

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### VYUŽITÍ MIKROVLNNÉ TECHNIKY PŘI ODŠTĚPOVÁNÍ ACIDOLABILNÍCH SKUPIN V CHEMII PEPTIDŮ

JAROSLAV ŠEBESTÍK<sup>a,b</sup>, JAN HLAVÁČEK<sup>a</sup>  
a IVAN STIBOR<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, <sup>b</sup>Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 10 Praha 6

Došlo dne 29.II.2000

Klíčová slova: chránící skupiny, štěpení, mikrovlnná technika

### Úvod

Acidolabilní chránící skupiny *terc*-butylového typu se využívají převážně při chránění aminokyselin v chemii peptidů, kdy se nejčastěji odštěpují působením trifluoroctové kyseliny. Do 30 min je tak možné provést deprotektci *N-terc*-butyloxykarbonylové nebo *terc*-butylové chránící skupiny esterové funkce, zatímco odštěpení *terc*-butylové chránící skupiny hydroxylové funkce zpravidla vyžaduje delší reakční dobu<sup>1</sup>. Deprotekci aminoskupiny vznikají trifluoracetáty potlačující její nukleofilnost, kterou je nutno před případnou acylační reakcí obnovit neutralizací příslušnou bází. Bylo však již také popsáno, že u některých *N-terc*-butyloxykarbonylových derivátů dochází k odštěpování chránící skupiny za vzniku volné aminoskupiny pomocí mikrovlnného (MW) záření v přítomnosti silikagelu<sup>2</sup>.

Pokusili jsme se proto tuto metodu aplikovat na chráněné deriváty aminokyselin, případně peptidů, neboť v této oblasti je *terc*-butylová skupina jednou z nejpoužívanějších při přechodném i permanentním chránění reaktivních skupin.

Dále nás zajímalo, zda je možné působením mikrovlnného záření výrazněji ovlivnit poměrně malý rozdíl v odštěpování jednotlivých typů *terc*-butylového chránění, to znamená, zda tato metoda poskytuje možnost selektivního odštěpení *N*-Boc skupiny vedle *t*-Bu chránící skupiny esterové či hydroxylové funkce.

Vzhledem k tomu, že použité zařízení na generaci mikrovlnného záření mělo ve srovnání s publikovanými údaji (450 W) nižší výkon (300 W), bylo nutné metodiku odštěpení chránících skupin pomocí MW modifikovat dále uvedenými postupy.

Při našich experimentech jsme využili možnosti zvolit výkony 150 W, 180 W a 270 W a různé časové periody při ohřevu reakční směsi složené z příslušně chráněné aminokyseliny a silikagelu nebo oxidu hlinitého. Energie aplikovaného záření byla vyjadřována v kW.min.

### Experimentální údaje

Vzorky pro obě metody byly připravovány rozpuštěním 1 mmol příslušné látky ve 30 ml methanolu. Po přidání 10 g nosiče (silikagel nebo oxid hlinitý) bylo rozpouštědlo odpařeno a zbytek po vpravení do nádoby přístroje ozařován MW o různém výkonu po dobu stanovenou jednotlivými experimenty. Stupeň konverze reakce byl určen pomocí HPLC na koloně LiChroCART WP 300 RP-18 (5  $\mu$ m; Merck, SRN), za použití gradientu mobilní fáze 0–100 % ACN v 0,0 5% TFA za 1 hod, při průtoku 1 ml.min<sup>-1</sup>. Pro studii byl použit přístroj SyntheWave 402 Prolabo s výkonem na výstupu 300 W (spin +5), laskavě zapůjčený firmou Merck spol. s r.o., Praha.

### Metody P1, P2

Při pulsní metodě P1 se pracovalo v otevřené nádobě při teplotě vzorku do 100 °C, kdy docházelo ke kolísání vlhkosti silikagelu. Jedna 20 min dávka se skládala z 20 pulsů, z nichž každý trval 10 s při výkonu 150 W. Po něm pak následovala 50-ti sekundová prodleva bez aplikovaného záření. Jelikož při opakování metody P1 docházelo k poklesu maximální teploty až o 10 °C, byl při pulsní metodě P2 výkon pulsů zvýšen na 180 W.

### Metoda X

Tato metoda byla uplatněna po zjištění nízké efektivity pulsních metod při tvorbě primární aminoskupiny z prekursoru chráněného skupinou Boc. Vzorek látky byl vystaven působení MW o výkonu 270 W po dobu 6 min, kdy se vzorek začal rychle zahřívat. Jeho teplota, celkově závisající na způsobu úpravy silikagelu, nepřesáhla 146 °C.

### Výsledky a diskuse

Výsledky experimentů jsou souhrnně uvedeny v tabulce I. Z ní vyplývá, že odštěpování chránících skupin *terc*-butylového typu závisí na struktuře chráněné aminokyseliny nebo sekvenci příslušného peptidu.

Na silikagelu jako nosiči byl zaznamenán 65 % úbytek Boc-Trp-OH za vzniku pouze 29 % odchráněné aminokyseliny a 36 % produktů vedlejších reakcí patrně na postranním řetězci tryptofanu. Na druhé straně deprotektce dipeptidu Boc-Pro-Ala-OMe za vzniku sekundární aminoskupiny proběhla čistě s výtěžkem 60 % a odštěpení *terc*-butyl esterové skupiny u Fmoc-Asp(O*t*-Bu)OH rovněž s výtěžkem 60 %. V ostatních případech proběhlo odštěpení N<sup>α</sup>-Boc chránící skupiny u Boc-Phe-OH, Boc-Trp(For)-OH a tetrapeptidu Boc-Tyr-Asp(OBzl)-Pro-Ala-OMe pouze s výtěžkem 34 %, 28 % a 27 %, přičemž i v případě tryptofanu s chráněným indolovým kruhem bylo zjištěno poměrně vysoké, 5 % zastoupení vedlejších produktů.

Zároveň byla zjištěna vysoká rezistence *terc*-butyl etherové skupiny u Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH, kde štěpení za standardních podmínek probíhalo jen z 3 %, zatímco odštěpení stejné

skupiny z fenolického postranního řetězce Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH proběhlo z 15 %. Poměr v odštěpování N<sup>α</sup>-Boc nebo *t*-Bu chránící skupiny esterové funkce a *t*-Bu chránící skupiny hydroxylové funkce dosahující maximálně jednoho řádu zhruba odpovídá poměru dosaženému při 100 % odštěpení Boc skupiny (30 min) pomocí TFA.

Experimenty se zvyšováním dodané MW energie a prodlužováním doby MW radiace u Boc-Phe-OH (tabulka II, obrázek 1) s cílem zjistit podmínky, při kterých je deprotektce nejvyšší, ukázaly na postupné snižování obsahu původního

Tabulka I

Složení reakční směsi po dávce mikrovlnného záření při metodě X, P1 a P2

Látka	X <sup>a</sup>	P1 <sup>a</sup>	P2 <sup>a</sup>	b	c	d
Nosič silikagel						
Boc-Phe-OH	1	2	0	66	30	4
Boc-Pro-Ala-OMe	0	5	0	39,9	60	0,1
Boc-Tyr-Asp(OBzl)-Pro-Ala-OMe	0	5	0	73	25	2
Boc-Trp-OH	2	0	0	35	29	36
Boc-Trp(For)-OH	2	0	0	72	23	4,6
Fmoc-Gly-OH	0	4	1	100	0	0
Fmoc-Ser( <i>t</i> -Bu)-OH	0	5	0	96,9	3	0,1
Fmoc-Tyr( <i>t</i> -Bu)-OH	0	5	0	84,7	15	0,3
Fmoc-Asp(O <i>t</i> -Bu)-OH	0	5	0	37	60	3
Z-D-Ala-OH	0	5	0	100	0	0
Nosič oxid hlinitý						
Boc-Phe-OH	2	0	0	100	0	0
Z-D-Ala-OH	2	0	0	100	0	0
Fmoc-Gly-OH	2	0	0	55	2,8	42,2

<sup>a</sup> Počet ozáření vzorku, <sup>b</sup> % výchozí látky, <sup>c</sup> % ochráněného produktu reakce, <sup>d</sup> % vedlejších produktů

chráněného derivátu v reakční směsi až na 1,2 %. Současně však při tom docházelo k degradaci ozařovaného materiálu, takže při maximálním dosaženém výtěžku odblokovaného Phe ve výši 77 % bylo v reakční směsi přítomno i 23 % vedlejších produktů. Dále bylo potvrzeno, že N-Fmoc i N-Z chránící skupiny jsou rezistentní vůči MW záření za použitých experimentálních podmínek.

Když byl jako nosič použit místo silikagelu oxid hlinitý, nedocházelo k odštěpování ani N-Boc chránící skupiny. Fmoc-Gly-OH však byl ze 45 % modifikován převážně na vedlejší produkty (42 % v reakční směsi) neobsahující volnou primární aminoskupinu.

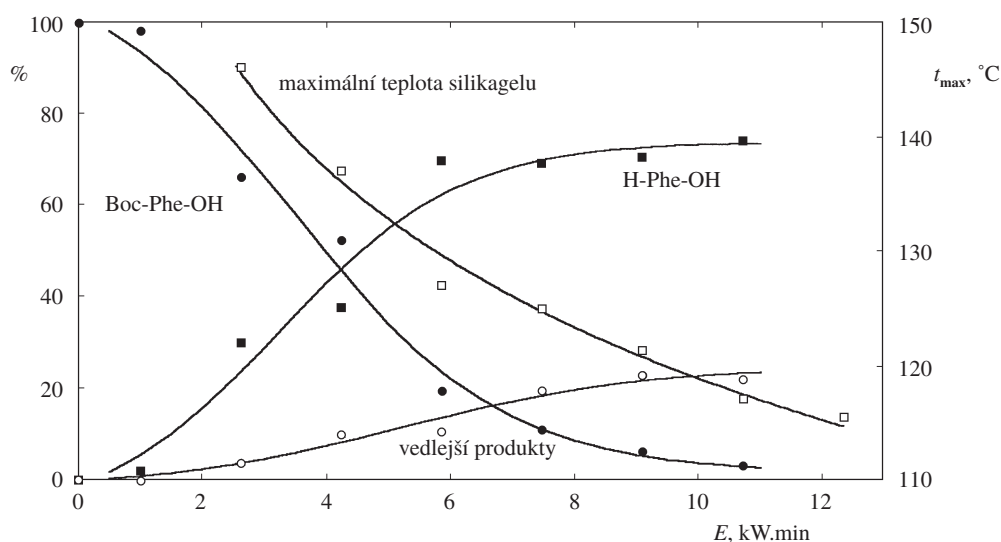
Jelikož bylo také popsáno, že Boc skupina je štěpena během 1 hod ve vodě za varu<sup>3</sup>, provedli jsme srovnávací experiment, při němž byl Boc-Phe-OH nanesen na silikagel a vystaven teplotě 100 °C po dobu 2 hod (doba 6 experimentů P1) bez přítomnosti MW záření. Po extrakci methanolem však vzorek obsahoval pouze původní Boc-Phe-OH.

Tabulka II

Deprotektce Boc-Phe -OH

Metoda	a	b	c	d	<i>t</i> <sub>max</sub> /°C
P1 <sup>e</sup>	1,00	98,0	1,9	0,1	100 <sup>f</sup>
X	2,62	66,0	30,0	4,0	146,0
X	4,24	52,3	37,6	10,1	137,0
X	5,86	19,5	69,7	10,8	127,0
X	7,48	11,2	69,0	19,8	125,0
X	9,10	6,3	70,5	23,2	121,4
X	10,72	3,4	74,2	22,4	117,2
X	12,34	1,2	76,0	22,8	115,6

<sup>a</sup> Energie záření v kW.min, <sup>b</sup> % výchozí látky, <sup>c</sup> % ochráněného produktu reakce, <sup>d</sup> % vedlejších produktů [100 % – (b + c)], <sup>e</sup> metoda byla aplikována dvakrát, <sup>f</sup> metoda P1 jen do teploty 100 °C



Obr. 1. Závislost složení reakční směsi a maximální reakční teploty na dávce mikrovlnného záření

**Závěr**

Závěrem lze konstatovat, že v oblasti aminokyselin a peptidů umožňuje MW záření za určitých experimentálních podmínek štěpení chránících acidolabilních skupin *terc*-butylového typu v závislosti na povaze aminokyseliny nebo peptidové sekvenci.

K dosažení maximálního odštěpení N-Boc nebo *t*-Bu skupiny je však zapotřebí několikanásobně prodloužit reakční dobu, resp. několikanásobně opakovat dávky MW záření, po nichž je v reakční směsi detegován vysoký obsah vedlejších produktů.

Selektivita mezi štěpením N<sup>α</sup>-Boc nebo *t*-Bu chránící skupiny esterové funkce a *t*-Bu chránící skupiny hydroxylové funkce v rámci jednoho řádu je srovnatelná se štěpením pomocí TFA. Proto praktický význam použití MW techniky při odštěpování chránících skupin *t*-Bu typu u peptidů bude patrně omezen jen na některé speciální případy deprotektce, při nichž nelze použít TFA, případně nelze provést následnou neutralizaci vzniklého trifluoracetátu působením terciární báze.

**Použité zkratky**

ACN	acetonitril
Boc	<i>terc</i> -butyloxykarbonyl
For	formyl
Fmoc	fluorenylmethoxykarbonyl
MW	mikrovlny
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
OBzl	benzylester
<i>Ot</i> -Bu	<i>terc</i> -butylester
OMe	methylester
<i>t</i> -Bu	<i>terc</i> -butyl

TFA	trifluoroctová kyselina
Z	benzyloxykarbonyl

*Studie byla finančně podpořena granty Grantové agentury České republiky č. 203/98/1330 a 203/00/0955.*

**LITERATURA**

1. Wunsch E., v knize: *Synthese von Peptiden, Methoden der organischen Chemie* (Houben-Weyl), sv. I, str. 46. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974.
2. Siro J. G., Martín J., García-Navío J. L., Remuñan M. J., Vaquero J. J.: *Synlett* 1998, 147.
3. Bailey W. J., Griffith J. R.: *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* 5(1), 279 (1964).

**J. Šebestík<sup>a,b</sup>, J. Hlaváček<sup>a</sup>, and I. Stibor<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic*, <sup>b</sup>*Department of Organic Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Utilization of Microwave Technique for Cleavage of Acid-Labile Groups in Peptide Chemistry**

We report on our findings concerning the microwave-assisted silica gel removal of Boc and *t*-Bu groups protecting  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> and COOH groups in amino acids and peptides, and also on selectivity of this deprotection to OH-protecting *t*-Bu groups. To obtain high conversions in deprotection, increased microwave doses and prolongation of the reaction time are required. As a consequence, relatively large amounts of side products were detected. The microwave radiation could possibly be utilized in deprotection of peptides when the trifluoroacetic acid cleavage and subsequent neutralization of the acid with a tertiary base have to be avoided.