

Vinylprotonen im Allylalkohol in Schema 1 bei $\delta = 5.5\text{--}6.0$ spalten im Racemat in vier gleich intensive Doublets auf, im angegebenen *S*-Isomer finden sich zwei gleiche Signalgruppen im Verhältnis 8:1. In (*S,R*)-2 zeigten sich hingegen keine Aufspaltungen.

- [8] G. R. Lister, B. W. Thair, *Can. J. Bot.* **1981**, *59*, 640–648.
 [9] H. C. Brown, R. S. Randad, K. S. Bhat, M. Zaidlewicz, U. S. Racherla, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2389–2392.
 [10] Die Zuordnung der *S*-Konfiguration erfolgte durch Vergleich des Drehwerts ($[\alpha]_{D}^{25,C} = -8.5$ (Benzol)) mit einem Literaturwert (H. Riediker, R. D. Duthaler, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 488–490; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 494–495) und den Voraussagen H. C. Browns [9] folgend. Für natürlich vorkommende 10-Nonacosanole wurden die Drehwerte ($[\alpha]_{D}^{25,C}$ (Chloroform) = 1.9 und 2.2 berichtet (S. Beckmann, H. Schüle, *Z. Naturforsch. B* **1968**, *23*, 471). Wir fanden für das synthetisierte (*S*)-Nonacosanol unter identischen Bedingungen Drehwerte von 0.33 und 0.30. Das gemeinsame positive Vorzeichen der sehr geringen Drehwerte lässt vermuten, daß auch der Naturstoff *S*-konfiguriert ist, was aber naturgemäß sehr unsicher ist. Die Kristallisation von diastereomeren Derivaten scheiterte. Nur mit deren Strukturanalyse wäre eine eindeutige Zuordnung möglich.
 [11] T. Tachibana, H. Kambara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1969**, *42*, 3422–3424.
 [12] N. Nakashima, S. Asakuma, T. Kunitake, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 509–510.
 [13] J. König, C. Boettcher, H. Winkler, E. Zeitler, Y. Talmon, J.-H. Fuhrhop, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 693–700.
 [14] J.-H. Fuhrhop, P. Schnieder, E. Boekema, W. Helfrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2861–2867.
 [15] W. Helfrich, J. Prost, *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3065.

Enzymatische Hydrolyse hydrophiler Diethylenglycol- und Polyethylenglycolester von Peptiden und Glycopeptiden durch Lipasen**

Horst Kunz*, Danuta Kowalczyk, Peter Braun und Günther Braum

Herrn Professor Reinhard W. Hoffmann
zum 60. Geburtstag gewidmet

Ester primärer Alkohole sind schon früh in der Peptidsynthese als Schutzgruppe für Carboxygruppen verwendet worden^[1]. Die alkalische Hydrolyse dieser Ester ist jedoch mit hohem Racemisierungsrisiko verbunden. In der Glycopeptidsynthese^[2] besteht bei *O*-Glycosyl-serin- und -threonin-Derivaten darüber hinaus die Gefahr der β -Eliminierung des Kohlenhydrats^[3].

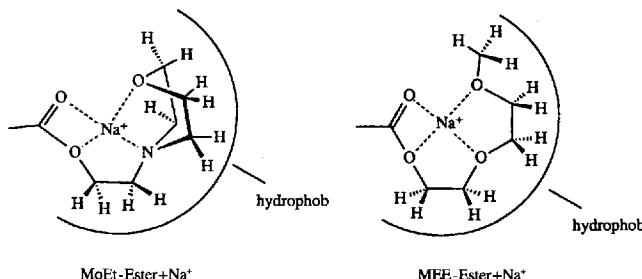
Neue Perspektiven eröffnen die in neutralem Milieu ablaufenden enzymatischen Verfahren^[4], wie die selektive Hydrolyse von Aminosäure- und Peptid-heptylestern durch Lipasen zeigt^[5]. Für Peptidsynthesen haben Lipasen den Vorteil, daß sie Peptidbindungen nicht angreifen. Eine Einschränkung liegt in der Substratselektivität der Enzyme; so werden z.B. die Heptylestere von hydrophoben Dipeptiden wie -Val-Phe- von Lipasen nur sehr langsam oder gar nicht angegriffen^[5a]. Auch Heptylestere von Peptiden mit C-terminalem Prolin^[5a] sowie *O*-Azidogalactosyl-threonin- oder *O*-Galactosaminyl-serin-heptyl-ester^[5b] werden weder von Lipase M (Amano) aus *Mucor javanicus* noch von Lipase N (Amano) aus *Rhizopus niveus* hydrolysiert. Neben einer für das aktive Zentrum der Enzyme ungünstigen Substratstruktur können für die ausbleibende Re-

[*] Prof. Dr. H. Kunz, Dipl.-Ing. D. Kowalczyk, Dipl.-Chem. P. Braun, Dr. G. Braum
Institut für Organische Chemie der Universität
J.-J.-Becher-Weg 18–20, D-55099 Mainz
Telefax: Int. + 6131/39-4786

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Der Firma Amano Pharmaceutical Co. danken wir für die zur Verfügung gestellten Enzyme.

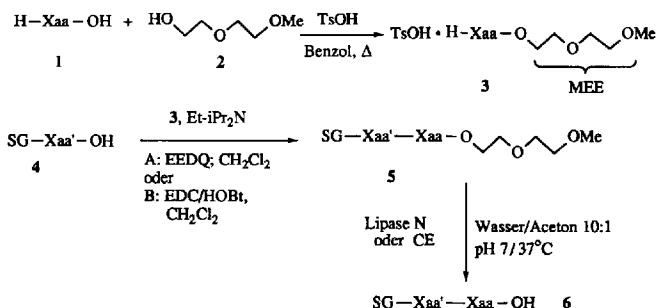
aktion auch einfache physikalische Gründe maßgeblich sein, wie die mangelnde Löslichkeit und Benetzungsfähigkeit der Heptylestere in Wasser. Für die Reaktionen mit Lipasen wurden Heptyl-^[5] und ähnliche Alkylester ursprünglich ausgewählt, weil sie in ihren hydrophoben Eigenschaften die natürlichen Substrate dieser Enzyme imitieren^[6]. Von mehreren Autoren ist nämlich gefunden worden, daß Lipasen in ihre katalytischen Prozesse die Lipidgrenzfläche einschließen^[7]. Deshalb wird allgemein angenommen, daß Verbindungen, die einen hydrophoben und einen polaren Teil enthalten, günstige Substrateigenschaften für Lipase-katalysierte Hydrolysen mitbringen.

In der Glycopeptidsynthese haben wir jedoch beobachtet, daß 2-Morpholinoethylester (MoEt-Ester) von Peptiden, die keine betont hydrophoben Bereiche enthalten, von Lipasen glatt hydrolysiert werden^[8]. Dieser überraschende Befund kann dahingehend interpretiert werden, daß eine Komplexierung des amphiphilen Morpholinoethylesters, z.B. mit Na^+ , die Exponierung einer hydrophoben Oberfläche bewirkt, die als Erkennungsregion für die Wechselwirkung mit der Lipase fungiert (Schema 1).



Schema 1.

Aus der Verallgemeinerung dieser Interpretation schlossen wir, daß Diethylenglycol- sowie Oligo- und Polyethylenglycolester von Aminosäuren und Peptiden enzymatisch spaltbare Schutzfunktionen sein sollten^[9]. Zur Prüfung dieses Gedankens wurden zunächst Hydrotosylate der Ester 3 von Aminosäuren 1 mit Diethylenglycolmonomethylether 2 (2-[2-(Methoxy)ethoxy]ethylester; MEE-Ester) durch azeotrope Veresterung hergestellt. Die Ester 3 entstehen praktisch quantitativ, halten aber nach Behandlung im Hochvakuum und Waschen mit Diethyl-ether noch 2 fest. Deshalb werden sie mit N-geschützten Aminosäuren 4 durch übliche Peptidkondensation zu den geschützten Dipeptidestern 5 umgesetzt. Die enzymatische Hydrolyse der Dipeptid-MEE-ester 5 gelang in Wasser/Aceton (10:1) bei 37 °C, wobei mit 0.2 M Natriumphosphat-Puffer pH 7 konstant



Schema 2. SG = Schutzgruppe. EEDQ = Ethyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin-1-carboxylat, EDC = 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid, HOBT = 1-Hydroxybenzotriazol.

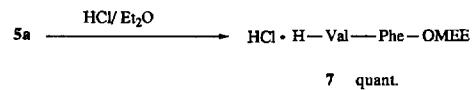
Tabelle 1. Synthese der Aminosäure-MEE-ester **3** aus **1** und **2**, Umsetzung von **3** mit geschützten Aminosäuren **4** zu geschützten Dipeptid-MEE-estern **5** und deren Hydrolyse durch Lipasen zu **6**.

SG	Xaa'	Xaa	Methode [a]	5 [b]	Ausb. [%] [c]	$[\alpha]_D^{22}$ (c 1, CHCl ₃)	Lipase	6	Ausb. [%] [d]	$[\alpha]_D^{22}$ [d] (c 1, MeOH)
Boc	Val	Phe	A	5a	71	23.3	N	6a	97	-14.3
Boc	Ser	Phe	A	5b	64	-6.6	N	6b	94	15.4
Tcoc [e]	Ala	Ser	A	5c	74	-3.4	N	6c	92	-1.0
Z	Ala	Pro	B	5d	50	-53.1	CE	6d	31	-33.1

[a] A, B siehe Schema 2. [b] Charakteristische ¹H-NMR-Signale der MEE-Gruppe: δ = 4.2 (m, 2H, COOCH₂) 3.7–3.4 (m, 6H, OCH₂) 3.3 (s, 3H, OCH₃). [c] Gesamtausbeute über zwei Schritte. [d] Isoliert wurden die Dicyclohexylammoniumsalze, die korrekte Elementaranalysen und mit der Struktur vereinbare 200 MHz-¹H-NMR-Spektren ergaben. [e] Tcoc = 2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl.

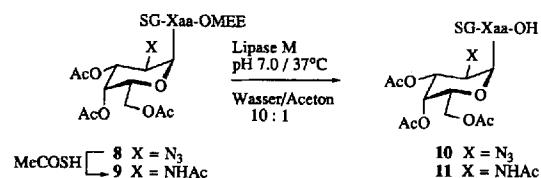
gehalten wird. Als geeignet erwies sich Lipase N (Amano) aus *Rhizopus niveus*. Nur im Falle des Alanyl-prolin-MEE-esters **5d** mußte Lipase CE (Amano) aus *Humicola lanuginosa* verwendet werden (Schema 2 und Tabelle 1).

Die MEE-Ester sind unter Spaltungsbedingungen für die meisten N-terminalen Schutzgruppen stabil. So ließ sich z.B. die Boc-Gruppe aus **5a** mit HCl/Diethylether quantitativ entfernen, ohne daß die MEE-Esterbindung in **7** angegriffen wurde.



Entsprechend dieser Stabilität und der günstigen Löslichkeit der Aminosäure- und Peptid-MEE-Ester verlaufen Peptidsynthesen mit diesen Komponenten ohne Komplikationen (vgl. die Gesamtausbeuten an **5** über zwei Schritte in Tabelle 1). In der Lipase-katalysierten Hydrolyse erwiesen sich die MEE-Ester den bisher untersuchten Estern^[4, 5, 8] als überlegen. So gelang mit Lipase N (Amano) die völlig selektive und nahezu quantitative Hydrolyse des MEE-Esters **5a**, während der entsprechende Heptylester^[5] mit keiner der Lipasen reagierte. Besonders hervorzuheben ist, daß selbst der Prolin-terminierte MEE-Ester **5d** hydrolysiert werden konnte, zwar nicht mit Lipase N, aber mit Lipase CE (Amano). **5d** ist der erste Prolinester, für den eine Hydrolyse durch Lipasen gefunden wurde.

Zur Prüfung der MEE-Ester in Glycopeptidsynthesen wurden aus Serin- und Threonin-MEE-Estern durch literaturbekannte Einführung der Aloc-^[10], Fmoc-^[11] oder Z-Schutzgruppe und anschließende Glycosylierung mit 2-Azido-2-desoxy-3,4,6-tri-O-acetyl- α -D-galactopyranosylbromid^[12] oder Ethyl-2-azido-2-desoxy-3,4,6-tri-O-acetyl- β -D-1-thiogalactosid^[13] die O-Glycosyl-aminosäureester **8** hergestellt. Mit Thioessigsäure^[14] wurden die Verbindungen **8** in die Galactosamin-Konjugate (T_n-Antigen) **9** überführt. In der Lipase-katalysierten Hy-



drolyse (Tabelle 2) zeigten die MEE-Ester **8** wiederum günstigere Substrateigenschaften als die entsprechenden Heptyl- und Brommethylester^[4, 5].

Die unterschiedlich geschützten Azidogalactosyl-serin-MEE-ester **8a** und **8b** wurden durch Lipase M problemlos zu **10a**

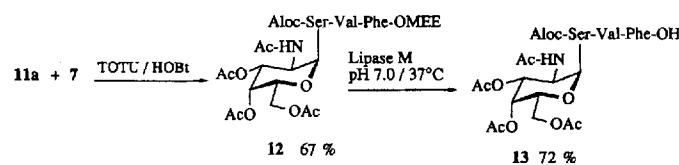
bzw. **10b** hydrolysiert. Der entsprechende Threonin-MEE-ester **8c** reagierte für préparative Zwecke zu langsam. Die Acetamido-galactosyl-serin **9a** und -threonin-MEE-ester **9b**, deren Hepptyl- und Brommethylester-Analoga keinerlei Reaktivität gegenüber Lipasen zeigten^[5], werden zwar langsam, aber doch nutzbar hydrolysiert. Auf eine weitere Optimierung dieser Spaltung wurde hier verzichtet, weil sich inzwischen zeigte, daß Glycosyl-aminosäure-MEE-ester durch die Protease Papain effektiv C-terminal deblockiert werden können^[15].

Tabelle 2. Durch Lipase M (Amano) aus *Mucor javanicus* katalysierte Hydrolyse von O-Glycosylaminosäure-MEE-estern **8** und **9** zu **10** bzw. **11**.

Verb.	SG	Xaa	Produkt	Ausb. [%]	$[\alpha]_D^{22}$ (c 0.5, MeOH)
8a	Aloc	Ser	10a	89	132.8
8b	Fmoc	Ser	10b	64	101.5
8c	Z	Thr	10c	5	—
9a	Aloc	Ser	11a	17	113.3 [b]
9b	Z	Thr	11b	18	94.4

[a] Die Produkte **10a**, **10b**, **11a** und **11b** wurden durch korrekte Elementaranalysen sowie durch mit der Struktur vereinbare 400 MHz-¹H-NMR-Spektren charakterisiert. [b] (c 1, CHCl₃).

Bei Glycopeptiden, deren Saccharidseitenkette nicht C-terminal lokalisiert ist und für deren Deblockierung sich Papain wegen seiner Proteaseaktivität nur eingeschränkt eignet, verläuft die Lipase-katalysierte Spaltung der MEE-Ester effizient (Schema 3). Der aus **11a** und **7** durch Kondensation mit TOTU^[16] gewonnene T_n-Antigen-Glycopeptidester **12** wurde von Lipase M glatt und selektiv zu **13** hydrolysiert^[17]. Die Reaktion verläuft laut Dünnschichtchromatographie quantitativ. Alle anderen Schutzgruppen und die glycosidische Bindung bleiben unangetastet.

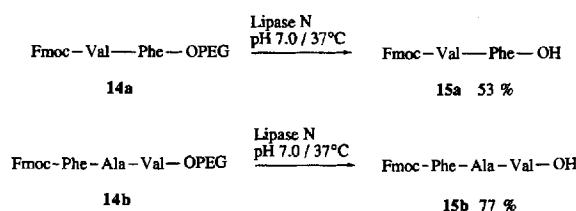


Schema 3. TOTU = 2-[(Ethoxycarbonyl-cyanmethylen)amino]-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat.

Ermutigt durch diese Ergebnisse haben wir nach dem von Mutter und Bayer^[18] eingeführten Verfahren die Fmoc-Peptid-polyethylenglycolester (PEG-Ester) **14** hergestellt und mit Lipase N hydrolysiert. Die Belegung des Polyethylenglycols in den Konjugaten **14** wurde durch Eichung mit Fmoc-Phe-OH be-

stimmt. Nach ersten Ergebnissen werden die sehr hydrophilen Peptid-PEG-Ester durch Lipasen in praktisch neutralem Milieu hydrolysiert. In den vom Polymer abgelösten Peptiden **15** bleibt die basenlabile Fmoc-Gruppe intakt.

Die Lipase-katalysierte Hydrolyse der polaren, löslichkeitsvermittelnden MEE-Ester und der PEG-Ester eröffnet nach diesen Resultaten neue, interessante Möglichkeiten sowohl in der Peptid- und Glycopeptidsynthese in Lösung als auch in der Synthese an polymergebundenen Substraten. Die Lipasen haben keine Proteaseaktivität und greifen Peptidbindungen nicht an. Die MEE-Ester fördern die Benetzungbarkeit und Löslichkeit in Wasser und stellen so die enzymatische Hydrolysebarkeit der Ester von hydrophoben Peptidsequenzen sicher. Einige dieser polaren Peptidester, z.B. **14a** und **14b**, sind in Wasser klar löslich. Ihre Hydrolyse (siehe oben) stellt die Allgemeingültigkeit des Postulats in Frage, wonach Lipasen ihre Wirkung nur an heterogenen Grenzflächen entfalten^[19]. Die durch Komplexie-



rung organisierte Exposition hydrophober Oberflächen (siehe Schema 1) dürfte für die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes der Lipasen ausreichen. Da die Hydrolysen durch die Lipasen in neutralem Milieu ablaufen, bleiben in den deblockierten Produkten empfindliche Strukturelemente, wie Schutzgruppen und Glycosidbindungen, vollständig intakt.

Arbeitsvorschrift

Allgemeine Vorschrift zur Hydrolyse der MEE-Ester: In 2 mL 0.2 M wäßrigem Natriumphosphat-Puffer (pH 7) werden 200 mg Lipase N oder CE zur Inhibition von Rest-Proteaseaktivität mit 3.5 mg Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 1 h bei 0°C gerührt. Nach Zugabe von weiteren 18 mL Natriumphosphat-Pufferlösung wird bei 37°C nochmals 1 h geschüttelt. (Bei Lipase M ist die Vorbehandlung mit PMSF nicht erforderlich.) Zu einer so hergestellten Lösung von 200 mg Lipase in 20 mL 0.2 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) wird eine Lösung von 0.5 mmol Peptidester 5 in 2 mL Aceton getropft. Anschließend wird 24 h bei 37°C kräftig geschüttelt. Nach Sättigen der Lösung mit NaCl wird fünfmal mit 25 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Lösungen werden über MgSO_4 getrocknet und eingeengt. Durch Flash-Chromatographie (Petrolether/Ethylacetat \rightarrow Ethylacetat) an 30 g Kieselgel erhält man die *N*-geschützten Peptide **6**, welche in Diethylether gelöst und in ihre Dicyclohexylammonium-Salze überführt werden. Diese Salze fallen laut Elementaranalyse und 200 MHz ^1H -NMR-Spektren in reiner Form an.

Eingegangen am 23. August,
veränderte Fassung am 26. Oktober 1993 [Z 6308]

- [1] a) T. Curtius, F. Goebel, *J. Prakt. Chem.* [2] **1888**, 37, 150; b) E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1906**, 39, 2893.
- [2] H. Kunz, *Pure Appl. Chem.* **1993**, 65, 1223; *Antibiotics and Antiviral Compounds - Chemical Synthesis and Modifications* (Hrsg.: K. Krohn, H. Kirst, H. Maas), VCH, Weinheim, **1993**, 251.
- [3] R. D. Marshall, A. Neuberger, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1970**, 25, 407.
- [4] A. Reidel, H. Waldmann, *J. Prakt. Chem.* **1993**, 335, 109.
- [5] a) P. Braun, H. Waldmann, W. Vogt, H. Kunz, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 165; b) P. Braun, H. Waldmann, H. Kunz, *Synlett* **1992**, 39.
- [6] J. B. West, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 1629.
- [7] C.-S. Chen, C. J. Sih, *Angew. Chem.* **1989**, 101, 711; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, 28, 695.
- [8] G. Braum, P. Braun, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 3111.
- [9] H. Kunz, G. Braum, P. Braun, (Hoechst AG), DE-AP4133139.7 (7. Okt. 1991).
- [10] H. Kunz, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1984**, 96, 426; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, 23, 436.

- [11] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 5748.
- [12] H. Paulsen, J.-P. Hölk, *Carbohydr. Res.* **1982**, 109, 89.
- [13] H. Paulsen, M. Rauwald, U. Weichert, *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 75.
- [14] T. Rosen, J. M. Lico, D. T. W. Chu, *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 1580.
- [15] H. Kunz, P. Braun, unveröffentlicht.
- [16] G. Breipohl, W. König (Hoechst AG), EP-A 0460446, A1 (23. Mai 1990).
- [17] 13: $[\alpha]_D^{22} = +71.3$ ($c = 1.2$, CHCl_3); $R_f = 0.33$ (Ethylacetat/Methanol = 2:1); $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 5.33$ –5.24 (m, 2H, H-4, $-\text{CH}=\text{CH}_{2\text{trans}}$), 5.20 (dd, 1H, $J_{\text{gem}} = 1.0$ Hz, $J_{\text{cis}} = 10.4$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}_{2\text{cis}}$), 5.04 (dd, 1H, $J_{\text{3,2}} = 11.5$ Hz, $J_{\text{3,4}} = 2.9$ Hz, H-3), 4.80 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$, Phe), 4.72 (d, 1H, $J_{\text{1,2}} = 3.2$ Hz, H-1), 0.82 (2d, 6H, CH_3 , Val); FAB-MS (3-NOBA): m/z : 763.2 ($\text{M}-\text{H}$)⁺ (ber. 763.2).
- [18] a) M. Mutter, E. Bayer, *Angew. Chem.* **1974**, 86, 101; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1974**, 13, 88; b) V. N. R. Pillai, M. Mutter, E. Bayer, I. Gatfield, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 5364.
- [19] H. L. Brockmann in *Lipases* (Hrsg.: B. Borgström, H. L. Brockmann), Elsevier, Amsterdam, **1984**, S. 3.

Einfluß der Konformation auf die Redoxpotentiale von Porphyrinen, die in den β -Pyrrolpositionen halogeniert sind **

Philippe Ochsenbein, Khadija Ayougou, Dominique Mandon, Jean Fischer, Raymond Weiss*, Rachel N. Austin, Karupiah Jayaraj, Avram Gold, James Terner und Jack Fajer

Porphyrine mit Alkylsubstituenten an den β -Pyrrolpositionen sind leichter oxidierbar und schwerer reduzierbar als Porphyrine mit Phenylsubstituenten an den *meso*-Positionen^[1]. Nickel(II)- und Zink(II)-Derivate von β -alkylsubstituierten Tetraphenylporphyrinen, einer Mischform dieser beiden Hauptarten, liegen in Sattelkonformationen vor und werden leichter oxidiert als die entsprechenden Octaethyl- oder Tetraphenylporphyrine. Dies ist in Einklang mit der theoretisch vorhergesagten Destabilisierung des π -Systems, die durch die Deformation in eine Sattelkonformation hervorgerufen wird^[2, 3]. Im Gegensatz dazu werden Tetraphenylporphyrine, die an den β -Pyrrolpositionen teilweise halogeniert sind, leichter reduziert und schwerer oxidiert als die nichthalogenierte makrocyclische Stammverbindung^[4]. Wir wollten nun einen Einblick in die Beziehung zwischen den Redoxpotentialen und den durch Substituenten hervorgerufenen Änderungen der Makrocyclus-Konformation von Tetraarylporphyrinen, die an den β -Pyrrolpositionen halogeniert sind, gewinnen. Dazu haben wir die elek-

[*] Prof. Dr. R. Weiss, P. Ochsenbein, K. Ayougou, Dr. D. Mandon, Prof. Dr. J. Fischer, Dr. J. Fajer^[+]
Laboratoire de Cristallochimie et de Chimie Structurale (UA 424)
Université Louis Pasteur, Institut Lc Bel
4, rue B. Pascal, F-67070 Strasbourg (Frankreich)
Telefax: Int. + 33/88415363

R. N. Austin, Dr. K. Jayaraj, Prof. Dr. A. Gold
Department of Environmental Science and Engineering
University of North Carolina
Chapel Hill, NC 27599-7400 (USA)
Prof. Dr. J. Terner
Department of Chemistry, Virginia Commonwealth University
Richmond, VA 23284-2006 (USA)

[+] Ständige Adresse: Department of Applied Science, Brookhaven National Laboratory, Upton, NY 11973 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde vom Centre National de la Recherche Scientifique (UA-424), vom US Public Health Service (Grants ES03433 für A. G. und GM34443 für J. T.), vom US Department of Energy (Contract DE-AC02-76CH00016 für J. F.) und von der NATO (Gemeinschaftsprojekt von R. W. und A. G.) gefördert. J. Fajer dankt dem chemischen Institut der Université Louis Pasteur in Strasbourg für eine Gastprofessur.