

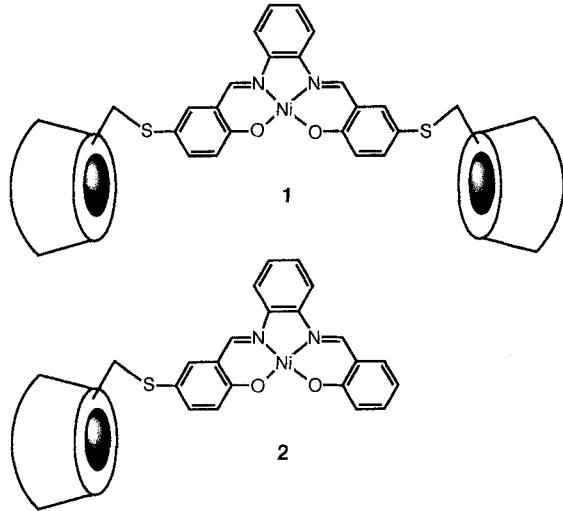
## Selektive Wechselwirkung der Dipeptide L-Phe-d-Pro und d-Phe-L-Pro mit $\beta$ -Cyclodextrin\*\*

Milana Maletić\*, Helma Wennemers\*, D. Quentin McDonald, Ronald Breslow und W. Clark Still

Im Laufe der letzten drei Jahrzehnte haben sich Cyclodextrin-Einschlußkomplexe zu Grundpfeilern der Wirt-Gast-Chemie entwickelt<sup>[1]</sup>. Wie bei der Wechselwirkung von Enzymen mit ihren Substraten und von Antikörpern mit den zugehörigen Antigenen bestimmen hauptsächlich hydrophobe Effekte die Bindung von Molekülen an Cyclodextrine<sup>[2]</sup>. Zahlreiche biologisch wichtige Moleküle bilden stabile Einschlußkomplexe mit Cyclodextrinen in Wasser, darunter die hydrophoben Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Ihre Cyclodextrinkomplexe wurden unter anderem als Enzymmodelle<sup>[3]</sup>, zum Studium der Wirkstoff-Freisetzung<sup>[4]</sup> und zur Trennung von Peptiden<sup>[5]</sup> eingesetzt. Während die Wechselwirkung von Cyclodextrinen mit einzelnen hydrophoben Aminosäuren weitgehend verstanden ist, herrscht über ihre Wechselwirkung mit kleinen Peptidfragmenten noch immer Unklarheit. Hier beschreiben wir Untersuchungen zur Wechselwirkung von  $\beta$ -Cyclodextrin mit Di- und Tripeptiden mit Hilfe eines kombinatorischen Ansatzes.

Die kombinatorische Chemie hat sich in den letzten Jahren zu einem wichtigen Werkzeug bei der Suche nach geeigneten Substraten für einen gegebenen Rezeptor, und umgekehrt, entwickelt<sup>[6]</sup>. Es ist damit möglich geworden, auch sehr kleine Unterschiede in der Wechselwirkung zwischen Wirt und Gast, insbesondere unterschiedliche Bindungsselektivitäten, nachzuweisen, die weder mit konventionellen Methoden detektiert noch durch Molecular Modeling vorausgesagt werden konnten<sup>[7]</sup>.

Die orangefarbenen Nickelsalphen-Komplexe **1** und **2** mit zwei bzw. einem Cyclodextrinsubstituenten wurden mit einer



[\*] M. Maletić, Dipl.-Chem. H. Wennemers, Dr. D. Q. McDonald, Prof. R. Breslow, Prof. W. C. Still  
Department of Chemistry, Columbia University  
New York, NY 10027 (USA)  
Telefax: Int. + 212/854-5429  
E-mail: clark@still3.chem.columbia.edu

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der National Science Foundation (Grant CHE 9544253) (WCS), den National Institutes of Health und dem Office of Naval Research (RB) gefördert. HW dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Kekulé-Stipendium. MM und HW haben zu gleichen Teilen zu der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Tripeptidbibliothek auf hydrophilem Polyethylenglycol-Poly-styrol-Pfropfcopolymer (TentaGel)<sup>[8]</sup> in Wasser aquilibriert. Die Bibliothek hatte die allgemeine Struktur AA3-AA2-AA1-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-TentaGel und wurde mittels kodierter kombinatorischer Synthese hergestellt<sup>[9]</sup>. An jeder der drei Positionen wurden 29 verschiedene Aminosäuren verwendet, so daß die Bibliothek maximal 29<sup>3</sup> (24389) verschiedene Tripeptide enthielt<sup>[10]</sup>.

Der Bis(cyclodextrinrezeptor) **1** zeigte in Wasser bei pH 7 eine bemerkenswert hohe Bindungsselektivität: Nur etwa ein Harzkügelchen unter zweihundert hatte nach 24stündiger Aquilibrierung bei einer Rezeptorkonzentration von ca. 2 mM die orange Farbe des Rezeptors angenommen. Analoge Beobachtungen wurden mit dem Mono(cyclodextrinrezeptor) **2** gemacht (Abb. 1), was darauf hindeutet, daß eine  $\beta$ -Cyclodextrineinheit für die beobachtete Wechselwirkung ausreicht. Die Zugabe des kompetitiven Inhibitors Natrium-4-*tert*-butylbenzoat führte bei beiden Experimenten zur vollständigen Entfärbung der Harzkügelchen. Dies spricht dafür, daß die Peptide in erster Linie an  $\beta$ -Cyclodextrin binden.

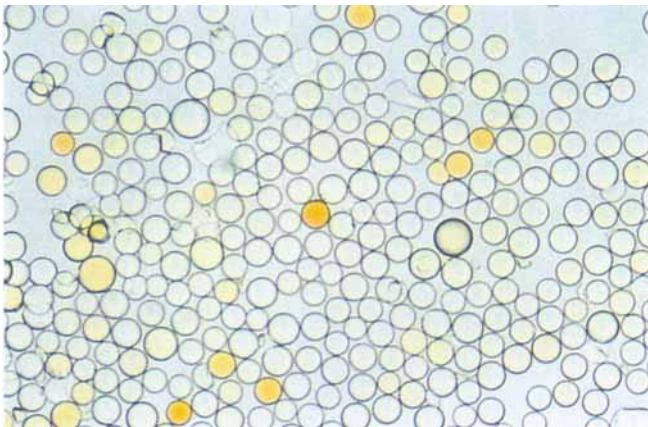


Abb. 1. Ergebnis eines typischen Experiments zur Bindung von Rezeptor **2** an die eingesetzte Tripeptidbibliothek.

Die Sequenzen der Tripeptide auf den farbigen Harzkügelchen wurden durch Gaschromatographie mit Elektroneneinfangendetektor entschlüsselt<sup>[9]</sup>. Dabei ergab sich eine bemerkenswerte Selektivität: Alle durch den Rezeptor **1** gefärbten Harzkügelchen und die meisten der durch den Rezeptor **2** gefärbten Kügelchen enthielten entweder das Dipeptidsegment L-Phe-d-Pro oder das Dipeptidsegment d-Phe-L-Pro (Tabelle 1). Weder ein anderes Phenylalanin enthaltendes Tripeptid noch die diastereomeren, homochiralen Dipeptide L-Phe-L-Pro und D-Phe-d-Pro wurden selektiert.

Um die Ursache dieser hochselektiven Wechselwirkung aufzuklären, wurden die beiden Dipeptide **3** und **4** synthetisiert und

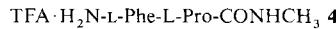
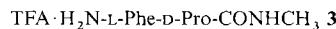


Tabelle 1. Sequenzen, die von den Rezeptoren **1** und **2** in der hier untersuchten Tripeptidbibliothek selektiert wurden [a].

AA3	AA2	AA1	Häufigkeit des Auftretens [%] mit
			1      2
L-Phe	d-Pro	X	36      46
X	L-Phe	d-Pro	16      8
d-Phe	L-Pro	X	28      31
X	d-Pro	L-Pro	20      0

[a] X steht für die jeweils beliebige dritte Aminosäure des Tripeptids.

die Bindungsenergien ihrer Komplexe mit  $\beta$ -Cyclodextrin in Wasser mittels NMR-Titration bestimmt. Dabei wurde jeweils mit einer konstanten Dipeptidkonzentration von 2.0 mM und mit acht unterschiedlichen  $\beta$ -Cyclodextrinkonzentrationen von 0–13 mM in  $D_2O$  gearbeitet. An die Meßwerte wurden Kurven mit dem Software-Paket KaleidaGraph unter Verwendung des Standarditerationsverfahrens angepaßt<sup>[11]</sup>.

Im  $^1H$ -NMR-Spektrum von L-Phe-D-Pro ist hauptsächlich (>95%) ein Konformer, das s-trans-Konformer<sup>[12]</sup>, sichtbar. Bei der Zugabe von  $\beta$ -Cyclodextrin ändern sich die chemischen Verschiebungen zahlreicher Protonen signifikant, und als Bindungskonstante wurde  $180 \pm 20 \text{ M}^{-1}$  ermittelt ( $\Delta G = -3.0 \pm 0.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Während der Titration wurden für die drei Prolinprotonen ( $H3'$ ,  $H4'$ ,  $H5'$ ), die sich auf einer Seite des Pyrrolidinrings befinden, große Hochfeldverschiebungen beobachtet, während sich die Lage der übrigen drei Protonen ( $H3$ ,  $H4$ ,  $H5$ ) auf der anderen Seite des Prolinrings nicht meßbar veränderte. Diese Beobachtungen sind mit einem Bindungsmodus vereinbar, bei dem der Phenylring des Phenylalanins vollständig in dem hydrophoben  $\beta$ -Cyclodextrinhohlraum eingeschlossen ist und eine Seite des Prolinringes diesen Hohlraum als „Kappe“ abschließt. Alle hydrophilen funktionellen Gruppen des Dipeptids sind in dieser Bindungsgeometrie dem Wasser zugewandt (siehe Abb. 2). Zu der hohen Stabilität des  $\beta$ -Cyclodextrin-Dipeptid-Komplexes tragen daher sowohl die Einschließung des Phenylrings in den Hohlraum als auch die hydrophobe Wechselwirkung zwischen dem Pyrrolidinring und dem Cyclodextrin bei. Die Bindungskonstante für das s-cis-Konformer konnte wegen dessen geringen Anteils (<5%) nicht bestimmt werden.

Das  $^1H$ -NMR-Spektrum von L-Phe-L-Pro zeigt das Vorliegen zweier Konformere in einem Verhältnis von 5:1 zugunsten des s-trans-Konformers an<sup>[12]</sup>. Anders als beim D-L-Heteroisomer bindet bei L-Phe-L-Pro das s-trans-Konformer nur mit geringer Affinität an  $\beta$ -Cyclodextrin. Dagegen verändert sich die chemische Verschiebung einiger Protonen des s-cis-Konformers bei Zugabe von  $\beta$ -Cyclodextrin erheblich; eine quantitative Auswertung ergibt eine Bindungskonstante von  $120 \pm 5 \text{ M}^{-1}$  ( $\Delta G = -2.80 \pm 0.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Die ermittelte Bindungskonstante ist mit der Abnahme des s-trans:s-cis-Verhältnisses von 5:1 auf 3:1 im Laufe der Titration in Einklang. Die Art der Bindung im Komplex aus dem s-cis-Konformer von 4 und  $\beta$ -Cyclodextrin scheint analog zu der im Komplex aus dem s-trans-Konformer von 3 und  $\beta$ -Cyclodextrin zu sein: Alle hydrophilen funktionellen Gruppen des Peptids befinden sich in wäßriger Umgebung, während der hydrophobe Phenyl- und der Pyrrolidinring den  $\beta$ -Cyclodextrinhohlraum ausfüllen und abschließen. Dagegen bindet das s-trans-Konformer von 4 nur schwach an  $\beta$ -Cyclodextrin, da einige seiner hydrophilen funktionellen Gruppen dem hydrophoben  $\beta$ -Cyclodextrinhohlraum nicht ausweichen können. Die Bindungskonstante des s-trans-Konformers wurde zu  $20 \pm 5 \text{ M}^{-1}$  (Sättigung ca. 20%) abgeschätzt, was der für die Bindung von Phenylalanin an  $\beta$ -Cyclodextrin entspricht<sup>[4]</sup>.

Da das stärker bindende Konformer von 4 nur zu ca. 21% vorliegt, ist es nicht überraschend, daß Harzkügelchen mit der Peptidsequenz L-Phe-L-Pro bei den Bindungsstudien an der Festphase nie die orange Farbe der Rezeptoren angenommen haben.

Um die Strukturen der  $\beta$ -Cyclodextrin-Dipeptid-Komplexe eingehender zu untersuchen, wurden gründliche Konforma-

tionsanalysen mit dem Programm MacroModel 5.0 durchgeführt. Für die Rechnungen wurden das United-atom-AMBER\*-Kraftfeld<sup>[13]</sup> und das GB/SA-Modell für Wasser<sup>[14]</sup> verwendet. Die Konformationssuchten wurden in Blöcken von 5000 Schritten nach der MCMM-Methode<sup>[15]</sup> durchgeführt, bis keine weiteren energiearmen Strukturen (<3 kcal mol<sup>-1</sup> energiereicher als das globale Minimum) in einem Block gefunden werden konnten (insgesamt 15000 Schritte pro Komplex). Die Konformationssuche umfaßte alle frei drehbaren Bindungen des Peptids sowie Rotationen und Translationen des Peptids relativ zum  $\beta$ -Cyclodextrinmolekül. Die Startgeometrie des  $\beta$ -Cyclodextrinmoleküls wurde aus der Kristallstrukturanalyse übernommen<sup>[16]</sup>.

Die Konformationssuchten ergaben energiearme Strukturen, die den durch die NMR-Untersuchungen nahegelegten Bindungsmodus stützen. In den energieärmsten Strukturen des Komplexes aus L-Phe-D-Pro und  $\beta$ -Cyclodextrin sind der Phenyl- und der Pyrrolidinring in enger Nachbarschaft und bilden einen „hydrophoben Stöpsel“, der stark mit dem  $\beta$ -Cyclodextrinhohlraum wechselwirkt (Abb. 2).

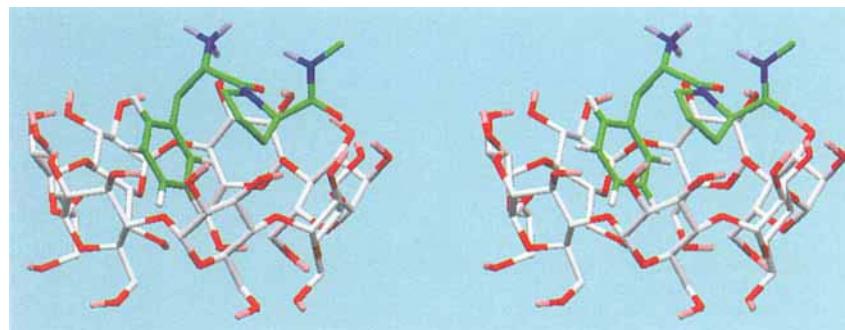


Abb. 2. Stereobild der mit dem Programm MacroModel 5.0 errechneten energieärmsten Struktur des Komplexes aus L-Phe-D-Pro und  $\beta$ -Cyclodextrin.

Die Konformationssuche für den Komplex aus L-Phe-L-Pro und  $\beta$ -Cyclodextrin ergab ähnliche Strukturen für das s-cis-Konformer, allerdings wurden zusätzliche energiearme Strukturen gefunden, bei denen der Phenylring vollständig in den Hohlraum eingeschlossen ist, während der hydrophobe Prolinring zum Teil dem Lösungsmittel ausgesetzt ist.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß mit Hilfe der kombinatorischen Chemie eine bemerkenswert selektive Wechselwirkung von  $\beta$ -Cyclodextrin mit den enantiomeren Dipeptiden L-Phe-D-Pro und D-Phe-L-Pro entdeckt wurde. Weiterhin konnte aus NMR-spektroskopischen Studien ein Bindungsmodell für den  $\beta$ -Cyclodextrin-Dipeptid-Komplex abgeleitet werden. Die gefundene Bindungsselektivität könnte zum Design neuer  $\beta$ -Cyclodextrinkatalysatoren genutzt werden, die in der Lage sind, Peptide sequenzspezifisch zu spalten.

#### Experimentelles:

**3:** D-Pro-NHCH<sub>3</sub> (90 mg, 0.70 mmol) und N-Boc-L-Phe (186 mg, 0.70 mmol) wurden in 3 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und mit Hilfe von EDC (372 mg, 1.40 mmol) gekuppelt. Das N-Boc-geschützte Dipeptid wurde durch Flash-Chromatographie an 30 g Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Aceton 5:1, dann 2:1) und anschließende Kristallisation aus Et<sub>2</sub>O/Hexan gereinigt. 1 mL TFA wurde zu einer Lösung des N-Boc-geschützten Dipeptids (200 mg, 0.32 mmol) in 4 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gegeben. Nach 1.5 h wurden alle flüchtigen Bestandteile unter reduziertem Druck entfernt und 210 mg (80%) TFA-L-Phe-D-Pro-NHCH<sub>3</sub> als farbloser Feststoff isoliert. (TFA-L-Phe-L-Pro-NHCH<sub>3</sub> 4 wurde analog hergestellt.)

**3:** TFA-L-Phe-D-Pro-NHCH<sub>3</sub> (trans-Konformer):  $^1H$ -NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O, 25°C, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta = 1.40$  (m, 1 H; Pro-H4'), 1.68 (m, 2 H; Pro-H3 und Pro-H4), 1.90 (m, 1 H; Pro-H3'), 2.60 (m, 1 H; Pro-H5'), 2.61 (s, 3 H; CH<sub>3</sub>), 3.02 (dd, J=13.4, 9.0 Hz, 1 H; Phe-βH), 3.11 (dd, J=13.4, 6.3 Hz, 1 H; Phe-βH'). 3.38 (m,

1H; Pro-H5), 4.14 (dd,  $J = 4.6, 8.3$  Hz, 1H; Pro- $\alpha$ H), 4.41 (dd,  $J = 6.3, 9.0$  Hz, 1H; Phe- $\alpha$ H), 7.21 (m, 2H; arom.), 7.32 (m, 3H; arom.);  $^{13}\text{C}$ -NMR (75.4 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25°C):  $\delta = 25.24, 26.35, 30.78, 38.29, 48.45, 54.19, 61.65, 129.05, 130.07, 130.24, 130.37, 130.61, 135.44, 168.53, 174.55$ ; hochauflötes MS: ber. für C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> ( $M^+$ ):  $m/z: 275.1534$ ; gef.: 275.1644.

4: TFA · L-Phe-L-Pro-NHCH<sub>3</sub>;  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O, 25°C, CH<sub>3</sub>CN): *trans*-Konformer:  $\delta = 1.77$  (m, 1H; Pro-H3'), 1.85 (m, 2H; Pro-H4 und Pro-H4'), 2.13 (m, 1H; Pro-H3), 2.64 (s, 3H; CH<sub>3</sub>), 2.99 (dd,  $J = 14.5, 7.5$  Hz, 1H; Phe- $\beta$ H'), 3.21 (dd,  $J = 14.5, 6.2$  Hz, 1H; Phe- $\beta$ H), 3.25 (m, 1H; Pro-H5'), 3.61 (m, 1H, Pro-H5), 4.27 (dd,  $J = 6.3, 8.1$  Hz, 1H; Pro- $\alpha$ H), 4.43 (pseudo-t,  $J = 7.3$  Hz, 1H; Phe- $\alpha$ H), 7.24 (m, 2H; arom.), 7.30 (m, 3H; arom.); *cis*-Konformer:  $\delta = 1.56$  (m, 3H; Pro-H3, Pro-H3' und Pro-H4), 1.70 (m, 1H; Pro-H4), 2.60 (s, 3H; CH<sub>3</sub>), 2.90 (dd,  $J = 13.2, 9.8$  Hz, 1H; Phe- $\beta$ H), 3.05 (dd,  $J = 13.2, 5.4$  Hz, 1H; Phe- $\beta$ H'), 3.29 (m, 1H; Pro- $\alpha$ H), 3.33 (m, 1H; Pro-H5), 3.42 (m, 1H; Pro-H5'), 3.80 (dd,  $J = 9.8, 5.4$  Hz, 1H; Phe- $\alpha$ H), 7.13 (m, 2H; arom.), 7.27 (m, 3H; arom.);  $^{13}\text{C}$ -NMR (75.4 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25°C):  $\delta = 23.08, 26.00, 26.36, 26.66, 30.45, 32.62, 37.70, 38.90, 54.41, 61.38, 61.85, 128.89, 129.11, 130.13, 130.51, 130.81, 135.36, 135.43, 168.65, 174.15$ ; hochauflötes MS: ber. für C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> ( $M^+$ ):  $m/z: 275.1534$ ; gef.: 275.1633.

1 wurde nach bekannten Vorschriften synthetisiert [17]:  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO, 25°C):  $\delta = 8.98$  (s, 2H; CH), 8.09 (m, 2H; CH), 7.74 (s, 2H; CH), 7.39 (m, 4H; CH), 6.87 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H; CH), 5.74 (m, 2H; OH), 4.82 (m, 14H; CH), 4.48 (m, 12H; OH), 3.65 (m, 56 H; 4 CH, 2 CH<sub>2</sub>), 3.30 (m, 28H; CH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (75.4 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO, 25°C):  $\delta = 164.6, 156.2, 142.2, 139.3, 137.3, 128.0, 121.7, 120.7, 120.5, 116.3, 102.5, 102.0, 101.7, 84.9, 81.6, 81.4, 73.1, 72.9, 72.4, 72.1, 70.1, 60.0, 59.6$ . FAB-MS: ber. für C<sub>10</sub><sub>a</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>Ni ( $[M + H]^+$ ):  $m/z: 2671.7$ ; gef.: 2672; UV/Vis (H<sub>2</sub>O):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 374 (20000), 273 (55000) nm.

Eingegangen am 22. Januar 1996 [Z 8743]

**Stichworte:** Cyclodextrine · Kombinatorische Chemie · Molekulare Erkennung · Peptide

- [1] M. L. Bender, M. Komiyama, *Cyclodextrin Chemistry*, Springer, New York, 1978; W. Saenger, *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 343–361; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, *19*, 344–362; J. Szejtli, *Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1982.
- [2] R. Breslow, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 159–164.
- [3] Übersicht: R. Breslow, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 146–153.
- [4] K. Matsuyama, S. El-Gizawy, J. H. Perrin, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1987**, *13*, 2687–2691; J. Horsky, J. Pitha, *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1994**, *18*, 291–300.
- [5] A. Wutte, G. Gubitz, S. Fribe, G.-J. Krauss, *J. Chromatogr. A* **1994**, *661*, 7–12; *ibid.* **1994**, *677*, 186–191; K. B. Lipkowitz, S. Raghothama, J. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1554–1562.
- [6] Übersichten: M. A. Gallop, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, E. M. Gordon, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1233–1251, 1385–1401.
- [7] A. Borchardt, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7467–7468; H. Wennermers, S. S. Yoon, W. C. Still, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1108–1109.
- [8] TentaGel-S-NH<sub>2</sub> von Rappe Polymere: E. Bayer, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 117–133; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 113–129.
- [9] 15 Reportermoleküle (fünf Reportermoleküle pro AAn) wurden dem publizierten Protokoll folgend zur Kodierung der Bibliothek verwendet: 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.
- [10] AAn = Gly, D-Ala, L-Ala, D-Val, L-Val, D-Leu, L-Leu, D-Phe, L-Phe, D-Pro, L-Pro, D-Ser, L-Ser, D-Thr, L-Thr, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Asn, L-Asn, D-Gln, L-Gln, D-His, L-His, D-Lys, L-Lys, D-Arg, L-Arg. Tyrosin und Tryptophan waren nicht in der Bibliothek enthalten.
- [11] K. A. Connors, *Binding Constants: The Measurement of Molecular Complex Stability*, Wiley, New York, 1987; KaleidaGraph von Abelbeck Software.
- [12] NOE-Experimente bestätigten die Identität der *s-trans*- und *s-cis*-Konformere beider Diipeptide. Das *s-trans*-Konformer zeigt einen starken NOE zwischen dem Phe- $\alpha$ H und dem Pro- $\alpha$ H, das *s-cis*-Konformer einen zwischen dem Phe- $\alpha$ H und dem Pro- $\alpha$ H. Die Zuordnung aller Signale erfolgte mit Hilfe von <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY-Experimenten.
- [13] D. Q. McDonald, W. C. Still, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 7743–7746; H. Senderowitz, C. Parish, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, im Druck.
- [14] W. C. Still, A. Tempczyk, R. C. Hawley, T. Hendrickson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6127–6129.
- [15] G. Chang, W. C. Guida, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4379–4386.
- [16] CSD BCDEX1: K. Lindner, W. Saenger, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 738–740; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 694–695.
- [17] W. Zhang, E. N. Jacobsen, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2296–2298.

## Sequenzspezifische DNA-Erkennung durch einen in der großen und der kleinen Furche bindenden Liganden\*\*

Jason W. Szewczyk, Eldon E. Baird und Peter B. Dervan\*

Oligonukleotid-vermittelte Tripelhelixbildung<sup>[1]</sup> sowie DNA-Komplexierung durch Pyrrol/Imidazol-Polyamide<sup>[2]</sup> sind zwei nichtbiologische Ansätze zur sequenzspezifischen Erkennung von doppelsträngiger DNA. Die Erkennung der großen DNA-Furche wird durch Pyrimidin-Oligonukleotide vermittelt, die parallel zum Watson-Crick-Purin-Strang binden<sup>[1]</sup>. Die Spezifität wird durch die Bindung von Thymin (T) an Adenin-Thymin-Basenpaare (T · AT-Basentriplets) sowie durch die Bindung von protoniertem Cytosin (C<sup>+</sup>) an Guanin-Cytosin-Basenpaare (C<sup>+</sup> · GC-Basentriplets) erreicht<sup>[1]</sup>. Zur Erkennung der kleinen DNA-Furche dienen Polyamide aus *N*-Methylimidazol- (Im) und *N*-Methylpyrrol-Aminosäuren (Py), wobei die DNA-Sequenzspezifität durch die lineare Sequenz der Pyrrol- und Imidazol-Aminosäuren bestimmt wird<sup>[2–4]</sup>: Die antiparallele Paarung von Imidazol- und Pyrrolcarboxamid-Einheiten ermöglicht die Erkennung von GC-Basenpaaren, während umgekehrt angeordnete Pyrrolcarboxamid- und Imidazol-Einheiten CG-Basenpaare erkennen<sup>[2]</sup>. Die durch Kombination von zwei Pyrrol-Einheiten vermittelte Erkennung ist teilweise degeneriert, sie erlaubt die Bindung von TA- und von AT-Basenpaaren<sup>[2, 3]</sup>. Ein Pyrrol/Imidazol-Polyamid-„Haarnadel“-Ligand mit  $\gamma$ -Aminobuttersäure ( $\gamma$ ) als „Turn“-Einheit ist ein vielseitiges Bindungsmotiv zur hochaffinen Erkennung einer Vielfalt von DNA-Sequenzen in der kleinen DNA-Furche<sup>[5]</sup>. Eine Schlüsselfrage in bezug auf die beschriebenen Strategien zur Erkennung der großen und der kleinen DNA-Furche ist, ob beide Bindungsmotive in einem Molekül kombiniert werden können, ohne daß die Sequenzspezifität der jeweiligen Erkennungsdomänen verloren geht.

Wir berichten hier über ein „Haarnadel“-Polyamid, das mit einem Nucleotid-Undecamer verknüpft wurde. Dieses Konjugat bindet bei subnanomolaren Konzentrationen spezifisch und gleichzeitig an die große und die kleine DNA-Furche. Die Verknüpfung des Pyrimidin-Oligonukleotids 5'-TTTTTT<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>C-TTT-3' über einen Linker aus zwölf Atomen in der Kette mit dem Polyamid ImPyPy $\gamma$ ImPyPy $\beta$  ( $\beta = \beta$ -Alanin) ermöglicht die Erkennung eines 16 Basenpaare langen Segmentes einer DNA-Doppelhelix. Hierbei wird jeweils spezifisch ein Pyrrol/Imidazol-Polyamid-DNA-Komplex in der kleinen Furche sowie eine Tripelhelix in der großen Furche gebildet (Abb. 1) und durch 10 Wasserstoffbrückenbindungen zur Erkennung von 5 Basenpaaren in der kleinen Furche (5'-TGACA-3') bzw. 22 Wasserstoffbrückenbindungen zur Erkennung von 11 Basenpaaren in der großen Furche (5'-AAAAAAGGAAA-3') stabilisiert.

Das am C-Terminus mit einer freien Aminogruppe versehene Polyamid ImPyPy $\gamma$ ImPyPy $\beta$  wurde durch Festphasensynthese<sup>[6, 7]</sup> hergestellt. Umsetzung mit Essigsäureanhydrid liefert das Polyamid **1**, das als Standard dient. Reaktion der freien Aminogruppe von ImPyPy $\gamma$ ImPyPy $\beta$  mit festphasengebundenem *N*-

[\*] Prof. P. B. Dervan, J. W. Szewczyk, E. E. Baird  
Arnold and Mabel Beckman Laboratories of Chemical Synthesis  
California Institute of Technology  
Pasadena, CA 91125 (USA)  
Telefax: Int. + 818/683-8753

[\*\*] Wir danken den National Institutes of Health für die Unterstützung (GM-27681) sowie dem Howard Hughes Medical Institute für ein Doktorandenstipendium (E. E. B.).