

## 8. Chemische Synthese von Peptiden

Heute ist die chemische Synthese von Peptiden und Proteinen mit Molekulargewichten von 3.000 – 10.000 Da möglich. Zwei Entwicklungen machten dieses im wesentlichen möglich

- Kupplungsausbeuten von > 99,5%
- Razemisierungsfreiheit der Kupplung

Heute werden Peptide und Peptidomimetika auf zwei Wegen synthetisch erschlossen.

- 1) Flüssigphasenchemie
- 2) Festphasenchemie

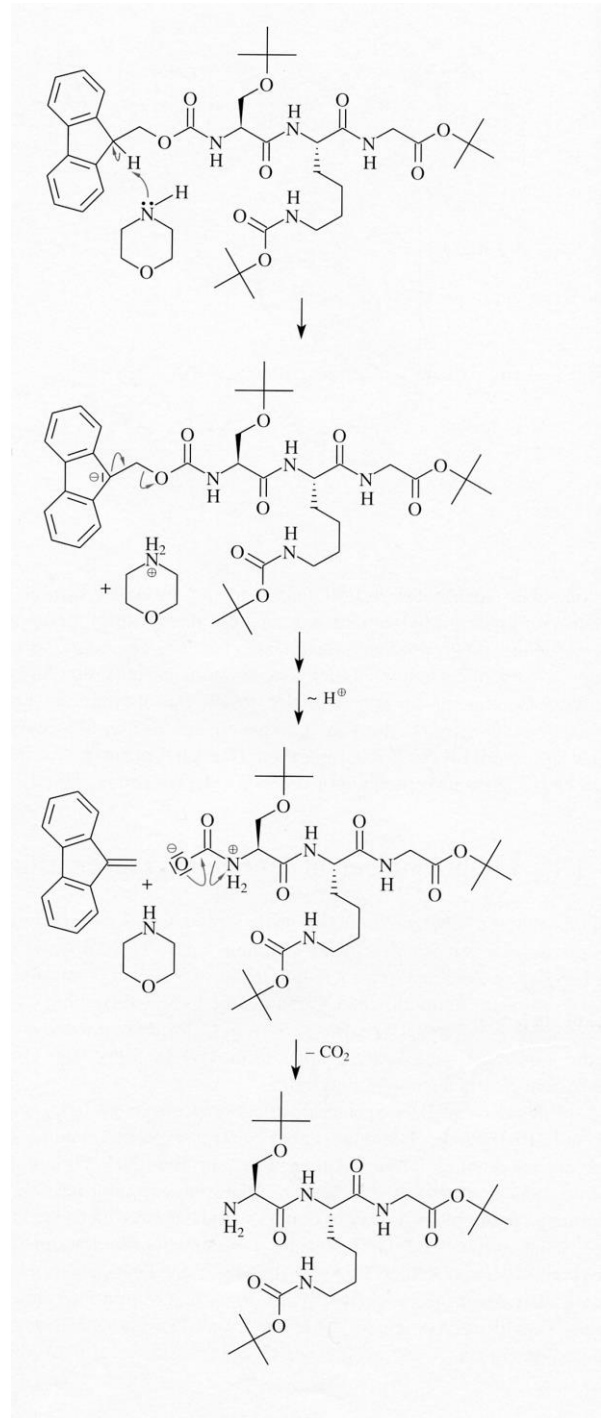
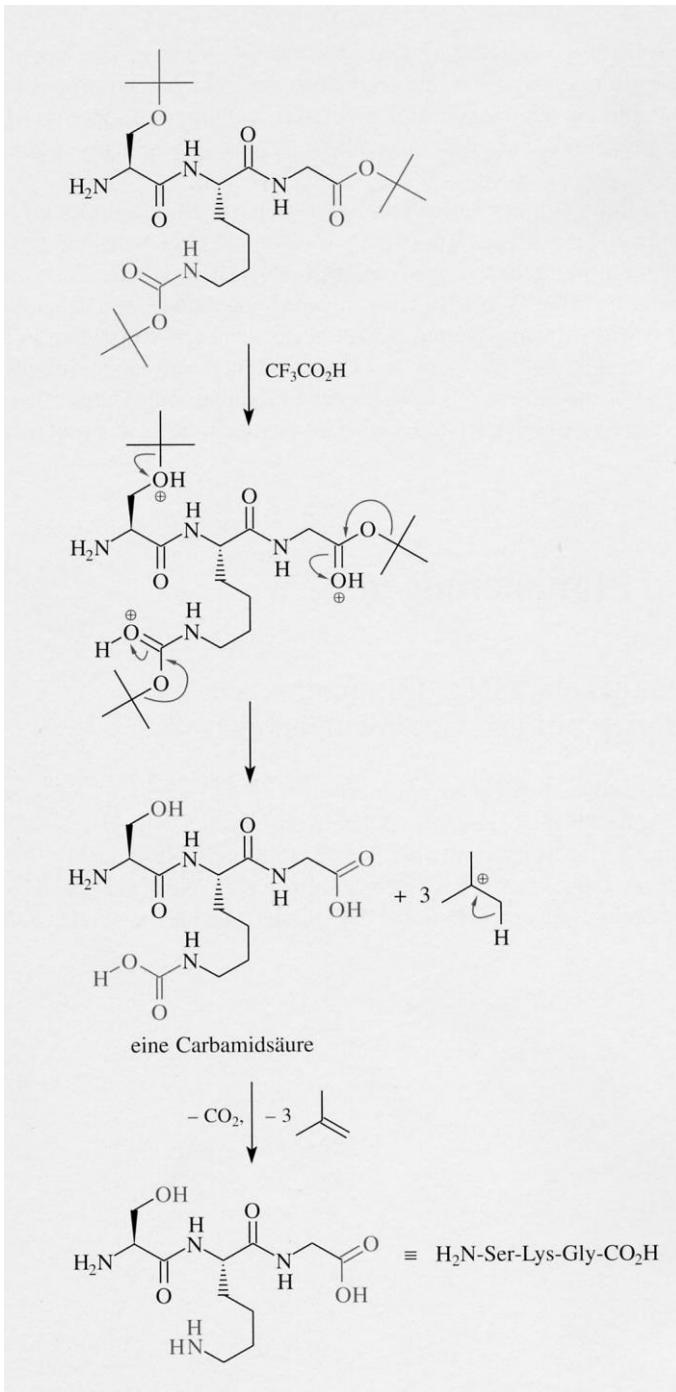
Beide Methoden beruhen auf einer ausgeklügelten Schutzgruppenchemie. So müssen die Seitenketten der Aminosäure permanent geschützt werden. Die  $\alpha$ -Aminogruppe wird temporär geschützt und die Carbonsäurefunktion wird zur Kupplung aktiviert.

### 8.1 Die N $^{\alpha}$ -Schutzgruppe

Für die Kupplung muß die Aminogruppe der Aminosäure geschützt werden, da sonst nach Aktivierung der Säure die Aminosäure mit sich selber reagieren würde. Nach der Kupplung muß diese Schutzgruppe schnell und mild abspaltbar sein, damit eine weitere Kupplung erfolgen kann. Die Synthese von Peptiden wird somit vom C  $\rightarrow$  N Terminus durchgeführt. Als temporäre  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe sind heute zwei Urethan-Schutzgruppen gebräuchlich.

- |                                      |                               |
|--------------------------------------|-------------------------------|
| 1) <i>tert</i> -Butoxycarbonyl (Boc) | abspaltbar mit H <sup>+</sup> |
| 2) Fluorenylmethoxycarbonyl          | abspaltbar mit sek. Aminen    |

Die Fmoc-Schutzgruppe wird nach einem E<sub>1cb</sub>-Mechanismus abgespalten unter Bildung einer Carbanion Zwischenstufe. Die Boc Schutzgruppe eliminiert einem E<sub>1</sub>-Mechanismus folgend über eine Carbokation Zwischenstufe



Entschützung der Boc Schutzgruppe einem  $\text{E}_1$ - Mechanismus folgend und der Fmoc- Schutzgruppe via eines  $\text{E}_{1\text{cb}}$  Mechanismus (Aus *R. Brückner, Reaktionsmechanismen*)

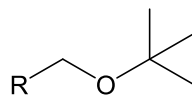
## 8.2 Die Seitenkette-Schutzgruppen

Die Schutzgruppe der Seitenketten müssen orthogonal entschützbar sein. Diese Schutzgruppen müssen stabil sein während der Entschützung der  $N\alpha$ -Schutzgruppen (Boc oder Fmoc), müssen aber am Ende der Synthese möglichst leicht abspaltbar sein.

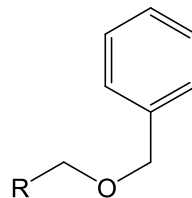
### 8.2.1 Ser, Thr, Tyr

Für die Boc- und Fmoc-Synthesestrategie schützt man die OH-Gruppen meist als Ether. Im Fall der Boc-Chemie wird das Peptid am Ende mit HF entschützt und vom Harz abgespalten. Im Fall eines Fmoc-Syntheseprotokolls wird zum Schluß mit Trifluoressigsäure TFA (90%) abgespalten. Im Boc-Syntheseprotokoll werden daher Schutzgruppen verwendet, die bedingt säurestabil sind. Sie überleben die temporäre Entschützung der Boc-Schutzgruppe mit 1% TFA nach jeder Peptid-Kupplung, werden aber mit HF am Ende der kompletten Synthese entfernt. Es wird die Benzyl (Bn)-Schutzgruppe im Boc Protokoll eingesetzt. Im Fmoc-Syntheseprotokoll wird der *tert*-Butylether verwendet. Dieser überlebt die temporäre Entschützung der Fmoc-Gruppe mit Piperidin, wird aber am Ende mit 90%-TFA gespalten.

Für die Aminosäure Tyr wechselt man gerne auf die 2,6-Dichlorbenzylschutzgruppe.



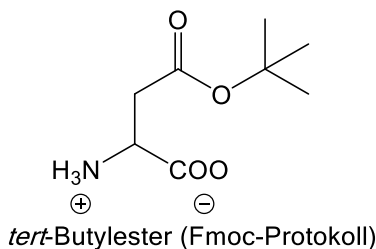
*tert*-Butylether (Fmoc-Protokoll)



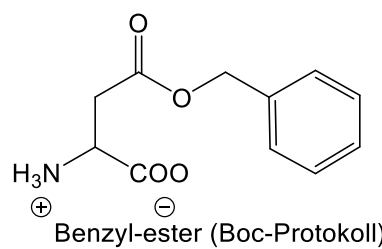
Benzyl-ether (Boc-Protokoll)

### 8.2.2 Asp und Glu.

Hier werden im Fall der Boc-Chemie die Benzylester verwendet. Für die Fmoc Chemie kommt der *tert*-Butylester zum Einsatz.



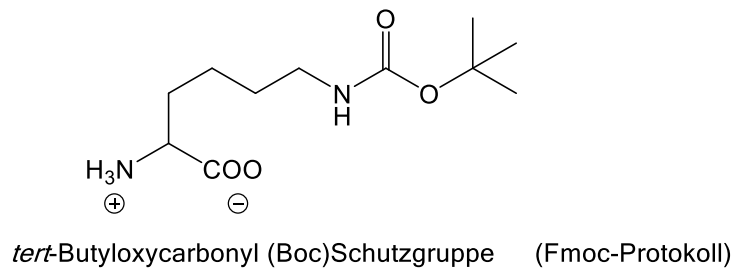
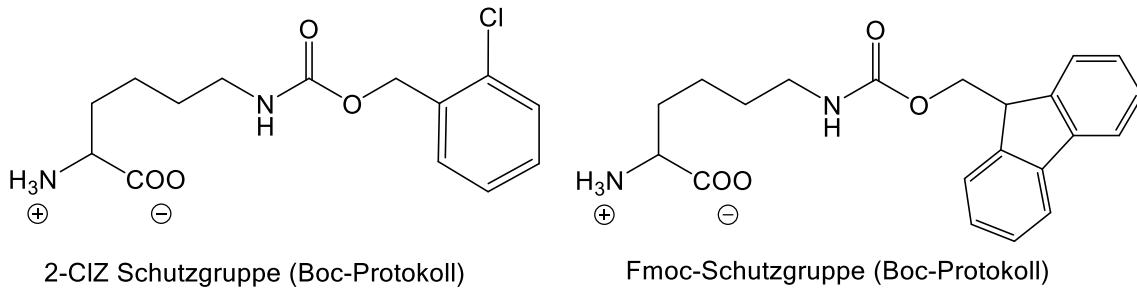
*tert*-Butylester (Fmoc-Protokoll)



Benzyl-ester (Boc-Protokoll)

### 8.2.3 Lys

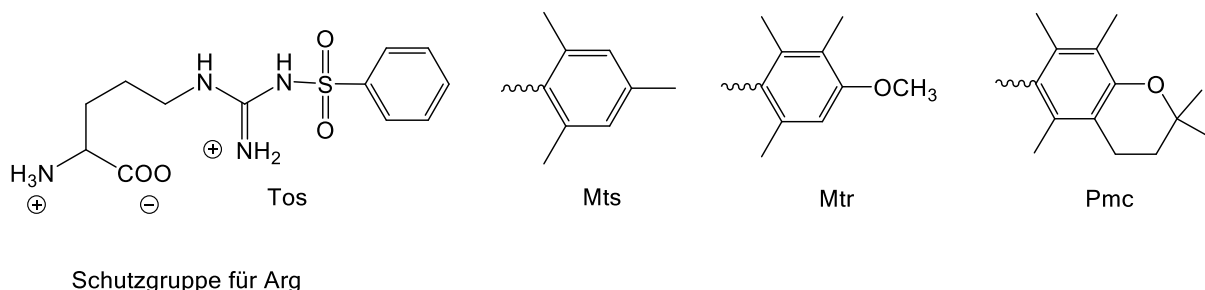
Die  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin muß unbedingt geschützt werden. Im Boc Syntheseprotokoll wird hierzu die Fmoc-Gruppe verwendet. Alternativ kann die 2-Chlorbenzyloxycarbonylschutzgruppe (2ClZ) eingesetzt werden. Diese ist labiler als die klassische Z = Benzyloxycarbonylschutzgruppe.



Wird Fmoc Chemie betrieben, so verwendet man meistens die Boc-Schutzgruppe.

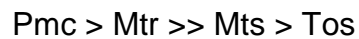
### 8.2.4 Arg

Die Guanidiniumgruppe muß mit ihrem  $\text{pK}_a$ -Wert von 12.5 nicht unbedingt geschützt werden. Allerdings ist dann die Löslichkeit schlecht. Praktisch werden meistens Benzenesulfonylschutzgruppen verwendet. Innerhalb der Boc-Chemie ist die 4-Toluolsulfonyl (Tos) und die Mesitylen-2-sulfonyl-Gruppe (Mts) beliebt.



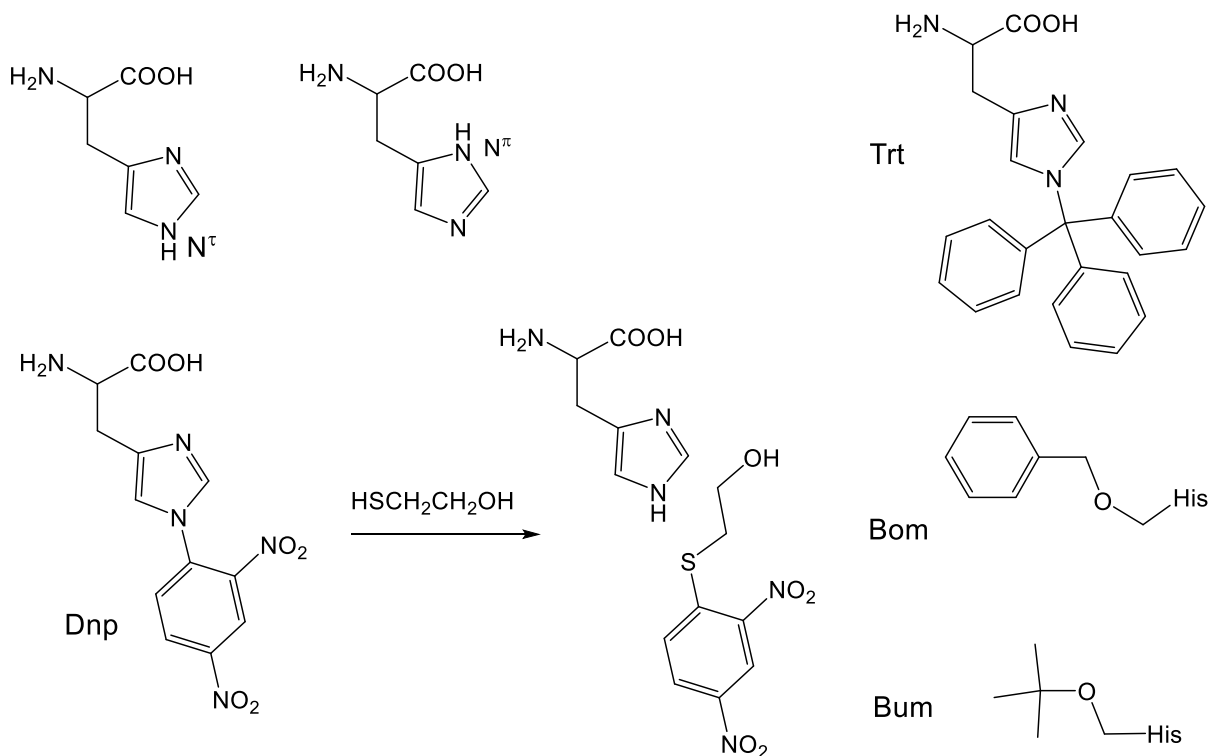
Betreibt man Fmoc-Chemie, so wird die Mtr-Schutzgruppe oder die Pmc-Schutzgruppe verwendet.

Die Säureempfindlichkeit dieser Schutzgruppen nimmt in der Reihe wie folgt ab:



### 8.2.5 His

Im Fall des Histidins wird entweder  $\text{N}^\tau$  oder  $\text{N}^\pi$  geschützt. So kann das  $\text{N}^\tau$  einfach Tosyl geschützt werden. Im Boc Syntheseprotokoll wird hingegen meistens die 2,4-Dinitrophenylschutzgruppe eingesetzt (Dnp). Im Fall der Fmoc-Strategie wird  $\text{N}^\tau$  häufig Boc oder einfach Trt geschützt. Für  $\text{N}^\tau$  wird häufig die Bom-Schutzgruppe = Benzyloxymethyl oder die Bum-Schutzgruppe = *tert*-Butoxymethyl verwendet. Die Verwendung von  $\text{N}^\pi$  Schutzgruppen reduziert das Razemisierungsrisiko.



### 8.2.6 Asn, Gln

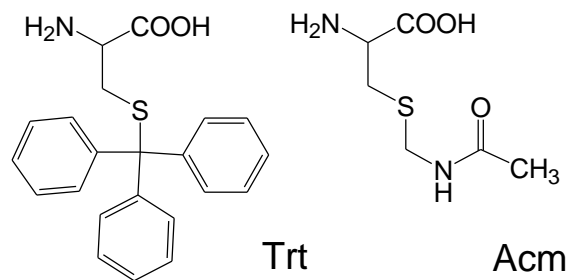
Diese Seitengruppen werden meist ungeschützt gelassen. Allerdings kann es zu Dehydratisierung kommen was dann Nitrile ergibt.

### 8.2.7 Trp, Met

Diese Seitenketten werden in der Regel nicht geschützt.

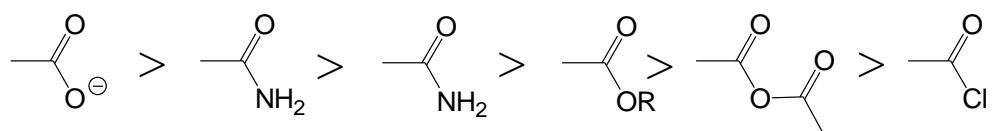
### 8.2.8 Cys

Es handelt sich um eine sehr problematische Aminosäure, deren Schützung unbedingt angezeigt ist. Für Boc-Chemie bietet sich die Acetaminomethyl-Schutzgruppe (Acm) an. Kompatibel mit der Fmoc-Chemie ist ebenfalls die Acm-Schutzgruppe. Die Acm-Schutzgruppe wird mit  $\text{Hg}^{2+}$ - oder  $\text{Ag}^+$ -Salzen gespalten (*J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94 (15), 5456–5461). Auch die mit Säure abspaltbare Trt-Gruppe wird für Cys gerne verwendet.



## 9. Acylierungen

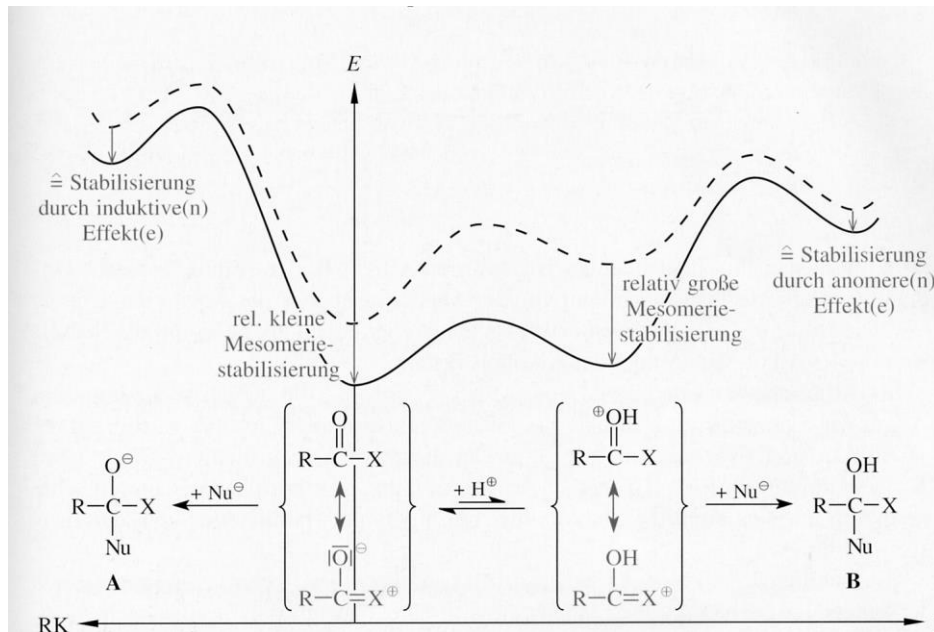
Um eine Peptidbindung bilden zu können, muss die Carboxylatfunktion aktiviert werden. Die unterschiedlichen Carboxylat-Derivate weisen eine unterschiedliche Resonanzstabilisierung auf, welche die Reaktivität herabsetzt. Das Carboxylat selber besitzt eine Delokalisierungsenergie von ca. 30 kcal/mol, das Amid wird mit 22 kcal/mol veranschlagt und der Ester besitzt immerhin noch eine Resonanzstabilisierung von 14 kcal/mol. Anhydride und Säurechloride haben kaum eine Resonanzstabilisierung. Sie sind aus diesem Grund sehr reaktiv. Ziel der Carbonsäureaktivierung muss es also sein Derivate zu erzeugen, in denen die Resonanzstabilisierung nur minimal ist



Reaktivität nimmt von links nach rechts zu

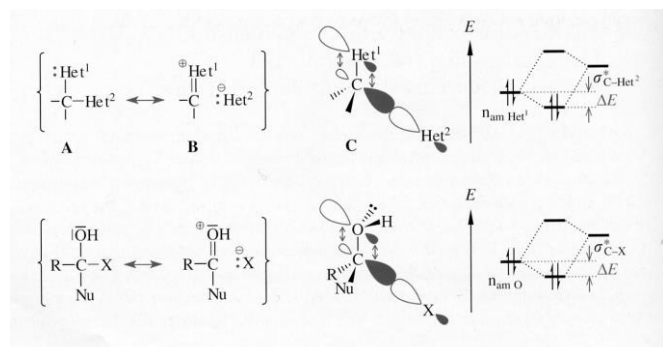
Der Angriff des Nukleophils ergibt eine Tetraederzwischenstufe, in der die Resonanzstabilisierung nicht mehr existiert. Je größer der Verlust an Resonanzenergie ist, umso höher liegt der Übergangszustand der Reaktion und umso unreaktiver ist das Derivat (später Übergangszustand). Die Grundlagen der

nukleophilen Substitution am Carboxylat Kohlenstoff sollten z. B. im Buch (R. Brückner, Reaktionsmechanismen nachgelesen werden.

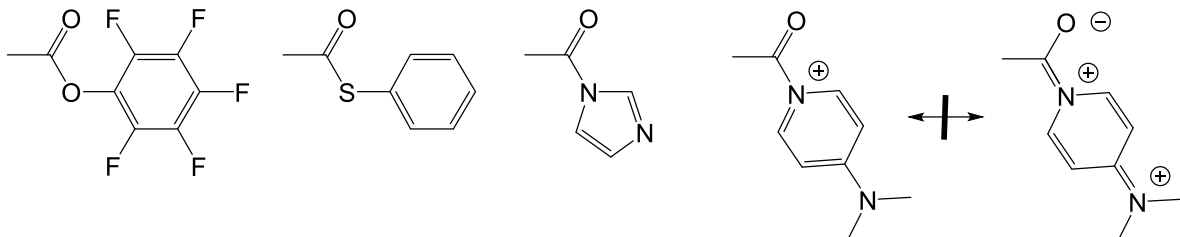


Energieprofil der Carboxyl-Reaktivität mit Nukleophilen über ein tetraedrisches Zwischenprodukt.

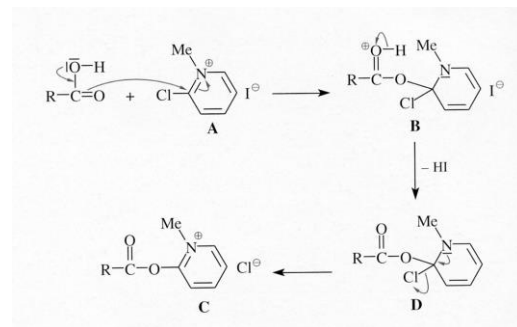
Ein weiterer Punkt, der die Reaktivität beeinflusst ist die Stabilisierung der tetraedrischen Zwischenstufe. Je stärker dessen Stabilisierung umso energetisch tiefer liegt der Übergangszustand und umso schneller ist die Reaktion. Da die tetraedrischen Zwischenprodukte oft negativ geladen sind, was sich im Übergangszustand partiell bereits bemerkbar macht, wirken sich sehr elektronenziehende Substituenten (z.B. das Cl- im Säurechlorid) stabilisierend und damit ratenbeschleunigend aus. Auch der anomere Effekt stabilisiert die Tetraederzwischenstufe sehr stark. Der anomere Effekt ist in Strukturelementen Het-C-Het (Het = heteroatom) bedeutsam. Es handelt sich um eine  $n \rightarrow \sigma^*$  Wechselwirkung wie unten gezeigt ist.



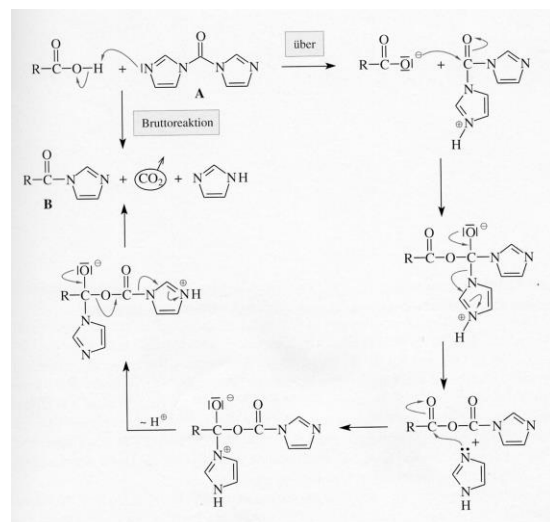
Carbonsäuren werden für die Amidbindungsbildung daher zunächst in reaktive Substanzen überführt. Sehr bekannt sind die Anhydride, die Pentafluorphenylester, Thioester (aktiviert wegen der geringen Neigung des Schwefels Doppelbindungen zu bilden), Imidazole und natürlich die Aktivierung mit Hilfe des Steglich Reagenzes Dimethylaminopyridin.



Eine bekannte Methode zur Aktivierung von Carbonsäure bietet das Mukaiyama Verfahren. Hier entsteht über Meisenheimer ähnliche Zwischenstufen (Nukleophile aromatische Substitution) ein Aktivester, der leicht mit Nucleophilen reagiert. Die Aktivierung findet hier demnach *in situ* statt.



Der Mechanismus der Carbonsäureaktivierung soll am Beispiel der Imidazole dargestellt werden. Hier wird ausgehend von der Carbonsäure mit Carbonyldiimidazol das Imidazolid erzeugt.

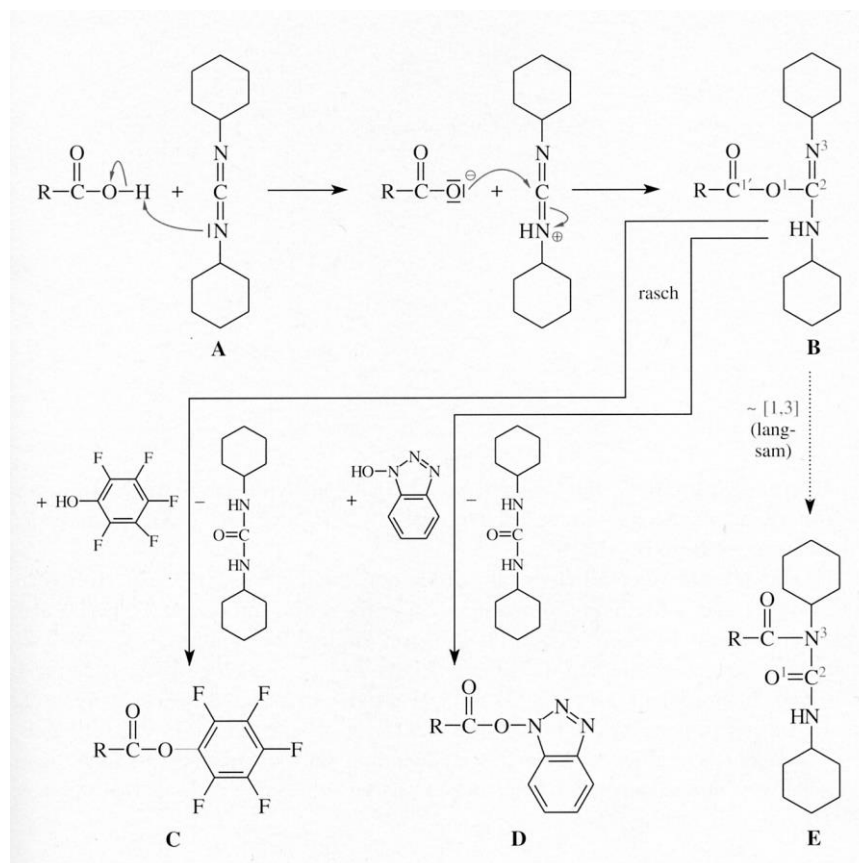




Man informiere sich über den Mechanismus der Bildung von Säurechloriden mit Thionylchlorid und Oxalyldichlorid, sowie mit der Frage warum DMF die Bildung eines Säurechlorids aus einer Carbonsäure und Thionylchlorid katalysiert.

## 9.2 Kupplungsmethoden

In der Peptidchemie wird nur selten ein stabiles aktiviertes Carbonsäurederivat eingesetzt. Meist wird die  $N^\alpha$ - und Seitenketten-geschützte Aminosäure direkt *in situ* vor der Kupplung aktiviert. Hierzu wird häufig ganz klassisch ein Gemisch aus DCC + HOBt eingesetzt. das DCC aktiviert die Carbonsäure unter Bildung eines sehr reaktiven Acylisoharnstoffs (B). Dieser reagiert mit dem HOBt zu einem Reaktivester in dem ein sehr großer Teil der anfänglichen Reaktivität konserviert ist. Dieser Reaktivester reagiert dann mit dem Nukleophil, z. B. mit der zweiten Aminosäure mit der freien Aminogruppe. Eine direkte Umsetzung des Acylisoharnstoffs ist wenig ratsam, da die Reaktivität so hoch ist, das Razemisierung eintritt. Außerdem erfolgt ein, wenn auch langsamer [1,3]-Acylshift, der zu einem unreaktiven Acylharnstoff (E) führt.



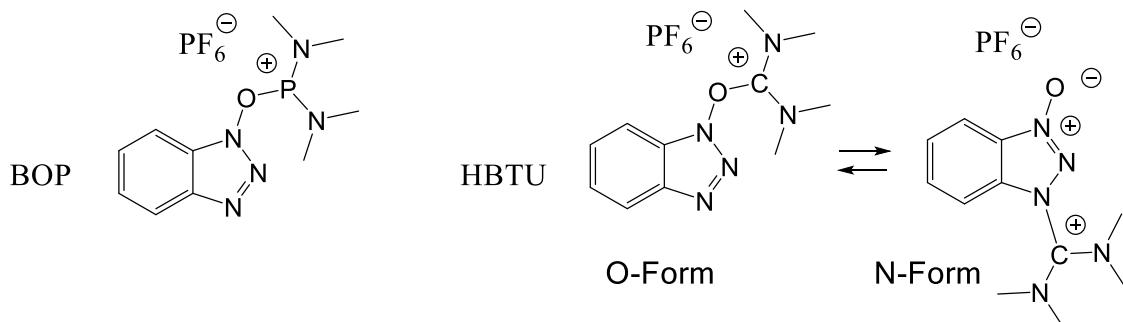
Alternativ zum DCC wird häufig Diisopropylcarbodiimid (DIPCDI) verwendet, da der sich bildende Harnstoff löslicher ist und leichter abgetrennt werden kann. Das HOBt beschleunigt die Reaktion, unterdrückt die Razemisierung und hilft auch das die Asn- und Gln-Seitengruppen nicht dehydratisieren. Mit Hilfe von DCC lassen sich also die Aminosäuren *in situ* in relativ stabile Aktivester überführen wie: Pentafluorphenyl- oder eben HOBt-Ester. Diese Aktivester können auch isoliert und sogar chromatographiert werden.

### 9.2.1 Das Reagenz BOP

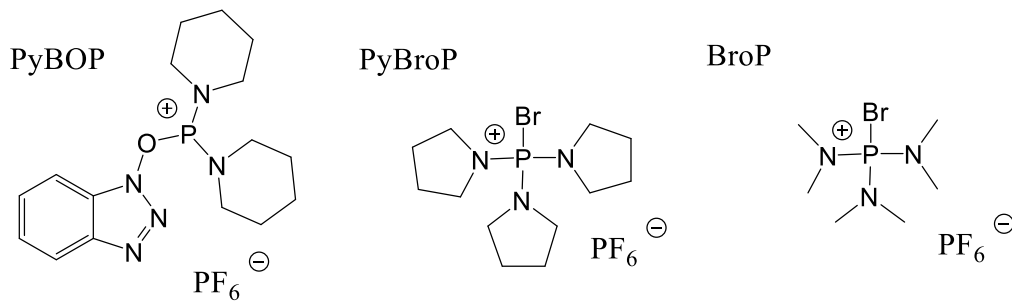
Sehr modern und beliebt ist neben der DCC Methode die Kupplung mit einem Gemisch aus HBTU/HOBt oder BOP. HBTU liegt sowohl in der O- als auch in der N-Form vor.

BOP = Benzotriazolyloxytris[dimethylamino]phosphoniumhexafluorophosphat.

Auch bekannt als Castros Reagenz. Wichtig ist, dass das Gegenion sehr wenig nukleophil ist, deshalb das  $\text{PF}_6^-$  als Gegenion.

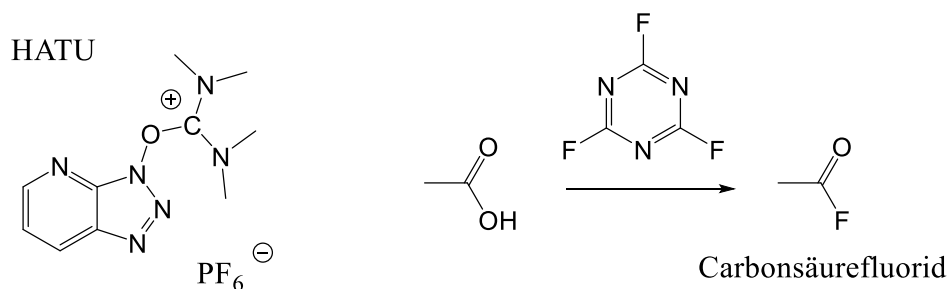


Das BOP Reagenz ist stabil, nicht hygroskopisch und sehr gut löslich in organischen Lösungsmitteln. Generell ist das BOP Reagenz wesentlich effizienter als die Kombination DCC/HOBt. Ein Nachteil ist, dass während der Reaktion Hexamethylphosphorsäuretriamid entsteht, das wegen seiner Carcinogenität gefürchtet wird. Das neue Reagenz PyBop schafft hier Abhilfe. Dieses Reagenz besitzt statt Methylgruppen, Pyrrolidineinheiten.

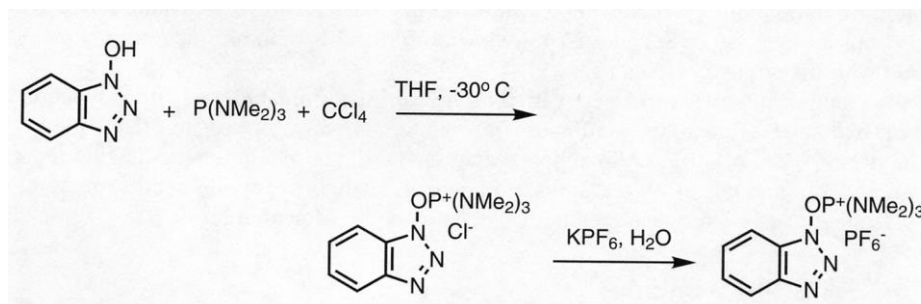


Andere neue Reagenzien enthalten überhaupt keine Oxybenzotriazole mehr. Hierzu gehören BroP oder auch PyBroP. Diese Reagenzien kuppeln vor allem sekundäre Amide wie *N*-Methylaminosäuren sehr effizient.

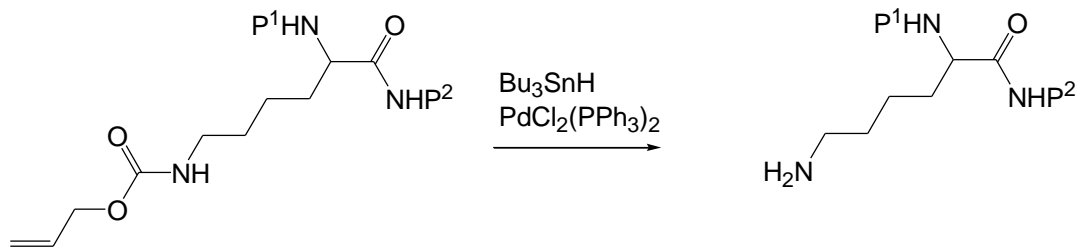
Weitere Reagenzien, die sehr beliebt sind, sind HBTU = 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat oder auch einfach die Carbonsäurechloride oder Carbonsäurefluoride. Besonders aktiv ist das neue Reagenz HATU.



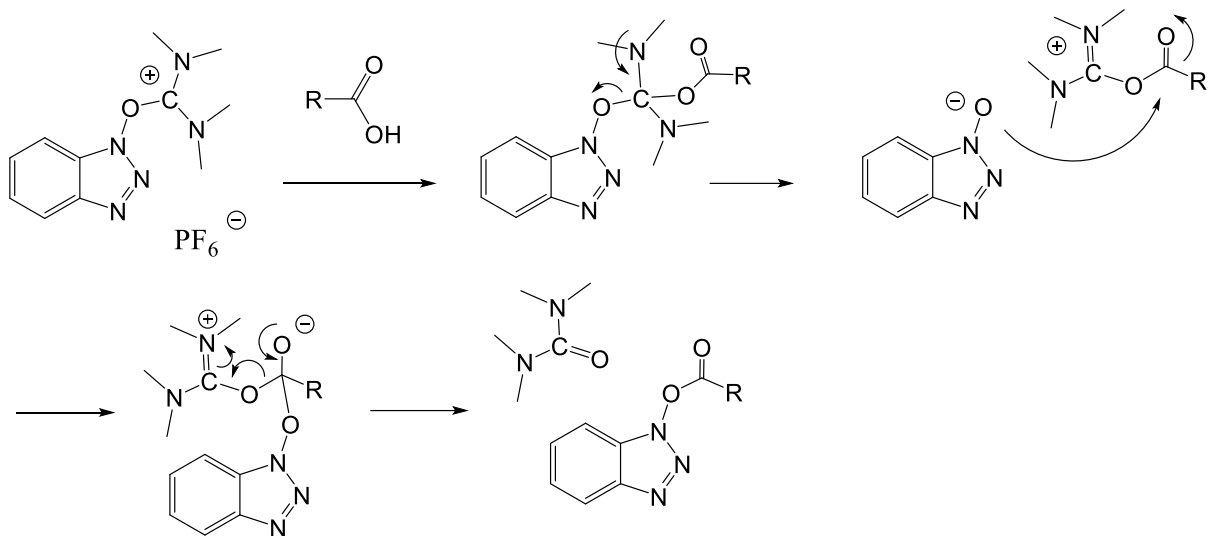
Als Beispiel sei unten die Synthese des BOP Reagenzes gezeigt.



Manchmal ist es nötig, während der Peptidsynthese gezielt eine Aminogruppe einer Lys-Seitenkette freizusetzen um z. B. eine Cyclisierung einzuleiten. Hierzu benötigt man eine weitere orthogonale Schutzgruppe. In der Regel wird hierfür die Allyloxycarbonylgruppe verwendet.

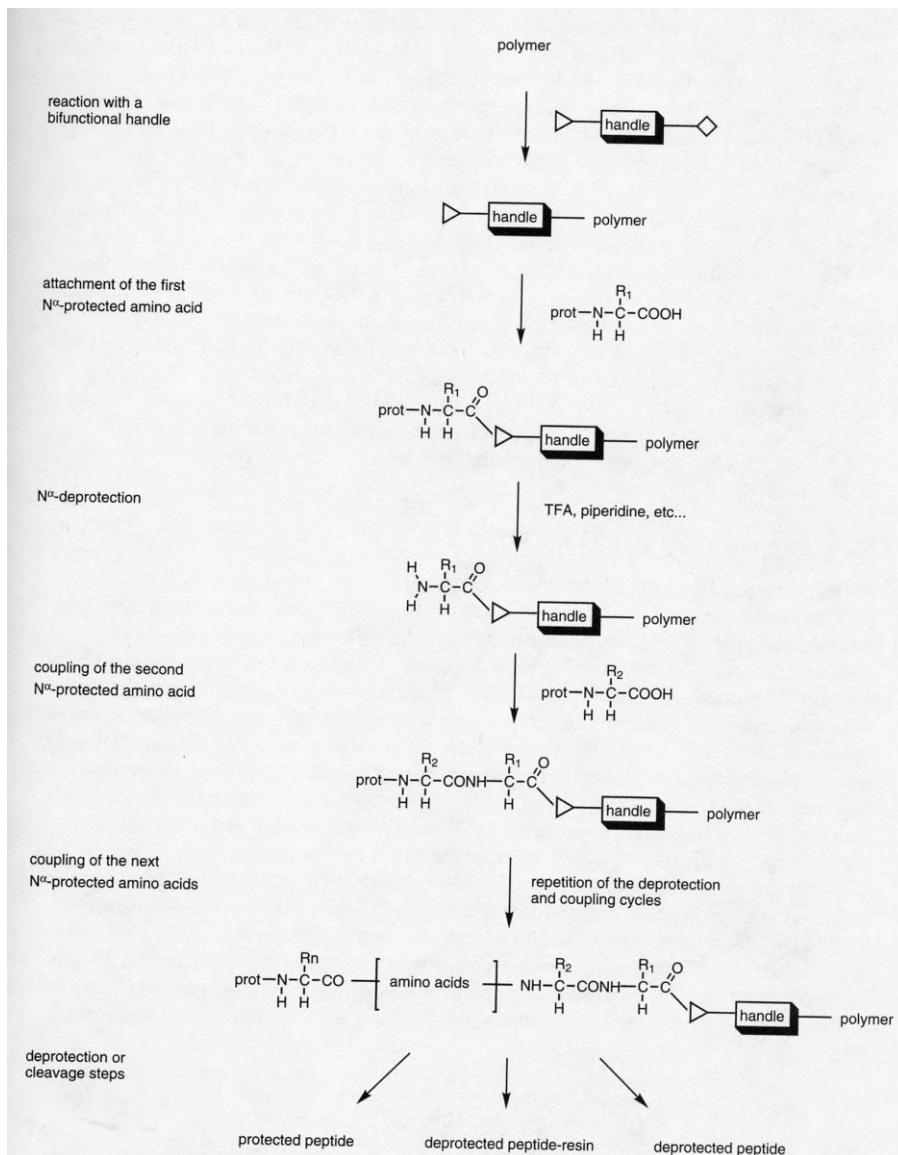


Reaktionsmechanismus der direkten *in situ* Synthese von reaktiven HOBT-Estern.



## 10 Festphasensynthese

Bei der Festphasensynthese wird das Peptid an einem Polymer hergestellt. Durch die Immobilisierung können die verwendeten Reagenzien sehr schnell gewaschen werden. Ferner können Sie in einem großen Überschuss zugesetzt werden, wodurch die Kupplungsausbeute sehr stark gesteigert werden kann. Die Immobilisierung erlaubt es die Peptidsynthese sehr stark zu automatisieren. So gibt es heute kommerzielle Peptidsynthesegeräte mit denen Peptide bis zu einer Länge von ca. 100 Aminosäuren (praktisch 50 Aminosäuren) hergestellt werden können. Die Peptidsynthese verlangt an der festen Phase eine repetitive Wiederholung der chemischen Schritte: 1. Kupplung, 2. Entschützen der temporären Schutzgruppe und erneutem Kuppel wie unten dargestellt ist.



Besondere Beachtung muss dem Harz-Polymer und dem Linker geschenkt werden. Der Linker ist das Bindeglied zwischen dem polymeren Träger und dem Peptid. Dieser Linker muss am Ende ebenso wie die permanenten Schutzgruppen spaltbar sein um das Peptid freizusetzen. Im Fall der Boc Chemie muß die Spaltung demnach mit HF möglich sein. Im Fall der Fmoc-Chemie muss die Spaltung mit ca. 80%-iger TFA realisierbar sein. Der Linker legt fest, ob nach der Abspaltung eine C-terminale Carbonsäure oder eine andere Gruppe wie z. B. ein Amid erhalten wird.

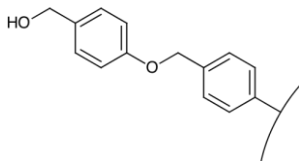
Im Fall des Harzes, also des Polymers sind die Quell-Eigenschaften bedeutsam, sowie die Beladung und die Inertheit gegenüber den Reagenzien. Das Harz muss gut quellen, damit die Reagenzien leicht an die Synthesestelle kommen können. Man

muß sich das Polymer als ein eng geknüpfted Maschennetzwerk vorstellen, in dem das Peptid hergestellt wird.

### 10.1 Die feste Phase

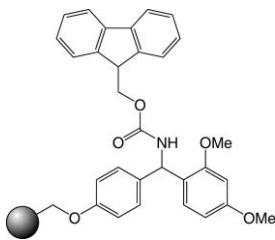
In der Regel handelt es sich um Polystyrol das 1% mit *m*-Divinylbenzol versetzt (crosslinking) wurde. Die Funktionalisierung geschieht meist über eine Chlormethylierung. Zwischen die Chlormethylgruppe und der ersten Aminosäure wird meist ein Linker gesetzt, der die Abspaltung des fertigen Peptides vom Harz am Ende der Synthese erlaubt.

A) Wang-Harze, nennt man Harze die einen Wang Linker zwischen dem Polystyrol und dem Peptid besitzen. Diese Harze werden im Rahmen der **Fmoc-Peptidsynthese** eingesetzt und erlauben die Synthese von C-terminalen Carbonsäuren. Wang-Harze enthalten einen *p*-Alkoxybenzylester-Linker. Man erhält die Wang-Harze durch Umsetzung der Chlormethylpolystyrole mit 4-Hydroxybenzylalkohol. Die Abspaltung des fertigen Peptids geschieht mit 90%-TFA.



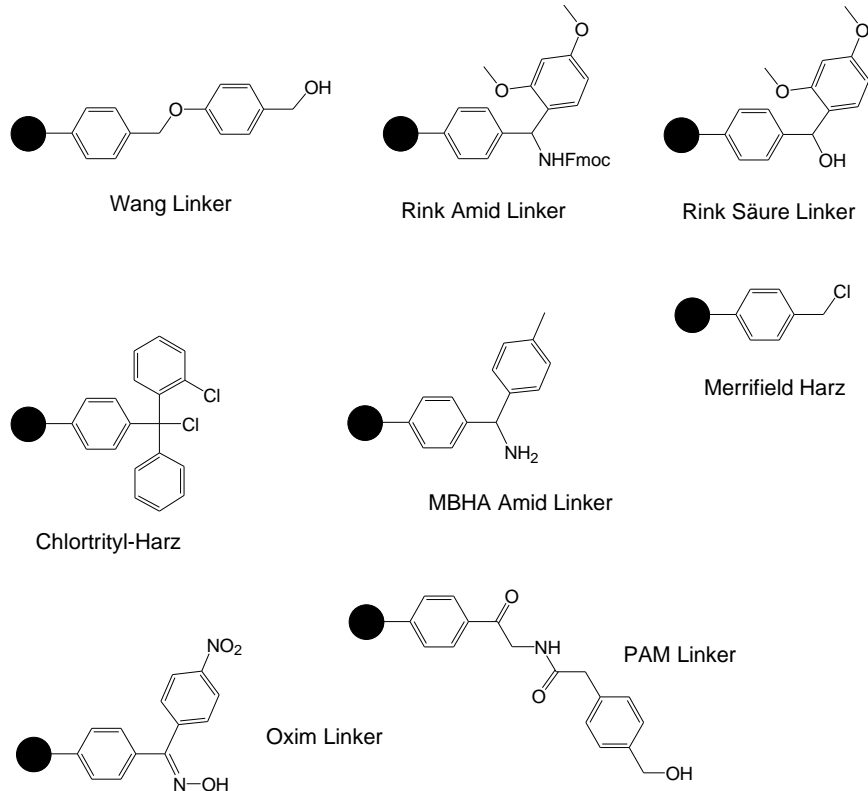
Wang Harz

B) Rink-Harze (4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-4-hydroxymethyl-phenoxy)-Harze sind entweder als Amid oder Säure Harze erhältlich. Das Amidharz (unten) liefert C-terminale Amide und wird für die Fmoc-Synthese eingesetzt. Das Rink Säure Harz ermöglicht Peptidsynthese nach der Boc-Strategie. Es liefert C-terminale Carbonsäuren.



Rink Amid-Harz

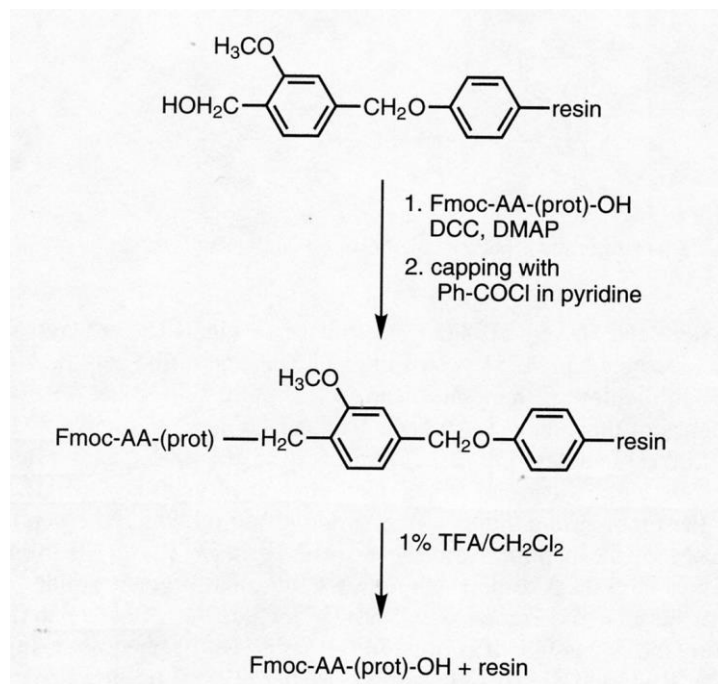
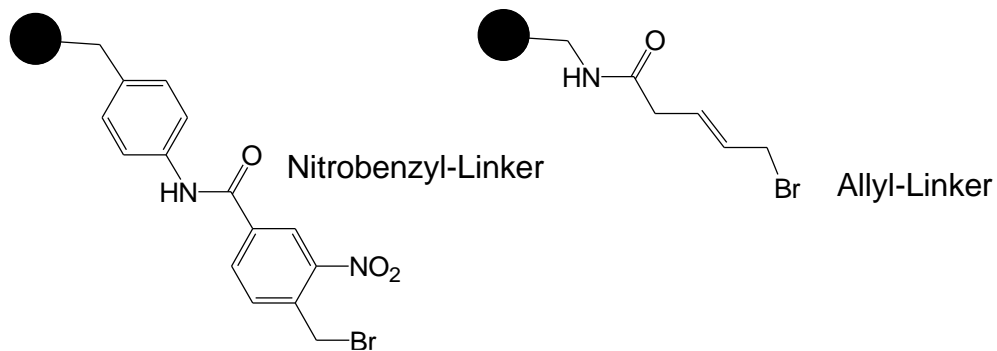
Der Rink Säure Linker ist ebenso wie der Chlortrityl-Linker so säurelabil, daß die Peptide mit z. B. verdünnter TFA vollgeschützt vom Harz abgespalten werden können. Diese Fragmente können dann in die Fragmentkondensation eingesetzt werden.



C) MBHA- und PAM-Harze (Boc-Strategie)

Die MBHA = *p*-Methylbenzhydrylamin oder PAM = Phenylacetamidomethyl-Harze werden ebenso wie das klassische Merrifield Harz im Rahmen der Boc-Peptidsynthese verwendet. Die Abspaltung der fertigen Peptide erfolgt am Ende mit HF. Mit den MBHA-Harzen werden am Ende die Peptidamide erhalten. Die PAM-Harze liefern die Carbonsäuren. Will man mit Hilfe der Boc-Strategie voll geschützte Peptide erhalten so kann dieses mit Oximharzen erreicht werden. Hier findet die Spaltung mit  $\text{NH}_3$  oder  $\text{H}_2\text{N-NH}_2$  statt.

neben diesen Linker, die mit unterschiedlich starken Säuren die Abspaltung des Peptides ermöglichen gibt eine große Auswahl anderer Linker die eine völlig orthogonale Abspaltung mit z.B. Licht (Nitrobenzylharze) oder Pd(0) (Allyl-Harze) sind die:



Abspaltung eines Peptids im vollgeschützten Zustand. Die Synthese erfolgte nach dem Fmoc-Protokoll an einem Sasrin Harz, welches dem Wang Harz sehr ähnlich ist.

## 10.2 Die Entschützung

- Man kann das Peptid mitsamt den Seitenketten-Schutzgruppen abspalten, wenn z. B. eine spätere Fragmentkondensation geplant ist.
- Möglich ist auch, zunächst wenige orthogonale Schutzgruppen am Peptid abzuspalten, um z. B. zunächst eine Cyclisierung am Harz durchzuführen.
- In den meisten Fällen wird man wohl das Peptid komplett am Harz entschützen und dann auch gleich vom Harz abspalten.

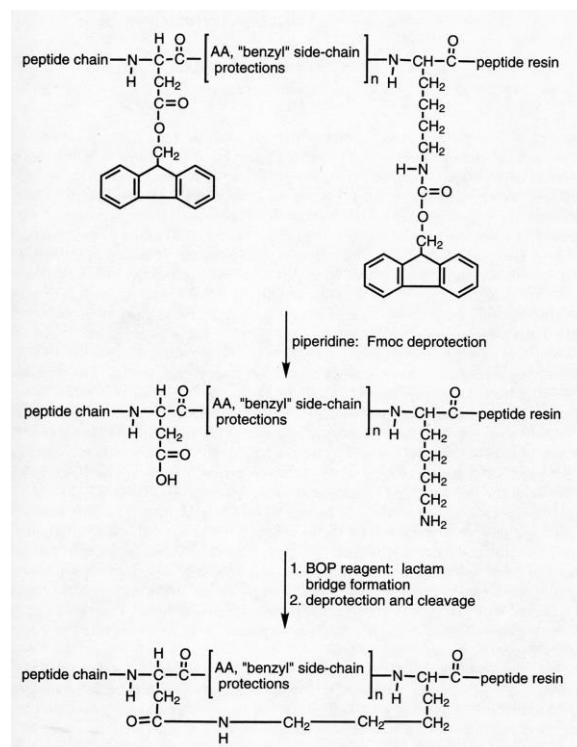


Dieses erreicht man im Fall der Boc-Strategie mit flüssigem HF oder Trifluormethansulfonsäure (TFMSA) in TFA oder HBr in HOAc. Im Fall der Fmoc-Strategie wird TFA (ca. 80%-ig) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> verwendet.

In der Regel werden Abfangreagenzien (Scavengers) zugesetzt, um reaktive Intermediate abzufangen, die das Peptid schädigen könnten. Hier kommen Anisol, Ethandithiol, Dimethylsulfid, u. a. zum Einsatz.

Für die HF-Abspaltung wird eine spezielle Ausrüstung benötigt.

### Ein Beispiel für die Synthese eines cyclischen Peptids direkt am Harz



Das Peptid wird mit Hilfe der Boc-Strategie an einem Oxim-Harz synthetisiert. Eine Asparaginsäure und ein Lysin-Rest werden Fmoc geschützt. Diese Schutzgruppen werden nach der kompletten Peptidsynthese selektiv entschützt. Dann erfolgt die Cyclisierung mit dem Reagenz BOP direkt am Harz. Ganz zum Schluss wird vollständig entschützt und vom Harz abgespalten.

## 11. Synthese von langen Peptiden und Proteinen

Zur Synthese sehr langer Peptide oder Proteine mit auch unnatürlichen Aminosäuren stehen derzeit 4 Methoden zur Verfügung.

- a) Fragmentkondensation
- b) Ligationen (Native chemical ligation)
- c) Intein -/Extein-Systeme
- d) Einbau unnatürlicher Aminosäuren in Proteine

### 11.1 Fragmentkondensation

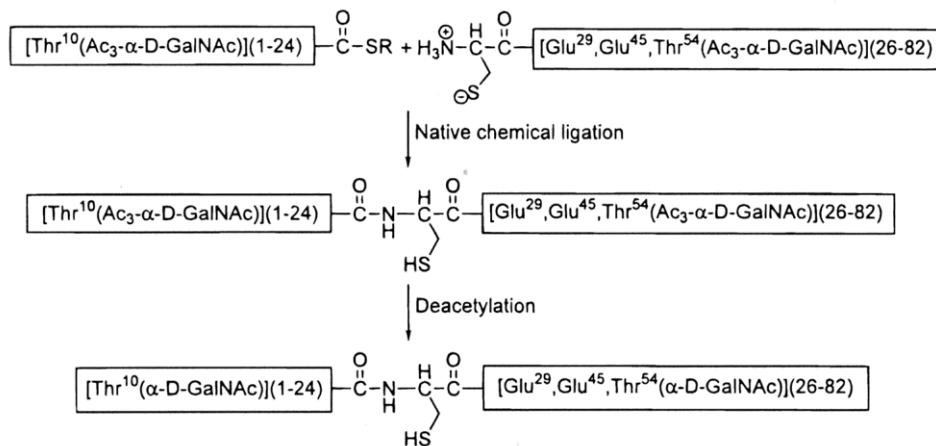
Durch die normale Peptidsynthese sind Peptide mit einer Länge von 30 – 40 Aminosäuren herstellbar. Längere Peptide neigen am Harz zur Aggregation, was die Syntheseausbeute sehr deutlich reduziert. Man erhält dann uneinheitliche Produkte. Die Kupplungsausbeute lässt sich mit Hilfe von Detektoren (Abspaltung der Fmoc-Gruppe) oder mit Hilfe von Ninhydrintests überwachen.

Bei der Segmentkondensation werden die Peptide vollgeschützt isoliert. Dann werden die zwei Fragmente gekuppelt. Die Limitierungen liegen meist in schlechten Ausbeuten auch bedingt durch eine schlechte Löslichkeit. Auch Razemisierung der aktiven Aminosäure ist ein Problem.

### 11.2 Chemische Ligation von ungeschützten Peptidsegmenten

Eine typische funktionelle Proteindomäne enthält  $130 \pm 40$  Aminosäuren. Nur 70 lassen sich heute am Harz routinemäßig koppeln und schon das erfordert einige Übung. Die chemische Ligation ermöglicht es zwei ungeschützte Peptidsegmente zu koppeln. Man benötigt allerdings einen N-terminalen Cysteinrest an der Kupplungsstelle.

Man synthetisiert zunächst ein Peptid mit einem C-terminalen Thioester. Das zweite Fragment enthält N-terminal ein Cystein. Werden beide Fragmente zusammengegeben, so setzt ein Thiolaustausch (Umesterung) ein, in dessen Folge im Gleichgewicht auch das Thioester verknüpfte Produkt entsteht. Eine nachfolgende schnelle Umlagerung führt zum *trapping* von diesem Intermediat unter Ausbildung natürlicher einer Peptidbindung. Daher nennt man die Art der Kupplung "*native*" *chemical ligation*.



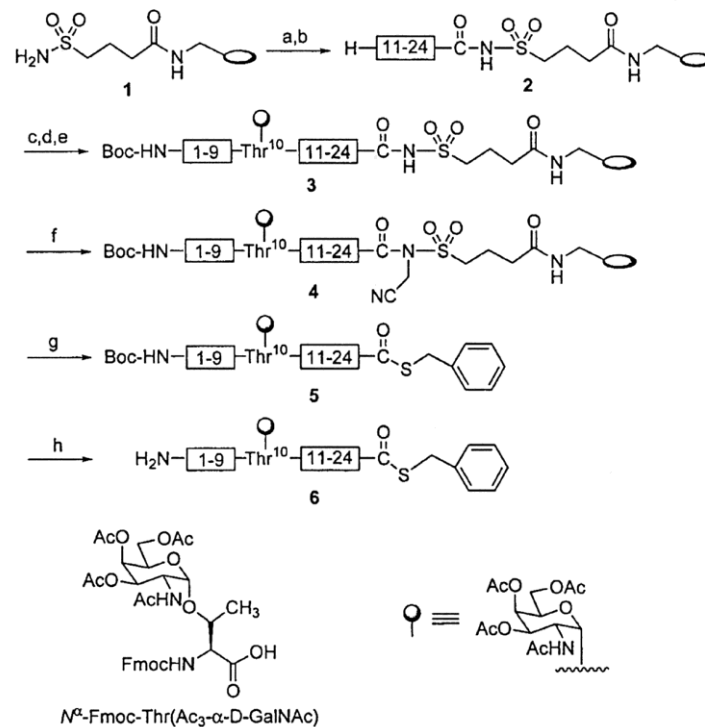
- Es gibt mittlerweile auch Methoden, die es ermöglichen Peptide zu ligieren ohne dass ein Cys-Rest anwesend sein muss.

Ein Problem ist immer die Synthese des Thioesters vom Fragment 1. Hier wird zumeist das Peptid durch Boc-Chemie assembliert, welches per Thioester mit dem Harz verbunden ist. Dann wird das Peptid schrittweise aufgebaut und am Ende abgespalten. Der Thioester „überlebt“ diese Schritte die saure Bedingungen benötigen gut.

Problematischer ist die Synthese der Thioester basierend auf der Fmoc-Chemie, da der Thioester den regelmäßigen basisch erfolgenden Fmoc-Abspaltungen nicht standhält.

Die Fmoc-Chemie muß aber unbedingt angewendet werden, wenn zum Beispiel glycosylierte Peptide ligiert werden sollen. Die Thioester Synthese gelingt in diesem Fällen auch im Fmoc-Synthesemodus mit Hilfe des Säure und Base stabilen „Safety-Catch“-Linker von J. Ellman. Das Peptid wird am Sulfonamid-„Safety-Catch“-linker mittels Fmoc-Chemie assembliert. Die letzte Aminosäure ist in der Regel Boc geschützt. Das ist wichtig, da diese erst nach der Thioesterbildung entschützt werden kann. Das Harz wird dann mit  $\text{ICH}_2\text{CN}$  behandelt und so der Linker aktiviert. Das Iodacetonitril reagiert mit dem Sulfonamid auf Grund dessen größerer Azidität. Das hochsubstituierte Sulfonamid kann dann auf Grund des durch die Cyanogruppe ausgeübten -I-Effektes mit Thiolen zu den Thioestern gespalten werden. Im nachfolgenden Beispiel gelingt das mit Thiobenzylalkohol. Da der Thioester unter sauren Bedingungen stabil ist kann nun die Abspaltung der N-terminalen Boc Gruppe

erfolgen. Außerdem gelingt jetzt die saure Abspaltung aller permanenten Seitenkettenschutzgruppen.



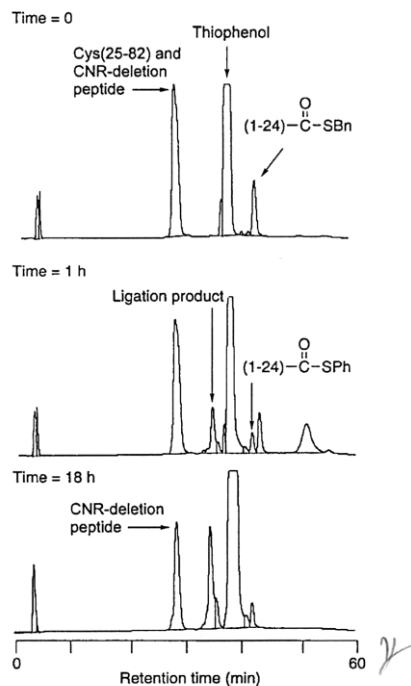
**Figure 4.** Synthesis of the glycopeptide-<sup>4</sup>thioester using the alkanesulfonamide “safety-catch” linker. (a) Fmoc-Gly-OH (4 equiv), PyBOP (3 equiv), DIEA (9 equiv), DMF, -20 °C, 8 h followed by room temperature overnight, and then repetition of the procedure; (b) SPPS using *N*<sup>4</sup>-Fmoc-amino acids (sequence 11–23), coupling with DCC/HOBT in NMP; (c) *N*<sup>4</sup>-Fmoc-Thr(Ac<sub>3</sub>-α-D-GalNAc) (5 equiv), DIC (10 equiv), HOBT (10 equiv), DMF (30 min premix), 30 min; (d) SPPS using *N*<sup>4</sup>-Fmoc-amino acids (sequence 2–9), coupling with DCC/HOBT in NMP; (e) *N*<sup>4</sup>-Boc-Asp(OtBu)-OH (5 equiv), DIC (10 equiv), HOBT (10 equiv), DMF, 30 min; (f) ICH<sub>2</sub>CN, DIEA, NMP, 24 h; (g) BnSH, THF, 24 h; (h) Reagent K (TFA (82.5%), phenol (5%), H<sub>2</sub>O (5%), thioanisole (5%), ethanedithiol (2.5%)), 4 h.

### Die safety catch Methode

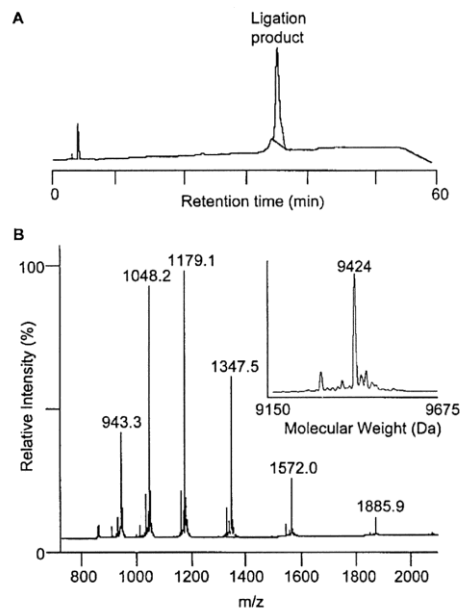
Diese Schutzgruppenabspaltungen erfolgen in der Regel mit Trifluoressigsäure (TFA).

Die Ligation der zwei Peptidfragmente (Thioester-Fragment + Cys-Fragment) wird per HPLC verfolgt. Hierzu dient wieder die Umkehrphasen-Hochdruckchromatography an C18-Material. Als Laufmittelgemische dient Wasser dem 01% TFA beigemischt ist und Acetonitril oder Methanol. Die Säure wird benötigt um alle basischen Zentren sicher zu protonieren. Dadurch erhält man eine definiert geladene Substanz. Bei dieser Chromatographie an sehr hydrophobem Material werden zunächst mit 100% Wasser die Salze eluiert. Die hydrophoberen Verbindungen werden auf der hydrophoben Matrix adsorbiert. Durch Steigerung des Anteils von Acetonitril bzw. Methanol auf am Ende 100% wird die mobile Phase zunehmend hydrophober und die hydrophoben Verbindungen ändern Ihre Verteilung von der festen Phase in die flüssige. Je hydrophober die Substanz umso später erfolgt die

Elution. Die endgültige Charakterisierung erfolgt durch Massenspektrometrie. Man informiere sich in diesem Zusammenhang über die *electrospray* (ESI)- und *matrix assisted laser desorption* (MALDI)- Ionisationsmethoden.



**Figure 5.** Time course of the ligation reaction. The starting materials were dissolved in 0.1 M sodium phosphate buffer containing 6 M Gn·HCl, pH 7.5, to which 4% thiophenol had been added. The ligation reaction was monitored by reversed-phase HPLC eluting with a gradient of 10–50% B over 50 min, at a flow rate of 1 mL/min. After 18 h, the glycopeptide- $\alpha$ thioester was mostly consumed. Conversion of the C-terminal segment to product revealed an underlying peak corresponding to the CNR-deletion peptide which was characterized by ESI-MS.



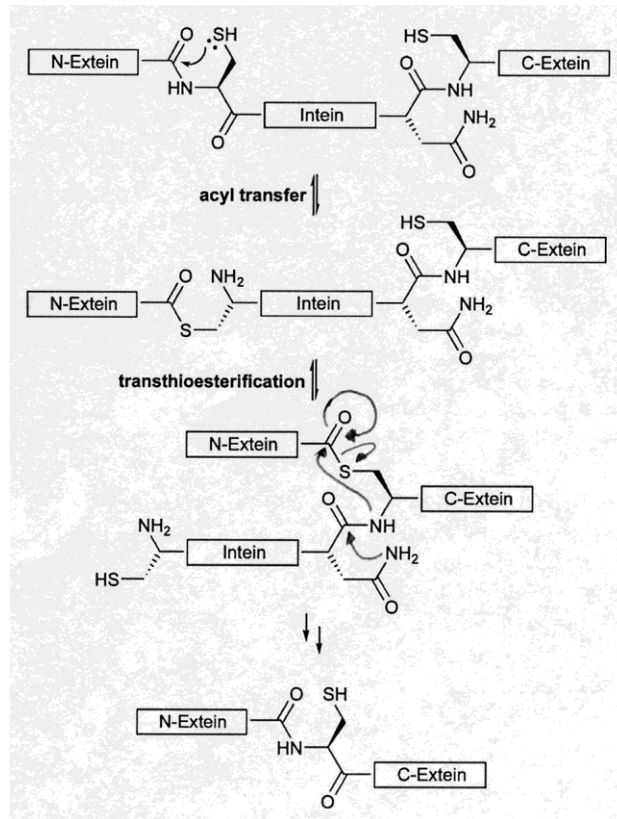
**Figure 6.** (A) Reversed-phase HPLC analysis of the purified ligation product. (B) ESI-MS of the purified ligation product.

## 12 Expressed Protein Ligation (EPL)

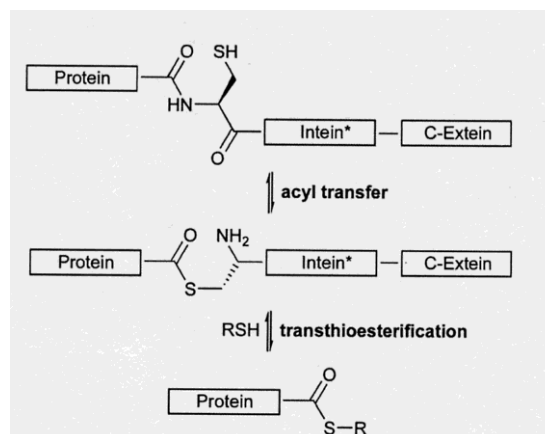
Auch rekombinante Peptid- und Proteinfragmente können mit synthetischen Peptiden im völlig ungeschützten Zustand ligiert werden. Das Problem ist hier oft den Thioester rekombinant zu erzeugen, damit eine Kupplung mit dem Cys-Peptid erfolgen kann

**12.1 Rekombinant erzeugte C-terminale Thioester-Peptide** können mit einem synthetischen Fragment gekuppelt werden welches am N-Terminus ein Cystein enthält. Diese Kombination ermöglicht die Ligation. Wie wird molekularbiologisch ein Thioester erzeugt? Inteine sind Proteine, die eine Selbstspaltung von Proteinen katalysieren. Hierbei werden die Proteinfragmente links und rechts vom Intein, die sogenannten Exteine, ligiert und das Intein herausgeschnitten. Der Mechanismus beinhaltet zunächst die Bildung eines Thioesters. Dann folgt eine Transthioveresterung unter Bildung eines Intermediates, in dem die Exteine über

einen Thioester verknüpft sind. Im letzten Schritt schließt sich die Exzision des Inteins unter Bildung von Asparaginsäureamid an (*Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33, 422-430.)

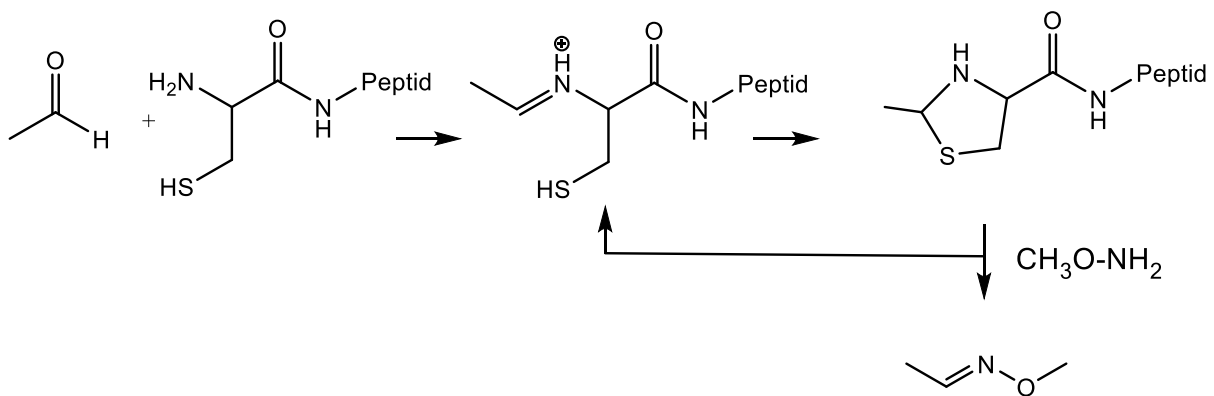


Inteine spleißen immer zusammen, wenn N- und C-Termini aufeinander treffen. Diese Reaktion wird nun im Rahmen der EPL ausgenutzt. Hierzu wird das zu ligierende Peptid/Protein-Fragment an ein Intein fusioniert, welches so modifiziert wurde, dass die Spleißreaktion nicht stattfinden kann. Dieses Fusionsprotein wird rekombinant erzeugt. Es erfolgt daraufhin der Acylshift. In Gegenwart eines externen Thiols findet eine Transthioveresterung zum Thioester statt. In der Regel werden Alkylthioester oder Phenylthioester erzeugt.

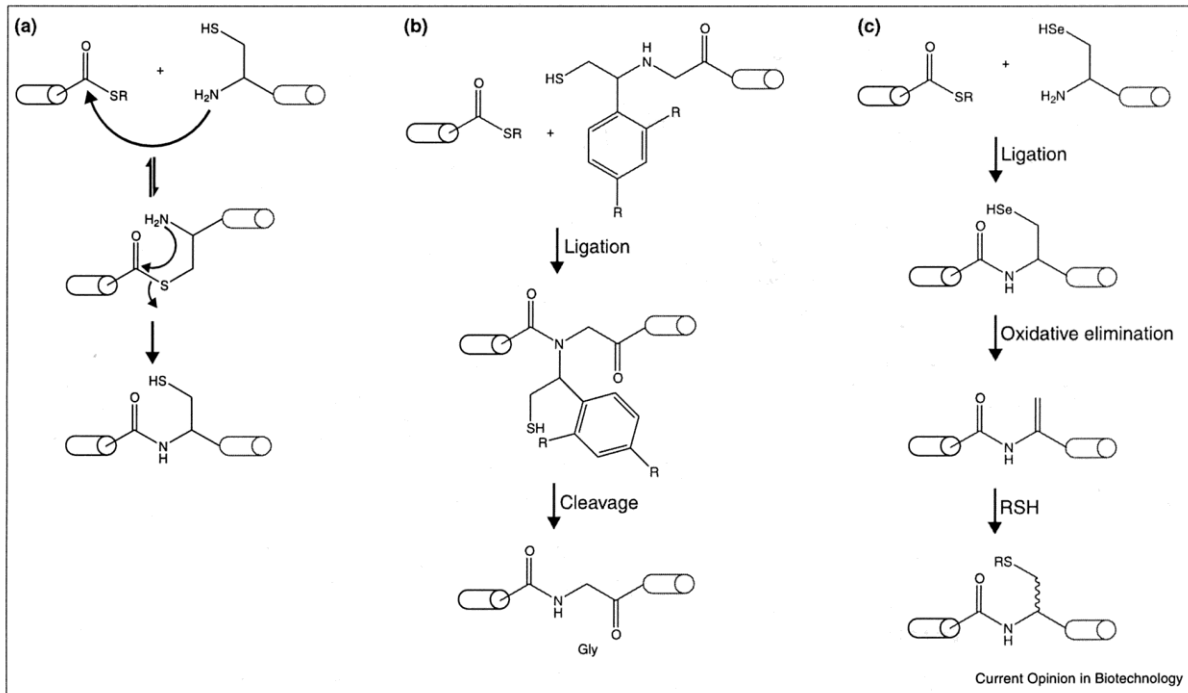


## 12.2 Kupplung über N-terminale Cysteine

Natürlich ist es auch möglich, ein molekularbiologisch erzeugtes Protein mit einem N-terminalen Cystein an einen synthetischen Peptid-Thioester zu ligieren. Die N-terminal Cystein-enthaltenden Peptide und Proteine können leicht aus Zelllysaten abgetrennt werden. Hierzu werden Aldehyd spezifische Reaktiv Säulen verwendet, die mit den Cysteinen zu Thiozolidinen reagieren (resin capture). Die Spaltung erfolgt mit Methylhydroxylamin.

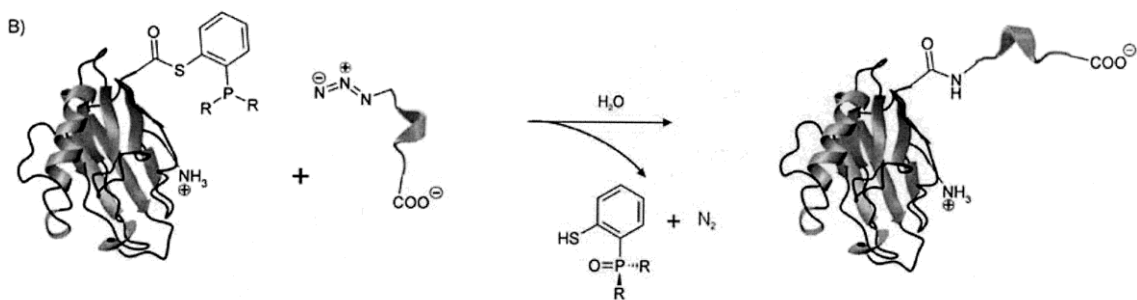


Eine Einschränkung des Ligationsverfahrens ist, dass immer ein Cystein vorhanden sein muss. Heute können auch auxilliäre Gruppen eingesetzt werden. Eine Alternative ist auch die direkte Entfernung der SH-Gruppe unter Bildung von Alanin mit Pd(0) (Entschwefelung). Man kann auch Selenocysteine statt Cysteine verwenden. Chemoselektive, oxidative Eliminierung ergibt Dehydroalanin, welches dann mit einem Nukleophil weiter funktionalisiert werden kann. So kann z. B. farnesyliert, thioliert oder thioglykosyliert werden (*Curr. Op. Biotechnol.* **2002**, 13, 297-303).



Natürliche chemische Ligation mit einem a) Thioester, b)  $\alpha$ -2-dialkylmercaptoethyl, und c) Selenocystein.

**13 Staudinger Ligation:** Die Staudinger Ligation ist eine weitere Möglichkeit, die es erlaubt, auf das Cystein zu verzichten. Für die Reaktion wird ein Thioester benötigt, welcher allerdings ein Triarylphosphin beinhaltet. Das zweite zu ligierende Fragment besitzt statt eines Cysteins ein N-terminales Azid (*ChemBioChem*. **2004**, 5, 1176-1179).



Schematische Darstellung der Staudinger Ligation.

Während der Reaktion wird ein reaktives Intermediat gebildet, das den Thioester nukleophil angreift.