

## Mikroreaktoren

DOI: 10.1002/ange.200602167

Synthese von  $\beta$ -Peptiden im Mikroreaktor\*\*Oliver Flögel, Jeroen D. C. Codée, Dieter Seebach und  
Peter H. Seeberger\*

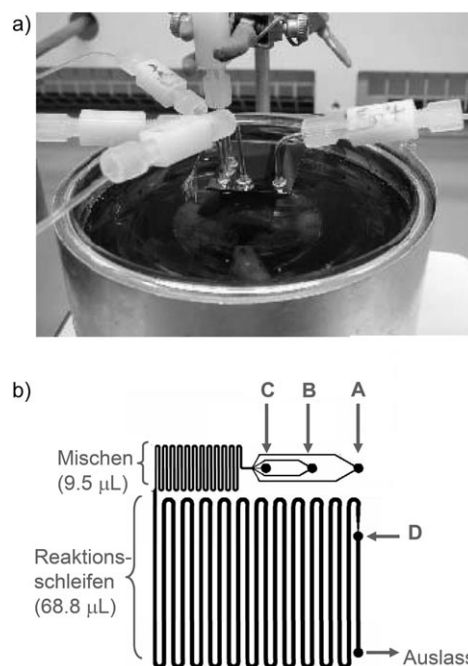
Oligomere von  $\beta$ -Aminosäuren, so genannte  $\beta$ -Peptide, stellen eine einzigartige Klasse von Peptiden dar. Da sie im Unterschied zu den natürlichen  $\alpha$ -Peptiden metabolisch stabil sind und schon bei einer geringen Anzahl von Aminosäurebausteinen Sekundärstrukturen wie Schleifen, Helices oder Faltblatt-Strukturen bilden können, haben sie beträchtliche Aufmerksamkeit auf sich gezogen.<sup>[1]</sup> Allerdings kann die Bildung der Sekundärstrukturen die Synthese der Oligomere erheblich erschweren.<sup>[2]</sup> Kurze bis mittellange  $\beta$ -Peptide werden in Lösung<sup>[1b]</sup> oder an fester Phase<sup>[1c]</sup> hergestellt, wohingegen längere Peptide auch durch chemische Ligation<sup>[1e]</sup> zugänglich sind. Darüber hinaus wurden  $\beta$ -Peptide erfolgreich durch mikrowellenunterstützte Peptidsynthese an fester Phase (SPPS) erhalten.<sup>[2a,3]</sup> Da  $\beta$ -Peptide auf Merrifield-Harz Sekundärstrukturen einnehmen, kann ihre Synthese fehlschlagen, insbesondere dann, wenn sich Haarnadelschleifen bilden können. In diesen Fällen ist es erforderlich, auf die Fragmentkupplung zurückzugreifen.<sup>[2b,c]</sup>

Mikroreaktoren haben als Alternative zu herkömmlichen Syntheseverfahren im Rundkolben große Aufmerksamkeit erfahren.<sup>[4]</sup> Die Entwicklung von Mikroreaktoren für die organische Synthese ist jedoch im Vergleich zu den verbreiteten Mikroreaktor-Analysesystemen nicht weit fortgeschritten. Zwar wurde eine Reihe von chemischen Umwandlungen in Mikroreaktoren durchgeführt, beim Großteil dieser Umsetzungen handelte es sich jedoch nur um Machbarkeitsstudien.<sup>[5]</sup>

Hier stellen wir die erste Anwendung eines Durchfluss-Mikrofluidreaktors aus Silicium zur Synthese von Peptiden

vor. Dabei gelingt im Mikroreaktor nicht nur ein schneller Test der Reaktionsbedingungen, sondern auch die Herstellung größerer Mengen des Peptids.<sup>[6]</sup> Darüber hinaus beschreiben wir hier die ersten Peptidkupplungen von Boc- und Fmoc-geschützten Aminosäuren binnen 1–5 min bei 120 °C, den Einsatz von  $\beta^2$ - und  $\beta^3$ -Homoaminosäurefluoriden zur Peptidkupplung und die vorteilhafte Anwendung einer  $C_{10}H_4F_{17}$ -substituierten Benzylester-Schutzgruppe für die Peptidsynthese in Lösung.<sup>[7–9]</sup>

Mikroreaktoren weisen zahlreiche Vorteile für die organische Synthese in Lösung auf: Es werden nur geringe Mengen der wertvollen Synthesebausteine benötigt, Parameter wie Reaktionszeit und Temperatur sind exakt einstellbar, und eine Vielzahl von Reaktionsbedingungen kann fortlaufend und zügig getestet werden. So kann der von uns verwendete Durchflussreaktor mit vielen verschiedenen Lösungsmitteln und in einem breiten Temperaturbereich (–80 °C bis +150 °C) eingesetzt werden (Abbildung 1).<sup>[10]</sup> Das Reaktionsvolumen des Mikroreaktors (78.3  $\mu$ L) eignet sich für Testreaktionen im Mikromolbereich und für die Herstellung von einigen Gramm der Zielverbindung pro Tag.



**Abbildung 1.** a) Aufbau des Mikroreaktors. b) Schema des Mikroreaktors mit den drei Eingängen – für Säurefluorid, A, Aminosäurebenzylester, B, und N-Methylmorpholin (NMM), C – Quench-Anschluss, D, für Trifluoressigsäure und den internen Standard sowie einem Auslass. Das Reaktorvolumen bis zum Punkt D beträgt 78.3  $\mu$ L.

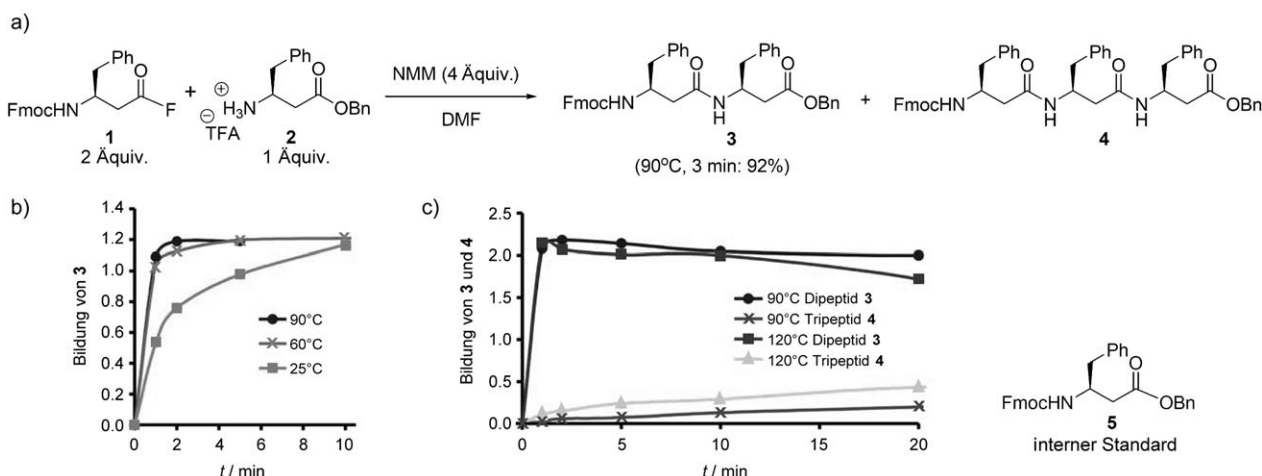
Zunächst untersuchten wir die Kupplung von Fmoc- $\beta^3$ -Homophenylalaninfluorid (Fmoc- $\beta^3$ hPheF, **1**) und H- $\beta^3$ hPhe-OBn (**2**) im Mikroreaktor (Schema 1a). Säurefluoride wurden als aktivierte Form der Aminosäuren aus folgenden Gründen gewählt: 1) Sie sind auf einfache Weise aus den Aminosäuren zugänglich, 2) sie sind besonders aktive Acylierungsmittel, und 3) bei ihrer Verwendung in Gegenwart tertiärer Amine fallen die löslichen Ammoniumfluoride als

[\*] Dr. O. Flögel,<sup>[+]</sup> Dr. J. D. C. Codée,<sup>[+]</sup> Prof. Dr. D. Seebach, Prof. Dr. P. H. Seeberger  
Laboratorium für Organische Chemie  
Eidgenössische Technische Hochschule  
Wolfgang-Pauli-Strasse 10, 8093 Zürich (Schweiz)  
Fax: (+41) 44-644-1235  
E-Mail: seeberger@org.chem.ethz.ch

[†] Beide Autoren haben gleichermaßen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

[\*\*] Wir danken der ETH Zürich, der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), dem Schweizerischen Nationalfonds, der Novartis Pharma AG Basel und der Niederländischen Organisation für Wissenschaftliche Forschung (NWO) für die finanzielle Unterstützung. Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. K. F. Jensen und E. R. Murphy (Department of Chemical Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge) für die Bereitstellung des in dieser Arbeit verwendeten Mikroreaktors.

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

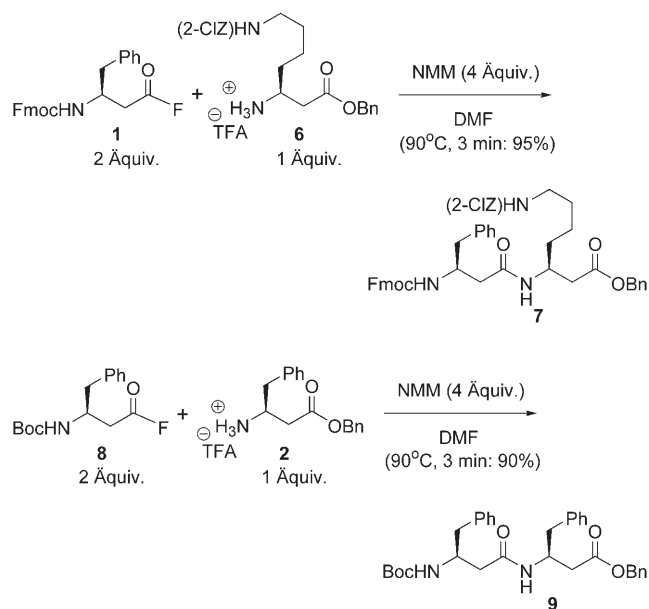


**Schema 1.** a) Herstellung des Dipeptids **3** im Mikroreaktor. b) LCMS-Analyse der Bildung von **3** in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur. c) LCMS-Analyse der Bildung von **3** und **4** bei höheren Temperaturen und nach längeren Reaktionszeiten. Bn = Benzyl, Fmoc = 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl, TFA<sup>−</sup> = Trifluoracetat.

Beiprodukte an.<sup>[11]</sup> Die Reaktion in Schema 1a wurde bei verschiedenen Temperaturen (25°C, 60°C, 90°C) und mit verschiedenen Reaktionszeiten (1, 2, 5 und 10 min) unter Verwendung von Fmoc-β<sup>3</sup>hPhe-OBn (**5**) als internem Standard für die LCMS-Analyse untersucht. Ein Vergleich des Umsatzes bei verschiedenen Temperaturen zeigte, dass die maximale Ausbeute bei 90°C nach 3 Minuten erreicht war (Schema 1b). Interessanterweise nahm die Menge an Dipeptid ab, wenn die Kupplung von **1** und **2** bei höheren Temperaturen und/oder über längere Zeit durchgeführt wurde.<sup>[12]</sup> Dies konnte durch einen zweiten Ansatz verdeutlicht werden (Schema 1c). Dabei wurde durch Fmoc-Abspaltung – nicht überraschend unter diesen Bedingungen – und nachfolgende Peptidkupplung mit einem Überschuss an Säurefluorid das Tripeptid **4** gebildet.<sup>[13]</sup> Nach dem Abschluss des Optimierungsprozesses wurde das Dipeptid **3** im 0.5-mmol-Maßstab hergestellt (3 min bei 90°C, 92% Ausbeute nach Säulenchromatographie). Identische Bedingungen wurden für die Synthese der β<sup>3</sup>-Dipeptide **7** (0.5-mmol-Maßstab) und **9** (0.3 mmol) verwendet (Schema 2).

Nachdem gezeigt war, dass sich unser Mikroreaktor für die Herstellung von β<sup>3</sup>-Dipeptiden eignet, untersuchten wir die Synthese des Tetrapeptids **17** unter Verwendung der Boc-Strategie (Schema 3). Das Tetrapeptid enthält alle möglichen β-Peptidbindungen – (β<sup>3</sup>-β<sup>3</sup>), (β<sup>3</sup>-β<sup>2</sup>) und (β<sup>2</sup>-β<sup>3</sup>) – sowie das schleifeninduzierende Element β<sup>3</sup>h(R)Ala-β<sup>2</sup>h(R)Val.<sup>[1f,2b]</sup> Ferner ist die erste Aminosäure durch eine fluorierte Benzylgruppe geschützt, um eine einfachere Aufreinigung durch Fluorfestphasenextraktion (FSPE) zu ermöglichen.<sup>[7,8,14]</sup> Die Synthese des Tetrapeptids **17** begann mit dem Aufbau der ersten β<sup>3</sup>-β<sup>3</sup>-Peptidbindung unter den bewährten Reaktionsbedingungen. Eine Verweildauer von 3 Minuten bei 90°C lieferte das Boc-geschützte Dipeptid **12b** in 91% Ausbeute nach FSPE. Dabei zeigte das Ausfallen des Produktes im Sammelkolben, der bei Raumtemperatur gehalten wurde, dass die Verbindung eine sehr geringe Löslichkeit aufweist.<sup>[15]</sup>

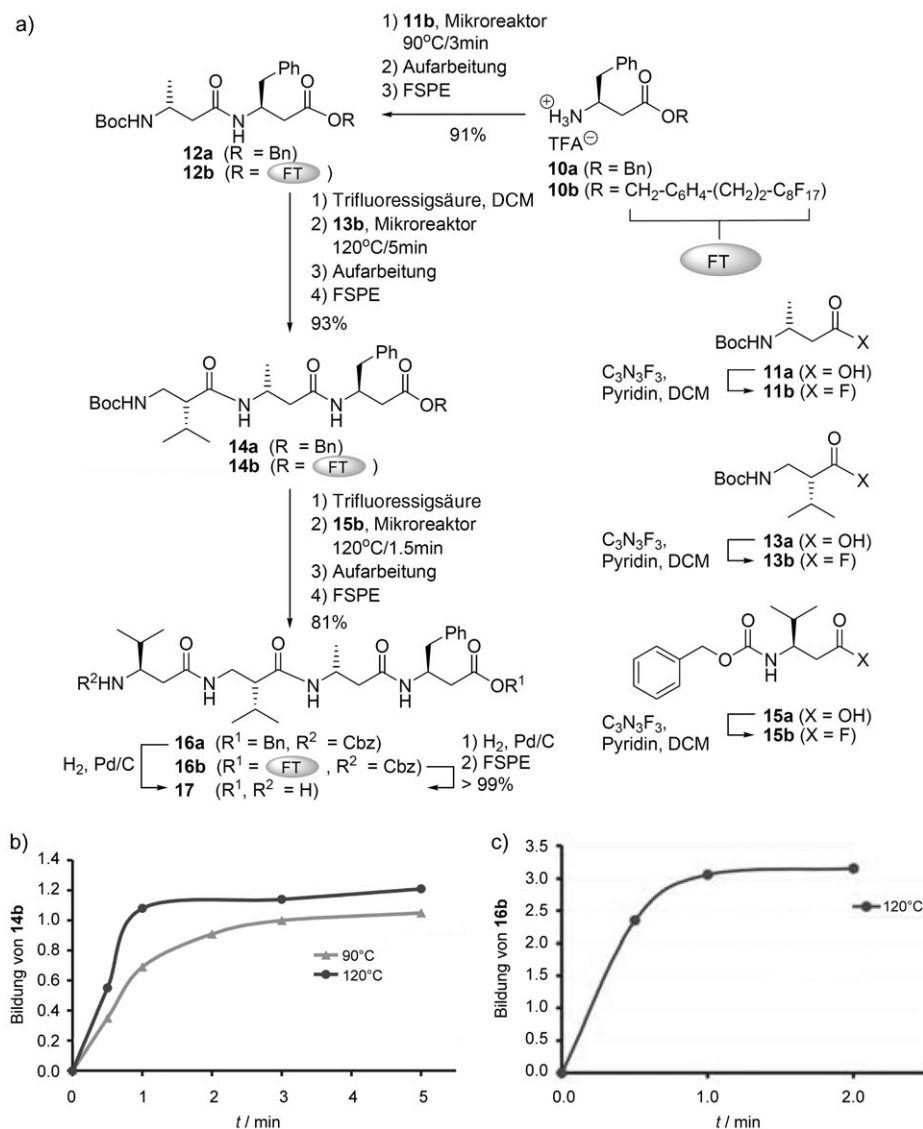
Reaktionen bei 90°C und 120°C ergaben, dass die Bildung der β<sup>2</sup>-β<sup>3</sup>-Peptidbindung durch sterische Einflüsse er-



**Schema 2.** Herstellung der β<sup>3</sup>-Dipeptide **7** und **9**. Boc = *tert*-Butyloxycarbonyl, 2-ClZ = 2-Chlorbenzyloxycarbonyl.

schwert ist und daher höhere Temperaturen und/oder längere Reaktionszeiten benötigt. Der höchste Umsatz wurde mit einer Verweildauer von 5 Minuten bei 120°C erreicht.<sup>[16]</sup> Auf diese Weise gelang die Herstellung des Tripeptids **14b** in 93% Ausbeute im 0.4-mmol-Maßstab.<sup>[17]</sup> Die abschließende β<sup>2</sup>-β<sup>3</sup>-Kupplung wurde bei 120°C durchgeführt (vollständige Kupplung nach 1.5 Minuten). Unter diesen Bedingungen wurde das Tetramer **16b** in 81% Ausbeute erhalten; die anschließende Abspaltung der fluorierten und der nichtfluorierten Benzylgruppe lieferte die zwitterionische Zielverbindung **17**.

Um die Mikroreaktormethodik mit den etablierten Methoden zu vergleichen, wurde das Tetrapeptid **17** auch an fester Phase unter Verwendung der Fmoc-Strategie mit



**Schema 3.** a) Synthese der Tetrapeptide **16** und **17**. b) Bildung von **14b** bei verschiedenen Temperaturen. c) Bildung von **16b** bei 120°C. Cbz = Benzyloxycarbonyl, DCM = Dichlormethan.

**Tabelle 1:** Synthese der Tetrapeptide **16a/b** und **17** im Mikroreaktor, durch Kupplungen in Lösung und an fester Phase.<sup>[19]</sup>

Methode	<b>12a/b</b> Bedingungen (Ausbeute)	<b>14a/b</b> Bedingungen (Ausbeute)	<b>16a/b</b> Bedingungen (Ausbeute)	<b>17</b> Ausbeute
Mikroreaktor	<b>11b</b> (2 Äquiv.); NMM (4 Äquiv.), 90°C, 3 min (91%)	<b>13b</b> (2 Äquiv.); NMM (4 Äquiv.), 120°C, 5 min (93%)	<b>15b</b> (2 Äquiv.); NMM (4 Äquiv.), 120°C, 1.5 min (81%)	> 99%
in Lösung (F-Markierung)	<b>11b</b> (2 Äquiv.); NMM (4 Äquiv.), RT, 3 h (94%)	<b>13b</b> (2 Äquiv.); NMM (4 Äquiv.), RT, über Nacht (93%)	<b>15b</b> (2 Äquiv.); NMM (4 Äquiv.), RT, über Nacht (93%)	> 99%
in Lösung <sup>[a]</sup>	<b>11a</b> (2 Äquiv.); HATU (1.8 Äquiv.), NMM (4 Äquiv.), RT, über Nacht (85%)	<b>13a</b> (2 Äquiv.); HATU (1.8 Äquiv.), NMM (4 Äquiv.), RT, über Nacht (85%)	<b>15a</b> (2 Äquiv.); HATU (1.8 Äquiv.), NMM (4 Äquiv.), RT, über Nacht (87%)	79%
an fester Phase <sup>[b]</sup> (Wang-Harz)	Fmoc- <b>11a</b> (3 Äquiv.); HATU (2.8 Äquiv.), DIPEA (6 Äquiv.), RT, 1.5 h	Fmoc- <b>13a</b> (3 Äquiv.); HATU (2.8 Äquiv.), DIPEA (6 Äquiv.), RT, 1 h	Fmoc- <b>15a</b> (3 Äquiv.); HATU (2.8 Äquiv.), DIPEA (6 Äquiv.), RT, 1 h	55% (nach HPLC) <sup>[20]</sup>

[a] HATU = 2-(1*H*-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat. [b] DIPEA = Diisopropylethylamin.

HATU-DIPEA-vermittelten Kupplungen<sup>[18]</sup> sowie in Lösung unter Einsatz herkömmlicher Glasgeräte hergestellt. Zur Synthese des Peptids in Lösung wurden zwei Strategien angewendet: Im ersten Ansatz nutzten wir die auch im Mikroreaktor eingesetzte fluoridierte Benzylgruppe in Kombination mit Säurefluoriden, im zweiten gingen wir von H-β<sup>3</sup>hPhe-OBn aus und setzten HATU-DIPEA-Kupplungsbedingungen ein. Die Ergebnisse der vier Syntheseverarianten sind in Tabelle 1 dargestellt. In allen Fällen wurde das Tetramer in vergleichbaren Gesamtausbeuten erhalten. Allerdings war die Reinigung für fluoridierte Peptide viel einfacher als für nichtfluorierte Peptide; wegen seiner geringen Löslichkeit erwies sich die Aufreinigung des nichtfluoridierten Tetramers **16a** als besonders problematisch. Darüber hinaus konnte die Reaktion im Mikroreaktorsystem genau kontrolliert werden. Dies ermöglichte die Verwendung außergewöhnlich hoher Temperaturen, was die Reaktionszeit beträchtlich verkürzte. Außerdem wurde dadurch das Ausfallen des Produktes während der Reaktion verhindert, das bei Synthesen in normalen Kolben zu inhomogenen gallertartigen Reaktionsmischungen führte.

Wir haben einen Mikroreaktor aus Silicium vorgestellt, der für die Synthese von Peptiden geeignet ist. Der mikrostrukturierte Reaktor benötigt für eine detaillierte Untersuchung und Optimierung der Reaktionsparameter nur eine minimale Menge an Reagentien. Darüber hinaus konnte im Mikroreaktor bei ungewöhnlich hohen Temperaturen gearbeitet werden, was zu homogenen Reaktionsmischungen führt und die Reaktionszeiten deutlich verkürzt. Die Effizienz der Synthese konnte weiter durch eine fluoridierte Benzylschutzgruppe gesteigert werden, die zum ersten Mal für die Herstellung von  $\beta$ -Peptiden eingesetzt wurde und sich als besonders hilfreich bei der Reinigung schwerlöslicher Produkte erwies.<sup>[8]</sup> Die hier beschriebene Methode wird nicht nur für die Herstellung anspruchsvoller Peptide, sondern auch für die Synthese anderer Biopolymere wie Oligosaccharide und Oligonucleotide eingesetzt werden können. Generell eröffnet die kontinuierliche Prozessführung viele Möglichkeiten für vielstufige Synthesen und für die Automatisierung.<sup>[21]</sup>

Eingegangen am 31. Mai 2006

Online veröffentlicht am 29. September 2006

**Stichwörter:**  $\beta$ -Peptide · Fluorierte Schutzgruppen · Mikroreaktoren · Synthesemethoden

- [1] a) D. Seebach, A. K. Beck, D. J. Bierbaum, *Chem. Biodiversity* **2004**, *1*, 1111–1239; b) R. P. Cheng, S. H. Gellman, W. F. De-Grado, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219–3232; c) D. Seebach, M. Overhand, F. N. M. Kühnle, B. Martinoni, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 913–941; d) D. Seebach, J. V. Schreiber, P. I. Arvidsson, J. Frackenhohl, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 271–279; e) T. Kimmerlin, D. Seebach, *J. Pept. Res.* **2005**, *65*, 229–260; f) D. Seebach, S. Abele, K. Gademann, B. Jaun, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1700–1703; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1595–1597.
- [2] a) J. K. Murray, S. H. Gellman, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1517–1520; b) G. Lelais, D. Seebach, B. Jaun, R. I. Mathad, O. Flögel, F. Rossi, M. Campo, A. Wortmann, *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89*, 361–403; c) P. I. Arvidsson, J. Frackenhohl, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 1522–1553.
- [3] M. Erdélyi, A. Gogoll, *Synthesis* **2002**, 1592–1596.
- [4] a) W. Ehrfeld, V. Hessel, H. Löwe, *Microreactors: New Technology for Modern Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**; b) K. F. Jensen, *Chem. Eng. Sci.* **2001**, *56*, 293–303; c) K. Jähnisch, V. Hessel, H. Löwe, M. Baerns, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 410–451; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 406–446.
- [5] a) P. D. I. Fletcher, S. J. Haswell, E. Pombo-Villar, B. H. Warrington, P. Watts, S. Y. F. Wong, X. L. Zhang, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 4735–4757; b) P. Watts, S. J. Haswell, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 235–246; c) M. Brivio, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, *Lab Chip* **2006**, *6*, 329–344; d) K. Geyer, J. D. C. Codée, P. H. Seeberger, *Chem. Eur. J.*, im Druck.
- [6] Kupplungen von  $\beta$ -Peptiden in einem durch elektroosmotischen Fluss angetriebenen Mikroreaktor aus Glas: a) P. Watts, C. Wiles, S. J. Haswell, E. Pombo-Villar, P. Styring, *Chem. Commun.* **2001**, 990–991; b) P. Watts, C. Wiles, S. J. Haswell, E. Pombo-Villar, *Lab Chip* **2002**, *141*–144; c) P. Watts, C. Wiles, S. J. Haswell, E. Pombo-Villar, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5427–5439. Diese Arbeit beschreibt die Bildung von  $\beta$ -Peptiden; dabei wurden jedoch keine synthetisch nützlichen Substanzmengen produziert.
- [7] a) D. P. Curran, Z. Y. Luo, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9069–9072; b) W. Zhang, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2004**, *7*, 784–797.
- [8] Einsatz fluorierter Schutzgruppen in der Synthese von  $\alpha$ -Peptiden an fester Phase: a) D. V. Filippov, D. J. van Zoelen, S. P. Oldfield, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, J. W. Drijfhout, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7809–7812; b) P. C. de Visser, M. van Helden, D. V. Filippov, G. A. van der Marel, J. W. Drijfhout, J. H. van Boom, D. Noort, H. S. Overkleeft, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 9013–9016.
- [9] Synthese von  $\alpha$ -Peptiden mithilfe eines fluoridierten Dendrimerarms: M. Mizuno, K. Goto, T. Miura, T. Matsuura, T. Inazu, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3425–3428.
- [10] D. M. Ratner, E. R. Murphy, M. Jhunjhunwala, D. A. Snyder, K. F. Jensen, P. H. Seeberger, *Chem. Commun.* **2005**, *5*, 578–580.
- [11] L. A. Carpino, M. Beyermann, H. Wenschuh, M. Bienert, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 268–274.
- [12] Längere Verweilzeiten (30 min) führten zu einem unregelmäßigen Fließverhalten, was an den starken Abweichungen der UV-Absorptionen der Produkte im Vergleich zum internen Standard im LCMS zu erkennen war.
- [13] Tetramere wurden ebenfalls beobachtet (Daten nicht gezeigt).
- [14] a) D. P. Curran, *Synlett* **2001**, 1488–1496; b) W. Zhang, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 2531–2556.
- [15] Diese geringe Löslichkeit zwang uns, relativ große Mengen DMF (30 mg mL<sup>-1</sup>) zum Auftragen auf das fluoridierte Kieselgel (Fluorchrom, 20 g) zu verwenden. Dies beeinträchtigte nicht die Reinigung (siehe Details in den Hintergrundinformationen).
- [16] Aufgrund der geringen Löslichkeit des Produkts konnte der Mikroreaktor weder bei einer niedrigeren Temperatur noch mit längeren Reaktionszeiten betrieben werden.
- [17] a) Für diese Umsetzung wurde eine Mischung der Enantiomere eingesetzt ((*R*)-**13b**/*S*)-**13b** ca. 93:7). Die LCMS-Analyse ergab das gleiche Diastereomerenverhältnis im Produkt; unter den Reaktionsbedingungen fand also keine Epimerisierung statt. Die Epimerisierung wird zurzeit im Detail untersucht. b) Für die Synthese des Aminosäurefluorids **13** wurde eine Mischung der beiden Enantiomere des Boc- $\beta^2$ -Homovalins (*R/S* 93:7) verwendet: T. Hintermann, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 2093.
- [18] *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics (Houben-Weyl Methods of Organic Synthesis)*, Vol. E22a (Hrsg.: M. Goodman, A. Felix, L. Moroder, C. Toniolo), Thieme, Stuttgart, **2002**, S. 665–877.
- [19] Detaillierte experimentelle Bedingungen sind in den Hintergrundinformationen zu finden.
- [20] Nur das Hauptdiastereomer wurde aufgefangen.
- [21] I. R. Baxendale, J. Deeley, C. M. Griffiths-Jones, S. V. Ley, S. Saaby, G. K. Tranmer, *Chem. Commun.* **2006**, *24*, 2566.