

- Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 8087–8091; c) G. E. Hofmeister, F. E. Kahn, S. F. Pedersen, *ibid.* **1989**, *111*, 2318–2319; d) G. E. Hofmeister, A. Alvarado, J. A. Leary, D. I. Yoon, S. F. Pedersen, *ibid.* **1990**, *112*, 8843–8851; e) B. M. Murphy, J. M. Harrowfield, D. L. Kepert, B. W. Skelton, A. H. White, F. R. Wilner, *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 4231–4236.
- [3] F. Corazza, C. Floriani, A. Chiesi-Villa, C. Guastini, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 640–641.
- [4] F. Corazza, C. Floriani, A. Chiesi-Villa, C. Guastini, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1083–1084.
- [5] F. Corazza, C. Floriani, A. Chiesi-Villa, C. Rizzoli, *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 4465–4468.
- [6] J. A. Acho, L. H. Doerrer, S. J. Lippard, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 2542–2556.
- [7] a) D. J. Cardin, M. F. Lappert, C. L. Raston, *Chemistry of Organozirconium and Hafnium Compounds*, Wiley, New York, **1986**; b) S. L. Buchwald, R. B. Nielsen, *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 1047–1058; c) M. T. Reetz in *Organometallics in Synthesis* (Hrsg.: M. Schlosser), Wiley, New York, **1994**, Kap. 3; d) E.-I. Negishi in *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 5 (Hrsg.: B. M. Trost, I. Fleming, L. A. Paquette), Pergamon, Oxford, **1991**, S. 1163; e) E.-I. Negishi, T. Takahashi, *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 124–130, zit. Lit.; f) N. E. Schore in *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 5 (Hrsg.: B. M. Trost, I. Fleming, L. A. Paquette), Pergamon, Oxford, **1991**, S. 1037; g) G. Erker, R. Pfaff, C. Krüger, S. Werner, *Organometallics* **1993**, *12*, 3559–3568; h) G. Erker, R. Noe, C. Krüger, S. Werner, *ibid.* **1992**, *11*, 4174–4177; i) G. Erker, R. Pfaff, *ibid.* **1993**, *12*, 1921–1926.
- [8] R. F. Jordan, *Adv. Organomet. Chem.* **1991**, *32*, 325–387; R. B. Grossman, W. M. Davis, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2321–2322; A. S. Guram, D. C. Swenson, R. F. Jordan, *ibid.* **1992**, *114*, 8991–8996; A. S. Guram, Z. Guo, R. F. Jordan, *ibid.* **1993**, *115*, 4902–4903; A. S. Guram, R. F. Jordan, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5595–5597; T. J. Marks, *Acc. Chem. Res.* **1992**, *25*, 57–65; G. W. Coates, R. M. Waymouth, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 91–98; G. Erker, M. Aulbach, M. Knickmeier, D. Wingbermühle, C. Krüger, M. Nolte, S. Werner, *ibid.* **1993**, *115*, 4590–4601; G. Guerra, L. Cavallo, G. Moscardi, M. Vacatello, P. Corradini, *ibid.* **1994**, *116*, 2988–2995; X. Yang, C. L. Stern, T. J. Marks, *ibid.* **1994**, *116*, 10015–10031.
- [9] G. Erker, C. Krüger, G. Müller, *Adv. Organomet. Chem.* **1985**, *24*, 1–39, zit. Lit.; H. Yasuda, K. Tatsumi, A. Nakamura, *Acc. Chem. Res.* **1985**, *18*, 120–126, zit. Lit.; H. Yasuda, Y. Kajihara, K. Mashima, K. Nagasuna, K. Lee, A. Nakamura, *Organometallics* **1982**, *1*, 388–396; G. Erker, U. Dorf, R. Benn, R.-D. Reinhardt, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7649–7650; G. Erker, K. Engel, U. Korek, P. Czisch, H. Berke, P. Caubère, R. Vanderesse, *Organometallics* **1985**, *4*, 1531–1536; G. Erker, T. Mühlendernd, R. Benn, A. Rufinska, *ibid.* **1986**, *5*, 402–404; G. Erker, R. Lecht, J. L. Petersen, H. Bönemann, *ibid.* **1987**, *6*, 1962–1967; M. Akita, K. Matsuoka, K. Asami, H. Yasuda, A. Nakamura, *J. Organomet. Chem.* **1987**, *327*, 193–209; H. B. Bürgi, K. C. Dubler-Steude, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4953–4957; G. Erker, R. Aul, *Organometallics* **1988**, *7*, 2070–2072; G. Erker, F. Sosna, R. Zewtler, C. Krüger, *ibid.* **1989**, *8*, 450–454; H. Yasuda, T. Okamoto, Y. Matsuoka, A. Nakamura, Y. Kai, N. Kanehisa, N. Kasai, *ibid.* **1989**, *8*, 1139–1152; G. Erker, S. Friedrich, N. Ralf, *Chem. Ber.* **1990**, *123*, 821–827; G. Erker, M. Babil, *ibid.* **1990**, *123*, 1327–1329; R. Beckhaus, D. Wilbrandt, S. Flatau, H. Böhmer, *J. Organomet. Chem.* **1992**, *423*, 211–222.
- [10] A. Casnati, A. Arduini, E. Ghidini, A. Pochini, R. Ungaro, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2221–2228, zit. Lit.
- [11] L. D. Durfee, I. P. Rothwell, *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 1059–1079. Der Übersichtsartikel enthält auch Literaturhinweise zur verwandten Zr-Alkoxo-Organometalchemie.
- [12] R. F. Jordan, R. E. LaPointe, P. K. Bradley, N. Baenziger, *Organometallics* **1989**, *8*, 2892–2903.
- [13] a) Kristallstrukturanalyse von **3**: $C_{48}H_{60}O_4Zr$, $M = 801.25$, monoklin, Raumgruppe $P2_1/c$, $a = 16.299(2)$, $b = 13.757(4)$, $c = 20.250(2)$ Å, $\beta = 93.35(1)^\circ$, $V = 4533(2)$ Å³, $Z = 4$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.174$ g cm⁻³, $F(000) = 1716$, $Cu_K\alpha$ -Strahlung ($\lambda = 1.54178$ Å), $\mu(\text{MoK}\alpha) = 22.83$ cm⁻¹; Kristallabmessungen $0.15 \times 0.26 \times 0.43$ mm. Die Struktur wurde mit der Schweratommethode gelöst und alle Nichtwasserstoffatome anisotrop verfeinert. Eine der vier *tert*-Butylgruppen ist fehlgeordnet. Die Wasserstoffatome (ausgenommen die der fehlgeordneten Gruppe) wurden anhand der Differenzkarte lokalisiert und als feste Beiträge in der letzten Stufe der Verfeinerung eingeführt ($U_{\text{iso}} = 0.10$ Å²). Für 5580 unabhängige beobachtete Reflexe [$I > 2\sigma(I)$], aufgenommen bei Raumtemperatur auf einem Rigaku-AFC6S-Diffraktometer ($5 < 2\theta < 140^\circ$), wurde nach Absorptionskorrektur schließlich ein R -Wert von 0.052 ($wR2 = 0.132$) erhalten. b) Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Direktor des Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, GB-Cambridge CB2 1EZ, unter Angabe des vollständigen Literaturzitats angefordert werden.
- [14] Kristallstrukturanalyse von **9**: $C_{62}H_{70}O_4Zr \cdot 5C_6H_6$, $M = 1087.56$, triklin, Raumgruppe $P\bar{1}$, $a = 14.684(2)$, $b = 17.992(2)$, $c = 13.033(2)$ Å, $\alpha = 109.64(1)$, $\beta = 103.51(1)$, $\gamma = 86.55(1)^\circ$, $V = 3152.6(7)$ Å³, $Z = 2$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.146$ g cm⁻³, $F(000) = 1154$, $Cu_K\alpha$ -Strahlung ($\lambda = 1.54178$ Å), $\mu(\text{MoK}\alpha) = 17.73$ cm⁻¹; Kristallabmessungen $0.15 \times 0.26 \times 0.43$ mm. Eine statistische Verteilung um die C51...C54-Linie im Diphenylbutadienligand zeigte sich in einer nach der anisotropen Verfeinerung berechneten ΔF -Karte. Die beiden Ausrichtungen (A und B) des Butadiengerüsts teilen sich die an den Enden befindlichen Kohlen-
- stoffatome C51 und C54 und bilden einen Diederwinkel von $19.9(1.9)^\circ$, so daß nur C52 und C53 fehlgeordnet erscheinen. Verfeinerung der relativen Besetzungsgrade ergab einen Wert von 0.69(2) für C52A, C53A und 0.31(2) für C52B, C53B. Die vier *tert*-Butylgruppen sind stark fehlgeordnet. Alle Wasserstoffatome, mit Ausnahme derjenigen der *tert*-Butylgruppen, wurden in der Differenzkarte lokalisiert (auch diejenigen an C52A und C53A) und in den Strukturfaktorberechnungen verwendet ($U_{\text{iso}} = 0.10$ Å²). Für 4273 unabhängige beobachtete Reflexe [$I > 2\sigma(I)$], aufgenommen bei Raumtemperatur auf einem Rigaku-AFC6S-Diffraktometer ($6 < 2\theta < 140^\circ$), wurde nach Absorptionskorrektur schließlich ein R -Wert von 0.080 ($wR2 = 0.194$) erhalten. Alle Berechnungen wurden mit SHELX76 in den frühen Stufen der Strukturlösung und mit SHELXL92 für die Verfeinerungen auf einem Encore-91-Computer durchgeführt [13b].
- [15] L. Giannini, E. Solari, C. Floriani, A. Chiesi-Villa, C. Rizzoli, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2279–2281; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2204–2206, zit. Lit.

Enzymatische Synthese von Peptiden und Ras-Lipopeptiden unter Verwendung des Cholinesters als löslichkeitsvermittelnder Schutz- und Aktivierungsgruppe**

Michael Schelhaas, Simone Glomsda, Marion Hänsler, Hans-Dieter Jakubke* und Herbert Waldmann*

Für die Synthese von Peptiden und empfindlichen, komplexen Peptidkonjugaten bieten enzymatische Transformationen vorteilhafte Alternativen zu klassisch-chemischen Umsetzungen^[1,2]. So haben sich beispielsweise biokatalysierte Deblockierungen^[1] bei der Herstellung von Glyco-^[3] und Lipopeptiden^[4] bewährt, und mit der proteasevermittelten Peptidsynthese in Eis^[5] wurde eine effiziente Methode für die racemisierungsfreie Verknüpfung von Aminosäuren und Peptiden gefunden.

Enzymatische Umsetzungen werden jedoch oft durch die geringe Löslichkeit der blockierten Peptide unter den wäßrigen Reaktionsbedingungen und die dadurch verursachte mangelnde Zugänglichkeit der Substrate für die Biokatalysatoren erschwert oder gar verhindert. Diese Schwierigkeit kann durch löslichkeitsvermittelnde Schutzgruppen überwunden werden^[6]. Deren Abspaltung erfordert aber oft Bedingungen, die bei der Synthese empfindlicher Peptidkonjugate nicht toleriert werden können. Wir berichten nun, daß Cholinester vorteilhafte löslichkeitsvermittelnde Schutzgruppen für die enzymatische Synthese von Peptiden und Lipopeptiden sind, die unter mildesten Bedingungen abgelöst werden können.

Als Cholin(Cho)ester geschützte Peptide **1** (Schema 1) können durch Umsetzung von Peptid-2-bromethylestern mit Trimethylamin hergestellt werden^[7]. Darüber hinaus gelingt ihre Synthese durch Verlängerung der Peptidkette mittels Kondensation von Aminosäurecholinester-Hydrobromiden mit C-terminal deblockierten Peptiden (vide infra; Schema 2).

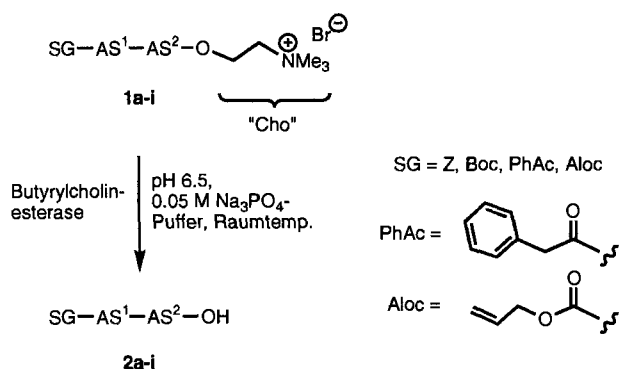
Die hohe Löslichkeit dieser amorphen hygroskopischen Feststoffe in Wasser oder auch in Wasser/Dioxan- und Wasser/Me-

[*] Prof. Dr. H. Waldmann, Dipl.-Chem. M. Schelhaas, Dipl.-Chem. S. Glomsda Institut für Organische Chemie der Universität Richard-Willstätter-Allee 2, D-76128 Karlsruhe
Telefax: Int. + 721/608-4825

Prof. Dr. H.-D. Jakubke, Dr. M. Hänsler
Institut für Biochemie der Universität
Talstraße 33, D-04103 Leipzig
Telefax: Int. + 341/295-939

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Bundesministerium für Bildung und Forschung und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Wir danken der Degussa AG für Chemikalienspenden und R. Schaaf und H. Späte für experimentelle Mitarbeit.

thanol-Gemischen ist äußerst vorteilhaft für die selektive Entfernung der C-terminalen Schutzgruppe mit Hilfe der Enzyme Butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8) aus Pferdeserum und Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) aus dem Zitteraal. Die Butyrylcholinesterase akzeptiert eine breite Palette von Dipeptiden als Substrate und spaltet den C-terminalen Cholinester in hoher Ausbeute unter mildesten Bedingungen (pH 6.5, Raumtemperatur) und vollkommen selektiv ab (Schema 1, Tabelle 1). Die ge-



Schema 1. Enzymatische Abspaltung des Cholinesters (Cho) aus Peptiden mit Hilfe von Butyrylcholinesterase. AS = Aminosäure, SG = Schutzgruppe.

schützten Dipeptidester **1** lösen sich in den meisten Fällen glatt im wässrigen Puffer, so daß ein Zusatz löslichkeitsvermittelnder Cosolventien in der Regel unnötig ist (Tabelle 1). Auch die Kombination zweier sterisch anspruchsvoller hydrophober Aminosäuren, die bei der enzymatischen Abspaltung der N-terminalen Phenylacetamido(PhAc)gruppe^[8] und der C-termina-

Tabelle 1. Ergebnisse der enzymatischen Abspaltung der Cholinester-Schutzgruppe aus den Dipeptidcholinestern **1** mit Hilfe von Butyryl- und Acetylcholinesterase.

Nr.	2	SG	AS¹	AS²	Vol.-% CH ₃ OH	Enzym [a]	Ausb. [%] [b]
1	a	Boc	Phe	Phe	–	BE	65
2	a	Boc	Phe	Phe	–	AE	46
3	b	Boc	Ala	Phe	–	BE	50
4	b	Boc	Ala	Phe	–	AE	44
5	c	Boc	Ile	Ala	–	BE	76
6	c	Boc	Ile	Ala	–	AE	60
7	d	Boc	Gly	Thr	–	BE	66
8	e	Z	Gly	Ala	10	BE	89
9	f	Z	Ser	Phe	10	BE	90
10	g	PhAc	Phe	Phe	–	BE	70
11	h	PhAc	Ile	Phe	–	BE	91
12	i	Aloc	Leu	Pro	–	BE	95

[a] BE = Butyrylcholinesterase aus Pferdeserum; AE = Acetylcholinesterase aus Zitteraal. [b] Die Ausbeuten beziehen sich auf reines deblockiertes Dipeptid **2**. Alle Dipeptidcarbonsäuren **2** wurden anhand ihrer 200-MHz-¹H-NMR-Spektren (jeweils in CDCl₃) und ihrer FAB-Massenspektren identifiziert. Die analytische Reinheit der Carbonsäuren **2** wurde durch HPLC belegt.

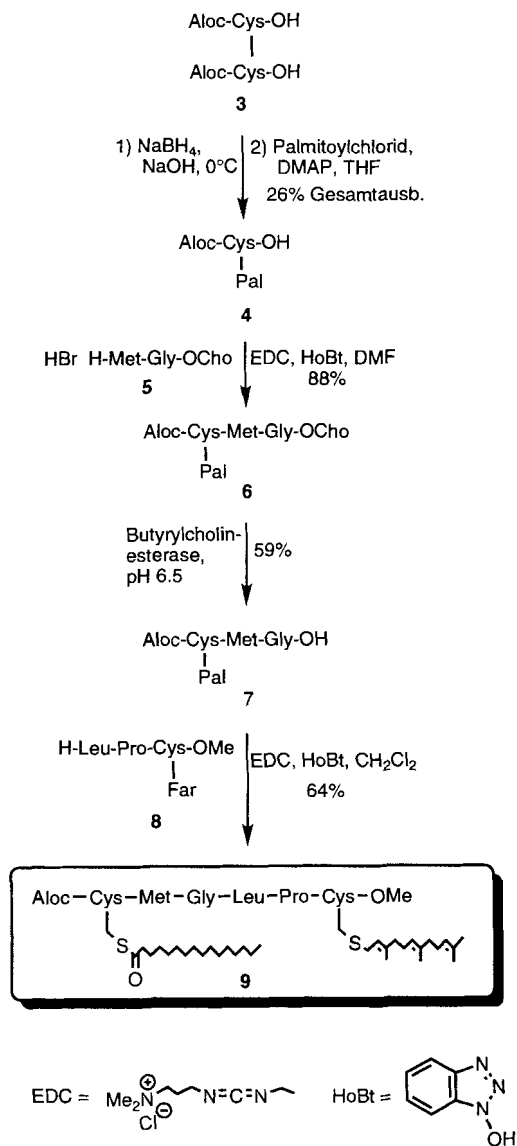
len Heptyl(Hep)ester^[9] wegen der Schwerlöslichkeit der entsprechenden Peptidderivate in den wässrigen Reaktionsmedien besonders problematisch ist, wird von der Butyrylcholinesterase ohne weiteres akzeptiert, so daß die Substrate **1 a, b, g, h** und **1 i** mit hoher Ausbeute entschützt werden. Mit der Acetylcholinesterase verläuft die gezielte Deblockierung von Peptidcholinestern unter den gleichen Bedingungen langsamer (Tabelle 1, Nr. 2, 4 und 6), so daß die Butyrylcholinesterase vorzuziehen ist.

Die Bedingungen für die enzymatische Abspaltung der Cholinester sind so mild, daß dieses Verfahren auch die schonende Synthese empfindlicher S-palmitoylierter und S-farnesylierter Cysteinyl-Lipopeptide ermöglicht, die z.B. kennzeichnende Partialstrukturen der Ras-Lipoproteine sind.

Ras-Proteine sind membrangebundene Lipoproteine, die als molekulare Schalter Signale, die von Wachstumsfaktoren über wohlabgestimmte nichtkovalente Protein/Protein-Wechselwirkungen ausgelöst werden, in eine Kaskade hochspezifischer intrazellulärer Phosphorylierungen übersetzen^[10]. Durch diese kovalente Modifikation werden schließlich Transkriptionsfaktoren aktiviert, die dann die Transkription des genetischen Codes beeinflussen können. Mit Hilfe dieser Signaltransduktionskaskade regeln so unterschiedliche Organismen wie Säugtiere, Fliegen, Würmer und Hefen Zellwachstum und -teilung. Wird diese Regulierung gestört oder unterbrochen, können unkontrolliertes Wachstum und letztendlich Krebs die Folge sein. So wird bei ca. 40% aller menschlichen Krebserkrankungen eine Punktmutation in den zugehörigen ras-Oncogenen nachgewiesen, und bei einigen der Hauptkrebsarten wie Lungen-, Darm- und Bauchspeicheldrüsenkrebs steigt diese Zahl bis auf 85% an^[11]. Die menschlichen N- und H-Ras-Proteine terminieren jeweils in einem S-farnesylierten Cysteinmethylester, und in Richtung des N-Terminus folgen ein oder mehrere S-palmitoylierte Cysteine^[12] (zum Beispiel im C-terminalen Lipohexapeptid **9** des menschlichen N-Ras-Proteins; Schema 2). Die Säurelabilität der Farnesylreste und die ausgeprägte Instabilität der Palmitinsäurethioester unter basischen Bedingungen (vide infra) schließen die Anwendung säure- und basenlabiler Schutzgruppen bei der Synthese charakteristischer Ras-Peptide aus^[4]. Um dieses Ziel zu erreichen, müssen Schutzgruppen eingesetzt werden, die selektiv unter mildesten, möglichst neutralen Bedingungen abgespalten werden können.

Retrosynthetisch wurde das Ras-Peptid **9** in das maskierte S-palmitoylierte Tripeptid **7** und den N-terminal deblockierten farnesylierten Tripeptidester **8** zerlegt, um zu gewährleisten, daß die abschließende Kupplung effizient verläuft (Schema 2). Für die Synthese von **7** wurde das Bis[allyloxycarbonyl(Aloc)]-geschützte Cystin **3** zu Aloc-Cystein reduziert und dieses sofort mit Palmitoylchlorid zum korrekt funktionalisierten Cystein **4** acyliert. **4** wurde dann in hoher Ausbeute mit dem Dipeptidcholinester **5** verknüpft, der aus dem entsprechenden Boc-geschützten Dipeptidcholinester durch Abspaltung der Boc-Gruppe mit HBr/AcOH zugänglich ist. Die gezielte Ablösung des Cholinesters aus dem vollgeschützten Tripeptid **6** ohne Angriff auf den basenlabilen Thioester ist schwierig, denn die Palmitinsäure wird bereits bei pH 6.5 in wässriger Lösung, d. h. unter fast neutralen Bedingungen, durch nichtenzymatische Hydrolyse abgespalten; der Cholinester bleibt aber intakt. Durch Behandeln von **6** mit der Butyrylcholinesterase bei diesem pH-Wert konnte die Chemo-selektivität jedoch vollkommen umgekehrt und das C-terminal deblockierte Lipotripeptid **7** in zufriedenstellender Ausbeute erhalten werden. Besonders bemerkenswert ist, daß unter diesen sehr milden Reaktionsbedingungen die für acylierte Cystein- und Serinderivate im basischen Bereich zu befürchtende β -Eliminierung des Acylrestes^[13] nicht eintritt. Die Synthese des vollständig funktionalisierten Lipopeptids **9**^[14] wurde schließlich durch carbodiimidvermittelte Kondensation der S-palmitoylierten Peptidcarbonsäure **7** mit dem S-farnesylierten N-terminal deblockierten Peptidester **8**^[4] in hoher Ausbeute beendet (Schema 2).

Neben den Cholinesterasen spalten auch unterschiedliche Proteasen, wie Chymotrypsin, Papain, Trypsin, Subtilopeptidase A, Nagarse und Proteinase K, N-geschützte Aminosäure- und Peptidcholinester unter mildesten Bedingungen. So ist der



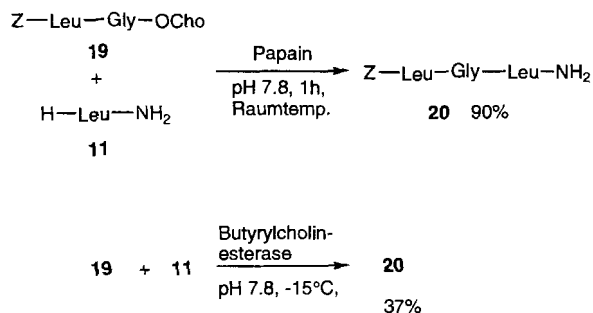
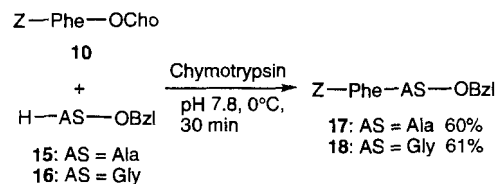
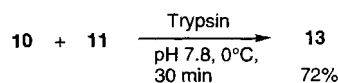
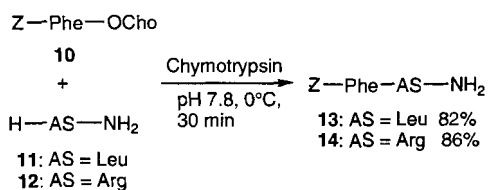
Schema 2. Enzymatische Synthese des S-palmitoylierten und S-farnesylierten *Ras*-Lipopeptids **9**.

Wert für die Spezifitätskonstante^[15] bei der Chymotrypsin-katalysierten Hydrolyse von Z-Phe-OCHO **10** mit $1.2 \times 10^6 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ wesentlich höher, als die, die für vergleichbare, ebenfalls wasserlösliche *N*-Maleinamidoamino- und -peptidbenzyl- und *p*-nitrophenylester bestimmt wurden. Diese exzellenten Substrateigenschaften, die einerseits durch die von uns ermittelte P_1 -Spezifität von Chymotrypsin für positiv geladene Reste^[16] und andererseits durch den Coulomb-Effekt der positiven Ladung hervorgerufen werden, der eine erhöhte Reaktivität der Cholinester-Bindung bedingt^[17], veranlaßten uns, Cholinester als Carboxykomponenten für kinetisch kontrollierte Peptidsynthesen zu prüfen.

Auch bei diesen Reaktionen erweist sich die ausgezeichnete Löslichkeit der geschützten Aminosäurecholinester in wäßrigen Medien als äußerst vorteilhaft. So wird der Z-geschützte Phenylalanincholinester **10** unter dem Einfluß von Chymotrypsin in nur 30 min mit den Aminosäureamiden **11** und **12** sowie mit den Aminosäurebenzylestern **15** und **16** in hoher Ausbeute zu den vollgeschützten Peptiden **13**, **14**, **17** und **18** verknüpft (Schema 3). Die unerwünschte konkurrierende Hydrolyse des Cholinesters kann dabei einfach dadurch zurückgedrängt werden,

daß eine auf 0°C vorgekühlte Lösung des Acyldonors langsam zu einer ebenfalls eisgekühlten Lösung (pH 7.8), die den Acylacceptor und den Biokatalysator enthält, zugetropft wird.

Die Verwendung von Aminosäurecholinestern bei enzymatischen Peptidsynthesen ist nicht auf den Einsatz von Chymotrypsin als Biokatalysator beschränkt. So wird beispielsweise das Dipeptid **13** ebenfalls in hoher Ausbeute unter dem Einfluß von Trypsin erhalten (Schema 3) und der N-terminal geschützte Peptidcholinester **19** ergibt mit Leucinamid **11** in Gegenwart von Papain das Tripeptid **20** sogar in 90% Ausbeute (Schema 3). Sehr überraschend ist darüber hinaus der Befund, daß auch die Butyrylcholinesterase den Acylrest von Aminosäurecholinestern auf N-Nucleophile übertragen und so zusätzlich zur Hydrolyse von Cholinestern auch die Knüpfung von Peptidbindungen katalysieren kann. In ersten orientierenden Versuchen wurde allerdings nicht bei Raumtemperatur, sondern nur bei -15°C im gefrorenen wäßrigen System^[5] das Tripeptid **20** aus den Edukten **19** und **11** in 37% Ausbeute erhalten.



Schema 3. Enzymatische Peptidsynthese mit Aminosäure- und Peptidcholinestern als Acyldonoren.

Experimentelles

Allgemeine Arbeitsvorschrift für die enzymatische Abspaltung von Cholinestern mit Butyrylcholinesterase: Eine Lösung von 1 mmol des Cholinesters und 1000 u Butyrylcholinesterase in 50 mL 0.05 M Natriumphosphatpuffer (pH 6.5; falls notwendig werden 5–10 Vol-% Methanol zugegeben) wird bei 37°C geschüttelt. Nach vollständigem Umsatz (24–36 h; dünnsschichtchromatographische Kontrolle mit *n*-Hexan/Essigester/Methanol-Gemischen) wird der pH-Wert mit 1 N HCl auf 2–3 eingestellt und die Lösung je nach Substrat vier- bis achtmal mit 40 mL Dichlorme-

than extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und der Rückstand durch Chromatographie an Kieselgel mit *n*-Hexan/Essigester/Methanol 60:30:5 [v/v/v];

7: farbloses Öl; $R_f = 0.25$ (*n*-Hexan/Essigester/Methanol 60:30:5 [v/v/v]); $[\alpha]_D^{25} = -59$ ($c = 0.5$ in CH_3OH); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25°C, TMS): $\delta = 0.88$ (t, $J = 7$ Hz, 3H, $\omega\text{-CH}_3$ Pal), 1.25 (m, 24H, CH_2 Pal), 1.60–1.68 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$ Pal), 1.95–2.09 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$ Met), 2.10 (s, 3H, CH_3 Met), 2.53–2.57 (m, 4H, $\alpha\text{-CH}_2$ Pal, $\gamma\text{-CH}_2$ Met), 3.15–3.27 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$ Cys), 3.83–3.93 (m, 1H, CH_2 Gly), 4.10–4.20 (m, 1H, CH_2 Gly), 4.39–4.78 (m, 4H, $\alpha\text{-CH}$ Met, $\alpha\text{-CH}$ Cys, OCH_2 Aloc), 5.18–5.38 (m, 3H, $\text{CH}_2=\text{CH}$ Aloc); FAB-MS (2-NBA/TFA 5:1): m/z (%): 654 (63) $[M + \text{Na}]^+$.

Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Chymotrypsin-katalysierte Peptidsynthese mit N-geschützten Aminosäurecholinestern:

Zu einer Lösung von 2 mmol des Aminosäureesters oder Aminosäureamids und 7.5 mg Chymotrypsin in 7.5 mL Wasser (pH 7.8) wird unter Rühren bei 0°C innerhalb von 3 min eine auf 0°C vorgekühlte Lösung von 1 mmol des N-geschützten Cholinesters in 10 mL Wasser getropft, und das Reaktionsgemisch wird 30 min gerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert, dreimal mit Wasser gewaschen, im Vakuum getrocknet und aus Methanol/Wasser umkristallisiert.

13: Schmp. 189–193°C; FAB-MS (2-NBA): m/z : 654 $[M + \text{H}]^+$; die Analysenreinheit von 13 wurde durch HPLC überprüft (Laufmittel: $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 40:60 [v/v] unter Zugabe von 0.1 Vol-% Trifluoressigsäure).

Eingegangen am 17. August,
veränderte Fassung am 19. Oktober 1995 [Z 8334/8335]

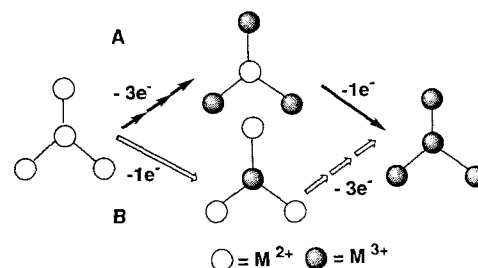
Stichworte: Cholinesterase · Enzymkatalyse · Peptidsynthesen · Ras-Proteine

- [1] Übersicht über enzymatische Schutzgruppentechniken: H. Waldmann, D. Sebastian, *Chem. Rev.* **1994**, 94, 911.
- [2] Übersicht über enzymatische Peptidsynthesen: V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 1440; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1437.
- [3] P. Braun, H. Waldmann, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **1993**, 1, 197.
- [4] E. Nägele, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 2425; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 2259.
- [5] a) M. Schuster, A. Aaviksaar, H.-D. Jakubke, *Tetrahedron* **1990**, 46, 8093; b) M. Schuster, G. Ullmann, U. Ullmann, H.-D. Jakubke, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 5701.
- [6] a) Für eine enzymatische Peptidsynthese unter Verwendung löslichkeitsvermittelnder Schutzgruppen siehe: A. Fischer, A. Schwarz, C. Wandrey, A. S. Bommarium, G. Knaup, K. Drauz, *Biomed. Biochim. Acta* **1991**, 50, 169; b) für enzymatisch abspaltbare löslichkeitsvermittelnde C-terminale Schutzgruppen siehe: H. Kunz, D. Kowalczyk, P. Braun, G. Braum, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 353; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 336; G. Braum, P. Braun, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 3111.
- [7] H. Kunz, M. Buchholz, *Chem. Ber.* **1979**, 112, 2145.
- [8] H. Waldmann, *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 1175.
- [9] P. Braun, H. Waldmann, W. Vogt, H. Kunz, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 165.
- [10] Übersichten: a) S. E. Egan, R. A. Weinberg, *Nature* **1993**, 365, 781; b) M. S. Boguski, F. McCormick, *Nature* **1993**, 366, 643; c) J. L. Bos, *Mutation Res.* **1988**, 195, 255.
- [11] Übersicht: A. Levitsky, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 226, 1.
- [12] W. A. Maltese, *FASEB J.* **1990**, 4, 3319, zit. Lit.
- [13] K. Wakabayashi, W. Pigman, *Carbohydr. Res.* **1974**, 35, 3.
- [14] 9: farbloses Öl; $R_f = 0.75$ (*n*-Hexan/Essigester/Methanol 50:50:10 [v/v/v]); $[\alpha]_D^{25} = -34$ ($c = 0.7$ in CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25°C, TMS): $\delta = 0.88$ (t, $J = 7$ Hz, 3H, $\omega\text{-CH}_3$ Pal), 0.94 (d, $J = 7$ Hz, 3H, $\omega\text{-CH}_3$ Leu), 0.98 (d, $J = 7$ Hz, 3H, $\omega\text{-CH}_3$ Leu), 1.25 (m, 24H, CH_2 Pal), 1.55–1.75 (m, 14H, $\beta\text{-CH}_2$ Pal, 4 CH_3 Far), 1.95–2.2 (m, 19H, $\beta\text{-CH}_2$ Met, $\beta\text{-CH}_2$ Leu, 4 CH_2 Far, 2 CH_2 Pro, S- CH_3 Met), 2.35 (m, 1H, $\gamma\text{-CH}$ Leu), 2.55 (m, 4H, $\alpha\text{-CH}_2$ Pal, $\gamma\text{-CH}_2$ Met), 2.65–2.68 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$ Cys-S-Far), 2.90–3.30 (m, 4H, $\beta\text{-CH}_2$ Cys-S-Pal, $\alpha\text{-CH}_2$ Far), 3.60–3.80 (m, 6H, CO_2CH_3 , CH_2 Pro, CH_2 Gly), 4.24–4.28 (m, 1H, CH_2 Gly), 4.50–4.78 (m, 7H, $\alpha\text{-CH}$ Met, 2 $\alpha\text{-CH}$ Cys, $\alpha\text{-CH}$ Leu, $\alpha\text{-CH}$ Pro, OCH_2 Aloc), 5.10–5.34 (m, 5H, 3 CH Far, $\text{CH}_2=\text{CH}$ Aloc), 5.86–5.93 (m, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}$ Aloc), 6.05 (d, br, NH Urethan), 7.05 (d, br, 1H, NH), 7.25 (d, br, 1H, NH), 7.4 (br, 1H, NH), 7.58 (d, br, 1H, NH); FAB-MS (2-NBA/TFA 5:1): m/z (%): 1163 (4) $[M + \text{H}]^+$, 1185 (20) $[M + \text{Na}]^+$.
- [15] V. Schellenberger, U. Schellenberger, H.-D. Jakubke, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1988**, 53, 2884.
- [16] V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, 869, 54.
- [17] P. Sikk, A. Aaviksaar, *Org. React.* **1977**, 14, 61.

Protoneninduziertes Umschalten von Elektronentransfer-Wegen in dendritischen, vierkernigen RuOs_3 -Komplexen**

Masa-aki Haga*, Md. Meser Ali und Ruyichi Arakawa

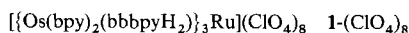
Supramolekulare Komplexe haben in den letzten Jahren große Aufmerksamkeit als Vorläufer für molekulare Funktionseinheiten erregt^[1]. Zu den grundlegenden Funktionen supramolekularer Komplexe zählt, daß sie, durch externe Stimuli ausgelöst, als molekulare Schalter genutzt werden können. Sofern basische Zentren in den Komplexen vorhanden sind, kann Protonentransfer ein externer Stimulus sein. Erst kürzlich wurde gezeigt, daß Fluoreszenz^[2], Redoxeigenschaften^[3] und Elektronentransfer^[3a, 4] mit Protonentransfer umgeschaltet werden können. Das Umschalten von Redoxpotentialen basiert auf der reversiblen Protonierung nichtkomplexierter Stickstoffzentren in Ru-Komplexen mit dem Liganden 2-(2-Pyridyl)benzimidazol. Wir wenden dieses Prinzip auf dendritische, vierkernige Komplexe an. Für solche ligandverbrückten Komplexe sind zwei mögliche Oxidationsmuster bekannt (Schema 1)^[5]. Im



Schema 1. Zwei Redoxmuster in dendritischen, ligandverbrückten, vierkernigen Metallkomplexen.

Falle von Muster A werden die drei peripheren Os^{II} -Zentren bei nahezu gleichem Potential und noch vor der Einelektronenoxidation des zentralen Ru-Atoms oxidiert. Im Falle von Muster B ist die Reihenfolge genau umgekehrt. Die Redoxmuster A und B können durch Protonierung/Deprotonierung basischer Zentren ineinander überführt werden.

Komplex 1 ($\text{bpy} = 2,2'$ -Bipyridin; $\text{bbbpyH}_2 = 2,2'$ -Bis(benzimidazol-2-yl)-4,4'-bipyridin) (Schema 2) ist aus einem zentralen



Ru^{II} -Atom aufgebaut, das von drei Pyridin- und drei Benzimidazolliganden koordiniert wird. Außerdem sind insgesamt drei $\text{Os}^{\text{II}}(\text{bpy})_2$ -Einheiten an die peripheren Pyridin- und Benzimid-

[*] Prof. M. Haga, Md. Meser Ali
Department of Chemistry, Faculty of Education, Mie University
1515 Kamihama, Tsu, Mie 514 (Japan)
Telefax: Int. +/592-31-4657
E-mail: haga@libelle.edu.mie-u.ac.jp
Prof. R. Arakawa
Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering
Osaka University, Toyonaka, 560 (Japan)

[**] Diese Arbeit wurde vom Ministerium für Erziehung, Wissenschaft und Kultur durch einen Grant-in-Aid für Scientific Research (No. 06804036) sowie von der Iketani-Stiftung für Wissenschaft und Technologie und der Sumitomo-Stiftung (basic science grant) gefördert. M. M. A. dankt dem Ministerium für Erziehung, Wissenschaft und Kultur für ein Stipendium der japanischen Regierung (Monbusho). Prof. T. Ohno und Dr. K. Nozaki von der Osaka Universität danken wir für die Messung der NIR-Spektren.