

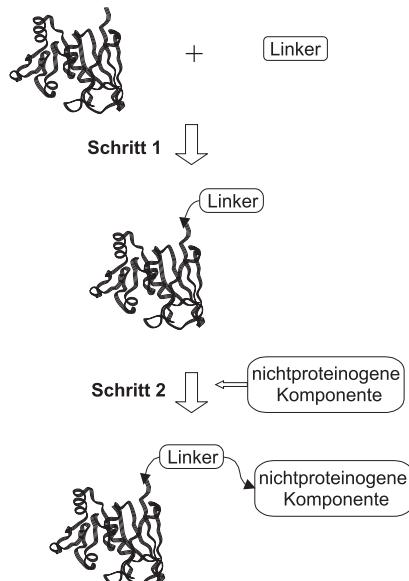
L. Prodi, M. V. Reddington, A. M. Z. Slawin, N. Spencer, J. F. Stoddart, C. Vicent, D. J. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 193.

[19] Kristallstrukturdaten von **7** ( $C_{101}H_{122}B_2Cl_2F_8N_4O_7P_4Rh_2$ ): tetragonal,  $P4_22_2$ ,  $a = 16.6807(1)$  Å,  $c = 39.1582(1)$  Å,  $V = 10895.6(1)$  Å $^3$ ,  $Z = 4$ ,  $T = 223(2)$  K,  $\rho_{\text{ber.}} = 1.266$  g cm $^{-3}$ ,  $R(F) = 7.33\%$  für 9088 beobachtete unabhängige Reflexe ( $3^\circ \leq 2\theta \leq 56^\circ$ ).<sup>[11b]</sup>

## Biokonjugation von Peptiden durch Palladium-katalysierte C-C-Kreuzkupplung in Wasser\*\*

Harald Dibowski und Franz P. Schmidtchen\*

Die biologische Aktivität von Proteinen in höheren Organismen hängt oft von Modifizierungen durch kovalent angebundene Strukturelemente ab (z. B. prosthetische Gruppen, Saccharidketten und Membrananker), deren Anknüpfung in vivo enzymatisch erfolgt und die deshalb nicht unmittelbar mit gentechnischen Methoden steuerbar ist. Ein In-vitro-Verfahren zur regioselektiven kovalenten Anknüpfung von nicht proteinogenen Strukturelementen an ein gefaltetes Protein wäre ein willkommenes Werkzeug als Ergänzung zum Einsatz entsprechender disponierter Zelllinien. Die nahe liegende Strategie dazu wäre ein Zweistufenprozeß, bei dem zunächst eine besonders funktionalisierte Aminosäure auf bekanntem Weg in die gewünschte Position der Primärsequenz eingebaut würde (in Schema 1 ist dies der N-Terminus eines fertig gefalteten Proteins).<sup>[1]</sup> Im nächsten Schritt, der zum fertigen Biokonjugat führt, müßte daran die weitere Komponente geknüpft werden (Schema 1).



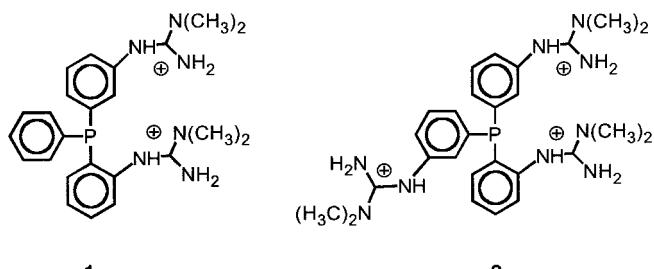
Schema 1. Aufbau eines Biokonjugats über einen Zweistufenprozeß.

[\*] Prof. Dr. F. P. Schmidtchen, Dr. H. Dibowski  
Institut für Organische Chemie und Biochemie  
der Technischen Universität München  
Lichtenbergstraße 4, D-85747 Garching  
Telefax: Int. + 89/289-13345  
E-mail: FPSchmid@nucleus.org.chemie.tu-muenchen.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (Projekt-Nr. 03D0002D6) gefördert. Wir danken auch dem Fonds der Chemischen Industrie für die finanzielle Unterstützung.

Neben chemoselektiver und permanenter Verankerung der beiden Einheiten sollte dieser zweite, nichtenzymatische Schritt die Kupplung der Komponenten unter milden Reaktionsbedingungen in Wasser ermöglichen, um die fragile Tertiärstruktur der Proteine nicht zu schädigen. Darüber hinaus müßte eine hohe Reaktivität garantiert werden, damit die bimolekulare Kupplung auch bei den sehr kleinen Konzentrationen der Biopolymere in akzeptablen Zeiträumen ermöglicht wird. Hier berichten wir über eine Palladium-katalysierte Kreuzkupplung von Aryliodiden mit terminalen Alkinen, die Castro-Stephens-Sonogashira-Reaktion,<sup>[5]</sup> mit einem in situ gebildeten Palladium-Guanidinophosphan-Katalysator in Wasser, die diese Anforderungen erfüllt.

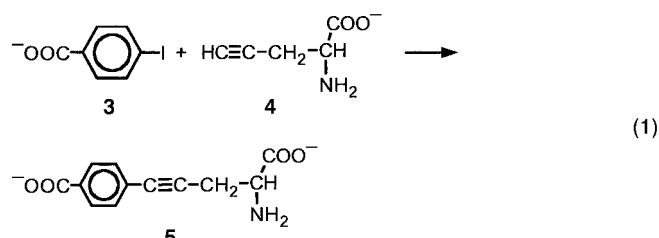
Bei wasserlöslichen Palladiumkatalysatoren für C-C-Kreuzkupplungen werden vorzugsweise sulfonierte anionische Triphenylphosphane als Liganden verwendet.<sup>[6]</sup> Unter den obligatorisch basischen Reaktionsbedingungen der Sonogashira-Reaktion liegen Proteine aber ebenfalls als Anionen vor, so daß bei der Katalyse an einem anionischen Metallkomplex eine elektrostatische Hürde zu überwinden wäre. Experimentell wird eine deutlich verbesserte katalytische Aktivität mit den kürzlich von uns hergestellten, kationischen Guanidinophosphanen **1** und **2** festgestellt, die ebenso hydrophil wie die sulfonierten Analoga und dabei wesentlich oxidationsstabiler sind.<sup>[7]</sup>



1

2

In ersten Versuchen wurden nichtnatürliche freie Aminosäuren, die entweder Alkin- oder Iodarylgruppen enthielten, mit den komplementären Reaktionspartnern in wäßrigem Acetonitril ( $H_2O:CH_3CN = 7:3$ ) bei  $50^\circ C$  umgesetzt. Die Reaktion von *p*-Iodbenzoat **3** mit Propargylglycin **4** lieferte innerhalb von ca. 3 h das Kreuzkupplungsprodukt **5** in 75 % Ausbeute [Reaktion (1)], ohne daß das Produkt der Alkin-

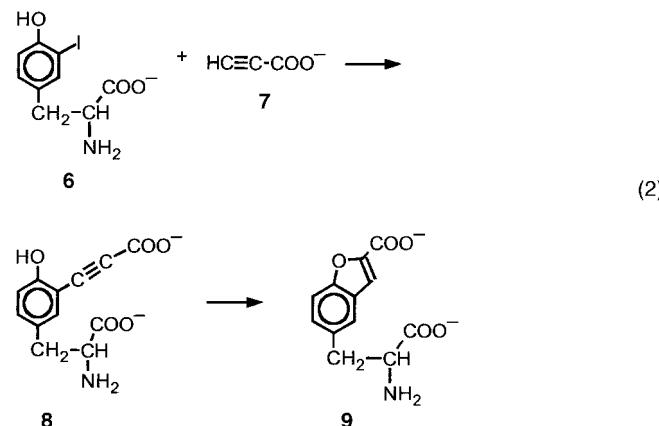


Homokupplung auftrat. Unter denselben Bedingungen (siehe Tabelle 1) reagierte 3-Iodtyrosin **6** mit Propiolsäure **7** in 25 h in 86 % Ausbeute zum Kreuzkupplungsprodukt **8**, das unter sauren Aufarbeitungsbedingungen isoliert und NMR-spektroskopisch charakterisiert werden konnte [Reaktion (2)].

Tabelle 1. Reaktionsbedingungen der Kreuzkupplungen.<sup>[a]</sup>

| Reaktion | Lösungsmittel  | Katalysator<br>[Mol-%] | Ausb.<br>[%] | t<br>[min] |
|----------|--|------------------------|--------------|------------|
| (1)      | H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> CN 7:3<br>N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>3</sub> <sup>[b]</sup> | 5                      | 75           | 195        |
| (2)      | H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> CN 7:3<br>N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>3</sub>                | 5                      | 86           | 120        |
| (2)      | 0.2 M TAPS-Puffer<br>pH 8.3 in H <sub>2</sub> O  | 5 <sup>[c]</sup>       | 89           | 140        |
| (3)      | 0.2 M TAPS-Puffer<br>pH 8.3 in H <sub>2</sub> O  | 10 <sup>[d]</sup>      | 75           | 240        |
| (4)      | 0.2 M TAPS-Puffer<br>pH 8.3 in H <sub>2</sub> O  | 10                     | 75           | 240        |

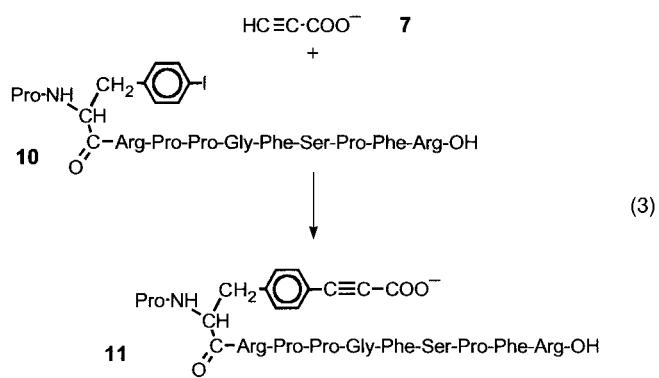
[a]  $T=50^\circ\text{C}$ , sofern nicht anders angegeben. Substratkonzentrationen: Iodaren 10 mM, Alkin 20 mM. Die Katalysatorlösung wurde durch Zusammenpipettieren von Lösungen von 10 mM  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  und 50 mM **1**·Cl<sup>-</sup> in Wasser und 0.1 M CuI in Acetonitril im Volumenverhältnis 5:1 und fünfzigiges Konditionieren bei 4°C unter  $\text{N}_2$  hergestellt. Die Aktivität dieser Stammlösung wurde in Standardkatalysen regelmäßig überprüft und war bei 4°C unter  $\text{N}_2$  über mehrere Wochen stabil. [b] Verhältnis Iodaren:Alkin = 1:1.4 unter Zusatz von 4 Äquiv. Hydroxylamin. [c] Ligand **2**. [d] Nur 4 Äquiv. Ligand und 1 Äquiv. CuI in der Katalysatorlösung,  $T=35^\circ\text{C}$ .



Bei Verlängerung der Reaktionszeit oder auch bei alkalischer Aufarbeitung lagerte sich das Primärprodukt **8** dagegen in bekannter Weise vollständig zum Benzofuranderivat **9** um.

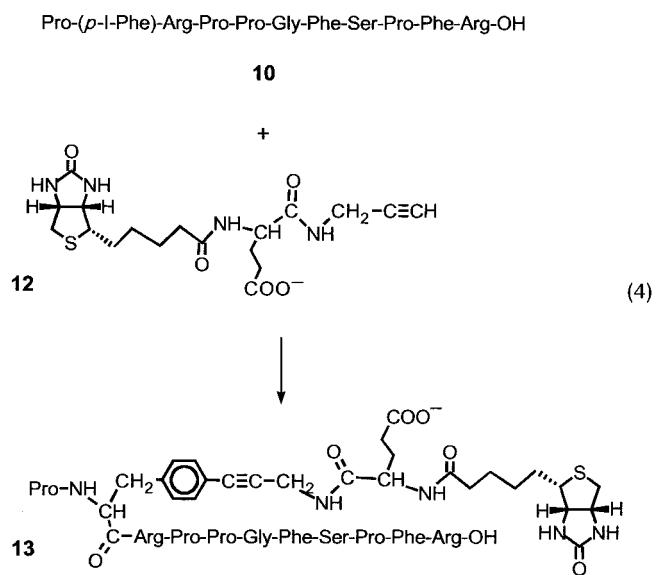
Der gleiche Reaktionsverlauf wurde auch in rein wäßrigem Milieu (3-[Tris(hydroxymethyl)methylamino]-1-propansulfonate(TAPS)-Puffer, pH 8.3) festgestellt, so daß wir jetzt prüfen konnten, ob die Reaktionsbedingungen durch zugesetztes Protein beeinflußt werden, d.h., ob sie mit der katalytischen Funktion von Proteinen vereinbar sind. Als Modellprotein wählten wir RNase A, weil diese Nuclease leicht verfügbar und ihre Aktivität schnell durch Standardenzymtests bestimmbar ist.<sup>[8]</sup> Ein Vergleich der Kinetik der Reaktion (2) mit und ohne Zusatz von 14 mg mL<sup>-1</sup> RNase A ergab qualitativ keinen Unterschied in der Produktbildung, allerdings war die Reaktion in Gegenwart des Proteins deutlich schneller. Die Nuclease-Aktivität von RNase A und ihr kapillarelektrophoretisches Verhalten wurden vor und nach der Reaktion bestimmt; sie wurden durch die Pd-katalysierte Kreuzkupplung nicht beeinflußt.

Als Beispiel für eine regioselektive C-C-Kreuzkupplung eines multifunktionellen, aber ungeschützten Peptids wurde Pro(*p*-I-Phe)bradykinin **10** mit Propiolsäure umgesetzt [Reaktion (3)]. **10** ist ein synthetisches Undecapeptid, das in



guter Ausbeute durch kinetisch kontrollierte reverse Proteolyse mit Cathepsin C aus Pro(*p*-I-Phe)NH<sub>2</sub> und Bradykinin hergestellt werden kann.<sup>[4a]</sup> Durch kapillarelektrophoretische Verfolgung der Reaktion in wäßrigem TAPS-Puffer (pH 8.3) bei 35° ließ sich die problemlose Bildung eines einzigen Reaktionsprodukts nachweisen, das während 3 h in 91% Ausbeute entstand. Nach der Isolierung durch HPLC konnte dieses Produkt durch Fast-atom-bombardment(FAB)-MS ( $m/z=1373$ ;  $M^+$ ) als das gesuchte Kreuzkupplungsprodukt identifiziert werden.

In analoger Weise können Peptide mit Biotinderivaten kovalent verknüpft werden, so daß damit ein neuer Zugang für den Einsatz der in der biologischen Chemie weitverbreiteten Biotin-Avidin-Technologie<sup>[9]</sup> erschlossen wird. Zur Demonstration wurde Biotinylglutamoylpropargylamid **12** als



wasserlösliches Biotinderivat in wäßrigem TAPS-Puffer (pH 8.3) mit **10** umgesetzt [Reaktion (4)]. Bei einem Umsatz von 75% in 4 h bildete sich dabei ein einziges Reaktionsprodukt, das nach gelchromatographischer Reinigung im Elektrospray-Massenspektrum Peaks mit den korrekten  $m/z$ -Verhältnissen für das gesuchte Kreuzkupplungsprodukt ergab ( $m/z=1713$  ( $M+\text{H}^+$ ), 857 ( $M+2\text{H}^+$ ), 572 ( $M+3\text{H}^+$ )). Der Nachweis, daß dieses Produkt eine für die Bindung des Biotin-spezifischen Bindungsproteins Avidin kompetente

Biotinsubstruktur aufweist, gelang durch Affinitätskapillarelektrophorese (Abb. 1). Bei Zugabe von Avidin in 10-mg-Mengen zur Probe eines Ansatzes, bei dem die Kupplungs-

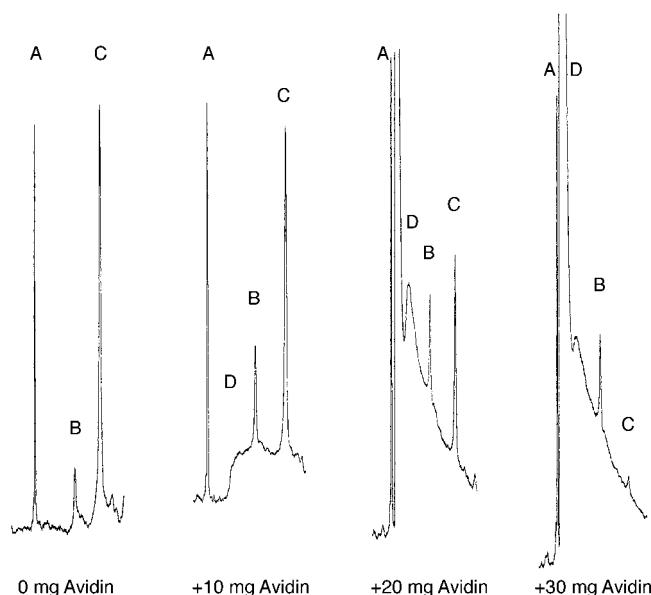


Abb. 1. Affinitätskapillarelektrophorese des Produkts **13** (C) aus Reaktion (4). A = Katalysatorkomplex; B = Pro(*p*-I-Phe)bradykinin **10**; D = Avidinproduktkomplex. Näheres siehe Text.

reaktion noch nicht beendet war, nahm nur der Produktheap ab, während der Peak eines neuen Proteinkomplexes zunahm.

Die C-C-Kreuzkupplung durch Katalyse mit Palladium-Guanidinoarylphosphan-Komplexen ermöglicht also die regioselektive Verknüpfung von Iodarenen und Alkinen, die einzeln chemisch stabil und in ihrer Reaktivität entgegengesetzt zu fast allen anderen funktionellen Gruppen in Proteinen sind. Deren spezifische Maskierung ist deshalb ebensowenig erforderlich wie Schutzmaßnahmen für die Tertiärstruktur, da die native Funktion der Proteine durch die äußerst milden Reaktionsbedingungen kaum geschädigt wird. Das Verfahren dürfte eine breite Anwendung für den Aufbau strukturell wohldefinierter Proteinkonjugate mit nichtnatürlichen funktionellen Gruppen finden.

Eingegangen am 24. September 1997 [Z10964]

**Stichwörter:** Bioorganische Chemie · Kreuzkupplungen · Palladium · P-Liganden · Proteine

[1] Prinzipiell bekannte Wege sind unter anderem Totalsynthese, Peptid-Segmentkondensation,<sup>[2]</sup> In-vitro-Proteinbiosynthese<sup>[3]</sup> und reverse Proteolyse.<sup>[4]</sup>

[2] a) M. Brinkley, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 2–13; b) H. D. Jakubke, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 189–191; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 175–177; c) D. Hilvert, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 201–203; d) C. F. Liu, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4149–4153.

[3] a) D. V. Goeddel, *Methods Enzymol.* **1990**, Vol. 185; b) J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Lab, Cold Spring Harbor, New York, **1989**.

[4] a) C. Gittel, F. P. Schmidtchen, *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 70–76; b) W. Kullmann, *Enzymatic Peptide Synthesis*, CRC, Boca Raton (FL), USA, **1987**; c) H. D. Jakubke, *Kontakte (Darmstadt)* **1991**, *60*–72; d) *ibid.* **1992**, *46*–60.

- [5] a) R. D. Stephens, C. E. Castro, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 3313–3315; b) C. E. Castro, E. J. Gaughan, D. C. Owsley, *ibid.* **1966**, *31*, 4071–4078; c) T. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 4467–4470.
- [6] a) W. A. Herrmann, C. W. Kohlpaintner, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1588–1609; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1524–1544; b) C. J. Li, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2023–2035; c) A. Lubineau, J. Augé, Y. Quenceau, *Synthesis* **1994**, 741–760; d) R. Rossi, A. Carpita, F. Bellina, *Org. Prep. Proc. Int.* **1995**, *27*, 127–160.
- [7] a) H. Dibowski, F. P. Schmidtchen, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 2325–2330; b) A. Heßler, O. Stelzer, W. S. Sheldrick, H. Dibowski, K. Worm, F. P. Schmidtchen, *J. Org. Chem.* **1997**, *52*, 2362–2369.
- [8] E. M. Crook, A. P. Mathias, B. R. Rabin, *Biochem. J.* **1960**, *74*, 234–238.
- [9] a) E. A. Bayer, M. Wilcheck, *Methods Biochem. Anal.* **1980**, *26*, 1–45; b) *Methods Enzymol.* **1990**, *184*, 138–160; c) Y. H. Chu, W. J. Lees, A. Stassinopoulos, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10616–10621.

## Selbstreplikation eines Peptids unter Ionenkontrolle\*\*

Shao Yao, Indraneel Ghosh, Reena Zutshi und Jean Chmielewski\*

Die Fähigkeit der DNA zur Selbstreplikation stellt den sich vermehrenden Spezies einen Transfermechanismus für das genetische Material zur Verfügung; sie hat darüber hinaus eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung der Biotechnologie gespielt.<sup>[1]</sup> DNA war mit dieser Fähigkeit zur Selbstreplikation lange einzigartig. Spezies, die für ihre Selbstreplikation auf die DNA setzen, vermögen sich Veränderungen in ihrer Umwelt durch natürliche Selektion anzupassen. Inzwischen gibt es aber auch eine Reihe von künstlichen molekularen Systemen, die zur Selbstreplikation fähig sind: Darunter finden sich Oligomere aus Nucleotiden,<sup>[2]</sup> Konjugate von Adenin und Kemps Tricarbonsäure,<sup>[3]</sup> Peptide<sup>[4]</sup> und Micellen.<sup>[5]</sup> Die Gewinnung eines selbstreplizierenden Moleküls aus einem großen Vorrat von Molekülen hat sich als eine größere Herausforderung erwiesen.<sup>[6]</sup> Nach jüngsten Untersuchungen von Lee et al. findet unter bestimmten Bedingungen bei Peptiden aus der GCN4-Leucinzipper-Domäne Selbstreplikation in einem autokatalytischen Cyclus statt.<sup>[4]</sup> Wir haben nach einem selbstreplizierenden Peptidsystem gesucht, das auf seine Umgebung reagiert und sich nur unter extremen Bedingungen repliziert. Wir stellen in diesem Beitrag ein Peptid vor, das sich autokatalytisch in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen repliziert.

Das Peptid K1K2 (Abb. 1) wurde auf der Grundlage einer Sequenz des KK-Peptids von Zhou et al.<sup>[7]</sup> und unseres Peptids E1E2<sup>[8]</sup> entwickelt. Das K1K2-Peptid enthält in den

[\*] Prof. J. Chmielewski, S. Yao, I. Ghosh, R. Zutshi  
Department of Chemistry  
Purdue University  
West Lafayette, IN 47907 (USA)  
Telefax: Int. + 765/494-0239  
E-mail: chml@chem.purdue.edu

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der National Science Foundation (9457372-CHE) gefördert. Wir danken Prof. G. von Kiedrowski, Bochum, für das Programm SimFit sowie für die Unterstützung durch ihn und Gary Knott.