

# Konvergenz führt zum Erfolg: Totalsynthese des komplexen nicht-ribosomalen Peptids Polytheonamid B\*\*

Christian Ducho\*

Aminosäuren · Ionenkanäle · Peptide ·  
Peptidsynthesen · Sulfoxide

Außer dem begrenzten Satz von Aminosäuren für die ribosomale Protein-Biosynthese nutzt die Natur auch zahlreiche nicht-proteinogene Aminosäuren zur Erzeugung komplexer Peptidstrukturen. In vielen Fällen werden derartige nicht-ribosomale Peptide durch nicht-ribosomale Peptid-Synthetasen (NRPS) generiert, große Enzyme mit modularem Aufbau. Ihre interessanten biologischen Eigenschaften machen nicht-ribosomale Peptide zu interessanten Zielstrukturen für die Totalsynthese, die eine Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (structure-activity relationships, SARs) ermöglicht.<sup>[1]</sup>

Die Polytheonamide A und B sind die wahrscheinlich größten und strukturell komplexesten bekannten nicht-ribosomalen Peptide.<sup>[2]</sup> Sie wurden aus dem marinen Schwamm *Theonella swinhoei* isoliert, in dem sie möglicherweise von einem noch unbekannten symbiotischen Mikroorganismus produziert werden. Sie bestehen aus 48 Aminosäuren und einer N-terminalen 5,5-Dimethyl-2-oxohexanoyl-Einheit (Abbildung 1). Die Aminosäuren weisen mit der Ausnahme von acht Glycin-Resten eine alternierende L- und D-Konfiguration auf. Von den 19 verschiedenen Aminosäure-Komponenten der Polytheonamide sind 13 nicht-proteinogen, was auch einige  $\beta$ -methylierte Derivate umfasst. Eine einzigartige Aminosäure-Struktur findet sich in Gestalt einer Sulfoxid-Aminosäure mit einem stereogenen Schwefel-Atom in der Seitenkette (Abbildung 1). Der einzige Strukturunterschied zwischen den Polytheonamiden A und B ist die absolute Konfiguration dieser Sulfoxid-Einheit an Position 44 der Polytheonamid-Sequenz, und bisher war noch keine Zuordnung der Konfiguration ( $R_S/S_S$ ) zum entsprechenden Polytheonamid-Peptid möglich.

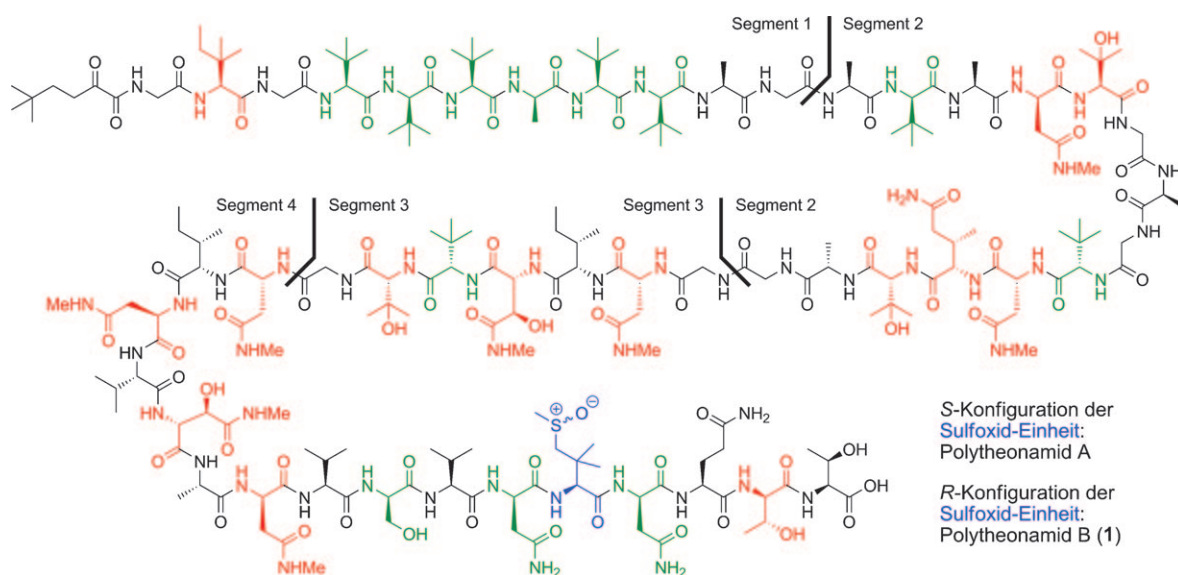
Die Polytheonamide zeigen außerordentliche cytotoxische Aktivitäten (z. B. Polytheonamid B (**1**):  $EC_{50} = 79 \text{ pM}$ ). NMR-spektroskopische Studien lassen auf eine Faltung von **1** zu einer Wasserstoffbrücken-stabilisierten  $\beta$ -Helix schließen, woraus eine 30 Å lange, röhrenförmige Struktur resultiert.<sup>[3]</sup> Aufgrund dieser dreidimensionalen Struktur, der Fähigkeit, einwertige Kationen durch Lipid-Doppelschichten zu leiten, und seiner elektrischen Schaltbarkeit wurde postuliert, dass Polytheonamid B als Ionenkanal fungiert,<sup>[4]</sup> was auch den cytotoxischen Effekt des Peptids erklären könnte. Während beispielsweise Gramicidin A ein recht gründlich studierter peptidischer Transmembran-Kanal ist,<sup>[5]</sup> steht eine Untersuchung des Funktionsmechanismus der Polytheonamide auf molekularer Ebene noch aus.

Ihre interessanten strukturellen und biologischen Eigenschaften machen die Polytheonamide zu vielversprechenden neuen Zielstrukturen für SAR-Studien. SAR-Daten könnten das Verständnis des Polytheonamid-Mechanismus im Speziellen sowie der Ionenkanal-Bildung und -Funktion in biologischen Membranen im Allgemeinen verbessern. Allerdings ist die Totalsynthese komplexer Peptidstrukturen wie jener der Polytheonamide nach wie vor höchst anspruchsvoll. Die zahlreichen ungewöhnlichen Aminosäuren erschweren den Zugang durch herkömmliche Festphasen-Peptid-Synthese (solid-phase peptide synthesis, SPPS), und biosynthetische Ansätze ermöglichen häufig nicht die für detaillierte SAR-Untersuchungen notwendigen Strukturvariationen. Inoue und Mitarbeiter haben nun über die erste Totalsynthese von Polytheonamid B **1** auf Basis einer konvergenten Synthesestrategie sowie über die erstmalige stereochemische Zuordnung der Sulfoxid-Einheit berichtet.<sup>[6]</sup> Die Forscher haben die Struktur von **1** in vier Peptid-Segmente aufgeteilt, die aus 7–16 Aminosäuren bestehen. Diese Bausteine wurden so gewählt, dass ihre spätere Kupplung jeweils durch Aktivierung eines C-terminalen Glycin-Restes erfolgen würde, wodurch eine Epimerisierung in den Fragment-Kupplungen vermieden wurde (Abbildung 1). Von den 13 nicht-proteinogenen Aminosäuren aus **1** waren 8 nicht kommerziell verfügbar. Die erste Aufgabe bestand somit in der Herstellung dieser Verbindungen, gefolgt vom Aufbau der vier Peptid-Segmente durch SPPS.

Einer der Schlüsselschritte der Totalsynthese von **1** war die stereoselektive Synthese eines 9-Fluorenylmethoxycar-

[\*] Prof. Dr. C. Ducho  
Fakultät für Chemie  
Institut für Organische und Biomolekulare Chemie  
Georg-August-Universität Göttingen  
Tammannstraße 2, 37077 Göttingen (Deutschland)  
Fax: (+49) 551-39-9660  
E-Mail: cducho@gwdg.de  
Homepage: <http://www.ducho.chemie.uni-goettingen.de>

[\*\*] Der Autor dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 803 „Functionality controlled by organization in and between membranes“) und dem Fonds der Chemischen Industrie (Sachkostenzuschuss) für finanzielle Unterstützung.

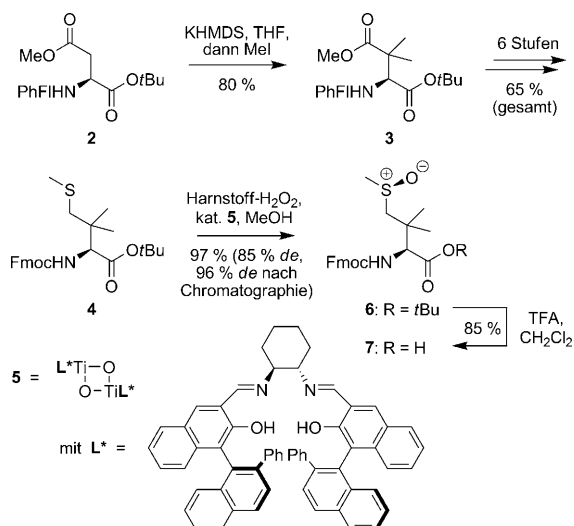


**Abbildung 1.** Struktur der Polytheonamide; nicht-proteinogene Aminosäuren in Grün oder – wenn sie im Rahmen der Totalsynthese von Polytheonamid B (**1**) zunächst synthetisiert werden mussten – in Rot. Die Sulfid-Aminosäure ist in Blau dargestellt. Die vier für die konvergente Totalsynthese von **1** gewählten und hergestellten Peptid-Segmente sind ebenfalls angezeigt.

bonyl(Fmoc)-geschützten Derivats der charakteristischen Sulfid-Aminosäure für die SPPS. Ausgehend vom entsprechend geschützten Aspartat **2** ergab Methylierung in der  $\beta$ -Position **3**, das in sechs Stufen in das Sulfid **4** überführt werden konnte. Anschließend erfolgte die diastereoselektive Oxidation von **4** unter Katsuki-Bedingungen<sup>[7]</sup> mit Harnstoff-Wasserstoffperoxid in Gegenwart des chiralen Titan-Salen-Katalysators **5**. Der Fmoc-geschützte Sulfid-Aminosäure-ester **6** konnte auf diese Weise zunächst mit einer Diastereoselektivität von 85 % erhalten werden, die durch Säulenchromatographie auf 96 % *de* erhöht werden konnte. Saure Entschützung lieferte schließlich die Zielverbindung **7** (Schema 1). Die absolute Konfiguration am stereogenen

Schwefel-Atom von **7** wurde durch Anwendung der NMR-spektroskopischen Methode von Kusumi und Yabuuchi nach Derivatisierung des Sulfoxids<sup>[8]</sup> als *R* bestimmt.

Diese Route ermöglichte die nachfolgende Herstellung der vier Peptid-Segmente mithilfe der SPPS. Die wesentlichen Hürden hierbei, die sich aus der Aminosäure-Sequenz von **1** ergaben, bestanden in den zahlreichen sterisch gehinderten und daher wenig reaktiven  $\beta$ -tetrasubstituierten Aminosäuren sowie in den vielen Asparagin- und Glutamin-Derivaten, die zur Bildung von Interstrang-Aggregaten in der Peptid-Harz-Matrix tendieren. Die mithilfe von SPPS zugängliche Sequenzlänge war daher auf 16 begrenzt, was zum beschriebenen Segment-basierten, konvergenten Ansatz führte. Die Segmente 1–3 (Abbildung 1) wurden auf einem Wang-Harz synthetisiert und nach der Abspaltung vom Träger in entsprechende Thioester-Derivate überführt. Die resultierenden Peptid-Thioester-Bausteine konnten in Gesamtausbeuten von 9–13 % isoliert werden. Das C-terminale Segment 4 wurde an einem 2-Chlortrityl-Harz hergestellt und in 7 % Gesamtausbeute über 31 Reaktionsschritte erhalten. Damit lagen nun alle Reaktanten für den finalen konvergenten Aufbau des vollständigen Peptids vor. Beginnend mit dem N-terminal ungeschützten Segment 4 wurde die Kupplung mit dem Thioester-Derivat des benachbarten Segments 3 nach Aimoto<sup>[9]</sup> in Gegenwart von Silber(I)-nitrat erzielt. Nach basischer Fmoc-Entschützung wurden dieselben Kupplungsbedingungen mit nachfolgender basischer Entschützung für die Reaktionen mit den Thioester-Segmenten 2 und 1 angewendet. Die Ausbeuten für jeden Kupplungsvorgang lagen dabei im Bereich von 83–91 %. Dies führte zum schrittweisen Aufbau von geschütztem Polytheonamid B, und globale saure Entschützung lieferte schließlich die Zielverbindung **1**. Da die erhaltene Substanz spektroskopisch und chromatographisch mit natürlichem Polytheonamid B identisch war, konnte hiermit erstmals bewiesen werden, dass



**Schema 1.** Diastereoselektive Synthese der Fmoc-geschützten Sulfid-Aminosäure **7** für die Festphasen-Peptid-Synthese. KHMDS = Kaliumhexamethyldisilazanid, PhFI = 9-Phenylfluoren-9-yl, TFA = Trifluoressigsäure.

Polytheonamid B in der Sulfoxid-Einheit *R*-Konfiguration aufweist, sodass für Polytheonamid A die *S*-Konfiguration in der Seitenkette der Aminosäure 44 belegt ist.

Die erste Totalsynthese des nicht-ribosomalen Peptids Polytheonamid B (**1**) demonstriert das Potenzial moderner Peptidchemie. Diese Arbeit steht damit in der Nachfolge anderer Meilensteine der Peptid-Synthese, z. B. der Synthese des Membranporen bildenden Antibiotikums Alamethicin<sup>[10]</sup> und des DNA-Gyrase-Inhibitors Microcin.<sup>[11]</sup> Im Falle von Polytheonamid B (**1**) eröffnete die stereoselektive Synthese nicht-proteinogener Aminosäuren in Kombination mit Festphasen-Peptid-Synthese und der Kupplung von Peptid-Segmenten unter milden Bedingungen den Zugang zu einer komplexen Peptidstruktur mit signifikanter biologischer Bedeutung. Die entwickelte Syntheseroute belegt auch die Nützlichkeit konvergenter Ansätze bei der Synthese längerer Oligopeptide. Damit sind nun die Voraussetzungen für die Herstellung von Polytheonamid-Analoga, SAR-Studien und weitere strukturelle sowie biophysikalische Untersuchungen geschaffen.

Eingegangen am 31. März 2010

Online veröffentlicht am 22. Juni 2010

- [1] D. Schwarzer, R. Finking, M. A. Marahiel, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, 20, 275–287.
- [2] T. Hamada, S. Matsunaga, G. Yano, N. Fusetani, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 110–118.
- [3] T. Hamada, S. Matsunaga, N. Fusetani, M. Fujiwara, K. Fujita, *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu* **1995**, 37, 695–700.
- [4] S. Oiki, I. Muramatsu, S. Matsunaga, N. Fusetani, *Folia Pharmacol. Jpn.* **1997**, 110, 195P–198P.
- [5] a) D. W. Urry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, 68, 672–676; b) D. A. Langs, *Biopolymers* **1989**, 28, 259–266; c) R. R. Ketchum, W. Hu, T. A. Cross, *Science* **1993**, 261, 1457–1460.
- [6] M. Inoue, N. Shinohara, S. Tanabe, T. Takahashi, K. Okura, H. Itoh, Y. Mizoguchi, M. Iida, N. Lee, S. Matsuoka, *Nat. Chem.* **2010**, 2, 280–285; diese Arbeit wurde auch in einem News-and-Views-Artikel gewürdigt: C. J. Forsyth, *Nat. Chem.* **2010**, 2, 252–254.
- [7] B. Saito, T. Katsuki, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 3873–3876.
- [8] T. Yabuuchi, T. Kusumi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10646–10647.
- [9] S. Aimoto, *Biopolymers* **1999**, 51, 247–265.
- [10] H. Schmitt, G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 321–344.
- [11] G. Videnov, D. Kaiser, M. Brooks, G. Jung, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 1607–1609; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1506–1508.