Peptidkonformationen, XIII¹⁾

cyclo-Enkephaline – Synthese und Konformationsstudien

Horst Kessler* und Günter Hölzemann

Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt a. M., Niederurseler Hang, D-6000 Frankfurt a. M. 50

Eingegangen am 25. Mai 1981

Die cyclischen Enkephaline *cyclo*(-Tyr¹-Gly²-Gly³-Phe⁴-Xxx⁵-) mit Xxx = Leu (c1) und Xxx = Met (c2) wurden synthetisiert und ¹H-NMR-spektroskopisch in DMSO-Lösung untersucht. Wie die Temperatur- und Lösungsmittelabhängigkeit der NH-Signale, die Kopplungskonstanten und die intramolekularen NOE-Effekte zeigen, nehmen beide Peptide eine Konformation mit zwei γ -Schleifen (Gly³-CO \leftarrow HN-Xxx⁵; Tyr¹-CO \leftarrow HN-Gly³) ein, die auch für *cyclo*(-Phe₃Gly₂-) (3) gefunden worden ist. Die Seitenkettenkonformation der aromatischen Aminosäuren wird kurz diskutiert. Aus dem Vergleich dieser Ergebnisse mit denen der zwitterionische Enkephaline 1 und 2 in DMSO wird für die linearen Verbindungen ebenfalls eine γ , γ -Konformation im Gegensatz zu der früher angenommenen Konformation mit einer β -Schleife für möglich gehalten. Die geringen Löslichkeiten verhinderten Tests der biologischen Aktivität von c1 und c2.

Peptide Conformations, XIII¹⁾. - cyclo-Enkephalin - Synthesis and Conformational Studies

The cyclic enkephalins cyclo(-Tyr¹-Gly²-Gly³-Phe⁴-Xxx⁵-) with Xxx = Leu (c1) and Xxx = Met (c2) were synthesized and investigated in DMSO solution by ¹H-NMR spectroscopy. Evaluation of the temperature and solvent dependence of the NH chemical shifts as well as coupling constants and intramolecular NOE effects leads to a predominant conformation containing two γ -turns (Gly³-CO \leftarrow HN-Xxx⁵; Tyr¹-CO \leftarrow HN-Gly³). The same conformation has been found in cyclo(-Phe₃Gly₂-) (3). Side chain conformations of the aromatic amino acids are shortly discussed. Comparison of these results with those of the zwitterionic enkephalins 1 and 2 in DMSO suggests a possible γ , γ -conformation for the latter as well, instead of the previously assumed conformation with only one β -turn. Low solubilities of c1 and c2 prevented testing the biological activity.

Die Enkephaline [H-Tyr¹-Gly²-Gly³-Phe⁴-Xxx⁵-OH; Xxx⁵ = Leu, Leu⁵-Enkephalin (1); Xxx⁵ = Met, Met⁵-Enkephalin (2)] haben seit ihrer Isolierung und Identifizierung durch *Hughes* et al.²⁾ wegen ihrer opioiden Wirkung beträchtliches Interesse gefunden. In systematischen Untersuchungen einer großen Zahl von Enkephalinanalogen wurden Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufgestellt³⁾. Außerdem ist versucht worden, die Konformation der beiden natürlichen Pentapeptide mit der starren Struktur des Morphins in Zusammenhang zu bringen^{4,5)}. Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen von Met⁵-Enkephalin in DMSO legten nahe, daß dieses lineare Pentapeptid in einer β I-Konformation vorliegt, wobei das Met⁵-NH-Proton zur Gly²-CO-Gruppe eine Wasserstoffbrücke ausbildet⁴⁻⁸⁾. Deutlich wird aber auch, daß die Flexibilität des Peptidgerüstes

sowie die Rotation der Seitenketten der Aminosäuren Tyr¹, Phe⁴ und Met⁵ (bzw. Leu⁵) eine Vielzahl von Konformationen in der Lösung erlauben⁴⁻¹⁵⁾.

Durch Cyclisierung läßt sich die Beweglichkeit des Peptidgerüstes stark einschränken. Dadurch werden Angaben über die Konformation in Lösung ermöglicht und Struktur-Wirkungs-Beziehungen aussagekräftiger. Unsere Untersuchungen an Cyclopentapeptiden¹⁶⁻¹⁹ ließen für *cyclo*-Leu⁵- (c1) und *cyclo*-Met⁵-Enkephalin (c2) eine dominierende Konformation mit zwei intramolekularen NH-Orientierungen erwarten. Die beiden internen Wasserstoffbrückenbindungen schränken die Flexibilität des Peptidgerüstes zusätzlich ein.

Den cyclischen Enkephalinen fehlt naturgemäß die Ladung, die in den linearen Peptiden am Amino- und/oder Carboxylende vorhanden ist und die für die Wirksamkeit und Löslichkeit von Bedeutung zu sein scheint²⁰⁾. Aufgrund der Tatsache, daß über das Amino- bzw. Carboxylende verlängerte Enkephalinanaloge ebenfalls noch Opiataktivität zeigen^{21,22)}, wäre aber auch für cyclische Enkephaline eine gewisse Wirksamkeit zu erwarten gewesen. Allerdings verhindert die extreme Unlöslichkeit der cyclischen Verbindungen die Durchführung biologischer Tests.

Synthese

Die Verbindungen c1 und c2 wurden nach den üblichen Methoden der Flüssigphasen-Peptidsynthese dargestellt. Wir cyclisierten jedoch nicht die natürliche Peptidsequenz, sondern legten die Schnittstelle zwischen die beiden Glycin-Reste. Dadurch wird sowohl eine sterische Hinderung als auch Racemisierung während der Cyclisierung vermieden. Das Syntheseschema für beide Verbindungen ist in Abb. 1 angegeben.



Abb. 1. Syntheseschema der cyclischen Enkephaline c1 (Xxx = Leu) und c2 (Xxx = Met)

Das lineare Pentapeptid wurde aus den Bausteinen Boc-Gly-Phe-Xxx-N₂H₃ und H-Tyr-Gly-OMe durch Azidkupplung²³ mit 54 bzw. 40% Ausbeute dargestellt. Die Cyclisierung erfolgte ebenfalls nach der Azidmethode^{23,24} in einer Ausbeute von ca. 15% für beide Verbindungen.

Bei der Synthese von *cyclo*-Met⁵-Enkephalin (c2) trat bei der Cyclisierung eine teilweise Oxidation der Thioetherseitenkette des Methionins ein. Die sulfoxidfreie Verbindung c2 erhielten wir durch Reduktion mit Ammoniumiodid in Trifluoressigsäure²⁵.

Ergebnisse

Die 270-MHz-¹H-NMR-Spektren beider Verbindungen in $[D_6]DMSO$ sind demjenigen von *cyclo*(-Phe³-Gly⁴-Gly⁵-Phe¹-Phe²-) (**3**)^{17,26} gegenübergestellt (Abb. 2). Dabei wird die besonders große Ähnlichkeit der drei Verbindungen deutlich. Diese bezieht sich nicht nur auf das äußere Erscheinungsbild (chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten), sondern auch auf die spektralen Veränderungen bei Variation der Meßbedingungen (Temperatur, Solvens). Bei Verbindung **3** wurde die Zuordnung der Signale zu den Aminosäuren in der Sequenz durch selektive Deuterierung gesichert¹⁷⁾. Die entsprechende Zuordnung für **c1** und **c2** folgt aus dem Spektrenvergleich; sie konnte durch NOE-Differenzspektroskopie bestätigt werden (siehe unten). Die zu der Aminosäure Xxx⁵ gehörenden Signale sind außerdem durch Entkopplungen ihrer charakteristischen Signale problemlos zuzuordnen. Die NMR-spektroskopischen Daten für **c1** und **c2** sind in Tab. 1 angegeben.



Abb. 2. 270-MHz-¹H-NMR-Spektrum von c1, c2 und 3 in $[D_6]DMSO$ bei 295 K. Die mit * bezeichneten Signale stammen aus dem Lösungsmittel H₂O und $[D_5]DMSO$. Die Aminosäuren sind mit den Einbuchstabensymbolen abgekürzt: F = Phe, G = Gly, L = Leu, M = Met, Y = Tyr

Ein erster Anhaltspunkt für das Vorliegen einer dominierenden Konformation ergibt sich aus der Temperaturabhängigkeit der NH-Signale (Abb. 3). Die Temperaturgradienten der NH-Protonen der Aminosäuren Gly³ und Leu⁵ in **c1** und Gly³ und Met⁵ in **c2** liegen unter $2 \cdot 10^{-3}$ ppm/K. Das spricht für die interne Orientierung dieser Protonen²⁷⁾. Ähnliche Temperaturgradienten fanden wir in **3**¹⁷⁾ (Abb. 8).



Abb. 3. Temperaturabhängigkeit der NH-Signale von c1 und c2 in $[D_6]DMSO$. Die Zahlenwerte sind die Steigungen in 10^{-3} ppm/K

Eine weitere Bestätigung der internen Orientierung dieser NH-Protonen ergibt sich durch die CDCl₃- bzw. Trifluorethanol-(TFE-)Titrationsreihen. Unter der Annahme, daß ein Zusatz von CDCl₃ zur DMSO-Lösung des Peptids keine Konformationsänderung bewirkt, läßt eine Hochfeldverschiebung der NH-Signale auf extern orientierte NH-Gruppen schließen, während sich intern orientierte NH-Protonen schwach nach tiefem Feld verschieben²⁸⁾. In ähnlicher Weise wirkt sich ein Zusatz von TFE aus. Die Ergebnisse beider Titrationsreihen sind für c1 in Abb. 4 gezeigt. Die Befunde aus der Temperaturabhängigkeit der NH-Verschiebung werden hier bestätigt: Die Titrationskurve zeigt bei höheren Chloroformkonzentrationen deutliche Hochfeldverschiebungen für die drei Aminosäuren, deren NH-Protonen extern orientiert sind, während die Signale für NH-Leu⁵ und NH-Gly³ kaum oder geringfügig zu tiefem Feld verschoben werden. Bei der TFE-Titration beobachtet man ein ähnliches aber weniger deutlich ausgeprägtes Verhalten. Wegen der noch geringeren Löslichkeit von c2 sind die Titrationskurven nur im Bereich hoher DMSO-Konzentrationen zu ermitteln und die Effekte nur noch andeutungsweise zu erkennen.

c1		Tyr ¹ a)	Gly ²	Gly ³	Phe ^{4 b)}	Leu ⁵
	NH	8.29	8.63	7.77	8.09	8.00
	CαH	4.24	A 3.84 B 3.45	A 3.73 B 3.58	4.32	4.05
δ	$C^{\beta}H$	A 2.89 B 2.79			A 2.99 B 2.90	1.32
	$C^{\gamma}H$					1.52
	$C^{\delta}H$					A 0.83 B 0.77
	${}^{3}J_{\mathrm{HNC}^{\alpha}\mathrm{H}}$	7.86	A 5.60 B 6.24	A 4.61 B 6.81	7.81	8.68
	${}^{2}J_{\mathrm{HC}^{\alpha}\mathrm{H}}$		15.42	14.89		
J	${}^{3}J_{\mathrm{HC}^{\alpha}\mathrm{C}^{\beta}\mathrm{H}}$	A 7.86 B 6.94			A 9.51 B 6.59	
	$^{2}J_{\mathrm{HC}^{\beta}\mathrm{H}}$	13.72			13.41	
c 2		Tyr ¹ a)	Gly ²	Gly ³	Phe ^{4 b)}	Met ^{5 c)}
	NH	8.34	8.55	7.75	8.08	7.93
	CαH	4.19	A 3.90 B 3.40	A 3.75 B 3.58	4.31	4.04
δ	$C^{\beta}H$	A 2.94 B 2.80			A 3.00 B 2.91	1.84
	$C^{\gamma}H$					2.20
	${}^{3}J_{\mathrm{HNC}^{\alpha}\mathrm{H}}$	7.58	A 5.21 B 6,56	A 4.43 B 7.04	7.68	8.13
	$^{2}J_{\mu}C^{\alpha}\mu$		15.59	14.83		
J	${}^{3}J_{\mathrm{H}^{\alpha}\mathrm{CC}^{\beta}\mathrm{H}}$	A 8.75 B 5.94			A 8.08 B 6.40	
	${}^{2}J_{\mathrm{HC}^{\beta}\mathrm{H}}$	13.72			14.28	

Tab. 1. 270-MHz-¹H-NMR-Daten von *cyclo*-Leu⁵-Enkephalin (c1) und *cyclo*-Met⁵-Enkephalin (c2) in [D₆]DMSO bei 293 K. δ [ppm], J[Hz]

^{a)} Aromat. Protonen: A 6.62, B 6.95; OH von c 1: 9.2, von c 2: 9.1 ppm. – ^{b)} Aromat. Protonen: um 7.2 ppm. – ^{c)} SCH₃: 2.01 ppm.

Interpretation

Peptidgerüst-Konformation

Aufgrund der dargestellten Ergebnisse kann man annehmen, daß die beiden *cyclo*-Enkephaline in einer bevorzugten Konformation vorliegen. Dafür sprechen die große Differenz der chemischen Verschiebungen der beiden α -Protonen der Glycinreste in **c1** und **c2** sowie die stark unterschiedlichen Temperaturgradienten der NH-Signale. Nimmt man für alle Peptidbindungen die energetisch günstigere *trans*-Konformation an, so ist für das intern orientierte Leu⁵-NH (bzw. Met⁵-NH) nur eine Wasserstoffbrücke zum Gly³-CO (γ -Schleife) erlaubt, da die CO-Gruppe von Gly² (β -Schleife) extern orientiert ist (wegen der internen Orientierung von NH-Gly³) und die Brücke zur CO-Gruppe von Tyr¹ im Cyclopentapeptid zur Ausbildung eines energetisch ungünsti-



Abb. 4. Einfluß des Zusatzes von CDCl₃ und Trifluorethanol (TFE) zur DMSO-Lösung von c1 auf die chemischen Verschiebungen der NH-Signale

gen 8-Ringes mit der *trans*-Peptidbindung Leu⁵-Tyr¹ führen würde²⁹⁾. Für das intern orientierte Gly³-NH gibt es dagegen die Möglichkeit der Wasserstoffbrückenbindung zur Tyr¹-Carbonylgruppe (γ -Schleife) oder zur Carbonylgruppe von Leu⁵ bzw. Met⁵ (β -Schleife).

Da man nun von einer einzigen Konformation ausgehen kann, lassen sich aus den beobachteten Kopplungskonstanten ${}^{3}J_{\text{HNC}^{\alpha}\text{H}}$ anhand der modifizierten Karplus-Kurve³⁰ Bereiche für mögliche Interplanarwinkel Φ_{L} bestimmen. Zur Festlegung der Konformation werden diese Winkelbereiche mit Winkeln verglichen, die durch Konformationsenergieberechnungen oder aus Röntgenstrukturanalysen erhalten worden sind. Modellbetrachtungen zeigen, daß man die beiden Schleifen getrennt betrachten kann¹⁸).

In Tab. 2 sind Interplanarwinkel Φ_L für die β -Schleife, die durch Wasserstoffbrückenbindung vom Gly³-NH zur Xxx⁵-CO-Gruppe gebildet wird, angegeben. Es handelt sich um berechnete Werte³¹; die Werte aus Röntgenstrukturanalysen streuen um $\pm 10^{\circ 29}$. Die aus der vicinalen Kopplungskonstante an Tyr¹ ermittelten Φ_L -Winkel geben lediglich für eine $\beta I'$ oder $\beta II'$ -Schleife²⁹ eine Übereinstimmung mit den erwarteten Winkelgrößen (in Tab. 2 durch Fettdruck hervorgehoben). Bisherige vielfältige Erfahrungen zeigen jedoch übereinstimmend, daß die *i*+1-Position einer $\beta I'$ oder $\beta II'$ -

Amino- säure	с1 ³ J _{HNC^αH} ^{b)} [Hz]	Φ _L [°]	typi βI	ische Φ βΙ'	L-Wink βII	el ^{c)} βΙΙ΄	Φ _L [°]	$\begin{array}{c} \mathbf{c2} \\ {}^{3}\!J_{\mathrm{HNC}^{\alpha}\!\mathrm{H}}{}^{\mathrm{b)}} \\ \mathrm{[Hz]} \end{array}$	Amino- säure
Tyr ¹	8.57	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	- 60	+ 60	- 60	+ 60	59 ± 21 -90 ± 5 -153 ± 7	8.26	Tyr ¹
Gly ²	12.31 ^{d)}	$\pm (62 \pm 5)$ $\pm (126 \pm 8)$	- 90	+ 90	+ 80	- 80	$\pm (62 \pm 5)$ + (126 \pm 8)	12.24 ^{d)}	Gly ²

Tab. 2. Auswertung der HNC^{α}H-Kopplungskonstanten und Vergleich der Interplanarwinkel Φ_L in einer β -Schleife^{a)}

a) Die Übereinstimmung von experimentellen und für die Schleife typischen Winkeln ist durch Fettdruck angedeutet. – ^{b)} Die gemessenen Kopplungskonstanten J_{obs} wurden zur Berücksichtigung der Elektronegativität der Seitenkette wie folgt korrigiert: ${}^{3}J_{HNC^{\alpha}H} = 1.09 J_{obs} {}^{30)}$. – ^{c)} Diese Winkel wurden aus Kraftfeldberechnungen ermittelt ${}^{31)}$. – ^{d)} Für den Glycinnest wurde die Summe der vicinalen Kopplungen ausgewertet: $\Sigma({}^{3}J_{HNC^{\alpha}H}) = 1.04 \Sigma(J_{obs}) {}^{30)}$.

Schleife nicht durch eine L-Aminosäure eingenommen werden kann²⁹⁾. Tatsächlich wird jegliche β -Schleifenstruktur sowohl anhand der Summe der *vicinalen* Kopplungen am Gly² (s. Tab. 2) als auch durch die Auswertung der geminalen Kopplungskonstante der C^{α}H₂-Protonen des Gly²-Restes³⁰⁾ ausgeschlossen.

Es bleibt demnach noch eine $\gamma\gamma$ -Struktur mit den internen Wasserstoffbrückenbindungen Tyr¹-CO \leftarrow HN-Gly³ und Gly³-CO \leftarrow HN-Xxx⁵. Die frei liegende *trans*-Peptid-



Abb. 5. Lösungskonformation ($\gamma_1^i \gamma_2 I$) von **c1**. Bei **c2** ist die (CH₃)₂CH-Seitengruppe von Leu⁵ durch eine CH₂SCH₃-Gruppe ersetzt

u _H ^{b)} Amino- J säure	t Tyr ¹	(d) Gly ²	(d) Gly ³	Phe ⁴	Met ⁵	ieser Tahelle
³ J _{HNC} ⁶ [Hz	8.26	12.24	11.93	8.37	8.86	en. In d
Φ ^Γ	$\begin{array}{c} 59 \pm 21 \\ -90 \pm 5 \\ -153 \pm 7 \end{array}$	$\pm (62 \pm 5)$ $\pm (126 \pm 8)$	$\pm (61 \pm 5)$ $\pm (129 \pm 9)$	$ \begin{array}{r} 59 \pm 21 \\ -90 \pm 5 \\ -152 \pm 7 \end{array} $	$59 \pm 16 \\ -94 \pm 6 \\ -149 \pm 7$	k hervorgehob
$\gamma_1^i\gamma_2II$	+ 95	- 90	+ 110	+ 85	- 105	Fettdring
$\gamma_1^i\gamma_2I$	- 100	- 85	+ 120	+ 85	- 95	sind durch
$\gamma_1\gamma_2^iII$	+100	+ 85	- 120	- 85	+ 95	n Winkeln o
kel c) γ ₁ γ ⁱ Ι	- 95	+ 90	- 110	- 85	+ 105	n tvnische
Φ _L -Win γ ⁱ ₁ γ ⁱ 11	- 66	- 85	+110	- 85	+ 110	onformatio
$\gamma_{1}^{i}\gamma_{2}^{i}I$	- 100	- 85	+ 110	- 85	+ 105	fiir die Ko
$\gamma_1\gamma_2 II$	+ 100	+ 85	- 110	+ 85	- 105	Verten und
$\gamma_1\gamma_2 I$	06 -	+ 85	- 110	+ 85	- 110	entellen V
Φ ^Γ	$ \begin{array}{r} 60 \pm 20 \\ -93 \pm 5 \\ -150 \pm 6 \end{array} $	$\pm (62 \pm 5)$ $\pm (126 \pm 8)$	$\pm (59 \pm 5)$ $\pm (129 \pm 9)$	$\begin{array}{rrrr} 60 \pm 20 \\ -93 \pm 5 \\ -150 \pm 6 \end{array}$	$\begin{array}{rrrrr} 59 \pm 6 \\98 \pm 6 \\ -145 \pm 7 \end{array}$	en von exnerim
³ J _{HNC^αH^{b)} [Hz]}	8.57	12.31 ^{d)}	11.88 ^{d)}	8.51	9.46	nstimmung
Amino- säure	Tyr ¹	Gly^2	Gly ³	Phe ⁴	Leu ⁵	a) Üherei

bindung zwischen den Aminosäuren Leu⁵ (Met⁵) und Tyr¹ kann dabei zwei Positionen annehmen: in I weist das NH-Proton auf die gleiche Seite wie die Seitenketten von Tyr¹, Phe⁴ und Xxx⁵ (in Abb. 5 nach vorn aus der "Ebene" des Peptidgerüstes); für II gilt das Umgekehrte: der Carbonylsauerstoff der Amidbindung hat nun die gleiche Orientierung wie die Seitenketten. Für ein Cyclopentapeptid mit zwei γ -Wasserstoffbrücken sind deshalb 8 Gerüstkonformationen möglich.

In Tab. 3 sind die durch *Konformationsenergieberechnungen* an *cyclo*(-Gly₅-) ermittelten Winkel in Cyclopentapeptiden mit zwei γ -Schleifen aufgeführt³²⁾. Die aus *Dreiding-Modellen* abgelesenen Winkel entsprechen diesen Werten weitgehend¹⁸⁾. Die beste Übereinstimmung ergibt sich bei einer $\gamma_1^i \gamma_2$ I-Konformation (Abb. 5).

Für den Gly²-Rest führt allerdings der aus den Kopplungskonstanten ermittelte Winkel $\pm (62 \pm 5^{\circ})$ zu einer weniger guten Korrelation mit *allen* möglichen Strukturen. Röntgenstrukturanalysen von γ -Schleifen ergeben für diese Position Winkel von $\pm (70-85^{\circ})^{29}$. Trotzdem halten wir die so abgeleitete $\gamma_1^i \gamma_2$ I-Konformation für wahrscheinlich, da sie auch durch NOE-Messungen bestätigt wird (s. u.).

Seitenketten-Konformation

Die Konformation der Seitenketten kann mit den Pachlerschen Parametern³³⁾ berechnet werden. In Tab. 4 sind die Ergebnisse wiedergegeben. Auf die Auswertung der Kopplungskonstanten der Leu⁵- und Met⁵-Seitenketten wurde verzichtet, da diese kompliziertere Spinsysteme besitzen. Außerdem sind beim Vergleich mit den nicht-peptidischen Opiaten zunächst einmal nur die aromatischen Seitenketten von Bedeutung^{12,13)}. Da die β -Protonensignale von Phe und Tyr nicht eindeutig zugeordnet werden können, bleibt die Bezeichnung P_I und P_{II} willkürlich. Die Auswertung ergibt eine etwa gleich große Population dieser beiden Konformationen am Tyrosin und Phenylalanin, während die sterisch ungünstigere Konformation P_{III} wenig am Gleichgewicht beteiligt ist.

	c	1	c	2
	Tyr ¹	Phe ⁴	Tyr ¹	Phe ⁴
P ₁	0.48	0.63	0.56	0.50
P _{II}	0.40	0.36	0.31	0.35
$\mathbf{P}_{\mathrm{III}}$	0.12	0.01	0.13	0.15





Abb. 6. Die drei Rotameren um die $C^{\alpha}C^{\beta}$ -Bindung (χ_1) der aromatischen Aminosäuren

Nuclear Overhauser Enhancement-(NOE-)Messungen³⁴⁾

Die Bedeutung der NOE-Messungen für die Konformationsanalyse ergibt sich aus der Tatsache, daß die ¹H-Spin-Relaxation, von welcher der NOE herrührt, hauptsächlich über den Dipol-Dipol-Mechanismus verläuft, dessen Ausmaß vom Abstand der Dipole abhängig ist. Es besteht deshalb die Möglichkeit, die beobachteten NOE-Werte mit den intramolekularen Entfernungen der beteiligten Protonen zu korrelieren^{34,35)}. Im allgemeinen werden nur Effekte beobachtet, wenn die Protonen weniger als 4 Å voneinander entfernt sind.

Eine Übersicht über die bei **c1** und **c2** durch NOE-Differenz-Spektroskopie³⁶ gemessenen Effekte gibt Tab. 5. Da man beim Einstrahlen mit der Frequenz eines NH-Signals NOE-Effekte vor allem an dem C^{α}H-Signal der in der Sequenz *vorausgehenden* Aminosäure beobachten kann, läßt sich durch stufenweises Abtasten eine eindeutige Signalzuordnung zur Peptidsequenz erreichen. Auf diese Weise wurde die oben aus Analogiegründen zu 3 abgeleitete Zuordnung bestätigt. Beispielsweise ergibt sich beim Einstrahlen in das Tieffeld-Gly-NH-Signal ein NOE für die beiden α -Protonen desselben Glycylrestes sowie des α -Protons der aromatischen Aminosäure Tyr¹. Schon aus diesem einzigen Experiment folgt die Zuordnung dieser Signale zur Sequenz Tyr¹-Gly². Die vorgeschlagene $\gamma\gamma$ -Konformation mit der Anordnung I der nicht in Wasserstoffbrücken involvierten Amidbindung Leu⁵-Tyr¹ (s. Abb. 5) wird durch einige besonders bemerkenswerte NOE-Effekte zu den Seitenketten bewiesen: Einstrahlen in das Tyr¹-NH-Signal zeigt einen Effekt von 3.5% für jedes Leu⁵- δ -Methylproton in **c1** und ca. 1.5% für jedes C^βH₂-Proton von Met⁵ in **c2**.

(e 1)	Beobachtet ^{a)}							
Eingestrahlt	Phe⁴-C ^α H	Tyr ¹ C ^α H	Leu ⁵ -C ^α H	Gly^2 - $C^{\alpha}H_2$	Gly^3 - $C^{\alpha}H_2$			
Gly ² -NH		4.8		NOE ^{b)}				
Tyr ¹ -NH		2.7	2.6					
Phe ⁴ -NH	3.2				1.7			
Leu ⁵ -NH	3.3		1.7					
Gly ³ -NH					NOE ^{b)}			
(c 2)			Beobachte	a)				
Eingestrahlt	Phe^4 - $C^{\alpha}H$	$Tyr^{1}C^{\alpha}H$	Met ⁵ -C ^α H	$Gly^2-C^{\alpha}H_2$	Gly^3 - $C^{\alpha}H_2$			
Glv ² -NH		1.9		NOE ^{b)}				
Tyr ¹ -NH		2.8						
Phe ⁴ -NH	1.3				1.9			
Met ⁵ -NH			4.0					
Gly ³ -NH					NOE ^{b)}			

Tab. 5. NOE-Effekte in	n % an c1	und c2 in	[D ₆]DMSO	bei 295 K
------------------------	-----------	-----------	-----------------------	-----------

^{a)} Die beobachteten NOEs sind alle positiv. Die Fehler betragen ca. 1%. – ^{b)} Beim Einstrahlen in die Gly-NH-Resonanz erhält man im AB-Teil dieser Aminosäure wegen der starken Kopplung abwechselnd positive und negative Veränderungen der Signale. Die Integration wurde daher in diesem Bereich nicht ausgewertet.

Diskussion

Die ¹H-NMR-Spektren des linearen Met-Enkephalins unterscheiden sich in der kationischen⁸⁻¹⁰⁾ und zwitterionischen Form^{4-6,8)} beträchtlich; nur für die letztere kann eine definierte Konformation angegeben werden. Der niedrige Temperaturgradient $(0.6 \cdot$ 10^{-3} ppm/K^{5,15}) des Met⁵-NH-Protons in DMSO wird durch eine intern orientierte Wasserstoffbrücke interpretiert. Aber auch für das Gly³-NH-Proton ist ein relativ niedriger Temperaturgradient $(3 \cdot 10^{-3} \text{ ppm/K})$ erkennbar. Bislang diente die in 1 bzw. 2 einzig verwendbare Kopplungskonstante an Phe⁴ (${}^{3}J_{HNC^{\alpha}H} = 8.5$ Hz; entsprechend einem korrigierten ³⁰⁾ Wert von 9.3 Hz; $\Phi_L = -95^\circ$) als Argument für die postulierte β I-Schleife Gly²-CO \leftarrow HN-Xxx⁵ (erwartet $\Phi_{L} = -90^{\circ}$ an Phe⁴). Allerdings läßt sich auch eine γ - bzw. γ ⁱ-Schleife durchaus mit dem Kopplungswert vereinbaren. Dann wäre aber die CO-Gruppe von Gly² nicht mehr intern fixiert und der kleine NH-Temperaturgradient von Gly³ durch eine zweite (schwächere) γ -Schleife interpretierbar (s. Abb. 7). Die sich daraus ergebende alternative Deutung und/oder die zusätzlichen Möglichkeiten eines konformativen Gleichgewichtes³⁷⁾ (z. B. zwischen β - und γ -Schleifen-Strukturen) zeigen, daß die zugänglichen Meßparameter in den linearen Enkephalinen nicht für eine zweifelsfreie und eindeutige Interpretation ausreichen.



Abb. 7. Schematischer Vergleich der Konformation von *cyclo*-Leu-Enkephalin mit Leu-Enkephalin. In der Mitte ist der in dieser Arbeit diskutierte Alternativvorschlag abgebildet

Durch die Cyclisierung zu c1 und c2 wird die Beweglichkeit stark eingeschränkt und so eine konformativ einheitliche Verbindung erhalten. Die Temperaturgradienten der Amidprotonen sind jetzt eindeutig interpretierbar. Zur Analyse des Peptidgerüstes können die HNC^{α}H-Kopplungskonstanten *aller* Aminosäuren ausgewertet werden. Unser Vorschlag einer dominierenden γ , γ -Konformation (Abb. 5) in den cyclischen

Enkephalinen ist deshalb relativ sicher. Wir halten es für möglich, daß die zwitterionischen Formen der linearen Enkephaline eine ähnliche Konformation einnehmen. Intramolekulare Coulomb-Kräfte können hier bei der Ausbildung einer quasi-cyclischen Struktur helfen.

Die Rotamerenverteilung der Seitenketten in den aromatischen Aminosäuren Tyr¹ und Phe⁴ in den cyclischen und acyclischen Enkephalinen^{6,8,11-13} unterscheidet sich nicht grundlegend: in beiden Fällen ist keine Seitenkettenkonformation gegenüber den anderen eindeutig bevorzugt (Tab. 4). Allerdings ist in den cyclischen Verbindungen die Konformation P_{III} (*gauche, gauche*) noch stärker benachteiligt als in den linearen Enkephalinen, da die Seitenketten in P_{III} in **c1** und **c2** direkt über dem Peptidgerüst liegen.

Konformationsvergleich in Cyclopentapeptiden

In Abb. 8 sind die Temperaturgradienten der Verbindungen c_1 , c_2 und 3 gegenübergestellt. Die auffällige Übereinstimmung der Gradienten läßt den Schluß zu, daß diese drei Verbindungen in der gleichen Konformation vorliegen. Ein Austausch der Seitenketten von Phe³ durch Tyr¹ und von Phe² durch Leu⁵ bzw. Met^{5 26)} bewirkt offenbar keine Änderung der Konformation. Ein völlig anderes Bild erhält man, wenn ein L-Phenylalanin durch sein Enantiomeres ersetzt wird: das NMR-Spektrum der Verbindung *cyclo*(-Phe-D-Phe-Phe-Gly₂-) (4)¹⁹⁾ ist schon auf den ersten Blick denen von c1, c2 und 3 nicht mehr ähnlich und die Temperaturgradienten sind nicht mehr vergleichbar (Abb. 8). Die geringe Differenzierung der letzteren weist auf das Vorliegen konformativer Gleichgewichte hin. Dieses Beispiel demonstriert sehr deutlich die Rolle, die die Chiralität der Aminosäuren für die Konformation der Peptide spielt.



Abb. 8. Gegenüberstellung der Temperaturgradienten der NH-Signale in c1, c2, 3 und 4 in 10⁻³ ppm/K (DMSO-Lösung). Die mit * bezeichneten Werte in 4 wurden den Aminosäuren nicht eindeutig zugeordnet

Nachdem wir bereits früher für die Peptide *cyclo*(-Phe-Gly-Xxx-Val-Ala-) eine Konformation mit zwei γ -Schleifen vorgeschlagen haben¹⁸), wurden Konformationsberechnungen an Cyclopentapeptiden durchgeführt³²⁾, die zeigten, daß diese Struktur relativ günstig ist. Auch die Daten für *cyclo*(-Phe-Gly₄-) lassen sich am besten durch diese Gerüstkonformation erklären¹⁹⁾, der wohl insgesamt ein größeres Gewicht bei Cyclopentapeptiden zukommt, als ursprünglich angenommen wurde^{16,17,38)}.

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* und dem *Fonds der Chemischen Industrie* für großzügige materielle Unterstützung.

Experimenteller Teil

NMR-Messungen

Die 270-MHz-¹H-NMR-Spektren wurden am WH 270-Gerät der Firma Bruker, ausgestattet mit dem Computer Aspect 2000 (32K-Daten-memory), aufgenommen. Die spektrale Auflösung wurde durch Lorentz-Gauß-Transformation, die digitale Auflösung durch "Zero-Filling" auf 128K (0.046 Hz/Punkt) verbessert.

Die Zuordnung der $C^{\beta}H_2$ -Signale der Aminosäuren Tyr¹ und Phe⁴ wurde durch Differenzentkopplung³⁹ gesichert.

Zur Aufnahme der NOE-Differenz-Spektren wurden die Proben (10 mg in 0.5 ml [D₆]DMSO) durch fünf "Freeze-pump-thaw"-Cyclen entgast und danach abgeschmolzen.

Aus Gründen der Zeitersparnis wurden bei der Serie der NOE-Messungen die Differenzen mehrerer ON-Resonance-Spektren mit einem einzigen OFF-Resonance-Spektrum gebildet⁴⁰⁾. Die Einstrahlzeit wurde auf 2 s begrenzt, um Spindiffusion klein zu halten. Die Wartezeit vor jeder Einstrahlung betrug 5 s. Pro Spektrum wurden in der Regel 640 "Scans" aufsummiert, die Interferogramme wurden vor der Differenzenbildung exponentiell multipliziert (Linienverbreiterung 1 Hz).

Synthese

Abkürzungen: Boc = tert-Butyloxycarbonyl, NMM = N-Methylmorpholin, DCC = Dicyclohexylcarbodiimid, HOBt = 1-Hydroxybenzotriazol, DCHA = Dicyclohexylamin, DMF = Dimethylformamid.

Schmelzpunkte: Schmelzpunktapparat nach Dr. Tottolli, unkorrigiert. Dünnschichtchromatographie: Fertigfolien von Riedel de Häen (SI F); Laufmittel: A Chloroform/Methanol/Eisessig (95:5:3), B *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (3:1:1), C Essigsäure-ethylester/*n*-Butanol/Pyridin/ Wasser (20:10:3:5). Die Identifizierung der Flecke erfolgte unter der UV-Lampe und durch Entwickeln in der Iodkammer. Optische Drehung: Polarimeter der Firma Perkin-Elmer (Nr. 141). Zur weiteren Identifizierung wurden IR- und NMR-Spektren der Verbindungen aufgenommen. Eindampfoperationen wurden schonend im Rotationsverdampfer vorgenommen.

Boc-Phe-OH \cdot DCHA (5), Boc-Gly-OH (10), Boc-Tyr-OH \cdot DCHA (13) erhielten wir nach der allgemeinen Vorschrift zur Einführung der Boc-Schutzgruppe mit Di-*tert*-butyldicarbonat⁴¹). Boc-Tyr-OH war nur nach verlängerter Reaktionszeit erhältlich. Die Dicyclohexylamin-Salze wurden durch Zutropfen der äquivalenten Menge von Dicyclohexylamin zur etherischen Lösung der N-geschützten Aminosäure dargestellt. *H-Leu-OMe* \cdot *HCl* (6), *H-Met-OMe* \cdot *HCl* (7) erhielten wir nach der Literaturvorschrift⁴²⁾. *H-Gly-OMe* \cdot *HCl* (14) wurde von der Firma Merck/Darmstadt erworben.

Boc-Phe-Leu-OMe (8), *Boc-Phe-Met-OMe* (9) wurde nach der üblichen DCC-Methode²⁴⁾ mit Zusatz von HOBt dargestellt. Die Zugabe von Base entfällt bei der Verwendung der DCHA-Salze. 8: Ansatz: 17.87 g (40 mmol) 5 und 7.27 g (40 mmol) 6. Ausb. 12.70 g (81%); Schmp. 103 – 105 °C; $R_F A 0.90$, B 0.77, C 0.93; ¹H-NMR (60 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.2$ (s + d, 6H, Phe-Aromat + Leu-NH); 5.6 (d, 1H, Phe-NH); 4.5 (m, 2H, Phe-C^αH + Leu-C^αH); 3.6 (s, 3H, OCH₃); 3.0 (m, 2H, Phe-C^βH₂); 1.4 (s + m, 12H, *tert*-Butyl + Leu-C^βH₂ + Leu-C^γH); 0.9 (m, Leu-(C^γH₃)₂); [α]⁵⁸⁹₂ = -24.3 (c = 1, Methanol). - 9: Ansatz: 17.87 g (40 mmol) 5 und 8.0 g (40 mmol) 7. Ausb. 11.50 g (70%); Schmp. 86–88 °C; $R_F A 0.73$, B 0.80; ¹H-NMR (60 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.2$ (s + d, 6H, Phe-Aromat + Met-NH); 5.7 (d, 1H, Phe-NH); 4.6 (m, 2H, Phe-C^αH + Met-C^αH): 3.7 (s, 3H, OCH₃); 3.1 (m, 2H, Phe-C^βH₂); 2.4 (m, 2H, Met-C^γH₂); 2.1 (m + s, 5H, Met-C^βH₂ + SCH₃); 1.4 (s, 9H, *tert*-Butyl); [α]²⁸⁹₂ = -20.2 (c = 1, Methanol).

H-Phe-Leu-OMe · *HCl* (11), *H-Phe-Met-OMe* · *HCl* (12): Zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wird das Peptid in einem 20fachen Überschuß von 2 N HCl in Dioxan 2 h gerührt. Danach wird eingeengt und mehrfach in Methanol aufgenommen und wieder eingedampft. Ausb. quantitativ. Die erhaltenen Salze sind sehr hygroskopisch oder fallen als Öl an. 11: R_F B 0.69, C 0.72. – 12: R_F A 0.13, B 0.47, C 0.29.

Boc-Gly-Phe-Leu-OMe (15), Boc-Gly-Phe-Met-OMe (16): Die Kupplung erfolgt nach der üblichen DCC-Methode²⁴⁾ aus 10 und 11 bzw. 12 unter Zusatz von HOBt und NMM als Base. 15: Ansatz: 8.32 g (47.5 mmol) 10 und 17.4 g (47.5 mmol) 11. Ausb. 20.3 g (95%), Öl. – 16: Ansatz: 3.15 g (18 mmol) 10 und 6.24 g (18 mmol) 12. Ausb. 3.61 g (43%), Öl. Diese Verbindungen werden auf der Stufe der Hydrazide 18 und 19 vollständig identifiziert.

Boc-Tyr-Gly-OMe (17): Die Kupplung erfolgt nach der üblichen DCC-Methode²⁴⁾ unter Zusatz von HOBt. Ansatz: 18.51 g (40 mmol) 13 und 5.02 g (40 mmol) 14. Ausb. 11.30 g (80%); Schmp. 104 – 106 °C; R_F A 0.22, B 0.79; ¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.02 + 6.70$ (d + d, 4H, Tyr-Aromat); 6.50 (t, 1H, Gly-NH); 5.05 (d, 1H, Tyr-NH); 4.36 (m, 1H, Tyr-C^αH); 3.96 (d, 2H, Gly-C^αH₂); 3.72 (s; 3H, OCH₃); 2.97 (d, 2H, Tyr-C^βH₂); 1.42 (s, 9H, *tert*-Butyl); $[\alpha]_{25}^{589} = -0.5$ (c = 1, Methanol).

*Boc-Gly-Phe-Leu-N*₂*H*₃ (18), *Boc-Gly-Phe-Met-N*₂*H*₃ (19): Die Lösung des Peptids in wenig Methanol wird mit einem 20fachen Überschuß an Hydrazinhydrat auf dem Wasserbad 2 h auf 40 °C erwärmt. 12 h läßt man sodann bei Raumtemp. rühren. Die Lösung wird eingeengt, mehrfach mit wenig Methanol aufgenommen und das Produkt aus Methanol/Ether auskristallisiert. 18: Ansatz: 20.4 g (45 mmol) 15 und 43.7 ml Hydrazinhydrat. Ausb. 20.0 g (98%); Schmp. 210 – 212 °C; *R*_F A 0.22, B 0.55, C 0.46; ¹H-NMR (270 MHz, [D₆]DMSO): δ = 9.09 (s, 1 H, Hydrazid-NH); 8.09 (d, 1 H, NH); 7.89 (d, 1 H, NH); 7.2 (m, 5 H, Phe-Aromat); 6.67 (t, 1 H, Gly-NH); 4.6 – 4.25 (br, C^αH von Phe und Leu + NH₂); 3.5 (m, Gly-C^αH₂); 2.99 + 2.78 (m + m, 2H, Phe-C^βH₂); 1.38 (s + m, *tert*-Butyl + Leu-C^βH₂ + Leu-C^γH); 0.87 (d + d, 6H, Leu-(C⁶H₃)₂; [α]⁵⁸⁹₂ = -19.4 (*c* = 1, Methanol). - 19: Ansatz: 26.80 g (57 mmol) 16 und 55.3 ml Hydrazinhydrat. Ausb. 17.46 g (65%); Schmp. 69 – 73 °C; *R*_F A 0.15, B 0.53, C 0.49; ¹H-NMR (270 MHz, [D₆]DMSO): δ = 9.02 (s, 1 H, Hydrazid-NH); 8.17 (d, 1 H, NH); 7.91 (d, 1 H, NH); 7.22 (s, 5 H, Phe-Aromat); 6.95 (t, 1 H, Gly-NH); 4.54 (m, 1 H, C^αH); 4.3 (m, 1 H, C^αH); 3.5 (br, Gly-C^αH₂ + NH₂); 2.9 (m, 2 H, Phe-C^βH₂); 2.4 (m, 2 H, Met-C^γH₂); 2.02 (s, 3 H, SCH₃); 1.85 (m, 2 H, Met-C^βH₂); 1.37 (s, 9 H, *tert*-Butyl); [α]⁵⁹⁸₂ = -17.5 (*c* = 1, Methanol).

H-Tyr-Gly-OMe · *HCl* (20) wird analog 11 und 12 aus 17 dargestellt. Ansatz: 3.52 g (10 mmol). Ausb. 2.47 g (86%); Schmp. 90 – 95 °C; R_F B 0.53, C 0.59; ¹H-NMR (90 MHz, [D₆]DMSO): $\delta =$

9.0 (t, 1H, Gly-NH): 7.6 (br, NH₃⁺); 7.10 + 6.72 (d + d, 4H, Tyr-Aromat); 3.92 (m, 3H, Gly-C^{α}H₂ + Tyr-C^{α}H); 3.65 (s, 3H, OCH₃); 2.97 (m, 2H, Tyr-C^{β}H₂).

Boc-Gly-Phe-Leu-Tyr-Gly-OMe (21), Boc-Gly-Phe-Met-Tyr-Gly-OMe (22) werden mit der Azid-Methode nach Medzihradszky²³⁾ dargestellt. 15 mmol des Boc-geschützten Hydrazids **18** oder **19** werden in ca. 100 ml DMF gelöst und auf -15 °C gekühlt. Es werden ein Sfacher Überschuß (6.23 ml) an konz. Salzsäure und ein 1.5facher Überschuß (11.1 ml) an 14proz. Natriumnitritlösung zugegeben. Man läßt 1 h bei -15 °C rühren. Zur Neutralisation der Salzsäure setzt man 8.25 ml NMM hinzu. Zu dieser Lösung gibt man ein Gemisch aus 15 mmol H-Tyr-Gly-OMe · HCl (20) und 15 mmol (1.68 ml) NMM. Man rührt noch 30 min bei -15 °C und 4 d bei Raumtemp.

Zur Aufarbeitung wird das DMF abgedampft. Man nimmt in Essigester auf, filtriert ab und wäscht das Filtrat mit 5proz. Citronensäurelösung, halbkonz. Hydrogencarbonatlösung und gesättigter Kochsalzlösung. Es wird über Natriumsulfat getrocknet und aus Essigester/Petrolether auskristallisiert. 21: Ansatz: 6.74 g (15 mmol) 18 und 4.32 g (15 mmol) 20. Ausb. 4.07 g (40%); Schmp. $85 - 89^{\circ}$ C; $R_{\rm F}$ A 0.11, B 0.80, C 0.81; ¹H-NMR (270 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 8.42$ (t, 1 H, Gly-NH); 8.25 (d, 1H, NH); 7.89 (d, 1H, NH); 7.8 (d, 1H, NH); 7.19 (s, 5H, Phe-Aromat); 7.02 + 6.64 (d + d, 4H, Tyr-Aromat); 6.94 (t, 1H, Gly-NH); 4.75-4.25 (br, C^{α} H); 3.85 (m, 2H, Gly-C^{α}H₂); 3.62 (s, 3H, OCH₃): 3.5 (m, Gly-C^{α}H₂); 2.95 + 2.76 (m, C^{β}H₂); 1.38 (s + m, 12H, *tert*-Butyl + Leu- $C^{\beta}H_2$ + Leu- $C^{\gamma}H$); 0.87 (d + d, 6H, Leu- $(C^{\delta}H_3)_2$); [α]₂₅⁵⁸⁹ = -19.0 (c = 1, Methanol). - 22: Ansatz: 7.01 (15 mmol) 19 und 4.32 g (15 mmol) 20. Ausb. 5.61 g (54%); Schmp. 112 - 116; $R_F A 0.29$, B 0.59; ¹H-NMR (270 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 8.44$ (t, 1 H, Gly-NH); 8.19 (d, 1 H, NH); 7.9 (d + d, 2H, NH); 7.2 (s, 5H, Phe-Aromat); 7.04 + 6.64 (d + d, 4H, Tyr-Aromat); 6.9 (t, 1 H, Gly-NH); 4.5 (m, 2 H, C^{α} H); 4.3 (m, 1 H, C^{α} H); 3.85 (m, 2 H, Gly- $C^{\alpha}H_{2}$; 3.62 (s, 3 H, OCH₄); 3.5 (m, 2H, Gly- $C^{\alpha}H_{2}$); 2.95 + 2.75 (m, 4H, Tyr- $C^{\beta}H_{2}$ + Phe-C^βH₂); 2.35 (m, 2H, Met-C^γH₂); 2.02 (s, 3H, SCH₃); 1.9 (m, 2H, Met-C^βH₂); 1.35 (s, 9H, tert-Butyl); $[\alpha]_{25}^{589} = -18.9$ (c = 1, Methanol).

*Boc-Gly-Phe-Leu-Tyr-Gly-N*₂*H*₃ (23), *Boc-Gly-Phe-Met-Tyr-Gly-N*₂*H*₃ (24) werden analog 18 und 19 dargestellt. 23: Ansatz: 6.7 g (10 mmol) 21 und 9.7 ml Hydrazinhydrat. Ausb. 6.5 g (97%); Schmp. 107 – 110 °C; $R_{\rm F}$ B 0.73, C 0.69; $[\alpha]_{25}^{589} = -8.1$ (c = 1, Methanol). – 24: Ansatz: 4.83 g (7 mmol) 22 und 6.8 ml Hydrazinhydrat. Ausb. 3.0 g (62%); Schmp. 212 – 214 °C; $R_{\rm F}$ B 0.65, C 0.55.

cyclo(-Gly-Phe-Leu-Tyr-Gly-) (c1): Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgt analog 11 und 12, die Cyclisierung nach der Azidmethode nach *Medzihradszky*^{23,24)}. Die Verdünnung beträgt 1 mmol pro Liter. Zur Aufarbeitung wird das gesamte DMF eingedampft, der Rückstand in Wasser/Methanol aufgenommen und mit Mischbettionenaustauscher V (Merck/Darmstadt) gerührt. Das Produkt wird in DMF aufgenommen und an Sephadex LH 20 chromatographiert. c1: Ansatz: 1.29 g (2 mmol) 23. Ausb. 129 mg (12%); Schmp. ca. 315 °C (Zers.); R_F B 0.65, C 0.70; $[\alpha]_{25}^{598} = -108.0$ (c = 0.5, DMF). – FD-Massenspektrum: Molpeak 538.

 $C_{28}H_{35}N_5O_6$ (537.7) Ber. C 62.56 H 6.56 N 13.03 Gef. C 62.32 H 6.43 N 12.95

cyclo(-Gly-Phe-Met-Tyr-Gly-) (c2): Die Darstellung und Aufarbeitung erfolgt wie bei c1. Nach Identifizierung ist das Produkt noch mit dem Sulfoxid cyclo(-Gly-Phe-Met(O)-Tyr-Gly-) verunreinigt. Dieses ist durch eine IR-Bande bei 1030 cm⁻¹ und im 270-MHz-¹H-NMR-Spektrum durch zwei SOCH₃-Singuletts im Verhältnis 1:1 bei $\delta = 2.47$ und 2.49 für die diastereomeren Sulfoxide charakterisiert (in [D₆]DMSO). Da die Signale von den [D₆]DMSO-Signalen aus dem Lösungsmittel überlagert sind, wurde ein Vergleichspektrum in [D₇]DMF aufgenommen. Mit H₂O₂ läßt sich das Substanzgemisch von c2 und dem Sulfoxid vollständig zum Sulfoxid oxidieren. Ansatz: 1.32 g (2 mmol) 24. Ausb. 120 mg (ca. 12%) Substanzgemisch. $R_{\rm F}$ B 0.57 und 0.63.

Zur Darstellung von reinem c2 werden nach Lit.²⁵⁾ 100 mg des Gemisches aus c2 und dem Sulfoxid in 5 ml Trifluoressigsäure gelöst und auf 0°C abgekühlt. Es werden 2 ml einer 2 M Ammoniumiodidlösung zugegeben. Nach 10 min bei 0°C wird das gebildete Iod mit frisch destillierter Thioglycolsäure reduziert. Die Lösung wird eingeengt, mit Wasser aufgenommen und mit Mischbettionenaustauscher V (Merck, Darmstadt) gerührt. Das Produkt wird mit DMF herausgelöst und eingedampft. Man nimmt in Methanol auf und saugt ab. Ausb. 62 mg reines c2; Schmp. ca. 340 °C (Zers.); R_F B 0.63. In der für eine Drehwertmessung benötigten Konzentration ist c2 nicht löslich.

C₂₇H₂₈N₅O₆S (550.6) Ber. C 58.36 H 5.99 N 12.60 Gef. C 58.20 H 5.85 N 12.41

- ¹⁾ 12. Mitteil.: H. Kessler, A. Friedrich und W. E. Hull, J. Org. Chem., im Druck.
- ²⁾ J. Hughes, T. W. Smith, H. W. Kosterlitz, L. A. Fothergill, B. A. Morgan und H. R. Morris, Nature (London) 258, 577 (1975).
- ³⁾ J. S. Morley, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20, 81 (1980).
- ⁴⁾ B. P. Roques, C. Garbay-Jaureguiberry, R. Oberlin, M. Anteunis und A. K. Lala, Nature (London) 262, 778 (1976).
- ⁵⁾ C. R. Jones, W. A. Gibbons und V. Garsky, Nature (London) 262, 779 (1976).
- ⁶⁾ C. Garbay-Jaureguiberry, B. P. Roques, R. Oberlin, M. Anteunis und A. K. Lala, Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 558 (1976).
- ⁷⁾ M. Anteunis, A. K. Lala, C. Garbay-Jaureguiberry und B. P. Roques, Biochem. 16, 1462 (1977).
- ⁸⁾ C. R. Jones, V. Garsky und W. A. Gibbons, Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 619 (1977).
- 9) H. E. Bleich, A. R. Day, R. J. Freer und J. A. Glasel, Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 592 (1977).
- ¹⁰⁾ H. E. Bleich, J. D. Cuttnell, A. R. Day, R. J. Freer, J. A. Glasel und J. F. McKelvy, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73, 2589 (1976).
- ¹¹⁾ C. Garbay-Jaureguiberry, B. P. Roques, R. Oberlin, M. Anteunis und S. Combrisson, FEBS Lett. 76, 93 (1977).
- ¹²⁾ J. Kobayashi, U. Nagai, T. Higashijima und T. Miyazawa, Biochim. Biophys. Acta 577, 195 (1979).
- ¹³⁾ J. Kobayashi, T. Higashijima, U. Nagai und T. Miyazawa, Biochim. Biophys. Acta 621, 190 (1980).
- ¹⁴⁾ M. A. Khaled, M. M. Long, W. D. Thompson, R. J. Bradley, G. B. Brown und D. W. Urry, Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 224 (1977).
- ¹⁵⁾ T. Higahijima, J. Kobayashi, U. Nagai und T. Miyazawa, Eur. J. Biochem. 97, 43 (1979).
- ¹⁶ D. Demel und H. Kessler, Tetrahedron Lett. 1976, 2801.
 ¹⁷ Y. A. Bara, A. Friedrich, H. Kessler und M. Molter, Chem. Ber. 111, 1045 (1978).
- ¹⁸⁾ H. Kessler und P. Kondor, Chem. Ber. 112, 3538 (1979).
 ¹⁹⁾ A. Friedrich, Dissertation, Univ. Frankfurt 1980.
- ²⁰⁾ R. C. A. Frederickson, Life Sci. 21, 23 (1977).
- ²¹⁾ N. Ling, S. Minick und R. Guillemin, Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, 565 (1978).
- ²²⁾ N. Ling und R. Guillemin, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73, 3308 (1976).
- 23) Y. S. Klausner und M. Bodanszky, Synthesis 1974, 549.
- 24) Y. A. Bara, A. Friedrich, W. Hehlein, H. Kessler, P. Kondor, M. Molter und H.-J. Veith, Chem. Ber. 111, 1029 (1978).
- ²⁵⁾ E. Izeboud und H. C. Beyerman, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 99, 124 (1980).
- ²⁶⁾ Die Aminosäuresequenz wurde in Analogie zu c1 und c2 gewählt.
- ²⁷⁾ Y. A. Ovchinnikov und V. T. Ivanov, Tetrahedron 31, 2177 (1975).
- ²⁸⁾ M. Llinas und M. P. Klein, J. Am. Chem. Soc. 97, 4731 (1975).
- ²⁹⁾ Zur Definition der β und γ -Schleifen siehe J. A. Smith und L. G. Pease, CRC Crit. Rev. Biochem. 8, 315 (1980).
- ³⁰⁾ V. F. Bystrov, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 10, 41 (1976).
- ³¹⁾ C. M. Venkatachalam, Biopolymers 6, 1425 (1968).

- ³²⁾ C. Ramakrishnan und B. N. N. Rao, Int. J. Pept. Protein Res. 15, 81 (1980).
- 33) K. G. R. Pachler, Spectrochim. Acta 20, 581 (1964).
- ³⁴⁾ J. H. Noggle und R. E. Schirmer, The Nuclear Overhauser Effect, Academic Press, New York 1971.
- ³⁵⁾ C. R. Jones, C. T. Sikakana, S. Hehir, M. E. Kuo und W. A. Gibbons, Biophys. J. 24, 815 (1978).
- ³⁶⁾ W. A. Gibbons, D. Crepaux, J. Delayre, J. J. Dunand, G. Hajdukovic und H. R. Wyssbrod, Peptides: Chemistry, Structure and Biology, Ed. R. Walter und J. Meienhofer, S. 127 ff., Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, Mich. 1975.
- ³⁷⁾ A. J. Fischman, M. W. Riemen und D. Cowburn, FEBS Lett. 94, 236 (1978).
- ³⁸⁾ L. G. Pease und C. Watson, J. Am. Chem. Soc. 100, 1279 (1978).
- ³⁹⁾ M. Kuo und W. A. Gibbons, J. Biol. Chem. 254, 6278 (1979).
- 40) L. D. Hall und J. K. M. Sanders, J. Am. Chem. Soc. 102, 5703 (1980).
- ⁴¹⁾ L. Moroder, A. Hallett, E. Wünsch, O. Keller und G. Wersin, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1651 (1976).
- 42) M. Brenner und W. Hüber, Helv. Chim. Acta 36, 1109 (1953).

[138/81]