

Synthese von immobilisierten Peptidfragmenten an Polystyrol-Polyoxyethylen zur Affinitätschromatographie

Synthesis of Immobilized Peptide Fragments on Polystyrene-Polyoxyethylene for Affinity Chromatography

Ernst Bayer, Heribert Hellstern und Heiner Eckstein

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

Z. Naturforsch. **42c**, 455–460 (1987); received December 1, 1986

Dedicated to Professor Helmut Simon on the occasion of his 60th birthday

Affinity Chromatography, Immobilization, Liquid-Solid-Phase, Peptides, Synthesis

Polystyrene-polyoxyethylene graft copolymers have been used for step-wise peptide synthesis. After completion of synthesis the protecting groups are cleaved under acidic conditions, where the polymer-peptide bond is stable. These gels in comparison to polystyrene peptide gels, show better properties for applications in affinity chromatography as well as synthesis on solid supports, because the advantageous properties of polystyrene beads are combined with the excellent spacer behavior of polyoxyethylene chains (mobility, solvation by water and organic solvents). Peptide gels with polylysine sequences have been synthesized as highly selective stationary phases for the separation of the homologous oligo desoxyribonucleotides (dT)_n with n = 1–3. The principal possibilities of these gels for affinity chromatography is demonstrated.

Funktionalisierte, dreidimensional vernetzte Polystyrole werden schon lange als Trägermaterialien in der Flüssigkeitschromatographie und auch als Träger für die Peptidsynthese [1] eingesetzt. Gegenüber Biopolymeren zeigt diese Matrix oft unerwünschte Adsorptionseffekte. Deshalb wurden von Bayer *et al.* [2, 3] Polystyrol-Polyoxyethylen-Propfcopolymere entwickelt. Die Oberfläche solcher kugelförmiger PS-POE-Polymeren sind vollständig mit POE-Resten belegt. Außerdem ergaben ¹³C-NMR-Untersuchungen [3], daß die POE-Ketten in solvatisiertem Zustand frei beweglich sind. Solche Polymere sollten im Gegensatz zu den Polystyrolen bessere Eigenschaften sowohl für chromatographische Anwendungen als auch für Trägersynthesen besitzen, da hier die optimalen Polymereigenschaften der Polystyrole (z. B. Porengröße, einheitliche Partikeldurchmesser, mechanische Stabilität) mit den wünschenswerten physikalisch-chemischen Eigenschaften des Polyoxy-

ethylen (freie Beweglichkeit, solvatisierbar durch Wasser und sowohl durch polare als auch mäßig hydrophobe organische Lösungsmittel) vereinigt sind. Durch diese neuen Träger werden Vorteile der Solid- und der Liquid-Phase-Peptidsynthese [4] vereint.

In der vorliegenden Arbeit wird die Eignung dieses neuen Spacerpolymeren für die Peptidsynthese, besonders aber ihre Verwendbarkeit als Trägermaterial für die Affinitätschromatographie untersucht.

Als Modellsystem für die Untersuchung von synthetischen Polymeren für die Affinitätschromatographie verwenden wir die von Eckstein *et al.* [5] eingeführte chromatographische Methode zur Untersuchung der Oligopeptid-Oligonukleotid-Wechselwirkung, bei der Peptidsequenzen an einer unlöslichen Polyacrylmatrix fixiert sind. Die in der mobilen Phase vorhandenen Oligonukleotide werden entsprechend ihrer Wechselwirkung mit den Peptidsequenzen der stationären Phase retardiert. Das Elutionsvolumen ist somit ein direktes Maß für die Stärke der Peptid-Nukleotid-Wechselwirkung. Im Hinblick auf die Histon-DNA-Wechselwirkung kommt Peptiden mit homologen Lysinsequenzen eine besondere Bedeutung zu. Deshalb sind an einer stationären Matrix immobilisierte Oligolysinpeptide von besonderem Interesse [6]. Es liegt nun nahe, anhand dieses Modellsystems die Eignung des neuen PS-POE-Spacerpolymeren für die Affinitätschromatographie zu

Abkürzungen: Ac₂O, Essigsäureanhydrid; ASA, Aminosäurenanalyse; Boc, *tert.* Butyloxycarbonyl; Cbo, Benzyloxycarbonyl; DCCI, N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid; DCHA, Dicyclohexylammoniumsalz; DIPEA, Diisopropylethylamin; DMF, Dimethylformamid; Fmoc, 9-Fluorenylmethoxycarbonyl; PS, Polystyrol; POE, Polyoxyethylen.

Reprint requests to Prof. Dr. E. Bayer.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341-0382/87/0400-0455 \$ 01.30/0

Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.



This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

untersuchen. Gleichzeitig soll der neue Träger für die Synthese solcher immobilisierter Oligolysinpeptide eingesetzt werden.

Zunächst wird aus einfachen Aminosäuren das Peptidgel PS-POE-Gly-(Ala)₅-Leu-Boc (**I**) aufgebaut. Da die Peptide für die späteren chromatographischen Untersuchungen permanent am Polymer fixiert bleiben sollen, kann auf die sonst notwendige Ankergruppe zwischen POE und Peptid verzichtet werden, die die Abspaltung des Peptids vom Polymer ermöglicht [7]. Im ersten Schritt wird das PS-POE-Polymer mit Boc-Glycin verestert. Nach dem Abspalten der Boc-Schutzgruppe werden nacheinander fünf Alaninreste gekuppelt. Durch Anfügen von Leucin als letzte Aminosäure wird die Aussagekraft der Aminosäurenanalyse beträchtlich erhöht. Während der Synthese schützen wir die Aminogruppen der Aminosäuren mit der durch 1,2 N HCl in Eisessig leicht abspaltbaren Boc-Gruppe. Die Synthese wird in einer Schüttelapparatur nach Merrifield durchgeführt [8]. Die einzelnen Schritte sind im Schema 1 wiedergegeben. Die Ergebnisse der Aminosäurenanalyse und des Umsatztests [9] zeigen einen zufriedenstellenden Verlauf der Synthese dieses Peptids (Tab. I).

Nachdem mit der Synthese von **I** die prinzipielle Eignung des PS-POE-Polymers für die Peptidsynthese gezeigt ist, wird versucht, das eine Pentalysin-

Schema 1. Bedingungen für die Synthesen von **I**, **II** und **III**.

1) Waschen mit CH ₂ Cl ₂	3 × 2 min
2) a) Abspalten mit 1,2 N HCl/Eisessig	1 × 30 min
b) Abspalten mit 55% Piperidin in CH ₂ Cl ₂	1 × 30 min
3) Waschen mit CH ₂ Cl ₂	3 × 2 min
4) a) Waschen mit MeOH	3 × 2 min
b) Waschen mit DMF	3 × 2 min
5) a) Waschen mit CH ₂ Cl ₂	3 × 2 min
b) Waschen mit H ₂ O/Dioxan (1:1)	3 × 2 min
6) a) Deprotonieren mit 10% DIPEA/CH ₂ Cl ₂	1 × 2 min
b) Waschen mit DMF	1 × 2 min
7) Waschen mit CH ₂ Cl ₂	3 × 2 min
8) Kuppeln mit vorakt. Aminosäure Zugabe von 1 meq NMM nach 15 min	1 × 2 h
9) Waschen mit CH ₂ Cl ₂	3 × 2 min
10) Waschen mit DMF	3 × 2 min
11) Waschen mit CH ₂ Cl ₂	3 × 2 min
12) Acetylieren mit 1% Ac ₂ O in CH ₂ Cl ₂	1 × 15 min
13) Waschen mit CH ₂ Cl ₂	3 × 2 min
14) Waschen mit MeOH	3 × 2 min
15) Umsatztest [9]	
16) Probenahme für die Aminosäurenanalyse	

a) Für die Synthese von **I** und **II**.
b) Für die Synthese von **III**.

Tab. I. Ergebnisse der Aminosäurenanalyse und des Umsatztests [9] bei der Synthese von PS-POE-Gly-(Ala)₅-Leu-Boc (**I**).

	Umsatz- test	ASA Gly : Ala : Leu [%]
PS-POE-Gly-(Ala)-Boc	> 99	1,00 : 1,00 : -
PS-POE-Gly-(Ala) ₂ -Boc	> 99	1,00 : 1,89 : -
PS-POE-Gly-(Ala) ₃ -Boc	> 99	1,00 : 2,90 : -
PS-POE-Gly-(Ala) ₄ -Boc	> 99	1,00 : 3,98 : -
PS-POE-Gly-(Ala) ₅ -Boc	> 99	1,00 : 4,99 : -
PS-POE-Gly-(Ala) ₅ -Leu-Boc	> 99	1,00 : 4,70 : 0,98 1,02 : 4,80 : 1,00

sequenz enthaltende Peptidgel PS-POE-Gly-[Lys(Fmoc)]₅-Leu-Boc (**II**) zu synthetisieren. Da Lysin in der ε-Stellung eine zweite Aminogruppe besitzt, muß diese während der gesamten Synthese geschützt werden. Die sonst bei Lysin als Schutz der ε-Aminogruppe oft eingesetzte Cbo-Gruppe kann hier nicht verwendet werden, da das Trägerpolymer unter den für diese Gruppe notwendigen Abspaltbedingungen (40% HBr/Eisessig) nicht stabil ist.

In neuerer Zeit hat sich die von Carpino [10] eingeführte Fmoc-Gruppe bewährt [11, 12]. Diese Schutzgruppe lässt sich durch schwache Basen in aprotischen Lösungsmitteln schonend abspalten und ist in saurem Milieu sehr stabil. Im vorliegenden Fall wäre diese Schutzgruppe für die ε-Aminogruppe des Lysins optimal, da sie sich später aus dem immobilisierten Peptidfragment leicht wieder abspalten lässt. Die endständige Boc-Gruppe könnte dann permanent im Peptid verbleiben.

Für das für die Synthese von **II** benötigte Boc-Lys(Fmoc)-OH wird zunächst N^ε-Cbo-Lysin nach der Vorschrift von Schlägel und Fabitschowitz [13] in abgewandelter Form [14] dargestellt und nach Schnabel [15] in Boc-Lys(Cbo)-OH überführt. Nach Hydrieren mit Pd/Aktivkohle wird das erhaltene Boc-Lys-OH mit Fmoc-Chlorid zu Boc-Lys(Fmoc)-OH in guter Ausbeute umgesetzt. Die Synthese von **II** wird analog zu der von **I** durchgeführt. Die Ergebnisse der Aminosäurenanalyse und des Umsatztests [9] sind in Tab. II zusammengestellt.

Die Umsatztests zeigen, daß die Kupplungen der Aminosäuren nicht quantitativ verlaufen. Dennoch liegen die Lysinwerte der Aminosäurenanalysen über den zu erwartenden Werten und nehmen von Kupplung zu Kupplung um etwa 15% mehr zu, als der Theorie entspricht. Diese Beobachtung lässt sich

Tab. II. Ergebnisse der Aminosäurenanalyse und des Umsatztests [9] bei der Synthese von PS-POE-Gly-[Lys(Fmoc)]₅-Leu-Boc (II).

	Umsatz- test [%]	ASA Gly : Ala : Leu
PS-POE-Gly-[Lys(Fmoc)] ₁ -Boc	98	1,00 : 1,15 : -
PS-POE-Gly-[Lys(Fmoc)] ₂ -Boc	98	1,00 : 2,36 : -
PS-POE-Gly-[Lys(Fmoc)] ₃ -Boc	90	1,00 : 3,43 : -
PS-POE-Gly-[Lys(Fmoc)] ₄ -Boc	90	1,00 : 4,65 : -
PS-POE-Gly-[Lys(Fmoc)] ₅ -Boc	80-90	1,00 : 5,76 : -
PS-POE-Gly-[Lys(Fmoc)] ₅ -Leu-Boc	80-90	1,00 : 5,94 : 1,68

mit der Annahme erklären, daß während der Kuppelung auch freie Aminogruppen der Lysinseitenketten vorliegen. Damit wird die Beobachtung von Bodanszky *et al.* [16] und anderen Autoren bestätigt, nach der die Basizität der endständigen freien Aminogruppe ausreicht, um die Fmoc-Gruppe teilweise abzuspalten.

Da sich die Fmoc-Gruppe nicht als Seitenketten- schutz verwenden läßt, haben wir die ebenfalls leicht abspaltbare Boc-Gruppe als Schutz für die Lysinseitenkette verwendet und schützen nun die α -Aminofunktion der zu kuppelnden Aminosäuren mit der Fmoc-Gruppe. Die Synthese von PS-POE-Gly-[Lys(Boc)]₅-Leu-Boc (III) wird wie die der Peptidgels **I** und **II** durchgeführt (Schema 1). Sowohl nach dem Umsatztest als auch nach den Aminosäurenanalysen (Tab. III) ist die Synthese erfolgreich verlaufen. Im letzten Schritt müssen noch die Schutzgruppen der ϵ -Aminofunktionen der Lysinreste abgespalten werden. Dies gelingt durch Behandlung des Peptidgels mit 1,2 N HCl in Eisessig. Danach kann das Gel als Sorbens für die Affinitätschromatographie eingesetzt werden.

Im folgenden soll nun untersucht werden, ob sich die auf diese Weise an der PS-POE-Matrix immobilisierten Peptidfragmente für die Affinitätschromatographie eignen. Hierzu prüfen wir zunächst die Porosität der Polymermatrix und der Peptidgels, indem wir Polyoxyethylene mit verschiedenen Molmassen sowohl an PS-POE als auch an Gel **I** chromatographieren. Wie aus Abb. 1 ersichtlich ist, zeigen beide Gele ein vergleichbares chromatographisches Verhalten. Demnach werden im wäßrigen Milieu Moleküle mit Molmassen über etwa 1000 g/mol ausgeschlossen. Dieses Trägermaterial ist also vor allem für die Trennung kleinerer Biomoleküle geeignet. Großen Molekülen steht dagegen nur die Oberfläche der Polymerkugeln zur Verfügung. Dies ist kein prinzipieller Nachteil, sondern hat nur eine Verringerung der Kapazität des Trenngels zur Folge. Besonders wichtig in diesem Zusammenhang ist die Klärung der Frage, ob die POE-Gruppen den störenden Einfluß des Polystyrols auf die Trennung von Substanzen, die heteroaromatische Ringe tragen, unterdrücken können. Bekanntlich rufen Trägermaterialien mit einer Polystyrolmatrix oft unspezifische

Tab. III. Ergebnisse der Aminosäurenanalyse und des Umsatztests [9] bei der Synthese von PS-POE-Gly-[Lys(Boc)]₅-Ala-Boc (III).

	Umsatz- test [%]	ASA Gly : Ala : Leu
PS-POE-Gly-[Lys(Boc)] ₁ -Fmoc	> 99	1,00 : 1,08 : -
PS-POE-Gly-[Lys(Boc)] ₂ -Fmoc	> 99	1,00 : 2,10 : -
PS-POE-Gly-[Lys(Boc)] ₃ -Fmoc	> 99	1,00 : 2,88 : -
PS-POE-Gly-[Lys(Boc)] ₄ -Fmoc	> 99	1,00 : 4,10 : -
PS-POE-Gly-[Lys(Boc)] ₅ -Fmoc	> 99	1,00 : 5,24 : -
PS-POE-Gly-[Lys(Boc)] ₅ -Ala-Boc	> 99	1,00 : 5,08 : 1,00

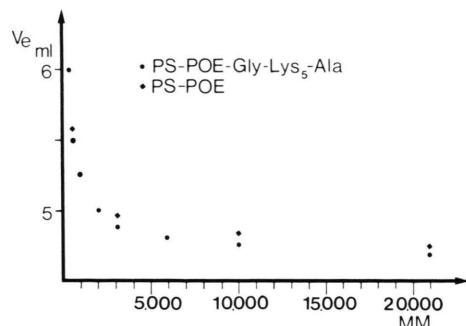


Abb. 1. Elutionsvolumina bei der Chromatographie von Polyoxyethylenen verschiedener Molmassen (s. Text) an PS-POE bzw. PS-POE-Gly-(Lys)₅-Ala (III) in Abhängigkeit von der Molmasse. Glassäule 120×14 mm, Fließmittel H₂O, Fließgeschwindigkeit ca. 50 ml/h.

Adsorptionseffekte hervor. Zu dieser Untersuchung werden Homologe der Desoxyribothymidylsäure eingesetzt. Zunächst werden die jeweiligen Nukleotide in wässriger Lösung auf die Säule aufgetragen und adsorbiert. Danach werden die Oligonukleotide im linear steigenden Salzgradienten eluiert.

Am Gel I werden alle eingesetzten Oligonukleotide bereits mit Wasser im Ausschlußvolumen eluiert. Damit ist sichergestellt, daß von der substituierten Polystyrolmatrix keine unerwünschten Adsorptionseffekte ausgehen.

Bei Chromatographie der Oligonukleotide an Gel III sollten die negativen Ladungen der Phosphatreste der Internukleotidbindungen mit den positiven Ladungen der immobilisierten Lysinreste in Wechselwirkung treten. Oligonukleotide sollten also mit zunehmender Kettenlänge stärker retardiert, also erst bei höheren Salzstärken eluiert werden, während das Nukleosid Thymidin nicht retardiert werden darf, da es ja keine elektrische Ladung trägt. Wie aus Abb. 2a hervorgeht, wird Thymidin erwartungsgemäß bereits mit Wasser eluiert, während das Dinukleotid (dT)₂ bei einer Salzstärke von 0,03 M (Abb. 2b) und (dT)₃ erst bei 0,07 M Natriumchlorid eluiert wird (Abb. 2c).

Damit ist eine wesentliche Voraussetzung für eine chromatographische Anwendung von PS-POE als Trägermaterial für die Affinitätschromatographie gegeben. Die mechanische Stabilität und die Fließeigenschaften des kugelförmigen Trägermaterials sind prinzipiell besser als die des bisher verwendeten, gebrochenen Materials. In der vorliegenden Form sind die Peptidgelen aber gegen eine Hydrolyse

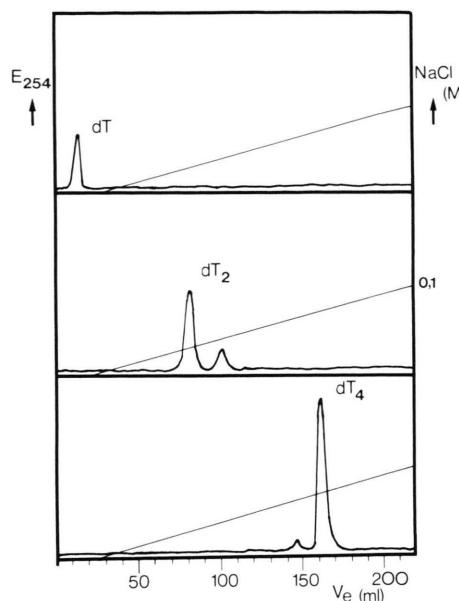


Abb. 2. Elutionsprofile der Chromatographie von je 5 OD a) (dT), b) (dT)₂ und c) (dT)₄ an PS-POE-Gly-(Lys)₅-Ala (III). Die Elution erfolgt im linear steigenden NaCl-Gradienten, der mit 0,05 M Tris-HCl auf pH 7,5 gepuffert ist. Säulenmaße 120×14 mm; Fließgeschwindigkeit ca. 50 ml/h.

durch Wasser noch nicht genügend stabil. Mit dem Ersatz der Esterbindung zwischen Polymer und erster Aminosäure durch eine Amidbindung läßt sich dieses Problem nach vorläufigen Ergebnissen beheben [17].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Trägermaterialien, die für die Affinitätschromatographie geeignet sind, bequem und effizient durch die Liquid-Solid-Phase-Synthese dargestellt werden können. Das Trennmaterial zeigt aufgrund der Polystyrolmatrix gute chromatographische Eigenschaften. Die auf die Polystyrolkugeln aufgepflanzten POE-Ketten verleihen den an ihnen immobilisierten Peptidfragmenten die ungehinderte Zugänglichkeit für die zu trennenden Komponenten und die geometrische Äquivalenz, die für einen effizienten chromatographischen Trennprozeß von großer Bedeutung sind.

Dank

Herrn Dr. W. Rapp danken wir für das Überlassen des PS-POE-Polymers.

Experimenteller Teil

Materialien

Diethylether wird mit Natrium-Dispersion in Paraffin absolutiert und destilliert. Methylchlorid wird über Kaliumcarbonat destilliert. DMF wird 12 h mit Calciumhydrid gekocht und im Wasserstrahlvakuum unter Lichtausschluß destilliert; dann erfolgt in Gegenwart von Ninhydrin eine zweite Destillation. Essigsäure wird mit P_4O_{10} vorgetrocknet und anschließend destilliert. DCCI wird im Hochvakuum destilliert und als 2-m-Lösung in Methylchlorid eingesetzt. Die L-Aminosäuren und die Kieselgelfertigplatten 60 F₂₅₄ werden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen. Diteriärbutyldicarbonat stammt von der Firma Fluka, Buchs. Das Fmoc-Chlorid wird nach Carpino und Han [10] dargestellt. Boc-Gly, Boc-Ala, Boc-Leu und das Dicyclohexylammoniumsalz von Boc-Lys(Cbo) werden nach allgemein bekannten Methoden in unserem Labor hergestellt.

Aminosäurenanalyse

Etwa ein Mikromol Polymerpeptid wird in einer Glasampulle genau eingewogen, mit ca. 3 ml HCl/Propionsäure 1:1 versetzt, die Ampulle unter Luftausschluß abgeschmolzen und 4 h unter Röhren auf 140 °C erhitzt. Anschließend wird vom unlöslichen Polystyrol abfiltriert und i. Vak. bis zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird nach Spackmann *et al.* [18] analysiert.

Darstellung von N^a -Fmoc, N^e -Boc-Lysin

Aus 55 g Lysinhydrochlorid (0,3 mol) werden nach der Vorschrift von Scott *et al.* [19] 52 g (71% d. Th.) N^e -Boc-Lysin dargestellt. 12,3 g H-Lys(Boc)-OH (50 mmol) werden mit 13 g Fmoc-Chlorid (50,2 mmol) nach der Vorschrift von Chang *et al.* [20] umgesetzt. Ausbeute 19 g (81% d. Th.); Schmelzpunkt 124–125 °C (Lit. 123–124 °C [20]); Drehwert $[\alpha]_D^{20} = +11,4^\circ$ ($c = 1$ in DMF).

$C_{26}H_{32}N_2O_6$ (468) Ber. C 66,64 H 6,88 N 5,98
 Gef. C 64,63 H 6,57 N 6,02.

Darstellung von N^a -Boc, N^e -Fmoc-Lysin

20 g Boc-Lys(Cbo) × DCHA (35 mmol) werden in 300 ml Essigester suspendiert und im Schütteltrichter mit 100 ml 2 N H_2SO_4 behandelt. Die wäßrige Phase wird 2mal mit 50 ml Essigester gewaschen.

Die vereinigten Esterphasen werden mit Wasser (3mal) neutral gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Nach dem Entfernen des Essigesters am Rotationsverdampfer erhält man 13 g Boc-Lys(Cbo)-OH als Öl. Das Produkt wird in 500 ml MeOH gelöst, 0,55 g Pd/Aktivkohle zugegeben und hydriert, bis die DC-Kontrolle vollständigen Umsatz anzeigt (ca. 3,5 h). Nach dem Abfiltrieren des Katalysators und dem Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. erhält man 8 g Boc-Lys-OH. Die Umsetzung mit Fmoc-Chlorid zum Boc-Lys(Fmoc)-OH wird analog zu der von Chang *et al.* [20] gegebenen Vorschrift für Fmoc-Lys(Boc)-OH durchgeführt. Hierzu wird das oben erhaltene Derivat in 80 ml 10prozentiger Natriumcarbonatlösung und 40 ml Dioxan gelöst, unter Eiskühlung und Röhren langsam eine Lösung von 10,4 g Fmoc-Chlorid (40 mmol) in 60 ml Dioxan zugetropft und 1 h bei 0 °C und weitere 10 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Lösung mit 11 Eiswasser versetzt und zweimal mit je 150 ml Ether extrahiert. Die wäßrige Phase wird unter Eiskühlung mit 2 N HCl auf pH 2 angesäuert, wobei das sich ausscheidende ölige Produkt in Essigester aufgenommen wird. Die Esterphase wird mit 0,1 N HCl und mit Wasser gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird das Produkt aus CH_2Cl_2 /Petrolether umkristallisiert. Ausbeute 9,8 g (70% d. Th.); Schmelzpunkt 93–96 °C; DC-Kontrolle $R_f = 0,62$ ($CHCl_3/EtOH$ (3:1)); Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -9,90^\circ$ ($c = 1$ in DMF).

$C_{26}H_{32}N_2O_6$ (468) Ber. C 66,62 H 6,84 N 5,98
 Gef. C 64,63 H 6,57 N 6,02.

Veresterung von PS-POE mit Boc-Gly

Pro meq Hydroxylgruppen am PS-POE werden 1,75 g Boc-Gly (10 mmol) in 10 ml CH_2Cl_2 gelöst und mit 2,5 ml 2 N DCCI-Lösung 1 h voraktiviert. Nach dem Abfiltrieren wird das Filtrat mit 1 mmol 4-Dimethylaminopyridin versetzt und mit dem Polymer 36 h am Rückfluß gekocht. Anschließend wird das Polymer abgesaugt, nacheinander mit CH_2Cl_2 , DMF, MeOH und Ether gewaschen und über P_4O_{10} i. Vak. getrocknet.

Darstellung von PS-POE-Gly-(Ala)₅-Leu-Boc (I)

Alle Syntheseschritte werden in einer Schüttelapparatur nach Merrifield durchgeführt [8]. Pro

Gramm Polymer werden 5 ml Lösungsmittel verwendet. Die Aminosäurederivate werden als symmetrische Anhydride in dreifachem Überschuß zur Kupplung eingesetzt. Die einzelnen Arbeitsgänge bei jeder Kupplung sind in Schema 1 aufgeführt. Zur Synthese werden 4,5 g PS-POE-Gly-Boc eingesetzt.

Darstellung von PS-POE-Gly-[Lys(Fmoc)]₅-Leu-Boc (II)

Die Synthesebedingungen entsprechen denen von **I**. Zur Synthese werden 4,4 g PS-POE-Gly-Boc eingesetzt.

Darstellung von PS-POE-Gly-[Lys(Boc)]₅-Ala-Boc (III)

Die Synthesebedingungen entsprechen denen von **I**. Zur Synthese werden 8 g PS-POE-Gly-Boc eingesetzt.

Chromatographische Untersuchungen

Die chromatographischen Untersuchungen werden mit einem LKB-Fraktionssammler mit optischer

Einheit Uvicord III durchgeführt. Die Elution erfolgt mit einer Fließgeschwindigkeit von ca. 50 ml/h und wird bei 254 und 276 nm registriert. Für die Gradientenelution wird eine 1 M NaCl/0,05 Tris-HCl (pH 7,5) Stammlösung hergestellt. Von dieser Stammlösung erhält man die gewünschten Konzentrationen durch Verdünnen. Zur Bestimmung des Ausschlußvolumens werden jeweils 0,5 ml einer POE-Lösung (200 mg/ml) unterschiedlicher Molmasse (300, 600, 1000, 2000, 3000, 10000 bzw. 20000) auf die Säule gegeben und das entsprechende Elutionsvolumen bestimmt. Das Ergebnis der chromatographischen Untersuchungen ist in Abb. 1 wiedergegeben. Zur Untersuchung der Wechselwirkung von Nukleotiden mit Gel **III** werden die Desoxyribothymidylsäuren (dT)_n verwendet mit $n = 1, 2$ und 4 . Hierzu werden jeweils ca. 5 OD₂₆₀ des Nukleotids auf die Säule gegeben und zuerst mit Wasser (ca. 10 Säulenvolumina), dann mit einem linearen Salzgradienten von 0 bis 0,5 M NaCl eluiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 2 dargestellt.

- [1] R. B. Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* **85**, 2194 (1963).
- [2] E. Bayer, B. Hemmasi, K. Albert, W. Rapp und M. Dengler, *Peptides: Structure and Function, Proceed. of the Eighth Amer. Pept. Symp.* (V. J. Hruby und D. H. Rich, Hrsg.), Pierce Chem. Comp. 1983.
- [3] E. Bayer und W. Rapp, in: *Chemistry of Peptides and Proteins, Vol. 3* (W. Voelter, E. Bayer und Y. A. Ovchinnikov, Hrsg.), de Gruyter Verlag, Berlin 1986.
- [4] E. Bayer und M. Mutter, *Nature (London)* **237**, 512 (1972).
- [5] H. Eckstein, H. Schott und E. Bayer, *Makromol. Chem.* **177**, 645 (1976).
- [6] H. Eckstein und H. Schott, *Makromol. Chem.* **181**, 2471 (1980).
- [7] B. Hemmasi, W. Stüber und E. Bayer, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **363**, 701 (1982).
- [8] J. M. Stewart und J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, W. H. Freeman and Comp., San Francisco 1969.
- [9] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger und P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **34**, 595 (1970).
- [10] L. A. Carpino und G. Y. Han, *J. Amer. Chem. Soc.* **92**, 5748 (1970).
- [11] C. D. Chang und J. Meienhofer, *Int. J. Peptide Protein Res.* **11**, 246 (1978).
- [12] E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, C. J. Logan, R. C. Sheppard und B. J. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **537** (1978).
- [13] K. Schlögel und H. Fabitschowitz, *Monatsh. Chem.* **84**, 1950 (1953).
- [14] H. Eckstein, R. E. Sievers und E. Bayer, *Liebigs Ann. Chem.* **1973**, 1467.
- [15] E. Schnabel, *Liebigs Ann. Chem.* **702**, 188 (1967).
- [16] M. Bodanzsky, S. S. Deshmane und J. Martinez, *J. Org. Chem.* **44**, 1622 (1979).
- [17] W. Rapp, *Dissertation, Universität Tübingen* 1985.
- [18] D. H. Spackmann und W. H. Moore, *Anal. Chem.* **30**, 1185 (1958).
- [19] J. W. Scott, D. Parker und D. R. Parrish, *Synthetic Communications* **11**, 303 (1981).
- [20] C. D. Chang, M. Waki, M. Ahmad, J. Meienhofer, E. O. Lundell, J. D. Haug, *Int. J. Peptide Protein Res.* **15**, 59 (1980).