

SYNTHESE UND ANWENDUNG VON BLOCKCOPOLYMEREN MIT FUNKTIONELLEN GRUPPEN IN DEFINIERTEM ABSTAND UNTER VERWENDUNG VON POLYÄTHYLENGLYKOLEN UND DIISOCYANATEN

E. BAYER*, I. GATFIELD, H. MUTTER und M. MUTTER

Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 18, D-7400 Tübingen-1, Deutschland

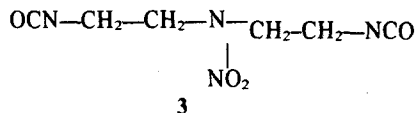
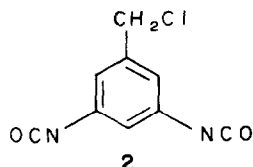
(Received in Germany 30 August 1977; received in the UK for publication 15 January 1978)

Zusammenfassung—Die Synthese von Blockcopolymeren mit funktionellen Gruppen in definiertem Abstand wird beschrieben. Polyäthylenglykole unterschiedlicher Molekulargewichte werden mit 3,5-Diisocyanato-benzylchlorid bzw. 3-Nitro-3-aza-pentan-1,5-diisocyanat umgesetzt. Die exakte Anzahl der OH-Gruppen der zur Polyaddition eingesetzten Polyäthylenglykol-Blöcke wird nach quantitativem Umsatz mit Phenylisocyanat spektroskopisch bestimmt; auf diese Weise werden Polymere mit hohen Molekulargewichten erhalten. Die Verwendbarkeit dieser Copolymere als löslichmachende Schutzgruppe bei der stufenweisen Peptidsynthese entsprechend der Liquid-Phase-Methode wird anhand der Synthese eines Tetrapeptids demonstriert.

Abstract—The synthesis of blockcopolymers carrying functional groups at defined distance is described. Polyethyleneglycol of various molecular weight is reacted with 3,5-diisocyanato benzylchlorid and 3-nitro-3-aza-pentan-1,5-diisocyanate, respectively. The exact amount of OH-groups of the polyethyleneglycol blocks used in the polyaddition reaction is determined spectroscopically after quantitative reaction with phenylisocyanate; thus, polymers of high molecular weight were obtained. The compatibility of these copolymers as solubilising protecting groups in the stepwise peptide synthesis according to the Liquid-Phase-Method is demonstrated by the synthesis of a tetrapeptide.

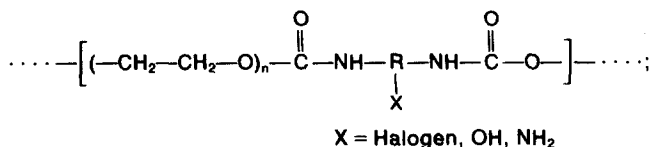
Funktionelle, lösliche Polymere gewinnen in der organischen Synthese zunehmend an Bedeutung. Beim stufenweisen Aufbau von Naturstoffen, z.B. in der Polypeptidsynthese, tragen sie wesentlich zur Vereinfachung des Synthesezyklus bei.¹ Weitere Anwendungen finden diese Polymere zur Solubilisierung von niedermolekularen, schwerlöslichen Molekülen² sowie in der homogenen Katalyse.^{3,4} Die zur Verknüpfung an das Polymer notwendigen funktionellen Gruppen werden üblicherweise durch Derivatisierung bzw. Modifizierung des Polymers oder durch Copolymerisation in das lineare Kettenmolekül eingebaut. Bei diesen Verfahren liegen die funktionellen Gruppen statistisch verteilt im Kettenmolekül vor. Kinetische Untersuchungen haben gezeigt, dass die chemische Reaktivität dieser Gruppen infolge von Nachbarschafts- und Solvatationseffekten nicht äquivalent ist,⁵ was sich z.B. in einer Abweichung der Reaktionskinetik vom linearen Verlauf ausdrückt.⁶ Die Äquivalenz aller funktioneller Gruppen ist aber besonders bei Synthesen^{6,7} und bei der Anwendung als Katalysatoren wichtig. Durch Polyaddition von Polyäthylenglykol (PEG) mit derivatisierten Diisocyanaten ist es uns gelungen, Polymere zu synthetisieren, deren funktionelle Gruppen sich in definiertem Abstand befinden (1), sodass sterische Komplikationen auszuschliessen sind.

Als Diisocyanate wurden die beiden Monomere 3,5-Diisocyanatobenzylchlorid⁸ (2) sowie das käufliche 3-Nitro-3-aza-pentan-1,5-diisocyanat (3) verwendet.

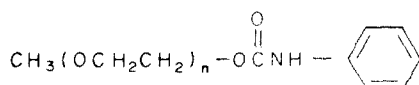


Versuche, die funktionelle Gruppe nachträglich in das Polyadditionsprodukt einzuführen (z.B. durch Chlormethylierung aromatischer Diisocyanatanker) verliefen unbefriedigend.⁸

Die Polyaddition erfolgte nach den üblichen Bedingungen der Polyurethanherstellung mit PEG-Blöcken der Mol.-Masse 400, 1000, 6000 und 10,000. Die Reduktion der N-Nitrogruppe von 3 zur N,N-substituierten Hydrazingruppierung verlief glatt durch katalytische Reduktion. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften



und die Kapazität der Polyadditionsprodukte lassen sich durch die Mol.-Masse des eingesetzten PEG in weiten Grenzen variieren. Um hohe Molekulargewichte der Blockcopolymeren zu erhalten, ist eine genaue Kenntnis der Hydroxylzahl der PEG-Blöcke Voraussetzung. Da die bisherigen Bestimmungsmethoden diesen Ansprüchen nicht genügen,^{9,10} haben wir ein Verfahren entwickelt, das die Ermittlung der OH-Zahl mit hoher Genauigkeit gestattet. Dabei werden die endständigen OH-Gruppen des PEG quantitativ mit Phenylisocyanat umgesetzt^{11,12} und die entstandene Urethanverbindung spektroskopisch im UV-Bereich vermessen ($\lambda_{\max}$ der Phenyl-Gruppe). Zuvor wird das überschüssige Isocyanat durch Kristallisation des PEG entfernt. Zur Prüfung etwaiger elektronischer Einflüsse der PEG-Kette auf den Phenylkern wurde der Extinktionskoeffizient der niedermolekularen Modellverbindung 4 bestimmt.¹⁰

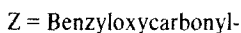
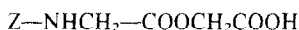


4

Für $n=1$ und $n=2$ wurden identische Werte für ϵ_A erhalten, wobei auch die Zugabe von PEG keinen Einfluss auf ϵ_A hatte. Der ϵ_A -Wert von Verbindung 4 wurde deshalb auch für die PEG-Urethane benützt. Der Vorteil dieser Bestimmungsmethode, die auch auf andere Polyole übertragbar ist, liegt in der einfachen Durchführbarkeit und der hohen Reproduzierbarkeit.

Eine Reihenuntersuchung an käuflichen Polyäthylen-glykolen ergab, dass die OH-Zahlen verschiedener PEG-Chargen (z.B. mit Mol.-Masse 10,000) z. Teil erhebliche Schwankungen aufweisen. Die daraus errechneten mittleren Mol.-Massen führten zu Abweichungen bis zu 30% vom angegebenen Wert.

Durch die Verwendung äquimolarer Mengen von PEG bzw. Diisocyanat (Verhältnis NCO/OH = 1:1) wurden bei der Polyaddition Molekulargewichte im Bereich von $\bar{M}_w = 5 \times 10^4$ – 10^6 erzielt. Die chemischen Eigenschaften der Blockcopolymeren wie Löslichkeits- und Kristallisationsverhalten werden vor allem durch die Mol.-Masse der zur Polyaddition verwendeten PEG-Blöcke bestimmt: PEG mit $\bar{M}_w \leq 1000$ führte zu hochviskosen, nicht kristallisierbaren Produkten. Dagegen erhielt man bei Verwendung von PEG, $\bar{M}_w \geq 4000$ gut kristallisierbare Polymere mit Erweichungspunkten um 60°C. Alle Polymere waren gut löslich in Lösungsmitteln wie CHCl_3 , CH_2Cl_2 , Dimethylformamid und in Wasser. Die Verwendbarkeit der Polykondensationsprodukte als C-terminale lösliche Schutzgruppe zum stufenweisen Aufbau von Peptiden nach dem Prinzip der Liquid-Phase-Peptidsynthese wurde durch die Synthese des Modellpeptids H-Ile-Ala-Val-Gly-OH¹⁸ demonstriert. Dabei wurde das durch Polyaddition von PEG, $\bar{M}_w = 10^3$ und Verbindung 3 erhaltene Polymere nach Reduktion der Nitrogruppen mit 5 umgesetzt



5

und das Peptid unter Verwendung von BOC-Aminosäure-Derivaten und DCCI als Kupplungskomponente aufgebaut.^{8,13,14} Das nach basischer Hydrolyse erhaltene

Tetrapeptid war nach den üblichen analytischen Kontrollen einheitlich. Das eingesetzte Polymere erwies sich unter den Bedingungen des Synthesesyklus der Liquid-Phase-Methode als stabil; durch die wesentlich höhere Kapazität gegenüber den bisher verwendeten Polyglykolen¹³ und die sterisch günstige Anordnung der funktionellen Gruppen im Polymer kann das Polymer besonders bei der Synthese von kurzkettigen Peptiden vorteilhaft eingesetzt werden. Polymere dieses Typs wurden inzwischen auch erfolgreich zur Solubilisierung biologisch interessanter Moleküle³ und in der homogenen Katalyse verwendet.⁴

EXPERIMENTALER TEIL

1. Bestimmung der Hydroxylzahl von PEG

PEG wird bei 110°C und 0.1 Torr ca. 2 h über P_4O_{10} getrocknet. 1 g trockenes PEG, $M_n = 10^4$, wird in 5 ml CH_2Cl_2 (destilliert über P_4O_{10}) gelöst und unter Ausschluss von Feuchtigkeit mit 4 mmol Phenylisocyanat (frisch destilliert) versetzt. Als Katalysator werden 2 Tropfen Dibutylzinndilaurat zugesetzt und die klare Lösung 4 h bei 25°C stehen gelassen. Dann wird die Lösung auf ca. 3 ml eingengt und das PEG-Urethan durch tropfenweises Zugabe von Diäthyläther (ca. 30 ml) unter Rühren zur Kristallisation gebracht; es wird noch 10 Min. bei Raumtemp. weitergerührt. Der Niederschlag mit einer G-3-Glasfritte abgesaugt und mit viel Äther nachgewaschen. Der trockene Rückstand wird in 20 ml MeOH aufgenommen und bei 0°–4°C mehrere h stehen gelassen. Das auskristallisierte PEG-Urethan wird wie oben abgesaugt oder abzentrifugiert, mit Äther nachgewaschen und über P_4O_{10} bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Zur Bestimmung der Hydroxylzahl (OHZ) wird eine definierte Probe in MeOH gelöst und gegen eine reine PEG-Lösung gleicher Mol.-Masse und Konzentration im UV vermessen. Die Konzentration c_A der OH-Gruppen pro eingewogene Probe ergibt sich aus der gemessenen Extinktion E_A bei $\lambda_{\max} = 235.5$ nm mit $\epsilon_{A,\max} = 17.500$ (aus 4 ermittelt) nach: $c_A = E_A/\epsilon_A d [\text{Mol/l}]$. Daraus errechnet sich das mittlere Molekulargewicht $\bar{M}_w$ bzw. die handelsgebräuchliche OHZ wie folgt: $\bar{M}_w = 2 A/c_A$ und $\text{OHZ} = 56.110 \times c_A/A$, wobei $A = \text{Einwaage in g/l}$ und $\text{OHZ} = \text{mg KOH-Verbrauch/g Polymer}$.⁹

2. 3,5-Diisocyanato-benzylchlorid

(a) 3,5-Diaminobenzylalkohol. 4.0 g (22.7 mmol) 3,5-Diaminobenzoessäureäthylester¹⁵ werden langsam zu einer Suspension von überschüssigem LiAlH_4 in 50 ml trockenem THF gegeben und 12 h am Rückfluss gekocht. Anschliessend werden 50 ml *abs.* Äther und danach 50 ml wasserhaltiger Äther zugesetzt. Dann wird vorsichtig Wasser zugegeben bis die Wasserstoffentwicklung beendet ist. Die Lösung wird filtriert und der Rückstand mit Äthanol nachgewaschen. Das Filtrat wird über MgSO_4 getrocknet und i. Vak. eingengt. Das gelbe Öl wird aus $\text{CHCl}_3/\text{Et}_2\text{O}$ umkristallisiert. Ausbeute: 2.8 g (91% d.Th.). Nadeln; Fp. 110°–111°C; R_f (Äthanol) 0.48; (Gef. C, 60.9; H, 7.2; N, 20.1. $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$ Ber. C, 60.87; H, 7.26; N, 20.29%).

(b) 3,5-Diaminobenzylchlorid. 3.0 g (14.5 mmol) 3,5-Diaminobenzylalkohol werden mit überschüssigem Phosgen in 250 ml trockenem Chlorbenzol bei 0°C behandelt. Nach beendeter COCl_2 -Zugabe wird noch 1 h bei Raumtemp. stehen gelassen und anschliessend 4 h am Rückfluss erhitzt. Das überschüssige COCl_2 wird mit N_2 verdrängt und die braunen Feststoffe abfiltriert. Nach Abziehen des Lösungsmittels wird ein hellgelbes Öl erhalten. Ausbeute: 1.0 g (22% d.Th.). (Gef. C, 55.5; H, 5.8; N, 17.6. $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_2\text{Cl}$ Ber. C, 55.13; H, 5.77; N, 17.95%).

3. Polyaddition

(a) PEG, $\bar{M}_w = 1150$. In einem Dreihalskolben mit Rührer und Thermometer werden zu 11.5 g getrocknetem PEG (= 10 mmol, OHZ nach 1. bestimmt) 10 ml trockenes Toluol zugegeben und auf 80°C erhitzt. Zu der Lösung wird 0.3 ml Dibutylzinndilaurat zugefügt und eine Lösung von 10 mmol Diisocyanat 2 bzw. 3 in 10 ml Toluol langsam unter starkem Rühren zugetropft. Nach ca. 20 min. wird die zähflüssige Lösung mit weiteren 10 ml Toluol

versetzt und zwei h bei 80°C gerührt. Nach Abziehen des Lösungsmittels wird der Rückstand in H₂O aufgenommen und der Katalysator durch 2-fache Ätherextraktion entfernt. Nach Gefriertrocknung wird ein hellgelbes, sehr viskoses Öl erhalten. Zur Reduktion der Nitrogruppe bei Verwendung des Diisocyanats 3 wird das Polyadditionsprodukt in 200 ml MeOH/AcOEt (1:1) gelöst, mit AcOH auf pH 5.5 gestellt und nach Zugabe von 1.0 g Pd/C drei Tage bei Raumtemp. reduziert. Nach Abfiltrieren vom Katalysator und Abziehen des Lösungsmittels erhält man ein hochviskoses Öl; Die Retention bei Ultrafiltration mit Amicon UM-10 Membranen¹⁶ (Ausschlussgrenze $\bar{M}_w \approx 10^4$) liegt über 99%.

(b) PEG, $\bar{M}_w = 7130$. Die Reaktion wird analog zu a) durchgeführt. Zur Entfernung aller niedermolekularer Produkte wird nach erfolgter Polyaddition auf 30% (G/V) eingeeengt und das Polymere durch Zutropfen von Äther unter Rühren bei 0°C ausgefällt; es wird noch 2 h bei 0°C weitergerührt, der Niederschlag abfiltriert und i. Vak. getrocknet.

4. Synthese des Modellpeptids H-Ile-Ala-Val-Gly-OH

(a) Z-NHCH₂COOCH₂COOH. 4.3 mmol Jodessigsäure werden in 20 ml trockenem, destillierten Methylenchlorid gelöst und mit 5.8 mmol Z-NHCH₂COOAg unter starkem Rühren versetzt. Nach 16-stündigem Rühren unter Lichtausschluss wird eine h unter Rückfluss erhitzt und vom ausgefallenen AgI abfiltriert. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abgezogen und der ölige Rückstand aus CHCl₃ umkristallisiert. Ausbeute: 1.0 g Z-NHCH₂COOCH₂COOH (77% d. Th.), weisse Nadeln; Fp. 97–98°C.

(b) Verknüpfung an das Aminopolymer. 14.5 mmol Z-NHCH₂COOCH₂COOH werden mit 7.2 ml ejner 2 M DCCI-Lösung in wenig CH₂Cl₂ 30 Min. bei 0°C voraktiviert und die filtrierte Lösung zu einer Lösung von 4.0 g (3.6 mmol) Aminopolymer (nach 3. hergestellt) in 40 ml CH₂Cl₂ gegeben. Nach der Neutralisation mit 3.6 mmol N-Methylmorpholin wird 4 h bei 25°C gerührt. Der Umsatz wird nach der semiquantitativen Ninhydrinmethode getestet.¹⁷ Die Lösung wird i. Vak. eingeeengt und mit AcOH auf pH 5.5 gebracht. Die Z-Gruppe wird durch Hydrierung über Pd/C bei 25°C unter Normaldruck während 5 h abgespalten. Die überschüssige Aminosäure wird durch Ultrafiltration (UM 02-Membran, Fa. Amicon) vollständig entfernt und das wässrige Retendat gefriergetrocknet. Ausbeute: 4.0 g Polymer-gebundenes Glycin; die Aminosäureanalyse ergibt eine Beladung von 0.709 mmol Glycin/g Polymer.

(c) Aufbau der Peptidkette. Nach dem Syntheszyklus der Liquid-Phase-Methode¹³ werden nacheinander BOC-Val, BOC-Ala und BOC-Ile als symmetrische Anhydride in 3-fachem Überschuss gekuppelt. Die Kupplungsausbeuten werden quan-

titativ bestimmt.¹⁷ Nach Abspaltung der BOC-Gruppe durch TFA/CH₂Cl₂ (1:1; 30 Min.) werden die überschüssigen Komponenten durch Ultrafiltration (UM-02-Membran) entfernt. Zur Abspaltung des Tetrapeptids vom Polymer werden 1.0 g Polymerpeptid in 10 ml H₂O und 0.5 ml 1 N NaOH 3 h bei 25°C gerührt. Nach Neutralisation mit 1 N HCl wird zur Trockene eingedampft, das Produkt in 10 ml H₂O aufgenommen und dreimal mit je 20 ml CHCl₃/CH₂Cl₂ (1:1) extrahiert. Die wässrige Phase wird lyophilisiert und das rohe Tetrapeptid über Sephadex G10 (40 × 3 cm) vom restlichen Polymer gereinigt. Ausbeute an H-Ile-Val-Gly-OH: 52% d.Th.; Fp. 243–244°C (Zers.). Aminosäureanalyse: Gly:Val:Ala:Ile = 1.00:1.00:1.02:1.04; R_f-Werte: 0.46 (n-Butanol/AcOH/H₂O = 3:1:1); 0.76 (CHCl₃/MeOH/H₂O/AcOH = 60:45:14:6); 0.55 (Pyridin/EtOH/Benzol/H₂O = 8:4:2:1).

LITERATUR

- ¹M. Mutter und E. Bayer, *Angew. Chem.* **86**, 101 (1974); *Angew. Chem. Internat. Edn.* **13**, 88 (1974).
- ²M. Mutter, H. Mutter, R. Uhmman und E. Bayer, *Biopolymers* **15**, 917 (1976).
- ³E. Bayer und G. Holzbach, *Angew. Chem.* **89**, 120 (1977); *Angew. Chem. Internat. Edn.* **16**, 117 (1977).
- ⁴E. Bayer und V. Schurig, *Angew. Chem.* **87**, 484 (1975); *Angew. Chem. Internat. Edn.* **14**, 493 (1975).
- ⁵H. Morawetz, In *Peptides, Proc. Am. Pept. Symp.* p. 385. New York (1975).
- ⁶R. H. Andreatta und H. Rink, *Helv. Chim. Acta* **56**, 1205 (1973).
- ⁷E. Bayer, M. Mutter, R. Uhmman, J. Polster und H. Mauser, *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 7333 (1974).
- ⁸I. Gatfield, Dissertation, Universität Tübingen (1975).
- ⁹Katalog, *Polyglycole*, Fa. Hoechst, Frankfurt.
- ¹⁰STI 3001-968 (1972); ASTM D 1638 (1975).
- ¹¹K. C. Frisch, S. L. Reegen und B. Thir, *J. Pol. Sci. Part C16*, 2191 (1967).
- ¹²H. Mutter, Dissertation, Universität Tübingen (1977).
- ¹³M. Mutter, R. Uhmman und E. Bayer, *Liebigs Ann. Chem.* **901** (1975).
- ¹⁴M. Mutter, H. Hagenmaier und E. Bayer, *Angew. Chem.* **83**, 883 (1971); *Angew. Chem. Internat. Edn.* **10**, 811 (1971).
- ¹⁵P. Cohn und P. Friedländer, *Chem. Ber.* **35**, 1266 (1902).
- ¹⁶Ultrafiltration with Diaflo Membranes (Amicon N.V. Oosterhout, Holland).
- ¹⁷H. Hagenmaier und M. Mutter, *Tetrahedron Letters* **9**, 767 (1974).
- ¹⁸Die in dieser Arbeit benutzten Abkürzungen entsprechen den Nomenklaturvorschlägen. In *Biochemistry* **5**, 2485 (1966).