

SYNTHESE VON CASEIN-PEPTIDEN NACH DER MERRIFIELD-METHODE

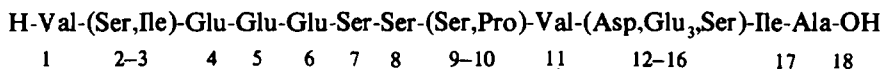
L-VAL-L-SER-L-ILE-L-GLU-L-GLU-L-GLU-L-SER-L-SER-L-PRO-L-SER-L-VAL-L-GLU-L-GLU-L-GLU-L-ASP-L-SER-L-ILE-L-ALA

K. P. POLZHOFFER und K. H. NEY
Unilever Forschungslaboratorium Hamburg

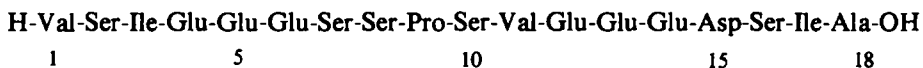
(Received in Germany 9 February 1970; Received in the UK for publication 12 March 1970)

Abstract—H-Val-Ser-Ile-Glu-Glu-Glu-Ser-Ser-Pro-Ser-Val-Glu-Glu-Glu-Asp-Ser-Ile-Ala-OH- was synthesized by the solid-phase method. The peptide was purified by gel chromatography and ion-exchange chromatography. The octadecapeptide shows α -helix-structure in 2-chloroethanol.

Die Partialstrukturformel eines Octadecapeptids aus dem α -Casein wird von Schormüller et al.¹ beschrieben:



Die Sequenzen der Aminosäuren innerhalb der Klammern sind nicht festgelegt. In der vorliegenden Arbeit wird die Synthese des Octadecapeptids:



nach der Merrifield-Methode² beschrieben. Die Teilsequenzen 2-3, 9-10 und 12-16 wurden von uns willkürlich gewählt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Als Träger bei der Festkörpersynthese diente ein Copolymerisat aus Styrol/Divinylbenzol (98/2) mit einer Korngrösse von 40-80 μm , das von uns durch Behandlung mit Zinn(IV)-chlorid in Chlormethylmethylläther² chlormethyliert wurde. Gründliches Auswaschen des Harzes vor der Chlormethylierung ist sehr wichtig, da Spuren von S-haltigen Verbindungen eine Vergiftung des Katalysators und eine intensive Rotfärbung des Ansatzes bewirken.^{3,4}

Für den Aufbau des Peptids Boc-Val-Ser(Bzl)-Ile-Glu-(OBzl)-Glu-(OBzl)-Glu(OBzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Pro-Ser(Bzl)-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-Ile-Ala am Träger wurden die in Tabelle 1 angegebenen Acyl-Aminosäuren⁵⁻⁷ in 5- bis 6-fachem Überschuss eingesetzt. Die Boc-Aminosäuren waren dünn-schichtchromatographisch in drei verschiedenen Systemen einheitlich. Schmelzpunkte und Drehungen entsprachen den Literaturwerten. Zur Abspaltung der α -Aminoschutzgruppe diente Chlorwasserstoff in Eisessig. Die entstehenden Aminosäure- bzw. Peptidhydrochloride wurden durch eine Chlorid-Titration nach Volhard bestimmt (vgl. Tabelle 1). In Abb. 1 sind die Ergebnisse dieser Titration graphisch

TABELLE 1. DATEN ZUR SYNTHESE DES OCTADECAPTIPTID

	Boc-Derivate ⁵⁻⁷		Chlorid nach Volhard	Für Aminosäure-Analysen abgenommene Harzmenge
	mMol	g	mÄqu.	mg
Ala	—	—	3.45	—
Ile	21.24	4.9	3.48	12.5
Ser	17.38	5.13	3.46	11.2
Asp	17.28	5.6	3.43	11.2
Glu	17.15	5.77	—	12.1
Glu	17.15	5.77	2.87	11.9
Glu	14.33	4.83	2.09	12.4
Val	12.54	2.72	1.77	10.0
Ser	8.83	2.60	1.73	16.3
Pro	10.38	2.23	1.71	16.0
Ser	8.55	2.52	1.79	18.2
Ser	8.93	2.63	1.81	—
Glu	9.05	3.05	1.72	16.1
Glu	10.29	3.46	1.31	13.8
Glu	7.86	2.65	1.22	20.7
Ile	7.29	1.68	1.01	25.0
Ser	5.05	1.49	0.99	24.5
Val	5.91	1.28	—	72.4

dargestellt. Im Falle der Glutaminsäure-Kupplungen erkennt man einen besonders starken Abfall der Werte. Die Mengen der für die Ancondensation benötigten Acyl-Aminosäuren wurden aufgrund der Chloridwerte berechnet.

Die Ancondensation der Boc-Aminosäuren erfolgte nach dem in Tabelle 2 dargestellten Schema.

Die Synthese wurde mit 10.0 g Boc-Ala-Polymeren begonnen; bei einem Peptidgehalt des Harzes von 0.99 mÄqu. (vgl. Tabelle 1, letzter Chloridwert) sollte das Gewicht

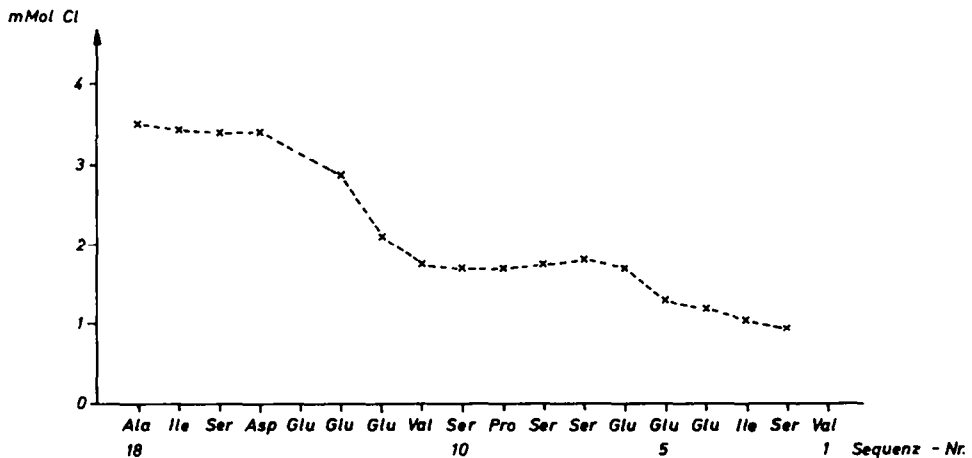


ABB 1. Titration von Triäthylaminhydrochlorid im Verlauf der Synthese von: H-Val-Ser-Ile-Glu-Glu-Glu-Ser-Ser-Pro-Ser-Val-Glu-Glu-Glu-Asp-Ser-Ile-Ala-OH

TABELLE 2

(1) Methylenchlorid	3 × waschen
(2) Äthanol	3 × waschen
(3) Eisessig	3 × waschen
(4) n HCl/Eisessig	30 Min schütteln
(5) Eisessig	3 × waschen
(6) Äthanol	3 × waschen
(7) Methylenchlorid	3 × waschen
(8) Chloroform	3 × waschen
(9) 10% Triäthylamin in Chloroform	20 Min schütteln
(10) Chloroform	4 × waschen
(11) Methylenchlorid	4 × waschen
(12) Zugabe von Boc-Aminosäure in Methylenchlorid	1 Std. schütteln
(13) dazu Dicyclohexylcarbodiimid in Methylenchlorid	16–18 Stdn. schütteln

Die Kupplungszeit wurde von uns auf 16–18 Stdn. festgelegt.

des Peptidharzes nach der letzten Kupplung 13.08 g betragen. Tatsächlich wurde eine Gewichtszunahme von 3.98 g festgestellt.

Durch Behandlung von 11.34 g Harz mit Bromwassertoff in Trifluoressigsäure wurden 1.56 g Peptidhydrobromid abgespalten; dies entspricht einer Ausbeute von 97%, bezogen auf den letzten Chloridwert (vgl. Tabelle 1).

Dünnschichtchromatographie in drei verschiedenen Laufmitteln und quantitative Aminosäure-Analyse* des Peptidhydrobromids (vgl. Tabelle 3) zeigten das Vorhandensein von Verunreinigungen an. Erst durch Gelfiltration und Ionenaustauscher-Chromatographie gelang die Feinreinigung des Octadecapeptids. Der Elutions-pH von 2.7 entsprach dem sauren Charakter des Peptids (vgl. Abb. 2).

TABELLE 3. AMINOSÄURE-ANALYSEN

	Asp	Ser	Glu	Pro	Ala	Val	Ile
Theorie	1.00	5.00	6.00	1.00	1.00	2.00	2.00
1*	1.77	3.56	6.00	0.83	1.78	1.47	2.20
2*	1.56	3.35	6.00	0.68	1.45	1.58	1.85
3*	0.97	4.34	6.00	1.16	1.25	2.13	2.12

* 1 = Peptidhydrobromid

2 = Peptid nach 2. Chromatographie an Sephadex G-15

3 = Peptid nach Ionenaustauscher-Chromatographie

Alle Hydrolysen wurden in 6n HCl im Vakuum bei 110° während 24 Stdn. ausgeführt.

Das Peptid war elektrophoretisch einheitlich. Über Cellogel-Elektrophorese und Anfärbbarkeit wurde bereits ausführlich berichtet.⁹

Wie durch ORD-Messungen* gezeigt wurde, vermag das Octadecapeptid in 2-Chloräthanol α -Helix-Struktur auszubilden.

* Die Messungen der optischen Dispersionsrotationen (ORD) und die Berechnungen dazu wurden dankenswerterweise von Herrn Dr. O. Korver, Unilever Forschungslaboratorium Vlaardingen, Vlaardingen/Holland, ausgeführt.

Während der Synthese des Octadecapeptids wurde nach den Glutaminsäure-Kupplungen immer ein Absinken der Chloridwerte (vgl. Abb. 1) beobachtet. Nach Kondensation von drei Glutaminsäuren in kumulierter Anordnung wurde nach der dritten Kupplung um etwa 50% weniger Chlorid bestimmt als vor der ersten. Dieses Phänomen wurde während der Synthese zweimal beobachtet: bei Sequenz 3–7 und 11–15 (vgl. Abb. 1). Obwohl Glu(OBzl) gegen n HCl/Eisessig stabil sein soll, könnte

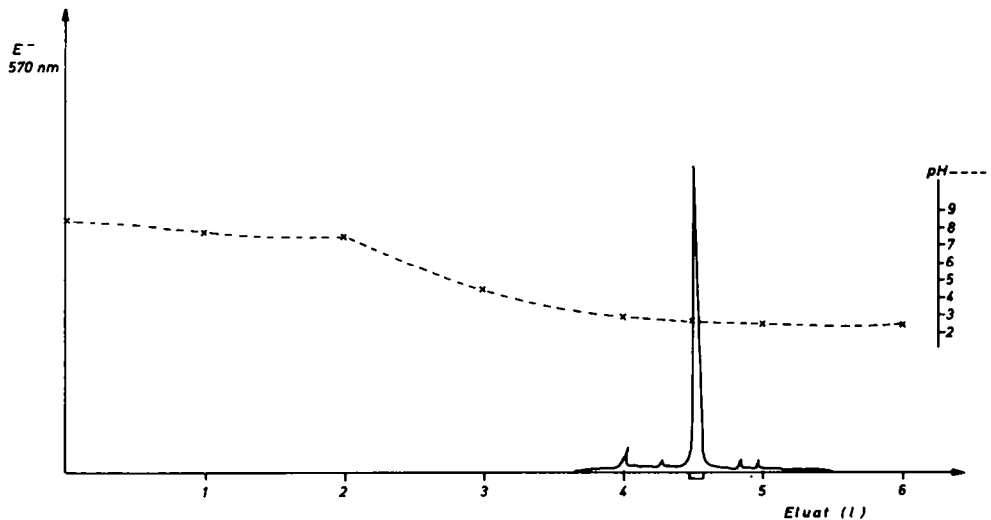


ABB 2. Ionenaustauscher-Chromatographie an Dowex 1 \times 2

Säule: 2.5 \times 90 cm

Substanz: 600 mg Octadecapeptid in 6 ml Puffer pH 9.0

Elution: 1. 2%iges Collidin, 2%iges Pyridin-Eisessig-Wasser, pH 8.4 (als Gradient)

2. 2%iges Collidin, 2%iges Pyridin-Eisessig-Wasser, pH 7.0 (als Gradient)

3. 0.1n Essigsäure

4. 1n Essigsäure

5. 2n Essigsäure

Fliessgeschwindigkeit: 10–15 ml/Std. \cdot cm²

Fractionen: je 3 ml

Säulentemperatur: 38°

durch partielle Verseifung des Glutaminsäure- γ -benzyl-esters und nachfolgende Kondensation der freien γ -Carboxyl-Gruppe mit der α -Aminogruppe ein Pyrrolidon-Derivat¹⁰ entstehen, wodurch ein Kettenabbruch während der Synthese eintreten könnte. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass bei der Synthese von -Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Sequenzen eine sterische Hinderung auftritt.

Für das Gelingen der Peptidsynthese nach Merrifield ist nach unserer Erfahrung die Reinheit und Trockenheit der Lösungsmittel, des Kupplungsreagenzes und der Aminosäure-Derivate von entscheidender Bedeutung.¹¹

Zu derselben Feststellung kamen auch Wieland *et al.*¹² bei der Synthese des Antamanids mit Hilfe der Merrifield-Technik.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Alle Lösungsmittel waren absolut wasserfrei und destilliert. N,N' -Dicyclohexylcarbodiimid wurde vor seiner Verwendung destilliert. Sämtliche Boc Aminosäuren waren flünnischichtchromatographisch einheitlich. Für die Dünnschichtchromatographie verwendete Fließmittel: Chloroform:Methanol:Eisessig 95:5:3 (v/v); n-Butanol:Pyridin:Eisessig:Wasser 30:20:6:24 (v/v); sek. Butanol:Ameisensäure:Wasser 75:13:5:11.5 (v/v); sek.-Butanol:Isopropanol:Monochloressigsäure:Wasser 70:10:3:40 (v/v). Zum Nachweis der Boc-Aminosäuren und der Peptide wurde Ninhydrin oder das Chlor-Tolidin-Reagens¹³ benutzt.

Chlormethylierung des Harzes. 400.0 g Bio-Beads S-X 2* (200–400 mesh) wurden in 2700 ml 1N NaOH suspendiert und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach gründlichem Auswaschen mit dest. Wasser suspendierte man das Harz in 2700 ml in HCl und rührte 3 Stdn. Anschließend wurde mit Wasser neutral gewaschen und je dreimal mit je 500 ml Dimethylformamid und Methanol behandelt. Das Polymere wurde 2 Tage bei 80° im Vakuum getrocknet.

Gewaschene Bio-Beads (200.0 g) wurden in 800 ml Methoxychlormethan 1 1/2 Std. bei 20° gequollen und dann auf –8° abgekühlt. Zur Suspension gab man unter Rühren in einem Guss 15 ml Zinn(IV)-chlorid in 100 ml Chlormethylmethyläther, wobei die Temperatur auf +1° stieg. Nach 45 Min bei 0° saugte man ab und wusch gründlich mit folgenden Lösungsmitteln: Dioxan:Wasser 3:1 (v/v) 4 l.; Dioxan:3n HCl 3:1 (v/v) 4 l.; Dioxan:Wasser 2:1 (v/v) 2 l.; Dioxan:Wasser 1:2 (v/v) 2 l.; Wasser 2 l.; Dioxan:Wasser 1:2 (v/v) 2 l.; Dioxan:Wasser 1:1 (v/v) 2 l.; Dioxan:Wasser 2:1 (v/v) 2 l.; Dioxan 2 l.; Dioxan:Methanol 2:1 (v/v) 2 l.; Dioxan:Methanol 1:1 (v/v) 2 l.; Dioxan:Methanol 1:2 (v/v) 2 l.; Methanol 2 l.

Es wurde im Vakuum bei 80° getrocknet, wobei keine Verfärbung des Chlormethyl-Polymeren eintrat. Chlorgehalt: 1.42 mÄqu./g.

Boc-Ala-O-CH₂-C₆H₄-Polymer. 25.0 g (35 mÄqu. Cl) Chlormethyl-Harz wurden in 100 ml Äthylacetat suspendiert und unter Rühren mit einer Lösung aus 21 mMol (3.97 g) Boc-Ala¹ und 19.2 mMol (1.94 g) Triäthylamin in 20 ml Äthylacetat versetzt. Das Gemisch wurde 24 Stdn. bei 80° am Rückfluss gekocht. Nach der Veresterung wurde gründlich mit Äthylacetat, Äthanol, Wasser und Methanol gewaschen. Das Aminosäureharz wurde im Vakuum bei 40° getrocknet. 26.22 g Auswaage, Quantitative Aminosäure-Bestimmungen ergaben einen Substitutionsgrad von 0.384 mMol Boc-Ala/g.

Aufbau von Boc-Val-Ser(Bzl)-Ile-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Pro-Ser(Bzl)-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-Ile-Ala-O-CH₂-C₆H₄-Polymer. 10.0 g Boc-Ala-O-CH₂-C₆H₄-Polymer (3.84 mMol Boc-Ala) wurden im Reaktionsgefäß nach Kusch¹⁴ folgenden Behandlungen unterworfen:

Abspaltung der Boc-Gruppe. Der Boc-Rest wurde mit 60 ml in HCl/Eisessig in 30 Min abgespalten. Ausgewaschen wurde je dreimal mit je 60 ml Eisessig, Äthanol, Methylenchlorid und Chloroform. Die Waschzeit beträgt jeweils 4 Min.

Freisetzen der Aminogruppe. Mit 6 ml Triäthylamin in 60 ml Chloroform während 25 Min; nachwaschen mit viermal je 60 ml Chloroform und Methylenchlorid, jeweils 5 Min. In aliquoten 1 eilen der vereinigten Filtrate aus 9, 10 und 11 (vgl. Tabelle 2) wurde der Chloridgehalt bestimmt.

Ankondensation der Boc-Aminosäuren. Die Acyl-Aminosäuren gab man in 5- bis 6-fachem Überschuss, in 40 ml Methylenchlorid gelöst, zum Harz, liess 1 Std. schütteln und fügte die äquivalente Menge Dicyclohexylcarbodiimid in Methylenchlorid zu und liess 16–18 Stdn. reagieren. Dann wurde je dreimal mit je 60 ml Methylenchlorid, Äthanol und Eisessig gewaschen.

Nach der letzten Kupplung wurde das Harz getrocknet und ausgewogen: 13.98 g. Während der Synthese wurden 389 mg Harz für die Aminosäure-Analyse abgenommen.

HBr.V al-Ser-Ile-Glu-Glu-Ser-Ser-Pro-Ser-Val-Glu-Glu-Glu-Asp-Ser-Ile-Ala- Abspaltung vom Träger. 11.34 g Harz suspendierte man in der für die Synthese benutzten Apparatur in 60 ml Trifluoressigsäure, 10% ig an Anisol, und leitete 90 Min sorgfältig gereinigten, d.h. viermal mit 10% Phenol in Eisessig gewaschenen Bromwasserstoff durch die Suspension.

Dann wurde abgesaugt und dreimal mit je 50 ml Trifluoressigsäure je 3 Min unter Durchleiten von Stickstoff gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden am Rotavapor im Vakuum eingedampft, der Rückstand in 150 ml Dimethylformamid gelöst und in 2 l Äther unter Rühren eingetrofft. Es bildete sich

* Fa. Bio-Rad. München.

ein weisser, flockiger Niederschlag, den man über Nacht bei 0° unter Äther stehen liess. Die Umfällung aus Dimethylformamid/Äther wurde noch zweimal wiederholt. Dann wurde das Peptidhydrobromid unter Feuchtigkeitsausschluss abgesaugt und im Vakuum über P_2O_5/KOH getrocknet: 1.56 g Auswaage.

Val-Ser-Ile-Glu-Glu-Glu-Ser-Ser-Pro-Ser-Val-Glu-Glu-Glu-Asp-Ser-Ile-Ala, *Chromatographie an Sephadex G-15*. 1.56 g Peptidhydrobromid wurden in 3 ml 0.1 M NH_4HCO_3 gelöst und mit 3 ml 1N NH_4OH auf pH 9 eingestellt. Die Lösung wurde auf eine Sephadex G-15-Säule (5 × 80 cm), äquilibriert mit 0.1 M NH_4HCO_3 , aufgegeben und mit einer Fließgeschwindigkeit von 10 ml/Std · cm² eluiert. Man sammelte Fraktionen zu je 8 ml. Das Elutionsvolumen des Peptids lag zwischen 640 und 840 ml. Die peptidhaltigen Fraktionen wurden durch DC in BPEW lokalisiert und gefriergetrocknet. Das Peptid wurde nochmals unter denselben Bedingungen chromatographiert, konnte aber von Spuren einer Verunreinigung nicht befreit werden (vgl. Tabelle 3). 1.10 g Auswaage; *R_f* (BPEW) Peptid 0.23; *R_f* (BPEW) Verunreinigung 0.16.

Feinreinigung an Dowex 1 × 2. 600 mg des vorgereinigten Peptids wurden in 3 ml Startpuffer (pH 8.4) gelöst und mit n Äthylmorpholin auf pH 9.0 eingestellt. Diese Lösung wurde auf eine Dowex-1 × 2 (200–400 mesh, Acetatform)-Säule (2.5 × 90 cm) aufgegeben, die vorher mit dem Startpuffer (pH 8.4) äquilibriert worden war. Die Säulentemperatur betrug 38°.

Folgende Puffer wurden für die Ionenaustauscher-Chromatographie verwendet: (a) 2%iges wässriges 2,4,6-Collidin, 2%iges wässriges Pyridin, mit Eisessig auf pH 8.4 eingestellt = Startpuffer. (b) 2%iges wässriges 2,4,6-Collidin, 2%iges wässriges Pyridin, mit Eisessig auf pH 7.0 eingestellt. (c) 0.1N Essigsäure. (d) 0.1N Essigsäure. (e) 2N Essigsäure.

Man liess 775 ml Startpuffer, pH 8.4, durch die Säule fließen und schloss dann einen linearen Gradienten an, bestehend aus 1200 ml pH-8.4-Puffer und 1200 ml pH-7.0-Puffer. Nach dem Gradienten wurde stufenweise mit 0.1N, 1N und 2N Essigsäure eluiert. Die Fraktionen (je 3 ml) zwischen 4509 ml und 4566 ml, pH 2.7, wurden mehrmals gefriergetrocknet (vgl. Abb. 2). 109 mg Auswaage; *R_f* (BPEW) 0.23; Aminosäure-Analyse vgl. Tabelle 3.

Danksagung—Fräulein R. Machleidt danken wir für ihre ausgezeichnete technische Mitarbeit, Herrn Dr. W. B. Schulz und Fräulein U. Dahnke für die Durchführung der Aminosäure-Analysen.

LITERATUR

- ¹ J. Schormüller, R. Hans und H.-D. Belitz, *Z. Lebensm. Unters. u. Forsch.* **131**, 65 (1966)
- ² R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149 (1963)
- ³ B. Green und L. R. Garson, *J. Chem. Soc.* 401 (1969)
- ⁴ K. H. Ney und K. P. Polzhofer, *Tetrahedron* **24**, 6619 (1968)
- ⁵ E. Schnabel, *Liebig's Ann.* **702**, 188 (1967)
- ⁶ K. P. Polzhofer, *Tetrahedron Letters* 2305 (1969)
- ⁷ K. P. Polzhofer, *Chimia* **23**, 298 (1969)
- ⁸ D. H. Spackman, W. H. Stein und S. Moore, *Anal. Chem.* **30**, 1190 (1958)
- ⁹ K. P. Polzhofer und K. H. Ney, *J. Chromatog.* **43**, 404 (1969)
- ¹⁰ E. Schröder und K. Lübke, *The Peptides* Band I.S. 197. 75. Academic Press, New York, London (1965)
- ¹¹ K. P. Polzhofer, *Tetrahedron* **25**, 4127 (1969)
- ¹² Th. Wieland, Chr. Birr und F. Flor, *Liebig's Ann.* **727**, 130 (1969)
- ¹³ H. Zahn und E. Rexroth, *Z. Anal. Chem.* **148**, 181 (1955)
- ¹⁴ P. Kusch, *Kolloid-Z.* **208**, 138 (1966)