

Vitamin-B₁₂-Mimetika mit einem Peptidrückgrat und einstellbaren Koordinations- und Redoxseigenschaften**

Kai Zhou und Felix Zelder*

Cobalamine (Cbls) sind Corrinnoide mit flexibler Konstitution: Ihre Dimethylbenzimidazol(Dmbz)-Base kann entweder an das Cobalt-Zentrum des Corrin-Makrocyclus binden (base on) oder von diesem abdissoziieren (base off).^[1,2] Dieses Gleichgewicht spielt eine wichtige Rolle für den Transport, die Umsetzung und die Reaktivität von Vitamin B₁₂ (**1**, CNCbl) und seinen metallorganischen Analoga.^[3] Geringe Mengen an Base-on-Vitamin-B₁₂ (10 µg d⁻¹) gelangen über einen komplizierten und hoch selektiven Aufnahmeweg in die Zellen, bevor es zu den Cofaktoren Adenosylcobalamin (AdoCbl) und Methylcobalamin (MeCbl) umgewandelt wird.^[4]

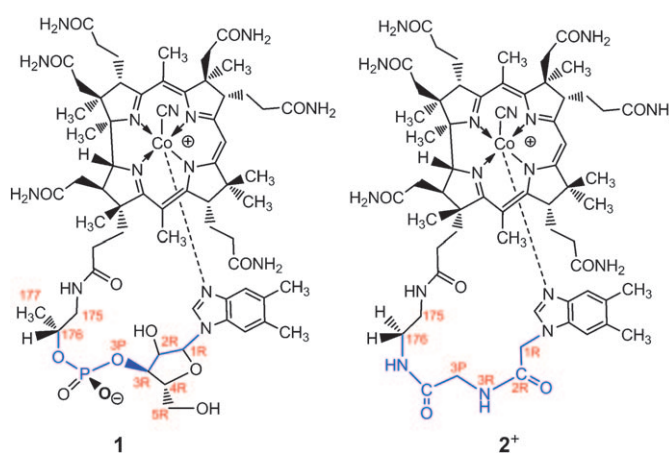
Erst kürzlich wurde über die reduktive, durch das MMACHC-Chaperon katalysierte Abspaltung des Cyanid-Ions von Base-on-CNCbl unter Bildung einer Base-off-Cobalt(II)-Verbindung berichtet.^[5] Mutationen der MMACHC-Gene verursachen Probleme bei dieser Reaktion,^[4] wobei Cbl-Derivate, die leichter als **1** zu den entsprechenden Co^{II}-Intermediaten reduziert werden, medizinischen Studien zufolge eine therapeutische Wirkung aufweisen.^[6,7]

Es gibt bereits detaillierte Arbeiten über die Eigenschaften von Cbls mit unterschiedlichen Liganden auf der β -Seite (oberen Seite) des Makrocyclus.^[8–10] Recht wenig weiß man hingegen noch über den Einfluss von Strukturveränderungen auf der α -Seite (unteren Seite) des Moleküls auf die koordinativen Fähigkeiten der Dmbz-Base und die elektrochemischen Eigenschaften des Metallions.^[11–13] Hier berichten wir über die Koordinations- und elektrochemischen Eigenschaften einer neuen Klasse von Vitamin-B₁₂-Mimetika, bei denen der Corrin-Makrocyclus und die Dmbz-Base durch ein Peptidbindeglied verknüpft sind.

In einer eleganten Arbeit zeigten Kräutler et al., dass eine vom Koordinationszentrum weit entfernt liegende Methylgruppe die Base-on-Form von natürlichen Cbls stabilisiert, und bestätigten damit eine frühere Vorhersage von Eschenmoser et al.^[11,14] In einer anderen wegbereitenden Studie tauschten Toraya und Ishida die α -Ribofuranotid-Einheit in

Vitamin B₁₂ gegen Methylen-Brücken unterschiedlicher Länge aus.^[12]

Im Hinblick auf zukünftige biologische Anwendungen sind wir an der Entwicklung von künstlichen Vitamin-B₁₂-Derivaten mit veränderbaren koordinativen und elektrochemischen Eigenschaften interessiert. Wir entschieden uns für den Austausch der Ribosephosphodiester-Einheit von Vitamin B₁₂ gegen Peptide mit derselben Zahl von Atomen zwischen dem Stickstoffdonor der Dmbz-Base und dem Corrin-Makrocyclus (Schema 1), weil sich Amidbindungen als exzellente Phosphodiester-Mimetika in anderen Naturstoffen erwiesen hatten, die zu Derivaten mit interessanten physikochemischen und biologischen Funktionen geführt hatten.^[17–20]



Schema 1. Vitamin B₁₂ (**1**) und der Peptid-B₁₂-Prototyp (**2**⁺). Das natürliche Bindeglied von **1** und sein Peptid-Analogon in **2**⁺ enthalten die gleiche Zahl an Atomen (blau; vollständige Atomnummerierung siehe Hintergrundinformationen).

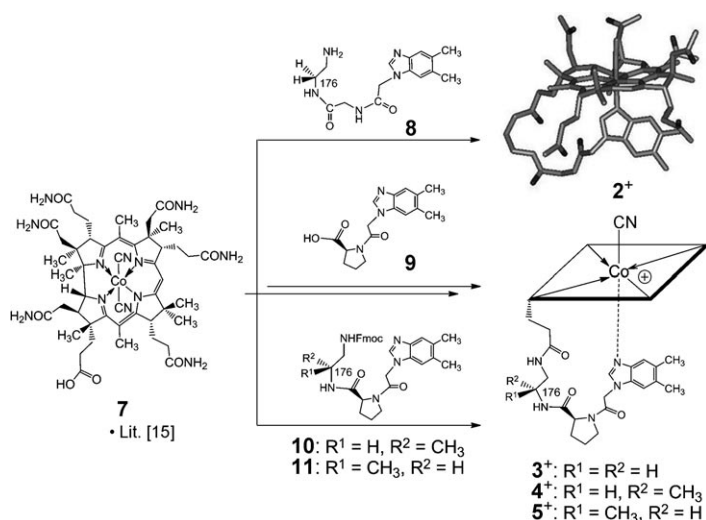
Eine energieminierte Struktur von **2**⁺ (Schema 2, oben rechts) konnte durch semiempirische quantenchemische Rechnungen (PM3, Spartan-'06-Software) erhalten werden, denen zufolge die Dmbz-Base eine ähnliche Position wie in seinem natürlichen Vorbild **1** einnimmt. Das künstliche Bindeglied **8** wurde in sechs Stufen synthetisiert und anschließend mit 4-Dimethylaminopyridin und *N*'-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid an Dicyanocobyrinsäure **7**^[15] gekuppelt, wobei **2** in einer Ausbeute von 62 % erhalten wurde (Schema 2).^[16]

Das hochaufgelöste Massenspektrum von **2** enthält das Signal eines [*M*]⁺-Ions bei *m/z* 1243.59334 (*m/z*_{ber.}: 1243.59337) in Übereinstimmung mit der Molekülformel C₆₁H₈₄CoN₁₆O₉. Die Struktur von **2** wurde des Weiteren mit UV/Vis-Spektroskopie, Umkehrphasen-HPLC, ¹H-NMR-

[*] K. Zhou, Dr. F. Zelder
Institut für Anorganische Chemie, Universität Zürich
Winterthurerstrasse 190, 8057 Zürich (Schweiz)
Fax: (+41) 446-356-802
E-Mail: zelder@aci.uzh.ch

[**] Wir danken R. Alberto, A. Eschenmoser, T. Fox und O. Zerbe für hilfreiche Diskussionen sowie L. Bigler für die Aufnahme der HR-ESI-MS-Spektren. Vitamin B₁₂ wurde großzügigerweise von DSM Nutritional Products AG (Basel) zur Verfügung gestellt. Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds unterstützt (Grant No. 200021-117822).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201001928> zu finden.



Scheme 2. Synthese der Peptid-B₁₂-Derivate **2⁺–5⁺** ausgehend von Dicyano-Cobyrinsäure (**7**)^[15] und den Peptidbausteinen **8–11**.^[16] **2⁺–5⁺** wurden als **2⁺·CF₃COO[–]–5⁺·CF₃COO[–]** isoliert (**2–5**). **2⁺** (oben rechts) ist in seiner energieminierten Struktur gezeigt (Spartan '06, PM3-semiempirische Rechnung; H-Atome sind nicht gezeigt). Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl.

Spektroskopie und ¹H,¹³C-HSQC-Korrelation untersucht.^[16] Die UV/Vis-Spektren von Base-on-Vitamin-B₁₂ (**1**) und **2** waren identisch, unterschieden sich jedoch signifikant ($\Delta\lambda_{\text{max}} = 29 \text{ nm}$) vom Absorptionsspektrum von Aquocyanocobinamid, wodurch gezeigt wurde, dass **2** in der Base-on-Form vorliegt.^[16] Die ¹H-NMR-Signale des Corrin-Makrocyclus und der Dmbz-Base wichen nur geringfügig voneinander ab, die Signale der Brückeneinheiten unterschieden sich jedoch deutlich voneinander (Abbildung 1).^[16]

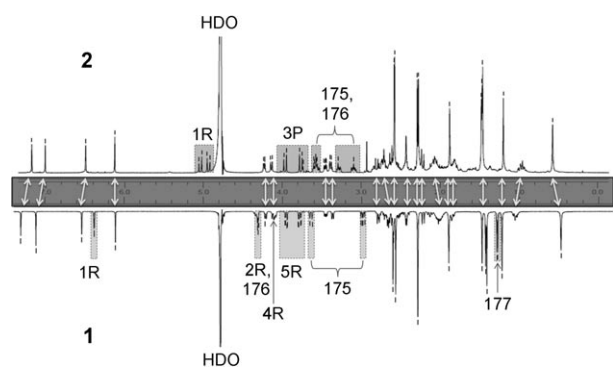


Abbildung 1. ¹H-NMR-Spektrum von **2** (oben) und **1** (unten) in D₂O. Die Pfeile zeigen die Positionen am Corrin-Ring und an der Dmbz-Base an. Die Beschriftung bezieht sich auf die Protonen im Peptid- bzw. Ribofuranotidbaustein (Schema 1).

Die intramolekulare Dissoziation der Dmbz-Base von **2** (Tabelle 1, oben links) wurde mit spektrophotometrischer pH-Titration untersucht. Die Stabilität der Base-on-Form von **2** ist mit $pK_{\text{base off}} = 1.38$ neunzehnmal geringer als die von Vitamin B₁₂, das eine starke intramolekulare Koordination aufweist, ausgedrückt durch einen niedrigen $pK_{\text{base off}}$ -Wert von 0.1^[2] (K^* ; Tabelle 1, Nr. 2 bzw. 1). Zugleich spiegelt der Wert eine 25-fache Bevorzugung der Base-on-Konstitution gegenüber einem anderen künstlichen B₁₂-Derivat, **6**,^[12,21] mit

einem Phosphodiester-haltigen Bindeglied wider (Tabelle 1, Nr. 6). Die veränderten Koordinationseigenschaften von **2** beeinflussten die Reduktion des oktaedrisch umgebenen Cobalt(III)-Zentrums zum quadratisch-pyramidal koordinierten Cobalt(II)-Zentrum unter Verlust des β -gebundenen Cyano-Liganden (Tabelle 1, oben rechts) und wurde mit Cyclovoltammtrie (CV) in Wasser untersucht ([Tris] = 0.2 M, pH 8.0; Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan). Das Cyclovoltammogramm von **2** weist einen kathodischen E_{pc}^* -Wert von -1.056 V auf, der um 70 mV positiver ist als der von **1**. Die einfachere Reduktion des Cobalt(III)-Zentrums in **2** kann durch eine geringere Elektronendichte am Metallzentrum wegen der schwächeren Koordination der Dmbz-Base erklärt werden.

Wir vermuteten, dass eine erhöhte Rigidität zu einer verstärkten intramolekularen Koordination führt und somit die Reduktion von Cobalt(III) zu Cobalt(II) erschwert. Zunächst entschieden wir uns, die Glycin-Einheit in **2** gegen L-Prolin auszutauschen, um **3** zu erhalten (Schema 2). Dieser cyclische Baustein sollte als Haar-

Tabelle 1: Base-on/Base-off- (links) und Co^{III}/Co^{II}-Gleichgewicht (rechts).

Nr.	Verbindung	$pK_{\text{base off}}$	K^* [a]	E_{pc}^* [V] ^[b]
1	1	0.1 ^[c]	19	-1.126
2	2	1.38	1	-1.056
3	3	0.97	2.6	-1.077
4	4	0.62	5.8	-1.096
5	5	1.64	0.55	-1.039
6	6 ^[d]	2.8 ^[d]	0.04	n.b. ^[e]

[a] $K^* = K_{\text{base off}(x)} / K_{\text{base off}(2)}$. [b] $E_{\text{pc}}^* = E_{\text{pc}} - E_o'$ (siehe Hintergrundinformationen). [c] Lit. [2]. [d] Lit. [12, 21]. [e] n.b. = nicht berichtet.

nadel fungieren und die α -Ribose-Einheit von natürlichen Cobalaminen imitieren, was wiederum die Base-on-Form stabilisieren sollte. **3** (Schema 2) wurde wie in den Hintergrundinformationen beschrieben synthetisiert. Die Base-on-Form von **3** war mit einem $pK_{\text{base off}}$ -Wert von 0.97 in der Tat 2.6-mal stärker begünstigt als beim Prototypen **2**. Elektrochemische Studien bestätigten zudem unsere Vermutung, dass bei **3** die Reduktion zu Cobalt(II) schwieriger ist als bei **2** ($\Delta V = -21 \text{ mV}$; Tabelle 1, Nr. 3).

In natürlichen Cobalaminen spielt die Methyl-Gruppe am R-konfigurierten C176 eine wichtige Rolle für die Stabilisierung der Base-on-Form,^[11] und wir vermuteten einen ähnlichen Effekt für die Peptid-B₁₂-Mimetika. Zur Prüfung dieser Hypothese wurde das Derivat **4**, das eine Methyl-Gruppe am R-konfigurierten Kohlenstoffatom C176 aufweist, ausgehend von **10** und **7** synthetisiert (Schema 2).^[16] Die Base-on-Form von **4** ($pK_{\text{base off}} = 0.62$) ist doppelt so stabil wie die des Deri-

vats **3** ohne diese Modifikation, und gleichzeitig ist die Reduktion von Cobalt(III) zu Cobalt(II) erschwert ($\Delta V = -19$ mV; Tabelle 1, Nr. 4 bzw. 3). Der Einfluss der weit vom Koordinationszentrum entfernten Methyl-Gruppe auf das Base-on/Base-off-Gleichgewicht ähnelt der Stabilisierung in natürlichen Cobalaminen,^[11] was die Nützlichkeit von Peptidstrukturen als künstlichen Bindegliedern in Vitamin-B₁₂-Derivaten deutlich macht.

In früheren Arbeiten hatten Eschenmoser et al. vorausgesagt, dass ein Wechsel der Konfiguration an C176 von *R* zu *S* eine Destabilisierung der Base-on-Konstitution von Vitamin B₁₂ zur Folge haben sollte.^[14] Dies kann durch einen zusätzlichen *gauche*-Effekt in der Base-on-Konstitution von Vitamin B₁₂ erklärt werden.^[14] Bestärkt durch unsere Ergebnisse mit **4**, synthetisierten und charakterisierten wir sein Epimer **5** (Schema 2). Diese Verbindung mit *S*-Konfiguration an C176 hat einen $pK_{\text{base off}}$ -Wert von 1.64 – eine ausgeprägte, 10-fache Schwächung der Base-on-Form gegenüber jener von **4**. Es ist bemerkenswert, dass die energetisch ungünstige Konformation der cyclischen Base-on-Struktur von **5** den entropischen Gewinn, der durch die Präorganisation des Bindeglieds erzielt wurde, überwiegt. Dieses Verhalten drückt sich in einem höheren $pK_{\text{base off}}$ -Wert von **5** als beim Prototypen **2** aus (Tabelle 1, Nr. 5 bzw. 2). Der Wechsel der Konfiguration hat auch elektrochemische Konsequenzen: **5** lässt sich um ca. 60 mV leichter reduzieren als sein Epimer **4**.

Die Peptidmimetika **2–5** zeigten eine lineare Abhängigkeit des kathodischen E_{pc}^* -Wertes der Co^{III}/Co^{II}-Reduktion und der $pK_{\text{base off}}$ -Werte ($\Delta V = 57$ mV, $\Delta pK_{\text{base off}} = 1.02$; Abbildung 2). Da während der Reduktion derselbe β -Cyano-Ligand vom Cobalt-Zentrum entfernt wird (Tabelle 1, oben

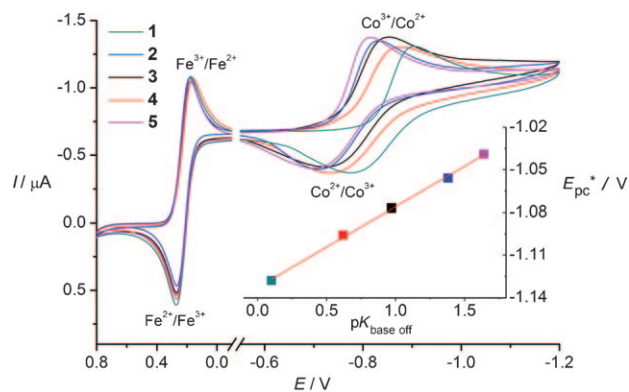


Abbildung 2. CV-Spektren von **1–5** in Wasser ([Tris] = 0.2 M, pH 8.0) (Referenzelektrode: Ag/AgCl, interne Referenz: K₃[Fe(CN)₆]). Einschub: $pK_{\text{base off}}-E_{\text{pc}}^*$ -Diagramm. $pK_{\text{base off}}(1) = 0.1$ wurde Lit. [2] entnommen.

rechts), sollten die Entropien der zugehörigen Reaktionen ähnlich sein, sodass die Reduktionspotentiale direkt mit den Bindungsenthalpien der Co-CN-Bindung korrelieren. Ein niedrigerer $pK_{\text{base off}}$ -Wert entspricht einer stärkeren Koordination der Dmbz-Base an das Metallzentrum, was zu einer verstärkten Rückbindung zwischen dem Cobalt-Ion und dem β -Cyano-Liganden führt. Dieses Verhalten erschwert die Reduktion und verschiebt das Redoxpotential zu einem negativeren Wert.

Wir haben hier eine neue Klasse von Vitamin-B₁₂-Mimetika mit einem Peptidbindeglied zwischen dem Corrin-Makrocyclus und der Dmbz-Base beschrieben. Untersuchungen mit vier Peptid-B₁₂-Derivaten ergaben, dass durch die Wahl eines geeigneten Peptidrückgrates Vitamin-B₁₂-Mimetika mit einstellbaren Koordinations- und Redox Eigenschaften synthetisiert werden können. Dies eröffnet die Möglichkeit, die Reaktivität von Cofaktor-katalysierten Reaktionen, in denen eine Base-on-Cobalt(II)-Zwischenstufe auftritt, zu steuern. Momentan beschäftigen wir uns mit der Entwicklung metallorganischer Peptid-B₁₂-Analoge für biologische und physikochemische Untersuchungen.

Eingegangen am 31. März 2010
Online veröffentlicht am 22. Juni 2010

Stichwörter: Bioanorganische Chemie · Elektrochemie · Koordinationschemie · Peptide · Vitamine

- [1] B. Kräutler, D. Arigoni, B. Golding, *Vitamin B₁₂ and B₁₂-Proteins*, Wiley-VCH, Weinheim, **1998**.
- [2] K. L. Brown, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2075.
- [3] R. Banerjee, *Chemistry and Biochemistry of B₁₂*, 1. Aufl., Wiley-Interscience, New York, **1999**.
- [4] R. Banerjee, C. Gherasim, D. Padovani, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 484.
- [5] J. Kim, C. Gherasim, R. Banerjee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 14551.
- [6] I. Mellman, H. F. Willard, P. Youngdahlturner, L. E. Rosenberg, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 1847.
- [7] J. P. Lerner-Ellis, J. C. Tirone, P. D. Pawelek, C. Dore, J. L. Atkinson, D. Watkins, C. F. Morel, T. M. Fujiwara, E. Moras, A. R. Hosack, G. V. Dunbar, H. Antonicka, V. Forgetta, C. M. Dobson, D. Leclerc, R. A. Gravel, E. A. Shoubridge, J. W. Coulton, P. Lepage, J. M. Rommens, K. Morgan, D. S. Rosenblatt, *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 93.
- [8] J. M. Pratt in *Inorganic Chemistry of Vitamin B₁₂* (Hrsg.: J. M. Pratt), Academic Press, New York, **1972**, S. 44.
- [9] L. Hannibal, C. A. Smith, D. W. Jacobsen, N. E. Brasch, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5232; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5140.
- [10] H. A. Hassanin, L. Hannibal, D. W. Jacobsen, M. F. El-Shahat, M. S. A. Hamza, N. E. Brasch, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9071; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8909.
- [11] P. Butler, M. O. Ebert, A. Lyskowski, K. Gruber, C. Kratky, B. Kräutler, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1004; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 989.
- [12] T. Toraya, A. Ishida, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 5430.
- [13] R. B. Wang, B. C. MacGillivray, D. H. Macartney, *Dalton Trans.* **2009**, 3584.
- [14] A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 5; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 5; F. Kreppelt, Dissertation Nr. 9458, ETH-Zürich, **1991**.
- [15] G. Müller, O. Müller, *Z. Naturforsch. B* **1966**, *21*, 1159.
- [16] Hintergrundinformationen.
- [17] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497.
- [18] U. Diederichsen, H. W. Schmitt, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 312; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 302.
- [19] P. E. Nielsen, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 624.
- [20] G. K. Mittapalli, K. R. Reddy, H. Xiong, O. Munoz, B. Han, F. De Riccardis, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2522; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2470.
- [21] Die Strukturformel von **6** ist in den Hintergrundinformationen gezeigt.