

- [17] V. P. W. Böhm, T. Weskamp, C. W. K. Gstöttmayr, W. A. Herrmann, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1672–1674; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1602–1604.
- [18] Hinweise darauf, dass 12-Elektronenspezies für die Aktivität nullwertiger Metallkatalysatoren der Gruppe 10 mit sterisch anspruchsvollen Liganden verantwortlich sind, wurden auch bei Untersuchungen am System Pd⁰/P(*o*-Tol)₃ erhalten: J. F. Hartwig, F. Paul, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5373–5374.
- [19] F. Terrier, *Nucleophilic Aromatic Displacement*, VCH, Weinheim, **1991**.
- [20] R. W. Hoffmann, *Dehydrobenzene and Cycloalkynes*, Academic Press, New York, **1967**.
- [21] G. Smith, J. K. Kochi, *J. Organomet. Chem.* **1980**, *198*, 199–214.
- [22] C. Hansch, A. Leo, *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*, Wiley, New York, **1979**.
- [23] Die relativen Geschwindigkeitskonstanten wurden aus den Produktverhältnissen von Konkurrenzreaktionen ermittelt.

Fmoc-kompatible Festphasensynthese von langen, C-terminalen Peptidthioestern**

Axel Sewing und Donald Hilvert*

C-terminale Peptidthioester sind wertvolle Intermediate für die chemische Synthese von Proteinen durch Peptidfragmentkondensation,^[1] von cyclischen Peptiden^[2] sowie von Peptiddendrimeren.^[3] Üblicherweise werden sie durch Festphasensynthese^[4] oder bei längeren Segmenten biosynthetisch nach der Intein-Methode^[5] hergestellt.

Bis vor kurzem war die Festphasensynthese von C-terminalen Peptidthioestern im Wesentlichen auf die *tert*-Butoxycarbonyl(Boc)-Methode^[4] beschränkt, da Peptidthioester nicht mit den basischen Bedingungen kompatibel sind, die zur Abspaltung der 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Schutzgruppe nötig sind.^[6] Mittlerweile sind einige Fmoc-kompatible Verfahren zur Peptidthioesterherstellung bekannt, darunter eines, das neue Abspaltungsreagentien verwendet,^[7] eines, bei dem das Peptidrückgrat über einen Amidlinker an das Harz gekoppelt wird (backbone amide linker),^[8] und eines, bei dem ein aktivierbarer Sulfonamidlinker verwendet wird.^[9, 10] Jeder dieser Ansätze hat Vor- und Nachteile, sie erfordern aber alle spezielle Linker, Harze und/oder beinhalten komplizierte Verfahren.

Wir haben kürzlich eine alternative Fmoc-kompatible Strategie vorgestellt, bei der der Peptidthioester in einer

einstufigen Reaktion mit AlMe₂Cl und EtSH im Überschuss in Dichlormethan in guter Ausbeute und Reinheit von Standardharzen abgespalten wird.^[11] Dennoch gab es einige Einschränkungen hinsichtlich der Epimerisierung der C-terminalen Aminosäure, und unerwünschte Nebenreaktionen an Aminosäureseitenketten, insbesondere die Bildung von Seitenkettenthioestern und die Cyclisierung zum Asparagimid, wurden festgestellt. Hier stellen wir wesentliche Verbesserungen des ursprünglichen Verfahrens vor, die die Anwendung der Methode auch auf lange und komplexe Peptide ermöglichen.

Die Synthese des Pentapeptidthioethylesters LYRAG-SET wurde als Modellreaktion für die Optimierung des Verfahrens verwendet und der Einfluss des Harzes (4-Hydroxymethylphenylacetamidomethyl-Polystyrol (PAM)-, Wang- und 4-Hydroxymethylbenzoesäure(HMBA)-Harz)^[6, 12] sowie der der Lewis-Säure auf Ausbeute, Nebenreaktionen und Epimerisierung untersucht. In unserer früheren Publikation^[11] haben wir berichtet, dass LYRAG vom PAM-Harz mit AlMe₂Cl/EtSH als LYRAG-SET in 60 % Ausbeute abgespalten werden konnte. Mit verbesserten Arbeitsweisen und genaueren Methoden zur Bestimmung der Harz-Beladung^[6] konnte die Ausbeute auf bis zu 87 % erhöht werden (Tabelle 1). Mit dem HMBA-Harz lassen sich ähnliche Ergebnisse erzielen (84 %

Tabelle 1. Ausbeuten ausgewählter C-terminaler Peptidthioester.

| Peptid | Harz/ Ester | Reagens ^[a] | Thioester [%] | Säure [%] | Bisthioester ^[b] [%] | Asparagimid ^[c] [%] |
|--------|----------------|------------------------|------------------|---------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| LYRAG | PAM | A | 87 | 5 | – | – |
| LYRAG | PAM | B | 85 | 6 | – | – |
| LYRAG | HMBA | A | 84 | 5 | – | – |
| LYRAG | OMe | C | 67 | 17 | – | – |
| IFKDG | PAM | A | 22 | n.b. ^[d] | 13 | 25 |
| IFKDG | PAM | D | 43 | n.b. ^[d] | 15 | 6 |
| IFKDG | PAM | B | 62 | n.b. ^[d] | 6 | 3 |

[a] Reagens A: 0.2 M AlMe₂Cl, 0.6 M EtSH in CH₂Cl₂; Reagens B: 0.2 M AlMe₃, 0.6 M EtSH in CH₂Cl₂; Reagens C: 0.02 M (2 Äquiv.) AlMe₂Cl, 0.06 M (6 Äquiv.) EtSH in CH₂Cl₂; Reagens D: 0.2 M AlMe₂Cl, 0.6 M EtSH, 0.2 M THF in CH₂Cl₂. [b] Bisthioester IFKD(SET)G-SET. [c] Asparagimid-Thioester IFKD(imid)G-SET. [d] n.b.: nicht bestimmt.

isolierter Peptidthioester); mit dem reaktiveren Wang-Harz wurde der Thioester dagegen in niedrigeren Ausbeuten und ein größerer Anteil an freier, C-terminaler Säure erhalten. Da mit Boc-Aminosäuren bereits beladene PAM-Harze kommerziell erhältlich sind, wurden sie bevorzugt verwendet. Das HMBA-Harz bietet aber zusätzlich die Möglichkeit, das geschützte Peptid mit Triethylamin in Methanol als C-terminalen Methylester abzuspalten,^[6] der dann mit deutlich geringerem Überschuss an Alkylaluminiumreagens in den Thioester überführt werden kann als bei der direkten Abspaltung vom Harz. Diese zweistufige Vorgehensweise hat allerdings keinen Vorteil bezüglich Ausbeute und Reinheit des Peptidthioesters, wie es von früheren Versuchen mit geschützten Aminosäuren in Lösung hätte erwartet werden können.^[11]

Mit dem Ersatz von AlMe₂Cl durch das weniger saure AlMe₃ wurde die Bildung von Asparagimiden und Asparaginsäureseitenkettenthioestern weitgehend unterdrückt (Ta-

[*] Prof. D. Hilvert, A. Sewing
Laboratorium für Organische Chemie
Eidgenössische Technische Hochschule Zürich
Universitätsstraße 16, 8092 Zürich (Schweiz)
Fax: (+41) 1-632-1486
E-mail: hilvert@org.chem.ethz.ch

[**] Diese Arbeit wurde von der ETH Zürich und der Novartis Pharma AG unterstützt. Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

belle 1). So konnte die Abspaltung von IFKDG-PAM mit $\text{AlMe}_2\text{Cl}/\text{EtSH}$, die lediglich 22 % IFKDG-SEt, dafür aber 13 % IFKD(SEt)G-SEt-Bisthioester und durch Cyclisierung der Asparaginsäureseitenkette 25 % Asparagimid-Thioester IFKD(imid)G-SEt gab, durch Verwendung von $\text{AlMe}_3/\text{EtSH}$ deutlich verbessert werden: 62 % Thioester, 6 % Bisthioester und nur 3 % Asparagimid-Thioester. Die Bildung von Asparagimiden konnte zwar auch durch Zugabe von stöchiometrischen Mengen Tetrahydrofuran (THF) zum AlMe_2Cl -Reagens verringert werden, jedoch hatte dieses keinen Einfluss auf die Bisthioesterbildung. Die Zugabe von THF zu AlMe_3 führte dagegen zu keiner Verbesserung.

Auch wenn AlMe_3 mit Peptiden komplexer Zusammensetzung kompatibel ist, so haben frühere Studien^[11] an einzelnen Aminosäuren ergeben, dass es die Epimerisierung der thioesterbildenden Aminosäure fördert. Untersuchungen an Tripeptiden ergaben, dass das Verhältnis der L,L,L,D-Diastereomere des Thioesters Ac-Gly-Ala-Phe-SEt sich von 9:1 auf 3.5:1 erniedrigte, wenn AlMe_3 statt AlMe_2Cl zur Abspaltung verwendet wurde. Diese Schwierigkeit wird umgangen, wenn eine Peptidabspaltung an einem C-terminalen Glycinrest gewählt werden kann.^[1, 9, 13, 14]

Die breite Anwendbarkeit dieser optimierten $\text{AlMe}_3/\text{EtSH}$ -Bedingungen wurde anhand der Synthese des 37 Aminosäuren langen, N-terminalen Fragments des Rinderpankreas-Trypsininhibitors (bovine pancreatic trypsin inhibitor, BPTI) illustriert (Abbildung 1). Dieses Fragment wurde

RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGICRAKRNNFKSAEDCMRTC GGA

Abbildung 1. Sequenz von BPTI mit markierter Lignationsstelle (I).

bereits mit der Boc-Methode hergestellt und zur Ligation nach der Methode der „native chemical ligation“^[14] zum vollständigen, 58 Aminosäuren langen Inhibitor verwendet.

Wir haben das BPTI^{1–37}-Fragment am PAM-Harz nach der üblichen Fmoc-Festphasensynthesemethode aufgebaut. Die optimierte Synthese erforderte zum einen drei Kupplungen an schwierigen Abschnitten^[15] und zum anderen deutlich verlängerte Kupplungs- und Entschützungszeiten. Nach der Synthese wurde das Peptid durch fünfstündige Umsetzung mit AlMe_3 und Thiol als Thioester abgespalten, und alle Seitenkettenschutzgruppen wurden anschließend mit einem Cocktail aus 89 % Trifluoressigsäure (TFA), 4 % Wasser, 2 % Phenol, 2 % Thioanisol, 2 % Ethanthiol (EtSH) und 0.8 % Triisopropylsilan (TIS) entfernt. Durch HPLC/MS-Analyse des Rohproduktes wurde der gewünschte BPTI^{1–37}-SEt-Thioester als Hauptprodukt identifiziert (Abbildung 2). Nebenprodukte waren der Asp³(SEt)-Bisthioester, ein *tert*-Butyladdukt des Thioesters sowie die beiden Acetyl-terminierten Fragmentthioester Ac-BPTI^{6–37}-SET und Ac-BPTI^{15–37}-SEt. Die geringe Löslichkeit des Hauptproduktes erschwerte die Reinigung. Nach zwei präparativen HPLC-

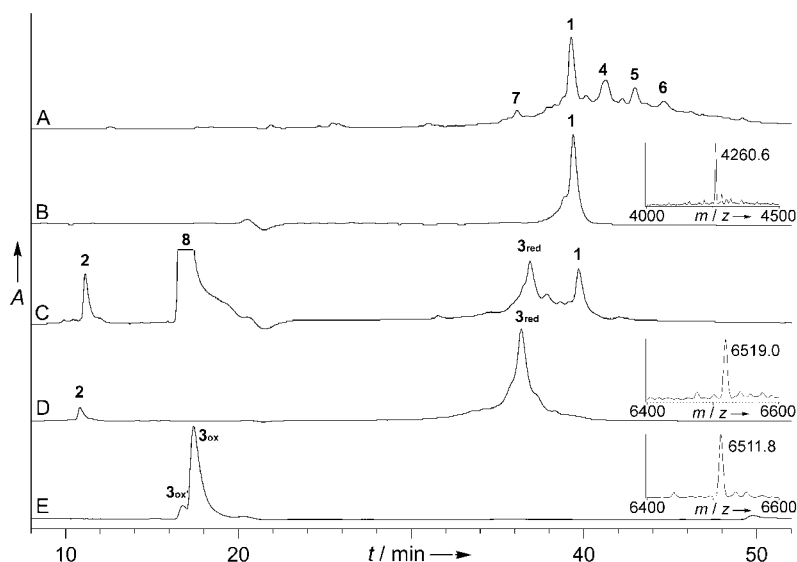


Abbildung 2. Verfolgung der Synthese von BPTI^{1–37}-SEt **1** und der Ligation mit BPTI^{38–58} **2** durch analytische HPLC. A) Rohprodukt; B) isoliertes, gereinigtes **1**; C) Ligation ($t = 8$ h) von **1** mit **2** zu BPTI^{1–58} **3_{red}**; D) Lignationsansatz ($t = 16$ h) nach Gelfiltration zur Abtrennung niedermolekularer Verbindungen; E) natives, oxidiertes BPTI^{1–58} **3_{ox}** nach Gelfiltration und HPLC-Reinigung. Einschübe: Massenspektren wichtiger Produkte, die angegebenen Massen wurden aus denen der mehrfach geladenen Ionen berechnet. Nebenprodukte und Reagentien: **3_{ox}** = oxidiertes BPTI^{1–58}, das Methioninsulfoxid enthält; **4** = BPTI^{1–37}-Bisthioester; **5** = *t*-Bu-Addukt von BPTI^{1–37}-SEt; **6** = Ac-BPTI^{15–37}-SEt; **7** = Ac-BPTI^{6–37}-SEt; **8** = Thiophenol.

Läufen auf einer C-8-Säule erhielt man dann jedoch das gewünschte Produkt in 8 % Gesamtausbeute (vgl. 15 % nach der Boc-Methode). Die Masse dieses Fragments wurde mittels Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) zu 4260.5 Da bestimmt, sie stimmt damit gut mit der berechneten Masse von 4261.0 Da überein.

Um zu zeigen, dass das synthetische BPTI^{1–37}-SEt-Fragment zu dem früher hergestellten identisch ist, wurde es nach Literaturvorschriften mit dem BPTI^{38–58}-Fragment zum reduzierten, denaturierten BPTI in 63 % Ausbeute kondensiert (Abbildung 2). Nach Oxidation und Faltung^[14, 15] wurde das synthetische BPTI durch Gelfiltration und HPLC gereinigt. Die experimentell bestimmten Massen von oxidiertem (6511.8 Da) und reduziertem BPTI (6519.0) stimmen gut mit den berechneten Massen überein (6512.5 bzw. 6518.5). Synthetisches und kommerzielles BPTI coeluierten auf einer analytischen C-8-HPLC-Säule und gaben identische Circular dichroismusspektren. Zudem inhibierte das synthetische Protein Trypsin stöchiometrisch^[16] und Chymotrypsin^[14, 17] mit $K_i = 1.3 \times 10^{-8} \text{ M}$ (Lit.:^[14] $1.2 \times 10^{-8} \text{ M}$).

Die Lewis-Säure-aktivierte Peptidabspaltung von kommerziell erhältlichen Harzen bildet einen einfachen und direkten Weg zu C-terminalen Peptidthioestern. Die Methode ist mit Standard-Fmoc-Verfahren kompatibel, die erforderlichen Reagentien und Harze sind kommerziell erhältlich, und die Schritte des Verfahrens sind in der Handhabung weder aufwändig noch anspruchsvoll. Bei Verwendung von AlMe_3 als Lewis-Säure werden Nebenreaktionen wie die Bildung von Asparagimiden und Seitenkettenthioestern deutlich verringert, allerdings kommt es zu einer partiellen Epimerisierung der C-terminalen Aminosäure. Berücksichtigt man die

Einfachheit dieser Methode, so sollte sie zur Herstellung einer Vielzahl von Peptidthioestern gut geeignet sein, die am C-Terminus Glycin enthalten, wie es in der Proteinsynthese oftmals der Fall ist.^[1, 9, 13, 14]

Eingegangen am 6. April 2001 [Z16912]

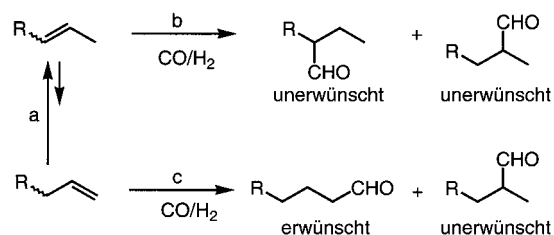
Hoch selektive Katalysatoren für die Hydroformylierung interner Olefine zu linearen Aldehyden**

Holger Klein, Ralf Jackstell, Klaus-Diether Wiese, Cornelia Borgmann und Matthias Beller*

Professor Manfred Michalik zum 60. Geburtstag gewidmet

- [1] Aktuelle Übersicht: P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923–960.
- [2] a) Y. Shao, W. Y. Lu, S. B. H. Kent, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3911–3914; b) J. A. Camarero, T. W. Muir, *Chem. Commun.* **1997**, 1369–1370.
- [3] a) J. Shao, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3893–3899; b) L. S. Zhang, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3311–3320.
- [4] S. Aimoto, *Biopolymers* **1999**, *51*, 247–265.
- [5] Aktuelle Übersicht: C. J. Noren, J. M. Wang, F. B. Perler, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 458–476; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 450–466.
- [6] *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Vol. 222 (Hrsg.: W. C. Chan, P. D. White), Oxford University Press, Oxford, **2000**.
- [7] X. Li, T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8669–8672.
- [8] a) J. Alsina, T. S. Yokum, F. Albericio, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8761–8769; b) K. J. Jensen, J. Alsina, M. F. Songster, J. Vagner, F. Albericio, G. Barany, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5441–5452; c) J. Alsina, T. S. Yokum, F. Albericio, G. Barany, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7277–7280.
- [9] Y. Shin, K. A. Winans, B. J. Backes, S. B. H. Kent, J. A. Ellman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11684–11689.
- [10] R. Ingenito, E. Bianchi, D. Fattori, A. Pessi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11369–11374.
- [11] D. Swinnen, D. Hilvert, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2439–2442.
- [12] B. A. Bunin, *The Combinatorial Index*, Academic Press, San Diego, **1998**, S. 9–76.
- [13] a) L. Z. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 526–533; b) A. Brik, E. Keinan, P. E. Dawson, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3829–3835; c) W. Y. Lu, M. Randal, A. Kossiakoff, S. B. H. Kent, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 419–427; d) G. J. Cotton, B. Ayers, R. Xu, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1100–1101; e) P. E. Dawson, M. J. Churchill, M. R. Ghadiri, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4325–4329; f) M. Baca, S. B. H. Kent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 11638–11642; g) H. Hojo, S. Aimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1992**, *65*, 3055–3063.
- [14] W. Y. Lu, M. A. Starovasnik, S. B. H. Kent, *FEBS Lett.* **1998**, *429*, 31–35.
- [15] M. Ferrer, C. Woodward, G. Barany, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *40*, 194–207.
- [16] B. Kassel, *Methods Enzymol.* **1970**, *19*, 844–852.
- [17] J. W. Williams, J. F. Morrison, *Methods Enzymol.* **1979**, *63*, 437–467.

Die rhodiumkatalysierte Hydroformylierung aliphatischer Olefine zu linearen Aldehyden ist heute mengenmäßig das wichtigste homogenkatalytische Verfahren.^[1] Mehr als 7 Mio. Tonnen verschiedener Aldehyde und Alkohole werden jährlich auf diese Weise hergestellt. Dabei ist die Hydroformylierung von Propen besonders wichtig für die Herstellung von *n*-Butyraldehyd, der eine wertvolle Ausgangsverbindung für 2-Ethylhexanol ist, dem momentan bedeutendsten Weichmacheralkohol. Derzeit gibt es ein steigendes Interesse an der Produktion alternativer Weichmacheralkohole aufgrund ökologischer Bedenken gegenüber den gegenwärtigen Produkten.^[2] Aus ökonomischer Sicht sind interne Olefine oder Gemische aus internen und terminalen Olefinen Ausgangsverbindungen der Wahl für neue Weichmacheralkohole, wobei wegen der besseren physikalischen Eigenschaften der resultierenden Weichmacher möglichst wenig verzweigte Alkohole erwünscht sind. Die selektive Hydroformylierung interner Olefine zu linearen Aldehyden ist jedoch sehr schwierig (Schema 1). Zur Herstellung linearer Aldehyde



Schema 1. Selektive Hydroformylierung interner Olefine zu linearen Aldehyden: a) Isomerisierung, b) Hydroformylierung eines internen Olefins, c) Hydroformylierung eines terminalen Olefins.

aus internen Olefinen muss der Katalysator eine schnelle Isomerisierung zwischen dem internen und dem terminalen Olefin vermitteln (Schema 1, Reaktion a). Leider enthält das Gemisch im thermodynamischen Gleichgewicht im Allgemeinen weniger als 5% des terminalen Olefins (aus diesem Grund sollte die Isomerisierung beim Einsatz terminaler Olefine vermieden werden). Außerdem muss die Hydrofor-

[*] Prof. Dr. M. Beller, Dipl.-Chem. H. Klein, Dr. R. Jackstell
Institut für Organische Katalyseforschung (IfOK)
an der Universität Rostock e.V.
Buchbinderstraße 5–6, 18055 Rostock (Deutschland)
Fax: (+49) 381-466-9324
E-mail: matthias.beller@ifok.uni-rostock.de
Dr. K.-D. Wiese, C. Borgmann
Oxeno Olefinchemie GmbH
Industriepark Marl, Marl (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Oxeno Olefinchemie GmbH und vom Land Mecklenburg-Vorpommern gefördert. Dr. C. Fischer und Frau S. Buchholz danken wir für ihre exzellente technische Unterstützung.