

(Bruker) mit D8-Goniometer, ausgerüstet mit einer Tieftemperatur-einheit im ω -Modus,^[11] MoK α -Strahlung ($\lambda = 0.71073$ Å), Graphitmonochromator; Lp-Korrektur; Lösung durch Direkte Methoden, Verfeinerung mit voller Matrix, Kleinst-Fehlerquadrate-Verfahren; $R_1 = 0.0274$, $wR_2 = 0.0719$ (für 10117 Reflexe mit $I > 2\sigma(I)$, $R_1 = 0.0300$, $wR_2 = 0.0734$ (für alle 10944 Datenreflexe); Reflex/Parameter-Verhältnis 15.05; max./min. Restelektronendichte $+0.919/-0.593$ e Å $^{-3}$. CCDC-178267 (**5**) und -178268 (**11**) enthält die ausführlichen kristallographischen Daten zu dieser Veröffentlichung. Die Daten sind kostenlos über www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html erhältlich (oder können bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: Cambridge Crystallographic Data Centre, 12, Union Road, Cambridge CB2 1EZ; Fax: (+44) 1223-336-033; oder deposit@ccdc.cam.ac.uk).

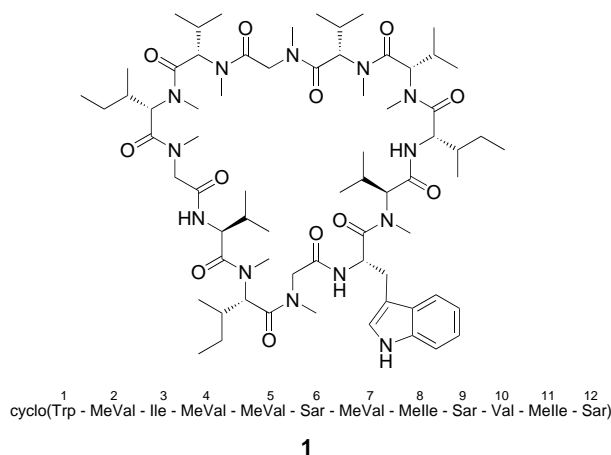
- [6] U. Herber, T. Pechmann, B. Weberndörfer, K. Ilg, H. Werner, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 309–319.
 [7] K. G. Caulton, *Chemtracts: Inorg. Chem.* **1999**, 592–595.
 [8] P. Braunstein, N. M. Boag, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2493–2499; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2427–2433.
 [9] M. Sauthier, B. Le Guennic, V. Deborde, L. Toupet, J.-F. Halet, R. Reau, *Angew. Chem.* **2001**, *11*, 234–237; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 228–231.
 [10] Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten der Phenylgruppen wurden der Einfachheit halber weggelassen.
 [11] D. Stalke, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 171–178.

Totalsynthese des nematiziden Cyclododecapeptids Omphalotin A durch eine racemisierungsfreie Festphasenkupplung mit Triphosgen**

Bernd Thern, Joachim Rudolph und Günther Jung*

In memoriam Ernst Bayer

Der Naturstoff Omphalotin A (**1**) gehört zu einer Familie cyclischer Dodecapeptide des Basidiomyceten *Omphalotus olearius* und zeichnet sich durch eine selektive Wirkung gegen pflanzenpathogene Nematoden wie *Meloidogyne incognita* aus.^[1] Unter In-vitro-Bedingungen übertrifft Omphalotin A



bekannte Nematizide wie beispielsweise Ivermectin an Wirksamkeit und Selektivität.^[2] Die hohe Spezifität und die für ein Nematizid ungewöhnliche Struktur lassen vermuten, dass der Wirkung von **1** ein neuartiger Wirkmechanismus zugrunde liegt. Zu dessen Aufklärung sind Mengen des Cyclopeptides nötig, die biotechnologisch nicht produziert werden können.^[2]

Strukturell ist das stark lipophile Omphalotin A eng mit den immunsuppressiven Cyclosporin-Therapeutika verwandt. Neun der zwölf Aminosäuren sind N-methyliert, was zu konformativer Flexibilität führt und chemische Synthesen erheblich erschwert, wie die Erfahrungen aus der Synthese von Cyclosporinen zeigen.^[3] Schlechte Kupplungsausbeuten, Nebenreaktionen wie Diketopiperazinbildung und Racemisierung^[4] sowie die Säurelabilität von N-Alkylpeptiden^[5] sind die Hauptprobleme. Obwohl etliche Berichte über Reagentien für die Kupplung der sterisch stark gehinderten N-Methylaminosäuren existieren,^[6] ist eine zufriedenstellende Lösung für dieses Problem noch nicht gefunden worden.^[7]

Wir stellen hier die Synthese von **1** mit Fmoc-Aminosäuren am Polystyrolträger mit Trityl-Anker (TCP-Harz) vor. Dieser Anker erlaubt eine Produktabspaltung unter äußerst milden Bedingungen mit Hexafluorisopropanol (HFIP),^[8] was angesichts der Säurelabilität der Syntheseprodukte als entscheidend angesehen wurde.

Zunächst wurden in Modellversuchen vier unterschiedliche Reagentien (DCC: Dicyclohexylcarbodiimid, BTC: Triphosgen, DIC/HOAt: Diisopropylcarbodiimid/Hydroxyazabenzotriazol, TFFH: Tetramethylfluorformamidiniumhexafluorphosphat) zur isolierten Kupplung aller N-methylierten Amidbindungen in **1** systematisch verglichen. Dabei erwies sich die BTC-Methode nach Falb et al.^[9] als deutlich überlegen (Tabelle 1).

HPLC-MS-Untersuchungen der abgespaltenen, BTC-kuppelten Produkte zeigten aber, wie auch die von Falb et al.^[9] publizierten HPLC-Chromatogramme, erhebliche Mengen an Nebenprodukten. Zudem stellte sich heraus, dass die beschriebene Methode der BTC-Kupplung^[9] für die Synthese längerer Peptide ungeeignet ist, da bereits nach wenigen solcher Kupplungen auf TCP-Harz kein Produkt mehr isoliert werden konnte. Auf Wang-Harz mit der weniger säurelabilen p-Alkoxybenzyl-Ankergruppe erfolgte bei der N-Fmoc-Deblockierung des Dipeptidyl-Harzes mit Piperidin

[*] Prof. Dr. G. Jung, Dipl.-Chem. B. Thern
 Institut für Organische Chemie
 Universität Tübingen
 Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tübingen (Deutschland)
 Fax: (+49) 7071-295-560
 E-mail: guenther.jung@uni-tuebingen.de
 Dr. J. Rudolph
 Zentrale Forschung, Bayer AG
 51368 Leverkusen (Deutschland)
 Neue Adresse: Bayer Corporation
 Pharmaceutical Division, Dept. of Chemistry
 400 Morgan Lane, West Haven, CT 06516 (USA)

[**] B.T. erhielt ein Stipendium des Graduiertenkollegs „Analytische Chemie“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Wir danken Dietmar G. Schmid für hochauflösende FTICR-MS-Messungen, Graeme Nicholson für Enantiomerenanalysen mit GC-MS, Dr. Joachim Wesener für Diskussionen zur MS-Analytik, Daniel Bischoff für präparative HPLC-MS-Messungen sowie Heidi Theis und Roman Hanke für experimentelle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Tabelle 1. Alle acht im Omphalotin A vorkommenden N-Methylamidbindungen wurden jeweils mit vier verschiedenen Kupplungsmethoden hergestellt. Bei den quantitativ verlaufenen Umsetzungen zeigte der negative Chloraniltest nach einem (+ +) bzw. zwei (+) Kupplungszyklen die Abwesenheit sekundärer Amine an. Bei unvollständiger Reaktion (–) blieb der Chloraniltest auch nach Doppelkupplung positiv. Die Ergebnisse wurden nach Abspaltung der Peptide mit HPLC bzw. HPLC-MS verifiziert.

Geknüpfte N-Methylamidbindung ^[a]	TFFH ^[b]	DIC/HOAt ^[c]	DCC ^[d]	BTC ^[e]
Fmoc-Trp-OH → H-MeVal-R	–	+	+	++
Fmoc-Ile-OH → H-MeVal-R	–	–	+	++
Fmoc-Sar-OH → H-MeVal-R	–	++	++	++
Fmoc-MeVal-OH → H-MeVal-R	–	–	–	++
Fmoc-MeVal-OH → H-Melle-R	–	–	–	++
Fmoc-Val-OH → H-Melle-R	–	–	+	++
Fmoc-MeVal-OH → H-MeGly-R	++	++	++	++
Fmoc-Melle-OH → H-MeGly-R	++	++	++	++

[a] R = Phe-TCP-Harz; [b] Fmoc-AS, TFFH: 5 Äquiv., DIEA: 10 Äquiv., 1 h in DMF; [c] Fmoc-AS, HOAt, DIC, DIEA: 3 Äquiv., 1 h in DMF; [d] Fmoc-AS: 6 Äquiv., DCC: 3 Äquiv., 1.5 h in DMF; [e] vgl. Lit. [9].

quantitative Diketopiperazinbildung. Deshalb entschieden wir uns, das TCP-Harz weiterzuverwenden und das BTC-Kupplungsverfahren den Eigenschaften des Trityl-Linkers anzupassen.^[10]

Zur ersten erfolgreichen Synthese von **1** wurde folgende Methode entwickelt: Das N-Fmoc-deblockierte Peptidyl-TCP-Harz wird mit Diisopropylethylamin (DIEA) vorbehandelt. Die Aktivierung der Fmoc-N-Methylamino-säure wird bei Raumtemperatur in THF unter ausschließlichem Zusatz von Collidin und BTC durchgeführt.^[11] Dies ermöglicht die Anwendung von BTC auf säurelabilem TCP-Harz. Die zunächst bei Synthesen ausgehend von harzgebundenem Sarcosin beobachtete vorzeitige Produktabspaltung konnte dadurch verhindert werden, dass sowohl die Behandlung des Syntheseharzes mit DIEA als auch die Fmoc-Abspaltung mit Piperidin zeitlich auf ein Minimum verkürzt wurden. Auf eine erhöhte Temperatur während der Kupplung kann verzichtet werden, da die Anwesenheit der stärkeren Base DIEA die Kupplungsreaktion offenbar deutlich beschleunigt.^[12] Diese Änderungen verringerten die Bildung von Nebenprodukten weitestgehend. Außerdem konnte der Gesamtbedarf an Fmoc-Aminosäure ohne Ausbeuteeinbuße von 5 auf 3.5 Äquivalente je Kupplung verringert werden.

Selbst die äußerst schwierige Kupplung von Fmoc-MeVal auf immobilisiertes MeVal verläuft nach der modifizierten BTC-Aktivierung quantitativ. Dagegen war die Kupplungsausbeute bei Kupplung von nicht N-methylierten Fmoc-Aminosäuren zum Teil unzureichend. In diesen Fällen wurden mit einer DIC/HOAt- oder HATU-Aktivierung bessere Ergebnisse erzielt.

Ausgehend von mit Fmoc-Sarcosin vorbelegtem TCP-Harz wurde das lineare Dodecapeptid mit C-terminalem Sar⁶ [OmA(7-6)] unter Anwendung einer

Kombination von BTC-, DIC/HOAt- und HATU-Kupplungen in einer Reinheit von 90 % (HPLC, $\lambda = 214$ nm) und einer Ausbeute von 84 % erhalten. Lediglich drei Kupplungen mussten mehrfach durchgeführt werden, die übrigen waren bereits nach einem Kupplungszyklus quantitativ verlaufen (Abbildung 1). Das Rohprodukt der Cyclisierung wurde durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt. Diastereomerenreines^[13] Omphalotin A wurde mit einer Cyclisierungsausbeute von 37 % und einer Gesamtausbeute von 31 % bezogen auf die erste Belegung des Syntheseharzes mit Fmoc-Sarcosin erhalten.

Analoge Synthesen ausgehend von immobilisiertem Sar⁹ und Sar¹² lieferten ebenfalls die Zielverbindung in reiner Form. Insgesamt wurden 102 mg diastereomerenreines **1** hergestellt.

Die hochaufgelösten ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren des synthetischen Produktes entsprechen den Literaturdaten;^[1b] die mit ES-FTICR-MS im ultrahochauflösenden Modus gemessene Masse stimmt bis auf einen relativen Massenfehler von 2 ppm mit dem berechneten Wert überein (Abbildung 2). Zusätzlich konnte die Identität durch Koelution in der analytischen HPLC sowie durch Vergleich der ES-FTICR-MS-Tochterionenspektren des Naturstoffs und des synthetischen Produkts bestätigt werden.

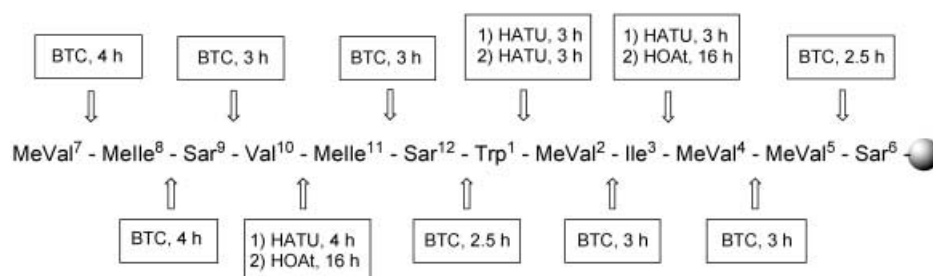


Abbildung 1. Syntheseverlauf für das lineare Dodecapeptid ausgehend von Sar⁶ [Omphalotin A(7-6)]. Nach den angegebenen Zeiten waren die jeweiligen Kupplungen vollständig (Chloraniltest-, Kaiser- und/oder HPLC-Kontrolle). Peakfläche des Fmoc-deblockierten Dodecapeptids (Rohprodukt): 90 % (HPLC, $\lambda = 214$ nm).

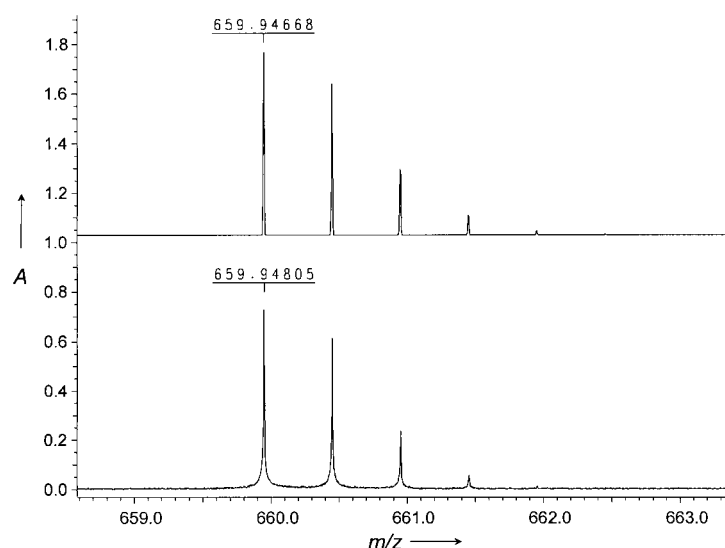


Abbildung 2. ES-FTICR-Massenspektren des synthetischen Omphalotin A ($[M+2H]^{2+}$). Die obere Spur zeigt das simulierte, die untere Spur das im ultrahochauflösenden Modus gemessene Spektrum. Der relative Massenfehler beträgt 2 ppm.

Mit der modifizierten BTC-Kupplung wurde somit eine sehr effiziente, experimentell einfach durchführbare und äußerst kostengünstige Methode zur Kupplung von *N*-Methylaminosäuren gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass diese neue BTC-Aktivierung ohne Racemisierung verläuft.^[13] Mit dieser Festphasen-Kupplungsmethode wurde ein Syntheseweg entwickelt, der die Totalsynthese von Omphalotin A, verglichen mit Festphasen- und Lösungssynthesen der strukturell verwandten Cyclosporine, in sehr kurzer Zeit und sehr hoher Ausbeute erlaubt. Diese Methode wird auch die Synthese anderer *N*-alkylierter Peptidwirkstoffe wie Cyclosporine,^[14] Tentoxine, Dolastatine, Jaspamide oder Didemnine^[7] erheblich erleichtern. Außerdem hat sie ein hohes Potenzial zur Automatisierung für die multiple, parallele Polypeptidsynthese,^[15] das gegenwärtig von uns untersucht wird. Versuche, die Effizienz der BTC-Methode auch für die Kupplung nicht *N*-alkylierter Aminosäuren zu verbessern, werden derzeit in unserem Labor durchgeführt.

Experimentelles

Fmoc-*N*-Methylaminosäuren wurden nach Freidinger et al.^[16] hergestellt. HOAt und HATU stammen von Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), TFFH von Advanced ChemTech (Bamberg, Deutschland). TCP-Harz wurde von PepChem (Tübingen, Deutschland) bezogen. Präparative HPLC erfolgte auf dem „high-throughput purifier“ (HTP) mit Kopplung an das M-8000-ES-MS (Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland) auf einer C18-Umkehrphase (isokratische Elution: 62% Acetonitril in H₂O, 0.1% TFA) unter MS- und UV-Detektion (Diodenarray). ES-FTICR-MS-Messungen wurden mit dem Daltonic APEX II Spektrometer (Bruker, Bremen, Deutschland) durchgeführt.

Die Synthese von **1** ausgehend von Sar⁶ wurde an TCP-Harz, das mit Fmoc-Sarcosin vorbelagt war, durchgeführt. Es wurden 238 mg (0.58 mmol g⁻¹; 138 μmol; 1 Äquiv.) Harz eingesetzt.

BTC-Kupplung: Fmoc-Peptidyl-Harz wurde mit 20% Piperidin/DMF (2 min + 8 min) deblockiert. Nach dem Waschen wurde das Harz in wasserfreiem THF (1 mL) für 15 min vorgequollen. Währenddessen wurde die zu kuppelnde Fmoc-Aminosäure (483 μmol; 3.5 Äquiv.) in einer 68 mm Lösung von BTC in wasserfreiem THF gelöst (2.4 mL; 1.15 Äquiv. BTC). Zu der klaren Lösung wurde *sym*-Collidin (180 μL; 10 Äquiv.) gegeben (Fällung von Collidinhydrochlorid). Das Harz wurde mit DIEA (190 μL, 8 Äquiv.) versetzt. Unmittelbar danach wurde die Suspension zum Harz gegeben und für die angegebenen Zeiten (Abbildung 1) geschüttelt, abgesaugt und gewaschen.

DIC/HOAt-Kupplung: Fmoc-Aminosäure (414 μmol; 3 eq) und HOAt (57 mg; 3 Äquiv.) wurden in wenig CH₂Cl₂/DMF (1:1) gelöst. Dazu wurde DIC (65 μL; 3 Äquiv.) gegeben und gut durchmischt. Nach 15 min wurde diese Lösung zu dem in DMF vorgequollenen, Fmoc-entschützten Peptidylharz gegeben und für die jeweils angegebenen Zeiten (Abbildung 1) geschüttelt.

HATU-Kupplung: Fmoc-Aminosäure (552 μmol; 4 Äquiv.) und HATU (210 mg; 4 Äquiv.) wurden in wenig CH₂Cl₂/DMF (1:1) gelöst. Dazu wurde DIEA (190 μL, 8 Äquiv.) gegeben und die Lösung gut durchmischt. Nach 15 min wurde diese Lösung zu dem in DMF vorgequollenen, Fmoc-deblockierten Peptidylharz gegeben und für die jeweils angegebenen Zeiten (Abbildung 1) geschüttelt.

Abspaltung und Cyclisierung: Nach Fmoc-Abspaltung wurde das Dodecapeptidyl-TCP-Harz gewaschen, mit HFIP/CH₂Cl₂ 1:5 (5 mL) versetzt und für 15 min geschüttelt. Die abfiltrierte Abspaltlösung wurde unter vermindertem Druck zur Trockene eingengt. Die Abspaltung wurde zweimal wiederholt. Es wurden 155 mg lineares Dodecapeptid OmA(7-6) (116 μmol; 84%) erhalten.

Dieses Peptid (155 mg; 116 μmol; 1 Äquiv.) wurde in CH₂Cl₂ (400 mL) gelöst. Dazu wurden nacheinander HOAt (32 mg; 2 Äquiv.), EDCI (45 mg; 2 Äquiv.) und DIEA (160 μL; 8 Äquiv.) gegeben. Nach 16 h Rühren bei RT

wurde die Lösung unter vermindertem Druck eingengt und mit gesättigter NaHCO₃-Lösung, 8% Citronensäure und gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde chromatographisch an Kieselgel (Ethylacetat/Methanol 95:5) getrennt. Ausbeute: 57 mg **1** (43 μmol; 31%).

Analytische Daten von **1**: Die ¹H- und ¹³C-NMR-Daten des synthetischen Omphalotin A stimmen mit denen des Naturstoffes^[1b] überein. HR-MS (ES-FTICR-MS): ber.: *m/z* 659.94668, gef.: *m/z* 659.94805 ([*M*+2H]²⁺) (Abbildung 2). Weitere Analysedaten und experimentelle Angaben siehe Hintergrundinformationen.

Eingegangen am 22. Februar 2002 [Z18750]

- [1] a) A. Mayer, H. Anke, O. Sterner, *Nat. Prod. Lett.* **1997**, *10*, 25–32; b) O. Sterner, W. Etzel, A. Mayer, H. Anke, *Nat. Prod. Lett.* **1997**, *10*, 33–38; c) A. Mayer, H. Anke, O. Sterner, M. Kilian, R. Hain, D. Berg, W. Etzel, H. Gau (Bayer AG), WO 97/20857, **1996**.
- [2] A. Mayer, M. Kilian, B. Hoster, O. Sterner, H. Anke, *Pestic. Sci.* **1999**, *55*, 27–30.
- [3] S. Y. Koo, R. M. Wenger, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 695–705; b) P. Raman, S. S. Stokes, Y. M. Angell, G. R. Flentke, D. H. Rich, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5734–5735.
- [4] J. R. McDermott, N. L. Benoiton, *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 2555–2561.
- [5] a) J. Urban, T. Vaisar, R. Shen, M. S. Lee, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1996**, *37*, 182–189; b) T. Vaisar, J. Urban, *J. Mass Spectrom.* **1998**, *33*, 505–524.
- [6] a) P. Li, J. C. Xu, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8301–8304; b) P. Li, J. C. Xu, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2951–2958.
- [7] J. M. Humphrey, A. R. Chamberlin, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2243–2266.
- [8] R. Bollhagen, M. Schmiedberger, K. Barlos, E. Grell, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, *22*, 2559–2560.
- [9] F. Falb, T. Yechezkel, Y. Salitra, C. Gilon, *J. Pept. Res.* **1999**, *53*, 507–517. Die Aminosäure wird hier mit BTC und Collidin in THF voraktiviert und für 1 h bei 50 °C mit Peptidylharz umgesetzt.
- [10] Bei den von Falb et al.^[9] beschriebenen Synthesen wurden Peptidamide auf Rink-Amid-Harz hergestellt, das keine Diketopiperazinbildung zulässt.
- [11] J. Rudolph, G. Jung, B. Thern, Patent application pending (Bayer AG).
- [12] Eine Steigerung der Kupplungseffizienz durch Einsatz einer schwachen Base zur Carboxy-Aktivierung und einer stärkeren Base zur Kupplungsreaktion ist für das System DIC/HOAt beschrieben worden: L. A. Carpino, A. El-Faham, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 6813–6830.
- [13] Totalhydrolysate von **1** und von Zwischenprodukten wurden mit GC-MS an einer chiralen Phase untersucht (W. König, I. Benecke, N. Lucht, E. Schmidt, J. Schulze, S. Sievers, *J. Chromatogr.* **1983**, *279*, 555–562). Dabei konnten nur vernachlässigbare Mengen an *D*-Aminosäuren nachgewiesen werden, siehe Hintergrundinformationen.
- [14] B. Thern, J. Rudolph, G. Jung, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, im Druck.
- [15] a) *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries* (Hrsg.: G. Jung), Wiley-VCH, Weinheim, **1996**; b) *Combinatorial Chemistry—Synthesis, Analysis and Screening* (Hrsg.: G. Jung), Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [16] R. M. Freidinger, J. S. Hinkle, D. S. Perlow, B. H. Arison, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 77–81.