

Synthese des biologisch aktiven Undecapeptids Substanz P nach der Flüssig-Phasen-Methode

Ernst Bayer* und Manfred Mutter

Lehrstuhl für Organische Chemie, Universität Tübingen,
D-7400 Tübingen 1, Auf der Morgenstelle

Eingegangen am 21. November 1973

Die Synthese des biologisch aktiven Undecapeptids Substanz P mit Hilfe der neuentwickelten Flüssig-Phasen-Methode (LPM) wird beschrieben. Das Peptid konnte mit hoher Ausbeute und voller biologischer Aktivität dargestellt werden. Das Beispiel zeigt, daß es nach dem modifizierten Verfahren der LPM, der Kristallisationsmethode möglich ist, biologisch aktive Peptide in kurzer Zeit mit guter Ausbeute und Reinheit zu synthetisieren.

Synthesis of the Biological Active Undecapeptide Substance P with the Liquid-Phase Method

The synthesis of the biological active undecapeptide substance P with the liquid-phase method (LPM) is described. The over-all-yield of the synthesis is high and the peptide shows full biological activity. The synthesis demonstrates that the modification of the liquid-phase synthesis, the crystallisation method, enables the preparation of peptides in short time with high yield and purity.

Die Synthese biologisch aktiver Peptide für Untersuchungen des Zusammenhangs zwischen biologischer Wirksamkeit und chemischer Struktur sowie für therapeutische Zwecke ist nach dem klassischen Prinzip der Fragmentkondensation zwar zuverlässig möglich¹⁾, aber so zeitaufwendig, daß nur eine begrenzte Zahl von Verbindungen zugänglich gemacht werden konnte. Die Festkörpermethode²⁾ hingegen erlaubt zwar den schnellen und standardisierten Aufbau der Peptidkette; aber neben den bekannten Problemen bei heterogenen Reaktionen³⁾ ist die analytische Kontrolle des Syntheseverlaufs schwierig und die Breite der klassischen Peptidchemie bezüglich Schutzgruppen und Kupplungsmethoden kann nicht auf das heterogene System übertragen werden. Die Folge dieser Beschränkungen sind aufwendige Endreinigungen von Fehlersequenzen, die die Vorteile dieser Methode beim Aufbau der Peptidkette aufheben³⁾.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, haben wir den Aufbau von Peptiden an solubilisierenden Polymeren in homogener Phase vorgeschlagen, die wir als Flüssig-Phasen-Methode (Liquid-Phase Methode, LPM) bezeichnen⁴⁻⁶⁾. Die LPM erlaubt

¹⁾ E. Wünsch, *Angew. Chem.* **83**, 773 (1971); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **10**, 786 (1971).

²⁾ R. B. Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* **85**, 2149 (1963).

³⁾ E. Bayer, H. Eckstein, K. Hägele, W. A. König, W. Brüning und H. Hagenmaier, *J. Amer. Chem. Soc.* **92**, 1735 (1970).

⁴⁾ M. Mutter, H. Hagenmaier und E. Bayer, *Angew. Chem.* **83**, 883 (1971); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **10**, 811 (1971).

⁵⁾ E. Bayer und M. Mutter, *Nature (London)* **237**, 512 (1972).

⁶⁾ M. Mutter und E. Bayer, *Angew. Chem.* **86**, 101 (1974); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **13**, 88 (1974).

den schnellen und standardisierten Aufbau einer Peptidkette, ähnlich wie beim Festkörpervorverfahren, wobei aber alle Vorteile der klassischen Synthese, wie analytische Kontrollen, die Möglichkeit der Fragmentkondensation und die Anwendbarkeit aller bekannten Methoden zum Aufbau von Peptiden bewahrt bleiben. Vergleichende kinetische Untersuchungen von Peptidkupplungen an solubilisierenden, polymeren Trägern mit niedermolekularen C-terminalen Schutzgruppen zeigen keine Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit⁷⁾. Durch die lineare Kinetik der Peptidkupplung im System der LPM können — im Gegensatz zum Festkörpersystem — die einzelnen Kupplungen quantitativ durchgeführt werden. Der analytisch kontrollierte Aufbau der Peptidkette nach der LPM bietet somit erstmals die Möglichkeit, Peptide mit der Variationsbreite der klassischen Synthese und den Vorteilen der stufenweisen Trägersynthese zu synthetisieren.

Das neue Verfahren hat sich bisher bei der Synthese von Modellpeptiden bewährt. Es war nun zu zeigen, daß auch biologisch aktive Peptide schnell und mit befriedigendem Reinheitsgrad darzustellen sind. Bei der Auswahl des Synthesebeispiels sollte ein Vergleich mit dem klassischen Syntheseprinzip und mit der Festkörpermethode möglich sein. Hierfür eignet sich das von *Euler* und *Gaddum*⁸⁾ zuerst an seiner physiologischen Wirkung nachgewiesene Undecapeptid Substanz P^{9,10)}, für das sowohl eine klassische¹¹⁾ als auch eine Festkörpersynthese¹²⁾ beschrieben ist.

Beide Synthesen haben bisher nicht zu dem gewünschten Ziel geführt, das Peptid bequem und in größeren Mengen zugänglich zu machen, so daß seine physiologische Funktion noch nicht endgültig interpretiert werden konnte¹³⁾. Da eine enge Strukturverwandtschaft zwischen Substanz P und weiteren biologisch aktiven Peptiden, wie Physalämin und Eledoisin, besteht, ist ein einfaches Syntheseverfahren zur Herstellung dieser Peptide und weiterer Analoga von allgemeiner Bedeutung.

Die Synthese von Substanz P mit der Aminosäuresequenz H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂¹⁴⁾ bietet viele präparative Schwierigkeiten. Bei der klassischen Synthese dominieren das Problem der Schwerlöslichkeit einzelner Fragmente sowie die aufwendigen Reinigungsschritte aufgrund schlechter Kupplungsausbeuten.

Die Anhäufung sterisch gehinderter Aminosäuren am N-terminalen Kettenende des Peptids hat zur Folge, daß bei der Festkörpermethode einzelne Kupplungsschritte nicht quantitativ verlaufen. Problematisch ist auch die aktive Esterkupplung der beiden Glutaminreste im heterogenen System. Die Folge davon sind aufwendige Reinigungsoperationen am Ende der Synthese, die die Gesamtausbeute an reinem Produkt erheblich vermindern.

⁷⁾ *E. Bayer, M. Mutter, R. Uhmann, J. Polster* und *H. Mauser*, in Vorbereitung.

⁸⁾ *U. S. von Euler* und *J. H. Gaddum*, *J. Physiol. (London)* **72**, 74 (1931).

⁹⁾ *R. O. Studer, A. Trzeciak* und *W. Lergier*, *Helv. Chim. Acta* **56**, 860 (1973).

¹⁰⁾ *M. M. Chang* und *S. E. Leeman*, *J. Biol. Chem.* **245**, 4784 (1970).

¹¹⁾ *H. Yajima* und *K. Kitagawa*, *Chem. Pharm. Bull.* **21**, 682 (1973).

¹²⁾ *G. W. Tregear, H. D. Niall, J. T. Potts jr., S. E. Leeman* und *M. M. Chang*, *Nature New Biology* **232**, 87 (1971).

¹³⁾ *M. M. Chang, S. E. Leeman* und *H. D. Niall*, *Nature New Biology* **232**, 86 (1971).

¹⁴⁾ Die in der Arbeit benutzten Abkürzungen entsprechen den Nomenklaturvorschlägen in *Biochemistry* **5**, 2485 (1966).

Durch die solubilisierende C-terminale Schutzgruppe, sowie die analytische Verfolgung der einzelnen Kupplungsreaktionen im homogenen System der LPM sollte es möglich sein, diese Probleme zu lösen.

Als C-terminale Schutzgruppe diente Polyäthylenglycol (PEG) mit der Mol.-Masse 15000. Nach der Veresterung mit Methionin folgte der stufenweise Aufbau des Peptids unter Verwendung von *N*-Boc-geschützten Aminosäuren und zweifachem Überschuß an symmetrischen Anhydriden, die durch Aktivierung mit DCCI hergestellt wurden¹⁵. Diese Aktivierungsmethode wurde auch zur Kupplung von Boc-Glutamin benützt, nachdem sich gezeigt hat, daß unter den gewählten Bedingungen keine Nitrilbildung stattfindet.

Die Entfernung der überschüssigen Komponenten erfolgte nach der kürzlich beschriebenen Kristallisationsmethode⁶. Während im Normalfall das Polymerpeptid aus Methylchlorid oder Äthanol durch Zusatz von Diäthyläther auskristallisiert wurde, erfolgte die Entfernung der überschüssigen Gln-, Lys- sowie Arg-Derivate durch Umkristallisation des Polymerpeptids aus reinem Äthanol. Die Kontrolle auf quantitative Entfernung der Überschüsse erfolgte durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel (R_F Polymerpeptid = 0). Die Umsatzkontrolle wurde nach der Ninhydrinmethode unter Verwendung der Durchflußanalyse durchgeführt¹⁶. Nach dieser Methode sind noch ca. 0.2% nicht umgesetzter Aminogruppen quantitativ nachweisbar.

Die Abspaltung des Peptids vom Polyäthylenglycol erfolgte durch Ammonolyse in ÄtOH/CH₂Cl₂ und verlief innerhalb von drei Tagen zu ca. 90%. Die Unlöslichkeit des vollgeschützten Undecapeptids in Wasser wurde zur Trennung von Polymer und Peptid ausgenützt. Durch Digerieren des Ammonolyseprodukts in Wasser war das Peptid nach dem Abfiltrieren frei von Polymeren.

Die Abspaltung der Schutzgruppen (Z, Tos, Boc) vom isolierten Undecapeptid erfolgte durch Behandlung mit HF.

Die Tabelle gibt einen Überblick über den Verlauf der einzelnen Kupplungsreaktionen. Daraus geht hervor, daß alle Kupplungen zu über 99.5% verlaufen sind. Vorversuche haben ergeben, daß unter den üblichen Abspaltungsbedingungen der Boc-Schutzgruppe mit TFA/CH₂Cl₂ (1:1) in der siebten Synthesestufe erhebliche Pyroglutaminbildung eintritt. Um dies zu vermeiden, wurde in dieser Stufe die Abspaltungszeit verkürzt (10 min) und bei tiefer Temperatur gearbeitet. Die Pyroglutaminbildung ließ sich dadurch vollständig verhindern; der etwas zu tiefe Wert von Prolin bei der Aminosäureanalyse des Rohprodukts sowie eine Nebenkomponente bei der Elektrophorese des Endproduktes lassen auf nicht quantitative Abspaltung der Boc-Schutzgruppe von Gln schließen. Zur weiteren Optimierung der Synthese wird nun zur Umgehung dieses Problems *N*-Boc-Gln(Mbh) eingesetzt¹⁷.

Der Test auf überschüssige Komponenten durch Dünnschichtchromatographie ergab, daß nach der Kristallisationsmethode, bei der der PEG-Ester des Peptids unter Bedingungen zur Kristallisation gebracht wird, unter denen die überschüssigen Aminosäurederivate in Lösung bleiben, alle Überschüsse quantitativ entfernbar

¹⁵ H. Hagenmaier und H. Frank, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1973 (1972).

¹⁶ H. Hagenmaier und M. Mutter, Tetrahedron Lett., im Druck.

¹⁷ W. König und R. Geiger, Chem. Ber. 103, 2041 (1970).

waren. Die starke Kristallisationsneigung des Polymerpeptids blieb während des Kettenwachstums konstant, so daß bei sorgfältigem Arbeiten praktisch keine Verluste an Polymerpeptid eintraten.

Tab. Verlauf der Kupplungsreaktionen bei der Synthese von Substanz P

Kupplung	Reaktionszeit (min)	Überschuß an Anhydrid	Ausb. nach Durchflußanalyse (%)
Leu → Met	10	2-fach	>99.8
Gly → Leu	10	2-fach	>99.8
Phe → Gly	10	2-fach	>99.6
Phe → Phe	30	2	>99.5
Gln → Phe	30	2	>99.8
Gln → Gln	30	2	>99.7
Pro → Gln	60	2	>99.5
Lys → Pro	60	3	>99.5
Pro → Lys	60	3	>99.5
Arg → Pro	60	3	>99.6

Das Polymerpeptid war während der gesamten Synthese gut löslich. Interessant dabei war das alternierende Löslichkeitsverhalten in CH_2Cl_2 mit steigender Kettenlänge. In den Stufen 7–9 trat eine starke Viskositätszunahme ein; nach geringem Zusatz von DMF (bis 20%) war dagegen die anfängliche Viskosität (leichtflüssige Lösung) wieder hergestellt. Das vollgeschützte, polymerfixierte Undecapeptid hingegen zeigte das gleiche Löslichkeitsverhalten wie die Polymerpeptide der Stufen 1–6. Durch Untersuchungen des Circular dichroismus¹⁸⁾ in verschiedenen Lösungsmitteln sollte die Frage geklärt werden, ob dieses ungewöhnliche Löslichkeitsverhalten, das auch bei weiteren Peptidsynthesen zwischen Hepta- und Decapeptid feststellbar ist¹⁹⁾, mit der Ausbildung einer Sekundärstruktur zu erklären ist. Abb. 1 zeigt das CD-Spektrum verschiedener Stufen des polymergeschützten Peptids, aus dem ersichtlich ist, daß nach anfänglicher Dominanz der Seitenkettenchromophore (Phe, Pro, Met) der Einfluß des Amidchromophors auf das CD-Spektrum bis zum Undecapeptid zunimmt. Das Dichrogramm des polymergebundenen, vollgeschützten Endprodukts (Kurve 11) deutet eine Helixstruktur an. Die bisherigen Ergebnisse schließen zwar einen möglichen Zusammenhang zwischen Konformation und Löslichkeitsverhalten des Polymerpeptids nicht aus, jedoch liegt noch nicht genügend Material vor, um allgemeingültige Aussagen machen zu können. Möglicherweise üben auch Solvationseffekte der *N*-terminalen Aminosäuren einen entscheidenden Einfluß auf die Löslichkeit des Polymerpeptids²⁰⁾ aus.

Die LPM wird bei der Synthese geeigneter Peptide unter Ausnützung der analytischen Möglichkeiten in Zukunft wichtige Aufschlüsse über den Zusammenhang zwischen Löslichkeitseigenschaft, Konformation und dem kinetischen Verhalten von Peptiden bringen.

¹⁸⁾ E. Bayer, M. Mutter und R. Uhmann, in Vorbereitung.

¹⁹⁾ R. Uhmann, persönl. Mitteilung.

²⁰⁾ W. S. Hancock, D. J. Prescott, P. R. Vagelos und G. R. Marshall, *J. Org. Chem.* **38**, 774 (1973).

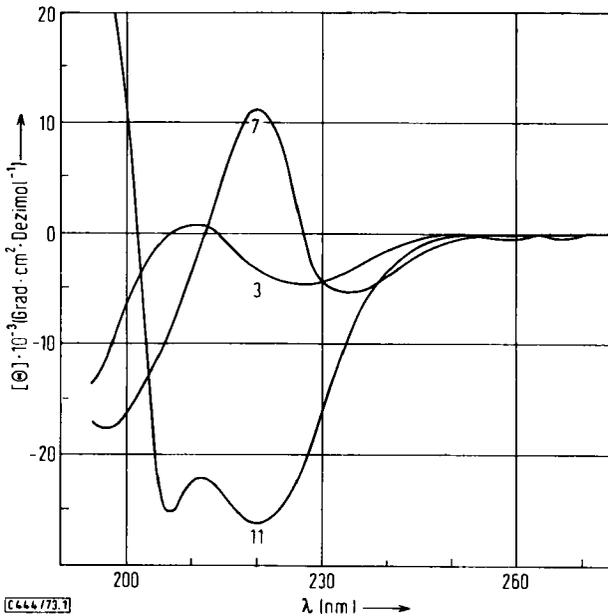


Abb. 1. Circulardichroismus von H-Gly-Leu-Met-OPEG (3), H-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-OPEG (7), Z-Arg(Tos)-Pro-Lys(Z)-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-OPEG (11) in Trifluoräthanol

Gerät: Dichrographie II, Roussel-Jouan, Paris

Die starke solubilisierende Wirkung des Polyäthylenglycols zeigt sich darin, daß das Undecapeptid, das in der vollgeschützten Form selbst in DMF sehr schwer löslich ist, als PEG-Ester das weite Löslichkeitsspektrum von PEG selbst (z. B. in CH_2Cl_2 , DMF, Dioxan, ÄtOH, MeOH, AcOH, H_2O etc.) besitzt. Die große Tendenz des PEG, seine außergewöhnlichen Eigenschaften²¹⁾, wie Löslichkeit und Konformation (α -Helix, kristalliner Zustand), auch nach Fixierung einer Peptidkette an die beiden Kettenenden beizubehalten, zeigt auch das Röntgenspektrum des PEG-gebundenen Undecapeptids (Abb. 2 (II)). Die d -Werte stimmen exakt mit denen des unveresterten, reinen PEG (Abb. 2 (I)) überein. Aufgrund des kristallinen Zustandes von PEG lassen sich die überschüssigen Komponenten in jeder Stufe problemlos entfernen und die hervorragenden, für Polymere ungewöhnlichen Filtriereigenschaften bleiben in allen Synthesestufen erhalten.

Eine Aminosäureanalyse des Undecapeptids vor der Abspaltung durch Ammonolyse ergibt, daß die Beladung (Veresterungsgrad) des PEG von 80% auf 70% gesunken war. Eine Hydrolyse der Esterbindung läßt sich durch absolut wasserfreie Lösungsmittel verhindern. Der Ester ist unter den Abspaltungsbedingungen der Schutzgruppen stabil. Die hohe Ausbeute bei der Ammonolyse deutet auf eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber den klassischen Peptidestern hin, was durch den $-I$ -Effekt der benachbarten Ätherbindung erklärbar ist.

²¹⁾ Katalog „Polyglycole Hoechst“, Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt.

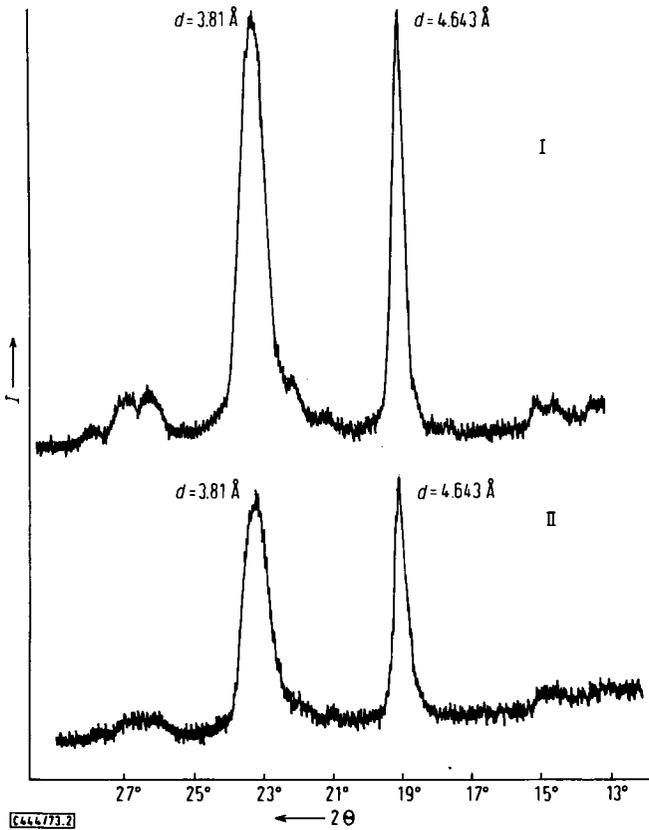


Abb. 2. Röntgenographisches Phasendiagramm von PEG, Mol.-Masse 15000 (I) und Z-Arg(Tos)-Pro-Lys(Z)-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-OPEG (II).
Gerät: Zählrohr-Goniometer Müller-Mikro 111, $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung

Die Trennung zwischen Peptid und Polymer aufgrund von Löslichkeitsunterschieden der beiden Komponenten ist in vielen Fällen möglich. Häufig ist das vollgeschützte Peptid, wie in diesem Beispiel, wasserunlöslich, so daß das gut wasserlösliche PEG leicht abtrennbar ist. Beim Vorliegen anderer Löslichkeitsverhältnisse stehen Trennmethoden wie Extraktion, Verteilung (PEG geht bei Verteilung zwischen H_2O und CH_2Cl_2 oder CHCl_3 praktisch quantitativ in die organische Phase), Säulenchromatographie, Ultrafiltration usw. zur Verfügung und werden in einer separaten Mitteilung beschrieben²²⁾.

Der Test auf vollständige Entfernung des PEG vom Peptid erfolgte durch IR-Spektroskopie: Nach zweimaligem Digerieren des Ammonolyseprodukts mit Wasser ist im IR-Spektrum des isolierten Undecapeptids die intensive, charakteristische Ätherbande des PEG bzw. PEG-Peptids bei 1110 cm^{-1} restlos verschwunden. Ein zusätzlicher Schritt zur Abtrennung des PEG, z. B. durch Gelchromatographie, war deshalb nicht notwendig.

²²⁾ M. Mutter, R. Uhmann und E. Bayer, in Vorbereitung.

Die Reinigung des Peptids nach Abspaltung aller Schutzgruppen erfolgte durch kontinuierliche Hochspannungselektrophorese bei pH 1.9. Die Hauptkomponente verhielt sich dünnstichtchromatographisch in verschiedenen Systemen einheitlich und wurde weiterhin durch Papierelektrophorese, Elementaranalyse und Aminosäureanalyse charakterisiert.

Der Test auf biologische Aktivität²³⁾ ergab gleiche spasmogene Aktivität am isolierten Meerschweinchenileum wie das natürliche Produkt. Der getestete Dosenbereich lag zwischen 10^{-10} g/ml bis 10^{-7} g/ml. Die Gesamtausbeute an reiner, biologisch vollaktiver Substanz P betrug etwa 30%, bezogen auf das C-terminal eingesetzte Methionin.

Der Zeitaufwand der Synthese einschließlich der Reinigung des Endprodukts betrug 10 Tage.

Das Ergebnis hat gezeigt, daß es mit Hilfe der Kristallisationsmethode möglich ist, auch biologisch wirksame Peptide in kurzer Zeit mit guter Ausbeute rein zu synthetisieren.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

A) Veresterung von Boc-Met-OH mit PEG, Mol.-Masse 15000

7.50 g PEG, Mol.-Masse 15000 (= 1 mmol funktionelle Gruppen), 10 mmol Boc-Met-OH und 10 mmol DCCI werden in 50 ml CH_2Cl_2 gelöst und 7 d bei Raumtemp. unter Ausschluß von Feuchtigkeit gerührt. Danach wird abfiltriert (DC-Harnstoff), auf -10°C abgekühlt und das Boc-Met-OPEG durch Zutropfen von kaltem Diäthyläther unter Rühren ausgefällt. Die Mischung wird noch weitere 30 min bei ca. 0°C gerührt, der Niederschlag mit einer Glasfritte abgesaugt und i. Vak. getrocknet. Das weiße Pulver wird erneut aus 30 ml CH_2Cl_2 , wie oben beschrieben, mit Äther ausgefällt. Nach Abfiltrieren und Trocknen des Niederschlags werden 7.50 g Boc-Met-OPEG erhalten. Die Beladung nach Aminosäureanalyse beträgt 0.80 mmol (80%) bzw. 0.11 mmol/g Polymer.

Zur Abspaltung der Boc-Gruppe wird das Produkt in einer Mischung aus Trifluoressigsäure und CH_2Cl_2 (1:1) gelöst (10proz. Lösung) und 30 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird die Lösung eingeeengt und unter Kühlung auf 0°C und starkem Rühren Äther zugegeben, bis alles H-Met-OPEG ausgefallen ist. Die Mischung wird noch weitere 15–30 min bei 0°C gerührt. Danach wird der Niederschlag abgesaugt, in der Fritte nochmals mit Äther aufgeschlämmt und getrocknet. Zur Entfernung restlicher Spuren von TFA wird das Pulver in ca. 50 ml absol. ÄtOH unter leichtem Erwärmen aufgenommen und nochmals mit Äther gefällt. Nach Absaugen und Trocknen i. Vak. werden 7.41 g H-Met-OPEG erhalten.

B) Peptidsynthese

7.00 g H-Met-OPEG (= 0.77 mmol Met) werden in 70 ml CH_2Cl_2 gelöst (Lösung I). In einem separaten Gefäß werden 3 mmol Boc-Leu-OH in wenig CH_2Cl_2 gelöst, auf 0°C abgekühlt und 1.5 mmol DCCI zugefügt. Nach 30 min Rühren bei 0°C wird das Gemisch unter Abfiltrieren des ausgefallenen DC-Harnstoffs zu Lösung I gegeben. Anschließend werden dem Reaktionsgemisch 0.80 mmol *N*-Methylmorpholin langsam zugetropt und die klare Lösung 30 min stehengelassen. Danach wird die Lösung i. Vak. auf ca. 30 ml eingeeengt, auf 0°C abgekühlt und unter heftigem Rühren Diäthyläther zugetropt, bis das

²³⁾ Herrn Dr. Hefti, Fa. Hoffmann-La Roche, danken wir für die Durchführung des Aktivitätstests.

Polymerpeptid quantitativ ausgefallen ist. Die Mischung wird dann noch weitere 30 min bei 0°C gerührt und anschließend mit einer Glasfritte der Niederschlag abgesaugt. Zur vollständigen Entfernung der überschüssigen Boc-Aminosäure wird das Polymerpeptid erneut unter leichtem Erwärmen in absol. ÄtOH (ca. 50 ml) aufgenommen und wie oben beschrieben mit Äther ausgefällt. Der Niederschlag wird abgesaugt und i. Vak. getrocknet. Ausb. 6.98 g Boc-Leu-Met-OPEG.

Nach Einwiegen einer Probe wird der Umsatz durch Ninhydrintest¹⁶⁾ getestet. Anschließend wird das geschützte Polymerpeptid in einer Mischung aus TFA/CH₂Cl₂ (1:1) gelöst (10proz. Lösung) und 30 min bei Raumtemp. gerührt. Dann wird die Lösung stark eingeeengt und das Polymerpeptid unter Kühlung auf 0°C und heftigem Rühren mit Diäthyläther ausgefällt. Nach Absaugen (nach 30 min bei 0°C) und Trocknen des Rückstandes wird in ca. 50 ml absol. ÄtOH aufgenommen und nochmals mit Äther gefällt. Das weiße Pulver wird erneut abgesaugt und i. Vak. bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ausb. 6.95 g H-Leu-Met-OPEG.

Genau in der oben beschriebenen Weise werden nacheinander folgende Aminosäure-derivate gekuppelt (gleiche Mengenverhältnisse):

- a) Boc-Gly-OH: Ausb. an H-Gly-Leu-Met-OPEG = 6.98 g,
- b) Boc-Phe-OH: Ausb. an H-Phe-Gly-Leu-Met-OPEG = 6.93 g,
- c) Boc-Phe-OH: Ausb. an H-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-OPEG = 6.92 g.
- d) Boc-Gln-OH: Der Syntheszyklus wird hierbei wie folgt abgewandelt:

Boc-Gln-OH wird in einer Mischung aus DMF/CH₂Cl₂ (1:2) gelöst.

Die Aktivierungszeit zur Darstellung von Boc-Gln-Anhydrid beträgt nur 5 min. Nachträglich ausfallender DC-Harnstoff wird nach beendeter Kupplung abgesaugt. Zur quantitativen Entfernung des überschüssigen Boc-Gln-OH wird das geschützte Polymerpeptid nach Fällung mit Diäthyläther unter Erwärmen in absol. Äthanol gelöst (10proz. Lösung) und abkühlen gelassen. Nach ca. 2 h bei -5°C wird der Niederschlag durch Zentrifugieren und Dekantieren des Überstandes isoliert und getrocknet. Das Dünnschichtchromatogramm zeigt, daß alle Überschüsse entfernt sind. Die Abspaltung der Boc-Gruppe erfolgt durch 10 min Behandeln mit TFA/CH₂Cl₂ bei 0°C. Anschließend wird das Peptidpolymer direkt aus der Lösung mit Äther ausgefällt. Ausb. an H-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-OPEG = 6.88 g.

- e) Boc-Gln-OH: Gleiches Vorgehen wie unter d) beschrieben.

Ausb. an H-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-OPEG = 6.70 g.

Zum Lösen des Polymerpeptids werden ab dieser Stufe dem CH₂Cl₂ 20% DMF zugesetzt. Die Fällung mit Diäthyläther erfolgt aus DMF.

- f) Boc-Pro-OH: Ausb. an H-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-OPEG = 6.60 g.
- g) Boc-Lys(Z)-OH: Ausb. an H-Lys(Z)-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-OPEG = 6.57 g.
- h) Boc-Pro-OH: Ausb. an H-Pro-Lys(Z)-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-OPEG = 6.25 g.
- i) Z-Arg(Tos)-OH: Die Entfernung der Überschüsse erfolgte durch zweimaliges Umkristallisieren aus Äthanol. Ausb. an Z-Arg(Tos)-Pro-Lys(Z)-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-OPEG = 6.05 g.

In jeder Stufe wurden ca. 200 mg Polymerpeptid für analytische Kontrollen entnommen. Die tatsächliche Ausbeute an vollgeschütztem Polymerpeptid ist somit auf ca. 7.1 g zu korrigieren.

Die Beladung des Polymers an geschütztem Undecapeptid betrug nach dem letzten Syntheszyklus insgesamt 0.7 mmol, bezogen auf 0.80 mmol Boc-Met-OH in der ersten Stufe und 1 mmol funktioneller Gruppen des ursprünglich eingesetzten PEG.

C) Abspaltung und Isolierung des Peptids

Zur Abspaltung des vollgeschützten Peptids vom Träger durch Ammonolyse werden 4.00 g Polymerpeptid in 40 ml absol. Äthanol und 20 ml CH_2Cl_2 gelöst, die Lösung bei -10°C ca. 30 min mit Ammoniak gesättigt (Druckflasche) und 4 d bei Raumtemp. stehen gelassen. Anschließend wird das Lösungsmittel abdestilliert und der feste Rückstand mit 40 ml H_2O (pH 5) digeriert. Das wasserunlösliche Peptid wird abzentrifugiert (30 min bei 15000 U/min), die überstehende Lösung dekantiert und mit ca. 20 ml H_2O behandelt.

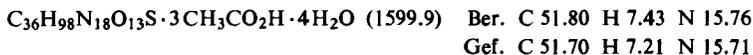
Nach erneutem Abzentrifugieren, Dekantieren und Lyophilisieren bleiben 680 mg rohes Peptid zurück. Ausb. 680 mg Substanz P, vollgeschützt. Das IR-Spektrum des Peptids zeigt, daß das Polymer quantitativ entfernt ist.

Abspaltung der Schutzgruppen: 200 mg vollgeschütztes Peptid werden in 2 ml Anisol 1 h bei 0°C mit ca. 10 ml wasserfreiem HF behandelt, anschließend das HF im N_2 -Strom entfernt und die Lösung im Exsiccator getrocknet. Der Rückstand wird dann mit je 30 ml Essigester und 0.1 N Essigsäure extrahiert. Die Essigesterphase wird dreimal mit H_2O extrahiert und die wäßrigen Phasen vereinigt. Nach 2maligem Lyophilisieren bleiben 180 mg rohes Peptid zurück.

D) Reinigung und Charakterisierung des Peptids

Das Synthese-Rohprodukt wies papierelektrophoretisch bei pH 1.9 vier ninhydrinpositive Banden auf. Die Reinigung und Entsalzung erfolgte durch kontinuierliche Hochspannungselektrophorese im freien Pufferfilm bei pH 1.9 (Elektrolyt: 14.5 ml konz. Ameisensäure und 11.9 ml Eisessig in 5000 ml Wasser). Die Feldstärke betrug ca. 35 V cm^{-1} . Ca. 100 mg Rohprodukt wurden in 5 ml Puffer gelöst und bei der Anode (über Gläschen 1) zugeführt. Die Fraktionseinteilung ergab sich aus Tüpfelproben mit Ninhydrin und nach Sakaguchi, sowie direkten Papierelektrophoresen mit konzentrierten aliquoten Proben aus den einzelnen Gläschen. Die unten angegebenen Fraktionen wurden zweimal mit Wasser lyophilisiert:

Fraktion 27–33: 32 mg weißes, stark hygroskopisches Pulver, das sich dünnschichtchromatographisch wie das natürliche Produkt verhält. Zur Analyse wurde das Produkt während 24 h über P_2O_5 i. Vak. getrocknet.



Aminosäureanalyse: Arg 0.95; Lys 0.98; Pro 1.91; Gln 1.98; Phe 1.93; Gly 1.02; Leu 1.01; Met 1.00.

Fraktion 35–39: Reine Nebenkomponente mit der elektrophoretischen Beweglichkeit von 0.69 wie Lys (Menge nicht bestimmt).

Aus der Aminosäureanalyse des Rohprodukts (Peptidanteil ca. 75%, bezogen auf Met) und der tatsächlich isolierten Menge an reinem Produkt geht hervor, daß ca. 45% des abgespaltenen Peptidmaterials der Sequenz von Substanz P entsprechen. Die Gesamtausbeute an biologisch vollaktivem Produkt beträgt selbst nach den sicher noch optimaler zu gestaltenden Reinigungsoperationen 28%, bezogen auf die in der ersten Stufe am PEG gebundenen 0.80 mmol C-terminales Methionin. Insgesamt ließen sich bei Aufarbeitung aller jeweils anfallenden Substanzmengen in jeder Stufe aus 0.80 mmol Methionin 355 mg reine Substanz P darstellen.