

DARSTELLUNG GESCHÜTZTER PEPTID-FRAGMENTE UNTER
EINSATZ SUBSTITUIERTER TRIPHENYLMETHYL-HARZE

Kleomenis Barlos^{*a)}, Dimitrios Gatos^{a)}, John Kallitsis^{a)}, Giorgos Papaphotiu^{a)},
Petros Sotiriu^{a)}, Yao Wenging^{a)} und Wolfram Schäfer^{b)}

a) Chemisches Institut der Universität Patras, Patras, Griechenland

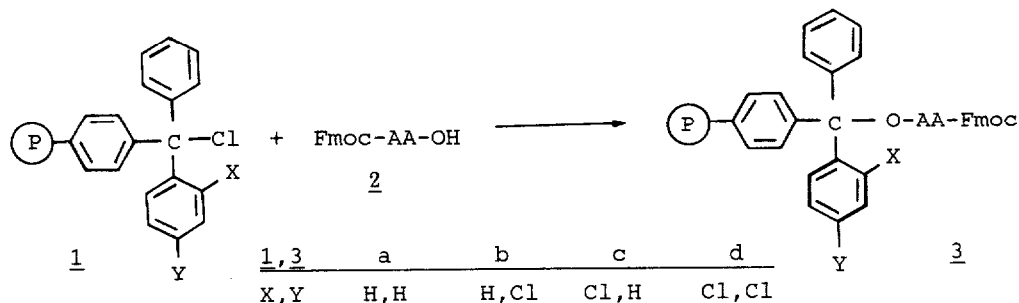
b) Max-Planck-Institut für Biochemie, 8033-Martinsried, B.R.D.

Summary: Substituted triphenylmethyl(trityl) resins have been tested for their applicability for the synthesis of protected peptide fragments. Among them the 2-chlorotrityl resin 3c fulfills all requirements needed to obtain the desired fragments in high yield and purity, using Fmoc-amino acids protected at their side chains with groups of the t-butyl type.

Die Kondensation partiell geschützter Fragmente in Lösung ist eine effektive Methode zur Synthese langkettiger Peptide. Die Peptidsegmente kann man sehr einfach nach der "solid-phase" Methode an Fluorid-Ionen labilen^{1,2}, photosensitiven^{3,4}, "Allyl"^{5,6} und säurelabilen Harzen⁷⁻¹¹) erhalten. Geeignet sind insbesondere Harze, aus welchen die synthetisierten Peptide mit intaktem Seitenschutz durch extrem milde Acidolyse abgespalten werden können.

Zur Synthese von Fragmenten, welche durch Gruppen des t-butyl-Typs geschützt sind, wurden Dialkoxybenzyl-^{9,10}) und Trialkoxydiphenylmethyl-Harze¹¹) verwendet. Beide Harze können schwer racemisierungsfrei mit Fmoc-Aminosäuren 2 verestert werden. Außerdem ist einerseits die selektive Abspaltung des synthetisierten Peptids im Falle des Dialkoxybenzylalkohol-Harzes mit 1%-Trifluoressigsäure (TFA) nicht in allen Fällen gesichert, andererseits erfordert die extreme Säurelabilität vom Trialkoxydiphenylmethyl-Harz den Zusatz von Basen während der Kupplungsreaktionen um eine partielle Peptidabspaltung während der Synthese zu verhindern¹¹).

Aus Untersuchungen zur Peptidsynthese in Lösung ist bekannt¹²), daß Tritylester von Aminosäuren extrem säureempfindlich sind. Wir untersuchten deshalb die Eignung der "polymeren" Tritylester 3 zur "solid-phase" Synthese geschützter Peptidfragmente.



(P) = Polystyryl; Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl; AA = α -Aminosäure

Die zur Darstellung von 3 benötigten Tritylchloride 1 erhält man, wie für 1a beschrieben¹³⁾. Aus der Reaktion von 1 mit Fmoc-Aminosäuren 2 und Diisopropylethylamin (DIEA) in Dichlormethan erhält man die Ester 3.

Veresterung der Trityl-Harze 1 mit Fmoc-Aminosäuren 2

1 g Harz (1.4-1.6 mmol Cl⁻/g Harz) in 10 ml trockenem Dichlormethan wird unter Schütteln mit 415 mg (3 mmol) DIEA und 1.2 mmol 2 versetzt und 30-60 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 0.5 ml DIEA und 3 ml Methanol wird weitere 15 min gerührt. Das Harz wird abgesaugt, mit DMF, Dichlormethan, Isopropanol und Diethylether gewaschen und i. Vak. 2h bei Raumtemperatur getrocknet. Die erhaltenen Harze sind mit 0.3-0.8 mmol Aminosäure/g Harz beladen. Bei Verwendung eines kleineren bzw. größeren Überschusses an 2 können Harze 3 mit einer Beladung von 0.05-1.1 mmol Aminosäure/g erhalten werden.

Zur quantitativen Spaltung der Esterbindung in 3a und 3b benötigt man die Einwirkung von Eisessig/Dichlormethan (1:9) während 15-20 min bei Raumtemperatur. Die stabileren Verknüpfungen in 3c und 3d werden mit Eisessig/Trifluorethanol (TFE)/Dichlormethan (1:1:8) innerhalb 30 min gespalten. Unter diesen Spaltbedingungen verbleiben die zum Seitenkettenschutz eingesetzte Gruppen vom t-Butyl-Typ intakt. Der N^{im}-Trt-Rest von Fmoc-His(Trt)-OH^{14,15)}, der säureempfindlichsten Gruppe, die in Peptidsynthesen nach der Fmoc-Methode eingesetzt wird, verbleibt unter diesen Bedingungen ebenfalls intakt. Die enorme sterische Hinderung der während der Spaltreaktion entstehenden "polymeren" Tritylkationen unterbindet vollständig den elektrophilen Angriff auf die Indol-Funktion von Tryptophan.

Da unsere Untersuchungen zeigten, daß die p-Chlorsubstitution keinen wesentlichen Einfluß auf die Stabilität der Esterverknüpfung ausübt, führten wir Peptidsynthesen nur unter Einsatz von 3a und 3c durch. Die Kupplungsreaktionen werden mit einem dreifachen Überschuß an 2 durchgeführt. Ihre Aktivierung erfolgte in einem Vorreaktor mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) [2/HOBT/DCC = 1 : 1.5 : 1; 10 ml DMF/mmol 2; 20 min bei 20°C].

Fmoc-Arg(Mtr)-Pro-Lys(Boc)-Pro-OH 4

Fmoc-Lys(Boc)-Ile-Ile-Gly-OH 5

Fmoc-Phe-His(Trt)-Thr(t-Bu)-Phe-Pro-OH 6

Fmoc-Leu-Ser(t-Bu)-Thr(t-Bu)-Cys(Trt)-Met-Leu-Gly-OH 7

Boc-Cys(Trt)-Gly-Asn-Leu-Ser(t-Bu)-Thr(t-Bu)-Cys(Trt)-Met-Leu-Gly-OH 8

Fmoc-Asn-Leu-Ser(t-Bu)-Thr(t-Bu)-Cys(Trt)-Met(O)-Leu-Gly-Thr(t-Bu)-Tyr(t-Bu)-
Thr(t-Bu)-Gln-Asp(t-Bu)-Phe-Asn-Lys(Boc)-OH 9

Fmoc-Ala-Glu(t-Bu)-Asp(t-Bu)-Glu(t-Bu)-Ser(t-Bu)-Ala-Glu(t-Bu)-Ala-Phe-Pro-OH
10

Die extreme Säurelabilität von 3a verursacht während der Synthese des Substanz P(1-4)-Fragments (4) 15% Peptidabspaltung vom Harz. Dagegen folgt aus den Ergebnissen(Tab.1) der Synthese des Peptids 5, der Calcitonin-Fragmente 6-9 und des Corticotropin-Fragments 10, daß die höhere Stabilität der 2-Chlortrityl-Harze 3 die "solid-phase" Synthese von Peptiden in exzellenter Ausbeute erlaubt.

Während der Peptidkettenverlängerung wird nach jeden Synthesecyclus eine kleine Menge des Harzes entnommen, für 1-10 min mit Eisessig/TFE/Dichlormethan (1:1:8 - 2:2:6) gespalten und durch Dünnschichtschromatographie(DC) die Reinheit des Peptids überprüft. Dabei beobachtet man, daß die Abspaltung der Peptide vom Harz, nicht in allen Fällen mit der gleichen Geschwindigkeit erfolgt. Daraus folgt, daß die Stabilität der Verknüpfung auch von der individuellen Peptid-Sequenz abhängig ist. Am Beispiel der Isolierung von 9 wird die Effektivität der verwendeten Methode demonstriert.

Isolierung von 9

1 g (0.177 mmol 9; Startsubstitution : 0.35 mmol Lys/g Harz) wird mit 15 ml eines Gemisches von Eisessig/TFE/Dichlormethan(2:2:6) versetzt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird das Harz abgesaugt und mit der Spaltlösung gut gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden i. Vak. eingedunstet und mit Wasser behandelt. Der ausgefallene Feststoff wird abzentrifugiert, mit Diethylether gewaschen und i. Vak. getrocknet. Man erhält 462 mg (94%) rohes 9. Weitere Reinigung erfolgte mit Mitteldruckchromatographie(Tab.1).

Tabelle 1. Isolierung der Peptide 4-10

Peptid	Spaltbe- ^{a)} dingungen	Rohausbeute [%]	Reinigung ^{b)}	Reines ^{c)} Peptid[%] ^{d)}	Molmasse FAB-MS ^{e)}
<u>4</u>	A	86	A	69	1031[(M+H) ⁺]
<u>5</u>	C	96	A	82	733[(M+H) ⁺]
<u>6</u>	B	89	A	70	1169[(M+H) ⁺]
<u>7</u>	C	99	B	87	1301[(M+H) ⁺]
<u>8</u>	C	99	B	89	1717[(M+Na) ⁺]
<u>9</u>	C	94	C	81	2774[(M+Na) ⁺]
<u>10</u>	C	100	B	76	1590[(M+Na) ⁺]

^{a)} A=Eisessig/Dichlormethan (5:95), 15 min bei Raumtemperatur; B=Eisessig/TFE/Dichlormethan(2:2:6), 1 h bei Raumtemperatur; C = Eisessig/TFE/Dichlormethan(1:1:8), 45 min bei Raumtemperatur.-^{b)} Säulenchromatographie, Kieselgel 60, 230-400 mesh, Fa. Merck, 10 g/100 mg Peptid; Eluent: A = Toluol/Eisessig/Methanol(8:0.7:0.9); B = Chloroform/Eisessig/Methanol(10:0.3:0.6); C = Chloroform/Methanol(7.2:2.8).-^{c)} Homogen in zwei HPTLC-Systemen(HPTLC Alufolien F₂₅₈, Fa. Merck.-^{d)} Berechnet anhand der anfänglichen Substitution der Harze an C-terminalen Aminosäuren.-^{e)} Massenspektrometer-Datensystem MAT 312/SS220 der Fa. Varian-Finnigan-MAT, ausgerüstet mit einer FAB-Einrichtung der Fa. Ion Tech Ltd.-

Wir danken dem "Ministerium für Energie und Forschung" und Biohellas AG für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

LITERATURVERZEICHNIS

1. D.G.Mullen und G.Barany, *Tetrahedron Lett.* 28(1987)491.
2. R.Ramage, C.A.Barron, S.Bieleki und D.W.Thomas, *Tetrahedron Lett.* 28(1987)4105.
3. D.H.Rich und S.K.Gurwara, *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* 1973, 610.
4. A.Ajayaghosh, V.N.Rajasekharan, *Tetrahedron* 44(1988)6661 und dort zitierte Literatur.
5. H.Kunz und B.Dombo, *Angew.Chem.* 100(1988)732.
6. B.Blankenmeyer-Menge und R.Frank, *Tetrahedron Lett.* 29(1988)5871.
7. R.C.Sheppard und B.J.Williams, *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* 1982, 587; E.Atherton, E.Brown, G.Priestley, R.C.Sheppard und B.J.Williams, *Proceedings of the Seventh American Peptide Symposium*, D.H.Rich and E.Gross, Eds, Pierce Chemical Company, Rockford, Il., USA, 1981, 163.
8. E.Pedroso, A.Grandas, M.Saralegui, E.Giralt, C.Granier und J.Van Rietschoten, *Tetrahedron* 38(1982)1183.
9. M.Mergler, R.Tanner, J.Gosteli und P.Grogg, *Tetrahedron Lett.* 29(1988)4005.
10. M.Mergler, R.Nyfelner, R.Tanner, J.Gosteli und P.Grogg, *Tetrahedron Lett.* 29(1988)4009.
11. H.Rink, *Tetrahedron Lett.* 28(1987)3787.
12. E.Wünsch, *Synthese von Peptiden*, Houben-Weyl-Müller, Bd.XV/1, Thieme, Stuttgart, 1974.
13. J.M.J.Fréchet und L.J.Nuyens, *Can.J.Chem.* 54(1976)926.

(Received in Germany 18 May 1989)