

# ANGEWANDTE CHEMIE

97. Jahrgang 1985

Heft 10

Seite 801–892

## Festphasen-Synthese (Nobel-Vortrag)\*\*

Von Robert Bruce Merrifield\*

Proteine sind, wie der aus dem Griechischen stammende Name andeutet, für Lebewesen von größter Bedeutung. Ihre kleineren Verwandten, die Peptide, spielen in der Biologie ebenfalls eine wichtige Rolle, da zu ihnen viele Hormone, die Releasing-Faktoren, Wachstumsfaktoren, Ionophore, Antibiotica, Toxine und die Neuropeptide gehören. Dieser Aufsatz beschreibt die chemische Synthese von Peptiden und Proteinen und diskutiert die Anwendung der Peptidsynthese zur Beantwortung biologischer Fragestellungen.

Die hier zu erzählende Geschichte beginnt mit *Emil Fischer*<sup>[1]</sup>, der um die Jahrhundertwende das erste Peptid synthetisierte und den Namen dieser Verbindungsklasse prägte. Für die Verknüpfung zweier Aminosäuren ist es erforderlich, daß die Carboxygruppe der einen und die Aminogruppe der anderen geschützt sind. Nach Aktivierung der freien Carboxygruppe kann dann die Peptidbindung gebildet werden, und selektive Abspaltung der beiden Schutzgruppen führt schließlich zum freien Dipeptid. *Fischer* selbst fand keine passende Gruppe für die reversible Blockierung der Aminfunktion, sein ehemaliger Student *Max Bergmann* jedoch war zusammen mit *Zervas* erfolgreich<sup>[2]</sup>. Ihre Entdeckung, daß der Benzyloxycarbonylrest eine gute Schutzgruppe ist, leitete eine neue Ära ein. Als ich viele Jahre später mit der Synthese von Peptiden begann, wurde dieses Syntheseschema allgemein angewandt. Es war sehr effizient; mit ihm war zum Beispiel *du Vigneaud* et al. 1953 die erste Synthese eines Peptidhormons gelungen<sup>[3]</sup>. Mir wurde jedoch bald klar, daß Synthesen dieser Art schwierig und zeitraubend waren und daß es ei-

ner völlig neuen Methode bedurfte, wenn viele Peptide oder größere und komplexere hergestellt werden sollten.

### Synthese am festen Träger

Eines Tages hatte ich die folgende Idee, die die Synthese von Peptiden effizienter machen sollte<sup>[4]</sup>: Ein Peptid nach kovalenter Verankerung des einen Endes der Kette an einem unlöslichen Träger schrittweise aufzubauen. Die wachsende Peptidkette wäre unlöslich und würde schnelles Filtrieren und Waschen erlauben. Überschüssige Reagentien und Nebenprodukte könnten nach jedem Syntheseschritt durch Filtrieren und gründliches Waschen entfernt werden, und die Zwischenstufen der Synthese ließen sich sehr einfach und schnell unter Umgehung der sonst üblichen, oft langwierigen Kristallisationsversuche reinigen. Für einen vielstufigen Prozeß wie die Herstellung eines Polypeptids oder Proteins bedeutete dies eine sehr große Ersparnis an Zeit, Arbeitsaufwand und Chemikalien. Da alle Reaktionen zwischen einem gelösten Reagens und der wachsenden Peptidkette am festen Träger ablaufen (heterogene Reaktionen), wurde der Name „Festphasen-Peptidsynthese“ eingeführt.

Das Prinzip der Festphasen-Synthese ist in Abbildung I dargestellt. Es beginnt mit einem unlöslichen Partikel, angedeutet durch die großen Kreise, das die reaktive Gruppe X enthält. Das erste Monomer (kleiner Kreis) wird an einem der beiden Enden und an der eventuell vorhandenen reaktiven Gruppe in der Seitenkette geschützt (schwarze Punkte) und über eine stabile kovalente Bindung am Träger verankert. Dann wird die  $\alpha$ -Schutzgruppe entfernt, und das zweite Monomer wird durch eine geeignete Reaktion an das erste angehängt. Auf die gleiche Weise wird Schritt für Schritt die gesamte Sequenz des Polymers aufgebaut. Schließlich wird die Bindung zwischen Peptidkette und festem Träger gespalten, und gleichzeitig werden die Seiten-

[\*] Prof. Dr. R. B. Merrifield  
The Rockefeller University  
1230 York Avenue, New York, NY 10021-6399 (USA)

[\*\*] Copyright © The Nobel Foundation 1985. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieser Übersetzung.

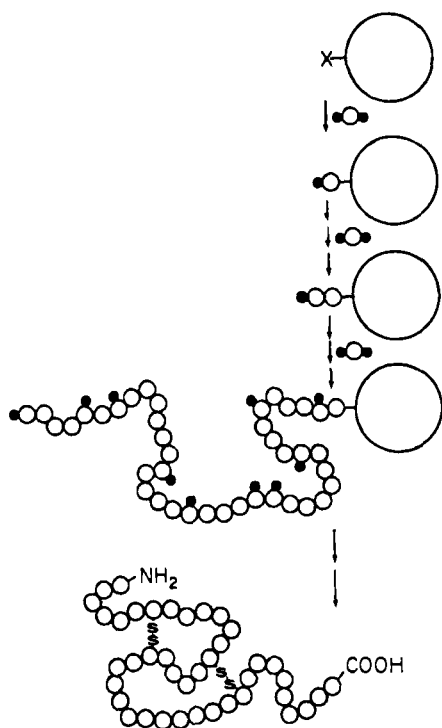


Abb. 1. Prinzip der Festphasen-Synthese (siehe Text).

kettenschutzgruppen entfernt: Das freie Peptid geht in Lösung. Dieses Schema bietet vier Hauptvorteile:

- Es vereinfacht und beschleunigt eine vielstufige Synthese, da alle Reaktionen in einem einzigen Gefäß stattfinden, so daß wiederholtes Transferieren von Substanzen und damit verbundene Verluste vermieden werden.
- Es verhindert auch die großen Verluste, die gewöhnlich bei Isolierung und Reinigung von Zwischenstufen auftreten.
- Es ermöglicht hohe Ausbeuten an Endprodukten, da Reagentien im Überschuß eingesetzt werden können, so daß die einzelnen Reaktionen vollständig ablaufen.
- Es erhöht die Solvatation und vermindert die Aggregation der Zwischenprodukte.

Die Aufgabe war nun, die Idee in die Praxis, d. h. in chemische Reaktionen umzusetzen.

Obwohl der Plan ursprünglich für die Synthese von Peptiden konzipiert worden war, wird die Natur der Monomere durch das allgemeine Schema nicht spezifiziert. Es wurde bald deutlich, daß die Methode auch auf andere Bausteine als Aminosäuren anwendbar sein sollte, so z. B. auf die in Abbildung 2 gezeigten. Uns gelang auf diese Weise die Synthese von Depsipeptiden<sup>[5]</sup>, andere Laboratorien synthetisierten erfolgreich Polyamide<sup>[6]</sup>, Polynucleotide<sup>[7]</sup> und Polysaccharide<sup>[8]</sup>. Prinzipiell kann als Monomer jede difunktionelle Verbindung fungieren, die selektiv an einem Ende geschützt und am anderen aktiviert werden kann. Des weiteren kann die Festphasen-Synthese bei einer Vielzahl von konventionellen Reaktionen in der Organischen Chemie dazu genutzt werden, den Reaktionsverlauf zu steuern oder die Produkte von Reagentien und Nebenprodukten abzutrennen. Das Konzept liegt auch der Festphasen-Sequenzierung zugrunde.

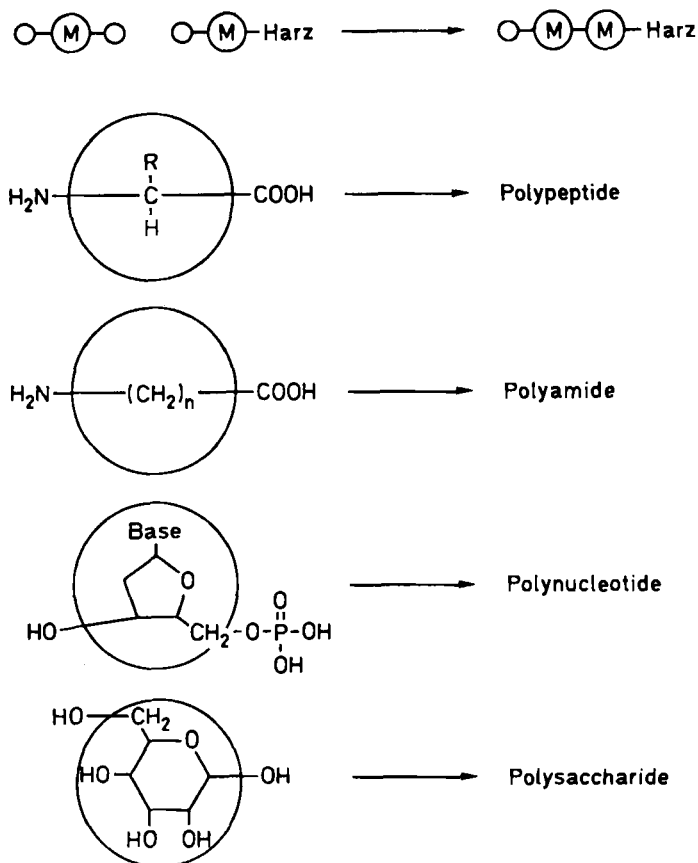


Abb. 2. Festphasen-Synthesen mit verschiedenen Monomeren.

## Festphasen-Peptidsynthese

Den detaillierten Verlauf einer Peptidsynthese zeigt Abbildung 3. Zwar ist jeder Schritt mehrfach modifiziert worden, doch hat diese Variante gute Dienste geleistet und ist bei zahlreichen Peptiden angewandt worden<sup>[9]</sup>. Die carboxyterminale Aminosäure, deren Aminogruppe durch den *tert*-Butyloxycarbonyl(Boc)rest geschützt ist, wird durch Reaktion mit der Chlormethylgruppe als Benzylester kovalent an das Trägerharz gebunden. Die funktionellen Gruppen der Seitenketten müssen ebenfalls geschützt werden, gewöhnlich verwendet man Benzylderivate. Bei der Synthese wird die um den Faktor 1000 unterschiedliche Säureempfindlichkeit dieser beiden Schutzgruppenklassen genutzt. Die Boc-Gruppe wird mit 50proz. Trifluoressigsäure in Dichlormethan vollständig abgespalten, die verankerte Bindung und andere Schutzgruppen bleiben intakt. Das entstandene Ammonium-Salz wird mit einem tertiären Amin wie *N,N*-Diisopropylethylamin neutralisiert, und die freie Aminogruppe der harzgebundenen Aminosäure ist nun zur Kupplung mit einer zweiten Boc-Aminosäure bereit. Diese muß aktiviert werden, damit eine Reaktion stattfindet. Das einfachste und am häufigsten benutzte Verfahren ist die Aktivierung mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)<sup>[10]</sup> (Abb. 3), aber auch aktivierte Ester<sup>[11]</sup>, Anhydride<sup>[12]</sup> und andere Derivate wurden erfolgreich eingesetzt. Alle diese Reaktionen werden in organischen Lösungsmitteln ausgeführt, in denen das Harz quillt, was die Reaktionsgeschwindigkeiten erhöht. Dichlormethan und Dimethylformamid sind die Lösungsmittel der Wahl.

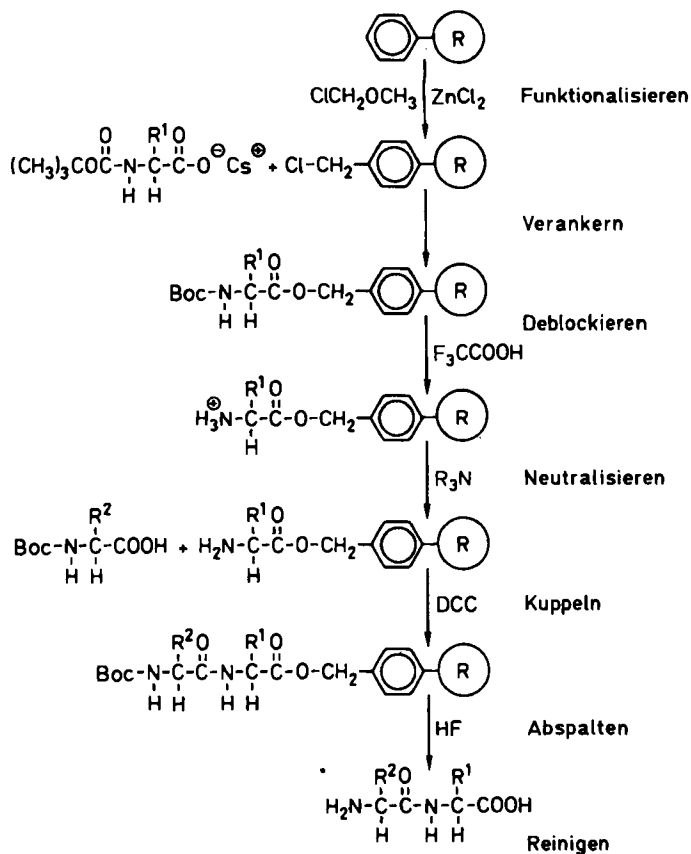


Abb. 3. Schema einer Festphasen-Peptidsynthese (siehe Text).

Zur Verlängerung der Peptidkette werden Deblockierungs-, Neutralisations- und Kupplungsschritt für jede der folgenden Aminosäuren wiederholt, bis die gewünschte Sequenz aufgebaut ist. Schließlich wird das Peptid deblockiert und vom festen Träger abgespalten; bei der hier beschriebenen Synthese wird dies durch Behandlung mit einer starken wasserfreien Säure wie  $\text{HF}^{[13]}$  erreicht. Das freie Peptid wird dann mit geeigneten Methoden gereinigt.

Es ist sehr wichtig, daß die sich wiederholenden (repetitiven) Schritte schnell und mit hohen Ausbeuten ablaufen; Nebenreaktionen sollten möglichst nicht auftreten, damit sich keine großen Mengen an Nebenprodukten anhäufen. Ein beträchtlicher Teil unserer Anstrengungen galt daher der Suche und Optimierung von Reaktionen, damit diese Anforderungen erfüllt würden.

### Festphasen-Nucleotidsynthese

Ähnliche Reaktionssequenzen, die schnell und mit relativ hohen Ausbeuten zu den Produkten führen, sind jetzt auch für die Festphasen-Synthese von Oligonucleotiden entwickelt worden<sup>[14, 15]</sup>. Als Monomere dienen geschützte Nucleotide, die Kettenverlängerung erfolgt nach der Phosphorsäure- oder Phosphorignsäuretriestermethode. Die Grundzüge eines dieser Verfahren zeigt Abbildung 4. Zuerst wird das Harz funktionalisiert (Aminomethylgruppe), dann wird das Nucleotidderivat über einen „Spacer“ als Amid gebunden. Im konkreten Beispiel ist die 5'-Hydroxygruppe mit dem „Spacer“ verestert, während die 3'-Hydroxygruppe mit einer Dimethoxytrityl(DMT)gruppe ge-

schützt ist. Diese wird mit Säure oder  $\text{ZnBr}_2$  abgespalten, um die Kette am 3'-Ende durch Kupplung mit dem nächsten geschützten Nucleotid nach Aktivierung mit 1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazolid (MSNT) zu verlängern. Das fertige Oligonucleotid wird durch sukzessive Be-

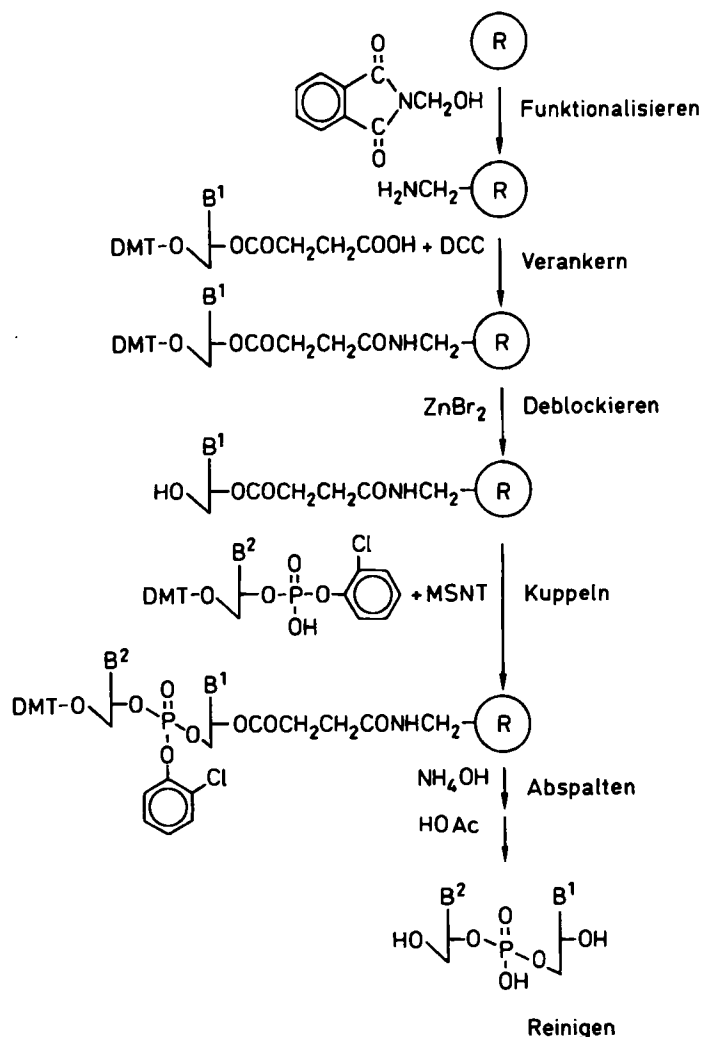


Abb. 4. Schema einer Festphasen-Nucleotidsynthese (siehe Text).

handlung mit einer Base wie  $\text{NH}_4\text{OH}$  oder Tetramethylguanidin und mit heißer Essigsäure vom festen Träger abgespalten und deblockiert. Die Produkte können leicht durch Ionenaustauschchromatographie oder Elektrophorese gereinigt werden; das gewünschte Produkt hat dabei immer die größte negative Ladung. Ich möchte mich hier jedoch nicht länger mit Polynucleotiden und ihrer Anwendung bei der ortsspezifischen Mutagenese oder mit synthetischen Genen befassen, sondern mich auf Peptide und Proteine konzentrieren.

### Der Träger

Zur Entwicklung der Festphasen-Synthese mußte als erstes ein geeigneter Träger gefunden werden. Nach Prüfung zahlreicher potentieller Trägermaterialien zeigte es sich, daß ein Gel, das durch Suspensionscopolymerisation von Styrol und 1% Divinylbenzol als Vernetzungsreagens erhal-

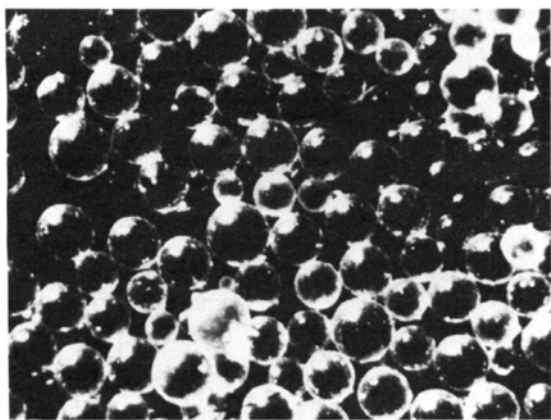
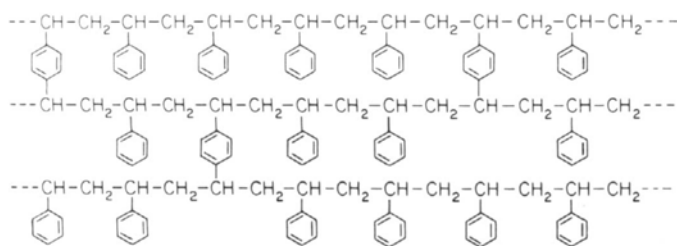


Abb. 5. Copolymer aus Styrol und 1% Divinylbenzol. Oben: Strukturformel, unten: elektronenmikroskopische Aufnahme.

ten wurde, die günstigsten Eigenschaften aufweist<sup>[4]</sup>. Die von diesem Copolymer gebildeten Kügelchen (Abb. 5) haben im trockenen Zustand einen Durchmesser von ungefähr 50  $\mu\text{m}$ , quellen jedoch in organischen Lösungsmitteln wie Dichlormethan auf das fünf- bis sechsfache ihres ursprünglichen Volumens. Mit wachsender Peptidkette nimmt das Trockenvolumen zu, und auch das Quellvolumen steigt an. Volumenvergrößerungen auf das 25fache sind gemessen worden, und nach Berechnungen ist eine maximale Ausdehnung auf das 200fache des Trockenvolumens möglich<sup>[16]</sup>. Das bedeutet, daß die Polystyrolmatrix und das gebundene Peptid während der Reaktionen stark solvatisiert und für diffundierende Reagentien frei zugänglich sind. Die Reaktionen finden nicht nur auf der Oberfläche der Kügelchen statt, sondern zum größeren Teil im Innern der quervernetzten polymeren Matrix. Dies wurde durch Autoradiographie des Querschnitts eines Harzkügelchens gezeigt, das ein synthetisches Tritium-markiertes Peptid enthielt<sup>[17]</sup>. Bei dieser Auflösung waren die Silberkörnchen gleichmäßig angeordnet, die Verteilung auf molekularer Ebene ist jedoch nicht bekannt. Quellung und Solvataion der Kügelchen führen zu sehr kurzen Reaktionszeiten sowohl für den Kupplungs- als auch für den Deblockierungsschritt (Halbwertszeiten in der Größenordnung von Sekunden). Massentransfer und Diffusion sind – wie wir jetzt fanden – nicht geschwindigkeitsbestimmend. Wir sind überzeugt, daß die feste Matrix nicht nur keine nachteiligen, sondern in bestimmten Fällen sogar positive Auswirkungen auf die Synthese hat.

Eine wohlbekannte Schwierigkeit der klassischen Peptidsynthese in homogener Lösung ist das Auftreten unlöslicher Zwischenprodukte. Dieses Problem kann in vielen Fällen durch die Verwendung eines festen Trägers, an dem eine „solvatisierende“ Wechselwirkung zwischen den Peptidketten und den schwach quervernetzten Polymerketten

möglich ist, gelöst werden. Unter diesen Bedingungen ist Selbstaggregation des Peptids thermodynamisch ungünstig, und es steht somit zur Weiterreaktion zur Verfügung. Dabei muß der solvatisierte Zustand des gebundenen Peptids nur gegenüber dem amorphen, nicht solvatisierten Zustand innerhalb der Peptid-Harz-Matrix begünstigt sein<sup>[16]</sup>. Auch lineare Polymere können kovalent gebundene Verbindungen solubilisieren, doch ist der Effekt eines schwach quervernetzten polymeren Netzwerks größer. Das Phänomen kann anhand der Synthese von Oligoisoleucinen illustriert werden<sup>[18]</sup>: Durch Synthese in Lösung gelangte man nur bis zum Tetrapeptid, da dann die Löslichkeit wegen Aggregation zu gering war; auf linearem Polyethylenglykol konnte die Kette auf acht Reste verlängert werden. Die Festphasen-Synthese verlief zumindest bis zum Dodecamer glatt, dann wurde das Experiment beendet. In den quervernetzten Polystyrolharzen sind die Polymerketten beweglich. Sowohl nach  $^1\text{H}$ - als auch nach  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messungen<sup>[19]</sup> ist die Beweglichkeit der aromatischen Seitengruppen und der aliphatischen Rückgrat- atome in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  groß, und sie ähnelt der von linearem löslichem Polystyrol ( $\tau_c = 10^{-8}$  s). Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale der  $\alpha$ -C-Atome von modellharz-gebundenen Peptiden in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  oder Dimethylformamid sind genauso scharf wie das Lösungsmittelsignal und ähnlich wie die von kleinen Molekülen in Lösung ( $\tau_c = 10^{-10}$  s). Auch viele chemische Experimente haben die Flexibilität des Polymers demonstriert. So reagieren kurze, harzgebundene Peptide, die, läge eine starre Matrix vor, zu weit voneinander entfernt wären, um in Berührung zu kommen, in einem Ausmaß von 99.5%; dies beweist einmal mehr die beträchtliche Bewegung der Polystyrolsegmente innerhalb der Matrix<sup>[20]</sup>.

Viele andere feste Träger sind untersucht worden; einige von ihnen erwiesen sich für die Peptidsynthese als geeignet. Zu diesen gehören Polymethylmethacrylat, Polysaccharide, Phenolharze, Kieselgel, poröses Glas und Polyacrylamide, aber nur die zuletzt genannten haben weite Verbreitung gefunden<sup>[21]</sup>. Nach vergleichenden Untersuchungen eignen sich Polystyrol und Polyacrylamid bei der Synthese von kompliziert gebauten Peptiden gleich gut.

## Automation

Die Möglichkeit, nach jeder Reaktion durch einfaches Filtrieren und Waschen zu reinigen, und die Tatsache, daß alle Reaktionen in einem einzigen Gefäß ausgeführt werden können, waren ideale Voraussetzungen für eine Mechanisierung und Automatisierung des Prozesses. Anfangs wurde ein einfacher, manuell zu bedienender Apparat konstruiert (Abb. 6), der der Ausarbeitung der Methodik diente und mit dem Bradykinin<sup>[22]</sup>, Angiotensin<sup>[23]</sup>, Oxytocin<sup>[24]</sup> und viele andere kleine Peptide synthetisiert wurden. Um den Prozeß zu beschleunigen, haben wir die in Abbildung 7 gezeigte automatische Peptidsynthesemaschine konstruiert<sup>[25]</sup>. Ihre wichtigsten Teile sind das Reaktionsgefäß, das das Harz mit der wachsenden Peptidkette enthält, und ein Leitungssystem, das es erlaubt, die erforderlichen Lösungsmittel und Reagentien in der richtigen Reihenfolge zuzugeben, zu mischen und zu entfernen. Diese mechanischen Vorgänge wurden durch eine einfache programmierbare Schritttrommel und eine Anzahl Stopp-

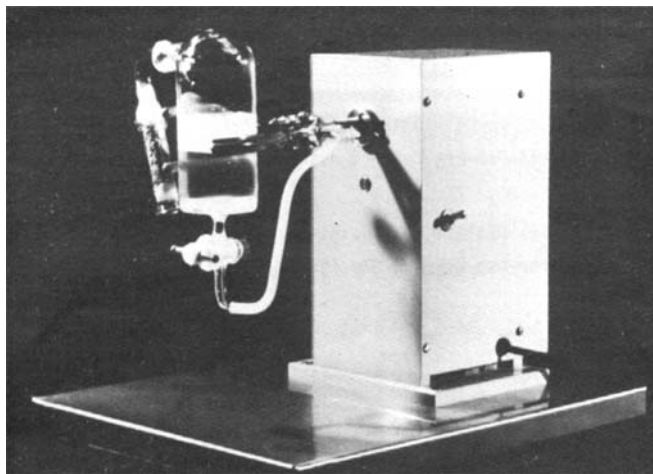


Abb. 6. Manuell betriebener Peptidsyntheseapparat.

uhren gesteuert. In den letzten Jahren sind viele kommerzielle Geräte in verschiedenen Ländern konstruiert worden. Sie unterscheiden sich im Detail, vor allem in der Elektronik, doch nutzen sie alle die gleiche Chemie.

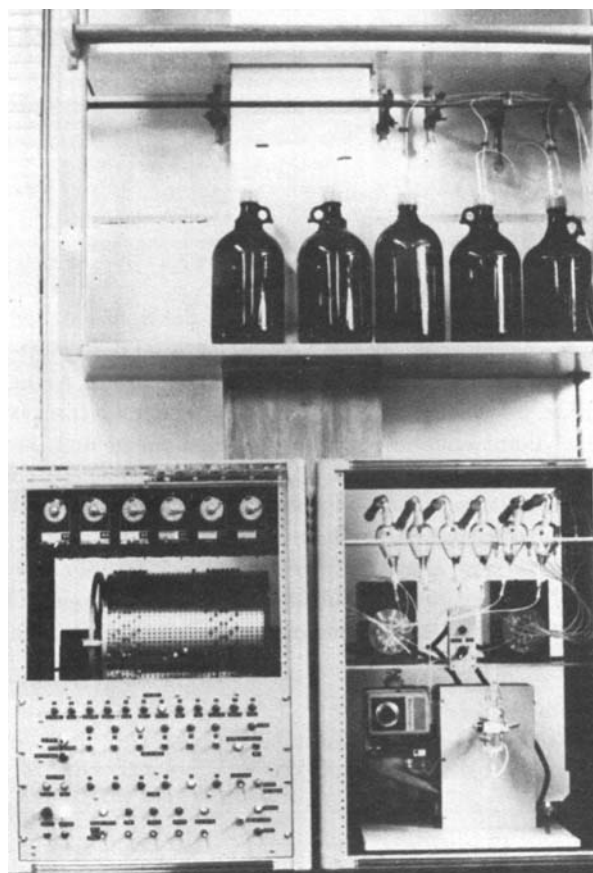


Abb. 7. Automatische Peptidsynthesemaschine.

### Synthese von Ribonuclease A

Die Idee, ein Enzym im Laboratorium chemisch zu synthetisieren, muß im Laufe der Jahre viele Leute beschäftigt haben. Es gab eine Zeit, zu der ein solcher Gedanke selbst vom philosophischen Standpunkt aus absolut unpassend gewesen wäre. Nachdem man jedoch gefunden hatte, daß

Enzyme Proteine und Proteine definierte organische Moleküle sind, begann man über die Synthese von Enzymen nachzudenken. Wenn ein Enzym im Laboratorium hergestellt werden könnte, sollte es möglich sein, neue Erkenntnisse über die Wirkungsweise dieser großen und sehr komplizierten Moleküle zu gewinnen. So könnten spezifische Strukturänderungen vorgenommen werden, die nicht ohne weiteres durch Modifikation der nativen Proteine zu erzeugen sind. Die Eigenschaften der resultierenden künstlichen Mutanten könnten dann das Wissen, das bereits über die entsprechenden natürlichen Enzyme vorliegt, erweitern. Bezeichnend ist in dieser Hinsicht ein Zitat von *Emil Fischer* aus dem Jahre 1906<sup>[26]</sup>:

„Während vorsichtige Fachgenossen befürchten, dass eine rationelle Bearbeitung dieser Körperklasse [Proteine] durch ihre verwickelte Zusammensetzung und ihre höchst unbequemen physikalischen Eigenschaften heute noch auf unüberwindliche Schwierigkeiten stoßen werde, neigen andere, optimistisch veranlagte Beobachter, zu denen ich mich zählen will, zu der Ansicht, daß man wenigstens den Versuch machen soll, mit allen Hilfsmitteln der Gegenwart die jungfräuliche Feste zu belagern; denn nur durch das Wagniss selbst kann die Grenze für die Leistungsfähigkeit unserer Methoden ermittelt werden.“

Mit der Entwicklung der Festphasen-Peptidsynthese und ihrer Automation schien die Zeit gekommen, die Totalsynthese eines Enzyms in Angriff zu nehmen. Dr. *Bernd Güte* und ich wählten Ribonuclease A aus Rinderpankreas, ein kleines stabiles Protein mit bekannter Aminosäuresequenz<sup>[27]</sup>, dessen Struktur durch Röntgenbeugung bestimmt worden war<sup>[28]</sup>. Der detaillierte Mechanismus, nach dem dieses Enzym Ribonucleinsäure hydrolysiert und depolymerisiert, war zum großen Teil ebenfalls bekannt. Primärer Zweck der chemischen Synthese dieses aus 124 Aminosäureresten bestehenden Moleküls war es, den Beweis zu erbringen, daß ein Protein mit der hohen katalytischen Aktivität und Spezifität eines natürlich vorkommenden Enzyms im Laboratorium hergestellt werden kann. Zugleich hatten wir natürlich das Ziel im Auge, eine neue Methode zur Untersuchung von Enzymen einzuführen. Wir glaubten, daß es möglich sein sollte, durch Modifizierung der Struktur eines Enzyms dessen Aktivität und Substratspezifität zu ändern.

Die Synthese<sup>[29]</sup> wurde an einem Copolymer aus Styrol und Divinylbenzol (1%) nach dem oben beschriebenen Verfahren durchgeführt. Das C-terminale Boc-Val wurde an der festen Matrix über eine Benzylesterbindung verankert; die Blockierung der reaktiven Seitenketten erfolgte durch die üblichen, auf dem Benzylrest basierenden Schutzgruppen, die reversible *N*<sup>α</sup>-Blockierung durch die Boc-Gruppe. Die Boc-Gruppen wurden mit Trifluoressigsäure abgespalten und die Kupplungsreaktionen mit Dicyclohexylcarbodiimid durchgeführt. Abbildung 8 zeigt das geschützte Endprodukt der Ribonuclease-Synthese. Es enthält insgesamt 67 Seitenkettenschutzgruppen und hat ein Molekulargewicht von 19791. Zusammenfassend ist die Synthese in Tabelle 1 beschrieben. Die Gesamtausbeute betrug nach mehreren Reinigungsschritten etwa 3%, bezogen auf die zu Beginn der Synthese am Harz gebun-

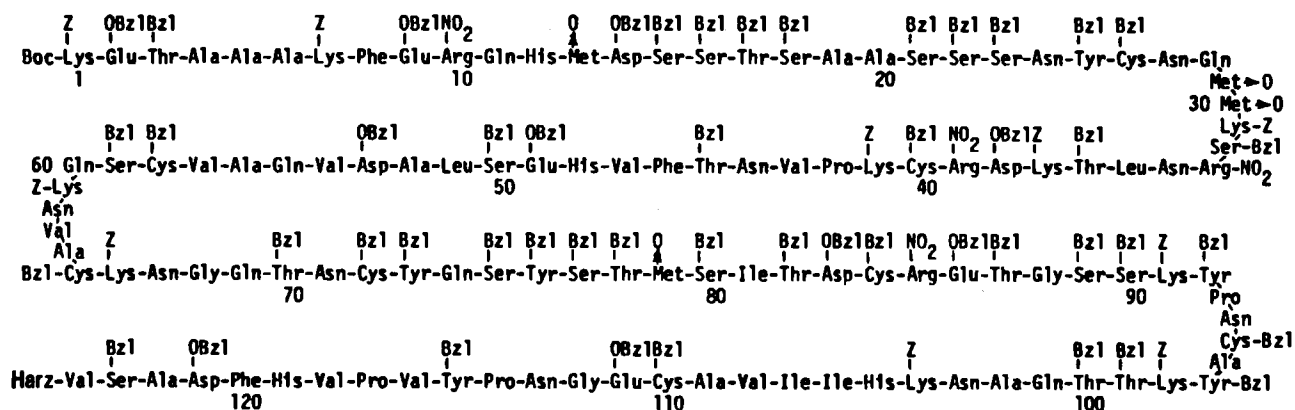


Abb. 8. Harzgebundene, geschützte Ribonuclease.

Tabelle 1. Zusammenfassung der Ribonuclease(RNase)-A-Synthese.

Synthesestufe	Gesamtausbeute [mg]	[%]
Boc-Val-Harz	2000	100
↓ deblockieren neutralisieren kuppeln	123mal	
Geschütztes RNase-Harz	3430	17
↓ abspalten und deblockieren mit HF		
Rohe RNase (SH) <sub>8</sub>	697	12
↓ Sephadex G-75		
RNase A (Monomerfraktion)	373	6.4
↓ Trypsinverdauung Sephadex G-50		
RNase A (Trypsinresistente Fraktion)	256	4.4
↓ (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Fraktionierung		
RNase A	169	2.9

dene Menge Valin. Ein großer Verlust (83%) trat beim sukzessiven Aufbau des Ribonucleasemoleküls durch ungenügende Stabilität der Bindung zum Harz auf, weitere Verluste von insgesamt 80% entstanden bei der Abspaltung vom Harz mit HF und bei der Reinigung. Das abgespaltene Rohprodukt wurde mit Luft oxidiert, um die vier Disulfidbindungen zu erzeugen, und die Monomerfraktion wurde durch Gelfiltration isoliert. Monomere mit falschen Disulfidbindungen oder falscher Faltung wurden durch Trypsin verdaut, und die gebildeten tryptischen Fragmente wurden vom unverdauten Protein abgetrennt. Ammoniumsulfatfraktionierung ergab das gereinigte Enzym mit etwa 80% der spezifischen Aktivität von nativer Ribonuclease A. Zwar konnten wir nicht behaupten, daß unser Produkt völlig rein war oder daß die Synthese einen Strukturbeweis für Ribonuclease geliefert hätte, doch konnten wir sagen, daß das synthetische Produkt in seinen chemischen und physikalischen Eigenschaften sehr gut mit denen des nativen Proteins übereinstimmte und daß es ein echtes Enzym war. Verglichen hatten wir natives und künstliches Enzym durch Aminosäureanalyse, Enzymverdauungen, zweidimensionale Auftrennung der tryptischen Peptide („peptide maps“), Papierelektrophorese, Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie und Antikörperneutralisierung. HPLC und Affinitätschromatographie standen noch nicht zur Verfügung.

Tabelle 2 zeigt die Abhängigkeit der Aktivität des synthetischen Enzyms vom Grad der Reinigung. Da sowohl die spezifische Aktivität als auch die Zahl der Einheiten der RNase mit fortschreitender Reinigung anstiegen, wurden entweder inhibitorische Verunreinigungen entfernt,

Tabelle 2. Ribonuclease-A-Aktivität.

Reinigungsstufe	Spezifische Aktivität [%]	Gesamtkaktivität mg RNase 2g Harz
Spaltung mit HF	2	14
Sephadex G-75	9	33
IRC-50	13	53
Trypsin	61	156
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	78	132

oder das Molekül nahm mehr und mehr die Konformation der nativen Struktur an. Die Substratspezifität des synthetischen Enzyms entsprach derjenigen von RNase A: Es wurden sowohl große (RNA) als auch kleine (cyclisches 2',3'-Cytidinmonophosphat) Substrate gespalten und damit beide Reaktionsschritte (Transphosphorylierung und Hydrolyse) katalysiert; die synthetische RNase war spezifisch für D-Ribose statt D-Desoxyribose und für eine Pyrimidinbase statt einer Purinbase an der 3'-Position des Phosphodiestersubstrats (Tabelle 3). Die K<sub>M</sub>-Werte gegenüber RNA waren für das natürliche und das synthetische Enzym gleichfalls gleich.

Tabelle 3. Substratspezifität von synthetischer Ribonuclease A.

Substrate	Aktivität [%]
Ribonucleinsäure	(RNA) 78
Desoxyribonucleinsäure	(DNA) 0
cyclisches Cytidin-2',3'-monophosphat	(C > p) 65
cyclisches Guanosin-2',3'-monophosphat	(G > p) 0
5'-(3'-Guanylyl)cytidylsäure	(GpCp) 0
5'-(3'-Adenylyl)adenylsäure	(ApAp) 0

Die gereinigte RNase wurde auf einer CM-Cellulose-säule mit natürlicher und mit reduzierter-reoxidiert natürllicher RNase A verglichen. Nach diesem Kriterium, das zuerst von White<sup>[30]</sup> angewandt worden war, um zu zeigen, daß RNase A nach Reduktion und Reoxidation der Disul-

fidbindungen vom nativen Enzym nicht zu unterscheiden ist, waren die drei Ribonucleasen identisch. Die Experimente von White<sup>[30]</sup> führten zur Hypothese, daß die Primärstruktur eines Proteins dessen Tertiärstruktur bestimmt<sup>[31]</sup>. Unsere Befunde stützten auf neuartige Weise diese Hypothese. Die Tatsache, daß der Synthese als einzige Information die Aminosäuresequenz zugrunde lag, bedeutete, daß die Primärstruktur die Faltung des Moleküls in die aktive Tertiärstruktur bestimmt. Die Synthese eines aktiven Enzyms, das einzig und allein aus Aminosäuren aufgebaut war, erbrachte auch einen neuen Beweis für die heute allgemein akzeptierte Anschauung, daß schon ein einfaches Protein, das keine anderen Komponenten enthält, enzymatisch aktiv sein kann.

## Struktur-Funktions-Untersuchungen an Ribonuclease

Die Synthese der Ribonuclease A beantwortete einige fundamentale Fragen und bildete die Grundlage für neue Untersuchungen zur Beziehung zwischen Struktur und Funktion dieses Enzyms. Das von Richards<sup>[32]</sup> entdeckte klassische S-Peptid-S-Protein-System war hierfür ideal geeignet, weil ein kleines Peptid (Reste 1–20) und eine große Proteinkomponente (Reste 21–124) nicht-kovalent kombiniert werden konnten und dabei die nahezu volle enzymatische Aktivität regeneriert wurde. Die intensiven Studien in den Laboratorien von Hofmann<sup>[33]</sup> und Scoffone<sup>[34]</sup> über die Synthese des S-Peptids und dessen Kombination mit natürlichem S-Protein hatten bereits eine große Zahl von Informationen über die Bedeutung einzelner Reste der N-terminalen Region des Enzyms erbracht. Wir nahmen uns vor, diese Region der RNase auf dem Wege der Totalsynthese zu untersuchen (Abb. 9). Zu Beginn unserer Arbeiten

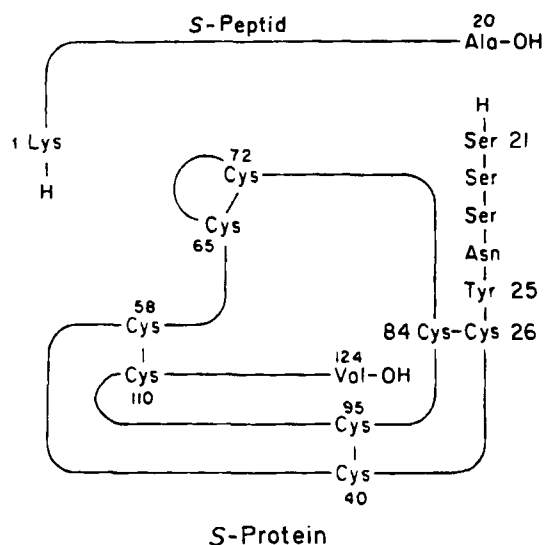


Abb. 9. Das S-Peptid-S-Protein-System.

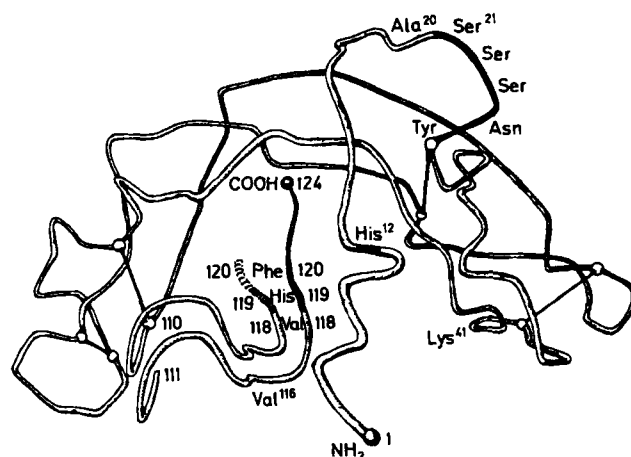
synthetisierten wir S-Protein (21–124) und S-Protein (26–124). Die vier Disulfidbindungen der partiell gereinigten Proteine wurden reduziert, und die reduzierten Proteine wurden mit synthetischem S-Peptid gemischt, reoxidiert und auf enzymatische Aktivität geprüft. Jedes dieser Gemische hatte dieselbe Aktivität wie das Produkt mit nativem S-Protein nach identischer Behandlung. Daraus wurde geschlossen, daß S-Protein synthetisiert worden war und daß

die fünf Reste 21–25 für die Bindung und Reaktivierung nicht notwendig sind. Nach einer Röntgen-Strukturanalyse<sup>[35]</sup> war vorausgesagt worden, daß die Serinreste in den Positionen 21, 22 und 23 wahrscheinlich nicht notwendig sind, daß aber Asn 24 und Tyr 25, die in RNase S an fünf Wasserstoffbrücken beteiligt sind, für die Bildung des aktiven Komplexes essentiell sein könnten. Unsere Untersuchungen zeigten, daß sie es nicht sind.

Einige Jahre vorher hatte mich die Frage interessiert, ob nicht ein Peptid vom Carboxyende der RNase eine ähnliche Funktion wie das S-Peptid am Aminoende ausüben könnte. Deshalb synthetisierten wir das Tetradecapeptid RNase-111–124. Dann wurde RNase durch Carboxymethylierung des Imidazolrings von His 119 inaktiviert. Versuche, das Enzym durch Hinzufügen des synthetischen Peptids zu reaktivieren, verliefen negativ. Etwas später gelang es Lin, in unabhängigen Untersuchungen eine Reihe verkürzter Ribonucleasen – RNase 1–120, RNase 1–119 und RNase 1–118 – durch enzymische Verdauung herzustellen<sup>[36]</sup>. Wenn das synthetische Peptid 111–124 mit diesen inaktiven Proteinen gemischt wurde, entstand hohe enzymatische Aktivität<sup>[37]</sup>, und es wurde offenbar, daß am C-terminalen Bereich der RNase ein System existiert, das dem am N-terminalen ähnelt.

Wir machten dann die interessante Entdeckung, daß das C-terminale Peptid 111–124, das His 119 enthält, das N-terminale Peptid 1–20, das His 12 enthält, und die zentrale Proteinkomponente 21–118 mit Lys 41 einen nicht-kovalent gebundenen Komplex bilden, der Ribonuclease-Aktivität hat. Drei Komponenten, von denen jede einen der Reste enthält, die für die enzymatische Aktivität erforderlich sind, konnten also einen Komplex bilden, der die spezifische geordnete Struktur hat, die für Substratbindung und katalytische Aktivität notwendig ist.

Wir führten dann eine Reihe von Synthesen durch, um die Funktion einzelner Aminosäurereste der C-terminalen Region zu klären. Diese Untersuchungen können anhand von Abbildung 10 zusammengefaßt und diskutiert werden. Wenn Peptide, die kürzer als die Sequenz 111–124 sind, mit RNase 1–118 kombiniert wurden, nahmen Bindungskonstante und Aktivität stufenweise ab; Peptid 117–124 war inaktiv. Dies deutete an, daß jeder Rest einen Beitrag



zur Bindung leistet<sup>[38]</sup>. Im Komplex der Komponenten 1–118 und 116–124 war immer noch eine Überlappung von drei Resten vorhanden. Es wurde dann gefunden, daß der Komplex 1–115+116–124, bei dem keine Reste überlappen, eine hundertmal größere Bindungskonstante hat<sup>[39]</sup>. Durch diese Experimente wurde auch gezeigt, daß Tyr 115 für die enzymatische Aktivität nicht notwendig ist.

Die Bedeutung von Phe 120 für die Stabilität der Ribonuclease-Struktur und für die Interaktion mit den Pyrimidin-Substraten wurde durch Messung der Übergangstemperatur bzw. durch Röntgenbeugungs- und NMR-Untersuchungen demonstriert. Unsere Arbeiten mit synthetischen Analoga am System RNase 1–118+111–124 ergaben, daß der Austausch von Phe 120 durch Leu 120 oder Ile 120 die Bindung um das fünf- bzw. siebzehnfache herabsetzt und die maximale enzymatische Aktivität auf 10 bzw. 5% reduziert. Dies wies auf die Bedeutung der aromatischen Seitenkette des Phenylalanins für die Bindung zwischen Peptid und Protein hin<sup>[40]</sup>. Sie kann nur partiell durch eine hydrophobe aliphatische Seitenkette ersetzt werden, da in deren Gegenwart das aktive Zentrum nicht exakt konstituiert wird. Wurde der kleine Rest Ala oder der große aromatische Rest Trp in Position 120 eingebaut, so konnte kein aktiver Komplex erhalten werden. Das Peptid 111–124, in dem Phe 120 durch Tyr 120, einen aromatischen Rest ähnlicher Größe, ersetzt wurde, ergab mit RNase 1–118 einen Komplex, der gegenüber cyclischem Cytidin-2',3'-monophosphat als Substrat voll aktiv war und gegenüber cyclischem Uridin-2',3'-monophosphat 190% Aktivität hatte<sup>[41]</sup>. Ein semisynthetisches Enzym, das erhöhte Aktivität hat, war neu.  $K_M$ - und  $K_i$ -Daten erlaubten den Schluß, daß Phe 120 für die Substratbindung nicht essentiell ist, daß es aber für die Stabilität des Peptid-Protein-Komplexes und des nativen Enzyms selbst sehr wichtig ist. In Gegenwart von Substrat nahm die Bindungskonstante zwischen RNase 1–118 und RNase 111–124 noch um den Faktor 50 zu.

Ähnliche Experimente wurden mit dem Asparaginsäurerest in Position 121 durchgeführt. Wurde er durch Glutaminsäure ersetzt, so sank die Aktivität auf ca. 20%; die Asn-121- und Ala-121-Analoga wiesen keine meßbare Bindung auf. Abspaltung von Val 124 der RNase A beeinträchtigte deren enzymatische Aktivität nicht, ebenso reduzierte die Abspaltung von Val 124 des S-Proteins die Aktivität des Komplexes mit dem S-Peptid nicht. Wurde hingegen im C-terminalen Tetradecapeptid auf Val 124 verzichtet, so entstand mit RNase 1–118 ein nahezu inaktiver Komplex; dies verdeutlichte die Notwendigkeit dieses hydrophoben Restes für die Peptid-Protein-Bindung. Der kleinere aliphatische Rest Ala 124 konnte nur die Hälfte der Bindungsenergie regenerieren<sup>[41]</sup>.

Nach Befunden einer Röntgen-Strukturanalyse<sup>[42]</sup> werden die Uracil- und Cytosinreste der RNA und die entsprechenden cyclischen Nucleotide wahrscheinlich durch die in Abbildung 11 skizzierten Wasserstoffbrücken an Ribonuclease gebunden. Für Uracil ist die Hydroxygruppe von Thr 45 ein H-Acceptor, für Cytosin ein H-Donor. Dagegen ist die Hydroxygruppe von Ser 123 ein H-Donor für Uracil und ein H-Acceptor für Cytosin. Wenn diese beiden Hydroxygruppen als Methylether blockiert wären, könnten sie nur noch H-Acceptoren sein; würden hingegen Thr 45 und Ser 123 z. B. durch Alanin ersetzt, könnten die beiden Reste weder als Donor noch als Acceptor fungieren. Eine

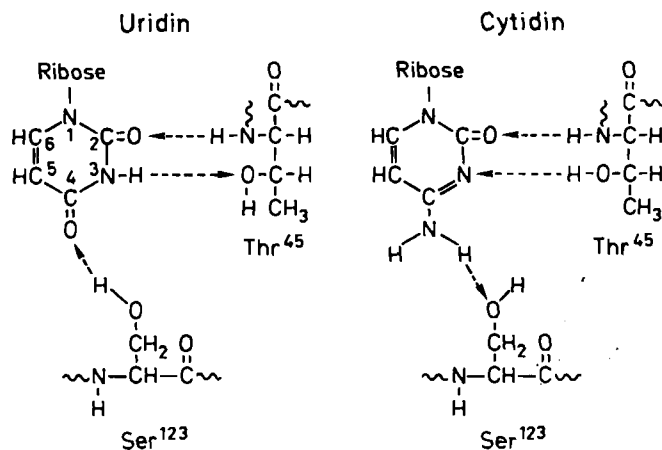


Abb. 11. Postulierte Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Uracil- und Cytosinsubstraten und Ribonuclease.

geeignete Kombination dieser Variationsmöglichkeiten könnte zu einer synthetischen Ribonuclease mit veränderter Substratspezifität führen. Analoga dieser Art wurden für Ser 123 hergestellt<sup>[43]</sup>.

Das Tetradecapeptid mit Alanin in Position 123 bildete mit RNase 1–118 einen Komplex, der eine deutliche Selektivität für Cytosinsubstrate gegenüber Uracilsubstraten (entweder die cyclischen 2',3'-Nucleotide oder Polynucleotide) hatte (Tabelle 4). Ersatz durch *O*-Methylserin veränderte die Substratspezifität nicht. Aus diesen Ergebnissen

Tabelle 4. Substratelektivität von [Ala<sup>123</sup>]-RNase-Komplexen.

Enzym	Selektivität ( $k_s/K_m$ ) C > p U > p
RNase A	4,6
[Ser <sup>123</sup> ]-RNase 111–124 + RNase 1–118	5,0
[Ala <sup>123</sup> ]-RNase 111–124 + RNase 1–118	19

wurde geschlossen, daß eine Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxygruppe von Ser 123 und der C<sup>4</sup>-Aminogruppe von Cytosin für Substratbindung und katalytische Aktivität nicht wichtig ist, daß aber die Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxygruppe von Ser 123 und der C<sup>4</sup>-Carbonylgruppe von Uracil einen signifikanten Beitrag zu Bindung und Aktivität leistet; wenn Serin durch Alanin ersetzt wird, fehlt diese Wasserstoffbrücke, und die Aktivität ist reduziert. Der entsprechende Austausch von Thr 45 durch Ala 45 und *O*-Me-Ser 45 erfordert die Totalsynthese des Enzyms; diese sehr viel schwierigeren Experimente sind noch nicht abgeschlossen. Wir vermuten, daß die Substratbindung an Thr 45 viel fester als an Ser 123 ist und daß Änderungen in dieser Position zu einer viel größeren Substratelektivität führen.

### Verbesserungen der Festphasen-Peptidsynthese

Obleich sich die Festphasen-Synthese in ihrer ursprünglich eingeführten Version für die Untersuchungen an Ribonuclease bewährt hatte, bestand kein Zweifel, daß Verbesserungen notwendig waren. Eine betraf die Art der

Bindung des Peptids an das Harz. Wenn die Strategie der unterschiedlichen Säurestabilität der  $N^\alpha$ - und  $C^\alpha$ -Gruppe beibehalten werden sollte, war eine Peptid-Harz-Bindung mit erhöhter Säurestabilität nötig. Wir vermuteten, daß der Einschub einer Acetamidomethylgruppe zwischen den Benzylester und die Polystyrolmatrix die Stabilität des Benzylesters gegenüber Trifluoressigsäure etwa um den Faktor 25 bis 400 erhöhen würde. Wir setzten den Plan in die Tat um und fanden, daß sie hundertmal stabiler war als die einfache Benzylester-Verknüpfung<sup>[44]</sup>. Zuerst entwickelten wir eine neue Methode zur Synthese des Aminomethylharzes durch Friedel-Crafts-Reaktion von *N*-Hydroxymethylphthalimid und Polystyrolharz unter  $AlCl_3$ -Katalyse<sup>[45]</sup>. Das Harz wurde dann mit einem Derivat der C-terminalen Aminosäure unter DCC-Aktivierung gekuppelt; bei dem Derivat handelte es sich um  $N^\alpha$ -Boc-aminoacyloxymethylphenyllessigsäure, ein Copolymer aus Polystyrol und Divinylbenzol (1%), das Acyloxymethylphenylacetamidomethylgruppen trug (Acyloxymethyl-Pam-Harz) (Abb. 12). Dieses neue Präparat ist gegenüber Säure stabi-

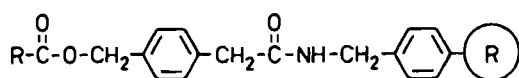


Abb. 12. Acyloxymethyl-Pam-Harz.

ler und es ist reiner, da es aus gereinigten, gut charakterisierten Zwischenstufen gewonnen wird. Es ist frei von Chlormethylgruppen, die Quaternisierung und Ionenaustauschreaktionen hervorrufen können, und auch frei von Hydroxygruppen, die über den Umweg der Trifluoracetylierung die Verlängerung von Peptidketten verhindern können<sup>[46]</sup>.

Als alternative Schutzgruppenstrategie kann ein „orthogonales System“<sup>[47]</sup> benutzt werden, in dem  $N^\alpha$ -,  $C^\alpha$ - und Seitenketten-Schutzgruppen drei verschiedene Verbindungstypen repräsentieren, die durch drei verschiedene Reaktionstypen abspaltbar sind. Auf diese Weise kann jede Schutzgruppenklasse selektiv in Gegenwart der beiden anderen entfernt werden. Abbildung 13 illustriert ein solches System. Der die Peptidkette verankernde *o*-Nitrobenzylester ist photolabil, jedoch stabil gegenüber Säuren und Nucleophilen; die funktionellen Gruppen in den Seitenketten werden mit *tert*-Butylgruppen geschützt, die sehr säurelabil, gegenüber Licht oder Nucleophilen aber stabil sind; die  $N^\alpha$ -Schutzgruppe schließlich ist der Dithiasuccinylrest, der durch nucleophile Thiole entfernt wird, jedoch säure- und photostabil ist. Dieses System wurde vor kurzem erprobt und lieferte ausgezeichnete Ergebnisse<sup>[48]</sup>.

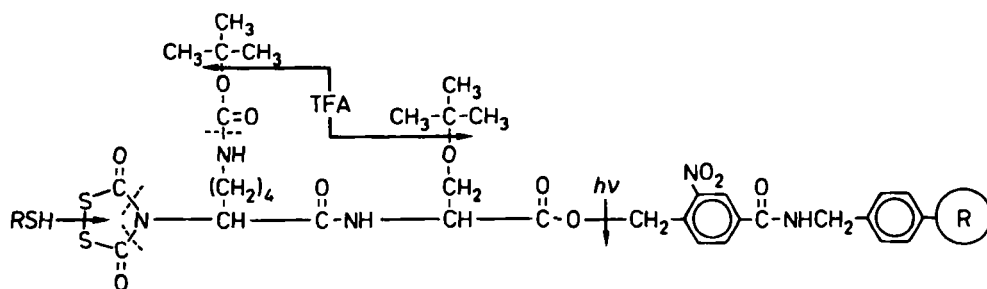


Abb. 13. Schema einer Anwendung von „orthogonalen“ Schutzgruppen.

Wasserfreier Fluorwasserstoff, das übliche Deblockierungsreagens in der Festphasen-Peptidsynthese, führt als sehr starke Säure ( $pK_a = -10.8$ ) zu Nebenreaktionen. Dabei entstehen Carbokationen, die Tyrosin-, Tryptophan-, Methionin- und Cysteinreste des Peptids alkylieren können. Weiterhin kann HF die Seitenkettencarboxygruppe von Glutaminsäureresten protonieren und dehydratisieren, wobei das sehr reaktive Acylium-Ion entsteht, das die aromatischen Ringe von Anisol und anderen kationenabfangenden Verbindungen, die im Gemisch enthalten sind, acyliert. Aktivierte Glutaminsäurereste können auch Pyrrolidon(Pyroglutaminsäure)-Verbindungen bilden. Asparaginsäurereste können in Gegenwart von HF durch Ringschluß zum Aspartimid-Derivat reagieren, durch anschließende Öffnung des Rings entstehen  $\beta$ -Asparaginsäurereste. Diese unerwünschten Reaktionen resultieren aus dem  $S_N1$ -Mechanismus der Abspaltung des Peptids vom Harz unter den üblichen Bedingungen (90% HF + 10% Anisol,  $0^\circ C$ , 1 h). Wir vermuteten, daß unter Bedingungen, die die Abspaltung nach einem  $S_N2$ -Mechanismus ermöglichten, bei dem die Acidolyse durch ein Nucleophil unterstützt wird und keine Carbokationen auftreten (Abb. 14), diese Probleme vermindert oder vermieden werden könnten. Dr. James Tam und Bill Heath, ein Doktorand, waren bei der Suche nach geeigneten Bedingungen erfolgreich und konnten so die Festphasen-Peptidsynthese verbessern<sup>[49]</sup>.

Es mußte eine schwache Base gefunden werden, die die Säurewirkung von HF reduzierte, die aber im vorliegenden sauren Milieu weitgehend unprotoniert und nucleophil bleiben sollte. Sie mußte schwächer basisch sein als die abzusplittenden Gruppen, damit jene bevorzugt protoniert würden. Ideal erfüllte die Anforderungen Dimethylsulfid (DMS). Es hat einen  $pK_b$ -Wert von  $-6.8$ . Die zu spaltenden Benzylether, -ester und -carbamate weisen solche von  $-2$  bis  $-5$  auf. Es ist ein gutes Lösungsmittel für HF, und es ist flüchtig und deshalb leicht aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen. Eine äquimolare Mischung von HF und DMS (1:3, V/V) hat einen mit Hilfe von Hammett-Indikatoren bestimmten  $pK_a$ -Wert zwischen  $-4.6$  und  $-5.2$ . Die Mechanismen der Abspaltung verschiedener, auf dem Benzylrest basierender Schutzgruppen durch HF/DMS-Gemische wurden durch kinetische Experimente und Produktanalyse untersucht. Auf Grund früherer Befunde über  $H_2SO_4$ -Hydrolyse von Alkylacetaten<sup>[50]</sup> wurde mit steigender Säurekonzentration ein scharfer Anstieg der Geschwindigkeitskonstante erwartet. An einem bestimmten Punkt wechselt der Mechanismus von  $S_N2$  nach  $S_N1$ . Ein solcher Wechsel wurde bei der Spaltung von *O*-Benzylserin durch HF/DMS-Gemische gefunden; oberhalb 50% Volumenanteil HF stieg die Reaktionsgeschwindigkeit

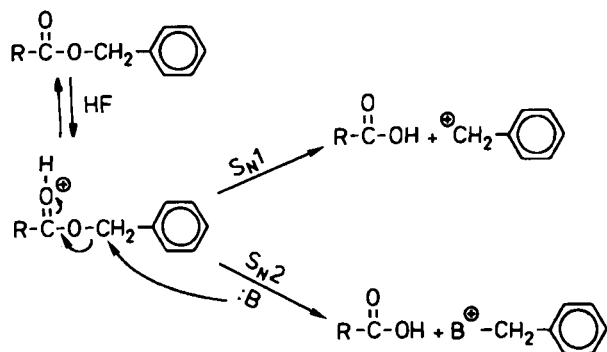


Abb. 14.  $S_N1$ - und  $S_N2$ -Acidolyse.

rasch an, wodurch die Änderung des Mechanismus deutlich wurde. Abbildung 15 zeigt die Produktanalyse der Spaltung von Tyrosinbenzylether als Funktion der HF-Konzentration. Bei einem HF-Anteil über 15% war die Tyrosinausbeute nach 1 h bei 0°C quantitativ, als weiteres Produkt wurde Benzyl(dimethyl)sulfoniumsalz gebildet. Zwischen 40% und 50% HF-Anteil nahm die Ausbeute an Sulfoniumsalz ab, während die des unerwünschten Nebenprodukts 3-Benzyltyrosin anstieg. Wiederum erfolgte eine Änderung des Mechanismus von  $S_N2$  nach  $S_N1$  bei einer HF-Konzentration von 40–50%. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 5–10% Kresol beschleunigt. Als optimal erwies sich ein Gemisch aus 25% HF, 65% DMS und 10% Kresol, das wir als „schwaches HF“ („low HF“) bezeichnen.

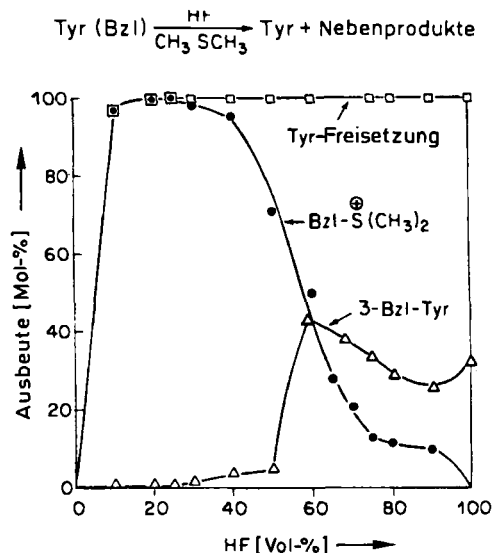


Abb. 15. Produktanalyse der Spaltung von Tyrosinbenzylether mit Gemischen von HF und Dimethylsulfid in Abhängigkeit vom HF-Anteil.

„Schwaches HF“ verhinderte auch die Bildung von Acylium-Ionen in Glutamyl- und Aspartylpeptiden sowie Acylierung und Imidbildung. Es erwies sich weiterhin als sehr wirkungsvoll in der Umwandlung von Methioninsulfoxid zu Methionin (Coprodukt: Dimethylsulfoxid). In Gegenwart von 5% eines Thiols (z. B. Thiokresol) ermöglichte es auch eine nahezu quantitative Abspaltung der Formylschutzgruppe vom Indol-Stickstoffatom des Tryptophans (Coprodukt:  $HC(SR)_3$ ). Bei hoher HF-Konzentration

(90%) laufen die beiden letztgenannten Reaktionen wegen Protonierung der Reagentien nicht ab.

Die Derivate Arg(Tos), Arg( $NO_2$ ), Cys(4-MeBzl) oder Asp(Octyl,Hexyl) werden durch „schwaches HF“ nicht deblockiert. Peptide, die diese und bestimmte andere Reste enthalten, müssen deshalb nach Entfernung von DMS mit HF hoher Konzentration (90%) nachbehandelt werden. Da jedoch die meisten potentiellen Carbokationen im Peptid bereits als weniger reaktive Dimethylsulfoniumsalze abgefangen werden, entstehen auch bei der Reaktion mit 90proz. HF erheblich weniger Nebenprodukte.

## Die Beachtung von Details ist essentiell

Ich kann nicht genug betonen, wie wichtig es für die Synthese eines Peptids von hoher Qualität ist, selbst dem kleinsten Detail Aufmerksamkeit zu schenken. Die wichtigsten Nebenprodukte der Festphasen-Peptidsynthese können in Terminierungs- und Deletionspeptide sowie modifizierte Peptide eingeteilt werden. Große Anstrengungen sind unternommen worden, um die Nebenreaktionen zu unterdrücken. Zuallererst ist darauf zu achten, daß mit reinen, gut charakterisierten Harzen, reinen Aminosäurederivaten und reinen Lösungsmitteln gearbeitet wird. Die meisten Nebenreaktionen können heute durch die Wahl geeigneter Kupplungsmethoden und -bedingungen<sup>[51]</sup> verhindert oder doch stark zurückgedrängt werden. Es ist wichtig, die Vollständigkeit der Kupplungsreaktionen zu kontrollieren, um das Auftreten von Deletionspeptiden, in denen ein oder mehrere Aminosäurereste fehlen, zu vermeiden. Für diesen Zweck eignet sich die quantitative Ninhydrinreaktion<sup>[52]</sup>, die noch positiv ist, wenn nur 0.1% der Ketten nicht reagiert hat, die Kupplungsausbeute also 99.9% beträgt. Nachdem eine Peptidkette synthetisiert worden ist, können durch Festphasen-Sequenzierung<sup>[53]</sup> die Deletionssequenzen quantifiziert werden<sup>[54]</sup>. Abgesehen von Spezialfällen stellt die Racemisierung bei der schrittweisen Festphasen-Synthese gewöhnlich kein Problem dar; empfindliche Detektionsmethoden stehen auch hierfür zur Verfügung<sup>[55]</sup>. Wenn die in diesem Abschnitt erwähnten Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden, ist in den meisten Fällen mit befriedigenden Ergebnissen zu rechnen.

## Einige neuere Peptidsynthesen

Eine sehr große Zahl von Peptiden ist in den letzten Jahren via Festphasen-Synthese hergestellt worden, und es ist völlig unmöglich, diese Synthesen hier im einzelnen zu beschreiben. In meinem Laboratorium haben wir uns mit Synthesen von Apamin<sup>[56]</sup>, Thymosin  $\alpha_1$ <sup>[57]</sup>, Glucagon<sup>[58]</sup> und Cecropin A<sup>[59,60]</sup> beschäftigt. Für diesen Bericht habe ich Synthesebeispiele ausgewählt, die zur Erläuterung der gegenwärtig bearbeiteten Gebiete beitragen.

Ein ausgezeichnetes Beispiel einer peptidsynthetischen Untersuchung, die zu nützlichen Medikamenten führte, ist die Entwicklung von Vasopressin-Analoga, die hohe anti-diuretische Aktivität haben und im wesentlichen frei von blutdrucksteigernder Wirkung sind; die von Manning und Sawyer et al.<sup>[61]</sup> synthetisierten Derivate eignen sich für die Behandlung von Diabetes insipidus. Das beste Analogon

war 1-Desamino(4-valin,8-D-arginin)vasopressin. Ebenfalls durch Synthese stießen sie auf Argininvasopressin-Analoga, die starke Inhibitoren antidiuretischer und blutdrucksteigernder Aktivität sind und bei Patienten mit Hyponatriämie, die durch übermäßige Retention von Wasser verursacht wird, Verwendung finden<sup>[62]</sup>; am wirksamsten ist das Analogon [1-( $\beta$ -Mercapto- $\beta$ , $\beta$ -cyclopentamethylenpropionsäure),2-D-phenylalanin,4-valin]-argininvasopressin.

In einigen Fällen werden Festphasen-Synthesen im kommerziellen Maßstab durchgeführt. Ein gutes Beispiel ist Lachs-Calcitonin<sup>[63]</sup>. Es wurde in Ansätzen von 50–100 g in hoch gereinigter Form hergestellt. Dieses aus 32 Aminosäureresten bestehende Hormon ist sehr wirksam bei der Behandlung der Paget-Krankheit und anderer Symptome von Hypercalcämie.

Das Gebiet, das gegenwärtig am meisten interessiert und am intensivsten bearbeitet wird, ist zweifellos die Synthese von Peptiden zur Aufklärung der immunogenen Determinanten von Proteinen und zur Entwicklung synthetischer Impfstoffe gegen virale und andere Infektionskrankheiten. Die Arbeiten aus dem Laboratorium von *Lerner*<sup>[64]</sup> haben dazu einen wichtigen Anstoß gegeben. Synthetische Antigene sind auch für die Entwicklung von Diagnostica und die Produktion von Antikörpern als Hilfsmittel für die Auffindung und Isolierung nicht identifizierter Genprodukte nützlich.

Um die Bedeutung von „neuer Chemie“ und die Notwendigkeit der Beachtung von Details bei der Anwendung der Festphasen-Peptidsynthese noch einmal zu unterstreichen, möchte ich neue Arbeiten am epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) von *Bill Heath*<sup>[65]</sup> erwähnen. EGF stimuliert die Zellproliferation, inhibiert die Sekretion der Magensäure und spielt eine Rolle in der embryonalen Entwicklung. Die Struktur dieses aus 53 Aminosäureresten bestehenden Peptids<sup>[66]</sup> zeigt Abbildung 16. Es ist ein hydrophobes, stark quervernetztes, kompaktes Molekül, das, wie andere Autoren fanden, nur sehr schwer zu synthetisieren ist. Unter Verwendung des neu entwickelten Pam-Harzes, verschiedener neuer Schutzgruppen, reiner Reagentien, der quantitativen Monitorverfahren, der neuen HF-Abspaltungsmethoden und unter Beachtung aller anderen bekannten Vorsichtsmaßregeln zur Verhütung von Nebenreaktionen gelang ihm eine nahezu quantitative Synthese der Peptidkette und eine Abspaltung mit einer Ausbeute von 97%, wobei ein Rohprodukt entstand, an dem das gewünschte EGF einen Anteil von 65% hatte. Das syntheti-

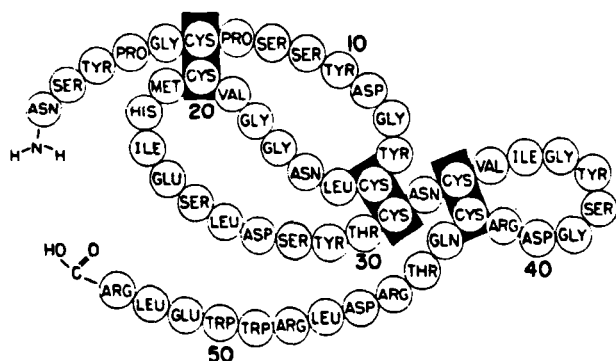


Abb. 16. Struktur des epidermalen Wachstumsfaktors aus Mäusen.

sche EGF konnte leicht als hochreines Produkt, das auf einer  $C_{18}$ -HPLC-Säule exakt die gleiche Retentionszeit wie natürliches EGF hat (Abb. 17), isoliert werden. Im empfindlichen und charakteristischen Leydig-Zellen-Wachstumstest hatten synthetisches und natürliches EGF identische Aktivität.

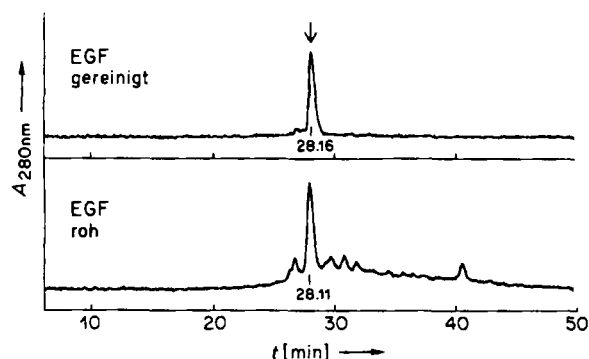


Abb. 17. HPLC-Analyse von synthetischem EGF.

Aus der Fülle der präsentierten Befunde schließen wir, daß mit der Festphasen-Synthese Peptide bis zu einer Länge von 50 Resten oder etwas darüber rasch, in guter Ausbeute und hoher Reinheit hergestellt werden können. Dies ist weit mehr, als ich bei Einführung der Methode erwarten konnte.

Als Beispiel für die Synthese eines Proteins habe ich unsere neueren Untersuchungen über Interferon gewählt. Die Sequenz von Human-Leukocyteninterferon- $\alpha_1$  wurde zuerst aus der DNA-Sequenz des klonierten Gens abgeleitet<sup>[67]</sup>. Sie enthält 166 Aminosäurereste, darunter fünf Cysteinreste (Abb. 18). Die Aminosäuresequenz von isolier-

$\alpha_1$	1	Cys-Asp-Leu-Pro	Glu	Thr-His-Ser-Leu	Asp-Asn	Arg-Arg-Thr-Leu
$\alpha_2$	2		Gln		Gly-Ser	
	16	Met-Leu-Leu-Ala-Gln-Met	Ser-Arg	Ile-Ser	Pro-Ser	Ser-Cys-Leu
			Arg-Lys		Leu-Phe	
	31	Met	Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Gln-Glu-Glu-Phe	Asp	Gly	
		Lys				
	46	Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala	Pro-Ala	Ile	Ser	Val-Leu-His-Glu
			Glu-Thr		Pro	Met
	61	Ile-Gln-Gln-Ile-Phe-Asn-Leu-Phe	Thr	Thr-Lys-Asp-Ser-Ser-Ala		
			Ser			
	76	Ala-Trp-Asp-Glu	Asp	Leu-Leu-Asp-Lys-Phe	Cys	Thr-Glu-Leu-Tyr
			Thr		Tyr	
	91	Gln-Gln-Leu-Asn-Asp-Leu-Glu-Ala-Cys-Val	Met	Gln	Glu-Glu-Arg	
			Ile		Gly-Val-Gly	
	106	Val	Gly	Glu-Thr-Pro-Leu-Met	Asn-Ala	Asp-Ser-Ile-Leu-Ala-Val
		Thr			Lys-Glu	
	121	Lys	Lys-Tyr-Phe	Arg	Arg-Ile-Thr-Leu-Tyr-Leu	Thr
		Arg		Gln		Lys
	136	Tyr-Ser-Pro-Cys-Ala-Trp-Glu-Val-Val-Arg-Ala-Glu-Ile-Met-Arg				
	151	Ser	Leu	Ser-Leu-Ser-Thr	Asn-Leu-Gln-Glu-Arg-Leu-Arg-Arg-Lys-Glu	
		Phe				

Abb. 18. Sequenzen der Leukocyteninterferone  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$ .

tem Human-Leukocyteninterferon- $\alpha_2$  wurde auch proteinchemisch bestimmt<sup>[68]</sup>; sie wies nur 155 Reste auf. Zwischen den beiden Sequenzen besteht ein hoher Grad an Übereinstimmung, die letztgenannte hat jedoch eine Deletion an der Position von Asp<sup>44</sup> und ist, entgegen der Vorhersage aus der DNA-Sequenz, am COOH-Ende zehn Reste kürzer (Abb. 18). Wir haben diese beiden Proteine und auch deren Ser<sup>1</sup>-Analoga synthetisiert und durch Reduk-

tion, Gelfiltration, Reoxidation, wiederum Gelfiltration und Affinitätschromatographie auf einer Säule, die immobilisierte Antikörper gegen polyklonales Human-Leukocyteninterferon enthielt, gereinigt<sup>[69]</sup>. Die synthetischen Proteine sowie natürliches und rekombinantes Interferon hatten in antiviralen Tests gegen ein breites Spektrum von Zelllinien eine Aktivität von 10<sup>8</sup> bis 10<sup>9</sup> Einheiten/mg. Entwicklung und Dauer des antiviralen Zustands waren ebenfalls ähnlich. Synthetisches [Ser<sup>1</sup>]-Interferon- $\alpha_2$  und natürliches Human-Leukocyteninterferon- $\alpha$  zeigten vergleichbare Wachstumsinhibition von K-562-Zellen. [Cys<sup>1</sup>]-Interferon- $\alpha_2$  und natürliches Human-Leukocyteninterferon- $\alpha$  verursachten einen ähnlichen Anstieg der Aktivität von natürlichen Killerzellen, während synthetisches [Ser<sup>1</sup>]-Interferon- $\alpha_2$  eine Abnahme dieser Aktivität bewirkte. Alle vier synthetischen Interferone werden von immobilisierten polyklonalen Anti-Human-Leukocyteninterferon- $\alpha$ -Antikörpern unter ähnlichen Bedingungen eluiert.

Diese Ergebnisse sind ermutigend, doch bleibt noch viel zu tun, um zu gewährleisten, daß selbst kleine Proteine in hoher Ausbeute und Reinheit synthetisiert werden können. Ich glaube, daß wir in dieser Hinsicht optimistisch in die Zukunft blicken können.

*Ich schulde ganz besonderen Dank meinen Lehrern Dr. M. S. Dunn von der University of California, Los Angeles, und Dr. D. W. Woolley von der Rockefeller University. Mehrere meiner früheren und jetzigen Mitarbeiter sind schon genannt worden, aber den vielen anderen, die nicht namentlich erwähnt wurden, bin ich gleichermaßen dankbar, weil sie alle zum Fortschritt unserer Arbeit beigetragen haben. Schließlich möchte ich für die fortwährende Unterstützung durch die Rockefeller University und die National Institutes of Health danken.*

Eingegangen am 13. März 1985 [A 552]  
Übersetzt von Prof. Dr. B. Gutte, Zürich

- [1] E. Fischer, E. Fourneau, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 34 (1901) 2868.
- [2] M. Bergmann, L. Zervas, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 65 (1932) 1192.
- [3] V. Du Vigneaud, C. Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts, P. G. Katsoyanis, S. Gordon, *J. Am. Chem. Soc.* 75 (1953) 4879.
- [4] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 2149.
- [5] B. H. Gisin, R. B. Merrifield, D. C. Tosteson, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 2691.
- [6] P. Kusch, *Angew. Chem.* 78 (1966) 611; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 5 (1966) 610.
- [7] R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* 87 (1965) 3526.
- [8] J. M. Fréchet, C. Schuerch, *J. Am. Chem. Soc.* 93 (1971) 492.
- [9] R. B. Merrifield, *Adv. Enzymol.* 32 (1969) 221.
- [10] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* 77 (1955) 1067.
- [11] M. Bodanszky, J. T. Sheehan, *Chem. Ind. London* 1964, 1423.
- [12] T. Wieland, C. Birr, F. Flor, *Angew. Chem.* 83 (1971) 333; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 10 (1971) 336.
- [13] S. Sakakibara, Y. Shimonishi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 38 (1965) 1412.
- [14] S. A. Narang, *Tetrahedron* 39 (1983) 3.
- [15] K. Itakura, J. J. Rossi, R. B. Wallace, *Annu. Rev. Biochem.* 53 (1984) 323.
- [16] V. K. Sarin, S. B. H. Kent, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 5463.
- [17] R. B. Merrifield, V. Littau in E. Bricas (Hrsg.): *Peptides 1968*, Elsevier, Amsterdam 1968, S. 179–182.
- [18] S. B. H. Kent, R. B. Merrifield in K. Brunfeldt (Hrsg.): *Peptides 1980*, Scriptor, Kopenhagen 1981, S. 328–333.
- [19] D. H. Live, S. B. H. Kent in V. Hruby, D. Rich (Hrsg.): *Peptides: Structure and Function*, Pierce Chem. Co., Rockford, IL, USA 1983, S. 65–68.
- [20] K. K. Bhargava, V. K. Sarin, N. L. Trang, A. Cerami, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 3247.
- [21] E. Atherton, D. L. J. Clive, R. C. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975) 6584.
- [22] R. B. Merrifield, *Biochemistry* 3 (1964) 1385.
- [23] G. R. Marshall, R. B. Merrifield, *Biochemistry* 4 (1965) 2394.
- [24] M. Manning, *J. Am. Chem. Soc.* 90 (1968) 1348.
- [25] R. B. Merrifield, J. M. Stewart, N. Jernberg, *Anal. Chem.* 38 (1966) 1905.
- [26] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 39 (1906) 530.
- [27] C. H. W. Hirs, S. Moore, W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 633.
- [28] G. Kartha, J. Bello, D. Harker, *Nature London* 213 (1967) 862.
- [29] B. Gutte, R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 1922.
- [30] F. H. White, Jr., *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 1353.
- [31] C. B. Anfinsen, E. Haber, *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 1361.
- [32] F. M. Richards, C. R. Trav. *Lab. Carlsberg Ser. Chim.* 29 (1955) 329.
- [33] F. M. Finn, K. Hofmann, *J. Am. Chem. Soc.* 87 (1965) 645.
- [34] R. Rocchi, F. Marchiori, L. Moroder, G. Borin, E. Scoffone, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 3927.
- [35] H. W. Wyckoff, K. D. Hardman, N. M. Allewell, T. Inagami, L. N. Johnson, F. M. Richards, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 3984.
- [36] M. C. Lin, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 6726.
- [37] M. C. Lin, B. Gutte, S. Moore, R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 5169.
- [38] B. Gutte, M. C. Lin, D. G. Caldi, R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 4763.
- [39] R. Hayashi, S. Moore, R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.* 248 (1973) 3889.
- [40] M. C. Lin, B. Gutte, D. G. Caldi, S. Moore, R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 4768.
- [41] R. B. Merrifield, R. S. Hodges in E. B. Mano (Hrsg.): *Proc. Int. Symp. Macromol.*, Elsevier, Amsterdam 1975, S. 417–431.
- [42] H. W. Wyckoff, D. Tsernoglou, A. W. Hanson, J. R. Knox, B. Lee, F. M. Richards, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 305.
- [43] R. S. Hodges, R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 1231.
- [44] A. R. Mitchell, B. W. Erickson, M. N. Ryabtsev, R. S. Hodges, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 7357.
- [45] A. R. Mitchell, S. B. H. Kent, B. W. Erickson, R. B. Merrifield, *Tetrahedron Lett.* 1976, 3795.
- [46] S. B. H. Kent, A. R. Mitchell, M. Engelhard, R. B. Merrifield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 2180.
- [47] G. Barany, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 7363.
- [48] G. Barany, persönliche Mitteilung.
- [49] J. P. Tam, W. F. Heath, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 6442.
- [50] K. Yates, R. A. McClelland, *J. Am. Chem. Soc.* 89 (1967) 2686.
- [51] G. Barany, R. B. Merrifield in E. Gross, J. Meienhofer (Hrsg.): *The Peptides*, Vol. 2, Academic Press, New York 1979, S. 1–284.
- [52] V. K. Sarin, S. B. H. Kent, J. P. Tam, R. B. Merrifield, *Anal. Biochem.* 117 (1981) 147.
- [53] R. A. Laursen, *J. Am. Chem. Soc.* 88 (1966) 5344.
- [54] H. D. Niall, G. W. Tregear, J. Jacobs in J. Meienhofer (Hrsg.): *Chemistry and Biology of Peptides*, Ann Arbor Press, Ann Arbor, MI, USA 1972, S. 695–699.
- [55] J. M. Manning, S. Moore, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 5591.
- [56] W. L. Cosand, R. B. Merrifield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 2771.
- [57] T. W. Wong, R. B. Merrifield, *Biochemistry* 19 (1980) 3233.
- [58] S. Mojsos, R. B. Merrifield, *Biochemistry* 20 (1981) 2950.
- [59] R. B. Merrifield, L. D. Vizioli, H. G. Boman, *Biochemistry* 21 (1982) 5020.
- [60] D. Andreu, R. B. Merrifield, H. Steiner, H. G. Boman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 6475.
- [61] M. Manning, L. Balaspiri, M. Acosta, W. H. Sawyer, *J. Med. Chem.* 16 (1973) 975.
- [62] M. Manning, W. A. Klis, A. Olma, J. Seto, W. H. Sawyer, *J. Med. Chem.* 25 (1982) 414.
- [63] J. Hughes, US-Pat. 3926938 (16. Dezember 1975).
- [64] R. A. Lerner, *Nature London* 299 (1982) 592.
- [65] W. F. Heath, unveröffentlicht.
- [66] S. Cohen, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 1555.
- [67] N. Mantel, M. Schwarzstein, M. Streuli, S. Panem, S. Nagata, C. Weissmann, *Gene* 10 (1980) 1.
- [68] W. P. Levy, M. Rubinstein, J. Shively, V. Del Valle, C. Y. Lai, J. Moschere, L. Brink, L. Gerber, S. Stein, S. Pestka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 6186.
- [69] M. Krim, I. Mecs, E. L. Merrifield, F. Fox, V. Sarin, R. B. Merrifield, TNO-ISIR Meeting, Heidelberg, 21.–25. Oktober 1984.