

Durch die schnelle Umsetzung von Fettsäuren nach Beschädigung der Zellen sind *A. formosa* und *T. rotula* in der Lage, sehr hohe lokale Konzentrationen der Verteidigungsmetaboliten **5** und **6** oder strukturverwandter Michael-Acceptoren wie **9** aufzubauen. Diese enzymatischen Mechanismen führen dazu, dass die reaktiven Aldehyde direkt gegen die jeweiligen Fraßfeinde gerichtet sind, die durch ihre Tätigkeit die Verteidigung der Diatomeen aktivieren. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die fettsäureabbauenden Enzyme auch noch im Verdauungstrakt der jeweiligen Fraßfeinde aktiv sind.^[15] Durch derartige Mechanismen könnten sogar die hohen Konzentrationen von ca. 10 µM **5** oder **6** aufgebaut werden, die zur effektiven Verringerung des Bruterfolgs von Copepoden nötig sind.^[1]

In den hier untersuchten Diatomeen werden damit die zellulären Ressourcen in die Produktion von C₂₀-Fettsäuren investiert, die nur bei Bedarf für die chemische Verteidigung aktiviert werden. Die energieaufwändige Produktion von Sekundärmetaboliten zur konstitutiven Verteidigung kann damit verringert werden, und gleichzeitig ist das Risiko der Selbstvergiftung durch aggressive Metaboliten minimiert. Die Erforschung von chemischen Verteidigungsmechanismen in planktonischen Mikroorganismen ist noch in den Anfängen, und die hier vorgestellte dynamische Verteidigungsstrategie kann zu einem genaueren Verständnis der komplexen Prozesse in diesem Lebensraum beitragen.

Experimentelles

Allgemeines: *A. formosa* (SAG, Universität Göttingen) wurde wie beschrieben kultiviert;^[5] *T. rotula* (von S. Poulet, Roscoff, Frankreich) wurde in künstlichem Seewasser^[16] als stehende Kultur bei 19 °C (Tag:Nacht 14:10) kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation konzentriert. Alle Versuche wurden mit konzentrierten Zellsuspensionen im Kulturmedium durchgeführt. Die zellfreien Extrakte wurden wie beschrieben hergestellt.^[2]

Eingegangen am 7. Juni 2000 [Z15234]

- [1] A. Miralto, G. Barone, G. Romano, S. A. Poulet, A. Ianora, G. L. Russo, I. Buttino, G. Mazzarella, M. Laabir, M. Cabrini, M. G. Giacobbe, *Nature* **1999**, 402, 173–176.
- [2] G. Pohnert, W. Boland, *Tetrahedron* **1996**, 52, 10073–10082.
- [3] M. Hombeck, G. Pohnert, W. Boland, *Chem. Commun.* **1999**, 243–244.
- [4] T. Wendel, F. Jüttner, *Phytochemistry* **1996**, 41, 1445–1449.
- [5] M. Hombeck, W. Boland, *Tetrahedron* **1998**, 54, 11033–11042.
- [6] 20 µL des zellfreien Extraktes von *A. formosa* wurden direkt oder nach Zugabe von 6 µg mL⁻¹ [5,6,8,9,11,12,14,15-²H₆]Arachidonsäure **1** (Sigma, Deisenhofen) RP-HPLC-chromatographisch untersucht (Detektion: Finnigan LCO mit Finnigan-LC/MS-APCI-Interface, Vaporizer 460 °C). Die spektroskopischen und chromatographischen Eigenschaften des *A. formosa*-Metaboliten stimmen mit denen von synthetischem **9** überein.
- [7] Abfangexperimente wurden wie beschrieben durchgeführt,^[2] und die Identität des Intermediats wurde durch Vergleich der HPLC/MS-Eigenschaften mit denen reiner 12-Hydroxyeicosatetraensäure (SIG-MA, Deisenhofen) überprüft.
- [8] **5** und **6** wurden durch Festphasenmikroextraktion (SPME; D. Spiteller, G. Spiteller, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 595–597; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 583–585) aus zellfreien Extrakten von *T. rotula* mit und ohne 6 µg mL⁻¹ [²H₆]Arachidonsäure **1** angereichert und mit GC/MS analysiert.
- [9] a) E. Blee, *Prog. Lipid Res.* **1998**, 37, 33–72; b) S. Tahara, S. Kasai, M. Inoue, J. Kawabata, J. Mizutani, *Experientia* **1994**, 50, 137–141.

- [10] a) W. H. Gerwick, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1211, 243–255; b) W. Boland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 37–43.
- [11] Nach Konzentration der Zellen durch Zentrifugation wurde die Bildung von Lyaseprodukten durch Einstellen von pH 1 mit 2N HCl verhindert. Bei pH 1 entstand 12-ODTE **9** nicht; 96 % an **9** konnten nach analoger Behandlung einer synthetischen Referenzprobe bei pH 1 wiedergefunden werden. Die konzentrierte Zellsuspension (6.4 × 10⁶ Zellen mL⁻¹) wurde mit Ultraschall behandelt (eine lichtmikroskopische Beurteilung zeigt, dass 80 % der Zellen zerstört sind), zentrifugiert und mit HPLC/MS untersucht. Keine nachweisbare Menge an **9** wurde in intakten Zellen gefunden. Kinetische Versuche wurden nach Behandlung der Zellen mit Ultraschall (siehe oben) im neutralen Medium durchgeführt. Die Produktion von **9** wurde für die kinetischen Messungen zum jeweiligen Zeitpunkt durch Einstellung von pH 1 der Proben gestoppt. Für kinetische Messungen mit *T. rotula* wurden **5** und **6** mit CH₂Cl₂ extrahiert und per GC/MS quantifiziert.
- [12] Die fungizide Wirkung wurde nach Standardmethoden (S. Ohta, M. Makino, K. Nagai, H. Zenda, *Biol. Pharm. Bull.* **1996**, 19, 308–310) bestimmt. 12-ODTE **9** wies gegenüber *Aspergillus nidulans* etwa ein Zehntel der Aktivität von Benzalkoniumchlorid auf.
- [13] E. van Donk, J. Ringelberg, *Freshwater Biol.* **1983**, 13, 241–251.
- [14] I. Schnitzler, G. Pohnert, M. E. Hay, W. Boland, *Oecologia* **2001**, im Druck.
- [15] a) G. V. Wolfe, M. Steinke, G. O. Kirst, *Nature* **1997**, 387, 894–897; b) G. V. Wolfe, *Biol. Bull.* **2000**, 198, 225–244.
- [16] H. Müller, *Arch. Hydrobiol. Suppl.* **1972**, 38, 399–484.
- [17] K. C. Nicolaou, J. Y. Ramphal, Y. Abe, *Synthesis* **1989**, 898–901.
- [18] P. H. Naccache, Y. Leblanc, J. Rokach, P. Patrignani, B. F. de Lacroix, P. Borgeat, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 1133, 102–106.

Kombinatorische Festphasensynthese von multivalenten cyclischen Neoglycopeptiden**

Valentin Wittmann* und Sonja Seeberger

Professor Horst Kessler gewidmet

Die molekulare Erkennung von Kohlenhydraten durch Kohlenhydrat-bindende Proteine (Lectine) ist die Basis zahlreicher interzellulärer Erkennungsprozesse.^[1] Hochaffine Lectinliganden sind von großem medizinischem Interesse in der Diagnostik und Manipulation solcher Prozesse.^[2] Individuelle Kohlenhydratepitope (in der Regel Mono- bis Pentasaccharide) werden von Lectinen allerdings meist nur mit niedriger Affinität (Dissoziationskonstanten im milli- bis mikromolaren Bereich) und zum Teil geringer Spezifität gebunden.^[3] Da viele membranständige Lectine mehrere

[*] Dr. V. Wittmann, Dipl.-Chem. S. Seeberger
Institut für Organische Chemie
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Marie-Curie-Straße 11, 60439 Frankfurt (Deutschland)
Fax: (+49) 69-798-29148
E-mail: wittmann@chemie.uni-frankfurt.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. Wir danken Prof. Joachim W. Engels für seine Unterstützung und der Degussa-Hüls AG für Aminosäurespenden. Verwendete Abkürzungen werden in Lit. [25] erwähnt.

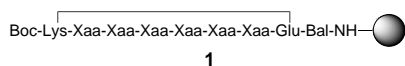
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können vom Autor angefordert werden.

Bindungsstellen aufweisen oder in oligomerer oder gehäufte Form vorliegen,^[4] ist die Erzeugung multivalenter Kohlenhydratderivate ein Erfolg versprechender Ansatz, um zu effektiven Lectinliganden zu gelangen.^[5, 6]

Verschiedene Strategien wurden beschrieben, um die für eine hohe Avidität eines multivalenten Liganden notwendige Bildung einer ausreichenden Zahl von Wechselwirkungen zu erreichen. Glycopolymere^[7] können beispielsweise große Bereiche von Zelloberflächen abdecken und mehrere membranständige Lectine überbrücken („statistische“ Multivalenz). Kleine oligovalente Kohlenhydratderivate (Minicluster)^[6] dagegen binden bevorzugt an mehrere räumlich benachbarte Bindungsstellen eines einzelnen (oligomeren) Lectins und können an Lectine mit bekannter 3D-Struktur angepasst werden („gezielte“ Multivalenz).^[8] Sind die Kohlenhydratepitope dabei durch ein starres Gerüst miteinander verbunden, erhält man besonders affine Liganden – vorausgesetzt, die für eine mehrzählige Bindung notwendige Geometrie liegt vor.^[5] Zudem können konformativ eingeschränkte Minicluster prinzipiell zwischen verschiedenen multivalenten Lectinen mit gleicher Kohlenhydratspezifität, aber unterschiedlicher Anordnung der Bindungsstellen differenzieren. Ist die räumliche Struktur des zu untersuchenden Lectins unbekannt, muss – insbesondere beim Einsatz konformativ eingeschränkter „Linker“ – eine große Zahl an potentiellen Liganden synthetisiert und getestet werden, um die erforderliche Anordnung der Zuckerreste zu ermitteln.

Wir beschreiben hier ein Konzept zur Generierung von Bibliotheken aus konformativ eingeschränkten Miniclustern, das folgende Schritte umfasst: a) „Split-Mix“-Synthese^[9] einer Bibliothek aus Gerüstmolekülen mit Seitenketten-Aminogruppen in unterschiedlicher Zahl und räumlicher Anordnung, b) Anknüpfung mehrerer identischer Kohlenhydratliganden an die Aminogruppen.

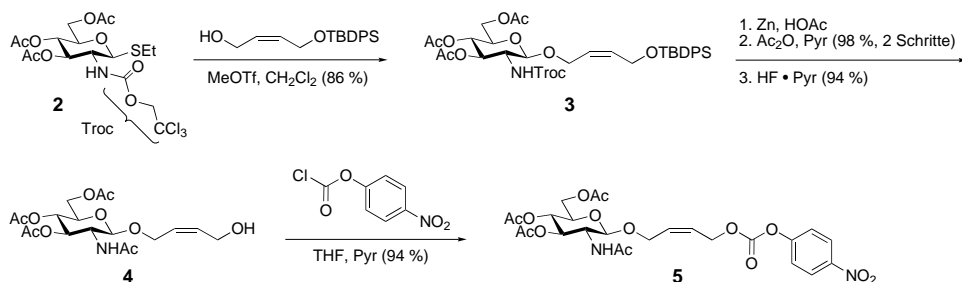
Als Gerüste zur multivalenten Präsentation der Kohlenhydratliganden haben wir cyclische Peptide der allgemeinen Formel **1** (Bal = β -Alanin) gewählt, in denen die Reste Xaa kombinatorisch variiert werden.^[10] Durch Einsatz kommerziell erhältlicher D- und L-konfigurierter Aminosäuren lässt



sich leicht ein hohes Maß an konformativer Diversität erzeugen.^[11] Diaminosäuren mit Ddv-geschützten^[12] Seitenketten variabler Länge dienen zur Anbindung der Zucker. Hierzu wurde ein neuer, auf der Aloc-Schutzgruppe^[13] basierender Linker vom Urethantyp entwickelt. Im Unterschied zu Glycosylierungen mit festphasengebundenen Peptiden^[14] verläuft die Urethanbildung in praktisch quantitativer Ausbeute. Außerdem lassen sich im Anschluss an einen Bindungstest an fester Phase die Kohlenhydrate von den

seitenkettencyclisierten Peptiden Palladium-katalysiert wieder absplalten. Dadurch reduziert sich die beim Arbeiten nach der Split-Mix-Methode notwendige Analyse der an einzelne Harzkugeln gebundenen Verbindungen auf eine automatisierte Mikrosequenzierung (Edman-Abbau) unter Standardbedingungen.

Schema 1 zeigt die Synthese des als *p*-Nitrophenylcarbonat aktivierten Kohlenhydrat-Linker-Derivats **5**, das zur Anknüpfung von *N*-Acetylglucosaminresten an die Cyclopeptide diene. Umsetzung des Glycosyldonors **2**^[15] mit mono-



Schema 1. Synthese des als *p*-Nitrophenylcarbonat aktivierten Kohlenhydratderivats **5**.

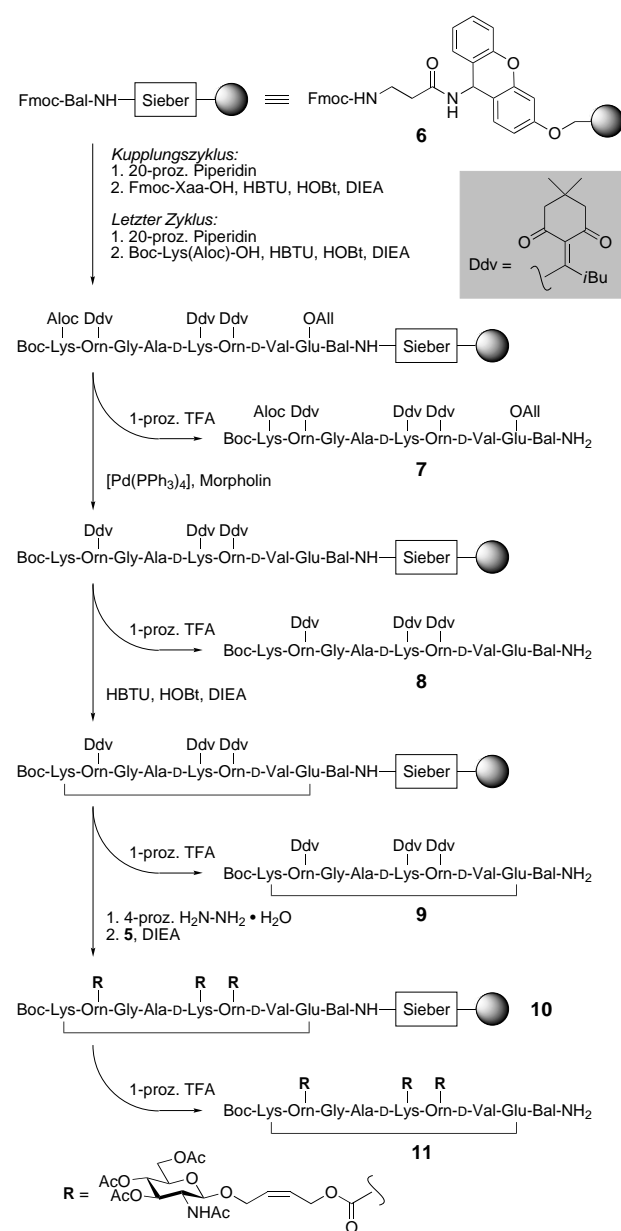
TBDPS-geschütztem *cis*-But-2-en-1,4-diol unter Methyltri-*n*-butylammoniumkatalyse lieferte das β -konfigurierte O-Glycosid **3** in hoher Ausbeute. Austausch der Troc-Schutzgruppe gegen eine Acetylgruppe und anschließende Abspaltung der TBDPS-Gruppe mit HF-Pyridin-Komplex führten zum *N*-Acetylglucosaminderivat **4**. Kondensation mit Chlorameisensäure-*p*-nitrophenylester ergab schließlich das aktivierte Carbonat **5** als eine kristalline, bei Raumtemperatur lagerbare Substanz (Tabelle 1).

Tabelle 1. Ausgewählte physikalische Daten von **5** und **12**.

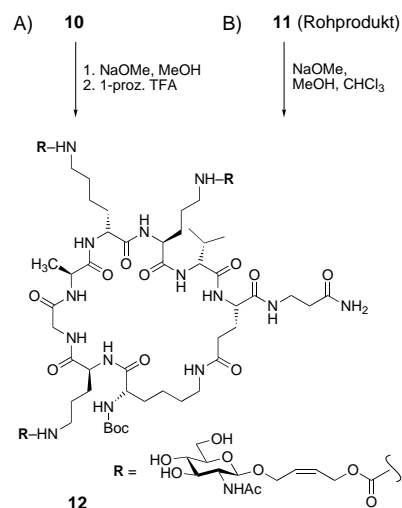
5: R_f = 0.43 (Kieselgel, EtOAc); Schmp. 133 °C (EtOAc/*n*-Hexan); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ = 8.29–8.25 (m, 2H, arom. H), 7.40–7.36 (m, 2H, arom. H), 5.85–5.75 (m, 2H, Vinyl-H), 5.64 (d, J = 8.7 Hz, 1H, NH), 5.28 (dd, J = 9.3, 10.6 Hz, 1H, H-3), 5.05 (dd, J = 9.3, 10.0 Hz, 1H, H-4), 4.90–4.79 (m, 2H, Allyl-H), 4.75 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-1), 4.44–4.29 (m, 2H, Allyl-H), 4.22 (dd, J = 4.7, 12.3 Hz, 1H, H-6a), 4.13 (dd, J = 2.5, 12.3 Hz, 1H, H-6b), 4.83 (ddd, J = 8.3, 8.7, 10.6 Hz, 1H, H-2), 3.69 (ddd, J = 2.5, 4.7, 10.0 Hz, 1H, H-5), 2.06 (s, 3H, C(O)CH₃), 2.01 (s, 3H, C(O)CH₃), 2.00 (s, 3H, C(O)CH₃), 1.93 (s, 3H, C(O)CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ = 170.8, 170.6, 170.2, 169.3, 155.4, 152.4, 145.4, 131.0 u. 125.8 (olefin. C), 125.3 u. 121.8 (aromat. CH), 99.5 (C-1), 72.2 (C-3), 71.8 (C-5), 68.6 (C-4), 64.6 u. 64.2 ($\text{CH}_2^{\text{allyl}}$), 62.0 (C-6), 54.7 (C-2), 23.3 (CH₃), 20.67 (CH₃), 20.61 (CH₃), 20.55 (CH₃); C, H, N-Analyse: ber. für $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_{14}$: C 51.55, H 5.19, N 4.81; gef. C 51.52, H 5.28, N 4.79

12: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, 298 K): Boc-Lys¹: δ = 6.767 (αNH), 3.917 (αH), 1.565 (βH_2), 1.27–1.17 (γH_2), 1.379 (δH_2), 3.083 u. 3.003 (ϵH_2), 7.688 (ϵNH), 1.304 (Boc); Orn: δ = 8.262 (αNH), 4.254 (αH), 1.722 u. 1.633 (βH_2), 1.47–1.38 (γH_2), 3.023 (δH_2), 6.791 (δNH); Gly³: δ = 8.201 (NH), 3.855 u. 3.788 (αH_2); Ala⁴: δ = 7.999 (NH), 4.203 (αH), 1.277 (βH_2); D-Lys⁵: δ = 8.148 (αNH), 4.185 (αH), 1.690 u. 1.615 (βH_2), 1.248 u. 1.215 (γH_2), 1.382 (δH_2), 2.998 (ϵH_2), 6.733 (ϵNH); Orn: δ = 8.316 (αNH), 4.254 (αH), 1.731 u. 1.633 (βH_2), 1.478 u. 1.420 (γH_2), 3.032 (δH_2), 6.767 (δNH); D-Val⁷: δ = 8.136 (NH), 3.982 (αH), 2.041 (βH), 0.820 u. 0.786 (2 γH_2); Glu⁸: δ = 8.201 (NH), 4.107 (αH), 1.831 u. 1.999 (βH_2), 2.201 u. 2.136 (γH_2); Bal⁹: δ = 8.049 (NH), 2.41–2.33 (αH_2), 3.40–3.30 (βH_2); 3 äquival. GlcNAc: δ = 8.103 (NH), 4.427 (H-1), 3.588 (H-2), 3.429 (H-3), 3.38–3.31 (H-4, H-5), 3.810 u. 3.651 (2 H-6), 1.927 (Ac); 5.72–5.60 (6 Vinyl-H), 4.52–4.48 u. 4.30–4.18 (je 6 Allyl-H); ESI-MS ($M+H^+$): ber. 1963.0, gef. 1963.7

Der Aufbau der cyclischen Neoglycopeptide wurde am Beispiel der Modellverbindung **12** optimiert (Schemata 2 und 3, Tabelle 1). Die Anknüpfung der ersten Aminosäure an das Trägermaterial (TentaGel) erfolgte mit dem Sieber-Linker.^[16] Dadurch war es möglich, auf jeder Stufe der Reaktionssequenz das jeweilige Produkt durch Behandlung mit einer 1-proz. Lösung von TFA in Dichlormethan abzuspalten (\rightarrow **7–9**, **11**, **12**) und den Syntheseverlauf durch analytische HPLC (Abbildung 1) und anschließende ESI-MS zu verfolgen. Die Synthese des linearen Peptids erfolgte nach der Fmoc-Strategie;^[17] lediglich im letzten Kupplungsschritt kam eine Boc-geschützte Aminosäure zum Einsatz. Zum Schutz der ω -NH₂-Gruppen von Lysin und Ornithin bevorzugten wir die Ddv-Gruppe,^[12] die sich von der häufig eingesetzten Dde-Gruppe^[18] durch eine höhere Stabilität unter den Bedingungen der Fmoc-Abspaltung auszeichnet. Zur Vorbereitung des Cyclisierungsschritts wurden der Allylester und die Aloc-



Schema 2. Festphasensynthese des cyclischen Neoglycopeptids **11**.



Schema 3. Synthese des entschützten Neoglycopeptids **12**.

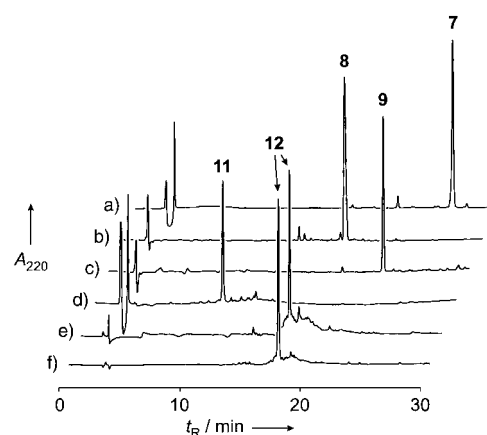


Abbildung 1. RP-HPLC-Analyse der rohen Peptide **7–9**, **11** und **12**, erhalten nach Schema 2 (a–d), Schema 3, Weg A (e) und Schema 3, Weg B (f).

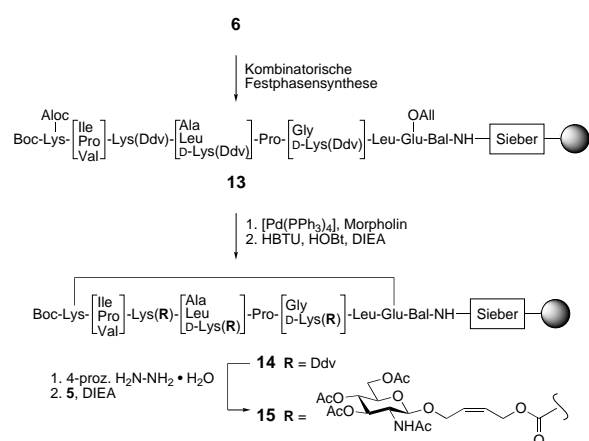
Schutzgruppe simultan durch Palladium(0)-katalysierte Allylübertragung auf Morpholin als Abfangnucleophil entfernt.^[13]

Zugabe einer Mischung aus HBTU, HOBt und DIEA führte zum gewünschten Cyclopeptid, das nach Abspaltung vom Harz in ausgezeichneter Reinheit vorlag (Abbildung 1 c). Nebenprodukte, hervorgerufen durch die Reaktion von Kupplungsreagens mit der freien Aminogruppe^[19] (Guanylierung), wurden nicht beobachtet. Andere Cyclisierungsmethoden (*N,N'*-Diisopropylcarbodiimid/HOBt oder Aktivierung der Carbonsäure als Pfp-Ester^[20]) waren deutlich weniger effektiv. Anschließend wurden die Ddv-Gruppen abgespalten, wobei sich in dem von uns angewandten Batch-Verfahren die Verwendung von 4-proz. Hydrazinhydrat als vorteilhafter gegenüber der in der Literatur empfohlenen^[12] 2-proz. Lösung herausstellte.^[21]

Die Anknüpfung der Zucker erfolgte durch Zusatz eines Überschusses (5 Äquiv. pro freie NH₂-Gruppe) an **5** in Gegenwart von DIEA. Nach beendeter Reaktion wurde die Abwesenheit freier Aminogruppen durch den Kaiser-Test^[22] und Zugabe von Bromphenolblau^[23] verifiziert. Zur Desacetylierung der Zucker wurde **10** mit einer Lösung von Natriummethanolat in Methanol behandelt (Schema 3,

Weg A). Nach Abspaltung vom Harz erhielt man das in Abbildung 1 e gezeigte HPL-Chromatogramm, in dem neben dem gewünschten Glycopeptid **12** deutliche Mengen an Nebenprodukten erkennbar sind. Da deren Auftreten möglicherweise mit der Säurelabilität von **12** verknüpft ist^[24] und somit nicht die tatsächlichen Verhältnisse am Harz widerspiegelt werden, haben wir zum Vergleich die Desacetylierung nach der Abspaltung vom Träger vorgenommen (Schema 3, Weg B). Das Chromatogramm des so erhaltenen Rohproduktes (Abbildung 1 f) zeigt nur noch geringe Mengen an Nebenprodukt und demonstriert die hohe Effizienz der gesamten Synthese.

Um zu verifizieren, dass die beschriebenen Reaktionsbedingungen, speziell die des kritischen Cyclisierungsschritts,



Schema 4. Split-Mix-Synthese der Neoglycopeptid-Bibliothek **15**. An den drei mit eckigen Klammern gekennzeichneten Positionen wurde das Syntheseharz auf zwei oder drei Reaktionsgefäße verteilt und jeweils eine der angegebenen Aminosäuren angekuppelt.

auch auf andere Peptidsequenzen übertragbar sind, synthetisierten wir die aus 18 Verbindungen bestehende Neoglycopeptid-Bibliothek **15** nach der Split-Mix-Methode (Schema 4). Wiederum wurde der Verlauf der Synthese durch Entnahme kleiner Harzproben und Analyse der Abspaltprodukte durch HPLC in Kombination mit ESI-MS verfolgt (Abbildung 2, Tabelle 2). In allen Chromatogrammen konn-

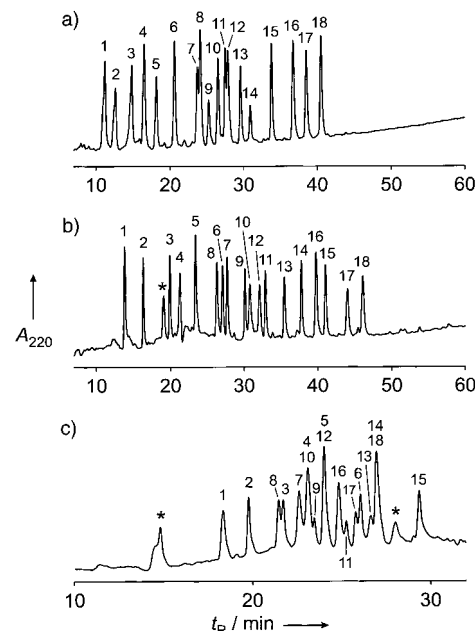
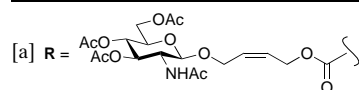


Abbildung 2. RP-HPLC-Analyse der nach Behandlung von a) **13**, b) **14** und c) **15** mit 1-proz. TFA erhaltenen Verbindungsbibliotheken. Die Zuordnung der Peaks erfolgte massenspektrometrisch und ist in Tabelle 2 angegeben. Peaks, hervorgerufen von Peptidderivaten gleicher Sequenz, tragen identische Nummern. Die mit Sternchen gekennzeichneten stammen von nichtpeptidischen Verunreinigungen.

Tabelle 2. Berechnete und experimentell gefundene Massen der nach Behandlung von **15** mit 1-proz. TFA erhaltenen Bibliothek von cyclischen Neoglycopeptiden (die Peaknummern entsprechen der Zuordnung in Abbildung 2c).

Peak	Verbindung ^[a]	[M+H] ⁺	
		ber.	gef.
1	<i>cyclo</i> [Boc-Lys-Pro-Lys(R)-Ala-Pro-Gly-Leu-Glu]-Bal-NH ₂	1434.7	1435.4
2	<i>cyclo</i> [Boc-Lys-Val-Lys(R)-Ala-Pro-Gly-Leu-Glu]-Bal-NH ₂	1436.7	1437.3
8	<i>cyclo</i> [Boc-Lys-Pro-Lys(R)-D-Lys(R)-Pro-Gly-Leu-Glu]-Bal-NH ₂	1934.9	1935.7
3	<i>cyclo</i> [Boc-Lys-Ile-Lys(R)-Ala-Pro-Gly-Leu-Glu]-Bal-NH ₂	1450.8	1451.2
7	<i>cyclo</i> [Boc-Lys-Pro-Lys(R)-Ala-Pro-D-Lys(R)-Leu-Glu]-Bal-NH ₂	1949.0	1950.0
4	<i>cyclo</i> [Boc-Lys-Pro-Lys(R)-Leu-Pro-Gly-Leu-Glu]-Bal-NH ₂	1476.8	1477.4
10	<i>cyclo</i> [Boc-Lys-Val-Lys(R)-D-Lys(R)-Pro-Gly-Leu-Glu]-Bal-NH ₂	1937.0	1938.0
9	<i>cyclo</i> [Boc-Lys-Val-Lys(R)-Ala-Pro-D-Lys(R)-Leu-Glu]-Bal-NH ₂ oder <i>cyclo</i> [Boc-Lys-Ile-Lys(R)-D-Lys(R)-Pro-Gly-Leu-Glu]-Bal-NH ₂	1951.0	1952.0
5	<i>cyclo</i> [Boc-Lys-Val-Lys(R)-Leu-Pro-Gly-Leu-Glu]-Bal-NH ₂	1478.8	1479.4
12	<i>cyclo</i> [Boc-Lys-Ile-Lys(R)-D-Lys(R)-Pro-Gly-Leu-Glu]-Bal-NH ₂ oder <i>cyclo</i> [Boc-Lys-Val-Lys(R)-Ala-Pro-D-Lys(R)-Leu-Glu]-Bal-NH ₂	1951.0	1952.0
16	<i>cyclo</i> [Boc-Lys-Pro-Lys(R)-D-Lys(R)-Pro-D-Lys(R)-Leu-Glu]-Bal-NH ₂	2449.2	2450.1
11	<i>cyclo</i> [Boc-Lys-Ile-Lys(R)-Ala-Pro-D-Lys(R)-Leu-Glu]-Bal-NH ₂	1965.0	1966.2
17	<i>cyclo</i> [Boc-Lys-Val-Lys(R)-D-Lys(R)-Pro-D-Lys(R)-Leu-Glu]-Bal-NH ₂	2451.2	2452.8
6	<i>cyclo</i> [Boc-Lys-Ile-Lys(R)-Leu-Pro-Gly-Leu-Glu]-Bal-NH ₂	1492.8	1493.3
13	<i>cyclo</i> [Boc-Lys-Pro-Lys(R)-Leu-Pro-D-Lys(R)-Leu-Glu]-Bal-NH ₂	1991.0	1991.8
14	<i>cyclo</i> [Boc-Lys-Val-Lys(R)-Leu-Pro-D-Lys(R)-Leu-Glu]-Bal-NH ₂	1993.0	1993.6
18	<i>cyclo</i> [Boc-Lys-Ile-Lys(R)-D-Lys(R)-Pro-D-Lys(R)-Leu-Glu]-Bal-NH ₂	2465.2	2465.9
15	<i>cyclo</i> [Boc-Lys-Ile-Lys(R)-Leu-Pro-D-Lys(R)-Leu-Glu]-Bal-NH ₂	2007.0	2008.0



ten die erwarteten 18 Produkte identifiziert werden. Es zeigte sich, dass alle Peptide ohne nennenswerte Nebenproduktbildung cyclisierten. Insbesondere konnten wir bei der Analyse von **14** massenspektrometrisch weder Edukte noch lineare oder cyclische Dimere detektieren.

Die vorgestellte Synthesestrategie eignet sich zum effizienten Aufbau von Bibliotheken aus Neoglycopeptiden, die beliebige Kohlenhydratligenanden in unterschiedlicher Anzahl und unterschiedlichen Distanzen zueinander präsentieren. Die konvergente Vorgehensweise erlaubt es, ohne großen Aufwand mit einer einmal bereitgestellten Cyclopeptidbibliothek durch Ankuppeln entsprechender Kohlenhydratligenanden verschiedene Lectine zu untersuchen.

Experimentelles

Die Festphasenpeptidsynthese erfolgte an NovaSyn-TG-Sieber-Harz (Novabiochem) (Abkürzung: Sieber-TG) nach üblichen Vorschriften^[17] (Beladung nach Immobilisierung der ersten Aminosäure: 0.17 mmol g⁻¹). Kupplungen wurden in NMP durchgeführt. Zur Abspaltung wurden Festphasenaliquote (ca. 5 mg) wiederholt mit TFA/*i*Pr₃SiH/CH₂Cl₂ (1:1:98) behandelt. Produkte, die in der Abspaltung schwerlöslich waren, wurden mit einem Lösungsmittel von der festen Phase gewaschen. Vor dem Einengen wurden die Abspalllösungen mit Pyridin neutralisiert. Analytische HPLC erfolgte an C18-RP-Säulen (250 × 4 mm) mit linearen Gradienten von Acetonitril in Wasser/0.1-proz. TFA bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL min⁻¹. Produktpeaks wurden durch ESI-MS charakterisiert. Experimentelle Details zur Synthese von **8**, **9**, **11** und **12** sind den Hintergrundinformationen zu entnehmen.

Eingegangen am 16. Mai,
veränderte Fassung am 4. August 2000 [Z15129]

- [1] *Essentials of Glycobiology* (Hrsg.: A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, J. Marth), Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, **1999**.
- [2] a) Y. C. Lee, R. T. Lee, *J. Biomed. Sci.* **1996**, 3, 221–237; b) J. M. Gardiner, *Expert Opin. Invest. Drugs* **1998**, 7, 405–411; c) C. A. Lingwood, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, 695–700.
- [3] a) H.-J. Gabius, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 243, 543–576; b) H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 637–674.
- [4] J. M. Rini, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, 24, 551–577.
- [5] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2908–2953; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2754–2794.
- [6] a) R. Roy, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, 6, 692–702; b) L. L. Kiessling, N. L. Pohl, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 71–77; c) *Neoglycoconjugates. Preparation and Applications* (Hrsg.: Y. C. Lee, R. T. Lee), Academic Press, San Diego, **1994**.
- [7] a) G. B. Sigal, M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 3789–3800; b) R. Roy, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **1996**, 8, 79–99; c) M. Kanai, K. H. Mortell, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 9931–9932.
- [8] a) P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvery, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle, *Nature* **2000**, 403, 669–672; b) E. Fan, Z. Zhang, W. E. Minke, Z. Hou, C. L. M. J. Verlinde, W. G. J. Hol, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2663–2664.
- [9] K. S. Lam, M. Lebl, V. Krchňák, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 411–448.
- [10] Zur Verwendung cyclischer Peptide als Gerüste siehe: a) U. Sprengard, M. Schudok, W. Schmidt, G. Kretzschmar, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 359–362; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 321–324; b) H. Franzky, M. K. Christensen, R. M. Jørgensen, M. Meldal, H. Cordes, S. Mouritsen, K. Bock, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 21–40; c) G. Tuchscherer, M. Mutter, *Pure Appl. Chem.* **1996**, 68, 2153–2162; d) J. Eichler, A. W. Lucka, R. A. Houghton, *Peptide Res.* **1994**, 7, 300–307.
- [11] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1440–1456; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1374–1389; zit. Lit.
- [12] S. R. Chhabra, B. Hothi, D. J. Evans, P. D. White, B. W. Bycroft, W. C. Chan, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 1603–1606.
- [13] H. Kunz, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1984**, 96, 426–427; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, 23, 436–437.
- [14] A. Schleyer, M. Meldal, M. Renil, H. Paulsen, K. Bock, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2064–2067; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1976–1978.
- [15] a) U. Ellervik, G. Magnusson, *Carbohydr. Res.* **1996**, 280, 251–260; b) M. Schultz, H. Kunz, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, 4, 1205–1220.
- [16] P. Sieber, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 2107–2110.
- [17] D. A. Wellings, E. Atherton, *Methods Enzymol.* **1997**, 289, 44–67.
- [18] B. W. Bycroft, W. C. Chan, S. R. Chhabra, N. D. Hone, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 778–779.
- [19] S. C. Story, J. V. Aldrich, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, 43, 292–296.
- [20] Bei dieser Cyclisierungsmethode wurde der Rink-Amid-Linker zur Ankuppung an das Harz verwendet und die ε-NH₂-Gruppe des am Ringschluss beteiligten Lysins mit der Mtt-Gruppe geschützt und nach Bildung des Pfp-Esters freigesetzt: D. Tumelty, M. C. Needels, V. V. Antonenko, P. R. Bovy in *Peptides: Chemistry, Structure, and Biology* (Hrsg.: P. T. P. Kaumaya, R. S. Hodges), Mayflower Scientific, Kingwinford, **1996**, S. 121–122.
- [21] Mit 2-proz. Hydrazinhydrat konnten selbst nach fünfmaliger Behandlung des Synthescharzes noch deutliche Mengen des Abspaltprodukts 3-Isobutyl-6,6-dimethyl-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-indazol UV-spektroskopisch (A₂₉₀) nachgewiesen werden.
- [22] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, 34, 595–598.
- [23] Beobachtung einzelner Harzkugeln unter einem Mikroskop.
- [24] Die Stabilität einer Glycosidbindung wird durch Acylierung des Kohlenhydrats erhöht: H. Kunz, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 1763–1765; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 1697.
- [25] Verwendete Abkürzungen: Aloc = Allyloxycarbonyl, Bal = β-Alanin, Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, Dde = 1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexylen)ethyl, Ddv = 1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexylen)isovaleryl, DIEA = Ethyldiisopropylamin, ESI-MS = Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie, Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, HBTU = *O*-Benzotriazol-1-yl-*N,N,N,N*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat, HOBt = 1-Hydroxybenzotriazol, Mtt = (4-Methylphenyl)diphenylmethyl, NMP = 1-Methyl-2-pyrrolidon, MeOTf = Trifluormethansulfonsäuremethylester, Pfp = Pentafluorphenyl, RP-HPLC = Umkehrphasen-HPLC, TBDPS = *tert*-Butyldiphenylsilyl, TFA = Trifluoressigsäure, Troc = 2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl.

„Remote Stereocontrol“ in der Organokupferchemie: hoch enantioselektive Synthese von Vinylallen durch 1,5-Substitution von Eninacetaten**

Norbert Krause* und Martin Purpura

Professor Henning Hopf zum 60. Geburtstag gewidmet

Vinylallene, eine spezielle Klasse von Allenen, sind aufgrund ihrer hohen Reaktivität und Stereoselektivität besonders interessante Substrate, z.B. für Diels-Alder-Reaktionen.^[1,2] So bieten sie im Unterschied zu herkömmlichen 1,3-Dienen nicht nur den Vorteil, ihre inhärente axiale Chiralität hoch stereoselektiv auf die im Verlauf der Cycloaddition neu

[*] Prof. Dr. N. Krause, Dr. M. Purpura
Lehrstuhl für Organische Chemie II der Universität
44221 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-755-3884
E-mail: nkrause@pop.uni-dortmund.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Europäischen Gemeinschaft (COST-D2) und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert.