

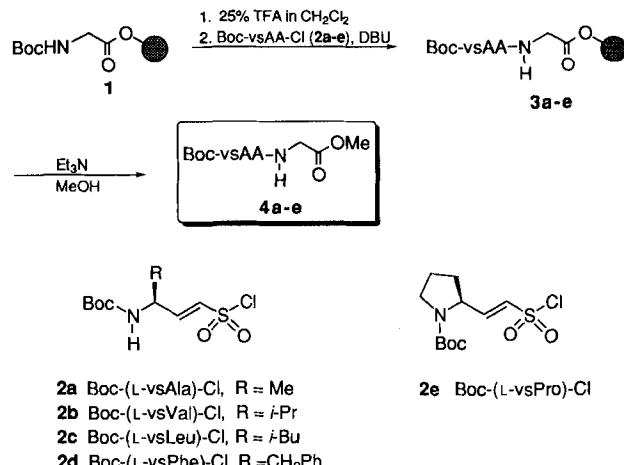
Festphasensynthese von vinylogen  
Sulfonylpeptiden\*\*

Cesare Gennari\*, H. Peter Nestler, Barbara Salom und  
W. Clark Still

Kombinatorische Substanzbibliotheken auf polymeren Trägern ermöglichen das Aufspüren von subtilen Unterschieden intermolekularer Wechselwirkungen und eröffnen einen neuen Weg zum Auffinden neuer Wirkstoffleitstrukturen<sup>[1]</sup>. Die Einbeziehung von Pharmacophoren in solche Bibliotheken erregt daher zur Zeit starkes Interesse, und Peptide sowie ihre Analoga und Isostere gehören im Hinblick auf biologische als auch klinische Anwendungen zu den interessantesten Strukturelementen<sup>[2]</sup>. Phosphorylpeptide (Phosphonamidate und Phosphonate) sind weithin als Übergangszustandsmimetica der Peptidhydrolyse anerkannt und intensiv untersucht worden<sup>[1b, 3]</sup>. Sulfonamide haben die gleiche Tetraederstruktur der Amidbindung, wurden aber trotz ihres Potentials als Pharmacophore für die Hemmung von Proteasen bislang vernachlässigt<sup>[4]</sup>. Die im Vergleich zur normalen Peptidbindung stärkere Polarisierung der entsprechenden Bindung des Sulfonamids begünstigt zudem die Bildung von Wasserstoffbrücken und führt zu einer ausgeprägten strukturellen Präorganisation, was Sulfonylpeptide zu interessanten Objekten für die Untersuchung nichtkovalenter molekularer Wechselwirkungen macht<sup>[5, 6]</sup>.

Das Problem der Strukturaufklärung von Molekülen aus kombinatorischen Substanzbibliotheken wurde durch Codierungsverfahren gelöst<sup>[7]</sup>, und die größte Herausforderung liegt zur Zeit in der Entwicklung einer Technik für die organische Festphasensynthese. Wir beschreiben nun eine Festphasensynthese von vinylogen Sulfonylpeptiden, die mit der Boc-Schutzgruppenstrategie (Boc = *tert*-Butoxycarbonyl) der Peptidsynthese kompatibel ist. Unsere Methode ermöglicht die Einbeziehung vinyloger Sulfonylpeptide in kombinatorische Bibliotheken und ist somit ein wichtiger Schritt in der Entwicklung von Synthesemethoden zum Einbau von Pharmacophoren in Bibliotheken natürlicher und nichtnatürlicher Oligomere<sup>[1]</sup>. Die erste Synthese von vinylogen Sulfonylpeptiden in Lösung, die auf der gleichen Strategie, wie sie hier verwendet wurde, basiert, wurde kürzlich beschrieben<sup>[5]</sup>. Wir haben ausgehend von Boc-Glycin-PEG-Harz 1 (PEG = Polyethylenglycol)<sup>[8]</sup> und den Sulfonylchloriden 2a–e (Boc-vsAA-Cl)<sup>[9]</sup> die fünf Sulfonyldipeptide 3a–e synthetisiert. Nach der Methanolysen des Harzes erhielten wir die Sulfonylpeptidmethylester 4a–e in guter Ausbeute (Schema 1).

Unsere Vorgehensweise für die Synthese der Sulfonylpeptide ist von der Boc-Schutzgruppenstrategie der Festphasenpeptidsynthese abgeleitet. Das Harz wird zur Abspaltung der Boc-Gruppen mit 25proz. TFA (Trifluoressigsäure) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> behandelt und die entstandenen Ammoniumsalze durch dreimaliges Waschen mit 2.5proz. DBU (DBU = 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-en) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> neutralisiert. Nach Zugabe



Schema 1. Durch Festphasensynthese hergestellte Sulfonylmonopeptide. Abkürzungen siehe Text.

von 1 Äquiv. Sulfonylchlorid 2 wird DBU mit einer Geschwindigkeit von etwa 1.5 Äquiv. pro Stunde in kleinen Portionen solange zugesetzt, bis das gesamte Sulfonylchlorid abgebaut ist. Das Harz wird fünfmal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gewaschen und der Kupplungscyclus dreimal wiederholt, um eine vollständige Umsetzung aller Aminogruppen auf dem Harz zu erzielen. Zum Abschluß werden eventuell noch vorhandene Aminogruppen mit Acetanhydrid acetyliert.

Wir erhielten die Sulfonylpeptidmethylester 4a–e nach Methanolysen des Harzes mit 10proz. Et<sub>3</sub>N in MeOH und Reinigung mit präparativer Dünnschichtchromatographie (DC) in 60–70% Ausbeute. Um den Grad der Umsetzung zu ermitteln, bestimmten wir die <sup>1</sup>H-NMR-Signalintensitäten der Sulfonylpeptid-Boc-Gruppe ( $\delta \approx 1.45$ ) und der Acetylglycinmethylester-Acetylgruppe ( $\delta = 2.06$ ) im Methanolyserohprodukt. Nach den zuvor beschriebenen vier Kupplungscyclen war die Umsetzung jeweils größer als 95%. Der verwendete Acetylglycinmethylester wurde nach Entschützen des Harzes 1, Acetylierung mit Acetanhydrid, Methanolysen und präparativer DC in 67% Ausbeute erhalten.

Wir hatten festgestellt, daß DBU zur Zersetzung der Sulfonylchloride führt, aber auch für die Kupplung unentbehrlich ist<sup>[5]</sup>. Trotzdem überprüften wir mehrere Möglichkeiten zur Katalyse der Festphasenkupplung. Die Zugabe eines oder mehrerer Äquivalente DBU zu Beginn der Kupplungsreaktion führte überwiegend zur Zersetzung der Sulfonylchloride und die zur Synthese in Lösung analoge Zugabe von mehreren Äquivalenten Sulfonylchlorid ohne Entfernung der löslichen Nebenprodukte unter schrittweiser Neutralisation mit DBU führte in keinem der untersuchten Fälle zur vollständigen Umsetzung: Die Produkte der Sulfonylchloridzersetzung scheinen das Fortschreiten der Kupplungsreaktion zu unterdrücken. Das gleiche Phänomen beobachteten wir auch, wenn wir leicht verunreinigte Sulfonylchloride einsetzten; trotz vollständigem Abbaus des Sulfonylchlorides konnten wir keine Umsetzung der Aminogruppen feststellen. Das Ersetzen von DBU durch 2,6-Lutidin, *N*-Methylimidazol oder Triethylamin führte ebensowenig zu verbesserten Ausbeuten. Zwar erhielten wir unter Einsatz von 2,6-Lutidin ausgezeichnete Kupplungsausbeuten für die Reaktion von Boc-vsAla-Cl 2a mit Glycinpolystyrolharz, doch führte unser Versuch, auf diese Weise das Sulfonyldipeptid Boc-(L-vsAla)-(L-vsAla)-Gly-OMe 5 herzustellen, zu einem komplexen Produktgemisch. Zudem stellten wir fest, daß das PEG-Harz für die Synthese von Sulfonylpeptiden weitaus besser geeignet ist als der in der Peptidsynthese übliche Polystyrolträger<sup>[8]</sup>.

[\*] Prof. Dr. C. Gennari, B. Salom

Dipartimento di Chimica Organica e Industriale  
Università di Milano

Centro CNR per lo Studio delle Sostanze Organiche Naturali  
via G. Venezian 21, I-20133 Milano (Italien)

Telefax: Int. + 2/236-4369

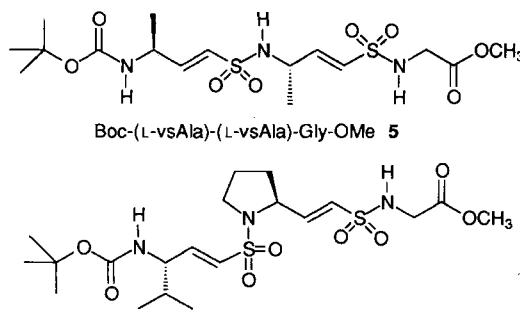
Prof. Dr. W. C. Still  
Department of Chemistry, Columbia University (USA)

Dr. H. P. Nestler  
Cold Spring Harbor Laboratory (USA)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (Grant HL25634 für W.C.S.) gefördert. C.G. und W.C.S. danken der NATO für einen Collaborative Research Grant (NATO 921422). H.P.N. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Liebig-Stipendium.

Beim Verfolgen unserer Kupplungsreaktion trafen wir auf ein unerwartetes Problem: Weder der traditionelle Kaiser-Ninhydrin-Test<sup>[10]</sup> noch die Verwendung von Bromphenolblau als einfacher Säure/Base-Indikator<sup>[11]</sup> erwiesen sich zum Test auf freie Amine auf dem Harz geeignet. Die Kupplungsreaktion scheint zu Spuren von Aminoverbindungen zu führen, die selbst im Falle nahezu vollständiger Umsetzungen positive Aminnachweise zur Folge haben. Trotzdem erwies sich Bromphenolblau als äußerst nützlich zur In-situ-Verfolgung des Sulfonylchloridabbau während der DBU-Zugabe. Die Reaktionslösung ist, solange DBU nicht im Überschüß vorhanden ist, gelb und schlägt am Neutralisationspunkt nach Grün um. Nach einer Weile zeigt ein weiterer Farbumschlag von Grün nach Blau den vollständigen Abbau des Sulfonylchlorides an und ermöglicht somit die einfache Verfolgung der Kupplung vinyloger Sulfonylpeptide während der Synthese kombinatorischer Bibliotheken.

Nachdem wir die Reaktionsbedingungen zur Synthese der Monosulfonylpeptide ausgearbeitet hatten, stellten wir zwei Sulfonylpeptide her, um die Anwendbarkeit unserer Methode zur Synthese von Oligomeren zu unterstreichen (Schema 2).



Schema 2. Durch Festphasensynthese hergestellte Sulfonyldipeptide.

Wir erhielten beide Produkte in zufriedenstellenden Ausbeuten (**5**: 57%, **6**: 52%). Die Herstellung von **5** erbrachte den Beweis, daß die Kupplung auf der Festphase ebenso wie die Synthese in Lösung stereoselektiv verläuft: Nur ein einziges Diastereomer von **5** konnte im unzureinigten Methanolysenprodukt nachgewiesen werden. Unser Interesse bei der Synthese von **6** galt vor allem dem sekundären Amin in Prolin. Die Eigenschaften dieses Amins beeinflussen seine Reaktivität gegenüber den Sulfonylchloriden nicht: Weder die Reaktivität auf der Festphase noch die in Lösung unterscheiden sich von denen der primären Amine der übrigen Aminosäuren.

Wir beschrieben eine Methode zur Festphasensynthese vinyloger Sulfonylpeptide, die den Weg zur Einbeziehung dieser Peptidanaloga in kombinatorische Bibliotheken eröffnen. Wir untersuchen zur Zeit die Möglichkeiten und Grenzen unserer Methodik als auch die Einbeziehung funktionalisierter Seitenketten in unseren Monomerbasissatz. Darüber hinaus beschäftigen wir uns mit dem Aufbau von Rezeptoren aus vinylogen Sulfonylpeptiden und dem Screening ihrer Affinität gegen kombinatorische Peptidbibliotheken<sup>[16]</sup>.

### Experimentelles

**6:** 600 mg Boc-Gly-OPEG-Harz **1** wurden mit 10 mL 25proz. TFA in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  30 min entschützt. Das Harz wurde fünfmal mit je 10 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gewaschen. Das so erhaltene TFA-Ammoniumsalz wurde durch dreimaliges Waschen mit 10 mL 2.5proz. DBU in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  neutralisiert. Überschüssiges DBU wurde durch dreimaliges Waschen mit 10 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  entfernt. Drei Tropfen einer 1proz. Bromphenolblau-Lösung in Dimethylacetamid (DMA) wurden zur Reaktionsverfolgung zugesetzt und das Harz vier Kupplungscyclen unterworfen. Jeder Cyclus bestand aus der Zugabe von 2 mg DMAP und 40 mg Boc-(L-vsPro)-Cl **2** in 5 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , gefolgt

von der Zugabe von 0.4 mL 2.5proz. DBU-Lösung in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  alle 10 min, bis die Lösung eine basische Reaktion gegen Bromphenolblau (intensive blaue Färbung) zeigte. (Im ersten Cyclus wurden hierfür 2 Äquiv. DBU benötigt, in den folgenden Cyclen bis zu 4 Äquiv. DBU.) Die Reaktionsmischung wurde weitere 30 min geschüttelt und dann fünfmal mit 10 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gewaschen. Nach dem letzten Kupplungscyclus wurde das Harz 1 h mit 0.5 mL  $\text{Ac}_2\text{O}$  in 10 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  behandelt und dann fünfmal mit 10 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , dreimal mit 10 mL DMF und dreimal mit 10 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gewaschen. 300 mg des so erhaltenen Harzes **3e** wurden fünfmal mit 10 mL MeOH gewaschen, in einen 10-mL-Rundkolben überführt und unter 12 h in magnetischem Röhren mit 5 mL 10proz.  $\text{NEt}_3$  in wasserfreiem MeOH behandelt. Die Suspension wurde filtriert und das Filtrat im Vakuum eingeengt. Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Rückstands zeigte einen Gehalt an Acetylglycinmethylester von weniger als 5%. Reinigung mit präparativer DC (Silica, Hexan/AcOEt 1 + 1) ergab 18 mg (75%) Boc-(L-vsPro)-Gly-OMe **4e**.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, TMS):  $\delta$  = 1.44 (9 H, s), 1.78 (1 H, m), 1.88 (2 H, m), 2.10 (1 H, m) 3.35–3.47 (2 H, m), 3.78 (3 H, s), 3.82 (2 H, s), 4.45 (1 H, br), 4.96 (1 H, br), 6.21 (1 H, d,  $J$  = 15.0 Hz), 6.65 (1 H, dd,  $J$  = 15.0,  $J$  = 5.7);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 23.546 ( $\text{CH}_2$ ), 28.354 ( $\text{CH}_3$ ), 30.912 ( $\text{CH}_2$ ), 43.844 ( $\text{NCH}_2$ ), 46.513 ( $\text{CH}_2\text{N}$ ), 52.550 ( $\text{OCH}_3$ ), 57.012 (CHN), 127.443 (=CH), 145.714 (=CH), 158.848 (C=O), 169.638 (C=O), HRMS: ber. für  $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$  349.1433, gef. 349.1441.

Das zurückbehaltene Harz **3e** wurde wie zuvor beschrieben entschützt und mit Boc-(L-vsVal)-Cl (28, 21 mg pro Cyclus) umgesetzt. Acetylierung und Spaltung vom Harz entsprechend der obigen Vorschrift ergaben **6** in ca. 90% Reinheit ( $^1\text{H-NMR}$ ). Reinigung mit präparativer DC (Silica, Hexan/AcOEt 2 + 1) ergab 18 mg (52%) Boc-(L-vsVal)-(L-vsPro)-Gly-OMe **6**.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.95 (3 H, d,  $J$  = 6.7), 0.96 (3 H, d,  $J$  = 6.7), 1.44 (9 H, s), 1.75–2.00 (4 H, m), 2.00–2.20 (1 H, m), 3.25–3.50 (2 H, m), 3.76 (3 H, s), 3.87 (2 H, d,  $J$  = 5.5), 4.13 (1 H, m), 4.28 (1 H, m), 4.75 (1 H, d,  $J$  = 8.2), 5.44 (1 H, t,  $J$  = 5.5), 6.27 (1 H, d,  $J$  = 15.1), 6.46 (1 H, d,  $J$  = 15.0), 6.65 (2 H, dd,  $J$  = 15.0,  $J$  = 5.5);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 18.178 ( $\text{CH}_3$ ), 18.769 ( $\text{CH}_3$ ), 23.927 ( $\text{CH}_2$ ), 28.173 ( $\text{CH}_3$ ), 31.549 (CH), 31.858 ( $\text{CH}_2$ ), 43.835 ( $\text{NCH}_2$ ), 48.712 ( $\text{NCH}_2$ ), 52.579 ( $\text{OCH}_3$ ), 56.695 (CHN), 59.157 (CHN), 124.999 (=CH), 128.911 (=CH), 144.349 (=CH), 145.616 (=CH). HRMS: ber. für  $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}_2$  510.1944, gef. 510.1956. Die erhaltenen Daten stimmen mit den Daten für die in Lösung hergestellten Verbindungen überein.

Eingegangen am 24. März 1995 [Z 7826]

**Stichworte:** Festphasensynthesen · Kombinatorische Chemie · Peptide · Sulfonamide

- [1] Kürzlich erschienene Übersichtsartikel: M. A. Gallop, R. W. Barrett, W. J. Doerfer, S. P. A. Fodor, E. M. Gordon, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1233–1251; *ibid.* **1994**, *37*, 1385–1401.
- [2] A. Giannis, T. Kolter, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1303–1326; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1244–1267; J. Gante, *ibid.* **1994**, *106*, 1780–1802 bzw. **1994**, *33*, 1699–1720.
- [3] K. Teraishi, M. Saito, I. Fujii, H. Nakamura, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 7153–7156; D. Maffre-Lafon, R. Escale, P. Dumy, J.-P. Vidal, J.-P. Girard, *ibid.* **1994**, *35*, 4097–4098; J.-M. Campagne, J. Coste, P. Jonin, *ibid.* **1995**, *36*, 2079–2082; A. Mucha, P. Kafarski, F. Plenat, H.-J. Christau, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 12743–12754; W. P. Malachowski, J. K. Coward, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7616–7624; *ibid.* **1994**, *59*, 7625–7634; H.-J. Musiol, F. Grams, S. Rudolph-Bohner, L. Moroder, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6144–6146, zit. Lit.
- [4] R. M. J. Liskamp, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 661–664; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 633–636; W. J. Moree, L. C. van Gent, G. A. van der Marel, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 1133–1150; W. J. Moree, G. A. van der Marel, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6389–6392.
- [5] C. Gennari, B. Salom, D. Potenza, A. Williams, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2181–2183; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2067–2069.
- [6] C. Gennari, H. P. Nestler, B. Salom, W. C. Still, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1894–1896; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, Nr. 16.
- [7] M. H. J. Ohlmeyer, R. N. Swanson, L. W. Dillard, J. C. Reader, G. Asouline, R. Kobayashi, M. Wigler, W. C. Still, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10922–10926; b) H. P. Nestler, P. A. Bartlett, W. C. Still, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4723–4724.
- [8] E. Bayer, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 117–133; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 113–124. PEG-Harz (Tentagel S-OH) wurde von Rapp Polymere, Ernst-Simon-Str. 9, D-72072 Tübingen, (Bestellnummer S 30900) bezogen, Hydroxymethylpolystyrolharz erhielten wir von Bachem California, 3132 Kashia Street, Torrance, CA 90505 (USA) (Bestellnummer RM135).
- [9] vsAA = vinylogous Sulfonaminoacids. Definierte vinylogous Aminosäuren sind durch den vs-Präfix und den Dreibuchstabencode der entsprechenden Aminosäure gekennzeichnet, z.B. vsAla = vinylogous Sulfonamylalanyl. Die Sulfonylchloride Boc-vsAA-Cl **2a–e** wurden wie in [5] dargestellt und vor ihrer Verwendung zur Festphasenkupplung durch zusätzliche Flash-Chromatographie an Silicagel (Hexan/EtOAc 1 + 1) gereinigt.
- [10] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595–598; V. K. Sarin, S. B. H. Kent, J. P. Tam, R. B. Merrifield, *ibid.* **1981**, *117*, 147–157.
- [11] V. Krchňák, J. Vágner, P. Sáfrá, M. Lebl, *Collect. Czech. Chem. Comm.* **1988**, *53*, 2542–2548.