

UNTERSUCHUNGEN ZUR OPTIMIERUNG DER PEPTIDSYNTHESE AN POLYMEREN TRÄGERN—III

DER EINFLUSS VERSCHIEDENER CHLOR-METHYLIERTER POLYSTYROLHARZE AUF DIE PRODUKTZUSAMMENSETZUNG BEI SYNTHESEN EINES MODELLPENTAPEPTIDS^a

H. FRANK und H. HAGENMAIER
Chemisches Institut der Universität Tübingen, D-74 Tübingen

(Received in Germany 20 October 1973; Received in the UK for publication 22 January 1974)

Abstract—The influence of the support material on the result of a solid phase peptide synthesis was studied in a model system by synthesizing the pentapeptide Gly-Val-Gly-Ala-Pro. Eight preparations of chloromethylated styrene-divinylbenzene copolymer were investigated, which differed in matrix structure and in the procedure used for chloromethylation. Coupling yields and product composition turned out to be highly dependent on the type of support used. An ion-exchange chromatographic procedure is described which allows the rapid determination of the degree to which a particular support influences the product composition. In addition, an exact product analysis was carried out for the eight syntheses at all coupling steps. Certain conclusions are drawn on which basis the support influences the course of peptide synthesis and how this influence can be minimized.

Zusammenfassung—Der Einfluss des Trägermaterials auf den Verlauf der Peptidsynthese an festen Trägern wurde mit Hilfe eines Modellsystems durch Synthese des Pentapeptids Gly-Val-Gly-Ala-Pro untersucht. Verwendet wurden acht verschiedene Trägerpräparationen auf Polystyrolbasis, die sich in der Matrixstruktur und im Verfahren zur Einführung der Chlormethylgruppen unterschieden. Die Kupplungsausbeuten und die Produktzusammensetzung erwiesen sich dabei als stark trägerabhängig. Es wird ein einfaches Verfahren beschrieben, um mit Hilfe der Ionenaustauscher-Chromatographie die Brauchbarkeit eines Trägermaterials für die Peptidsynthese zu ermitteln. Auf Grund einer exakten Produktanalyse auf allen Synthesestufen wird ausserdem der Frage nachgegangen, inwiefern der Träger einen Einfluss auf den Syntheseverlauf nimmt und wie dieser Einfluss auf ein Minimum reduziert werden kann.

EINLEITUNG

Die Peptidsynthese an festen Trägern¹ unterscheidet sich von der konventionellen Peptidsynthese nachteilig in drei wesentlichen Punkten. Erstens entfällt die Reinigungsmöglichkeit und Charakterisierungsmöglichkeit von Zwischenstufen, zweitens wird die Analytik der Umsatzkontrolle durch den festen Träger erschwert² und drittens haben Trägereigenschaften einen Einfluss auf die Produktzusammensetzung, worauf schon mehrfach hingewiesen wurde.^{3,4} Die fehlende Reinigungsmöglichkeit bei Zwischenstufen ist nur von Nachteil, wenn die einzelnen Reaktionsstufen nicht mit 100-proz. Ausbeute zum gewünschten Produkt ablaufen. In mehreren Laboratorien wurde in den letzten

Jahren intensiv daran gearbeitet, die Ausbeuten bei den einzelnen Reaktionsstufen erstens genau zu erfassen^{4,5} und zweitens sie möglichst nahe an 100% heranzubringen.⁶ Der Verlauf einer Kupplungsreaktion am polymeren Träger wird im Einzelfalle zunächst von den beiden Reaktionspartnern Aminkomponente und Carboxylkomponente abhängen, wie es bei der konventionellen Peptidsynthese nicht anders ist, ausserdem wird sich aber der Einfluss des Trägers unter Umständen bemerkbar machen.

Wie wir bei vielen Synthesen beobachteten, sind Ausbeuten und Reinheit eines am festen Träger synthetisierten Peptids bei Verwendung von chloromethylierten Polystyrolharzen verschiedener Präparation oft sehr unterschiedlich.⁷ Zwar wurde bereits der Einfluss der Trägerstruktur auf den Verlauf der Veresterung der ersten Aminosäure⁸ und die Auswirkung einer Distanzgruppe zwischen Polymermatrix und erster Aminosäure⁹ in Einzelfällen geprüft, nicht aber die Abhängigkeit

^a II. Mitteil.: H. Hagenmaier und H. Frank, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie*, 353, 1973-76 (1972).— Verwendete Abkürzungen: Boc = t-Butyloxycarbonyl, DCCI = N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, SPPS = Solid Phase Peptidsynthese.

der Ausbeuten bei aufeinanderfolgenden Syntheseyklen von den Eigenschaften eines Trägers untersucht. Mit Hilfe des von uns entwickelten Modellsystems¹⁰ untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit die Produktzusammensetzung auf den verschiedenen Reaktionsstufen der Synthese des Pentapeptids Gly-Val-Gly-Ala-Pro* an verschiedenen chlormethylierten Polystyrolharzen und stellten dabei fest, dass der Syntheseverlauf vom Vernetzungsgrad und Chlormethylierungsverfahren des Trägers beeinflusst wird. Das Modellsystem hat sich dabei als geeignet erwiesen, die Brauchbarkeit eines Trägermaterials für die Peptidsynthese zu ermitteln.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

An acht verschiedenen chlormethylierten Polystyrolharzpräparationen wurde das Pentapeptid Gly-Val-Gly-Ala-Pro* synthetisiert. Diese Präparationen unterscheiden sich in der Matrixstruktur und im Verfahren, das für die Einführung der Chlormethylgruppe verwendet wurde. Zur Darstellung der Träger wurde käufliches Copolymerisat aus Styrol und 1% bzw. 2% Divinylbenzol unter verschiedenen Bedingungen der Chlormethylierungsreaktion unterworfen, wobei zum einen die Mengenverhältnisse der Reaktionspartner variiert wurden und zum anderen das Reaktionsmedium so gewählt wurde, dass das vernetzte Polystyrol entweder bei Verwendung von Chloroform in gequollenem Zustand oder aber bei Verwendung von n-Hexan im ungequollenen Zustand chlormethyliert wurde. Ausserdem wurde ein im Handel befindliches makroporöses chlormethyliertes Polystyrolharz untersucht. In Tabelle 1 sind die wesentlichen Daten für diese acht Trägermaterialien zusammengestellt.

*Gly-Val-Gly-Ala-Pro ist die Desamidoform der C-terminalen Sequenz von Calcitonin M.¹¹

Die Synthesen des Modellpeptids Gly-Val-Gly-Ala-Pro an den Trägern erfolgte mit geringfügigen Abwandlungen nach dem generellen Schema von Merrifield.¹ Nach jeder Kupplung wurde eine Probe entnommen und die Reaktionsprodukte mit HBr in Trifluoressigsäure abgespalten. Diese wurden nach dem in Abb 1 wiedergegebenen Schema durch Ionenaustauscher-Chromatographie analysiert. Die Berechnung der Kupplungsausbeuten erfolgte auf der Basis der Farbwerte der jeweiligen Produkte.¹⁰ Am Beispiel der Modellsynthese am Träger 3 (Tabelle 1) sei der Gang der Analysen und die schrittweise Entstehung von Rumpf- und Fehlsequenzen veranschaulicht. (Abb 2). Chromatogramm A zeigt die Analyse des Reaktionsprodukts von N-Boc-Alanin mit trägergebundenem Prolin. Aus nicht umgesetztem Prolin und dem entstandenen Dipeptid Ala-Pro er-

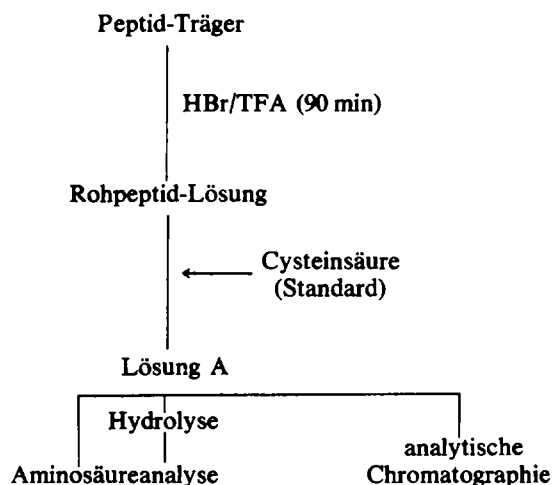


Abb 1. Schema der Analyse eines Peptidgemisches.

Tabelle 1. Verwendete Träger für die Probesynthese des Modellpeptids

Nr.	Chlormethylierung ^a (Reaktionsmedium)	Vernetzung (%)	Chlormethylgruppen (mMol/g) ^b	Aminosäureanalyse (mMol/g) ^c	Quellfähigkeit ^d
1	1-fach (Hexan)	2	4.1	0.83	5.4
2	1-fach (Hexan)	2	3.8	0.50	5.1
3	3-fach (Hexan)	2	4.5	0.78	5.3
4	1-fach (CHCl ₃)	1	0.8	0.10	7.9
5	2-fach (CHCl ₃)	2	1.4	0.32	5.3
6	4-fach (CHCl ₃)	2	1.4	0.22	5.3
7	Merck Merrifield Harz	—	2.4	0.55	1.7
8	1-fach (Hexan)	1	2.3	0.85	8.0

^a Mengenangaben von Methylchlormethyläther und Zinn-IV-chlorid gemäss (2).

^b Bestimmt durch Aminosäureanalyse nach 24-stündiger Hydrolyse mit 6N HCl bei 110°C.

^c Bestimmt durch Wiegen der nach dem Filtrieren von 1 g Harz zurückgehaltenen Menge an Methylchlorid.

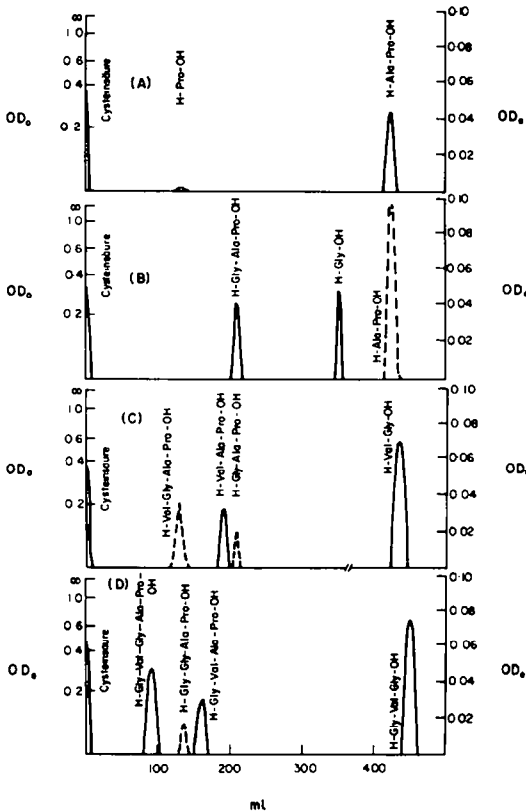


Abb 2. Elutionsdiagramme der Rohprodukte jeder Synthesestufe des Modellpeptids an Träger 3. Die Detektion wurde mit Ninhydrin durchgeführt. Ausgezogene Peaks sind mit normaler Schreibereempfindlichkeit $E = 0 - \infty(OD_0)$, die gestrichelten Peaks mit höherer Schreibereempfindlichkeit $E = 0 - 0.10(OD_0)$ registriert.¹⁰

rechnet sich eine Ausbeute an Dipeptid von mehr als 99.8%. Nach der Kupplung mit N-Boc-Glycin werden chromatographisch drei ninhydrin-positive Substanzen erfasst (Chromatogramm B), die nach Isolierung durch Aminosäureanalyse und Massenspektrometrie identifiziert wurden. In der Reihenfolge der Elution handelt es sich um das gewünschte Tripeptid Gly-Ala-Pro, die Aminosäure Glycin und nicht umgesetztes Dipeptid. Aus den Mengenverhältnissen von Ausgangsprodukt (Ala-Pro) und Endprodukt (Gly-Ala-Pro) ergab sich eine Kupplungsausbeute von 61%. Dass es sich bei dem in Chromatogramm B gefundenen Glycin nicht um adsorbiertes, sondern um kovalent gebundenes Glycin handelt, zeigte die chromatographische Analyse der Reaktionsprodukte nach der Kupplung mit N-Boc-Valin (Chromatogramm C). Glycin hatte sich zum Dipeptid Val-Gly unter Bildung einer neuen "Kopfsequenz" umgesetzt. Ausserdem hatte die Rumpfsequenz Ala-Pro teilweise zur Fehlsequenz Val-Ala-Pro weiterreagiert. Die Kettenverlängerung von Gly-Ala-Pro zum gewünschten Tetrapeptid Val-Gly-Ala-Pro verlief mit 94.2% Ausbeute. Die letzte Kupplung von Glycin verlief vollständig und zwar reagierte N-Boc-Glycin mit allen Rumpf-, Fehl- und Kopfsequenzen (Chromatogramm D).

In der beschriebenen Weise wurde der Syntheseverlauf des Modellpeptids an den in Tabelle 1 aufgeführten Trägern untersucht und die jeweiligen Kupplungsausbeuten und Produktzusammensetzungen auf jeder Synthesestufe bestimmt. Die Kupplungsausbeuten an jeweils gewünschtem Peptid sind in Abb 3a in graphischer Form dargestellt. Aus dieser Abbildung wird deutlich, dass sich die verschiedenen Träger dadurch unterscheiden, in

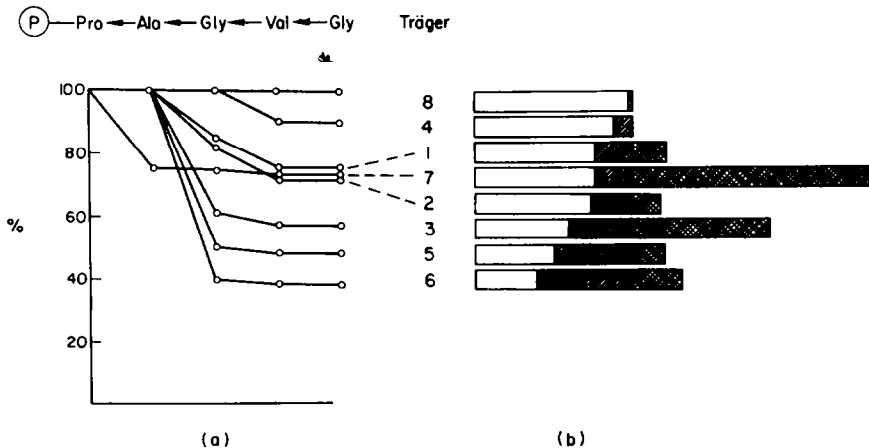


Abb 3. (a) Kupplungsausbeuten für die verschiedenen Trägerpräparationen. Angegeben ist jeweils die Ausbeute an Peptid mit korrekter Aminosäuresequenz. (b) Zusammensetzung des Rohprodukts auf der Pentapeptidstufe für die verschiedenen Trägerpräparationen (in Mol % bezogen auf Prolin). Weisses Feld: Pentapeptid mit korrekter Sequenz. Schräg schraffiert: Fehlsequenzen mit C-terminalem Prolin. Waagrecht schraffiert: Kopfsequenz Gly-Val-Gly.

welcher Kupplungsstufe der stärkste Rückgang der Ausbeuten beobachtet wird. Während der stärkste Ausbeuteabfall beim markroporösen Träger bereits bei der ersten Kupplungsstufe erfolgt, ist dies bei den 2% vernetzten gelporösen Trägern 1, 2, 3, 5 und 6 erst auf der 2. Kupplungsstufe der Fall. Bei den zu 1% vernetzten Polystyrolträgern erfolgt dieser Abfall bei dem in Chloroform chlormethylierten Trägern auf der 3. Kupplungsstufe, aber gegenüber den 2% vernetzten Trägern in vergleichsweise geringem Masse. Die besten Ergebnisse wurden mit dem in n-Hexan chlormethylierten, 1% vernetzten Polystyrolträger erzielt, wobei das Pentapeptid mit einer Gesamtausbeute von 98% erhalten wurde.

Neben der Kupplungsausbeute ist die Produktzusammensetzung von entscheidender Bedeutung bei der Beurteilung der Peptidsynthese an festen Trägern. Während hier eine Gesamtanalyse des Syntheseverlaufs, wie sie in Tabelle 2 zusammengefasst ist, den grösstmöglichen Informationsgehalt liefert, ist es zur Beurteilung der Brauchbarkeit eines Trägers für die SPPS nicht notwendig, die Ausbeute und Produktzusammensetzung auf jeder einzelnen Kupplungsstufe zu bestimmen. Eine vollständige chromatographische Analyse des Rohprodukts auf der Stufe des Pentapeptids zeigt deutlich genug die wichtigsten Unterschiede (siehe Tabelle 2 und Abb 3). Da aber selbst eine solche

vollständige chromatographische Analyse auf der Stufe des Pentapeptids relativ zeitraubend ist, ist für die qualitative Abschätzung der Brauchbarkeit eines Trägers für die SPPS bereits die Aufnahme des Elutionsdiagramms ohne quantitative Bestimmung der verschiedenen Produkte ausreichend. Dies wird an den Abbildungen der acht Elutionsdiagramme für die verschiedenen Trägerharze deutlich (Abb 4, Träger 1-8).

Es konnte also sehr deutlich der Einfluss des festen Trägers auf die Kupplungsausbeute und die Produktzusammensetzung nachgewiesen werden. Da die hierbei bestimmenden Grössen wie Quellverhalten, Vernetzungsgrad, Kapazität und Diffusionsgeschwindigkeit komplexer Natur und sämtlich voneinander abhängig sind, ist jedoch die Zurückführung eines bestimmten Syntheseverlaufs auf den Einfluss eines einzelnen Parameters nur schwer möglich.

An Hand der vollständigen Analysen der Reaktionsprodukte auf den einzelnen Synthesestufen für die untersuchten Trägerharze (Tabelle 2) können aber doch gewisse Rückschlüsse auf den Einfluss verschiedener Parameter bei der SPPS gezogen werden. Bei allen Trägern mit Ausnahme des Trägers 8 lässt sich auf einer der Kupplungsstufen ein Abfall der Kupplungsausbeuten erkennen (Abb 3a). Der stärkste Rückgang erfolgt beim

Tabelle 2. Zusammensetzung der Rohprodukte auf den einzelnen Kupplungsstufen

Trägerpräparation	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Kupplung								
Ala-Pro	99.9	99.6	99.9	100.0	99.4	99.5	75.0	100.0
Pro	0.1	0.4	0.1	0.0	0.6	0.6	25.0	0.0
2. Kupplung								
Gly-Ala-Pro	84.5	81.1	60.9	99.0	50.0	40.0	73.5	99.5
Ala-Pro	14.5	18.0	39.1	—	—	—	—	—
Gly—Pro	—	—	—	1.0	48.0	60.1	23.2	0.5
Gly	19.3	17.2	85.9	—	18.4	29.4	156.0	—
3. Kupplung								
Val-Gly-Ala-Pro	75.1	71.8	57.0	89.0	48.1	38.5	72.3	98.0
Gly-Ala-Pro	8.9	9.4	3.5	10.2	1.5	1.6	1.9	1.8
Ala-Pro	14.0	16.8	—	—	—	—	—	—
Val—Ala-Pro	—	—	37.0	—	—	—	—	—
Val-Gly—Pro	—	—	—	1.0	48.0	60.1	21.8	—
Val-Gly	19.0	17.1	84.0	—	19.2	29.4	145.0	—
4. Kupplung								
Gly-Val-Gly-Ala-Pro	74.2	71.0	57.5	89.0	48.0	38.1	72.5	98.5
Val-Gly-Ala-Pro	—	—	—	—	—	—	—	—
Gly—Gly-Ala-Pro	8.9	9.5	3.1	10.4	—	1.4	—	—
Ala-Pro	14.5	17.0	—	—	—	—	—	—
Gly-Val—Ala-Pro	—	—	37.0	—	—	—	—	—
Gly-Val-Gly—Pro	—	—	—	—	48.1	60.1	22.9	—
Gly-Val-Gly	20.0	17.4	83.5	—	18.9	30.2	145.0	—

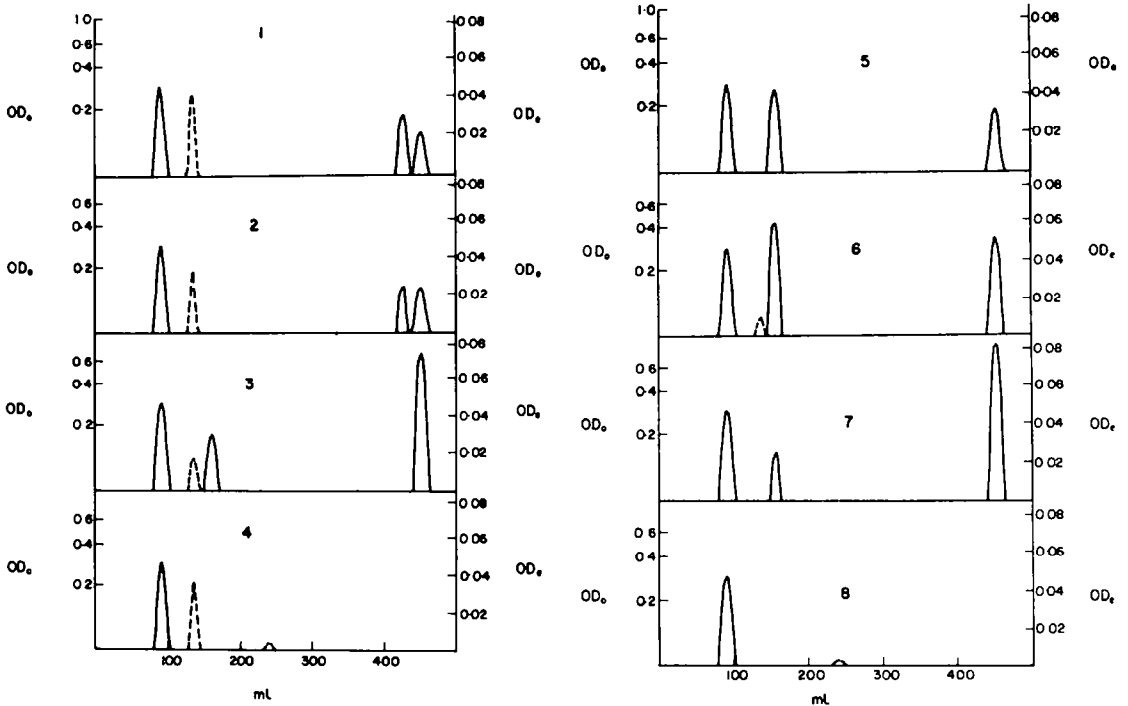


Abb 4. Elutionsdiagramme der Rohprodukte der Synthese des Modellpeptids an den Trägern 1–8. Die Detektion wurde mit Ninhydrin durchgeführt. Ausgezogene Peaks sind mit normaler Schreiberempfindlichkeit $E = 0 - \infty$ (OD_e), die gestrichelten Peaks mit höherer Schreiberempfindlichkeit $E = 0 - 0.10$ (OD_e) registriert.¹⁰ Die reinen Oligopeptide werden in folgender Reihenfolge eluiert (Elutionsvolumen in ml): Gly-Val-Gly-Ala-Pro (92), Gly-Gly-Ala-Pro (135), Gly-Val-Gly-Pro (156), Gly-Val-Ala-Pro (161), Gly-Ala-Pro (232), Ala-Pro (427), Gly-Val-Gly (451).

makroporösen Träger auf der 1. Kupplungsstufe (75%). Bei weiteren Kupplungen liegen die Ausbeuten bei diesem Träger dann nicht unter 97%. Bei den gelporösen, 2% vernetzten Trägern ist dagegen ein starker Abfall erst auf der zweiten Kupplungsstufe zu beobachten, der sich bei den Trägern 1 und 2 auch noch auf der 3. Stufe fortsetzt. Bei dem 1% vernetzten Trägern 4 ist eine unterdurchschnittliche Ausbeute erst auf der 3. Kupplungsstufe zu beobachten. Beim Vergleich eines gelporösen und makroporösen Trägers wurde von A. Losse⁹ ein ähnlicher Unterschied festgestellt. Da die Ausbeuteabfälle bei den verschiedenen Trägerpräparationen auf verschiedenen Kupplungsstufen festzustellen ist, kann ein durch die Aminosäuresequenz bedingter Einfluss ausgeschlossen werden. Es handelt sich hier offensichtlich um eine teilweise sterische Abschirmung von freien Aminogruppen durch die Trägermatrix.

In Essigester oder Äthanol, den üblicherweise zur Verankerung der ersten Aminosäure am Träger verwendeten Lösungsmitteln, ist die Quellfähigkeit aller untersuchten Träger etwa gleich gering. In Methylenchlorid, dem Medium in dem die Kupplungsreaktionen durchgeführt werden, ist das

Quellvermögen des makroporösen Trägers nur geringfügig erhöht (Tabelle 3).

Der starke Ausbeuteabfall beim makroporösen Träger kann daher so interpretiert werden, dass hier kovalent gebundene Prolinreste teilweise so in den beim makroporösen Träger vorhandenen kleinen Poren placiert sind, dass sie nicht mit der zweiten Aminosäure reagieren können. Bei den gelporösen Trägern findet der beobachtete Abfall in den Kupplungsschritten erst bei späteren Kupplungsschritten statt, da die Poren, in die die Prolinreste im ungequollenen Zustand eindringen

Tabelle 3. Quellvermögen von vernetztem Polystyrol in Methylenchlorid

Vernetzungsgrad	Quellvermögen	
	I	(ml/g) ^a II
2%	5.2	5.3
1%	7.1	7.9
M ^b	1.6	1.7

^a Volumenverhältnis in Methylenchlorid/Äthanol (I: mikroskopisch; II: makroskopisch).

^b Makroporöses Polystyrol (Merck, Merrifield Harz).

und mit den dort vorhandenen Chlormethylgruppen reagieren konnten, durch die hohe Quellfähigkeit in Methylchlorid aufgeweitet werden (Tabelle 3). So macht sich eine sterische Hinderung durch die Polymermatrix bei den 2% vernetzten Harzen bei der 2. und 3. Kupplung, beim 1% vernetzten Träger 4 erst auf der 3. Kupplungsstufe bemerkbar.

Unterdrückt oder sogar verhindert werden konnte dieses Phänomen des Ausbeuteabfalls dadurch, dass die Einführung der Chlormethylgruppen bei den gelporösen Polystyrolharzen im ungequollenen Zustand und unter der Wahl entsprechender Reaktionsbedingungen durchgeführt wird. So ergaben sich für die in Hexan chlormethylierten Polystyrolharze im Vergleich mit den in Chloroform chlormethylierten Trägern die jeweils besseren Ausbeuteergebnisse. In der Reihe der "Hexan"-Harze ebenso wie in der Reihe der "Chloroform"-Harze wurde jedoch deutlich, dass die Reaktionsbedingungen der Chlormethylierung, insbesondere die Wahl der Mengenverhältnisse der Reaktionspartner von grossem Einfluss auf die Ausbeute bei den einzelnen Reaktionsstufen sind.

Dass der Abfall in den Ausbeuten in einzelnen Kupplungsstufen die Heterogenität der Reaktionsorte widerspiegelt und nicht etwa auf eine unvollständige Kupplungsreaktion auf Grund zu kurzer Reaktionszeiten zurückzuführen ist, zeigte eine zeitabhängige Untersuchung der Kupplungsausbeuten bei einer Synthese des Modellpeptids am Träger 1. Wie die Ergebnisse in Tabelle 4 zeigen, waren innerhalb von 30 Minuten die jeweils maximal erreichbaren Kupplungsausbeuten erreicht. Freie Aminogruppen, die zu diesem Zeitpunkt nicht reagiert hatten, konnten auch durch eine weitere Zugabe von Boc-Aminosäure und DCCI nicht zur Reaktion gebracht werden.

Die Heterogenität der Reaktionsorte konnte auch bei der Spaltungsgeschwindigkeit der Esterbindung Aminosäure-Träger mit HBr in Trifluoressigsäure nachgewiesen werden. Wie aus Abb 5 ersichtlich ist, wird die nach Erreichen der Sättigungskonzentration von HBr in Trifluoressigsäure verlaufende Reaktion 1. Ordnung nach ca 90-proz. Esterspaltung deutlich langsamer, d.h. die restli-

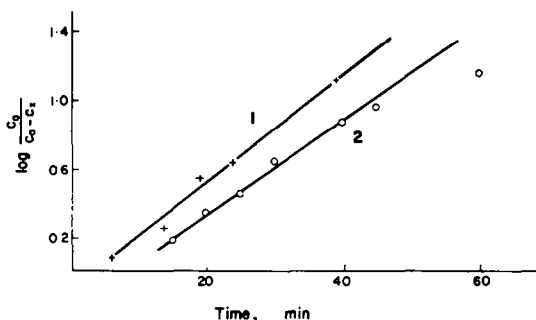


Abb 5. Spaltung der Träger-Prolin-Bindung mit Bromwasserstoff/Trifluoressigsäure. I: 0.10 mMol Prolin/g Träger (Träger 4), II: 0.50 mMol Prolin/g Träger (Träger 2).

chen Esterbindungen sind einer Acidolyse weniger leicht zugänglich.

Die beobachteten unvollständigen Umsätze bei den Kupplungen sind bei dem in diesen Untersuchungen angewandten Kupplungsverfahren allerdings nicht ausschliesslich auf die sterische Hinderung durch die Polymermatrix zurückzuführen. Teilweise beruhen sie auf einer Diffusionsbehinderung durch den während der Kupplungsreaktion innerhalb der Polymermatrix ausfallenden Dicyclohexylharnstoff. Dies konnte in einer vergleichenden Untersuchung mit einem modifizierten Carbodiimid-Kupplungsverfahren bewiesen werden.¹² Wir wenden heute daher ausschliesslich dieses modifizierte Verfahren an, bei dem mit Hilfe von DCCI zunächst die symmetrischen Anhydride der Boc-Aminosäuren hergestellt werden und diese vor Zugabe zur trägergebundenen Aminkomponente vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert werden.

Die Tatsache, dass in den Reaktionsprodukten in Tabelle 2 neben Rumpf- auch Fehlsequenzen aufzufinden sind, kann einerseits durch die eben erwähnte Diffusionsbehinderung durch Dicyclohexylharnstoff während einer Kupplungsreaktion verursacht werden, andererseits muss, zumindest bei den gelporösen Trägern angenommen werden, dass durch alternierende Schrumpf- und

Tabelle 4 Kupplungsausbeuten bei einer Synthese des Modellpeptids nach verschiedenen Reaktionszeiten

Aminosäure Kupplungs- stufe	Pro		Ala		Gly		Val		Gly	
	%	min	%	min	%	min	%	min	%	min
	97.4	5	80.9	1	93.0	5	89.0	0.5		
	97.4	13	82.1	3	96.0	30	99.0	3		
	97.6	24	84.8	7	98.0	120				
	97.7	50	84.7	120						
	97.7	120	84.5	10*						

* Erneuter Zusatz von Acylierungsreagenz.

Quellvorgänge, wie sie z.B. bei Verwendung von Athanol und Methylenchlorid während der Waschoperationen auftreten, Konformationsänderungen im Polymer stattfinden, wodurch Aminogruppen, die während der einen Kupplungsreaktion unzugänglich waren, bei der nächsten Kupplung teilweise wieder einer Reaktion zugänglich sind.

Als Konsequenz aus diesen Beobachtungen wird in unserem Laboratorium die Kupplungsreaktion am festen Träger wie folgt ausgeführt. Soweit möglich,⁷ werden mit Hilfe von DCCI die symmetrischen Anhydride der Boc-Aminosäuren hergestellt, die man 10–60 Minuten in wenigstens dreifachem Überschuss mit der trägergebundenen Aminokomponente reagieren lässt. Das Filtrat wird anschliessend gesammelt. Nach mehrmaligem Waschen des Peptidharzes mit Athanol und Methylenchlorid wird die zuvor gesammelte Lösung von überschüssigem Anhydrid wieder zugegeben, um die Kupplungsreaktion soweit als möglich zu vervollständigen. Die Stabilität der symmetrischen Anhydride erlaubt eine solche Reaktionsfolge,⁷ da der von Tometsko¹³ beobachtete Abfall in der Reaktionsfähigkeit der aktivierten Aminosäuren hier nicht auftritt.

Unsere Interpretation der Ursache für unvollständige Umsätze bei den Kupplungsreaktionen lässt ausserdem die Nützlichkeit der Verwendung von sogenannten Blockern wie Essigsäureanhydrid,¹ Sulfopropionsäureanhydrid¹⁴ oder Nitroptalsäureanhydrid¹⁵ zweifelhaft erscheinen, worauf schon mehrfach hingewiesen wurde.^{16,4}

Von Interesse ist noch, dass auch das Ausmass der Bildung der "Kopfsequenz" Gly-Val-Gly, die auf einer kovalenten Bindung des Glycinrestes am Träger beruht, welche unter Abspaltung des Alanyl-Glycyl-Dioxopiperazins auf der zweiten Kupplungsstufe vor sich geht, ebenfalls von den Trägereigenschaften abhängt. Die Bildungstendenz von Dioxopiperazinen ist besonders gross bei den N-Alkylaminosäuren.¹⁷ Diese Nebenreaktion bei der SPPS wird durch Basen,¹⁸ aber auch durch schwache Säuren¹⁹ katalysiert. Da beide als Protonenakzeptoren in die Reaktion eingreifen, ist es wahrscheinlich, dass bei Gegenwart des stark basischen Carboxylatans die Dioxopiperazinbildung begünstigt wird. Dies ist dann der Fall, wenn von der vorhergehenden Deprotonierung der Aminogruppe noch Base im Harz zurückgehalten wurde, welche mit neu hinzugefügter Boc-Aminosäure das Salz bildet. Die Bildung der Kopfsequenz zeigt sich besonders deutlich bei den Trägern (Abb 3b), aus denen überschüssige Reagenzien infolge der geringen Diffusionsgeschwindigkeit langsamer entfernt werden. Während das Diffusionsgleichgewicht bei den 1% vernetzten Trägern schon nach 30 Sekunden erreicht ist,² ist dies bei den 2% vernetzten Trägern erst nach 2 Minuten, bei den makroporösen erst

nach mehr als 30 Minuten erreicht.⁷ Entsprechend gross sind die jeweiligen Anteile der Sequenzen Gly-Val-Gly. Der relativ hohe Anteil dieser Sequenz bei Harz 3 lässt sich möglicherweise auf eine durch die Chlormethylierung verursachte weitere Vernetzung und damit eine Behinderung der Diffusion zurückführen.

Da eine langsame Diffusionsgeschwindigkeit lange Verweilzeiten bei den einzelnen Schritten eines Zyklus bedingt, ist es klar, dass aus Gründen der Zeitersparnis den stark quellenden Trägern der Vorzug zu geben ist. Andererseits darf nicht übersehen werden, dass bei Gleichverteilung der auszuwaschenden Stoffe ein 7 bis 11-maliges Waschen notwendig ist, um sie zu mehr als 99% zu entfernen, wenn pro g Harz 10ml Lösungsmittel verwendet werden. Ausserdem werden hinzugefügte Reagenzien durch das zurückgehaltene Lösungsmittel stark verdünnt. In diesen Fällen ist alternierendes Waschen mit Methylenchlorid und Mathanol angebracht, wodurch die Partikel "ausgedrückt" und in kurzer Zeit gereinigt werden.

Einen unerwartet geringen Effekt hat die Beladung des Trägers mit der ersten Aminosäure auf die Kupplungsausbeute. So ist die Reinheit des Pentapeptids am höher beladenen Träger 2 nur wenig geringer als an Träger 1, bei Träger 5 sogar noch besser als an Träger 6.

Auf Grund unserer Untersuchungen sollten bei der Trägerpräparation für die SPPS folgende Punkte in der Reihenfolge beachtet werden:

- Wahl eines Polymers mit möglichst geringem Vernetzungsgrad und damit möglichst grossem Quellvermögen
- Einführung der Ankergruppe in ungequollenem Zustand (z.B. im Hexan)
- sorgfältige Einhaltung der Chlormethylierungsbedingungen.

Die vorliegenden Untersuchungen haben den Einfluss des festen Trägers auf die Peptidsynthese gezeigt. Eine Probesynthese des Pentapeptids Gly-Val-Gly-Ala-Pro und anschliessende chromatographische Trennung des abgespaltenen Reaktionsprodukts gibt Aufschluss über den Grad dieses Einflusses auf die Kupplungsausbeuten und die Produktzusammensetzung. Mit Hilfe des Modellsystems liess sich feststellen, unter welchen Bedingungen die Trägerpräparation durchgeführt werden muss, um das Modellpeptid in sehr guten Ausbeuten zu erhalten. An einer solchen optimierten Trägerpräparation lässt sich auch das C-terminale Nonapeptid von Calcitonin M Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro in Ausbeuten von über 99% pro Kupplungsstufe synthetisieren.¹² Die Tatsache, dass der Träger aber überhaupt einen Einfluss auf den Syntheseverlauf nehmen kann, ist in jedem Fall von Nachteil bei der SPPS und dürfte auch ein wesentlich limitierender Faktor der Methode sein, jedenfalls in der Form, in

der sie von Merrifield konzipiert wurde und in der sie im Prinzip bis heute unverändert angewandt wird.

Die am festen Träger in jedem Falle vorhandene Heterogenität der Reaktionsorte ist ein Hindernis auf dem Weg zum gewünschten 100-proz. Umsatz bei jeder Reaktionsstufe. Der von Andreatta und Rink²¹ geforderte monovalente Träger mit homogenen Reaktionsorten wäre die Lösung dieses Problems. Der von Bayer *et al.*²³ vorgeschlagene bivalente, lösliche Träger Polyäthylenglykol erfüllt im Prinzip diese Forderung. An diesem Träger wurde das beschriebene Modellpeptid ohne Optimierungsversuche mit denselben hohen Ausbeuten synthetisiert,²² wie sie hier für den Träger 8 erzielt wurden.

EXPERIMENTELLER TEIL

Chlormethylierung¹

50g Polystyrolharz 200–400 mesh mit einem Vernetzungsgrad von 1% (Bio. Rad Laboratories, München Kontroll-Nr. 9253) bzw. 2% (Fluka, Basel, Kontroll-Nr. 576084), werden mit 300 ml Chloroform bzw. n-Hexan gemischt, auf 0°C abgekühlt und unter Rühren und Kühlen wird tropfenweise eine Lösung von 7.5 ml Zinntetrachlorid in 50 ml Methylchlormethyläther zugesetzt (= 1-fache Menge, Tabelle 1). Nach 30 Min. lässt man auf Zimmer-temp. erwärmen und rührt noch ca. 20 Min. weiter. Das Harz wird abfiltriert und dreimal mit 200 ml Dioxan/Wasser (3:1) sowie dreimal mit je 200 ml Dioxan/3N Salzsäure (3:1) gewaschen. Dann wird, allmählich von einem Lösungsmittel zum anderen übergehend, nacheinander mit Äthanol, Methylenechlorid, Essigsäure und Äther gewaschen. Das luftgetrocknete Harz wird mit 100 ml wasserfreier Essigsäure gemischt und zwei Stunden ein langsamer, gereinigter HBr-Strom hindurchgeleitet. Dann wird abfiltriert, nochmals mit Methylenechlorid, Äthanol und Äther gewaschen und bei 65° im Vakuum getrocknet.

Zur Bestimmung der Beladung mit Chlormethylgruppen werden drei Proben zu je 300mg in einer dickwandigen Ampulle mit 15 ml Pyridin eingeschmolzen und 3 Stunden auf 110° erhitzt. Darauf wird mit 100 ml Wasser verdünnt, mit Salpetersäure angesäuert, mit 20 ml 0.1N

Silbernitrat-Lösung versetzt und mit 0.1N Ammoniumrhodanid-Lösung zurücktitriert.

Verankerung der ersten Aminosäure

1g chlormethyliertes Polystyrol-Harz wird mit einer den Chlormethylgruppen äquimolaren Menge an Boc-Prolin und Triäthylamin in 8 ml Essigester in eine Ampulle gefüllt, auf –60°C gekühlt, evakuiert und zugeschmolzen. Dann wird 18 Stunden unter ständigem Wenden im Ölbad bei 80°C erhitzt, das Harz abfiltriert und mit Essigester, Methylenechlorid und Äthanol gewaschen. Die Ermittlung der Beladung erfolgt durch Stickstoff- und Chlorbestimmung, sowie durch Aminosäureanalyse.

Spaltung der Träger-Peptid-Bindung

1g Peptidyl-Harz werden in einen 100ml Zweihalskolben mit Tauchfritte und Trockenrohr viermal mit je 20ml Essigsäure und einmal mit 20ml Trifluoressigsäure gewaschen. Nach der nochmaligen Zugabe von 20 ml Trifluoressigsäure wird das Trockenrohr durch eine Gasableitung ersetzt und durch die Tauchfritte unter ständigem Rühren HBr-Gas eingeleitet. Nach 60 Min. wird das Filtrat durch die nun mit einem 100ml Rundkolben verbundene Tauchfritte abgesaugt und das Harz dreimal mit je 10 ml Trifluoressigsäure gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden einedampft, mit Äther p.A. versetzt und nochmals eingedampft. Der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet, mit Wasser aufgenommen und, falls notwendig, mit Pyridin auf pH 6–7 eingestellt. Dann wird lyophilisiert. Zur Überprüfung der Abspaltungsgeschwindigkeit wurden nach jeweils 5, 10, 15, 20, 30, 45 und 60 Minuten Behandlung mit Bromwasserstoff Proben zu je 0.5 ml entnommen und in einer Ampulle eingedampft. Der Rückstand wurde mit 5 ml 6N Salzsäure versetzt, hydrolysiert und eine Aminosäureanalyse durchgeführt. Der Bezugswert wurde mit einer Probe bestimmt, die 24 Stunden mit Bromwasserstoff-Trifluoressigsäure behandelt worden war.

Synthesen des Modellpeptids

Die Synthesen des Modellpeptids an den chlormethylierten und mit Boc-Prolin veresterten Harzen 1–8 (Tabelle 1) erfolgten nach dem Syntheschema in Tabelle 5.

Tabelle 5. Syntheschema des Modellpeptids

Operationsschritte	Konzentration	Reagenz	ml/g	Lösungsm.	t(min)	Wiederholg.
1 Deblockierung	50%	TFA ^a	5	CH ₂ Cl ₂	20	2 ×
2 Waschen			10	CH ₂ Cl ₂	10	3 ×
3 Waschen			10	EtOH	15	2 ×
4 Waschen			10	DMF	10	4 ×
5 Neutralisation	10%	TÄA ^a	10	DMF	10	2 ×
6 Waschen	3%	TÄA ^a	10	DMF	15	3 ×
7 Waschen			10	CH ₂ Cl ₂	30	6 ×
8 Kupplung	1.0 M	Boc-AS ^b	2	CH ₂ Cl ₂	120	1 ×
	1.0 M	DCCI	2	CH ₂ Cl ₂		
9 Waschen			10	CH ₂ Cl ₂	10	2 ×
10 Waschen			10	DMF	10	2 ×
11 Waschen			10	CH ₂ Cl ₂	15	3 ×
12 = 1						

^a TFA = Trifluoressigsäure, TÄA = Triäthylamin.

^b Da das Harz ca. 6ml Methylenechlorid zurückhält, ist die effektive Konzentration an Boc-Aminosäure ca. 0.2-molar.

Bestimmung der Kupplungsgeschwindigkeit

5g Boc-Prolyl-Harz mit einer Beladung von 0.5 mMol/g wurden wie in Tabelle 5 beschrieben mit der jeweiligen Aminosäure umgesetzt. Nach der Zugabe der Lösungen von Boc-Aminosäuren und DCCI ($t = 0$) werden nach den in Tabelle 4 angegebenen Zeiten jeweils ca. 60mg Harz entnommen, in einem 100-ml-Dreihalskolben mit 10ml Essigsäure/Methylchlorid (1:3) gemischt, und schliesslich wie oben die Träger-Peptid-Bindung mit Bromwasserstoff/Trifluoressigsäure gespalten.

LITERATUR

- ¹R. B. Merrifield, *Fed. Proc.* **21**, 412 (1962); *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149 (1963); **86**, 304 (1964)
- ²H. Frank, Dissertation Tübingen 1973
- ³R. B. Merrifield, V. Littau, in E. Bricas (ed.), *Peptides*, North Holland Pub., Amsterdam 1968, p. 179–182
- ⁴W. S. Hancock, D. J. Prescott, P. R. Vagelos and G. R. Marshall, *J. Org. Chem.* **38**, 774 (1973)
- ⁵F. Weygand and R. Obermeyer *Z. Naturf.* **23b**, 1390 (1968); K. Esko, S. Karlsson und J. Porath, *Acta Chem. Scand.* **22**, 3342 (1968); L. C. Dorman, *Tetrahedron Letters* 2319 (1969); K. Brunfeldt, P. Roepstorff und J. Thomsen, *Acta Chem. Scand.* **23**, 2906 (1969); S. Hörnle und W. Geising, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **352**, 5 (1971); G. Losse und R. Ulbrich, *Z. Chem.* **11**, 346 (1971); E. Bayer, P. Hunziker, M. Mutter, R. Sievers und R. Uhmman, *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 265 (1972); B. F. Gisin, *Anal. Chem. Acta*, **58**, 248 (1972); A. M. Felix und M. H. Jimenez, *Anal. Biochem.* **52**, 377 (1973)
- ⁶F. C. Westall und A. B. Robinson, *J. Org. Chem.* **35**, 2842 (1970)
- ⁷H. Hagenmaier und H. Frank, unveröffentlichte Ergebnisse
- ⁸A. Loffet, *Intern. J. Prot. Res.* **3**, 297 (1971); A. Losse, *Z. Chem.* **11**, 386 (1971)
- ⁹G. Losse und R. Ulbrich, *Tetrahedron* **28**, 5823 (1972); A. Losse, *Ibid*; **29**, 1203 (1973)
- ¹⁰H. Hagenmaier und H. Frank, *J. Chrom. Sci.* **10**, 663 (1972)
- ¹¹R. Neher, B. Riniker, W. Rittel und H. Zuber, *Helv.* **51**, 1900 (1968)
- ¹²H. Hagenmaier und H. Frank, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353**, 1973 (1972)
- ¹³A. M. Tometsko, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **50**, 886 (1973)
- ¹⁴H. Wissmann und R. Geiger, *Angew. Chem.* **82**, 937 (1970)
- ¹⁵Th. Wieland, C. Birr und H. Wissenbach, *Ibid.* **81**, 782 (1969)
- ¹⁶H. Hagenmaier, *Tetrahedron Letters* 283 (1970)
- ¹⁷M. C. Khosla, R. R. Smeby und F. M. Bumpus, *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 4721–4724 (1972); M. Rothe, R. Theyson, K. -D. Steffen, M. Kostrzewa und M. Zamani in E. Scoffone (ed.), *Peptides* 1969, North Holland Pub., Amsterdam 1971, p. 179–188
- ¹⁸M. Goodman und K. C. Stueben, *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 1279 (1962)
- ¹⁹B. F. Gisin, R. B. Merrifield, *Ibid.* **94**, 3102 (1972)
- ²⁰A. Losse, *Tetrahedron Letters* 4989 (1971)
- ²¹R. H. Andreatta, H. Rink, *Helv.* **56**, 1205 (1973)
- ²²H. Frank, H. Hagenmaier, M. Mutter, unveröffentlichte Ergebnisse
- ²³M. Mutter, H. Hagenmaier und E. Bayer, *Angew. Chem.* **83**, 883 (1971)