

SYNTHESE VON OLIGO-L-PROLINEN BIS ZUM EIKOSAMEREN
NACH DER FESTPHASENMETHODE

M. Rothe und J. Mazánek

Organisch-Chemisches Institut der Universität Mainz

(Received in Germany 27 July 1972; received in UK for publication 7 August 1972)

Die Festphasensynthese von oligomeren Peptiden, die aus gleichen Aminosäure-Bausteinen aufgebaut sind, hat gegenüber derjenigen der üblichen, unregelmäßig zusammengesetzten Peptide den Vorteil, daß das Auftreten von Fehlsequenzen auf kürzere Peptide mit gleicher Baustein-Zusammensetzung beschränkt ist. Dies erleichtert entscheidend die analytische Untersuchung der Peptide während und nach der Synthese und damit auch ihre Reinigungsmöglichkeiten.

Oligoproline können als Modellsubstanzen für Polyprolin I und II und für Kollagen dienen¹⁾. Ihre Synthese gelang bisher nach der Methode der aktiven Ester bis zum Pentadekapeptid²⁾; jedoch erscheint die Gewinnung noch höherer Oligomere, die für kinetische Messungen interessieren, aufgrund von Isolierungs- und Reinigungsschwierigkeiten problematisch. Dagegen erwies sich die Festphasenmethode in diesem Falle³⁾ als sehr erfolgversprechend, so daß wir freie Oligo-L-proline bis zum Eikosameren ($n = 20$) durch stufenweise Verlängerung aufbauen konnten.

Bei einer Beladung des polymeren Trägers (Polystyrol/2 % Divinylbenzol) von ~ 1 mMol Pro/g Boc-Pro-Harz wurde die Boc-Schutzgruppe mit 1 N HCl/Eisessig oder Trifluoressigsäure (TFA)/CH₂Cl₂ (1:1) abgespalten (30 Min.), die Neutralisation erfolgte mit frisch hergestelltem 10-proz. Triäthylamin/CH₂Cl₂ (10 Min.). Die Kupplung mit einem 3-fachen Überschuß an Dicyclohexyl-carbodiimid (DCCI) wurde auf insgesamt 20 Stdn. verlängert, wobei die Zugabe der gleichen Menge

an Boc-Pro und DCCI nach 6 Stdn. wiederholt wurde. Die Konzentration des Reaktionsgemisches betrug 0.3 - 0.5 m in CH_2Cl_2 (bez. auf Boc-Pro). Zur Kontrolle wurde nach jedem einzelnen Syntheseschritt das Peptid von einer kleinen Menge des polymeren Trägers mit HBr/TFA (50 Min.) abgespalten und in wäßriger Lösung mit einem schwach basischen Ionenaustauscher (Merck II) freigesetzt.

Bei dem Syntheseschritt vom Diprolin zum Triprolin beobachteten wir unter den üblichen Bedingungen ein Absinken der Peptidbeladung von fast 40 %. Wie wir zeigen konnten, ist dies auf die Bildung von Cyclo-di-L-prolyl zurückzuführen^{4,5)}. Um diese Nebenreaktion möglichst niedrig zu halten, wurden die Waschvorgänge nach der Neutralisation von je 5 Min. auf je 1 Min. und das Vorquellen mit Boc-prolin vor Zugabe von DCCI von 10 auf 5 Min. verkürzt. Außerdem wurde ein höherer (5-facher) Überschuß an Kupplungskomponenten (0.5 m) verwendet. Dadurch gelang es, den Ausbeuterückgang auf ~ 25 % herabzusetzen (Tab. 1).

Die unerwünschte Veresterung der bei der Diketopiperazinbildung^{4,5)} sowie durch interchenare Aminolyse benachbarter Ketten⁵⁾ entstandenen Hydroxymethylgruppen bei den folgenden Kupplungen mit DCCI und Boc-prolin ist vernachlässigbar.

Außerdem würden sich die neu aufgepfropften Ketten auf der Dipeptidstufe wieder als Diketopiperazin abspalten, zumal sie an sterisch besonders günstigen Stellen des Trägers liegen, an denen zuvor Cyclisierung stattgefunden hat.

Die erhaltenen Oligoproline waren bereits als Rohprodukte von hoher Reinheit. Während sich bei der Dünnschichtchromatographie nur noch Prolin von Diprolin unterscheiden ließ, gelang es, die Oligoproline bei der Dünnschichtelektrophorese (DE, 1000 V) bis zum Pentadekameren und bei der Hochspannungspapierelektrophorese (HE, 5000 V) sogar bis zum Eikosameren eindeutig zu trennen (Tab. 1).

Die Trennungen sind bei Entwicklung mit tert.-Butylhypochlorit/Tolidin oder besser Isatin⁶⁾ so empfindlich, daß wir bei Hexaprolin noch 0.5 % an absichtlich zugemischtem Pentaprolin (DE) oder bei Eikosaprolin noch 4 % an zugemischtem Nonadecaprolin (HE) finden konnten. Mit Hilfe dieser semiquantitativen Auswertung konnten wir feststellen, daß im synthetisierten Eikosameren maximal < 4 % an Nonadecaprolin vorhanden sein können, was einem Umsatz von etwa 99.8 %⁷⁾ in jedem der 19 Syntheseschritte entspricht. Bei den niederen Oligopeptiden ist die Empfindlichkeit noch größer. Im Hexaprolin können danach

Tab. 1: Oligo-L-proline nach der Festphasenmethode

n	Ausbeute ^{a)}	Schmp. (°C)	$[\alpha]_D^{22}$ (c=1, in H ₂ O)	E _F -Werte ^{b)}	
1	100	220-2	- 86,5	1.00 ^{c)}	
2	96	144-5	-171	0.84	
3	69	122	-220	0.72	
4	67	170	-291	0.60	
5	65	189	-338	0.52	1.00 ^{d)}
6	63	209	-374	0.91	
7	61	228	-394	0.77	
8	60	>260	-412	0.72	
9	59	>260	-435	0.66	
10	58	>280	-456	0.60	1.00 ^{e)}
11	57	>280	-464	0.92	
12	56	>280	-472	0.83	
13	55	>300	-480	0.75	1.00 ^{f)}
14	54	>300	-491	0.70	0.94
15	53	>300	-496	0.64	0.90
16	53	>300	-499	0.86	
17	52	>300	-505	0.81	1.00 ^{g)}
18	52	>300	-509	0.95	
19	51	>300	-513	0.90	
20	51	>300	-520	0.84	

a) Durchschnittswerte mehrerer Versuche

b) Die Laufstrecke der Bezugssubstanz x (mm) ist unter c) - g) angegeben

c) x = 118 mm, 1000 V, 40 mA, 40 Min.

d) x = 149 mm, 1000 V, 80 mA, 120 Min.

e) x = 143 mm, 1000 V, 70 mA, 240 Min.

f) x = 328 mm, 5000 V, 110 mA, 140 Min.

g) x = 349 mm, 5000 V, 115 mA, 210 Min.

Elektrolyt: Ameisensäure-Eisessig-Wasser 1:1:3

DE: Kieselgel G/Kieselgur G (1:1); HE: Papier Schleicher-Schüll 2043b

nöchstens <0.5 % Pentaprolin enthalten sein, entsprechend einem Umsatz von mehr als 99.9 % in jeder Stufe.

Der Vergleich der optischen Drehwerte der konventionell²⁾ und nach der Festphasenmethode hergestellten Oligopeptide zeigte gute Übereinstimmung: das gleiche

gilt für die Drehwerte von Oligoproline, die an fester Phase, aber durch Fragmentverknüpfung (und damit in weniger Schritten) hergestellt waren.

Die Reinheit der Oligoproline auch nach 19 Syntheseschritten ist überraschend hoch, was auch dann gilt, wenn man sich der sinkenden Unterschiede in den Eigenschaften von aufeinanderfolgenden Oligomeren und der damit verbundenen sinkenden Empfindlichkeit der Analysenmethoden bewußt bleibt. Wir führen dies auf die bekannte Ausbildung einer starren Helix-Konformation der Peptidkette zurück, die bereits ab Triprolin eintritt^{1,2)}. Die helicale Struktur der polymergebundenen Oligoproline verhindert eine Verknäuelung der Peptidkette, so daß der Zugang der Kupplungsreagenzien zu den endständigen Aminogruppen nur noch durch die Diffusion in der polymeren Matrix bestimmt wird.

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. und der Studienstiftung des deutschen Volkes für ein Stipendium an J. M.

Literatur:

- 1) M. Rothe, W. Dunkel, K.-D. Steffen, HJ. Schneider und M. Zamani, Angew. Chem. 80, 413 (1968); Angew. Chem., internat. Edit. 7, 399 (1968); M. Rothe, R. Theysohn, K.-D. Steffen, M. Kostrzewa und M. Zamani, Proc. 10th Europ. Peptide Sympos., Abano Terme, 1969; North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1971, S. 179.
- 2) M. Rothe, R. Theysohn und K.-D. Steffen, Tetrahedron Lett. 1970, 4063.
- 3) N- und C-geschützte Oligoproline bis n = 11: L. Stryer und R. Haughland, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 58, 719 (1967); G. Gabor, Biopolymers 6, 809 (1968).
- 4) M. Rothe und J. Mazánek, Angew. Chem. 84, 290 (1972); Angew. Chem., internat. Edit. 11, 293 (1972).
- 5) M. Rothe und J. Mazánek, Proc. 3rd Amer. Peptide Sympos., Boston, 1972; Ann Arbor Science Publ., Inc., Ann Arbor, Mich., im Druck.
- 6) R. Monier und M. Jutisz, Biochim. Biophys. Acta 14, 551 (1954).
- 7) J. M. A. Baas, H. C. Beyerman, B. van de Graaf und E. W. B. de Leer, Proc. 10th Europ. Peptide Sympos., Abano Terme, 1969; North-Holland Publ. Co., Amsterdam 1971, S. 173.