

10. Kombinatorische Peptidsynthese

10.1 Einführung in die Problemstellung

Der klassische Weg zur Auffindung neuer Wirkstoffe ist die sequentielle Herstellung und Testung. Aus den Ergebnissen der Testung können dann Informationen, die zur Synthese weiterer Verbindungen mit (hoffentlich) verbesserten Eigenschaften führen, gewonnen werden. Die Modifikation der Ausgangsstruktur ist dabei nicht zufällig, sondern basiert auf Intuition und Modellierung. Dies setzt ein Mindestwissen über das Zielmolekül (Target), das man mit dem Wirkstoff beeinflussen möchte, voraus. Für die computergestützte Modellierung ist außerdem eine bekannte Raumstruktur des Targets unerlässlich, sofern es sich nicht um ein sehr kleines Molekül handelt. Obwohl dieser Ansatz Erfolge vorzuweisen hat, ist er sehr arbeits- und zeitaufwendig. Er führt auch nicht zum gewünschten Erfolg, wenn die Struktur des Targets unbekannt ist.

In solchen Fällen muß zunächst durch Screening eine Substanz mit zumindest geringer Aktivität gefunden werden. Das Screening hat eine lange Tradition bei der Suche nach neuen Antibiotika. Man gibt dabei Naturstoffgemische, wie z.B. Pilzextrakte, zu einer Bakterienkultur und mißt den Einfluß auf das bakterielle Wachstum. Das eigentliche Targetmolekül kann dabei völlig unbekannt sein, da es sich um eine zufallsbasierte Suche handelt. Schwieriger ist dann die Identifizierung der aktiven Komponente.

Die Screeningverfahren sind in den letzten Jahren sehr effizient geworden. Sie werden von Robotern durchgeführt und erlauben Durchsätze von mehreren tausend Proben pro Tag. Die größere Schwierigkeit besteht darin, diese Vielzahl an Substanzen oder Substanzgemischen überhaupt herstellen zu können. Ein klassisch arbeitender Chemiker kann diese Aufgabe kaum erfüllen.

Der Begriff "kombinatorische Synthese" umfaßt mehrere Methoden, auf deren Basis in kurzer Zeit große Mengen an Verbindungen hergestellt werden können. Das wird durch eine Maßstabsverkleinerung in Form der Spotsynthese oder durch die Synthese von Substanzgemischen (Bibliotheken) möglich. Die Substanzgemische fließen dabei entweder als Gemische bzw. nach der Auftrennung in einem leistungsfähigen Chromatographieverfahren mit paralleler Analytik (z.B. LC-MS) als individuelle Substanzen in den Screeningprozeß ein. Der zentrale Begriff der "Bibliothek" bezeichnet in der kombinatorischen Chemie eine Substanzmischung, deren Herstellungsbedingungen bekannt sind und deren Inhalt man deshalb abschätzen kann. Ist eine Mischung, die die gewünschte Aktivität zeigt, identifiziert, so stellt man Unterbibliotheken her, bis die aktive Verbindung herausgefunden ist.

Ein Beispiel:

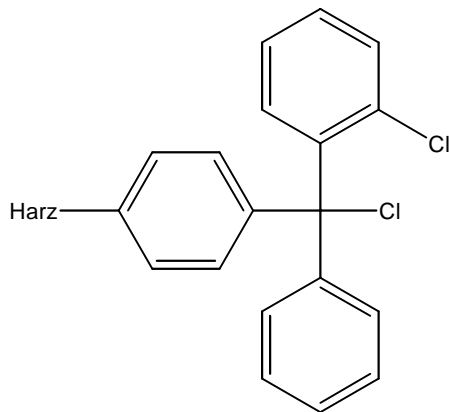
Eines der 8000 möglichen Tripeptide aus den 20 Standardamino­säuren ist aktiv. Rechnet man die Herstellung eines Tripeptids als einen Arbeitsschritt, so ergeben sich maximal 8000 Arbeitsschritte bei einer sequentiellen Synthese. Für 20 Bibliotheken, die sich in der letzten Aminosäure definiert unterscheiden wäre im Grunde nur 1 Arbeitsschritt nötig (*warum?*). Die beste Bibliothek wird wieder unterteilt mit divergenter Synthese nach der ersten Aminosäure (1 Schritt). Die verbleibenden 20 Variationen können entweder einzeln synthetisiert oder aus einer Mischung herausgereinigt werden. Insgesamt ergeben sich maximal 22 Arbeitsschritte, bei weiterer Unterteilung sind es noch weniger.

Diversität: man unterscheidet zwischen Bibliotheken hoher Diversität (viele chemisch sehr unterschiedliche Substanzen) und solchen niedriger Diversität (strukturell ähnliche Verbindungen). Bei der Herstellung von Unterbibliotheken nimmt die Diversität ab.

Informieren Sie sich weiter über die kombinatorische Synthese mit Hilfe der beigefügten pdf-Datei oder über den Suchbegriff "kombinatorische Chemie" in jeder beliebigen Suchmaschine (z.B. Yahoo).

Festphasensynthese: Die ursprüngliche Festphasenpeptidsynthese (SPPS) hat sich im Laufe der Zeit auf andere Bereiche der Chemie ausgeweitet, so daß man heute allgemein von Festphasensynthese spricht (SPS). Dabei wird einer der Reaktanden an einem polymeren Trägermaterial (Harz) immobilisiert, die anderen Reaktanden können in beliebigen Überschüssen zugesetzt werden, da das Harz nach der Reaktion einfach gewaschen werden kann. Dadurch entfällt die aufwendige Prozedur der Aufreinigung wie sie nach einer Lösungssynthese notwendig ist. Die Substanzen werden an die feste Phase über einen Linker, der die Abspaltbedingungen beeinflusst, gebunden.

Im Versuch wird ein 2-Cl-Triptyllinker, der bereits als Chlorid aktiviert ist und sofort beladen werden kann, verwendet.



Dieser Linker ist extrem säurelabil. Zur Abspaltung kann deshalb Hexafluorisopropanol (HFIP) verwendet werden.

Bei der Synthese wird die sogenannte Fmoc-Chemie mit PyBOP (s.u.) als Kopplungsreagenz und DIEA (Diisopropylethylamin) als Hilfsbase angewendet. PyBOP gehört zu einer Reihe kommerziell erhältlicher Kupplungsreagenzien, die aus der Carboxylgruppe der zu koppelnden Fmoc-Aminosäure zunächst einen Aktivester erzeugen, der dann aminolytisch an der Aminogruppe gespalten werden kann. Die Fmoc-Abspaltung erfolgt mit 20 %igem Piperidin in DMF. Die Kopplungsreaktion ist in Abb. 1 wiedergegeben.

Massenspektrometrie: Die Massenspektrometrie ist eine Analysenmethode, die mit minimalem Substanzbedarf auskommt. Gemessen wird die molare Masse von Ionen, die aus der Probe erzeugt werden. Diese Ionen werden im Hochvakuum durch ein elektrisches Feld beschleunigt und entlang einer definierten Flugstrecke entsprechend ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung aufgetrennt. Bei manchen Geräten erfolgt die Trennung auch über das Einfangen der Ionen in magnetischen Feldern (Ion Trap, ICR).

In der Massenspektrometrie werden viele Abkürzungen und Begriffe verwendet, die sich in der Regel auf die zwei Hauptkomponenten des Geräts, die Ionisierungsquelle und den Detektor, beziehen. Das für diesen Versuch verwendete Gerät ist ein MALDI-TOF. MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) bezeichnet die Ionisierungsmethode: durch einen Laser wird ein Kokristallat aus der Probe und einer absorbierenden Matrix verdampft. Dabei werden Ionen der Probe und der Matrix erzeugt. TOF (Time Of Flight) beschreibt die Detektionsmethode. Es wird die Flugzeit zwischen der Ionisierungsquelle und dem Detektor gemessen. Diese wird dann nach der Eichung des Systems mit der Masse korreliert. MALDI-TOF Geräte sind von mittelmäßiger Genauigkeit, bei guter Eichung jedoch für die meisten Zwecke ausreichend.

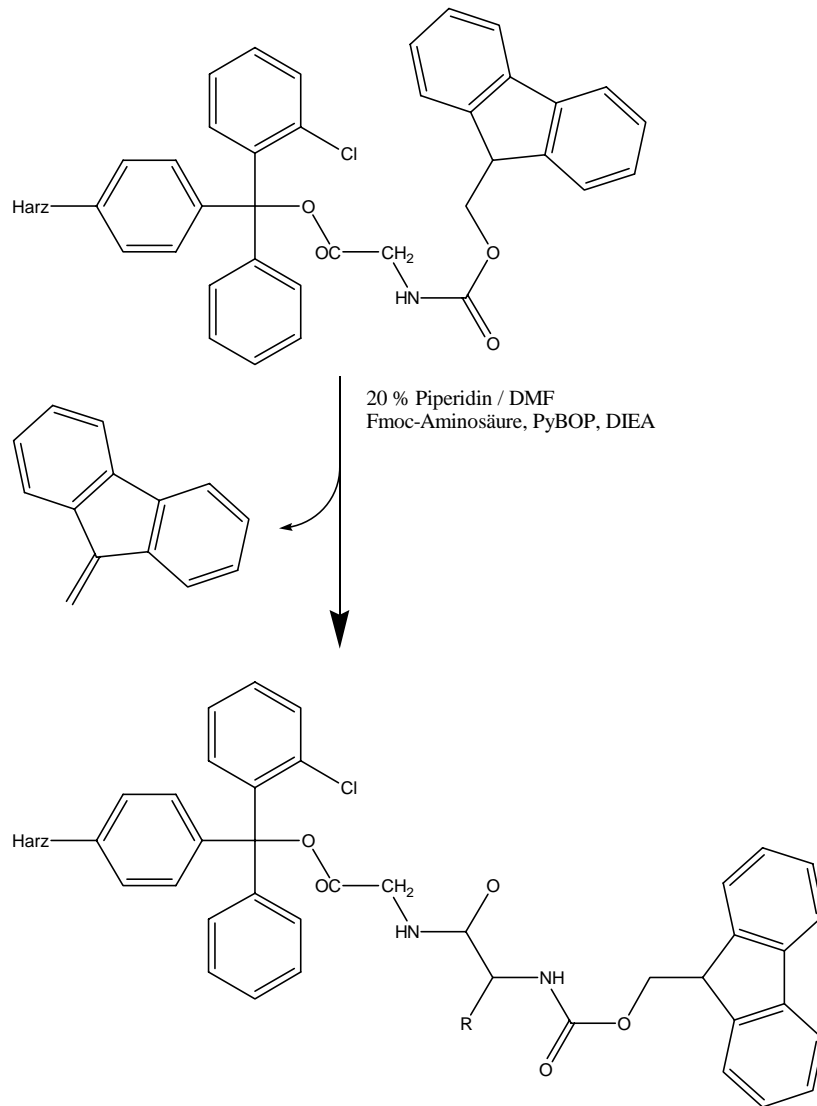


Abb. 1: Ankopplung einer Fmoc-Aminosäure an ein 2-Cl-Triptylharz mit bereits gebundenem Fmoc-Gly.

Sehr genau (und sehr teuer) sind FT-ICR Geräte (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance), die mit verschiedenen Quellen kombiniert werden können. Die Ionen werden hier im Magnetfeld eines supraleitenden Magneten eingefangen und durch ein elektromagnetisches Breitbandsignal in eine größere Umlaufbahn gehoben. Nach Abschalten des Signals fallen die Ionen unter Abgabe der jeweils spezifischen Frequenz in den Grundzustand zurück und man kann das Gesamtsignal durch Fouriertransformation in die einzelnen Frequenzen zerlegen, die wiederum mit den Massen (m/z) korrelieren. Da man eine Schwingung theoretisch beliebig genau messen kann, ist die Auflösung solcher Geräte sehr gut. Differenzen von einer Elektronenmasse lassen sich zuverlässig messen.

Informieren Sie sich über die Methode der Massenspektrometrie in Büchern, z.B. Hesse/Meier/Zeh: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie (Thieme Verlag).

10.2 Aufgabenstellung und Versuchsdurchführung

75 mg 2-Cl-Triptylharz sind in einem ersten Schritt mit Fmoc-Gly-OH zu beladen. Fmoc ist anschließend abzuspalten und die Beladung des Harzes durch photometrische Bestimmung

der Fmoc-Konzentration (Dibenzofulven-Piperidin-Addukt) zu ermitteln. Danach ist ein Gemisch von Fmoc-Aminosäuren unbekannter Zusammensetzung anzukoppeln. Die Fmoc-geschützten Dipeptide werden dann vom Harz abgespalten und für die HPLC sowie MALDI-Massenspektrometrie vorbereitet. An Hand der MS-Daten sind die gebildeten Dipeptide zu identifizieren und mit Hilfe der HPLC-Daten ist das grobe Mengenverhältnis abzuschätzen.

10.2.1 Harzbeladung:

Das Harz hat eine maximale Beladung von ca. 1 mmol/g, in der Praxis werden aber nur ~0,6 mmol/g erreicht.

- Harz in 2 ml Dichlormethan (DCM) 10 min quellen;
- 1 eq Fmoc-Gly-OH in 1 ml DMF/DCM 1:1 lösen, 5 eq DIEA zusetzen;
- Mischung in die Spritze ziehen, 2 Stunden schütteln lassen;
- jeweils 1 min wie folgt waschen:
 - 3 mal DCM/MeOH/DIEA (17:2:1)
 - 3 mal DCM
 - 3 mal DMF

10.2.2 Fmoc-Abspaltung:

- Harz mit Fmoc geschütztem Gly 5 min mit 20 %igen Piperidin in DMF schütteln;
- Vorgang wiederholen, aber 15 min schütteln;
- beide Waschüberstände für die Fmoc-Bestimmung aufbewahren;
- 10 mal 1 min in DMF waschen.

10.2.3 Kopplung:

- Kopplungsmischung: 1eq Fmoc-Aminosäuren, 1 eq PyBOP, 2.5 eq DIEA in 2ml DMF lösen;
- pH-Wert überprüfen! (sollte zwischen pH 9 bis pH 10 liegen);
- Kopplungsmischung in die Spritze ziehen und 2 h koppeln (dabei schütteln);
- jeweils 1 min wie folgt waschen:
 - 3 mal DMF
 - 3 mal DCM
 - 2 mal DMF
 - 3 mal DCM
- 1h im Vakuum trocknen, in der Zwischenzeit Fmoc-Bestimmung ausführen.

10.2.4 Dipeptid-Abspaltung:

- **sehr vorsichtig** 20 % HFIP in DCM in die Spritze mit dem beladenen Harz aufziehen und 30 min schütteln;
- Überstand in ein Spitzkölbchen ausdrücken und einengen;
- Vorbereitung der Proben für HPLC und MS.

Die HPLC wird jeweils über Nacht ausgeführt, die MS-Proben werden gesammelt und am Ende der Woche vermessen.

10.3 Kontrollfragen:

1. Erläutern sie die Vor- und Nachteile einer Split-Mix- und einer Eintopfsynthese.
2. Wodurch ist die sinnvolle Größe einer Bibliothek begrenzt? Wie unterscheidet sich Screening von Selektion?

3. Wann ist die Verwendung von Bibliotheken hoher Diversität sinnvoll, wann die niedriger Diversität? Warum?
4. Welches sind die Vorteile der Festphasensynthese im Vergleich zur Lösungssynthese, können Sie sich auch Nachteile vorstellen?
5. Werden unter den gewählten Abspaltbedingungen Z-, Boc- bzw. OBz- und OtBu-Schutzgruppen mit entfernt?
6. Kann man die Spot-Synthese automatisieren?