

Günter Losse, Christian Madlung und Peter Lorenz

## Peptidsynthese in fester Phase am Phenol-Formaldehyd-Harz

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Dresden

(Eingegangen am 20. Oktober 1967)

Ein Phenol-Formaldehyd-Harz vom Resitol-Typ wird nach Verätherung der phenolischen Hydroxyle chlormethyliert und als Träger für die Festphasen-Peptidsynthese eingesetzt. Die optimalen Bedingungen für die Anknüpfung der Startaminosäure, den Peptidbildungsschritt sowie die Waschoptionen werden angegeben und das Syntheseprinzip durch Aufbau der Modellpeptide Phe-Leu-Leu-Gly-Phe und Gly-Phe-Leu-Phe-Leu-Gly-Phe demonstriert.

Die Peptidsynthese in fester Phase (*Merrifield-Synthese*)<sup>1-9)</sup> ist in den letzten drei Jahren zur wichtigsten Arbeitsmethode in der synthetischen Eiweißchemie geworden.

Die Anwendungsmöglichkeiten des Verfahrens für spezielle Syntheseprobleme<sup>9,10)</sup> sowie Wege zu seiner Weiterentwicklung<sup>11-15)</sup> werden gegenwärtig eingehend untersucht. Bis heute ist jedoch der Frage, inwieweit der bei der *Merrifield-Synthese* verwandte Träger (mit Divinylbenzol quervernetztes Polystyrol) durch prinzipiell andere hochmolekulare Harze ersetzt werden kann, noch relativ wenig Beachtung geschenkt worden. Als Variante in dieser Richtung setzten *Shemyakin*, *Ovchinnikov* und *Kiryushkin*<sup>16)</sup> ein niedrigmolekulares lösliches Polystyrol-Harz ein. *Wieland* und *Birr*<sup>17)</sup> verwendeten ein spezielles Phenol-Formaldehyd-Harz, dessen Hydroxylgruppen zur Anknüpfung *N*-geschützter Aminosäuren über aktivierte Esterbindungen dienen.

- 1) R. B. Merrifield, J. M. Stewart und N. Jernberg, *Analytic. Chem.* **38**, 1905 (1966).
- 2) V. A. Najjar und R. B. Merrifield, *Biochemistry* **5**, 3765 (1966).
- 3) R. B. Merrifield, *Science* [Washington] **150**, 178 (1965).
- 4) R. B. Merrifield, *Endeavour* **24**, 3 (1965).
- 5) R. B. Merrifield, *J. org. Chemistry* **29**, 3100 (1964).
- 6) R. B. Merrifield, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 304 (1964).
- 7) R. B. Merrifield, *Biochemistry* **3**, 1385 (1964).
- 8) R. B. Merrifield, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 2149 (1963).
- 9) A. Marglin und R. B. Merrifield, *J. Amer. chem. Soc.* **88**, 5051 (1966).
- 10) H. Zahn, *Naturwissenschaften* **54**, 396 (1967).
- 11) M. Bodanszky und J. T. Sheehan, *Chem. and Ind.* **1964**, 1423; **1966**, 1597.
- 12) M. Fridkin, A. Patchornik und E. Katchalski, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 4646 (1965); **88**, 3164 (1966).
- 13) F. Cramer, R. Helbig, H. Hettler, K. H. Scheit und H. Seliger, *Angew. Chem.* **78**, 640 (1966); *Angew. Chem. internat. Edit.* **5**, 601 (1966).
- 14) R. L. Letsinger und M. J. Kornet, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 3045 (1963); R. L. Letsinger, M. J. Kornet, V. Mahadevan und D. M. Jerina, ebenda **86**, 5163 (1964); R. L. Letsinger und V. Mahadevan, ebenda **87**, 3526 (1965); **88**, 5319 (1966).
- 15) R. Loursen, *J. Amer. chem. Soc.* **88**, 5344 (1966).
- 16) M. M. Shemyakin, Ju. A. Ovchinnikov und A. A. Kiryushkin, *Tetrahedron Letters* [London] **1965**, 2323.
- 17) Th. Wieland und Ch. Birr, *Angew. Chem.* **78**, 303 (1966); *Angew. Chem. internat. Edit.* **5**, 310 (1966).

Wir haben unter den Phenol-Formaldehyd-Harzen ebenfalls nach geeigneten Trägern für die Festphasensynthese gesucht, dabei jedoch das Grundprinzip *Merrifields*, wonach die *N*-geschützte Aminosäure carboxylseitig über Chlormethylgruppen an das Harz geknüpft wird, beibehalten. Als besonders geeignet erwies sich ein durch basische Kondensation erhaltenes quellbares Phenol-Formaldehyd-Harz vom Resitol-Typ, dessen freie Hydroxylgruppen zwecks Vermeidung von Nebenreaktionen mit Diazomethan veräthert wurden und das dann bis zu einem Chlorgehalt von 2.7–4.7% chlormethyliert wurde. Im folgenden sind die Ergebnisse dargestellt.

## 1. Der Träger

Die Gewinnung der für die Festphasensynthese geeigneten farblosen glasartigen Kondensate erfolgte durch Umsetzen von Phenol, Formaldehyd und  $6n$  NaOH im Molverhältnis 1 : 1.5 : 0.12 bei 100° (45 Min.) und anschließendes Nachhärten in 6 Std. bei 90°. Das in einer Korngröße von 60–100  $\mu$  eingesetzte Harz zeigte in Dimethylformamid eine Quellbarkeit von ca. 300%. Der Gesamthydroxylgehalt<sup>18)</sup> betrug 23.0–24.5 Gew.-% OH. Die nach Verätherung mit ätherischer Diazomethanlösung erhaltenen Methoxylgruppenwerte<sup>19)</sup> sind stark von der Korngröße abhängig, weil die Außenbezirke bevorzugt reagieren (Tab. 1).

Tab. 1. Abhängigkeit des Methoxylgehaltes im dargestellten Harz von der Korngröße

Korngröße $\mu$	Gew.-% OCH <sub>3</sub> (Mittelwert aus 3 Bestimmungen)
60–100	9.90
150	6.85
250	4.44
300	3.90

Die anschließende Chlormethylierung des Harzes mit Chlordimethyläther in Chloroform in Gegenwart von SnCl<sub>4</sub><sup>20)</sup> liefert unter den in Tab. 2 angeführten Standardbedingungen gut reproduzierbare Chlorwerte. Das Harz muß anschließend sehr gründlich gewaschen werden (s. Versuchsteil).

Tab. 2. Chlormethylierung des Resitols  
(Korngröße 60–100  $\mu$ , Temperatur 0°, Reaktionszeit 30 Min.)

Ansatz	1	2	3	4	5	
Harz (g)	5	10	10	15	30	
SnCl <sub>4</sub> (g)	1.2	2.2	4.5	4.5	9.0	
ClCH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub> (g)	3.0	6.5	8.5	10	20	
Lösungsmittel (ccm)	35	75	75	80	160	
Chlor- gehalt	mÄquivv. Gew.-%	0.77 2.74	0.80 2.81	1.31 4.65	0.95 3.36	0.96 3.39

<sup>18)</sup> H. Stäger und W. Siegfried, *Fette und Seifen* **45**, 232 (1938).

<sup>19)</sup> F. Vieböck und A. Schwappach, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **63**, 2818 (1930).

<sup>20)</sup> K. W. Repper, H. M. Paisley und M. A. Young, *J. chem. Soc. [London]* **1953**, 4097.

## 2. Der Veresterungsschritt

Zur Veresterung des chlormethylierten Harzes wählten wir als Startaminosäure das relativ sperrige tert.-Butyloxy-carbonyl(Boc)-phenylalanin, um die Anknüpfung der Peptidkette zunächst möglichst auf leicht zugängliche exponierte Reaktionszentren der Harzoberfläche zu konzentrieren. Die Reaktion selbst wurde durch 48stündige Umsetzung bei 80° von 2 mÄquiv. Boc-Aminosäure und 2 mÄquiv. Triäthylamin mit 1 mÄquiv. harzgebundenem Chlor in Essigester erreicht. Äthanol als Lösungsmittel brachte weniger gute Ergebnisse. Der anschließende Reaktionsschritt, die Umsetzung des Harzes nach l. c.<sup>8)</sup> mit Triäthylammoniumacetat zur Verminderung der Zahl nicht umgesetzter Chlormethylgruppen, ergab erwartungsgemäß nur ein unbedeutendes Absinken des Restchlorgehaltes und erwies sich für den weiteren Verlauf

Tab. 3. Mittlere Chlor- und Aminosäure-Werte des Trägers (4 Ansätze)

	mÄquiv.	%
Ausgangschlorgehalt des Trägers <sup>a)</sup>	0.96	3.39
Gesamter Aminosäure-N-Gehalt nach Veresterung <sup>b)</sup>	0.62	0.87
Restchlorgehalt des Trägers nach Veresterung	0.56	1.98
Restchlorgehalt nach Behandlung mit Triäthylammoniumacetat	0.32	1.08
Mit HBr/Eisessig abspaltbarer (nutzbarer) Aminosäure-Anteil <sup>c)</sup>	0.50	0.70
Nutzbarer Abspaltungsgrad der Aminosäure, bez. auf den gesamten Aminosäure-N-Gehalt		80

<sup>a)</sup> Elementaranalytisch bestimmt.

<sup>b)</sup> Der mit siedender 6*n* HCl in Eisessig (1 : 1) in 24 Stdn. abspaltbare und nach Anfärbung mit Ninhydrin-Hydrindantin bei 578 bestimmte<sup>21)</sup> Aminosäureanteil.

<sup>c)</sup> Durch 1stdg. Einleiten von HBr in eine 35proz. HBr/Eisessiglösung abspaltbarer Anteil. Bestimmung wie unter <sup>b)</sup>.

der Synthese als entbehrlich. Tab. 3 zeigt die Versuchsergebnisse als Mittelwerte aus 4 Ansätzen. Unsere entsprechenden Versuche mit NPS-Aminosäuren brachten demgegenüber beim Veresterungsschritt noch keine voll befriedigenden Umsetzungsgrade.

## 3. Der Peptidbindungsschritt

Die weiteren Syntheseschritte am Phenol-Formaldehyd-Harz konnten prinzipiell in Anlehnung an die Arbeitsvorschrift von Merrifield<sup>7,8)</sup> ausgeführt werden. Dazu wurde bei jedem Reaktionszyklus die Boc-Gruppe mit *n* HCl in Eisessig<sup>7)</sup> abgespalten, die Aminogruppe mit Triäthylamin in Dimethylformamid freigesetzt und dann die harzgebundene Aminosäure oder das gebundene Peptid in Dimethylformamid mit Boc-Aminosäure und Dicyclohexylcarbodiimid bei 20° umgesetzt.

Methylenchlorid als Lösungsmittel im Peptidbindungsschritt sowie eine Verminderung der Carbodiimidmenge führten zur Bildung uneinheitlicher Nebenprodukte, eine Erhöhung der Menge an Carbodiimid oder Kupplungskomponente erforderte einen wesentlich höheren Aufwand an Waschoptionen.

<sup>21)</sup> S. Moore und W. H. Stein, J. biol. Chemistry **24**, 907 (1954).

In Tab. 4 ist der Aufbau zweier Modellpeptide an je 40 g von dem Harz des beschriebenen Standardtyps wiedergegeben. Die dort angeführten Daten resultieren aus der Abspaltung der betreffenden Teilsequenz von einer Probe des Harzes mit HBr/Eisessig. Die beiden Endpeptide reinigte man an Sephadex G 10.

Tab. 4. Zwischenstufen bei der Festphasensynthese eines Penta- und Heptapeptides

Peptid-hydrobromid (DL)	Zur Abspaltung des Peptides verwandte Harzmenge (g)	Ausb. %, bez. auf die mit HBr/HAc abspaltbare Phe- Menge	$R_F$ -Wert (*)	
Phe	6	0.85	100	0.55
Gly-Phe	6	0.76	90	0.55
Leu-Gly-Phe	8.5	0.96	57	0.63
Leu-Leu-Gly-Phe	8.5	1.03	48	0.74
Phe-Leu-Leu-Gly-Phe	8.5	1.1	40	0.80
Leu-Gly-Phe	8.5	0.96	57	0.63
Phe-Leu-Gly-Phe				0.68
Leu-Phe-Leu-Gly-Phe				0.75
Phe-Leu-Phe-Leu-Gly-Phe				0.83
Gly-Phe-Leu-Phe-Leu-Gly-Phe	3.0	0.48	32	0.77

\*) Kieselgel G, Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 1).

## Beschreibung der Versuche

### 1. Darstellung des Trägers

a) *Phenol-Formaldehyd-Kondensation*: 94 g (1 Mol) Phenol, 125 g 35proz. Formaldehyd-Lösung (1.5 Mol) und 2 ccm 6*n* NaOH (0.012 Mol) werden unter Rühren 45 Min. auf 97–100° gehalten. Anschließend wird bei 15 Torr soviel Wasser abdestilliert, bis die Innentemp. wieder auf 95° gestiegen ist, was bei molarem Ansatz nach ca. 30 Min. der Fall ist. Das flüssige, farblose bis hellgelbe Kondensat wird in Formen gegossen und 6 Stdn. bei 89–90° ausgehärtet. Vor der weiteren Bearbeitung ist noch eine Nachhärtung von 2–3 Tagen bei 20° erforderlich. Die Harzplatten werden dann zerkleinert, die Fraktion von 60–100  $\mu$  ausgesiebt und mehrmals zur Entfernung von Staubteilchen mit Dimethylformamid angerührt, wobei Quellung erfolgt (Quellbarkeit ca. 300%). Anschließend wird das Harz 12 Stdn. im Soxhlet-Apparat mit Äthanol zur völligen Entfernung des Dimethylformamid-Stickstoffs gewaschen und i. Vak. bei 65° getrocknet. Gesamthydroxylgehalt 23.0 bis 24.5 Gew.-% OH (Pyridin-Acetanhydrid-Methode)<sup>18)</sup>.

b) *Verätherung*: Die Reaktion erfolgt auf üblichem Wege mit äther. Diazomethan-Lösung bei 20°. Zur vollständigen Verätherung muß das Harz mehreremale mit überschüssiger frischer Diazomethanlösung behandelt werden, bis die Gelbfärbung der Lösung über längere Zeit bestehen bleibt. Methoxylgruppenbestimmung<sup>19)</sup>: 9.90 Gew.-% OCH<sub>3</sub> (vgl. auch Tab. 1).

c) *Chlormethylierung*: Das Harz wird entsprechend den Angaben von Tab. 2 1/2 Stde. bei 20° in Chloroform gerührt, auf 0° abgekühlt und dann innerhalb von 10 Min. ein Gemisch von Chlordimethyläther und SnCl<sub>4</sub> zugetropft, wobei die Temp. 5° nicht übersteigen darf.

Anschließend wird noch 20 Min. gerührt und die Reaktion durch  $\text{CHCl}_3$ -Zugabe und Absaugen abgebrochen. Dann werden für 15 g Harz folgende Waschoptionen ausgeführt:

- 3 × je 50 ccm  $\text{CHCl}_3$
- 4 × je 50 ccm Dioxan
- 3 × je 50 ccm Dioxan/3 n HCl (3 : 1)
- 1 × je 50 ccm Dioxan/Wasser (1 : 1)
- 1 × je 50 ccm Wasser (bis Wasser  $\text{Cl}^-$ -frei)
- 4 × je 50 ccm Dioxan
- 4 × je 50 ccm Methanol
- 2 × je 50 ccm Äther

## 2. Veresterung mit Boc-Aminosäure

a) *Boc-Aminosäuren*: Boc-Glycin, Schmp. 84–85°, Boc-DL-Phenylalanin, Schmp. 144°, Boc-DL-Leucin, Schmp. 107–110°.

b) *Veresterung*: 1 g chlormethyliertes Harz (entspr. ca. 1 mÄquiv. Chlor) wird mit 2 mÄquiv. Boc-Aminosäure und 2 mÄquiv. Triäthylamin in 5 ccm Essigester 48 Stdn. auf 80° gehalten. Dann wird abgesaugt und mit Essigester, Äthanol, Wasser und Methanol gewaschen (analytische Daten s. Tab. 3).

## 3. Peptidbildungsschritt

a) *Abspaltung der Boc-Gruppe*: 10 g Harz werden 2 Stdn. mit 30 ccm 1 n HCl in Eisessig bei 20° geschüttelt (Bildung des Hydrochlorids). Anschließend wird entspr. Tab. 5 gewaschen.

b) *Freisetzung der Aminogruppe*: 10 g Harz werden mit 3 g Triäthylamin in 20 ccm Dimethylformamid 20 Min. stehengelassen (Waschoption siehe Tab. 5).

c) *Knüpfungsschritt*: 10 mÄquiv. harzgebundener Aminosäure (entspr. ca. 20 g Harz) werden mit 35 mÄquiv. Boc-Aminosäure in 25 ccm Dimethylformamid 20 Min. unter Feuchtigkeitsausschluß geschüttelt, dann 35 mÄquiv. Dicyclohexylcarbodiimid in 25 ccm Dimethylformamid hinzugefügt und weitere 12 Stdn. bei Raumtemp. geschüttelt, wobei reichliche Mengen an *N,N'*-Dicyclohexyl-harnstoff (Schmp. 234°) ausfallen (Waschoptionen siehe Tab. 5).

Tab. 5. Waschoption in einem Synthesesyklus für jeweils 2 g Harz (20°)

Syntheseschritt	Waschmittel	Anzahl der Waschoptionen mit je 20 ccm Lösungsmittel
Abspaltung der Boc-Gruppe	Eisessig	3
	Äthanol	3
	Äthanol/DMF (1 : 1)	1
	DMF	3
Freisetzung der Aminogruppe	DMF	3
Knüpfungsschritt	DMF	3
	DMF/Äthanol (1 : 1)	1
	Äthanol	3
	Äthanol/Eisessig	1
	Eisessig	3

d) *Abspaltung des Peptides mit HBr/Eisessig*: 5 g des die *N-geschützte Peptidkette* enthaltenen Harzes werden mit 15 ccm 35proz. *HBr/Eisessig*-Lösung 30 Min. gerührt und anschließend unter weiterem Rühren 1 Stde. trockener Bromwasserstoff bei 20° eingeleitet. Nach Abfiltrieren des Trägers wird i. Vak. bei 20° eingedampft, der Rückstand mit verd. Essigsäure extrahiert, die erhaltene Lösung erneut bei 20° eingedampft und der Rückstand gefriergetrocknet.

#### 4. Reinigung der Peptidhydrobromide durch Gelfiltration

Die Reinigung erfolgt an Sephadex G 10. Gelbett  $0.8 \times 70$  cm, Elutionsmittel 0.1 *m* Essigsäure, Durchfluß 12 ccm/Stde., 50 Fraktionen zu 2.5 ccm. Aufgebrachte Menge 100 bis 150 mg, gelöst in 1–2 ccm 0.1 *m* Essigsäure. Spektralphotometrische Auswertung der Fraktionen nach Anfärbung bei 578 nm. Ausb. 50% des Rohproduktes nach Eindampfen i. Vak. und 6 Stdn. Gefriertrocknung. Zur Analyse erfolgte Trocknung i. Vak. über  $P_2O_5$  bei 60°.

DL-Phe-Leu-Leu-Gly-Phe · HBr

$C_{32}H_{45}N_5O_6 \cdot HBr$  (676.7) Ber. N 10.40 Gef. N 10.17

DL-Gly-Phe-Leu-Phe-Leu-Gly-Phe · HBr

$C_{43}H_{57}N_7O_8 \cdot HBr$  (880.8) Ber. N 11.13 Gef. N 11.48

Die Totalhydrolyse und quantitative Papierchromatographie<sup>21,22)</sup> lieferte bei einer Fehlergrenze von  $\pm 10\%$  die Aminosäureverhältnisse:

Phe-Leu-Leu-Gly-Phe Gly: Leu: Phe = 1: 2: 2

Gly-Phe-Leu-Phe-Leu-Gly-Phe Gly: Leu: Phe = 2: 2: 3

<sup>22)</sup> Schleicher-Schüll-Papier 2043 b, absteigend, Butanol/Eisessig/Wasser 4: 1: 1, Laufstrecke 35 cm.