

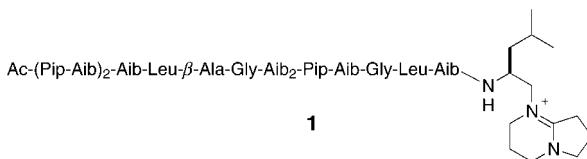
Die erste Totalsynthese von Efrapeptin C**

Micha Jost, Jörg-Christian Greie, Nina Stemmer, Sven David Wilking, Karlheinz Altendorf und Norbert Sewald*

Professor Peter Welzel zum 65. Geburtstag gewidmet

Die Efrapeptine sind eine Klasse von Peptidantibiotika, die von dem Pilz *Tolypocladium niveum* und weiteren Vertretern dieser Spezies als Mischung eng verwandter Sequenzanaloga produziert werden (Efrapeptine C–G).^[1] Sie sind Inhibitoren der F₁-ATPase und auch gegen den Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* aktiv.^[2] Die Efrapeptine sind reich an α,α -dialkylierten Aminosäuren und enthalten ein β -Alanin und mehrere Pipecolinsäurereste. Der C-Terminus trägt eine ungewöhnliche Kopfgruppe, die sich von Leucinol ableitet. Obwohl die Efrapeptine in zahlreichen biologischen Studien verwendet wurden,^[3] ist bisher noch keine chemische Totalsynthese beschrieben.^[4] Dies mag daran liegen, dass die Synthese von Peptiden, die einen hohen Anteil α,α -dialkylierter Aminosäuren aufweisen, durch unvollständige Kupplungen auf Grund von sterischer Hinderung erschwert ist.^[5] Da wir uns für die strukturellen und biologischen Eigenschaften der Efrapeptine interessieren, haben wir ein Projekt zur Synthese von Efrapeptin C und dessen Analoga begonnen.

Wir konnten Efrapeptin C **1** aus drei Fragmenten aufbauen: einem N-terminalen Fragment (Pip 1–Gly 8), einem mitt-



leren Fragment (Aib 9–Gly 13) und einem C-terminalen Fragment, das aus den Resten Leu 14–Aib 15 und der Kopfgruppe besteht. Zur Einführung der Aib-Reste in Festphasensynthesen haben wir eine zuerst von Meldal et al.^[6] beschriebene Strategie erfolgreich verbessert. Diese besteht aus der Acylierung der Harz-gebundenen Aminokomponente mit dem hoch reaktiven α -Azidoisobuttersäurechlorid (Azib-Cl) und anschließender Reduktion des Azids zum primären

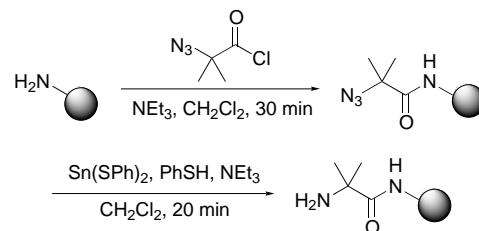
[*] Prof. Dr. N. Sewald, Dipl.-Chem. M. Jost, N. Stemmer, Dipl.-Chem. S. D. Wilking
Fakultät für Chemie
Universität Bielefeld
Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld (Deutschland)
Fax: (+49) 521-106-8094
E-mail: norbert.sewald@uni-bielefeld.de

Dr. J.-C. Greie, Prof. Dr. K. Altendorf
Fachbereich Biologie/Chemie
Universität Osnabrück
Barbarastraße 11, 49069 Osnabrück (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Die Autoren danken Dr. Holger Wenschuh für hilfreiche Diskussionen.

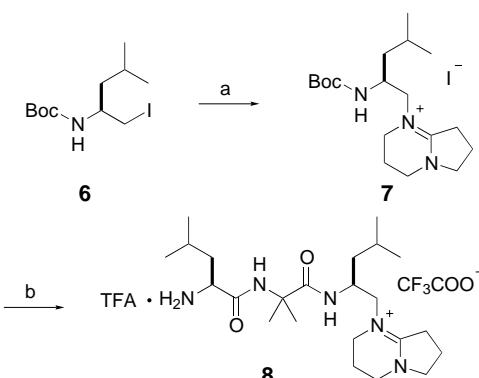
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Amin. Nach dem ursprünglichen Verfahren wird die Reduktion durch Behandlung mit DTT (DTT = 1,4-Dithio-D,L-threit) bei höherer Temperatur erreicht und benötigt Reaktionszeiten von bis zu sechs Stunden. Wir verwendeten Vilarrasas Reagens $[\text{Et}_3\text{NH}]^+[\text{Sn}(\text{SPh})_3]^-$,^[7] das gewöhnlich für die Reduktion von Alkyl- und Arylaziden genutzt wird. Die Anwendung dieses Reduktionsmittels stellt die Umsetzung des Azids innerhalb kurzer Reaktionszeiten bei Raumtemperatur sicher (Schema 1).^[8] Die Reduktion lässt sich leicht FT-IR-spektroskopisch verfolgen und war in allen untersuchten Fällen bereits nach wenigen Minuten vollständig.

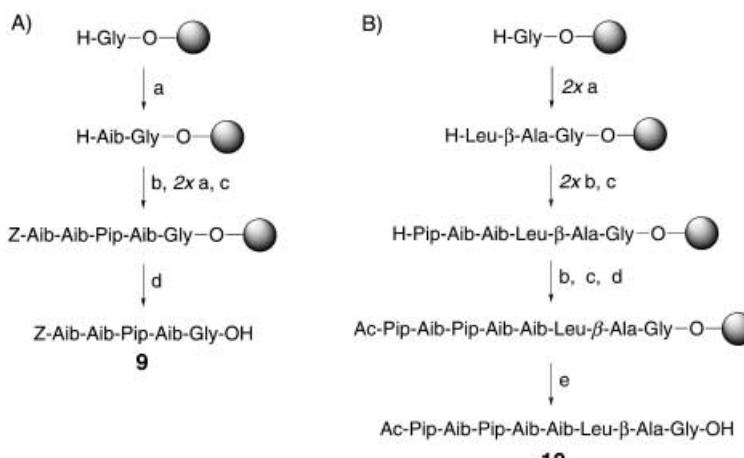


Schema 1. Einführung von Aib-Resten in Festphasensynthesen über Kupplung von Azib-Cl und nachfolgende Reduktion. Aib = α -Aminoisobuttersäure, Azib = α -Azidoisobutyryl.

Das C-terminale Fragment von Efrapeptin C **1** wurde ausgehend von α -Aminoisobuttersäure H-Aib-OH **2** synthetisiert. Säurekatalysierte Veresterung von **2** mit Allylalkohol ergab H-Aib-OAl **3** und anschließende Kupplung von Boc-Leu-OH mit **3** ergab das Dipeptid Boc-Leu-Aib-OAl **4**, welches C-terminal durch Allyltransfer auf Morpholin bei Anwesenheit von $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$ entschützt wurde, wobei Boc-Leu-Aib-OH **5** erhalten wurde.^[9] Die Synthese der Kopfgruppe (Schema 2) ging vom bekannten Iodid **6**^[10] aus, das DBN in heißem Toluol zu dem Amidiniumsalz **7** alkyliert.^[11] Die Boc-Gruppe in **7** wurde durch Behandlung mit TFA in Dichlormethan entfernt und das erhaltene Amin wurde anschließend unter Verwendung von N-HATU^[12] als Kupplungsreagens an **5** gekuppelt. Nach Abspaltung der Boc-Gruppe mit TFA wurde das C-terminale Fragment **8** durch



Schema 2. a) DBN, Toluol, Rückfluss, 75%; b) 1. TFA/CH₂Cl₂; 2. (1.2 Äquiv.), N-HATU (1.2 Äquiv.), DIPEA (2.2 Äquiv.), DMF; c) TFA/CH₂Cl₂, 27%. DBN = 1,4-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-en, N-HATU = 1-[Bis(dimethylamino)methyl]imidolumyl-1H-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridin-3-oxid-hexafluorophosphat, DIPEA = Diisopropylethylamin.

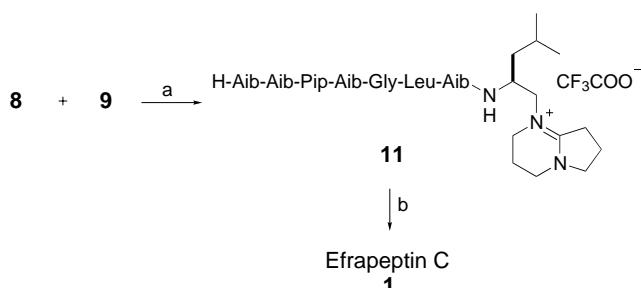


Schema 3. A) a) 1. Azib-Cl (15 Äquiv.), NEt₃ (22 Äquiv.), CH₂Cl₂; 2. Sn(SPh)₂ (10 Äquiv.), PhSH (30 Äquiv.), NEt₃ (50 Äquiv.), CH₂Cl₂; b) 1. Fmoc-Pip-OH (3 Äquiv.), PyBOP (3 Äquiv.), DIPEA (6 Äquiv.), DMF; 2. DBU/Piperidin, DMF; c) Z-OSu (10 Äquiv.), NEt₃ (25 Äquiv.), DMF/CH₂Cl₂; d) 1% TFA/CH₂Cl₂. B) a) 1. Fmoc-Xaa-OH (3 Äquiv.), TBTU (3 Äquiv.), DIPEA (6 Äquiv.), DMF; 2. DBU/Piperidin, DMF; b) 1. Azib-Cl (15 Äquiv.), NEt₃ (22 Äquiv.), CH₂Cl₂, 2. Sn(SPh)₂ (10 Äquiv.), PhSH (30 Äquiv.), NEt₃ (50 Äquiv.), CH₂Cl₂; c) 1. Fmoc-Pip-OH (3 Äquiv.), PyBOP (3 Äquiv.), DIPEA (6 Äquiv.), DMF; 2. DBU/Piperidin, DMF; d) Ac₂O (30 Äquiv.), DMAP (20 Äquiv.), CH₂Cl₂; e) 1% TFA/CH₂Cl₂, DBU = 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en, Pip = L-Pipecolinsäure, Z-OSu = N-(Benzoyloxycarbonyloxy)succinimid, PyBOP = Benzotriazol-1-yloxytritypyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, TBTU = 1-[Bis(dimethylamino)-methyliumyl]-1H-benzotriazol-3-oxidtetrafluoroborat.

präparative RP-HPLC isoliert. Verbindung **8** wurde bereits von Gupta et al.^[1] beschrieben. Sie entsteht durch Behandlung von Efrapeptin C **1** mit HCl.

Das mittlere und das N-terminale Fragment von Efrapeptin C wurden mit Festphasenmethoden unter Verwendung des sehr säurelabilen *o*-Chlortriyl-Harzes synthetisiert.^[13] Die Verwendung dieser Art von Harz ist entscheidend für den Erfolg der Synthese, da einige -Aib-Xaa-Peptidbindungen ausgesprochen säureempfindlich sind.^[14] Die Peptide **9** und **10** (Schema 3 A und B) wurden mit Ausnahme der Aib-Reste, die wie oben beschrieben mithilfe von Azib-Cl eingeführt wurden, nach der Fmoc-Strategie synthetisiert. Proteinogene Aminosäuren wurden mit TBTU als Kupplungsreagens eingeführt und PyBOP wurde für die Einführung von L-Pipecolinsäure genutzt.

N-HATU kam für den abschließenden Aufbau von **1** aus den drei Fragmenten als Kupplungsreagens zum Einsatz (Schema 4). **11** wurde durch Reaktion von **9** mit **8** und



Schema 4. a) 1. N-HATU, DIPEA, CH₂Cl₂/DMF, 2. H₂, Pd/C, MeOH/AcOH, 44%; b) **10** (1.3 Äquiv.), N-HATU (1.3 Äquiv.), DIPEA (2.3 Äquiv.), CH₂Cl₂/DMF, 67%.

Entfernung der Z-Gruppe erhalten. Schließlich erhielt die Kondensation von **10** mit **11** Efrapeptin C **1** als Trifluoracetat.

Das Produkt wurde durch ¹H-NMR-Spektroskopie und ESI-FT-ICR-MS charakterisiert.^[15] Seine Homogenität wurde durch RP-HPLC bewiesen. Um die Bioaktivität des synthetischen **1** zu zeigen, untersuchten wir die Hemmung der F₁-ATPase aus *E. coli* und ermittelten einen *K_i*-Wert im Bereich von 10 µM. Dieses Ergebnis stimmt gut mit einem von Wise et al.^[16] beschriebenen Wert von 21.5 µM für die aus Fermentationsbrühen isolierte Mischung der Efrapeptine überein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir zum ersten mal ein Mitglied der Peptidantibiotika-Klasse der Efrapeptine synthetisieren konnten, wobei wir eine effiziente Methode für die Einführung von Aib-Resten verwendeten. Die gesamte Sequenz wurde durch eine Kombination aus Lösungs- und Festphasensyntheseschritten mit Segmentkondensationen aufgebaut. Gegenwärtig nutzen wir diesen Syntheseweg für die Synthese einer Reihe von Efrapeptin-Analoga, die hinsichtlich ihrer Bioaktivität und konformativen Eigenschaften untersucht werden sollen, um so Struktur-Aktivitäts-Beziehungen abzuleiten.

eingegangen am 27. Mai 2002,
veränderte Fassung am 7. August 2002 [Z19491]

- [1] a) S. Gupta, S. B. Krasnoff, D. W. Roberts, J. A. A. Renwick, L. S. Brinen, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 707–709; b) S. Gupta, S. B. Krasnoff, D. W. Roberts, J. A. A. Renwick, L. S. Brinen, J. Clardy, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2306–2313.
- [2] a) J. P. Abrahams, S. K. Buchanan, M. J. van Raau, I. M. Fearnley, A. G. W. Leslie, J. E. Walker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 9420–9424; b) G. Nagaraj, M. V. Uma, M. S. Shivayogi, H. Balaraj, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 145–149.
- [3] Repräsentative Beispiele: a) A. R. Bandani, B. Amiri, T. M. Butt, R. Gordon-Weeks, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1510*, 367–377; b) M. Muroi, N. Kaneko, K. Suzuki, T. Nishio, T. Oku, T. Sato, A. Takatsuki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *227*, 800–809; c) V. N. Kasho, W. S. Allison, P. D. Boyer, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *300*, 293–301; d) G. E. Dean, P. J. Nelson, G. Rudnick, *Biochemistry* **1986**, *25*, 4918–4925; e) A. Matsuno-Yagi, Y. Hatefy, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 14031–14038.
- [4] Benedetti et al. berichteten über die Synthese des C-terminalen Pentapeptids von Efrapeptin C in vollständig blockierter Form: E. Benedetti, R. Iacovino, M. Saviano, J. Kamphuis, M. Crisma, F. Formaggio, V. Moretto, C. Toniolo, *Protein Pept. Lett.* **1996**, *3*, 283–288.
- [5] E. Frérot, J. Coste, A. Pantaloni, M.-N. Dufour, P. Jouin, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 259–270.
- [6] M. Meldal, M. A. Julian, A. M. Jansson, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2531–2534.
- [7] a) M. Bartra, F. Urpi, J. Vilarrasa, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5941–5944; b) M. Bartra, P. Romea, F. Urpi, J. Vilarrasa, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 587–594.
- [8] Vorschrift für die Einführung von Aib-Resten in Festphasensynthesen: Das Peptidyl-Harz (1 Äquiv.) wird in einer Lösung von NEt₃ (22 Äquiv., ca. 0.7 M) in CH₂Cl₂ gequollen und mit Azib-Cl (15 Äquiv.) versetzt. Die Mischung wird unter gelegentlichem Schütteln 30 min bei Raumtemperatur belassen. Das Harz wird mit CH₂Cl₂ (4 ×), DMF (4 ×) und erneut mit CH₂Cl₂ (4 ×) gewaschen. Thiophenol (30 Äquiv.) und NEt₃ (50 Äquiv.) werden zu einer Suspension von Sn(SPh)₂ (10 Äquiv., ca. 0.3 M) in CH₂Cl₂ gegeben. Nach 5 min wird die

- entstandene Mischung filtriert und das gelbe Filtrat wird zum Harzgebundenen Azid gegeben. Die Mischung wird unter gelegentlichem Schütteln 20 min bei Raumtemperatur belassen. Das Harz wird mit CH_2Cl_2 (4×), DMF (4×) und erneut mit CH_2Cl_2 (4×) gewaschen.
- [9] a) H. Schmitt, G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 321–344; b) T. M. Balasubramanian, N. C. E. Kendrick, M. Taylor, G. R. Marshall, J. E. Hall, I. Vodyanoy, F. Reusser, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 6127–6132; c) H. Kunz, H. Waldmann, C. Unverzagt, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1985**, 26, 493–497.
- [10] R. Caputo, E. Cassano, L. Longobardo, G. Palumbo, *Tetrahedron* **1995**, 51, 12337–12350.
- [11] G. A. Reynolds, F. D. Saeva, J. J. Doney, C. H. Chen, *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 4843–4848.
- [12] L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 457–461; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 441–445.
- [13] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriou, Y. Wenqing, W. Schäfer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 3943–3946.
- [14] H. Brückner, W. A. König, M. Greiner, G. Jung, *Angew. Chem.* **1979**, 91, 508–509; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1979**, 18, 476–477.
- [15] Siehe Hintergrundinformationen.
- [16] J. G. Wise, T. M. Duncan, L. R. Latchney, D. N. Cox, A. E. Senior, *Biochem. J.* **1983**, 215, 343–350.

gen zur Verfügung,^[2–7] jedoch sind diese nicht immer breit einsetzbar oder inkompatibel mit Hochdurchsatz-Screening-Formaten und Echtzeit-Analysen. Die Entwicklung neuer Methoden, die möglichst unabhängig von den zu untersuchenden Target-Molekülen und für die genannten Zwecke breit einsetzbar sind, ist daher von großer Bedeutung.

Wir verwenden seit einiger Zeit Ribozyme für die Entwicklung funktionaler Assays, mit denen Wechselwirkungen zwischen biologisch relevanten Molekülen in Echtzeit analysiert werden können. So haben wir Systeme entwickelt die eine schnelle und verlässliche Analyse der katalytischen Aktivität des Hammerhead-Ribozyme (HHR) erlauben, indem Substratoligonucleotide eingesetzt werden, die mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind.^[8] Die räumliche Nähe der beiden Farbstoffe im ungeschnittenen Zustand des Substrats führt zu einer Fluoreszenzlösung des Donorfluorophors durch Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET). Die Spaltungsaktivität des Ribozyme kann dann durch einen zeitlichen Anstieg der Fluoreszenz in Echtzeit verfolgt werden. Mit Hilfe dieser Reporter-Ribozyme haben wir neue Inhibitoren des Hammerhead-Ribozyme^[9] oder des Rev-Proteins aus HIV-1^[10] aus Bibliotheken organischer Moleküle identifiziert, welche auch unter In-vivo-Bedingungen die biologische Aktivität ihres jeweiligen Zielmoleküls spezifisch inhibieren konnten.

In dieser Arbeit berichten wir über das rationale Design eines Reporter-Ribozyme, dessen Aktivität durch die reverse Transkriptase (RT) des humanen Immundefizienz Virus Typ I (HIV-1-RT) spezifisch reguliert werden kann. Wir zeigen, dass das HIV-1-RT-abhängige Reporter-Ribozym nicht nur selektiv die Anwesenheit von HIV-1-RT in Echtzeit anzeigt, sondern darüber hinaus auch die domänen spezifische Bindung des Proteins an andere molekulare HIV-1-RT-Interaktoren, wie etwa den Primer-Templatkomplex.

Für die Herstellung des Reporter-Ribozyme orientierten wir uns an ähnlichen, mit kleinen organischen Molekülen regulierbaren Systemen, bei denen Helix II des HHR, deren Bildung für die Spaltungsaktivität essentiell ist, durch eine Aptamersequenz substituiert worden war.^[11–14] Wir verwendeten ein Aptamer, das von Tuerk et al. aus einer kombinatorischen RNA-Bibliothek isoliert und charakterisiert worden war und die HIV-1-RT mit einer Affinität von 25 pm bindet.^[15] Die Kristallstruktur des RNA-Protein-Komplexes zeigt, dass das anti-HIV-1-RT-Aptamer im Komplex mit HIV-1-RT eine Pseudoknoten-Struktur bildet, bei der die 5'- und 3'-Enden der Sequenz räumlich voneinander entfernt sind.^[16]

Wir wählten ganz bewusst ein Aptamer mit Pseudoknoten-Motiv, denn diese Strukturelemente werden auch in der Natur in verschiedenster Weise als regulatorische Elemente genutzt. So induziert in einigen viralen mRNA-Sequenzen die Bildung eines Pseudoknoten eine Verschiebung des Leserahmens.^[17] In manchen eukaryontischen Transkripten führt die Faltung eines Pseudoknotens in der 5'-nichttranslatierten Region zur Aktivierung eines regulatorischen Proteins, welches dann lokal die Translation des entsprechenden Gens kontrolliert.^[18]

Aufgrund dieser bekannten regulatorischen Eigenschaften von Pseudoknoten-Motiven und ihrer besonderen Strureigenschaften erschien uns das anti-HIV-1-RT-Aptamer als regulatorisches Element für ein Hammerhead-Ribozym be-

Reporter-Ribozyme zur Echtzeit-Analyse domänen spezifischer Interaktionen in Biomolekülen: reverse Transkriptase von HIV-1 und der Primer-Templatkomplex**

Jörg S. Hartig und Michael Famulok*

In der „Postgenom-Ära“, der Zeit nach der Aufklärung der verschiedenen Genomsequenzen, gilt es, die Funktion tausender neuer Proteine zu erforschen, ihre Einbindung in regulatorische Netzwerke zu untersuchen und sie auf ihre Eignung als pharmazeutische Zielmoleküle zu überprüfen. Dazu bedarf es neuer Methoden, die eine schnelle und verlässliche Identifizierung molekularer Interaktionen komplexer biologischer Systeme im Hochdurchsatzformat erlauben. Informationen über Interaktionspartner eines Biomoleküls, die Identifizierung von Interaktionsdomänen oder die einfache Quantifizierung von Bindungsstärken bilden die Basis für die Aufklärung der biologischen Funktion und die Identifizierung neuer Proteininhibitoren, Modulatoren und Leitstrukturen für die Medikamentenentwicklung.^[1] Zwar stehen eine Reihe sehr leistungsfähiger Methoden für die Messung und Quantifizierung molekularer Wechselwirkun-

[*] Prof. Dr. M. Famulok, Dipl.-Chem. J. S. Hartig
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)
Fax: (+49) 228-735-388
E-mail: m.famulok@uni-bonn.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Wir danken Dr. T. Restle (MPI Dortmund) für die Überlassung der reversen Transkriptase von HIV-1 und HIV-2 und Dr. Andreas Marx für kritische Kommentare zum Manuskript.

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