

- [21] K. Wuthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, 1986.
- [22] Bei Zugabe von weniger als zwei Äquivalenten  $\text{AgO}_3\text{SCF}_3$  zu einer Lösung in THF erhält man breite, undefinierbare Signale im Arenbereich, die für ein auf der NMR-Zeitskala schnell fluktuierendes System typisch sind.
- [23] K. A. Connors, *Binding Constants: The Measurement of Molecular Complex Stability*, Wiley, New York, 1987.
- [24] Die Tatsache, daß in den UV-Spektren ein deutlicher isosbestischer Punkt bei 375 nm auftritt, deutet auf die selektive Entstehung nur einer Spezies bei der Komplexbildung hin.

## Peptidfaltung: Wenn die Simulation das Experiment erreicht

Xavier Daura, Karl Gademann, Bernhard Jaun, Dieter Seebach, Wilfred F. van Gunsteren\* und Alan E. Mark

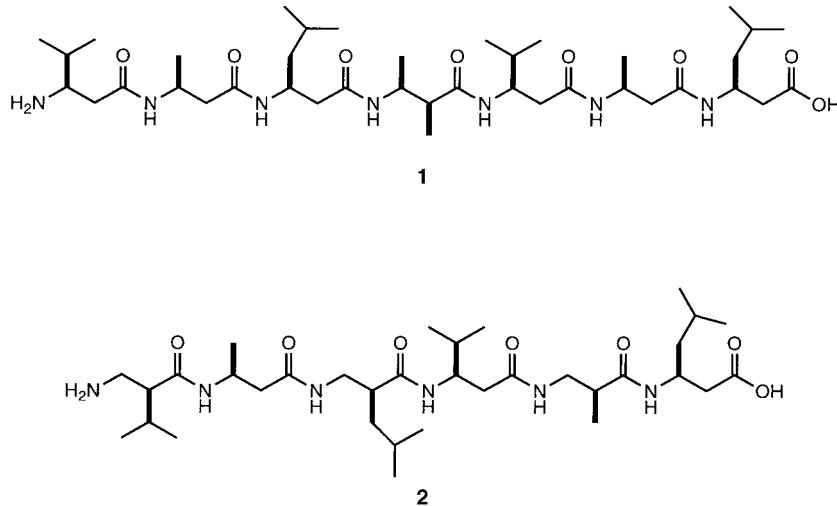
In den letzten beiden Jahrzehnten ist der Horizont von Wissenschaft und Technik durch den Einsatz neuer Computersimulationsmethoden ständig erweitert worden. Insbesondere ist die Computersimulation die Methode der Wahl, um Prozesse zu untersuchen, die gefährlich, teuer oder experimentell entweder überhaupt nicht oder wegen ihrer mikroskopischen Natur nur teilweise zugänglich sind. Moleküldynamik(MD)-Simulationen, in denen die zeitliche Entwicklung (Trajektorie) der Atompositionen eines Molekülsystems durch die Integration der Newton-Bewegungsgleichungen reproduziert wird, werden häufig benutzt, um dynamische Prozesse von Biomakromolekülen bei atomarer Auflösung zu untersuchen.<sup>[1]</sup>

Das Hauptziel jeder Simulation ist es, das Verhalten realer Systeme zu charakterisieren und vorherzusagen. Zwei Parameter entscheiden darüber, ob dieses Ziel erreicht werden kann: die Qualität des verwendeten Modells und die verfügbaren Rechenkapazitäten. Kein Modell ist eine exakte Repräsentation eines realen Systems. Alle Modelle müssen normalerweise durch Vergleich mit experimentellen Daten verifiziert werden. Jedoch ist diese Verifizierung bei Simulationen, die das Verständnis der Protein- oder Peptidfaltung zum Ziel haben, eine Herausforderung. Erstens ist die Dynamik der einzelnen Atome während des Faltungsprozesses nicht direkt experimentell zugänglich. Alle experimentellen Daten bei atomarer Auflösung beruhen auf Gleichgewichtsver-

teilungen zwischen verschiedenen Konformationen bei definierten Bedingungen. Zweitens liegt die Zeitskala, auf der relevante biomolekulare Systeme bei atomarer Auflösung simuliert werden können, gegenwärtig in der Größenordnung von Picosekunden bis Nanosekunden, während das Zeitlimit für die Faltung von Proteinen und der meisten Peptide wahrscheinlich eher im Mikrosekundenbereich liegt. Drittens beinhaltet der Prozeß der Peptidfaltung viele Freiheitsgrade (von Peptid und Lösungsmittel) und wird von kleinen Beträgen der (freien) Energie bestimmt, die lediglich in der Größenordnung von einigen Vielfachen von  $k_B T$  liegen. Dies stellt sowohl an die Genauigkeit der für die Simulation der atomaren Wechselwirkungen verwendeten Funktion als auch an das verwendete Modell höchste Anforderungen.

Wir berichten hier, daß die reversible Faltung von Peptiden in Lösung bei atomarer Auflösung durch Computersimulationen beschrieben werden kann. Dies ist von großem Nutzen, da für Peptide als hochflexible Moleküle nur wenige Strukturinformationen experimentell erhalten werden können. Die Kenntnis ihrer Strukturen ist aber von großer Bedeutung in bezug auf ihre Wechselwirkungen in lebenden Organismen.

Wir beschreiben hier die MD-Simulationen der Faltung zweier  $\beta$ -Peptide.  $\beta$ -Peptide sind nichtnatürliche Peptide, die aus  $\beta$ -Aminosäuren bestehen ( $\text{R}^4\text{-NH-C}^{\beta}\text{HR}^3\text{-C}^{\alpha}\text{HR}^2\text{-CO-R}^1$ ).<sup>[2]</sup> Sie sind stabil gegen den Abbau durch Proteasen und können je nach Position der Seitenketten am Rückgrat verschiedene Sekundärstrukturen einnehmen. Die sich daraus ergebenden Anwendungsmöglichkeiten als Peptidmimetika fanden in letzter Zeit große Beachtung.<sup>[2-6]</sup> Zwei  $\beta$ -Peptide wurden nun untersucht: das Hepta- $\beta$ -peptid **1** und das Hexa- $\beta$ -peptid **2**.



$\text{H-}\beta^3\text{-HVal-}\beta^3\text{-HAla-}\beta^3\text{-HLeu-}(\text{S},\text{S})\text{-}\beta^3\text{-HAla}(\alpha\text{Me})\text{-}\beta^3\text{-HVal-}\beta^3\text{-HAla-}\beta^3\text{-HLeu-OH}$  **1**

$\text{H-}\beta^2\text{-HVal-}\beta^3\text{-HAla-}\beta^2\text{-HLeu-}\beta^3\text{-HVal-}\beta^2\text{-HAla-}\beta^3\text{-HLeu-OH}$  **2**

Bei **1** befinden sich die Seitenketten ausschließlich in Position  $\text{R}^3$  (außer bei der vierten Aminosäure, die bei  $\text{R}^3$  und  $\text{R}^2$  methyliert ist), während bei **2** die Seitenketten zwischen den Positionen  $\text{R}^2$  und  $\text{R}^3$  alternieren. In Methanol und

[\*] Prof. Dr. W. F. van Gunsteren, Dr. X. Daura, Dr. A. E. Mark  
Laboratorium für Physikalische Chemie, ETH Zürich  
ETH-Zentrum, CH-8092 Zürich (Schweiz)  
Fax: (+41) 1-632-1039  
E-mail: wfvggn@igc.phys.chem.ethz.ch  
K. Gademann, Prof. Dr. B. Jaun, Prof. Dr. D. Seebach  
Laboratorium für Organische Chemie, ETH Zürich  
ETH-Zentrum, CH-8092 Zürich (Schweiz)

Pyridin bildet **1** eine linksgängige Helix (H-Brücken zwischen den Aminosäuren *i* und *i* + 2), in der immer drei Aminosäuren eine Helixwindung bilden ( $3_1$ -Helix) und in der die C=O-Bindungen der Amidgruppen in Richtung des N-Terminus weisen (Abbildung 1a).<sup>[3]</sup> **2** bildet hingegen in den gleichen

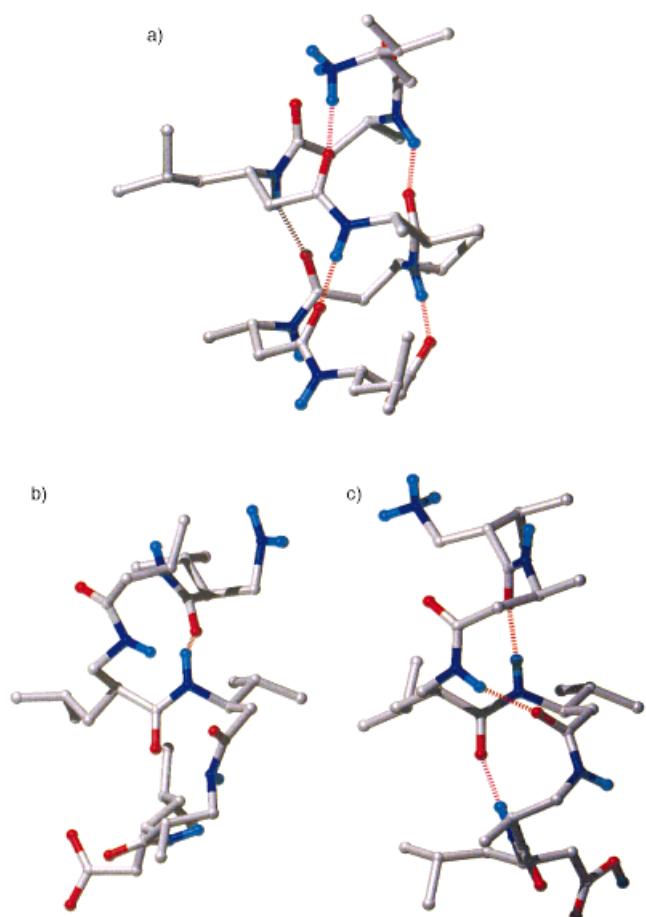


Abbildung 1. Molekülmodelle des Hepta- $\beta$ -peptids **1**<sup>[3]</sup> (a) und des Hexa- $\beta$ -peptids **2**<sup>[5]</sup> (b), die anhand von NMR-spektroskopischen Daten (Methanol, 298 K) berechnet wurden. c) Molekülmodell des Hexa- $\beta$ -peptids **2**, berechnet anhand von NMR-spektroskopischen Daten (Pyridin, 298 K).<sup>[4]</sup> H-Brücken (mit 0.25 nm als maximalem Proton-Acceptor-Abstand und  $135^\circ$  als minimalem (Donor-Proton-Acceptor)-Winkel) sind durch rote, gestrichelte Linien symbolisiert.

Lösungsmitteln eine rechtsgängige Helix (H-Brücken zwischen den Aminosäuren *i* und *i* + 1 sowie *i* und *i* - 3), in der die C=O-Bindungen der Amidgruppen alternierend nach oben und unten parallel zur Helixachse weisen (Abbildung 1b, c).<sup>[4, 5]</sup> Die Strukturen des Hepta- und des Hexa- $\beta$ -peptids wurden NMR-spektroskopisch bestimmt.<sup>[3-5]</sup> Für **2** wurden aus den NMR-Daten kleine Unterschiede zwischen seiner Struktur in Methanol (Abbildung 1b) und der in Pyridin (Abbildung 1c) ermittelt. Die in Pyridin gemessenen NMR-Daten wurden mit einem Modell in Einklang gebracht, in der das Hexa- $\beta$ -peptid eine reguläre Helix mit drei H-Brücken (NH(3)-O(4), NH(4)-O(1), NH(6)-O(3)) bildet. Im folgenden wird das Vorliegen einer H-Brücke durch einen Proton-Acceptor-Abstand von 0.25 nm und einen (Donor-Proton-Acceptor)-Winkel von mindestens  $135^\circ$  definiert. Das Hexa- $\beta$ -peptid wird jedoch, um gleichzeitig alle 34 bei der

Messung in Methanol über den Kern-Overhauser-Effekt (nuclear Overhauser effect, NOE) bestimmten Abstandskriterien zu erfüllen, in eine verzerrte helicale Struktur mit nur einer H-Brücke (NH(4)-O(1)) gezwungen (Abbildung 1b). Diese Verzerrung wird durch drei der 34 Abstandskriterien hervorgerufen. Der Unterschied (root mean square difference, RMSD) in den Atompositionen zwischen den beiden Strukturmodellen (Abbildung 1b, c) beträgt 0.07 nm für das Peptidrückgrat der Aminosäuren 2–5.

Die hier verwendeten Systeme sind aus mehreren Gründen gut geeignet, um die Faltung von Peptiden mit MD-Simulationen zu untersuchen. Erstens falten sich diese Peptide bei Simulationen innerhalb einiger Nanosekunden, wobei die Zeitskala der Faltung in Methanol experimentell noch nicht ermittelt worden ist. Dies ist im Vergleich zu kleinen helixbildenden  $\alpha$ -Peptiden in wässriger Lösung schnell.<sup>[7]</sup> Zweitens hat Methanol eine geringere Dichte als Wasser und ist somit vom Rechenaufwand her ein günstigeres Lösungsmittel (etwa um den Faktor 3), um Faltungsvorgänge zu simulieren. Drittens können  $\beta$ -Peptide in Abhängigkeit von Art und Position der Seitenketten eine große Zahl von Sekundärstrukturen einnehmen. Die kleinen Unterschiede in der Sequenz der beiden Peptide führen zu zwei vollkommen verschiedenen Faltungsmustern (Abbildung 1), obwohl Seebach und Mitarbeiter<sup>[4]</sup> das Hexa- $\beta$ -peptid so entworfen hatten, daß es die linksgängige Helixstruktur des Hepta- $\beta$ -peptids einnehmen sollte. Weil die Konformation sehr stark von der Art der interatomaren Wechselwirkungen abhängt, ist dieses System ein empfindlicher Test für das in den Simulationen verwendete Kraftfeld. Wichtig ist insbesondere auch, daß das hier verwendete Kraftfeld GROMOS96<sup>[8]</sup> nicht für  $\beta$ -Aminosäuren oder  $\beta$ -Peptide entwickelt wurde. Deshalb besteht kein Grund zur Annahme, daß das Kraftfeld angepaßt wurde, um die experimentell ermittelten Faltungsmuster zu reproduzieren. Außerdem besteht kein grundlegender Unterschied zwischen der Untersuchung der Faltung von  $\beta$ -Peptiden in Methanol mit MD-Simulationen und der Faltung von aus  $\alpha$ -Aminosäuren bestehenden Peptiden in Wasser, außer dem Unterschied zwischen der Zeitskala, in der die Faltung erfolgt, und der Zeitskala, in der sie simuliert werden kann.

In Abbildung 2 sind die RMS-Abweichungen zwischen den in Abbildung 1 gezeigten Strukturen, die die hauptsächlich in Lösung vorliegenden, anhand von NMR-Daten bestimmten Konformationen bei 298 K repräsentieren, und den Konformationen, die während der Simulationen bei 340 K erhalten wurden, als Funktion der Zeit dargestellt. Beim Hepta- $\beta$ -peptid **2** wurde eine Konformation als gefaltet angesehen, wenn der RMSD-Wert  $\leq 0.1$  nm betrug (Rückgrat, Aminosäuren 2–6).<sup>[9]</sup> Beim Hexa- $\beta$ -peptid **2** wurde ein unterer Grenzwert von 0.08 nm (Rückgrat, Aminosäuren 2–5) verwendet, um die unterschiedliche Zahl der Aminosäuren in den beiden Peptiden zu berücksichtigen. Wie in Abbildung 2 zu erkennen ist, falten und entfalten sich sowohl **1** als auch **2** während der Simulationsdauer von 50 ns mehrmals. In Abbildung 3 sind Beispiele für gefaltete und entfaltete Konformationen gezeigt, die bei den Simulationen erhalten wurden. Obwohl die Simulation für **1** ausgehend von einer  $3_1$ -Helix-Struktur begonnen wurde, faltet sich dieses Peptid auch aus einer vollständig gestreckten Konformation

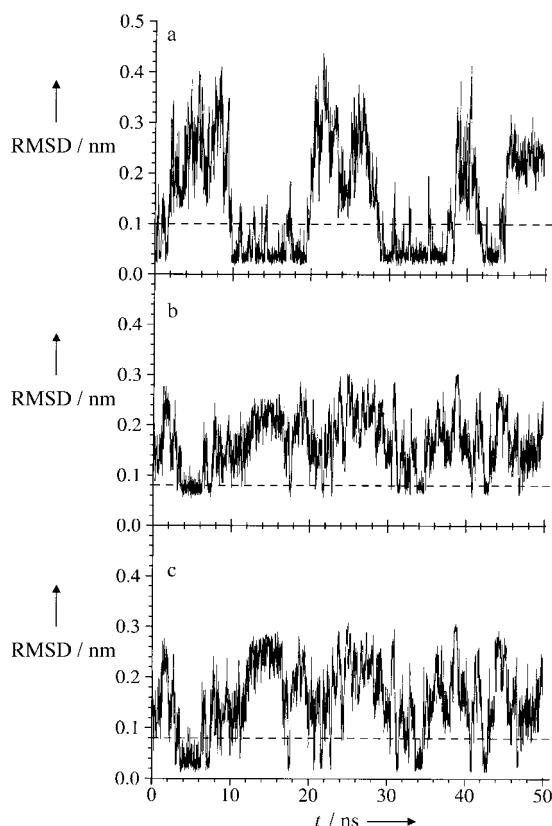


Abbildung 2. RMS-Abweichungen für Atompositionen des Rückgrats der simulierten Strukturen von denen der Modellstrukturen als Funktion der Zeit bei 340 K: a) RMS-Abweichungen zur Modellstruktur in Abbildung 1a für die Aminosäuren 2–6 des Hepta- $\beta$ -peptids **1**. b) RMS-Abweichungen zur Modellstruktur in Abbildung 1b für die Aminosäuren 2–5 des Hexa- $\beta$ -peptids **2** (0.33 nm für die vollständig gestreckte, lineare Ausgangsstruktur). c) RMS-Abweichungen zur Modellstruktur in Abbildung 1c für die Aminosäuren 2–5 des Hexa- $\beta$ -peptids **2** (0.36 nm für die vollständig gestreckte, lineare Ausgangsstruktur). Strukturen mit kleineren RMS-Werten als den durch die gestrichelten Linien definierten Schwellenwerten weisen eindeutig die gleiche Faltung auf wie die Modellstrukturen, mit denen sie verglichen werden.

bei 340 K.<sup>[9]</sup> Das rechtsgängig-helicale Hexa- $\beta$ -peptid ist bei 340 K eindeutig instabiler als das linksgängig-helicale Hepta- $\beta$ -peptid. Die gemessene Lebensdauer für eine linksgängig-helicale Hepta- $\beta$ -peptid-Konformation betrug maximal 10 ns, die einer rechtsgängig-helicalen Hexa- $\beta$ -peptid-Konformation nur ca. 3 ns. Eine Clusteranalyse (siehe *Experimentelles*) wurde mit 5000 Strukturen durchgeführt, die in Intervallen von 0.01 ns aus den Trajektorien berechnet wurden. Bei der Simulation von **1** war die in Abbildung 1a gezeigte Konformation die Hauptkonformation, die etwa während der Hälfte der Simulationsdauer populiert war. Hingegen wurde für **2** keine Hauptkonformation erhalten. Drei Cluster, darunter der am stärksten populierte, die zusammen ca. 30 % des gesamten Ensembles abdecken, enthalten aber die in Abbildung 1c gezeigte Konformation. Interessanterweise war auch für das Hexa- $\beta$ -peptid die linksgängige  $3_1$ -Helix-Konformation während ca. 1.3 % der Simulationszeit populiert. Man kann nun unter folgenden Annahmen die freie Energie der Faltung ( $\Delta G_{\text{Faltung}}$ ) berechnen: Alle Konformationen mit einem RMSD-Wert  $\leq 0.10$  nm (für **1**, Aminosäuren 2–6, Abbildung 2a) oder  $\leq 0.08$  nm (für **2**, Aminosäuren 2–5,

Abbildung 2c) für das Rückgrat bezüglich der jeweiligen Modellstruktur werden als gefaltet angesehen, und alle Konformationen mit einem RMSD-Wert für das Rückgrat  $\geq 0.15$  nm (**1**) oder  $\geq 0.12$  nm (**2**) werden als ungefaltet angesehen. Damit können die Werte für  $\Delta G_{\text{Faltung}}$  bei 340 K zu 0 kJ mol<sup>-1</sup> für **1** und 4 kJ mol<sup>-1</sup> für **2** abgeschätzt werden.

Nun kann die Frage beantwortet werden, ob die in Abbildung 1b gezeigte Konformation ein geeignetes Modell für die am stärksten populierte Konformation des Hexa- $\beta$ -peptids **2** in Methanol bei Raumtemperatur ist. Die Simulationen (Abbildung 2b, c) zeigen eindeutig, daß das in Abbildung 1c gezeigte Konformer ein besseres Modell für die Hauptkonformation des Hexa- $\beta$ -peptids in Methanol ist als das in Abbildung 1b dargestellte. Die Konformation in Abbildung 1b hat durch ihre ungünstigen bindenden (Bindungs- und Torsionswinkel) und nichtbindenden Wechselwirkungen im Kraftfeld eine hohe Energie. Daraus geht hervor, daß diese Konformation eher unwahrscheinlich ist, auch wenn sie alle in Methanol gemessenen NOE-Abstandskriterien erfüllt. Die gemessenen NOE-Werte stammen somit eher von einem Gemisch zweier oder mehrerer Konformationen, die bei 298 K vorliegen und in einem schnellen Gleichgewicht miteinander stehen. Die drei NOE-Abstandskriterien, die vom Molekülmodell in Abbildung 1e nicht erfüllt werden, sind charakteristisch für eine linksgängige  $3_1$ -Helix und wurden in Pyridin nicht erhalten. Die rechtsgängig-helicale Konformation des Hexa- $\beta$ -peptids war die Hauptkonformation in der bei 340 K durchgeföhrten Simulation. Trotzdem waren auch andere Konformationen signifikant populiert, so auch die linksgängige  $3_1$ -Helix (1.3 %). Wenn man unter Verwendung der Beziehung  $\text{NOE} \sim \langle 1/r^6 \rangle^{-1/6}$  das Mittel über das Ensemble der Konformationen bei 340 K bildet, wird nur ein NOE-Abstandskriterium (für die Messung in Methanol) um mehr als 0.1 nm verletzt. Trotz der Tatsache, daß die aus der Simulation bei 340 K erhaltenen Daten nicht direkt mit den experimentellen Daten bei Raumtemperatur verglichen werden können, steht fest, daß die rechtsgängig-helicale Konformation des Hexa- $\beta$ -peptids **2** in Methanol bei 298 K nicht so stabil wie die linksgängig-helicale Konformation des Hepta- $\beta$ -peptids **1** ist. Zusätzlich können auch alternative Konformationen wie die  $3_1$ -Helix für einige der in Methanol gemessenen NOE-Werte des  $\beta$ -Hexapeptids ursächlich sein.

Mit dieser Arbeit haben wir klar gezeigt, daß es möglich ist, die reversible Faltung von Peptiden in Lösung bei atomarer Auflösung zu simulieren, auch wenn es sich hier um nicht-natürliche  $\beta$ -Peptide handelt. Trotz der kleinen Sequenzunterschiede der beiden untersuchten Peptide sagen die Ergebnisse der Simulationen eine linksgängige  $3_1$ -Helixstruktur für das Hepta- $\beta$ -peptid und eine rechtsgängige Helixstruktur für das Hexa- $\beta$ -peptid korrekt voraus. Unsere Resultate eröffnen viele Möglichkeiten der Anwendung von MD-Simulationen für die Untersuchung der Prozesse der Peptidfaltung und die Vorhersage möglicher Faltungsmuster von Peptiden in Lösung.

#### Experimentelles

Zwei MD-Simulationen von 50 ns Dauer wurden bei 340 K und 1 atm für **1** und **2** durchgeführt. Periodische Randbedingungen wurden verwendet. Die

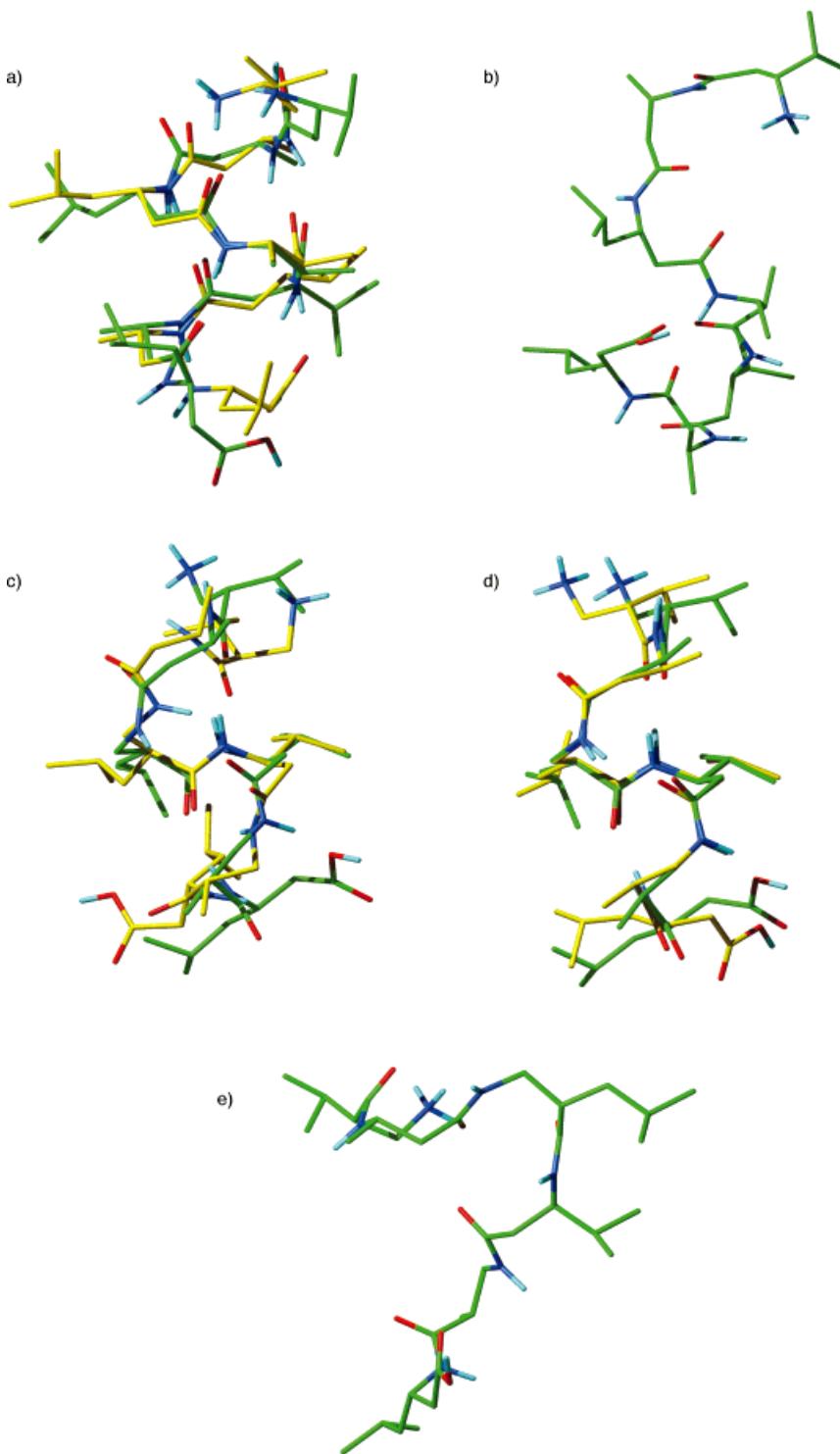


Abbildung 3. Ausgewählte Konformationen, die aus den Simulationen erhalten wurden: a) Überlagerung der Modellstruktur aus Abbildung 1a mit der Konformation des Hepta- $\beta$ -peptids **1**, die nach einer Simulationsdauer von 18 ns erhalten wurde (RMS-Abweichung 0.03 nm; Rückgrat, Aminosäuren 2–6). b) Konformation des Hepta- $\beta$ -peptids **2**, die nach einer Simulationsdauer von 24 ns erhalten wurde (RMS-Abweichung 0.25 nm; Rückgrat, Aminosäuren 2–6). c) Überlagerung der Modellstruktur aus Abbildung 1b mit der Konformation von **2**, die nach einer Simulationsdauer von 5 ns erhalten wurde (RMS-Abweichung 0.07 nm; Rückgrat, Aminosäuren 2–5). d) Überlagerung der Modellstruktur aus Abbildung 1c mit der Konformation von **2**, die nach einer Simulationsdauer von 5 ns erhalten wurde (RMS-Abweichung 0.02 nm; Rückgrat, Aminosäuren 2–5); e) Konformation von **2**, die nach einer Simulationsdauer von 26 ns erhalten wurde (RMS-Abweichung von den Modellstrukturen aus Abbildung 1b, c 0.21 nm; Rückgrat, Aminosäuren 2–5).

Ausgangsstruktur für **1** war eine 3<sub>1</sub>-Helix (Abbildung 1a) und eine vollständig gestreckte lineare Struktur (alle Rückgrat-Diederwinkel wurden auf 180° gesetzt) für **2**. Das Hepta- $\beta$ -peptid **1** wurde mit 962 Methanolmolekülen in einem rechteckigen Kasten solvatisiert, und das Hexa- $\beta$ -peptid **2** wurde mit 1435 Methanolmolekülen in einem abgeschnittenen Oktaeder solvatisiert. In beiden Fällen wurde für den anfänglichen Minimalabstand zwischen Peptid und Rand der untere Grenzwert für die nichtbindenden Wechselwirkungen (1.4 nm) gewählt. Die für die Simulationen gewählte Temperatur entspricht der früher geschätzten<sup>[9]</sup> Schmelztemperatur von **1** im Kraftfeld. Es wurden keine experimentellen Einschränkungen (restraints) verwendet. Die hier nicht aufgeführten Parameter entsprachen denen aus Lit. [9]. Für das Kraftfeld wurde das GROMOS96-Programmpaket verwendet.<sup>[8]</sup>

Der RMSD-Wert der Atompositionen zwischen allen Paaren von Strukturen wurde bestimmt, um Cluster von Strukturen in einer Trajektorie zu finden. Für jede Struktur wurde so die Zahl der anderen Strukturen berechnet, für die der RMSD-Wert  $\leq 0.1$  nm (**1**, Rückgrat, Aminosäuren 2–6) oder  $\leq 0.08$  nm (**2**, Rückgrat, Aminosäuren 2–5) betrug (Nachbarkonformationen). Die Struktur mit der höchsten Zahl an Nachbarkonformationen wurde als Zentrum eines Clusters angesehen und bildete zusammen mit allen Nachbarkonformationen einen (ersten) Cluster. Alle Strukturen dieses Clusters wurden dann aus dem Ensemble aller Strukturen entfernt. Dieser Prozeß wurde so lange wiederholt, bis keine Strukturen mehr übrigblieben. Auf diese Weise wurde eine Serie nichtüberlappender Cluster erhalten.

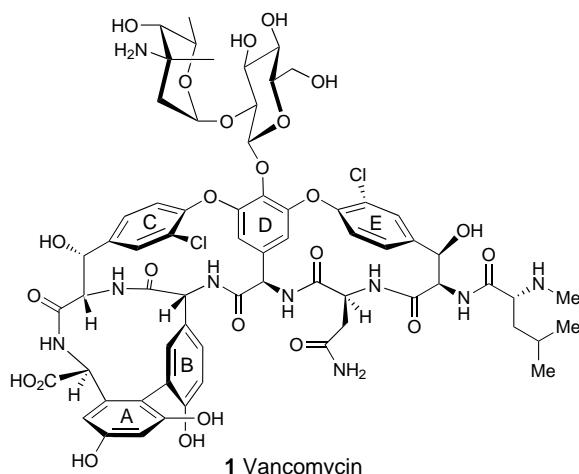
Die freien Energien der Faltung wurden berechnet nach  $\Delta G_{\text{Faltung}} = -k_{\text{B}} T \ln(p_{\text{gefaltet}}/p_{\text{ungefaltet}})$ , wobei  $k_{\text{B}}$  die Boltzmann-Konstante und  $T$  die Temperatur ist.  $p_{\text{gefaltet}}$  und  $p_{\text{ungefaltet}}$  sind die relativen Wahrscheinlichkeiten für die gefaltete bzw. die entfaltete Konformation. Die Werte für  $p_{\text{gefaltet}}$  und  $p_{\text{ungefaltet}}$  wurden anhand der Zahl gefalteter bzw. ungefalteter Konformationen, die bei den Simulationen erhalten wurden, näherungsweise bestimmt.

Eingegangen am 1. September 1998 [Z 12359]  
International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.*  
1999, 38, 239–243

**Stichwörter:** Computerchemie • Konformationsanalyse • Moleküldynamik • Peptide • Peptidfaltung

- [1] *Computer simulation of biomolecular systems, theoretical and experimental applications, Vols. 1–3* (Hrsg.: W. F. van Gunsteren, P. K. Weiner, A. J. Wilkinson), Kluwer, Dordrecht, 1989–1997.
- [2] D. Seebach, M. Overhand, F. N. M. Kühnle, B. Martinoni, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1996**, 79, 913–941.
- [3] D. Seebach, P. E. Ciceri, M. Overhand, B. Jaun, D. Rigo, L. Oberer, U. Hommel, R. Amstutz, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1996**, 79, 2043–2066.
- [4] D. Seebach, K. Gademann, J. V. Schreiber, J. L. Matthews, T. Hintermann, B. Jaun, L.

- Oberer, U. Hommel, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 2033–2038.
- [5] D. Seebach, S. Abele, K. Gademann, G. Guichard, T. Hintermann, B. Jaun, J. L. Matthews, J. V. Schreiber, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 932–982.
- [6] a) T. Hintermann, D. Seebach, *Chimia* **1997**, *50*, 244–247; b) X. Daura, W. F. van Gunsteren, D. Rigo, B. Jaun, D. Seebach, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1410–1417; c) D. H. Appella, L. A. Christianson, I. L. Karle, D. R. Powell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13071–13072; d) D. H. Appella, L. A. Christianson, D. A. Klein, D. R. Powell, X. Huang, J. J. Barchi, Jr., S. H. Gellman, *Nature* **1997**, *387*, 381–384; e) S. Krauthäuser, L. A. Christianson, D. R. Powell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11719–11720; f) S. H. Gellman, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173–180; g) S. Borman, *Chem. Eng. News* **1997**, *75*(24), 32–35; h) U. Koert, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1922–1923; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1836–1837; i) B. L. Iverson, *Nature* **1997**, *385*, 113–115.
- [7] a) S. Williams, T. P. Causgrove, R. Gilman, K. S. Fang, R. H. Callender, W. H. Woodruff, R. B. Dyer, *Biochemistry* **1996**, *35*, 691–697; b) P. A. Thompson, W. A. Eaton, J. Hofrichter, *Biochemistry* **1997**, *36*, 9200–9210.
- [8] W. F. van Gunsteren, S. R. Billeter, A. A. Eising, P. H. Hünenberger, P. Krüger, A. E. Mark, W. R. P. Scott, I. G. Tironi, *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 manual and user Guide*, Vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, Zürich, **1996**, S. 1–1042.
- [9] X. Daura, B. Jaun, D. Seebach, W. F. van Gunsteren, A. E. Mark, *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 925–932.



ist in der letzten Zeit<sup>[3]</sup> wegen seiner wachsenden Bedeutung für Chemie, Biologie und Medizin ins Rampenlicht gerückt. Seine Totalsynthese wurde lange als gewaltige Herausforderung für die organische Synthesekemie angesehen.<sup>[4]</sup> In den letzten Jahren führten intensive Forschungsbemühungen zur Entwicklung von Totalsynthesen des Vancomycin-Aglycons **2** (siehe Schema 1), die kürzlich von der Arbeitsgruppe von Evans<sup>[5]</sup> sowie unserer eigenen<sup>[6]</sup> abgeschlossen wurden. Hier berichten wir über die Totalsynthese des gesamten Moleküls von Vancomycin **1**. Diese Synthese beinhaltet die schrittweise Glycosidierung eines geeignet geschützten Derivats des zuvor hergestellten Aglycons **2**<sup>[6]</sup> und liefert die Zielverbindung mit hoher Effizienz und Stereoselektivität.

Bevor die schwierige Aufgabe in Angriff genommen werden konnte, die Kohlenhydrateinheiten mit dem Vancomycin-Aglycon an der phenolischen OH-Gruppe des Rings D zu verknüpfen, mußte ein geeignet geschütztes Derivat hergestellt werden. Dazu wurde **2** mit TBSOTf in Gegenwart von 2,6-Lutidin persilyliert, wodurch nach wässriger Aufarbeitung das Hexa-TBS-Derivat **3** in 72 % Ausbeute erhalten wurde. Das Umsetzen von **3** mit CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> im Überschuß in Ether lieferte den Methylester **4** (91 % Ausbeute), der nach Behandeln mit CbzCl und wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung das Cbz-geschützte Derivat **5** ergab (92 % Ausbeute). Der Schlüsselschritt, das selektive Entfernen der TBS-Gruppe am D-Ring von **5**, wurde durch Umsetzen mit KF·Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>[7]</sup> erreicht und lieferte den gewünschten Glycosyl-Acceptor **6** in 60 % Ausbeute (Schema 1; Tabelle 1).

Die abschließende erfolgreiche Verknüpfung der Disaccharideinheit mit dem Substrat **6** erforderte etliche Versuche zur Feinabstimmung der Wahl der Schutzgruppen und der Glycosidierungsreaktionen. So standen anfänglichen Erfolgen bei der Glycosidierung mit vollständig O-benzylierten und N-Cbz-geschützten Kohlenhydrat-Donoren<sup>[8]</sup> Fehlschläge beim Entfernen der Benzylgruppen ohne gleichzeitiges reduktives Abspalten des Chlorsubstituenten im E-Ring gegenüber. Ebenso blieben Glycosidierungsversuche mit persilylierten oder peracetylierten Kohlenhydrat-Donoren aufgrund von sterischer Hinderung, Labilität unter den verwendeten Glycosidierungsbedingungen und/oder zu geringer Reaktivität erfolglos. Als gelungener Kompromiß erwiesen sich die Ausstattung des von Glucose abgeleiteten

## Totalsynthese von Vancomycin\*\*

K. C. Nicolaou,\* Helen J. Mitchell,  
Nareshkumar F. Jain, Nicolas Winssinger,  
Robert Hughes und Toshikazu Bando

Innerhalb der Klasse der Glycopeptid-Antibiotika<sup>[1]</sup> nimmt Vancomycin **1**<sup>[2]</sup> eine vorherrschende Position als hochwirksamer und klinisch vielfältig einsetzbarer Wirkstoff zur Bekämpfung schwerer, durch wirkstoffresistente Erreger hervorgerufener bakterieller Infektionen ein.<sup>[1–3]</sup> Dieses neuartige Antibiotikum, das aus dem zur Gruppe der Actinomyceten gehörenden Bakterium *Streptomyces orientalis* (später umbenannt in *Nocardia orientalis* und schließlich als *Amycolatopsis orientalis* neu klassifiziert)<sup>[2c]</sup> isoliert wurde,

[\*] Prof. Dr. K. C. Nicolaou, H. J. Mitchell, Dr. N. F. Jain, N. Winssinger, R. Hughes, Dr. T. Bando  
Department of Chemistry and  
Skaggs Institute for Chemical Biology  
Scripps Research Institute  
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)  
Fax: (+1) 619-784-2469  
E-mail: kcn@scripps.edu  
und  
Department of Chemistry and Biochemistry  
University of California, San Diego  
9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093 (USA)

[\*\*] Wir danken Dr. D. H. Huang und Dr. G. Siuzdak für ihre Hilfe bei der NMR-Spektroskopie bzw. bei der Massenspektrometrie. Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (USA), vom Skaggs Institute for Chemical Biology sowie von den Firmen Pfizer, Schering Plough, Hoffmann La Roche und Merck gefördert.