

Synthetische Rezeptoren aus vinylogenen Sulfonylpeptiden**

Cesare Gennari, H. Peter Nestler*, Barbara Salom und W. Clark Still

Die Untersuchung nichtkovalenter intermolekularer Wechselwirkungen ist seit vielen Jahren ein zentraler Punkt der Wirkstoffforschung und der Versuch, die Ursachen dieser Wechselwirkungen zu verstehen und dieses Verständnis zum rationalen Design von Rezeptoragonisten und Antagonisten einzusetzen, ist eine der größten Herausforderungen der Supramolekularen Chemie. Wechselwirkungen von Peptiden und Proteinen bilden die Grundlage der meisten biochemischen Vorgänge, und codierte kombinatorische Bibliotheken eröffnen einen neuen effizienten Weg, empirische Informationen über diese Wechselwirkungen zu sammeln^[1]. Wir beschreiben nun das Screening pinzettenförmiger molekularer Rezeptoren auf der Basis von vinylogenen Sulfonylpeptiden^[2] gegen eine Tripeptidbibliothek. Diese binden in der Bibliothek enthaltene Oligopeptide mit geringer Affinität und hoher Selektivität. Das Ausmaß ihrer Affinität und Selektivität ähnelt dem ihrer Analoga auf Peptidbasis; die individuellen gebundenen Sequenzen zeigen allerdings keine Gemeinsamkeiten.

Verglichen mit Phosphorylpeptiden (Phosphoramidate und Phosphonate)^[3] wurden Sulfonamide bei der Untersuchung von Peptidanaloga vernachlässigt. Jedoch haben Sulfonamide ebenfalls die Tetraederstruktur der Amidbindung, die als Analogon des Übergangszustandes der Peptidhydrolyse anerkannt ist, und sind somit potentielle Pharmacophore zur Hemmung von Proteasen^[4]. Darüber hinaus ist ein Sulfonamid polarer als ein Amid, was zu stärkeren inter- und intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen führt, und die Mailänder Gruppe hat gezeigt, daß vinyloge Sulfonylpeptide daher dazu neigen, wenige wohldefinierte Konformationen einzunehmen^[2a]. Diese Einschränkung des konformativen Freiraums sollte auch beim Aufbau selektiver Rezeptoren hilfreich sein.

Zuerst wollten wir wissen, ob einfache Sulfonylpeptide signifikante Wechselwirkungen zu Peptiden aufweisen. Wir verknüpften willkürlich gewählte Sulfonylpeptide (**1a–c**) über Glutarsäure mit dem roten Farbstoff Dispersionsrot 1 (=DR = **4**) (Abb. 1). Wir screenen die so erhaltenen rotgefärbten Sulfonylpeptide gegen eine codierte kombinatorische Bibliothek 50625 acylierter Tripeptide R-(C=O)-AA₁-AA₂-AA₃-NH-(CH₂)₅-(C=O)-NHCH₂-Polystyrol, die wir bereits beschrieben haben (R und AA_n sind in Abb. 2 spezifiziert)^[5]. Interessanterweise zeigte keines der drei gefärbten Sulfonylpeptide **2a–c** nachweisbare Affinität zu Mitgliedern dieser Bibliothek bei Konzentrationen kleiner als 500 µM. Wie auch mit normalen Peptiden scheinen größere Masse und stärkere Strukturierung der Moleküle für die Erzeugung signifikanter Wechselwirkungen nötig zu sein.

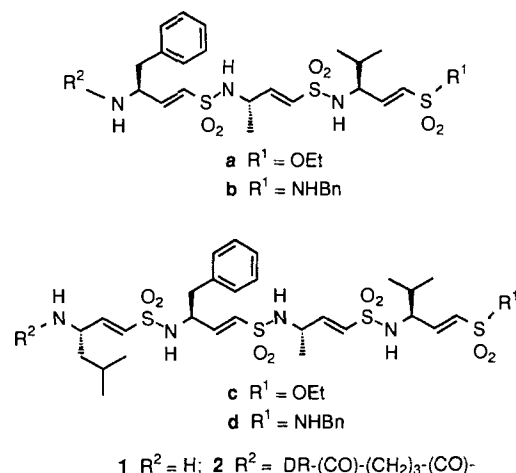
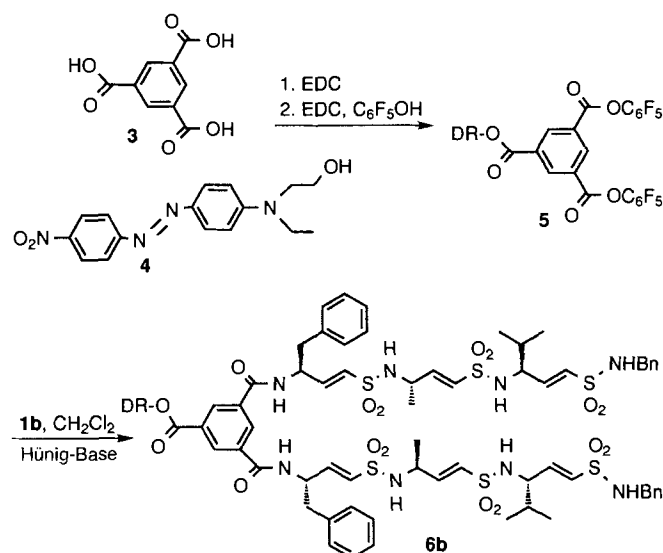


Abb. 1. Verwendete vinyloge Sulfonylpeptide. Bn = Benzyl.

Pinzettenförmige, zweiarmige Moleküle sind bereits als Rezeptoren für einfache Biomoleküle eingesetzt worden^[6]. Wir suchten daher nach einem Verbindungsstück für zwei unserer vinylogenen Sulfonylpeptidketten, das gleichzeitig als Anker für den Farbstoff dienen konnte. Unsere Wahl fiel auf 1,3,5-Benzotricarbonsäure (Trimesinsäure) **3**, und wir erhielten die zweiarmigen Rezeptoren **6a–d** über eine dreistufige Synthesesequenz: **3** wurde mit Dispersionsrot 1 **4** in den Monoester überführt und die verbliebenen Säuregruppen mit Pentafluorphenol verestert (Schema 1). Der so erhaltene Bispentafluorphenylester **5** wurde anschließend mit 2 Äquiv. der entsprechenden Sulfonylpeptide **1a–d** in guten Ausbeuten (75–85%) zu den farbigen Rezeptoren **6a–d** umgesetzt (**6b** als Beispiel in Schema 1).



Schema 1. Synthese des Rezeptors auf der Basis des vinylogenen Sulfonylpeptids **6b**; EDC = 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-hydrochlorid. DR = Dispersionsrot 1 = **4**. Hünig-Base = Diisopropylethylamin.

Die Rezeptoren **6a–d** wurden unserer Standardvorschrift folgend gegen die oben erwähnte Tripeptidbibliothek gescreent^[7]. Das Screening durchläuft die folgenden Stufen: 24 h Äquilibriumierung der Rezeptorlösung in Chloroform mit der festphasengebundenen Tripeptidbibliothek, Selektion und Isolierung der rot gefärbten Trägerperlen und Decodierung der Struk-

[*] Dr. H. P. Nestler

Cold Spring Harbor Laboratory
P.O. Box 100

Cold Spring Harbor, NY 11724 (USA)

Telefax: Int. + 516/367-8873

E-mail: nestler@cshl.org

Prof. Dr. C. Gennari, B. Salom

Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università di Milano (Italien)

Prof. Dr. W. C. Still

Department of Chemistry, Columbia University (USA)

[**] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (Grant HL25634 für W.C.S.) gefördert. C.G. und W.C.S. danken der N.A.T.O. für einen Collaborative Research Grant (NATO 921422). H.P.N. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Liebig-Stipendium.

Selektivitäten (die erstaunlich groß sind) an Oligopeptide binden. Es ist nicht überraschend, daß sich die von den beiden Rezeptorklassen gebundenen Sequenzen unterscheiden. Die hier beschriebenen Rezeptoren sind aus einfach herstellbaren linearen Molekülen aufgebaut und können als Prototypen für kombinatorische Bibliotheken von molekularen Pinzetten auf der Basis vinyloger Sulfonylpeptide dienen, die nach Rezeptoren für vorgegebene Substrate gescreent werden können.

Experimentelles

Herstellung von **6b**: 7 mg des Sulfonylpeptides **1b** wurden in 2 mL CH_2Cl_2 gelöst und mit 0.5 mL TFA versetzt. Die Reaktionslösung wurde 30 min bei 25 °C gerührt, anschließend bis zur Trockene eingengt und 2 h im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 1 mL CH_2Cl_2 gelöst und mit 20 µL Diisopropylethylamin und 3.5 mg Bispentafluorophenylester **5** versetzt. Nach 2 d Rühren bei 25 °C wurden 5 mg (70%) des Rezeptors **6b** säulenchromatographisch an 20 g Kieselgel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95/5) und Gelchromatographie an 30 g LH20 (CHCl_3) isoliert. $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMF}$, 400 MHz): δ = 0.94 (12 H, d, J = 6.8 Hz): 1.26 (3 H, t, J = 7.0), 1.32 (6 H, d, J = 7.0), 1.92 (2 H, m), 3.19 (4 H, m), 3.71 (2 H, q, J = 6.9), 3.85 (2 H, m), 4.00 (2 H, t, J = 6.6), 4.06 (2 H, m), 4.18 (4 H, d, J = 6.3), 4.63 (2 H, m), 5.17 (2 H, m), 6.58–6.70 (10 H, m), 6.87 (2 H, dd, J = 15.1, J = 5.6), 7.11 (2 H, d, J = 9.2), 7.18–7.41 (20 H, m), 7.54 (2 H, d, J = 7.6), 7.59 (2 H, d, J = 8.4), 7.65 (2 H, t, J = 6.4), 7.94 (2 H, d, J = 9.3), 8.01 (2 H, d, J = 9.1), 8.42 (2 H, m, J = 9.1), 8.67 (2 H, d, J = 1.8), 8.71 (1 H, s), 9.20 (2 H, d, J = 8.2). HRMS: ber. für $\text{C}_{75}\text{H}_{95}\text{N}_{12}\text{O}_{18}\text{S}_6$ ($M + \text{H}$) 1691.5210, gef. 1691.5240.

Peptidaffinitätsassay mit Rezeptor **6b**: Die generelle Vorgehensweise ist in Lit. [5b] beschrieben. Nach 24 h Äquilibrierung des Rezeptors **6b** (Ausgangskonzentration ca. 250 µM) in CHCl_3 mit der Tripeptidbibliothek und kontinuierlichem Schütteln hatte sich eine Gleichgewichtskonzentration des Rezeptors von 160 µM eingestellt. Ausgehend von der Annahme, daß wir Perlen, deren Rezeptorstellen zu 10% gesättigt sind, als tiefrot gefärbt detektieren, liegt die geschätzte minimale Bindungskonstante (K_d) für Rezeptoren, die in diesem Assay gefunden wurden, bei 694 ($\Delta G = -15.9 \text{ kJ mol}^{-1}$). 66 der am stärksten gefärbten Perlen wurden separiert und decodiert, dabei wurden 58 verschiedene Sequenzen gefunden. Ausgehend von der Verteilung der mehrfach aufgetretenen Sequenzen schätzen wir die Gesamtzahl der stark bindenden Sequenzen unter den Assaybedingungen auf ca. 250 aus 50 625 [10].

Herstellung von **7**: 120 mg Boc-(L-Phe)-(L-Ala)-(L-Val)-NHBn wurde in 7.5 mL CH_2Cl_2 gelöst und mit 2.5 mL TFA versetzt. Die Reaktionslösung wurde 1 h bei 25 °C gerührt, anschließend zur Trockene eingengt und 4 h im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 10 mL CH_2Cl_2 gelöst, mit 100 µL Diisopropylethylamin und 84 mg Bispentafluorophenylester **5** versetzt und 3 d bei 25 °C gerührt. Während dieser Zeit bildete sich ein roter Niederschlag. Die Reaktionsmischung wurde über 50 g Kieselgel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95/5) filtriert und die Fraktionen, die ausschließlich **7** (Dünnschichtchromatographie) enthielten, mit Gelchromatographie an 30 g LH20 (CHCl_3) gereinigt. Man erhielt so 12 mg (9%) des Rezeptors **7**. $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMF}$, 400 MHz): δ = 0.90 (12 H, m), 1.25 (3 H, t, J = 6.9 Hz), 1.34 (6 H, d, J = 7.2), 2.13 (2 H, m), 3.16 (2 H, m), 3.32 (2 H, dd, J = 13.6, J = 3.6), 3.61 (2 H, q, J = 6.9), 3.99 (2 H, t, J = 5.7), 4.31 (2 H, t, J = 6.6), 4.34 (4 H, d, J = 6.0), 4.51 (2 H, t, J = 7.2), 4.63 (2 H, m), 4.94 (2 H, m), 7.08 (2 H, d, J = 9.1), 7.14 (2 H, d, J = 7.4), 7.17–7.30 (14 H, m), 7.41 (4 H, m), 7.86 (2 H, d, J = 8.8), 7.92 (2 H, d, J = 9.1), 8.01 (2 H, d, J = 7.6), 8.43 (4 H, m), 8.62 (2 H, s), 8.68 (2 H, d, J = 7.2), 8.75 (1 H, d, J = 6.2), 9.27 (2 H, d, J = 8.3). HRMS: ber. für $\text{C}_{73}\text{H}_{82}\text{N}_{12}\text{O}_{12}\text{Na}$ ($M + \text{Na}$): 1341.6070, gefunden 1341.6050.

Bindungsassay von Rezeptor **7**: Der Assay wurde wie für Rezeptor **6b** beschrieben durchgeführt. Die ermittelte Gleichgewichtskonzentration von **7** von 130 µM entspricht einer geschätzten minimalen Bindungskonstante von $K_d = 855$ ($\Delta G = -16.5 \text{ kJ mol}^{-1}$). 54 Sequenzen, darunter 49 unterschiedliche, wurden decodiert. Aus der Analyse der Replikate [10] schätzen wir die Zahl der Sequenzen mit hoher Affinität unter unseren Assaybedingungen auf 269.

Eingegangen am 24. März 1995 [Z 7827]

Stichworte: Kombinatorische Chemie · Peptidanaloga · Rezeptoren · Supramolekulare Chemie

- [1] Kürzliche erschienene Übersichtsartikel: M. A. Gallop, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, E. M. Gordon, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1233–1251; *ibid.* **1994**, *37*, 1385–1401.
 [2] a) C. Gennari, B. Salom, D. Potenza, A. Williams, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2181–2183; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2067–2069; b) C. Gennari, H. P. Nestler, B. Salom, W. C. Still, *ibid.* **1995**, *107*, 1892–1893 bzw. **1995**, *34*, Nr. 16.
 [3] K. Teraishi, M. Saito, I. Fujii, H. Nakamura, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 7153–7156; D. Maffre-Lafon, R. Escalé, P. Dumy, J.-P. Vidal, J.-P. Girard, *ibid.* **1994**, *35*, 4097–4098; A. Mucha, P. Kafarski, F. Plenat, H.-J. Christau, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 12743–12754; H.-J. Musiol, F. Grams, S. Rudolph-Bohner, L. Moroder, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6144–6146; D. A. Campbell, J. C.

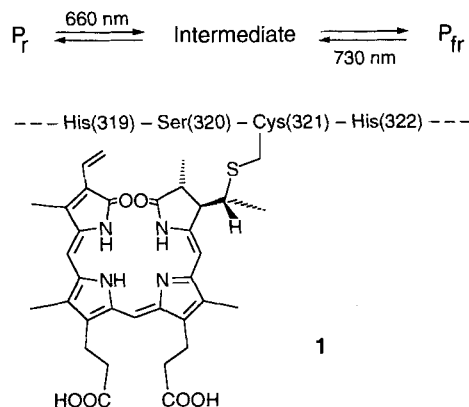
- Bermak, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6039–6040; W. P. Malachowski, J. K. Coward, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7616–7624; *ibid.* **1994**, *59*, 7625–7634.
 [4] R. M. J. Liskamp, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 661–664; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 633–636; W. J. Moree, L. C. van Gent, G. A. van der Marel, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 1133–1150; W. J. Moree, G. A. van der Marel, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6389–6392.
 [5] a) S. S. Yoon, W. C. Still, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 567–578; b) A. Borchardt, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 373–374.
 [6] a) S. C. Zimmerman, W. Wu, Z. Zeng, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 196–201; b) R. Boyce, G. Li, H. P. Nestler, T. Suenaga, W. C. Still, *ibid.* **1994**, *116*, 7955–7956; c) S. R. LaBrenz, J. W. Kelly, *ibid.* **1995**, *117*, 1655–1656; d) H. Wennemers, S. S. Yoon, W. C. Still, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1108–1109.
 [7] M. H. J. Ohlmeyer, R. N. Swanson, L. W. Dillard, J. C. Reader, G. Asouline, R. Kobayashi, M. Wigler, W. C. Still, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10922–10926.
 [8] Die Affinität von **6d** könnte 1/10 derjenigen von **6a–c** sein, und wir würden unter unseren Assaybedingungen keine Wechselwirkungen detektieren.
 [9] 15 Möglichkeiten für R und für jede der Position AA₁, AA₂, AA₃ ergibt 15³ = 50 625 verschiedene Sequenzen. Die verwendeten R und AA_n sind in Abbildung 2 aufgeführt.
 [10] Die statistische Auswertung der Sequenzdaten wurde mit dem Programm SACCs von Dr. Peter Shenkin (Columbia University) durchgeführt. Die Gesamtzahl bindender Sequenzen in der Bibliothek wird aus einer binomischen Analyse der Zahl der mehrfach aufgetretenen Sequenzen abgeschätzt und es gibt einen groben Anhaltspunkt über die Sequenzspezifität des getesteten Rezeptors.
 [11] a) 1 aus 15³ Möglichkeiten = 0.03%; b) 1 aus 15² Möglichkeiten = 0.4%.
 [12] a) A. Borchardt, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7469–7468; b) S. S. Yoon, W. C. Still, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2517–2519; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2458–2460.

Ein Serylinoester des Phycocyanobilins als neues Modell für die Chromophor-Protein-Wechselwirkung des Phytochroms**

Ronald Micura und Karl Grubmayr*

Professor Albert Eschenmoser zum 70. Geburtstag gewidmet

Phytochrom ist der Photorezeptor der Photomorphogenese in höheren Pflanzen^[1]. Es existiert in zwei Formen (P_r = Phytochrom red, P_{fr} = Phytochrom far red), die sich in ihren Absorptionsspektren (660 bzw. 730 nm) unterscheiden und die photochemisch ineinander überföhrbar sind. Phytochrom P_r ist seiner Struktur nach ein Biliprotein. Durch Photoisomerisierung^[2] und eine Sequenz von Dunkelreaktionen^[3] wandelt sich



[*] Univ.-Doz. Dr. K. Grubmayr, Dipl.-Ing. R. Micura
 Institut für Chemie der Universität
 Altenbergerstraße 69, A-4040 Linz (Österreich)
 Telefax: Int. +732/2468-10
 E-mail: karl.grubmayr@jk.uni-linz-ac.at

[**] Diese Arbeit wurde vom österreichischen Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekt-Nr. P-9166) unterstützt.