

SYNTHESE VON OLIGO-L-PROLINEN BIS ZUM PENTADECAPEPTID

M. Rothe, R. Theysohn und K.-D. Steffen

Organisch-Chemisches Institut der Universität Mainz

(Received in Germany 11 August 1970; received in UK for publication 9 September 1970)

Oligo-L-proline mit einheitlicher Molekülgröße sind als definierte Modellsubstanzen für Poly-L-prolin I und II und damit auch für das Kollagen von Interesse; insbesondere sollte die polymerhomologe Reihe der Peptide eine Abhängigkeit der Konformation von der Kettenlänge erkennen lassen<sup>1</sup>).

Die Synthese freier Oligoproline ist bisher allerdings auf erhebliche Schwierigkeiten gestoßen (vgl. z.B. Berger et al.<sup>2</sup>) und nur bis zur Stufe des Di-peptids gelungen. Diese Schwierigkeiten beruhen einerseits auf sterischer Hindernung bei der Verknüpfung von mehreren Prolinresten<sup>3</sup>) als sekundären Amin-derivaten, andererseits auf der besonderen Empfindlichkeit der Pro-X-Bindung (X = beliebige Aminosäure) gegenüber intramolekularem nucleophilem Angriff vom N-terminalen Ende der Peptidkette her, bedingt durch eine hohe, konformativ erklärbare Bildungstendenz der Prolin-diketopiperazine<sup>4</sup>).

N-tert.-Amyloxy carbonyl-oligoproline wurden kürzlich bis zum Octapeptid aufgebaut, jedoch fehlen bisher Angaben über den Syntheseweg. Beidseitig geschützte Oligoproline (5-Dimethylaminosulfonyl-oligoprolin-naphthylamide) bis zum Dodecameren wurden nach der Festphasenmethode gewonnen<sup>6</sup>).

Wir selbst haben freie und N-geschützte Oligo-L-proline bis zum Pentadecapeptid nach dem p-Nitrophenylester-Verfahren<sup>7</sup>) in molekulareinheitlicher Form dünn-schichtelektrophoretisch rein synthetisiert. Als Iminoschutzgruppe diente der tert.-Butyloxycarbonyl(Boc)-Rest, die Peptidverknüpfung erfolgte durch Reaktion der N-geschützten Oligoprolin-p-nitrophenylester (I) (aus den Boc-oligoprolinen und p-Nitrophenol mit Carbodiimid<sup>8</sup>) mit den Na-Salzen der freien Oligoproline (II) in wäßrigem Pyridin bei konstantem pH-Wert (8.5 - 9.0). Racemisierung ist bei Aktivierung und Peptidbildung von Prolinpeptiden auch bei der Fragmentkondensation nicht zu erwarten. Bewiesen wird dies durch die Übereinstimmung der

optischen Drehwerte der nach Entfernung der Schutzgruppe erhaltenen freien Oligoproline mit denen der durch schrittweise Synthese vom Carboxylenende her durch Festphasensynthese erhaltenen Produkte<sup>1)</sup>. Tab. 1 enthält die gewonnenen Boc-oligoproline (III) mit Angaben über den Syntheseweg, Ausbeuten, physikalische Eigenschaften und dünnenschichtchromatographisches Verhalten. Bei geeigneter Wahl der Ausgangsprodukte für die Peptidverknüpfung - große Unterschiede zwischen x und (x+y) in I bzw. III - lassen die unterschiedlichen R<sub>F</sub>-Werte der Polymerhomologen leicht die Reinheit und molekulare Einheitlichkeit der Syntheseprodukte erkennen.

Tab. 1. Boc-oligo-L-proline

n	Synthese		Ausbeute (%)	Schmp. (°C)	$[\alpha]_D^{22}$ (c = 1, CHCl <sub>3</sub> )	R <sub>F</sub> <sup>+</sup>
	Boc(Pro) <sub>x</sub> ONp	H(Pro) <sub>y</sub> ONa				
x	y					
1			95	137-138	-105	0.84
2	1	1	88	191-193	-138	0.68
3	1	2	93	219	-173	0.60
4	1	3	76	178	-186	0.53
5	3	2	81	224	-208	0.47
6	3	3	92	247	-232	0.41
7	3	4	75	267	-242	0.37
8	4	4	78	>280	-256	0.33
9	3	6	85	>280	-264	0.29
10	4	6	71	>280	-267	0.25
11	5	6	50	>300	-269	0.23
12	6	6	68	>300	-272	0.22
15	5	10	58	>300	-280	0.20

+)  
+) n-Butanol (9) : Aceton (3) : Eisessig (2) : Ammoniak, 1:4 (2) : Wasser (4)

Bei Verwendung der Carbobenzoxy-Schutzgruppe fand bei ihrer Entfernung durch katalytische Hydrierung oder mit HBr/Eisessig auf der Stufe des besonders empfindlichen Tripeptids teilweise oder sogar vollständige Zersetzung unter Bildung von Prolin-diketopiperazin und Prolin statt.

Die Boc-Schutzgruppe lässt sich dagegen ohne Zersetzung mit Trifluoressigsäure bei 0°C abspalten. Die Peptid-trifluoracetate wurden mit schwach basischen Anionenaustauschern in die kristallinen freien Peptide übergeführt.

Alle Oligoproline sind außerordentlich leicht löslich in Wasser und enthalten Kristallwasser; Triprolin ist hygroskopisch. Di- und Triprolin zersetzen sich auch in trockenem Zustand bei längerem Aufbewahren, wiederum unter Diketopiperazinbildung, die höheren Oligomeren beim Schmelzpunkt bzw. bei Temperaturen oberhalb 250°C in der gleichen Weise, z.T. aber auch unter Bildung höhermolekularer Produkte.

Tab. 2. Oligo-L-proline

n	Schmp. (°C)	$[\alpha]_D^{25}$ (c=1/2, H <sub>2</sub> O)	$E_F^+)$		
			A	B	C
1		- 87	1.00		
2	144-145	-169	0.83		
3	122	-216	0.71		
4	169-170	-288	0.52		
5	186	-331	0.45	1.00	
6	206-208	-378	0.41	0.92	
7	226-227	-393		0.78	
8	> 260	-408		0.65	
9	> 260	-421		0.45	1.00
10	> 260	-454		0.36	0.92
11	> 270	-464			0.76
12	> 280	-472			0.50
15	> 290	-495			0.36

+)  
A: 800 V; 60 Min.; HCOOH : CH<sub>3</sub>COOH : H<sub>2</sub>O = 1:1:8  
B: 1000 V; 145 Min.; HCOOH : CH<sub>3</sub>COOH : H<sub>2</sub>O = 1:1:3  
C: 1000 V; 270 Min.; HCOOH : CH<sub>3</sub>COOH : H<sub>2</sub>O = 3:3:4

Tab. 2 zeigt die Eigenschaften der Oligoproline, insbesondere die charakteristisch hohen Drehwerte und ihre elektrophoretische Trennbarkeit als Reinheitskriterium. Die spezifische Drehung steigt bei mehrstuündigem Stehen in wässriger Lösung; die angegebenen Werte sind die konstanten Endwerte. Sie entsprechen der II-Form des Polyprolins<sup>1)</sup>, einer linksgängigen Helix mit trans-Peptidbindungen<sup>9)</sup>. In schlechten Lösungsmitteln, wie n-Propanol, ändern die Peptide ihre Konformation. Dies ist ersichtlich aus der allmählichen Mutarotation zu geringeren negativen Drehwerten, analog dem bekannten Übergang von Polyprolin II in Polyprolin I, einer rechtsgängigen, viel kompakteren Helix mit cis-Peptidbindungen<sup>9)</sup>.

Diese Konformationsänderung ist in guten Lösungsmitteln, wie Wasser oder Eisessig umkehrbar. Aus den betreffenden Lösungsmitteln lassen sich die Oligopeptide vom Hexaprolin an in den I- bzw. II-Formen auch im festen Zustand isolieren und IR-spektroskopisch unterscheiden. In Lösung sind die I- und II-Formen schon vom Triprolin an durch ihre UV- und CD-Spektren zu erkennen. Die CD-Spektren der I-Formen zeigen in n-Propanol drei Cotton-Effekte (schwach negativ bei 225 - 232 nm, stark positiv bei 208 - 213 nm, stark negativ bei 193 - 198 nm), während die II-Formen in Wasser nur zwei Cotton-Effekte (schwach positiv bei 227 - 228 nm, stark negativ bei 197 - 205 nm) aufweisen, deren Maxima sich mit wachsender Kettenlänge längerwellig verschieben. Die II-Formen verlieren im festen Zustand offenbar zum Teil ihre durch das Lösungsmittel stabilisierte<sup>10)</sup> Konformation, was sich beim Wiederauflösen in Wasser durch eine geringe Mutarotation zu einem stärkeren negativen, konstanten Enddrehwert bemerkbar macht.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für materielle Unterstützung, der Farbwerke Hoechst AG für die Gewährung des Karl-Winnacker-Stipendiums an M. R.

#### Literatur:

- 1) M. Rothe, R. Theysohn, K.-D. Steffen, M. Kostrzewska und M. Zamani, Proc. 10th Europ. Peptide Symposium, Abano Terme, 1969, im Druck.
- 2) A. Yaron und A. Berger, Biochim. Biophys. Acta 107, 307 (1965).
- 3) R. B. Merrifield, Biochemistry 3, 1385 (1964).
- 4) E. Wünsch, Proc. 5th Europ. Peptide Symposium, Oxford, 1962, 89.
- 5) T. Isemura, H. Okabayashi und S. Sakakibara, Biopolymers 6, 307 (1968).
- 6) L. Stryer und R. P. Haugland, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, 719 (1967); G. Gabor, Biopolymers 6, 809 (1968).
- 7) M. Bodanszky, J. T. Sheehan, M. A. Ondetti und S. Lande, J. Amer. Chem. Soc. 85, 991 (1963).
- 8) M. Rothe, Tagungsbericht Chem. Gesellschaft (DDR) 1956, S. 52; M. Rothe und F. W. Kunitz, Liebigs Ann. Chem. 609, 88 (1957); M. Rothe, Coll. Czech. Chem. Commun. 24, 28, 148 (1959).
- 9) Übersicht: J. P. Carver und E. R. Blout, in "Treatise on Collagen", Vol. 1 S. 441, Ed. G. N. Ramachandran, Academic Press, New York und London, 1967.
- 10) H. Strassmair, J. Engel und G. Zundel, Biopolymers 8, 237 (1969).