

VERESTERUNG VON PARTIELL GESCHÜTZTEN PEPTID-FRAGMENTEN MIT HARZEN.
EINSATZ VON 2-CHLORTRITYLCHLORID ZUR SYNTHESE VON LEU¹⁵-GASTRIN I

Kleomenis Barlos^{a)}*, Dimitrios Gatos^{a)}, Stauros Kaposos^{a)}, Giorgos Papaphotiu^{a)}, Wolfram Schäfer^{b)} und Yao Wenqing^{a)}

a) Chemisches Institut der Universität Patras, Patras, Griechenland

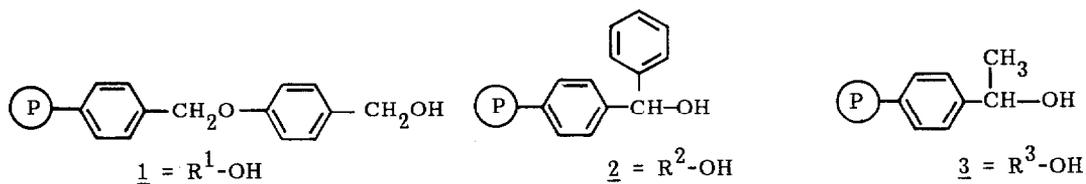
b) Max-Planck-Institut für Biochemie, 8033 Martinsried, B.R.D.

Summary: The esterification of several partially protected peptide fragments through the C-terminal or a free side chain carboxy group with hydroxy groups containing resins and the 2-chlorotritylchloride resin 8 is described. As an application example crude protected Leu¹⁵-gastrin I (15a) has been obtained in 99% yield by the "solid-phase" method using 8 as the solid support. Crude 15a has been deprotected to free Leu¹⁵-gastrin (16) which is thus obtained in 92% yield and 90% purity.

Die nebenprodukt- und racemisierungsfreie Verknüpfung von partiell geschützten Peptidsegmenten mit geeigneten Harzen kann die "solid-phase" Synthese von größeren Peptiden vereinfachen. Die benötigten Segmente kann man in Lösung oder durch "solid-phase" Synthese z.B. an extrem säureempfindlichen Harzen¹⁾ erhalten, reinigen, an das Harz verknüpfen und die Synthese fortführen.

Wir untersuchten die Möglichkeit partiell geschützte Fragmente mit den säureempfindlichen Alkoxybenzylalkohol-²⁾ (1), Diphenylmethanol-³⁾ (2), 1-Phenylethanol-⁴⁾ (3) und den 2-Chlortriphenylmethylchlorid¹⁾ (8)-Harzen zu verknüpfen.

Die Veresterung von 1-3 mit den Fmoc- und Trt-Fragmenten 4-7(a-b) erfolgt nach der Methode von Mitsunobu^{3,5)}. Die resultierenden Harze 4-7(c-h) werden dabei mit einer Beladung von 0.12-0.59 mmol Peptid/g Harz erhalten, wenn man die Peptide in einen dreifachen Überschuß (bezogen auf die freien Hydroxyl-Gruppen des Harzes) einsetzt. Der Einsatz eines geringeren Überschusses an Peptid führt in den meisten Fällen nur zu einer geringen Beladung (0.01-0.02 mmol Peptid/g Harz) der Harze. Obwohl diese Veresterungsreaktion, wie man aus der Analyse der erneut aus dem Harz abgespalteten Peptide erkennen kann, racemisierungs- und nebenproduktfrei verläuft, scheint sie auf den Einsatz kleiner Peptide beschränkt zu sein. Aus Untersuchungen zur Peptidsynthese in Lösung ist bekannt, daß



Pr-Leu-Phe-OR

4

Pr-Leu-Gly-OR

5

Pr-Leu-Gly-Pro-Val-OR

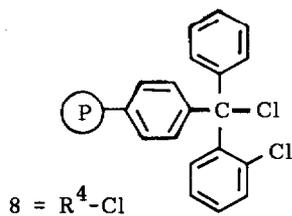
6

Fmoc-Val-Asp(Bzl)-Ile-

Lys(Z)-Val-OR

7

4-7 a b c d e f g h
 Pr,R Fmoc,H Trt,H Fmoc,R¹ Trt,R¹ Fmoc,R² Trt,R² Fmoc,R³ Trt,R³



Fmoc-Phe-His(Trt)-Thr(t-Bu)-Phe-Pro-OR

9

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

10

9,10 a b
 R H R⁴

Fmoc-Gly-OR

11

Fmoc-Asn-Gly-OR

12

11,12 a b c
 R H Ph₂CH R⁴

Fmoc-Lys(Boc)-Pro-Val-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Mtr)-Arg(Mtr)-

Pro-Val-Lys(Boc)-Val-Tyr(t-Bu)-Pro-Asn-Gly-OR

13

13 a b
 R H R⁴

Fmoc-Asp(OR)-Phe-NH₂14

14 a b c d e
 R H t-Bu R¹ R² R⁴

pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(t-Bu)-Glu(t-Bu)-Glu(t-Bu)-Glu(t-Bu)-

Glu(t-Bu)-Ala-Tyr(t-Bu)-Gly-Trp-Leu-Asp(R)-Phe-NH₂

15 a b
 R H R⁴

pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂16

Peptide mit Triphenylmethylchlorid (Tritylchlorid, Trt-Cl) in sehr guten Ausbeuten verestert werden können⁶⁾. Deshalb prüften wir, ob auch "polymere" Trt-Cl dazu geeignet ist. Für unsere Untersuchungen verwendeten wir das 2-Chlortritylchlorid-Harz (8), da dessen Peptidester stabiler und zur Peptidsynthese geeigneter als die des analogen "polymeren" Tri-tylchlorids sind.

Die Verknüpfung der Calcitonin-Fragmente 9a und 10a mit 8 erfolgt mit Diisopropylethylamin (DIEA) in Dichlormethan, für 12 h bei Raumtemperatur. Der Einsatz von überschüssigem Harz 8 (50 mg Peptid, 100 mg 8) führt zu etwa 80% Veresterung und man erhält die Harze 9b und 10b mit einer Beladung von 0.18 und 0.12 mmol Peptid/g Harz.

Ein Anwendungsbeispiel für die beschriebene Methode ist die Synthese des geschützten Corticotropin(11-26) Fragments 13a. Ausgehend vom Harz 11c erhält man mit Fmoc-Asn-OH und "in situ" Aktivierung mit 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) das Dipeptid 12c. Nach Abspaltung vom Harz mit Eisessig/Trifluorethanol (TFE)/Dichlormethan(1:1:8) und dünnschichtschromatographische Analyse des Peptids 12a erkennt man, daß dieses durch geringe Mengen weniger polaren Nebenprodukte verunreinigt ist. Um die gesamte Synthese nicht durch diese zu belasten, synthetisierten wir 12a aus Glycindiphenylmethylester⁷⁾ durch Kupplung mit Fmoc-Asn-OH (HOBt/DCC-Methode) und Abspaltung der Diphenylmethylgruppe des erhaltenen kristallinen Esters 12b, mit 15% Trifluoressigsäure in Dichlormethan über 20 min bei Raumtemperatur⁸⁾. Das Peptid 12a kann dann mit 8 durch Einwirkung von DIEA in Dichlormethan zu 12c, mit einer Beladung von 0.31 mmol 12a/g Harz, verestert werden. Die Synthese von 13a wird dann wie üblich, durch vorgeformte Fmoc-Aminosäure-(1-benzotriazolylester) fortgeführt. Durch Einwirkung von Eisessig/TFE/Dichlormethan(2:2:6) erhält man schließlich rohes 13a in 97%. Seine Reinigung erfolgt durch Mitteldruckchromatographie und seine Struktur wird mit FAB-MS als die erwartete gefunden.

Eine weitere Möglichkeit zur Bindung eines partiell geschützten Fragments an ein Harz besteht in der Reaktion einer Seitenkettencarboxylgruppe mit einer funktionellen Gruppe des Harzes.

Für unsere Untersuchungen wählten wir die Veresterungsreaktionen des Dipeptids 14a mit 1, 2 und 8. Das Peptid 14a erhält man in 82% Ausbeute, indem man Fmoc-Asp(t-Bu)-OH mit Phenylalaninamid kuppelt und den t-Butyl-Rest von 14b mit 50%-TFA abspaltet⁹⁾. Seine erfolgreiche Veresterung mit den Harzen 1-3 und 8 würde die "solid-phase" Synthese von säureempfindlichen Peptid-Amiden z.B. der Cholecystokinin-Gastrin-Gruppe ermöglichen.

Um diese Möglichkeit zu prüfen synthetisierten wir Leu¹⁵-Gastrin I (Leu¹⁵-little gastrin, 16).

Die Mitsunobu Veresterung von 14a mit 1 und 2 führt zu den Harzen 14c, d mit einer synthetisch unbedeutender Beladung (0.01-0.02 mmol 14a/g Peptid). Dagegen führt die Reaktion eines zweifachen Überschusses von 14a mit 8 zum Dipeptidester 14e mit einer Beladung von 0.34 mmol 14a/g Harz. Die Peptidkette wurde nun durch Einsatz eines dreifachen Überschusses vorgeformter Fmoc-AA-OBt und 2.5 h Kupplungszeit in Dimethylformamid zum Peptidester 15b aufgebaut. Eine zweifache Kupplung war bei der Einführung der Glu-7, Leu-5 und Trp-4 Einheiten zur Vervollständigung der Acylierungsreaktionen nötig. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen erfolgten durch Einwirkung von 20%-Piperidin in Dimethylformamid. Die Reinheit der erhaltenen Zwischenprodukte wurde während der Kettenverlängerung durch DC-Analyse verfolgt. Die Abspaltung der Peptide vom Harz mit Eisessig/TFE/Dichlormethan (1:1:8)

erwies sich während der Peptidkettenverlängerung als sequenzunabhängig und führt innerhalb 45 min bei Raumtemperatur zur quantitativen Abspaltung (99% isoliertes Peptid) von 15a aus dem Harz. Die zum Seitenkettenschutz verwendeten t-Butyl-Gruppen verbleiben unter diesen Bedingungen intakt. Das Rohprodukt 15a erweist sich durch HPTLC-Analyse als Homogen¹⁰⁾. Freies Leu¹⁵-Gastrin I erhält man schließlich aus 15a mit 60% TFA/Anisol/Thioglykol (85:10:5, 45 min bei Raumtemperatur) in Dichlormethan. HPLC-Analyse des erhaltenen rohen 16 (92%) zeigt, daß das Produktengemisch aus 90% 16 besteht¹¹⁾.

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

LITERATURVERZEICHNIS

1. Beiliegendes Manuskript.
2. S.S.Wang, J. Amer. Chem. Soc. 95(1973)1328.
3. G.L.Southard, G.S.Brooke und J.M.Pettee, Tetrahedron 27(1971)2701; K.Barlos, D.Gatos, J.Kallitsis, D.Papaioannou, P.Sotiriou und W.Schäfer, Liebigs Ann. Chem. 1987,1031.
4. K.Barlos, D.Gatos, J.Hondrelis, J.Matsoukas, G.Moore, W.Schäfer und P.Sotiriou, submitt.
5. O.Mitsunobu, Synthesis 1981,1.
6. K.Brunfeld und J.Halstroem, Acta chem. scand. 24(1970)3013.
7. K.Barlos, J.Kallitsis, P.Mamos, S.Patrianakou und G.Stauroopoulos, Liebigs Ann.Chem. 1987,633.
8. Fmoc-Asn-Gly-OH: 86.5%; m.p. 151-152.5^oC.- $[\alpha]_D^{20} = -2.1$ ($c = 1$, DMF).
9. Fmoc-Asp-Phe-NH₂: m.p. 210-211^oC.- $[\alpha]_D^{20} = -29.2$ ($c = 1$, DMF).
10. Geschütztes Leu¹⁵-Gastrin I (15a): m.p. 226-229^oC (dec.).- $[\alpha]_D^{20} = -11.8$ ($c = 0.5$ DMF).- HPTLC-Alufolien Fa.Merck, R_f [n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)] = 0.14, R_f [n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5, organische Phase)] = 0.55.- Korrekte Aminosäureanalyse.
11. Durch Einsatz von 90% TFA/Anisol (9:1) erhält man ein Produktengemisch bestehend aus 80% 16.- HPLC-Analyse und Reinigung von rohem 16 (72% reines 16 bezogen auf das zur Reinigung eingesetzte Rohpeptid) ist gemäß Lit.¹²⁾ durchgeführt worden.- Seine Identifizierung erfolgte durch FAB-MS [(M+H)⁺: ber. = 2079 ; gef. = 2080].
12. E.Brown, R.C.Sheppard and B.J.Willams, J.Chem.Soc.Perkin Trans.I 1983,1161.

(Received in Germany 18 May 1989)