

DARSTELLUNG UND EINSATZ VON N-Fmoc-O-Trt-HYDROXYAMINOSÄUREN
ZUR "SOLID PHASE" SYNTHESE VON PEPTIDEN

Kleomenis Barlos^{*a)}, Dimitrios Gatos^{a)}, Sophia Koutsogianni^{a)},
Wolfram Schäfer^{b)}, George Stavropoulos^{a)} und Yao Wenqing^{a)}

a) Chemisches Institut der Universität Patras, Patras, Griechenland

b) Max-Planck-Institut für Biochemie, 8033 Martinsried, B.R.D.

Summary: The preparation of the N-Fmoc-O-Trt derivatives of serine, threonine and tyrosine is described. Their usefulness in peptide synthesis has been determined in the successful solid phase preparation of the partially protected ACTH (fragment 1-10) and peptide T 12. The latter, having six hydroxy amino acid side chains protected with Trt groups, can be quantitatively cleaved from the applied 2-chlorotrityl resin with simultaneous side chain deprotection.

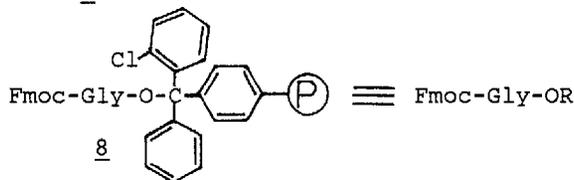
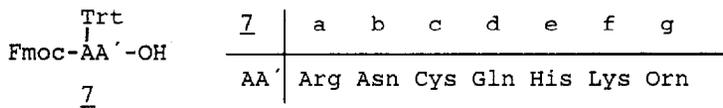
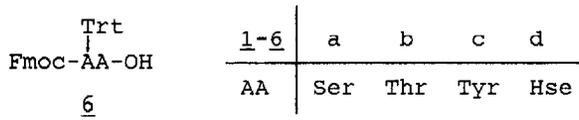
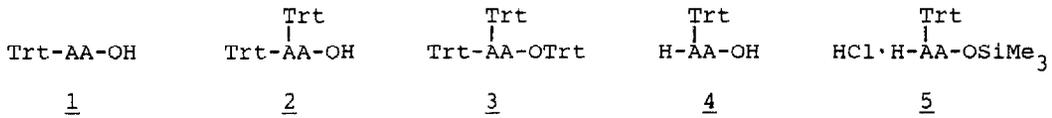
In letzter Zeit sind zur "solid-phase" Synthese von Peptiden und geschützten Peptid-Fragmenten extrem säurelabile Harze des Triphenylmethyl-,^{1,2} Diphenylmethyl-³⁻⁵ und Dialkoxybenzyl-Typs^{6,7} eingeführt worden. Zum Schutz der eingesetzten Aminosäuren wurde die Fmoc/t-Butyl-Schutzgruppenkombination verwendet. Die vollständige Entfernung der t-Butyl-Schutzgruppen bedarf der Einwirkung von 50%-Trifluoressigsäure (TFA). Unter diesen Bedingungen finden säurekatalysierte Nebenreaktionen statt. Diese führen zu mehreren Nebenprodukten, insbesondere durch den elektrophilen Angriff des t-Butyl-Kations auf die Seitenketten von Tryptophan und Methionin.⁸ Um die Vorteile der neuen Harze voll ausnutzen zu können ist es deshalb sinnvoll, die Säurestabilität des verwendeten Seitenkettenschutzes herabzusetzen und ähnlich zu der des verwendeten Harzes zu gestalten. In diesem Sinne wurden neulich die multifunktionalen Aminosäuren 6a, d and 7 synthetisiert.⁹⁻¹² Dabei werden die α -Aminogruppen der Aminosäuren mit dem basenlabilen Fmoc-Rest und die Seiten-

ketten-funktionen mit dem säurelabilen Trt-Rest geschützt. Letzterer kann bei den Derivaten 6a, d mit verdünnter TFA abgespalten werden, also unter wesentlich mildereren Reaktionsbedingungen, als sie zur Abspaltung von t-Butyl-Gruppen benötigt werden.

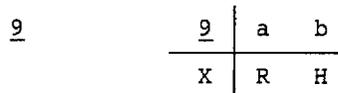
Die Synthese von 6a, d gelingt,¹² indem man die Triethylammonium-Salze von 1a, d mit Trt-Cl und Et₃N in 3a bzw. 2d überführt, diese mit 1%-TFA zu 4a, d selektiv detrityliert und letztere unter Schotten-Bauman-Bedingungen mit Fmoc-Cl zu 6a, d umwandelt. Dagegen mißlingt die Darstellung von 6b, c, da die Zwischenprodukte 4b, c durch diese Methode nicht erhältlich sind.

Wir untersuchten jetzt die Gründe dazu und fanden, daß die O-Tritylierung unter diesen Bedingungen bei 1b sehr träge verläuft und, daß 1%-TFA, einen beträchtlichen Anteil der Hydroxytrityl-Gruppe von 4c innerhalb weniger Minuten abspaltet. Beide Probleme konnten gelöst werden: so führt der Zusatz von DMAP (0.05 mmol) als Tritylierungskatalysator einerseits zur beträchtlichen Beschleunigung der Tritylierung von 1 und andererseits zu ihrem vollständigen Ablauf. Die Gemische von 2 und 3 werden dann mit Eisessig/TFE/Dichlormethan (1:2:7) oder mit 1-Hydroxybenzotriazol in TFE/Dichlormethan (1:3) bei 0°C detrityliert. Die so in 60-80% Ausbeute anfallenden 4 können mit Fmoc-Cl oder Fmoc-OSu in wäßrigem Dioxan in 60-80% oder über die entsprechenden Silylester 5 in 70-90% Ausbeute in 6 überführt werden.¹³

Um die Eignung von 6a-c zur Synthese von Peptiden zu überprüfen, suchten wir zunächst mit TFA-Lösungen verschiedener Konzentration die mildesten Reaktionsbedingungen zur quantitativen O-Trt-Spaltung bei 6. Diese erfolgt bei 6a, b mit 5% TFA in TFE/Dichlormethan (5:95) in 2-5 min bei Raumtemperatur. Bei 6c genügt 1-2% TFA in der gleichen Zeit. Der Stabilitätsunterschied zwischen Ser/Thr- und Tyr-Derivaten wird auch bei der Spaltung mit Eisessig/TFE/Dichlormethan (1:1:8) beobachtet. Laut DC-Kontrolle ist 6a für mindestens 30 min bei Raumtemperatur stabil, während man bei 6b sehr geringe und bei 6c beträchtliche O-Trt-Spaltung beobachtet. Da bei der "solid-phase" Synthese unter Einsatz des 2-Chlortrityl-Harzes die Peptide mit intakten Seitenketten-schutz durch Einwirkung von Eisessig/TFE/Dichlormethan (1:1:8) vom Harz abgespaltet werden, resultiert aus unseren Untersuchungen, daß besonders 6a zur Darstellung geschützter Peptid-Segmente geeignet ist. Dieses sollte während der Synthese des Corticotropin (1-10)-Fragments 9b unter Einsatz von 6a bestätigt werden. So wurde das mit Fmoc-Gly substituierte Trityl-Harz 8 mit Benzotriazolylestern der Fmoc-Aminosäuren gekuppelt. Zum Schutz der funktionellen Seitenketten von Tyrosin und Glutaminsäure wurde t-Butyl eingesetzt. Arginin wurde als Fmoc-Arg(Pmc)-OH und Histidin als Fmoc-His(Trt)-OH eingeführt. Nach jedem beendeten Syntheseabschnitt wurde der Fmoc-Rest, wie üblich, mit 20%-Piperidin in DMF abgespaltet. Die aminoendständige Boc-Gruppe in 9a wurde nach der Fmoc-Abspaltung mit Di-tert-butylidicarbonat und Triethylamin



Boc-Ser(Trt)-Tyr(Bu^t)-Ser(Trt)-Met-Glu(Bu^t)-His(Trt)-Phe-Arg(Pmc)-Trp-Gly-OX



Fmoc-Thr(Trt)-OR

H-Ala-Ser(Trt)-Thr(Trt)-Trt(Trt)-Thr(Trt)-Asn-Tyr(Trt)-Thr(Trt)-OR

10

11

Ala-Ser-Thr-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr

12

in DMF eingeführt. Die Ablösung des geschützten Peptids 9b vom Harz erfolgte durch 30 min Einwirkung von Eisessig/TFE/Dichlormethan (1:1:8). Dabei bleiben die verwendeten Schutzgruppen vollständig intakt. Nach Zusatz von Ether und Petrolether zur Reaktionslösung wird das Rohpeptid 9b in hoher Reinheit (96%, HPLC) und 94% Ausbeute erhalten (bezogen auf anfängliche Substitution von 8) und durch FAB-MS identifiziert.

Anhand der Synthese von Peptid T 12 sollten sterische Effekte der voluminösen Trt-Gruppen in allen Phasen einer Peptidsynthese untersucht werden. Zunächst wird 6b (0.65 mmol) mit 2-Chlortritylchlorid Harz (1 g, 1.6 mmol) verestert. Die Reaktion in Dichlormethan, mit Diisopropylethylamin als Chlorwasserstoffakzeptor ergibt in 25 min bei Raumtemperatur Harz 10 mit einer Beladung von 0.48 mmol 1b/g. Die erhaltene Harzsubstitution entspricht einem 91%igen Umsatz von 1b, woraus gefolgert wird, daß dabei keine sterische Hinderung wirksam ist. Die Kupplungen zur Peptid-

kettenverlängerung führten wir in DMF- oder Dimethylacetamid-Lösung, unter Einsatz eines 3 molaren Überschusses von hergestelltem Benzotriazolylester der Fmoc-Aminosäure durch. Man erhält in allen Fällen in 2 h eine vollständige Kupplung; d.h. es wird, verglichen mit den Kupplungszeiten bei Fmoc-Aminosäuren, keine Verzögerung der Kupplung beobachtet. Das Peptid 12 wird vom Harz 11 bei gleichzeitiger Entfernung aller Schutzgruppen durch Einwirkung von TFA/TFE/Dichlormethan (5:5:95) innerhalb 5 min bei Raumtemperatur abgelöst. Unseres Wissens sind diese Bedingungen die mildesten, die bisher zur Abspaltung eines Peptids vom Harz, bei gleichzeitiger Entfernung des Seitenkettenschutzes, angewandt wurden. Wie aus dem HPLC des erhaltenen Rohproduktes hervorgeht, erhält man dadurch Peptid T (12, 92% Ausbeute) in 94proz. Reinheit. Seine Identifizierung erfolgte durch FAB-MS und Aminosäureanalyse.

Danksagung: Wir danken dem "Ministerium für Industrie, Energie und Forschung" und die "Chemical and Biopharmaceutical Laboratories of Patras", für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

LITERATUR

1. K.Barlos, D.Gatos, J.Kallitsis, G.Papaphotiu, P.Sotiriu, Y.Wenqing und W.Schäfer, *Tetrahedron Lett.* 30 (1989) 3943.
2. K.Barlos, D.Gatos, S.Kapalos, G.Papaphotiu, W.Schäfer und Y.Wenqing, *Tetrahedron Lett.* 30 (1989) 3947.
3. H.Rink, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 3787.
4. K.Barlos, D.Gatos, J.Kallitsis, D.Papaioannou, P.Sotiriu und w.Schäfer, *Liebigs Ann.Chem.* 1987, 1031.
5. K.Barlos, D.Gatos, J.Hondrellis, J.Matsoukas, G.J.Moore, W.Schäfer und P.Sotiriu, *Liebigs Ann.Chem.* 1989, 951.
6. R.C.Sheppard und B.J.Williams, *Int.J.Peptide Protein Res.* 20 (1982) 451.
7. M.Mergler, R.Tanner, J.Gosteli und P.Grogg, *Tetrahedron Lett.* 29 (1988) 4005.
8. G.B.Fields und R.L.Noble, *Int.J.Peptide Protein Res.* 35 (1990) 161.
9. V.Caciagli und A.S.Verdini, in *Peptide Chemistry 1987* (T.Shiba and S.Sakakibara eds.) 1988, 283.
10. P.Sieber und B.Riniker, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 6031.
11. P.Sieber und B.Riniker, *Helv.Chim.Acta*, in preparation.
12. K.Barlos, P.Mamos, D.Papaioannou, S.Patrianakou, C.Sanida und W.Schäfer, *Liebigs Ann.Chem.* 1987, 1025.
13. 6b: Farbloses Pulver durch Zutropfen einer Essigesterlösung in n-Hexan; Schmp. 109-110°C, $[\alpha]_D^{25} = -54.5$ (c=1, DMF), 6c: Umkristallisiert aus Dichlormethan/n-Hexan; Schmp. 168-170°C, $[\alpha]_D^{25} = -23.5$ (c=1), DMF).

(Received in Germany 11 August 1990)