

PHYSALAEVIN-ANALOGA-SYNTHESEN AM FESTEN TRÄGER

W. VOELTER, K. ZECH und G. JUNG

Chemisches Institut der Universität Tübingen, 74 Tübingen, Wilhelmstrasse 33

und

K.-F. SEWING

Pharmakologisches Institut der Universität, 74 Tübingen, Autder Morgenstelle

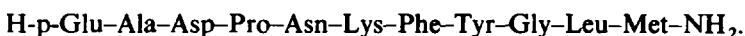
(Received in Germany 29 May 1972; Received in the UK for publication 22 June 1972)

Zusammenfassung— Die Festphasen-Synthesen von drei Peptidamiden (H-Pro-Asn-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH₂ **1b**, H-Asn-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH₂ **2b**, H-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH₂ **3b** mit den natürlichen Teilsequenzen von Physalaemin werden beschrieben. Die Synthesen werden mit Methioninharz begonnen. Stufenweise werden t-Butyloxycarbonyl(t-BOC)-Aminosäuren an die Peptidharze gekuppelt. Die gewünschten Verbindungen werden mit DMF/NH₃ als Amide vom Harz getrennt. **2b** und **3b** zeigten dieselbe biologische Aktivität wie auf klassische Weise hergestellte Peptide.

Abstract— The solid phase synthesis of 3 peptide amides (H-Pro-Asn-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH₂ **1b**, H-Asn-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH₂ **2b**, H-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH₂ **3b** with the natural sequences of physalaemin is described. Starting with methionine resin the t-butyloxycarbonyl (t-BOC) amino acids are coupled stepwise to the peptides bound to the resin. The desired compounds were separated by DMF/NH₃ as amides from the resin, **2b** and **3b** have the same biological activity as peptides synthesized by classical methods.

DIE Festphasensynthese nach Merrifield¹ kann nur unter Vorbehalt²⁻⁴ zur Herstellung längerer Peptidketten eingesetzt werden. Als vernünftiges Konzept bietet sich die Synthese kurzer Teilstücke nach Merrifield und deren Kupplung nach klassischen Methoden zu längerkettigen Peptiden an. Auf Grund unzureichender Erfahrung ist es heute noch schwierig, Grenzen und Möglichkeiten dieser Synthesemethode für jedes beliebige Peptid im voraus abzuschätzen. Zur Reinheitsprüfung der nach der Festphasentechnik synthetisierten Oligopeptide sind die üblichen physikalisch-chemischen Untersuchungsmethoden meist ungenügend. Andererseits kann die Synthese bei vielen biologisch aktiven Peptiden durch biologische Tests überprüft werden; dies trifft für die hier beschriebenen Analoga des Physalaemins zu.

Physalaemin wurde erstmals von Erspamer *et al.*⁵ aus der Haut der amerikanischen Amphibie *Physalaemus fuscumaculatus* isoliert. Von derselben Arbeitsgruppe stammt der erste Strukturvorschlag. Physalaemin besitzt folgende Aminosäuresequenz:

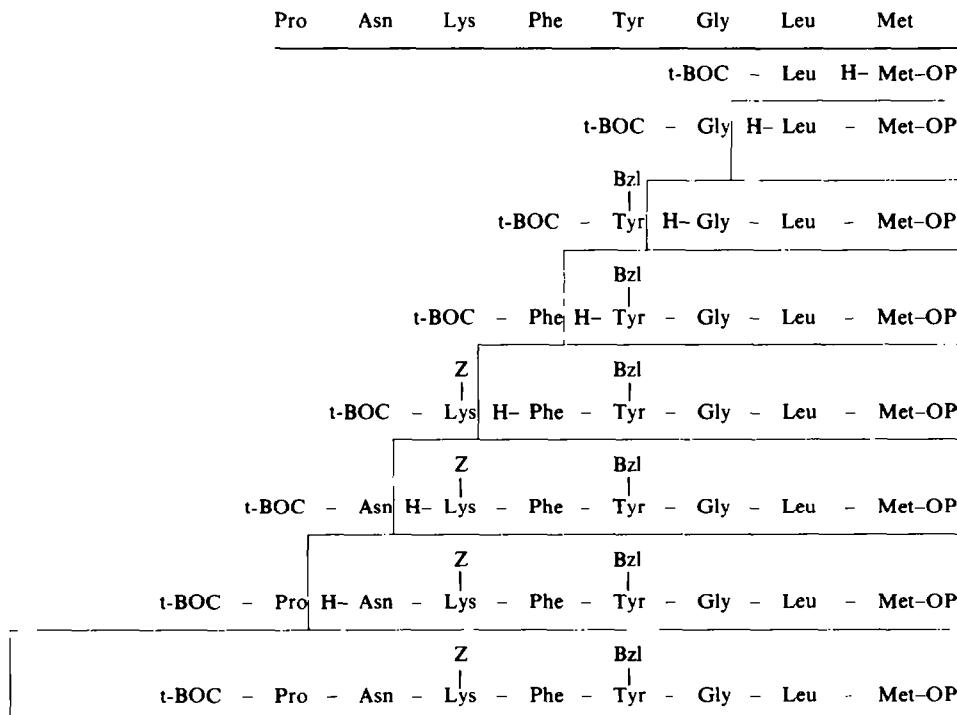


Totalsynthesen von Physalaemin nach klassischen Methoden wurden von Bernardi *et al.*⁶ und Chillemi⁷ beschrieben.

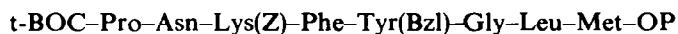
Die hervorstechendsten Eigenschaften von Physalaemin sind seine gefäßerweiternde Wirkung und seine Erregung der extravascularen glatten Muskulatur.

Die Arbeit beschreibt die Festphasensynthese des C-terminalen Hexa-, Hepta- und Octapeptidamids von Physalaemin.

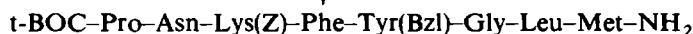
Die erste Stufe zur Synthese der hier beschriebenen Peptide ist die Verknüpfung von BOC-Methionin mit chlormethyliertem Copolymerem aus Styrol und Divinylbenzol. Wie in einer vorangehenden Mitteilung beschrieben,⁸ verläuft diese Reaktion im Gegensatz zu Berichten in der Literatur⁹ mit zufriedenstellenden Ausbeuten. Nach Waschen des t-BOC-Methioninharzes mit Äthanol, Wasser, Methanol und Methylenchlorid wird die Beladung mit Hilfe des Aminosäureanalysators zu 0,22 m Mol/g bestimmt. Die t-BOC-Gruppe wird wie bei den später erwähnten Peptidharzen innerhalb von 60 Minuten mit Trifluoressigsäure/Methylenchlorid (1:1) vollständig abgespalten. Nach verschiedenen Waschungen, Neutralisation mit Triäthylamin/Methylenchlorid (2:1) und erneutem Waschen des Harzes wird eine zweifache Kupplung in Methylenchlorid mit einem fünfzigprozentigen Überschuss an t-BOC-Aminosäure und Dicyclohexylcarbodiimid durchgeführt. Für jede neu zu kuppelnde Aminosäure wird der Vorgang wiederholt. Die Peptide 1–3 werden nach folgendem Schema synthetisiert:



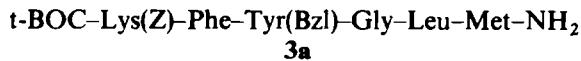
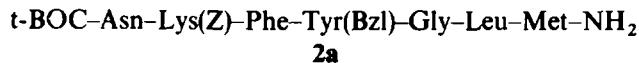
Das Oktapeptidamid **1a** wird mit flüssigem Ammoniak/Dimethylformamid von dem Trägerharz abgespalten:¹⁰



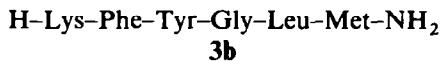
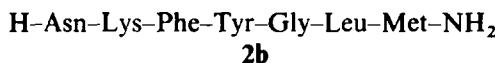
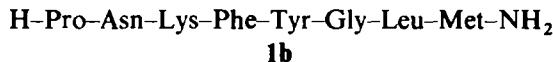
↓
Ammoniak/Dimethylformamid



Analog werden die Peptidamide **2a** und **3a** hergestellt:



Nach Abdampfen des Ammoniaks werden die Peptide **1a** bis **3a** aus Dimethylformamid/Äthanol (1:1) mit Äther/Petroläther (5:1) gefällt. Nach Abspalten der restlichen Schutzgruppen mit Bromwasserstoff/Trifluoressigsäure¹¹ erhält man die Peptidamide **1b** bis **3b** als Rohprodukte.



Zur Reinigung werden die Rohprodukte **1b** bis **3b** auf eine Sephadex G 15 Säule gebracht und mit Wasser eluiert. Die Elutionsdiagramme der Peptidamide **1b** bis **3b** zeigen die Abb. 1-3.

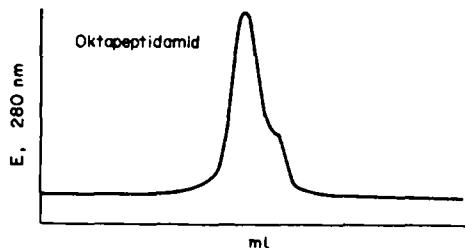


ABB 1. Elutionsdiagramm vom Festphasensyntheseprodukt des Peptids **1b** (Sephadex G 15, Wasser). Gemessen wird die Extinktion bei 280 nm.

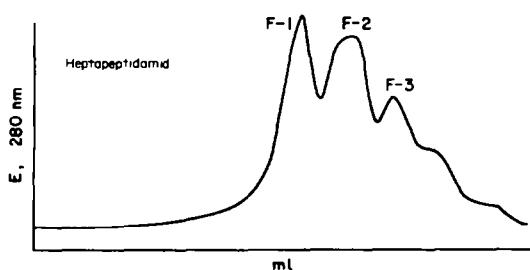


ABB 2. Elutionsdiagramm vom Festphasensyntheseprodukt des Peptids **2b** (Sephadex G 15, Wasser). Gemessen wird die Extinktion bei 280 nm.

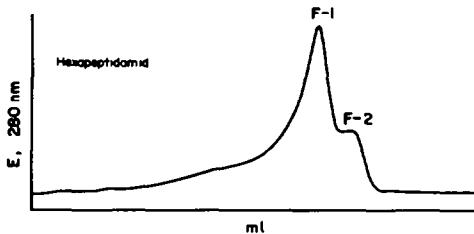


ABB 3. Elutionsdiagramm vom Festphasensyntheseprodukt des Peptids 3b (Sephadex G 15, Wasser). Gemessen wird die Extinktion bei 280 nm.

Die biologische Aktivität der synthetisierten Peptide wird am isolierten Meerschweinchenileum im Vergleich zum Physalaemin der Firma Farmitalia, Mailand ermittelt. Die Referenzsubstanz besitzt nach Angaben der Firma 70% der Aktivität von reinem Physalaemin.

Das Oktapeptidamid, das nach Bernardi¹² 150mal stärker biologisch aktiv ist als das gesamte Physalaeminmolekül, besitzt nur 12% der Aktivität der authentischen Referenzsubstanz. Obwohl die Aminosäurezusammensetzung keinerlei Abweichung von der zu erwartenden zeigt und im Elutionsdiagramm der Gelfiltration an Sephadex G 15 nur ein Peak auftritt (vgl. Abb. 1), scheint hier auf Grund der geringen biologischen Aktivität grösstenteils eine Fehlsequenz vorzuliegen. Als mögliche Ursache dafür kommt in Frage, dass an einem bereits fehlerhaft gekuppelten Asparagin das folgende Prolin ebenfalls in eine Fehlposition eingekuppelt wird.

Bei der Gelfiltration des rohen Heptapeptidamids an Sephadex G 15 wurden 3 Fraktionen (F-1, F-2 und F-3) eluiert, von denen F-1 37%, F-2 200% und F-3 33% Aktivität im Vergleich zur Referenzsubstanz zeigten. Zu erwarten ist nach den Untersuchungen von Bernardi¹² eine Aktivität von etwa 35%. Bei der Variabilität dieses biologischen Tests kommen sowohl F-1 als auch F-3 als gesuchtes Synthese- produkt in Frage. Für das Auftreten dieser 3 durch Gelfiltration zu trennenden und unterschiedlich biologisch aktiven Fraktionen kann es verschiedene Gründe geben, die u.a. in der Struktur des beim Hexapeptid N-terminalen Lysins zu suchen sind. Das als nächste Aminosäure anzukuppelnde Asparagin kann nach eventueller Abspaltung der ε-Lysinschutzgruppe sowohl an die α-Aminogruppe, als auch an die ε-Aminogruppe von Lys oder mit beiden verknüpft werden.

Das wiederholt gefällte und gereinigte Rohprodukt des Hexapeptids lässt sich mit Hilfe der Gelfiltration an Sephadex G-15 in 2 Fraktionen (F-1 und F-2) trennen. Beide Fraktionen sind im biologischen Test etwa so aktiv, wie es die Untersuchungen von Bernardi¹² erwarten lassen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Sämtliche Chemikalien und Dünnschichtchromatographieplatten (DC-Fertigplatten, Kiesel F 254) sind Produkte der Firma E. Merck AG, Darmstadt.

Äthanol wird über CaO vorgetrocknet, destilliert, durch ein Grignardreagens vollends absolutiert und erneut destilliert. Methylenchlorid wird nach Vortrocknen über Calciumchlorid über eine Kolonne destilliert. Dicyclohexylcarbodiimid wird durch Hochvakuumdestillation, Triäthylamin durch fraktionierte und Dimethylformamid durch azeotrope Destillation (250 g Dimethylformamid, 30 g Benzol und 12 g Wasser, unter Lichtausschluss!) gereinigt.

Alle Schmelzpunkte sind unkorrigiert. Bei der Herstellung der BOC-Aminosäuren werden zum Konstanthalten des pH-Wertes ein pH-Meter (Typ E 512) und ein Impulsomat Typ E 473 der Firma Metrohm (Herisau, Schweiz) verwendet. Die Drehwerte werden mit einem Digitalpolarimeter OLD 5 der Firma Zeiss, Oberkochen gemessen. Die $[\alpha]_D^{20}$ -Werte werden durch Extrapolieren bestimmt. Die Aminosäureanalysen werden mit einem automatischen Aminosäureanalysator, Modell Unichrom, der Firma Beckmann Inst., München, durchgeführt.

N-tert-Butyloxycarbonylaminosäuren. Die eingesetzten t-BOC-Aminosäuren werden im wesentlichen nach der pH-Stat-Methode von Schnabel¹³ hergestellt. Herstellungsbedingungen, Ausbeute und Schmelzpunkte sind in der Tabelle 1 zusammengestellt.

TABELLE 1. REAKTIONSDATEN ZUR HERSTELLUNG VON t-BOC-AMINOSÄUREN; CHARAKTERISIERUNG DER ISOLIERTEN t-BOC-VERBINDUNGEN

Aminosäurederivat	pH-Wert	Reaktionszeit (Stunden)	Ausbeute %	Schmp. °C	$[\alpha]_D^{20}$ (c = 1)	Lösungsmittel
t-BOC-L-Methionin	9.8	10	96	Öl	+17.0°	(DMF) ^b
t-BOC-L-Leucin	10.0	12	95	82–85 (EE/PÄ) ^a	-27.5°	(E) ^c
t-BOC-Glycin	10.0	4	93	93–94 (EE/PÄ) ^a	—	—
t-BOC-L-(O-Benzyl)-Tyrosin	10.0	48	72	108–110 (EE/PÄ) ^a	+11°	(Ac) ^d
t-BOC-L-Phenylalanin	10.2	18	90	81–84 (EE/PÄ) ^a	-4°	(E) ^c
t-BOC-L-(ε-N-Carbo-benzoxo)-Lysin	10.4	50	55	Öl	-9°	(E) ^c
t-BOC-L-Asparagin	9.6	36	80	173–175 (EE/PÄ) ^a	-7.5°	(DMF) ^b
t-BOC-L-Prolin	8.6	1	95	132–134 (EE/PÄ) ^a	-64°	(E) ^c

^a Essigester-Petroläther (30–50°)

^b Dimethylformamid

^c Essigsäure

^d Aceton

O-Benzyl-tyrosin. Die Verbindung wird über den Kupferkomplex nach Wünsch *et al.*¹⁴ hergestellt. Ausbeute 3.0 g (80%); Schmp. 226–230°, $[\alpha]_D^{20}$: -8°, c = 2 (Essigsäure, 80%).

εN-Carbobenzoxo-lysine wird nach Schlögel und Fabitschowitz¹⁵ hergestellt. Ausbeute 4.5 g (65%); Schmp. 231–237° (Äthanol/H₂O); $[\alpha]_D^{20}$: -9°, c = 1 (Essigsäure).

t-BOC-L-Methioninharz. 10 g chlormethyliertes Harz (10.4 mMol Chlorid), 3 g (12 mMol) BOC-Methionin, 1.3 ml (9.4 mMol) Triäthylamin und 20 ml absolutes Äthanol werden 25 Stunden bei 90° umgesetzt. Anschliessend wird mit Äthanol, Wasser, Methanol und Methylenechlorid gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Die Beladung wird durch Aminosäureanalyse festgestellt und beträgt 0.22 mMol/g.

t-BOC-Pro-Asn-Lys(Z)-Phe-Tyr(BzI)-Gly-Leu-Met-O-Polymer. Die Synthese dieses Polymeren erfolgt nach dem Schema von Tab. 2. Die Kupplungsreaktionen werden zweimal hintereinander mit einem fünfzigprozentigen Überschuss an geschützter Aminosäure durchgeführt.

t-BOC-Asn-Lys(Z)-Phe-Tyr(BzI)-Gly-Leu-Met-O-Polymer. Die Synthese wird analog zu der des Oktapeptidpolymeren durchgeführt (vgl. oben).

t-BOC-Lys(Z)-Phe-Tyr(BzI)-Gly-Leu-Met-O-Polymer. Wird analog zum Oktapeptidpolymeren synthetisiert (vgl. oben).

TABELLE 2. SYNTHESESCHHEMA

Arbeitsgang	Reagens	Dauer [Minuten]
Waschen	CH_2Cl_2	5
t-BOC-Abspaltung	TFA ^a /CH ₂ Cl ₂ (1:1)	60
Waschen	2 × CH ₂ Cl ₂ 1 × C ₂ H ₅ OH 2 × CH ₂ Cl ₂	{ je 5
Neutralisieren	CH ₂ Cl ₂ /(C ₂ H ₅) ₃ N (1:2)	2 × 15
Waschen	1 × CH ₂ Cl ₂ 2 × C ₂ H ₅ OH 3 × CH ₂ Cl ₂	{ je 5
Kupplung (2 ×)	BOC-Aminosäure (50%iger Überschuss in CH ₂ Cl ₂); DCC ^b	je 60

^a Trifluoressigsäure^b Dicyclohexylcarbodiimid

t-BOC-Pro-Asn-Lys(Z)-Phe-Tyr(BzI)-Gly-Leu-Met-NH₂ (**1a**). 4 g Peptidharz werden in einer Ampulle in 20 ml DMF aufgeschlämmt und 50–60 ml Ammoniak zukondensiert. Die Ampulle wird abgeschmolzen, auf Zimmertemperatur erwärmt und nach viertägiger Reaktionszeit wird der Ammoniak abgedampft. das Peptid in Dimethylformamid/Äthanol (1:1) aufgenommen und mittels Äther/Petroläther (5:1) gefällt. Ausbeute: 780 mg (61.5%); Schmp. 175°C Aminosäureanalyse vgl. Tab. 3.

TABELLE 3. AMINOSÄUREANALYSE DES OKTAPEPTIDAMIDES VOR UND NACH DER REINIGUNG

Aminosäure	Peptid 1a , umgefällt (gefunden)	Peptid 1b , Eluat (gefunden)	berechnet
Methionin	1	1	1
Leucin	1	1	1
Glycin	1	1	1
Tyrosin	0.6	0.85	1
Phenylalanin	0.75	0.95	1
Lysin	0.80	0.99	1
Asparaginsäure	0.93	0.5	1
Prolin	0.99	0.6	1

t-BOC-Asn-Lys(Z)-Phe-Tyr(BzI)-Gly-Leu-Met-NH₂ (**2a**). 2 g Peptidharz werden analog zu **1a** behandelt. Ausbeute: 340 mg (58%); Schmp. 175°; Aminosäureanalyse vgl. Tab. 4.

t-BOC-Lys(Z)-Phe-Tyr(BzI)-Gly-Leu-Met-NH₂ (**3a**). 2 g Peptidharz werden analog zu **1a** behandelt. Ausbeute 295 mg (57%); Schmp. 197°; Aminosäureanalyse vgl. Tab. 5.

H-Pro-Asn-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH₂ (**1b**). 50 mg **1a** werden in 30 ml Trifluoressigsäure (mit 10% Thioglykolsäure!) gelöst. Man leitet dann 1 Stunde lang gereinigten Bromwasserstoff (über eine vorgesetzte Waschflasche mit 30 ml Trifluoressigsäure und 5 g Resorcin) ein. Das von den Schutzgruppen befreite Peptid wird durch Äther/Petroläther (1:1) gefällt. Ausbeute: 32 mg (83%); Schmp. 205–215°. Das Peptidamid wird auf einer Sephadex-G-15-Säule (1.5 × 90) mit Wasser als Elutionsmittel gereinigt. Zur Aminosäureanalyse vgl. Tab. 3.

TABELLE 4. AMINOSÄUREANALYSE DES HEPTAPEPTIDAMIDES

Aminosäure	Peptid 2a, umgefällt (gefunden)	Peptid 2b Eluat (gefunden)	berechnet
Methionin	1	0.68	1
Leucin	1	1	1
Glycin	1	1	1
Tyrosin	0.89	0.89	1
Phenylalanin	1	1	1
Lysin	1	0.92	1
Asparaginsäure	0.85	0.92	1

H-Asn-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH₂ (2b). Von 50 mg 2a werden die Schutzgruppen wie bei 1a abgespalten (vgl. oben). Ausbeute: 38 mg (92 %). Schmp. 222–234° (Zers.). Zur Reinigung wird eine Sephadex-G-15-Säule (1.5 × 90) und Wasser als Elutionsmittel verwendet. Zur Aminosäureanalyse vgl. Tab. 4.

H-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH₂ (3b). Von 50 mg 3a werden die Schutzgruppen wie bei 1a abgespalten. Ausbeute: 29 mg (86 %). Die Reinigung erfolgt über eine Sephadex-G-15-Säule (Elutionsmittel: Wasser). Zur Aminosäureanalyse von 3a, b vor und nach der Reinigung vgl. Tab. 5.

TABELLE 5. AMINOSÄUREANALYSE DES HEXAPEPTIDAMIDES VOR UND NACH DER REINIGUNG

Aminosäure	Peptid 3a umgefällt (gefunden)	Peptid 3b, Eluat (gefunden)	berechnet
Methionin	0.89	1	1
Leucin	1	1	1
Glycin	1	1	1
Tyrosin	0.86	0.95	1
Phenylalanin	0.90	0.92	1
Lysin	0.93	1	1

Danksagung—Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir herzlich für die Unterstützung dieser Arbeit, ebenso Herrn Hans Bartholomä für die Durchführung der Aminosäureanalysen. Der Firma Carl Zeiss, Oberkochen danken wir für die Möglichkeit zur Messung von Drehwerten.

LITERATUR

- ¹ R. B. Merrifield, *Recent Progr. Hormone Res.* **23**, 451 (1967)
- ² J. D. Young, W. Voelter, M. Shimizu, C. Y. Leung, W. J. Peterson und E. Benjamini, *Peptides* im Druck
- ³ E. Bayer, H. Eckstein, K. Häggle, W. A. König, W. Brüning, H. Hagenmaier und W. Parr, *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 1735 (1970)
- ⁴ E. Wünsch, *Angew. Chem.* **83**, 773 (1971)
- ⁵ V. Erspamer, A. Anastasi, G. Bertaccini, J. M. Cei, *Experientia*, **20**, 489 (1964)
- ⁶ L. Bernardi, G. Bosisio, O. Goffredo und R. De Castiglione, *Ibid.* **20**, 490 (1964)
- ⁷ F. Chillemi, *Gazz. Chim. Ital.* **95**, 402 (1965)
- ⁸ W. Voelter, K. Zech und G. Jung, *Tetrahedron* **28**, 2649 (1972)
- ⁹ J. M. Stewart und J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, S. 9. Freeman, San Francisco (1969)
- ¹⁰ E. Bayer, E. Breitmaier, G. Jung und W. Parr, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **352**, 759 (1971)
- ¹¹ W. Voelter, J. D. Young, M. Shimizu, C. Y. Leung und E. Benjamini, *Z. Physiol. Chem.* **352**, 6 (1971)
- ¹² L. Bernardi in E. G. Erdös, N. Back, F. Sicuteri, *Hypotensive Peptides*, p. 86–92. Springer-Verlag New York (1966)
- ¹³ E. Schnabel, *Liebigs Ann.* **702**, 188 (1967)
- ¹⁴ E. Wünsch, G. Fries und A. Zwick, *Chem. Ber.* **91**, 542 (1958)
- ¹⁵ K. Schlögel und H. Fabitschowitz, *Mh. Chem.* **84**, 949 (1953)