

FESTPHASENSYNTHESE EINES BIOLOGISCH AKTIVEN ELEDOISINANALOGONS

W. VOELTER, K. ZECH und G. JUNG

Chemisches Institut der Universität Tübingen, 74 Tübingen, Wilhelmstr. 33

K.-F. SEWING

Pharmakologisches Institut der Universität Tübingen, 74 Tübingen, Wilhelmstr. 56

(Received in Germany 24 December 1971; Received in the UK for publication 14 January 1972)

Zusammenfassung—Die Festphasensynthese eines Heptapeptidamids (H-Asp(OH)-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH₂) mit der natürlichen Teilsequenz 5–11 des Eledoisins wird beschrieben. Die Peptidkette wird aus Methioninharz durch stufenweise Kupplung mit tert.-Butyloxycarbonylamino-säuren synthetisiert und mit DMF/NH₃ als Amid vom Harz getrennt. Nach Reinigung des Peptids entspricht seine Aktivität dem auf klassischem Weg synthetisierten Produkt.

Abstract—The solid phase synthesis of a heptapeptideamide with the natural sequence 5–11 of eledoisin is described. The peptide chain is built up stepwise by coupling methionine resin with tert.-butyloxycarbonyl-amino acids. The cleavage from the resin is achieved in DMF/NH₃. After purification the activity of the peptide is equivalent to a material which was synthesized by classical methods.

IM ZUSAMMENHANG mit Untersuchungen zur Wirkungsweise von Proteinhormonen^{1,2} und systematischen Untersuchungen zur Peptidsynthese an hochpolymeren Trägern^{3–5} synthetisierten wir ein Heptapeptidamid, das der Sequenz 5–11 des Eledoisins entspricht.

Von Erspamer und Anastasi⁶ ist die Aminosäuresequenz von Eledoisin nach dessen Isolierung aus den hinteren Speicheldrüsen von Tintenfischen zuerst bestimmt worden. Diese Struktur wurde durch Synthese von Sandrin und Boissonnas⁷ bestätigt. Weitere Totalsynthesen wurden von Lübke *et al.*⁸ und Bajusz⁹ durchgeführt. In grosser Zahl wurden Eledoisinanaloga nach den klassischen Methoden der Peptidsynthese^{8, 10–19} hergestellt.

Die Verknüpfung von t-Butyloxycarbonyl (Boc)-methionin mit dem polymeren Träger ist die erste Stufe zur Synthese des Heptapeptids. Nach der Literatur soll sich Boc-Methionin mit chlormethyliertem Copolymerem aus Styrol und Divinylbenzol nicht verestern lassen. Das Methioninderivat soll sich jedoch an eine Hydroxymethylharz mit Hilfe von Carbonyldiimidazol knüpfen lassen.²⁰ Mit dieser Aussage stimmt jedoch eine kürzlich erschienene Publikation²¹ nicht überein. Um diesen Widerspruch zu klären, wird die Veresterung von Boc-Methionin mit Chlorid- und Hydroxyharz bei Polymeren verschiedener Herkunft untersucht. Die Verknüpfung mit dem Chlormethylharz erfolgt durch Erhitzen in absolutem EtOH/Et₃N,²² die mit dem Hydroxymethylharz in absolutem CH₂Cl₂/Carbonyldiimidazol.²³ Das Hydroxymethylharz wird aus chlormethyliertem Polystyrol durch Umsetzung mit Kaliumacetat in Benzylalkohol und Verseifung der Acetoxymethylverbindung mit alkoholischer Natronlauge hergestellt.²³ Tabelle 1 zeigt eine Zusammenstellung des Methioningehaltes von verschiedenen chlormethylierten Harzen und Hydroxymethylharzen nach Veresterung mit Boc-Methionin.

TABELLE 1. METHIONINGEHALT VON CHLORMETHYLIERTEN HARZEN UND DARAUS HERGESTELLTEN HYDROXYMETHYLHARZEN NACH VERESTERUNG MIT BOC-METHIONIN

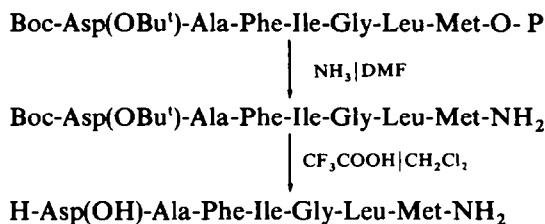
Hersteller	reaktive Gruppe	Menge Methionin mMol/g
Merck ^a	—CH ₂ Cl	0.53
selbst aus chlormethyliertem Harz Merck	—CH ₂ OH	0.56
Schwarz ^b	—CH ₂ Cl	0.07
selbst aus chlormethyliertem Harz Schwarz	—CH ₂ OH	0.36

^a E. Merck AG, Darmstadt

^b Schwarz BioResearch, Inc., Orangeburg, N.Y.

Aus der Tabelle geht hervor, dass die Beladungen nach der Veresterung mit Methionin beim Harz der Firma Merck für das käufliche chlormethylierte Harz und das daraus hergestellte Hydroxymethylharz nahezu gleich hoch sind. Dies gilt nicht für das Harz von Schwarz. Die widersprüchlichen Berichte^{20, 21} in der Literatur über den Umsatz von Boc-Methionin mit chlormethyliertem Harz sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass Harze mit verschiedener Struktur eingesetzt wurden. Die Synthese des Heptapeptids wird folgendermassen durchgeführt: Das C-terminale Methionin wird als Boc-Met-OH²⁴ mit chlormethyliertem Harz (E. Merck AG, Darmstadt) in Et₃N/EtOH verestert.²² Das Boc-Methioninharz wird mit EtOH, H₂O, MeOH und CH₂Cl₂ gewaschen und hat eine Beladung von 0.53 mMol/g. Die Boc-Schutzgruppe wird in einer Reaktionszeit von 75 Minuten mit Trifluoressigsäure-CH₂Cl₂ abgespalten. Vor und nach der Neutralisation mit Et₃N wird mit CH₂Cl₂ und Äthylalkohol gewaschen. Bei der Kupplung wird Dicyclohexylcarbodiimid und ein fünfzig-prozentiger Überschuss an Boc-Aminosäure verwendet. Unter diesen Bedingungen wird die Kupplungsreaktion jeweils zweimal nacheinander durchgeführt.

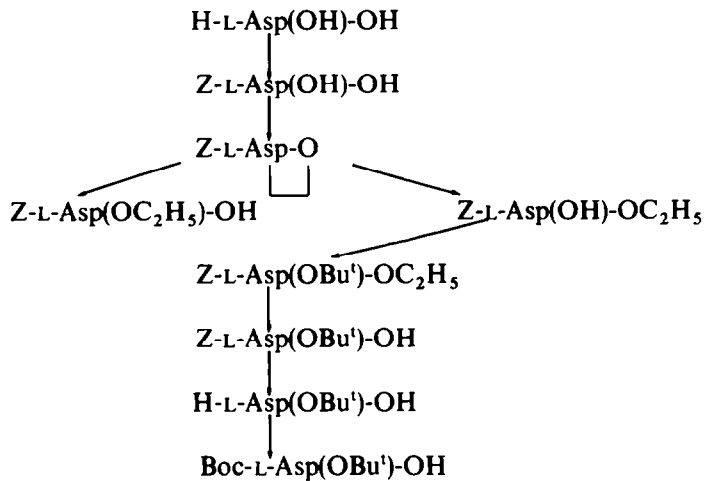
Mit flüssigem Ammoniak wird das Heptapeptid vom Trägerharz abgespalten.^{21, 25} Bei der Ammonolyse ist die Amino- und Carboxylgruppe der Asparaginsäure durch die tert.-Butyloxy-carbonyl- bzw. tert.-Butylester-Gruppe geschützt; diese Schutzgruppen werden anschliessend mit Trifluoressigsäure/CH₂Cl₂ entfernt:



Die Gesamtausbeute an Heptapeptid, bezogen auf die Beladung von Methionin am Harz, beträgt 7.5%. Zur säulenchromatographischen Reinigung des Peptids wird der Gelyp Sephadex G-25 Superfine verwendet.

Die verwendeten Boc-Aminosäuren werden nach Schnabel²⁶ hergestellt. Die am Autotitrator eingestellten pH-Werte und die Reaktionszeiten sind in Tabelle 2

zusammengefasst. Der N-tert.-Butyloxy-carbonyl-L-asparaginsäure- β -tert.-butylester wird nach folgendem Schema synthetisiert:²⁷



Die biologische Aktivität von 3 synthetischen Peptiden im Vergleich zu authentischem Eledoisin (Deutsche Farmitalia) wurde am isolierten Meerschweinchenileum ermittelt. Dabei betrug die relative biologische Aktivität bezogen auf Eledoisin (= 100%):

H-Asp-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH ₂ *	10%
H-Asp-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH ₂ ·TFA*	20%
Boc-Asp(OBu ^t)-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH ₂	13%

Die Aktivität entspricht im wesentlichen der von Bernardi²⁸ und von Stürmer *et al.*¹³ angegebenen. Sowohl der blutdrucksenkende Effekt am Hund als auch die spasmogene Wirkung am isolierten Meerschweinchenileum von Eledoisin homologen verhalten sich synchron, d.h. dass bei einer Kettenlänge von neun Aminosäuren in beiden Fällen die Aktivität weit über der von Eledoisin liegt, und dass bei einer Kettenlänge von weniger als sechs Aminosäuren die Peptide biologisch inaktiv sind.²⁸ Die Tatsache, dass auch das geschützte Heptapeptidamid (vgl. oben) biologisch aktiv ist, spricht ebenfalls dafür, dass für die Wirkung von Eledoisin der Bereich der Aminosäuren sechs bis elf vorhanden sein sollte. Über die biologische Funktion der restlichen Aminosäuren lassen sich keine Aussagen machen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Alle Schmelzpunkte sind unkorrigiert. Dicyclohexylcarbodiimid, Carbonyldiimidazol, Dicyclohexylamin (alle mit dem Reinheitsgrad "zur Synthese") und sämtliche Aminosäuren (für biochemische Zwecke) sind Produkte der Firma E. Merck AG, Darmstadt. Die Reinheit der Aminosäure- und Peptidderivate wird durch Dünnschichtchromatographie (DC-Fertigplatten, Kieselgel F 254, E. Merck AG, Darmstadt) und Drehwert überprüft.

CH₂Cl₂ wird über CaCl₂ getrocknet und über eine Vigreuxkolonne destilliert, EtOH über CaO vorgetrocknet, destilliert und das Destillat durch ein Grignardreagens vollständig absolutiert. Dicyclo-

* Peptide verschiedener Ansätze

hexylcarbodiimid wird durch Hochvakuumdestillation gereinigt, Et₃N durch Destillation fraktioniert und DMF durch azeotrope Destillation (Gemisch DMF (250 g): Benzol (30 g): Wasser (12 g)) unter Ausschluss von Licht gereinigt. Die Drehwertmessungen werden mit einem Zeiss Polarimeter 0·01°, die Aminosäureanalysen mit einem automatischen Aminosäureanalysator, Modell Unichrom, der Fa. Beckmann Instr., München, durchgeführt.

TABELLE 2. pH-WERTE UND REAKTIONSZEITEN BEI DER HERSTELLUNG VON BOC-AMINOSÄUREN
SCHMELZPUNKTE UND DREHWERTE DER BOC-VERBINDUNGEN

Aminosäurederivat	pH-Wert	Reaktionszeit (Stunden)	Ausbeute %	Schmp.°C	$[\alpha]_D^{20}$ (c = 1)
Boc-L-Methionin	9·8	10	96	Öl	+ 17·0° (DMF) ^c
Boc-L-Leucin	10·0	12	95	82–85 (EE/PÄ) ^a	– 27·5° (E) ^d
Boc-Glycin	10·0	4	93	93–94 (EE/PÄ) ^a	
Boc-L-Isoleucin	10·0	9	90	62 (Hemihydrat) (EE/PÄ) ^a	+ 3° (E) ^d
Boc-L-Phenylalanin	10·2	18	90	81–84 (EE/PÄ) ^a	– 4° (E) ^d
Boc-L-Alanin	10·3	10	95	79–80 (Ä/PÄ) ^b	– 24° (E) ^d

^a Essigester-Petroläther (30–50°)

^b Äther-Petroläther (30–50°)

^c DMF

^d Essigsäure

N-tert-Butyloxycarbonylaminosäuren. Die Boc-Aminosäuren wurden nach Schnabel²⁶ hergestellt. pH-Wert und Reaktionszeit werden leicht modifiziert (Tabelle 2). Ausbeuten, Schmelzpunkte, Drehwerte und Literaturangaben sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester²⁷. (1) N-Carbobenzoxy-L-asparaginsäure. Äquimolare Mengen von Asparaginsäure und Carbobenzoxychlorid wurden zur Carbobenzoxyamino-säure umgesetzt. Ausbeute: 33%, Schmp. 112–114°; $[\alpha]_D^{20}$: 10° (AcOH, c = 1); ¹³C-Resonanzsignale (δ-Werte in ppm gegen Tetramethylsilan (TMS)): – 173·05, – 172·0, – 156·25, – 137·25, – 128·90, – 127·95, – 65·80, – 50·80, – 36·35.

(2) N-Carbobenzoxy-L-asparaginsäureanhydrid. Aus Carbobenzoxy-L-asparaginsäure erhält man mit Dicyclohexylcarbodiimid das Anhydrid. Ausbeute: 98%, Schmp. 108–109°; $[\alpha]_D^{20}$: – 39° (AcOH, c = 1); ¹³C-Resonanzsignale (δ-Werte in ppm gegen TMS): – 179·15, – 172·40, – 156·10, – 128·70, – 128·20, – 136·60, – 66·55, – 50·70, – 35·05.

(3) N-Carbobenzoxy-L-asparaginsäure-(α,β)-äthylester. Aus Carbobenzoxy-asparaginsäureanhydrid werden mit EtOH die α- und β-Ester hergestellt. Der α-Äthylester wird als Dicyclohexylammoniumsalz getrennt. Ausbeute: 30%; Schmp. 35–37°; $[\alpha]_D^{20}$: – 13° (EtOH, c = 2); ¹³C-Resonanzsignale (δ-Werte in ppm gegen TMS): – 171·65, – 171·25, – 156·00, – 137·00, – 128·50, – 127·75, – 65·70, – 60·95, – 50·80, – 36·15, – 14·05.

(4) N-Carbobenzoxy-L-asparaginsäure-α-äthyl-β-tert.-butylester. Der Carbobenzoxy-asparaginsäure-α-äthylester wird mit Isobutylen/H₂SO₄ zum Asparaginsäure-α-äthyl-β-tert.-butylester umgesetzt. Ausbeute: 79%; Schmp. 35–37°; $[\alpha]_D^{20}$: – 13° (EtOH, c = 2); ¹³C-Resonanzsignale (δ-Werte in ppm gegen TMS): – 174·05, – 170·80, – 155·45, – 137·45, – 128·40, – 127·65, – 79·30, – 65·15, – 60·95, – 53·05, – 27·85, – 14·05.

(5) N-Carbobenzoxy-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester (Dicyclohexylammoniumsalz). Der Asparaginsäure-α-äthyl-β-tert.-butylester wird alkalisch zum Monoester verseift und als Dicyclohexylammoniumsalz umkristallisiert. Ausbeute: 86%, Schmp. 122–123°.

(6) L-Asparaginsäure-β-tert.-butylester. Vom N-Carbobenzoxy-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester wird die Carbobenzoxygruppe mit Palladium/Aktivkohle abhydriert. Ausbeute: 88%; Schmp. 195° unter

Zersetzung: $[\alpha]_D^{20}$: 7.5° (AcOH, $c = 1$): ^{13}C -Resonanzsignale (δ -Werte in ppm gegen TMS): -170.35, -82.10, -50.35, -35.90, -27.95.

(7) *N*-*tert*-*Butyloxycarbonyl*-*l*-*asparaginsäure*- β -*tert*-*butylester*. Der *l*-Asparaginsäure- β -*tert*-*butylester* wird mit *t*-Butyl-azidoformiat in alkalischem Medium umgesetzt. Ausbeute: 92%, Schmp. 57–62°: $[\alpha]_D^{20} = -20^\circ$ (DMF, $c = 1$): ^{13}C -Resonanzsignale (δ -Werte in ppm gegen TMS): -169.50, -172.85, -155.25, -80.25, -78.35, -50.30, -37.55, -28.25, -27.75.

Hydroxymethylharz. 2 g chlormethyliertes Harz (1.5 mMol Chlorid/g) und 2.94 g (30 mMol) Kaliumacetat -beide Substanzen werden zuvor gut über P_2O_5 im Hochvakuum getrocknet- werden mit 10 ml frisch destilliertem Benzylalkohol am Ölbad bei einer Temperatur von 80° 14 Stunden lang erhitzt. Das Produkt wird anschliessend mit 1.8 g (30 mMol) Kaliumhydroxid in 50 ml EtOH 4 Stunden lang gekocht, dann mit Wasser und MeOH gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.

Boc-*l*-*Methionin*harz: (a) Umsatz mit chlormethyliertem Harz. 2 g Harz (2.08 mMol Chlorid), 0.6 g (2.4 mMol) *Boc*-Methionin, 0.3 ml (2.1 mMol) Et_3N und 8 ml absolutes EtOH werden 25 Stunden bei 90° umgesetzt. Anschliessend wird mit EtOH, H_2O , MeOH und CH_2Cl_2 gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Die Beladung an Methionin wird durch Aminosäureanalyse festgestellt und beträgt 0.53 mMol/g.

(b) Hydroxymethylharz. 1 g Harz (1.5 mMol Chlorid/g) und 1.55 g *Boc*-Methionin (6 mMol) werden mit 0.96 g (6 mMol) Carbonyldiimidazol, gelöst in 10 ml CH_2Cl_2 versetzt. Nach beendeter Kohlendioxidentwicklung wird noch eine Stunde lang gekocht und anschliessend wie üblich gewaschen und getrocknet. Die Beladung beträgt 0.5–0.6 mMol Aminosäure pro g Harz.

TABELLE 3. SYNTHESCHEMA

Arbeitsgang	Reagens	Dauer [Minuten]
Waschen	CH_2Cl_2	5
<i>Boc</i> -Abspaltung	TFA ^a / CH_2Cl_2 (50:50)	75
Waschen	2 × CH_2Cl_2	
	1 × $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	je 5
	2 × CH_2Cl_2	
Neutralisieren	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$	2 × 15
Waschen	1 × CH_2Cl_2	
	2 × $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	je 5
	3 × CH_2Cl_2	
Kupplung (2 ×)	<i>Boc</i> -Aminosäure (50%iger Überschuss in CH_2Cl_2); DCCI ^b	60

^a Trifluoressigsäure

^b Dicyclohexylcarbodiimid

Boc-*Asp*(*OBu*¹)-*Ala*-*Phe*-*Ile*-*Gly*-*Leu*-*Met*-*O*-*Polymer*. Das *Boc*-Methioninharz wird nach dem in Tabelle 3 zusammengestellten Syntheschema behandelt. Die Kupplungsschritte werden jeweils zweimal nacheinander mit einem fünfzigprozentigen Überschuss an geschützter Aminosäure durchgeführt.

Boc-*Asp*(*OBu*¹)-*Ala*-*Phe*-*Ile*-*Gly*-*Leu*-*Met*- NH_2 . 2.2 g Peptidharz werden in einer starkwandigen 100 ml Ampulle in 20 ml DMF aufgeschlämmt und ca. 50–60 ml Ammoniak hinzukondensiert. Man lässt die abgeschmolzene Ampulle 4 Tage bei Raumtemperatur stehen. Anschliessend wird der Ammoniak abgedampft und das Peptid aus der Lösung mit über Natrium getrocknetem Äther gefällt und abzentrifugiert. Ausbeute: 200 mg; Schmp. 213–216° (unter Zersetzung); $[\alpha]_D^{20}$: -18° (DMF, $c = 0.5$).

H-*Asp*(*OH*)-*Ala*-*Phe*-*Ile*-*Gly*-*Leu*-*Met*- NH_2 . 200 mg getrocknetes Peptid (*Boc*-*Asp*(*OBu*¹)-*Ala*-*Phe*-*Ile*-*Gly*-*Leu*-*Met*- NH_2) werden mit je 15 ml Trifluoressigsäure und CH_2Cl_2 versetzt und eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann wird mit absolutem Äther ausgefällt und abzentrifugiert. Ausbeute: 190 mg; Schmp. ~220° (unter Zersetzung); $[\alpha]_D^{20}$: -16° (DMF, $c = 1$). Das Peptidamid wird auf einer Säule vom Geltyp G-25 Superfine gereinigt.

Zur Aminosäureanalyse wird das chromatographierte Peptid 12 Stunden lang mit 6 n Salzsäure bei 115° hydrolysiert. Das Resultat zeigt Tabelle 4.

TABELLE 4. AMINOSÄUREANALYSE VON H-ASP(OH)-
ALA-PHE-ILE-GLY-LEU-MET-NH₂

Aminosäure	gefunden	berechnet
Asparaginsäure	0.90	1
Glycin	1.0	1
Alanin	1.02	1
Methionin	1.01	1
Isoleucin	0.94	1
Leucin	1.19	1
Phenylalanin	0.96	1

Danksagung—Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir herzlich für die Unterstützung dieser Arbeit. Herrn Dr. Bianchi danken wir für Eledoisinproben, Herrn Dozent Dr. Breitmaier für die Aufnahme der ¹³C-NMR-Spektren und Frau Dr. Fretzdorff für die Durchführung der Aminosäureanalysen.

LITERATUR

- ¹ W. Voelter und K. Zech, zur Publikation eingereicht
- ² G. Jung und W. Göring, zur Publikation eingereicht
- ³ E. Bayer, G. Jung und H. Hagenmaier, *Tetrahedron* **24**, 4853 (1968)
- ⁴ W. Voelter, J. D. Young, M. Shimizu, C. Y. Leung und E. Benjamini, *Z. Physiol. Chem.* **352**, 6 (1971)
- ⁵ J. D. Young, W. Voelter, M. Shimizu, C. Y. Leung, W. J. Peterson und E. Benjamini, *Peptides*, im Druck
- ⁶ V. Erspamer und A. Anastasi, *Experientia* **18**, 58 (1962)
- ⁷ E. Sandrin und R. A. Boissonnas, *Ibid.* **18**, 59 (1962)
- ⁸ K. Lübke, E. Schröder, R. Schmiechen und H. Gibian, *Ann. Chem.* **679**, 195 (1964)
- ⁹ S. Bajusz, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **42**, 383 (1964)
- ¹⁰ B. Camerino, G. de Caro, R. A. Boissonnas, E. Sandrin und E. Stürmer, *Experientia* **19**, 339 (1963)
- ¹¹ F. Chillemi, *Gazz. Chim. Ital.* **93**, 1079 (1963)
- ¹² E. Schröder und K. Lübke, *Experientia* **20**, 19 (1964)
- ¹³ E. Stürmer, E. Sandrin und R. A. Boissonnas, *Ibid.* **20**, 303 (1964)
- ¹⁴ K. Lübke, R. Hempel und E. Schröder, *Ibid.* **21**, 84 (1965)
- ¹⁵ L. Bernardi, G. Bosisio, F. Chillemi, G. de Caro, R. de Castiglione, V. Erspamer, A. Glaesser und O. Goffredo, *Ibid.* **20**, 306 (1964)
- ¹⁶ F. Chillemi, L. Bernardi und G. Bosisio, *Gazz. Chim. Ital.* **94**, 891 (1964)
- ¹⁷ E. Sandrin und R. A. Boissonnas, *Helv. Chim. Acta* **47**, 1294 (1964)
- ¹⁸ K. Lübke und E. Schröder, *Ann. Chem.* **681**, 250 (1965)
- ¹⁹ E. Schröder, K. Lübke und R. Hempel, *Experientia* **21**, 70 (1965)
- ²⁰ J. M. Stewart and J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, S. 9, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1969)
- ²¹ J. Halstrom, K. Brunfeldt, J. Thomsen und K. Kovacs, *Acta Chem. Scand.* **23**, 2335 (1969)
- ²² R. B. Merrifield, *J. Am. chem. Soc.* **86**, 304 (1964)
- ²³ M. Bodansky und J. F. Sheehan, *Chem. and Ind.* 1597 (1966)
- ²⁴ Abkürzungen nach IUPAC, *Europ. J. Biochem.* **1**, 375 (1967)
- ²⁵ E. Bayer, E. Breitmaier, G. Jung und W. Parr, *Z. Physiol. Chem.* **352**, 759 (1971)
- ²⁶ E. Schnabel, *Ann. Chem.* **702**, 188 (1967)
- ²⁷ W. Voelter, K. Zech, W. Grimminger, E. Breitmaier, und G. Jung, *Chem. Ber.* (im Druck)
- ²⁸ E. G. Erdös, N. Back und F. Sicuteri, *Hypotensive Peptides*, S. 86–92, Springer-Verlag, New York (1960)