

ANGEWANDTE CHEMIE

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«

HERAUSGEGEBEN VON DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

83. JAHRGANG 1971

HEFT 5

SEITE 155–184

Die Synthese physiologisch wirksamer Peptide [**]

Von Rolf Geiger [**]

Zur Synthese von Peptiden tritt heute neben die altbewährten Schutzgruppen und Verknüpfungsmethoden eine Reihe neuerer Techniken, die den racemisierungsfreien Aufbau langerer Peptidketten gestatten. In diesem Fortschrittsbericht wird an einigen Beispielen, insbesondere aus dem Bereich der neurohypophysären Hormone Oxytocin und Vasopressin, der Corticotropine und der Releasing-Hormone, die Bedeutung der durch chemische Synthese zugänglichen Analoga für Diagnostik und Therapie aufgezeigt. Bei fortschreitender Entwicklung der Synthesetechnik werden sich auch kompliziertere Moleküle wie z. B. Insulin und selbst Enzyme in solche Betrachtungen einbeziehen lassen.

1. Einleitung

Wir kennen keinen physiologischen Vorgang, der ohne Beteiligung von Proteinen abläuft. Alle Enzyme zum Beispiel gehören dieser Stoffklasse an, und Enzyme sind die Katalysatoren für den Aufbau, den Umbau und den Abbau organischer Substanz in der Natur.

Aus chemischer Sicht sind Proteine Peptide, also Verbindungen, in denen Aminosäuren säureamidartig miteinander zu oft außerordentlich großen Molekülen verbunden sind^[1].

Die Unterscheidung zwischen Peptiden und Proteinen ist historisch bedingt und heute problematisch geworden: Man wählte die Molekülgröße, bis zu der diese Verbindungen eine natürliche Dialysemembran passieren, als Grenze. Sie liegt bei einem Molekulargewicht von etwa 10000. Peptide bestehen demnach aus bis zu ungefähr 100 Aminosäuren, während Proteine oder Makropeptide mehr als etwa 100 Aminosäuren enthalten.

Der Chemiker sucht Proteine dem Oberbegriff der Peptide unterzuordnen. Dem Biologen hingegen steht die Vorstellung vom Protein als einem Molekül näher, das – im Gegensatz zu den kleineren Peptiden – neben charakteristischen physikalischen Eigenschaften auch eine gewisse autonome Reaktivität besitzen kann. Sie äußert sich zum Beispiel in physikalischer Hinsicht in der Kon-

traktionsfähigkeit der Faserproteine oder in chemischer Hinsicht in der Katalyse hochspezifischer Reaktionen durch Enzyme.

Die Eigenschaften der Proteine sind in der Sequenz der Aminosäuren in der Peptidkette, der Primärstruktur, verschlüsselt. Die genetische Information für die Aminosäuresequenz ruht in der Basenfolge der Desoxyribonucleinsäuren (DNA) im Gen.

Die Aktivierung eines Genabschnitts setzt die Biosynthese des zugehörigen Proteins in Gang. Sie beginnt mit der Transkription der Information in eine Ribonucleinsäure (RNA), die als Sendbote am Ort der Proteinsynthese letztlich die Translation der Information in die Aminosäuresequenz bewirkt.

Der Chemiker, dem die Analyse von Proteinen oder Peptiden obliegt und der versucht, sich dieser Moleküle durch die Synthese zu bemächtigen, stößt gerade hier auf außerordentliche Schwierigkeiten. So wächst zwar die Zahl der in ihrer Aminosäuresequenz aufgeklärten Proteine immer rascher, aber erst vor kurzem wagte man sich an die Synthese eines Proteins, des Enzyms Ribonuclease.

In den letzten 15 Jahren waren Peptide bis zu einer Kettenlänge von etwa 40 Aminosäuren die eigentliche Domäne der Synthetiker. Sie fanden hier zahlreiche Vertreter aus dem Bereich der Hormone mit hoher physiologischer Aktivität und faszinierenden Eigenschaften.

Im Organismus werden diese Stoffe in Sekundenschnelle aufgebaut. Ein Team erfahrener Chemiker benötigt Wo-

[*] Dr. R. Geiger
Farbwerke Hoechst AG
623 Frankfurt (Main) 80, Postfach 800320

[**] Nach einem Vortrag vor der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte am 6. Oktober 1970 in Düsseldorf.

chen, Monate oder oft Jahre für eine solche Synthese. So erscheint es zunächst unökonomisch, auf diesem Gebiet mit der Natur konkurrieren zu wollen. Die unvorteilhafte Relation wendet sich aber sogleich, wenn man bedenkt, daß bis zum Durchsetzen einer Gen-Mutation, die sich im Austausch einer einzigen Aminosäure innerhalb eines Proteins äußert, zum Beispiel beim Hämoglobin 7–10 Millionen Jahre verstreichen^[2]. Der Chemiker hingegen bewältigt die Synthese zahlreicher analoger Peptide nach einem einmal ausgearbeiteten Schema innerhalb kurzer Zeit.

Die Peptidsynthese ermöglicht somit das Studium von Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Die chemische oder enzymatische Abwandlung natürlich vorkommender Peptide erlaubt solche Untersuchungen nur in sehr begrenztem Rahmen.

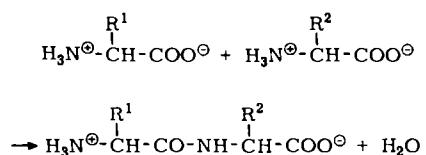
Ein weiterer Anreiz zur Synthese kann in der schweren Zugänglichkeit vieler vergleichsweise einfach gebauter Peptide liegen. Sie kommen selbst am Ort ihrer Bildung, zum Beispiel in einer Drüse oder im Serum, oft nur in geringer Konzentration vor. Erst die Synthese macht sie in einer für biologische Forschung oder medizinische Anwendung ausreichenden Menge zugänglich.

Schließlich gilt eine klare Synthese auch in dieser Stoffklasse als Beweis für eine vorgeschlagene Struktur.

Parallel zur Synthese einer wachsenden Zahl von Peptiden vergrößerte sich in den vergangenen 20 Jahren das Arsenal an methodischen Entwicklungen und technischen Erfahrungen.

2. Schutzgruppen und neuere Kondensationsmethoden

Bekanntlich entstehen Peptide formal durch Kondensation von Aminosäuren unter Wasseraustritt. Schema 1 zeigt das Prinzip dieser Reaktion am Beispiel einer Dipeptidsynthese. Für einen eindeutigen Verlauf der Reaktion darf nur jeweils eine Amino- und eine Carboxylgruppe frei sein; diejenigen funktionellen Gruppen, die nicht reagieren sollen, müssen durch



Schema 1.

Schutzgruppen verschlossen werden. Eine Komplikation liegt darin, daß auch Seitenketten R reaktionsfähige Gruppen tragen können, die dann ebenfalls blockiert werden müssen.

Wir benötigen also zwei Arten von Schutzgruppen, nämlich solche, die intermittierend die an der Peptidsynthese beteiligten α-Amino- und Carboxylgruppen schützen und selektiv wieder freigeben, und andere, die weitere funktionelle Gruppen während der ganzen Synthese blockieren. Alle diese Schutzgruppen müssen schließlich nach beendeter Synthese unter Bedingungen zu entfernen sein, die das empfindliche Endprodukt nicht verändern.

Die Zahl der empfohlenen Schutzgruppen ist groß, aber nur wenige haben eine allgemeine und ausgedehnte Anwendung gefunden. Da die meisten Peptide in saurem Medium hinreichend stabil sind, bevorzugt man heute Kombinationen von Schutzgruppen mit abgestufter Säurelabilität.

In Tabelle 1 werden drei wichtige Typen vorgestellt, der Benzyl-, der tert.-Butyl- und der Phenylsulfenyl-Typ^[1]. Benzylester als Schutz für Carboxylgruppen können durch katalytische Hydrierung gespalten werden. Erst später wurde entdeckt, daß auch Säuren wie Jodwasserstoff oder Bromwasserstoff in Eisessig, ferner Fluorwasserstoff oder heiße Trifluoressigsäure eine Protonensolvolyse von Benzylestern bewirken.

Tabelle 1. Schutzgruppen für Aminosäuren während der Peptidsynthese

Aminosäure + Schutzgruppe	Name	Abk.	Abspaltung
	Benzyoxy (Benzylester)	OBzl	HBr, HF, heiße Trifluoressigsäure, katalyt. Hydrierung
	Benzyl-oxy-carbonyl	Z	
	tert.-Butyoxy (tert.-Butylester)	OBu ^t	z. B. kalte Trifluoressigsäure
	tert.-Butyl-oxy carbonyl	Boc	
	2-Nitro-phenylsulfenyl	Nps	z. B. schwache Säure + Indol

Zum Schutz der Aminogruppe kann der Benzylrest nicht unmittelbar am Stickstoff befestigt werden, denn die C–N-Bindung ist zu stabil. Damit der Benzylrest auch hier wieder in Esterbindung vorliegt, wird ein Urethan hergestellt. Nach Abspalten des Benzylrests entweicht die Kohlensäure als CO₂, und die Aminogruppe liegt in freier Form vor.

In gleicher Weise wird der tert.-Butylrest zum Schutz von Amino- und Carboxylgruppe verwendet. Tert.-Butylester widerstehen alkalischer Verseifung und katalytischer Hydrierung, werden von Säuren aber schon unter Bedingungen rasch angegriffen, unter denen Benzylreste noch stabil sind, zum Beispiel durch kalte Trifluoressigsäure.

Eine nochmalige Steigerung der Säureempfindlichkeit erreicht man mit dem Nitrosulfenylrest, der allerdings nur zum Schutz der Aminogruppe brauchbar ist. Zur Spaltung der S–N-Bindung genügt schon ein nucleophiler Angriff in verdünnter Säure. Weil diese Reaktion aber nur zu einem Gleichgewicht führt und die Nitrophenylsulfenylgruppe überdies leicht auf den Indolring des Tryptophans übertragen wird, setzt man einen „Fänger“ zu, z. B. Indol, der den Sulfenylrest aufnimmt und irreversibel bindet^[3].

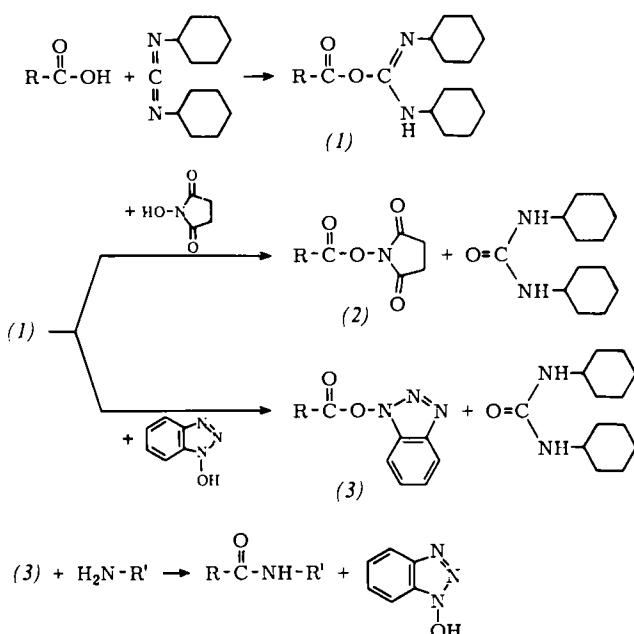
Auch für die Maskierung von Hydroxy-, Mercapto- und Guanidinogruppen, die ebenfalls Bestandteile von Aminosäuren sein können, hat man – meist auf der Basis der erwähnten Benzyl- und tert.-Butyl-Typen – mehr oder minder praktikable Lösungen gefunden^[1].

Ein weiteres zentrales Problem der Peptidchemie ist die racemisierungsfreie Kondensation von Aminosäuren oder Peptidfragmenten.

Die Bildung einer Peptidbindung zwischen Amino- und Carboxylgruppe unter Wasseraustritt benötigt Energie. Sie wird über die chemische Aktivierung der Carboxylgruppe zugeführt. In diesem energiereichen Zustand unterliegen die optisch aktiven Aminosäuren jedoch leicht der Racemisierung. Sie bedeutet meist Verlust an biologischer Wirkung. Deshalb ist ihre Vermeidung die dringlichste Forderung, die an jede Kondensationsmethode gestellt werden muß.

Von den „alten“ Techniken erfüllte zunächst nur eine einzige diese Forderung: die Azidmethode, die noch auf Curtius zurückgeht^[1]. Schließlich gelang es auch, bei der schon lange bekannten Carbodiimid-Methode^[1] die Racemisierung auf ein Minimum zu senken (Schema 2).

Zunächst lagert sich Dicyclohexyl-carbodiimid (DCC) an die Carbonsäure zu einem äußerst reaktionsfähigen und deshalb racemisierungsgefährdeten Isoharnstoffderivat an. Diese Verbindung wird nun sehr rasch von bestimmten N-Hydroxyverbindungen, die dem Ansatz beigegeben werden, zerlegt. Dabei



Schema 2.

entstehen z. B. die hier aufgeführten aktivierte Carbonsäurederivate (2) und (3)^[4,5]. In der letzten Stufe, der langsameren Bildung der Peptidbindung durch Aminolyse von (2) oder (3), reagiert das Amin nicht mehr mit dem zur Racemisierung neigenden primären Anlagerungsprodukt, sondern mit diesen aktivierte Derivaten, die trotz hoher Reaktivität der Racemisierung widerstehen.

Kürzlich wurde gezeigt, daß auch die Peptidsynthese über gemischte Anhydride mit Kohlensäure-halbestern^[1] unter bestimmten Bedingungen racemisierungsfrei verlaufen kann^[6].

Eine neuere Variante der Synthesetechnik bleibt noch zu erwähnen: die Festköpersynthese nach Merrifield^[7]. Bei ihr wird die Aminosäure am Carboxylen reversibel an einem Kunstharz befestigt. Die weiteren Syntheseschritte spielen sich nun an diesem unlöslichen Träger ab, der in Lösungsmittel suspendiert wird und darin quillt. Nach jeder Reaktion werden überschüssige Reagentien einfach durch Lösungsmittel ausgewaschen. Da sich beim sukzessiven Anknüpfen der Aminosäuren die Reaktionsschritte wiederholen, ist die Synthese automatisierbar. Die mit dieser interessanten Methode erzielten Resultate haben zwar bisher in vielen Fällen die hochgespannten Erwartungen noch nicht erfüllt, doch lassen sich mit ihr z. Zt. Peptide bis zu etwa zwölf Aminosäuren unter beträchtlichem Zeitgewinn herstellen, wenn man über gute Reinigungsmöglichkeiten für das zunächst anfallende rohe Peptidgemisch und über Kenntnisse und Erfahrungen in der Anwendung und Beurteilung von Reinheitskriterien verfügt. Im folgenden sollen nun Überlegungen, welche die Synthese physiologisch wirksamer Peptide leiten, an einigen Beispielen besprochen werden.

3. Die Hormone der Neurohypophyse

Hormone besitzen keine autonome Reaktivität wie zum Beispiel Enzyme; sie sind Sendboten, die erst nach Bindung an spezifische Rezeptoren am Wirkungsort eine Reaktion oder Reaktionskette auslösen. Wenn wir also

in der Aminosäuresequenz eines Peptidhormons Änderungen vornehmen, um Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu studieren, tasten wir damit gleichzeitig den Rezeptor ab, ohne mit dieser Methode allerdings hinreichend genaue Aussagen über seine Natur und Topographie machen zu können.

Die beiden Neurohypophysenhormone, das wehenauslösende Oxytocin (6) und das antidiuretische und pressorisch wirkende Vasopressin [Arg⁸-Vasopressin (8) und Lys⁸-Vasopression (9)], werden zum Beispiel nur in ihrer durch die cyclische Form bestimmten Raumstruktur vom Rezeptor erkannt. Schon die Öffnung des von einer Disulfidbrücke gebildeten Ringes oder auch nur eine geringfügige Ringerweiterung bringen die Hormonwirkung zum Verschwinden. Eine ganze Reihe von Modifikationen ist allerdings trotzdem möglich.

In Tabelle 2 sind aus den über 150 bekannten natürlichen und synthetischen Peptiden mit analoger Struktur^[1] einige wenige herausgegriffen. Wir erkennen das Arginin-vasotocin (7), in dem man das Urhormon dieser Familie vermutet. Es findet sich noch in Kaltblütlern und in der Zirbeldrüse höherer Wirbeltiere^[8]. Von ihm ausgehend, kann man sich die Differenzierung in die Oxytocin- oder Vasopressinreihe durch schrittweise Gen-Mutation nach vorangegangener Gen-Verdoppelung vorstellen^[9].

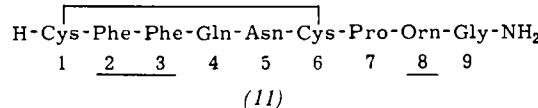
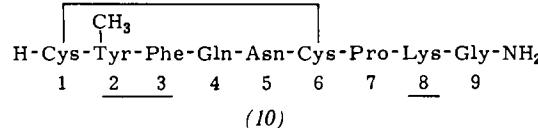
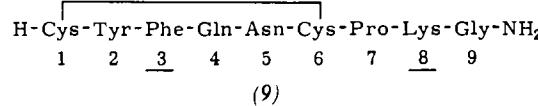
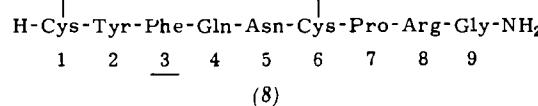
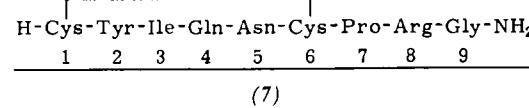
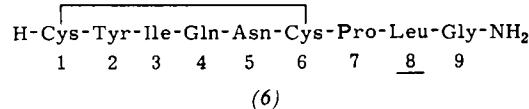
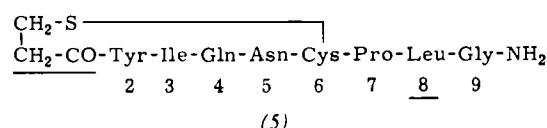
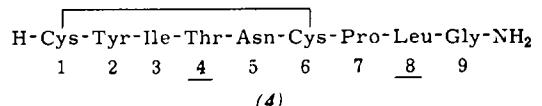


Tabelle 2. Biologische Wirkungen der Neurohypophysenhormone und ihrer Analoga (angegeben in I.E./mg).

Hormon oder Analogon	Oxytocin-wirkung (Ratten-uterus)	Vasopressin-Wirkung Blutdruck (Ratte)	Antidiurese (Ratte)	Verhältnis Blutdruck: Antidiurese
Thr ¹ -Oxytocin (4) (synth.)	900	0.4	3	1 : 7.5
Desamino-oxytocin (5) (synth.)	900	1	15	1 : 15
Oxytocin (6) (nat.)	450	5	5	1 : 1
Arg ² -Vasotocin (7) (nat.)	155	245	250	≈ 1 : 1
Arg ² -Vasopressin (8) (nat.)	16	400	400	1 : 1
Lys ² -Vasopressin (9) (nat.)	5	270	250	≈ 1 : 1
O-Methyl-Tyr ² - Lys ² -vasopressin (10) (synth.)	0.02	2.4	275	1 : 115
Phe ² -Orn ⁸ -Vaso- pressin (11) (synth.)	1	120	0.5	240 : 1

Neben diese natürlichen Hormone treten nun synthetisch hergestellte Peptide. Eliminiert man die Aminogruppe, die sich am Cystein befindet, so kommt man in der Oxytocin-Reihe zum Desamino-oxytocin (5), das eine stärkere biologische Wirkung zeigt als das Naturprodukt.

Zur Erklärung dieses Phänomens müssen wir einige Betrachtungen über den biologischen Abbau der Peptide einschieben. Peptide werden im Organismus innerhalb kurzer Zeit gebildet und wieder abgebaut. Es ist deshalb sicher kein Zufall, daß sich der Körper gerade dieser Stoffklasse zur empfindlichen, rasch einsetzenden und ebenso rasch abklingenden „Feinregulierung“ physiologischer Vorgänge bedient, wobei durch Erhöhung oder Drosselung der Zufuhr auch eine sehr rasch regulierbare Gleichgewichtseinstellung erreicht wird.

Aminopeptidasen bauen die Peptide vom Aminoende her und Carboxypeptidasen vom Carboxyende her ab. Die Spaltung bestimmter Bindungen innerhalb des Moleküls, die bei Proteinen im Vordergrund steht, tritt bei niederen Peptiden zurück.

Beim Desamino-oxytocin (5) kann die für den Oxytocin-Abbau spezifische Aminopeptidase nicht mehr greifen. Das Molekül hat deshalb eine längere Lebensdauer als das natürliche Hormon. Sie äußert sich im Experiment als erhöhte Aktivität, vorausgesetzt, daß – wie im vorliegenden Fall – die Rezeptorbindung durch die veränderte Struktur nicht wesentlich verringert wird.

Eine Überraschung brachte das hochaktive Threonin⁴-oxytocin (4), dessen Synthese erst kürzlich von *Manning* beschrieben wurde^[10]. Man hat während der letzten 15 Jahre über 80 Oxytocin-Analoga synthetisiert, kam aber nur beim Desamino-oxytocin auf dem Umweg über die längere Lebensdauer des Moleküls zu erhöhter biologischer Wirkung. Im Threonin⁴-oxytocin wird nun aber offensichtlich die Bindung an den Rezeptor und damit der noch unbekannte primäre Effekt des Hormons am Rezeptor verstärkt. In dieser Hinsicht ist das natürliche Hormon jetzt durch eine synthetisch hergestellte „Mutante“ entthront!

Die Vasopressine zeichnen sich vor allem durch zwei physiologische Effekte aus: Sie fördern die Rückresorption von Wasser im distalen Abschnitt der Nierentubuli,

d. h. sie wirken antidiuretisch. Weiterhin verstärken sie die Kontraktion der Arteriolen und Kapillaren und erhöhen dadurch den Blutdruck.

Die Vasopressine finden demnach mehrere Rezeptoren. Daß auch eine gewisse Affinität zu Oxytocin-Rezeptoren besteht, ist bei der nahen strukturellen Verwandtschaft der Hormone nicht überraschend. Schließlich hat umgekehrt auch Oxytocin eine gewisse Vasopressinwirkung. Variationen innerhalb der Peptidkette beeinflussen die Vasopressinwirkungen in unterschiedlichem Maße. Besonders deutlich wird dies bei der geringfügigen Änderung am Tyrosin in Position 2. Die Methylierung der phenolischen OH-Gruppe des Tyrosins wie in (10) bringt die pressorische Wirkung nahezu zum Erliegen, während die Antidiurese ein wenig gesteigert wird. Beim Ersatz des Tyrosins durch Phenylalanin, also bei Eliminierung der OH-Gruppe, verschwindet umgekehrt die antidiuretische Wirkung fast völlig, während der pressorische Effekt weniger stark beeinflußt wird. Zusätzliche Variation in Position 8 wie in (11) verstärkt diese Tendenz. Während sich bei Vasopressin Pressorwirkungen und Antidiurese, in Internationalen Einheiten pro mg ausgedrückt, definitionsgemäß die Waage halten, gelingt es also durch geringfügige Änderung des Moleküls, die Wirkungsspezifität um Größenordnungen zu steigern (siehe letzte Spalte in Tabelle 2). Praktische Anwendung findet ein Vasopressin mit spezifischer Pressorwirkung in der Gynäkologie, wo es als Zusatz zu Lokalanästhetica das Adrenalin ersetzen soll.

Verschiebungen des Wirkungsspektrums kennt man übrigens auch beim Oxytocin, das neben der Uteruskontraktion auch die Milchejektion auslöst, doch sind hier bisher keine so ausgeprägten Änderungen der Spezifität gefunden worden.

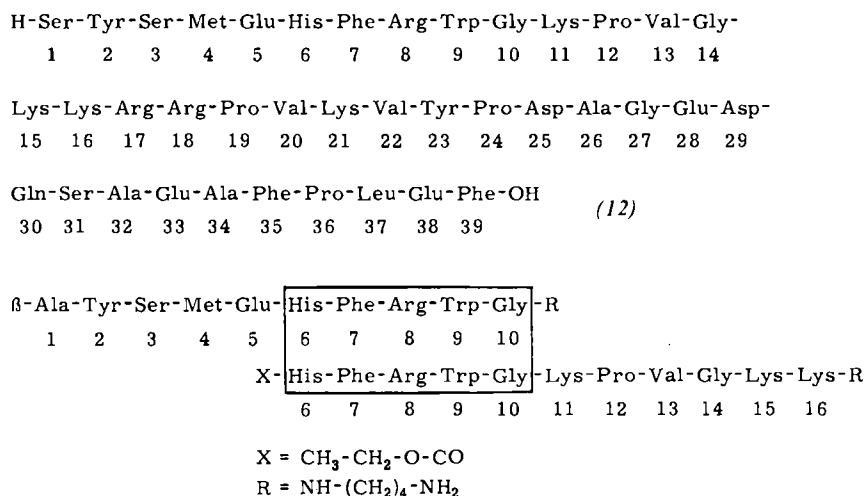
4. Das Adrenocorticotrope Hormon^[1]

Während bei den Neurohypophysenhormonen Variationen nur unter Konstanthaltung der Molekülgröße zu hochwirksamen Analoga führen, tritt beim Adrenocorticotropen Hormon (ACTH, Corticotropin) als weitere Variationsmöglichkeit die Verkürzung der Kette hinzu.

Das Hormon besteht aus einer Kette von 39 Aminosäuren (Schema 3). Es wird in der Adenohypophyse, dem Hypophysenvorderlappen, gebildet, und es provoziert nach Anlagerung an einen Rezeptor der Nebennierenrinde die Ausschüttung der Corticosteroide.

Nur ein Teil des Moleküls kann für die Hormonwirkung verantwortlich sein, denn schon Peptide mit etwa 20–24 Aminosäuren, vom Aminoende aus gerechnet, sind biologisch voll aktiv. Bei weiterer Verkürzung der Peptidkette tritt ein rascher, aber dennoch nicht abrupter Abfall der ACTH-Wirkung ein. Das deutet schon darauf hin, daß der eigentlich aktive Bereich wesentlich kleiner sein könnte und von Sequenzen eingeschlossen ist, welche die Bindung dieses aktiven Bereichs an den Rezeptor vermitteln.

Zur Prüfung dieser Hypothese wurden zwei Peptide mit stark verkürzter ACTH-Sequenz miteinander verglichen (Schema 3)^[11]. Der ihnen gemeinsame, hervorgehobene Bereich ist die vermutete aktive Sequenz. Die übrigen Teile des Moleküls wären dann für die Bindung dieser Sequenz an den spezifischen ACTH-Rezeptor verantwortlich. Die terminalen Reste wurden so gewählt, daß sie das Molekül gegen enzymatischen Abbau vom Amino- und Carboxylende her schützen.



Schema 3. Human-Corticotropin (12) (oben) und Prinzip zur Ermittlung der kürzesten biologisch wirksamen Sequenz (unten) an synthetischen ACTH-Analoga (Wirkung: 0.4 bzw. 7 I.E./mg).

Wie das Experiment ergab, üben beide Peptide eine zwar geringe, aber eindeutig meßbare ACTH-Wirkung aus. Da nur die Sequenz 6–10 beiden Peptiden gemeinsam ist, muß also dieses kleine Fragment für die Auslösung des ACTH-Effekts unentbehrlich sein.

Tabelle 3. Konstitution und ACTH-Aktivität von synthetischen ACTH-Analoga. Die Sequenz 5–16 der vier Analoga entspricht der im natürlichen Hormon [vgl. (12)].

Verbindung [a]	Zahl der Aminosäuren	ACTH-Aktivität [b]
β -Ala-Tyr-Ser-Met-Glu-...-Lys-Lys-R	17	807
1 2 3 4 5 16 17		(533–1360)
β -Ala-Tyr-Ser-Met-Glu-...-Lys-R	16	136
1 2 3 4 5 16		(86–202)
X-Ser-Met-Glu-...-Lys-Lys-R	15	149
3 4 5 16 17		(82–250)
X'-Glu-...-Lys-Lys-R	13	92
5 16 17		(70–120)

[a] R = $\text{NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_2$; X = $p\text{-HOC}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{CO}$; X' = $\text{H}_3\text{C-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-CO}$.

[b] Angaben in I.E./mg; Bestimmung an der Ratte nach Dexamethason®-Blockierung; 3. Internat. Standard, P = 0.95.

Interessanterweise ist dieselbe Sequenz auch für die Wirkung des Melanophoren Stimulierenden Hormons^[1] (MSH) und des Lipotropen Hormons (LPH)^[12] verantwortlich. Erst die beiderseitig an dieses Grundelement angebauten Sequenzen bestimmen, an welchen Rezeptor der aktive Bereich gebunden wird, und entscheiden darüber, ob seine Wirkung bevorzugt corticotrop, melanophorenstimulierend oder lipolytisch sein wird.

Die bindenden Sequenzen tragen erheblich zur biologischen Wirkung bei. Schon Peptide mit 13–15 Aminosäuren erreichen nahezu die Wirkung des natürlichen Corticotropins, vorausgesetzt, daß Amino- und Carboxylende gegen enzymatischen Abbau geschützt sind (Tabelle 3)^[11].

Bei einer Kettenlänge von 17 Aminosäuren steigt die biologische Wirkung jedoch sprunghaft an und erreicht

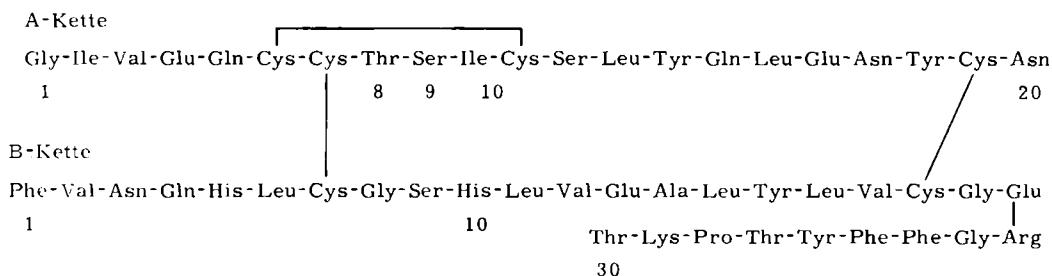
mit etwa 800 I.E./mg ungefähr die vierfache Wirkung des natürlichen Hormons. Ähnliche Beobachtungen wurden an einem Peptid mit 18 Aminosäuren gemacht, bei dem das Aminoende durch α -Serin und das Carboxylende als unsubstituiertes Amid blockiert waren^[13].

Die Bedeutung dieser kurzkettigen, biologisch hochaktiven Corticotropine liegt in ihrer Fähigkeit, infolge ihres vergleichsweise niedrigen Molekulargewichts Schleimhäute leichter zu durchdringen als das natürliche Hormon. Sie sind deshalb im Gegensatz zum natürlichen Hormon sublingual oder intranasal applizierbar. Ihre gesteigerte Wirkungsdauer, die sich bei geeigneter Dosierung über einige Stunden erstreckt, kommt einer idealen ACTH-Therapie entgegen, welche den circadianen Rhythmus berücksichtigt. Der Zeit-Wirkungs-Verlauf dieser neuen synthetischen Corticotropine entspricht dem raschen morgendlichen Anstieg des ACTH-Blutspiegels und dem langsamen Zurückgehen auf den niedrigen Normalwert.

5. Insulin und Ribonuclease

Bei den bisher behandelten Hormonen bot die chemische Synthese selbst keine grundsätzlichen Schwierigkeiten mehr, und man konnte sich völlig auf das Studium von Struktur-Wirkungs-Beziehungen konzentrieren. Insulin jedoch, das auch aus medizinischer Sicht zu den meistdiskutierten Peptidhormonen zählt, stellt nicht nur den Physiologen, sondern auch den Chemiker vor viele Probleme. Insulin verkörpert chemisch einen neuen Typ: Es besteht aus zwei Peptidketten, die über zwei Di-

sulfidbrücken miteinander verbunden sind. Eine weitere Disulfidbrücke befindet sich innerhalb der A-Kette (Schema 4).



Schema 4. Human-Insulin. Rinder-Insulin enthält in Position 8–10 der A-Kette Ala-Ser-Val, und bei Rinder- und Schweine-Insulin schließt die B-Kette mit Ala statt Thr.

Man hat lange gerätselt, wie der Organismus ein solches Molekül aufbaut. Steiner entdeckte das Proinsulin^[14], einen einkettigen Vorläufer, in dem wir die beiden Ketten des Insulins wiederfinden. Sie sind über ein Zwischenglied, das „connecting peptide“ oder C-Peptid, miteinander verbunden. Wenn dieses C-Peptid seine Aufgabe, die beiden Kettenbereiche in die zur Ausbildung der Disulfidbrücken geeignete Position zu bringen, erfüllt hat, wird es enzymatisch herausgespalten und fällt dem Abbau anheim (Abb. 1).

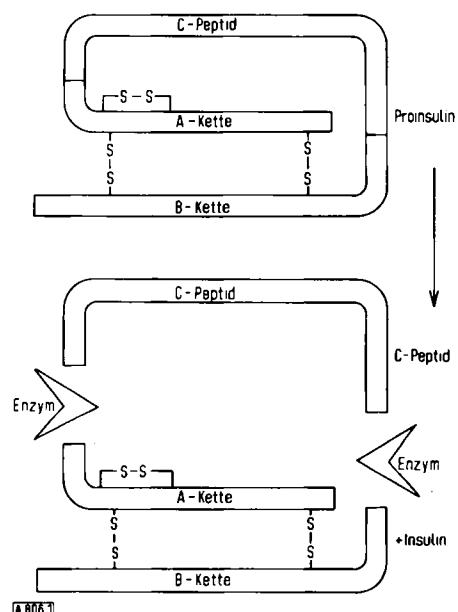


Abb. 1. Schema der Bildung von Insulin aus Proinsulin.

Obwohl die chemische Synthese des Insulins bereits ge-glückt ist^[15], sind wir von einer befriedigenden Lösung der damit verbundenen Probleme noch weit entfernt. Allein die Synthese der beiden Peptidketten bereitet größere Schwierigkeiten als die Synthese anderer Peptide vergleichbarer Kettenlänge. Der limitierende Schritt ist jedoch die gezielte Kombination beider Ketten zum Insulin.

Während zum Beispiel bei der Ribonuclease, einem Enzym, das aus einer Peptidkette von 124 Aminosäuren besteht und vier Disulfidbrücken enthält (Abb. 2), nach

reduktiver Öffnung und erneutem Schließen der vier Disulfidbrücken anstelle der 105 möglichen monomolekularen Isomeren in quantitativer Ausbeute nur ein einzi-

ges, nämlich das voll aktive Enzym, entsteht, fehlt den beiden Insulinketten die der Ribonuclease innewohnende Richtkraft. Man erhält ein Gemisch zahlreicher isomerer und polymerer Verbindungen.

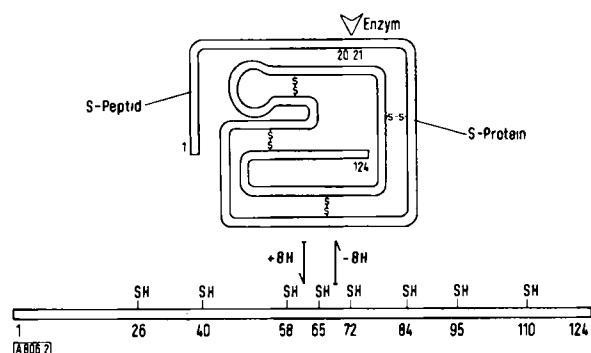


Abb. 2. Oben: oxidierte (enzymatisch wirksame) und unten: reduzierte Ribonuclease.

Proinsulin, der einkettige Insulin-Vorläufer, verhält sich der Ribonuclease ähnlicher: In großer Verdünnung werden immerhin etwa 70% formelgerechter Rekombination erhalten. Unter präparativen Bedingungen, d. h. bei höherer Konzentration, wird diese Ausbeute allerdings nicht mehr erreicht.

Man kann die Parallelen zwischen Ribonuclease und Insulin sowie Proinsulin noch weiter verfolgen. Ribonuclease wird durch das Enzym Subtilisin an einer einzigen Stelle – zwischen den Aminosäuren 20 und 21 – spezifisch gespalten^[16]. Trotz des Bruchs der Peptidkette an dieser Stelle bleibt die enzymatische Wirkung der Ribonuclease erhalten. Sie verschwindet erst, wenn die beiden Bruchstücke, das S-Peptid und das S-Protein, voneinander getrennt werden. Vereinigt man die beiden Teile wieder in Lösung, so bewirken die starken zwischenmolekularen Kräfte zwischen beiden Peptiden, daß sie sofort wieder in richtiger Konformation zum enzymatisch voll aktiven Gebilde zusammentreten (Abb. 2).

Die an der Ribonuclease gewonnenen Erfahrungen wurden auch auf das Proinsulin übertragen: Man versuchte, reduziertes Proinsulin, das bereits an einer oder an beiden Spaltstellen enzymatisch aufgebrochen war, zu reoxidieren. Die Rekombinationsausbeute war aber nicht

höher als bei der Kombination von A- und B-Kette, d. h., auch diesen Spaltstücken des Proinsulins wohnen nicht dieselben Richtkräfte inne wie den beiden Spaltstücken der Ribonuclease.

Bei diesem Versuch muß aber hinsichtlich der Aussagekraft eine Einschränkung gemacht werden. Bei der enzymatischen Spaltung des Proinsulins wird nicht nur das C-Peptid herausgeschnitten. An den Bindungsstellen befinden sich je zwei basische Aminosäuren, die bei dieser Reaktion ebenfalls ganz oder teilweise abgespalten werden. Was schließlich als C-Peptid isoliert wird, ist nicht das eigentliche Fragment, sondern das um vier basische Aminosäuren ärmere Zwischenglied.

Es bestünde also immerhin die Möglichkeit, daß gerade diese basischen Aminosäuren für die volle Ausbildung der Attraktionskräfte zwischen den drei Bereichen verantwortlich sind.

Da diese Frage nicht mit natürlichem C-Peptid beantwortet werden konnte, mußte in einer etwa 120-stufigen Synthese ein C-Peptid synthetisiert werden, das diese vier basischen Aminosäuren an den beiden Enden besäß^[17].

Da auch die Zugabe dieses synthetischen Fragments die Ausbeute bei der Rekombination von A- und B-Kette nicht beeinflußte^[18], haben wir aus dieser Richtung wohl keine Hilfe mehr für die Insulinsynthese zu erwarten.

Auch die Synthese über Proinsulin ist in ökonomischer Hinsicht wenig attraktiv. Zu der Mühe, ein Peptid mit über 80 Aminosäuren anstelle zweier Ketten mit 21 bzw. 30 Aminosäuren zu synthetisieren, tritt die präparativ nicht voll befriedigende Ausbildung der Disulfidbrücken. Das Herausspalten des C-Peptids mit einem Enzym, das wir noch nicht in der Hand haben, und der Verlust dieser Sequenz, die nicht mehr für eine erneute Synthese verwendet werden könnte, lassen eine präparativ ergiebige Insulinsynthese auf diesem Weg vollends utopisch erscheinen.

So bleibt noch der Versuch der sukzessiven Bildung der Disulfidbrücken durch spezifische Reaktionen zur Herstellung asymmetrischer Disulfide. Entsprechende Methoden sind im Prinzip bekannt und wurden bereits auf Modellpeptide mit partieller Insulinsequenz angewandt^[19].

Trotz dieser ungeklärten Situation begann man auch beim Insulin schon mit Studien über Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Der Zwang, unbefriedigende Synthesewege zu beschreiten, gestattet zwar noch keine präzisen Aussagen über die biologische Wirkung von Insulin-Analoga, doch hofft man durch Aminosäureaustausch zu erfahren, welche Aminosäuren oder funktionellen Gruppen für die Insulinwirkung essentiell sind. Auch beim Insulin bietet sich ein ähnliches Bild wie beim Oxytocin und Vasopressin. Extensiver Aminosäureaustausch beeinflußt die biologische Wirkung in quantitativer und qualitativer Hinsicht noch weniger als bei den Neurohypophysenhormonen, dagegen sind oft ganz geringfügige Variationen in der A-Kette, die vielleicht die Raumstruktur des Insulins beeinflussen, nicht mehr erlaubt^[20].

Beim Insulin ist man der alten Grenze zwischen Peptiden und Proteinen schon sehr nahe gekommen; mit der Syn-

these der Ribonuclease^[21] sowie des Ribonuclease-S-Proteins^[22] wurde sie erstmals überschritten. Die Methoden, deren man sich hier bediente, waren aber dieselben wie bei der Synthese niederer Peptide – ein Grund mehr, die Peptidnatur der Proteine noch stärker als bisher in den Vordergrund zu rücken.

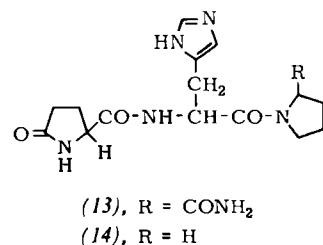
Die Tendenz zu immer kühneren Synthesen immer größerer Peptide ist unverkennbar. Gerade im Jahr der ersten Enzymsynthese wandte sich das Interesse aber auch wieder einer Gruppe niedriger Peptide zu, den Releasing-Hormonen^[23].

6. Releasing-Hormone

Die Releasing-Hormone werden im Hypothalamus gebildet, wandern durch ein Portalsystem in den Hypophysenvorderlappen (HVL) und bewirken dort spezifisch die Ausschüttung eines Hormons, wobei jedem dieser HVL-Hormone anscheinend ein Releasing-Hormon (und möglicherweise auch ein „Inhibiting Factor“) übergeordnet ist.

Die Bedeutung der Releasing-Hormone liegt zunächst einmal auf diagnostischem Gebiet. Ähnlich wie man mit den HVL-Hormonen die Funktionstüchtigkeit der Erfolgsorgane, z. B. der Gonaden oder der Nebennierenrinde, prüfen kann, sollte mit den Releasing-Hormonen eine Hypophysen-Funktionsprüfung gelingen, wobei eine Differentialdiagnose der Zelltypen möglich würde, denen jeweils die Produktion eines bestimmten HVL-Hormons obliegt.

Therapeutisch werden Releasing-Hormone vielleicht in solchen Fällen eine Rolle spielen, in denen die aus tierischem Material gewonnenen, untergeordneten HVL-Hormone wegen ihrer Artspezifität beim Menschen unwirksam sind. Die Behandlung hormonaler Störungen mit Releasing-Hormonen käme somit – intakter Hypophysenvorderlappen und mangelnde Artspezifität der Releasing-Hormone vorausgesetzt – der Behandlung mit arteigenen HVL-Hormonen gleich.



Noch ist allerdings erst die Struktur eines einzigen dieser Hormone aufgeklärt, des Thyreotropin-Releasing-Hormons (TRH)^[24] (Pyroglutamyl-histidyl-prolinamid) (13). Die Entdeckungsgeschichte dieses Hormons beleuchtet die unvorstellbaren Schwierigkeiten, denen man bei der Bearbeitung dieser Stoffklasse gegenübersteht. Selbst hochgereinigte Extrakte aus Hunderttausenden von Hypothalamen ergaben für eine Konstitutionsaufklärung noch zu wenig Material, das außerdem chemisch uneinheitlich war. Zeitweilig sah man die im Hydrolysat

gefundenen Aminosäuren nur noch als Verunreinigung an und glaubte nicht mehr an die Peptidnatur dieser Hormone.

Erst als auch in weitgehend reinen Präparaten die drei Aminosäuren Histidin, Prolin und Glutaminsäure in äquimolaren Mengen gefunden wurden, begann man mit der Synthese der sechs möglichen isomeren Tripeptide. Sie waren biologisch inaktiv. Dennoch war man der Lösung des Problems schon näher als die negativen Befunde vermuten ließen. Beim Versuch, diese Peptide zu acetylieren, lieferte Glu-His-Pro ein Produkt mit hoher TRH-Wirkung^[25]. Gleichzeitig wurde die Anwesenheit von Pyroglutaminsäure abgeleitet^[26], die neben anderen Produkten auch bei der Acetylierung von Glutaminsäure entstehen kann.

Diese Beobachtungen veranlaßten schließlich die Synthese von Pyroglutamyl-histidyl-prolin-amid, dessen Identität mit dem natürlichen TRH bewiesen wurde^[24]. Damit waren gleichzeitig Synthese und Konstitutionsaufklärung dieses Hormons gelungen.

Der Verlauf dieser Strukturaufklärung liefert vermutlich das Modell für das Auffinden weiterer Releasing-Hormone, denn alle diese Verbindungen sind nur in so geringer Menge isolierbar und so schwer in der für die Konstitutionsermittlung erforderlichen Reinheit zu gewinnen, daß man die Unterstützung durch die Synthese schon in einem sehr frühen Stadium benötigt. Auch für Diagnostik und Therapie werden diese Hormone nur als synthetische Verbindungen in ausreichender Menge verfügbar sein.

Die Konstitutionsspezifität des TRH ist hoch. Schon geringfügige Änderungen der Struktur führen zum Verlust der biologischen Aktivität. Die Carbonsäureamidgruppe ist jedoch für die Wirkung entbehrlich. Ihre Eliminierung führt zu einem Dipeptidamid (14), das zwar etwas weniger aktiv, aber ebenso spezifisch ist wie das natürliche Hormon^[27]. Dieses Dipeptidamid ist unseres Wissens das erste und bisher einzige Dipeptid mit einer so starken und spezifischen Hormonwirkung.

7. Schlußbetrachtung

Bei einem Rückblick auf die Arbeiten der vergangenen Jahre stellt man zunächst mit Erstaunen fest, daß es vor nur 20 Jahren noch keine Peptidchemie im heutigen Sinne gab.

Obwohl Emil Fischer schon im ersten Dezennium unseres Jahrhunderts das Fundament zu diesem Gebäude legte, nahm es nur langsam seine jetzige Gestalt an. Die Entdeckung der Benzoxy carbonyl-Schutzgruppe durch Bergmann und Zervas 1932 leitete eine neue Phase der Peptidsynthese ein^[1], aber noch 1950 waren erst wenige natürlich vorkommende Di- und Tripeptide bekannt und synthetisiert.

Zwischen 1944 und 1954 wurden jedoch die analytischen Voraussetzungen für die Reinigung, Isolierung und Konstitutionsaufklärung höherer Peptide geschaffen, und 1953 zeigte Du Vigneaud mit der Synthese des

Oxytocins^[11], daß die Herstellung solcher Stoffe in der Retorte nicht mehr länger Utopie war. Mit dieser Tat wurde der Bann gebrochen, und das vergangene Jahrzehnt brachte mit den Synthesen von Corticotropin, Insulin, Glucagon und Calcitonin und schließlich mit der ersten Synthese eines Enzyms und eines Releasing-Hormons einen ungeahnten Aufschwung der Peptidchemie. Die Chemie der Peptide ist mit ihrer methodischen Seite in die organische Chemie integriert; ihre Aufgabe bezieht sie aus biochemischen Problemstellungen. Sie schlägt so eine der stärksten und lebendigsten Brücken zwischen Chemie und Biologie, und die Hoffnung ist sicher berechtigt, daß die Medizin in zunehmendem Maße an dieser Allianz partizipieren wird.

Eingegangen am 1. Dezember 1970 | A 806

- [1] E. Schröder u. K. Lübke: *The Peptides*. Academic Press 1965/66.
- [2] Siehe G. Braunitzer, *Jahrbuch Max-Planck-Gesellschaft* 1967, 77.
- [3] E. Wünsch, A. Fontana u. F. Drees, *Z. Naturforsch.* 22b, 607 (1967).
- [4] F. Weygand, D. Hoffmann u. E. Wünsch, *Z. Naturforsch.* 21b, 426 (1966); E. Wünsch u. F. Drees, *Chem. Ber.* 99, 1451 (1966).
- [5] W. König u. R. Geiger, *Chem. Ber.* 103, 788, 2024, 2034 (1970).
- [6] D. S. Kemp, Z. Bernstein u. J. Rebek, *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 4756 (1970).
- [7] R. B. Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 2153 (1963).
- [8] S. Pavel, *Endocrinology* 77, 807 (1965).
- [9] R. Schwyzer, *Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss.* 25, 74 (1970).
- [10] M. Manning, *Biochemistry* 9, 3925 (1970).
- [11] R. Geiger u. H.-G. Schröder, *Proc. 2. Amer. Peptide Symposium*, Cleveland 1970. Gordon and Breach, New York, im Druck.
- [12] C. H. Li, L. Barnafi, M. Chrétien u. D. Chung, *Nature* 208, 1093 (1965).
- [13] A. Walser, *Helv. Med. Acta* 34, Suppl. 48, 125 (1968); B. Riniker u. W. Rittel, *Helv. Chim. Acta* 53, 513 (1970).
- [14] D. F. Steiner u. P. E. Oyer, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 57, 437 (1967); D. F. Steiner, D. Cunningham, L. Spiegelman u. B. Aten, *Science* 157, 697 (1967); R. E. Chance, R. M. Ellis u. W. W. Bromer, *ibid.* 161, 165 (1968).
- [15] Siehe H. Zahn, *Naturwissenschaften* 54, 396 (1967).
- [16] F. M. Richards u. P. J. Vithayathil, *J. Biol. Chem.* 234, 1459 (1959).
- [17] R. Geiger, G. Jäger, W. König u. A. Volk, *Z. Naturforsch.* 24b, 999 (1969).
- [18] R. Geiger, H. Wissmann, H.-L. Weidenmüller u. H.-G. Schröder, *Z. Naturforsch.* 24b, 1486 (1969).
- [19] L. Zervas, I. Photaki u. N. Ghelis, *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 1337 (1962); L. Zervas, I. Photaki, A. Cosmatos u. D. Borovas, *ibid.* 87, 4922 (1965); R. G. Hiskey, R. L. Smith, A. M. Thomas, J. T. Sparrow u. W. C. Jones jr. in E. Bricas: *Peptides*. North-Holland Publishing Comp., Amsterdam 1968.
- [20] U. Weber, F. Schneider, P. Köhler u. G. Weitzel, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 348, 947 (1967); S. Hörmle, U. Weber u. G. Weitzel, *ibid.* 349, 1428 (1968); U. Weber u. G. Weitzel, *ibid.* 349, 1431 (1968).
- [21] B. Gutte u. R. B. Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* 91, 501 (1969).
- [22] R. Hirschmann, R. F. Nutt, D. F. Veber, R. A. Vitali, S. L. Varga, T. A. Jacob, F. W. Holly u. R. G. Denkewalter, *J. Amer. Chem. Soc.* 91, 507 (1969).
- [23] J. Meites: *Hypophysiotropic Hormones of the Hypothalamus: Assay and Chemistry*. Williams & Wilkins, Baltimore 1970; A. V. Schally, A. Arimura, C. Y. Bowers, A. J. Kastin, S. Sawano u. T. W. Redding, *Recent Progr. Hormone Res.* 24, 497 (1968).
- [24] R. Burgus, T. F. Dunn, D. Desiderio u. R. Guillemin, C. R. Acad. Sci. Paris 269, 1870 (1969); C. Y. Bowers, A. V. Schally, F. Enzmann, J. Boler u. K. Folkers, *Endocrinology* 86, 1143 (1970).
- [25] R. Burgus, T. F. Dunn, D. N. Ward, W. Vale, M. Amoss u. R. Guillemin, C. R. Acad. Sci. Paris 268, 2116 (1969); D. Gillessen, A. M. Felix, W. Lergier u. R. O. Studer, *Helv. Chim. Acta* 53, 63 (1970).
- [26] R. Burgus, T. F. Dunn, D. Desiderio, W. Vale u. R. Guillemin, C. R. Acad. Sci. Paris 269, 226 (1969); K. Folkers, F. Enzmann, J. Boler, C. Y. Bowers u. A. V. Schally, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 123 (1969).
- [27] R. Geiger, H. Wissmann, W. König u. G. Azadian, unveröffentlicht.