

Schnellverfahren zur „Liquid-Phase“-Peptidsynthese: Die Kristallisationsmethode

Von Manfred Mutter und Ernst Bayer^[*]

Zur Peptidsynthese in homogener Lösung sind Polyäthylenglykole als solubilisierende C-terminale Schutzgruppe besonders geeignet^[1-3]. Bisher werden niedermolekulare Reagenzien und Kupplungskomponenten von der am Polyäthylenglykol wachsenden Peptidkette durch Diafiltration getrennt^[1, 2]. Ein Syntheszyklus dauert daher mit Lösungsmittelwechsel etwa einen Tag. Die Synthese ließe sich durch Kristallisation des Polymerpeptids in jeder Zwischenstufe beschleunigen. Polyäthylenglykol unterscheidet sich von anderen bei der „Liquid-Phase“-Methode verwendeten Polymeren, z.B. Polyvinylalkohol, durch besondere Kristallisationsneigung und Ausbildung einer stabilen Helixstruktur^[4-6]. Sollte diese Konformation und Kristallisationstendenz auch bei Polyäthylenglykol mit wachsender Peptidsequenz erhalten bliebe, wäre die Reinigung jeder Zwischenstufe durch Kristallisation gegeben und der Syntheszyklus auf 1-2 Stunden zu verkürzen.

Röntgenographische Untersuchungen zeigen nun, daß aus Methylenchlorid mit Diäthyläther kristallin gefällte freie Polyäthylenglykole (z.B. PEG 15000) und Polyäthylenglykolpeptidester (z.B. mit dem Oktapeptid BOC-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met) die gleichen Reflexe ergeben ($d_1 = 3.81 \text{ \AA}$; $d_2 = 4.643 \text{ \AA}$).

Durch die Kristallisierbarkeit werden Einschlüsse vermieden, wie sie bei gelartigen Ausfällungen entstehen^[7], und eine quantitative Entfernung der im Überschuß eingesetzten geschützten Aminosäuren wird möglich. Abbildung 1

zeigt das prinzipielle Syntheseschema mit dem Zeitbedarf der einzelnen Operationen.

Syntheszyklus: Zur Veresterung (A) der ersten C-terminalen Aminosäure mit Polyäthylenglykol dient Carbonyldiimidazol oder DCCI^[1, 2]. Zur 10-proz. Lösung des Polymerpeptids in CH_2Cl_2 wird das aktivierte Derivat der jeweils nächsten Aminosäure (B) in 1.5- bis 3-fachem Überschuß bei 0°C gegeben unter gleichzeitigem Zutropfen der tertiären Base zur Neutralisation der freien Aminogruppen. Nach ca. 5 min wird der Umsatz durch Entnahme von aliquoten Mengen getestet (C). Nach der Kupplung (maximal 30 min) wird die Lösung eingeeigt (20-proz.) und ihr unter starkem Rühren Äther zugesetzt, bis das Polymerpeptid quantitativ ausgefallen ist (zu 20-30 ml CH_2Cl_2 ca. 100-200 ml Äther). Das Polymerpeptid wird abgesaugt (Glasfritte), zweimal mit Diäthyläther nachgewaschen und getrocknet. An dieser Stelle kann die quantitative Entfernung der Überschüsse einfach durch Dünnschicht-Chromatographie getestet werden (r_f Polymerpeptid = 0). Anschließend wird die Schutzgruppe abgespalten (z.B. Eisessig/1.2 N HCl) und das Polymerpeptid erneut mit Äther ausgefällt, gewaschen und getrocknet.

Mit dieser Methode sind u.a. die schwierige Teilsequenz 14-20 des ACTH H-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-OH sowie das biologisch aktive Peptid „Substanz P“^[8-10] mit PEG vom Molekulargewicht 6000 bzw. 15000 in kurzer Zeit^[**] synthetisiert worden. Dieses Schnellverfahren der „Liquid-Phase“-Synthese bewahrt die bisherigen Vorteile der Methode, doch werden die Operationen soweit vereinfacht, daß die Ankupplung eines Aminosäurerestes in kürzerer Zeit als mit der Festkörpermethode gelingt und ebenfalls eine Automatisierung der Synthese möglich ist.

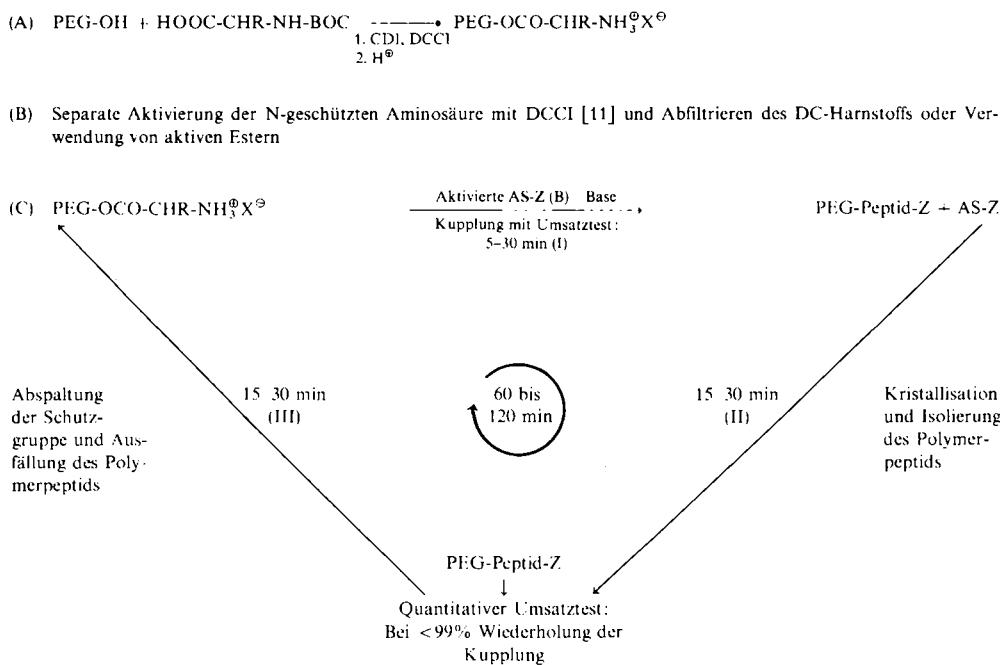


Abb. 1. Syntheszyklus des Kristallisationsverfahrens nach der Liquid-Phase-Methode. Abkürzungen: PEG = Polyäthylenglykol. AS = Aminosäure. CDI = Carbonyldiimidazol, andere Abkürzungen nach [12].

[*] Dr. M. Mutter und Prof. Dr. E. Bayer
Lehrstuhl für Organische Chemie der Universität
74 Tübingen, Auf der Morgenstelle

[**] Zeitbedarf für beide Synthesen: 7 bzw. 10 Tage einschließlich Isolierung und Reinigung.

Für das Kristallisierungsverfahren eignen sich Polyäthylen-glykole im Molekulargewichtsbereich von 20000-2000, wodurch Kapazitäten von 0.1 mmol/g bis 1 mmol/g Polymer erzielt werden können.

Eingegangen am 14. Februar 1973
Auf Wunsch der Autoren erst jetzt veröffentlicht [Z. 804]

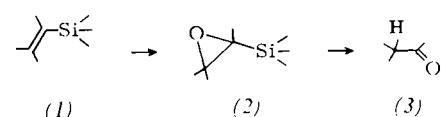
- [1] M. Mutter, H. Hagenmaier u. E. Bayer, Angew. Chem. 83, 883 (1971); Angew. Chem. internat. Edit. 10, 811 (1971).
- [2] E. Bayer u. M. Mutter, Nature 237, 512 (1972).
- [3] Nachr. Chem. Techn. 20, 495 (1972).
- [4] Katalog Polyglykole, Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt.
- [5] H. Tadokoro, Y. Chatani, T. Yoshihara, S. Tahara u. S. Murahashi, Makromol. Chem. 73, 109 (1964).
- [6] R. Springer u. R. Lang, Deut. Apoth.-Ztg. 108, 1605 (1968).
- [7] M. M. Shemyakin, Y. A. Ovchinnikov, A. A. Kirushkin u. I. V. Kozhernikova, Tetrahedron Lett. 1965, 2323.
- [8] K. Vogler, W. Haefely, A. Hürlmann, R. O. Studer, W. Lergier, R. Strässle u. K. H. Bemeis, Ann. N. Y. Acad. Sci. 104, 378 (1963).
- [9] R. O. Studer et al., noch unveröffentlicht.
- [10] E. Bayer u. M. Mutter, Chem. Ber., im Druck.
- [11] H. Hagenmaier u. H. Frank, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 353, 1973 (1972).
- [12] IUPAC Recommendations, Eur. J. Biochem. 1, 375 (1965).

Bequeme Darstellung von Vinylsilanen und deren Verwendung zur Ketonsynthese^[**]

Von Bengt-Thomas Gröbel und Dieter Seebach^[†]

Vinylsilane (1) lassen sich oxidativ über Epoxide (2) in Carbonyl-Derivate (3) überführen^[11].

Damit sind alle Verfahren der C-C-Verknüpfung, bei denen Vinylsilane entstehen, potentielle Methoden zum Aufbau von Carbonylverbindungen.



Wir beschreiben hier neue α -Silyllithium-Reagentien (8) und (9), mit denen durch einfache C-C-Verknüpfung oder durch Peterson-Olefinition Vinylsilane (10)-(12) mit verschiedenen Substitutionsmustern zugänglich sind.

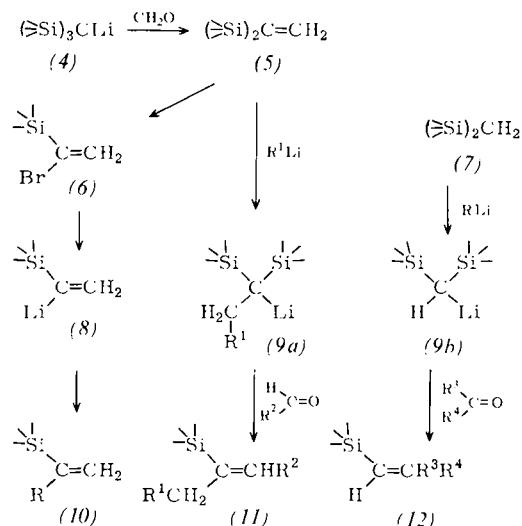


Tabelle 1. Substitutionsmuster, Ausbeuten und einige charakteristische NMR-Daten der Produkte (10), (11) und (12). Bei allen Reaktionen gab man das Elektrophil bei -80 °C zur THF-Lösung des Lithium-Reagens und ließ innerhalb 14 h aufwärmen. Alle Verbindungen zeigen korrekte Elementaranalysen.

Reaktion	Elektrophil	Ausb. [%] [a]	NMR [δ] Silyl	olefin. H	
(8) \rightarrow (10)	R				
n-Pentyljodid	n-C ₅ H ₁₁	83	0.05	5.28, 5.50	
Benzaldehyd	C ₆ H ₅ CH(OH)	64	0.08	5.40, 5.68	
Cyclohexanon	(CH ₂) ₅ C(OH)	60	0.12	5.29, 5.56	
Benzophenon	(C ₆ H ₅) ₂ C(OH)	62	0	5.03, 5.53	
(9a) \rightarrow (11)	R ¹	R ²			
Formaldehyd	n-C ₄ H ₉	H	73	0.05	5.28, 5.50
Benzaldehyd	n-C ₄ H ₉	C ₆ H ₅	62	-0.08, 0.15	6.78, 7.2 [b]
Formaldehyd	s-C ₄ H ₉	H	64	0.08	5.30, 5.44
Formaldehyd	t-C ₄ H ₉	H	71	0.09	5.46, 5.57
Benzaldehyd	t-C ₄ H ₉	C ₆ H ₅	64	-0.08, 0.15	6.92, 7.18 [b]
Zimtaldehyd	t-C ₄ H ₉	CH=CHC ₆ H ₅	60	0.13, 0.25	6.24, 7.25 [b]
(9b) \rightarrow (12)	R ³	R ⁴			
Benzaldehyd	C ₆ H ₅	H	70 [c]	0.03, 0.17	5.79, 6.37, 6.85, 7.27 [b]
Zimtaldehyd	CH=CHC ₆ H ₅	H	35	0.15, 0.25	5.6, 6.0, 6.4, 7.0 [b]
Benzophenon	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	65	-0.12	6.19

[a] Bezogen auf destillierte Produkte.

[b] Wie aus den NMR-Spektren ersichtlich, entstehen hier E-Z-isomere Olefine, Verhältnis 1:1.0-1:1.4.

[c] $\eta_2^{20} = 1.5230$ [L. H. Sommer et al., J. Amer. Chem. Soc. 76, 1613 (1954): 1.5270].

[*] Dipl.-Chem. B.-Th. Gröbel und Prof. Dr. D. Seebach
Fachbereich 14 Chemie, Institut für Organische Chemie der Universität
63 Gießen, Ludwigstraße 21

[**] Die Arbeit wurde vom Fonds der chemischen Industrie unterstützt;
B.-Th. G. dankt der Studienstiftung des Deutschen Volkes für ein Stipendium.

Zur Herstellung von (8)^[12] gehen wir von Tris(trimethylsilyl)methylolithium (4)^[13] aus, das zunächst in einer Peterson-Reaktion^[4] mit 70 % Ausbeute in das Olefin (5)^[15] überführt wird. (5) lässt sich in (6) umwandeln^[6], das einem Brom-Lithium-Austausch mit tert.-Butyllithium^[7] unterworfen wird. Die sub-