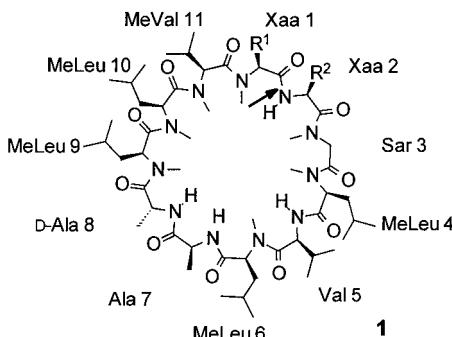


Effiziente, racemisierungsfreie Peptidkupplung von N-Alkylaminosäuren mit in situ generierten Aminosäurechloriden – Totalsynthesen der Cyclopeptide Cyclosporin O und Omphalotin A^{**}

Norbert Sewald*

Lineare und cyclische Peptide, die *N*-Alkylaminosäuren (z.B. *N*-Methylaminosäuren, MeXaa) enthalten, kommen in der Natur relativ häufig vor und zeichnen sich oft durch interessante biologische Eigenschaften aus. Die Cyclosporine bilden eine Familie von etwa 25 cyclischen Peptiden, die von dem Pilz *Beauveria nivea* (vormals als *Tolypocladium inflatum* bezeichnet) produziert werden. Cyclosporin O (**1b**, Schema 1)^[1] und das bekanntere Cyclosporin A (**1a**) sind



Schema 1. Strukturen von Cyclosporin A (**1a**, Xaa1: MeBmt, R¹ = CH(OH)-CH(CH₃)-CH₂-(E)-CH=CH-CH₃; Xaa2: Abu, R² = CH₂CH₃) und Cyclosporin O (**1b**, Xaa1: MeLeu, R¹ = CH₂-CH(CH₃); Xaa2: Nva, R² = CH₂CH₂CH₃). Der Pfeil kennzeichnet den Ort der Cyclisierung bei der Synthese von Cyclosporin O.

sequenzhomologe cyclische Undecapeptide mit fungizider, antiinflammatorischer und immunsuppressiver Wirkung. Das strukturell mit den Cyclosporinen verwandte Omphalotin A (**2**) ist Mitglied einer Familie cyclischer Dodecapeptide aus *Omphalotus olearius* und übertrifft in vitro bekannte Nematizide an Aktivität und Selektivität. Dies wird als ein Hinweis auf einen neuartigen Wirkmechanismus interpretiert.^[2] Cyclosporine und Omphalotin A enthalten eine Reihe von *N*-Methylaminosäuren (sieben bei Cyclosporin A, neun bei

Omphalotin A). Die *N*-Alkylierung führt zu einer verringerten Zahl an möglichen Wasserstoffbrückenbindungen und damit zu erhöhter konformativer Flexibilität.

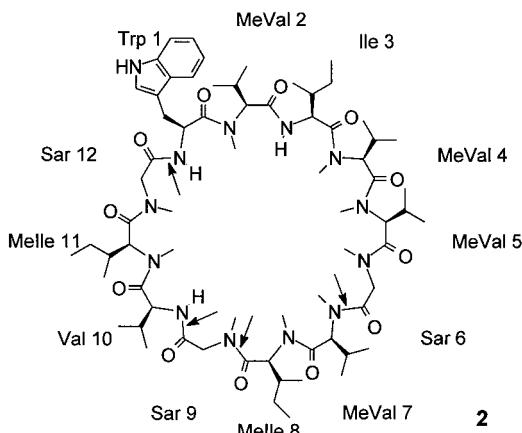
Die Biosynthese der Cyclosporine verläuft nichtribosomal nach dem Thiotemplat-Mechanismus am Multienzym-Komplex Cyclosporin-Synthetase.^[3] Dabei werden mehr als 40 Einzelschritte auf dem Weg zu den Cyclosporinen katalysiert.

Die chemische Synthese von Peptiden, die *N*-Alkylaminosäuren enthalten, ist durch die sterische Hinderung der sekundären Aminogruppen enorm erschwert. Wenngleich seit der ersten chemischen Synthese von Cyclosporin A aufgrund der außerordentlich interessanten biologischen Eigenschaften mehrere hundert Analoga synthetisiert wurden, gibt es noch keine allgemein anwendbare Methode für die Knüpfung einer Peptidbindung unter Einbau von *N*-Alkylaminosäuren. Praktisch quantitative Kupplungsausbeuten sind aber gerade bei der Peptidsynthese am festen Träger (solid-phase peptide synthesis, SPPS) eine zentrale Voraussetzung, da Rumpfsequenzen (Abbruch der Peptidsynthese auf einer bestimmten Stufe) und Fehlsequenzen (Auslassung einer Aminosäure durch unvollständige Peptidkupplung) nach der Abspaltung vom Träger auch durch präparative HPLC oft nur sehr schwer vom Zielpепtido abgetrennt werden können.^[3] Die Reaktivität harzgebundener sekundärer Amine ist oft sogar niedriger als bei Synthesen in Lösung. Je langsamer eine Kupplungsreaktion abläuft, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass Nebenreaktionen wie Racemisierung oder Diketopiperazinbildung stattfinden. Darüber hinaus sind Peptide, die *N*-Alkylaminosäuren enthalten, säurelabil.

Jung et al. berichteten kürzlich in zwei Publikationen über die Totalsynthesen von Cyclosporin O^[1] (**1b**, Schema 1) und Omphalotin A^[2] (**2**, Schema 2) am festen Träger unter Verwendung der von Gilon et al.^[4] eingeführten Methode mit Triphosgen (Bis(trichlormethyl)carbonat, BTC) als Kupplungsreagens. Die Carboxygruppenaktivierung N^a-geschützter Aminosäuren mittels BTC verläuft möglicherweise über die In-situ-Generierung des entsprechenden Säurechlorids.^[4] Die Bildung gemischter Anhydride wäre ebenfalls möglich. Triphosgen (Schmp. 81–83 °C) ist ein sicherer Ersatzstoff für Phosgen und Diphosgen.^[5] Gilon et al. verwendeten BTC mit Collidin als Base in THF bei 50 °C, um N^a-Fmoc-geschützte Aminosäurechloride sowohl aus pro-

[*] Prof. Dr. N. Sewald
Organische und Bioorganische Chemie
Universität Bielefeld
Postfach 100131, 33501 Bielefeld (Deutschland)
Fax: (+49) 521-106-8094
E-mail: norbert.sewald@uni-bielefeld.de

[**] Eine Liste verwendeter Abkürzungen findet sich vor dem Literaturverzeichnis.



Schema 2. Struktur von Omphalotin A (**2**). Die Pfeile kennzeichnen die unterschiedlichen Varianten zur Cyclisierung.

teinogenen als auch aus N-alkylierten Aminosäuren in situ herzustellen.^[4] Nach einer kurzen Voraktivierungszeit wurden diese mit dem harzgebundenen Peptid umgesetzt. Die Autoren zeigten, dass diese Methode auch mit einer Sequenz von drei aufeinander folgenden N-Alkylaminosäuren racemisierungsfrei verläuft.

Aminosäurechloride wurden bereits von Emil Fischer für Peptidkupplungen eingesetzt. Aminosäurehalogenide galten aber in der Peptidchemie lange Zeit als ungeeignete, „überaktivierte“ Derivate, die sehr racemisierungsanfällig sind. N-Urethan-geschützte Aminosäurefluoride und -chloride erwiesen sich jedoch im vergangenen Jahrzehnt durch die entscheidenden Pionierarbeiten von Carmino et al. als stabile und effiziente Bausteine für die Peptidsynthese.^[6] Während erste sich durch eine etwas breitere Toleranz gegenüber säurelabilen Seitenkettenenschutzgruppen auszeichnen, kommen Aminosäurechloride fast ausschließlich in Form ihrer N^α-Fmoc-geschützten Derivate zum Einsatz.^[6] N^α-Fmoc-Aminosäurechloride, bei denen aus taktischen Gründen eine Seitenkettenfunktionalität mit einer säurelabilen Schutzgruppe versehen ist (Boc, iBu, Trt), sind allerdings nicht ausreichend stabil und daher nicht in allen Fällen zugänglich.

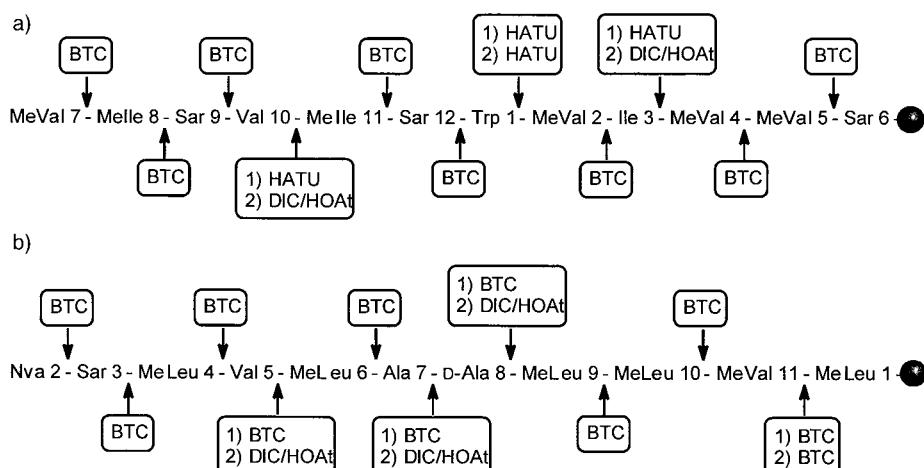
Die Generierung der N^α-Fmoc-Aminosäurechloride in situ umgeht diesen Nachteil durch Zusatz von Collidin.^[4] Jung et al. bestätigten, dass die BTC-Aktivierung einer Reihe anderer Methoden (DCC, DIC/HOAt, In-situ-Generierung der Säurefluoride mit TFFH^[6]) deutlich überlegen ist.^[2] Die Bildung diastereomerer Peptide durch Racemisierung aktivierter Aminosäuren wurde nicht beobachtet. Allerdings erwies sich in diesen Untersuchungen die Methode von Gilon et al.^[4] als ungeeignet für die Synthese langerer Peptide. Das sehr säurelabile TCP-Harz (Trityl-Anker auf Polystyrol, Abspaltung mit Hexafluorisopropanol) ist wegen der

Säurelabilität der Produkte erforderlich, kann aber nur verwendet werden, wenn die Kupplung des harzgebundenen Peptids mit dem in situ erzeugten N^α-Fmoc-Aminosäurechlorid in Gegenwart mehrerer Äquivalente Diisopropylethylamin erfolgt.^[2] Interessanterweise kann dann auf die nach Gilon et al.^[4] nötige Erhöhung der Reaktionstemperatur verzichtet werden. Eine ähnliche Steigerung der Kupplungseffizienz durch Einsatz einer schwachen Base zur Carboxygruppenaktivierung und einer starken Base in der eigentlichen Kupplungsreaktion wurde am System DIC/HOAt beschrieben.^[7]

Jung et al. fanden auch, dass das BTC-Verfahren bei der Kupplung von nicht N-alkylierten Aminosäuren der DIC/HOAt- oder HATU-Aktivierung unterlegen sein kann. In solchen Fällen führten Doppelkupplungen mit BTC und nachfolgend mit DIC/HOAt bzw. HATU zum Erfolg (Schema 3). Die finale Cyclisierung der linearen Vorstufen gelang in allen Fällen mit EDC/HOAt.

Die Kupplungsschritte für die Herstellung von **1b** und **2** sind in Schema 3 dargestellt. Bei der Synthese von Omphalotin A (OmA) wurde die Synthese und Cyclisierung unterschiedlicher linearer Vorstufen ausgehend von harzgebundenem Sar12 (OmA(1–12)), Sar9 (OmA(10–9)) und Sar6 (OmA(7–6), Schema 3a) sowie von harzgebundenem Melle8 (OmA(9–8)) untersucht. Die Cyclisierung über Aktivierung eines C-terminalen Sarcosins erwies sich als geeigneter, da andernfalls beträchtliche Epimerisierung des C-terminalen Restes auftrat, so z.B. bei der Aktivierung von Melle8 im linearen Peptid OmA(9–8).

Die BTC-Methode führte in allen von den Autoren getesteten Synthesen zur quantitativen Knüpfung von Peptidbindungen unter Verwendung N^α-Fmoc-geschützter N-Methylaminosäuren. Es gelang ihnen somit, durch Modifizierung und Optimierung der BTC-Methode^[4] ein reproduzierbares und allgemein anwendbares Verfahren zum Einbau dieser sterisch sehr anspruchsvollen Derivate zu etablieren. Dies öffnet den Weg für eine breite Anwendung dieser Methode in der Synthese natürlich vorkommender N-Methylaminosäuren enthaltender Peptide mit interessanten biologischen Eigenschaften. Eine automatisierte Parallelsynthese von deren



Schema 3. a) Festphasensynthese der zur Cyclisierung am besten geeigneten linearen Vorstufe von Omphalotin A (**2**). b) Festphasensynthese der linearen Vorstufe von Cyclosporin O (**1b**).

Analoga ist damit ebenso zuverlässig machbar wie die Synthese in größerem Maßstab.

Butenyl-4,N-dimethyl-L-threonin, Nva: Norvalin, TFFH: Tetramethylfluorformamidinium-hexafluorophosphat, Trt: Triphenylmethyl (Trityl).

Verwendete Abkürzungen

Abu: 2-Aminobuttersäure, Boc: *tert*-Butoxycarbonyl, BTC: Bis(trichlormethyl)carbonat, DCC: *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid, DIC: *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid, EDC: *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid, Fmoc: 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, HATU: O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (IUPAC: 1-[Bis-(dimethylamino)methylumyl]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridin-3-oxid-hexafluorophosphat), HOAt: 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol, MeBmt: (4*R*)-4[(*E*)-2-

- [1] B. Thern, J. Rudolph, G. Jung, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 5013–5016.
- [2] B. Thern, J. Rudolph, G. Jung, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2401–2403; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2307–2309.
- [3] N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
- [4] E. Falb, Y. Yechezkel, Y. Salitra, C. Gilon, *J. Pept. Res.* **1999**, 53, 507–517.
- [5] H. Eckert, B. Forster, *Angew. Chem.* **1987**, 99, 922–923; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, 26, 894–895.
- [6] L. A. Carpino, M. Beyermann, H. Wenschuh, M. Bienert, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 268–274.
- [7] L. A. Carpino, A. El-Faham, *Tetrahedron* **1999**, 55, 6813–6830.

Neue Proteinstrukturprinzipien: Nester, Eier – und was noch?**

Debnath Pal, Jürgen Sühnel* und Manfred S. Weiss*

Rückfaltungsexperimente an durch Harnstoff denaturierter Ribonuclease, die vor mehr als 40 Jahren durchgeführt wurden, veranlassten den Chemie-Nobelpreisträger Anfinsen zu folgender Aussage, die das noch heute weitgehend gültige Paradigma der Proteinfaltung widerspiegelt: „... it may be concluded that the information ... for the assumption of the native secondary and tertiary structures [von Proteinen] is contained in the amino acid sequence itself.“^[1] Davon ausgehend sollte man eigentlich in der Lage sein, die dreidimensionale Struktur von Proteinen direkt aus ihrer Sequenz vorherzusagen. Allerdings sind trotz intensiver Bemühungen vieler ausgezeichneter Wissenschaftler und einer Datenbasis experimentell bestimmter Proteinstrukturen, die in geradezu beängstigender Weise täglich größer wird,^[2] wirkliche Erfolge bei der Vorhersage von Proteinstrukturen selten. Die gegenwärtige Situation stellt sich daher als eher enttäuschend dar. Die Gründe dafür sind unklar. Trotz der schon erwähnten umfangreichen experimentellen Datenbasis, die durch die

rasante Entwicklung der Strukturbioologie in den letzten zehn Jahren aufgebaut wurde, und trotz vieler gründlicher Analysen dieser Daten^[3–5] ist unsere gegenwärtige Kenntnis von Proteinstrukturen nach wie vor in erster Linie deskriptiver Natur und ohne ein wirkliches Vorhersagepotenzial. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die gegenwärtig bekannten Proteinstrukturprinzipien unvollständig sind. So mit bestünde ein Bedarf an neuen Konzepten, um von dem heutigen vorwiegend deskriptiven Status zu wirklichen Vorhersagen zu kommen.

In dieser Hinsicht erscheinen zwei Arbeiten, die kürzlich im *Journal of Molecular Biology* publiziert wurden, von besonderem Interesse:^[6, 7] Bei einer Analyse der Hauptkettentorsionswinkel benachbarter Aminosäuren fanden Watson und Milner-White, dass viele Bindungsstellen für Anionen und Kationen aus drei in der Sequenz aufeinander folgenden Aminosäuren aufgebaut sind (wobei unter Anionen und Kationen alle Atome zu verstehen sind, die entweder eine volle oder eine partielle negative bzw. positive Ladung tragen). Zwei benachbarte dieser drei Aminosäuren haben dabei „enantiomere“ Hauptkettenkonformationen. Der Terminus „enantiomer“ wurde gewählt, weil die Werte der Hauptkettentorsionswinkel (ϕ, ψ) der beiden Aminosäuren bezüglich des Koordinatenursprungs des Ramachandran-Plots näherungsweise invertiert sind.^[8] Während in der Sequenz aufeinander folgende Aminosäuren mit identischen oder nahezu identischen Hauptkettenkonformationen α -Helices, β -Strände oder Polyprolin-Typ-II-Helices bilden, ergeben benachbarte Aminosäuren mit enantiomeren Hauptkettenkonformationen so genannte „Nester“ oder Nest-Motive. Die Hauptkettentorsionswinkel (ϕ, ψ) der entsprechenden

[*] Dr. J. Sühnel, Dr. D. Pal

Institut für Molekulare Biotechnologie
Beutenbergstraße 11, 07745 Jena (Deutschland)
Fax: (+49) 3641-656210
E-mail: jsuehnel@imb-jena.de

Dr. M. S. Weiss
EMBL Hamburg Outstation
c/o DESY, Notkestraße 85, 22603 Hamburg (Deutschland)
Fax: (+49) 40-89902-149
E-mail: msweiss@embl-hamburg.de

[**] Die Autoren bedanken sich bei E. James Milner-White für die Einführung in das Nest-Konzept und für weitere stimulierende Diskussionen.