

# ÜBER DIE VERWENDUNG DES 2,2,2-TRIFLUOR-1-BENZYLOXYCARBONYL- AMINOÄTHYL-RESTES ALS HYDROXYL- SCHUTZGRUPPE BEI DER MERRIFIELD-SYNTHESE

K. P. POLZHOFFER

Unilever Forschungslaboratorium Hamburg

(Received in Germany 16 May 1969; Received in the UK for publication 30 May 1969)

**Zusammenfassung**—Für die Festphasen-Synthese der beiden Tripeptide L-Ala-L-Ser-L-Phe und L-Ala-L-Thr-L-Phe wurde der 2,2,2-Trifluor-1-benzyloxycarbonylaminoäthyl-Rest als Schutzgruppe für die Hydroxylgruppen des Serins und Threonins verwendet.

**Abstract**—The 2,2,2-trifluoro-1-benzyloxycarbonylaminoethyl-group was used as a protecting group for the OH groups of serine and threonine during the solid-phase synthesis of the tripeptides L-Ala-L-Ser-L-Phe and L-Ala-L-Thr-L-Phe.

BISHER wurde Thr bei der Merrifield-Synthese meist mit freier Hydroxylgruppe verwendet.<sup>1-4</sup> O-Acylierungen während der Boc-Schutzgruppenabspaltung waren dabei nicht auszuschliessen, wenn man 1N HCl-Eisessig zur Abspaltung einsetzte. 4N HCl-Dioxan würde zu keiner O-Acylierung führen, doch wird der Abspaltungsmethode mit 1N HCl-Eisessig der Vorzug gegeben.<sup>1</sup>

Vor kurzem wurde die Synthese von Boc-O-Bzl-L-Thr beschrieben,<sup>5</sup> doch kann die Substanz in nur 10%eiger Ausbeute erhalten werden. Auch die Synthese von Boc-O-Bzl-L-Ser<sup>6</sup> ist mit grossem Aufwand verbunden.

Erst die Entwicklung des 2,2,2-Trifluor-1-benzyloxycarbonylaminoäthyl (Z-TF)-Restes durch Weygand<sup>7</sup> brachte hier einen Fortschritt für die Peptidchemie. Boc-O-Z-TF-L-Ser<sup>7</sup> und Boc-O-Z-TF-L-Thr (Experimenteller Teil) können nach dieser Methode schnell und in guter Ausbeute synthetisiert werden.

Über die Verwendung von Boc-O-Z-TF-L-Ser und Boc-O-Z-TF-L-Thr bei der Merrifield-Synthese soll berichtet werden.

## METHODEN UND ERGEBNISSE

Die Tripeptide L-Ala-L-Ser-L-Phe und L-Ala-L-Thr-L-Phe werden wie folgt synthetisiert: (1) Hydroxylschutzgruppe = Benzylrest; (2) Hydroxylschutzgruppe = O-Z-TF-Rest.

Zur Peptid-Synthese wurde das Merrifield-Verfahren<sup>8</sup> in der von uns abgeänderten Form benutzt: die Boc-Aminosäuren<sup>9</sup> wurden in 5-fachem molarem Überschuss eingesetzt, und die Kupplungszeit betrug 16–18 h.

Ob der Z-TF-Rest<sup>7</sup> auch für die Merrifield-Synthese geeignet ist, schien in erster Linie von der Konformation dieses voluminösen Restes abzuhängen. Betrachtet man die Strukturformel der beiden voll geschützten Peptidharze oder das Kalotten-Modell der geschützten Peptide, so erkennt man, besonders im Falle des O-Z-TF-Thr mit Verzweigung am  $\beta$ -Kohlenstoff, die sterische Hinderung.

Wie die Aminosäure-Analysen der aus Dimethylformamid/Äther umgefällten Peptidhydrobromide (Tab. 1) zeigen, waren die mit Hilfe der Z-TF- und Benzylschutzgruppen hergestellten Peptide identisch. Die Ser- und Thr-Werte wurden nach Schultze<sup>15</sup> korrigiert. Auch die Ausbeuten an Reinpeptiden lagen mit 65–80% in derselben Grösse.

Die Papierelektrophorese bewies die Einheitlichkeit der Peptide. Die Substanzen wurden mit dem Chlor-Reagenz<sup>17</sup> nachgewiesen.

Boc-O-Z-TF-Ser und Boc-O-Z-TF-Thr können bei der Peptid-Synthese nach Merrifield ohne Schwierigkeiten verwendet werden. Die Hydroxylgruppen des Serins und Threonins bleiben während der gesamten Synthese geschützt und werden erst bei der Ablösung des Peptids vom Harz entfernt. O-Acylierungen werden durch die Verwendung der Z-TF-Schutzgruppe vollständig ausgeschlossen. Die hohen Ausbeuten und die Reinheit der Peptide beweisen ausserdem, dass im Falle der Boc-O-Z-TF-Thr-Kupplung keine sterische Hinderung auftritt.

Vom 1-Diäthylamino-1-propin ist bekannt,<sup>10-12</sup> dass es als Kupplungsreagenz anstelle von DCCI höhere Ausbeuten liefert. Auch sei das Reaktionsgemisch leichter aufzuarbeiten.<sup>12</sup> Wir haben 1-Diäthylamino-1-propin zur Synthese der hier beschriebenen Tripeptide eingesetzt und mussten feststellen, dass eine leichte Racemisierung eintrat. Dies entspricht früheren Beobachtungen.<sup>13, 14</sup>

TABELLE 1. AMINOSÄURE-ANALYSEN

Peptid (Hydroxyl- schutzgruppe)	Ala	Phe	Ser	
			unkorr.	korr. nach Lit. 15
Ala-Ser-Phe (O-Z-TF)	1,00	0,976	0,876	1,007
Ala-Ser-Phe (O-Bzl)	1,00	0,980	0,840	0,966
			Thr	
	Ala	Phe	unkorr.	korr. nach Lit. 15
Ala-Thr-Phe (O-Z-TF)	1,00	0,994	0,938	1,004
Ala-Thr-Phe (O-Ezl)	1,00	1,009	0,991	1,060

Hydrolysebedingungen: 22 h bei 110° i. Vak. in 6N HCl.

TABELLE 2. SPEZIFISCHE DREHUNG\*  $[\alpha]$  DER PEPTIDE

Peptid (Hydroxyl- schutzgruppe)	$[\alpha]_D^{25}$	$c$ g/100 ml Lösungsmittel
Ala-Ser-Phe (O-Z-TF)	+ 33,2°	0,5
Ala-Ser-Phe (O-Bzl)	+ 31,4°	0,5
Ala-Thr-Phe (O-Z-TF)	+ 39,0°	0,5
Ala-Thr-Phe (O-Bzl)	+ 32,8°	0,5

\* Bestimmt am Perkin-Elmer 141-Polarimeter; Lösungsmittel: Ameisensäure.

Abkürzungen: O-Z-TF = 2,2,2-Trifluor-1-benzyloxycarbonylaminoäthyl.

## EXPERIMENTELLER TEIL

Für die Dünnschichtchromatographie wurde Kieselgel G (Merck) als Sorptionsmittel verwendet. Zur Sichtbarmachung der Substanzen wurden das Ninhydrin-Reagenz und das Chlorierungsverfahren nach Zahn<sup>17</sup> verwendet.

*Fließmittelsysteme.* BPEW: n-Butanol:Pyridin:Eisessig:Wasser = 30:20:6:24 (v/v); SIMW: sek. Butanol:Isopropanol:Monochloressigsäure:Wasser = 70:10:3:40 (v/v/w/v); SBAW: sek. Butanol:Ameisensäure:Wasser = 75:13,5:11,5 (v/v); CME: Chloroform:Methanol:Eisessig = 90:10:5 (v/v). Sämtliche Lösungsmittel wurden wie üblich gereinigt und absolutiert. 6N HCl für Peptid-Hydrolysen wurde zweimal destilliert. Die quantitativen Aminosäure-Analysen wurden am Gerät Dr. Bender/Dr. Hobein ausgeführt. Das optische Drehungsvermögen der Peptide wurde am Perkin-Elmer 141-Polarimeter bestimmt. Für die Papierelektrophorese auf Schleicher(Schüll-Elektrophorese-Streifen (3 cm × 30,6 cm), Nr. 2043a Mgl, wurde folgender Puffer verwendet: Ameisensäure:Essigsäure:Wasser = 30:20:150 (v/v), pH 2,0.

*Synthese von Boc-O-Z-TF-L-Ser, Boc-O-Z-TF-L-Thr und Boc-O-Bzl-L-Thr*

Boc-O-Z-TF-L-Ser wurde nach Lit. 7 aus Boc-L-Ser<sup>9</sup> und Z-TF-Cl\* hergestellt. Boc-O-Bzl-L-Thr wurde nach Lit. 5 in 10% iger Ausbeute hergestellt.

*Boc-O-Z-TF-L-Thr*

*Boc-L-Thr.* 59,6 g (0,5 Mol) L-Thr wurden in 200 ml eines Dioxan/Wasser-Gemisches (1:1, v/v) suspendiert, mit 78,7 g (0,55 Mol) Butyloxycarbonyl-Azid<sup>18</sup> versetzt und mit 4N NaOH auf pH 9,5 eingestellt. Unter starkem Rühren wurde das Reaktionsgemisch auf 45° erwärmt. Der pH wurde dabei durch laufende Zugabe von 4N NaOH konstant<sup>9</sup> gehalten. Nach 28 h konnte in der Lösung kein freies L-Thr nachgewiesen werden. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, die Hauptmenge Dioxan i. Vak. abgezogen, die wässrige Lösung zweimal mit je 100 ml Äther extrahiert und die wässrige Phase mit 40% iger Citronensäure auf pH 3,5 eingestellt. Die saure Lösung wurde fünfmal mit je 100 ml Äthylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 200 ml gesättigter NaCl-Lösung und zweimal mit je 200 ml H<sub>2</sub>O gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak.

\* 2,2,2-Trifluor-1-chlor-N-benzyloxycarbonyläthylamin (Z-TF-Cl), Fa. Schuchardt, München.

eingedampft. Ausbeute: 99,9 g (0,46 Mol)=92% d.Th.; Öl. Boc-L-Thr war dünnschichtchromatographisch einheitlich,  $R_f$  (CME): 0,35.

**Boc-O-Z-TF-L-Thr.** Zu 21,9 g (0,1 Mol) Boc-L-Thr und 53,5 g (0,2 Mol) Z-TF-Cl in 300 ml abs. THF wurden bei 0° innerhalb von 20 min 20,2 g (0,2 Mol) Triäthylamin (TÄA) gegeben. Nach 1 h gab man nochmals 26,7 g (0,1 Mol) Z-TF-Cl und 10,1 g (0,1 Mol) TÄA in 100 ml THF zu, da noch freies Boc-L-Thr nachgewiesen werden konnte. Das Reaktionsgemisch liess man über Nacht bei Raumtemperatur stehen und saugte dann vom ausgefallenen Triäthylaminhydrochlorid ab. Das Salz wurde gründlich mit abs. THF ausgewaschen, die gesammelten Filtrate wurden i.Vak. bei 40° eingedampft. Der Rückstand wurde nach Zugabe von 300 ml Dioxan und 150 ml gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung 3 h bei 50° gerührt. Die Hauptmenge Dioxan wurde i.Vak. abgedampft, der Rückstand mit 200 ml H<sub>2</sub>O verdünnt und das ausgefallene 2,2,2-Trifluor-1-hydroxy-N-benzyloxycarbonyläthylamin abgesaugt. Die Filtrate säuerte man mit verdünnter Citronensäure an, extrahierte dreimal mit je 200 ml Äthylacetat, wusch den Extrakt mit Wasser neutral, trocknete ihn über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und dampfte i.Vak. ein, Ausbeute: 36,4 g (0,081 Mol)=81% d.Th.; Öl.

**Dicyclohexylammoniumsalz.** Zu einer ätherischen Lösung von 36,4 g (81 mMol) Boc-O-Z-TF-L-Thr wurden 14,7 g (81 mMol) Dicyclohexylamin gegeben; nach 1 h gab man n-Hexan zu und saugte die ausgefallenen Kristalle ab. Ausbeute: 42,9 g = 68% d.Th., bezogen auf Boc-L-Thr. Das Salz wurde aus Methanol/Wasser umkristallisiert, Schmp.: 108–110° (Schmelzbeginn bei 88°);  $R_f$  (CME): 0,70; (Ber: N, 6-65; Gef: N, 6,70%).

**Boc-Phe-Polymeres.** 40,0 g Chlormethylharz<sup>a</sup> (56 mMol Cl), suspendiert in 120 ml Äthylacetat, wurden mit 14,84 g (56 mMol) Boc-Phe und 7,08 ml (50,4 mMol) Triäthylamin versetzt und während 48 h bei 80° unter Rühren am Rückfluss gehalten. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches wurde das Boc-Phe-Harz mit Äthylacetat, Wasser, Methanol und Ather gewaschen und i.Vak. über KOH/P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bei 40° getrocknet. 20 mg des Aminosäureharzes wurden während 40 h in einem Dioxan:10N HCl-Gemisch (1:1, v/v) bei 110° i.Vak. hydrolysiert. Das Filtrat dampfte man ein und bestimmte Phe quantitativ. Aminosäure im Harz: 0,54 mMol/g Boc-Phe-Harz.

#### H-Ala-Ser-Phe·OH(O-Z-TF)\*

**Boc-O-Z-TF-Ser-Phe-Ⓢ.** 5,0 g Boc-Phe-Harz wurden in das Reaktionsgefäss nach Kusch<sup>16</sup> eingewogen und wie folgt behandelt:

#### Reaktionsschema

(1) Methylenchlorid	15 min	schütteln	
(2) Äthanol	3 ×	„	
(3) Eisessig	3 ×	„	
(4) 1N HCl in Eisessig	30 min	„	
(5) Eisessig	3 ×	„	
(6) Äthanol	3 ×	„	
(7) Methylenchlorid	3 ×	„	
(8) 10% Triäthylamin in Methylenchlorid	20 min	„	Chlorid nach
(9) Methylenchlorid	4 ×	„	Volhard: 2,715 mMol
(10) Zugabe von 13,6 mMol = 6'g (5-fache molare Menge des Volhard-Wertes) Boc-O-Z-TF-Ser in 30 ml CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20 min	„	
(11) dazu 15,0 ml 1 m DCCI in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	18 h	„	
(12) Methylenchlorid:Äthanol = 1:1	3 ×	„	
(13) Äthanol	3 ×	„	

Die Filtrate 8 und 9 werden gesammelt, eingedampft und für die Chlorid-Bestimmung nach Volhard verwendet. Pro Waschschrift wurden 50 ml Lösungsmittel verwendet. Die Schüttelzeit betrug, wenn nicht anders angegeben, 4 min pro Schritt.

**Boc-Ala-O-Z-TF-Ser-Phe-Ⓢ.†** Zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe von Boc-O-Z-TF-Ser-Phe-Ⓢ und Kupplung mit Boc-Ala wurde wieder das gleiche Reaktionsschema durchlaufen. Chlorid nach Volhard: 2,670 mMol Cl; Boc-Ala: 2,56 g (13,5 mMol = 5-fache molare Menge) in 30 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; DCCI: 15 ml 1 m DCCI in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; Kupplungszeit: 18 h.

\* Hydroxylschutzgruppe.

† Ⓢ = Kunstharz.

Nach der Kupplung (Schritt 11) wurde bis Schritt 13 weitergearbeitet, abgesaugt und i. Vak. über  $P_2O_5$  getrocknet.

**Ala-Ser-Phe-Hydrobromid.** Die Abspaltung der Schutzgruppen und Ablösung des Peptids vom Träger wurde mittels HBr in wasserfreier Trifluoressigsäure/10% Anisol während 1½ h vorgenommen. Die Trifluoressigsäure-Filtrate wurden am Rotationsverdampfer bei 20° eingedampft, der Rückstand dreimal mit je 20 ml Trifluoressigsäure versetzt und eingeeignet und in 100 ml Dimethylformamid aufgenommen. Das Peptid-Hydrobromid wurde durch Eintropfen in 2 l abs. Äther als flockiger, weisser Niederschlag ausgefällt. Nach Filtration unter Feuchtigkeitsausschluss wurde die Umfällung aus Dimethylformamid/Äther noch zweimal wiederholt.

**H-Ala-Ser-Phe-OH.** Das über  $P_2O_5$ /KOH getrocknete Peptid-Hydrobromid wurde in 0,1 m wässrigem  $NH_4HCO_3$ -Puffer (pH 8,0) gelöst und mit 0,5N  $NH_4OH$  auf pH 9,0 eingestellt. Die Trennung des Peptid-Ammoniumsalzes vom  $NH_4Br$  wurde an einer Sephadex-G-10-Säule (90 cm × 2,5 cm) mit 0,05 m  $NH_4HCO_3$ -Puffer als Elutionsmittel durchgeführt.

Nach dreimaliger Gefriertrocknung der ninhydrin-positiven Fraktionen lag das Peptid als weisses Pulver vor, Ausbeute: 0,690 g (74,8% d.Th., bezogen auf C-term. Phe im Harz); Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{25}$ : +33,2° (c 0,5 in HCOOH); Dünnschichtchromatographie:  $R_f$  BPEW 0,54,  $R_f$  SIMW 0,43,  $R_f$  SBAW 0,30; Elektrophorese: 500 V, 70 min; 3,5 cm gegen Kathode; pH 2,0.

#### Daten zur Synthese von H-Ala-Ser-Phe-OH (O-Bzl)

Harzmenge: 4,98 g Boc-Phe-Polymeres; Chlorid vor Ser-Kupplung: 2,70 mMol Cl; Chlorid nach Ser-Kupplung: 2,83 mMol Cl; Kupplungszeit: je 18 h; 1. Kupplung: 13,7 mMol (4,04 g) Boc-O-Bzl-Ser, 7,5 ml 2 m DCCI in  $CH_2Cl_2$ ; 2. Kupplung: 14,15 mMol (2,68 g) Boc-Ala, 7,8 ml 2 m DCCI in  $CH_2Cl_2$ ; Ausbeute: 0,595 g (65% d.Th., bezogen auf C-term. Phe im Harz); Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{25}$ : +31,4° (c 0,5 in HCOOH); Dünnschichtchromatographie:  $R_f$  BPEW 0,54,  $R_f$  SIM 0,43,  $R_f$  SBA 0,30; Elektrophorese: 500 V, 70 min; 3,5 cm gegen Kathode; pH 2,0.

#### Daten der Synthese von H-Ala-Thr-Phe-OH (O-Z-TF)

Harzmenge: 7,40 g Boc-Phe-Polymeres; Chlorid vor Thr-Kupplung: 4,12 mMol Cl; Chlorid nach Thr-Kupplung: 3,97 mMol Cl; Kupplungszeit: je 18 h; 1. Kupplung: 20,60 mMol (9,26 g) Boc-O-Z-TF-Thr, 11,33 ml 2 m DCCI in  $CH_2Cl_2$ ; 2. Kupplung: 20,0 mMol (3,78 g) Boc-Ala, 11,0 ml 2 m DCCI in  $CH_2Cl_2$ ; Ausbeute: 1,105 g (75,5% d.Th., bezogen auf C-term. Phe im Harz); Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{25}$ : +39,0° (c 0,5 in HCOOH); Dünnschichtchromatographie:  $R_f$  BPEW 0,54,  $R_f$  SIM 0,51,  $R_f$  SBA 0,33; Elektrophorese: 500 V, 70 min; 2,0 cm gegen Kathode; pH 2,0.

#### Daten zur Synthese von H-Ala-Thr-Phe-OH (O-Bzl)

Harzmenge: 7,66 g Boc-Phe-Polymeres; Chlorid vor Thr-Kupplung: 3,96 mMol Cl; Chlorid nach Thr-Kupplung: 3,89 mMol Cl; 1. Kupplung: 19,80 mMol (6,2 g) Boc-O-Bzl-Thr, 10,9 ml 2 m DCCI in  $CH_2Cl_2$ ; 2. Kupplung: 19,48 mMol (3,68 g) Boc-Ala, 10,71 ml 2 m DCCI in  $CH_2Cl_2$ ; Ausbeute: 1,12 g (80% d.Th., bezogen auf C-term. Phe im Harz); Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{25}$ : +32,8° (c 0,5 in HCOOH); Dünnschichtchromatographie:  $R_f$  BPEW 0,54,  $R_f$  SIM 0,51,  $R_f$  SBA 0,3; Elektrophorese: 500 V, 70 min; 2,0 cm gegen Kathode; pH 2,0.

**Danksagung**—Fräulein R. Machleidt danke ich für die ausgezeichnete technische Mitarbeit; Herrn Dr. W. Schulz, Fräulein U. Dahnke und Fräulein A. Zacher für die Durchführung der Aminosäure-Analysen.

#### LITERATUR

- 1 E. Bayer, G. Jung und H. Hagenmaier, *Tetrahedron* **24**, 4853 (1968).
- 2 P. Jollès und J. Jollès, *Helv. Chim. Acta* **51**, 980 (1968).
- 3 A. Marglin und R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 5051 (1966).
- 4 H. Zahn, T. Okuda und Y. Shimonishi, *Angew. Chem.* **79**, 424 (1967).
- 5 T. Mizoguchi, G. Levin, D. W. Woolley und J. M. Stewart, *J. Org. Chem.* **33**, 903 (1968).
- 6 E. Wünsch und H. Zwick, *Chem. Ber.* **97**, 2497 (1964).
- 7 F. Weygand, W. Steglich, F. Fraunberger, P. Pietta und J. Schmid, *Ibid.* **101**, 923 (1968).
- 8 R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149 (1963).

- <sup>9</sup> E. Schnabel, *Liebigs Ann.* **702**, 188 (1967).
- <sup>10</sup> R. Buijle und H. G. Viehe, *Angew. Chem.* **76**, 572 (1964).
- <sup>11</sup> F. Weygand, W. König, R. Buijle und H. G. Viehe, *Chem. Ber.* **98**, 3632 (1965).
- <sup>12</sup> F. Weygand, P. Huber und K. Weiss, *Z. Naturforschg.* **22b**, 1084 (1967).
- <sup>13</sup> A. S. van Mourik, E. Harryvan und J. F. Arens, *Rec. Trav. Chim.* **84**, 1 (1965).
- <sup>14</sup> W. Steglich, G. Höfle, W. König und F. Weygand, *Chem. Ber.* im Druck.
- <sup>15</sup> H. E. Schultze, N. Heimbürger und G. Frank, *Biochem. Z.* **336**, 388 (1962).
- <sup>16</sup> P. Kusch, *Kolloid-Z.* **208**, 138 (1966).
- <sup>17</sup> H. Zahn und E. Rexroth, *Z. Analyt. Chem.* **148**, 181 (1955).
- <sup>18</sup> L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4427 (1957).