

Ionenspray-Massenspektrometrie von Lipopeptid-Vaccinen^{**}

Von Jörg W. Metzger, Werner Beck und Günther Jung*

Professor Michael Hanack zum 60. Geburtstag gewidmet

Ionenspray (IS) ist eine sanfte Ionisierungsmethode, bei der eine Lösung des Analyten durch eine Kapillare, an deren Ende eine Spannung von mehreren Kilovolt anliegt, hindurch mit Druckluft versprüht wird^[1]. Das hohe elektrische Feld und das Versprühen bewirkt die Bildung hochgeladener Tröpfchen, aus denen bereits in Lösung vorhandene Ionen direkt in die Gasphase überführt werden. Für den Bildungsmechanismus von Ionen aus geladenen Tröpfchen heraus diskutiert man zwei Modelle: Ionenverdampfung^[2] und Rayleigh-Zerfall^[3]. Das Versprühen mit Druckluft unterstützt die Tröpfchenbildung, sie bewirkt einen stabileren Ionenstrom und ermöglicht damit höhere Flußgeschwindigkeiten^[1] als die eng mit IS verwandte Elektrospray-Technik^[4]. IS-Ionisierung findet bei Atmosphärendruck statt; nach ihrem Austritt aus der Flüssigkeit werden die Ionen durch eine kleine Öffnung (orifice) in das Massenspektrometer gelenkt. Da die Probe nicht erhitzt wird, ist die IS-Massenspektrometrie (IS-MS) eine hochempfindliche Methode zur Molekülmassenbestimmung von thermolabilen Molekülen wie Peptiden und Proteinen^[5].

Bei der Analyse eines Polypeptids oder eines Proteins wird die Probe gelöst, und die Lösung der IS-Quelle mit Flußgeschwindigkeiten bis zu $200 \mu\text{L min}^{-1}$ kontinuierlich zugeführt; die Empfindlichkeit ist jedoch umso höher, je geringer die Flußgeschwindigkeit ist. Die IS-Massenspektren von Peptiden und Proteinen bestehen aus einer Reihe von Peaks, die einfach und mehrfach geladenen, protonierten Molekülionen $[M + nH]^n^+$ entsprechen. Für die meisten Peptide und Proteine stehen diese Mehrfachladungen in Beziehung zur Anzahl ihrer basischen Aminosäurereste Lysin, Arginin und Histidin und der N-terminalen α -Aminogruppe^[5, 6]. Jeder Peak im Spektrum entspricht einer unabhängigen Massenbestimmung des Analyten, wobei sich aus jedem Paar benachbarter Peaks die Molekülmasse berechnen lässt^[7]. Die Massenzuordnung kann deshalb mit größerer Genauigkeit und Zuverlässigkeit vorgenommen werden als mit einfach geladenen Ionen. Der effektive Massenbereich eines jeden Massenspektrometers wird um einen Faktor vergrößert, der gleich ist der Zahl der Ladungen, die das Ion trägt. Dies eröffnet die faszinierende Möglichkeit, Molekülmassen von Biomolekülen im kD-Bereich mit Quadrupol-Massenspektometern zu bestimmen.

Die wachsende Bedeutung von synthetischen Lipopeptid-Vaccinen für das immunologische Screening^[8] und das Fehlen einer einfachen und zuverlässigen Methode zur Charakterisierung dieser Verbindungen waren der Anlaß für die vorliegende Studie. Die untersuchten synthetischen Vaccine bestehen aus der dreikettigen Lipoaminoäure N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)propyl]-(*R*)-cystein (Tripalmitoyl-S-glycerylcystein, Pam₃Cys-OH; Molekülmasse 910.5 u)^[9] und ausgewählten Partialsequenzen (B- und T-Zellepitope mit 15–25 Aminosäuren) viraler Proteine^[8]. Wir fanden, daß IS-MS eine äußerst hilfreiche Analysentechnik ist, um diese Verbindungen und ihre Edukte zu charakterisieren. Da übliche wäßrige Lösungsmittelgemische nicht verwendet werden können, um diese hochlipophilen, wasserunlöslichen Verbindungen zu analysieren, setzen wir für die IS-MS-Un-

tersuchungen starker lipophile, organische Lösungsmittelgemische ein^[10]. Kleinere Lipopeptide dieser Art, z.B. das amphiphile Lipohexapeptid Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄^[11] oder verwandte Lipopeptide^[12] konnten von uns mit Felddesorption- und Plasmadesorption-Massenspektrometrie analysiert werden. Auch die Matrix-unterstützte Laserdesorption^[13] erwies sich als leistungsfähige Methode zur Massenbestimmung von größeren lipophilen Verbindungen.

Lipopeptid-Vaccine^[8] werden gewöhnlich durch Festphasen-Peptidsynthese (Merrifield-Synthese) aufgebaut. Die Lipoaminoäure Pam₃Cys-OH wird mit der antigenen Determinante entweder N-terminal im letzten Kupplungsschritt^[8] oder C-terminal, beginnend mit dem harzgebundenen Baustein Pam₃Cys-Lys(Fmoc)-OH (Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl)^[14], verbunden. Eine dritte Möglichkeit besteht darin, die Lipoaminoäure O,O'-Dipalmitoyl-S-glycerylcystein mit einem N_α-Fmoc-geschützten Derivat^[15] in die Peptidkette einzubauen. Auf diese Weise wurde die Partialsequenz 135–154 des Oberflächenproteins VPI (O₁K) des Maul-und-Klauen-Seuche-Virus^[8] an einem säurelabilen Harz mit Fmoc/tBu-Strategie aufgebaut. Dieses Epitop enthält drei Argininreste, die mit Fmoc-Arg(Mtr)-OH (Mtr = 4-Methoxy-2,3,5-trimethylbenzolsulfonyl) eingeführt wurden. Insbesondere in längeren Sequenzen kann die quantitative Entfernung von Mtr mit Trifluoressigsäure selbst bei erhöhten Temperaturen und verlängerten Reaktionszeiten schwierig sein. Zur Kontrolle der Synthese dieses Epitops wurde ein kleiner Teil des harzgebundenen Peptids (der antigenen Determinante) noch vor der Ankupplung der Lipoaminoäure Pam₃Cys-OH vom Harz abgespalten. Das erhaltene Rohpeptid VP1 (135–154) wurde mit IS-MS untersucht. Das Massenspektrum zeigt die doppelt-, dreifach-

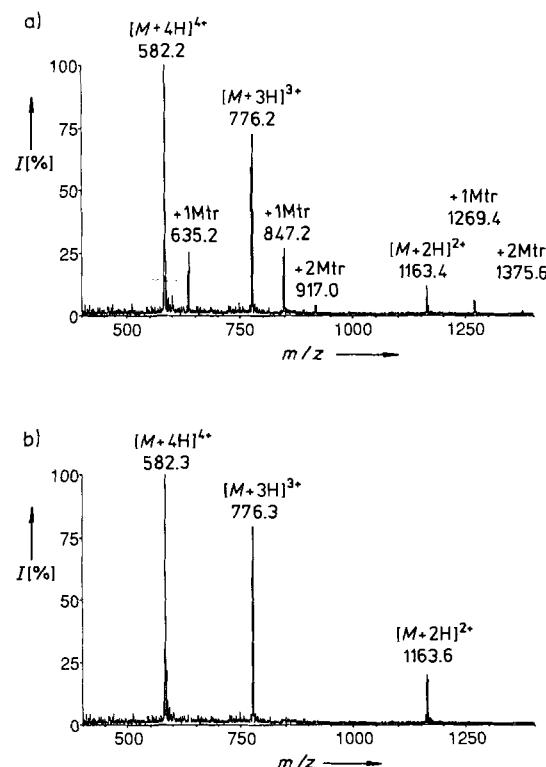


Abb. 1. a) IS-Massenspektrum einer Peptidmischung, die nach Festphasen-Peptidsynthese des Icosapeptids VP1 (135–154) erhalten wurde. Drei Serien zweifach, dreifach und vierfach geladener Ionen zeigen die Anwesenheit des freien Peptids (ber. 2357.7 u) und zweier partiell geschützter Peptide (ber. 2537.9 und 2750.2 u) an. b) IS-Massenspektrum des Icosapeptids VP1 (135–154) (2325.7 u), erhalten nach optimierten Kupplungs- und Abspaltungsbedingungen. Die angegebenen Massenwerte über den (nicht-zentrierten) Signalen bezeichnen die beobachteten Signalmaxima.

[*] Prof. Dr. G. Jung, Dr. J. W. Metzger, Dipl.-Chem. W. Beck

Institut für Organische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 18, W-7400 Tübingen

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 323) gefördert.

und vierfach-geladenen Quasi-Molekülionen von drei Peptiden: dem erwarteten freien Peptid VP1 (135–154) (Molekülmasse 2325.7 u) und zwei partiell geschützten Peptiden mit einer und zwei Mtr-Schutzgruppen auf den Argininseitenketten (Molekülmasse 2537.9 bzw. 2750.2 u; Abb. 1a). Optimierte Kupplungs- und Deblockierungsreaktionen ergaben reines VP1 (135–154) (Abb. 1b).

Die N-terminale Kupplung der Lipoaminoäure Pam₃Cys-OH an das harzgebundene Peptid und die darauf folgende Abspaltung mit Trifluoressigsäure ergab ein Konjugat^[18], das in Wasser oder Wasser/Methanol-Mischungen nur wenig löslich war. Um solche Lipopeptide untersuchen zu können, testeten wir verschiedene Mischungen organischer Lösungsmittel, unter anderem Chloroform, Dichlormethan, Dimethylformamid, Methanol, Acetonitril, 2-Propanol und *tert*-Butylalkohol. Optimale Ergebnisse wurden erhalten, wenn der synthetische Impfstoff in Chloroform

(zwei Volumenteile) vorgelöst wurde und dann Methanol (drei Volumenteile) und 10proz. wäßrige Ameisensäure oder 1proz. Ammoniumacetat (ein Volumenteil) zugegeben wurde. Mischungen aus Chloroform und Methanol, die keine Säure oder Salz enthielten und gute Ionenausbeuten bei der „Atmospheric-pressure-spray“-Ionisierungsmethode^[16] ergeben, führten mit der IS-Technik zu unbefriedigenden Ergebnissen. Die Lösung wurde der IS-Quelle mit einer Flußgeschwindigkeit von $5 \mu\text{L min}^{-1}$ zugeführt. Die IS-Massenspektren von Pam₃Cys-Ser-Ser-[VP1 (135–154)] (ber. 3392 u; Abb. 2a) und Pam₃Cys-Lys([VP1 (135–154)])-Ala (ber. 3417 u; Abb. 2b), ein Konjugat, bei dem die Lipoaminoäure mit dem C-Terminus der Partialsequenz verbunden wurde, zeigten die doppelt, dreifach und vierfach geladenen Quasi-Molekülionen, aus denen die Molekülmassen mit einer Genauigkeit von ± 1 u bestimmt wurden. Durch Optimierung der Abspaltungsbedingungen erhielten wir das reine und vollständig deblockierte Lipopeptid, wie das IS-Massenspektrum beweist. Das Spektrum zeigt die Quasi-Molekülsignale mit hoher Intensität, Signale von Fragment-Ionen über 400 u treten nicht auf (Abb. 1 und 2). Signale von Fragment-Ionen können jedoch gewöhnlich zusammen mit Lösungsmittelsignalen unterhalb 400 u beobachtet werden (nicht abgebildet). Das Ausmaß der Fragmentierung während der IS-Ionisierung wird durch das Orifice-Potential beeinflußt und ist auch abhängig von der Struktur der Lipopeptide; im IS-Massenspektrum eines Lipopeptids beispielsweise, das dem synthetischen N-Terminus der Cytochromuntereinheit eines bakteriellen Photoreaktionszentrums entspricht, beobachteten wir zwei Signale hoher Intensität von Fragment-Ionen, die auf eine bei der Ionisierung auftretende Spaltung zwischen Prolinresten in der Peptidkette zurückzuführen sind^[17].

IS-MS erwies sich somit als zweckmäßige Methode zur Charakterisierung von Lipopeptid-Vaccinen: sie ist schnell und empfindlich, die Probenbereitung ist sehr einfach. Molekülmassenbestimmungen bis 6000 u werden routinemäßig mit Genauigkeiten besser als ± 1 u erreicht. Die Verwendung von Chloroform-haltigen Lösungsmittelmischungen in der Ionspray-Massenspektrometrie ermöglicht nicht nur die Untersuchung von Lipopeptiden, sondern auch anderer lipophiler Substanzklassen, z.B. modifizierter Cyclodextrine^[18].

Eingegangen am 17. Juli 1991 [Z 4799]

CAS-Registry-Nummern:

Pam₃Cys-Ser-Ser-[VP(135–154)], 128820-63-3; Pam₃Cys-Lys-[VP(135–154)], 138128-52-6.

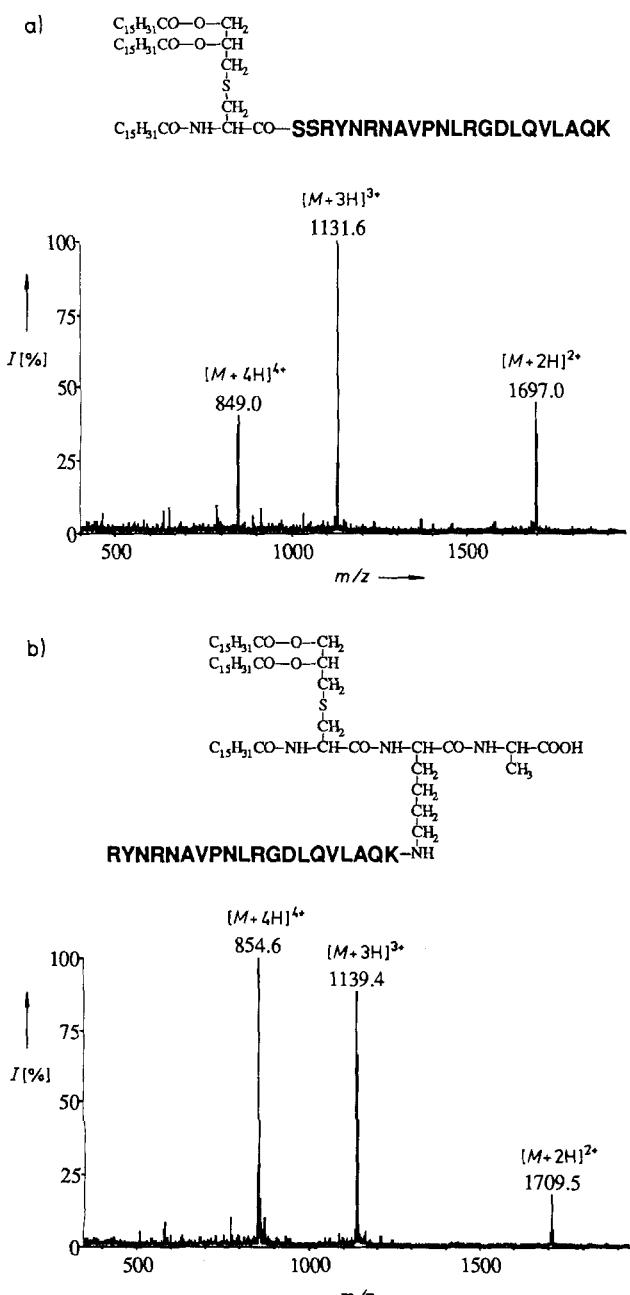


Abb. 2. Strukturformeln und IS-Massenspektren der Lipopeptid-Vaccine
a) Pam₃Cys-Ser-Ser-[VP1 (135–154)] mit N-terminal gebundenem Pam₃Cys (ber. 3392.3 u) und b) Pam₃Cys-Lys([VP1 (135–154)])-Ala mit C-terminal gebundenem Pam₃Cys (ber. 3417.4 u).

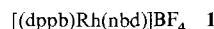
- [1] A. P. Bruins, T. R. Covey, J. D. Henion, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2642.
- [2] J. V. Iribarne, B. A. Thomson, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2287.
- [3] G. Schmelzeisen-Redeker, L. Bütfering, F. W. Röllgen, *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Processes* **1989**, *90*, 139; F. W. Röllgen, E. Brammer-Wegner, L. Bütfering, *J. Phys.* **1987**, *48*, C6–253.
- [4] a) M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice, *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2240; b) J. Gieniec, L. L. Mack, K. Nakamae, C. Gupta, V. Kumar, M. Dole, *Biomed. Mass. Spectrom.* **1984**, *11*, 259; c) C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita, J. B. Fenn, *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 675.
- [5] T. R. Covey, R. F. Bonner, B. I. Shushan, J. Henion, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **1988**, *2*, 249.
- [6] R. D. Smith, J. A. Loo, C. G. Edmonds, C. J. Baringa, H. R. Udseth, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 882.
- [7] M. Mann, C. K. Meng, J. B. Fenn, *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 1702.
- [8] K.-H. Wiesmüller, G. Jung, G. Hess, *Vaccine* **1989**, *7*, 29; M. Krug, G. Folkers, B. Haas, G. Hess, K.-H. Wiesmüller, S. Freund, G. Jung, *Biopolymers* **1989**, *28*, 499; K. Deres, H. Schild, K.-H. Wiesmüller, G. Jung, H. G. Rammensee, *Nature* **1989**, *342*, 561.
- [9] K.-H. Wiesmüller, W. Bessler, G. Jung, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1983**, *364*, 593.
- [10] IS-Massenspektren wurden mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer API III (Sciex, Thornhill, Ontario, Canada) ausgestattet mit einer IonSpray™-Quelle aufgenommen. Die Lipopeptide (ca. 200 µg) wurden in

- Chloroform/Methanol/10proz. wäßriger Ameisensäure oder 1proz. Ammoniumacetat gelöst, (2:3:1, v:v:v; 1 mL), freie Peptide (ca. 200 µg) in Methanol/1proz. Ameisensäure (1:1 v:v; 1 mL). Die Lösungen wurden der IS-Quelle mit einer medizinischen Infusionspumpe (Modell 22, Harvard Apparatus, USA) bei Flussgeschwindigkeiten zwischen 2–10 µL min⁻¹ zugeführt.
- [11] J. Metzger, K.-H. Wiesmüller, R. Schade, W. G. Bessler, G. Jung, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *37*, 46.
 [12] J. Metzger, G. Jung, *Angew. Chem.* **1987**, *99*, 343; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, *26*, 336.
 [13] F. Hillenkamp, *Proc. 38th ASMS Conf. Mass Spectrom. Allied Topics (Tucson, AZ, 1990)*, S. 8.
 [14] W. Beck, J. W. Metzger, K.-H. Wiesmüller, A. Surovoy, B. Haas, G. Jung in *Innovation & Perspectives in Solid Phase Synthesis & Related Technologies (Proc. 2nd Int. Symp. Canterbury, England, 1991)* (Hrsg.: R. Epton, SPC, Birmingham, 1992, im Druck).
 [15] J. Metzger, K.-H. Wiesmüller, G. Jung, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, im Druck.
 [16] M. Sakairi, H. Kambara, *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 1159.
 [17] A. G. Beck-Sickinger, J. W. Metzger in *Peptides: Chemistry and Biology (Proc. 12th Am. Peptide Symp., Boston, MA, 1991)* (Hrsg.: J. A. Smith, J. E. Rivier), Escom, Leiden, 1992, im Druck.
 [18] J. W. Metzger, M. Jung, D. Schmalzing, E. Bayer, V. Schurig, *Carbohydr. Res.* **1991**, *222*, 23.

Durch eine Hydroxygruppe gesteuerte Hydrierung von Vinylstannanen und -silanen: ein hochdiastereoselektiver Weg zu β-Stannyl- und β-Silylalkoholen

Von Mark Lautens*, ChunHao Zhang und Cathleen M. Crudden

Für den diastereo- und enantioselektiven Aufbau komplexer Moleküle sind Reaktionen, bei denen eine im Molekül vorhandene funktionelle Gruppe ein Reagens an eine bestimmte Stelle dirigiert, ein wichtiges Prinzip. Die in Gegenwart eines löslichen Metallkatalysators von einem Allyl- oder Homoallylkohol gesteuerte Hydrierung von Olefinen ist eine wirksame Methode, um die relative Stereochemie der Alkyl- und Hydroxygruppen zu kontrollieren^[1, 2]. Alle bislang veröffentlichten Untersuchungen waren auf kohlenstoffsubstituierte Olefine, unter anderem mit Alkyl-, Aryl- und Acylsubstituenten, beschränkt. Wir berichten von einer hochdiastereoselektiven Hydrierung von Olefinen mit Silicium- und Zinnsubstituenten, die durch den ionischen Rhodiumkomplex **1** katalysiert wird^[3]. Bisher wurden solche Olefine als unreaktive Verbindungen bezüglich den typischen Bedingungen für Hydrierungen angesehen^[4].



Die für diese Untersuchungen benötigten Vinylstannane wurden nach unserer Hydrometallierungs-Stannylierungssequenz hergestellt^[5], die Vinylsilane nach literaturbekannten Verfahren^[6]. Zuerst wurde die Hydrierung der Vinylstannane **2** und **4** (Tabelle 1) untersucht, um, ohne die zusätzliche Schwierigkeit der Diastereoselektivitätsbestimmung, die Reaktionsbedingungen festzulegen. Die Umset-

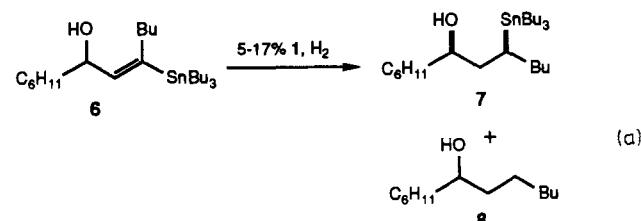
zung von **2** oder **4** mit 5 Mol-% des Katalysators **1** in Dichlormethan bei 103×10^5 Pa Wasserstoffdruck und einer Reaktionszeit von 24–36 h lieferte die gesättigten Produkte **3** bzw. **5** in 67% bzw. 59% Ausbeute. Die Hydrierung der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung verläuft also bedeutend leichter als die Destannylierung über eine Insertion in eine Kohlenstoff-Zinn-Bindung^[7].

Tabelle 1. Gesteuerte Hydrierung von γ -Hydroxyvinylstannanen. Katalysator **1** wird mit dem Substrat in CH_2Cl_2 innerhalb von 24–48 h umgesetzt.

Substrat	Reaktionsbedingungen	Produkt	Ausbeute [%] [a] (syn-anti-Verhältnis)
<chem>C6H11C=C(O)SnBu3</chem> 2	[b]	<chem>C6H11C(O)C(CSnBu3)2</chem> 3	67 [c]
<chem>CC(CSnBu3)=O</chem> 4	[d]	<chem>CC(CSnBu3)(O)CMe</chem> 5	59
<chem>C6H11C=C(O)SnBu3</chem> 6 , R' = nBu	[d]	<chem>C6H11C(O)C(CSnBu3)R'</chem> 7 , R' = nBu	70 (> 100:1) 85 (> 100:1)
10 , R' = iPr	[b]	11 , R' = iPr	83 (> 200:1)
12 , R' = tBu	[d]	13 , R' = tBu	70
<chem>CC(CSnBu3)=O</chem> 14	[b]	<chem>CC(CSnBu3)(O)CMe</chem> 15	95
<chem>CC(CBu)=O</chem> 16	[e]	<chem>CC(CBu)(O)C(CSnBu3)2</chem> 17	51
<chem>C6H11C=C(O)SnBu3</chem> 18	[f]	<chem>C6H11C(O)C(CBu)2</chem> 19	

[a] Ausbeute bezieht sich auf das reine Produkt nach Flash-Chromatographie.
 [b] 5 Mol-% **1** bei 103×10^5 Pa. [c] 17% der Ausgangsverbindung wird zurückgewonnen. [d] 17 Mol-% **1** bei 96×10^5 Pa. [e] 20 Mol-% **1** bei 103×10^5 Pa. [f] 5–20 Mol-% **1** bei 103×10^5 Pa.

Die diastereofaciale Selektivität der Hydrierung wurde am Vinylstannan **6** untersucht. Wurden 17 Mol-% des Katalysators **1** bei einem Druck von 96×10^5 Pa und einer Reaktionszeit von 36 h eingesetzt, konnten sowohl das Alkylstannan **7** in 70% Ausbeute als auch das Nebenprodukt **8** isoliert werden, bei dem Hydrogenolyse des Vinylstannans und Hydrierung des Olefins eingetreten waren [ca. 13%, Gl. (a)]. Durch Verringerung der Katalysatormenge auf 5 Mol-% und Erhöhen des Drucks auf 103×10^5 Pa verbesserte sich



[*] Prof. M. Lautens, Dr. C. H. Zhang, C. M. Crudden
Department of Chemistry
University of Toronto
Toronto, Ontario M5S 1A1 (Kanada)

[**] Diese Arbeit wurde von der A. P. Sloan Foundation, dem Natural Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, dem Merck Frosst Centre for Therapeutic Research, Bio-Méga Inc. und der University of Toronto gefördert.