

## OXYTOCIN A DALŠÍ PEPTIDOVÁ UTEROTONIKA: JEJICH PRAŽSKÉ OSUDY

Full text English translation of this article is available at the end of this document.

VLADIMÍR PLISKA<sup>a</sup>, ANTONÍN PAŘÍZEK<sup>b</sup>  
a MARTIN FLEGEL<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Collegium Helveticum, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich & Universität Zürich, Schmelzbergstrasse 25, CH-8092 Zürich, <sup>b</sup> Gynekologicko-porodnická klinika 1. lékařské fakulty UK a VFN v Praze, Perinatologické centrum, Apolinářská 18, 128 51 Praha 2, <sup>c</sup> Ústav chemie přírodních látek, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6 vladimir.pliska@biol.ethz.ch, martin.flegel@vscht.cz, parizek@porodnice.cz

Došlo 26.2.19, přijato 15.8.19.

Klíčová slova: oxytocin, vasopressin, neurohypofýza, endokrinologie – neurohypofyzární hormony, I. P. Pavlov, sekretin, carbetocin, dDAVP, deamino-D-arginin vasopressin, desmopressin, atosiban, František Šorm, Josef Rudinger

### Historická poznámka: Hormony neurohypofýzy a počátky endokrinologie

Endokrinologie jako autonomní obor biomedicíny byla ustanovena na zlomu 19. a 20. století, převážně zásluhou britských fyziologů. Pojem *hormon* poprvé použil v přednášce (Croonian Lecture) pro Royal College of Physicians of London v červnu 1905 fyziolog Ernest Henry Starling (1866–1927)<sup>1</sup>. Hormonem označil látku produkovanou sekretorickou tkání, a která je transportovaná krevním oběhem do cílové tkáně, kde vyvolává funkční změny<sup>a</sup>.

Starling tuto definici doložil pokusy se sekrecí pankreatu, které spolu s dalším významným londýnským fyziologem, Williamem Maddock Baylissem (1860–1924), publikovali v roce 1902 (cit.<sup>2</sup>). Prokázali, že sekrece pankreatu, kterou vyvolali stimulací tenkého střeva (duodena)

kyselinou chlorovodíkovou, trvá i po úplné denervaci střeva. Dále zjistili, že extrakt takto stimulované střevní tkáně vyvolá i po jeho intravenózním podání u pankreatu stejnou sekretorickou reakci jako stimulace kyselinou či postprandiální stimulace duodena potravou. Tento první přesný popis humorální regulace, jako alternativy nervové regulace, měl mnohem širší význam v dalších výzkumech fyziologických procesů. Hypotetickou, částečně ovšem už tehdy předčistěnou stimulující látku, označili jako sekretin. Sekretin se proto v literatuře označuje jako první prokázaný hormon<sup>b</sup>.

Ne ovšem zcela právem. Biologické účinky látek, později podle Starlingovy a Baylissovy definice identifikované jako hormony, byly totiž známy už dříve. V roce 1888 popsali Oskar Minkowski (1858–1931) a Josef (též Joseph) Freiherr von Mering (1849–1908)<sup>3</sup> glykosurii u psů po odstranění pankreatu a otevřeli tím i cestu k pozdější identifikaci a izolaci inzulinu. V souvislosti s tehdejší zájmou o tzv. organoterapii<sup>c</sup> studovali o několik let později, v roce 1895, londýnský praktický lékař George Oliver (1841–1915) a fyziolog Edward Albert Schäfer (též Sir Edward Albert Sharpley-Schafer, 1850–1935), pozdější profesor fyziologie na univerzitě v Edinburghu, fyziologické účinky extraktů nadledvinek, štítné žlázy, sleziny a hypofýzy<sup>4,5</sup>. Zajímaly je jejich centrální účinky, u extraktů hypofýzy a nadledvinek především na zvýšení arteriálního tlaku v důsledku vazokonstrikce. William Harry Howell (1860–1945)<sup>6</sup>, profesor fyziologie na John-Hopkins University, E. A. Schäfer a (Thomas) Swale Vincent<sup>d</sup> (1868–1933)<sup>7</sup> pak lokalizovali účinné složky extraktů zadního laloku hypofýzy (1898–1899). Lze tedy říci, že Oliver, Schäfer, Howell a Vincent zavedli jako první do endokrinologického výzkumu biochemicko-farmakologické postupy. Funkce jednotlivých orgánů či tkání byly doposud studovány jejich chirurgickým odnětím (-ektomie). Hormony produkované neurohypofýzou oxytocin a vasopresin (později označovaný jako antidiuretický hormon – AHD) se tak významně zařadily do dějin endokrinologie.

<sup>a</sup> Citát v Lancet<sup>1</sup> (s. 340) „...These chemical messengers [...] or ‚hormones‘ (from *ὀρμαίνω*, I excite or arouse), as we might call them, have to be carried from the organ where they are produced to the organ which they affect by means of the blood stream ...“

<sup>b</sup> Bayliss a Starling docházejí v tomto sdělení k opačným závěrům než Ivan Petrovič Pavlov (1849–1936), který deklaroval přímou a výhradní roli nervového impulsu a přítomnosti chymu v duodenu na pankreatickou sekreci. Jeho nálezy diskutují kontroverzně a poukazují na existenci humorální regulace. Příspěvek Pavlova (Nobelova cena za fyziologii či medicínu v roce 1904, tedy dva roky po publikaci jejich výsledků) citují autoři se značným, plně kolegiálním respektem a oceněním. Nicméně nadepisují příslušnou kapitolu ve své publikaci titulem *VII. The normal mechanism, chemical or nervous?*

<sup>c</sup> Organoterapii se označovalo používání tkáňových extraktů k terapeutickým účelům.

<sup>d</sup> Britský fyziolog, později profesor fyziologie (University of Manitoba in Winnipeg, Kanada).

Uterokinetický účinek extraktů hypofýzy pak poprvé popsal v roce 1906 londýnský biochemik Sir Henry Hallett Dale (1875–1968)<sup>8</sup>, laktační efekt Isaac Ott (1847–1916) a John C. Scott<sup>9</sup> z Medico-Chirurgical College ve Philadelphii. Peptidový charakter uterokinetické složky extraktů z neurohypofýzy se snažil prokázat Harold Ward Dudley (1887–1935) jejich inaktivací proteolytickými enzymy<sup>10</sup>. Avšak z pohledu dnešní enzymologie šlo spíše o závěry pokusů typu „right-for-the-wrong-reason“. Čisté enzymové preparáty ještě nebyly ve dvacátých letech 20. století většinou dostupné, proto Dudley referuje o rychlé inaktivaci extraktu z neurohypofýzy trypsinem na krysí děloze. Ve svých pokusech používal ale Pankreatin firmy Merck, tedy extrakt pankreatických enzymů z různých živočišných druhů. Pozdější měření potvrdily, že oxytocin není enzymově čistým trypsinem štěpitelný. Dudleyovy výsledky by bylo možno vysvětlit enzymologicky netypickým štěpením oxytocinu mezi oběma koncovými aminokyselinami (leucinem v poloze 8 a glycinamidem v poloze 9) chymotrypsinem<sup>11</sup>, neboť chymotrypsin byl totiž téměř jistě v použitém preparátu obsažen.

Tuto průkopnickou epochu pak uzavírá pečlivá práce výzkumníků z laboratoří firmy Parke, Davis and Co. v Detroitu (Michigan). Oliver Kamm se spolupracovníky<sup>12</sup> zde rozdělili v roce 1928 složitým pracovním postupem – opakovanou precipitací, vysolováním a extrakcí do organických rozpouštědel – neurohypofyzární extrakt na dvě frakce, jedna vykazovala převážně uterokinetickou a druhá více vazokonstrikční aktivitu. Dále odhadli (z rychlosti difuze) molekulovou hmotnost uterokinetické substance na 600 Da (později přesně potvrzená molekulová hmotnost oxytocinu činí 1007 Da) a naznačili, že vazokonstrikční komponenta vykazuje též anti-diuretickou aktivitu. Patrně ještě vyšší čistoty obou frakcí dosáhli v polovině třicátých let R. M. Stehle a A. L. Fraser<sup>13</sup>. Protiproudním vytřepáváním v systému voda/2-butanol (techniku zavedl Lyman C. Craig v roce 1944, cit.<sup>14</sup>) získal pak Arthur H. Livermore a Vincent du Vigneaud<sup>15</sup> čistou substanci s vysokou uterokinetickou aktivitou. Tento preparát použil pak na počátku 50. let du Vigneaud (1901–1978) a jeho spolupracovníci tzv. Edmanovým odbouráváním<sup>16</sup> k určení struktury a jako standard při syntéze oxytocinu<sup>17,18</sup>.

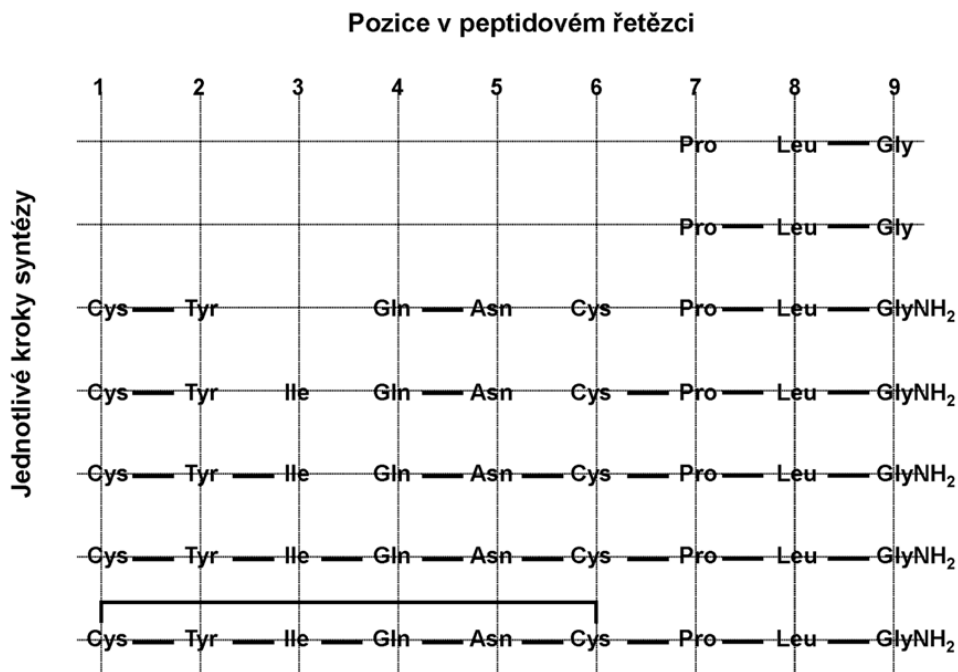
Du Vigneaud a jeho početný tým spolupracovníků z Cornell University Medical College (Ithaka, NY) má pak jednoznačnou zásluhu na první chemické syntéze vasopresinu a oxytocinu. Tato du Vigneaudova práce byla záhy, v roce 1955, oceněna Nobelovou cenou za chemii.

Laudatio Nobelovy komise plně vystihuje jeho zásluhy – a zároveň ovšem i zásluhy jeho spolupracovníků: „... for his work on biochemically important sulphur compounds, especially for the first synthesis of a polypeptide hormone...“ Pokud jde však o určení struktury, zvládl totéž v mnohem skromnějších technických a finančních podmínkách, než jaké měla k dispozici du Vigneaudova skupina, ve stejné době mladý rakouský biochemik Hans Tuppy (\*1924) spolu se svým tehdejší spolupracovníkem H. Michlem. Stalo se tak téměř paralelně s du Vigneaudem. Určil sekvenci aminokyselin oxytocinu u méně čistého oxytocinového preparátu chromatografickou metodou<sup>19,20,c</sup>. Zásluha o určení struktury oxytocinu, což byl ve své době unikátní vědecký výkon, nepatří tedy výhradně du Vigneaudovi, ale i H. Tuppymu. Du Vigneaud tento fakt ve zmíněné přednášce při přebírání Nobelovy ceny přešel pouze bagatelizující poznámkou<sup>22,f</sup>.

V následujících letech uveřejnilo několik laboratoří alternativní metody syntézy oxytocinu, jejichž syntetická schémata shrnul do názorných diagramů R. A. Boissonas a St. Guttmann (Sandoz A. G., Basel)<sup>23</sup>. Jednou z nich byla elegantní syntéza vypracovaná v roce 1956 v Ústavu organické chemie a biochemie Československé akademie věd (dále také ÚOCHB) Josefem Rudingerem (1924–1975) a jeho spolupracovníky Janem Honzlem a Milanem Zaorallem<sup>24,25</sup>. Oproti du Vigneaudově syntéze se tato „pražská metoda“, spolu se syntézou oxytocinu z laboratoří Sandoz (R. A. Boissonas a spol.<sup>26</sup>), projevila jako zvlášť metodicky výhodná a více uživatelsky praktická. „Stavebnicový“ postup, takzvané „trojkové“ schéma (obr. 1), pozůstávající ve spojování kratších peptidů (tripeptidů), navrhla jako alternativu k poněkud náročnému postupu du Vigneauda v následujících letech řada dalších autorů. Syntéza strukturních analogů neurohypofyzárních peptidů tím byla usnadněna a zrychlena. Diagram její verze použité Rudingerem a spolupracovníky je na obr. 1. Tato strategie ve farmakologii peptidů rovněž velice usnadnila studium vztahu závislosti mezi strukturou látky a jejími biologickými aktivitami. Endokrinologické charakteristiky, izolace a syntetické práce na obou hlavních hormonech neurohypofýzy – oxytocinu a arginin- či lysin-vasopresinu – probíhaly paralelně. I projekty syntézy analogů vycházely ze stejných či velmi podobných strategií. V době po publikaci prvních syntéz se jejich autoři převážně soustředili na izolované změny struktury jednotlivých pozic peptidového řetězce. Kombinace aminokyselin v jednom peptidovém řetězci vedly později k přípravě klinicky pozoruhodných farmak.

<sup>c</sup> Hans Tuppy měl již v tomto oboru nejen zkušenosti, ale i významné výsledky: Na roční stáži v roce 1949 určil v laboratoři F. Sangeru v Cambridge strukturu B-řetězce inzulínu. Frederick Sanger jeho podstatný příspěvek ke struktuře inzulínu s uznáním zdůraznil ve své první nobelovské přednášce<sup>21</sup> (cena za chemii 1958): „... the work on fraction B progressed so favourably and Tuppy worked so hard that by the end of the year we were virtually able to deduce the whole of the sequence of its 30 residues.“

<sup>f</sup> Cit. <sup>22</sup>: „It is of considerable interest that Tuppy, on the basis of data we had published along with some data of his own, arrived at the same structure independently. Tuppy's proposal was based on the data from our laboratory on composition, molecular weight, terminal groups, as worked out by our use of the Sanger dinitrophenyl end group procedure ...“



Obr. 1. Postup syntézy oxytocinu použitý skupinou Josefa Rudingera v roce 1954. Naznačeno je v jednotlivých stupních syntézy (svislá osa) postupné propojení jednotlivých komponent daného stupně (aminokyselin a peptidů ze stupně předcházejícího). Předposlední stupeň je „lineární“ oxytocin s cysteinem v poloze 1 a 6. Aktivní oxytocin je získán jeho oxidací (uzavření disulfidového můstku). Chránič skupiny v jednotlivých stupních nejsou znázorněny, jsou znázorněny ve schématu v cit.<sup>23</sup>

## Strukturní analogy neurohypofyzárních peptidů a farmakologické strategie

Pražská „stavebnicová“ syntéza oxytocinu a strukturně obměněných molekul v oxytocinu „v roztoku“ je v průmyslové výrobě používána často dodnes. Po zavedení pozdější a dnes široce používané syntézy v „pevné fázi“ Brucem R. Merrifieldem (1921–2006), který obdržel Nobelovu cenu za chemii roku 1984, byla u některých léčivých látek tohoto typu zvolena pak tato metoda z hlediska správné výrobní praxe jako výhodnější. Problém dostupnosti a strategie volby analogů se později přesunuly do oblasti farmakologie a biochemie. Při studiu závislosti mezi strukturou a biologickou aktivitou (SAR – structure-activity relationships) neurohypofyzárních peptidů se v následujících „pionýrských“ letech jednotlivé výzkumné laboratoře zaměřily na různé cíle.

### 1. Vliv jednotlivých funkčních skupin či vazeb v peptidickém řetězci

„Intuitivní“ postup („trial-and-error“) použila především du Vigneaudova skupina. Cílem bylo zjistit vliv jednotlivých funkčních skupin či vazeb v peptidovém řetězci

pomocí jejich modifikace či jejich vypuštěním. Tak byly získány první zajímavé analogy – jako příklad uvedme 2-*O*-methyltyrosin-oxytocin<sup>27</sup> a 2-*D*-tyrosin-oxytocin (substituce enantiomeru *L*-tyrosinu za *D*-formu). Především tak ale vznikly podklady pro další racionální postupy pro analýzu SAR.

### 2. Biologická aktivita jednotlivých analogů

Dalším cílem bylo studium spekter biologických aktivit jednotlivých analogů. Pro neurohypofyzární peptidy je typické, že vykazují pluripotentní aktivitu. Mají v různých proporcích uterokinetické, laktační, vazopresorické a anti-diuretické účinky (a další, spíše farmakologicky zajímavé, účinky). Změna spektra aktivity biologických účinků se stala zájmem i základního výzkumu. Posun aktivit ve prospěch jedné z nich je často klinicky žádaný.

Dva příklady:

1) Analoga se zvýšeným poměrem vazopresorického/anti-diuretického účinku (analoga vasopresinu) syntetizovali R. A. Boissonnas, W. Doerpfner, St. Guttman, K. Saameli a E. Stürmer ve výzkumných laboratořích firmy Sandoz v Basileji<sup>28,29</sup>. Klinicky významný byl svého času Octapressin® (2-fenylalanin-8-lysin-vasopresin),

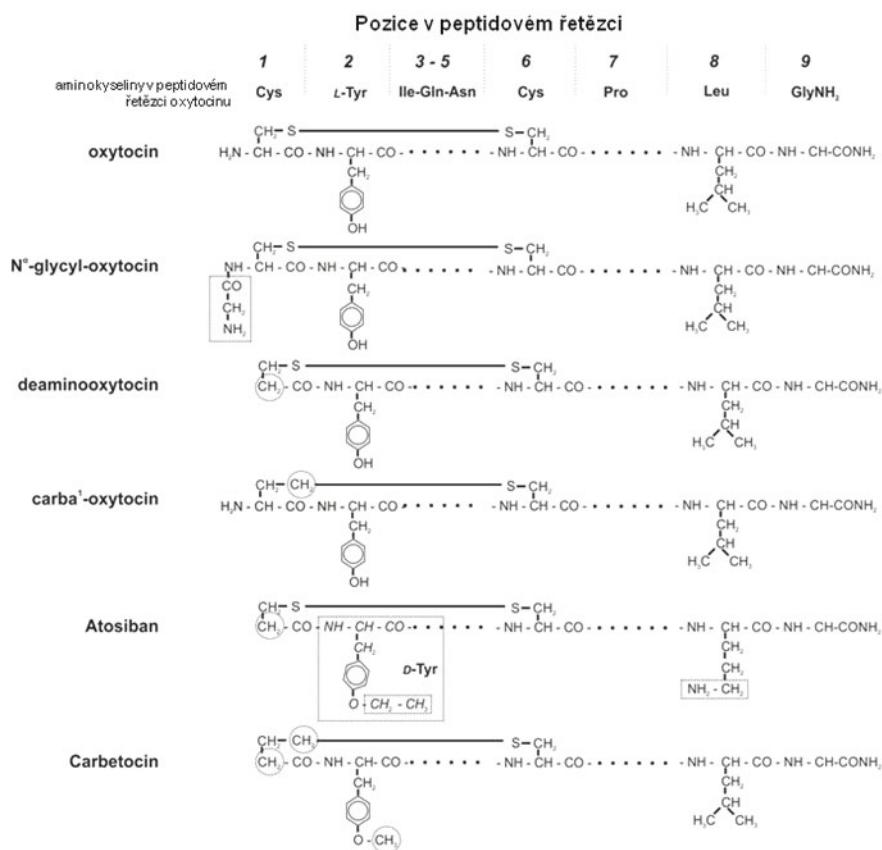
vykazující poměr vazopresorická/antidiuretická aktivita 2,5<sup>§</sup>, užívaný při lokální anestezii. Přidání této látky k lokálnímu anestetiku způsobilo vazokonstrikci a tím prodloužený anestetický účinek a nižší potřebu anestetika. Pro úpravu hemodynamiky, zejména u hemoragického šoku, byl navržen 8-ornitin-vasopresin (Ornipressin), případně jeho analog (2-fenylalanin-8-ornitin)-vasopresin (poměr aktivit 4,0). Tyto látky, ve srovnání s jinými vazopresorickými aminy, byly výrazně výhodnější<sup>30</sup>.

2) Mezi klinicky používanými analogy byl nejspěšnější vasopresinový analog pražské skupiny, 1-deamino-8-D-arginin-vasopresin (DDAVP, Desmopressin, Minirin), syntetizovaný v laboratořích ÚOCHB (Milan Zaoral, Jaroslav Kolc, František Šorm)<sup>31</sup>. Extrémně zvýšená antidiuretická aktivita při minimální aktivitě vazopresorické tento analog předurčila být téměř výhradním lékem pro substi-

tuční terapii *diabetes insipidus*. Později bylo náhodně zjištěno, že tento analog zvyšuje hladinu koagulačního faktoru VIII jako hematostatikum při menších chirurgických (např. stomatologických) zásazích u osob s lehkou formou hemofilie a osob se sklonem k hemoragické diatéze.

### 3. Metabolická stabilita neurohypofyzárních hormonů

Specifickým cílem biochemické skupiny na ÚOCHB byla metabolická stabilita (inaktivace a clearance) neurohypofyzárních hormonů v souvislosti s jejich enzymovým odbouráváním *in vivo*. Tento záměr vedl chemiky k syntéze analogů s obměněnými místy potenciálních enzymových atak v molekulách nativních hormonů. Vzniklo tak několik velice pozoruhodných analogů (obr. 2).



Obr. 2. Modifikované pozice v molekule oxytocinu potenciálně vedoucí k prodlouženému biologickému účinku, schematické zobrazení. Sekvence oxytocinu je naznačena v horním řádku, ve schematických vzorcích jsou neobměněné pozice vyznačeny silnou tečkovanou čarou. Obměněné pozice jsou označeny tenkou přerušovanou čarou (kruhy a čtyřúhelníky)

<sup>§</sup> Test na kryse. Poměr aktivit pro arginin-vasopresin (standard) je 1,0.

Předně byl učiněn pokus o chránění peptidové vazby na N-konci peptidu, tedy mezi koncovým cysteinem a následujícím tyrosinem. Již v padesátých letech zjistili Tuppy a Nesvadba<sup>32</sup>, že oxytocin je v průběhu těhotenství štěpen enzymem aminopeptidasového charakteru; později byl označen jako sérová či těhotenská oxytocinasa. Za částečně empiricky potvrzeného předpokladu, že aminopeptidasy tuto vazbu neštěpí, není-li aminoskupina přítomna, byl již du Vigneaudovou skupinou syntetizovaný – plně aktivní 1-deaminoxycocin rezistentní vůči enzymům tohoto typu. Později bylo, opět v laboratořích ÚOCHB, objeveno, že všechny oxytocinové a vasopresinové analogy s vypuštěnou či modifikovanou aminoskupinou skutečně vykazují prodloužené účinky. Podobná strategie byla použita i pro další místa možného enzymového štěpení, či *vice versa* k zodpovězení otázky, zda projekční modifikace takových míst ve struktuře peptidu vede k prodloužení účinku a tím k identifikaci dalších inaktivujících enzymů. Tak se na příkladu dalo prokázat, že tyrosinasa<sup>33,h</sup>, jiný možný inaktivační enzym neurohypofyzárních peptidů, je bez podstatného vlivu na kinetiku inaktivace: alkylace hydroxylové skupiny na druhé aminokyselině oxytocinu či vasopresinu délku účinku výrazně nezvyšuje. Protekční zásahy na karboxylovém, resp. karboxamidovém, konci řetězce nemají vliv na kinetiku biologických účinků, i když farmakologové z Mount Sinai University v New Yorku existenci enzymů štěpících oxytocin na tomto konci popsali<sup>34,35,i</sup>.

Disulfidový můstek mezi oběma cysteinovými řetězci v pozici 1 a 6 zaručuje aktivní cyklickou konformaci molekuly oxytocinu a s výjimkou zmíněné sérové oxytocinasy patrně i resistenci vůči aminopeptidasám. Redukce, resp. odstranění, disulfidického můstku vede k téměř neaktivnímu „lineárnímu“ oxytocinu. Zdá se, že specifická redukta oxytocinového můstku, která by vedla k inaktivaci tohoto hormonu, neexistuje, i když byla v biochemických laboratořích na ÚOCHB dlouho hledána. J. Rudinger a K. Jošt navrhli řešení otázky významu disulfidového můstku pro aktivitu a inaktivaci oxytocinu zcela unikátním způsobem. Navrhli náhradu jednoho nebo obou atomů síry neredukovatelnou „izosterní“ methylenovou skupinou (-CH<sub>2</sub>) o zhruba stejném molekulárním objemu jako má atom síry (obr. 2). Tak vznikly pozoruhodné sloučeniny s biologickými aktivitami řádově srovnatelnými s nativní molekulou, označené jako „carba“-oxytociny<sup>37</sup>. Pod tímto jménem jsou dnes známy v chemickém a farmakologickém názvosloví mezinárodně. Kupodivu

však nevykazují zvláště prodloužené účinky, takže fyziologický význam inaktivace neurohypofyzárních peptidů redukcí disulfidického můstku byl tímto přinejmenším zpochybněn<sup>38</sup>.

„Chráněné“ analogy umožnila nadto reverzní strategii tzv. enzymových sond (enzyme probes), tedy analýzu farmakokinetických procesů v blízkosti receptorů neurohypofyzárních peptidů, tedy v tzv. receptorovém kompartmentu<sup>39</sup>. Výsledky, stručně shrnuté, svědčí o tom, že stabilita peptidu, a tím i poločas účinku, souvisí převážně se strukturou aminokyseliny na jeho aminovém konci (na N- $\alpha$ -koncové aminokyselině). Kritický inaktivující enzym je tedy aminopeptidasa typu oxytocinasy popsané již výše zmíněnými autory Tuppym a Nesvadbou<sup>32</sup>. Snaha o prodloužení účinku, zvláště pro klinické využití, vedla k syntéze další významné skupině oxytocinových a vasopresinových analogů, k tzv. „syntetickým“ hormonogennům, u nichž byla na N-koncovou aminoskupinu připojena další aminokyselina či krátký peptid<sup>40,41</sup> (obr. 2). Předpokládalo se, že takto upravené molekuly se budou *in vivo* v prvním kroku enzymově štěpit aminopeptidasami, a teprve pak že dojde k uvolňování účinného hormonu. Farmakologické a imunologické podklady tento předpoklad u oxytocinových a lysin-vasopresinových hormonogennů plně potvrdily. Dva zvláště názorné příklady – časové profily antiuretického a vazopresorického účinku analogů lysin-vasopresinu – přináší obr. 3. Klinicky se uplatnil jako akutní prostředek při krvácivých stavech 1-N- $\alpha$ -triglycyl-8-lysin-vasopresin (TGLVP, Terlipressin, Glypressin), především v případě krvácení z jícnových varixů, a to kvůli svému vazokonstrikčnímu/hemostatickému účinku<sup>j</sup>. O podobných oxytocinových analogích, především 1-N- $\alpha$ -triglycyl-oxytocinu a 1-N- $\alpha$ -leucyl-glycyl-glycyl-oxytocinu, existuje sice řada sdělení v literatuře, v gynekologicko-porodnické praxi se ale příliš neujaly. Výhody ve srovnání s oxytocinem se nezdají být výrazné.

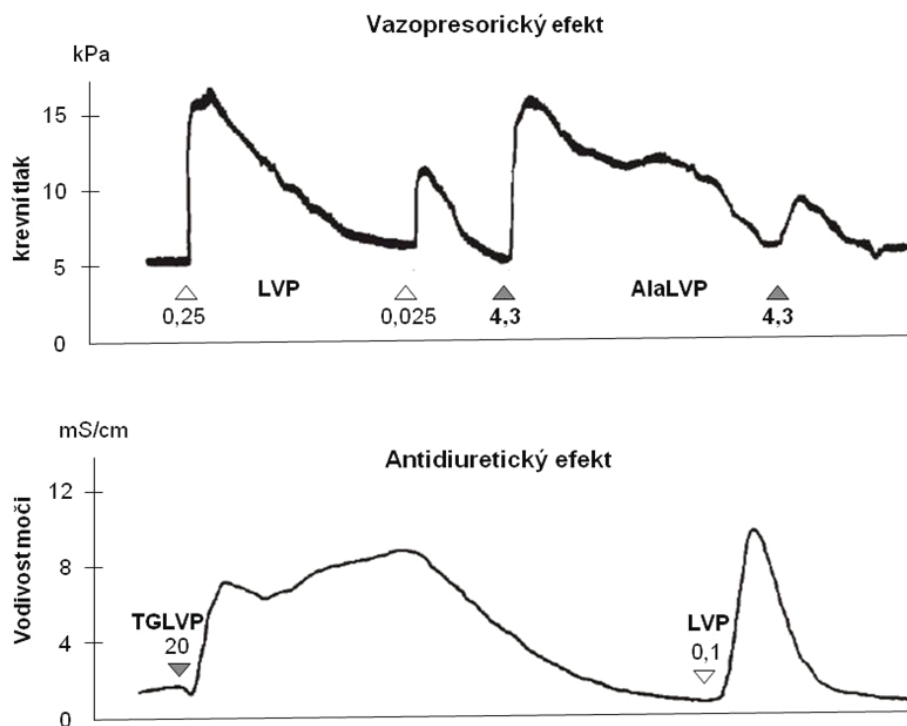
#### 4. Inhibice biologických aktivit neurohypofyzárních hormonů

Výzkum strukturálních analogů působících jako inhibitory biologických aktivit neurohypofyzárních hormonů se datuje od rovněž spíše náhodného nálezu inhibice vazopresorického účinku 8-arginin-vasopresinu 2-O-methyltyrosin-oxytocinem na krysách. Jako první publikovali syntézu tohoto analogu v roce 1960 Law a du Vigneaud<sup>27</sup>; stalo se

<sup>h</sup> Enzym katalyzující oxidaci fenolů v *ortho*-pozici k hydroxylové skupině tyrosinu (oxytyrosinasa), či – za přítomnosti exogeniho kyslíku – na chinony. Lze předpokládat, že takto modifikovaná molekula oxytocinu je biologicky neaktivní.

<sup>i</sup> Peptidy vzniklé odštěpením koncového glycinamidu zmíněnými enzymy (karboxamidopeptidasami) – zvláště desglycinamid-8-lysin-vasopresin – mohou mít četné účinky na různá mozgová centra<sup>36</sup>. Dlouhá léta se jimi zabýval David de Wied (1925–2004) se spolupracovníky (zvláště B. Bohus, T. B. van Wimersma Greidanus) na univerzitě v Utrechtu (Rudolf Magnus Institut). Jde ovšem o účinky sekundární; jejich regulační fyziologická funkce není dostatečně doložena.

<sup>j</sup> Podle neověřených sdělení byl jako akutní protišokový prostředek zajímavý pro sanitní sbory některých armád. Další testovanou farmakologickou možností bylo použití Terlipressinu jako kontracepčního prostředku v prvním trimestru.



Obr. 3. **Prodloužený účinek syntetických vasopresinových analogů.** Horní část: vazopresorický efekt 1-*N*- $\alpha$ -triglycyl-8-lysin-vasopresinu (TGLVP) na kryse (tlak v kPa, *arteria carotis*). Dolní část: antidiuretický efekt TGLVP na hydratované kryse v alkoholické anestezii (stav vodní diurézy). Ordináta: konduktivita kontinuálně vyměšované moči (mS/cm). Na profilu TGLVP znázorňuje první vrchol vlastní antidiuretický efekt analogu, z něhož se postupně uvolňuje LVP (druhý vrchol). Dávky (v nmolech) substance injikované do kanylované femorální žíly. Bílé trojúhelníky: lysin vasopresin (LVP), tmavé: hormonogen

tak krátce před publikací stejné látky v laboratořích ÚOCHB<sup>42</sup>. Časový rozdíl obou publikací byl velmi krátký. Obě skupiny pracovaly na syntéze nezávisle a téměř současně. Pražská skupina však přesto v tomto případě ztratila primát<sup>k</sup>. Avšak brzy nato publikovali biochemici z ÚOCHB mnohem systematictější studii inhibice uterotonického účinku oxytocinu tímto a dalšími analogy modifikovanými v pozicích aminokyselin 2, 3 a 4 (cit.<sup>43</sup>, obr. 2). Popsané objevy dosvědčují, že tento typ strukturální modifikace byl na ÚOCHB již dříve ve středu zájmu. Z pražských výzkumných pracovišť pocházejí pak další studie těchto analogů. Týkající se farmakologicky významného jevu, a to změny antagonismu v parciální a plný agonismus změnou pokusných podmínek<sup>44</sup>. Dodnes jsou vztahy mezi strukturou analogů a jejich inhibičními vlastnostmi celosvětově předmětem studií v četných laboratořích. Již

na zlomu šedesátých a sedmdesátých let shrnul Josef Rudinger výsledky dosavadních studií v několika přehledech<sup>45,46</sup>. Přehled novějších prací, zaměřený převážně na význam antagonisticky působících analogů neurohypofyzárních peptidů a jejich možné léčebné využití, publikoval nedávno Maurice Manning (University of Toledo College of Medicine) se spolupracovníky z různých laboratoří<sup>47</sup>.

## 5. Syntéza analogů s kombinacemi změn na různých pozicích peptidového řetězce

Období izolovaných obměn, které vedly k již známým změnám biologických aktivit, vystřídaly zhruba od 70. let pokusy s kombinacemi změn na různých pozicích peptidového řetězce, motivované převážně snahou připravit klinicky použitelná farmaka. K tomu dvě poznámky.

<sup>k</sup> Jeden z autorů tohoto sdělení (V. P.) si vzpomíná, že Josef Rudinger se ihned po uveřejnění syntézy skupinou du Vigneaud vyjádřil, že na primátu nezáleží, hlavně že analog byl syntetizován. To je přesvědčivý příklad vysoké vědecké morálky Josefa Rudingera.

První se týká kumulace strukturních změn v jednotlivých analogích. Tato nevede zpravidla ke kumulaci biologických vlastností spojených se stavem jednotlivých pozic v molekule. Vedla ovšem k syntéze řady pozoruhodných farmak. V případě oxytocinu takto vznikly dnes klinicky v porodnictví hojně používané léky carbetocin (Duratocin<sup>®</sup>/Pabal<sup>®</sup>) a (dnes již generikum) atosiban (Tractocile<sup>®</sup> a další generické názvy jeho lékových forem).

Poznámka druhá, biologický fenomén charakterizovaný farmakologicky se nemusí nutně v podobné formě projevit klinicky. Výrazně se to týká farmakokinetických vlastností konkrétních látek, když poločasy účinků měřených v pokusech *ex vivo* se liší od pozorování *in vivo*. V klinické praxi používaný analog vasopresinu, 1-deamino-8-D-arginin-vasopresin (Desmopressin, DDAVP), vykazoval v anti-diuretickém testu při aplikaci ekvipotentních dávek odpovídajících 8-arginin-vasopresinu jen mírně prodloužený poločas (nejspíše vlivem vypuštění aminoskupiny na N-konci), ale téměř dramaticky prodloužený účinek při intranazálním podání pacientům s *diabetes insipidus*. Příčinou ovšem může být i vznik depotních forem, například vazbou peptidu ve velké dávce na bílkoviny a jeho postupného uvolňování. Podobný efekt lze pozorovat u carbetocinu, 1-deamino-carba<sup>1</sup>-2-O-methyltyrosin-oxytocinu. Carbetocin se v dnešní době používá v porodnictví pro prevenci a/nebo léčbu peripartálního život ohrožujícího krvácení. Jak již bylo zmíněno, samotná substituce -S- atomu skupinou -CH<sub>2</sub>- neprodlužuje poločas rozpadu oxytocinu, avšak v klinické situaci výrazně prodlouženě působí. Klinický význam carbetocinu pak spočívá v uterotonickém účinku. Oproti oxytocinu navozuje silnější a dlouhodobější retrakci myometria při porodu placenty člověka, tedy ve III. době porodní. Proto je vedle preventivního podání používán i léčebně, a to při poporodní hypotonii a/nebo atonii hladké svaloviny dělohy.

## Dva protagonisté ve výzkumu neurohypofyzárních peptidů v Praze

Od poloviny 50. do konce 60. let minulého století byl český výzkum obou hormonů neurohypofýzy zcela nerozlučně spojen s osobnostmi Josefa Rudingera a Františka Šorma (1913–1980) (obr. 4). První z nich byl už od počátku své akademické kariéry především světově uznávaný chemik v oblasti peptidů. Byl spíše konstruktivní teoretik než experimentátor. Kvůli svému neobyčejnému jazykovému nadání byl současně vynikající organizátor; dovedl pohotově shrnout pohledy odborníků různých oborů a formulovat z nich vědecké závěry. Byl proto také vítaným hostem na nejrůznějších vědeckých shromážděních. Jako první přišel s myšlenkou inovativní syntézy oxytocinu v Ústavu organické chemie a biochemie Československé akademie věd. Avšak vzhledem ke své rodinné historii



Obr. 4. Josef Rudinger a František Šorm (sedící), 1st European Peptide Symposium, Prague 1958. Snímek patrně z archivu jednoho z účastníků, prof. Dr. Maxe Brennera (Basel) zapůjčil a s reprodukcí souhlasil prof. Dr. Alex N. Eberle (Basel)

(otec odsouzen v procesech na počátku 50. let k dlouhému trestu odnětí svobody) by své myšlenky v raných létech komunistické diktatury neuskutečnil bez jednoznačné podpory druhého jmenovaného, profesora Františka Šorma, tehdejšího ředitele ÚOCHB a pozdějšího prezidenta Československé akademie věd.

Několik slov k F. Šormovi. Byl přesvědčený (snad?) komunista, člen ústředního výboru KSČ, v době komunistického režimu poslanec Národního shromáždění. V tehdejší totalitní státě se tedy jednalo o pevně zakotvenou osobnost. V první řadě byl ale profesor a vědec. Jednal přímo, energicky a svoje tehdejší postavení nezneužíval v neprospěch vědy a sotva kdy k vlastnímu prospěchu. „Kádrové“ záležitosti ho nezajímaly, kritériem pro výběr spolupracovníků byl, snad jen s malými výjimkami, vědecký talent. Tím lze i vysvětlit, že jedním z prvních jím vybraných spolupracovníků byl Josef Rudinger, a to i přes jeho již zmíněnou rodinnou historii. Obsáhlý životopis Josefa Rudingera publikoval jako *editorial* v roce 2004 John Jones<sup>48</sup>.

Zásluhou obou byla založena tradice dodnes se rozvíjejících Evropských peptidových symposií<sup>1</sup>: V době, kdy komunistický režim naprosto zabraňoval stykům se Západem, se právě první Evropské peptidové symposium konalo v roce 1958 v Praze. Toto svým stranickým vlivem, z podnětu Josefa Rudingera, umožnil František Šorm.

<sup>1</sup> Jsou do dnešního dne organizovány prostřednictvím European Peptide Society vždy v sudých letech v jednotlivých evropských státech.

Snad nejlépe bude tento počín charakterizovat pasáž z knihy *The World of Peptides* dvou významných chemiků, Theodora Wielanda a Miklose Bodanszkyho, spolupracovníka Vincenta du Vigneauda<sup>49</sup>: „We cannot enumerate here Rudinger's many valuable contributions to the methodology of peptide synthesis or to the design of molecules for specific pharmacological studies. It seems to be more important to recall one of his ideas, that had and still has a major impact on peptide chemistry. In 1958 he invited the handful of European investigators active in peptide research to participate in a symposium in Prague. This first European Peptide Symposium was followed [...] by meetings held in various locations in Europe. Their excellence acted as a stimulus or perhaps as catalyst and led to an unprecedented growth in research and understanding of peptide chemistry. Not less important are the friendships and collaborations formed at the Symposia. Their example was followed in the United States and also Japan ...“

Po sovětské okupaci, již koncem srpna 1968, odešel Josef Rudinger z Československa do Švýcarska. Jako světoznámý vědec se stal na jedné z nejlepších evropských univerzit, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) v Zürichu, jedním z prvních profesorů molekulární biologie. Věnoval se, vedle četných dalších úkolů spadajících do povinností vysokoškolského profesora, spolu se svojí skupinou až do své předčasné smrti v roce 1975 nadále chemii a biologii peptidů. Avšak vědecky nejproduktivnější bylo bezesporu jeho životní období na pražském Ústavu organické chemie a biochemie v Praze. Výzkum peptidů ovšem na tomto ústavu pokračoval dále, přesto že Rudingerova nepřítomnost zanechala nepřekonatelnou mezeru. Jeho roli převzalo několik vynikajících chemiků, z nich je na místě zmínit alespoň Karla Jošta (1932–1986), Karla Podušku (†1974, datum neověřeno) a Milana Zaorala (1926–2011) (obr. 5). První dva rovněž předčasně zemřeli, ve stejné době jako Josef Rudinger<sup>m</sup>. M. Zaoral se pak od původní „peptidové skupiny“, vedené po odchodu Josefa Rudingera Karlem Bláhou (1926–1987), odpojil a vedl vlastní nezávislou laboratoř.

### Oxytocin a vasopresin v laboratořích a na klinikách v Praze

Dostupností analog, které pocházely z prací Rudingerovy skupiny, iniciovala pozdější farmakologický, biochemický a klinický výzkum neurohypofyzárních hormonů na různých pracovištích v Praze. V 60. letech existovala již v Praze, zásluhou Františka Šorma, rozsáhlá komunikace se západními a středoevropskými pracovišti, především v Maďarsku, v Polsku, v NDR, ve Švýcarsku, ve Velká



Obr. 5. 1st European Peptide Symposium, Prague 1958. Snímek účastníků. Označení jsou příslušníci peptidové skupiny ÚOCHB (identifikace: VP a MF). (Archiv M. Brenner, viz obr. 4)

Británii a v Německé spolkové republice. I v této době již existovala mezinárodní výměna informací a často i preparátů. Centrální osobou byl v úloze jakéhosi vyslance opět Josef Rudinger. V té době se stal pražský výzkum peptidů součástí světového výzkumu.

Biochemický a zčásti též farmakologický výzkum byl na Ústavu organické chemie a biochemie soustředěn v oddělení molekulární biologie, zpočátku v laboratoři vedené Ivanem Rychlíkem (Ivan Rychlík, Zdeňka Beránková-Ksandrová, Ivan Bartošek, Vladimír Pliška, Tomislav Barth, Tomáš Douša), poslední tři jmenovaní spolu s dalšími spolupracovníky v oddělené laboratoři biochemie a farmakologie peptidů. Kromě metabolických a farmakokinetických studií byl zájem zaměřen na anti-diuretické a natriferické účinky analogů vasopresinu a oxytocinu. Farmakokinetická charakteristika peptidů a originální anti-diuretický test na kryse pocházející z této laboratoře se rozšířily ve farmakologickém výzkumu a farmaceutickém průmyslu<sup>50</sup>.

Z ÚOCHB rovněž pocházejí jedny z prvních konformačních studií oxytocinu a jeho carba-analogů (Ivo Frič, Milan Kodíček, Karel Jošt, Karel Bláha<sup>51</sup>).

Velkou část farmakologického výzkumu převzal pražský Výzkumný ústav přírodních léčiv (Ivan Krejčí, Ivo Poláček, Běla Kupková, Alena Machová a řada dalších). Odtud pochází většina dat k uterotonickým a vazopresorickým aktivitám peptidů z ÚOCHB. Ivan Krejčí se spolupracovníky se nadto zabýval základními otázkami farmakologie peptidů. Studovali inhibici uterotonického efektu oxy-

<sup>m</sup> V 70. letech zemřelo několik peptidových chemiků v Praze a v zahraničí (Itálie, USA) před dosažením padesáti let nebo krátce po padesátce, nejméně tři z pěti nám známých s onkologickou diagnózou. Podle nepotvrzené domněnky mohlo jejich onemocnění souviset s dlouhodobou expozicí dicyclohexylcarbodiimidem (DCC), běžně používaného v chemii peptidů jako kondenzační činidlo. Jeho kancerogenitu deklaruje National Institute of Health (NIH Publication No. 07-4426).



tocinu, přechody mezi plným agonismem a antagonismem, a vlivem vápníku a hořčičku na tyto procesy. Jeho skupina přešla koncem 60. let do Výzkumného ústavu pro farmacii a biochemii. I tam přetrvala tematika oxytocinových analog 70. léta a končila až v novém tisíciletí. Rovněž, avšak snad v menší míře, spolupracovali v tomto ústavu s biochemickou skupinou ÚOCHB Karel Řežábek, Evžen Kasafírek a Jaroslav Kynčl na syntéze, především však na farmakologické charakteristice vazopresinových hormonogonů.

Projekty z oboru kardiiovaskulární farmakologie a fyziologie vasopresinu byly až do počátku 70. let součástí programu **Ústavu pro choroby oběhu krevního v Praze-Krči** (Jiří Heller, nějaký čas také Joseph H. Cort<sup>n</sup>).

To je ovšem pouze stručný výčet pražských farmakologických a fyziologických pracovišť, která se na výzkumu „pražských“ analog oxytocinu a vasopresinu podílela. Do tohoto proudu byla zapojena i řada pražských klinických zařízení, především z oboru gynekologie a porodnictví. Zde patří zmínit **Ústav pro péči o matku a dítě** (Vladimír Brotánek, Stanislav Kazda, J. Hodr, Č. Jungmannová, J. Židovský) a **Gynekologicko-porodnická klinika fakulty dětského lékařství Univerzity Karlovy**, dnes Gynekologicko-porodnická klinika 2. LF UK a Fakultní nemocnice v Motole. V té době byl přednostou Alfréd Kotásek, po něm Miroslav Břešťák. Farmakologický a klinický výzkum byl také předmětem endokrinologické laboratoře **III. interní kliniky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze** pod vedením profesorů Vladimíra Holečka, Josefa Marka a Vratislava Schreiberu.

V roce 1968 započala spolupráce se švédskou firmou Ferring Läkemedel AB, Malmö. Pokračovala pak prodejem licence na dDAVP/Desmopressin (později i prodejem dalších patentů), čímž tato společnost získala právo vyrábět Desmopressin, Carbetocin/Pabal a Terlipressin v západní Evropě a USA. Firma Léčiva, n. p., jako součást trustu Spofa pak vyráběla v jednom ze svých závodů v Praze-Komořanech stejné peptidy pro státy východní Evropy a Sovětský svaz.

Pražský výzkum později změnil svůj charakter a orientoval se více na klinickou farmakologii. Řada chemicko-syntetických a farmakologických projektů se pak soustředila nejprve v Malmö, později v dalších pobočkách této rychle rostoucí a zvěšující se firmy ve světě. Pražský „Gründerzeit“ má zde svůj přirozený, přesto velmi úspěšný konec.

*Autoři jsou zavázáni díky paní Mgr. Olze Štajnrtové z Gynekologicko-porodnické kliniky 1. LF UK a VFN v Praze za pečlivé jazykové a věcné korektury rukopisu, zvláště pak za ověření a opravu citovaných údajů.*

#### LITERATURA

1. Starling E. H.: *Lancet* 2, 339 (1905).
2. Bayliss W. M., Starling E. H.: *J. Physiol.* 28, 325 (1902).
3. von Mering J., Minkowski O.: *Arch. Exp. Path. Pharm.* 26, 371 (1890).
4. Oliver G., Schäfer E. A.: *J. Physiol.* 18, 230 (1895).
5. Oliver G., Schäfer E. A.: *J. Physiol.* 18, 277 (1895).
6. Howell W. H.: *J. Exp. Med.* 3, 245 (1898).
7. Schäfer E. A., Vincent S.: *J. Physiol.* 25, 87 (1899).
8. Dale H. H.: *J. Physiol.* 34, 163 (1906).
9. Ott I., Scott J. C.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 8, 48 (1910).
10. Dudley H. W.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 14, 295 (1919).
11. Pliška V., Barth T.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 35, 1576 (1970).
12. Kamm O., Aldrich T. B., Grote I. W., Rowe L. W., Bugbee E. P.: *J. Am. Chem. Soc.* 50, 573 (1928).
13. Stehle R. L., Fraser A. M.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 55, 136 (1935).
14. Craig L. C.: *J. Biol. Chem.* 155, 519 (1944).
15. Livermore A. H., du Vigneaud V.: *J. Biol. Chem.* 180, 365 (1949).

<sup>n</sup> Poznámka k osobě Josepha H. Corta, jehož jméno se často objevuje mezi autory pražských publikací v 60. a 70. létech. Cort emigroval v 50. létech z USA, údajně před hrozbou žaloby ze strany komise McCarthyho, do Anglie a brzy poté nejprve do Polska a pak do Československa. Jako údajná oběť pronásledování komunistů na Západě byl oficiální Prahou vítán. (Nutno podotknout, že před kolegy v Praze používal zcela jiný, vůči komunismu satiricko-kritický postoj.) Jako absolvent Yale University se připojil k výzkumným pracím Josefa Rudingeru, s kterým se úzce přátelil. Mimo zmíněný ústav je v publikacích uváděn jako jeho pracoviště též Fyziologický ústav ČSAV v Krči (laboratoř biologie peptidů). Byl bezesporu nadaným experimentátorem, měl řadu originálních návrhů, hlavně se týkaly vlivu neurohypofyzárních hormonů na iontový metabolismus. O jeho morálním profilu, alespoň pokud šlo o vědu, existovaly již tehdy v zasvěcených kruzích značné pochyby. Mimo jiné byly výsledky jeho pokusů často nereprodukovatelné. V roce 1976 se vrátil do Spojených států, kde působil nejprve na Mount Sinai Medical Center v New Yorku, později ve firmě Vega Biotechnologies, Tucson (Arizona). Koncem roku 1982 veřejně přiznal, že jeden z analogů vasopresinu, který údajně farmakologicky testoval a na který mu byl udělen americký patent, ve skutečnosti nebyl nikdy syntetizován. O dalších jím deklarovaných podobných peptidech rovněž neexistují doklady, zda vůbec kdy syntetizovány byly. Tento vyslovený podvod okamžitě vzbudil veřejný skandál a zřejmě ukončil Cortovu kariéru (viz např. *New Scientist*, January 6, 1983, *New York Times*, December 27, 1982 atd.). Naštěstí nevrhla tato historie dlouhé stíny na práci pražských výzkumníků. Pokud víme, Cort si pak otevřel firmu ve Wiesbadenu, kde se pokoušel mimo jiné vyrábět také carbetocin.

16. Edman P.: Arch. Biochem. 22, 475 (1949).
17. du Vigneaud V., Ressler C., Trippett S.: J. Biol. Chem. 205, 949 (1953).
18. du Vigneaud V., Ressler C., Swan J. M., Roberts C. W., Katsoyannis P. G.: J. Am. Chem. Soc. 76, 3115 (1954).
19. Tuppy H.: Biochim. Biophys. Acta 11, 449 (1953).
20. Tuppy H., Michl H.: Monatsh. Chem. 84, 1011 (1953).
21. Sanger F., v knize: *Nobel lectures – chemistry 1942–1962. Including presentation speeches and laureates' biographies*, str. 544. Nobel Foundation by Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1964.
22. du Vigneaud V., v knize: *Nobel lectures – chemistry 1942–1962. Including presentation speeches and laureates' biographies*, str. 446. Nobel Foundation by Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1964.
23. Boissonnas R. A., Guttmann S., v knize: *Neurohypophysial Hormones and Similar Polypeptides* (B. Berde, ed.), kap. 2, str. 40. Springer Verlag, Berlin 1968.
24. Rudinger J., Honzl J., Zaoral M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 21, 202 (1956).
25. Honzl J., Rudinger J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 20, 1190 (1955).
26. Boissonnas R. A., Guttmann S., Jaquenoud P.-A., Waller J.-P.: Helv. Chim. Acta 28, 1491 (1955).
27. Law, H. D., du Vigneaud V.: J. Am. Chem. Soc. 82, 4579 (1960).
28. Berde B., v knize: *Neurohypophysial Hormones and Similar Polypeptides* (B. Berde, ed.), kap. 16, str. 802. Springer Verlag, Berlin 1968.
29. Jošt K., v knize: *Handbook of Neurohypophysial Hormone Analogs*, Vol. II/2 (K. Jošt, M. Lebl, F. Brtník ed.), str. 94. CRC Press, Inc., Boca Raton (FL) 1987.
30. Altura B. M.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 198, 187 (1976).
31. Zaoral M., Kolc J., Šorm F.: Collect. Czech. Chem. Commun. 32, 1250 (1967).
32. Tuppy H., Nesvadba H.: Monatsh. Chem. 88, 977 (1957).
33. Chang T.-S.: Int. J. Mol. Sci. 10, 2440 (2009).
34. Walter R., Havran R. T., Schwartz I. L.: J. Med. Chem. 19, 328 (1976).
35. Walter R., Schlank H., Glass J. D., Schwartz I. L., Kerenyi T. D.: Science 173, 827 (1971).
36. van Wimersma Greidanus T. B., Van Ree J. M., v knize: *Behavioral Aspects of Neuroendocrinology* (D. Ganten, D. Pfaff, ed.), kap. 3, str. 61. Springer Verlag, Berlin 1990.
37. Rudinger J., Jošt K.: Experientia 20, 570 (1964).
38. Pliška V., Rudinger J., Douša T., Cort J. H.: Am. J. Physiol. 215, 916 (1968).
39. Pliška V., Jutz G., Beck S., v knize: *PEPTIDES: Structure and Function. Proceedings of the Ninth American Peptide Symposium* (C. M. Deber, V. J. Hruby, K. D. Kopple, ed.), str. 603. Pierce Chemical Company, Tucson (AR) 1985.
40. Beránková-Ksandrová Z., Bisset G. W., Jošt K., Krejčí I., Pliška V., Rudinger J., Rychlík I., Šorm F.: Brit. J. Pharmacol. 26, 615 (1966).
41. Kynčl J., Řežábek K., Kasářík E., Pliška V., Rudinger J.: Eur. J. Pharmacol. 28, 294 (1974).
42. Jošt K., Rudinger J., Šorm F.: Collect. Czech. Chem. Commun. 26, 2496 (1961).
43. Beránková Z., Rychlík I., Jošt K., Rudinger J., Šorm F.: Coll. Czech. Chem. Commun. 26, 2673 (1961).
44. Krejčí I., Kupková B., Rudinger J.: Brit. J. Pharmacol. 30, 506 (1967).
45. Rudinger J., Krejčí I., v knize: *Neurohypophysial Hormones and Similar Polypeptides* (B. Berde, ed.), kap. 15, str. 748. Springer Verlag, Berlin 1968.
46. Rudinger J., Pliška V., Krejčí I.: Recent Prog. Horm. Res. 28, 131 (1972).
47. Manning M., Misicka A., Olma A., Bankowski K., Stoev S., Chini B., Durroux T., Mouillac B., Corbani M., Guillon G.: J. Neuroendocrinol. 24, 609 (2012).
48. Jones J.: J. Pept. Sci. 10, 393 (2004).
49. Wieland T., Bodanszky M.: *The World of Peptides. A Brief History of Peptide Chemistry*, str. 156. Springer Verlag, Berlin 1991.
50. Thorn N. A., Niels A., v knize: *Neurohypophysial Hormones and Similar Polypeptides* (B. Berde, ed.), kap. 7, str. 372. Springer Verlag, Berlin 1968.
51. Frič I., Kodíček M., Jošt K., Bláha K.: Collect. Czech. Chem. Commun. 39, 1271 (1974).

V. Pliška<sup>a</sup>, A. Pařízek<sup>b</sup>, and M. Flegel<sup>c</sup> (<sup>a</sup> *Collegium Helveticum, Swiss Federal Institute of Technology, Zürich & The University of Zürich, Zürich, Switzerland*, <sup>b</sup> *Gynecology and Obstetrics Department, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague*, <sup>c</sup> *Department of Chemistry of Natural Compounds, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic*): **Oxytocin and Further Uterotonic Peptide Agents: Their Early Research in Prague**

Amino acid sequence of oxytocin, identified already in 1906 as the uterotonic component of neurohypophysial extracts, was established in 1953 by Vincent du Vigneaud in New York and Hans Tuppy in Vienna. Its structure was verified by the total synthesis one year after in the du Vigneaud laboratory. In the following years, simplified synthetic strategies elaborated in a number of laboratories worldwide enabled structural modifications of individual sites in the peptide chain, aiming at a detailed elucidation of their influence upon pharmacologic features of oxytocin. Frequently, these peptide analogues opened the way to new, clinically useful drugs. The research on vasopressin, the other main peptide hormone of posterior pituitary, underwent a similar development.

Among the first who elaborated a more flexible alternative to du Vigneaud protocol was the peptide group at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechoslovak Academy of Sciences (ÚOCHB) in Prague, chaired by Josef Rudinger. Its research activities were broadly supported – sometimes even enabled – by Fran-

tišek Šorm, director of the Institute. This opened a way to an easier synthesis of oxytocin analogues. Design strategy in Prague was focused on oxytocin analogues with an enhanced metabolic stability (prolongation of half-life *in vivo*), and on analogues acting as inhibitors to its uterotonic/galactobolic response. In the former case, design strategy has originated from studies of enzymatic stability of oxytocin, accomplished in the biochemical laboratories at the ÚOCHB, or reported in earlier communications. Dose-response and time-response behaviour of analogues in which potential sites of enzymatic attacks were replaced by resistant sequences, and modified peptides investigated in a number of *in situ* and/or *ex vivo* pharmacological experiments. Of particular interest were analogues in which one or both sulphur atoms in the –S–S– bridge were replaced by the methylene group (–CH<sub>2</sub>–), the so-called carba-analogues. Individual analogues of this series possessed, in various degrees, biological activities of oxytocin but not a prolongation of their responses in pharmacological models or in their physiological clearance. Thus, the carba analogues document, firstly, that the integrity of the disulfide bridge is not a necessary condition of oxytocin (or vasopressin) activity, and secondly, that the –S–S– bridge is not the rate determining site of neurohypophyseal hormone inactivation *in vivo*. In an attempt to prolong the action of oxytocin, its *N*- $\alpha$ -group was acylated by an additional amino acid or a short peptide, in expectation that such analogues would act as prohormones: splitting of additional substituent by tissue aminopeptidases would *in vivo* produce “free” oxytocin (therapeutically, the ana-

logues would act as oxytocin depots). A number of *in vivo* experiments verified this “hormonogen” model and brought forth some clinically interesting substances; some of them are in use until now. In the latter case, the search for structural modifications potentially leading to antagonism indeed brought some new antagonists but, in particular, contributed to the notion of continuous change from “full” agonism via partial agonism to antagonism, according to the tissue conditions. Such a change could have been achieved for uterotonic response of several analogues by changing calcium and magnesium concentrations in the tissue medium.

Ideas originated by Rudinger’s group brought about several clinically useful peptides like Carbetocin, Atosiban, Glypressin, Terlipressin. Very successful was the Prague vasopressin analogue dDAVP (Desmopressin) licensed to the Swedish pharmaceutical company Ferring Läkemedel AB.

Josef Rudinger left Czechoslovakia in 1968 and became a professor of molecular biology at the Swiss Federal Institute of Technology (ETH). He passed away, 51 years old, in 1975.

Full text English translation is available in the on-line version.

Keywords: oxytocin, vasopressin, neurohypophysis, endocrinology – neurohypophysial hormones, I. P. Pavlov, secretin, carbetocin, dDAVP, deamino-D-arginine vasopressin, desmopressin, atosiban, František Šorm, Josef Rudinger

## OXYTOCIN AND OTHER PEPTIDE UTEROTONICS: THEIR PRAGUE FATES

VLADIMÍR PLISKA<sup>a</sup>, ANTONÍN PAŘÍZEK<sup>b</sup>,  
and MARTIN FLEGEL<sup>c</sup>

<sup>a</sup> *Collegium Helveticum, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich & Universität Zürich, Schmelzbergstrasse 25, CH-8092 Zürich,*

<sup>b</sup> *Department of Obstetrics and Gynecology, 1st Faculty of Medicine of Charles University and General University Hospital in Prague, Apolinářská 18, CZ-128 51 Prague 2,*

<sup>c</sup> *Department of Natural Chemistry, Faculty of Food and Biochemical Technology, VŠCHT, Technická 5, CZ-166 28 Prague 6*

*vladimir.pliska@biol.ethz.ch, martin.flegel@vscht.cz, parizek@porodnice.cz*

Received 26.2.19, accepted 15.8.19.

**Keywords:** oxytocin, vasopressin, neurohypophysis, endocrinology – neurohypophysial hormones, I. P. Pavlov, secretin, carbetocin, dDAVP, deamino-D-arginine vasopressin, desmopressin, atosiban, František Šorm, Josef Rudinger

### Historical note: Neurohypophysial hormones and the origins of endocrinology

Endocrinology as an autonomous branch of biomedicine was established at the turn of the 19th and 20th centuries, predominantly thanks to British physiologists. The name *hormone* was used first by physiologist Ernest Henry Starling (1866–1927)<sup>1</sup> in the Croonian Lecture to the Royal College of Physicians of London in June 1905. He used the denotation “hormone” for substances produced by secretory tissue and transported via the bloodstream to their target tissue, where they induce functional changes<sup>a</sup>. Starling demonstrated this definition on experiments with

pancreatic secretion, which he and another eminent London physiologist, William Maddock Bayliss (1860–1924)<sup>2</sup>, published in 1902. They proved that the pancreatic secretion induced by stimulating the small intestine (duodenum) with hydrochloric acid occurred even after complete denervation of the intestine. Furthermore, they found that intravenously administered extracts of the intestinal tissue incised after stimulation induce the same pancreatic response as the acid stimulation or the postprandial stimulation of the duodenum with food. This first accurate description of humoral regulation, as an alternative to a neural one, was of much broader significance in subsequent investigations of manifold physiological processes. A hypothetical, but already partially pre-purified stimulating substance was denoted as “secretin”. Thus, secretin has been referred to in the literature as the first demonstrated hormone<sup>b</sup>.

Not quite rightly, indeed. The biological effects of substances, later identified as hormones according to Starling’s and Bayliss’ definition, were already known. In 1888, Oskar Minkowski (1858–1931) and Josef (Joseph) Freiherr von Mering (1849–1908) described glycosuria in dogs after removal of the pancreas<sup>3</sup>, thus opening the way for the later identification and isolation of insulin. A few years later, in 1895, physiological effects of extracts from the adrenal glands, thyroid, spleen and pituitary<sup>4,5</sup> were studied in the context of the then popular organotherapy<sup>c</sup> by the London clinician George Oliver (1841–1915) and the physiologist Edward Albert Schäfer (Sir Edward Albert Sharpley-Schafer, 1850–1935), later Professor of Physiology at the University of Edinburgh. In the case of pituitary and adrenal extracts, they were particularly interested in the increase of arterial pressure as a consequence of the primary effect – the vasoconstriction. William Harry Howell (1860–1945)<sup>6</sup>, professor of physiology at Johns Hopkins University, E. A. Schäfer and (Thomas) Swale Vincent<sup>d</sup> (1868–1933)<sup>7</sup> then located the posterior lobe as the site of occurrence of these active constituents (1898–1899). Considering this, one can say that Oliver, Schäfer,

<sup>a</sup> Quote in *Lancet*<sup>1</sup> (p. 340) “...These chemical messengers [...] or ‘hormones’ (from ὁρμάω, I excite or arouse), as we might call them, have to be carried from the organ where they are produced to the organ which they affect by means of the blood stream ...”.

<sup>b</sup> Bayliss and Starling come in this communication to conclusions opposite from Ivan Petrovich Pavlov (1849–1936), who declared the direct and exclusive role of the nerve impulses and the presence of chyme in the duodenum in pancreatic secretion. They discuss his findings critically and point to the existence of humoral regulation. Pavlov’s paper (Nobel Prize in Physiology or Medicine in 1904, two years after the publication of their results) is cited by the authors with considerable, fully collegial respect and appreciation. However, they title the relevant chapter in their publication with a question mark: *VII. The normal mechanism, chemical or nervous?*

<sup>c</sup> Organotherapy referred to the use of tissue extracts for therapeutic purposes.

<sup>d</sup> British physiologist, later professor of physiology (University of Manitoba in Winnipeg, Canada).

Howell and Vincent were the first who introduced biochemical and pharmacological methods into endocrinological research; endocrine functions of individual organs and tissues had hitherto been studied by their surgical removal. The hormones produced by the neurohypophysis, oxytocin and vasopressin (later also referred to as antidiuretic hormone – AHD), thus became important in the history of endocrinology.

The uterotonic effect of pituitary extracts was first described in 1906 by the London biochemist Sir Henry Hallett Dale (1875–1968)<sup>8</sup>, the galactobolic effect by Isaac Ott (1847–1916) and John C. Scott<sup>9</sup> of the Medico-Chirurgical College in Philadelphia. Harold Ward Dudley (1887–1935), National Institute for Medical Research in London, attempted to demonstrate the peptide nature of the uterotonic component of neurohypophysis extracts by incubating them with proteolytic enzymes<sup>10</sup>. He ascribed a rapid decrease of their uterotonic activity to their cleavage by trypsin. However, this was rather a right-for-the-wrong-reason conclusion as later measurements confirmed that oxytocin is not cleavable by enzymatically pure trypsin. Since pure enzyme preparations were still mostly unavailable in the 1920s, Dudley used in his experiments the Pancreatin from the Merck company, an extract of pancreatic enzymes from various animal species. Dudley's results could be explained by the enzymatically atypical cleavage of oxytocin between the two terminal amino acids (leucine at position 8 and glycynamide at position 9) by chymotrypsin<sup>11</sup>; chymotrypsin was almost certainly present in Pancreatin. In any case, Dudley was the first to demonstrate that oxytocin belongs to the group of protein-like substances.

This pioneering epoch is rounded off by the painstaking work of researchers from the laboratories of Parke, Davis and Co. in Detroit, MI. Here, in 1928, Oliver Kamm and co-workers<sup>12</sup> separated by an elaborate procedure (repeated precipitation, desalting and extraction into organic solvents) neurohypophysial extracts into two fractions – one showing predominantly uterotonic and the other more vasoconstrictive activity. They further estimated (from the diffusion rate) the molecular weight of the assumed uterotonic substance to be 600 Da (the molecular weight of oxytocin was confirmed later to be 1007 Da), and suggested that the vasoconstrictor component also exhibited antidiuretic activity. R. M. Stehle and A. L. Fraser<sup>13</sup> reached even higher purity of both fractions in the mid-1930s. Using counter-current separation in a water/2-butanol system (a technique introduced by

Lyman C. Craig in 1944, cit.<sup>14</sup>) Arthur H. Livermore and Vincent du Vigneaud<sup>15</sup> obtained a pure substance with high uterotonic activity. This preparation was then used in the early 1950s by du Vigneaud (1901–1978) and his co-workers to determine the amino acid sequence of oxytocin by the so-called Edman degradation<sup>16</sup>, and as a standard in the synthesis of oxytocin<sup>17,18</sup>.

Du Vigneaud and his large team of collaborators from Cornell University Medical College (Ithaca, NY) is credited with the first chemical synthesis of vasopressin and oxytocin. This work was soon awarded the Nobel Prize in Chemistry to du Vigneaud (1955). The Nobel Committee's Laudatio rightly describes his merits – and those of his collaborators: "... for his work on biochemically important sulphur compounds, especially for the first synthesis of a polypeptide hormone..." However, as far as the determination of the oxytocin structure is concerned, the young Austrian biochemist Hans Tuppy (\*1924), together with his then collaborator Heribert Michl, achieved the same almost in parallel with du Vigneaud under much more modest technical and financial conditions than what du Vigneaud's group had at their disposal. They determined the amino acid sequence of oxytocin in a less pure oxytocin preparation by chromatographic techniques<sup>19,20</sup>.<sup>e</sup> The credit for the determination of the primary structure of oxytocin, a unique scientific accomplishment in its time, does therefore not belong exclusively to du Vigneaud, but also to H. Tuppy. In his Nobel Prize Lecture, du Vigneaud downplayed this fact<sup>22, f</sup>.

In the following years, several laboratories published alternative methods for the synthesis of oxytocin; contemporary synthetic schemes were summarized in illustrative diagrams by R. A. Boissonas and St. Guttman (Sandoz A. G., Basel)<sup>23</sup>. One of them was an elegant synthesis worked out in 1956 at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czechoslovak Academy of Sciences (IOCB) by Josef Rudinger (1924–1975) and his collaborators Jan Honzl and Milan Zaoral<sup>24,25</sup>. Compared to du Vigneaud's procedure, this "Prague method", as well as the synthesis of oxytocin from the Sandoz laboratories (R. A. Boissonas and co.<sup>26</sup>), proved to be methodologically advantageous and more practical for the user. The "building block" procedure, the so-called "triplet" scheme (Fig. 1), residing in the coupling of shorter peptides instead of single amino acids, was utilised by numerous other authors in the following years as an alternative to du Vigneaud's rather demanding procedure. The synthesis of structural analogues of was thus greatly accelerated and

<sup>e</sup> Hans Tuppy already possessed in this field not only experience, but also significant results: in 1949, during a one-year fellowship in F. Sanger's laboratory in Cambridge, he determined the structure of the B-chain of insulin. Frederick Sanger highlighted his substantial contribution to the structure of insulin with appreciation in his first Nobel lecture<sup>21</sup> (Chemistry Prize 1958): "... the work on fraction B progressed so favourably and Tuppy worked so hard that by the end of the year we were virtually able to deduce the whole of the sequence of its 30 residues."

<sup>f</sup> "It is of considerable interest that Tuppy, on the basis of data we had published along with some data of his own, arrived at the same structure independently. Tuppy's proposal was based on the data from our laboratory on composition, molecular weight, terminal groups, as worked out by our use of the Sanger dinitrophenyl end group procedure ..." <sup>22</sup>

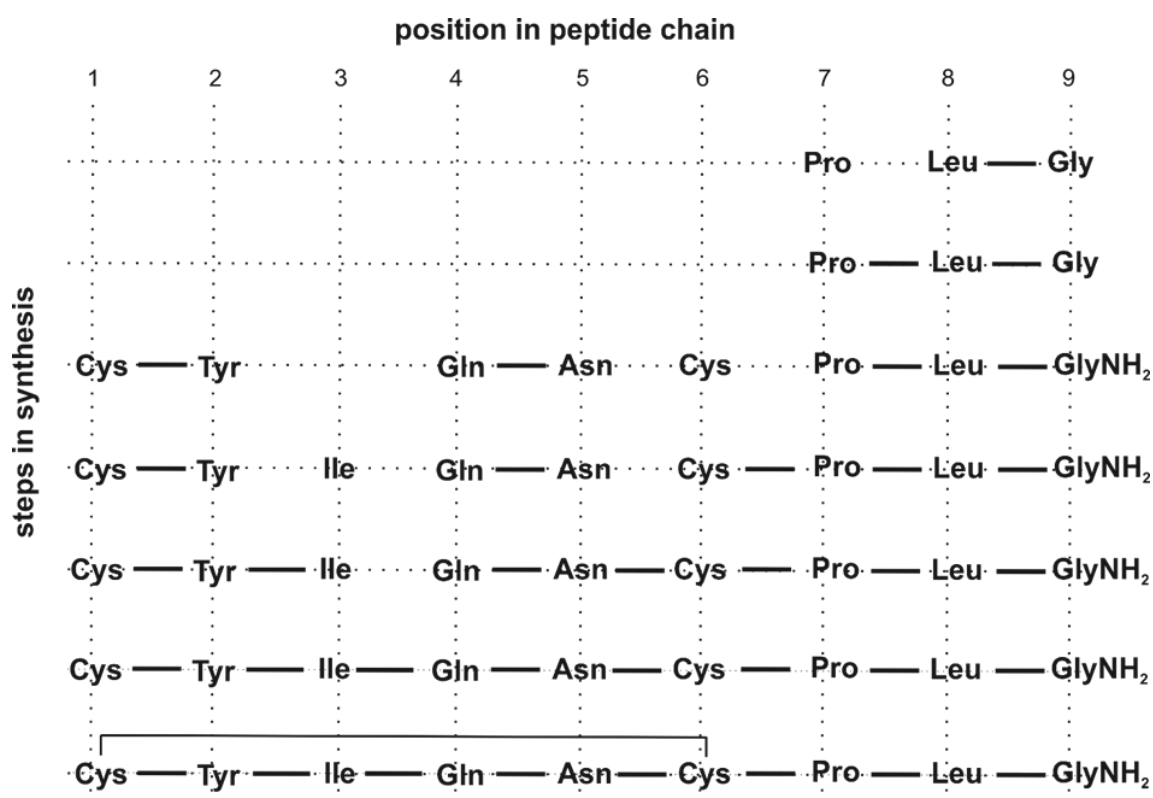


Fig. 1. The oxytocin synthesis procedure used by Josef Rudinger's group in 1954. Indicated in the individual synthesis steps (vertical axis) are the sequential interconnections of the individual components in a given step (amino acids and peptides from the preceding step). The penultimate stage is "linear" oxytocin with cysteine at positions 1 and 6; its oxidation (closing the disulfide bridge) yields the active oxytocin. The protecting groups in each stage are not shown; they are illustrated in the diagram in ref.<sup>23</sup>

facilitated studies of the relationship between the structure of neurohypophysial peptides and their biological activities.

In the period after the publication of the first syntheses of oxytocin and vasopressin, their designers were mainly focused on isolated changes in the structure of individual positions of the peptide chain. Combinations of amino acids in a single peptide chain later led to the preparation of clinically remarkable drugs.

### Structural analogues of neurohypophysial peptides and pharmacological strategies

The Prague "building block" synthesis of oxytocin and structurally altered molecules of oxytocin "in solution" is occasionally used in industrial production even today. However, the development of the "solid-phase" synthesis by Bruce R. Merrifield (1921–2006), awarded with the Nobel Prize in Chemistry in 1984, is nowadays the preferred method for the synthesis and manufacturing of peptide drugs. Thanks to it, the synthesis itself ceased to be the most important problem in the peptide drug design. Rather, the problem of the strategy for choosing suitable

novel analogues moved into the field of pharmacology and biochemistry. In studying the structure-activity relationships (SAR) of neurohypophysial peptides, different research laboratories focused on different objectives in the following "pioneering" years.

#### 1. Influence of individual functional groups or bonds in the peptide chain

Du Vigneaud's group used mainly a "trial-and-error" approach. The aim was to determine the role of individual functional groups or bonds in a peptide in its biological activities by modifying or omitting them. In this way, the first interesting analogues were obtained – for example, 2-*O*-methyltyrosine-oxytocin<sup>27</sup> and 2-*D*-tyrosine-oxytocin (substitution of the enantiomer of *L*-tyrosine for the *D*-form). Above all, this provided the firm basis for further rational procedures for SAR analysis.

#### 2. Biological activity of individual analogues

Another objective was to study the spectra of biological activities of individual analogues. Typically, neurohypophysial peptides exhibit a pluripotent activity. They

exhibit uterotonic, galactobolic, vasopressor and antidiuretic effects (and other, rather pharmacologically interesting effects) in different proportions. A shift of activities in favour of one of them is often clinically desirable.

Two examples:

1) Vasopressin analogues with an increased vasopressor/antidiuretic ratio were synthesized by R. A. Boissonnas, W. Doerpfner, St. Guttman, K. Saameli and E. Stürmer in the research laboratories of Sandoz in Basel<sup>28,29</sup>. Clinical use found one of them, 2-phenyl-alanine-8-lysine-vasopressin (Octapressin®), displaying the vasopressor/antidiuretic activity ratio 2.5<sup>§</sup>: in combination with local anaesthetics it caused a local vasoconstriction, thus prolonging the anaesthetic effect at lower requirement of anaesthetics. Other analogues of this kind, 8-ornithine-vasopressin (Ornipressin), or its analogue (2-phenylalanine-8-ornithine)-vasopressin (activity ratio 4.0), were proposed for the adjustment of hemodynamics in emergency medi-

cine, particularly in the haemorrhagic shock. These substances, in comparison with vasoactive amines, were significantly more advantageous<sup>30</sup>.

2) Among the clinically used analogues of this kind, the most successful was the vasopressin analogue of the Prague group, 1-deamino-8-D-arginine-vasopressin (DDAVP, Desmopressin, Minirin), synthesized in the laboratories of IOCB (Milan Zaoral and Jaroslav Kolc)<sup>31</sup>. Extremely increased antidiuretic activity with minimal vasopressor activity predestined it to be the almost exclusive drug in a replacement therapy of *diabetes insipidus*. Later, it was accidentally discovered that this analogue increases the level of coagulation factor VIII in blood plasma, and the peptide has also been used as a haemostatic agent during minor surgical (e.g., dental) interventions in persons with a milder form of haemophilia and persons prone to haemorrhagic diathesis.

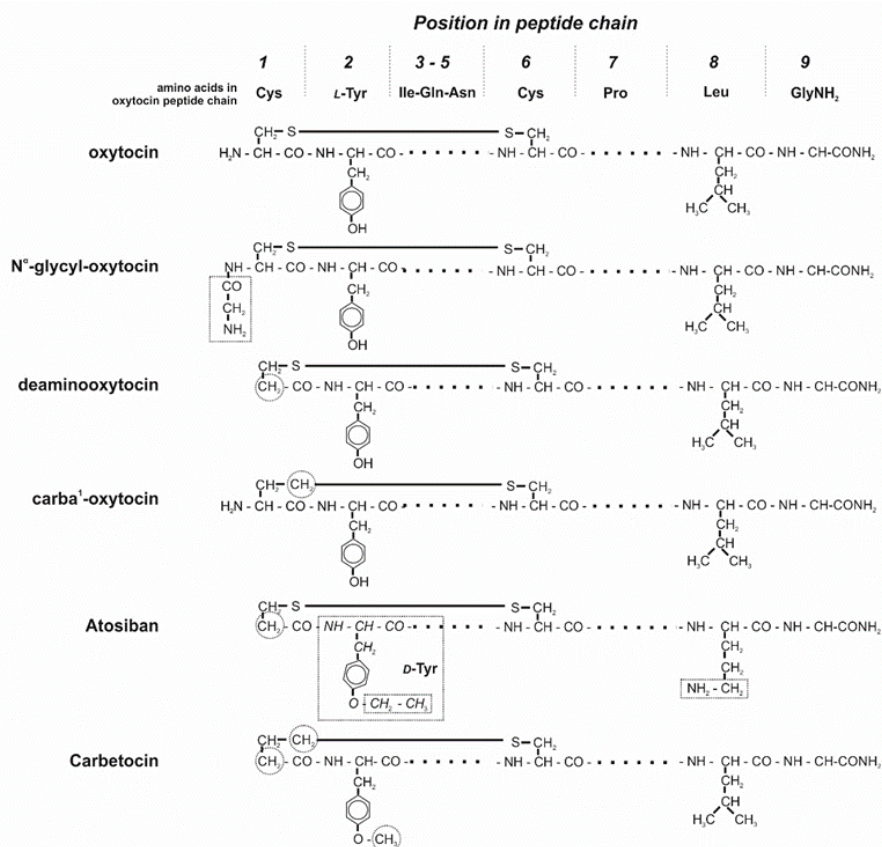


Fig. 2. Modified positions in the oxytocin molecule potentially leading to prolonged biological activities; schematic representation. The sequence of oxytocin is shown in the top row; in schemes of analogues a thick dotted line indicates unmodified positions, a thin dashed line (circles and quadrilaterals) indicates altered positions

<sup>§</sup> Rat assay. The activity ratio for arginine-vasopressin (standard) is 1.0.

### 3. Metabolic stability of neurohypophysial hormones

The specific aim of the biochemistry group at the IOCB was the metabolic stability (inactivation and clearance) of neurohypophysial hormones in relation to their enzymatic degradation *in vivo*. This aim led the chemists to synthesize analogues with modified sites of potential enzyme attack in the native hormone molecules and resulted in several very remarkable analogues (Figure 2).

First, an attempt was made to protect the peptide bond at the N-terminus of the peptide, i.e., between the terminal cysteine and the following tyrosine, against enzymatic cleavage. As early as in the 1950s, Tuppy and Nesvadba<sup>32</sup> found that oxytocin is inactivated during pregnancy by cleavage at this position by an enzyme of aminopeptidase nature; this enzyme was later termed serum (or pregnancy) oxytocinase. Under the partially confirmed assumption that aminopeptidases cannot cleave this bond unless the amino group is present, du Vigneaud's group synthesized a fully active 1-deaminoxytocin. It was later found, again in the laboratories of the IOCB, that all oxytocin and vasopressin analogues with an omitted or modified amino group indeed exhibit prolonged effects. A similar strategy was used for other conceivable enzyme cleavage sites, or *vice versa*, for answering the question whether prospective modifications of such sites in the peptide structure lead to a prolonged action, and hence to the identification of additional inactivating enzymes. As an example, it could be demonstrated that tyrosinase<sup>33,h</sup>, another potential inactivating enzyme of neurohypophysial peptides, is without significant effect on the inactivation kinetics: alkylation of the hydroxyl group on the second amino acid of oxytocin or vasopressin does not significantly increase the length of action. Protective interference at the carboxyl or carboxamide end of the chain does not markedly affect the kinetics of biological effects, although pharmacologists at Mount Sinai University in New York described<sup>34,35,i</sup> the existence of cleaving enzymes at the C-terminus of oxytocin.

The disulfide bridge between the two-cysteine side chains in positions 1 and 6 maintains the active cyclic conformation of the oxytocin molecule and, with the exception of the aforementioned serum oxytocinase, probably also resistance to aminopeptidases. Reduction or removal of the disulfide bridge leads to an almost inactive "linear" oxytocin. There does not seem to exist a specific reductase of the oxytocin disulfide bridge that would lead to inactivation of this hormone, although it has long been sought in

the biochemical laboratories at the IOCB. J. Rudinger and K. Jošt proposed a unique proof of the role of the disulfide bridge in the activity and inactivation of oxytocin. It consists in the replacement of one or both sulphur atoms with a non-reducible "isosteric" methylene group (-CH<sub>2</sub>-) of approximately the same molecular volume as the sulphur atom (Fig. 2). This led to remarkable compounds with biological activities of the order of the native molecule. They are now known in chemical and pharmacological nomenclature under the name "carba"-oxytocins<sup>37</sup>. Surprisingly, however, they do not exhibit particularly prolonged effects, so that the physiological significance of the inactivation of neurohypophysial peptides by reduction of the disulfide bridge could at least be questioned<sup>38</sup>.

As mentioned above, synthesis of potentially "protected" analogues also enabled a reverse strategy, by using them as the so-called enzyme probes for the analysis of pharmacokinetic processes near the corresponding receptors in the so-called receptor compartment<sup>39</sup>. The results, briefly summarized, indicate that the stability of the peptide, and thus the half-life of its effect, is mainly related to the structure of the amino terminal end. Thus, the critical inactivating enzyme is an aminopeptidase of the oxytocinase type<sup>32</sup>. The desire to prolong the action, especially for clinical use, led to the synthesis of another important group of oxytocin and vasopressin analogues, the so-called "synthetic" hormonogens, in which an additional amino acid or short peptide<sup>40,41</sup> was attached to the N-terminal amino group (Fig. 2). It was assumed that in molecules such modified would *in vivo* be the additional group in a first step enzymatically split off by aminopeptidases, followed by release of the active hormone. Pharmacological and immunological evidence has fully confirmed this assumption for oxytocin and lysine-vasopressin hormonogens. Two particularly illustrative examples – time profiles of the antidiuretic and vasopressor effects of lysine-vasopressin analogues – are presented in Fig. 3. Owing to its vasoconstrictor/haemostatic effect<sup>j</sup>, one of them, 1-*N*- $\alpha$ -triglycyl-8-lysine-vasopressin (TGLVP, Terlipressin, Glypressin), was used in clinics as an acute agent in bleeding conditions, especially in oesophageal variceal bleedings. Even though there are several reports in the literature on similar oxytocin analogues, especially 1-*N*- $\alpha$ -triglycyl-oxytocin and 1-*N*- $\alpha$ -leucyl-glycyl-oxytocin, they have not gained much attention in gynaecological and obstetric practice. The advantages compared to oxytocin do not seem to be substantial.

<sup>h</sup> Oxytyrosinase: an enzyme catalysing the oxidation of tyrosine in the *ortho*-position to the hydroxyl group into quinones. (It can be assumed that the oxytocin molecule thus modified is biologically inactive).

<sup>i</sup> Peptides formed by cleavage of the terminal glycinamide by the enzymes mentioned above (carboxamidopeptidases) – in particular desglycinamide-8-lysine-vasopressin – can have numerous effects on various brain centres<sup>36</sup>. For many years, David de Wied (1925–2004) and his collaborators (especially B. Bohus, T. B. van Wimersma Greidanus) at the University of Utrecht (Rudolf Magnus Institute) have been working on these. However, such effects are secondary; their regulatory physiological function is not well documented.

<sup>j</sup> According to unverified reports, it was of interest to the ambulance services of certain armies, as an acute anti-shock agent. Tested, but not applied, was also the use of Terlipressin as a contraceptive in the first trimester of pregnancy.



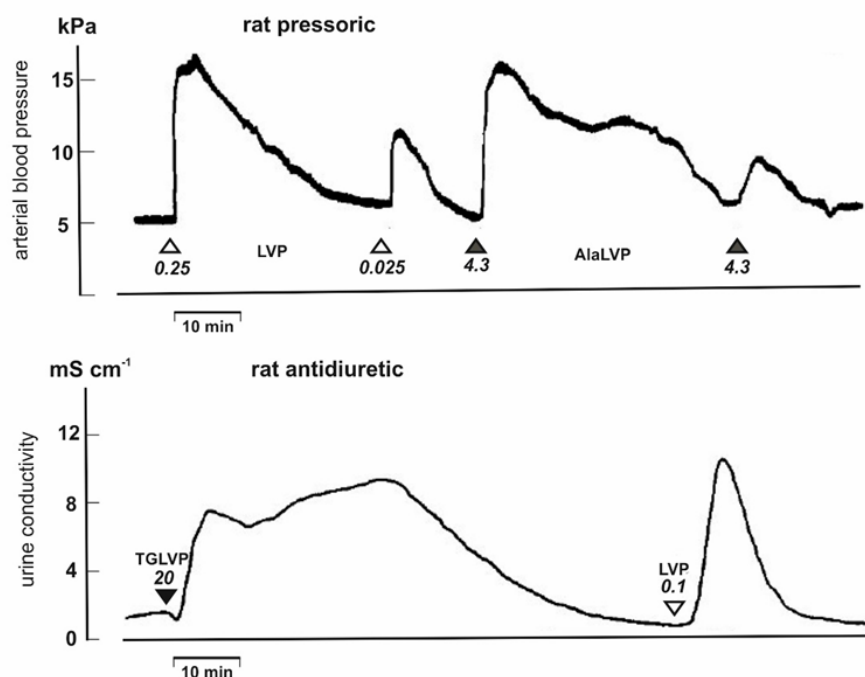


Fig. 3. **Prolonged effect of synthetic vasopressin analogues.** Top: vasopressor effect of 1-*N*- $\alpha$ -triglycyl-8-lysine-vasopressin (TGLVP) on rat (blood pressure in *arteria carotis*, kPa: kilopascal,). Lower part: antidiuretic effect of TGLVP on hydrated rat under alcoholic anaesthesia (state of water diuresis); ordinate: conductivity of continuously emptied urine (mS/cm). The TGLVP profile shows the intrinsic antidiuretic effect of the analogue (first peak) and of gradually released LVP (second peak). White triangles: lysine vasopressin (LVP), dark: TGLVP. From<sup>41</sup>. The numbers next to the triangles indicate the dose (in nmoles) of the respective substance injected into the cannulated femoral vein.

#### 4. Inhibition of biological activities of neurohypophysial hormones

Research on structural analogues acting as inhibitors of neurohypophysial hormone activities dates back to the rather accidental finding that 2-*O*-methyltyrosine-oxytocin inhibits the vasopressor effect of 8-arginine-vasopressin in rats. Law and du Vigneaud<sup>27</sup> were the first to publish the synthesis of this analogue in 1960. This was shortly before the publication of the same substance in the laboratories of the IOCB<sup>42</sup>. The two groups worked on the synthesis independently and almost simultaneously, the time difference between the two publications was very short. The Prague group nevertheless lost the primacy hand in this case<sup>k</sup>. Soon afterwards, however, biochemists from IOCB published a more systematic study dealing with inhibition of

the uterotonic response to oxytocin by this and other analogues modified at amino acid positions 2, 3 and 4 (cit.<sup>43</sup>, Fig. 2). The discoveries described therein confirm that this type of structural modification had previously been a focus of interest at the IOCB. Inhibition studies of these analogues were then carried out at various research institutes, in collaboration with the IOCB groups. They concern a pharmacologically significant phenomenon, namely the change of antagonism into partial and full agonism by changing the experimental conditions<sup>44</sup>. To date, the relationships between the structure of the analogues and their inhibitory properties are subject of studies in numerous laboratories worldwide; at the turn of the sixties and seventies J. Rudinger summarized the results of previous studies in several reviews<sup>45,46</sup>. Maurice Manning (University of Toledo College of Medicine) and his

<sup>k</sup> One of the authors of this communication (V. P.) remembers that Josef Rudinger, immediately after the publication of the synthesis by the group of du Vigneaud, pointed out that the primacy did not matter – the main thing was the analogue had been synthesized. This is a convincing example of J. Rudinger's high scientific ethics.

collaborators from various laboratories<sup>47</sup> have recently published a review of recent studies pointing to a possible therapeutic use of inhibitory properties in clinics.

## 5. Analogues with combinations of changes at different positions of the peptide chain

The period of isolated variations leading to already known changes in biological activities was followed, from about the 1970s, by syntheses of analogues with combinations of changes at different positions of the peptide chain. The motivation was primarily the possibility of using such analogues as clinically useful pharmaceuticals.

Two comments on this: first, the accumulation of structural changes in individual analogues does not generally lead to an overlapping of biological properties associated with them in the resulting molecule. Despite of it, the synthesis of such combined peptides led to a number of remarkable drugs. In the case of oxytocin, these drugs are known as carbetocin (Duratocin<sup>®</sup>/Pabal<sup>®</sup>) and atosiban (Tractocile<sup>®</sup> and other trademarks), which are now widely clinically used in obstetrics.

Note two, a pharmacologically characterized biological phenomenon may not manifest itself equally in a clinical situation. This can be demonstrated with the pharmacokinetic properties of specific substances, where the half-lives of effects observed in *in vivo* pharmacological experiments differ from clinical observations. A therapeutically utilised vasopressin analogue, 1-deamino-8-D-arginine-vasopressin (Desmopressin, DDAVP), showed only a slightly prolonged half-life in the antidiuretic test when administered at equipotent doses corresponding to 8-arginine-vasopressin (most likely due to the deletion of the amino group at the N-terminus), but an almost dramatically prolonged effect when administered intranasally to patients with *diabetes insipidus*. However, this may also be due to the formation of depot forms, for example by binding of the peptide in large doses to protein carriers and its slow gradual release. A similar effect was observed with carbetocin, 1-deamino-carba<sup>1</sup>-2-*O*-methyltyrosine-oxytocin. As already mentioned, a substitution of the -S-atom by the -CH<sub>2</sub>- group alone does not prolong the half-life of oxytocin, but in clinical conditions it shows a markedly prolonged effect. Compared to oxytocin, it induces a stronger and more prolonged retraction of the myometrium during delivery of the human placenta, i.e., in the third stage of labour. It is therefore used therapeutically for prevention of the life-threatening peripartum haemorrhage in postpartum hypotonia and/or atony of the uterine smooth muscle.



Fig. 4. Josef Rudinger and František Šorm (seated), 1st European Peptide Symposium, Prague 1958. The photograph probably originates from the archive of one of the participants, Prof. Dr. Max Brenner (Basel); it is reproduced here with the consent of Prof. Dr. Alex N. Eberle (Basel).

## Two protagonists in research neurohypophysial peptides in Prague

From the mid-1950s to the end of the 1960s, Czech research on the two hormones of the neurohypophysis was inseparably linked with the personalities of Josef Rudinger and František Šorm (1913–1980) (Figure 4). The former was, from the beginning of his academic career, a world-renowned peptide chemist. J. Rudinger was by nature a constructive theoretician rather than an experimenter. In addition, due to his extraordinary linguistic talents, he was capable to readily summarize the views of experts in different fields and readily formulate scientific conclusions from them. This made him a welcome guest at various scientific meetings. He was the first to come up with the idea of an innovative synthesis of oxytocin at the IOCB. However, since his father was sentenced by dubious courts in the early years of the communist dictatorship to a long prison term in the early 1950s, he would scarcely have been given a chance to implement his ideas. This was only possible thanks to the unequivocal support of the second appointee, Professor František Šorm, then Director of the IOCB and later President of the Czechoslovak Academy of Sciences.

A few words about F. Šorm. He was (perhaps?) a convinced communist, a member of the Central Commit-

<sup>1</sup> To date, they are organised through the European Peptide Society in even-numbered years to be held alternately in different European countries.

tee of the Communist Party of Czechoslovakia, during the communist regime a member of the National Assembly. In the totalitarian state of that time, he was a firmly established personality. Primarily, however, he was an academician, a professor and a scientist. He acted directly, energetically and did not abuse his position to the detriment of science and hardly ever to his own advantage. He was not interested in "cadre" matters; his criterion for selecting collaborators was, with perhaps only a few exceptions, the scientific talent. This explains the fact that one of the first collaborators he chose was J. Rudinger, despite his aforementioned family history. John Jones<sup>48</sup> published a comprehensive biography of J. Rudinger as an editorial in 2004.

Thanks to both, the tradition of the ever-evolving European Peptide Symposia<sup>1</sup> was established: at a time when the communist regime largely prevented contacts with the West, the first European Peptide Symposium was held in 1958 in Prague. Initiated by J. Rudinger, it was made possible by F. Šorm through his party influence. This venture is perhaps best characterized by a passage from the book *The World of Peptides* by two eminent chemists, Theodor Wieland and Miklos Bodanszky, du Vigneaud's associates<sup>49</sup>: „We cannot enumerate here Rudinger's many valuable contributions to the methodology of peptide synthesis or to the design of molecules for specific pharmacological studies. It seems to be more important to recall one of his ideas, that had and still has a major impact on peptide chemistry. In 1958 he invited the handful of European investigators active in peptide research to participate in a symposium in Prague. This first European Peptide Symposium was followed [...] by meetings held in various locations in Europe. Their excellence acted as a stimulus or perhaps as catalyst and led to an unprecedented growth in research and understanding of peptide chemistry. Not less important are the friendships and collaborations formed at the Symposia. Their example was followed in the United States and also Japan.“

After the Soviet occupation, at the end of August 1968, J. Rudinger left Czechoslovakia for Switzerland. As a world-renowned scientist, he became one of the first professors of molecular biology at one of Europe's top universities, the Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) in Zurich. He and his group continued to deal with the chemistry and biology of peptides, along with numerous other tasks that fall within the duties of a university professor, until his untimely death in 1975. However, the most scientifically productive period of his life was undoubtedly at the IOCB in Prague. Peptide research, however, continued at this institute, even though Rudinger's absence left an insurmountable gap. His role was taken



Fig. 5. 1st European Peptide Symposium, Prague 1958. Photograph of participants. Members of the peptide group of the IOCB are marked (identification: VP and MF). (Archive of M. Brenner, see Fig. 4)

over by several outstanding chemists, among whom it is worth mentioning at least Karel Jošt (1932–1986), Karel Poduška (†1974, date unverified) and Milan Zaoral (1926–2011) (Figure 5). The first two also died prematurely, at the same time as J. Rudinger<sup>m</sup>. M. Zaoral then broke away from the original peptide group, led by Karel Bláha (1926–1987) after J. Rudinger's departure, and ran his own independent laboratory at the IOCB.

### Oxytocin and vasopressin in other laboratories and clinics in Prague

The accessibility of analogues derived from the work of Rudinger's group initiated later pharmacological, biochemical and clinical research on neurohypophysial hormones at various institutes in Prague and in then Czechoslovakia. In the 1960s, there already existed an extensive communication between Prague and Western as well as Central European research centres, especially in Hungary, Poland, East Germany, Switzerland, Great Britain, the Federal Republic of Germany, and North America. Those centres exchanged information and frequently also unique specimens. The central person was again J. Rudinger in the role of a kind of ambassador. At that time, peptide research in Prague became part of world research.

Biochemical and partly also pharmacological research at the IOCB was concentrated in the Department of Molec-

<sup>m</sup> In the 1970s, several peptide chemists in Prague and abroad (Italy, USA) died before or shortly after the age of 50, at least three out of five known to us, with a cancer diagnosis. According to an unconfirmed hypothesis, their illness could be related to a long-term exposure to dicyclohexylcarbodiimide (DCC), commonly used in peptide chemistry as a condensing agent. The National Institute of Health (NIH Publication No. 07-4426) declared its carcinogenicity.

ular Biology, initially in the laboratory headed by Ivan Rychlík (Ivan Rychlík, Zdeňka Beránková-Ksandrová, Ivan Bartošek, František Kalousek, Vladimír Pliška, Tomislav Barth, Tomáš Douša), and later (by the last three mentioned, together with other collaborators) in a separate laboratory of biochemistry and pharmacology of peptides. In addition to metabolic and pharmacokinetic studies, interest was focused on the antidiuretic and natriuretic effects of vasopressin and oxytocin analogues. The pharmacokinetic characterization of peptides and the antidiuretic rat assay developed in the latter laboratory<sup>50</sup> was used in other pharmacological research centres and in pharmaceutical industry.

One of the earliest conformational studies of oxytocin and its carba-analogues (Ivo Frič, Milan Kodíček, Karel Jošt, Karel Bláha<sup>51</sup>) also originated from the IOCB.

Much of the pharmacological research was taken over by the Prague Research Institute of Pharmacy and Biochemistry (Ivan Krejčí, Ivo Poláček, Běla Kupková, Alena Machová and many others). Most of the data on uterotonic and vasopressor activities of peptides came from this institute. Ivan Krejčí and his collaborators also dealt with basic questions of peptide pharmacology: they studied the inhibition of the uterotonic effect of oxytocin, the transitions between full agonism and antagonism, and the influence of calcium and magnesium on these processes. The topic of oxytocin analogues persisted there through the 1970s and ended in the new millennium. Also, but perhaps to a lesser extent, Karel Řežábek, Evžen Kasafírek and Jaroslav Kynčl collaborated with the biochemical group of the IOCB on the synthesis, mainly on the pharmacological characterization of vasopressor hormones.

Projects in the field of cardiovascular pharmacology and vasopressin physiology were part of the agenda of the Institute of Cardiovascular Research in Prague-Krč until the early 1970s (Jiří Heller, for some time also Joseph H. Cort<sup>n</sup>).

This is, however, only a brief list of pharmacological and physiological departments in Prague that participated

in the research of "Prague" analogues of oxytocin and vasopressin. Several Prague clinical facilities, mainly in the field of gynaecology and obstetrics, were also involved in this community. Here we should mention the Institute for Mother and Child Care (Vladimír Brotánek, Stanislav Kazda, J. Hodr, Č. Jungmannová, J. Židovský) and the Gynaecology and Obstetrics Clinic of the Faculty of Paediatrics of Charles University, now the Gynaecology and Obstetrics Clinic of the 2nd Faculty of Medicine of Charles University and the University Hospital in Motol. At that time, Alfréd Kotásek was its head, after him Miroslav Břešťák. Pharmacological and clinical research was also the subject of the endocrinology laboratory of the III Internal Clinic of the General University Hospital in Prague under the direction of Professors Vladimír Holeček, Josef Marek and Vratislav Schreiber.

In 1968, the cooperation with the Swedish company Ferring Läkemedel AB, Malmö began. This continued with the grant of the patent licence for dDAVP/Desmopressin (and later of other patents), whereby the company obtained the rights to manufacture Desmopressin, Carbetocin/Pabal and Terlipressin in Western Europe and the USA. Léčiva, n.p., as part of the Spofa Trust, then produced the same peptides for the countries of Eastern Europe and the former Soviet Union at one of its plants in Prague-Komořany.

Later, Prague research changed its character and became more oriented towards clinical pharmacology. Numerous chemical and pharmacological projects were then concentrated first in Malmö and later in other branches of the rapidly growing and expanding Ferring company worldwide. The Prague "Gründerzeit" has its natural, yet very successful end here.

*The authors are indebted to Ms. Mgr. Olga Štajnrtová, Department of Obstetrics and Gynaecology, 1st Faculty of Medicine of Charles University and General University Hospital in Prague, for careful proofreading of the Czech version of this manuscript, especially for verification and*

<sup>n</sup> Note on the person of Joseph H. Cort, whose name often appears among the authors of Prague publications in the 1960s and 1970s. Cort emigrated from the USA in the 1950s, allegedly under the threat of prosecution by the McCarthy Commission, to England and soon afterwards first to Poland and then to Czechoslovakia. As an alleged victim of communist persecution in the West he was, in the time of the communistic regime, welcomed by official Prague. (It should be noted that in contacts with his colleagues in Prague he used a completely different, satirical-critical attitude towards communism.) As a Yale University graduate, he joined the research work of Josef Rudinger, with whom he was a close friend. Apart from the aforementioned institute, his workplace is also listed in publications as the Institute of Physiology of the Czechoslovak Academy of Sciences in Krč (as "laboratory of peptide biology"). He was undoubtedly a gifted experimenter and had many original proposals, mainly concerning the influence of neurohypophysial hormones on water and ion metabolism, and on the cardiovascular system. His moral profile, at least as far as science was concerned, was already in considerable doubt in insider circles. Among other things, the results of his experiments were often not reproducible. In 1976, he returned to the United States, working first at Mount Sinai Medical Center in New York and later at Vega Biotechnologies Inc., Tucson, AR. In late 1982, he publicly admitted that one of the analogues of vasopressin, which he had allegedly tested pharmacologically and for which he had been granted a US patent, had actually never been synthesised. There is also no evidence that several other peptides claimed by him have ever been synthesised. This evident fraud immediately caused a public scandal and apparently ended Cort's academic career (see, e.g., *New Scientist*, January 6, 1983, *New York Times*, December 27, 1982, etc.). Fortunately, this history did not cast long shadows on the work of Prague researchers. As far as we know, Cort then opened a company in Wiesbaden (Germany), where he attempted, among other things, to produce carbetocin.

correction of the cited data. Thanks are due to Dr. Paul Pliska for reviewing the English version of the manuscript.

**On the current occasion:** The pharmaceutical company FERRING Pharmaceuticals CZ s.r.o. donated through the Vita et Futura Endowment Fund, by way of the Czech Red Cross, large quantities of Carbetocin to help women in childbed in war-affected areas of Ukraine. Carbetocin is in obstetrics one of the life-saving drugs for treatment of perinatal bleedings; it is one of the peptides that resulted from the cooperation between Prague and Swedish researchers, as mentioned in this report. As a result of the aggressive Russian invasion, medical care in Ukraine is presently struggling with great difficulties. Our thanks for this efficient help go to the organizations mentioned above, to the director of FERRING in Prague Ing. Branislav Kotlárík, to the President of the Czech Red Cross Dr. Marek Jukl and to all persons who participated in this humanitarian action.

## REFERENCES

- Starling E. H.: *Lancet* 2, 339 (1905).
- Bayliss W. M., Starling E. H.: *J. Physiol.* 28, 325 (1902).
- von Mering J., Minkowski O.: *Arch. Exp. Path. Pharm.* 26, 371 (1890).
- Oliver G., Schäfer E. A.: *J. Physiol.* 18, 230 (1895).
- Oliver G., Schäfer E. A.: *J. Physiol.* 18, 277 (1895).
- Howell W. H.: *J. Exp. Med.* 3, 245 (1898).
- Schäfer E. A., Vincent S.: *J. Physiol.* 25, 87 (1899).
- Dale H. H.: *J. Physiol.* 34, 163 (1906).
- Ott I., Scott J. C.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 8, 48 (1910).
- Dudley H. W.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 14, 295 (1919).
- Pliška V., Barth T.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 35, 1576 (1970).
- Kamm O., Aldrich T. B., Grote I. W., Rowe L. W., Bugbee E. P.: *J. Am. Chem. Soc.* 50, 573 (1928).
- Stehle R. L., Fraser A. M.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 55, 136 (1935).
- Craig L. C.: *J. Biol. Chem.* 155, 519 (1944).
- Livermore A. H., du Vigneaud V.: *J. Biol. Chem.* 180, 365 (1949).
- Edman P.: *Arch. Biochem.* 22, 475 (1949).
- du Vigneaud V., Ressler C., Trippett S.: *J. Biol. Chem.* 205, 949 (1953).
- du Vigneaud V., Ressler C., Swan J. M., Roberts C. W., Katsoyannis P. G.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 3115 (1954).
- Tuppy H.: *Biochim. Biophys. Acta* 11, 449 (1953).
- Tuppy H., Michl H.: *Monatsh. Chem.* 84, 1011 (1953).
- Sanger F., in the book: *Nobel lectures – chemistry 1942–1962. Including presentation speeches and laureates' biographies*, p. 544. Nobel Foundation by Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1964.
- du Vigneaud V., in the book: *Nobel lectures – chemistry 1942–1962. Including presentation speeches and laureates' biographies*, p. 446. Nobel Foundation by Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1964.
- Boissonnas R. A., Guttmann S., in book: *Neurohypophysial Hormones and Similar Polypeptides* (B. Berde, ed.), ch. 2, p. 40. Springer Verlag, Berlin 1968.
- Rudinger J., Honzl J., Zaoral M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 21, 202 (1956).
- Honzl J., Rudinger J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 20, 1190 (1955).
- Boissonnas R. A., Guttmann S., Jaquenoud P.-A., Waller J.-P.: *Helv. Chim. Acta* 28, 1491 (1955).
- Law, H. D., du Vigneaud V.: *J. Am. Chem. Soc.* 82, 4579 (1960).
- Berde B., in book: *Neurohypophysial Hormones and Similar Polypeptides* (B. Berde, ed.), ch. 16, p. 802. Springer Verlag, Berlin 1968.
- Jošt K., in *Handbook of Neurohypophyseal Hormone Analogs*, Vol. II/2 (K. Jošt, M. Lebl, F. Brtník ed.), p. 94. CRC Press, Inc., Boca Raton (FL) 1987.
- Altura B. M.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 198, 187 (1976).
- Zaoral M., Kolc J., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 32, 1250 (1967).
- Tuppy H., Nesvadba H.: *Monatsh. Chem.* 88, 977 (1957).
- Chang T.-S.: *Int. J. Mol. Sci.* 10, 2440 (2009).
- Walter R., Raven R. T., Schwartz I. L.: *J. Med. Chem.* 19, 328 (1976).
- Walter R., Schlank H., Glass J. D., Schwartz I. L., Kerényi T. D.: *Science* 173, 827 (1971).
- van Wimersma Greidanus T. B., Van Ree J. M., in *Behavioral Aspects of Neuroendocrinology* (D. Ganten, D. Pfaff, eds.), ch. 3, p. 61. Springer Verlag, Berlin 1990.
- Rudinger J., Jošt K.: *Experientia* 20, 570 (1964).
- Pliška V., Rudinger J., Douša T., Cort J. H.: *Am. J. Physiol.* 215, 916 (1968).
- Pliška V., Jutz G., Beck S., in *PEPTIDES: Structure and Function. Proceedings of the Ninth American Peptide Symposium* (C. M. Deber, V. J. Hruby, K. D. Kopple, eds.), p. 603. Pierce Chemical Company, Tucson (AR) 1985.
- Beránková-Ksandrová Z., Bisset G. W., Jošt K., Krejčí I., Pliška V., Rudinger J., Rychlík I., Šorm F.: *Brit. J. Pharmacol.* 26, 615 (1966).
- Kynčl J., Řežábek K., Kasafírek E., Pliška V., Rudinger J.: *Eur. J. Pharmacol.* 28, 294 (1974).
- Jošt K., Rudinger J., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 26, 2496 (1961).
- Beránková Z., Rychlík I., Jošt K., Rudinger J., Šorm F.: *Coll. Czech. Chem. Commun.* 26, 2673 (1961).
- Krejčí I., Kupková B., Rudinger J.: *Brit. J. Pharmacol.* 30, 506 (1967).
- Rudinger J., Krejčí I., in book: *Neurohypophysial Hormones and Similar Polypeptides* (B. Berde, ed.), ch. 15, p. 748. Springer Verlag, Berlin 1968.
- Rudinger J., Pliška V., Krejčí I.: *Recent Prog. Horm. Res.* 28, 131 (1972).

47. Manning M., Misicka A., Olma A., Bankowski K., Stoev S., Chini B., Durroux T., Mouillac B., Corbani M., Guillon G.: *J. Neuroendocrinol.* 24, 609 (2012).
48. Jones J.: *J. Pept. Sci.* 10, 393 (2004).
49. Wieland T., Bodanszky M.: *The World of Peptides. A Brief History of Peptide Chemistry*, p. 156. Springer Verlag, Berlin 1991.
50. Thorn N. A., Niels A., in book: *Neurohypophysial Hormones and Similar Polypeptides* (B. Berde, ed.), ch. 7, p. 372. Springer Verlag, Berlin 1968.
51. Frič I., Kolděček M., Jošt K., Bláha K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 39, 1271 (1974).

## Abstract

The amino acid sequence of oxytocin, identified already in 1906 as the uterotonic component of neurohypophysial extracts, was established in 1953 by Vincent du Vigneaud in New York and Hans Tuppy in Vienna. Its structure was verified by the total synthesis one year after in the du Vigneaud laboratory. In the following years, simplified synthetic strategies elaborated in a number of laboratories worldwide enabled structural modifications of individual sites in the peptide chain, aiming at a detailed elucidation of their influence upon pharmacologic features of oxytocin. Frequently, these peptide analogues opened the way to new, clinically useful drugs. The research on vasopressin, the other main peptide hormone of posterior pituitary, underwent a similar development.

Among the first who elaborated a more flexible alternative to du Vigneaud protocol was the peptide group at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechoslovak Academy of Sciences (ÚOCHB) in Prague, chaired by Josef Rudinger. Its research activities were broadly supported – sometimes even enabled – by František Šorm, director of the Institute. This opened a way to an easier synthesis of oxytocin analogues. Design strategy in Prague was focused on oxytocin analogues with an enhanced metabolic stability (prolongation of half-life *in vivo*), and on analogues acting as inhibitors to its uterotonic/galactobolic response. In the former case, design strategy has originated from studies of enzymatic stability of oxytocin, accomplished in the biochemical laboratories at the ÚOCHB, or reported in earlier communications. Dose-response and time-response behaviour of analogues in which potential sites of enzymatic attacks were replaced

by resistant sequences, and modified peptides investigated in a number of *in situ* and/or *ex vivo* pharmacological experiments. Of particular interest were analogues in which one or both sulphur atoms in the -S-S- bridge were replaced by the methylene group (-CH<sub>2</sub>-), the so-called carba-analogues. Individual analogues of this series possessed, in various degrees, biological activities of oxytocin but not a prolongation of their responses in pharmacological models or in their physiological clearance. Thus, the carba analogues document, firstly, that the integrity of the disulfide bridge is not a necessary condition of oxytocin (or vasopressin) activity, and secondly, that the -S-S- bridge is not the rate determining site of neurohypophysial hormone inactivation *in vivo*. In an attempt to prolong the action of oxytocin, its *N*- $\alpha$ -group was acylated by an additional amino acid or a short peptide, in expectation that such analogues would act as prohormones: splitting of additional substituent by tissue aminopeptidases would *in vivo* produce "free" oxytocin (therapeutically, the analogues would act as oxytocin depots). A number of *in vivo* experiments verified this "hormogenic" model and brought forth some clinically interesting substances; some of them are in use until now. In the latter case, the search for structural modifications potentially leading to antagonism indeed brought some new antagonists but, in particular, contributed to the notion of continuous change from "full" agonism via partial agonism to antagonism, according to the tissue conditions. Such a change could have been achieved for uterotonic response of several analogues by changing calcium and magnesium concentrations in the tissue medium.

Ideas originated by Rudinger's group brought about several clinically useful peptides like Carbetocin, Atosiban, Glypressin, Terlipressin. Very successful was the Prague vasopressin analogue dDAVP (Desmopressin) licensed to the Swedish pharmaceutical company Ferring Läkemedel AB.

Josef Rudinger left Czechoslovakia in 1968 and became a professor of molecular biology at the Swiss Federal Institute of Technology (ETH). He passed away, 51 years old, in 1975.

**Keywords:** oxytocin, vasopressin, neurohypophysis, endocrinology – neurohypophysial hormones, I. P. Pavlov, secretin, carbetocin, dDAVP, deamino-D-arginine vasopressin, desmopressin, atosiban, František Šorm, Josef Rudinger