

PROBLEME UND ENTWICKLUNGSTENDENZEN BEI DER FESTPHASENPEPTIDSYNTHESE*

Von

G. LOSSE

Sektion Chemie der Technischen Universität Dresden

(Eingegangen am 16. Oktober, 1971)

An Hand der Probleme und der Entwicklungsrichtungen der Peptidsynthese in der Festphase werden u. a. die Prinzipien der Methode, der Träger und dessen Funktionsgruppen, die verschiedenen Schutzgruppenkombinationen und die Abspaltung der Peptide vom Träger, sowie die Bedeutung der Blocker und der analytischen Kontrolle der Kupplung behandelt. Es werden die bedeutendsten Resultate der letzten Jahre hervorgehoben, sowie eigene Untersuchungen auf diesem Gebiete besprochen.

Einleitung

Schema 1 zeigt das Grundprinzip jeder Peptidsynthese. Die Aminogruppe der Ausgangsaminosäure wird zunächst temporär durch den Substituenten X blockiert und die Carboxylgruppe dann durch einen reaktiven Substituenten Y aktiviert. Anschließend erfolgt Kupplung mit dem C-geschützten Derivat einer zweiten Aminosäure zum beidseitig geschützten Dipeptid-Derivat. Als Schutzgruppe X wendet man zweckmäßig hydrogenolyse- oder acidolyseempfindliche Substituenten vom Urethantyp an. Y ist in der Regel das Azid, Anhydrid, der aktive Ester oder das Aktivierungsprodukt durch Dicyclohexyl-carbodiimid (DCCI), Z gewöhnlich eine leicht entfern- oder umwandelbare Estergruppe. X und Z müssen zweckmäßigerweise unabhängig voneinander entfernbar sein. Bei Abspaltung von Z entsteht eine Carboxylkomponente, welche eine schrittweise Weiterverlängerung zum Carboxylende hin ermöglicht. Dieser Weg ist zu verwerfen, da die Carboxylgruppe einer peptidgebundenen Aminosäure aktiviert wird, was die Gefahr einer Racemisierung in sich birgt. Bei Entfernung von X entsteht eine Aminokomponente, was die schrittweise Weiterverlängerung mit urethangeschützten, C-aktivierten Aminosäuren zum Aminoende hin ermöglicht. Dieser Weg ist vorzuziehen, da hier keinerlei Racemisierung stattfinden kann.

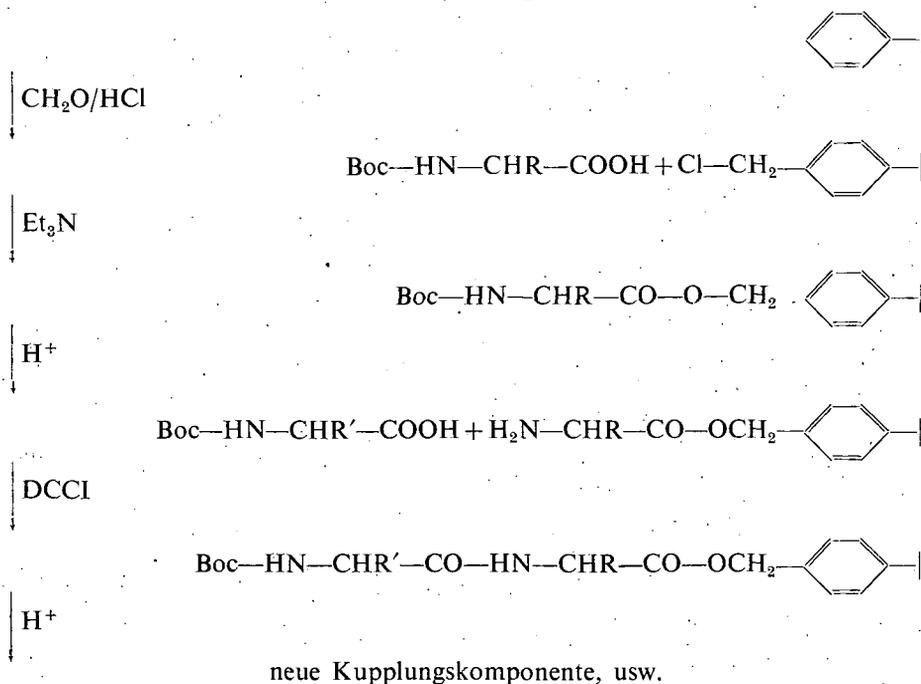
Da einem schrittweisen Aufbau wegen der immer schwerer werdenden Trennung von Ausgangs- und Endprodukt Grenzen gesetzt sind, geht man bei der Synthese höherer Peptide zu Fragmentkondensationen, d. h. Vereinigung von Carboxylkomponente mit der Aminosäurekomponente, über. Hier ist die Aktivierung einer peptidgebundenen Carboxylgruppe unumgänglich. Deshalb muß die Strategie der

* Auf Grund eines in den Organisch-Chemischen Instituten der Attila-József-Universität, Szeged (13. Oktober, 1971) und der Loránd-Eötvös-Universität, Budapest (14. Oktober, 1971) gehaltenen Vortrages.

Grundlagen der Festphasensynthese (Merrifield-Synthese)

Zuerst soll die MERRIFIELD-Synthese [1—3] im engeren Sinne besprochen werden. Später werden auch Varianten und andere Verknüpfungsmöglichkeiten für Peptide an festen Trägern behandelt. Grundprinzip der MERRIFIELD-Synthese ist die schrittweise N-terminale, d. h. racemisierungsfreie Kettenverlängerung eines polymeren Aminosäurebenzylesters mit *tert.*-Butyl-oxycarbonyl(Boc)-Aminosäuren. Nach beendeter Synthese wird das Peptid unter Spaltung der Harz-Benzylesterbindung abgetrennt und isoliert. Da man in heterogener Phase arbeitet, können die Reinigungsoperationen auf einfache Filtrier- und Waschvorgänge reduziert werden.

Schema 2



Die Kennzeichen der Methode sind folgende:

1. Die C-terminale Aminosäure wird esterartig an ein Chlormethyl-Polystyrol geknüpft (Anesterung). Mit diesem Schritt wird die Synthese gestartet. Er ist ein Spezialfall und wiederholt sich im Laufe des weiteren Ablaufes nicht wieder. Es sind hier besondere Reaktionsbedingungen erforderlich, was vor allen Dingen bei der Anesterung seitenkettengeschützter Aminosäuren berücksichtigt werden muß.
2. Der Syntheseyklus beginnt mit der Eliminierung der Boc-Gruppe, also der NH_2 -Entblockierung. Unter diesen Bedingungen gilt die Harz-Benzylester-

bindung als absolut stabil. In der Praxis muß jedoch mit einem schwachen Angriff bei jedem Abspaltungsschritt der Boc-Gruppe gerechnet werden. Dies kann zu einer sukzessiven Ablösung von Teilen der wachsenden Peptidkette vom Harz und somit zu Ausbeuteverlusten führen. Zu beachten sind auch die Stabilitätsverhältnisse an den Seitenketten der wachsenden Peptidkette unter den wiederholten Acidolyseschritten.

3. Knüpfung der Peptidbindung mit der Carboxylgruppe der nächsten urethangenschützten Aminosäure. In der Regel wird hierzu Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) verwendet. Ein praktisch quantitativer oder hochprozentiger Umsatz ist in diesem Schritt unbedingt erforderlich, um Sequenzabbrüche zu vermeiden, die das Endprodukt verunreinigen und sich schwer abtrennen lassen würden. Erreicht wird ein solcher durch Anwendung von Kupplungskomponente und Knüpfungsreagens in 3- bis maximal 5-molarem Überschuß. Wichtig ist auch die Quellfähigkeit der Matrix, die ein möglichst weitgehendes Eindringen der Reagentien und Lösungsmittel ermöglichen soll. Mit diesem Schritt ist der erste Zyklus abgeschlossen.

4. Durch Wiederholung dieser Operationen (Entblockierung und Kupplung) gelangt man stufenweise zum gewünschten Peptid, welches zum Schluß acidolytisch (HBr/Eisessig, HBr/TFA oder HF) vom Träger abgespalten wird. Unter diesen Bedingungen werden auch die meisten Seitenkettenschutzgruppen eliminiert. Gegebenenfalls müssen einige von ihnen nachträglich durch Spezialreagenzien entfernt werden. Man erhält auf diese Weise völlig entblockierte Peptide, die keinerlei Fragmentkondensation oder Weiterverlängerung mehr zugänglich sind.

Der Vorteil der Methode besteht in der einfachen und schnellen Arbeitsweise, man spart während der Synthese aufwendige Reinigungsoperationen ein und hat die Möglichkeit, das Verfahren zu automatisieren. Der Nachteil besteht darin, daß sie große Reagentienüberschüsse und Lösungsmittelmengen erfordert und deshalb nicht sehr ökonomisch ist. Außerdem muß ein Teil der eingesparten Reinigungsschritte durch eine sehr gründliche Endreinigung wieder nachgeholt werden. Schließlich darf man sich durch die spezielle Methodik nicht zu blindem Vertrauen in das planmäßige Ablaufen eines jeden Syntheseschrittes provozieren lassen. Hier sind eine ganze Reihe von analytischen Kontroll- und Absicherungsmaßnahmen erforderlich. Insgesamt ist die Bilanz jedoch positiv, wie die mit dieser Methode in den letzten 5 Jahren erzielten Ergebnisse [1] zeigen.

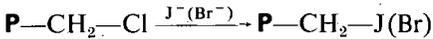
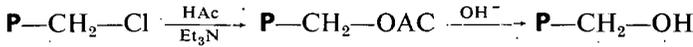
Es sollen jetzt die einzelnen Syntheseschritte detailliert besprochen werden.

Träger und Ankergruppen

1. Ausgangsmaterial ist ein zu 2% mit Divinylbenzol quervernetztes Polystyrolharz (Teilchendurchmesser 20–80 μ). Eine höhere Quervernetzung hat sich als unzweckmäßig erwiesen, weil die Quellfähigkeit sowie Durchlässigkeit derartiger Träger zurückgeht und dadurch niedere Ausbeuten beim Peptidknüpfungsschritt erreicht werden. Der Vorteil solcher höher quervernetzten Harze wäre unter Umständen eine günstigere mechanische Stabilität und bessere Filtrierbarkeit. Eine Quervernetzung <1% sichert keine absolute Unlöslichkeit mehr in organischen Solventien.

2. Die Chlormethyl-Ankergruppe wird zweckmäßig mit Chlordimethyläther/ SnCl_4 [4] eingeführt. Hierbei ist der Substitutionsgrad der Phenylkerne durch

Halogen beliebig variierbar. Zweckmäßig wird ein Chlorgehalt von 2—5% entsprechend einer Substitution von 5—15% aller aromatischen Kerne angestrebt. Da die Anesterung der C-terminalen Aminosäure an die Chlormethylgruppe relativ harte Bedingungen erfordert (80°, 20 Std., in Alkohol oder Essigester mit *tert.* Base [5, 6]), geht man bei empfindlicheren Aminosäurederivaten, wie z. B. Aminosäurederivaten mit Esterbindungen in den Seitenketten, zweckmäßigerweise vom Hydroxymethyl-(BODANSZKY)-Harz aus [7, 8].



Die Anesterung ist hier mit Dimethylformamid-dineopentylacetal oder Carbonyl-diimidazol unter milden Bedingungen möglich. Eine andere Variante, Aminosäuren unter milden Bedingungen am Harz zu binden, besteht darin, daß die Chlormethylgruppe in die reaktivere Jodmethylgruppe [9] übergeführt wird.

Es gibt außer über die Benzylesterbindung grundsätzlich andere Verankerungsmöglichkeiten der C-terminalen Aminosäure am Harz. Dann sind für die Endablösung des Peptides aber andere Spaltungsbedingungen erforderlich, was für den Seitkettenschutz, d. h. die Gewinnung von geschützten Peptidfragmenten, von Bedeutung ist. Hierauf wird später noch einzugehen sein. Hier soll zunächst die Verankerung durch die Benzylesterbindung besprochen werden.

Anesterung

Der Chlorgehalt der eingesetzten Chlormethyl-polystyrole soll in der Größenordnung von 2% (entsprechend 0.8 mA Chlor/g) liegen. Bei der Anesterung wird dann in der Regel eine Beladung von 0.2 bis 0.3 mA Aminosäure/g (entsprechend ca. 20—30% der vorhandenen Chloratome) erreicht. Als Nebenreaktion kann Quaternierung der tertiären Base durch die CH₂Cl-Gruppen eintreten [10, 11] und, sofern man in Alkohol als Lösungsmittel arbeitet, Verätherung. Der Nachweis der Quaternierung ist leicht durch Totalhydrolyse eines Boc-Aminoacyl-Harzes mit 6 n Salzsäure/Eisessig möglich. Nach gründlichem Auswaschen der Matrix ist elementaranalytisch ein konstanter Reststickstoff-Gehalt nachweisbar.

Tabelle I

Trägertyp	Korngröße μ	Chlorgehalt des Trägers (mA/g Harz) Elementaranalyse	Beladung mit Boc-Pro (mA/g Harz) Totalhydrolyse, Kolorimetrie	Veresterungsgrad der CH ₂ -Cl-Gruppe %
Phenol-Formaldehyd- Kondensat (Resitol-Typ)	60—100	0.75	0.20	27
Polystyrol/2% Divinylbenzol (MERRIFIELD-Harz)	20—80	0.76	0.13	17

Die auf diese Weise gebildete Anionenaustausch-Kapazität ist aber minimal und hat in der Praxis zu keinerlei Störungen bei der Peptidsynthese geführt. Über Nebenreaktionen des Restchlors ist nichts bekannt, so daß heute auf eine nachträgliche Blockierung der überschüssigen Chloratome z. B. durch Austausch mit Triäthylammonium-acetat verzichtet wird.

Die Beladung des Harzes durch die 1. Aminosäure ist als Bezugsgröße für Ausbeutebestimmungen der MERRIFIELD-Synthese von Bedeutung. Sie wird nach Totalhydrolyse und quantitativem Auswaschen aus dem Harz kolorimetrisch oder mit Hilfe eines Aminosäureanalysators bestimmt. Eine andere Möglichkeit besteht in der Anwendung der noch zu besprechenden Analytik für die Kontrolle der einzelnen Kupplungsschritte. Der Aminosäuregehalt soll optimal zwischen 0.1 bis 0.5 mÄ Aminosäure/g Harz liegen. Dies zeigt, daß die Substitution nicht auf die Oberfläche des Harzes beschränkt ist, da sonst nur eine viel kleinere maximale Ladung möglich wäre [12].

Tabelle I zeigt als Beispiel typische Daten für die Beladung auf der Chloromethyl- und Aminoacyl-Stufe bei zwei Harzen, die wir zum Aufbau der linearen Vorstufe von Gramacidin S verwendeten [13]. Es handelt sich einmal um ein authentisches Chlormethyl-MERRIFIELD-Harz, zum anderen um ein von uns entwickeltes chlormethyliertes, schwach quervernetztes Phenol/Formaldehyd-Harz [14].

N-Schutzgruppe und Spaltung

Heute stehen in der Peptidsynthese etwa 40 N-Schutzgruppen zur Verfügung [15]. Wegen der besonderen Anforderungen, die die Festphasensynthese stellt, sind hiervon jedoch nur wenige praktisch verwertbar.

Für die Festphasensynthese gelten folgende besondere Forderungen:

1. Vollständige und gegenüber der Harz-Benzylesterbindung absolut selektive Abspaltbarkeit über zahlreiche Syntheseschritte hinweg. Quantitative Untersuchungen von uns haben gezeigt, daß bei der Abspaltung der Boc-Gruppe vor allem in den ersten Syntheseschritten ein Angriff bis zu 1% auch auf die Harz-Benzylesterbindung stattfindet [16]. Die Ursache hierfür dürfte u. a. darin zu suchen sein, daß außer „normalen“ Benzylesterbindungen, etwa durch eine *o*-Chlormethylierung oder durch spezielle Anordnung im Polystyrolgerüst z. B. an Vernetzungsstellen, andere Benzylestertypen höherer Acidolyseaktivität gebildet werden.

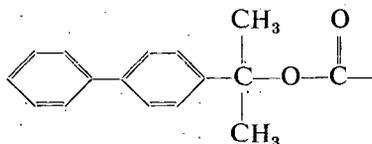
2. Die N-Schutzgruppe muß die anzukuppelnde Aminosäure gegen Racemisierung sichern und sollte daher zweckmäßig ein Urethanrest sein.

3. Bei der Abspaltung der N-Schutzgruppe dürfen nur wenig und einfache Nebenprodukte entstehen, da sonst das Auswaschen des Harzes erschwert würde. Weil sie die genannten Bedingungen optimal erfüllt, wird heute weitgehend die Boc-Gruppe bevorzugt. Grundsätzlich kommen aber auch andere Reste in Betracht, vor allen Dingen dann, wenn sie eine gegenüber der Boc-Gruppe erhöhte Säurelabilität besitzen.

Tabelle II zeigt anhand der von uns [17] in 0.05 Mol Bromwasserstoff-Eisessig gemessenen Spaltungsgeschwindigkeiten die Stabilitätsabstufung einer Reihe ausgesprochen säurelabiler N-Schutzgruppen. Dabei tritt vor allem die Reaktivitätsabstufung zwischen diesen Substituenten und die hohe Säurelabilität speziell der Nps-, Pmz- und Foc-Gruppe hervor.

Entsprechend Tabelle III haben wir die Eignung von einigen dieser säurelabilen Schutzgruppen für die MERRIFIELD-Synthese unter verschiedenen Bedingungen studiert [16]. Es ist ersichtlich, daß außer der Boc-Gruppe, der wegen der Bildung gasförmiger Reaktionsprodukte zweifellos der Vorzug zu geben ist, noch in die engere Wahl die Pmz- und Foc-Gruppe gelangen. So konnten wir unter Anwendung der Foc-Gruppe die lineare Vorstufe von Gramacidin S sowohl an der MERRIFIELD-Matrix als auch an Phenolformaldehyd-Harz in vergleichbarer bzw. höherer Ausbeute als unter Anwendung der Boc-Gruppe synthetisieren [13].

Inzwischen sind hochsäurelabile Schutzgruppen, wie z. B. die Biphenyl-isopropyl-oxycarbonyl (Bpoc)-Gruppe



bekannt, die schon mit Eisessig allein entfernt wird [18]. Dies sind Abspaltungsbedingungen, bei denen selbst die Boc-Gruppe und Seitenschutzgruppen vom *tert.*-Butyltyp intakt bleiben.

Tabelle II

Acydolysegeschwindigkeit von verschiedenen N-Schutzgruppen an Glycin-benzylamid in 0.05 Mol HBr/Eisessig bei 20°

N-Schutzgruppe	% Spaltung						K · 10 ⁵
	1	2	5	10	20	60	
	min						
Nps	89	98					3200
Pmz	53	75	96	100			1200
Foc	40	70	94	98			1000
Boc	28	55	89	98			700
Trt	4	9	23	42	60	92	88
Cbo	—	—	—	—	—	1	0.2

Nps = *o*-Nitrophenyl-sulfenyl

Pmz = *p*-Methoxy-benzyl-oxycarbonyl

Foc = Furfuryl-oxycarbonyl

Boc = *tert.*-Butyl-oxycarbonyl

Trt = Trityl

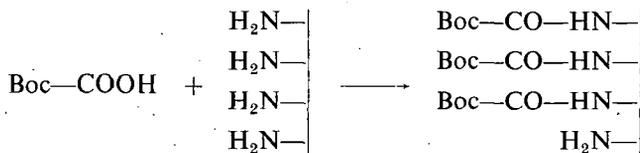
Cbo = Benzyl-oxycarbonyl

Tabelle III

Amino- schutz- gruppe	mÄq. Phe/ g N-gesch. Harz	Spaltreagens für N-Schutz in ml, bezogen auf 10 g N-gesch. Harz	Reakt.- zeit in min bei 20°C	Verhalten der N-Schutzgruppe		Prozentualer Angriff der Harz-Benzyl- ester-Bindung
				Abspaltungsgrad	nachgewiesene Reaktionsprodukte	
Boc	0.24	40 ml 1 n HCl/HAz 40 ml 6.5% HBr/HAz 40 ml 3.75 n HCl/Dioxan	30	totale Abspaltung		1.1
			30	totale Abspaltung		0.9
			30	totale Abspaltung		15
Foc	0.17	35 ml 1 n HCl/HAz 35 ml 6.5% HBr/HAz 35 ml 3.75 n HCl/Dioxan 35 ml 2 n HCl/Dioxan	30	totale Abspaltung	Verharzung	1.3
			30	totale Abspaltung		1.1
			30	totale Abspaltung		19
			30	totale Abspaltung		15
Nps	0.19	3 Äq. 1 n HCl/HAz in 40 ml CHCl ₃ 1.1 – 1.2 Äq. 1 n HCl/CH ₃ OH in 30 ml CH ₃ OH	10	totale Abspaltung	Nps-Chlorid	0.4
			45	totale Abspaltung	Nps-methylester	1.5
Tri	0.20	40 ml 50%ige Trifluoressigsäure 40 ml 75%ige HAz	30	totale Abspaltung	Triphenylcarbinol	0.8
			120	unvollständig	Triphenylcarbinol	0.6
For	0.25	80 ml 7 n HCl/Dioxan 80 ml 4 n HCl/Dioxan 80 ml 10 n HCl/THF 80 ml 8 n HCl/THF	24 h	30–35% Absp.		9
			24 h	20–25% Absp.		7
			24 h	totale Abspaltung		52
			24 h	90% Abspaltung		46

Peptidknüpfungsschritt

Dieser ist der wichtigste Teilschritt der Festphasensynthese. Die Hauptforderung hier ist die nach einem möglichst quantitativen Umsatz, wobei im Idealfall solche Umsatzgrade angestrebt werden, daß nicht umgesetzte freie Aminogruppen mit Hilfe der verfügbaren analytischen Nachweismethoden nicht mehr erfaßt werden können.



Unvollständige Umsätze liefern Kettenabbrüche und führen zur Bildung sogenannter Rumpfsequenzen. Diese verunreinigen das Endprodukt und erschweren dessen Reinigung. Die Weiterverlängerung solcher Rumpfsequenzen in einem späteren Stadium der Synthese, die Sequenzlücken (Fehlsequenzen) ergeben würde, ist bis jetzt nicht beobachtet worden. In der Praxis hält man solche Kettenabbrüche auf ein Minimum durch Anwendung eines 3- bis 5-fachen Überschusses an Kupplungsreagens und Kupplungskomponente, wobei in der Regel Umsätze von über 95% erreicht werden. Dennoch darf man sich nicht darauf verlassen, daß unter diesen Bedingungen generell hochprozentige Umsätze erzielt werden. Es hängt sehr von der Art der Aminosäure ab (z. B. sterische Hinderungen am Valin, sterische Hinderungen seitenkettengeschützter Aminosäuren) und dem Ort, an dem die Kupplung sich vollzieht (z. B. Nähe der Matrix, Nachbarschaft anderer Aminosäuren), welche Ausbeuten im konkreten Fall erhalten werden. Es ist daher sinnvoll, zumindest bei der erstmaligen Ausarbeitung einer Synthese nach dem MERRIFIELD-Prinzip jeden einzelnen Kupplungsschritt einer gründlichen analytischen Kontrolle zu unterziehen. Hierfür steht heute eine ganze Reihe von Verfahren zur Verfügung, die vorwiegend auf der Erfassung freier Rest-NH₂-Gruppen basieren und von denen als wichtigste die Methoden von ESKO [19] und DORMAN [20] zu nennen sind. Außerdem behält weiterhin die chromatographische Kontrolle nach Abspaltung aliquoter Teile der wachsenden Peptidkette von der Matrix ihre Bedeutung. Tabelle IV zeigt einen von uns durchgeführten Vergleich verschiedener qualitativer und quantitativer Methoden zur Bestimmung von Rest-Aminogruppen bei der MERRIFIELD-Synthese [21]. Bei diesen Versuchen wurde harzgebundenes Phe stufenweise mit Boc-Gly bis zur maximal erreichbaren Ausbeute gekuppelt und jede Umsatzstufe mit den angeführten analytischen Methoden bestimmt.

Man sieht, daß die Methode von ESKO (2-Hydroxy-naphthaldehyd-1) relativ wenig empfindlich ist und bereits nach dem 4. Kupplungsschritt vollständige Umsätze vortäuscht. Zuverlässiger sind die Salzbildungsreaktionen mit Pyridin-hydrochlorid (Methode nach DORMAN) sowie Pyridin-hydrobromid. Nach unseren Ergebnissen hat sich vor allem die Variante mit Pyridin-hydrobromid bewährt [21], welche bei der potentiometrischen Halogenbestimmung frei von Störungen durch in der Matrix adsorptiv zurückgehaltene Chlorionen ist. Zum qualitativen Test haben wir Aryl-azo-salicylaldehyde und -hydroxy-naphthaldehyde entwickelt [22], welche mit freien Aminogruppen in der Matrix farbige Schiff'sche Basen bilden. Ein unvollständig verlaufender Kupplungsschritt der MERRIFIELD-Synthese führt bei diesem

Tabelle IV

Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung des Umsatzgrades bei der MERRIFIELD-Synthese an Hand der Synthese von Boc-Gly-Phe (% Rest-NH₂-Gruppen)

Kupp- lungs- schritt	Molver- hältnis der Kupplungs- reagentien	Reak- tions- zeit Stunden	2-Hydroxynaphth- aldehyd-(1)		Salzbildungs- reaktionen		qualitative Teste		
			in Äthanol	in Äthanol/ CH ₂ Cl ₂	Pyr. HCl	Pyr. HBr	4-Nitro- benzol- (1-azo-5)- salicyl- aldehyd	Brom- kresol- purpur	dünnschicht- chromat. Nach- weisbarkeit von Phe neben Gly-Phe
1	1:1:1	4	16.4	20.0	24.2	20.8	++++	+++	++++
2	1:1:1	4	3.3	1.8	9.0	5.1	+++	++	+++
3	1:1:1	4	1.1	0.7	6.6	4.4	+++	++	+++
4	1:1:1	4	1.2	1.0	5.6	3.2	++	++	++
5	1:1:1	4			4.3	2.6	++	++	++
6	1:4:1	4			3.5	2.1	+	+	++
7	4:4:1	16			3.0	2.0	+	(+)	++
8	4:1:1	20			2.8	2.0	(+)	(+)	++
Standardabweichung			1.2	1.2	0.3	0.3			

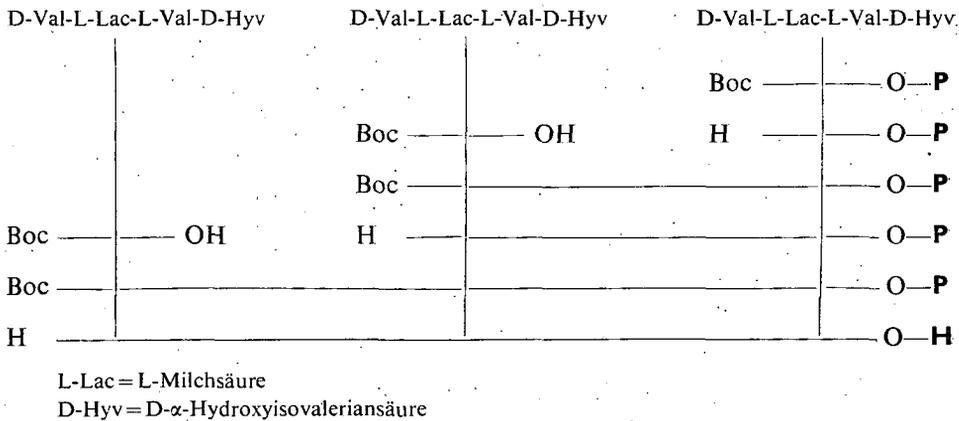
Reagens also zur Anfärbung der Matrix, während bei Umsätzen über 98% der Farbstoff völlig ausgewaschen wird und die Matrix farblos bleibt. Man erkennt aus der Tabelle, daß die höchsten Empfindlichkeiten bei den Salzbildungsreaktionen liegen, was verständlich ist, da ein Proton auch sterisch verborgene Aminogruppen leicht erreichen kann. Die Nachweisbarkeitsgrenzen für freie Aminogruppen reichten bei diesen Methoden bis ca. 1%. Außerdem zeigen diese Versuche, daß die Maximalausbeuten für die Gly-Phe-Bindung in Nachbarschaft zur Matrix nicht über 98% liegen können.

Zeigt eine dieser analytischen Methoden unbefriedigende Umsatzgrade von z. B. unter 90% an, so kann der Kupplungsschritt wiederholt werden (Nachkupplung) oder die Restaminogruppen werden mit Hilfe sogenannter NH₂-Blocker einer weiteren Reaktion entzogen. Als NH₂-Blocker wird heute bevorzugt Acetimidazolid [23] angewendet. Nach unseren Erfahrungen hat es sich aber gezeigt, daß dort, wo eine wiederholte Nachkupplung den Acylierungsgrad der Restaminogruppen nicht mehr steigert, auch Acetimidazolid keine nennenswerten Fortschritte mehr bringt [24].

Als Hauptreagens für die Kupplung wird DCCI verwendet, daneben gelangen die Methoden der aktiven Ester (z. B. Nitrophenylester, NHI-Ester) zur Anwendung. Die Methode der aktiven Ester hat vor allem für die Synthese von Glutamin- und Asparagin-Peptiden Bedeutung, welche mit DCCI Wasser zum Nitril abspalten würden [25], sowie dort, wo man bestrebt ist, die Peptidsynthese mit minimalem Seitenkettenschutz, z. B. ungeschützten OH- oder Carboxylgruppen durchzuführen. Die aktiven Ester besitzen den Nachteil, daß sie gegenüber der DCCI-Methode niedrigere Umsatzgeschwindigkeiten und Kupplungsgrade liefern. Ihr Vorteil ist, daß überschüssige Kupplungskomponente bequem zurückgewonnen werden kann [7, 26]. Hier ist zusätzlich auch die analytische Kontrolle des Umsatzschrittes durch quantitative Bestimmung des freigesetzten Phenols möglich.

Nach diesem Prinzip sind grundsätzlich auch Fragmentkondensationen zwischen kurzkettigen Boc-Peptiden und harzgebundener Aminosäure oder harzgebundenem Peptid möglich [27, 28]. Solche haben besondere Bedeutung für den gezielten Aufbau von Sequenzoligomeren, wie z. B. Perlon- oder Nylon-Oligomeren, und für die Synthese von Naturstoffen, z. B. Depsipeptiden, mit regular alternierenden Sequenzen. Schema 3 zeigt die von uns durchgeführte Festphasensynthese der linearen Vorstufe des Depsipeptides Valinomycin durch 2-malige Fragmentkondensation an der festen Matrix [22]. Auf diese Weise kann man auch die Knüpfung kritischer Stellen am Harz vermeiden und in Form einer konventionellen Synthese vorwegnehmen.

Schema 3



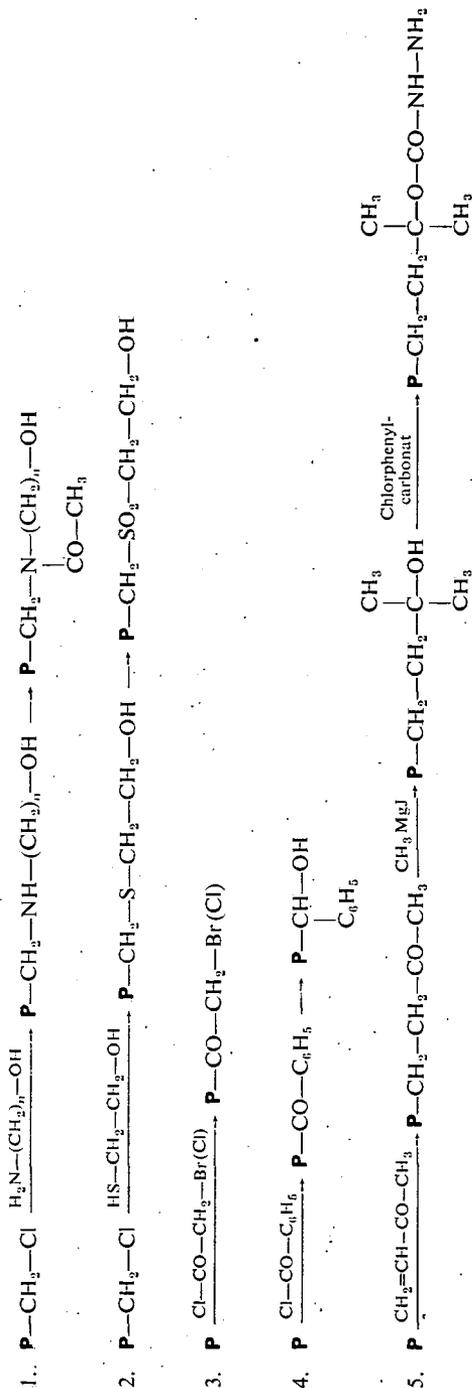
Da beim Kupplungsschritt niemals ein 100%iger Umsatz erreicht wird, sollte die maximal angestrebte Peptidkettenlänge im allgemeinen nicht über 15 Aminosäuren liegen, um den Reinigungsaufwand in vertretbaren Grenzen zu halten. Zum Aufbau höherer Peptide ist eine Strategie zweckmäßig, bei welcher nach MERRIFIELD synthetisierte, geschützte Fragmente konventionell zum Gesamtpeptid vereinigt werden.

Abspaltung der Peptidkette vom Träger

Im Normalfall wird die Peptidkette vom Träger durch Acidolyse mit 20%igem Bromwasserstoff/Eisessig oder besser Bromwasserstoff/Trifluoressigsäure abgelöst. Unter Umständen wird als Reagens auch Trifluoressigsäure in Methylenchlorid angewendet [29], da hier keine Acylierung von Hydroxyaminosäuren stattfinden kann [6]. Unter diesen Bedingungen fallen auch die meisten der gängigen Seitenskettschutzgruppen von der Peptidkette ab (Cbo-, Boc-Gruppen, *tert.*-Butylester und -äther, Benzylester und -äther).

Erhalten bleiben Nitro- und Tosylgruppen am Arginin, Benzyl am Cystein und Histidin. Letztere erfordern eine Nachbehandlung mit Natrium in flüssigem Ammoniak. Die Spaltung mit wasserfreiem HF in Gegenwart von Anisol nach

Schema 4



SAKAKIBARA [30] führt zu einer noch weitergehenden Seitenketten-deblockierung. Hier ist allerdings ein teilweiser Angriff auf die Peptidbindung nicht absolut ausgeschlossen. Die saure Spaltung der Harz-Benzylesterbindung führt also immer auf das freie Peptid zu.

Wegen der begrenzten Reichweite der MERRIFIELD-Synthese ist es aber gerade zweckmäßig, seitenkettengeschützte Fragmente zu gewinnen, die später untereinander zu größeren Verbänden kondensiert werden können. Hierzu gibt es nun bei Wahl passender Seitenkettenschutzgruppen zwei Möglichkeiten:

1. Spaltung der Harz-Benzylesterbindung mit Nucleophilen oder Alkali,

2. Veränderung der Ankergruppe für das Peptid.

Unter den alkalischen Spaltungsmöglichkeiten besitzen die größte Bedeutung [3]: Die Aminolyse mit NH_3 /Methanol, welche zu den Peptid-Amiden führt, die säure- oder basenkatalysierte Umesterung mit Alkoholen, wobei nach unseren Versuchen bezüglich der Endausbeute das effektivste Verfahren die Methanolyse ist, und schließlich die Hydrazinolyse. Diese Methoden führen auf die C-Ester oder -Hydrazide zu, die dann auch über die Azidmethode zur Verlängerung eingesetzt werden können. Allerdings ist dann ein anderes Arsenal an Seitenkettenschutzgruppen erforderlich, welche die genannten Abspaltungsbedingungen vom Träger überstehen. Dies sind beispielsweise Urethanreste an NH_2 -Gruppen, *tert.*-Butylester, O- und S-Äther. Verboten sind dagegen sonstige Alkylester, O- und S-Acyole, S-Disulfide wie S-Äthylmercaptocystein.

Andere Verankerungsmöglichkeiten der Peptidkette am Träger

Andere Möglichkeiten zur Festphasensynthese von seitenkettengeschützten Fragmenten ergeben sich durch Wechsel der Ankergruppe am Harz. Schema 4 zeigt eine Auswahl der wichtigsten heute bekannten Varianten:

1. Durch Zwischenschalten einer längeren Hydroxy-alkylamino-Gruppierung zwischen Matrix und aufzubauendem Peptid erreicht man zwar noch keine Änderung der Abspaltungsbedingungen — die Anesterung der C-terminalen Aminosäure wird mit Carbonyldimidazol oder Dimethylformamid-dineopentylazetal vorgenommen, die Abspaltung erfolgt methanolisch oder hydrazinolytisch — jedoch wird durch die größere Entfernung von der Matrix deren sterischer Hinderungseffekt eliminiert [31].

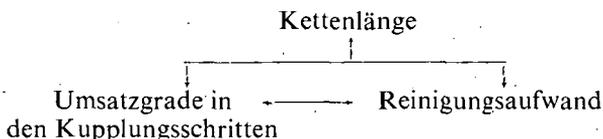
2. Wird als Zwischenglied ein α,ω -Hydroxy-mercaptan eingeschaltet, so ergeben sich bereits zwei neue Möglichkeiten. Einmal erfolgt die Verankerung wieder in größerer Entfernung von der Matrix, zum zweiten besteht die Möglichkeit, nach Oxidation der primär gebildeten Thioäthergruppe zum Sulfon die Peptidkette durch β -Eliminierung von der Matrix zu entfernen [32].

3. Nach einem Vorschlag von WEYGAND [33] wird Polystyrol-Grundharz mit α -Halogen-carbonsäurechloriden zu einem polymeren Halogenacetophenon umgesetzt und die C-terminale Aminosäure mit *tert.* Base bei 20° am reaktiven Halogen zur Umsetzung gebracht. Es entsteht eine Phenacylesterbindung, welche leicht mit Thiophenolat wieder gelöst werden kann.

4. und 5. liefern extrem säurelabile Ankergruppen: Bei 4. wird nach Friedel-Crafts-Acylierung des Grundharzes mit Lithiumaluminiumhydrid zum polymeren Benzhydrylester reduziert [34]. Die Anesterung der C-terminalen Aminosäure erfolgt mit Carbonylimidazol. Bei 5. wird nach einem Vorschlag von MERRIFIELD ein polymeres *tert.*-Alkyl-oxycarbonylhydrazid aufgebaut [35]. Die Verankerung der C-terminalen Aminosäure geschieht an der Hydrazidgruppe mittels DCCI, die Abspaltung der fertigen Peptidkette durch Lösung der Urethanbindung als Hydrazid. In den beiden letzten Beispielen liegt die Säurelabilität der Ankergruppe bereits auf dem Niveau von *tert.*-Butylestern bzw. Boc-Gruppen. Dies erfordert, daß zum N-Schutz bei den einzelnen Kupplungsschritten noch stärker säurelabile Gruppen vom Typ der Bpoc-Gruppe eingesetzt werden, um eine hinreichend hohe Acidolyse-Selektivität zur Ankergruppe zu erhalten. Als Seitenkettenschutz können bei dieser Methodik Cbo-Gruppen, Benzylester und -äther, gegebenenfalls auch *tert.*-Butyläther einbezogen werden. Ferner steht hier das Arsenal der alkalisch spaltbaren Reste zur Verfügung.

Reinigung

Aufwand und Erfolg der Reinigung des vom Harz abgespaltenen Peptides hängt unmittelbar von der exakten Durchführung, d.h. analytischer Kontrolle und gegebenenfalls Nachkupplung, eines jeden Syntheseschrittes ab.



Die Ausbeuten in den Kupplungsschritten, die erreichbare Kettenlänge und der Aufwand bei der Endreinigung sind somit 3 wechselseitig voneinander abhängige Größen. Je sorgfältiger jeder Kupplungsschritt durchgeführt wird, umso größere Kettenlängen können mit einem bestimmten Reinigungsaufwand erreicht werden. Kupplungsumsätze schon von 90% in jedem Schritt würden für ein Dekapeptid z. B. die theoretisch erreichbare Gesamtausbeute auf 35% senken und die erreichbare Kettenlänge auf diese Größenordnung beschränken, wenn man die Arbeit bei der Endreinigung in den üblichen Grenzen halten will.

Umgekehrt erfordern hohe Kettenlängen über 20 Aminosäuren hinaus auch bei sorgfältigster Durchführung der Syntheseschritte außergewöhnlich umfangreiche, kombinierte Reinigungsverfahren. Für die Endreinigung stehen zahlreiche Methoden (Molsiebe, wie z. B. Dextran-Gele, Ionenaustausch- und Verteilungschromatographie, Adsorptionschromatographie, Gegenstromverteilung) zur Verfügung. Es soll hierauf nicht näher eingegangen werden.

Schlußbetrachtung

Die Bedeutung des Verfahrens liegt darin, daß es automatisierbar ist und schnelle Synthesen erlaubt, wenn alle geschützten Aminosäuren und reinen Solventien in ausreichender Menge vorrätig sind. Entsprechende Peptidsynthesemaschinen [2, 36] sind heute auf dem Weltmarkt erhältlich. Mit Hilfe einer solchen Maschine konnte MERRIFIELD Ribonuclease A mit 124 Aminosäuren in 3 Wochen synthetisieren [37]. Hier waren aber extrem zeit- und materialaufwendige Reinigungsoperationen erforderlich. Dennoch betrug nach der Reinigung die maximal nachweisbare biologische Aktivität nur 13%. Offenbar ist hier die Grenze der Leistungsfähigkeit der Methodik erreicht oder bereits überschritten worden.

Die Gefahr des Verfahrens liegt darin, daß es nicht mit der Methodik Vertraute zu der Annahme verführen kann, daß nunmehr jede beliebige Sequenz ohne detaillierte Absicherung der einzelnen Schritte maschinell synthetisierbar ist. Auf diese Weise gelangt man leicht zu komplexen Peptidgemischen, die aber die gewünschte Sequenz nur in minimalen Prozentsätzen zu enthalten brauchen.

Aus dem Gesagten geht hervor, daß jede Phase der MERRIFIELD-Synthese ihre besonderen Probleme hat. Deshalb sollte jedes für die MERRIFIELD-Technik konzipierte neue Synthesevorhaben zunächst erst einmal schrittweise unter den spezifischen Bedingungen dieser Methodik analytisch durchtestet und optimiert werden. Steht die detaillierte und optimale Ausführungsweise dann fest, kann für spätere Routinesynthesen dieses gleichen Peptides maschinell gearbeitet werden.

Mit diesen Einschränkungen ist insgesamt aber eine durchaus positive Bilanz zu ziehen. Die größten Fortschritte auf diesem Gebiet werden wohl in Zukunft in der Kombination konventioneller Methoden mit der MERRIFIELD-Technik liegen, d. h. in der Entwicklung von Strategien, bei denen durch Festphasentechnik routinemäßig synthetisierte kleinere, geschützte Fragmente nach konventionellen Methoden vereinigt werden. Die MERRIFIELD-Synthese ist so nicht als Alternative zu den konventionellen Verfahren, sondern als Ergänzung zu diesen anzusehen.

Literatur

- [1] Merrifield, R. B.: *Advances in Enzymology* **32**, 221 (1969), s. dort auch frühere Arbeiten.
- [2] Stewart, J. M., J. D. Young: „Solid phase peptide synthesis“, W. H. Freeman u. Co., San Francisco 1969.
- [3] Losse, G., K. Neubert: *Z. Chem.* **10**, 48 (1970).
- [4] Pepper, K. W., H. M. Paisley, M. A. Young: *J. Chem. Soc.* **1953**, 4097.
- [5] Merrifield, R. B.: *J. Amer. Chem. Soc.* **85**, 2149 (1963).
- [6] Merrifield, R. B.: *Biochemistry (Washington)* **3**, 1385 (1964).
- [7] Bodanszky, M., J. T. Sheehan: *Chem. and Ind.* **1966**, 1597.
- [8] Losse, G., K. Neubert: *Z. Chem.* **8**, 387 (1968).
- [9] Tilak, M. A.: *Tetrahedron Letters* **1968**, 6323.
- [10] Beyerman, H. C., C. A. M. Boers-Boonekamp, H. Maassen van den Brink-Zimmermanova: *Recueil Trav. chim. Pays-Bas* **87**, 257 (1968).
- [11] Rudinger, J.: *Proc. of the 8. European Peptide Symposium, Noordwijk 1966, North Holland Publ. Comp. Amsterdam 1967*, S. 90.
- [12] Merrifield, R. B.: *Endeavour* **24**, 3 (1965).
- [13] Losse, G., K. Neubert: *Tetrahedron Letters* **1970**, 1267.
- [14] Losse, G., Ch. Madlung, P. Lorenz: *Chem. Ber.* **101**, 1257 (1968).
- [15] Schröder, E., K. Lübke: „The Peptides“, Academic Press, New York, London 1966.
- [16] Losse, G., K. Neubert: *Z. Chem.* **8**, 228 (1968).
- [17] Losse, G., D. Zeidler, Th. Grieshaber: *Ann.* **715**, 196 (1968).
- [18] Sieber, P., B. Iselin: *Helv. Chim. Acta* **51**, 622 (1968).
- [19] Esko, K., S. Karlsson, J. Porath: *Acta Chem. Scand.* **22**, 3342 (1968).
- [20] Dorman, L. C.: *Tetrahedron Letters* **1968**, 2319.
- [21] Losse, G., R. Ulbrich: *Z. Chem.* **11**, 1971 (im Druck).
- [22] Losse, G., H. Klengel: *Tetrahedron* **27**, 1423 (1971).
- [23] Markley, L. D., L. C. Dorman: *Tetrahedron Letters* **1970**, 1787.
- [24] Neubert, K., L. Baláspiri, G. Losse: *Monatshefte im Druck*.
- [25] Ressler, C., H. Ratzkin: *J. Org. Chem.* **26**, 3356 (1961).
- [26] Hörnle, S.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **348**, 1355 (1967).
- [27] Weygand, F., R. Obermeier: *Z. Naturforschung* **23b**, 1390 (1968).
- [28] Omenn, G. S., C. B. Anfinsen: *J. Amer. Chem. Soc.* **90**, 6571 (1968).
- [29] Merrifield, R. B.: *Recent Progr. Hormone Res.* **23**, 451 (1967).
- [30] Sakakibara, S., S. Kishida, Y. Kikuchi, R. Sakai, K. Kakiuchi: *Bull. Chem. Soc. Jap.* **41**, 1273 (1968).
- [31] Tilak, M. A., C. S. Hollinden: *Tetrahedron Letters* **1968**, 1297.
- [32] Tesser, G. J., B. W. J. Ellenbroek: *Proc. of the 8. European Peptid Symposium Noordwijk 1966, North Holland Publ. Comp. Amsterdam 1967*, S. 144.
- [33] Weygand, F.: *Proc. of the 9. European Peptide Symposium, Orsay 1968, North Holland Publ. Comp. Amsterdam 1968*, S. 183.
- [34] Southard, G. L., G. S. Brooke, J. M. Pettee: *Tetrahedron Letters* **1969**, 3505.
- [35] Wang, Su-sun, R. B. Merrifield: *J. Amer. Chem. Soc.* **91**, 6488 (1969).
- [36] Merrifield, R. B., J. M. Stewart: *Nature (London)* **267**, 522 (1965); *Chem. Eng. News* **43**, 40 (1965).
- [37] Gutte, B., R. B. Merrifield: *J. Amer. Chem. Soc.* **91**, 501 (1969).

ПРОБЛЕМЫ И ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ СИНТЕЗА ПЕПТИДОВ
В ТВЁРДОЙ ФАЗЕ

Г. Лоссе

В связи с проблемой и направлениями развития синтеза пептидов автор описывает основные методы и принципы, носители и их функциональные группы, разные комбинации защищающих групп, отщепление пептидов с носителя а также значение т. н. блоккеров и аналитического контроля копуляции. Автор даёт обзор своих и литературных результатов в этой области.