Hydrolyse von Insulin gewonnen wurde,

konnte von WOOLLEY⁵⁴ synthetisch hergestellt werden. Die Verbindung ist unter der Bezeichnung «Streptogenin» bekannt geworden – einer Bezeichnung, welche auch andern durch Abbau natürlicher Polypeptide und Proteine gewonnenen Peptiden zugelegt wurde, welche – wie das erwähnte Pentapeptid – eine gewisse Wachstumswirkung gegenüber Mikroorganismen, vornehmlich *Lactobacillus casei*, besitzen.

c) Synthese

heterodet zyklischer Polypeptidwirkstoffe

Als Synthese eines heterodet zyklischen Peptides ist diejenige des Ocytocins von DU VIGNEAUD⁴⁶ besonders berühmt geworden (Abb. 15), weil damit zum erstenmal ein Polypeptidhormon synthetisch zugänglich wurde. In ihrer letzten und entscheidenden Phase stützte sich diese Synthese auf die Beobachtung, daß sich reduziertes Ocytocin, bei welchem die heterodete Brücke reduktiv gesprengt ist und die beiden Schwefelatome in der Thiolform vorliegen, durch Oxydation mit Luft wieder in das zyklische Hormon überführen läßt. Das Syntheseproblem reduzierte sich somit auf die Gewinnung eines geschützten Nonapeptides, welches durch Entfernung der Schutzgruppen reduziertes Ocytocin ergibt. Ein Nonapeptidamid, dessen Aminogruppe mit dem Carbobenzyloxyrest und dessen Mercaptogruppen mit Benzylresten geschützt waren, erwies sich als geeignet. Die Schutzgruppen wurden durch Natrium in flüssigem Ammoniak entfernt. Luftoxydation lieferte ein Rohprodukt, welches nach eingehender Reinigung ein Ocytocin ergab, welches chemisch und physikalisch mit dem Naturprodukt identifiziert wurde und dessen biologische Wirkung derjenigen des natürlichen Ocytocins entsprach. Mit dieser Synthese wurde die Konstitution endgültig bewiesen, da vorher nicht entschieden war, ob Asparaginsäure- und Glutaminsäurereste mit ihren α - oder mit ihren β - bzw. γ -Carboxylgruppen am Aufbau der Polypeptidkette beteiligt waren⁵⁵. Der Aufbau des geschützten Nonapeptidamids geschah nach dem Schema Tetrapeptid 6-9 plus Tripeptid 3-5. Das Heptapeptid 3-9 wurde zuletzt mit dem Dipeptid 1-2 ergänzt. Bei diesem Aufbau bewährte sich der Tosylrest mehrmals als Schutzgruppe; die Verknüpfungen wurden nach der Phosphitamidmethode von ANDERSON⁴¹ vorgenommen. Interessant ist die Herstellung des Tetrapeptidamids 6-9 aus dem entsprechenden Disulfid durch Reduktion mit Natrium in flüssigem Ammoniak, Benzylierung der Mercapto- und Carboxylgruppen mit Benzylchlorid in flüssigem Ammoniak und schließlich Ammonolyse der Estergruppe zum Amid.

⁵⁴ R. B. MERRIFIELD und D. W. WOOLLEY, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 4646.

⁵⁵ Inzwischen ist auch das biologisch unwirksame Isoglutaminisomere synthetisiert worden. CH. RESSLER und V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 4511.

⁵² R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, J.-P. WALLER und P.-A. JAQUENOUD, *Experientia* 12 (1956) 446.

⁵³ M. SAFFRAN und A. V. SCHALLY, *Endocrinology* 56 (1955) 523.

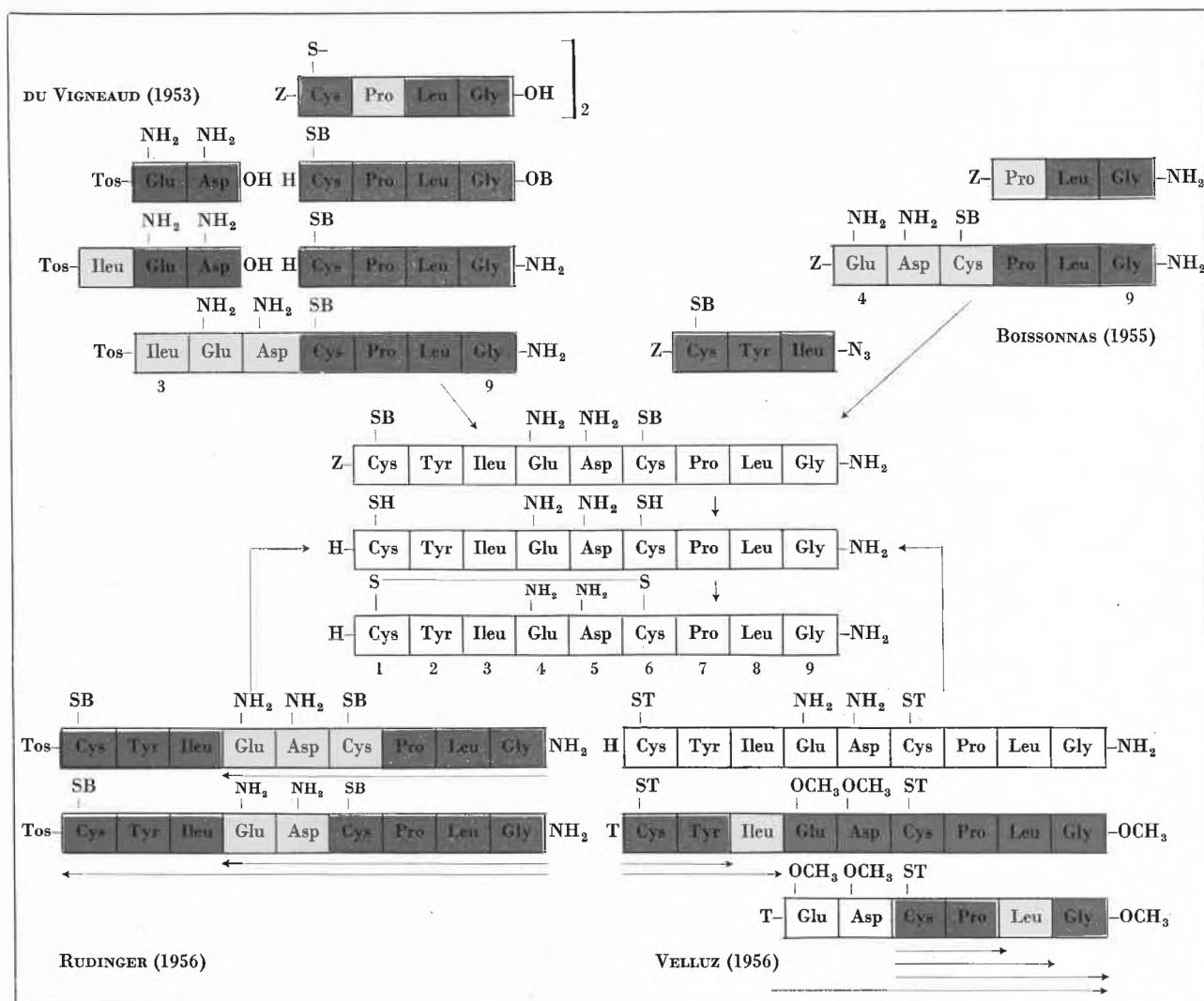


Abb. 15. Synthesen von Ocytocin (Z = Carbobenzoxy-; Tos = *p*-Toluolsulfonyl-; B = Benzyl-. Der Aufbau der Zwischenprodukte erfolgte jeweils in der Reihenfolge grün-gelb-blau-farblös).

Spätere Synthesen des Ocytocins stammen von BOISSONNAS⁵⁶, RUDINGER⁵⁷ und VELLUZ⁵⁸. Die beiden ersten Autoren bauten ein geschütztes Nonapeptid nach dem Schema Hexapeptid 4-9 plus Tripeptid-azid 1-3. BOISSONNAS verwendete dabei das Carbobenzoxytripeptid 1-3, welches ebenfalls von uns mit der Cyanmethylester-Methode aufgebaut worden war⁴³. RUDINGER zog als Schutzgruppe in diesem Falle den Tosylrest vor. Die Synthese von VELLUZ ist besonders bemerkenswert, weil sie konsequent unter Verwendung des Tritylrestes als Schutzgruppe und von Dicyclohexylcarbodiimid als Kondensationsmittel durchgeführt wurde. Die Einführung der drei Carbonamidgruppen wurde, im Gegensatz zu den andern Synthesen, erst auf der Nonapeptidstufe durch Ammonolyse der entsprechenden Methylester-

⁵⁶ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD und J.-P. WALLER, *Helv. Chim. Acta* 38 (1955) 1491.

⁵⁷ J. RUDINGER, J. HONZL und M. ZAORAL, *Coll. Czech. Chem. Comm.* 21 (1956) 202.

⁵⁸ L. VELLUZ, G. AMIARD, J. BARTOS, B. GOFFINET und R. HEYMÈS, *Bull. Soc. Chim. France* 1956, 1464.

gruppen vorgenommen. Die Entfernung der Tritylgruppen geschah mit verdünnter, kalter Säure, wodurch die etwas umständliche Verwendung von Natrium in flüssigem Ammoniak wegfiel. Die Zyklisierung endlich erfolgte auf dem von DU VIGNEAUD vorgezeichneten Pfade.

Auch vom Ocytocin sind einige Analoge synthetisch hergestellt worden (Abb. 16).

Einbau der Aminosäuren Phenylalanin und Arginin und von Phenylalanin und Lysin in die Stellungen 3 und 8 durch DU VIGNEAUD⁵⁹ führte zu den natürlichen Hormonen Arginin- und Lysin-Vasopressin mit starker anti-diuretischer und blutdrucksteigernder Wirkung. Die von RUDINGER⁶⁰ und BOISSONNAS⁶¹ dargestellten Ana-

⁵⁹ P. G. KATSOYANNIS, D. T. GISH und V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 4516. M. F. BARTLETT, A. JÖHL, R. ROESKE, R. J. STEDMAN, F. H. C. STEWART, D. N. WARD und V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 2905. V. DU VIGNEAUD, M. F. BARTLETT und A. JÖHL, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 5572.

⁶⁰ J. RUDINGER und Mitarbeiter, *Coll. Czech. Chem. Comm.* 21 (1956) 770.

⁶¹ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD und J.-P. WALLER, *Helv. Chim. Acta* 39 (1956) 1421.

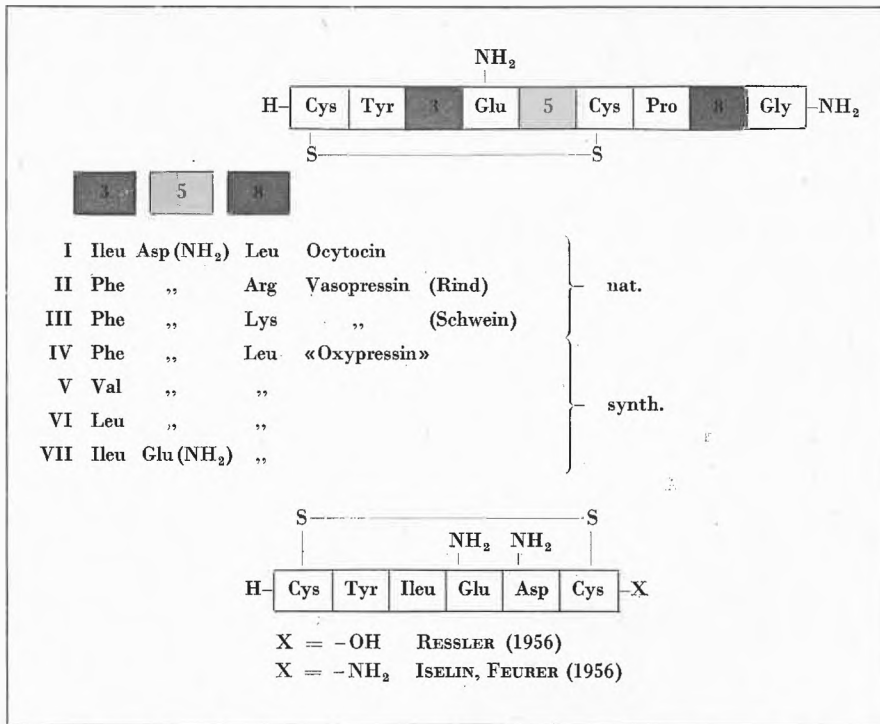


Abb. 16. Analoge des Ocytocins

logen mit Phenylalanin, Valin und Leucin an der Stelle 3 und mit Glutamin an der Stelle 5 (IV-VII) scheinen deutlich weniger wirksam als Ocytocin zu sein – das beste ist dasjenige mit Valin. Eines von diesen Analogen (IV) wurde von KATSOYANNIS, einem Schüler DU VIGNEAUDS, rein dargestellt und Oxypressin genannt⁶². Es besitzt den gleichen Ring wie die Vasopressine und die gleiche Seitenkette wie das Ocytocin, sowohl vasopressorische wie uterotonische Wirkungen sind rudimentär – die blutdrucksenkende Wirkung bei Vögeln ist ebenfalls nur schwach vorhanden, wenn auch nicht im gleichen Maße reduziert wie die andern Effekte.

Der heterodete Ring des Ocytocins wurde mit freier Carboxylgruppe von CH. RESSLER⁶³, mit Carbonamidgruppe von meinen Mitarbeitern ISELIN und FEURER⁶⁴ hergestellt. Die uterotonische Wirkung dieser Analogen ist sehr klein, nach RESSLERS Angaben für ihr Produkt etwa 1/150 derjenigen des Ocytocins, eine vasopressorische Wirkung fehlt ganz.

Kürzlich konnte von BOISSONNAS^{61a} durch Oxydation von H·CySH-Tyr-Tyr-Ileu-Glu(NH₂)-Asp(NH₂)-CySH-Pro-Leu-Gly·NH₂ ein erster biologischer Antagonist des Ocytocins gewonnen werden.

Sehr interessante Versuche über die Bildung heterodet zyklicher Polypeptide unter den Bedingungen der Ocytocin-Synthese hat RYDON⁶⁵ veröffentlicht (Abb. 17).

^{61a} ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD und R. A. BOISSONNAS, *Naturwiss.* 44 (1957) 632.

⁶² P. G. KATSOYANNIS, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 109.

⁶³ CH. RESSLER, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 92 (1956) 725.

⁶⁴ Unveröffentlichte Versuche.

⁶⁵ G. S. HEATON, H. N. RYDON und J. A. SCHOFIELD, *J. Chem. Soc.* 1956, 3157.

Nach seinen Angaben ist die Ausbeute beim oxydativen Ringschluß von Glycinpeptiden mit zwei endständigen Cysteinresten stark von der Kettenlänge abhängig. Bei einer Zunahme der Kettenlänge um je einen Glyzinrest von insgesamt drei Aminosäureresten auf deren sechs, was den Verhältnissen beim Ocytocin entspricht, steigt die Ausbeute kontinuierlich von 0 auf 90%. Es wäre interessant, zu wissen, ob dieser Wert ein Maximum darstellt oder ob noch größere Ringe ebenso leicht gebildet werden. Jedenfalls dürfte auch im lebenden Organismus eine eventuelle reversible Aufspaltung (reduktiv) und Schließung (oxydativ) des heterodeten Ringes bei den betreffenden Hormonen auf keine besonderen Schwierigkeiten stoßen.

d) Synthese homodet zyklicher Polypeptidwirkstoffe

Die erste Synthese eines homodet zyklichen Polypeptidantibiotikums war diejenige des Gramacidins S (Abb. 9, oben). Sie wurde mit der Unterstützung meines Assistenten Herrn SIEBER innerhalb weniger Monate ausgeführt (Abb. 18).

Die erste Aufgabe war die Herstellung eines offenkettigen Dekapeptides mit der richtigen Reihenfolge der Aminosäurereste und mit geeigneten Schutzgruppen. Da-

	Ausbeute bei der Oxydation des Dithiols (pH = 8,5)
	90%
	40%
	15%
	0%

Abb. 17. Oxydativer Ringschluß bei Cysteinpeptiden (RYDON)

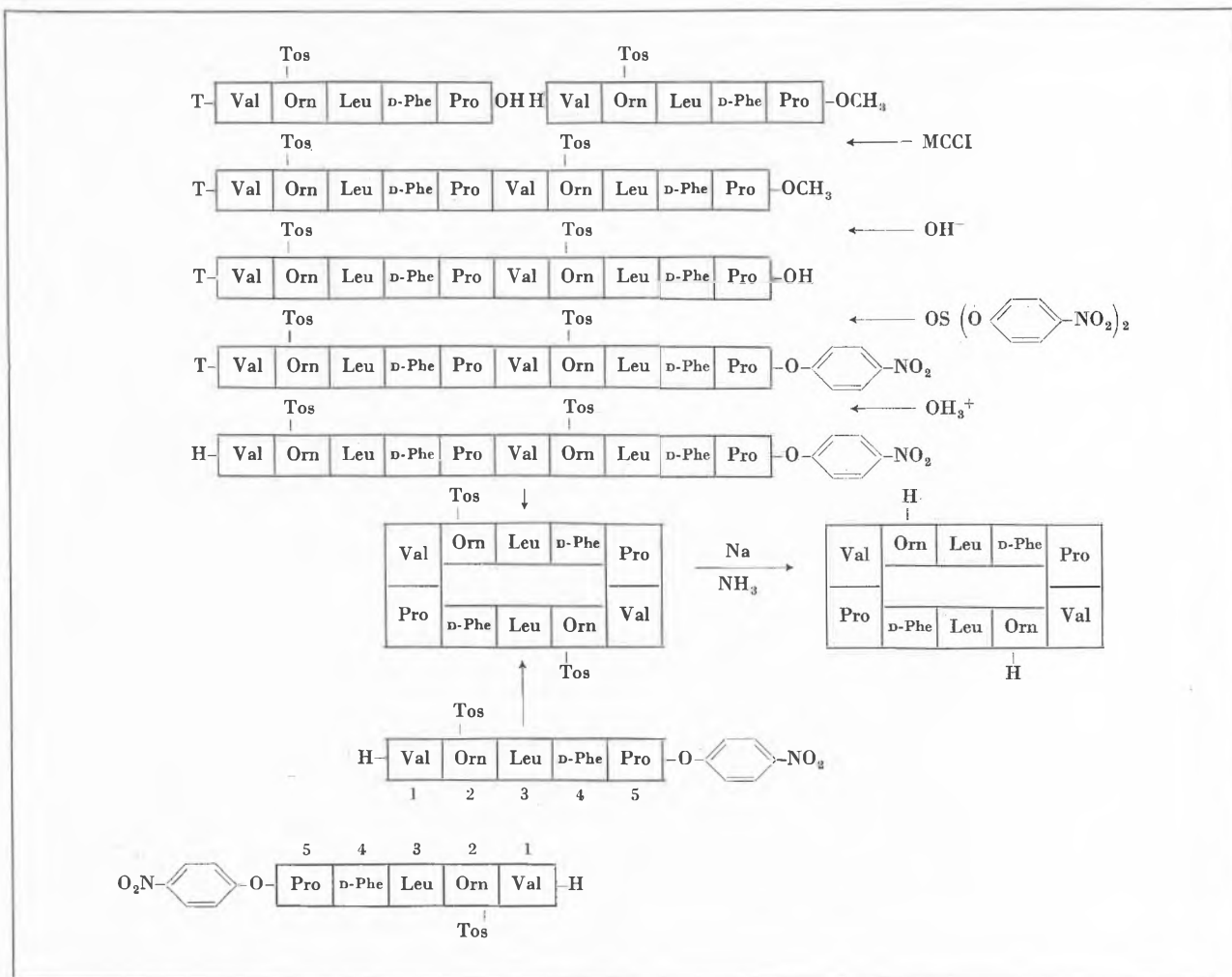


Abb. 18. Synthesen von Gramicidin S

zu wurde die Vereinigung zweier Pentapeptidderivate mit Hilfe von Morpholinyläthyl-3-cyclohexylcarbodiimid (MCCI)⁴⁴ gewählt. Als carboxylendständige Aminosäure wurde Prolin vorgesehen, weil damit der Gefahr der Razemisierung bei der Vereinigung der Pentapeptidderivate und beim Ringschluß vorgebeugt wurde. Als Aminschutzgruppen dienten Trityl- und Tosylreste, welche voraussichtlich bei der alkalischen Verseifung der Carbomethoxygruppe weniger Neigung zu Nebenreaktionen zeigen würden als Carbobenzoxygruppen.

Die zweite Aufgabe bestand in der Aktivierung der Carboxylgruppe, der selektiven Abspaltung der Tritylgruppe und im Ringschluß selbst. Die Methoden für diese letzten Schritte mußten erst noch gefunden werden. Wegen der damit erzielbaren relativ hohen Ausbeute – etwa 30% von der geschützten Dekapeptidcarbonsäure bis zum Ditosylgramicidin – wurde der *p*-Nitrophenylester durch Umsatz mit Di-*p*-nitrophenylsulfid⁶⁶ hergestellt, daraus die Tritylgruppe mit wäßriger Trifluoressigsäure abgespalten und der Ring in warmem Pyridin – unter Beachtung des Verdünnungsprinzips –

⁶⁶ B. ISELIN, W. RITTEL, P. SIEBER und R. SCHWYZER, *Helv. Chim. Acta* 40 (1957) 373.

geschlossen. Die Tosylreste wurden endlich mit Natrium in flüssigem Ammoniak abgespalten.

Eine Überraschung erlebten wir, als wir versuchten, das der Hälfte des Gramicidins entsprechende *c*-Pentapeptid herzustellen, indem auch hier einwandfrei identifiziertes Gramicidin entstand (Abb. 18, unten): zwei Moleküle des Tosyl-pentapeptid-*p*-nitrophenylesters hätten sich also während der Zyklisierungsreaktion miteinander kondensiert. Eine solche zyklisierende Verdoppelung wurde schon früher, beim Versuch *c*-Triglycyl herzustellen, beobachtet. Es war dabei *c*-Hexaglycyl entstanden⁶⁷. Um diese Erscheinungen zu erklären, muß man annehmen, daß – vorgängig der Zyklisierung – zwei reaktionsfähige Molekeln sich antiparallel nebeneinander legen. Dies könnte am besten nach den Gesetzmäßigkeiten der antiparallelenplissierten Schicht⁶⁸ geschehen, der Ringschluß würde dann, im Falle des Gramicidins, durch Verknüpfung benachbarter Prolin-

⁶⁷ D. G. H. BALLARD, C. H. BAMFORD und F. J. WEYMOUTH, *J. Amer. Chem. Soc.* 77 (1955) 6368. J. C. SHEEHAN und W. L. RICHARDSON, *ibid.* 76 (1954) 6329, 77 (1955) 6391. R. SCHWYZER, B. ISELIN, W. RITTEL und P. SIEBER, *Helv. Chim. Acta* 39 (1956) 872.

⁶⁸ L. PAULING und R. B. COREY, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 39 (1953) 247.

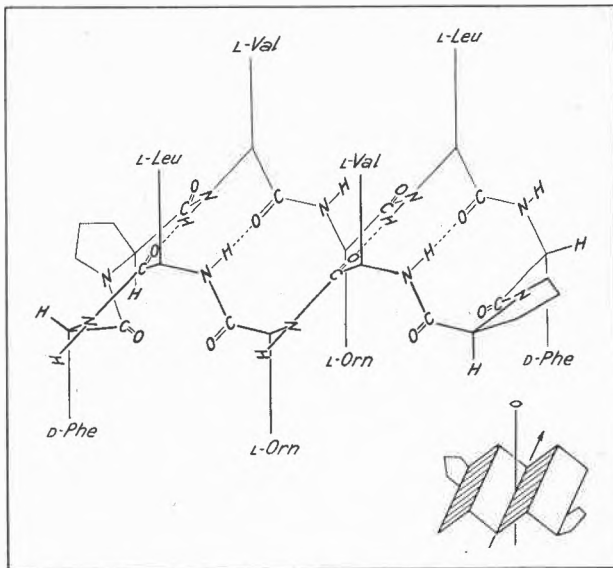


Abb. 19

und Valinreste ohne tiefgreifende Änderung der Konstellation erfolgen können. Die Seitenketten von Valin, Ornithin und Leucin könnten an ihrem Platze im Raume bleiben, was zu folgender Konstellation für die Gramicidin-S-Molekel führen würde (Abb. 19): hinten am Modell läuft die Kette Val-Orn-Leu von links nach rechts, vorn von rechts nach links (die Seitenketten der Aminosäurereste sind zur Verdeutlichung mit den ersten drei Buchstaben des Namens der Aminosäure bezeichnet). Wendepunkte der Kette bilden das Phenylalanin und das Prolin. Die ganze Molekel ist wie zwei aneinander anschließende Firstdächer gebaut, wie im Bilde rechts unten angedeutet. Auf den Flächen liegen jeweils die ebenen Peptidbindungen, an den Winkeln die α -C-Atome. Senkrecht durch die Mitte läuft eine zweizählige Achse. Die Aminosäureseitenketten sind annähernd axial nach oben und nach unten angeordnet. Weil das Phenylalanin die D-Konfiguration besitzt, schaut auch seine Seitenkette in dieser allgemeinen Richtung (bei der L-Form würde der Benzylrest seitwärts, äquatorial liegen). Intramolekular sind 4 von 8 möglichen Wasserstoffbrücken verwirklicht, die andern vier können ohne weiteres extramolekular mit andern Gramicidin-Molekeln abgesättigt werden.

Eine Konstellation der Art, wie sie hier für ein c-Dekapeptid dargestellt ist, ist nicht bei allen zyklischen Peptiden möglich. Außer bei c-Hexapeptiden, ist sie nur noch möglich bei zyklischen Peptiden mit $4n+2$ Aminosäureresten im Ringe (n gleich einer positiven ganzen Zahl).

Zur selben Zeit, als diese Ideen über die wahrscheinlichste Konstellation des Gramicidins S auf chemischer Grundlage entwickelt wurden, hatte Frau DOROTHY C. HODGKIN ihre röntgenanalytischen Untersuchungen beendet und daraus geschlossen, daß diese Struktur auch den physikalischen Befunden am besten entspricht⁶⁹.

⁶⁹ G. M. J. SCHMIDT, DOROTHY C. HODGKIN und B. M. OUGHTON, *Biochem. J.* 65 (1957) 744.

Wir haben hier ein Beispiel dafür, wie die synthetische Forschung auch zu so komplizierten Fragen wie die Konstellation von Polypeptiden direkte Beiträge liefern kann.

Über die Zusammenhänge zwischen Konstitution und Wirkung beim Gramicidin S kann zurzeit fast nichts ausgesagt werden. Arbeiten von HARRIS und WORK⁷⁰ und von ERLANGER⁷¹ lassen erkennen, daß bereits Derivate der offenkettigen Penta- und Dekapeptidsequenzen eine gewisse antibiotische Wirkung besitzen. Nach KATSCHALSKY⁷² sollen auch Copolymerisate der im Gramicidin vorhandenen sowie verwandter Aminosäuren wirksam sein. Möglicherweise waren in diesen Copolymerisaten wie in Polymerisaten des Glycins⁷³ größere Mengen zyklischer Peptide vorhanden. Wieviel die Ringstruktur an sich zur Wirkung beiträgt, läßt sich noch nicht entscheiden.

Ausblick

Hinter den kurz geschilderten Synthesen von Polypeptidwirkstoffen steht, hier kaum erkennbar, ein Berg von Arbeit und Rückschlägen. Wenn man mit den heute zur Verfügung stehenden Methoden zu einheitlichen Zwischenprodukten und Endprodukten gelangen will, läßt sich die Mühe auch mit viel Erfahrung kaum vermindern, und der Aufbau größerer Polypeptide wird immer eine Menge von Unsicherheitsfaktoren in sich schließen. Deren bedeutungsvollster bleibt wohl die Gefahr der partiellen Razemisierung bei der Verseifung von Peptidestern und bei der Verknüpfung zweier Peptidderivate⁷⁴. Um überhaupt wesentliche Fortschritte zu erzielen, wird es nötig sein, neue Verfahren zu finden, nach denen sich auch komplizierte Verbindungen über viele Stufen rasch und sicher aufbauen lassen. Erst dann wird es gelingen, die großen theoretischen und praktischen Möglichkeiten, welche das Polypeptidgebiet in sich schließt, voll auszuschöpfen. Erst dann wird man daran denken können, große Moleküle, wie Corticotropin, Insulin und ihre Analogen, zu synthetisieren und vielleicht gar zu den Gründen der spezifischen Wirkung von Fermenten⁷⁵ vorzustoßen.

Mit diesem wichtigen Hinweis auf die immer noch überragende Bedeutung der Grundlagenforschung für die weitere Entwicklung des für Wissenschaft und Industrie gleichermassen zukunftsreichen Gebietes der Polypeptidwirkstoffe möchte ich diese Ausführungen schließen.

⁷⁰ J. I. HARRIS und T. S. WORK, *Nature* 161 (1948) 804; *Biochem. J.* 46 (1950) 196, 582.

⁷¹ B. F. ERLANGER, H. SACHS und E. BRAND, *J. Amer. Chem. Soc.* 76 (1954) 1806. B. F. ERLANGER, W. V. CURRAN und N. KOKOWSKY, *Abstracts of Papers of the 131st Meeting*, S. 18 C. B. F. ERLANGER und L. GOODE, *Nature* 174 (1954) 840.

⁷² E. KATSCHALSKI, A. BERGER, L. BICHOWSKI-SŁOMNICKI und J. KURTZ, *Nature* 176 (1955) 118.

⁷³ D. G. H. BALLARD, C. H. BAMFORD und F. J. WEYMOUTH, *Proc. Roy. Soc. A* 227 (1954-1955) 155.

⁷⁴ Vgl. dazu A. NEUBERGER, *Advances Protein Chem.* 4 (1948) 359, und Lit.⁴².

⁷⁵ Vgl. z. B. D. E. KOSHLAND jr. und M. J. ERWIN, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 2659.