

Zur Festphasenpeptidsynthese des Makrophagen-migrationsinhibierenden Faktors der Maus (mMIF): Darstellung von Peptidfragmenten zur konvergenten Totalsynthese

Thomas Kaiser und Wolfgang Voelter

Tübingen, Abteilung für Physikalische Biochemie des Physiologisch-chemischen Instituts der Universität

Eingegangen am 19. Februar 1997

Herrn Professor Dr. Ekkehard Winterfeldt zum 65. Geburtstag gewidmet

Solid Phase Peptide Synthetic Approaches to Mouse Macrophage Migration Inhibitory Factor (mMIF): Synthesis of Peptide Fragments for a Convergent Solid Phase Peptide Synthetic Strategy

Abstract. For a convergent solid phase synthesis of mMIF, the sequence was separated into 10 fragments leading C-terminal Pro and Gly positions. Racemization of Cys(Trt) was observed during the *in situ* activation process using TBTU/DIEA in stepwise SPPS and also during a fragment conden-

sation of the protected fragment mMIF(53–69) with the mMIF (62–69) peptide resin. To overcome “difficult sequence” problems arising during several stepwise syntheses different coupling methods were performed.

Der migrationsinhibierende Faktor (MIF) ist ein Lymphokin, das sowohl im Bereich der Immunität [1, 2] als auch bei der Zelldifferenzierung [3, 4] und der Zellproliferation [5] entscheidende Funktionen ausübt. Bei der Variante der Maus handelt es sich um ein 12,5 kDa Protein, das aus sämtlichen der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren zusammengesetzt ist und eine intramolekulare Cysteingruppe aufweist [6]. Die murine Form ist im Vergleich mit dem Faktor der Ratte nahezu homolog, dessen Kristallstruktur ausgeprägte Sekundärstrukturbereiche (fünf β -Faltblattregionen und zwei α -Helices) zeigt [7].

Für die Darstellung dieses Proteins wurde die Methode der Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc/tBu-Strategie gewählt [8, 9, 10]. Verschiedene Synthesansätze zur Darstellung der C-terminalen Sequenz mMIF (93–115) charakterisierten diesen Sequenzbereich als “difficult sequence”, dessen schrittweise Darstellung an verschiedenen Harzen durchgeführt und mit 90% Ausbeute über den Weg einer konvergenten Festphasenpeptidsynthese (CSPPS) dargestellt wurde [11]. Aufgrund dieser Ergebnisse bietet sich eine Weiterführung der konvergenten Synthesestrategie an [12, 13], die von Barlos *et al.* für die Totalsynthese von Prothymosin α ,

einem Protein mit 109 AS erfolgreich durchgeführt wurde [14]. Die Darstellung von Peptidfragmenten ermöglicht weiterhin Untersuchungen von Struktur-Aktivitätsbeziehungen.

Ergebnisse und Diskussion

Wahl der Fragmente für einen konvergenten Festphasensynthesansatz

Die Einteilung der Fragmente erfolgte zunächst ausschließlich über die beiden Aminosäuren Gly und Pro in C-terminaler Position. Somit läßt sich Razemisierung als Nebenreaktion im Verlauf der Aktivierung der Fragmente und während der Kondensationsreaktion an der festen Phase vermeiden. Die Sequenz mMIF(1–92) wurde in die Fragmente mMIF(1–11), mMIF(12–18), mMIF(19–32), mMIF(33–44), mMIF(45–52), mMIF(53–69), mMIF(70–82), mMIF(83–92) unterteilt (Abb 1). Auf Grundlage von Sekundärstrukturberechnungen nach Chou und Fasman [15] und Garnier, Osguthorpe und Robson [16] wurde bei der Wahl der Fragmente ferner berücksichtigt, daß Kondensationsreaktionen in Regionen hoher Wahrscheinlichkeit von Sekundärstruk-

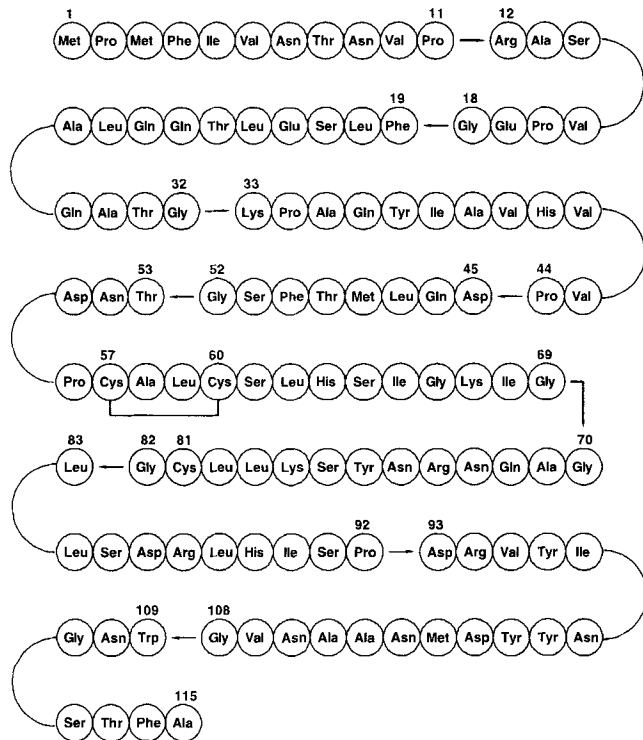


Abb. 1 Einteilung der Sequenz des Makrophagen-migrationsinhibierenden Faktors der Maus (mMIF) in Fragmente; die Kondensationsstellen sind durch Pfeile markiert.

turausbildung weitgehend vermieden wurden, wobei zu berücksichtigen ist, daß für die Vorhersage von ungeschützten Fragmenten ausgegangen wird.

Durchführung der Festphasensynthesen zur Darstellung der Fragmente

In Bezug auf die Fmoc-CSPPS Synthesestrategie wurden alle trifunktionellen Aminosäuren mit permanentem Schutz ihrer Seitenketten eingesetzt (Prinzip des 'maximalen Schutzes') [17]. Einige X-Pro-Sequenzen neigen auf der Stufe des Dipeptidharzes, bei dem anschließenden Fmoc-Abspaltungsprozeß stark zu Diketopiperazinbildung [8, 18]. Durch Verwendung des säurelabilen 2-Chlortrityl-Trägers als Trägermaterial zur Darstellung der geschützten Fragmente läßt sich diese Nebenreaktion vermeiden [19]. Alle Synthesen der gewählten Peptidfragmente wurden auf diesem säurelabilen 'Barlos'-Träger durchgeführt. Dieser Träger, der schon für die Darstellungen der Peptidfragmente mMIF(93–108), Fmoc-Asp(OtBu)⁹³-Arg(Pmc)-Val-Tyr(tBu)-Ile-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Met-Asn(Trt)-Ala-Ala-Asn(Trt)-Val-Gly¹⁰⁸-OH, sowie der C-terminalen Sequenz mMIF(109–115), Fmoc-Trp(Boc)¹⁰⁹-Asn(Trt)-Gly-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Phe-Ala¹¹⁵-OH, erfolgreich eingesetzt wurde [11], ermöglicht eine zusätzliche Kontrolle der entsprechenden

Reaktionen auf der festen Phase über DC-Analytik [20]. Der schrittweise Aufbau der Peptidfragmente erfolgte nach dem 'batch'-Verfahren über automatisierte Synthesezyklen mit alternierenden Fmoc-Abspaltungs- und Acylierungsschritten, die durch den 'Kaiser'-Test (Ninhydrin-Test) [21] und DC-Analytik auf Vollständigkeit überprüft wurden. Für die DC Kontrolle wurde das Peptid innerhalb weniger Minuten mit DCM/TFE/HAc-Lösungen vom Träger abgespalten und die Reinheit der Produkte in geschützter Form untersucht. Die Löslichkeit der dargestellten Peptidfragmente wurde in verschiedenen Lösungsmitteln überprüft.

DMF/NMP + 1% Triton X-100 hat sich als Lösungsmittelsystem bei der CSPPS-Darstellung der C-terminalen Sequenz mMIF(93–115) bewährt. Sehr gute Quelleneigenschaften des Ausgangs-peptidpolymers und rasche Aktivierung des Fragments mMIF(93–108) ermöglichten eine 90%ige Umsetzung innerhalb weniger Stunden [11].

Darstellung der Fragmente

Die Synthese der Fragmente **1b**, **4b**, **7b**, **10b** und **11b** verliefen, abgesehen von notwendigen Doppelacylierungen an bestimmten Positionen, unter Routinebedingungen problemlos.

Im Verlauf der Freisetzungen der geschützten Produkte **1b**, **4b**, **6b**, **6d** und **8b** mit DCM/TFE/HAc bzw. DCM/TFE Lösungen wurde ein teilweiser Verlust (bis 20%) der sehr säurelabilen Trt-Seitenschutzgruppe des His festgestellt [17, 20].

Bei der Darstellung des Fragments mMIF(70–82) (**2b**) wurde im Anschluß an die Kupplung von Fmoc-Lys(Boc)-OH über DC-Analytik ein zusätzlicher "spot" mit geringem ΔR_f -Wert detektiert. Das synthetisierte Fragment wurde in geschützter (DCM/TFE/HAc = 7:2:1) Form freigesetzt und mittels RP-HPLC und FAB-MS analysiert. Dabei zeigte die massenspektrometrische Analyse identische Massen für zwei unterschiedliche HPLC-Fractionen (Abb 3a). In anschließenden Rzemisierungstudien mit den Peptiden mMIF(78–82) und mMIF(77–82) wurden hohe Anteile an D-Cys in Folge von basenkatalysierten Acylierungsreaktionen mittels Aktivester nachgewiesen [22]. Durch eine basenfreie Acylierung mittels symmetrischer Anhydride (PSA) für die Einführung von Fmoc-Cys(Trt)-OH konnte diese Epimerisierungsreaktion bei allen Cys(Trt)-haltigen Fragmenten (**2b**, **3b** und **6b**) minimiert werden (Abb. 3b) [23, 24].

Im Verlauf einer Probesynthese von mMIF(53–69) (**6b**) zeigten sich im Bereich mMIF(61–56) starke 'Verklumpungen' der Peptidharzkugeln und Volumenverminderung des Peptidharzes in DMF. Deshalb wurden in diesem Sequenzbereich Doppelacylierungen an al-

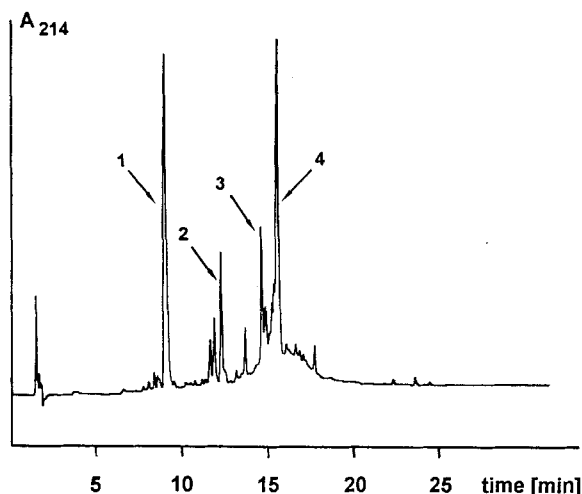


Abb. 4 RP-HPLC-Profil des entschützten Kondensationsprodukts mMIF(53-69) **5c**. HPLC-Bedingungen: Säule, HPLC-Anlage und Fließmittel siehe Abb. 3.; Gradient: 0–5 min 5% B, 1–31 min 5–60% B; Flußrate: 1 ml/min; Detektion: 214 nm; IS-MS Analyse (API III/TAGA 6000 E Massenspektrometer der Firma Sciex, Toronto, Kanada): Peak 1 = mMIF(62-69) **4c**, Peak 2 = Ac-mMIF(62-69), Fraktion 3 = mMIF(53-69) und Peak 4 = mMIF(53-69) (Cys⁵⁷-Cys⁶⁰).

[26] nachgewiesen. Trotz langer Reaktionszeit und einem abschließend durchgeführten “capping”-Schritt konnte in beiden Fällen keine komplette Umsetzung erzielt werden. Edukt **4c** (Peak 1) wurde mit einem RP-HPLC-Anteil von 37% nachgewiesen. Unter modifizierten Bedingungen erfolgte die Darstellung erneut in schrittweiser Form. In Bezug auf die Acylierungsreaktionen wurden die Umsetzung der PSA-Cys ‘Kupplungen’ verlängert, der Ansatz für Ser⁶¹, Leu⁵⁹, Ala⁵⁸ und Pro⁵⁶ vergrößert und nach zeitlicher Verlängerung der ‘Kupplungen’ mit TBTU bzw BOP ein zusätzlicher Acylierungsschritt mit Diisopropylcarbodiimid (DIPCDI/HOBT) durchgeführt. Das Produkt wurde in geschützter Form (**6b**) mit 70% und in vollständig entschützter Form (**6c**) mit 78% RP-HPLC-Anteil erhalten. Die Bildung der intramolekularen Disulfidbrücke erfolgte nach einer Methode von Barlos *et al.* [27] direkt im Anschluß an die Abspaltung von geschütztem Peptid von Peptidharz (**6a**) mit einem 10-fachen Überschuß an Iod in DCM/TFE (7:3). Das erhaltene Rohprodukt **6d** wurde mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH = 7,65:1,35) gereinigt und lieferte in einer Gesamtausbeute von 39% **6d** mit RP-HPLC-Reinheit 88%, sowie 8% weiteres Produkt in detritylierter Form (Abb. 5).

Auch die Darstellungen zu **8b** und **9b** waren von vergleichbaren Phänomenen begleitet, die im Sequenzbereich mMIF(61–56) zur Darstellung von mMIF(53-69) beschrieben wurden. In diesen “difficult sequence” Regionen (36–34) bei **8a** bzw. (29–22) **9a** wurden die Synthesbedingungen in Anlehnung der Darstellung von

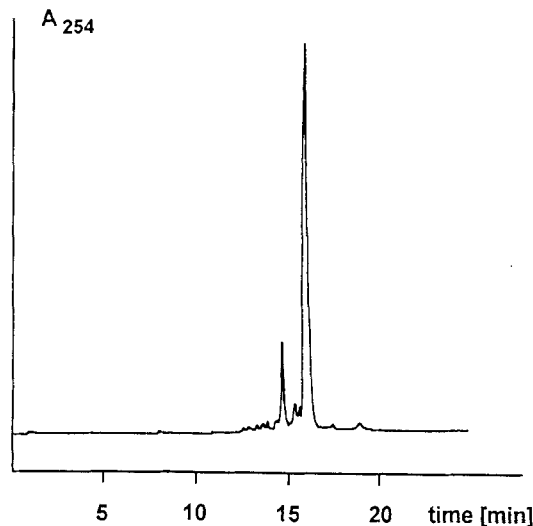


Abb. 5 RP-HPLC-Profil von dem gereinigten geschützten Produkt mMIF(53-69) (Cys⁵⁷-Cys⁶⁰) **6d**. HPLC-Bedingungen: Säule, HPLC-Anlage und Fließmittel siehe Abb. 2; Gradient: 0–1 min 50% B, 1–15 min 50–100% B, 15–31 min 100% B; Flußrate: 1 ml/min; Detektion: 254 nm; Konzentration: ca. 0,5 mg/ml (A/B); Retentionszeit **6d**: 15,92 min.

6a modifiziert. Während **8b** eine Reinheit von ca. 86% RP-HPLC aufwies, konnte der Anteil von **9b** aufgrund geringer Löslichkeit in dem HPLC-Elutionssystem nicht über RP-HPLC ermittelt werden. Die FAB-MS Analyse vom Rohprodukt **9b** weist auf eine hohe Reinheit und nach Freisetzung von Peptidmaterial mit TFA/“scavengern” wurde für **9c** eine Reinheit von 85% ermittelt.

Bis auf die Fragmente **9b**, **8b** und **6b** sind alle weiteren in DMF löslich. **6b** ist in dem Lösungsmittelsystem DMF/NMP + Triton X-100 und **8b** und **9b** durch weiteren Zusatz von DCM löslich. Die dargestellten Fragmente sind somit für einen konvergenten Synthesansatz von mMIF geeignet.

Beschreibung der Versuche

Für die Festphasensynthesen im “batch”-Verfahren wurde ein vollautomatisches Peptidsynthesegerät ECOSYN P, der Firma Eppendorf/Biotronik (Maintal, Deutschland) verwendet. Für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurden DC-Fertigplatten, beschichtet mit Kieselgel 60 F₂₅₄, der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) benutzt. Folgende Laufmittelsysteme wurden verwendet (jeweils v/v/v): A = CHCl₃/MeOH/HAc = 7:1,5:1; B = CHCl₃/MeOH/HAc = 8,65:1,3:0,05 Die Chromatogramme wurden mit UV-Licht bei 254 nm visualisiert und zusätzlich im Anschluß mit Ninhydrin angefärbt. Für die Säulenchromatographie wurde eine “Flash” Säule der Firma J. T. Baker (Baker Chemikalien, Groß-Gerau, Deutschland) eingesetzt. Unter Verwendung von Kieselgel 60 (230–400 μm

Korngröße) der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) als stationäre Phase erfolgte die Trennung mit dem Laufmittelsystem $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (7,65:1,35 v/v). Für die "Reverse Phase High Performance Liquid Chromatographie" (RP-HPLC) wurde folgende Anlage eingesetzt: High Precisions Pump Model 480 und UV-Detektor BT 3030 der Firma Gynkotek (München, Deutschland), C-R 6A CHROMATOPAC-Integrator der Firma Shimadzu (Duisburg, Deutschland) und eine selbstgepackte Säule: 4,6 Nucleosil O 120-5 C_{18} der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland). Als Laufmittel wurden die Systeme: $\text{H}_2\text{O} + 0,05\% \text{TFA}$ (A) und $\text{CH}_3\text{CN} + 0,05\% \text{TFA}$ (B) verwendet. Die Produkte wurden an einem LOC-1 Lyophilisator der Firma Christ (Gefrier Trocknungsanlagen GmbH, Osterode/Harz, Deutschland) gefriergetrocknet. – Kapillarzonenlektrophoresen (CZE) wurden an einem BioFocus CE 3000 Gerät der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) durchgeführt. FAB-Massenspektren wurden mit einem Varian MAT-711 der Firma Finnigan (Bremen, Deutschland) aufgenommen. Laserdesorptions-Massenspektren (LD-MS) wurden mit einem Kratos MALDI III der Firma Shimadzu (Duisburg, Deutschland) durchgeführt. Ionenspray-Massenspektren (IS-MS) wurden mit einem API III/TAGA 6000 E Gerät der Firma Sciex (Toronto, Kanada) vermessen. Aminosäureanalysen wurden an einem LC 3000 der Firma Eppendorf/Biotronik (Maintal, Deutschland) durchgeführt. Der Substitutionsgrad von Fmoc-AS- bzw. Peptidharzen wurde über die UV-Absorption an einem Uvikon 930 Spektrometer der Firma Kontron Instruments (Eching, Deutschland) ermittelt. Hierbei wurden Harzmengen von 1–3 mg eingesetzt und in 3 ml 25% Pip/DMF die Absorption bei 290 und 301 nm gemessen [28, 29]. Die nicht experimentell mit der UV-Methode ermittelten Angaben zur Endbelastung der Peptidharze (in mMol Peptid/g Harz) wurden nach einer von Barlos *et al.* publizierten Formel theoretisch berechnet [20]. – Die Lösungsmittel Dichlormethan (DCM), Diethylether (EE), Methanol (MeOH) und Chloroform (CHCl_3) wurden nach Standardvorschriften getrocknet und destilliert. Die Fmoc-Aminosäuren und das BOP-Kupplungsreagenz sind Produkte der Firma NovaBiochem (Heidelberg, Deutschland). Das TBTU-Reagenz wurde von der Firma Rapp Polymere (Tübingen, Deutschland) bezogen. 2-Chlortritylchlorid-Harz wurde von der Firma CBL (Patras, Griechenland) erworben. Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI), Diisopropylcarbodiimid (DIPCDI), *N*-Hydroxybenzotriazol (HOBt), Diisopropylethylamin (DIEA) und Trifluorethanol (TFE) sind Produkte der Firma Fluka (Buchs, Schweiz). Triton X-100, Thioanisol (TA), Ethandithiol (EDT), Triisopropylsilan (TIS), und Trifluoressigsäure (TFA) werden über die Firma Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. *N,N*-Dimethylformamid (DMF), *N*-Methylpyrrolidon (NMP), 1,4-Dioxan, Acetonitril, Essigsäure (HAc), Acetanhydrid (Ac_2O), Ninhydrin, Chloroform und Piperidin (Pip) sowie alle weiteren nicht aufgeführten Chemikalien sind Produkte der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland).

Durchführung der Peptidsynthesen

Die Darstellungen der Peptidfragmente erfolgte im 'batch'-Verfahren auf, vorab mit der entsprechenden AS beladen. 2-Chlortrityl-Harzen. Die Synthesen wurden unter folgenden

Bedingungen routinemäßig durchgeführt: die Fmoc-Gruppen wurden mit 25% Pip/DMF (v/v, 3x5 min und 1x15 min) abgespalten, und die Acylierungsreaktionen erfolgten in Form von Einfachkupplungen mit dem TBTU-Reagenz und im Fall von Doppelacylierungen mit dem BOP-Reagenz (Fmoc-AS-Derivat/TBTU bzw. BOP/HOBt/DIEA (12,5% DIEA/DMF v/v) = 3:3:1:6 w:w:w:v) in DMF, 35 min). Zwischen den Umsetzungen erfolgten DMF-Waschschritte sowie ein zusätzlicher Dioxan/ H_2O -Schritt (4:1, v/v) im Anschluß an den Fmoc-Abspaltungsprozeß. Die Teilschritte wurden mittels des 'Kaiser'-Tests und mittels DC-Analytik kontrolliert. Die DC-Überprüfung erfolgte nach Abspaltung von Peptidmaterial in geschützter Form mit DCM/TFE/HAc (7:2:1 v/v/v, 10 min, R. T.).

*Fmoc-Leu*⁸³-*Leu-Ser*(*t*Bu)-*Asp*(*O*tBu)-*Arg*(*P*mc)-*Leu-His*(*Trt*)-*Ile-Ser*(*t*Bu)-*Pro*⁹²-*OH* (**1b**)

Für die Synthese wurden 0,65 g (0,62 mMol/g) Fmoc-Pro-'2-Clt'-Harz eingesetzt. Zur vollständigen Einführung wurden Doppelacylierungen bei *Leu*⁸⁸, *Arg*(*P*mc)⁸⁷ und *Leu*⁸³ durchgeführt. Es wurden 1,14 g (84%) des Peptidharzes (**1a**) mit einem theoretischen Substitutionsgrad von 0,301 mMol Peptid/g erhalten.

1,1 g **1a** wurde in 20 ml einer Lösung DCM/TFE/HAc (7:2:1 v/v/v) suspendiert und das Produkt in geschützter Form innerhalb von 2 h bei R.T. abgespalten. Die Lösung wurde vom Harz abfiltriert, das Harz mit mehreren Portionen mit der Abspaltungslösung und DCM gewaschen und die vereinigten Fraktionen im Vakuum konzentriert. Das erhaltene, gelb gefärbte Öl wurde mit eisgekühltem abs. EE versetzt und das ausfallende Rohprodukt abzentrifugiert. Nach einem Waschprozeß mit EE wurde das Produkt im Vakuum getrocknet, in *t*BuOH/ H_2O (4:1) suspendiert und lyophilisiert. Ausbeute: 0,58 g (85%) geschütztes Peptid **1b**. – DC: $R_f = 0,79$ (A); 0,37 (B). RP-HPLC: 50% – 100% B in 31 min, 100% B bis 41 min, Flußrate: 1 ml/min; Detektion bei 254 nm; R_t : 26,49 min (76%) und 20,77 min (detriyliertes Produkt, 20%). – FAB-MS m/z (%): 1807,0 (46) [*M*(-*Trt*)+*H*]⁺, 2049,0 (100) [*M*+*H*]⁺, 2070,4 (32) [*M*+*Na*]⁺. – IS-MS m/z (%): 904,0 (21) [*M*(-*Trt*)+2*H*]²⁺, 1026,0 (42) [*M*+2*H*]²⁺, 1807,0 (70) [*M*(-*Trt*)+*H*]⁺, 2049,0 (100) [*M*+*H*]⁺. Das Produkt ist in DMF und DMF/NMP + 1% Triton X-100 gut löslich.

Von 40 mg **1a** wurde die Fmoc-Gruppe mit 25% Pip/DMF (v/v, 30 min) entfernt und die Freisetzung des Produkts vom Träger unter gleichzeitiger Entfernung der restlichen Schutzgruppen bei R.T. mit 5 ml TFA/TA/EDT/Phenol/ H_2O (78:9:6:4:3 v/v/v/w/v) 2,5 h durchgeführt. Im Anschluß wurde das Harz über eine Glasfritte abfiltriert und die Lösung in 70 ml eisgekühlten, abs. EE überführt. Das ausgefällte Rohprodukt wurde abzentrifugiert, mehrmals mit abs. EE gewaschen und lyophilisiert. Ausbeute: 11 mg (79%) weißes Lyophilisat (**1c**). – RP-HPLC: 5 – 60% B in 31 min, Flußrate: 1 ml/min; Detektion bei 214 nm, R_t : 14,15 min. – CZE: Kapillare: 24 cm x 25 μm (beschichtet), Puffer: 0,1M Phosphatpuffer pH 2,5, Injektion: 8 KV, 10 sec; Lauf: 10 KV, 15 °C, (von + nach -), Detektion bei 214 nm, M_t : = 5,79 min. – IS-MS, m/z (%): 576,0 (100) [*M*+2*H*]²⁺, 1151,0 (50) [*M*+*H*]⁺. – LD-MS, m/z (%): 1151,0 (100) [*M*+*H*]⁺. – ASA: 1,13 *Asp* (1,00); 2,06 *Ser* (2,00); 0,96 *Pro* (1,00); 0,92 *Ile* (1,00); 3,01 *Leu* (3,00); 0,97 *His* (1,00); 0,97 *Arg* (1,00).

Die Synthese wurde unter den oben genannten Bedingungen wiederholt und das Peptidharz mit einer Ausbeute von 1,21 g (88%) erhalten. Die Abspaltung vom Träger lieferte weitere 0,61 g (82%) **1b**, das über FAB-MS und RP-HPLC bestätigt wurde.

Fmoc-Gly⁷⁰-Ala-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Arg(Pmc)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Leu-Cys(Trt)-Gly⁸²-OH (2b)

Es wurden 0,4 g (0,66 mMol/g) Fmoc-Gly-'2-Clt'-Harz eingesetzt. Da unter den Standardaktivierungsbedingungen für Fmoc-Cys(Trt)-OH starke Razemisierung festgestellt wurde, ist dieses AS-Derivat über die Methode der Symmetrischen Anhydride (PSA) [30] eingeführt worden. Hierzu wurden 0,92 g (1,56 mMol Fmoc-Cys(Trt)-OH und 0,15 g (0,74 mMol) DCCI in 10 ml DCM vorgelegt und bei 0 °C 40 min gerührt. Die Lösung wurde von präzipitiertem Dicyclohexylharnstoff (DCU) über eine Glasfritte (Porengröße 3) abgetrennt und unter Vakuum in der Kälte auf ein geringes Volumen eingengt. Nach Zugabe von 4 ml DMF wurde die Lösung dem Peptidharz zugetropft und 40 min bei R.T. umgesetzt. Nach anschließendem Waschen mit MeOH wurde die Synthese unter automatischen Bedingungen fortgesetzt. Asn(Trt)⁷³ wurde doppelt gekuppelt und im Bereich (72-75) zusätzliche "capping"-Schritte (5 ml DCM + 1 ml DIEA + 0,52 ml Ac₂O, 10 min R.T.) durchgeführt. Es wurden 1,00 g (89%) des Peptidharzes (**2a**) mit einem theoretischen Substitutionsgrad von 0,232 mMol Peptid/g erhalten.

0,7 g **2a** wurde in 20 ml einer Lösung DCM/TFE/HAC (7:2:1 v/v/v) suspendiert und das Produkt in geschützter Form innerhalb von 2 h bei R.T. abgespalten. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter Erhalt von **1b** beschrieben. Das geschützte Peptid **2b** wurde mit einer Ausbeute von 0,47 g (94%) erhalten. – DC: $R_f = 0,75$ (A); 0,43 (B). RP-HPLC: 80 – 100% B in 11 min, 100% B bis 31 min, Flußrate: 1 ml/min; Detektion bei 254 nm; R_t : 16,93 min (92%) (R_t von D-Cys mMIF(70–83) Epimer: 14,85 min). – FAB-MS m/z (%): 3114,4 (42) [M+Na]⁺, 3136,1 (100) [M+2Na]⁺. Das Produkt ist in DMF und DMF/NMP + 1% Triton X-100 gut löslich.

Von 0,3 g **2a** wurde zunächst die Fmoc-Gruppe mit 25% Pip/DMF (v/v, 30 min) entfernt und im Anschluß das Peptid mit 10 ml TFA/TA/TIS/H₂O (90:5:4:1 v/v/v/v) innerhalb von 3 h bei R.T. abgespalten und entschützt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter Erhalt von **1c** beschrieben. Ausbeute: 83 mg (84%) weißes Lyophilisat (**2c**). – RP-HPLC: 5 – 60% B in 31 min, Flußrate: 1 ml/min; Detektion bei 214 nm, R_t : 13,05 min (R_t von D-Cys mMIF(70–82) Epimer: 14,24 min). – CZE: Kapillare: 24 cm × 25 µm (beschichtet), Puffer: 0,1M Phosphatpuffer pH 2,5, Injektion: 10 KV, 10 sec; Lauf: 10 KV, 15 °C, (von + nach –), Detektion bei 214 nm, M_t : = 5,84 min. – IS-MS, m/z (%): 712,5 (100) [M+2H]²⁺, 723,5 (60) [M+Na+H]²⁺, 734,5 (25%) [M+2Na]²⁺, 1424,5 (45) [M+H]⁺, 1446,0,5 (20) [M+Na]⁺. – ASA: 1,93 Asp (2,00); 0,97 Ser (1,00); 1,05 Glu (1,00); 2,11 Gly (2,00); 1,02 Ala (1,00); 0,86 Cys (1,00); 2,00 Leu (1,99); 0,99 Tyr (1,00); 1,06 Lys (1,00); 1,01 Arg (1,00). Die Bestimmung von Cys erfolgte nach Oxidation mit Perameisensäure und anschließender Detektion des entsprechenden Sulfonsäurederivates.

Die Synthese wurde unter den oben genannten Bedingungen mit jeweils 0,5 g Fmoc-Gly-'2-Clt'-Harz zweimal wiederholt und lieferte die Peptidharze mit einer Ausbeute von

1,21 g (85%) und 1,18 g (83%). Nach Abspaltung von den Trägern wurde mit 0,77 g (89%) und 0,74 g (90%) weiteres geschütztes Peptid **2b** erhalten, das über FAB-MS und RP-HPLC überprüft wurde.

Fmoc-Thr(tBu)⁵³-Asn(Trt)-Asp(OiBu)-Pro-Cys(Trt)-Ala-Leu-Cys(Trt)-Ser(tBu)⁶¹-OH (3b)

Für die Synthese wurden 0,55 g (0,55 mMol/g) Fmoc-Ser(tBu)-'2-Clt'-Harz eingesetzt und Fmoc-Cys(Trt)-OH über die PSA-Methode, wie bei der Darstellung von (**2a**) beschrieben, eingeführt. Es wurden 1,02 g (91%) des Peptidharzes (**3a**) mit einem ermitteltem Substitutionsgrad von 0,29 mMol Peptid/g erhalten.

Von 0,9 g **3a** wurde mit 20 ml einer Lösung DCM/TFE/HAC (7:2:1 v/v/v) das Produkt in geschützter Form innerhalb von 2 h bei R.T. vom Träger abgespalten. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter Erhalt von **1b** beschrieben. Das geschützte Peptid **3b** wurde mit einer Ausbeute von 0,48 g (90%) erhalten. – DC: $R_f = 0,96$ (A). RP-HPLC: 50 – 100% B in 15 min, 100% B bis 31 min, Flußrate: 1 ml/min; Detektion bei 254 nm; R_t : 18,18 min (> 95%). – FAB-MS m/z (%): 2061,4 (100) [mMIF(53–61)+Na]⁺, 2083,3 (45) [mMIF(53–61)+2Na]⁺. Das Produkt ist in DMF und DMF/NMP + 1% Triton X-100 gut löslich.

Von 0,11 g **3a** wurde die Fmoc-Gruppe mit 25% Pip/DMF (v/v, 30 min) entfernt und im Anschluß das Peptid innerhalb von 3 h bei R.T. mit 5 ml TFA/TA/TIS/H₂O (94:2:2:2 v/v/v/v) abgespalten und entschützt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter Erhalt von **1c** beschrieben. Ausbeute: 26 mg (88%) weißes Lyophilisat (**3c**). – RP-HPLC: 5 – 60% B in 31 min, Flußrate: 1 ml/min; Detektion bei 214 nm, R_t : 12,21 min. – IS-MS, m/z (%): 923,5 (100) [M+H]⁺, 945,5 (48) [M+Na]⁺, 961,0 (10) [M+K]⁺. – ASA: 2,15 Asx (2,00); 1,03 Thr (1,00); 0,69 Ser (1,00); 1,14 Pro (1,00); 1,08 Ala (1,00); 1,61 Cys (2,00); 1,02 Leu (1,00). Die Bestimmung von Cys erfolgte nach Oxidation mit Perameisensäure und anschließender Detektion des entsprechenden Sulfonsäurederivates.

Die Synthese wurde mit 0,5 g Fmoc-Ser(tBu)-'2-Clt'-Harz wiederholt und lieferte weitere 0,89 g (88%) Peptidharz. Nach Abspaltung von den Trägern wurde mit 0,47 g (89%) weiteres geschütztes Peptid **3b** erhalten, das über FAB-MS und RP-HPLC überprüft wurde.

Fmoc-Leu⁶²-His(Trt)-Ser(tBu)-Ile-Gly-Lys(Boc)-Ile-Gly⁶⁹-OH (4b)

Die Darstellung wurde mit 0,5 g (0,38 mMol/g) Fmoc-Gly-'2-Clt'-Harz durchgeführt. Eine Doppelacylierung erfolgte zur vollständigen Einführung von Ser⁶⁴. Es wurden 0,91 g (96%) des Peptidharzes (**4a**) mit einem ermitteltem Substitutionsgrad von 0,25 mMol Peptid/g erhalten.

Von 0,2 g **4a** wurde mit 5 ml einer Lösung DCM/TFE (7:3 v/v) das Produkt in geschützter Form innerhalb von 2,5 h bei R.T. vom Träger abgespalten. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter Erhalt von **1b** beschrieben. Das geschützte Peptid **4b** wurde mit einer Ausbeute von 62 mg (87%) erhalten. – RP-HPLC: 50 – 100% B in 15 min, 100% B bis 31 min, Flußrate: 1 ml/min; Detektion bei 254 nm; R_t : 12,08 min (90%) und 6,50 min (detriyliertes Produkt, 7%). – FAB-MS m/z (%): 1224,8 (15) [(M-Trt)+ Na]⁺, 1445,1 (18) [M+H]⁺, 1468,2

(100) [M+Na]⁺, 1488,4 (60) [M+2Na]⁺. Das Produkt ist in DMF und DMF/NMP + 1% Triton X-100 gut löslich.

Von 0,2 g **4a** wurde nach Entfernen der Fmoc-Gruppe mit (25% Pip/DMF v/v, 30 min) das Peptid mit 5 ml TFA/TA/TIS (96:2:2 v/v/v) innerhalb von 3 h bei R.T. abgespalten und entschützt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter Erhalt von **1c** beschrieben. Ausbeute: 38 mg (93%) weißes Lyophilisat (**4c**). – RP-HPLC: 5 – 60% B in 31 min, Flußrate: 1 ml/min; Detektion bei 214 nm, R_t : 11,19 min. – CZE: Kapillare: 25 cm × 50 µm (beschichtet), Puffer: 0,1M Phosphatpuffer pH 2,5, Injektion: 2 psi × sec; Lauf: 10 KV, R.T., (von + nach –), Detektion bei 200 nm, M_t : 5,27 min. – IS-MS, m/z (%): 412,5 (10) [M+2H]²⁺, 824,5 (100) [M+H]⁺, 846,5(30) [M+Na]⁺, 862,5 (10) [M+K]⁺. – ASA: 0,76 Ser (1,00); 2,09 Gly (2,00); 1,99 Ile (2,00); 1,01 Leu (1,00); 1,06 His (1,00); 1,09 Lys (1,00).

Fmoc-Thr(tBu)⁵³-Asn(Trt)-Asp(OtBu)-Pro-Cys(Trt)-Ala-Leu-Cys(Trt)-Ser(tBu)⁶¹-Leu⁶²-His(Trt)-Ser(tBu)-Ile-Gly-Lys(Boc)-Ile-Gly⁶⁹-OH (5b, 6b)

a) Für einen Kondensationsansatz zur Darstellung von **5b** wurden 0,5 g des Peptidharzes **4a** vorgelegt und zunächst die Fmoc-Deblockierung unter Routinebedingungen ausgeführt. – DC: R_f : 0,45 (A). Die anschließende Umsetzung erfolgte in dem Lösungsmittelgemisch DMF/NMP + 1% Triton X-100 mit 2,5 Äquiv. Fragment **3b** unter Zusatz von CuCl₂ [25]. Hierzu wurden 633 mg **3b** (0,31 mMol), 118 mg HATU (0,31 mMol), 33,4 mg HOAt (0,25 mMol), 8,3 mg CuCl₂ (0,06 mMol) in 4 ml Lösungsmittel gelöst und nach Zugabe von 107,15 µl DIEA (0,622 mMol) 45 min bei R.T. aktiviert. Die resultierende braungelbgefärbte Lösung wurde mit dem Peptidharz versetzt und der Reaktionsverlauf durch Entnahme von Harz über DC und 'Kaiser'-Tests kontrolliert. Nach 21 h wurde die Reaktion beendet (Kaiser-Test: gelbbraune Lösung und braunes Harz, DC: R_{f1} = 0,78 (UV-aktiv, stark), R_{f2} = 0,72 (UV-aktiv, schwach), R_{f3} = 0,51 (UV- und Ninhydrinaktiv, schwach), R_{f4} = 0,42 (UV-aktiv, schwach) (A) und ein zusätzlicher "capping"-Schritt (5 ml DCM + 0,5 ml DIEA + 0,52 ml Ac₂O + 0,5 ml DIEA; 20 min) ausgeführt. Es wurden 574,5 mg (79%) Peptidharz (**5a**) mit einem ermitteltem Substitutionsgrad von 0,14 mMol Peptid/g (77%) erhalten. 0,1 g **5a** wurden, wie unter Erhaltung von **4b** beschrieben, abgespalten und 35 mg (78%) **5b** erhalten. Von weiteren 0,2 g **5a** wurde nach routinemäßiger Fmoc-Abspaltung mit 5 ml (TFA/Phenol/Tis/H₂O = 94:2:2:2) das Peptid **5c** in vollständig entschützter Form innerhalb von 3 h bei R.T. vom Träger freigesetzt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter Erhalt von **1c** beschrieben, und es wurden 35 mg (73%) grüngelbtes Rohprodukt **5c** erhalten. Die RP-HPLC/IS-MS Analyse lieferte ca. 50% Produkt **5c** sowie ca. 37% Edukt **4c**.

b) Die schrittweise Darstellung von **6b** wurde mit 0,53 g (0,64 mMol/g) Fmoc-Gly-'2-Clf'-Harz durchgeführt. Im Sequenzbereich (56–61) wurden folgende Modifikationen durchgeführt: Die Fmoc-Abspaltungen wurden um einen weiteren Deblockierungsschritt ergänzt (17% Pip in DMF/DCM(1:2) (v:v:v), 1×3 min). Die Umsetzung der PSA-Cys 'Kupplungen' wurden auf 90 min. verlängert. Für die weiteren Acylierungsreaktionen bei Ser⁶¹, Leu⁵⁹, Ala⁵⁸ und Pro⁵⁶ wurden die Ansätze zunächst auf 5 Äquiv. vergrößert und nach zeitlicher Verlängerung der TBTU bzw. BOP 'Kupplungen' (jeweils 40

min) ein zusätzlicher Acylierungsschritt mit DIPCDI (Fmoc-AS/DIPCDI/HOBt = 5:5:5 w:v:w, 45 min) in DMF durchgeführt. Des weiteren erfolgten im Anschluß zusätzliche Acetylierungsschritte (5 ml DCM + 0,5 ml DIEA + 0,52 ml Ac₂O + 0,5 ml DIEA; 20 min). Es wurden 1,26 g (82%) des Peptidharzes (**6a**) mit einem ermitteltem Substitutionsgrad von 0,18 mMol Peptid/g erhalten.

0,3 g **6a** wurden, wie unter Erhaltung von **4b** beschrieben, abgespalten und 161 mg (92%) **6b** erhalten. DC: R_f = 0,79 (A). – RP-HPLC: 50 – 100% B in 15 min, 100% B bis 31 min, Flußrate: 1 ml/min; Detektion bei 254 nm; R_t : 21,74 min (70% RP-HPLC). –FAB-MS m/z (%): 3025,1 (40) [(M-Trt) + Na]⁺, 3246,3 (20) [M+H]⁺, 3268,1 (100) [M+Na]⁺, 3289,3 (30) [M+2Na]⁺. Das Produkt ist in DMF und DMF/NMP + 1% Triton X-100 gut löslich.

Von weiteren 0,1 g **6a** wurde nach routinemäßiger Fmoc-Abspaltung das Peptid mit 5 ml (TFA/Phenol/Tis/H₂O = 94:2:2:2) in vollständig entschützter Form innerhalb von 3 h bei R.T. vom Träger freigesetzt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter Erhalt von **1c** beschrieben. Das Rohprodukt (**6c**) wurde mit einer Ausbeute von 28 mg (89%) erhalten. – RP-HPLC: 5 – 60% B in 31 min, Flußrate: 1 ml/min; Detektion bei 214 nm; R_t : 14,14 min. – CZE: Kapillare: 25 cm × 50 µm (beschichtet), Puffer: 0,1M Phosphatpuffer pH 2,5, Injektion: 2 psi × sec; Lauf: 10 KV, R.T., (von + nach –), Detektion bei 200 nm, M_t : 9,19 min. – IS-MS m/z (%): 865,0 (100) [M+2H]²⁺, 876,0 (72) [(M+H+Na)²⁺, 884,0 (19) [M+2Na]²⁺, 887,0 (25) [M+2Na]²⁺, 1729,0 (62) [M+H]⁺, 1751,0 (25) [M+Na]⁺. – ASA: 1,85 Asx (2,00); 0,90 Thr (1,00); 1,91 Ser (2,00); 1,09 Pro (1,00); 2,14 Gly (2,00); 1,04 Ala (1,00); 1,81 Cys (2,00); 2,02 Ile (2,00); 1,95 Leu (2,00); 1,23 His (1,00); 1,07 Lys (1,00). Die Bestimmung von Cys erfolgte nach Oxidation mit Perameisensäure und anschließender Detektion des entsprechenden Sulfonsäurederivates. Die Synthese wurde mit 0,5 g bzw 0,6 g Fmoc-Gly-'2-Clf'-Harz unter den oben genannten Bedingungen wiederholt und lieferte die entsprechenden Peptidharze mit Ausbeuten von 1,21 g (83%) und 1,36 g (79%) mit einem berechneten Substitutionsgrad von 0,221 mMol Peptid/g. In beiden Fällen wurden geringe Mengen Peptidmaterials in geschützter und vollständig entschützter Form abgespalten und die Produkte über RP-HPLC und Massenspektrometrie bestätigt.

Fmoc-Thr(tBu)⁵³-Asn(Trt)-Asp(OtBu)-Pro-Cys⁵⁷-Ala-Leu-Cys⁶⁰-Ser(tBu)-Leu-His(Trt)-Ser(tBu)-Ile-Gly-Lys(Boc)-Ile-Gly⁶⁹-OH (Cys⁵⁷-Cys⁶⁰) (6d)

0,86 g des Peptidharzes (**6a**) wurde 2 h bei R.T. mit 10 ml DCM/TFE (7:3) versetzt. Die Lösung wurde über eine Glasfritte von dem Trägermaterial abgetrennt direkt in eine Lösung von 0,39 g (1,55 mM) I₂ in 5 ml DCM/TFE (7:3) überführt. Das Harz wurde in kleinen Portionen mit insgesamt 3 ml Spaltlösung gewaschen, die ebenfalls sofort zu der Iod-Lösung gegeben wurden. Nach 10 min Rühren bei R.T. wurde die Lösung mit 130 ml einer wäßrigen Na₂S₂O₃-Lösung (0,82 g Na₂S₂O₃, 3,1 mM) versetzt und die organische Phase in einen Schütteltrichter abgetrennt. Die wäßrige Phase wurde zweimal mit 100 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluß mit einer gesättigten NaCl/5%iger Zitronensäure-Lösung gleichen Volumens extrahiert. Nach Abtrennung der organischen Phase wurde das Lösungs-

mittel im Vakuum entfernt und mit eisgekühltem Et₂O versetzt. Das Präzipitat wurde abfiltriert, in mehreren Portionen mit H₂O und Et₂O gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 275 mg (65%) Rohprodukt (**6d**) erhalten, das über FAB-MS und RP-HPLC bestätigt wurde. Eine weitere Aufreinigung erfolgte über Säulenchromatographie mit 20 g Kieselgel mit dem Laufmittelsystem CHCl₃/MeOH (7,65:1,35 v/v). Die Produktfraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde mit eisgekühltem Et₂O versetzt und das Präzipitat abzentrifugiert. Nach Trocknung unter Vakuum wurde das Produkt in *t*BuOH/H₂O (4:1, v/v) gelöst und lyophilisiert. Es wurde 168 mg (61%) gereinigtes **6d** mit einer Gesamtausbeute von 39% in Bezug auf den ermittelten Substitutionsgrad vom Peptidharz erhalten. – DC: *R*_f = 0,66 (A);. – RP-HPLC: 50 – 100% B in 15 min, 100% B bis 31 min, Flußrate: 1 ml/min; Detektion bei 254 nm; *R*_t: 15,92 min (88% RP-HPLC) sowie detriptyliertes Produkt (*R*_t: 14,75 min, 8% RP-HPLC). – FAB-MS *m/z* (%): 2517,0 (37) [(M-Trt)+H]⁺, 2540,7 (35) [(M-Trt)+Na]⁺, 2760,8 (30) [M+H]⁺, 2781,5 (100) [M+Na]⁺, 2805,1 (20) [M+2Na]⁺. Das Produkt ist in DMF und DMF/NMP + 1% Triton X-100 gut löslich.

Von 20 mg **6d** wurde zunächst die Fmoc-Gruppe innerhalb von 30 min mit 30% Pip/DMF abgespalten und nach anschließender EE-Fällung das abzentrifugierte Produkt im Vakuum getrocknet. Mit 2 ml Abspaltreagenz TFA/H₂O (97:3 v/v) wurde das Peptid innerhalb von 3 h bei R.T. freigesetzt und mit einer Ausbeute von 12,1 mg (95%) (**6e**) erhalten. – RP-HPLC: 5 – 60% B in 31 min, Flußrate: 1 ml/min; Detektion bei 214 nm; *R*_t: 14,97 min. – IS-MS *m/z* (%): 864,0 (100) [M+2H]²⁺, 875,0 (25) [(M+H+Na)²⁺, 1727,0 (25) [M+H]⁺. – LD-MS *m/z* (%): 1728,6 (100) [M+H]⁺. – ASA: 1,83 Asx (2,00); 0,97 Thr (1,00); 2,05 Ser (2,00); 1,05 Pro (1,00); 1,99 Gly (2,00); 1,08 Ala (1,00); 2,08 Cys (2,00); 1,81 Ile (2,00); 1,93 Leu (2,00); 1,17 His (1,00); 1,03 Lys (1,00). Die Analyse von Cys erfolgte nach Oxidation mit Perameisensäure und anschließender Detektion des entsprechenden Sulfonsäurederivates.

Die Abspaltung mit sofortiger Oxidation wurde mit 1,2 g und 1,3 g Peptidharz in den entsprechenden Ansatzgrößen unter ansonsten gleichen Bedingungen wiederholt und lieferte weiteres Rohprodukt **6d** mit Ausbeuten von 460 mg (63%) bzw. 458 mg (58%). Die anschließende säulenchromatographische Aufarbeitung der jeweiligen Produkte (35 g Kieselgel, Laufmittel: CHCl₃/MeOH = 7,65:1,35 v/v) resultierte in weiteren 303 mg (66%) bzw. 284 mg (62%) gereinigten Produkt **6d**.

Fmoc-Asp(OtBu)⁴⁵-Gln(Trt)-Leu-Met-Thr(tBu)-Phe-Ser(tBu)-Gly⁵²-OH (7b)

Die Darstellung wurde mit 0,5 g (0,69 mMol/g) Fmoc-Gly-'2-Clt'-Harz durchgeführt. Es wurden 0,86 g (85%) des Peptidharzes (**7a**) mit einem ermitteltem Substitutionsgrad von 0,35 mMol Peptid/g erhalten.

Von 0,82 g **7a** wurde mit 15 ml einer Lösung DCM/TFE/HAc (7:2:1 v/v/v) das Produkt in geschützter Form innerhalb von 2 h bei R.T. vom Träger abgespalten. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter Erhalt von **1b** beschrieben. Das geschützte Peptid **7b** wurde mit einer Ausbeute von 422 mg (96%) erhalten. – DC: 0,97 (A). – RP-HPLC: 50 – 100% B in 21

min, 100% B bis 31 min, Flußrate: 1 ml/min; Detektion bei 254 nm; *R*_t: 17,52 min (96%). – FAB-MS *m/z* (%): 1552,4 (40) [M+Na]⁺, 1574,6 (100) [M+2Na]⁺, 1590,8 (20) [M+Na+K]⁺. Das Produkt ist in DMF und DMF/NMP + 1% Triton X-100 gut löslich.

Von 40 mg **7a-1** wurde nach Entfernen der Fmoc-Gruppe mit (25% Pip/DMF v/v, 30 min) das Peptid mit 5 ml TFA/EDT/TIS (97:2:1 v/v/v) innerhalb von 3 h bei R.T. abgespalten und entschützt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter Erhalt von **1c** beschrieben. Ausbeute: 12 mg (96%) weißes Lyophilisat (**7c**). – RP-HPLC: 5 – 60% B in 31 min, Flußrate: 1 ml/min; Detektion bei 214 nm, *R*_t: 14,38 min (*R*_t des oxidierten Produkts [mMIF(45–52) Met(O)]: 12,02 min). – IS-MS, *m/z* (%): 898,5 (100) [M+H]⁺, 920,5 (25) [M+Na]⁺, 1796,5 (20) [M+H]⁺- Dimere. LD-MS, *m/z* (%): 898,2 (100) [M+H]⁺. – ASA: 0,99 Asx (1,00); 0,96 Thr (1,00); 0,96 Ser (1,00); 1,12 Glx (1,00); 1,03 Gly (1,00); 0,85 Met (1,00); 1,02 Leu (1,00); 1,06 Phe (1,00).

Die Synthese wurde unter entsprechenden Bedingungen wiederholt und lieferte 0,91 g (90%) Peptidharz. Die Abspaltung vom Träger lieferte weitere 458 mg (94%) Produkt **7b**, das über FAB-MS und RP-HPLC überprüft wurde.

Fmoc-Lys(Boc)³³-Pro-Ala-Gln(Trt)-Tyr(tBu)-Ile-Ala-Val-His(Trt)-Val-Val-Pro⁴⁴-OH (8b)

Für die Synthese wurden 0,51 g (0,67 mMol/g) Fmoc-Pro-'2-Clt'-Harz eingesetzt. An den Positionen Gln³⁶, Ala³⁵ und Pro³⁴ wurden Doppelkupplungen ausgeführt, und es erfolgten zusätzliche "capping" Reaktionen (5 ml DCM + 0,5 ml DIEA + 0,52 ml Ac₂O + 0,5 ml DIEA; 10 min R.T.) im Bereich (37–34) In diesem Sequenzabschnitt wurden auch die Fmoc-Abspaltungen um einen weiteren Deblockierungsschritt ergänzt (17% Pip in DMF/DCM(1:2) (v:v:v), 1×3 min). Es wurden 0,84 g (75%) Peptidharz (**8a**) mit einem ermitteltem Substitutionsgrad von 0,21 mMol Peptid/g erhalten.

0,71 g **8a** wurden in 15 ml einer Lösung DCM/TFE (8:2 v/v) suspendiert und das Produkt in geschützter Form innerhalb von 2,5 h bei R.T. vom Träger abgespalten. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter Erhalt von **1b** beschrieben. Mit einer Ausbeute von 293 mg (90%) wurde das geschützte Peptid **8b** erhalten. – DC: 0,84 (A). – RP-HPLC: 50 – 100% B in 21 min, 100% B bis 31 min, Flußrate: 1 ml/min; Detektion bei 254 nm; *R*_t: 19,39 min (68%) sowie detriptyliertes Produkt bei 17,71 min (18%). – FAB-MS *m/z* (%): 1963,4 (15) [M-Trt)+Na]⁺, 2205,5 (35) [M+Na]⁺, 2221,2 (25) [M+K]⁺; 2227,4 (100) [M+2Na]⁺. Das Produkt ist in DMF/NMP + 1% Triton X-100 / DCM (1:1) löslich.

Von 130 mg **8a** wurde zunächst die Fmoc-Gruppe entfernt (25% Pip/DMF v/v, 30 min). Das Peptid wurde mit 5 ml TFA/EDT/H₂O/TIS (94:2:2:2 v/v/v/v) innerhalb von 3 h bei R.T. abgespalten und entschützt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter Erhalt von **1c** beschrieben. Ausbeute: 33 mg (91%) weißes Lyophilisat (**8c**). – RP-HPLC: 5 – 60% B in 31 min, Flußrate: 1 ml/min; Detektion bei 214 nm, *R*_t: 14,60 min. – IS-MS *m/z* (%): 662,0 (20) [M+2H]²⁺, 1322,5 (100) [M+H]⁺, 1344,5 (10) [M+Na]⁺. – LD-MS *m/z* (%): 1322,8 (100) [M+H]⁺, 1345,8 (75) [M+Na]⁺, 1365,1 (30) [M+2Na]⁺, 1380,6 (10) [M+Na+K]⁺. – ASA: 24 h Hydrolyse bei 110 °C: 1,05 Glx (1,00); 2,34 Pro (2,00); 2,29 Ala (2,00); 1,98 Val (3,00); 1,03 Ile (1,00); 1,04 Tyr (1,00); 1,05 His (1,00); 1,21

Lys (1,00). 16 h Hydrolyse bei 150 °C: 0,91 Glx (1,00); 2,20 Pro (2,00); 2,10 Ala (2,00); 3,01 Val (3,00); 0,72 Ile (1,00); 0,92 Tyr (1,00); 1,07 His (1,00); 1,06 Lys (1,00).

Die Synthese wurde unter entsprechenden Bedingungen mit 0,5 g Fmoc-Pro-'2-Clt'-Harz wiederholt und lieferte 0,89 g (79%) Peptidharz. Die Abspaltung vom Träger führte zu weiteren 375 mg (92%) Produkt **8b**.

Fmoc-Phe¹⁹-Leu-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Leu-Thr(tBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Leu-Ala-Gln(Trt)-Ala-Thr(tBu)-Gly³²-OH (9b)

Für die Darstellung wurden 0,54 g (0,63 mMol/g) Fmoc-Gly-'2-Clt'-Harz eingesetzt. Im Bereich (29–22) wurden die Fmoc-Abspaltungen um einen weiteren Deblockierungsschritt ergänzt (17% Pip in DMF/DCM(1:2) (v:v:v), 1×3 min) und Doppelkupplungen durchgeführt. Zur Einführung von Gln²⁵ erfolgten eine zusätzliche DIPCADI-Acylierung (siehe unter Erhalt von **6a**) und ab Position 25 zusätzliche Acetylierungsreaktionen (siehe unter Erhalt von **6a**). Es wurden 1,01 g (78%) des Peptidharzes (**9a**) mit einem ermittelten Substitutionsgrad von 0,21 mMol Peptid/g erhalten.

1 g **9a** wurde mit 15 ml einer Lösung DCM/TFE/HAc (7:2:1 v/v/v) versetzt und das Produkt in geschützter Form innerhalb von 2 h bei R.T. vom Träger abgespalten. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter Erhalt von **1b** beschrieben. Das geschützte Peptid **9b** wurde mit einer Ausbeute von 484 mg (86%) erhalten. – DC: 0,77 (A). – RP-HPLC: 50–100% B in 21 min, 100% B bis 55 min, Flußrate: 1 ml/min; Detektion bei 254 nm; R_t : 41–45 min (HPLC Anteil ist nicht quantifizierbar, da das Produkt in dem Elutionssystem H₂O/CH₃CH + 0,05% TFA nicht vollständig gelöst werden kann). – FAB-MS m/z (%): 2705,0 (100) [M+Na]⁺, 2727,0 (30) [M+2Na]⁺. Das Produkt ist in DMF/NMP + 1% Triton X-100 / DCM (1:1) löslich.

Von 70 mg **9a** wurde nach Entfernen der Fmoc-Gruppe mit (25% Pip/DMF v/v, 30 min) das Peptid mit 5 ml TFA/EDT/TIS/H₂O (95:2:2:1 v/v/v/v) innerhalb von 3 h bei R.T. abgespalten und entschützt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter Erhalt von **1c** beschrieben. Ausbeute: 22 mg (98%) weißes Lyophilisat (**9c**). – RP-HPLC: 5–60% B in 31 min, Flußrate: 1 ml/min; Detektion bei 214 nm, R_t : 17,50 min (85% RP-HPLC). – IS-MS, m/z (%): 754,0 (62) [M+2H]²⁺, 765,0 (25) [M+H+Na]²⁺, 1507,0 (100) [M+H]⁺, 1529,0 (23) [M+Na]⁺. – ASA: 1,92 Thr (2,00); 0,97 Ser (1,00); 4,26 Glx (4,00); 0,99 Gly (1,00); 1,94 Ala (2,00); 2,91 Leu (3,00); 1,00 Phe (1,00).

Fmoc-Arg(Pmc)¹²-Ala-Ser(tBu)-Val-Pro-Glu(OtBu)-Gly¹⁸-OH (10b)

Die Darstellung wurde mit 0,54 g (0,63 mMol/g) Fmoc-Gly-'2-Clt'-Harz durchgeführt. Es wurden 0,83 g (94%) des Peptidharzes (**10a**) mit einem ermittelten Substitutionsgrad von 0,28 mMol Peptid/g erhalten.

Von 0,8 g **10a** wurde mit 20 ml einer Lösung DCM/TFE/HAc (7:2:1 v/v/v) das Produkt in geschützter Form innerhalb von 2 h bei R.T. vom Träger abgespalten. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter Erhalt von **1b** beschrieben. Das geschützte Peptid **10b** wurde mit einer Ausbeute von 285 mg (97%) erhalten. – DC: 0,65 (A). – RP-HPLC: 70–100% B in 31

min, 100% B bis 41 min, Flußrate: 1 ml/min; Detektion bei 254 nm; R_t : 20,49 min (88%). – FAB-MS m/z (%): 1316,2 (10) [M+H]⁺, 1337,6 (100) [M+Na]⁺, 1359,8 (30) [M+2Na]⁺. Das Produkt ist in DMF und DMF/NMP + 1% Triton X-100 gut löslich.

Von 30 mg **10a** wurde nach Entfernen der Fmoc-Gruppe mit (25% Pip/DMF v/v, 30 min) das Peptid mit 5 ml TFA/TA/EDT/TIS/H₂O (94:2:2:1:1 v/v/v/v) innerhalb von 3 h bei R.T. abgespalten und entschützt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter Erhalt von **1c** beschrieben. Ausbeute: 5,8 mg (98%) weißes Lyophilisat (**10c**). – RP-HPLC: 5–60% B in 31 min, Flußrate: 1 ml/min; Detektion bei 214 nm, R_t : 7,37 min (83% RP-HPLC). – IS-MS, m/z (%): 715,5 (100) [M+H]⁺, 737,5 (15) [M+Na]⁺, sowie 1430,0 (20) Dimer ([M+H]⁺)₂, 1452,0 (10) Dimer ([M+H]⁺ + [M+Na]⁺). – LD-MS m/z (%): 715,3 (100) [M+H]⁺. – ASA: 0,92 Ser (1,00); 1,07 Glu (1,00); 1,00 Pro (1,00); 1,03 Gly (1,00); 0,98 Ala (1,00); 0,88 Val (1,00); 1,11 Arg (1,00).

Fmoc-Met¹-Pro-Met-Phe-Ile-Val-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Asn(Trt)-Val-Pro¹¹-OH (11b)

Für die Darstellung wurden 0,55 g (0,63 mMol/g) Fmoc-Pro-'2-Clt'-Harz eingesetzt. Es wurden 0,99 g (87%) des Peptidharzes (**11a**) mit einem ermittelten Substitutionsgrad von 0,28 mMol Peptid/g erhalten.

0,91 g **11a** wurde mit 20 ml einer Lösung DCM/TFE/HAc (7:2:1 v/v/v) versetzt und das Produkt in geschützter Form innerhalb von 2 h bei R.T. vom Träger abgespalten. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter Erhalt von **1b** beschrieben. Das geschützte Peptid **11b** wurde mit einer Ausbeute von 469 mg (91%) erhalten. – DC: 0,86 (A). – RP-HPLC: 50–100% B in 21 min, 100% B bis 31 min, Flußrate: 1 ml/min; Detektion bei 254 nm; R_t : 19,66 min (95%). – FAB-MS m/z (%): 2049,2 (100) [M+Na]⁺, 2071,1 (15) [M+2Na]⁺. Das Produkt ist in DMF und DMF/NMP + 1% Triton X-100 gut löslich.

Von 80 mg **11a** wurde nach Entfernen der Fmoc-Gruppe mit (25% Pip/DMF v/v, 30 min) das Peptid mit 5 ml TFA/EDT/TIS/H₂O (95:2:2:1 v/v/v/v) innerhalb von 3 h bei R.T. abgespalten und entschützt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter Erhalt von **1c** beschrieben. Ausbeute: 26 mg (92%) weißes Lyophilisat (**11c**). – RP-HPLC: 5–60% B in 31 min, Flußrate: 1 ml/min; Detektion bei 214 nm, R_t : 18,96 min. – CZE: Kapillare: 50 cm × 50 µm (beschichtet), Puffer: 0,1M Phosphatpuffer pH 2,5, Injektion: 5 psi × sec; Lauf: 15 KV, 20 °C, (von + nach –), Detektion bei 214 nm, M_t : 25,78 min. – IS-MS, m/z (%): 643,0 (15) [M+H+Na]²⁺, 651,0 (12) [M+H+K]²⁺, 1263,0 (100) [M+H]⁺, 1285,0 (25) [M+Na]⁺, 1301,0 (15) [M+K]⁺. – LD-MS m/z (%): 1263,1 (100) [M+H]⁺, 1285,5 (90) [M+Na]⁺, 1300,6 [M+K]⁺. – ASA: 2,18 Asn (2,00); 0,91 Thr (1,00); 2,07 Pro (2,00); 1,96 Val (2,00); 1,87 Met (2,00); 0,92 Ile (1,00); 1,08 Phe (1,00).

Literatur

- [1] J. Bernhagen, T. Calandra, R. A. Mitchell, S. B. Martin, K. J. Tracey, W. Voelter, K. R. Manogue, A. Cerami, R. Bucala, Nature **365** (1993) 756
- [2] T. Calandra, J. Bernhagen, C. N. Metz, L. A. Spiegel, M. Bacher, T. Donnelly, A. Cerami, R. Bucala, Nature

- 377 (1995) 68
- [3] T. Shimizu, A. Ohkawara, J. Nishihira, W. Sakamoto, FEBS Lett. **381** (1996) 199
- [4] G. J. Wistow, M. P. Shaughnessy, D. C. Lee, J. Hodin, P. S. Zelenka, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90** (1993) 1272
- [5] A. Lanahan, J. B. Williams, L. K. Sanders, D. Nathans, Mol. Cell. Biol. **12** (1992) 3919
- [6] J. Bernhagen, A. Kapurniotu, S. Stoeva, W. Voelter, R. Bucala, in: Peptides 1994, Proceedings of the 23rd European Peptide Symposium, H. L. S. Maia (Ed.), Escom, Leiden, die Niederlande 1994, 572
- [7] M. Suzuki, H. Sugimoto, A. Nakagawa, I. Tanaka, J. Nishihira, M. Sakai, Nat. Struc. Biol. **3** (1996) 259
- [8] G. B. Fields, R. L. Noble, Int. J. Pep. Protein Res. **35** (1990) 161
- [9] T. Kaiser, J. Bernhagen, R. Bucala, G. Paulus, W. Voelter, R. Bucala, in: Peptides 1994, Proceedings of the 23rd European Peptide Symposium, H. L. S. Maia (Ed.), Escom, Leiden, die Niederlande 1995, 853
- [10] T. Kaiser und W. Voelter, in: Innovation & Perspectives in Solid Phase Peptide Synthesis & Combinatorial Chemical Libraries, R. Epton (Ed.), Edinburgh, Scotland, UK 1995, im Druck
- [11] T. Kaiser, W. Voelter, Z. Naturforsch. **52 b** (1997) im Druck
- [12] P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt, Tetrahedron **49** (1993) 11065
- [13] H. Benz, Synthesis, **1993**, 337
- [14] K. Barlos, D. Gatos, W. Schäfer, Angew. Chem. **103** (1991) 572
- [15] P. Y. Chou, G. D. Fasman, Annu. Rev. Biochem. **47** (1978) 251
- [16] J. Garnier, D. J. Osguthorpe, B. Robson, J. Mol. Biol. **120** (1987) 97
- [17] B. Riniker, A. Flörnsheimer, H. Fretz, P. Sieber, B. Kamber, Tetrahedron **49** (1993) 9307
- [18] A. Kapurniotu, C. Ungermann, W. Voelter in: Innovation & Perspectives in Solid Phase Peptide Synthesis, R. Epton (Ed.), Edinburgh, Scotland, UK 1992, 129
- [19] K. Barlos, D. Gatos, G. Papaphotiou, W. Schäfer, Y. Wenqing, Tetrahedron Lett. **30** (1989) 3947
- [20] K. Barlos, D. Gatos, G. Papaphotiou, W. Schäfer, Liebigs Ann. Chem. **1993**, 215
- [21] E. Kaiser, R. L. Colecott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, Anal. Biochem. **34** (1970) 595
- [22] H.-J. Musiol, F. Siedler, D. Quarzago und L. Moroder, Biopolymers **34** (1994) 1553
- [23] T. Kaiser, G. J. Nicholson, H. J. Kohlbau, W. Voelter, Tetrahedron Lett. **37** (1996) 1187
- [24] T. Kaiser, G. J. Nicholson, W. Voelter, in: Peptides, Chemistry, Structure and Biology, Proceedings of the 14th American Peptide Symposium, P. T. P. Kaumaya, R. S. Hodges (Eds.), Mayflower Scientific Ltd., UK (1996) 127
- [25] A. C. Haver, D. D. Smith, in: Peptides 1994, Proceedings of the 23rd European Peptide Symposium, H. L. S. Maia (Ed.), Escom, Leiden, die Niederlande (1994) 199
- [26] H. Frank, W. Woiwode, G. Nicholson, E. Bayer, Liebigs Ann. Chem. **1981**, 354
- [27] K. Barlos, D. Gatos, S. Kutsogianni, G. Papaphotiou, C. Poulus, T. Tsegenidis, Int. J. Pep. Protein Res. **38** (1991) 562
- [28] J. Meienhofer, M. Waki, E. P. Heimer, T. J. Lambross, R. C. Makofske, C. D. Chang, Int. J. Pep. Protein Res. **13** (1979) 35
- [29] BiolynxTM, Peptide Synthesizer Practical Notes, LKB Pharmacia, Uppsala, Schweden, 1989, 13
- [30] E. Atherton, R. Sheppard und Peter Ward, J. Chem. Soc., Perkin Trans. I **1985**, 2065

Korrespondenzanschrift:
Prof. Dr. Dr. h.c. W. Voelter
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Abteilung für Physikalische Biochemie
Physiologisch-chemischen Institut
Hoppe-Seyler-Straße 4
D-72076 Tübingen