

NEUE HISTIDIN-DERIVATE FÜR DIE MERRIFIELD-PEPTIDSYNTHESE x)

G. Losse und U. Krychowski

Sektion Chemie der Technischen Universität Dresden, DDR

(Received in Germany 10 September 1971; received in UK for publication 28 September 1971)

Kürzlich berichteten wir über die Darstellung von Boc-L-His(Trt)-OH und Boc-L-His(Dpm)-OH. weiterhin haben wir Boc-L-His(Tnp)-OH (aus Boc-L-His-OH¹⁾ durch Umsetzung mit Pikrylchlorid entsprechend l.c.²⁾; Schmp. 140°, $[\alpha]_D^{20} = +45,8^\circ$, C₁₇H₁₈N₆O₁₀ (466,4), Ber. C 43,56, H 3,85, N 18,01; Gef. C 42,94, H 4,07, N 18,53 und Boc-L-His(Ppc)-OH (aus Boc-L-His-OH und Chlorameisensäure-piperidid analog l.c.³⁾; Schmp. 90 - 91°, $[\alpha]_D^{20} = +4,9^\circ$; C₁₇H₂₆N₄O₅ (366,23), Ber. C 56,93, H 7,14, N 14,86; Gef. C 57,25, H 6,93, N 14,97 gemonnen.

Zur Beurteilung der Einsatzmöglichkeiten dieser Verbindung des Types Boc-L-His(X)-OH in der Merrifield-Synthese interessierte 1. die Stabilität des N^{im}-Substituenten X bei vielfach wiederholten Abspaltungsschritten der N^α-Boc-Gruppe, 2. das Verhalten von X gegen übliche, zur Seitenkettenblockierung verwendete acidolytische und nucleophile Reagentien, 3. die Basizität des betreffenden Histidin-Derivates sowie 4. seine Löslichkeit beim Kupplungsschritt.

Im folgenden wird eine Charakteristik der genannten Histidin-Derivate unter diesen Gesichtspunkten gegeben.

x) Abkürzungen nach IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Z. physiol. Chem. 348, 256 (1967); J. Biol. Chem. 241, 2491 (1966), 242, 555 (1967).

Darüberhinaus gelten folgende Abkürzungen:

Dnp = 2,4-Dinitrophenyl, Tnp = Pikryl, Ppc = Piperidinocarbonyl.

Wie quantitative chromatographische Untersuchungen mit Ninhydrin- und Pauly-Reagenz zeigen, sind Dpm-, Trt-, Tnp- und Ppc-Gruppe mit dem zur Abspaltung der N^{α} -Boc-Gruppe verwendeten 1n HCl/Eisessig nach 24 Stunden noch völlig stabil, mit Et_3N/CH_2Cl_2 (1:9) bzw. $Et_3N/CHCl_3$ (1:9) (Neutralisationsschritt) bleiben Tnp- und Ppc-Gruppe bis zu 3 Stunden, Dpm- und Trt-Gruppe völlig unangegriffen. Die Stabilität der 4 N^{im} -Substituenten über mindestens 20 Acidolyseschritte der Merrifield-Synthese kann daher als gesichert gelten. Entsprechendes gilt für die Abspaltung der Boc-Gruppe mit TFA/ CH_2Cl_2 (1:1).

In Tabelle 1 sind für verschiedene Standardbedingungen der Seitenkettenentblockierung die Minimalzeiten angegeben, bis zu welchen die einzelnen N^{im} -Substituenten völlige Stabilität besitzen bzw. zu 100% abgespalten werden. Die durch quantitative Dünnschichtchromatographie gewonnenen Daten wurden an Modellen des Types Boc-L-His(X)-OH und H-L-His(X)-OH erhalten, wobei auch das von Merrifield beschriebene N^{α} -Boc, N^{im} -Dnp-L-Histidin mit einbezogen wurde.

Die Tabelle bestätigt die hohe Acidolyseempfindlichkeit der Arylalkyl-Substituenten am Imidazolkern, zeigt aber auch ihre große Beständigkeit gegenüber Basen und Nucleophilen. Umgekehrt sind die Dnp-, Tnp- und Ppc-Gruppe innerhalb der angegebenen Zeitspanne mit Säuren stabil, werden aber leicht durch Nucleophile eliminiert. Die hydrazinolytische oder auch methanolytische Abspaltung histidinhaltiger Peptide von der Merrifield-Matrix muß deshalb bei Anwendung dieser N^{im} -Schutzgruppen zu einer gleichzeitigen Entblockierung der N^{im} -Funktion führen.

Tabelle 2 zeigt die durch potentiometrische Titration 0,02 molarer Lösungen mit 0,1 molarer Säure bzw. Lauge ermittelten p_K -Werte ⁴⁾ der untersuchten Histidin-Derivate. Es ist ersichtlich, daß die für Peptidsynthesen erwünschte Basizitätsabschwächung des Imidazolkernes durch alle Substituenten, besonders jedoch durch die Nitroarylgruppen erreicht wird. Die Löslichkeit der Histidin-Derivate lag nach Tabelle 3 in dem für den Kupplungsschritt der Merrifield-Synthese erwünschten Bereich zwischen 0,1 und 0,3 Mol/Liter.

Literatur:

- 1) G. Losse und U. Krychowski, J. prakt. Chem. 312, 1097 (1970)
- 2) F. Chillemi und R.B. Merrifield, Biochemistry 8, 4244 (1969)
- 3) G. Jäger, R. Geiger und W. Siedel, Chem. Ber. 101, 3537 (1968)
- 4) J.P. Greenstein, J. Biol. Chem. 93, 479 (1931)

Tabelle 1. Grenzwerte zur Stabilität von N^{im} -Substituenten unter verschiedenen Bedingungen (20°, Reagenz im Überschuß)

N^{im} -Subst. X	6n HBr- Eisessig	HCOOH	TFA	Merkapto- äthanol (p_H^8) ²⁾	2n NaOH- Dioxan (1:1) ³⁾	$N_2H_4 \cdot H_2O$ - Alkohol (1:4)
	Stdn. %	Stdn. %	Stdn. %	Stdn. %	Stdn. %	Stdn. %
Dpm	3 100	1/6 100	1 100	12 0	6 0	15 0
Trt	2 100	1/30 100	0,5 100	12 0	6 0	15 0
Dmp ²⁾	6 0	6 0	6 0	1 100	2 0	15 100
Tnp	6 0	6 0	6 0	0,7 100	2 0	10 100
Fpc	6 0	6 0	24 0	1 0	2 100	10 100

Tabelle 2. p_K -Werte von Histidin-Derivaten des Types
 H-L-His(X)-OH und Boc-L-His(X)-OH
 (0,02 m wässrige Lösung, 20°)

N ^{im} -Substituenten X	H-L-His(X)-OH			Boc-L-His(X)-OH	
	p_{K_1} (COOH)	p_{K_2} (Im)	p_{K_3} (NH ₂)	p_{K_1} (COOH)	p_{K_2} (Im)
H	1,82	5,90	9,30	1,90	5,60
Dpm	1,80	5,00	8,20	1,85	4,90
Trt	1,78	4,85	8,00	1,80	4,85
Dnp	1,85	3,85	7,90	1,90	3,95
Tnp	1,90	3,90	8,00	1,95	3,95
Ppc	1,85	4,85	8,55	1,90	4,00

Tabelle 3. Sättigungskonzentrationen von Histidin-Derivaten
 Boc-L-His(X)-OH in verschiedenen Solventien bei 20°
 (Mol/Liter)

N ^{im} -Substituent X	CH ₂ Cl ₂	DMF	CH ₂ Cl ₂ /DMF (1:1)
H	0,006	0,038	0,080
Dpm	0,162	0,025	0,048
Trt	0,146	0,010	0,076
Dnp	0,310	0,285	0,216
Tnp	0,248	0,263	0,182
Ppc	0,320	0,300	0,202