

Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung antihepatotoxischer Naturstoffe (Silybin-Antamanid) durch Röntgenstrukturanalyse

Examination of the Structure Activity Relationship of Antihepatotoxic Natural Products
(Silybin-Antamanide) by X-Ray Analysis

Hermann L. Lotter

Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, Karlstr. 29, D-8000 München 2,
Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **39c**, 535–542 (1984); received December 2, 1983/March 26, 1984

Silybin, Antamanide, Phalloidin, Structure Activity Relationship, Antihepatotoxic Principle

Both, the flavonolignane silybin and the decapeptide antamanide, protect animals against the mushroom poison phalloidin from *Amanita* species. The X-ray structures of silybin and antamanide have been solved in previous studies. Here an attempt has been made to explain the antagonistic antihepatotoxic protection by similar chemical structure elements in the two compounds. It can be shown that two aromatic rings in a definite arrangement are essential for the attachment to the target structure of the liver cell membrane. Comparable pharmacological tests are discussed.

Einleitung: Pilzgifte und deren Antagonisten

Die meisten schweren und so gut wie alle tödlichen Pilzvergiftungen werden in Europa durch Pilze der Gattung *Amanita* (*A. phalloides*, der grüne Knollenblätterpilz) und die weißen Spezies *A. verna*, *A. virosa* sowie *A. bisporigera*, *A. suballiacea*, *A. hygrophoropisca* (in Nordamerika) verursacht (Abb. 1). Die Pilze der Amanita-Gruppe enthalten 3 Typen von toxischen Peptiden: Amatoxine, Phallotoxine und Virotoxine. Die offensichtlich allein für die tödlichen Wirkungen verantwortlichen Ama-



Abb. 1. Grüner Knollenblätterpilz, *Amanita phalloides*.

Sonderdruckanforderungen an Dr. H. Lotter.

0341-0382/84/0600-0535 \$ 01.30/0

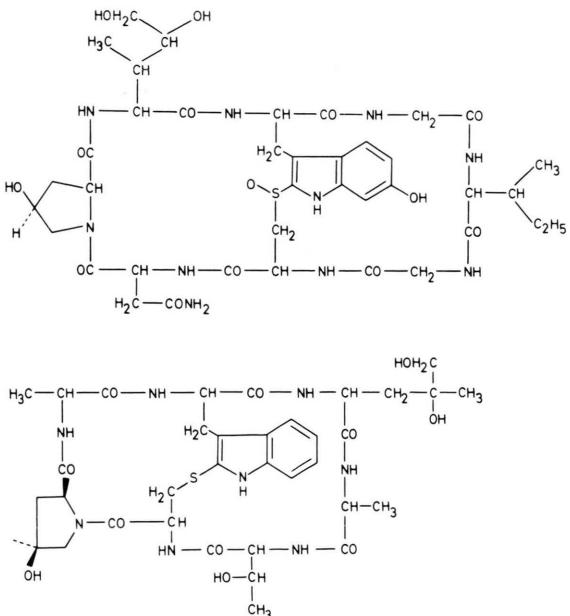


Abb. 2. Strukturformeln von α -Amanitin (oben) und Phalloidin (unten).

toxine sind zyklische Oktapeptide (Abb. 2), die eine R-Sulfoxid-Verbrückung zwischen dem Tryptophan und dem gegenüberliegenden Cystein enthalten. Sie bilden sehr stabile Komplexe mit der eukaryotischen RNS-Polymerase B, hemmen die Synthese der Messenger-RNS, so daß die Proteinbildung zum Stillstand kommt. Der Ausfall lebenswichtiger

Proteine führt schließlich nach 6–7 Tagen in die kritische Phase und mitunter zum Tode, wobei Erwachsenen bereits die in einem Pilz enthaltene Menge von Amatoxinen ausreicht [1].

Etwa 10mal weniger giftig sind Phalloidin (Abb. 2) und die ähnlich wirkenden Virotoxine [2]. Die Phallotoxine sind zyklische, durch eine Sulfidbindung überbrückte Heptapeptide, deren Wirkung sich von den im Zellkern angreifenden Amatoxinen wesentlich unterscheidet. Sie binden an Elemente der Zellmembran, nämlich an das kontraktile Protein Aktin und verschieben irreversibel das Gleichgewicht zwischen dem monomeren G-Aktin und polymeren F-Aktin zugunsten von F-Aktin [3]. Infolge dieser Modifikation wird die Plasmamembran der Leberzellen so verändert, daß *in situ* Blut eindringt und die Leber zur Schwellung bringt. An isolierten Hepatozyten werden infolge der Membranschwäche plasmagefüllte Bläschen hervorgedrückt (Abb. 3).

Die Wirkungen des Phalloidins können durch eine Reihe von chemischen Verbindungen verhindert werden. Zwei wirksame Antagonisten sind Antamanid und Silybin (Abb. 4) [5], [6]. Antamanid, selbst ein Inhaltsstoff des grünen Knollenblätterpilzes, ist ein zyklisches Dekapeptid, das aus Aminosäuren mit sämtlich hydrophoben Seitenketten besteht. Extrakte und Tinkturen des Flavonolignans Silybin aus dem Samen der Mariendistel (*Silybum marianum* Gaert., Abb. 5) wurden schon seit dem Altertum als Leberheilmittel verwendet [7].

Beide Substanzen verhindern das Eindringen der Phallotoxine ins Zellinnere, indem sie vermutlich um einen Rezeptor an der Oberfläche der Zelle

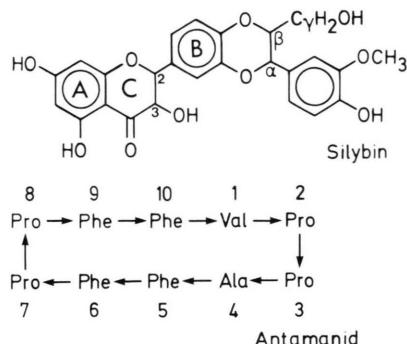


Abb. 4. Strukturformel des Silybins und Aminosäuresequenz des Antamanids.



Abb. 5. Mariendistel, *Silybum marianum* Gaert.

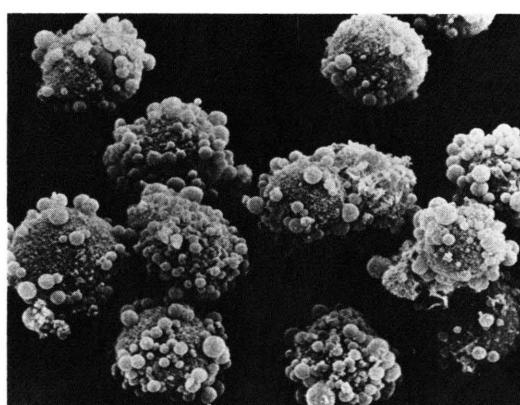


Abb. 3. Isolierte Leberzellen nach Behandlung mit Phalloidin (nach M. Frimmer [4]).

konkurrieren. Sie müssen vor dem Gift (am besten 10 min vorher) i.p. appliziert werden. Silybin zeigt noch merkliche Schutzwirkung 10–15 min nach der Applikation von Phalloidin. Eine Applikation später als 30 min nach dem Gift ist völlig unwirksam. Phalloidin hat bei Mäusen eine LD₅₀ von 2.0 mg/kg, Silybin reduziert die LD₉₀ des Phalloidins auf LD₀ in Dosen von 15 mg/kg (Körpergewicht), Antamanid die LD₉₀ auf LD₀ in Gaben von 0.5–1.0 mg/kg [8].

Antamanid und Silybin wirken nur als protektive Agentien, nicht als curative. Dennoch ist vergleichende Beschäftigung mit beiden Naturstoffen von grundsätzlichem wissenschaftlichem Interesse. Denn, glaubt man der Grundhypothese der Struk-

tur-Wirkungs-Beziehung von Arzneistoffen „Gleiche biologische Wirksamkeit liegt in gleichen oder ähnlichen chemischen Strukturelementen begründet“, so würde das Auffinden dieser gleichen Strukturelemente in Antamanid und Silybin ein Modell dafür liefern, welche Voraussetzungen eine chemische Verbindung erfüllen muß, um an Rezeptoren in der Membran der Leberzelle zu binden. Die Untersuchung dieser Frage geschah mittels Röntgenstrukturanalyse beider Naturstoffe.

Röntgenstrukturanalyse von Silybin und Antamanid

Zunächst scheint es aussichtlos, zwei Verbindungen so verschiedener Substanzklassen auf Gemeinsamkeiten hin zu untersuchen. Ermutigt wurden wir durch neuere Ergebnisse aus dem Gebiet der Opioide, wo gleiche strukturelle Eigenschaften für Morphin und die Peptide der Endorphine und Enkephaline wahrscheinlich gemacht wurden (Abb. 6), nachdem pharmakologische Tests gleiche biologische Wirkung offenbart hatten. Auch hier gab die Röntgenstrukturanalyse Aufschluß über die räumlichen Analogien chemisch sehr verschiedener Naturstoffe [9].

Antamanid bildet mit Metallionen (Na^+ , Li^+ , Ca^{2+}) stabile Komplexe, deren Konformation sich von der nativen bei Abwesenheit von Ionen aufgrund spektroskopischer Studien stark unterscheidet. Die Struktur des Komplexes mit cokristallisiertem LiBr wurde von Karle und Mitarbeitern gelöst [10]. Trotz der bekannten Atomlagen des komplexierten Antamanids konnte zunächst die Struktur der nativen

Verbindung nicht bestimmt werden. Von Wieland wurde deshalb ein Bromderivat mit kovalent gebundenem Br an Prolin 7 hergestellt und aus Methanol/Wasser (70:30) kristallisiert. Die Strukturanalyse dieses Antamanids gelang uns durch Kombination verschiedener kristallographischer Methoden, wie Schweratommethode, direkte Methoden mittels MULTAN- und SHELXTL-Programm [11, 12] und schließlich Fourierrecycling von Sim-weighted Fouriersynthesen. An Antamanid lagern sich im Kristallverband 8 Wassermoleküle an, von denen vier – in der Längsachse des Moleküls gelegen – gegenüberliegende Peptidstränge überbrücken (Abb. 7). Mit den zugehörigen angelagerten 8 Wassermolekülen hat das Antamanidderivat ein MG von 1377 [13].

Der Vergleich des nativen Antamanids mit dem Komplex bestätigte, was aus spektroskopischen Messungen und aus Strukturanalysen von Karle [14] an einem modifizierten Antamanid-Analogen geschlossen wurde, nämlich daß Antamanid als sehr flexibles Molekül vorliegt mit zwei stabilen Konformationen (Abb. 8): In unpolaren Lösungsmitteln (und mit wenig Wasser) liegt das Molekül gestreckt vor mit 2 Wasserstoffbrücken zwischen den Aminosäuren 1–5 und 6–10. In der komplexierten Form hat es eine „Tassen“-ähnliche Gestalt mit Wasserstoffbrücken zwischen den Aminosäuren Pro 3–Phe 6 und Pro 8–Val 1, in deren Inneren das Kation durch 4 Carbonyle des Backbones festgehalten wird. Das Molekül stülpt sich sozusagen um.

Natürlich vorkommendes Silybin kristallisiert äußerst langsam aus 0,5 mg in 1 ml Methanol/Wasser (20/1), in der triklinen Raumgruppe P1 mit 2 Molekülen in der Elementarzelle (asymmetrische Einheit). Wir bestimmten die Struktur von Silybin · 1 MeOH mit direkten Methoden und Fourierrecycling entsprechend Abb. 9. Danach liegt es als Diastereomerengemisch (1:1) vor, bei dem der Flavanonolteil seine Konfiguration am 2R, 3R beibehält, während am C_α , C_β im Benzodioxanteil beide Konfigurationen jeweils zweimal mit R bzw. S auftreten [15]. Dies bestätigte bislang aufgrund von NMR-Messungen vermutete Ergebnisse [16]. Silybin besitzt zwischen dem Flavanonolteil und dem Benzodioxan freie Drehbarkeit zwischen Ring C und B mit nur geringer Potentialhemmung in der parallelen Lage beider Ringsysteme; das ist für die Anpassung wichtig, wie später ausgeführt wird.

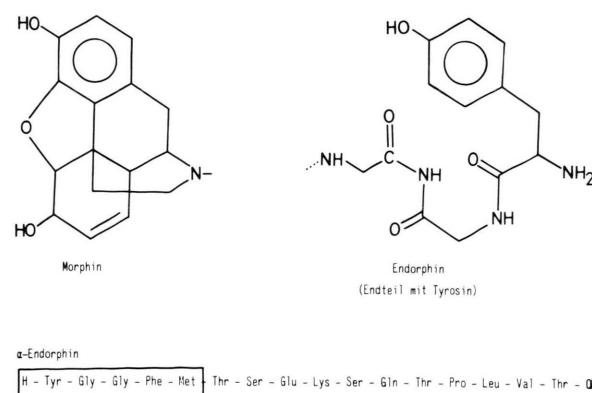


Abb. 6. Gleiche Strukturelemente in Morphin und Enkephalin bzw. Endorphin.

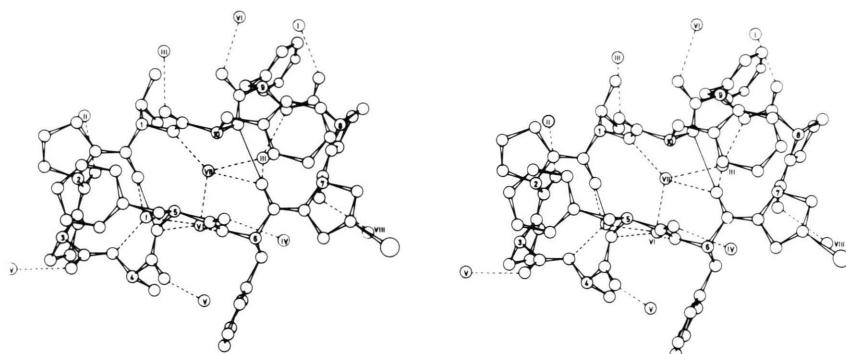


Abb. 7. Die Molekülstruktur des Antamanid-Bromiderivates mit umgebenden und innerhalb gelegenen Wassermolekülen. Die intra- und intermolekularen Wasserstoffbrücken zwischen Backboneatomen sind gestrichelt. Die Nummerierung der C_x -Atome des Peptidgerüstes entspricht der üblichen Zählweise aus Abb. 4.

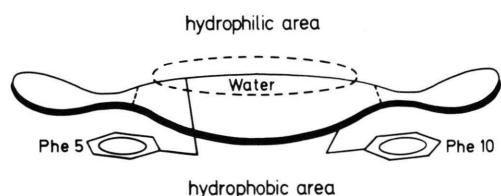
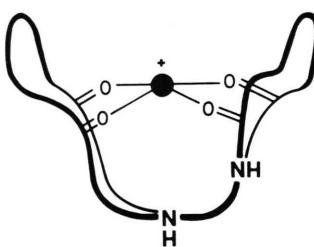


Abb. 8. Backbone der beiden stabilen Konformationen des Antamanids, links der Komplex mit einem Metallion [10]; rechts das native Moleköl mit angelagerten innermolekularen Wassern, die auf der Oberseite einen hydrophilen Molekölbereich ausbilden, während die Unterseite hydrophob ist – „geschützt“ durch die Seitenketten des Phe 5 und Phe 10.

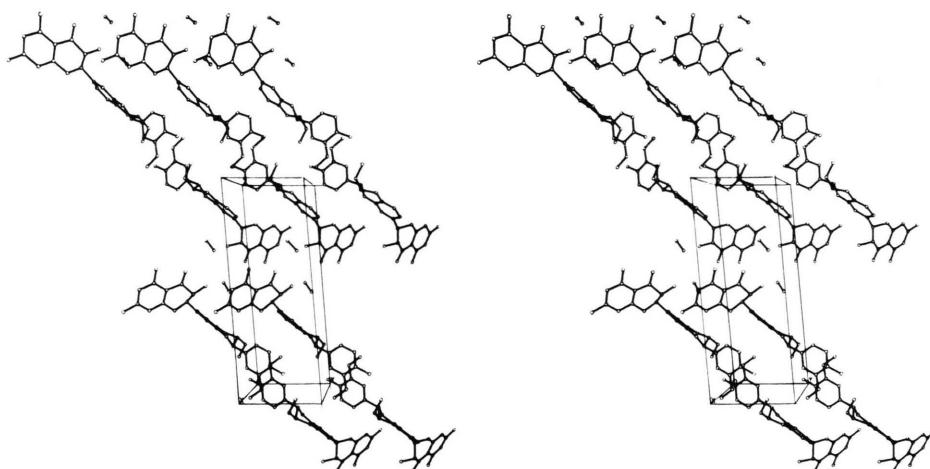


Abb. 9. Kristallstruktur des Silybin.

Anpassung nach Strukturähnlichkeiten des Sibyllins und Antamanids

Zur Auffindung von gleichen Strukturmerkmalen der beiden hier untersuchten antihepatotoxisch wirksamen Naturstoffe wurden zunächst aus den Atompositionen der X-Ray-Analyse naturgetreue

Modelle gebaut, sowohl Kendrew- als auch (schwieriger aber besser wegen der Einschätzung von Drehbarkeit und Raumerfüllung) Kalottenmodelle. Mit Erkenntnissen aus dieser ersten groben Vergleichsbetrachtung stellt man beide Moleküle oder die in Frage kommenden Teile mittels ihrer kristallographischen Atomkoordinaten auf einem

rechnergesteuerten Bildschirm dar. Diese Prozedur wurde gerechnet mit den Programmen von A. Jones [17] auf einer PDP 11/40 mit angeschlossenem Graphic Display (Vector General VG 3400) des Rechenzentrums im MPI für Biochemie in Martinsried. Ursprünglich dient dieses Rechnersystem mit Bildschirm zum Modellbau von Proteinen aus Contourplots von Fouriersynthesen und der Verfeinerung von Makromolekülen. Von uns wurden die Möglichkeiten des Systems modifiziert verwendet. Das Programm mit zugehöriger Hardware erlaubt die Drehung beider zu untersuchenden Moleküle als ganzes in eine günstige Blickrichtung sowie die Rotation und Translation des einen Moleküls gegen das andere, so daß geeignete gleiche Strukturelemente sich überdecken, und auch Drehungen von innermolekularen Gruppen um Winkel von erlaubter freier Drehbarkeit (z.B. Seitenketten der Aminosäuren des Antamanids). Bei diesen vielen Freiheitsgraden gelingt erst in mehreren Iterations schritten die gesuchte Anpassung der Teilstrukturen beider Moleküle. Die Feststellung der „besten“ Überlagerung geschieht vorerst noch nach subjektiven visuellen Kriterien. Ein sicherlich sehr aufwendiges Computerprogramm, das die Summe der quadratischen Abstände von Atomen und Ebenen minimalisiert und so die „beste Anpassung“ festlegt, existiert bislang hier noch nicht.

Zum Vergleich mit Silybin wurden die Koordinaten der Komplex-Konformation des Antamanids (nach [10]) verwendet. Denn es ist nicht unwahrscheinlich, daß Antamanid im Körper mit Ca^{2+} -Ionen, die in der Zellmembran oder Proteinen

gebunden sind, einen stabilen Komplex eingeht [8]. Es ist ausführlich diskutiert worden, ob die Fähigkeit zur Komplexbildung, die auch von anderen zyklischen Peptiden wie Valinomycin bekannt ist, der entscheidende strukturelle Grund für die Antitoxizität ist. Das muß verneint werden, da das enantiomere Antamanid mit ausschließlich D-Aminosäuren nur geringe Wirkung hat, obwohl es gleiches Verhalten zur Komplexbildung zeigt. Die Form des Peptidbackbones wurde bei unseren Untersuchungen wie die im Kristall des Metallkomplexes angenommen und nicht verändert, da sie durch die zwei H-Brücken und die Carbonyl-Metallionenbindung sehr stabil ist.

Das Ergebnis der nach obigem Verfahren erhaltenen Überlagerung von Antamanid und Silybin gibt die Abb. 10 wieder. Daraus lassen sich diese Folgerungen ziehen:

1. Die Phenylgruppen von Phe 9 und Phe 10 können durch erlaubte Drehung um die jeweiligen $C_\alpha-C_\beta$ und $C_\beta-C_\gamma$ -Bindungen so ausgerichtet werden, daß sie mit den Ringen A und B des Silybins gut zur Deckung kommen. Die Phenylalanine 9 und 10 beim Antamanid und die Aromaten A und B des Silybins sind offenbar für die Antitoxizität essentiell.
2. Der Ring C des Silybins dürfte selbst keine Rolle bei der Bindung an den Rezeptor spielen. Er legt nur den Abstand der Ringe A und B fest. Eine Ringöffnung von C würde das nicht beeinträchtigen.
3. Die funktionellen Gruppen des Silybins kommen in die Nähe der Peptidbildungen des Backbones im Antamanid, also der etwas polareren Teile des Moleküls.
4. Die Diastereomerie des Silybins ist bei der Anlagerung ohne Bedeutung, beide Diastereomeren sind zur Bindung befähigt.
5. Die Seitenketten des Benzodioxanteils sind vermutlich nur für die Löslichkeit und den Transportmechanismus, also die Pharmakokinetik, von Bedeutung.

Pharmakologisch vergleichbare Ergebnisse

Nach der Feststellung der für die Wirkung des Silybins wesentlichen Strukturmerkmale erhebt sich die Frage, welche bekannten Untersuchungen zur biologischen Wirksamkeit in diesen Rahmen gestellt werden können, um das Ergebnis abzusichern.

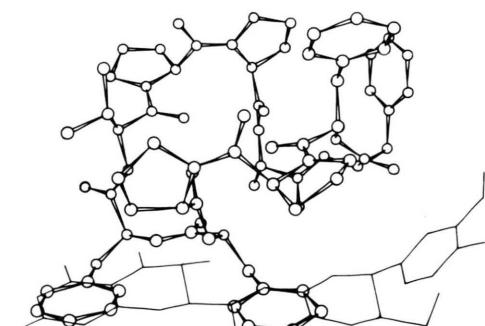


Abb. 10. Antamanid-Silybin-Anpassung. Die Seitenketten von Phe 9 und Phe 10 des Antamanids passen auf die aromatischen Ringe des Silybins (Antamanid ist mit Kreisen als Atome und durch Kegel verbunden, Silybin als gerade Striche dargestellt).

1. Zunächst sei eine Untersuchung genannt, die sich mit der Anlagerung von Silybin am Zellkern beschäftigt. Wenn es sich hier auch um die Wirkung an anderen Zellbausteinen als an der Membran handelt, so ist das Ergebnis über die Wirksamkeit verschiedener Flavonoide auch für unsere Arbeit von Interesse. Der Mechanismus einer erhöhten Regenerationsfähigkeit der Leber nach Silybin-Eingabe durch Einfluß des Präparates auf die Proteinbiosynthese wurde von Sonnenbichler und Mitarbeitern [18] untersucht. Es wurde gefunden [19], daß Silybin die enzymatische Aktivität der r-RNS-Polymerase erhöht. Durch Stimulierung der r-RNS-Synthese kommt es zu einer vermehrten Ribosomenbildung, wodurch die Proteinbiosynthese beschleunigt wird. In einer weiteren Arbeit [20] wurden zur Bestimmung der Strukturelemente, die für den Stimulierungseffekt notwendig sind, eine Reihe strukturähnlicher Flavonoide in ihrem Einfluß auf die RNS-Synthese *in vitro* untersucht. Unter 27 verschiedenen Flavonoiden zeigten die sechs Verbindungen der Abb. 11 zumindest abgeschwächte Stimulation, während alle anderen unwirksam waren.

Es zeigt sich, daß das Vorhandensein und der Abstand der beiden aromatischen Ringe A und B wesentlich ist. Der Hydrierungsgrad im Ring C ist offensichtlich ebenso wie die Substitution an C3 von untergeordneter Bedeutung. Wenn diese Untersuchung von Sonnenbichler auch zu denselben Strukturmerkmalen wie unser Silybin-Antamanid-Vergleich führt, so muß doch darauf hingewiesen werden, daß das erstere sich auf eine Wirkung im

Zellkern bezieht, während der Phalloidin-Antagonismus einen Membraneffekt darstellt. Beide so gut zusammenpassenden Ergebnisse sind also nur beschränkt vergleichbar.

2. Von Wieland und Mitarbeitern wurde Antamanid synthetisiert [21]. Um die Teile des Dekapeptids zu bestimmen, die für die antagonistische Wirkung gegen Phalloidin wesentlich sind, wurde durch Austausch von Aminosäuren auch eine große Zahl von Analogen des Antamanids hergestellt und *in vivo* an der perfundierten Rattenleber auf antitoxische Wirksamkeit getestet [8]. Die Ergebnisse dieser Testserien zeigt Abb. 12.

Unter den Analogen, bei denen die antitoxische Wirkung auf Null reduziert ist, sind die, in denen wenigstens eines der Proline gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht wurde (Nr. 8 und 18). Dies ist bei Kenntnis der Struktur recht plausibel. Denn die Proline spannen an vier Ecken den Rahmen, der die Struktur bestimmt und dem Molekül erlaubt, eine passende Konformation für die Komplexbildung einzugehen und an einen möglichen Rezeptor an den Hepatozyten zu passen. Der Ersatz eines Prolins ändert die Gestalt des Peptidbackbones völlig. Die obige Aufstellung zeigt weiter, daß eine Änderung von Aminosäuren an anderen Positionen keine große Minderung der Antitoxizität nach sich zieht. Dies gilt mit Ausnahme der Phenylalanine in 9 und 10, und das ist auch für unsere Aussage wichtig. Denn genau die Seitenketten dieser Aminosäuren sind es, auf die sich nach unserer Untersuchung (Abb. 10) das Ringsystem des Silybins einpassen läßt. Es ergibt sich also eine sehr

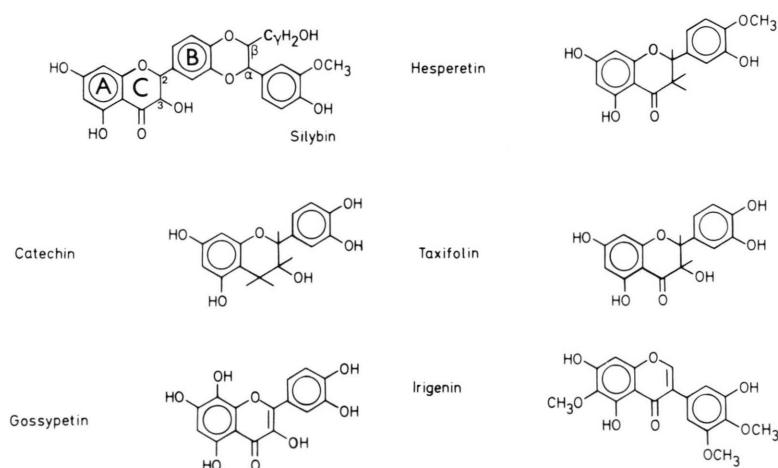
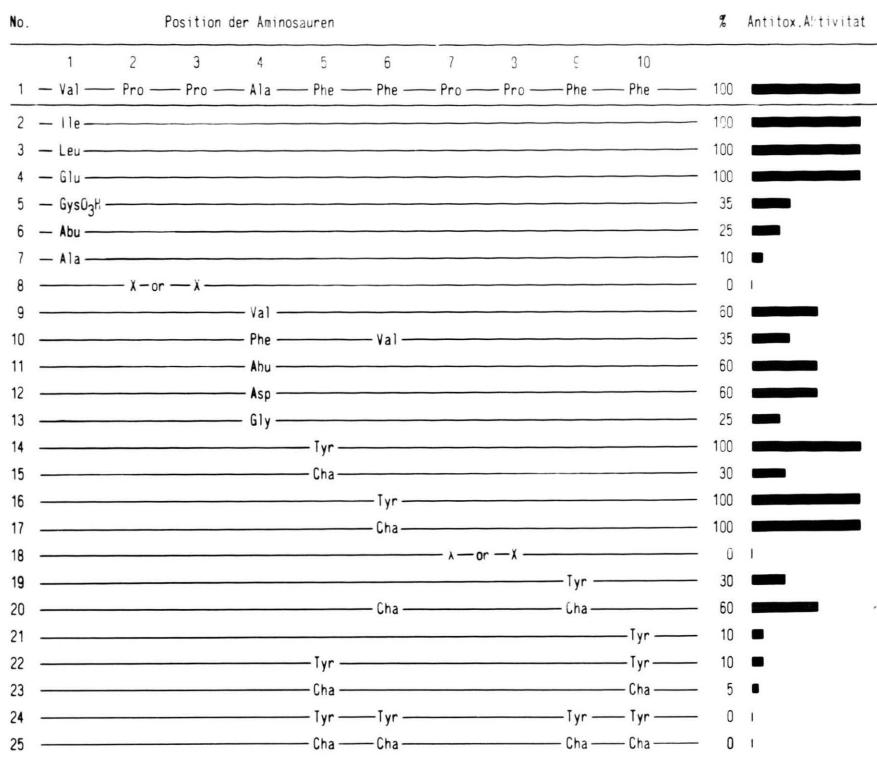


Abb. 11. Silybin und strukturähnliche Flavonoide. Taxifolin und Hesperetin zeigen deutliche, die anderen abgeschwächte Stimulation.

Abu = L- α -Aminobuttersäure

Cha = L-Cyclohexylalanin

X = Aminosäure außer Prolin

Abb. 12. Analoge des Antamanids und ihre antitoxische Wirkung bezogen auf Antamanid (100%).

befriedigende Übereinstimmung zwischen dem biologischen Test mit dem Peptid und unseren Strukturuntersuchungen.

3. Genuines Silybin besitzt im Flavanonol an der Verbindung zum Benzodioxan ein chirales C-Atom in R-Konfiguration. Bei unvorsichtiger Aufarbeitung oder bei längerer Aufbewahrung entsteht aus Silybin leicht 2,3-Dehydrosilybin mit einer Doppelbindung zwischen C2 und C3. Was unser Modell der Struktur-Wirkungsbeziehung dazu aussagen kann, soll Abb. 13 verdeutlichen.

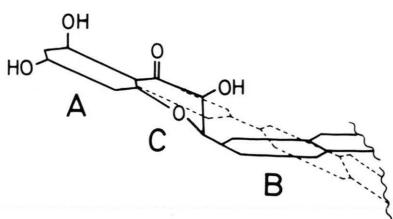


Abb. 13. Sterischer Vergleich Silybin und 2,3-Dehydrosilybin (Silybin stark durchgezogen, 2,3-Dehydrosilybin gestrichelt).

Sie gibt den räumlichen Unterschied zwischen den für die biologische Wirkung wichtigen Teilen des Silybin und 2,3-Dehydrosilybin wieder, betrachtet nahezu in Blickrichtung der Ebene von Ring A bzw. B. Wichtig für die gegenseitige Stellung der beiden Aromaten A und B ist die Bindungsart am C2. Durch das tetragonale C2 entsteht in der Molekülstruktur von Silybin zwischen A und B sowohl ein kleiner Höhenunterschied ($\sim 0.5 \text{ \AA}$) als auch ein Winkel von etwa 20° zwischen beiden Ebenen, während das dehydrierte Produkt eben sein muß. Das Anpassen des 2,3-Dehydrosilybins an die Seitenketten des Phe 9 und Phe 10 von Antamanid gelingt im Modellbau nicht so gut. Mit anderen Worten, die Existenz oder das Fehlen einer Doppelbindung zwischen C2 und C3 kann für die antagonistische Wirkung des Silybins nicht ohne Wirkung sein. In der Tat bestätigen Untersuchungen von Halbach [22], daß Dehydrosilybin nur 35% der antagonistischen Wirkung des Silybins erreicht (Abb. 14). Und mehr noch, α -Diketon, das durch

2,3-Dehydrosilybin

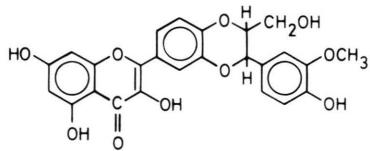
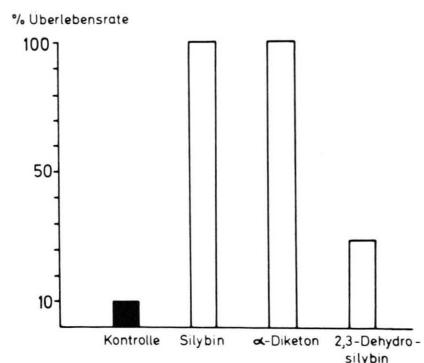
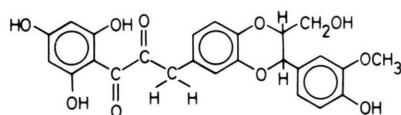
 α -Diketon

Abb. 14. Antitoxische Aktivität von 2,3-Dehydrosilybin und -Diketon nach [22].

Ringöffnung aus Silybin entsteht und bei dem Ring A und B gegeneinander einstellbar sind, besitzt die gleiche antagonistische Wirkung wie Silybin selbst. In Abstand und Stellung der aromatischen Ringe A und B zueinander müssen also die wesentlichen Strukturmerkmale der antihepatotoxischen Wirkung begründet sein.

Danksagung

Der Autor dankt der DFG (Bonn) für die Überlassung von Sachmitteln. Prof. Th. Wieland (Heidelberg) und Prof. D. J. Abraham (Pittsburgh) sei gedankt für wertvolle private Hinweise, Herrn Dr. J. Deisenhofer für die Hilfe beim Gebrauch des Computer-Display-Programms.

- [1] Th. Wieland, Naturwissenschaften **59**, 225 (1972).
- [2] Th. Wieland, Science, **159**, 946 (1968).
- [3] H. Faulstich, Th. Wieland, H. Schimassek, A. K. Walli, and N. Ehler, Mechanism of Intoxication II: Binding Studies, in Falk Symposium 22, ed. by H. Popper, L. Bianchi, W. Reutter, MTP, 1976.
- [4] E. Petzinger, J. Homann, and M. Frimmer, Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) **25**, 571 (1975).
- [5] Th. Wieland, H. Faulstich, W. Jahn, M. V. Govindan, H. Puchinger, Zd. Kopitar, H. Schmaus, and A. Schmitz, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. **353**, 1337 (1972).
- [6] G. Vogel and J. Temme, Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) **19**, 613 (1969).
- [7] H. Wagner, Plant Constituents with Antihepatotoxic Activity, aus: J. L. Beal, E. Reinhard, Natural Products as Medicinal Agents 217, Hippokrates Verlag, Stuttgart 1980.
- [8] Th. Wieland and H. Faulstich, in Critical Reviews in Biochemistry (G. D. Fasman, ed.), p. 185–261, CRC Press, 1978.
- [9] G. D. Smith and J. F. Griffin, Conformation of [Leu⁵] Enkephalin from X-ray Diffraction: Features Important for Recognition at Opiate Receptor, Science **199**, 1214 (1978).
- [10] I. L. Karle, J. Am. Chem. Soc. **96**, 4000 (1974).
- [11] G. Germain, P. Main, and M. M. Woolfson, Acta cryst. **B26**, 274 (1970).
- [12] G. M. Sheldrick, SHELXTL (Release 2.5), A Program for Crystal Structure Determination, Cambridge-Göttingen 1980.
- [13] H. Lotter, G. Rohr, and Th. Wieland, Conformation of [4-cis-Br-Pro]⁷antamanide crystallized from Methanol/Water, Die Naturwissenschaften, in Druck, 1983.
- [14] I. L. Karle, J. Karle, Th. Wieland, W. Burgermeister, and B. Witkop, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**, 1782 (1976).
- [15] H. Lotter and H. Wagner, Z. Naturforsch. **38c**, 339, 1983.
- [16] A. Arnone, L. Merlini, and A. Zanarotti, J.C.S. Chem. Comm. **1979**, 696.
- [17] T. A. Jones, J. Appl. Cryst. **11**, 268–272 (1978).
- [18] F. Machicao and J. Sonnenbichler, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **358**, 141–147 (1977).
- [19] J. Sonnenbichler, J. Mattersberger, and G. Hanser, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **361**, 1751–1756 (1980).
- [20] J. Sonnenbichler and A. Pohl, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **361**, 1757–1761 (1980).
- [21] Th. Wieland, J. Faesel, and W. Konz, Justus Liebigs Ann. Chem. **722**, 197 (1969).
- [22] G. Halbach and W. Trost, Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) **24**, 866 (1974).