

Fmoc-His(Mnt)-OH UND Fmoc-His(Mtt)-OH. ZWEI NEUE HISTIDIN-
DERIVATE N^{im} -GESCHÜTZT MIT SÄURE-HOCHEMPFINDLICHEN GRUPPEN.
DARSTELLUNG, EIGENSCHAFTEN UND EINSATZ IN DER PEPTIDSYNTHESE

Kleomenis Barlos*, Olga Chatzi, Dimitrios Gatos, George
Stavropoulos und Theodore Tsegenidis

Chemisches Institut der Universität Patras, Patras, Griechenland

Summary: The use of 4-methoxytrityl (monomethoxytrityl, Mnt) and 4-methyl-tri-
tyl (Mtt) groups for N^{im} -protection of Fmoc-His is described. Both groups
being unaffected by base, e.g. piperidine and diethylamine, can be quantita-
tively removed under very mild conditions, in comparison with trityl groups.
The solid phase peptide synthesis of magainin I (fragment 1-10) on 2-chloro-
trityl resin showed the excellent suitability of the above derivatives of
histidine for peptide synthesis.

Histidin (1), geschützt an der Imidazol-Funktion durch den Trt-Rest,¹ fin-
det Einsatz bei der Synthese von Peptiden in Form der N^{α} -Fmoc-²⁻⁴ bzw. N^{α} -
Boc-geschützten⁵ Derivaten. Die Trt-Gruppe ist bei diesen Verbindungen
beständig gegen Base, die Entfernung des N^{α} -Fmoc-Restes mit Piperidin erfolgt
selektiv. Die Säurestabilität des N^{im} -Trt-Restes von Histidin ist so hoch,
daß dieser während der Einwirkung von Chlorwasserstoff in Eisessig intakt
verbleibt.

Die quantitative N^{im} -Detritylierung von Histidin erfolgt bei der Einwir-
kung von 90%-TFA für 1h bei Raumtemperatur.^{3,4} Diese Bedingungen sind
drastischer als sie zur Abspaltung von Peptiden von sehr säureempfindlichen
Harzen benötigt werden. Die Seitenkettendetritylierung von Serin, Threonin,
Tyrosin und Lysin erfolgt ebenfalls unter weit mildereren Bedingungen als
die N^{im} -Detritylierung von Histidin.

Ziel unserer Untersuchungen war deshalb die Herabsetzung der
Säurestabilität des Seitenkettenschutzes von Histidin. Diese erhofften wir zu

realisieren, indem wir zur N^{im}-Blockierung von Fmoc-His die elektronenreicheren Mmt- bzw. Mtt-Reste, statt Trt verwendeten.

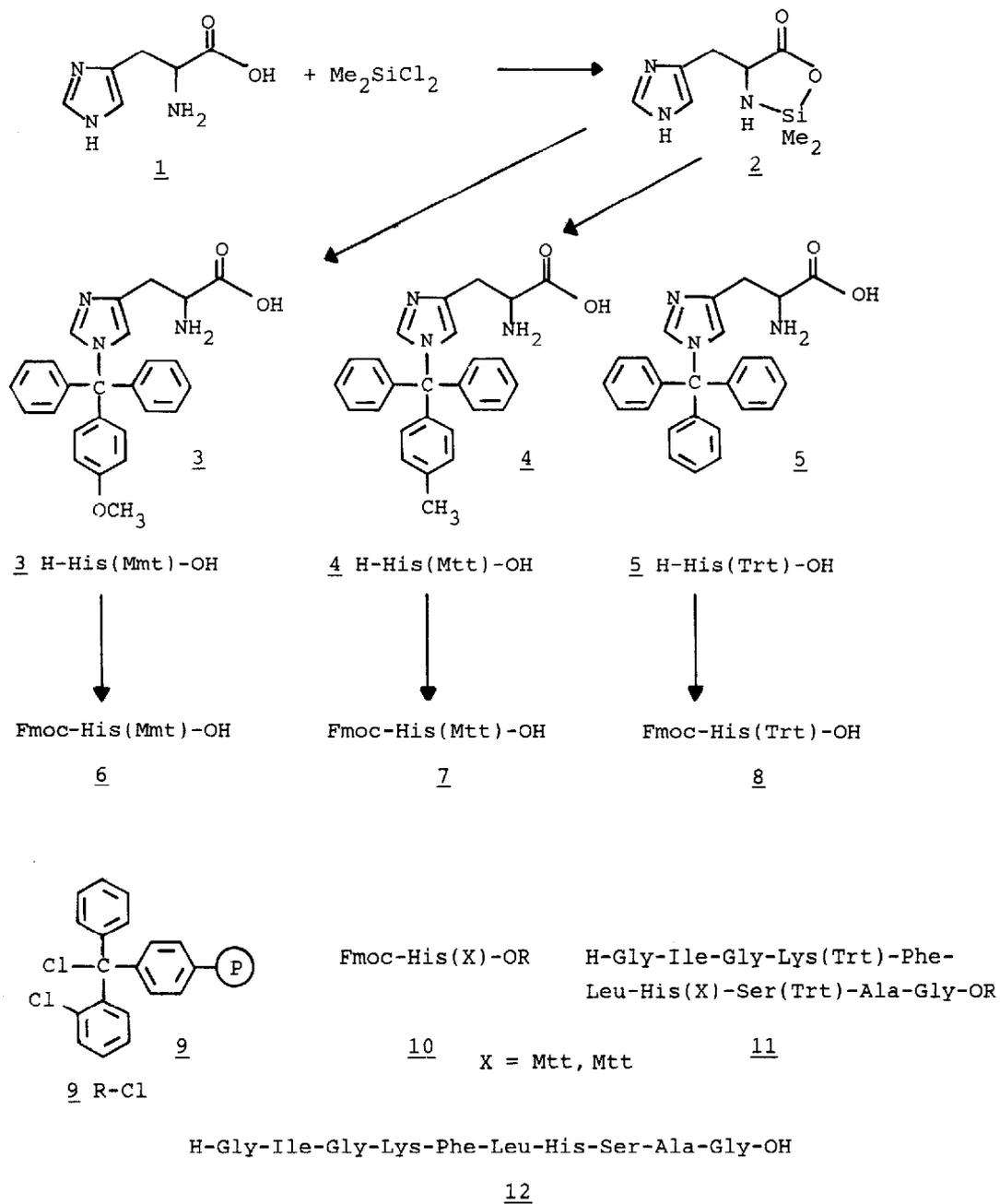
Die benötigten H-His(Mmt)-OH 3 und H-His(Mtt)-OH 4 erhält man, analog¹ zu H-His(Trt)-OH 5, durch Eintopfreaktion von Histidin, zunächst mit Dichlordimethylsilan in Dichlormethan, wobei vermutlich das cyclische Dimethylsilyl-Derivat 2 entsteht, gefolgt von der Umsetzung mit Triethylamin und Mmt- bzw. Mtt-Chlorid.⁶ Durch Zusatz von Wasser zum Reaktionsgemisch wird der Dimethylsilyl-Rest hydrolytisch entfernt, 3 und 4 fallen als leicht gelbliche amorphe Feststoffe aus. Man erhält sie in 90-98% Ausbeute und 96-98% Reinheit (HPLC). Aufgrund ihrer Schwerlöslichkeit erweist sich ihre Umkristallisation aus den verschiedensten Lösungsmittelgemischen als schwierig. Deshalb überführten wir 3 und 4 ohne weitere Reinigung in wäßrigem Dioxan mit Fmoc-Succinimid oder Fmoc-Chlorid in die Derivate 6 und 7. Letztere kristallisieren nach der üblichen extraktiven Aufarbeitung sehr gut aus Aceton. Man erhält sie rein in 65-75% Ausbeute [6: Schmp. 144-146°C; $[\alpha]_D^{25} = -0.5$ (c=1.9, DMF). 7: Schmp. 143-145°C; $[\alpha]_D^{25} = -0.9$ (c=1.9, DMF)].

Als nächstes untersuchten wir wichtige Eigenschaften der neuen Verbindungen bezüglich ihrer Eignung zur Synthese von Peptiden. So erfolgt die quantitative Entfernung der Mmt- bzw. Mtt-Reste bei 6 und 7, wie HPLC-Untersuchungen zeigen, mit 5 bzw. 15% TFA in Dichlormethan innerhalb 15 min bei Raumtemperatur. Diese Bedingungen sind wesentlich milder als die, die zur Entfernung des Trt-Restes verwendet werden. Auch gegenüber der Einwirkung von Eisessig (AcOH)/Trifluor-ethanol (TFE)/Dichlormethan (DCM) im Verhältnis 1:1:8 erweisen sich die neuen Derivate als empfindlich. So beobachtet man (HPLC), daß innerhalb 30 min bei Raumtemperatur 75-80% des Mmt- bzw. 3-8% des Mtt-Restes abgespaltet werden. Aus diesen Ergebnissen folgt, daß beide Derivate zur Darstellung geschützter Peptid-Segmente durch Einsatz des sehr säureempfindlichen 2-Chlortrityl-Harzes⁷ ungeeignet sind, da aus diesem Harz die synthetisierten Peptide durch Einwirkung von AcOH/TFE/DCM (1:1:8-2:2:6) abgelöst werden.

Die Verknüpfung von 6 und 7 mit dem 2-Chlortritylchlorid-Harz⁷ 9 erfolgt in Dichlorethan innerhalb 25 min bei Raumtemperatur. Die eingesetzten Aminosäuren 6 und 7 werden zu ca. 90% in die Harze 10 überführt [1g Harz 9 (1.6 mmol Chlorid), 1 mmol 6 bzw. 7, 2.5 mmol Diisopropylethylamin, 15 ml 1,2-Dichlorethan].

Die Eignung von 6 und 7 zur "solid-phase" Synthese von Peptiden wurde durch die racemisierungsfreie (HPLC, D-Isomer < 0.3%) Darstellung der Peptide L-His-Val-Val⁴ bzw. DL-His-Val-Val am 2-Chlortrityl-Harz bestätigt (1 mmol H-Val-Val-Harz 3 mmol 6 bzw. 7, 3 mmol DCC, 4.5 mmol 1-Hydroxybenzotriazol, 2h, 20°C in DMF).

Die Kupplungseigenschaften von 6 und 7 wurden weiter während der "solid phase" Synthese des Magainin I-Fragments 12 unter Einsatz von 9 untersucht. So wurde das mit Fmoc-Gly-OH veresterte Harz, mit den Benzotriazolyl-



estern der Fmoc-Aminosäuren, zum Peptidester-Harz 11 umgesetzt. Die Seitenketten von Ser und Lys wurden dabei mit dem ebenfalls sehr säureempfindlichen Trt-Rest geschützt.⁸ Die Synthese erfolgte mit einem dreifachen Überschuss von Benzotriazolylester. Alle Kupplungen waren in weniger als 2h bei Raumtemperatur vollständig abgelaufen.

Das synthetisierte Peptid 12 wurde vom Harz durch Einwirkung von AcOH/TFE/DCM (1:2:7) innerhalb 30 min bei Raumtemperatur quantitativ abgespaltet. Dabei erfolgt partielle Detritylierung. Die Vollständige Schutzgruppenentfernung zu 12 erfolgte entweder durch 15% TFA in Dichlormethan innerhalb 90 min bei Raumtemperatur oder durch 25% TFA in Dichlormethan/Wasser (95:5) in 20 min bei Raumtemperatur. Peptid 12 wird dadurch in 88% Ausbeute und nach semipräparativer HPLC-Reinigung in 66% Ausbeute erhalten. Die Identität wurde durch korrekte Aminosäureanalyse bestätigt.

Danksagung: Wir dankem 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.Papaioannou und D.Theodoropoulos, *J.Org.Chem.* 47 (1982) 1324.
2. K.Barlos, P.Mamos, D.Papaioannou, S.Patrianakou, C.Sanida und W.Schäfer, *Liebigs Ann.Chem.* 1987, 1025.
3. P.Sieber und B.Riniker, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 6031.
4. P.Sieber und B.Riniker, in *Peptides. Chemistry and Biology* (G.R.Marshall, ed.) ESCOM, Leiden, (1988) 270.
5. G.Losse und U.Kryschowski, *J.Prakt.Chem.* 312 (1979) 1097.
6. Mtt-Cl (Schmp. 93-95°C) erhält man in 68% Ausbeute durch Umsetzung von Benzophenon mit p-Tolylmagnesiumbromid in THF und Chlorierung des erhaltenen 4-Methyltritylcarbinols mit Acetylchlorid.
7. K.Barlos, D.Gatos, J.Kallitsis, G.Papaphotiou, P.Sotiriou, Y.Wenging und W.Schäfer, *Tetrahedron Lett.*, 30 (1989) 3943.
8. Nach wachsender Säureempfindlichkeit kann man die eingesetzten Derivate wie folgt einordnen: Fmoc-Lys(Trt)-OH < Fmoc-His(Mtt)-OH < Fmoc-Ser(Trt)-OH < Fmoc-His(Mmt)-OH.

(Received in Germany 11 August 1990)