

치오포스포티로신을 함유한 펩티드 유도체의 중간체 합성

김은경 · 최희성* · 이웅석*
영남대학교 약학대학, *동국제약 중앙연구소
(Received July 30, 1997)

Synthesis of the Key Intermediate for the Preparation of Thiophosphotyrosine-containing Peptide Derivatives

Eun-kyung Kim, Heesung Choi* and Eung-Seok Lee*
College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea
*Dong Kook Pharm. Co., Central Research Institute, Chungbuk 365-830, Korea

Abstract—*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*O*-(dicyanoethylthiophosphono)-L-tyrosine(7), the key intermediate for the synthesis of thiophosphotyrosine-containing peptide derivatives, was prepared. For the phosphorylation, we used *t*-Boc-tyrosine and phosphoramidite in the presence of 1*H*-tetrazol. For the protection of thiophosphate moiety, cyanoethyl protecting group was used. Thiophosphotyrosine-containing peptides could be used as tools for the elucidation of mechanism of signal transduction pathway and also prepared as PTK inhibitors, PTPase inhibitors and cytosolic protein binding blockers. It may be contributed for the development of potential anticancer agents.

Keywords □ thiophosphotyrosine, peptide synthesis, phosphorylation, signal transduction pathway.

세포의 성장과 증식은 세포내외의 조절 인자에 의한 신호전달경로(signal transduction pathway)를 통하여 조절되며 이러한 경로에 이상이 생길 경우 암 등의 질병이 유발될 수 있다.^{1,2)} 이러한 신호전달경로에서, 티로신을 함유한 펩티드나 단백질의 인산화 및 탈인산화 반응은 관련 효소 및 수용체 등을 활성화시키며 신호 전달에 관련된 단백질간의 결합 및 상호작용에 중요하며, 또한 세포증식과 분화 등에 관여한다고 보고되어 있다.³⁻⁵⁾ 티로신을 함유한 펩티드와 단백질의 인산화 및 탈인산화 반응은 티로신의 페놀성 히드록시기에서 관련 효소에 의하여 반응되며, protein tyrosine kinase (PTK)에 의하여 티로신과 인산이 반응하여 인산화된다.^{6,7)} 탈인산화 반응의 경우 phosphotyrosine을 함유한 단백질에 poetin tyrosine phosphatase(PTPase)에 의하여 인산기가 가수분해된다.^{8,9)} 또한 phos-

photyrosine을 함유한 단백질은 phosphotyrosine에 선택적으로 결합할 수 있는 SH-2 domain을 지닌 단백질과 결합하여 상호작용을 함으로써 신호전달경로를 조절한다.^{10,11)} 따라서 이에 관련된 여러 효소 및 단백질이 종양 발현에 관여하므로 이들 효소의 저해제 개발이 많이 연구되고 있고, 특히 티로신 유도체를 함유한 펩티드는 항암제 개발을 위한 연구의 관심이 되고 있다.^{12,13)}

티로신 대신 phosphotyrosine 및 phosphotyrosine유도체를 함유한 펩티드는 기질과 구조적으로 유사하므로 효소 및 수용체에 있는 촉매부위(catalytic site)와 phosphotyrosine과의 상호작용에 의해 효소의 기능을 저해할 수 있다.¹⁴⁾ 따라서 종양의 발현에 관련되는 여러 효소의 저해제 즉, PTK의 저해제^{13,15)}, PTPase의 저해제¹⁶⁾ 혹은 cytosolic protein의 결합을 방지하는 차단제¹⁷⁾로 사용할 수 있으며, 궁극적으로 항암제 개발과도 관련이 있다. 그러나, phosphotyrosine은 세포내에 존재하는 탈인산가수분해효소(phosphatase)에 의해 쉽게 가수분해되어 티로신으로 전환되므

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 053-810-2827 (팩스) 053-811-3871

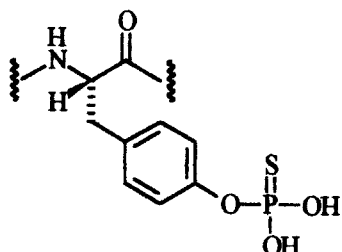


Fig. 1

로 저해제 혹은 차단제로서의 기능을 쉽게 상실하게 된다.¹⁷⁾ 따라서 인산기 대신 thiophosphate로 치환된 thiophosphono-L-tyrosine을 함유한 펩티드유도체를 사용한다면 탈인산가수분해효소(phosphatase)에 의한 가수분해를 억제할 수 있다(Fig. 1). 이에 thiophosphotyrosine을 함유한 펩티드유도체의 합성에 필수적인 중요한 중간체로서, *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*O*-(dicyanoethylthiophosphono)-L-tyrosine(7)을 합성하였다.

실 험

시약및 기기

본 실험에 사용한 시약은 Aldrich, Sigma 및 전문 시약회사 일급시약을 사용하였으며, 반응용기는 110°C에서 건조하여 사용하였고 모든 반응은 argon gas로 치환된 상태에서 시행되었다. 액체시료는 주사기를 이용하여 적가하고, 용매는 실험하기 바로 전에 증류하여 사용하였다. TLC는 Merck사의 Kieselgel 60F-254를 사용하여 UV 254 nm 및 I₂ 발색으로 확인하였고 column chromatography는 Kieselgel 60(70~230 mesh, 230~400 mesh, Merck)를 사용하였다. 용점은 electrothermal 1A 9100 digital melting point apparatus로 측정하였고 이에 대한 보정은 하지 않았다. ¹H NMR spectra는 tetramethylsilane를 내부표준물질로 하여 CDCl₃를 용매로 하여 Bruker ARX 300(300 MHz, FT)로 측정하였다.

실험방법

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-tyrosyl *p*-nitrobenzyl ester (2) - *t*-Boc-L-tyrosine(1, 10.0 g, 35.6 mmol)과 triethylamine(10 ml, 71 mmol)을 argon gas 존재하에서 ethyl acetate 107 ml에 녹인 후 80~90°C

에서 환류하고, 혼합액을 상온으로 식힌 후 *p*-nitrobenzyl bromide(15.4 g, 71 mmol)를 가하고 다시 80~90°C에서 16시간 교반하였다. 생성된 연노랑색의 triethylamine · HBr 침전물을 여과하여 제거하고, ethyl acetate(30 ml)로 세척한 후 유기층을 1N HCl(2×30 ml)과 증류수(30 ml), 5% NaHCO₃(2×30 ml) 및 포화 식염수(20 ml)로 세척하였다. 무수 MgSO₄로 건조하고, 여과, 감압 농축하여 얻은 오일상을 EtOAc/hexane(3:7, v:v) 72 ml에 재결정하여 생성된 고체를 다시 EtOAc/hexane(1:4, v:v)으로 재결정하여, 무색의 침상결정(13.9 g, 93.5%)을 얻었다.

mp 97~98°C(lit.¹⁸⁾ 111°C); TLC (silica gel, EtOAc/hexane=1:1, v:v), R_f 0.40; ¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ 8.21(d, 2H, aromatic), 7.40(d, 2H, aromatic), 6.92(d, 2H, aromatic), 6.73(d, 2H, aromatic), 5.59(bs, 1H, -OH, exchangeable with D₂O), 5.20(s, 2H, -CH₂), 5.02(d, 1H, -NH), 4.71(q, 1H, -CH), 3.02(d, 2H, -CH₂), 1.42(s, 9H, -CH₃).

N, *N*-Diethylphosphoroamidous dichloride (3) - Phosphorus trichloride(34.4 g, 21.9 ml, 0.25 mol)를 무수 diethyl ether(150 ml)에 녹이고 0°C 이하의 온도를 유지한 상태에서 교반하며 diethylamine(36.5 g, 51.6 ml, 0.50 mol)을 적가하였다. 혼합액을 20°C로 가온한 후 3시간동안 교반하였다. 생성된 흰색 침전물(diethylamine · HCl)을 여과하고, 여과된 diethylamine · HCl을 무수 diethyl ether(4×50 ml)로 세척한 후 여액을 감압 농축하여 얻은 액체를 감압 증류하여 순수한 무색 액체(33.41 g, 76.9%)를 얻었다.

bp 72~75°C/14 torr (lit.¹⁹⁾ 62°C/7 torr)

Dicyanoethyl *N*, *N*-diethylphosphoramidite (4) - 3-Hydroxypropionitrile(25.58 g, 24.60 ml, 0.360 mol)과 triethylamine(38.64 g, 53.22 ml, 0.382 mol)을 무수 diethyl ether(150 ml)에 녹이고, 이 혼합액을 *N*, *N*-diethylphosphoroamidous dichloride(3, 30.51 g, 0.175 mol)의 무수 diethyl ether 용액(100 ml)에 약 40분 간에 걸쳐 가하며 교반하였으며 반응액의 온도는 0°C 이하를 유지하였다. 혼합액의 온도를 상온으로 하고 3시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 혼합액에 5% NaHCO₃ 용액(70 ml)을 가한 후 분액 깔대기로 옮겨 수층을 제거하고, ether층을 5% NaHCO₃ 용액(2×60 ml)과 포화 식염수(60 ml)로 세척한 후 무수 MgSO₄로 건조, 여과, 감압 농축하여 무

색 오일(37.93g, 89.1%)을 얻었으며 더 이상의 정제 과정없이 다음 단계 반응에 사용하였다.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.08(t, 6H, $J_{\text{H}}=7.5$ Hz), 2.67(t, 4H, $J_{\text{H}}=6.5$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CN}$), 3.09(m, 4H, $J_{\text{H}}=7.5$ Hz, $J_{\text{P-N-C-H}}=10.0$ Hz, $\text{N}-\text{CH}_2$), 3.87(m, 4H, $J_{\text{H}}=6.5$ Hz, $J_{\text{H}}=7.5$ Hz, $J_{\text{P-O-C-H}}=10.5$ Hz, $\text{O}-\text{CH}_2$)

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*O*-(dicyanoethylthiophosphono)-*L*-tyrosyl *p*-nitrobenzyl ester (6) - *t*-Boc-*L*-tyrosyl *p*-nitrobenzyl ester(2, 5.00 g, 12.01 mmol)와 dicyanoethyl *N*, *N*-diethyl-phosphoramidite(4, 3.14 g, 12.91 mmol)를 무수 THF(40 ml)에 녹여 교반한 후 1*H*-tetrazole(2.30 g, 32.83 mmol)을 가하고 상온에서 15분간 교반하였다. 혼합액을 0°C로 냉각한 후, carbon disulfide(CS_2) (40 ml)에 녹인 황(0.42 g, 13.13 mmol)용액을 가하고 상온에서 2시간 교반하였다. 혼합액에 10% NaHSO_3 (70 ml)를 가하여 10분간 교반한 후 분액 깔대기에 옮겨, 유기층은 감압농축하여 ethyl acetate(20 ml)에 녹이고, 수층은 ethyl acetate(3×20 ml)로 추출하여 유기층의 ethyl acetate용액에 합하였다. Ethyl acetate용액을 10% NaHSO_3 (2×20 ml), 5% NaHCO_3 (2×20 ml), 물(20 ml), 포화 식염수(20 ml)로 세척하고, 무수 MgSO_4 로 건조, 여과, 감압농축하여 오일상의 물질(6.56 g)을 얻었다. Column chromatography(silica gel, 230~400 mesh, EtOAc/hexane=1:2, v:v)로 정제하여 연노랑 오일(4.87 g, 65.6%)을 얻었다.**

TLC(silica gel, EtOAc/hexane=1:1, v:v), Rf 0.27; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) 1.43(s, 9H), 2.81(m, 4H, CH_2-CN), 3.08(d, 2H, CH_2-C), 4.38(m, 4H, CH_2-O), 4.62(q, 1H, CH), 5.07(d, 1H, NH), 5.20(q, 2H, $-\text{CH}_2-\text{O}$), 7.09(s, 4H, aromatic), 7.40(d, 2H, aromatic), 8.21 (d, 2H, aromatic)

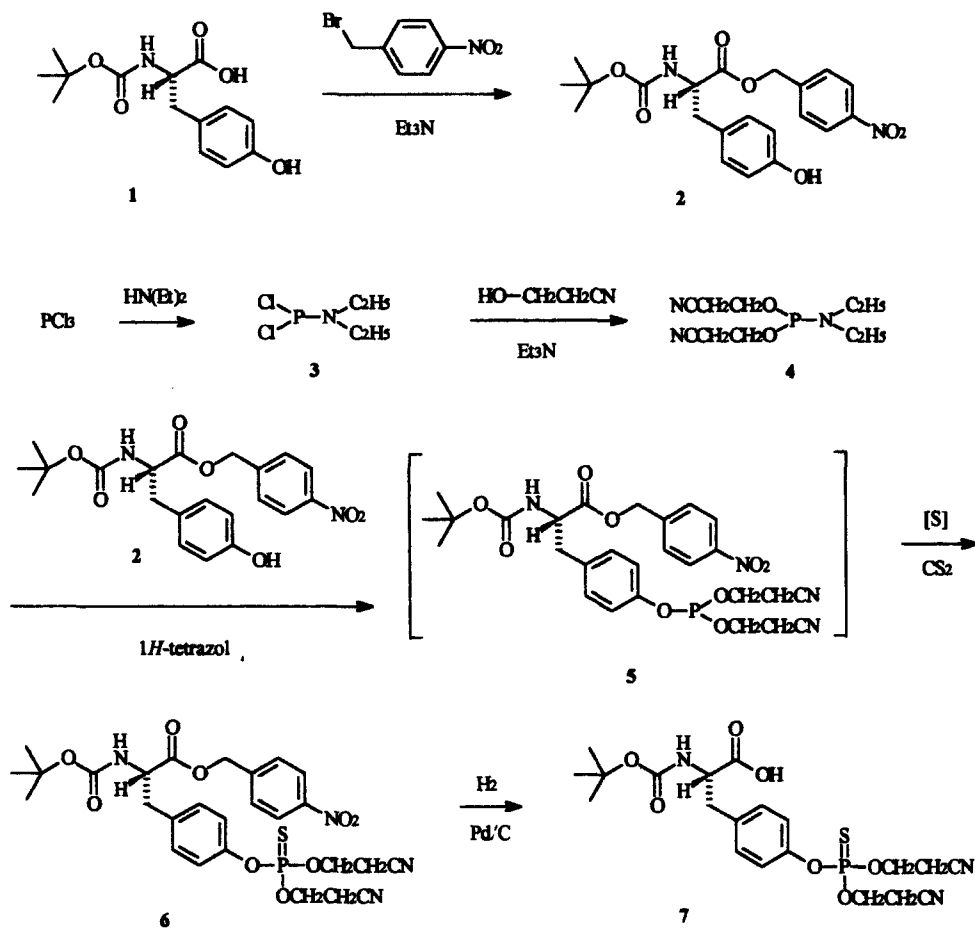
***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*O*-(dicyanoethylthiophosphono)-*L*-tyrosine (7) - Methanol(40 ml)에 acetic acid(3.0 ml)를 가하고, *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*O*-(dicyanoethylthiophosphono)-*L*-tyrosyl *p*-nitrobenzyl ester(6, 1.26 g, 2.04 mmol)을 녹인 후, 10% Pd/C 존재하에 대기압으로 상온에서 12시간동안 hydrogenolysis하였다. 반응액을 여과한 후 감압농축한 잔사를 ethyl acetate(50 ml)로 희석하고 1*N* HCl(2×15 ml)과 물(15 ml)로 세척하였다. 5% NaHCO_3 (3×15 ml)로 목적 화합물을 추출하고, 수층**

을 diethyl ether(15 ml), ethyl acetate(15 ml)로 세척하였다. 0°C에서 1*N* HCl로 수층의 액성을 pH2로 조정한 후 ethyl acetate(3×15 ml)로 추출하고 1*N* HCl(15 ml), 물(15 ml), 포화 식염수(10 ml)로 세척하였다. 무수 MgSO_4 로 건조하고 여과, 감압 농축하여 얻은 오일을 column chromatography(silica gel, 230~400 mesh, EtOAc/hexane/AcOH=60:30:5)로 정제하여 무색의 오일(0.50 g, 50.7%)을 얻었다.

TLC(silica gel, EtOAc/hexane/acetic acid=60:30:5, v:v), Rf 0.35; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) 1.44(s, 9H), 2.79(q, 4H), 3.11(m, 2H), 4.39(m, 4H), 4.59(q, 1H), 5.08(d, 1H), 7.18(m, 4H)

결과 및 고찰

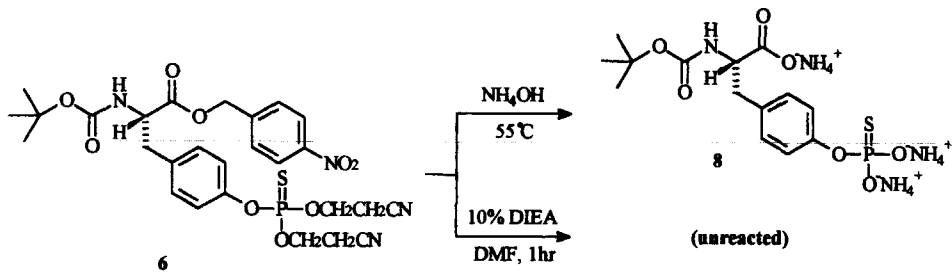
펩티드의 일반적인 화학적 합성방법으로는 *t*-Boc(*tert*-butoxycarbonyl) chemistry^{20, 21}와 Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl) chemistry^{22, 23}가 널리 사용되고 있으며, 본 연구에서는 좀 더 보편화되고 시약의 가격이 상대적으로 저렴한 *t*-Boc chemistry를 이용하였다. 따라서, 티로신 모체 내에 있는 아미노기를 *tert*-butoxycarbonyl기로 보호한 *t*-Boc tyrosine(1)을 출발물질로 하였다(Scheme I). *t*-Boc tyrosine(1)에 thiophosphate기를 도입하기 전에 triethylamine과 *p*-nitrobenzyl bromide를 가하여 반응하여 카르복시기를 *p*-nitrobenzyl기로 보호한 물질 2를 93.5% 수득률로 얻었다.¹⁸ 펩티드 합성시 발생할 수 있는 부반응을 방지하기 위하여 thiophosphate모체를 cyanoethyl 기로 보호하였다.^{24, 25} Thiophosphate의 보호에 사용한 cyanoethyl기는 주로 DNA합성에 광범위하게 사용되는 보호기로서²⁶⁻²⁹ 산에는 상당히 안정하나 염기에는 쉽게 분해되는 특성이 있다.²⁶ *t*-Boc chemistry를 이용한 펩티드 합성에서는 아미노기의 보호기를 탈보호하는 단계에서 33% trifluoroacetic acid(TFA)의 염화메틸렌 용액이 사용되므로, 산에 안정한 cyanoethyl기를 사용하여 상대적으로 발생 가능한 부반응을 억제하였다. 또한, TFA로 탈보호한 후 생성되는 amine·TFA염을 free amine으로 하기위한 neutralizing제제로써 10% *N,N*-diisopropylethylamine(DIEA)을 사용하는데, cyanoethyl기는 DIEA에 안정하다는 사실을 모델실험을 통해 인지할 수 있었다. Cyanoethyl기로 보호된 thiophosphate의 탈보호 반응에 사용되는 일반적인 시



Scheme I

약으로는 NH₄OH를 이용하며, 역시 모델실험을 통하여 NH₄OH에 의한 탈보호 반응이 쉽게 진행됨을 알 수 있었다. 인산기의 보호에 사용되는 다른 보호기로는 메틸기가 자주 사용되었으며, 본 연구에서도 thiophosphate의 보호기로 사용될 수 있는 대상이 되었으나, 모델실험을 통한 탈보호 반응에서 문제점이 발견되어 사용하지 않았다.³⁰⁾ 인산화를 위한 제제로써 phosphoramidite를 이용하여 인산화한 후 황으로 산화시키는 방법을 도입하였으며,^{19, 31, 32)} 인산화(phosphorylating) 제제인 dicyanoethyl *N,N*-diethylphosphoramidite (4)를 합성하기 위하여, phosphorus trichloride와 diethylamine과 반응하여 중간체 3을 합성한 후, triethylamine 존재하에 hydroxypropionitrile과 반응하여 phosphoramidite 4를 68.5%의 수득률로 합성하였다. Dicyanoethyl *N,N*-diethylphosphoramidite (4)는 상대적으로 불안정하므로 합성후 더 이상의 정제

과정 없이 다음 반응에 이용하였다. 중간물질 6의 합성은, phosphoramidite 4와 1H-tetrazol의 존재하에 *t*-Boc-L-tyrosyl *p*-nitrobenzyl ester(2)와 반응하여 중간체 5를 얻은 후 바로 황으로 인 모체를 산화시켜 *t*-Boc-(dicyanoethylthiophosphono)-L-tyrosyl *p*-nitrobenzyl ester(6)을 chromatography로 정제 후 65.6%의 수득률로 얻었다. 물질 6의 경우 ¹H NMR spectrum에서 thiophosphate의 보호기인 cyanoethyl기에 기인한 2개의 새로운 peak(2.81 ppm, 4.38 ppm)가 관찰되었고, 인과 수소의 coupling에 의한 P-O-C-H의 coupling constant 10.5Hz를 확인할 수 있었다. 최종 목적물 7은 물질 6을 가수분해(hydrogenolysis) 반응하여 50.7%의 수득률로 합성하였다. 일반적으로 가수분해반응은 90% 이상의 수득율을 얻는데 반하여, *p*-nitrobenzyl기를 제거하기 위한 가수분해 단계에서는 오랜 반응 시간과 50.7%의 낮은 수득률로써 최종 물질



Scheme II

을 얻었다. 이는 thiophosphate moiety의 황이 촉매독으로 작용하기 때문으로 사료된다.³³⁾ 탈보호 단계에서의 낮은 수득율을 개선하기 하여 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 와 Na_2CO_3 의 혼합물을 이용한 반응^{34, 35)} 및 4.4% formic acid와 Pd/C을 사용한 catalytic transfer hydrogenation 반응³⁶⁾을 시도하였으나 개선되지 않았다.

다양한 시약과 제제를 필요로 하는 펩티드 합성 과정에서, 중간체 7의 적합성 및 안정성을 확인하고 thiophosphate의 보호기를 선택적으로 간편하게 제거할 수 있는 제제 및 이의 조건을 개발하기 위하여 중간체 6을 이용한 모델 반응을 시도하였다(Scheme II). 중간체 6의 cyanoethyl 보호기의 제거를 위하여 conc. NH_4OH 용액에 55°C 에서 12시간 반응을 시도하였으며, 이 결과 다른 보호기에 영향을 미치지 않고 제거가 된 물질 8을 확인할 수 있었다. 또한 cyanoethyl 보호기의 DIEA에 대한 안정성을 실험하기 위하여 중간체 6을 DMF에 용해된 10% DIEA 용액에 상온에서 1시간 반응하였으며²²⁾, 이는 solid phase peptide 합성 과정에서 20번의 cycle에 해당하는 시간과 동일한 조건에서 시행하였다. 이 결과 cyanoethyl 보호기가 이 조건에서 안정한 것을 ^1H NMR로 확인할 수 있었다.

결 론

t-Boc tyrosine(1)을 출발물질로 하여 phosphoramidite와 1H-tetrazole에 의한 인산화 반응, 황을 이용한 산화반응 등으로 thiophosphotyrosine을 함유한 펩티드 유도체 합성에 필요한 중요한 중간체인 *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*O*-(dicyanoethylphosphono)-*L*-tyrosine(7)을 무색의 오일상으로 전체 수득율 31.1%로 합성하였다. Thiophosphate의 보호기로는 cyanoethyl기를 사용함으로써, *t*-Boc chemistry를 이용한 펩

티드 합성과정에서의 적합성과 안정성을 증가시켰으며, 최종 단계인 탈보호 반응의 간편성을 확인하였다. 중간체 7을 이용하여 thiophosphotyrosine을 함유한 다양한 펩티드 유도체를 합성함으로써, 신호전달에 관련된 생화학적 작용기전을 규명할 수 있는 도구로 사용될 수 있고 또한 PTK의 저해제, PTPase의 저해제 및 cytosolic protein의 결합을 방지하는 차단제의 개발 및 궁극적으로 항암제 개발에 기여하리라 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 1994학년도 영남대학교 학술연구조성비에 의하여 수행되었으므로 이에 감사하는 바입니다.

문 헌

- 1) Cantly, L. C., Auger, K. R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R. and Soltoff, S. : Oncogenes and signal transduction. *Cell* **64**, 281 (1991).
- 2) Hollywood, D. : Signal transduction. *Brit. Med. Bull.* **47**, 99 (1991).
- 3) Gullick, W. J. : Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor receptor in human cancers. *Brit. Med. Bull.* **47**, 87 (1991).
- 4) Konopka, J., Watanabe, S. M. and Witte, O. N. : An alteration of the human *c-abl* protein in K 562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell* **37**, 1035 (1984).
- 5) Clark, S. S., McLaughlin, J., Timmons, M., Pendergast, A. M., Ben-Neriah, Y., Dow, L. W., Crist, W., Rovera, G., Smith, S. D. and Witte,

- O. N. : Expression of a distinctive BCR-ABL oncogene in Ph1-positive acute lymphocytic leukemia (ALL). *Science* **239**, 775 (1988).
- 6) Bishop, J. M. : Cellular oncogenes and retroviruses. *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 301 (1983).
 - 7) Hunter, T. and Cooper, J. A. : Protein-tyrosine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 897 (1985).
 - 8) Hunter, T. : Protein-tyrosine phosphatases: the other side of the coin. *Cell* **58**, 1013 (1989).
 - 9) Tonks, N. K. and Charbonneau, H. : Protein-tyrosine dephosphorylation and signal transduction. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 497 (1989).
 - 10) Koch, C. A., Anderson, D., Moran, M., F., Ellis, C. and Pawson, T. : SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* **252**, 668 (1991).
 - 11) Matsuda, M., Mayer, B. J., Fukui, Y. and Hanafusa, H. : Binding of transforming protein, P47gag-crk, to a broad range of phosphotyrosine-containing proteins. *Science* **248**, 1537 (1990).
 - 12) Tritton, T. R. and Hickman, J. A. : How to kill cancer cells: membranes and cell signaling as targets in cancer chemotherapy. *Cancer cells* **2**, 95 (1990).
 - 13) Powis, G. : Signalling targets for anticancer drug development. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**, 188 (1991).
 - 14) Erneux, C., Cohen, S. and Garbers, D. L. : The kinetics of tyrosine phosphorylation by the purified epidermal growth factor receptor kinase of A-431 cells. *J. Biol. Chem.* **258**, 4137 (1983).
 - 15) Burke, T. R. Jr. : A new synthetic method for the synthesis of hydroxylated isoquinolines: preparation of methyl potential protein-tyrosine kinase inhibitors. *Drugs of the Future* **17**, 119 (1992).
 - 16) Hardie, D. G., Haystead, T. A. and Sim, A. T. : Use of okadaic acid to inhibit protein phosphatases in intact cells. *Methods in Enzymol.* **201**, 469 (1991).
 - 17) Escobedo, J. A. and Kaplan, D. R. : A phosphatidylinositol-3 kinase binds to platelet-derived growth factor receptors through a specific receptor sequence containing phosphotyrosine. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1125 (1991).
 - 18) Gibson, B. W., Falick, A. M., Burlingame, A. L., Nguyen, A. C. and Kenyon, G. L. : Liquid secondary ionization mass spectrometric characterization of two synthetic phosphotyrosine-containing peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 5343 (1987).
 - 19) Perich, J. W. and Johns, R. B. : Di-tert-butyl *N,N*-diethylphosphoramidite. A new phosphorylating agent for the efficient phosphorylation of alcohols. *Synthesis* 142 (1988).
 - 20) Stewart, J. M. and Young, J. D. : *Solid Phase Peptide Synthesis. 2nd edition*, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984).
 - 21) Kent, S. B. H. : Chemical synthesis of peptides and proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 957 (1988).
 - 22) Fields, G. B. and Noble, R. L. : Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Peptide Protein Res.* **35**, 161 (1990).
 - 23) Eienhofer, J., Waki, M., Heimer, E. P., Lambros, T. J., Makofske, R. C. and Chang, C-D. : Solid phase synthesis without repetitive acidolysis. Preparation of leucyl-alanyl-valine using 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Peptide Protein Res.* **13**, 35 (1979).
 - 24) Reese, C. B. and Ward, J. G. : Synthesis of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate. *Tetrahedron Lett.* **28**, 2309 (1987).
 - 25) Eener, G. M. : 2-Cyanoethyl phosphate and its use in the synthesis of phosphate esters. *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 159 (1961).
 - 26) Uhlmann, E. and Engels, J. : Chemical 5'-phosphorylation of oligonucleotides valuable in automated DNA synthesis. *Tetrahedron Lett.* **27**, 1023 (1986).
 - 27) Sinha, N. D., Bier, J. and Koster, H. : β -Cyanoethyl *N,N*-dialkylamino/*N*-morpholinomono-chloro phosphoramidites, new phosphorylating agents facilitating ease of deprotection and work-up of synthesized oligonucleotides. *Tetrahedron Lett.* **24**, 5843 (1983).
 - 28) Hsiung, H., Inouye, S., West, J., Sturm, B. and Inouye, M. : Further improvements on the phosphotriester synthesis of deoxyribo-oligonucleotides and the oligonucleotide directed site-

- specific mutagenesis of *E. coli* lipoprotein gene. *Nucleic Acid Res.* **11**, 3227 (1983).
- 29) Sinha, N. D., Biernat, J., McManus, J. and Koster, H. : Polymer support oligonucleotide synthesis X VII: use of beta-cyanoethyl-*N,N*-dialkylamino-*N*-morpholino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. *Nucleic Acid Res.* **12**, 4539 (1984).
- 30) Kim, E-k., Choi, H. and Lee, E-S. : Reactivity and suitability of *t*-Boc-protected thiophosphotyrosine intermediate analogs for the solid or solution phase peptide synthesis. *Arch. Pharm. Res.* submitted.
- 31) Perich, J. W. and Johns, R. B. : Conversion of alcohols into their dibenzyl phosphorotriesters using *N,N*-dibenzyl phosphoramidite. *Tetrahedron Lett.* **28**, 101 (1987).
- 32) Perich, J. W. and Johns, R. B. : Di-*t*-butyl *N,N*-diethylphosphoramidite and dibenzyl *N,N*-diethylphosphoramidite. Highly reactive reagents for the phosphite-triester' phosphorylation of serine-containing peptides. *Tetrahedron Lett.* **29**, 2369 (1988).
- 33) House, H. O. *Modern Synthetic Reactions, 2nd edition, The Benjamin/Comings Publishing Co.* p. 15 (1972).
- 34) Guibe-Jampel, E. and Wakselman, M. : Selective cleavage of *p*-nitrobenzyl esters with sodium dithionite. *Synth. Commun.* **12**, 219 (1982).
- 35) Lammert, S. R., Ellis, A. I., Chauvette, R. R. and Kukulja, S. : Azetidinone antibiotics. 19. A simple method for the removal of *p*-nitrobenzyl acid protective group. *J. Org. Chem.* **43**, 1243 (1978).
- 36) ElAmin, B., Anantharamaiah, G. M., Royer, G. P. and Means, G. E. : Removal of benzyl-type protecting groups from peptides by catalytic transfer hydrogenation with formic acid. *J. Org. Chem.* **44**, 3442 (1979).