

264. Der 2-Trimethylsilyläthyl-Rest als selektiv abspaltbare Carboxy-Schutzgruppe¹⁾²⁾

von Peter Sieber

Chemische Forschungslaboratorien der Division Pharma der CIBA-GEIGY AG, Basel

(30.IX.77)

The 2-trimethylsilylethyl residue, a selectively cleavable carboxyl protecting group

Summary

In a search for new carboxyl protecting groups suitable for use in peptide synthesis, 2-trimethylsilylethyl esters [$-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$] of several *N*-protected amino acids have been prepared. These esters can be synthesized in good yields from *N*ⁿ-benzyloxycarbonyl-amino acids and 2-trimethylsilylethanol with dicyclohexylcarbodiimide in the presence of pyridine. They are stable under a wide variety of conditions used during coupling and work-up in peptide synthesis. For removal the 2-trimethylsilylethyl group is readily cleaved by fluoride ions, preferably using a quaternary ammonium fluoride in dimethylformamide. Some side reactions which occurred during the removal of the 2-trimethylsilylethyl group are discussed.

Special attention has been paid to the question of racemization during the treatment with fluoride ions. No evidence of racemization was found in any of the cases examined.

Bei einer oft benutzten Strategie der Peptidsynthese - Fragmentkondensation unter Schutz der Seitenkettenfunktionen auf tert. Butylbasis - wird zur Blockierung der α -Carboxy-Funktion noch vorwiegend der Methylester verwendet. Während bei kleineren Peptiden die alkalische Hydrolyse der Methylester meist noch gut gelingt, kann diese bei grösseren, schwerlöslichen Peptiden schwierig werden. Seit längerer Zeit wurde deshalb versucht, besser geeignete Carboxy-Schutzgruppen zu finden.

Um bei der erwähnten Peptidsynthese-Strategie bleiben zu können, muss eine Carboxy-Schutzgruppe folgende Anforderungen erfüllen: 1) Stabilität gegen Hydrolyse, damit die bewährte Benzyloxycarbonyl(Z)-Gruppe zum Schutze der α -Aminogruppe verwendet werden kann; 2) Die Abspal-

1) Als Poster am 5. Amerikanischen Peptid-Symposium in San Diego (20.-24. 6. 1977) vorgetragen.

2) Zu der hier verwendeten abgekürzten Schreibweise von Aminosäuren und deren Derivate vgl. [1]. Ferner bedeuten: Boc: *t*-Butoxycarbonyl; Bpoc: 2-(*p*-Biphenyl)-isopropoxycarbonyl; OBut: *t*-Butylester; But: *t*-Butyläther; AcM: Acetamidomethyl; Trt: Trityl; DCCl: Dicyclohexylcarbodiimid; DMF: Dimethylformamid; DMSO: Dimethylsulfoxid.

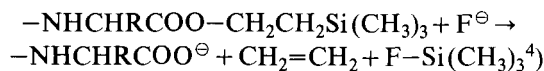
tung der Carboxy-Schutzgruppe muss in Lösungsmitteln wie DMF und DMSO vorgenommen werden können, ohne dass die Seitenketten-Schutzgruppen wie Boc, *t*-Butylester und *t*-Butyläther angegriffen werden; 3) Bei der Abspaltung darf keine Racemisierung eintreten.

Carpino [2] stellte fest, dass der 2-Trimethylsilyläthoxycarbonyl-Rest $[(\text{CH}_3)_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{OCO}-]$ eine geeignete *N*-Schutzgruppe darstellt, welche selektiv mittels «nackten» Fluoridionen abgespalten werden kann. Diese vielversprechende Methode wird auch zur Freisetzung der OH-Funktion aus den *t*-Butyldimethylsilyläthern [3] benützt. In dieser Arbeit wird über die Verwendbarkeit der 2-Trimethylsilyläthyl-Gruppe, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, (abgekürzt Tmse), als Carboxy-Schutzgruppe in der Peptidchemie berichtet.

Die Herstellung der Tmse-ester gelingt leicht aus den *N*-geschützten Aminosäuren und 2-Trimethylsilyläthanol (HOTmse) [4]³⁾ mit *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid in Gegenwart von 2-3 Mol.-Äquiv. Pyridin. Bisher konnten nur wenige der *N*-geschützten Aminosäure-Tmse-ester kristallisiert werden, doch können die öligen Produkte leicht durch Chromatographie an Kieselgel rein hergestellt werden. Als hauptsächlichstes Nebenprodukt werden die Acylharnstoffderivate gebildet, und zwar um so mehr, je polarer das verwendete Lösungsmittel ist. Wenn wegen schlechter Löslichkeit des Aminosäurederivats DMF verwendet werden muss, hat sich die Zugabe von $\frac{1}{4}$ Äquivalent 1-Hydroxybenzotriazol bewährt. Einzig der Tmse-ester von *N,S*-Ditritylcystein konnte nicht mit dieser Methode hergestellt werden, da mit DCCI das symmetrische Anhydrid gebildet wird, das auch unter energischen Bedingungen nicht mit HOTmse reagierte. Die Herstellung von Trt-Cys(Trt)-OTmse gelang jedoch mit *O*-(2-Trimethylsilyläthyl)-*N,N'*-dicyclohexyl-isoharnstoff [5]. Die Eigenschaften der bisher hergestellten *N*-geschützten Aminosäure-Tmse-ester sind in der Tabelle aufgeführt.

Z-Asn-OTmse liess sich nur in schlechter Ausbeute herstellen. Je nach Reaktionsbedingungen bildeten sich wechselnde Mengen von Z- β -Cyano-alanin-OTmse und Z-Asparagin-imid. Da es sich jedoch zeigte, dass bei der Abspaltung des Tmse-esters Cyclisierung zum Imid eintrat, wurde auf eine Ausbeuteverbesserung verzichtet.

Die Abspaltung der Tmse-ester mit Fluoridionen erfolgt vermutlich durch eine Fragmentierung, analog wie sie *Carpino* [2] für die *N*-Schutzgruppe formulierte:



Als Abspaltungsreagentien werden Tetraäthyl- oder das besser lösliche Tetrabutylammoniumfluorid⁵⁾ verwendet. Eine Lösung des Peptid-Tmse-esters in DMF⁶⁾ wird mit 2-10 Mol.-Äquiv. der Fluoridlösung⁷⁾ versetzt. Die Reaktion wird nach der in

³⁾ HOTmse ist erhältlich bei *Fluka AG*, Buchs.

⁴⁾ Die Gase wurden mit Argon in bromhaltigen Tetrachlorkohlenstoff eingeleitet. Mittels ¹H-NMR.-Spektrum konnte in dieser Lösung die Anwesenheit von 1,2-Dibromäthan und Trimethylfluorsilan nachgewiesen werden.

⁵⁾ Produkte der *Fluka AG*, Buchs.

⁶⁾ Die Reaktion gelingt auch in Acetonitril, verläuft jedoch langsamer.

⁷⁾ Am besten wird eine Lösung in DMSO hergestellt, deren Gehalt durch Titration mit HClO₄ in Eisessig bestimmt werden kann. Eine Lösung in DMF ist nicht stabil, es bildet sich Dimethylamin.

Tabelle. *Tm*-Ester von *N*(*a*)-geschützten Aminosäuren^{a)}

Tmse-Ester von	Ausbeute ^{b)} %	$[\alpha]_D^{20}$ c=1, EtOH	Eigenschaften
Z-Ala ^{c)}	86	- 23°	Öl
Z-Arg, HCl ^{c)}	67	- 8 ^{sd)}	Öl
Z-Asp(OBut)	81	- 13°	Öl
Boc-Cys(Acm)	86	- 27°	Öl
Trt-Cys(Trt)	66	+ 60°	Fester Schaum
Z-Glu(OBut)	75	- 16°	Öl
Z-Gln	72	- 15°	Smp.: 78-80°, aus Essigester/Hexan
Z-Gly	83		Öl
Z-His	80	- 12°	Öl
Z-Leu ^{c)}	95	- 22°	Öl
Z-Lys(Boc) ^{c)}	85	- 10°	Öl
Boc-Met	86	- 29°	Öl
Z-Phe	89	- 8°	Smp.: 48-49°, aus Dichlormethan/Hexan
Z-Pro ^{c)}	80	- 48°	Öl
Z-Thr(But)	94	- 6°	Smp.: 33-35°, aus Methanol/Wasser
Z-Trp	97	- 5°	Smp.: 81-82°, aus Äther/Hexan
Z-Tyr(But)	84	- 5°	Smp.: 66-67°, aus Hexan

a) Alle Derivate geben korrekte Elementaranalysen und ihre ¹H-NMR.-Spektren stehen im Einklang mit den angenommenen Strukturen.

b) Die Ausbeuten sind nicht optimiert.

c) Diese Beispiele verdanke ich den Herren Dr. R. Andreatta, K. Eisler und Dr. B. Riniker.

d) In DMF.

Vorversuchen bestimmten Dauer durch Zugabe von Wasser abgestoppt. Die Isolierung der Peptidsäure erfolgt je nach deren Eigenschaften durch Ansäuern und Extrahieren mit geeigneten Lösungsmitteln oder Ausfällen mit Wasser. Die Reaktion lässt sich durch Variieren der Fluoridmenge und Temperatur so steuern, dass sie nach 5-60 Minuten beendet ist. Die C-terminale Aminosäure übt einen kleinen Einfluss auf die Geschwindigkeit aus, indem z. B. -Gly-OTmse etwas langsamer als -Thr(But)-OTmse gespalten wird. In Gegenwart von basischen Gruppen wie Arginin oder Histidin im Peptidverband muss der Überschuss an Fluorid grösser sein.

Besondere Aufmerksamkeit wurde der Frage der Racemisierung bei der Ester-spaltung mit Fluorid gewidmet. Bekanntlich sind *S*-geschützte Cystein-Derivate besonders racemisierungsgefährdet. Deshalb wurden Boc-Cys(Trt)-Gly-OH, Boc-Cys(Trt)-Gly-OMe und Ac-Gly-Cys(Acm)-Gly-NH₂ in DMF in Gegenwart von [Et₄N]⁺ F⁻ stehengelassen und nach verschiedenen Zeiten die optische Drehung gemessen. Bis zu 10 Stunden liess sich keine Veränderung des Drehungswertes feststellen. Ein anderes günstiges Racemisierungsmodell besteht aus Z-Thr(But)-OH. Wird beispielsweise der Methyl ester unter ungünstigen Bedingungen mit NaOH-Lösung verseift, so kann bis zu 40% Z-D-*allo*-Thr(But)-OH entstehen, welches in einem einfachen Dünnschichtsystem abgetrennt werden kann (siehe exper. Teil). Bei der Fluoridspaltung von Z-Thr(But)-OTmse entsteht kein D-*allo*-Derivat.

Unter den üblicherweise verwendeten Peptid-Kupplungs- und -Aufarbeitungsbedingungen sowie bei der katalytischen Hydrogenolyse der Z-Gruppe sind die

Tmse-ester stabil. Wird in MeOH hydriert, so kann unter dem Einfluss der entstehenden basischen Aminogruppe Umesterung eintreten, eine Reaktion, die bekanntlich auch mit andern Estern eintritt. Deshalb wird zur Hydrierung der Z-Gruppe entweder die pH-Stat-Methode oder 2-Propanol als Lösungsmittel verwendet.

NaOH in wässrigem Dioxan hydrolysiert die Tmse-ester ähnlich rasch wie die Äthylester. HCl in organischen Lösungsmitteln spaltet Tmse-ester, die Reaktion ist jedoch genügend langsam, um eine selektive Abspaltung einer Boc-Gruppe zu ermöglichen (siehe Beispiel im exper. Teil). Wasserfreie Trifluoressigsäure spaltet die Tmse-ester rasch.

Anhand von Modellpeptiden wurde die Stabilität vielfach verwendeter Schutzgruppen bei der Spaltung der Tmse-ester mittels Fluorid geprüft. Als stabil erwiesen sich Boc, Bpoc, *N*- und *S*-Trt, *S*-Acm, *t*-Butyläther sowie die meisten Aminosäurereste (Ausnahmen siehe unten). Weitere funktionelle Gruppen zeigten folgendes Verhalten:

<i>Gruppe</i>	<i>Bemerkungen</i>
Z	Langsame Hydantoin-Bildung [6]. Unter kontrollierten Bedingungen (minimaler Überschuss an Fluorid, kürzest mögliche Reaktionsdauer) lässt sich die Tmse-Gruppe mit genügender Selektivität abspalten.
OMe	Langsame Spaltung, abhängig von der Aminosäure.
OBu ^t	Sehr langsame Spaltung. Ausnahme: Asp (OBu ^t)– <i>N</i> -terminal oder in der Peptidkette wird zu einer Mischung von α - und β -Peptiden gespalten. Unter den verwendeten Bedingungen entstanden 20–30% Nebenprodukte.
OBzl	Verhältnismässig rasche Spaltung. Eine selektive Abspaltung der Tmse-Gruppe ist kaum möglich.
R-S-S-R'	Rasche Disproportionierung. Eine selektive Abspaltung der Tmse-Gruppe ist nicht möglich ⁸⁾ .
Asn	<i>C</i> -terminales Asn bildet quantitativ das Succinimid-Derivat, vgl. auch [7]. Diese Nebenreaktion ist unbedeutend, wenn Asn nicht <i>C</i> -terminal ist.
Gln	<i>C</i> -terminales Gln bildet mehr als 50% des Glutarimid-Derivats neben der freien Säure. Wenn Gln nicht <i>C</i> -terminal ist, bilden sich nur Spuren des Nebenprodukts.

Die Tmse-Gruppe wurde mit Erfolg und ohne Racemisierungsgefahr u. a. bei der Synthese des Insulin-Fragments B 1–15 [8] und zur Herstellung von Somatostatin-Analogen [9] verwendet. In beiden Fällen führte dagegen die alkoholische Hydrolyse der entsprechenden Methylester zu beträchtlicher Racemisierung sowie zu weiteren Nebenprodukten.

Unabhängig von uns hat auch Gerlach [10] die Tmse-Gruppe entwickelt und gezeigt, dass sie sich zum Schutz der Carboxy-Funktion bei der Synthese von Makroliden eignet.

⁸⁾ Versuche von Dr. B. Kamber.

2-Trimethylsilyläthylester sind leicht herzustellen, stabil und unter milden Bedingungen abspaltbar. Ihre Anwendung ist daher nicht auf die Peptidsynthese beschränkt. Sie dürften sich als Carboxy-Schutzgruppen auch in anderen Bereichen der organischen Synthese mit Vorteil einsetzen lassen.

Herrn Dr. W. Rittel bin ich für sein grosses dieser Arbeit entgegengebrachtes Interesse zu Dank verpflichtet.

Experimenteller Teil

Allgemeines. Die Smp. sind auf einem Apparat nach Dr. Tottoli (Firma Büchi, Flawil) bestimmt und nicht korrigiert. - Für die Herstellung der eingesetzten und hier nicht näher beschriebenen Aminosäure-derivate, s. [11]. - Zur *Dünnschichtchromatographie* (DC.) wurden Kieselgel-Platten der Firma Antec, Birsfelden, verwendet. Angefärbt wurde mit Ninhydrin und TDM-Reagens nach [12].

Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von N^{α} -geschützten Aminosäure-2-trimethylsilyläthylestern.

Eine Lösung von 10 mmol N^{α} -geschützter Aminosäure in 6-10 ml Acetonitril (falls schwer löslich ein Minimum an DMF zugeben) wurde mit 1,6 ml Pyridin und 1,7 ml HOTmse versetzt und im Eisbad gekühlt. Nach 10 Min. wurden 2,25 g DCCI zugegeben, noch 1 Std. im Eisbad gerührt und 5-15 Std. im Kühlschrank belassen. Darauf wurde 0,3 ml 5M Oxalsäure in DMF zugefügt, nach $\frac{1}{2}$ Std. die Fällung abgenutscht und mit Essigester ausgewaschen. Die Essigesterlösung wurde mit HCl- und NaHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt und das Rohprodukt durch Chromatographie an Kieselgel 60 (Merck) mit Hexan/Essigester (Zusammensetzung je nach Lipophilität des Produkts) gereinigt. Ausbeuten s. *Tabelle*.

O-(2-Trimethylsilyläthyl)-N,N'-dicyclohexyl-isoharnstoff. 780 mg DCCI, 0,6 ml HOTmse und 50 mg Kupfer(I)-chlorid wurden $1\frac{1}{2}$ Std. bei RT. gerührt (DCCI-Bande im IR. verschwunden). Nach Verdünnen mit 3 ml Petroläther wurde über Alox filtriert und mit dem gleichen Lösungsmittel ausgewaschen. Nach Eindampfen zur Trockne hinterblieben 870 mg eines grünen Öls (70%). Eine Analysenprobe liess sich im Kragenkolben destillieren, Sdp. ca. $120^{\circ}/0,09$ Torr. (Beim Versuch, grössere Mengen zu destillieren, trat Zersetzung ein.)

$\text{C}_{13}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{OSi}$ (324,6) Ber. C 66,61 H 11,18 N 8,63% Gef. C 66,81 H 11,44 N 8,75%

Trt-Cys(Trt)-OTmse. Eine Lösung von 820 mg des obigen, rohen Isoharnstoffderivats in 2,5 ml Essigester wurde mit 1,5 g Trt-Cys(Trt)-OH 24 Std. bei 50° gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abgenutscht, die Essigesterlösung eingedampft und der Rückstand an Kieselgel 60 (Merck) mit Hexan/Essigester 9:1 chromatographiert. Die reinen Fraktionen wurden vereinigt und zur Trockne eingedampft. Ausbeute: 1,16 g = 66%. Rf 0,62 (Cyclohexan/Essigester 1:4).

$\text{C}_{46}\text{H}_{47}\text{NO}_2\text{SSi}$ (706,0) Ber. C 78,26 H 6,71 N 1,98% Gef. C 78,66 H 7,05 N 1,86%

Abspaltung der Tmse-Gruppe und Prüfung auf Racemisierung an Z-Thr(But)-OTmse. Eine Lösung von 440 mg Z-Thr(But)-OTmse in 9 ml DMF wurde unter Rühren bei 24° mit 1,25 ml einer 2,1M Lösung von Tetrabutylammoniumfluorid in DMSO versetzt, wobei sofort starke Gasentwicklung einsetzte. Nach 3 Min. wurden unter Eiskühlung 10 ml Wasser zugegeben, i.V. eingengt, mit Essigester verdünnt und mit 2N HCl angesäuert. Die Essigester-Phase wurde mit Wasser gewaschen, bis eine Probe davon rückstandsfrei war. Nach Eindampfen des Essigesters verblieben 100% des Z-Thr(But)-OH, welches im DC. vollständig frei von Z-D-*allo*-Thr(But)-OH war. System: Chloroform/Eisessig 98:2, Laufstrecke 15 cm. L-Derivat, Rf 0,25; D-*allo*-Derivat, Rf 0,19.

H-Met-OTmse · HCl aus Boc-Met-OTmse. Eine Lösung von 360 mg Boc-Met-OTmse in 0,72 ml 90proz. Trifluoräthanol wurde bei 23° mit 2,6 ml 1,2N HCl im gleichen Lösungsmittel versetzt. Nach

10 Min. wurde 2mal mit 10 ml *t*-Butylalkohol i.V. eingeengt, dann das restliche Lösungsmittel durch Lyophilisieren entfernt. Der Rückstand wurde in 30 ml Essigester gelöst, 2mal mit 2 ml halbgesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Nach Umkristallisieren aus Äther/Hexan wurden 231 mg (79%) erhalten, Smp. 99-101°, Rf 0,52 (Acetonitril/Wasser 9:1). $[\alpha]_D^{20}$: +14° (*c* = 1, EtOH).

C ₁₀ H ₂₄ ClNO ₂ SSi	Ber. C 42,01	H 8,46	N 4,90	Cl 12,40%
(285,9)	Gef. „ 42,24	„ 8,48	„ 4,86	„ 12,55%

Für sorgfältige technische Mitarbeit danke ich Frau *J. Seeberger* und Herrn *E. Manz*. Für die Ausführung der Elementaranalysen danke ich Herrn Dr. *Padowitz*, für die Aufnahme und Interpretation der NMR.-Spektren den Herren Dres. *H. Fuhrer* und *G. Rist*.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Recommendations, *J. biol. Chemistry* 247, 977 (1972).
- [2] *L. A. Carpino*, private Mitteilung.
- [3] *E. J. Corey & A. Venkateswarlu*, *J. Amer. chem. Soc.* 94, 6190 (1972).
- [4] *J. L. Speier, J. A. Webster & G. H. Barnes*, *J. Amer. chem. Soc.* 79, 974 (1957).
- [5] *E. Vowinkel*, *Chem. Ber.* 99, 1479 (1966).
- [6] *J. Pless*, *J. org. Chemistry* 39, 2644 (1974).
- [7] *W. König & A. Volk*, *Chem. Ber.* 110, 1 (1977).
- [8] *B. Riniker et al.*, Publikation in Vorbereitung.
- [9] *H. Rink et al.*, Publikation in Vorbereitung.
- [10] *H. Gerlach*, *Helv.* 60, 860 (1977).
- [11] *G. A. Fletcher & J. H. Jones*, *Int. J. Peptide Protein Res.* 4, 347 (1972); *iidem* 7, 91 (1975).
- [12] *E. von Arx, M. Faupel & M. Brugger*, *J. Chromatogr.* 120, 224 (1976).