

## ÜBER DEN EINSATZ MAKROPORÖSER HARZE IN DER FESTPHASEN-PEPTIDSYNTHESE

A. LOSSE

Sektion Chemie der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, DDR

(Received in Germany 7 November 1972; Received in the UK for publication 22 November 1972)

**Zusammenfassung** – In den Modellsystemen Gly-(P),\* Val-(P) und (Val-Acp)<sub>n</sub>-(P) wurden die DCCI-Kupplungsraten mit Boc-Gly und Boc-Val-Acp für Merrifield-Harze und 8% quervernetzte makroporöse Harze quantitativ bestimmt sowie der Einfluss beider Trägertypen auf die Peptid-Kettenverlängerung untersucht. Weiter wurde der Syntheseverlauf der Eledoisin-Teilsequenz Lys-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> an beiden Polymeren anhand analytischer Daten verglichen. Die Resultate zeigen die Eignung schwach quervernetzter makroporöser Harze als Träger für die Festphasensynthese von Oligopeptiden

**Abstract** – On the model systems Gly-(P), Val-(P) and (Val-Acp)<sub>n</sub>-(P) the DCCI coupling rates with Boc-Gly and Boc-Val-Acp on Merrifield-resins and 8% crosslinked macroporous resins were determined quantitatively and the influence of the two supports on the rate of peptide chain lengthening investigated. Furthermore the course of each synthesis on the two polymers of Eledoisin partial sequence Lys-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> was compared by analytical control. The results show, that macroporous resins with a low degree of crosslinking are suitable supports for the solid-phase-synthesis of oligopeptides.

Die Festphasensynthese nach Merrifield wird heute in weiten Bereichen der synthetischen Eiweisschemie angewendet.<sup>1-7</sup> Als feste, unlösliche Träger dienen hierzu in der Regel gelporöse, 1-2% mit Divinylbenzol quervernetzte Polystyrolharze, die mit 0.8-2.0 m Äquivalenten Chlormethylgruppen pro g Harz zur Bindung der wachsenden Peptidkette substituiert werden.

Mit dem Ziel, die physikalischen oder chemischen Eigenschaften des Trägers zu verbessern, wurden zahlreiche Varianten dieses Grundtypes vorgeschlagen. Ausser anderen Polymerisations- und Kondensationsprodukten sind auf der Basis Polystyrol-Divinylbenzol auch Popcorn-Polymerisate,<sup>5</sup> Schalenharze<sup>8-10</sup> und makroporöse Harze<sup>11-13</sup> erprobt worden. Für bestimmte peptidchemische Fragestellungen wurden weiterhin zielgerichtete Änderungen der Ankergruppe vorgenommen.<sup>5,7</sup>

Unter den genannten Grundharzen weisen die makroporösen (makroretikularen) Harze gegenüber gelporösen Harzen eine höhere effektive Oberfläche und leichtere Zugänglichkeit ihres Porengerüsts für grössere Moleküle sowie eine

erhöhte physikalische Stabilität auf. Sie erlauben ein schnelles Eindiffundieren der Reaktanten, ohne dass die Harzstruktur wie bei den gelporösen Harzen vorher durch Quellen aufgelockert zu werden braucht. Hieraus ergibt sich weitgehende Unabhängigkeit der Porenstruktur und damit der räumlichen Verhältnisse an den Reaktionszentren von Lösungsmittelleffekten. Der Einsatz dieser Harze in der Festphasensynthese erlaubt daher die zusätzliche Anwendung polarer, nicht quellender Lösungsmittel, die für An- und Abtransport der ionogenen Reaktanten besonders geeignet sind. Ein Nachteil der makroporösen Harze könnte demgegenüber in der Inhomogenität der Poren und der statistischen Porengrößenverteilung liegen.

Makroporöse Harze sind bisher in der Festphasen-Peptidsynthese vereinzelt zum Aufbau von Oligopeptiden herangezogen worden.<sup>11-13</sup> Quantitative Versuche zum Reaktionsablauf an diesen Harzen im Vergleich zur originalen Arbeitstechnik nach Merrifield liegen bisher nicht vor.

Anhand von Modellversuchen zur Anesterungsreaktion<sup>14</sup> wie auch zum Peptidbindungsschritt<sup>8</sup> konnte früher gezeigt werden, daß aus einer Auswahl mehrerer makroporöser Harze der schwach quervernetzte Typ (mP, Tabelle 1) bezüglich Diffusionsgeschwindigkeit der Kupplungskomponente sowie der Umsatzraten bei der Kupplungsreaktion für die Festphasensynthese die günstigsten Eigenschaften besitzt.

Dieser Typ wurde nun ausführlicher auf seine Einsatzfähigkeit als Trägersubstanz getestet.

Tabelle 2 zeigt zunächst die Umsatzraten von

\*Abkürzungen nach den Regeln der IUPAC-IUB-Commission on Biochem. Nomenclature. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 348, 256 (1967), *J. Biol. Chem.* 247, 977 (1972); Weitere Abkürzungen: DCCI = N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid; CDI = Carbonyldiimidazol; DVB = Divinylbenzol; (P) = Merrifield-Träger; (mP) = makroporöser Träger; Acp =  $\epsilon$ -Aminocapronsäure; TFA = Trifluoressigsäure; Et<sub>3</sub>N = Triäthylamin

Tabelle 1. Physikalische Eigenschaften von Merrifield- und makroporösem Harz

Typ	Quer- ver- netzung mit DVB %	Korn- grösse mm	Rütt- volu- men ml/g	Ges- amt- poren- volum. ml/g	mittl. Poren- radius Å	Poren- radius- be- reich Å	spez. Ober- fläche m <sup>2</sup> /g	Quel- lung in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ml/g
Merrifield- Harz (P)	2	0.02-0.08	1.63	—	—	—	—	5.28
Makropo- röses Harz (mP)	8	0.1-0.3	5.05	1.282	1630	630- 3900	20.45	7.45

Tabelle 2. Kupplung von Aminoacylharzen mit Boc-Gly (Kupplungs-  
raten in % bezogen auf Aminosäure-Beladung, Molverhältnis Boc-Gly:  
DCCI:harzgeb. Aminosäure = 3:3:1 in 0.06 mol CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

Zeit	Gly-(P) 0.17 mMol Gly/g Harz	Gly-(mP) 0.15 mMol Gly/g Harz	Val-(P) 0.20 mMol Val/g Harz	Val-(mP) 0.2 mMol Val/g Harz
	30 Min.	88.0	81.1	96.8
2 Std.	89.0	86.2	97.7	95.0
16 Std.	93.6	92.0	98.0	96.0

Boc-Gly mit substituierten Harzen beider Typen. Diese wie auch die weiteren Meßwerte wurden durch Bestimmung der freien, nicht acylierten Rest-NH<sub>2</sub>-Gruppen nach der Dorman-Variante<sup>15</sup> mit Pyridin-Hydrobromid<sup>16</sup> erhalten.

Man erkennt, dass bei Peptidknüpfung in unmittelbarer Matrixnähe, wo sterische Hinderungseffekte des Trägers besonders deutlich hervortreten, der makroporöse Träger dem Merrifield-Harz kaum nachsteht.

Für den Aufbau größerer Peptide an makroporösen Harzen ist vor allem die Zugänglichkeit des N-terminalen Endes der laufend wachsenden Peptidkette im Poreninneren durch die verschiedenen Kupplungskomponenten sowie die Aufnahmekapazität des gesamten Porenspektrums für die aufzubauende Peptidsequenz von Bedeutung. Um diese Verhältnisse experimentell zu überprüfen, wurde vergleichend an beiden Harzen die Sequenz Gly-(Val-Acp), unter Standardbedingungen und analytischer Kontrolle aufgebaut. Ausgangsmaterial waren wiederum die in Tabelle 1 angeführten Grundharze, welche mit Boc-Val-Acp entsprechend den in Tabelle 3 angeführten Daten verestert wurden.

Tabelle 3. Ausgangswerte von Valyl-e-  
Aminocaprylsäureharzen

Typ	Chlorgehalt mMol/g Harz	Dipeptidbeladung mMol/g Harz
(P)	1.70	0.45
(mP)	1.81	0.46

Anschließend wurde dreimal mit Boc-Val-Acp und schliesslich mit Boc-Gly zum harzgebundenen Nonapeptid gekuppelt. Die N-terminale Komponente diente zur Erkundung einer für die Peptidchemie typischen Kupplungssituation in Matrixferne sowie zur besseren analytischen Charakterisierungsmöglichkeit der Sequenzlänge. Die so erreichte Kettenlänge von ca 50 Å entspricht der eines α-Aminosäure-tetradecapeptides bei voll gestreckter Peptidkette.

In Tabelle 4 sind die Umsatzraten für die einzelnen Kupplungsstufen, bezogen auf die Ausgangsbeladung des Harzes an Peptid, wiedergegeben. Danach tritt an beiden Harzen im ersten Kupplungsschritt ein größerer Abfall ein, bedingt durch die sterische Hinderung der Matrix nahe am Kupplungsort.

Hier sind die Aminogruppen einer Weiterverlängerung zunächst nicht vollzählig zugänglich. Mit zunehmendem Abstand von der Matrix vermindern sich die Abfälle deutlich auf 1.2% (Merrifield-Harz) bzw. 2.7% (makroporöses Harz). Bei der abschließenden Kupplung mit Boc-Gly werden Umsatzraten gemessen, die höher liegen, als das verfügbare Äquivalent-Angebot der zu verlängernden Sequenz (Val-Acp)<sub>n</sub>-(P). Daraus folgt, daß hier Rumpfsequenzen vorausgegangener Kupplungsschritte, vor allem die des 1. Schrittes durch Boc-Gly, zusätzlich mit acyliert werden.

Diese bei Boc-Gly gegenüber Boc-Val-Acp erhöhten Umsatzraten dürften weniger auf Matrix abhängige Faktoren als vielmehr auf die höhere Aktivität von Boc-Glycin als Carboxylkomponente zurückzuführen sein. Boc-Glycin mit α-

Tabelle 4. Umsatzraten bei der 4-stufigen Kupplung von Val-Acp-(P) und Val-Acp-(mP) mit Boc-Val-Acp und Boc-Gly. (Molverhältnis Kupplungskomponente: DCCI: harzgebundener Aminosäure = 3:3:1 in 0.1 mol CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

Aminosäuresequenz	Kupplungsstufe	Umsatzrate in %	
		Val-Acp-(P) 0.45 mMol = 100%	Val-Acp-(mP) 0.46 mMol = 100%
Val-Acp		100 (9.2)	100 (10.4)
Boc-(Val-Acp) <sub>2</sub>	1	91.8 (1.1)	89.6 (5.9)
Boc-(Val-Acp) <sub>3</sub>	2	90.7 (1.2)	83.7 (2.7)
Boc-(Val-Acp) <sub>4</sub>	3	89.5	81.0
Boc-Gly-(Val-Acp) <sub>4</sub>	4	93.8	87.0

ständiger-I-Gruppierung ( $pK_1 = 2.54$ ) liefert mit DCCI ein reaktiveres Additionsprodukt als Boc-Val-Acp ( $pK_1 \sim 4$ ).

Nach Abspaltung der Nonapeptide von ihren Trägern mit HBr/TFA in 63% bzw. 78% Ausbeute ergaben sich die in Tabelle 9 angeführten Daten.

Ausgehend von diesen Modelluntersuchungen wurde das makroporöse Harz (Tabelle 1) zum Aufbau des verkürzten Eledoisinanalogen Lys-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> herangezogen, dessen biologische Aktivität in der Grössenordnung des natürlichen Undecapeptides liegt.<sup>17</sup> Eledoisin und zahlreiche seiner verkürzten Analogen sind im Rahmen von Struktur-Wirkungsuntersuchungen auf konventionellem Wege synthetisiert worden.<sup>18</sup> Durch Merrifield-Synthese wurden Eledoisin-Analoga von Zhukova,<sup>19</sup> Halström<sup>20</sup> und Norris<sup>21</sup> aufgebaut.

Die Synthese der vorgesehenen Sequenz wurde ebenfalls vergleichend am Merrifield- und makroporösen Harz ausgeführt. Da eine direkte Veresterung von Chlormethylharzen mit Boc-Met wegen der Gefahr der S-Alkylierung nicht möglich ist, wurden diese nach Bodanszky<sup>22</sup> in die Hydroxymethylharze übergeführt und die C-terminale Aminosäure mit CDI angeestert. (Ausgangsdaten siehe Tabelle 5).

Tabelle 5. Ausgangsdaten der Methionylharze für die Synthese des Eledoisin-Hexapeptides

Harz	Ausgangschlorwert mMol/g Harz	Hydroxylgruppen mMol/g Harz	Met-Beladung mMol/g Harz
(P)	1.17	1.09	0.18
(mP)	0.87	0.78	0.15

Nach Abspaltung der Boc-Gruppe erfolgte dann die stufenweise Verlängerung mit den entsprechenden Boc-Aminosäuren bis zur harzgebundenen Sequenz Boc-Lys-(Boc)-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-(P bzw. mP).

Jede Kupplungsstufe wurde unter Standardbedingungen mit 3 Äquivalenten Kupplungskomponenten und DCCI in 0.1 mol CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ausgeführt. Als Lys-N<sup>ε</sup>-Schutz diente ebenfalls die milde abspaltbare Boc-Gruppe, wodurch Angriffe auf die reaktionsfähige Methionin-Thioäthergruppe bei allen Deblockierungsschritten ausgeschaltet werden. Die Abspaltung der Di-Boc-Hexapeptide von ihren Trägern erfolgte mit NH<sub>3</sub> in DMF/EtOH (1:1) nach Meienhofer.<sup>23</sup> Tabelle 6 zeigt den Ausbeuteverlauf für die beiden Träger und die 5 Kupplungsschritte.

Im Gegensatz zu dem in Tabelle 4 wiedergegebenen Kupplungsverlauf mit  $\epsilon$ -Aminocaprinsäurederivaten zeigen sich hier bei den reaktiveren N<sup>ε</sup>-Boc-Aminosäuren als Carboxylkomponenten mit steigender Kettenlänge wesentlich schwächere Ausbeuteabfälle, wobei das makroporöse Harz dem Merrifield-Harz vergleichbar ist. In Tabelle 7 sind weitere experimentelle Daten für das Di-Boc-Hexapeptidar<sup>24</sup> und in Tabelle 8 für das deblockierte Endprodukt angeführt.

Nach diesen Ergebnissen dürfte die Eignung schwach quervernetzter makroporöser Harze als Trägersubstanzen für den Aufbau von Oligopeptiden bis zu ca. 10–15 Aminosäuren sichergestellt sein. Die breitere Anwendung dieser Polymeren und umfassendere Prüfung ihrer Leistungsfähigkeit erscheinen angebracht.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

1. *Ausgangsstoffe.* Boc-Gly (Schmp. 89–91°), Boc-L-Val (Schmp. 78–80°), Boc-L-Phe (Schmp. 84–86°) und Boc-L-Leu (Schmp. 81–83°) wurden nach Schnabel,<sup>25</sup> Boc-L-Met (gelbes Öl, Schmp. Dicyclohexylammoniumsalz 139–140°) nach Schwyzer<sup>26</sup> und N<sup>ε</sup>,N<sup>ε</sup>-Di-Boc-L-Lysin (farbloses Öl, Schmp. Dicyclohexylammoniumsalz 141–142°) nach Hofmann<sup>27</sup> in chromatographisch reiner Form hergestellt. Für Boc-L-Val-Acp wurde von  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure-benzylester-hydrochlorid<sup>28</sup> ausgegangen. Nach Freisetzen des Esters mit Triäthylamin/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) und Kuppeln mit Boc-L-Val/DCCI im äquimolaren Verhältnis zum Boc-Dipeptidylester wurde mit 1 n NaOH in Dioxan 48 Std. bei Zimmertemperatur

Tabelle 6. Umsatzraten bei der Kupplung von Met-(P) bzw. (mP) mit Boc-Aminosäuren zum Eledoisin-Hexapeptid (Molverhältnis Kupplungskomponente . DCCI : harzgebundener Aminosäure = 3 : 3 : 1 in 0·1 mol CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

Aminosäuresequenz	Kupp- lungs- stufe	Umsatzraten in %	
		Met-(P) = 0·18 mMol = 100%	Met-(mP) = 0·15 mMol = 100%
Met		100	100
Boc-Leu-Met	1	98·8	97·8
Boc-Gly-Leu-Met	2	97·6	97·2
Boc-Phe-Gly-Leu-Met	3	96·8	96·7
Boc-Phe-Phe-Gly-Leu-Met	4	96·6	94·3
Boc-Lys-Phe-Phe-Gly-Leu-Met	5	95·6	93·2
Boc			

Tabelle 7. Charakterisierung des geschützten Hexapeptidamids

N <sup>α</sup> ,N <sup>ε</sup> -Di-Boc-Lys-Phe-Phe-Gly Leu-Met-NH <sub>2</sub>	(P)	(mP)	Lit. <sup>24</sup>
Reinausbeute	47% bezogen auf 0·18 mMol Met-(P)	47% bezogen auf 0·15 mMol Met-(mP)	
Schmp.	229–233°	229–233°	233–235°
[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	– 41° (c = 0·5, DMF)	– 40° (c = 0·5, DMF)	– 39° (c = 0·5, DMF)
Lys . Phe . Gly : Leu : Met	1·00 : 1·91 : 1·03 : 0·92 : 0·85	1·00 : 1·94 : 1·05 : 0·98 : 0·80	
R <sub>f</sub> -Wert <sup>a</sup>	0·87	0·87	
C <sub>47</sub> H <sub>72</sub> O <sub>10</sub> N <sub>8</sub> S <sub>1</sub> (941·1) Ber. : N, 11·91	Gef. : 11·62	Gef. : 11·60	

<sup>a</sup>Dünnschichtchromatographie an Silufol UV<sub>254</sub>, CSSR Laufmittel n-Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 1 : 1.

verseift. Ausb. 53% d. Th. nach Umkristallisieren aus Äther/Petroläther; C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (330·4). (Ber. C, 58·20; H, 9·10; N, 8·48; Gef. C, 57·99; H, 9·10; N, 8·20%; R<sub>f</sub> 0·88 (Silufol UV<sub>254</sub>, CSSR; Laufmittel n-Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 1 : 1).)

Die Chlormethylierung der Harze erfolgte mit Monochlordimethyläther und SnCl<sub>4</sub>.<sup>20</sup> Die Hydroxymethylharze wurden nach Acetylierung des Chlormethylharzes durch anschließende alkalische Verseifung erhalten<sup>22</sup> (Tabelle 3 und 5).

2. Analytische Kontrolle. Für die Bestimmung der Aminosäurebelastung des Trägers sowie für die bei den Kupplungsschritten nicht umgesetzten freien NH<sub>2</sub>-Gruppen mit Pyridinhydrobromid<sup>16</sup> wurden 0·2–0·5 g Aminoacyl bzw. Peptidylharz unter Schütteln im Reaktionsgefäß nach folgendem Schema behandelt (10 ml Lösung/g Harz): dreimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, je 3 Min.; 0·18 mol Pyridinhydrobromid in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5 Min., fünfmal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, je 3 Min., achtmal mit DMF, je 3 Min. (Prüfung der letzten Waschlösung auf Bromidfreiheit), Neutralisa-

tion mit Et<sub>3</sub>N/DMF (1 : 9), 5 Min., sechsmal mit DMF, je 3 Min. Die vereinigten Filtrate der Triäthylamin-Neutralisation und der nachfolgenden Waschlösungen wurden mit 0·01 n AgNO<sub>3</sub> potentiometrisch titriert.

3. Kupplungsverlauf an Gly-(Val-Acp)<sub>4</sub>-(P bzw. mP). Boc-L-Val-Acp-(P bzw. mP) Die chlormethylierten Harze (P) und (mP) wurden mit Boc-L-Val-Acp und Et<sub>3</sub>N im Molverhältnis 1 : 1 : 1 in Essigester (8 ml/g Harz) 40 Std. bei 80° umgesetzt. Die NH<sub>2</sub>-Gruppenbestimmung mit Pyridinhydrobromid ergab die in Tabelle 3 angeführten Werte.

Boc-Gly-(L-Val-Acp)-(P bzw. mP). 0·4 g Boc-L-Val-Acp-(P bzw. mP) (entsprechend 0·180 mMol Dipeptid (P), bzw. 0·184 mMol Dipeptid (mP) wurden 45 Min. mit 5 ml TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 : 1) zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe geschüttelt, nacheinander je dreimal mit 5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, abs. EtOH und DMF gewaschen, die Aminogruppen mit 5 ml Et<sub>3</sub>N/DMF (1 : 9) (15 Min.) in Freiheit gesetzt und je dreimal mit DMF und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gewaschen. Zur Kupplung von Val-Acp-(P bzw. mP)

Tabelle 8. Charakterisierung des Eledoisin-Hexapeptidamids

Lys-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	(P)	(mP)	Lit. <sup>17</sup>
Reinausbeute	88% bezogen auf geschütztes Hexapeptidamid	88% bezogen auf geschütztes Hexapeptidamid	
Schmp.	164–167°	164–167°	165–170°
[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	–18° (c = 0,5, 50% MeOH)	–18° (c = 0,5, 50% MeOH)	–16° (c = 0,5, 50% MeOH)
Lys·Phe: Gly·Leu: Met	1·00:1·81: 1·01:1·01· 0·91	1·04:2·00· 1·03:0·93· 0·94	
R <sub>f</sub> -Wert <sup>a</sup>	0·17	0·17	
C <sub>37</sub> H <sub>56</sub> O <sub>8</sub> N <sub>8</sub> S <sub>1</sub> ·2HCl· 2H <sub>2</sub> O (849·9) Ber.: N, 13·17	Gef.: 12·87	Gef.: 12·84	
Biolog. Aktivität (Meerschweinchen- ileum) Eledoisin-Standard = 100%	115%	122%	

<sup>a</sup>Dünnschichtchromatographie an Silufol UV<sub>254</sub>, CSSR Laufmittel: n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1.

wurde Boc-L-Val-Acp sowie DCCI im 3 mol Überschuß in 0·1 mol CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> den Harzen zugegeben und 16 Std. geschüttelt. Nach der Kupplung wurde je dreimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOH, DMF und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gewaschen. Im Anschluß daran erfolgte die Bestimmung der Kupplungsausbeute mit Pyridinhydrobromid (Tabelle 4). Dieser Reaktionszyklus wurde dreimal wiederholt, beim vierten Schritt entsprechend mit Boc-Gly verfahren. Danach wurden die Harze mit Äthanol und Methanol gewaschen und im Vakuum über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> und KOH getrocknet.

Abspaltung des Gly-(L-Val-Acp)<sub>4</sub> von den Trägern. 0·4 g Boc-Gly(Val-Acp)<sub>4</sub>-(P bzw. mP) wurden in 5 ml TFA suspendiert und unter Schütteln 90 Min. lang trockener HBr eingeleitet, je dreimal mit TFA und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gewaschen und die vereinigten Filtrate bei 25° im Vakuum eingengt. Es verblieb in beiden Fällen ein hellgelbes zahflüssiges Öl, das nach verreiben mit abs. Äther fest wurde. Rohausbeute für (P) 114 mg, entsprechend 63%, bezogen auf 0·180 mMol Val-Acp-(P), für (mP):

144 mg, entsprechend 78%, bezogen auf 0·184 mMol Val-Acp-(mP). Zweimaliges Umfällen aus Eisessig/Äther ergab ein chromatographisch einheitliches Produkt und die in Tabelle 9 angeführten Daten.

4. Lys-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>. Die Anesterung von Boc-Met an die Hydroxymethylharze (P bzw. mP) ergab mit CDI im Molverhältnis 1:1:1 28 Std. bei Raumtemperatur in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 ml/g Harz). Die mit Pyridinhydrobromid bestimmten Werte für die Aminosäurebeladung sind in Tabelle 5 wiedergegeben. Für den Aufbau des Hexapeptides wurde von 10 g Boc-Met-(P bzw. mP) ausgegangen, entsprechend 1·8 bzw. 1·5 mMol Met und für die Waschvorgänge jeweils 8 ml Lösungsmittel/g Harz eingesetzt. Zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurde zunächst dreimal mit Eisessig gewaschen, mit 1 n HCl/Eisessig 30 Min. geschüttelt und erneut dreimal mit Eisessig gewaschen. Die weiteren Waschoperationen erfolgten nach dem gleichen Schema wie unter 3. Die Bestimmung der Kupplungsrate erfolgte durch

Tabelle 9. Charakterisierung der Nonapeptide

	Rohausbeute in % bez. auf mMol harzgeb. Val-Acp	Rein- aus- beute %	R <sub>f</sub> -Wert <sup>a</sup>	Schmp.	C <sub>46</sub> H <sub>85</sub> N <sub>9</sub> O <sub>10</sub> ·HBr (1005·11) Ber		
					C 54·96	H 8·52	Gly: Acp
Gly(Val-Acp) <sub>4</sub> (P)	63	50	0·71	211–214°	55·20	8·51	0·80:4·00
Gly-(Val-Acp) <sub>4</sub> (mP)	78	67	0·71	211–214°	54·74	8·44	0·88:4·00

<sup>a</sup>Dünnschichtchromatographie an Silufol UV<sub>254</sub>, CSSR Laufmittel: n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1.

Entnahme getrockneter Proben von 0.5 g. Die einzelnen Kupplungsschritte wurden wiederum mit 3 molarem Überschuß an Kupplungskomponente und DCCI in 0.1 mol  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ausgeführt.

$\text{N}^{\alpha}\text{N}^{\epsilon}$ -Di-Boc-Lys-Phe-Phe-Gly-Leu-Met- $\text{NH}_2$ . Je 5 g der im Vakuum über  $\text{P}_2\text{O}_5$  und KOH getrockneten Peptidharze (P bzw. mP) wurden in 200 ml DMF/abs. EtOH (1:1) suspendiert und bei  $-5^\circ$  mit trockenem  $\text{NH}_3$  gesättigt. Es wurde 82 Std. bei Zimmertemperatur geschüttelt, abfiltriert, fünfmal mit DMF gewaschen und die Filtrate bei  $25^\circ$  eingengt. Es verblieb ein hellgelber Rückstand, der aus DMF/Äther umgefällt wurde. Rohausbeute: 0.576 g N-geschütztes Hexapeptidamid für Merrifield-Harz (68%, bezogen auf 0.18 mMol Met/g Harz) und 0.459 g für das makroporöse Harz (65%, bezogen auf 0.15 mMol Met/g Harz). Schmp.  $225\text{--}227^\circ$  bzw.  $225\text{--}228^\circ$ . Die Amide zeigten im Chromatogramm neben dem Hauptprodukt ( $R_f$  0.87) noch in geringen Mengen zwei Nebenprodukte mit  $R_f$  0.7 und  $R_f$  0.12, die durch zweimalige fraktionierte Fällung aus DMF/Äther abgetrennt wurden. Reinausbeute: 0.398 g (47%, bezogen auf 0.18 mMol Met/g Harz für (P)) und 0.332 g (47%, bezogen auf 0.15 mMol/g Harz für (mP)). (Tabelle 7)

Lys-Phe-Phe-Gly-Leu-Met- $\text{NH}_2$ . Je 200 mg N-geschütztes Hexapeptidamid wurden 30 Min. mit 10 ml 1N HCl/Eisessig bei  $20^\circ$  behandelt, bei  $25^\circ$  im Vakuum eingengt, zweimal mit  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und nach Einengen im Vakuum über  $\text{P}_2\text{O}_5$  und KOH im Vakuum getrocknet. Rohausbeute: 0.172 g (96% d. Th.). Nach Umkristallisieren aus Eisessig/Äther wurden je 0.158 g Reinausbeute (88% d. Th.) Hexapeptidamid in chromatographisch reiner Form erhalten (Tabelle 8).

Herrn Prof. Dr. Dr. F. Wolf bin ich für die Unterstützung dieser Arbeit sehr zu Dank verpflichtet.

#### LITERATUR

- <sup>1</sup>T. Okuda, *Naturwiss.* **55**, 209 (1968).  
<sup>2</sup>R. B. Merrifield, *Advances in Enzymol.* **32**, 221 (1969).  
<sup>3</sup>R. B. Merrifield, *J. Am. Med. Assoc.* **210**, 1247 (1969).  
<sup>4</sup>J. M. Stewart und J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*. Freeman, San Francisco (1969).  
<sup>5</sup>G. Losse und K. Neubert, *Z. Chem.* **10**, 48 (1970).  
<sup>6</sup>A. Marglin und R. B. Merrifield, *Annu. Rev. Biochem.* **39**, 841 (1970).  
<sup>7</sup>G. Losse, *Acta Physica et Chemica XVIII*. 63 (1972).  
<sup>8</sup>A. Losse, *Tetrahedron Letters* 4989 (1971).  
<sup>9</sup>E. Bayer, H. Eckstein, K. Hägele, W. König, W. Brünning, H. Hagenmaier und W. Parr, *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 1735 (1970).  
<sup>10</sup>Ger. Offen. 2.109.027 (Cl. B 01 j, C 07 bc).  
<sup>11</sup>M. A. Tilak und C. S. Hollinden, *Org. Prep. and Proceed. Int.* **3**, 183 (1971).  
<sup>12</sup>USP 1 950 969 vom 9. 10. 1969.  
<sup>13</sup>S. Sano, R. Tokunaga und K. A. Kun, *Biochim., Biophys. Acta* **244** (1971).  
<sup>14</sup>A. Losse, *Z. Chem.* **11**, 386 (1971).  
<sup>15</sup>L. C. Dorman, *Tetrahedron Letters* 2319 (1969).  
<sup>16</sup>G. Losse und R. Ulbrich, *Z. Chem.* **11**, 346 (1971).  
<sup>17</sup>L. Bernardi, G. Bosisio, F. Chillemi, G. de Caro, R. de Castiglione, V. Erspamer, A. Glaesser und O. Goffredo, *Experientia* **20**, 306 (1964).  
<sup>18</sup>E. Schröder und K. Lübke *The Peptides* Vol. II, p. 127. Academic Press, New York-London (1966).  
<sup>19</sup>G. F. Zhukova, G. A. Ravdel und L. A. Shchukina, *Zh. Obshch. Khim.* **40**, 2753 (1970).  
<sup>20</sup>J. Halstrøm, K. Brunfeldt, J. Thomsen und K. Kovács, *Acta Chem. Scand.* **23**, 2335 (1969).  
<sup>21</sup>K. Norris, J. Halstrøm und K. Brunfeldt, *Ibid.* **25**, 945 (1971).  
<sup>22</sup>M. Bodanszky und J. T. Sheehan, *Chem. Ind.* 1597 (1966).  
<sup>23</sup>J. Meienhofer, A. Trzeciak, R. T. Havran und R. Walter, *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 7199 (1970).  
<sup>24</sup>O. Goffredo, L. Bernardi, G. Bosisio und F. Chillemi, *Gazz. Chim. Ital.* **95**, 172 (1965).  
<sup>25</sup>E. Schnabel, *Liebigs Ann.* **702**, 188 (1967).  
<sup>26</sup>R. Schwyzer, P. Sieber und H. Kappeler, *Helv. chim. Acta* **42**, 2622 (1959).  
<sup>27</sup>K. Hofmann, R. Schmiechen, R. D. Wells, Y. Wolman und N. Yanaiharu, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 611 (1965).  
<sup>28</sup>M. Rothe und K. Gehrke, *Makromolekulare Chem.* **83**, 1 (1965).  
<sup>29</sup>G. Losse, W. Grenzer und K. Neubert, *Z. Chem.* **8**, 21 (1968).