

SYNTHESE VON GRAMICIDIN S DURCH NEUE VARIANTEN DER FESTPHASENSYNTHESE

G. Losse und K. Neubert

Sektion Chemie der Technischen Universität Dresden, DDR

(Received in Germany 6 February 1970; received in UK for publication 27 February 1970)

Die von uns (1,2) als N-Schutz in der Peptidsynthese vorgeschlagene Furfuryl-oxycarbonyl-(Foc)(3)-Gruppe besitzt eine gegenüber der Boc-Gruppe erhöhte Säurelabilität (4). Wie wir fanden, läßt sie sich über Furfuryl-2,4,5-trichlorphenylcarbonat (Schmp. 65-66°; $C_{12}H_7Cl_3O_4$ (321,6); Ber. C 44,97; H 2,18; Gef. C 45,18; H 1,95) das analog dem tert. Butyl-Derivat nach l.c.(5) zugänglich ist, in Dioxan/ H_2O und Gegenwart von Triäthylamin (60°C, 3 Std.) mit guter Ausbeute in Aminosäuren einführen.

Tabelle 1

Foc-Aminosäurederivate

	Schmp. °C	$[\alpha]_D^{22}$	Analyse
Foc-L-Pro (DCHA-Salz) $C_{23}H_{36}N_2O_5$ (420,5)	156-158	- 37,5° (c=2 in Äthanol)	Ber. C 65,77 H 8,62 N 6,65 Gef. 65,60 9,02 6,91
Foc-(δ -N-tosyl)-L-Orn (DCHA-Salz) $C_{30}H_{45}N_3O_7S$ (591,8)	150-152	+ 6,8° (c=3 in Äthanol)	Ber. C 60,91 H 7,65 N 7,10 Gef. 60,77 7,89 7,10
Foc-L-Leu $C_{17}H_{17}NO_5$ (255,3)	64-66	- 30,0° (c=1 in Eisessig)	Ber. C 56,44 H 6,71 N 5,49 Gef. 57,04 7,06 5,70
Foc-D-Phe	89-90	- 10,0° (c=3 in Eisessig)	l.c. (2)
Foc-L-Val	62-63	- 3,6° (c=3 in Eisessig)	l.c. (2)

Um die Einsatzmöglichkeit dieser Schutzgruppe speziell für die Festphasenmethodik zu prüfen, haben wir den Aufbau des gut charakterisierbaren Testpeptides Gramicidin S (6,7) am

konventionellen Merrifield-Träger (8 - 11) und vergleichend dazu an einem früher durch uns charakterisierten (12) Phenol-Formaldehyd-Harz des Resitol-Types näher untersucht.

Ausgegangen wurde in beiden Synthesen von 10 g Harz (Teilchendurchmesser 20 - 80 μ beim Merrifield-Träger (I) und 60 - 100 μ beim Resitol-Träger (II)), welches mit Monochlor-dimethyläther / SnCl_4 bis zu 0,75 m. Ä. Cl / g chlormethyliert und mit der äquivalenten Menge Foc-L-Pro und Triäthylamin in Äthanol bei 75° 25 Stunden verestert wurde. Die durch Totalhydrolyse mit 6 n HCl / Eisessig (1:1) und anschließende Ninhydrin-Kolorimetrie bei 440 nm (13) ermittelte Prolin-Beladung betrug 0,13 m Mol / g bei I und 0,20 m Mol bei II.

Für die einzelnen Kupplungsschritte wurde Dicyclohexylcarbodiimid und Foc-Aminosäure in CH_2Cl_2 bei einer Reaktionszeit von 12 h im vierfachen Überschuß eingesetzt. Zur Abspaltung der Foc-Gruppe bewährte sich 1/2-stündige Behandlung mit 1n HCl in Eisessig bei 20° C (2) und anschließende Neutralisierung mit 10-proz. Triäthylamin in DMF (Waschoperationen entsprechen i.c. 2). Wie die dünnschichtchromatographische Kontrolle des Syntheseverlaufs zeigte, verlief bei Träger II die Verlängerung zum Heptapeptid zunächst unvollständig. Der Kupplungsschritt mußte daher unter gleichen Bedingungen wiederholt werden.

Die Abspaltung des Ditosyl-decapeptides Val-Orn(Tos)-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn(Tos)-Leu-D-Phe-Pro mit HBr / TFA (45 Minuten) erbrachte Rohausbeuten von 70 % (I) und 39 % (II), bezogen auf den mit HCl / Eisessig abspaltbaren Anteil an C-terminalem Prolin. Nach Reinigung an Sephadex L H-20 (Elutionsmittel Dioxan) wurden an beiden Trägern chromatographisch und IR-spektroskopisch identische Fraktionen mit folgenden Daten erhalten:

Träger I : Aminosäureanalyse: Val 1,2; Orn 1,0; Leu 1,2; Phe 1,1; Pro 1,0; $[\alpha]_D^{20}$: - 165°
(c=1 in Eisessig); N (Ber.): 10,88; N (Gef.) 10,77

Träger II: Aminosäureanalyse: Val 1,2; Orn 1,0; Leu 1,0; Phe 1,0; Pro 0,8; $[\alpha]_D^{20}$: - 160°
(c=1 in Eisessig); N (Gef.) 10,64

Durch Cyclisierung der Pro-Val-Bindung mit Dicyclohexylcarbodiimid / p-Nitrophenol in Pyridin (Konzentration 0,1 m Mol / Liter) bei 20° und Nachbehandlung mit Dowex 1 X - 2 (OH-Form) sowie Dowex 50 W X - 2 (H-Form) konnte das cyclo-Ditosyl-decapeptid in 40 % (I) bzw. 43 % (II) Ausbeute, bezogen auf lineare Vorstufe gewonnen werden.

Anschließende Reinigung an Sephadex L H-20 führte zu den in Tab. 2 angeführten Werten. Nach Detosylierung mit Na / NH_3 (30 Minuten), Überführung in das Dihydrochlorid und mehrmaligem Umkristallisieren aus Äthanol / 1 n HCl betrug die Ausbeute an Gramacidin S 55 % (I) bzw. 47 % (II), bezogen auf das cyclo-Ditosyl-peptid (Physikal. Konstanten Tab. 2; biolo-

gischer Test Tab. 3). Beide Fraktionen ergaben identische IR-Spektren.

Tabelle 2

	Schmp. °C	$[\alpha]_D^{20}$	Aminosäureverhältnis					N-Analyse
			Val	Orn	Leu	Phe	Pro	
cyclo Di-tosyl-Gramicidin S. 2 H ₂ O C ₇₄ H ₁₀₄ N ₁₂ O ₁₄ S ₂ · 2 H ₂ O (1449,7)								
Styrolharz (I)	320-322	-175°(c=0,7; AcOH)	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0	Ber. 11,32 Gef. 11,19
Phenolharz (II)	321-323	-170°(c=0,7; AcOH)	1,1	1,0	1,1	1,0	0,9	Gef. 11,35
Gramicidin S · 2 HCl · 3 H ₂ O								
Styrolharz (I)	275-277	-270°(c=0,1; EtOH)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
Phenolharz (II)	273-275	-275°(c=0,1; EtOH)	1,0	0,9	1,0	1,0	0,9	

Tabelle 3

Biol. Test: Grenzkonzentration in µg / ml

	Staphylococcus aureus SG 511	B. subtilis
Gramicidin S (Merrifield-Träger I)	30	7
Gramicidin S (Resitol - Träger II)	30	7

Die Ergebnisse zeigen, daß die Foc-Gruppe die wesentlichen Voraussetzungen als N-Schutz bei der Festphasensynthese erfüllt und in Kombination mit Merrifield-Harzen wie auch anderen festen Trägern eingesetzt werden kann.

Wir danken Frau Dr. Marquardt, Physiologisch-Chemisches Institut der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor Prof. Dr. H. Hanson) für die Ausführung der Aminosäureanalysen und Frau Schurigk, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Epidemiologie der Medizinischen Akademie Dresden (Direktor Prof. Dr. W. Ahrens) für die mikrobiologischen

Aktivitätsprüfungen.**Literatur**

1. H. Jeschkeit, G. Losse und K. Neubert, Chem. Ber. **99**, 2803 (1966)
2. G. Losse und K. Neubert, Z. Chem. **8**, 228 (1968)
3. Abkürzungen entspr. IUPAC IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Abbreviated designation of amino acid derivatives and peptides. Tentative rules, J. biol. Chem. **241**, 527, 2491 (1966)
4. G. Losse, D. Zeidler und Th. Grieshaber Liebigs Ann. Chem. **715**, 196 (1968)
5. W. Broadbent, J.S. Morley und B.E. Stone, J. chem. Soc. (London) **1967**, 2632
6. R. Schwyzer und P. Sieber, Helv. chim. Acta **40**, 624 (1957)
7. H. Klostermeyer; Chem. Ber. **101**, 2823 (1968)
8. R.B. Merrifield, J. Amer. chem. Soc. **85**, 2149 (1963)
9. R.B. Merrifield, Science(Washington) **150**, 178 (1965)
10. R.B. Merrifield, Recent Progr. Hormone Res. **23**, 451 (1967)
11. B. Gutte und R.B. Merrifield, J. Amer. chem. Soc. **91**, 501 (1969)
12. G. Losse, Ch. Madlung und P. Lorenz, Chem. Ber. **101**, 1257 (1968)
13. S. Moore und W.H. Stein, J. biol. Chem. **211**, 907 (1954)