

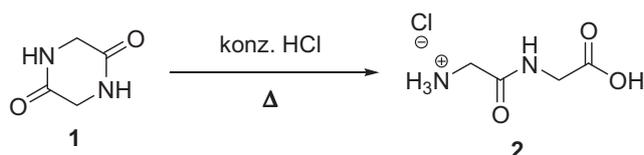
## Einleitung

# 1 Von Peptiden zu Peptidomimetika

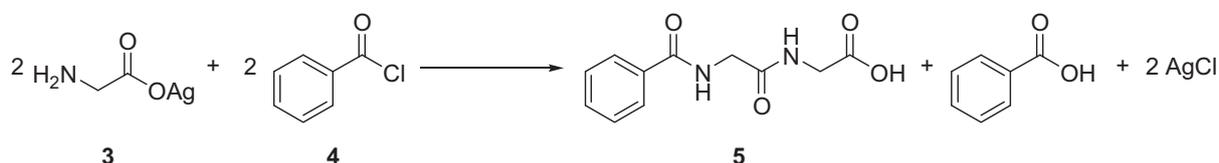
## 1.1 Eine kurze Geschichte der Peptidchemie<sup>[1]</sup>

Meist gilt die 1901 von E. Fischer publizierte Dipeptid-Synthese<sup>[2]</sup> als erste Peptid-Synthese. Ausgehend von Glycin-Diketopiperazin **1** wurde Glycylglycin **2** durch Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure hergestellt. 19 Jahre zuvor war jedoch schon von T. Curtius die Synthese eines *N*-geschützten Dipeptids<sup>[3]</sup>, des Benzoylglycylglycins **5**, erreicht worden (Schema 1), indem er das Silbersalz von Glycin **3** mit Benzoylchlorid **4** behandelte.

### E. Fischer, 1901



### T. Curtius, 1882

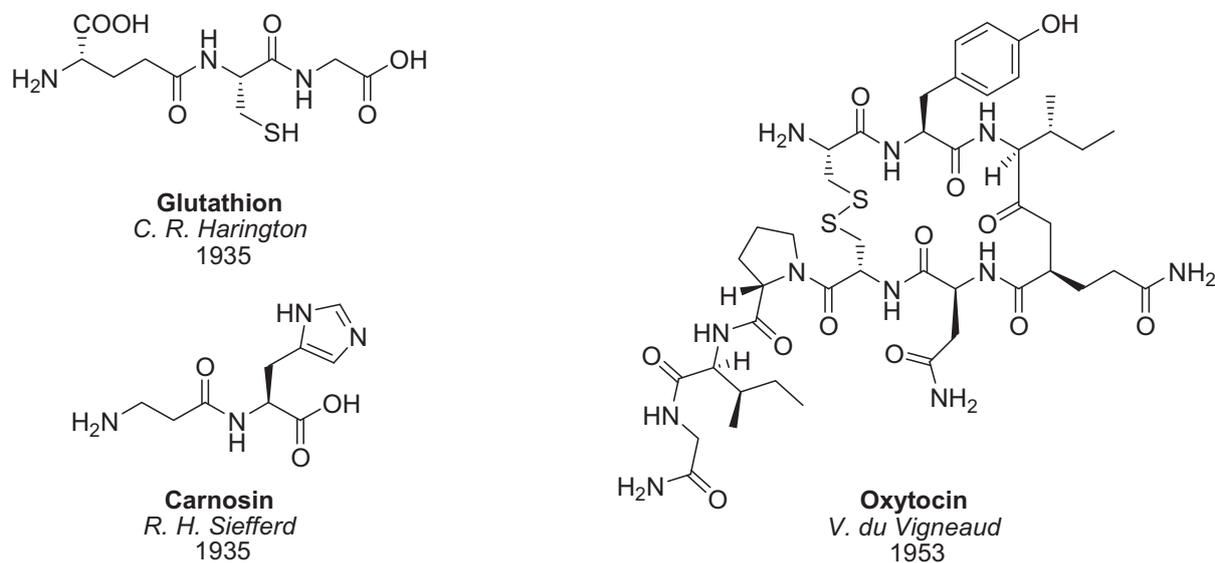


**Schema 1.** Synthese von Dipeptiden von T. Curtius und später von E. Fischer.

Aufgrund seiner intensiven Arbeit mit organischen Aziden entwickelte T. Curtius eine Peptidkupplung, in welcher ein Säureazid die aktive Spezies bildete. So konnte er *N*-Benzoylpentaglycin<sup>[4]</sup> herstellen. E. Fischer hingegen entwickelte eine Peptidkupplung, in der das Säurechlorid<sup>[5]</sup> mittels  $\text{PCl}_5$  direkt aus der Aminosäure generiert wurde.

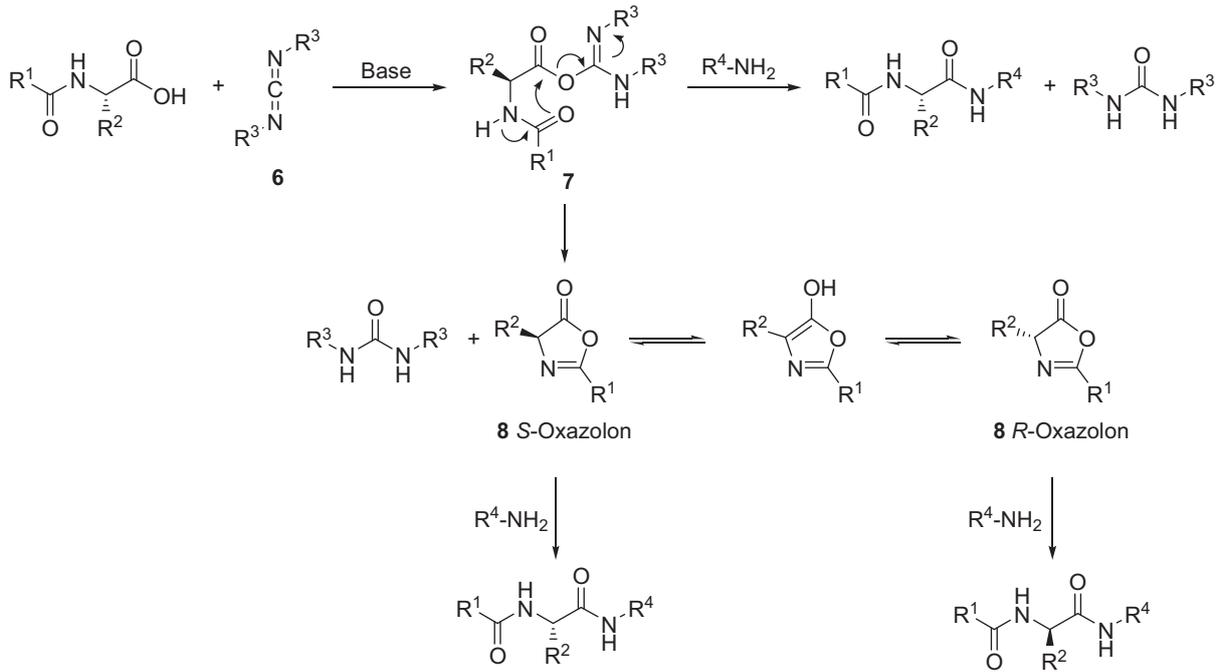
Das Hauptproblem dieser Kupplungsmethoden lag zu dieser Zeit in der fehlenden Verfügbarkeit der enantiomerenreinen *L*-Aminosäuren. Zudem war keine leicht abspaltbare Amino-Schutzgruppe bekannt. Erst mit der Einführung der *Z*-Schutzgruppe durch M. Bergmann und L. Zervas wurde die Synthese von kleinen Peptiden, wie z.B. von Glutathion<sup>[6]</sup> oder Carnosin<sup>[7]</sup> möglich (Abbildung 1). 1953 wurde das hormonell wirksame Octapeptid Oxytocin<sup>[8]</sup> von du Vigneaud *et al.* (Nobelpreis 1956) zum ersten Mal synthetisiert. Die Entwicklung der *Z*- und allgemein der Carbamat-Schutzgruppen stellte einen erheblichen

Fortschritt in der Peptidkupplung dar, da sie die Racemisierung während der Säurechlorid-Bildung verhindern können, bei der die Acetyl- und Benzoyl-Schutzgruppe zu vollständiger Racemisierung führen.



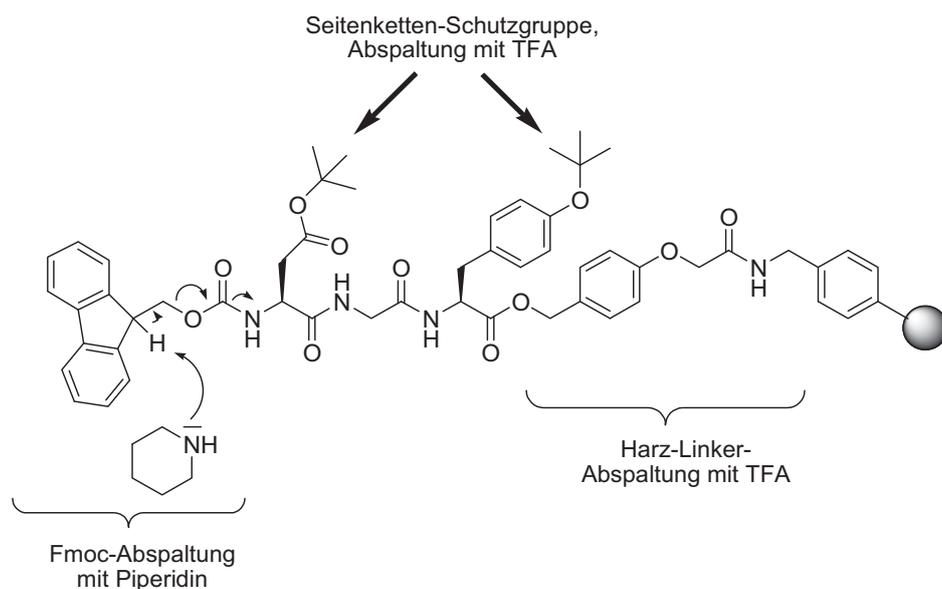
**Abbildung 1.** Einige früh synthetisierte biologisch aktive Peptide.

Später wurde die *tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe von L. A. Carpino<sup>[9]</sup> und F. C. McKay<sup>[10]</sup> eingeführt. Diese Schutzgruppe kann orthogonal zur Z-Schutzgruppe, zu Benzylestern und Benzylethern abgespalten werden. Mit dieser Schutzgruppe wurde die Synthese des  $\beta$ -Corticotrophins (adrenocorticotropes Hormon, ACTH<sup>[11]</sup>), eines aus 39 Aminosäuren aufgebauten Hormons, isoliert aus Schweine-Hypophysenvorderlappen, von R. Schwyzer und P. Sieber im Jahr 1963 erreicht. Die Entwicklung weiterer Schutzgruppen hing mit der Entwicklung anderer Kupplungsmethoden zusammen. Es folgte die Einführung von Carbodiimiden **6** durch J. C. Sheehan<sup>[12]</sup> und H. G. Khorana.<sup>[13]</sup> Diese Aktivester **7** neigten jedoch zur Racemisierung durch die Bildung von Oxazolonen **8** (Schema 2). Der Racemisierungsmechanismus, sowie die Parameter, die diese Racemisierung beeinflussen können, wurden von Goodman und McGahren untersucht.<sup>[14]</sup> Auf dieser Grundlage wurden Additive wie das 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) entwickelt, die die Oxazolone-Bildung unterdrücken können. Im Laufe der Zeit wurde eine Vielzahl weiterer Kupplungsreagenzien und Additive für erfolgreiche Peptidkupplungen verwendet.



**Schema 2.** Kupplungsreaktion durch Carbodiimid-Aktivierung und Mechanismus der Racemisierung durch Bildung eines 4,5-Dihydrooxazol-5-ons.

Als großer Fortschritt in der Peptidsynthese gilt das 1963 von B. Merrifield<sup>[15]</sup> beschriebene Prinzip der Festphasen-Peptidsynthese (SPPS). Diese Methode ermöglicht den Aufbau langer Peptide ohne aufwändige Reinigung der Zwischenstufen und die repetitive Art der Peptidsynthese (Entschützung, Waschen, Kupplung, Waschen, Entschützung, etc.). Merrifield schuf so ideale Voraussetzungen für eine Automatisierung.



**Abbildung 2.** Fmoc-Strategie in der Festphasen-Peptidsynthese. Die Fmoc-Gruppe wird hier mit Piperidin abgespalten während die Schutzgruppen an der Seitenkette und der Linker durch TFA entfernt werden.

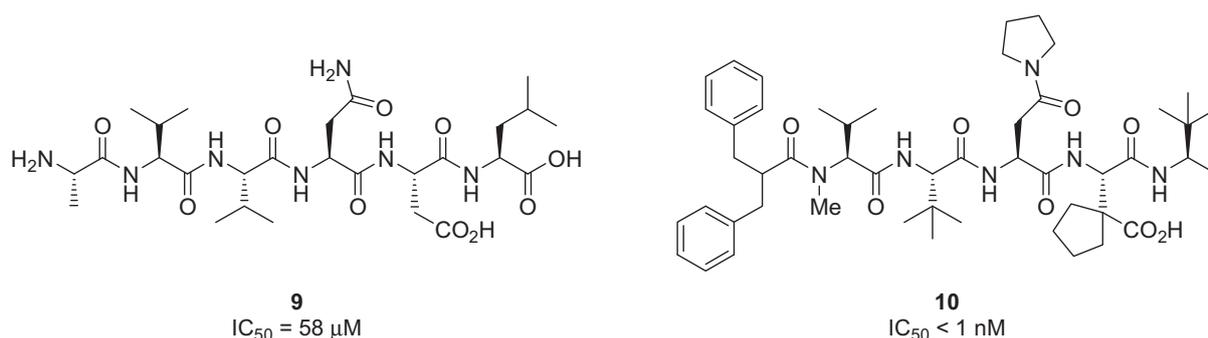
Die Einführung der Fmoc-Schutzgruppe, die unter milden basischen Bedingungen (Abbildung 2) und damit orthogonal zur Boc- und anderen *tert*-Butyl-Schutzgruppen abgespalten werden kann, durch L. A. Carpino und G. Y. Han<sup>[16]</sup> erleichterte 1970 die automatisierte Peptidsynthese und erlaubte nun den Aufbau von Peptiden mit mehr als zehn Aminosäureresten pro Tag. Allerdings ist diese Methode erst von Bedeutung seit die nötigen Reinigungsmethoden (HPLC) und die nötigen Analysemethoden (Massenspektrometrie) zur Verfügung stehen.

## 1.2 Biologische und pharmazeutische Bedeutung der Peptide und Peptidomimetika

Protein-Protein-Wechselwirkungen stehen im Mittelpunkt der meisten biologischen Prozesse, von der intrazellulären Kommunikation bis zum programmierten Zelltod; sie bilden damit eine wichtige Zielklasse für therapeutische Ansätze. Unter den Peptiden bilden die Antikörper eine wichtige Stoffklasse; in den letzten Jahren wurde viel in ihre Forschung investiert. In der Tat weisen Antikörper interessante Eigenschaften auf: sie sind sehr spezifisch für ein molekulares Ziel und neigen nicht zur Zersetzung im menschlichen Serum. Allerdings sind Antikörper sehr aufwändig und kostspielig zu produzieren und sie weisen keine gute orale Bioverfügbarkeit auf. Da die Zellwand außerdem nicht permeabel für Antikörper ist, stellen sie keine geeigneten Therapeutika als Antagonisten für intrazelluläre Protein-Protein-Systeme dar. Bisher wurde daher auf kleinere Moleküle, z.B. die Peptide zurückgegriffen. In der Tat sind sie, wie Antikörper, aus natürlichen Aminosäuren aufgebaut und können damit in ähnlicher Weise Wechselwirkungen eingehen. Allerdings werden sie sehr schlecht bis zur Zelle transportiert und zudem schnell im Körper durch Proteolyse metabolisiert und ausgeschieden. Die Peptide sind durch ihre konformationelle Flexibilität weniger spezifisch und meist weniger aktiv, dennoch machen ihre einfache Herstellung und ihre große Vielfalt sie zu potentiellen Therapeutika von morgen. Um einige oder alle diese Nachteile umgehen zu können, sollen den Peptiden ähnliche Verbindungen, so genannte Peptidomimetika, synthetisiert werden. Unter diesem Begriff werden alle Verbindungen zusammengefasst, die der Topologie der Peptide ähnlich sind, in welchen aber die charakteristische Amidbindung der Peptide teilweise oder vollständig verändert wurde.

Ein Beispiel für die erfolgreiche Optimierung eines Peptids stellt das Hexapeptid **9** dar.<sup>[17]</sup> **9** ist eine Kopie des Enzym-Fragments, das für die virale Aktivität von HSV (Herpes simplex-Virus) verantwortlich ist und stellt einen potenten Inhibitor des Enzyms dar. Durch

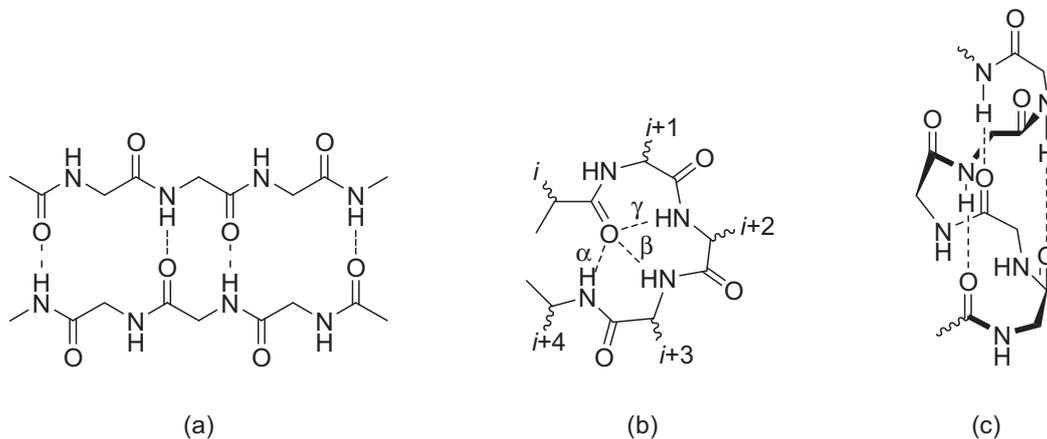
systematischen Austausch von Aminosäureresten wurden bestimmte Merkmale der Struktur-Aktivität des Peptids festgestellt und somit wurde für das Peptidomimetikum **10** eine 58000-fach höhere Aktivität (Abbildung 3) als für das native Hexapeptid **9** *in vivo* getestet. Dennoch ist man noch weit von der Entwicklung potentieller Arzneimittel entfernt, da die orale Bioverfügbarkeit und der Transport bis zur Zelle bisher nicht optimiert werden konnten. Die Verwendung kleiner Peptide für die Entwicklung von biologisch aktiven Verbindungen konnte jedoch erfolgreich gezeigt werden.



**Abbildung 3.** Ursprüngliches Peptid **9** und das optimierte HSV-Ribonukleotid-Reduktase-Inhibitor-Peptidomimetikum **10**.

### 1.3 Strukturelle Peptidomimetika

Die Variationsmöglichkeiten beim Aufbau von Peptiden sind aufgrund der Anzahl der natürlichen Aminosäuren bereits groß, der Aufbau eines Peptidomimetikums mit derselben Kettenlänge hingegen ist scheinbar unbegrenzt, da die Hauptkette, die Seitenkette oder auch beide verändert werden können. Außerdem besteht die Möglichkeit, bestimmte Strukturelemente einzuführen, die die Sekundärstruktur der Peptidomimetika beeinflussen. Die Erläuterung aller Möglichkeiten geht über dieses Kapitel weit hinaus, deshalb werden lediglich die strukturellen Veränderungen dargestellt, die die Sekundärstruktur beeinflussen. Die am häufigsten vorkommenden Sekundärstrukturelemente von Peptiden und Proteinen sind Turns, Helices und die Faltblattstrukturen. Darunter sind  $\beta$ -Turns,  $\alpha$ -Helices und antiparallele  $\beta$ -Faltblätter sehr häufige Konformationen (Abbildung 4).  $\gamma$ -Turns,  $3_{10}$ -Helices, Poly(Pro)<sub>n</sub>-Helices und parallele  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen werden auch in Peptiden beobachtet. Da deren Vorkommen aber gering ist, werden hier nur die zwei erstgenannten dreidimensionalen Strukturen diskutiert.



**Abbildung 4.** Elemente von Protein-Rückgrat-Strukturen: (a) antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt; (b)  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Peptid-Turn mit 13-, bzw. 10- und 7-gliedrigen-Wasserstoffbrücken-Ringen; (c)  $\alpha$ -Helix gebildet von mehreren  $\alpha$ -Turns.

### 1.3.1 Darstellung von $\beta$ -Turn-induzierenden Verbindungen

$\beta$ -Turns sind häufig vorkommende Strukturen in Peptiden, welche sich im Allgemeinen an der Oberfläche der Proteine<sup>[18]</sup> befinden. Die Aminosäuren, die in den Turns involviert sind, tragen meistens polare Gruppen<sup>[19]</sup> in der Seitenkette. Es wird vermutet, dass sie zum großen Teil als Erkennungsmotive an vielen biologischen Prozessen beteiligt sind,<sup>[20]</sup> die komplexe immunologisch-, metabolisch-, genomisch- und endokrinologisch-regulatorische Mechanismen auslösen. Außerdem sind  $\beta$ -Turns Nukleationsorte von Proteinfaltungen<sup>[21,22]</sup> und Marker für posttranslatorische Phosphorylierungen<sup>[23]</sup> und sie sind in die Glycosylierung,<sup>[24]</sup> in die Verarbeitung der Enzyme<sup>[25]</sup> und in die Degradation<sup>[26]</sup> involviert. Aus allen diesen Gründen wurden  $\beta$ -Turn-induzierende Verbindungen intensiv erforscht.

Ideale  $\beta$ -Turn-Parameter wurden von Venkatachalam<sup>[27]</sup> erstmals ermittelt:  $\beta$ -Turns werden von vier aufeinanderfolgenden Aminosäureresten mit einer gut definierten Stereochemie gebildet und durch eine Wasserstoffbrücke zwischen  $O_{(1)}$  und  $N_{(4)}$  (Abbildung 5) gebildet. Zwei Winkel,  $\phi$  und  $\psi$ , erlauben je nach Wert, jeweils für die Aminosäureeinheiten  $i+1$  und  $i+2$  die Zuordnung zu  $\beta$ -Turns des Typs I-III und I'-III'. Im Laufe der Jahre wurden weitere Typen beobachtet, so dass heute bis zu elf Typen<sup>[28]</sup> unterschieden werden können: in der Praxis entsprechen die Beobachtungen nicht diesen strengen Kriterien. Heute gilt weitgehend folgende Definition:  $\beta$ -Turns bestehen aus vier Aminosäuren, in welchen  $\alpha C(i)$  und  $\alpha C(i+3)$  maximal 7 Å voneinander entfernt sind und in denen die Aminosäurereste nicht an einer  $\alpha$ -Helix teilhaben.