

3-Nitro-4-Aminomethylbenzoylderivate von Poly-
ethylenglykolen: Eine neue Klasse von Photo-
sensitiven löslichen Polymeren Trägern zur
Synthese von C-terminalen Peptidamiden

V.N. Rajasekharan Pillai, Manfred Mutter und Ernst Bayer⁺
Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen,
7400 Tübingen 1, West Germany

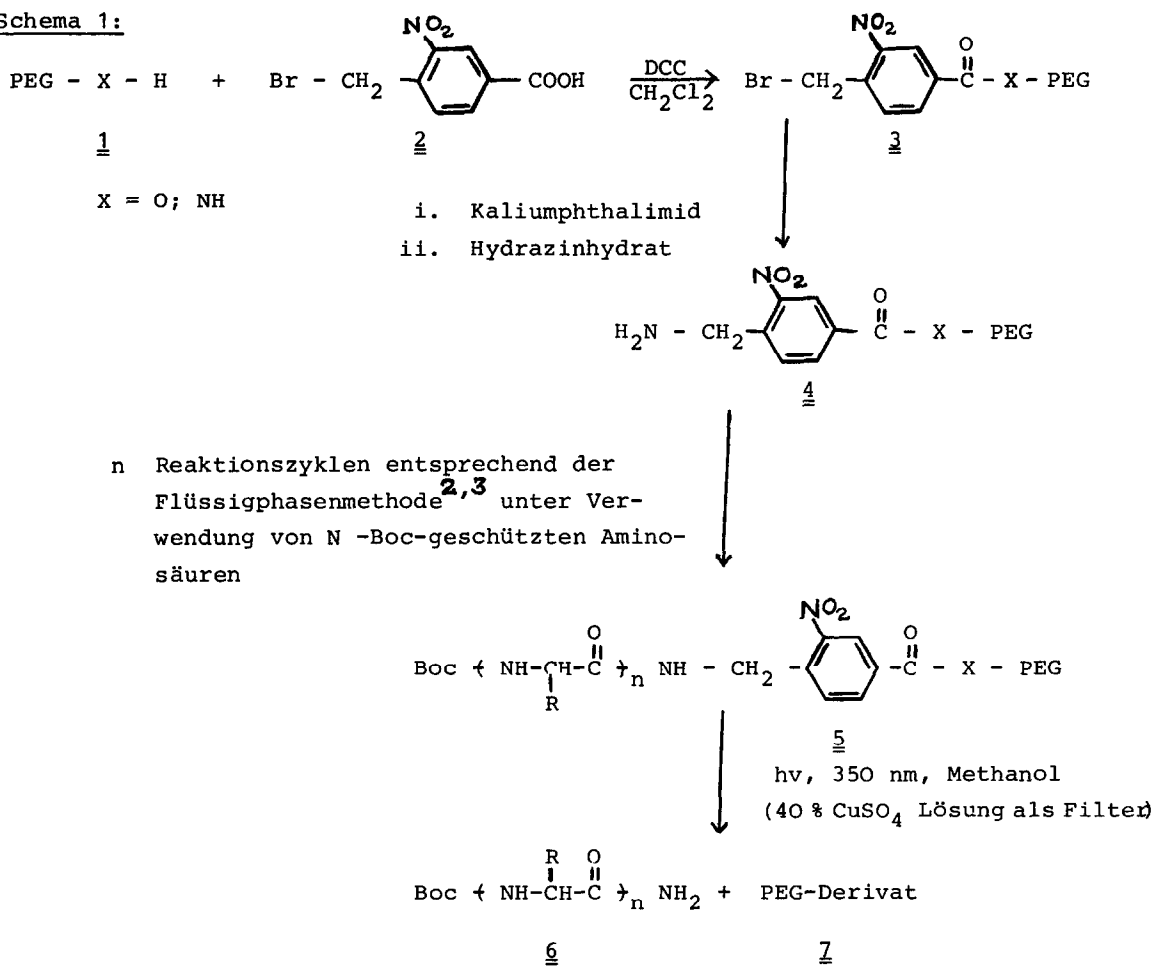
Zusammenfassung

Die Synthese von 3-Nitro-4-aminomethylbenzoylpolyethylenglykol und seine Anwendung in der Flüssigphasenpeptidsynthese wird beschrieben. Vollgeschützte Peptide können durch Photolyse als C-terminale Amide quantitativ vom polymeren Träger abgespalten werden.

Bei der Flüssigphasenmethode zur Synthese von Polypeptiden wird Polyethylenglykol (PEG) als solubilisierende C-terminale Schutzgruppe zum stufenweisen Aufbau der Peptidkette verwendet¹⁻³. Zur Fixierung der C-terminalen Aminosäure an PEG sind inzwischen eine Reihe von Methoden beschrieben worden, die eine schonende und milde Abspaltung des Peptids mit freier Carboxylgruppe vom polymeren Träger ermöglichen³⁻⁶. Durch die im Folgenden beschriebene Verwendung von photolabilen 3-Nitro-4-aminomethylbenzoylderivaten des PEG (siehe Schema 1) ist es erstmals gelungen, vollgeschützte Peptidamide unter milden Bedingungen quantitativ vom PEG abzuspalten. Die häufig beobachteten Nebenreaktionen bei der Abspaltung des Peptids durch Aminolyse werden somit umgangen. Die Überführung der endständigen OH-Gruppen von PEG in NH₂-Gruppen⁷ ("Amino-PEG") erlaubt eine vollständige Derivatisierung des PEG mit der photolabilen Ankergruppe und führt damit zu hohen Beladungsausbeuten.

Die neuen löslichen Träger wurden entsprechend Schema 1 dargestellt. PEG bzw. PEG-NH₂ 1 (Mol. Gew. 6000) wurden in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid (10 Eq.) mit 3-Nitro-4-bromomethylbenzoylsäure 2 (10 Eq.) in Methylenchlorid zum entsprechenden 3-Nitro-4-bromomethylbenzoylpolyethylenglykol 3 (0.29 mM/g Br) gekuppelt. Alternativ wurde 3 durch Umsetzung von PEG mit 3-Nitro-4-bromomethylbenzoylchlorid (4 Eq.) unter Rückflußkochen in Toluol erhalten. Durch Behandlung von 3 mit Kaliumphthalimid (5 Eq.) in Dimethylformamid unter Stickstoffatmosphäre und anschließender Hydrolyse des resultierenden Produkts mit Hydrazinhydrat (10 Eq.) in Ethanol wurden die 3-Nitro-4-aminomethylbenzoylpolyethylenglykole 4 (0.24 mM/g NH₂) dargestellt. Die Produkte 1-4 wurden durch Ausfällung mit Ether aus Methylenchlorid- und/oder Dimethylformamidlösungen sowie durch Umkristallisation aus Ethanol von den niedermolekularen Überschüssen befreit. In Methylenchlorid und Dimethylformamid unlösliche Komponenten wurden vor der Ausfällung mit Ether durch Filtration von den PEG-Derivaten entfernt.

Schema 1:

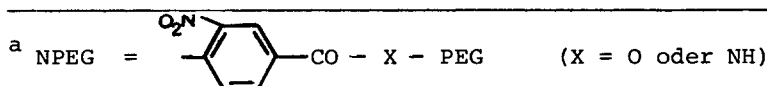


Die N-geschützten Peptide 5 wurden entsprechend dem Standardzyklus der Flüssigphasenmethode^{2,3} stufenweise unter Verwendung von symmetrischen Boc-Aminosäureanhydriden in Methylenchlorid/Dimethylformamid aufgebaut. Alle Kupplungsreaktionen, einschließlich der Verknüpfung der C-terminalen Aminosäure mit PEG-Derivat 4, verliefen nach quantitativer Umsatzkontrolle⁹ vollständig.

N-geschützte Aminosäure- bzw. Peptidamide 6 wurden durch Photolyse der entsprechenden PEG-Derivate 5 wie folgt erhalten: Eine Lösung von Verbindung 6 in Methanol oder Ethanol (1.5 - 2.5 g in ca. 150 ml) wurde mit Licht der Wellenlänge 350 nm unter Stickstoffatmosphäre bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte mit einer Hanovia 450 W Lampe (Hanovia Nr. 679 A 36) in einem doppelwandigen Quarzgefäß, das in die Reaktionslösung eingetaucht wurde.

Tabelle 1:

Verbindung <u>5</u>	Bestrahlungszeit (h)	Abgespaltenes Produkt <u>6</u> (Ausbeute in %) ^b	Fp °C	Aminosäureanalyse von <u>6</u>
Boc-Val-HN-CH ₂ -NPEG ^a	16	Boc-Val-NH ₂ (93)	154°	-----
Boc-Gly-HN-CH ₂ -NPEG	12	Boc-Gly-NH ₂ (95)	143°	-----
Boc-Pro-HN-CH ₂ -NPEG	12	Boc-Pro-NH ₂ (93)	174°	-----
Boc-Pro-Val-HN-CH ₂ -NPEG	18	Boc-Pro-Val-NH ₂ (97)	82°	Pro, 0.90 Val, 1.04
Boc-Lys(Z)-Gly-HN-CH ₂ -NPEG	12	Boc-Lys(Z)-Gly-NH ₂ (90)	79°	Lys, 1.02 Gly, 0.97
Boc-Leu-Ala-Gly-Val-CH ₂ -NPEG	16	Boc-Leu-Ala-Gly-Val-NH ₂ (95)	137°	Leu, 1.00 Ala, 0.95 Gly, 1.02 Val, 0.97



^b Die Ausbeute der Abspaltung wurde durch Hydrolyse und anschließender Aminosäureanalyse des PEG-Derivats 7 nach Entfernung des Peptids 6 bestimmt.

Eine 40 %-ige Kupfersulfatlösung wurde während der Bestrahlung über einen Kryostaten durch das doppelwandige Quarzgefäß zirkuliert und diente als Filter zum Ausschluß von Licht mit Wellenlängen unter 320 nm und als Kühlflüssigkeit. Nach beendeter Photolysereaktion (12 - 18 h) wurde das Lösungsmittel i.Vak.

entfernt, der Rückstand in wenig Methylenchlorid aufgenommen und der polymere Träger durch Zugabe von Ether gefällt.

Das N-geschützte Peptidamid wurde anschließend nach den üblichen Verfahren³ aufgearbeitet und gereinigt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Sämtliche Aminosäure- bzw. Peptidamide konnten selbst bei C-terminal stark gehinderten Aminosäureresten in Ausbeuten von über 90 % photolytisch gespalten werden. Die photolabile Verankerung von Peptiden an PEG eröffnet somit die Möglichkeit, auch biologisch aktive Peptidamide nach dem rationellen stufenweisen Trägerverfahren in homogener Lösung in hohen Ausbeuten zu erhalten.

Literatur

1. E. Bayer und M. Mutter, Nature, 237, 512 (1972).
2. M. Mutter und E. Bayer, Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 13, 88 (1974).
3. M. Mutter und E. Bayer, in "The Peptides", Ed. J. Meienhofer und E. Gross, Vol. II, Acad. Press, New York, im Druck.
4. F.S. Tjoeng, W. Staines, S. St.Pierre und R.S. Hodges, Biochim. Biophys. Acta, 490, 489 (1977).
5. F.S. Tjoeng, E. Tong und R.S. Hodges, J. Org. Chem., 43, 4190 (1978).
6. F.S. Tjoeng und R.S. Hodges, Tetrahedron Letters, 1979, 1273.
7. M. Mutter, Tetrahedron Letters, 1978, 2839.
8. D.H. Rich und S.K. Gurwara, Tetrahedron Letters, 1975, 301.
9. H. Hagenmaier und M. Mutter, Tetrahedron Letters, 1974, 767.

(Received in Germany 20 April 1979)