

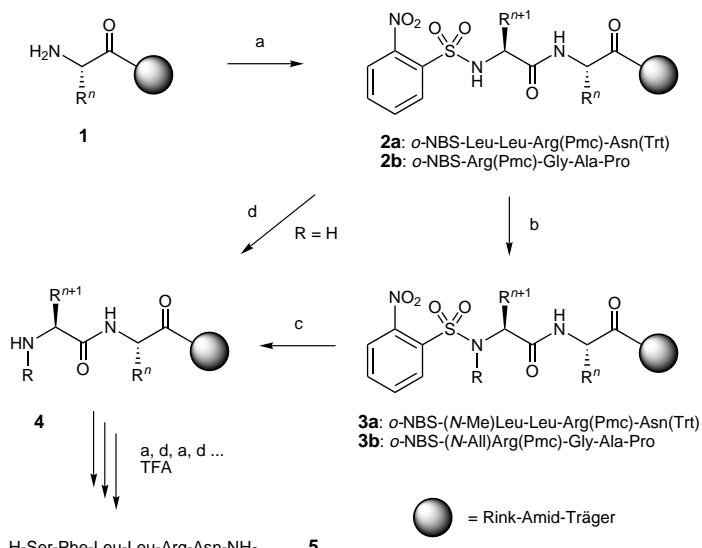
Neue Schutzgruppenstrategien zur Festphasensynthese und Modifizierung von Peptiden, Oligonucleotiden und Oligosacchariden

Oliver Seitz*

Merrifield's bahnbrechende Idee der Festphasenpeptidsynthese^[1] revolutionierte die biologische und medizinische Chemie. In kürzester Zeit erreichte die Festphasensynthese von Peptiden und Oligonucleotiden einen Reifegrad, der die Automatisierung des repetitiven Prozesses ermöglichte und damit auch dem Nichtchemiker den Aufbau dieser komplexen Biopolymere erschloß. Erstmals konnten detaillierte Untersuchungen der Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Peptiden und Oligonucleotiden durchgeführt werden. Die Vorstellung, Oligomere einer beliebigen Sequenz auf Knopfdruck synthetisieren zu können, verführte viele zur Annahme, daß alle Probleme dieser Chemie gelöst und Neuentwicklungen überflüssig seien. Der in der Pharmaforschung zunehmende Druck, in immer kürzerer Zeit immer mehr Wirkstoffe finden zu müssen, bescherte der Festphasensynthese in Form der kombinatorischen Chemie frischen Wind. Dies wirkt auch auf die Peptid- und Oligonucleotidchemie zurück und verstärkt Anstrengungen, die Synthese der hochkomplexen Oligosaccharide an fester Phase zu erschließen. Im folgenden werden neue Strategien zur Festphasensynthese dieser drei Biopolymerklassen vorgestellt. Besondere Aufmerksamkeit gilt dabei Verfahren, die durch Verwendung aktivierender Schutzgruppen die Orthogonalität und Diversität erhöhen können.

Miller et al. nutzten die acidifizierende Wirkung der *ortho*-Nitrobenzolsulfonyl(*o*-NBS)-Gruppe zur Aktivierung und selektiven N-Alkylierung von Amiden.^[2] Durch den Einbau N-alkylierter Aminosäuren wird vor allem die bioaktive Konformation eines Peptids ermittelt. Um solche N-Alkylierungen an fester Phase durchführen zu können, wurden N-*o*-NBS-geschützte Aminosäuren an die freie Aminogruppe eines Peptids **1** gekuppelt (Schema 1).^[3] Die erhaltenen N-*o*-NBS-Peptidderivate **2** wurden anschließend selektiv an der aciden Sulfonamidgruppe alkaliert. So reagierte das polymergebundene Tetrapeptid **2a** mit 4-Nitrobenzolsulfonsäuremethylester und der Base 7-Methyl-1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]-dec-5-en (MTBD) quantitativ zu **3a**. Die Pd⁰-katalysierte N-Alkylierung von **2b** gelang unter Verwendung von Allylmethylethercarbonat mit 98 % Ausbeute. Zur Abspaltung der *o*-NBS-Gruppe wurden die tertiären Sulfonamide **3** mit Sulfanyl-ethanol und 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) behandelt. Unter diesen Bedingungen blieben nichtalkylierte sekundäre Sulfonamide intakt.

Der *o*-NBS-Rest ließ sich auch als allgemeine temporäre Schutzgruppe in der Festphasensynthese nichtalkylierter Peptide verwenden. Im Abspaltungsschritt durch zehnminütiges Behandeln von **2** mit 0.5 M Kaliumthiophenolat in DMF wird neben der Aminogruppe von **4** ein gelber Chromophor



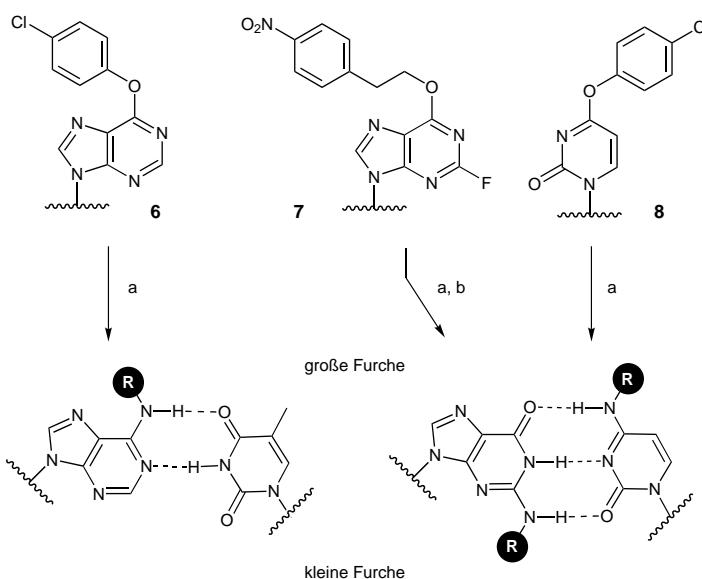
Schema 1. a) 4 Äquiv. *o*-NBS-NH(CHRⁿ⁺¹)COOH, 3.8 Äquiv. HBTU, NMM, DMF, 20 min; b) R = Me: 4 Äquiv. *p*-O₂N_C₆H₄SO₃Me, 3 Äquiv. MTBD, DMA, 30 min; R = All: 15 Äquiv. AlloCOOMe, 10 Mol-% [Pd₂(dba)₃], CHCl₃, 80 Mol-% PPh₃, THF, 2 h; c) 10 Äquiv. HO(CH₂)₂SH, 5 Äquiv. DBU, DMF, 30 min; d) 0.5 M PhSH, 2 Äquiv. K₂CO₃, je PhSH, DMF, 10 min. – All = Allyl, dba = Dibenzylidenacetone, DBU = 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en, DMA = *N,N*-Dimethylacetamid, HBTU = 2-(1-H)-Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat, MTBD = 7-Methyl-1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-en, *o*-NBS = *ortho*-Nitrobenzolsulfonyl, NMM = *N*-Methylmorpholin, Pmc = 2,2,5,7,8-Penta-methylchroman-6-sulfonyl, TFA = Trifluoressigsäure, Trt = Trityl.

freigesetzt, so daß der Reaktionsverlauf photometrisch verfolgt werden kann. Am Beispiel der Synthese des Thrombinrezeptoragonisten **5** wurden die *o*-NBS- und die Fmoc-Strategie^[4] verglichen (Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl): Nach chromatographischer Reinigung (HPLC) der in 85 % (*o*-NBS) und 91 % Reinheit (Fmoc) anfallenden Rohprodukte wurde **5** in 50 % bzw. 62 % Gesamtausbeute erhalten.

Schutzgruppen, die nach einer Festphasensynthese die Einführung zusätzlicher funktioneller Gruppen ermöglichen, sind für die Herstellung von medizinisch wertvollen DNA- und RNA-Konjugaten besonders interessant. Nucleinsäuren haben im Unterschied zu Proteinen nur wenige funktionelle Gruppen, die ohne gleichzeitige Beeinträchtigung der biologischen Funktion zur Konjugation von Reportergruppen oder Quervernetzern genutzt werden können. Verdine und MacMillan berichteten 1990 über eine Methode, mit der Uridinderivate in Oligonucleotide eingebaut und nachträglich modifiziert werden.^[5] Dieses Verfahren wurde kürzlich auf die Synthese funktionalisierter Oligoribonucleotide angewendet:^[6] Das Inosin **6** und das Uridin **8** enthalten an O-6 bzw. O-4 para-Chlorphenylgruppen, die unter Bildung der Adenosin- bzw. Cytidinderivate durch ein primäres Amin (RNH₂) substituiert werden können (Schema 2). Auf diese Weise

[*] Dr. O. Seitz

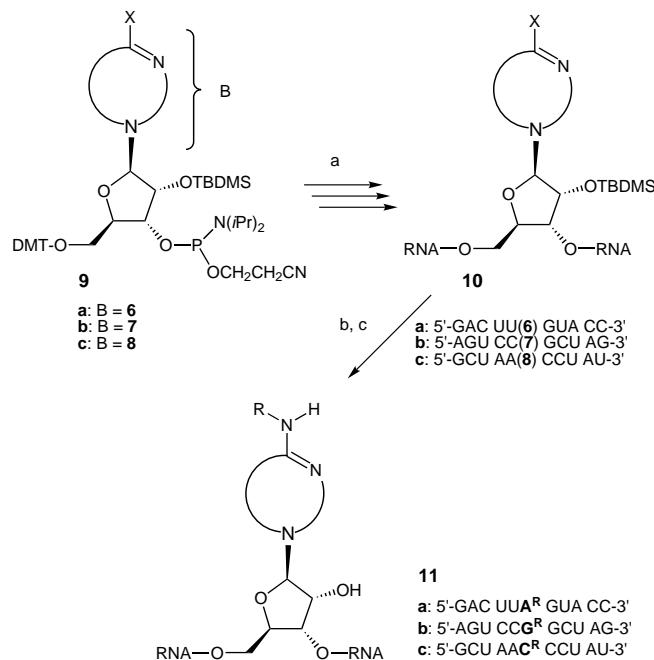
Institut für Organische Chemie der Universität
Richard-Willstätter-Allee 2, D-76128 Karlsruhe
Fax: (+49) 721-608-4825
E-mail: seitz@ochhades.chemie.uni-karlsruhe.de



Schema 2. Anordnung der Reste R im Duplex nach Reaktion der modifizierbaren Nucleoside **6**, **7** und **8** mit primären Alkylaminen.
a) RNH_2 , MeOH ; b) $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$.

gelangt der Rest R in die große Furche eines Nucleinsäure-duplex. Aus dem 2-Fluorinosin **7** entsteht durch Substitution des Fluorids und Abspaltung der Nitrophenylethyl(NPE)-Schutzgruppe ein Guanosinderivat. In diesem Fall wird R in der kleinen Furche des Duplex angeordnet.

Nach einer geringfügig modifizierten Vorschrift für RNA-Synthesen wurden die RNA-Oligomere **10a–c** durch Einbau der Phosphoramidite **9a–c** in die entsprechenden Positionen hergestellt (Schema 3). Die Funktionalisierung der partiell geschützten Oligomere **10a–c** erfolgte durch Reaktion mit



Schema 3. Konvergente Modifizierung von RNA. a) RNA-Festphasensynthese nach dem Phosphoamiditverfahren; b) 2 M RNH_2 in MeOH ($\text{R} = \text{Me}: 8\text{ M } \text{CH}_3\text{NH}_2$ in MeOH); c) **10a–c** → **11a–c**: 1 M $n\text{Bu}_4\text{NF}$ in THF ; d) **10b** → **11b**: $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$. – DMT = 4,4'-Dimethoxytrityl, TBDSM = *tert*-Butyldimethylsilyl.

den in Tabelle 1 aufgeführten Aminen. Die anschließende Umsetzung mit Tetra-*n*-butylammoniumfluorid (TBAF) oder $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$ entfernte die NPE- und *tert*-Butyldimethylsilyl(TBDMS)-Schutzgruppen. Zur Ermittlung der relativen

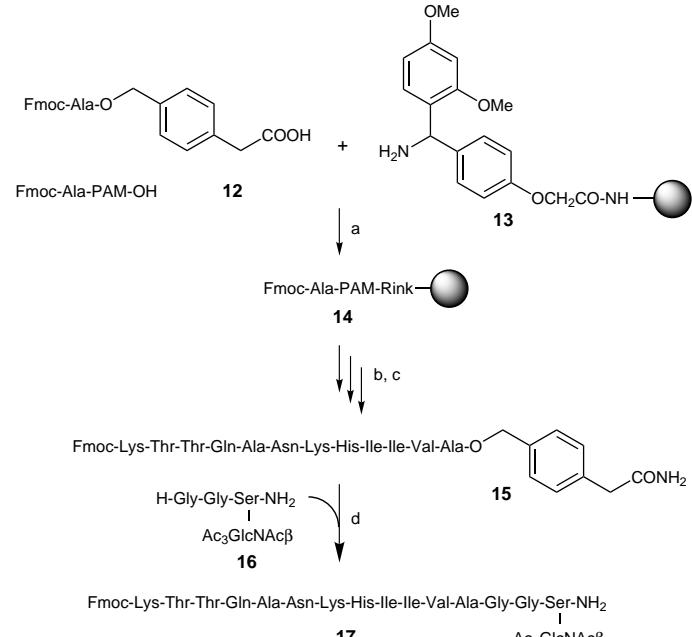
Tabelle 1. Relative Ausbeuten der Substitutionen von **10a–c** mit RNH_2 zu **11a–c** (Schema 3).

R	a ^[a]	b ^[b]	c ^[b]
H	0.24	1.0	1.0
CH_3	1.0	0.85	1.0
$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$	1.0	0.9	0.96
$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4$	1.04	0.88	1.0
HOCH_2CH_2	1.1	1.0	1.04
PhCH_2	0.67	0.65	0.79

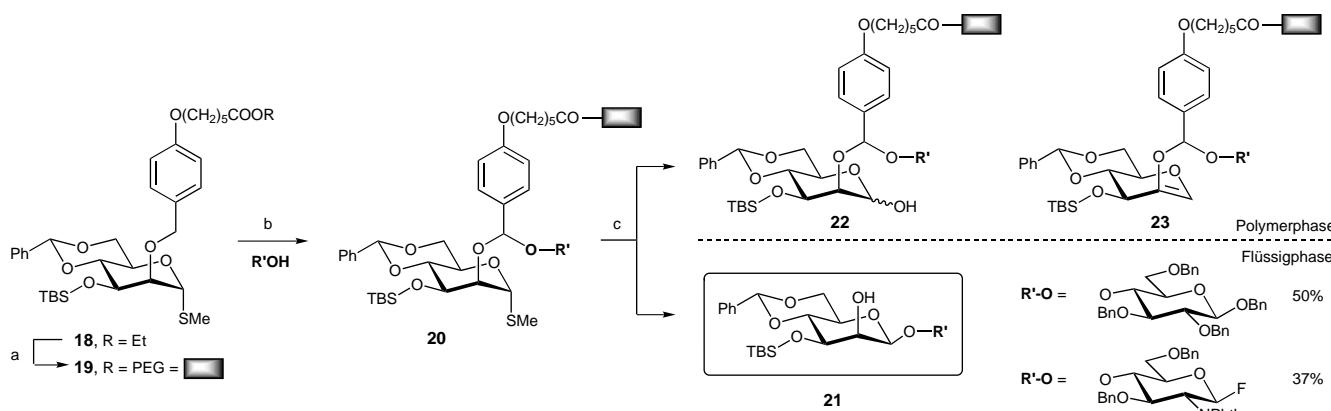
[a] Bezogen auf die Reaktion mit Methylamin. [b] Bezogen auf die Reaktion mit Ammoniak.

Ausbeuten wurden die Reaktionsprodukte **11a–c** durch denaturierende Polyacrylamid-Gelektrophorese (PAGE) gereinigt, enzymatisch hydrolysiert und durch HPLC auf ihren Nucleosidgehalt untersucht. Mit Ausnahme der Reaktionen mit Benzylamin und der Umsetzung von **10a** mit Ammoniak verliefen die Substitutionen nahezu quantitativ.

Über die nachträgliche Aktivierung eines an fester Phase hergestellten Peptidesters berichteten Wong et al.^[7] Zur Synthese einer Partialsequenz aus der C-terminalen Region der Ribonuclease B wurde das Konjugat **12** aus N-Fmoc-geschütztem Alanin und dem säure- und basenstabilen PAM-Linker an den Rink-Amid-Träger **13** gebunden (PAM = Phenylacetamidomethyl; Schema 4). Die Verlängerung von



Schema 4. a) 1. HBTU, HOEt, NMM, DMF; 2. Ac_2O , Pyr; b) 1. 20 % Piperidin/DMF; 2. Fmoc-AS-OH, HBTU, HOEt, NMM, DMF; 3. Ac_2O , Pyr; c) TFA/ $\text{Et}_3\text{SiH}/\text{H}_2\text{O}$ (95/2.5/2.5), 89 %; d) DMF/50 mm Triethanolamin (9/1), Subtilisin 8397 K 256 Y, 84 %. – $\text{Ac}_3\text{GlcNAc} = 2$ -Acetamido-3,4,6-tri- O -acetyl-2-desoxyglucose, AS = Aminosäure, HBTU = 2-(1-*H*)-Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat, HOEt = 1-Hydroxybenzotriazol, Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, NMM = *N*-Methylmorpholin, TFA = Trifluoressigsäure.



Schema 5. a) 1. NaOH, *t*BuOH; 2. PEG-Monomethylether, $\text{EtO}_2\text{CN}=\text{NCO}_2\text{Et}$, PPh_3 , CH_2Cl_2 , THF, 80%; b) DDQ, Molekularsieb (4 Å), CH_2Cl_2 , 3 h; c) MeOTf , MeSSMe , 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylpyridin, $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, Molekularsieb (4 Å), 21–120 h. – Bn = Benzyl, DDQ = 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-1,4-benzochinon, PEG = Polyethyleneglycol, Phth = Phthaloyl, TBS = *tert*-Butyldiphenylsilyl, Tf = Trifluormethansulfonyl.

14 erfolgte nach einem Standardverfahren für Fmoc-ge schützte Derivate. Bei der üblichen Abspaltung mit Trifluoressigsäure wurden nicht nur die säurelabilen Schutzgruppen der Seitenketten entfernt, sondern auch der N-Fmoc-ge schützte Peptid-PAM-Ester **15** vom Träger abgelöst. Durch die Verwendung eines Benzhydrylamin-Linkers wurde das Peptid-PAM-Konjugat **15** als PAM-Amid freigesetzt. Diese an den Seitenketten ungeschützten Ester können in enzym katalysierten Peptidkupplungen als Acyldonoren dienen. So wurde **15** in einer durch die Protease Subtilisin katalysierten Fragmentkondensation an das N-terminal ungeschützte Glycotripeptid **16** gekuppelt, wobei das Glycopentadecapeptid **17** in 84 % Ausbeute entstand. Diese Strategie eröffnet einen Zugang zu säure- und basenstabilen Peptidestern. Sie können durch Subtilisin in aktivierte Ester umgewandelt und – als Alternative zu chemischen Verfahren – in enzymatischen Segmentkondensationen eingesetzt werden.^[8]

Daß polymergebundene Schutzgruppen sogar der gezielten Heranführung eines Reaktionspartners dienen können, zeigten Ito und Ogawa am Beispiel einer polymergestützten β -Mannosidsynthese.^[9] Die thermodynamisch benachteiligte β -Mannosidbindung in **21** (Schema 5) ist wegen der stereoelektronisch ungünstigen 1,2-*cis*-Stellung schwierig herzustellen. Nach einer 1991 von Barresi und Hindsgaul vorgestellten Strategie kann die axiale 2-OH-Gruppe genutzt werden, um das Aglycon bei der Glycosylierung von der β -Seite heranzuführen.^[10] Dazu schützten Ito und Ogawa die 2-OH-Gruppe als *para*-Alkoxybenzylether. Die Carboxygruppe des geschützten Methylsulfanylmannosids **18** ermöglichte im nach folgenden Schritt die Verknüpfung mit dem polymeren Träger. Das polymergebundene Mannosid **19** bildet bei der Oxidation mit Dichlordicyanbenzochinon (DDQ) in Gegenwart eines Alkohols das Acetal **20**. Dieses reagiert nach Aktivierung des Thioglycosids mit Methyltriflat unter intramolekularer Transacetalisierung zum β -Mannosid **21**. Besonders bemerkenswert ist, daß nur die Produkte der gewünschten Glycosylierung vom polymeren Träger freigesetzt wurden.

Nebenprodukte, wie das Hydrolyseprodukt **22** oder das Eliminierungsprodukt **23**, verblieben an der festen Phase.

Dieses Beispiel illustriert, daß Schutzgruppen in der Festphasensynthese mehr leisten können als die durchaus wichtige temporäre Blockierung einer funktionellen Gruppe. Durch die Aktivierung bestimmter Positionen können Schutzgruppen wie die *o*-NBS-, die PAM-Amid- und die Chlorphenylgruppe selektive Folgereaktionen ermöglichen, deren Produkte nach anderen Methoden nur mit größerem Zeitaufwand herzustellen wären. Am Beispiel der polymer gestützten β -Mannosidsynthese wurde gezeigt, daß eine aktivierbare Schutzgruppe bei geeigneter Orientierung sogar stereoselektive Umsetzungen initiieren kann. Diese Methode weist auf eine Entwicklung hin, die in Zukunft sicherlich an Bedeutung gewinnen wird: Dem polymeren Träger kann die Rolle eines molekularen Pförtners zukommen, der im letzten Schritt der Synthese nur die gewünschten Produkte entläßt und so nicht nur die Synthese, sondern auch die mitunter zeitaufwendige Reinigung der Produkte vereinfacht.

Stichwörter: Festphasensynthesen • Kohlenhydrate • Nucleinsäuren • Peptide • Schutzgruppen

- [1] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- [2] S. C. Miller, T. S. Scanlan, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2301.
- [3] S. C. Miller, T. S. Scanlan, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2690.
- [4] E. Atherton, R. C. Sheppard, *Solid-Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, IRL, Oxford, Großbritannien, 1989.
- [5] A. M. MacMillan, G. L. Verdine, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5931.
- [6] C. R. Allerson, S. L. Chen, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7423.
- [7] K. Witte, O. Seitz, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1979.
- [8] Festphasensynthese von basenlabileren Peptid-Glycolimidestern und deren Verwendung in enzymatischen Segmentkondensationen: D. Y. Jackson, J. Burnier, C. Quan, M. Stanley, J. Tom, J. A. Wells, *Science* **1994**, *266*, 243.
- [9] Y. Ito, T. Ogawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5562.
- [10] F. Barresi, O. Hindsgaul, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9376.