

# ANGEWANDTE CHEMIE

103. Jahrgang 1991

Heft 2

Seite 117–222

## Auf dem Weg zur chemischen Synthese von Proteinen

Von Ernst Bayer\*

Die chemische Totalsynthese von Proteinen tritt in die Phase der Realisierbarkeit ein. Damit wird Wirklichkeit, was *Emil Fischer* schon 1902 voraussagte [\*\*]: „Ich sehe deshalb die Zeit voraus wo die physiologische Chemie ... sich auch künstliche Fermente bereitet.“ Die bisher für Peptide aus bis zu zwanzig Aminosäuren sicher etablierte Festphasensynthese an polymeren Trägern konnte durch die Entwicklung neuer Polymere und moderner Methoden zur Trennung und Charakterisierung von Polypeptiden wesentlich verbessert werden. Hydropholie, möglichst homogene Korngrößenverteilung, gleiche Quellung in verschiedenen zur Peptidsynthese verwendeten Lösungsmitteln sowie Druckstabilität sind die wesentlichsten Eigenschaften der neuen Träger für schnelle Peptidsynthesen im kontinuierlichen Durchfluß. Mit Ppropfcopolymeren aus schwach vernetztem Polystyrol und linearem Polyethylenglycol kann im Routinebetrieb der Synthesecyclus für die Anknüpfung eines Aminosäurerestes auf 10–20 min verkürzt und zugleich eine höhere Ausbeute erzielt werden. Mit monodispersen Ppropfcopolymeren von 10 µm Durchmesser läßt sich die Dauer eines Synthesecyclus im Prinzip auf 1–5 min verringern. Mit dieser Hochgeschwindigkeits-Festphasensynthese können auch längere Peptide bis in den Bereich von Proteinen in wenigen Stunden aufgebaut werden. Mit neueren massenspektrometrischen Methoden, wie der Ionspray-Massenspektrometrie, können Proteine bis zu Molmassen von 100 kDa charakterisiert werden, und mit der Kapillarzonenelektrophorese steht neben der HPLC eine weitere effiziente Trennmethode zur Verfügung.

### 1. Einleitung

Die chemische Synthese von Peptiden hat in den vergangenen zwanzig Jahren einen großen Aufschwung erfahren. Bei vielen neu isolierten natürlichen Wirkstoffen mit Peptidstruktur, wie Hormonen, Neuropeptiden, Antibiotica, die oft nur in kleinen Mengen rein gewonnen werden konnten, hat sich die Synthese zur endgültigen Strukturaufklärung als unerlässlich erwiesen. Die Erforschung der Beziehungen zwischen Struktur und biologischer Aktivität bei Peptidwirkstoffen erfordert die Synthese von vielen Peptiden mit varierten Sequenzen. In der Immunologie ist die Peptidsynthese ebenfalls ein unerlässliches Werkzeug geworden. So ist zur

Epitop-Charakterisierung und Antikörperbildung die Synthese von überlappenden Peptidsequenzen notwendig.

Der Aufschwung der chemischen Peptidsynthese wäre ohne die von *Merrifield*<sup>[1]–[3]</sup> eingeführte Festphasensynthese an polymeren Trägern nicht möglich gewesen. Für den außenstehenden Betrachter scheint es, als ob auf diese Art jedes Peptid routinemäßig synthetisiert werden könnte, und die heute verfügbaren Synthesearmaten verstärken diesen Eindruck noch. Es verwundert daher nicht, daß seit der Einführung der Festphasensynthese immer wieder vorausgesagt wurde, daß die chemische Synthese von Proteinen bald zu einer Routineangelegenheit würde. Tabelle 1 zeigt an einigen ausgewählten Beispielen, daß seit über zwanzig Jahren immer wieder gelegentlich Berichte über die Festphasensynthese von Proteinen in der Literatur auftauchen.

Wenn man die Reinheitskriterien der Organischen Synthesechemie und der Arzneimittelsynthese anlegt, lieferte keine der in Tabelle 1 genannten „Proteinsynthesen“ mit Sicher-

[\*] Prof. Dr. E. Bayer

Institut für Organische Chemie der Universität  
Auf der Morgenstelle 18, W-7400 Tübingen

[\*\*] Zitiert aus *Nobel Lectures-Chemistry 1901–1921*, Elsevier, Amsterdam 1966, S. 34.

heit ein einheitliches Produkt. Diese Erkenntnis hat auch dazu geführt, daß nach den in den Jahren 1969 bis 1973 häufiger beschriebenen „Proteinsynthesen“ in der Folgezeit nur noch wenige Publikationen erschienen. Das Ziel einer zuverlässigen Synthese langerer Polypeptide ist somit noch nicht erreicht. Es ist aber lohnenswert, dieses Ziel anzusteuern. Denn bei den nach der Festphasenmethode durchaus rein herstellbaren kleineren Peptidwirkstoffen hat die Synthese wesentliche Erkenntnisse über Zusammenhänge zwischen Struktur und biologischer Aktivität erbracht, wie sie auch bei Proteinen erwartet werden könnten, sofern eine zuverlässige Synthese möglich wäre.

Tabelle 1. Versuchte Synthesen natürlich vorkommender Proteine mit der Festphasenmethode.

Protein	Zahl der Amino-säurereste	Jahr	Autoren
Ferredoxin	55	1968	Bayer, Hagenmaier, Jung [133]
Ribonuclease A	124	1969	Gutte, Merrifield [134]
Cytochrom c	104	1969	Sano, Kurihara [135]
Wachstumshormon	188	1970	Li, Yamashiro [136]
Ribonuclease T <sub>1</sub>	104	1972	Izumiya [138]
Lysozym	129	1973	Sharp et al. [137]

Oft wird die Frage gestellt, ob durch die Möglichkeiten der Gentechnik zur Darstellung rekombinanter Proteine die chemische Synthese nicht überflüssig geworden sei. Solange eine zuverlässige chemische Synthese nicht möglich ist, läßt sich diese Frage nicht beantworten. Es ist aber einleuchtend, daß bei genetisch nicht codierten Aminosäuren oder bei nachfolgender Derivatisierung der Proteine die chemische Synthese eine geeignete Darstellungsmethode sein könnte. Wie man bei kleineren Peptiden durch Austausch von genetisch codierten gegen nicht übliche Aminosäuren überraschende biologische Wirkungen erzielt hat, kann dies auch bei Proteinen erwartet werden. Vor allem die spezifische Einführung <sup>13</sup>C-markierter Aminosäurereste in Sequenzpositionen des aktiven Zentrums von Enzymen für NMR-Studien des Mechanismus ist nur durch die chemische Synthese möglich. Die biotechnologische und die chemische Synthese können sich daher gut ergänzen, und die noch junge Wissenschaft des Protein-Design<sup>[4-6]</sup> würde von einer zuverlässigen Synthese langerer Peptide einen kräftigen Impuls erfahren.

Es ist daher wichtig, kritisch Bilanz zu ziehen über den gegenwärtigen Stand der automatisierbaren Peptidsynthesen und künftige Entwicklungslinien aufzuzeigen.

## 2. Prinzip der Festphasensynthese nach Merrifield

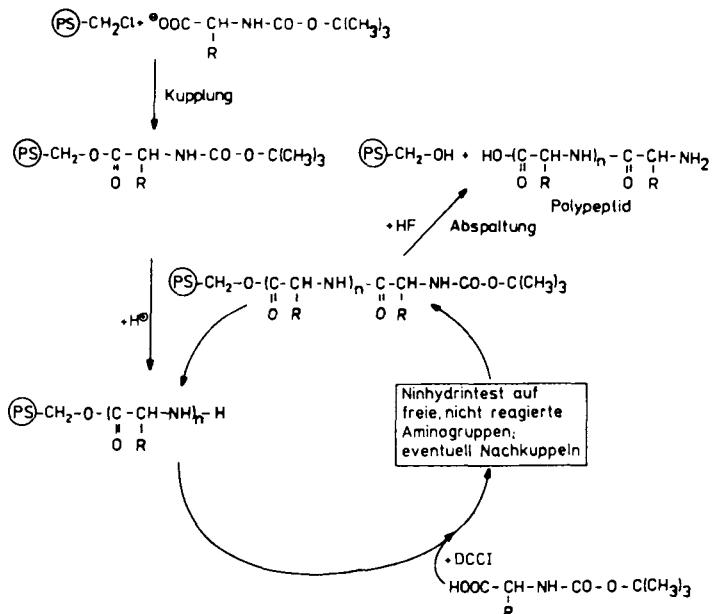
Grundsätzlich gehört die Synthese an festen Trägern zur Strategie des stufenweisen Aufbaus von Peptiden durch aufeinanderfolgende Kupplungen der Aminosäuren. Dieses Vorgehen ist in der Peptidchemie mit niedermolekularen Schutzgruppen seit längerem bekannt<sup>[7]</sup>, hat aber eine geringere Verbreitung als die klassische Kupplung von Fragmenten<sup>[8-10]</sup> gefunden. Es war auch schon bekannt, daß die stufenweise Kupplung jeweils vom C- zum N-terminalen Ende erfolgen sollte<sup>[11, 12]</sup>, da hier eine geringere Racemisierung auftritt als bei der umgekehrten Orientierung. Die stufenweise Kupplung unter Verwendung niedermolekularer C-terminaler Schutzgruppen ist auch wegen der häufigen Schwerlöslichkeit eines Kupplungspartners wenig verbreitet. Eine Fortführung der Synthese in solchen Fällen als heterogene Reaktion scheitert an der schlechten Filtrierbarkeit der Reaktionsmischung.

Die geniale Idee von Merrifield war nun, als C-terminaler Schutzgruppe ein Polymer zu verwenden, das gut filtrierbar ist, z. B. ein mit Divinylbenzol (DVB) schwach vernetztes chlormethyliertes Polystyrol, an das gemäß Schema 1 die N-geschützte C-terminalen Aminosäure geknüpft wird. Nach Abspaltung der Aminoschutzgruppe wird die nächste N-geschützte Aminosäure gekuppelt und der Cyclus so oft wiederholt, bis das Peptid am Träger aufgebaut ist. Der Vorteil dieser Arbeitsweise liegt darin, daß große Überschüsse an zu kuppelnden Komponenten verwendet werden können, da sie und alle zur Kupplung notwendigen Reagentien durch einfaches Filtrieren vom polymergebundenen Peptid abgetrennt werden können. Die mühsamen Zwischenreinigungen der klassischen Peptidsynthese entfallen dadurch, und die Synthesezeit wird erheblich kürzer.

Für die Peptidkupplung wurde ursprünglich Dicyclohexylcarbodiimid als Wasser-Acceptor vorgeschlagen, aber auch viele andere bewährte Kupplungsmethoden z. B. mit Aktivestern oder Anhydriden sind geeignet<sup>[13-20]</sup>. Neben der zur Verankerung der C-terminalen Aminosäure am Polymer zuerst vorgeschlagenen Chlormethylgruppe sind inzwischen viele andere Ankergruppen eingeführt worden<sup>[13, 21-28]</sup>.



Ernst Bayer wurde am 24. März 1927 in Ludwigshafen/Rhein geboren. Sein Chemiestudium an den Universitäten Heidelberg und Freiburg schloß er 1952 mit dem Diplom ab. 1954 promovierte er bei Richard Kuhn am Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung über Hämovanadin. Nach seiner Habilitation 1958 in Karlsruhe blieb er dort bis 1962 als Dozent. Seit 1962 ist er Professor an der Universität Tübingen, nur unterbrochen durch die Robert-A.-Welch-Professur an der University of Houston (Februar 1967 - April 1970). Er erhielt unter anderem 1978 die Tswett-Medaille der sowjetischen Akademie der Wissenschaften und den britischen A. J. P. Martin Award, 1981 die Max-Bergmann-Medaille, 1985 den US-amerikanischen Tswett Award, 1989 das Verdienstkreuz 1. Klasse des Verdienstordens der Bundesrepublik Deutschland und 1990 die Richard-Kuhn-Medaille der Gesellschaft Deutscher Chemiker. Seit 1982 ist er Vorsitzender des Beratergremiums für umweltrelevante Altstoffe. Seine wissenschaftlichen Arbeitsschwerpunkte sind Naturstoffchemie, Peptidsynthese, Trennmethoden, natürliche Metallkomplexe, Polymerchemie, Katalyse und Enantiomerenanalyse.



Schema 1. Synthesecyclus der Festphasensynthese nach Merrifield. PS = Polystyrol, das mit 0.5–1% DVB vernetzt ist; DCCI = Dicyclohexylcarbodiimid.

Auch heute noch wird die ursprüngliche Strategie von Merrifield breit angewendet und die von ihm vorgeschlagenen Ankergruppen sowie die sauer abspaltbare *tert*-Butyloxycarbonyl(Boc)-Gruppe als Aminoschutzgruppe verwendet. Zum Schutz trifunktioneller Aminosäuren wird auch bei der Festphasenmethode auf das reichhaltige Arsenal der in die Peptidchemie eingeführten Gruppen zurückgegriffen [9 – 13, 29 – 35].

Nach der Synthese wird das Peptid vom Polymer abgespalten. Bei der Merrifield-Strategie werden starke Säuren, z. B. die Fluorwasserstoffsäure, zur Abspaltung verwendet. Unter diesen Bedingungen werden gleichzeitig die Schutzgruppen entfernt und die freien Peptide gebildet. Wegen der standardisierten Arbeitsschritte ist die Festphasensynthese leicht automatisierbar. Synthesearmatoren wurden entwickelt und sind im Handel erhältlich<sup>[31, 36 – 38]</sup>.

### **3. Probleme der Reindarstellung**

Auch geniale Ideen wie die der Festphasensynthese haben allerdings ihre Tücken. So stellte sich bald heraus, daß die Tatsache, daß die wachsende Peptidkette stets am Polymer verbleibt, nicht nur Vorteile (leichte Abtrennbarkeit) hat. Denn im Prinzip liefert eine ohne Zwischenreinigung vorgenommene vielstufige Synthese nur dann ein einheitliches Produkt, wenn jede Teilreaktion eindeutig ist und quantitativ verläuft. Doch für welche organische Reaktion gilt schon, daß sie stets eindeutig und quantitativ verläuft? Auch bei der Peptidsynthese ist mit Nebenreaktionen zu rechnen, z. B. mit der Abspaltung der Schutzgruppen trifunktioneller Aminosäuren und der Weiterreaktion der Dritt funktionen (Carboxy-, Amino-, Hydroxygruppe), mit Racemisierung sowie mit Umlagerungen und Ringschlüssen.

Die dadurch entstehenden Nebenprodukte können weiterreagieren und verbleiben zusammen mit dem wachsenden Peptid bis zum Syntheseende am Polymer. Doch selbst wenn

Nebenreaktionen vermieden werden, ist eine vollständige Kupplung und Abspaltung der *N*-terminalen Schutzgruppe in jedem Schritt bei der heterogenen Reaktion am Polymerkugelchen unwahrscheinlich. Einflüsse der Polymermatrix sowie die Bildung von rigidten Konformationen können die Ausbeute drastisch senken, und in der Literatur wird auf solche konformationsabhängigen Effekte hingewiesen<sup>[38-46]</sup>. Vor allem die Bildung von  $\beta$ -Faltblattstrukturen bei Peptiden mit 6–20 Aminosäureresten kann oft das vorzeitige Ende einer geplanten Synthese bedeuten.

Selbst wenn man bei Kupplung und Abspaltung der Aminoschutzgruppe in jedem Schritt 99.5% Ausbeute erzielen würde, bliebe das Problem der Rumpf- und Fehlsequenzen<sup>[47-52]</sup>. Am Beispiel der Synthese eines Pentapeptids A-B-C-D-E ist dies in Abbildung 1 gezeigt. Die Rumpfsequenzen-Peptide entstehen, wenn das Polymerpeptid in einer Synthesestufe nicht mehr weiter reagiert. Sie haben im Prinzip noch die richtige Sequenzfolge. Da aber durch Konformationsänderungen eine Endgruppe, die bei einer oder mehreren Kupplungen nicht reagiert hat, bei späteren Reaktionen wieder zugänglich werden kann, entsteht eine mit wachsender Peptidlänge binomial steigende Zahl von Peptidsequenzen mit Fehlstellen. Diese Vielzahl von Fehlsequenzen-Peptiden, die dem gewünschten Produkt nahe verwandt sind, ist schwierig abzutrennen. Es ist nachgewiesen, daß solche Fehlsequenzen auch bei im Prinzip gut verlaufenden Synthesen auftreten<sup>[47-54]</sup>. Neben chromatographischen

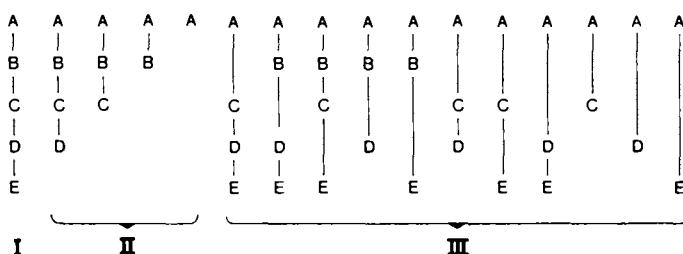


Abb. 1. Rumpf- II und Fehlsequenzen III bei der Festphasensynthese eines Pentapeptids A-B-C-D-E [**I**].

Methoden sind vor allem die neueren massenspektrometrischen Methoden wie FAB(*Fast Atom Bombardment*)- und Ionspray-Verfahren zum Nachweis der Fehlsequenzen-Peptide geeignet. Abbildung 2 zeigt den Nachweis solcher Fehlsequenzen bei einem synthetisierten Heptadecapeptid direkt nach der Abspaltung vom Polymer.

Bei der Annahme von 95% Ausbeute für jede Kupplung und Abspaltung der N-Schutzgruppe würde eine Ribonuclease mit 124 Aminosäureresten nur in 0.0002% Ausbeute erhalten werden, während zugleich die 15fache Menge an Peptiden mit einer Aminosäure weniger vorläge. Es ist augenscheinlich, daß eine Proteinsynthese daher beim ursprünglichen Stand der Festphasenmethode nur unter sehr glücklichen Umständen möglich wäre. Nur wenn die Ausbeute durch Optimierung der Synthese drastisch erhöht wird, besteht bei längeren Peptiden Aussicht, die richtige Sequenz in größeren Ausbeuten und dann auch rein erhalten zu können. Bei 99.5% Ausbeute in jedem Schritt würden immerhin schon 29% Hauptprodukt Ribonuclease erhalten werden können, gegenüber nur noch 36% Peptidsequenzen mit einer Aminosäure weniger.

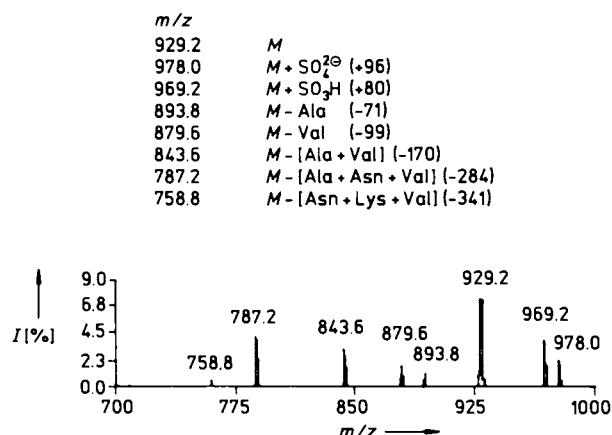


Abb. 2. Ionenspray-Massenspektrum des 17er Peptids H-Ala-Val-Leu-Gly-His-Asp-Glu-Ala-Ala-Tyr-Ser-Lys-Asn-Arg-Arg-Ala-Val-OH  $M$  unmittelbar nach der Abspaltung vom Polymer. Neben dem 17er Peptid  $m/z = 929.2$  sind fünf Fehlsequenz-Peptide nachweisbar. Die  $m/z$ -Werte gelten für die Ionen der rechts angegebenen Zusammensetzung, die jeweils als diprotonierte Spezies detektiert werden. In Klammern sind die Massendifferenzen zu  $M$  angegeben.

Bei kleineren Peptiden ist der Anteil an Fehlsequenz-Peptiden geringer und eine chromatographische Trennung leichter. Gleichwohl war die Reindarstellung auch bei diesen kleineren Peptiden in den Anfangsjahren der Festphasenmethode schwierig. Erst durch die in den siebziger Jahren entwickelte trennwirksame Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) konnte sich die Festphasenmethode endgültig durchsetzen. Die ersten Anwendungen der HPLC zur Trennung von synthetischen Peptiden sind 1973 dokumentiert<sup>[55, 56]</sup>. Heute gibt es kaum noch eine Publikation, in der nicht die HPLC zur Endreinigung eines am festen Träger synthetisierten Peptids verwendet würde. Somit bedurfte es einer neuen Trennmethode, um die polymergestützte Synthese von Peptiden im Bereich bis zu etwa zwanzig Aminosäureresten sicher zu etablieren.

Die Trennung von Proteinen ist durch die konventionelle HPLC nicht so leicht möglich. Zum einen nimmt bei längeren Polypeptiden die Zahl und Menge schwer abtrennbarer Peptide mit ähnlichen Sequenzen exponentiell zu, zum anderen sind viele stationäre Phasen nicht für Proteine geeignet. Daher ist die Entwicklung neuer Trenn- und Charakterisierungsmethoden grundsätzlich notwendig, um eine zuverlässige Synthese auch von Proteinen zu garantieren. In Abschnitt 6 wird auf das Zusammenspiel von Synthese und Trennmethoden nochmals zurückgekommen.

#### 4. Optimierung des Trägerpolymers

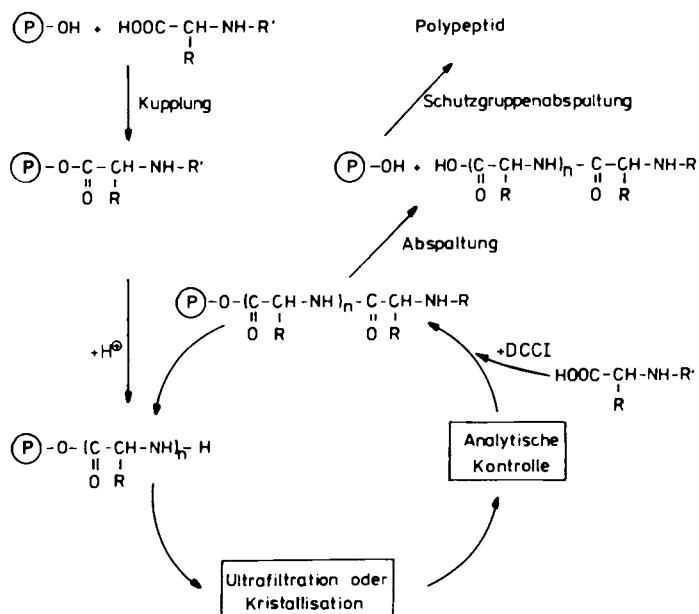
Ohne die Bedeutung der Optimierung von Peptidsynthesen durch die richtige Wahl der Schutzgruppen, der Anker zur Bindung der C-terminalen Aminosäure und der Strategie der Synthese einschränken zu wollen, ist es doch einleuchtend, daß eine Optimierung des Trägerpolymers am grundsätzlichsten zur Verbesserung der Festphasensynthese beitragen könnte. Polystyrol ist eine relativ hydrophobe Matrix und daher für die hydrophilen Peptide nicht die erste Wahl. Hinzu kommen sterische Faktoren und mangelnde kinetische Äquivalenz der funktionellen Gruppen im vernetzten Polymer. Da die Festphasensynthese eine heterogene Reaktion ist, ist die Verringerung der Diffusionsabhängigkeit

wichtig. Die unterschiedliche Reaktivität der funktionellen Gruppen in vernetzten Polystyrolen ist von *Rudinger et al.*<sup>[57]</sup> sowie von *Andreatta et al.*<sup>[58]</sup> nachgewiesen worden.

#### 4.1. Flüssigphasensynthese

Matrixeffekte des vernetzten Polymers und heterogene Reaktion können vermieden werden, wenn ein lineares, lösliches Polymer verwendet wird. Dieser Weg ist von *Shemyakin, Ovchinnikov et al.*<sup>[59]</sup> mit linearem Polystyrol und von *Bayer, Mutter et al.*<sup>[60–66]</sup> mit linearem Polyethylenglycol beschritten worden. Lineares Polystyrol vernetzt sehr leicht und läßt sich schlecht handhaben. Verträglicher ist Polyethylenglycol (PEG), das aufgrund seiner guten Löslichkeit in vielen organischen Lösungsmitteln sogar auch sonst unlösliche Peptide solubilisieren kann.

Ein Synthesecyclus nach der Flüssigphasenmethode ist in Schema 2 wiedergegeben. Die Kupplung findet in homoge-



Schema 2. Synthesecyclus der Flüssigphasenmethode [60–66].

ner Lösung statt. Kinetische Untersuchungen<sup>[67]</sup> haben gezeigt, daß mit der polymeren C-terminalen Polyethylenglycolschutzgruppe gleiche Geschwindigkeitskonstanten der Peptidkupplungen erhalten werden wie mit den üblichen niedermolekularen Schutzgruppen (siehe Tabelle 3). Diffusionsphänomene spielen also keine Rolle. An die Stelle der einfachen Filtration bei der Festphasenmethode tritt die Ultrafiltration, die hier geeignet ist, da sich Polymerpeptid ( $M \approx 3\text{--}20\text{ kDa}$ ) und niedermolekulare Reagentien in der Molekülgröße erheblich unterscheiden. Auch die leichte Kristallisierbarkeit von Polyethylenglycolpeptiden zur Abtrennung zu nutzen hat sich bewährt<sup>[64]</sup>.

Wesentlicher Vorteil der Flüssigphasenmethode ist die bessere analytische Kontrolle der Reaktion, da nun auch spektroskopische Methoden wie die NMR-Spektroskopie und Messung des Circulardichroismus (CD) routinemäßig eingesetzt werden können. Die breiteste Anwendung hat die Flüssigphasenmethode in Studien zur Änderung der Faltung

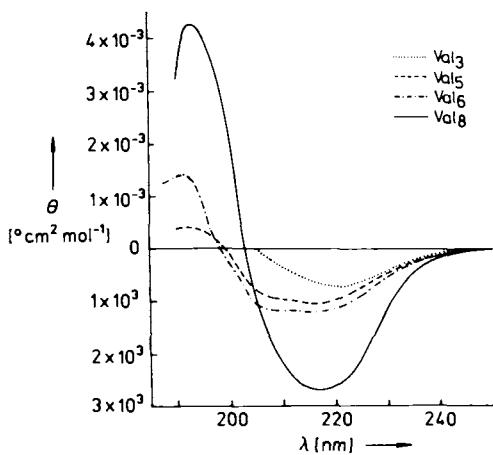


Abb. 3. CD-Spektren von Boc-(L-Val)<sub>n</sub>-Gly-PEG in Trifluorethanol. n = 3 und 5: ungeordnet (random coil); n = 6: 15% β-Faltblattstruktur; n = 8: 100% β-Faltblattstruktur.

von Peptiden bei deren stufenweisem Aufbau gefunden<sup>[65, 68 – 70]</sup>. Abbildung 3 zeigt eine solche CD-spektroskopische Studie des stufenweisen Aufbaus von Polyvalin<sup>[71]</sup> und Abbildung 4 das NMR-Spektrum einer an Polyethylenglycol gebundenen Insulinsequenz<sup>[72]</sup>.

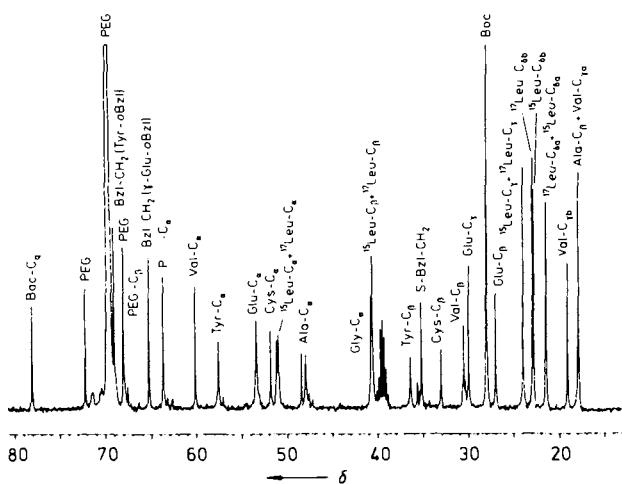


Abb. 4. Aliphatischer Bereich der <sup>13</sup>C-NMR-Signale des an Polyethylenglycol gebundenen Octapeptids, das dem Insulinsegment B 13-20 entspricht. Messung in [<sup>12</sup>C, <sup>2</sup>H]-Me<sub>2</sub>SO-Suspension.

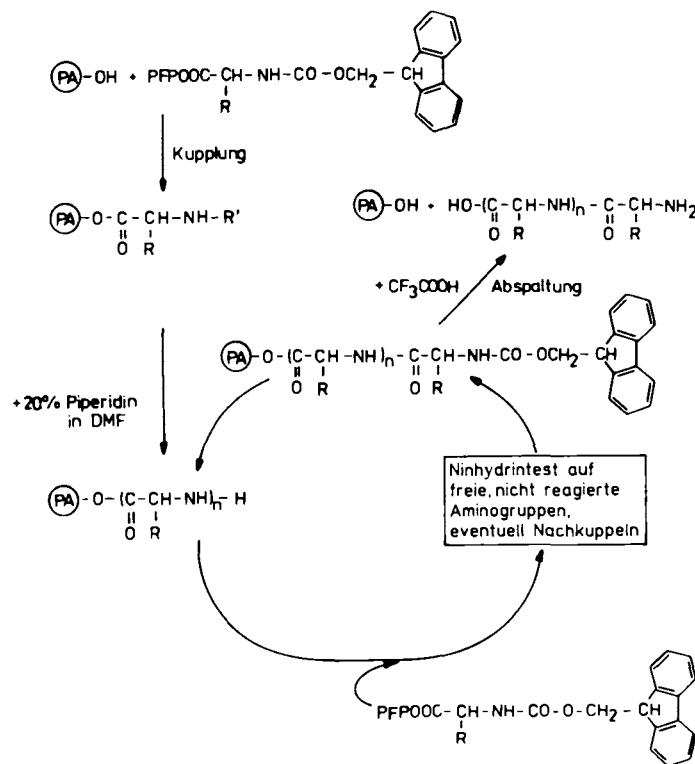
Nachteile der Flüssigphasenmethode sind jedoch die schlechte Automatisierbarkeit und der Zeitaufwand<sup>[73]</sup>. Die Ultrafiltration dauert oft sehr lange, und die Kristallisationsmethode kann wegen Fällung, Waschen und Wiederauflösen der Niederschläge praktisch nicht störungsfrei in einem Syntheseautomaten durchgeführt werden. Hinzu kommt, daß die Solubilisierung durch Polyethylenglycol bei längeren Peptidketten nicht ausreicht.

#### 4.2. Polyacrylamide als Träger

Hydrophilere Träger als Polystyrol sind von Atherton, Sheppard et al.<sup>[32, 74 – 76]</sup> mit Polyacrylamiden in die Peptidsynthese eingeführt worden. Poly(*N,N*-dimethyl-acrylamid) ist in seiner Polarität peptidähnlicher und quillt daher in den

für Peptidsynthesen oft notwendigen Lösungsmitteln, z. B. Dimethylformamid (DMF), besser als die Polystyrolträger. Ein gutes Quellen des Polymeren ist für die freie Zugänglichkeit der Funktionen im Polymer, vor allem auch in den Mikroporen, notwendig. Je weniger der Reaktionsraum durch die Polymermatrix eingeengt wird, desto günstiger sind die Reaktionsbedingungen.

Carpino und Han<sup>[77]</sup> haben die Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Gruppe zum Schutz der Aminofunktion beschrieben. Diese Fmoc-Gruppe kann alkalisch mit Piperidin abgespalten werden und somit gezielt als Aminoschutzgruppe verwendet werden, während für die Dritt funktionen sauer abspaltbare Schutzgruppen eingesetzt werden („orthogonaler Schutz“). Gegenüber der nur sauer abspaltbaren Boc-Gruppe bringt die Fmoc-Gruppe erhebliche Verbesserungen. Ihre UV-Absorption eröffnet auch die Möglichkeit der spektroskopischen Synthesekontrolle. Insbesondere für Syntheseautomaten ist die alkalische Abspaltung aus Korrosionsgründen günstiger als die saure. Wesentlich ist auch die Erweiterung der Strategie durch die alkalische Abspaltung.



Schema 3. Synthesecyclus der Festphasensynthese an Polyacrylamidgelen mit Fmoc-Strategie. PA = Copoly(dimethylacrylamid bis(acryloyl)ethylendiamin-acryloylsarcosinmethylester) + Linker. PFP = Pentafluorphenyl.

Aus diesen Gründen haben die Polyacrylamidgele und die Fmoc-Strategie insbesondere in Europa eine weitere Verbreitung gefunden als die ursprüngliche Merrifield-Strategie. In Schema 3 ist die Synthese an Poly(*N,N*-dimethylacrylamid) unter Verwendung der Fmoc-Schutzgruppe schematisch wiedergegeben.

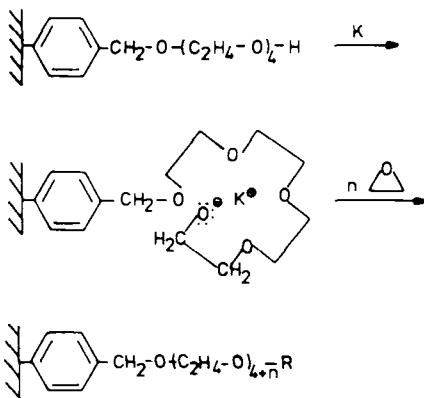
#### 4.3. Hydrophile Tentakelpolymere

Wie in Abschnitt 4.1 erwähnt, ist PEG ein sehr gut mit Peptiden verträgliches Polymer. Es löst sich in Wasser und

fast allen organischen Lösungsmitteln mit Ausnahme von aliphatischen Kohlenwasserstoffen und Diethylether. In der Flüssigphasensynthese hat sich PEG bewährt. Lediglich die Abtrennung des PEG-gebundenen Peptids von den Reagenzien in homogener Lösung bereitete Schwierigkeiten. Es lag daher nahe, diese Schwierigkeit durch Immobilisierung von längeren PEG-Ketten an einem festen Träger zu vermeiden und so die Vorteile von Festphasen- und Flüssigphasen-Peptidsynthese zu vereinen.

Da eine Vernetzung des linearen Polyethylenglycols eine zu große Einengung der Kettenmobilität bedeutet hätte, war das Syntheseziel eine Aufpfropfung von PEG auf eine feste Matrix. Anorganische Festkörper wie Kieselgel schieden als Matrix aus, da chemisch modifizierte Silicagele unter den bei der Peptidsynthese üblichen wiederholten sauren oder alkalischen Schutzgruppenabspaltungen nicht genügend stabil sind. Die einfachste Immobilisierung wäre die Bindung einer terminalen PEG-Hydroxygruppe an chlormethyliertes Polystyrol nach einer klassischen Ethersynthese<sup>[78, 79]</sup>. Bei dieser Reaktion nehmen aber die Ausbeuten bei längeren PEG-Ketten (> 800 Da) drastisch ab. Außerdem reagieren beide terminalen Hydroxygruppen mit Chlormethylgruppen, so daß das Polystyrol noch zusätzlich vernetzt wird. Die Zahl der freien Hydroxygruppen und damit die Kapazität des Polymers zur Bindung des Peptids werden dadurch vermindert.

Inzwischen wurde ein Verfahren entwickelt, um PEG-Ketten beliebigen Polymerisationsgrades auf durch Hydroxygruppen funktionalisierte vernetzte Polystyrolkugelchen aufzupfropfen; es basiert auf der anionischen Polymerisation von Ethylenoxid<sup>[80–86]</sup>. Über Synthese, Eigenschaften und Anwendung dieser Pfropfcopolymere wird hier erstmals zusammenfassend berichtet. Für die Synthese (Schema 4)



Schema 4. Synthese von Pfropfcopolymeren aus vernetztem PS und linearem PEG. R = H, K.

wird vorzugsweise das Kaliumsalz von Poly(styrylmethyl-tetraethylenglycol-ether), das in Form eines offenen Kronenethers vorliegt, eingesetzt. In dieser Aufpfropfreaktion können funktionalisierte Polystyrolkugelchen jeder beliebigen Porosität eingesetzt werden. Bei unporösen Kugelchen wird Ethylenoxid nur an der Oberfläche aufgepfropft, so daß die Polyoxyethylenketten wie Tentakeln völlig aus der Polystyrolmatrix herausragen. Solche Polymere sind als stationäre Phasen für die HPLC interessant, für Peptidsynthesen jedoch weniger geeignet, da die Beladung an Peptid zu gering

ist. Für Peptid- und Nucleotidsynthesen interessanter sind die aus porösen Polystyrolkugelchen hergestellten Pfropfcopolymere.

Als optimal haben sich aufgepfropfte PEG-Ketten von etwa 3000 Da herausgestellt. Diese Pfropfcopolymere enthalten etwa 70% lineares PEG und nur noch etwa 30% der vernetzten PS-Matrix. Die Eigenschaften der Polymere werden daher im wesentlichen durch den PEG-Anteil bestimmt. Dies kommt vor allem in der Quellung zum Ausdruck. In Tabelle 2 sind die Quellsfaktoren der Polystyrol-Polyethylenglycol-Pfropfcopolymere und der Polystyrole für mehrere Lösungsmittel verglichen. Die Pfropfcopolymere quellen in allen Lösungsmitteln, in denen PEG selbst löslich ist.

Tabelle 2. Vergleich der Quellsfaktoren von mit 1 % DVB vernetztem Polystyrol (PS) mit denen eines Pfropfcopolymers aus Polyethylenglycol (M = 3300 Da) und PS (PS-PEG).

Lösungsmittel	PS	PS-PEG
Wasser	-	2.5
MeOH	0.95	2.5
EtOH	1.05	1.2
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5.2	3.0
Toluol	5.3	3.1
DMF	3.5	3.2
CH <sub>3</sub> CN	2.0	3.0
THF	5.5	3.4
Dioxan	4.8	3.7
Ether	2.5	1.1

Die gute Solvation führt zu einer hohen Beweglichkeit der PEG-Ketten und daran gebundener Peptide. Die Beweglichkeit kann durch <sup>13</sup>C-NMR-Relaxationszeitmessungen an Polymerpeptiden nachgewiesen werden<sup>[87]</sup>. Abbildung 5 zeigt, daß die <sup>13</sup>C-NMR-Relaxationszeit *T*<sub>1</sub> von Peptiden, die an Polystyrol gebunden sind, geringer ist als die von Peptiden, die an lösliches PEG oder an Pfropfcopolymere gebunden sind, während letztere ungefähr gleiche Relaxationszeiten aufweisen. Sowohl die PEG-Kette als auch die

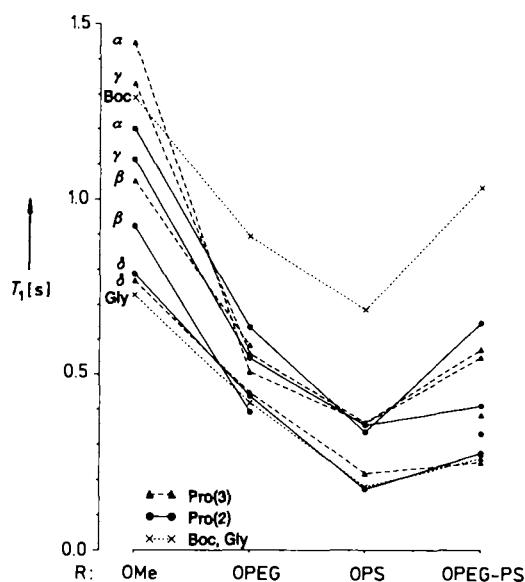


Abb. 5. <sup>13</sup>C-NMR-Relaxationszeiten *T*<sub>1</sub> des freien (R = OMe) und des polymergebundenen Tripeptids Boc-Gly-Pro(2)-Pro(3)-R.

gebundenen Peptide liefern daher in Suspension scharfe NMR-Signale, wie man sie sonst von Festkörpern nicht erhält. In Lösungsmitteln wie Ether, die PEG nicht solvatisieren, werden dagegen die für Festkörper üblichen breiten Signale gemessen. Wir können daher eine solvatisierte Tentakel und eine nicht solvatisierte Knäuelkonformation der Ppropfcopolymere unterscheiden (Abb. 6). Aus diesem

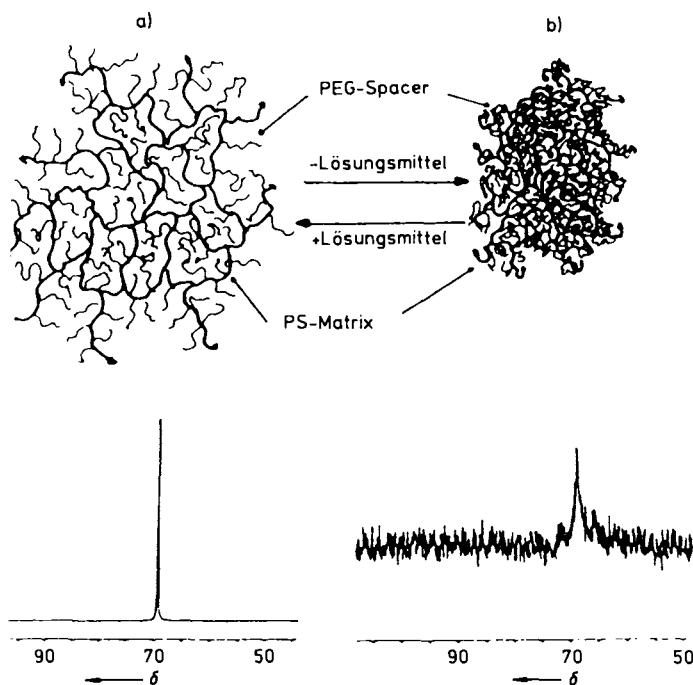


Abb. 6. Oben: Konformationen der Ppropfcopolymere aus PS und PEG; unten: die zugehörigen  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren. a) Aufgefaltete solvatisierte Form; scharfes NMR-Signal trotz Festkörper; b) Knäuelkonformation bei Kontakt mit nicht solvatisierenden Lösungsmitteln; übliche Signalverbreiterung von Festkörpern.

Grund werden die Polymere auch mit dem Trivialnamen Tentakelpolymere bezeichnet<sup>[88]</sup>. Abbildung 7 zeigt die homogene Verteilung der PEG-Ketten auf der Oberfläche und im Innern der Polymerkugelchen. Bei der elektronenmikroskopischen Aufnahme liegt die Knäuelkonformation vor.

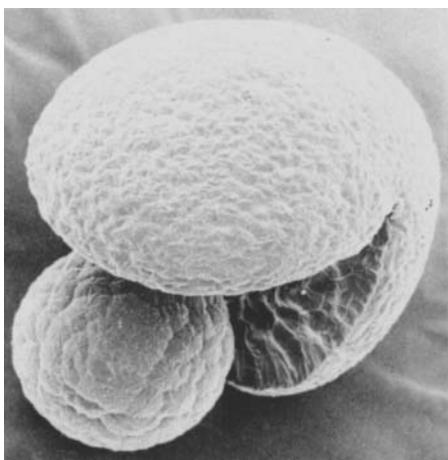


Abb. 7. Elektronenmikroskopische Aufnahme der Ppropfcopolymere aus PS und PEG (1 mm  $\approx$  3.227 µm).

Bemerkenswert sind die ähnlichen Quellfaktoren der Tentakelpolymere in verschiedenen Lösungsmitteln (Tabelle 2). Dies ermöglicht die Packung von Säulen mit dem Ppropfcopolymer und eine Peptidsynthese im kontinuierlichen Durchfluß, da bei den während des Synthesecyclus notwendigen Lösungsmittelwechseln keine Änderung der Packung auftritt. Die Quellfaktoren bleiben auch gleich, wenn die Peptidkette wächst.

Eine weitere Eigenschaft, die bei Polymeren sonst kaum beobachtet wird, erleichtert zusätzlich die Synthese im kontinuierlichen Durchfluß: Durch die Solvatation sind die PS-PEG-Kügelchen bis 200 bar druckstabil, so daß relativ hohe Durchflußgeschwindigkeiten möglich sind und die Dauer eines Synthesecyclus erheblich verkürzt werden kann. Auf die Vorteile der Synthese im kontinuierlichen Durchfluß wird in Abschnitt 5 eingegangen werden.

Tabelle 3. Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  der Kupplung von Glycinaktivestern an Polyethylenglycolglycin (PEG-Gly) in Lösung und an Polystyrol-Poly(ethylenglycolglycin)-Ppropfcopolymere (PS-PEG-Gly). Die Zahlen hinter PEG geben dessen mittlere Molmassen an.

Polymerträger	$10 k [\text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}]$	mequ. Gly pro g Polymer [a]
PS-PEG-2000-Gly	0.37	0.20
PS-PEG-3300-Gly	0.32	0.12
PS-PEG-5700-Gly	0.29	0.08
PEG-2000-Gly	0.16	0.49
PEG-4000-Gly	0.17	0.38
PEG-6000-Gly	0.13	0.27
Glycinylester	0.12	

[a] mequ. steht für Milliequivalente.

Da die Mobilität der auf vernetztes Polystyrol aufgepfropften PEG-Ketten nach den NMR-Untersuchungen der des freien PEG gleicht, kann nach Solvatation ein quasi-homogenes Verhalten angenommen werden. Dies zeigen auch die Geschwindigkeitskonstanten für die Peptidkupplung, die denjenigen der Flüssigphasensynthese gleichen (Tabelle 3). Nach diesen Untersuchungen sind die Tentakelpolymere als hydrophile Träger für eine schnelle Peptidsynthese geeignet.

#### 4.4. Monodisperse Tentakelpolymere

Bei der Peptidsynthesenoptimierung sind Diffusionsphänomene bisher kaum berücksichtigt worden, obwohl sie für das Erreichen kurzer Synthesecyclen von ausschlaggebender Bedeutung sein sollten. Da es sich um eine heterogene Reaktion handelt, spielt bei allen Diffusionsprozessen der Partikeldurchmesser eine entscheidende Rolle. Je größer er ist, desto größer sind die Diffusionsbeiträge zur Reaktionsgeschwindigkeit. Die für die Merrifield-Synthese im Handel erhältlichen Polymere sind polydispers, zeigen also eine breite Verteilung des Partikeldurchmessers z. B. zwischen 10 und 200 µm. Es ist einleuchtend, daß die Synthesezeit durch die größten Partikel bestimmt wird. Sie enthalten auch prozentual mehr funktionelle Gruppen als die kleinen Partikel, wie Abbildung 8 zeigt. Eine erhebliche weitere Verkürzung der Dauer des Synthesecyclus wäre daher möglich, wenn monodisperse, einheitliche Partikel möglichst kleinen Durchmessers zur Verfügung ständen. Die meisten Polymerisationsverfahren führen jedoch zu polydispersem Material.

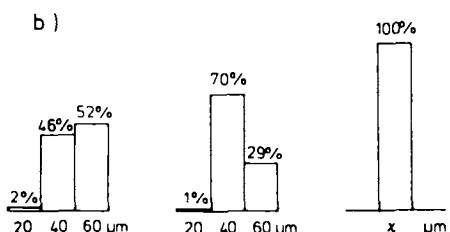
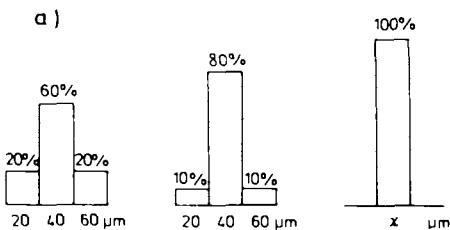
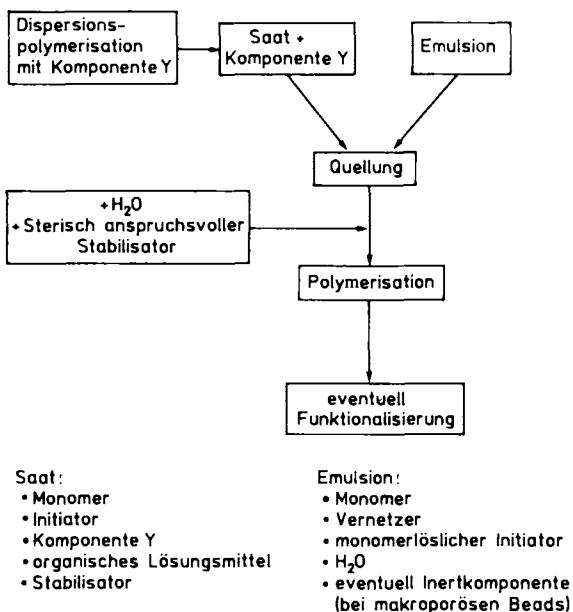


Abb. 8. Willkürlich vorgegebene Korngrößenverteilungen polydispenser Polymerkügelchen (a) und berechnete prozentuale Anteile an funktionellen Gruppen in den unterschiedlich großen Polymerkügelchen (b). x: beliebige Größe monodisperser Kügelchen.

Nach eingehenden Betrachtungen von Diffusionsvorgängen haben Ugelstad et al.<sup>[89, 90]</sup> die Parameter zur Darstellung monodisperser Polystyrolkügelchen untersucht. Aufbauend darauf wurde die Herstellung monodisperser, vernetzter Polystyrolkügelchen mit Durchmessern von 5–20 µm erarbeitet. In einem Zweistufenprozeß (Schema 5)



Schema 5. Zweistufenprozeß zur Synthese monodisperser, vernetzter Polystyrole.

wird dabei zunächst in homogener Lösung mit einem Initiator eine „Saat“ gebildet<sup>[91]</sup>. Wichtig zur Erzielung gleicher Partikeldurchmesser ist eine kurze Keimbildungsphase und die Gegenwart sterisch anspruchsvoller Stabilisatoren, die Aggregationen und Micellenbildung unterdrücken. Die Partikel der Saat sind noch nicht vernetzt; sie werden dann in eine wässrige Emulsion des Monomers Styrol, des Vernetzers

Divinylbenzol und des Initiators gebracht. In einem diffusionskontrollierten Prozeß in Gegenwart wasserlöslicher sterisch anspruchsvoller Stabilisatoren wird die Saat gequollen und vernetzt (Abb. 9).

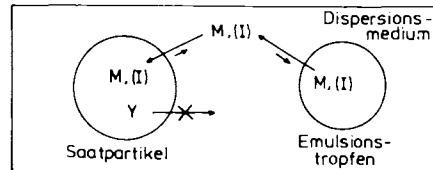


Abb. 9. Quellung der monodispersen Saat. M = Monomer; I = Initiator; Y = Komponente Y.

Abbildung 10 zeigt oben die so erhaltenen monodispersen, vernetzten Polystyrolkügelchen. Die Abweichungen im Durchmesser betragen weniger als 2%, z. B.  $10 \pm 0.02 \mu\text{m}$ . Wenn man dies mit der sonst üblichen breiten Verteilung der Molekülgröße synthetischer Polymere vergleicht, wird deutlich, daß hier erstmals größere Aggregate mit einer so molekulareinheitlichen Zusammensetzung und Größe hergestellt werden können, wie sie sonst nur in der Natur gebildet werden.

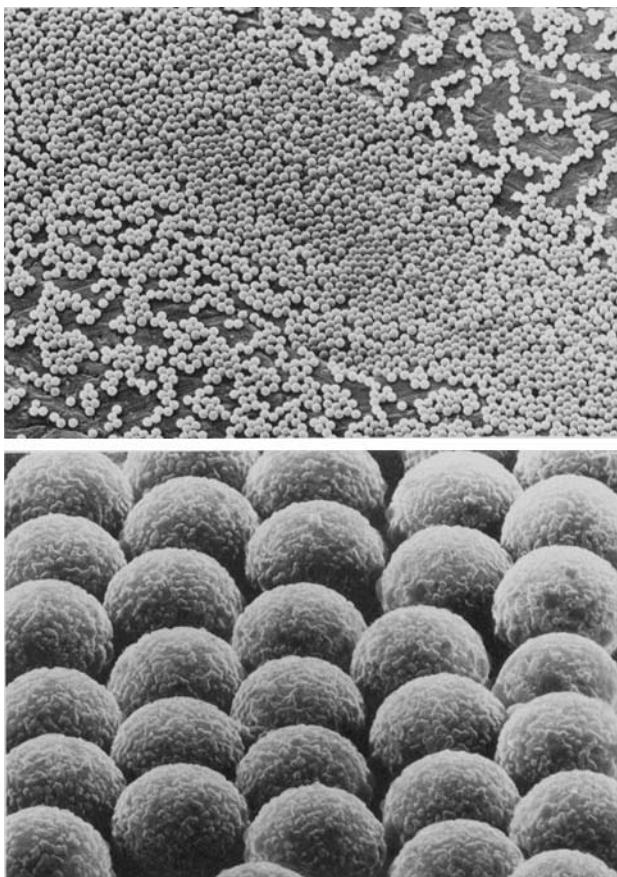


Abb. 10. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der monodispersen Polystyrole (oben,  $1 \text{ mm} \approx 1.424 \mu\text{m}$ ) und der Pfpfscopolymere aus Polystyrol und Polyethylenglycol (unten,  $1 \text{ mm} \approx 0.420 \mu\text{m}$ ).

Diese monodispersen, vernetzten Polystyrolkügelchen können nun weiter zu Trägern für die Peptidsynthese funktionalisiert werden. So lassen sich, wie in Abschnitt 4.3 be-

schrieben, PEG-Ketten aufspalten. Abbildung 10 unten zeigt solche monodispersen Pfpfropfcopolymere. Die PEG-Ketten liegen unter den Bedingungen der elektronenmikroskopischen Aufnahme als geordnete Knäuel vor.

Mit diesen polymeren, druckstabilen, hydrophilen Trägern lassen sich die Diffusionsprobleme der Festphasensynthese minimieren. Die neuen Träger können daher nicht nur für Peptid- und Nucleotidsynthesen, sondern auch als stationäre Phasen für die HPLC verwendet werden<sup>[92]</sup>.

## 5. Synthese im kontinuierlichen Durchfluß

Die Tentakelpolymeren sind druckstabil, und ihre Quellfaktoren sind relativ wenig lösungsmittelabhängig, so daß die Polymeren in Säulen gepackt und für Peptidsynthesen mit sehr hohen Durchflußgeschwindigkeiten verwendet werden können. Hierdurch zeichnen sich die Tentakelpolymeren vor allen anderen Polymeren aus. Eine Durchflußsynthese hat gegenüber der von Merrifield empfohlenen Batch-Synthese Vorteile. Bayer, Halasz et al. haben schon 1970<sup>[93]</sup> die erste Durchflußsynthese an chemisch modifizierten Kieselgelen als Trägern beschrieben und die kürzere Dauer eines Synthesecycles bei gleichzeitig größerer Reinheit der synthetisierten Peptide gezeigt. Für den Aufbau längerer Peptidketten sind die modifizierten Silicagel jedoch chemisch zu wenig beständig.

Später wurden Pelikularharze<sup>[94]</sup> im Durchflußverfahren verwendet. Wegen der geringen Druckstabilität und unterschiedlicher Quellfaktoren können normale Polymere nicht verwendet werden. Daher haben Frank und Gausepohl<sup>[95]</sup> lose mit verschiedenen Polymergelen gepackte Kartuschen für die Durchflußsynthese eingesetzt. Atherton, Sheppard et al. haben Polydimethylacrylamide in Kieselgur einpolymerisiert und erfolgreich für die Durchflußsynthese in automatisierten Geräten eingesetzt<sup>[96, 97]</sup>. Allerdings ist Kieselgur kein sehr reguläres Trägermaterial, wie die elektronenmikroskopische Aufnahme eines in Kieselgur einpolymerisierten Polydimethylacrylamids in Abbildung 11 zeigt. Deutlich ist auch die im Vergleich zu den Pfpfropfcopolymeren in Abbildung 10 unten wesentlich heterogener Verteilung des Polymeren zu sehen.

Die Pfpfropfcopolymeren aus vernetztem Polystyrol und Polyethylenglycol zeigen bezüglich Druckstabilität, Quellver-

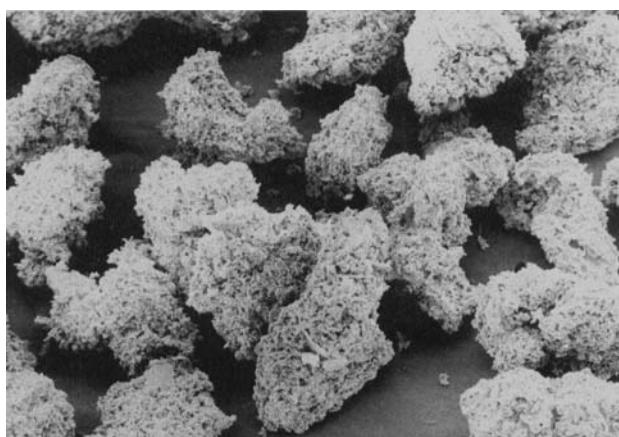


Abb. 11. Elektronenmikroskopische Aufnahme von Trägern aus Polyacrylamid auf Kieselgur ( $1 \text{ mm} \approx 28.486 \mu\text{m}$ ).

halten, chemischer Stabilität, Gestalt (sphärisch) und Korngröße (einheitlich) alle für eine schnelle Peptidsynthese im Durchfluß erforderlichen Eigenschaften und haben sich seit ihrer ersten Einführung gegenüber dem Batch-Verfahren in vielen Fällen als überlegen erwiesen.

Ein wesentlicher Vorteil der Durchflußsynthese besteht darin, daß die Überschüsse an Kupplungskomponenten sowie der Lösungsmittelverbrauch erheblich reduziert werden und durch UV-Detektoren am Säulenein- und -ausgang die Kupplung und die Abspaltung der Schutzgruppen verfolgt werden können. Hierbei sind besonders UV-aktive Schutzgruppen wie die Fmoc-Gruppe geeignet.

Die Verringerung der Überschüsse an Reagentien gegenüber der Batch-Methode ergibt sich aus der Reaktionsführung im Durchfluß. Wenn man relativ hoch konzentrierte Kupplungskomponenten in kleinen Volumina durch die Säulen wandern läßt, entwickelt sich ein Konzentrationsprofil, wie es in Abbildung 12 rechts wiedergegeben ist. Da beim

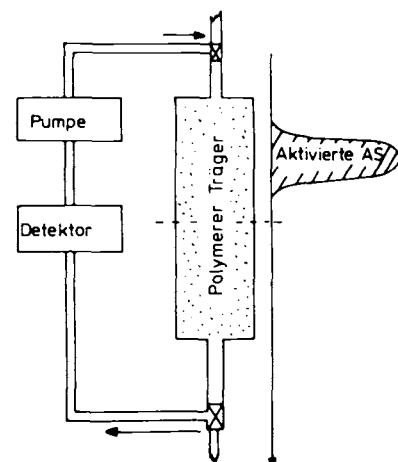


Abb. 12. Bande der Lösung von Kupplungskomponenten (AS = Aminosäure) beim Durchwandern des Reaktorbetts im Durchflußreaktor.

Durchgang der Bande durch die Säule relativ kleine Bereiche des funktionellen Polymers mit den Kupplungskomponenten in Kontakt sind, ist der Überschuß in dem jeweiligen Säulensegment größer, als wenn die Lösung mit der gesamten Menge des in der Säule befindlichen Trägers im Kontakt wäre. Je schmäler die Bande ist, desto größere Überschüsse sind in einem Säulensegment vorhanden. Dadurch kann die Reaktion vollständiger ablaufen, und der Gehalt an Peptiden mit statistischen Fehlsequenzen wird reduziert. Eine typische spektrophotometrische Verfolgung eines Synthesecycles zeigt Abbildung 13a.

Mit Polymerkügelchen von ca.  $80 \mu\text{m}$  Durchmesser dauert der Cyclus für die Anknüpfung einer Aminosäure ca. 6–15 min. Selbst bei Doppelkupplung kann damit ein Peptid mit 30 Aminosäureresten in wenigen Stunden aufgebaut werden. Mit den bereits zur Verfügung stehenden Tentakelpolymeren von  $8 \mu\text{m}$  Durchmesser kann der Kupplungscyclus nochmals auf etwa ein Zehntel, d.h. 1–2 min, verkürzt werden. Für solche kurzen Zeiten stehen allerdings noch keine Syntheseautomaten zur Verfügung. Die kontinuierliche Verfolgung der Synthese ermöglicht auch die Erkennung von Kupplungsschritten, die z.B. wegen Konformationseinflüssen schwierig sind. Besonders bei der Abspal-

tung der *N*-Schutzgruppe sind diese Einflüsse zu erkennen, da starkes Tailing der UV-Signale auftritt. Abbildung 13 zeigt neben einem Synthesecyclus mit normaler Kupplungszeit auch einen durch Konformationseinflüsse verlangsamten Synthesecyclus (Abb. 13 b)<sup>[\*]</sup>. Es ist ratsam, vor der eigentlichen Synthese zunächst in kleinerem Maßstab eine Preview-Synthese durchzuführen, spektrophotometrisch zu verfolgen und analytisch das Peptid zu untersuchen. Da die Zeit für eine Totalsynthese durch die neuen Träger sehr kurz geworden ist, lohnt sich dieser Aufwand.

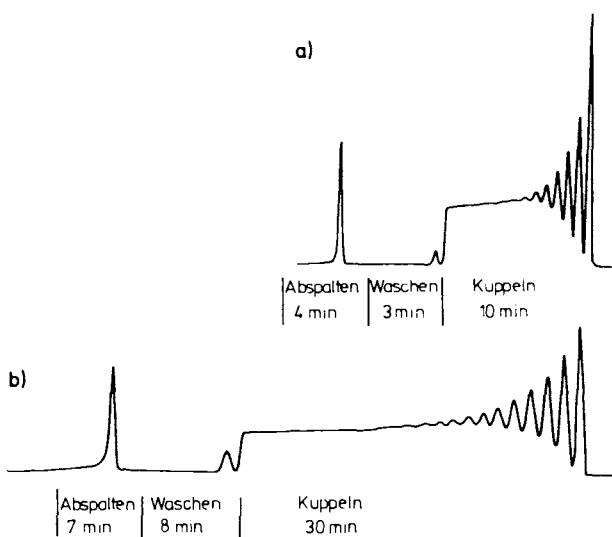


Abb. 13. Kontinuierliche UV-spektroskopische Verfolgung a) der Kupplungs- und Abspaltungskinetik eines Synthesecyclus am Tentakelpolymer im Durchflußverfahren. b) der verlangsamen Kinetik bei der Bildung einer  $\beta$ -Faltblattstruktur.

Bei der Preview-Synthese werden schwierige Kupplungsschritte erkannt, und man kann dann für die optimierte Synthese die Strategie ändern, z. B. andere Lösungsmittel, eine höhere Temperatur, andere Schutzgruppen wählen oder schwierige Stufen durch Ankuppeln von kleineren Peptiden an Stelle einer einzigen Aminosäure überbrücken. Durch Weiterentwicklung der spektrophotometrischen Kontrolle der Synthese im kontinuierlichen Durchfluß wird man künftig Syntheseautomaten haben, die Kupplungszeit und eventuell notwendige Nachkupplungen selbsttätig steuern, d. h. zu intelligenter Selbstregelung fähig sind.

## 6. Analytische Kontrolle und Reinigung

Die Anwendung der Trägersynthese zur Herstellung von Proteinen ist naturgemäß an eine sichere Charakterisierung und Abtrennung der Syntheseprodukte gebunden. So ist die Etablierung der Festphasensynthese erst nach Einführung der effizienten HPLC möglich gewesen.

Die ersten Anwendungen der HPLC zur Trennung und Charakterisierung von synthetischen Peptiden wurden beim

15. Europäischen Peptidsymposium 1973 vorgestellt<sup>[55, 56]</sup>. Seither ist die HPLC hauptsächlich und leider oft auch alleinige Methode zur Charakterisierung geworden. Oft wird in Publikationen unkritisch von einem einheitlichen Peak im Chromatogramm die Einheitlichkeit der Substanz abgeleitet. Ebenso wird in Publikationen über Festphasensynthesen fast ausnahmslos die Reinheit eines Produkts durch einfache Integration und Verhältnissbildung der Peakflächen, d. h. ohne Berücksichtigung der von Peptid zu Peptid oft stark variierenden spezifischen UV-Extinktion, angegeben. Zumindest wäre es angebracht, auf die Fehlermöglichkeiten in den Reinheitsangaben hinzuweisen, die auf die Nichtberücksichtigung der Response-Faktoren des UV-Detektors zurückzuführen sind.

Da trotz aller Optimierung der Synthesemethoden immer ein Verdacht auf Verunreinigungen durch Fehlsequenzenteptide bestehen bleibt, genügt die HPLC und eine Aminosäureanalyse nicht zur Charakterisierung des Produkts. Die Umkehrphasen-HPLC unterscheidet Peptide nur nach ihren hydrophoben Wechselwirkungen, wobei oft kleine Teilstrukturen des Peptids für die Wechselwirkung mit der Umkehrphase verantwortlich sind<sup>[98–100]</sup>. Umkehrphasen sind zur Unterscheidung von Peptiden nach unterschiedlicher Acidität oder Basizität und unterschiedlicher Molekülgöße nicht geeignet. Daher muß für eine vollständige Charakterisierung auch eine Elektrophorese oder Ionenaustauschchromatographie (Unterscheidung nach Ladung) und eine Ausschlußchromatographie (Unterscheidung nach Molekülgöße) durchgeführt werden. Die mehrdimensionale Chromatographie ermöglicht optimale Trennungen bei Anwendung unterschiedlicher Trennmechanismen<sup>[101–103]</sup>.

Notwendig ist neben der chromatographischen auch die spektroskopische Charakterisierung, z. B. durch Massenspektrometrie oder NMR-Spektroskopie. Für die bisher hauptsächlich synthetisierten Polypeptide bis etwa 20 Aminosäureresten steht inzwischen ein Arsenal an Trenn- und Charakterisierungsmethoden zur Verfügung, das mit einiger Sicherheit ermittelt, ob das gewünschte Syntheseziel erreicht ist.

Bei größeren Peptiden und Proteinen, deren sichere Synthese in der Zukunft ansteht, versagen jedoch viele der bei kleineren Peptiden bewährten Methoden. So treten bei der HPLC an den üblichen modifizierten Kieselgelen oft Denaturierungen der Proteine auf<sup>[104, 105]</sup>, und die massenspektrometrische Charakterisierung von Proteinen ist mit den konventionellen Methoden (EI, FAB, CI) nicht möglich.

Glücklicherweise sind aber parallel zur Weiterentwicklung der Trägersynthese sowohl für die Trennung als auch für die massenspektrometrische Identifizierung großer Peptide neue Methoden erarbeitet worden, die der Trägersynthese von Proteinen einen ähnlich starken Impuls geben werden, wie seinerzeit die HPLC der Trägersynthese kleinerer Peptide.

Für die schnelle Trennung von Proteinen ist nun eine Vielzahl neuer stationärer Phasen entwickelt worden, die eine größere mechanische und chemische Stabilität als die herkömmlichen Umkehrphasen aufweisen. So seien die Pellikularharze erwähnt, bei denen ein funktionalisiertes Monomer auf einen festen, anorganischen Träger wie Kieselgel polymerisiert wird<sup>[106–109]</sup>, aber auch die in den Abschnitten 4.5 und 4.4 erwähnten druckstabilen Tentakelpolymeren<sup>[110]</sup>. Abbildung 14 zeigt eine schnelle Proteintrennung an einem solchen Träger.

[\*] Anmerkung bei der Korrektur: D. Seebach hat in einer kürzlich erschienenen Übersicht (*Angew. Chem. 102* (1990) 1363; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29 (1990) 1320) beschrieben (dort S. 1379 bzw. 1337), daß Pfpfropcopolymeren aus Polystyrol und Polyethylenglycol bei kritischen Sequenzen in LiX-haltigen Lösungsmitteln vollständigere Kupplungen ergeben als Polystyrolträger.

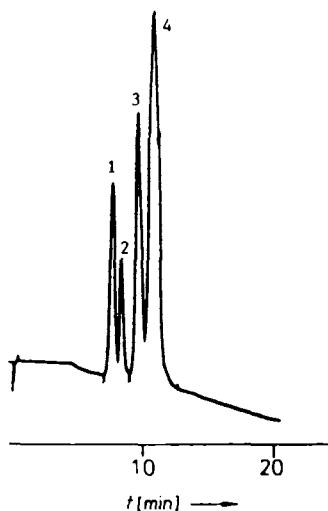


Abb. 14. Schnelle Proteintrennung an monodispersem TentaGel (13 µm): 1 = Ribonuclease, 2 = Insulin, 3 = Lysozym, 4 = Albumin. Gradient von 0.1% Trifluoressigsäure (TFA) in H<sub>2</sub>O nach 20:80 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O: Acetonitril in 20 min; 1.5 mL min<sup>-1</sup>, Säule 6 cm × 4.6 mm, UV-Detektion bei  $\lambda = 210$  nm.

Als weitere automatisierbare Trennmethode zeichnet sich die Kapillarzonenelektrophorese (CE) ab<sup>[111–118]</sup>, die bezüglich Trennschärfe, Schnelligkeit und bequemer Handhabung der HPLC ebenbürtig ist und sicher eine ähnlich weite Verbreitung wie diese finden wird. Die Kapillarzonenelektrophorese in offenen Kapillaren von 40–100 µm Durchmesser und 20–80 cm Länge erreicht leicht Trennstufenzahlen von mehreren 100 000, wie man sie sonst nur von der Kapillargaschromatographie gewohnt ist. Da die Kapillarzonenelektrophorese im wesentlichen Moleküle nach unterschiedlicher Ladung trennt, ergänzt sie die nach hydrophoben Wechselwirkungen trennende Umkehrphasen-HPLC.

Peptide, die HPLC-chromatographisch einheitlich scheinen, können dennoch in der Kapillarzonenelektrophorese Verunreinigungen zeigen, wie Abbildung 15 belegt<sup>[116]</sup>. Hier

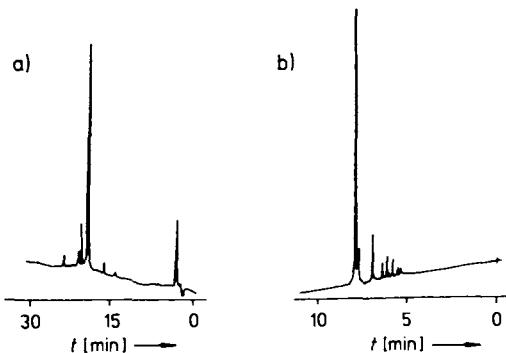


Abb. 15. Trennung eines Peptids a) durch HPLC, b) durch CE. HPLC: Umkehrphase C<sub>18</sub>-Säule 25 cm × 4.6 mm, Gradient Wasser/Acetonitril. CE: Quarzkapillare, chemisch modifiziert mit Chirasil-Val 500 µm × 40 cm; 100 mM Phosphatpuffer, pH = 2.5; 15 kV. UV-Detektion bei  $\lambda = 200$  nm (a und b).

wird einmal mehr deutlich, daß „orthogonale“ Trennverfahren zur Reinheitscharakterisierung von Peptiden verwendet werden müssen und nicht nur die Umkehrphasen HPLC. Für Nucleotidtrennungen ist die CE schon gut ausgearbeitet. Bei Proteintrennungen ist jedoch zu berücksichtigen, daß unbehandelte Kapillaren wegen Adsorption der Proteine an

die Quarzoberfläche wenig geeignet sind. Deshalb müssen die Oberflächen z. B. durch Bindung von Polymeren deaktiviert werden. Dann werden scharfe Signale erhalten, wie die Trennung an einer mit Polyethylenglycol deaktivierten Quarzkapillare in Abbildung 16 zeigt<sup>[118]</sup>.

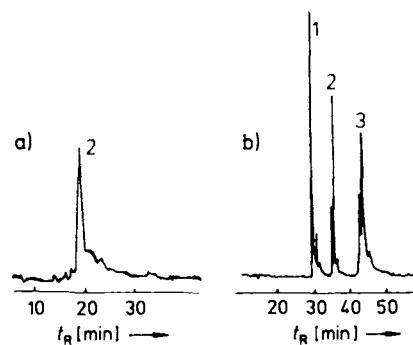


Abb. 16. CE-Trennung eines Proteingemisches (1 = Lysozym, 2 = Trypsin, 3 = Chymotrypsinogen) a) an einer unbehandelten Kapillare, b) an einer PEG-imprägnierten Kapillare. a) 0.01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer, pH = 6.8. b) 0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer, pH = 4.1 (nach [118]).

Parallel zur Entwicklung dieser neuen Trennmethoden ist die Massenspektrometrie in den Bereich der Proteine vorgedrungen, derzeit bis zu Molmassen von etwa 120 000 Da. Hier ist neben der FAB- und der Plasmadesorptions-Ionisation besonders die Ionenspray-Methode<sup>[119, 120, 127, 128]</sup> zu erwähnen, bei der die Probe, in einem Lösungsmittel gelöst, versprüht und im elektrischen Feld positiv oder negativ geladen wird. Beim Verdampfen des Lösungsmittels wird an der Oberfläche der verbleibenden Tröpfchen ein kritisches Feld erreicht, bei dem sich die Ionen so stark abstoßen, daß sie in die Gasphase emittiert werden und in den Massenanalysator eintreten. Da Peptide und Proteine basische Aminosäuren wie Lysin und Arginin enthalten, können sie mehrfach geladen werden. Die *m/z*-Werte dieser mehrfach geladenen Ionen liegen selbst für Proteine in dem von einem üblichen Quadrupolmassenspektrometer erfaßbaren Bereich. Abbildung 17 zeigt das mit dieser Methode erhaltene Massenspektrum eines Proteins<sup>[116]</sup>. Da in der ersten Stufe der Ionenspray-

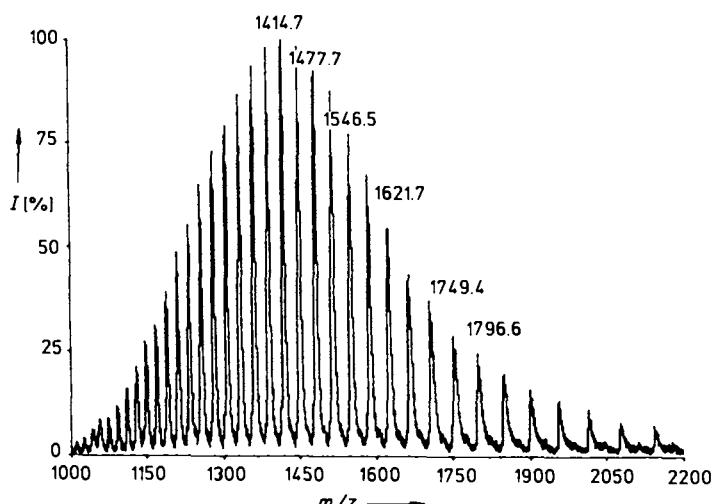


Abb. 17. Ionenspray-Massenspektrum von Schweineserumalbumin,  $M = 66\,439$  Da.  $m/z$  1796.6 entspricht dem 37mal positiv geladenen Protein (SCIEX-Massenspektrometer).

Massenspektrometrie aus einer Lösung der zu analysierenden Substanz bei Atmosphärendruck Nebel gebildet werden, kann sie sehr leicht direkt mit der Flüssigkeitschromatographie oder der Kapillarzonenelektrophorese gekoppelt werden. Mit dieser Anordnung wird in der Untersuchung makromolekularer Naturstoffe eine neue Dimension erreicht<sup>[116, 121, 122]</sup>. Abbildung 18 zeigt die bei Direktkopplung

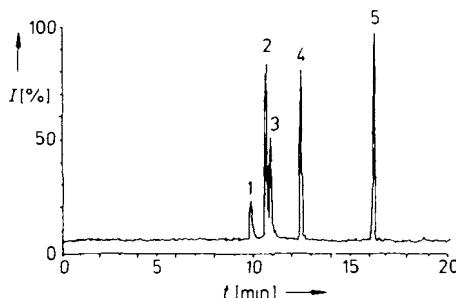


Abb. 18. Direktkopplung CE/Ionenspray-Massenspektrometrie zur Trennung von Dynorphinen [121]: 1 = Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg, 2 = Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg, 3 = Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile, 4 = Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg, 5 = Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu. Quarzkapillare 100 µm × 100 cm. Puffer: Ammoniumacetat (30 mM); Acetonitril = 50:50, pH = 4.8 (SCIEX-Massenspektrometer, Total-Ionenstrom).

lung CE/Ionenspray-Massenspektrometrie erhaltene Trennung von Dynorphinen. Für Peak 5 in Abbildung 18 errechnet sich eine Trennleistung von etwa 250 000 theoretischen Böden. Abbildung 19a zeigt das Ionenspray-Massenspektrum des Dynorphins, das Peak 5 in Abbildung 18 liefert.

te<sup>[121]</sup>. Durch Tandem-Massenspektrometrie kann aus dem ( $M + H$ )<sup>⊕</sup>-Peak die Sequenz ermittelt werden (Abb. 19 b).

## 7. Synthesen an Tentakelpolymeren

Die praktische Anwendung der Tentakelpolymeren soll an Hand der Synthese zweier Polypeptide gezeigt werden, wobei auch auf die Bedeutung der neuen analytischen Verfahren für die Kontrolle und Optimierung der Synthese eingegangen wird. Am Beispiel der HIV-1-Protease-Sequenz 89–59 wird eine schnelle Synthese in Form einer Preview-Synthese beschrieben, die mit den analytischen Methoden verfolgt wird.

### 7.1. Tentakelpolymerpeptide zur in-vivo-Bildung von Antikörpern

Die Voraussage von Epitopen zur Bildung von Antikörpern und die Synthese dieser Epitope sind in der Immunologie heute unverzichtbare Werkzeuge. Eine Vielzahl von überlappenden Peptiden ist für eine sichere Voraussage notwendig. Konjugate der Peptide mit Trägern wie Serumalbumin oder Lipopeptiden werden für die Immunisierung verwendet<sup>[123–125]</sup>. Es wäre nun ein wesentlicher methodischer Fortschritt, wenn das Peptid nicht vom Polymerträger abgespalten werden müßte, sondern direkt an Stelle von Konjugaten für die in-vitro- und in-vivo-Immunisierung und Erzeugung von Antikörpern verwendet werden könnte. Die Tentakelpolymeren sollten wegen der Verträglichkeit der Polyethylenglykolketten mit biologischen Systemen hierfür geeignet sein.

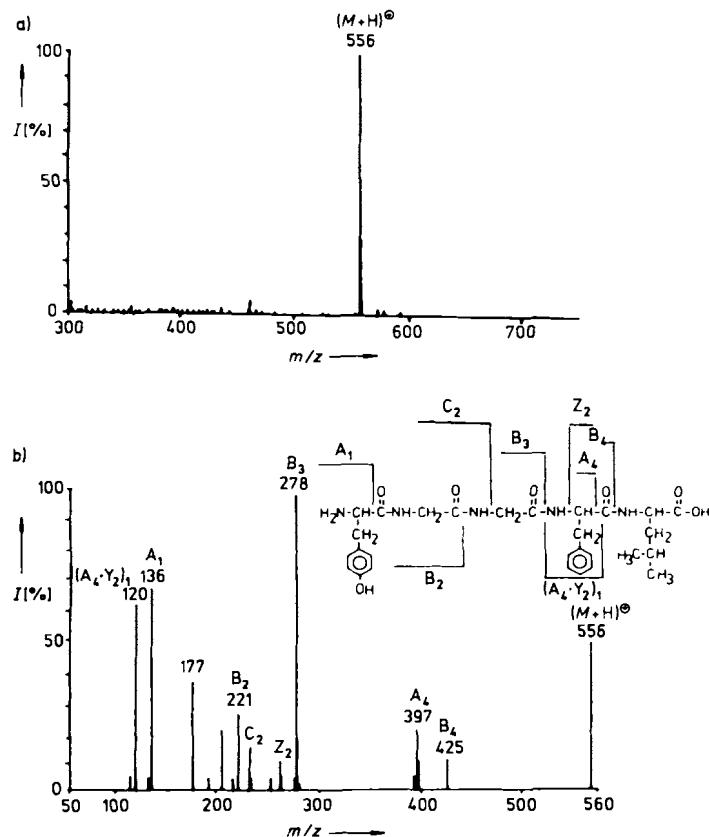


Abb. 19. Massenspektren zum Peak 5 in Abbildung 18. a) Ionenspray-Massenspektrum. b) Tochter-Ionen-Spektrum zum Peak in (a) [121] zur Sequenzanalyse.

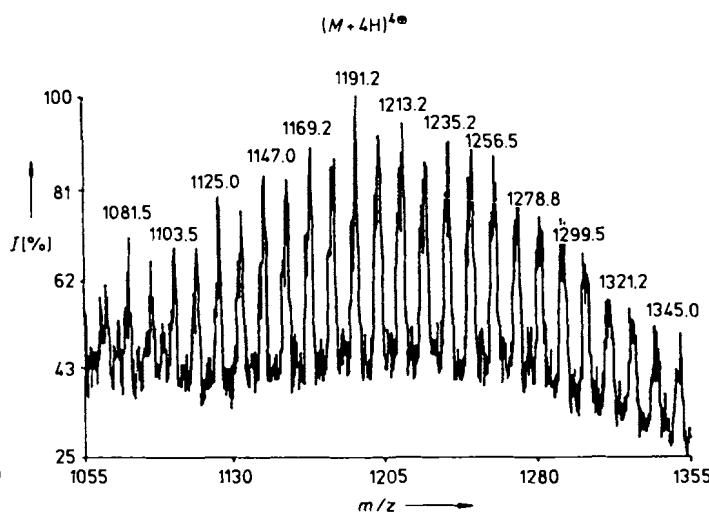


Abb. 20. Ionenspray-Massenspektrum des ( $M + 4H$ )<sup>4+⊕</sup>-Peaks des nach der Flüssigphasenmethode synthetisierten PEG-Peptids A-V-L-G-H-D-E-A-A-Y-S-K-N-R-R-A-V-PEG<sub>3000</sub>. Durchschnittliche Molmasse 4850.9 (SCIEX-Massenspektrometer).

Um diese Hypothese zu testen, wurde eine Epitop-Region des Haemophiles-influenza-P6-Proteins, entsprechend der Sequenz 115–131, an TentaGel und Polyethylenglycol aufgebaut<sup>[126]</sup>. Die Sequenz H<sub>2</sub>N-Ala-Val-Leu-Gly-His-Asp-Glu-Ala-Ala-Tyr-Ser-Lys-Asn-Arg-Ala-Val-OH wurde nach der Fmoc-Strategie mit folgenden Schutzgruppen der Dritt-funktionen synthetisiert: 4-Methoxy-2,3,6-trimethylbenzyl-

sulfonyl (Mtr) für Arg, Boc für Lys, Triphenylmethyl (Trt) für His, *t*Bu für Ser, *O**t*Bu für Glu, *O**t*Bu für Asp und 4-Nitrophenylester (ONp) für Asn.

Abbildung 20 zeigt das Ionenspray-Massenspektrum des PEG-Peptids. Interessant ist hierbei, daß mit einem einzigen Massenspektrum die exakte Molmassenverteilung des Polymerpeptids bestimmt werden kann, während sie sonst nur indirekt und über Eichsubstanzen durch Ausschlußchromatographie erhalten wird. Die Unterschiede der einzelnen Peaks im Massenspektrum des vierfach protonierten Polymerpeptids ( $M + 4H$ )<sup>4+</sup> der mittleren Molmasse 4850 entsprechen genau einem Viertel der Molmasse der  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ -Monomereinheit.

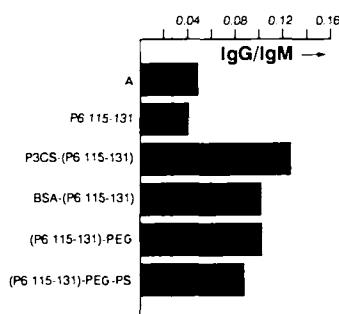


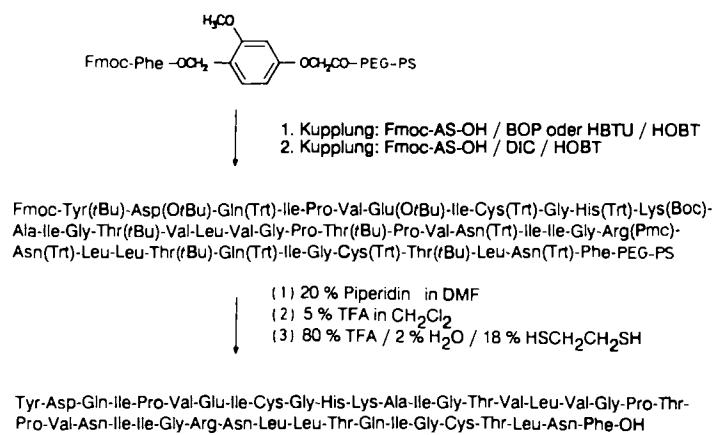
Abb. 21. ELISA-Titer der Seren nach Immunisierung mit verschiedenen Konjugaten des Peptids der Sequenz 115–131 des Haemophiles-influenzae-P6-Proteins [126]. G = Ziege; M = Maus; A = Negativ-Kontrolle.

Zur Immunisierung wurde sowohl das lösliche PEG-Peptid als auch das immobilisierte PEG-Peptid Mäusen appliziert. Nach vier Wochen wurden an Serumproben die Antikörper mit ELISA bestimmt. Die ELISA-Titer in Abbildung 21 zeigen, daß die Polymerpeptide ebenso gut Antikörper bilden wie die Serumalbumin-Konjugate BSA-(PG 115–131)<sup>[126]</sup>.

## 7.2. Preview-Synthese der HIV-1-Protease-Sequenz 59–99

Die chemische Synthese der zur Aktivierung des AIDS-Virus notwendigen HIV-1-Protease ist interessant, da dabei die Aminosäurereste des aktiven Zentrum spezifisch <sup>13</sup>C-markiert und so NMR-spektroskopisch Inhibitorstudien durchgeführt werden können. Die beiden kritischen Cysteinreste, die bei den Syntheseversuchen von Kent et al.<sup>[131]</sup> durch weniger kritische Aminosäurereste ersetzt wurden, befinden sich in den Sequenzpositionen 95 und 67. Die HIV-1-Protease-Sequenz 59–99 wurde an TentaGel mit der schnellen Durchflußsynthese aufgebaut (Schema 6).

Durch Preview-Synthese und anschließende Charakterisierung der Nebenprodukte konnte sehr schnell festgestellt werden, bei welchen Kupplungen Schwierigkeiten aufraten, und nach diesen Erkenntnissen wurde die Synthesestrategie optimiert. Bei der Synthese wird ein komplex zusammengesetztes Rohprodukt erhalten, wie das Chromatogramm in Abbildung 22 zeigt. Die hauptsächlichen Nebenprodukte können – ohne Vortrennung – durch Direkteinlaß in das Ionenspray-Massenspektrometer aufgrund ihrer Molmasse zugeordnet werden (Abb. 23). Durch HPLC mit Single Ion Monitoring (Abb. 24) können die Retentionszeiten des ge-



Schema 6. Schema der Synthese der HIV-1-Protease-Sequenz 59–99. BOP = Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat; HOBT = Hydroxybenzotriazol; HBTU = O-Benzotriazol-1-yl-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat; DIC = Diisopropylcarbodiimid; AS = Aminosäure.

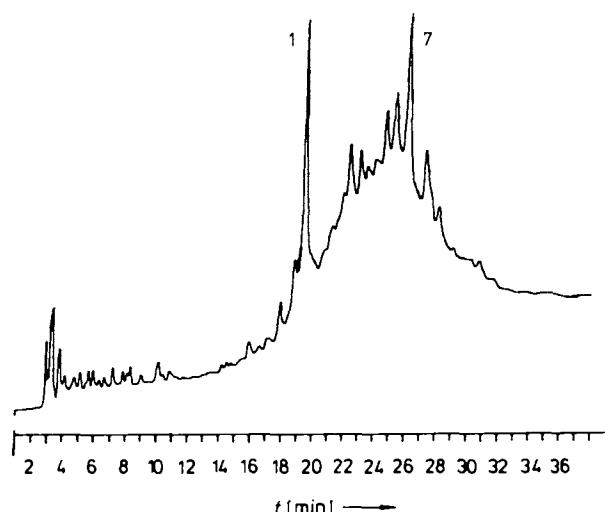


Abb. 22. HPL-Chromatogramm des Rohprodukts der HIV-1-Protease-Sequenz-Synthese nach Abspaltung vom Träger. Säule 25 cm × 0.46 cm Nucleosil 100 C18, 5 µm. Mobile Phase:  $\text{H}_2\text{O}/\text{Acetonitril}/0.1\%$  TFA; Gradient von 25 zu 50 % Acetonitril. 1 = Fehlsequenz; 7 = HIV-Protease-Sequenz 59–99.

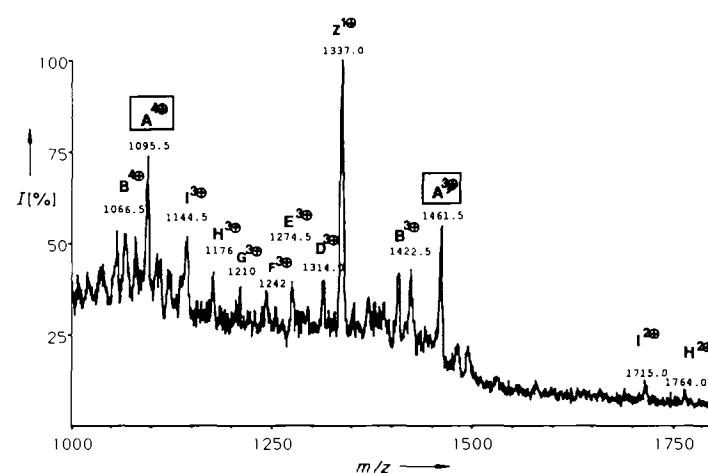


Abb. 23. Ionenspray-Massenspektrum des Rohprodukts der HIV-1-Protease-Sequenz-Synthese bei Direkteinlaß ohne vorherige HPLC-Trennung. A = Sequenz 59–99; Z = Sequenz 88–99. B-I andere Fehlsequenzen (siehe auch Abb. 27).

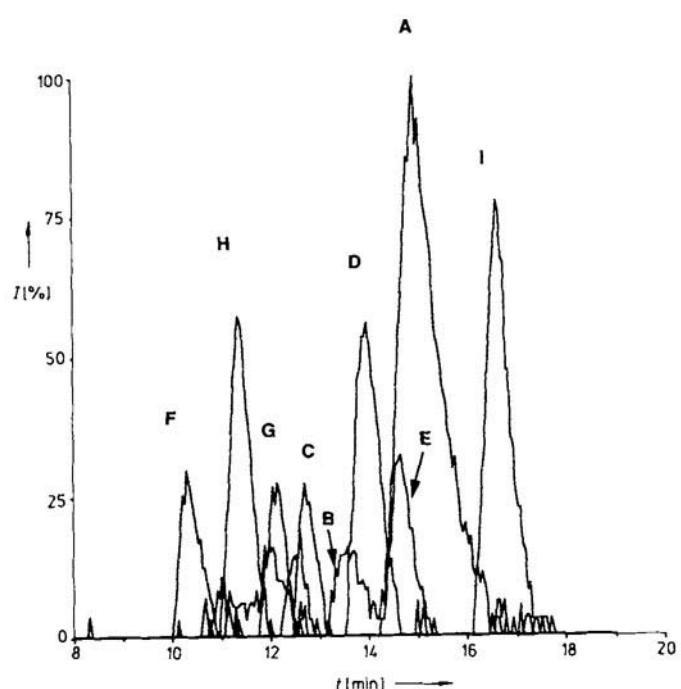


Abb. 24. Aus Single Ion Monitoring rekonstruiertes HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts der HIV-1-Protease-Sequenz-Synthese; Bezeichnung wie in Abbildung 23. I = relative Intensität der Massenpeaks.

wünschten Hauptprodukts und der Nebenprodukte exakt festgelegt werden. So kann die Fraktion der HIV-1-Protease-Sequenz (A) in reiner Form durch HPLC isoliert werden, wie das Massenspektrum in Abbildung 25 zeigt.

Die Nebenprodukte wurden durch Direktkopplung von HPLC und Tandemmassenspektrometrie aufgeklärt. Durch die Direktkopplung wird für die Aufklärung der Nebenproduktstrukturen nur noch die Zeit eines HPLC-Chromatogramms von etwa 30 min benötigt. Abbildung 26 zeigt das bei der Tandemmassenspektrometrie erhaltene Fragmentierungsschema eines Nebenproduktes, dessen Struktur ein-

deutig zugeordnet werden konnte. Die wichtigsten Nebenprodukte sind in Abbildung 27 aufgeführt. Daraus ergibt sich, daß wegen der Bildung starrer Konformationen die Kupplungen von der Sequenzposition 91 (Thr) bis zur Position 82 (Val) mit geringeren Ausbeuten verlaufen. Die anschließenden Kupplungen sind vollständig, und es werden keine Fehlsequenzen-Peptide mehr beobachtet. Interessant ist, daß wegen der konformativ bedingten geringen Ausbeute

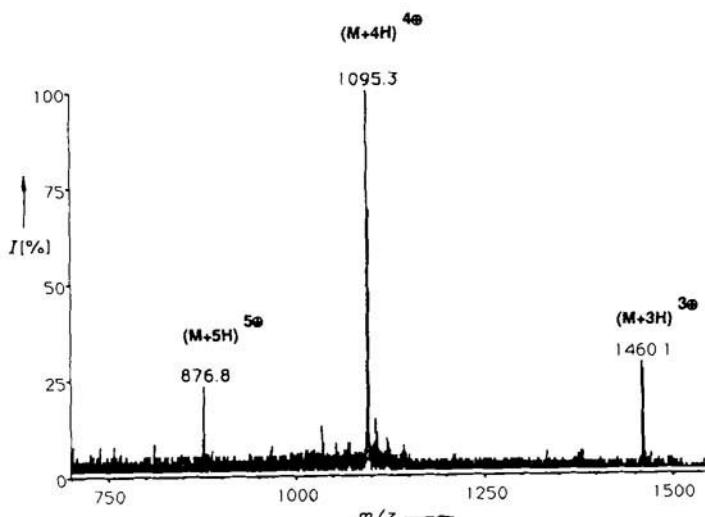


Abb. 25. Ionenspray-Massenspektrum der rein isolierten HIV-1-Protease-Sequenz 59-99. Molmasse gefunden  $4377.8 \pm 1$ .

in neun Kopplungsstufen auch Fehlsequenzen-Peptide mit bis zu neun Aminosäureresten weniger auftreten. Das Synthesziel, die Reindarstellung der HIV-1-Protease-Sequenz, wurde also schon bei dieser Preview-Synthese erreicht. Zur Herstellung größerer Mengen Substanz für Inhibitorstudien sollte die Strategie natürlich trotzdem noch optimiert werden. Dies ist auch für die Synthese therapeutisch anwendbarer Polypeptide wichtig.

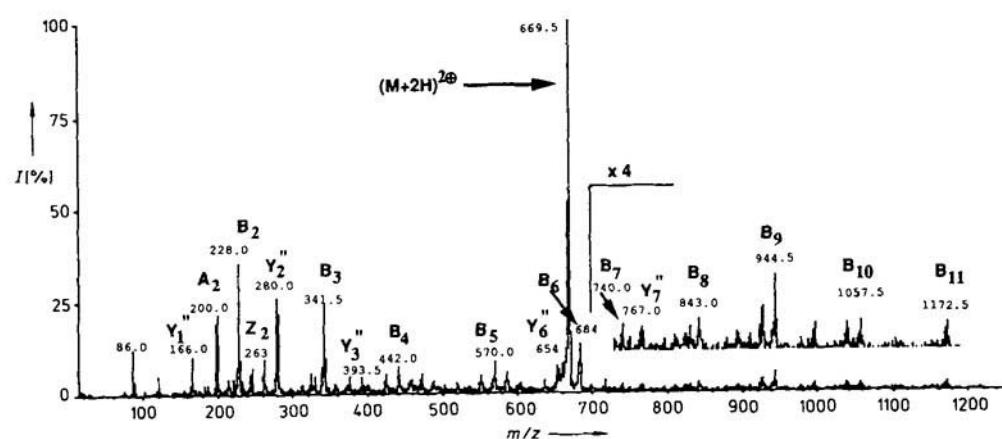
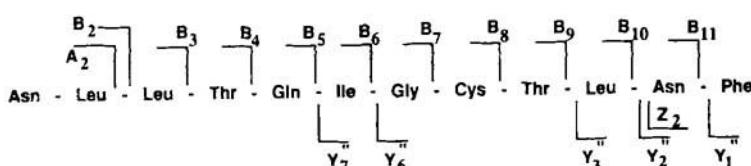


Abb. 26. MS/MS-Fragmentierungsschema des Fehlsequenzen-Peptids Z.

Abb. 27. Fehlsequenzen-Peptide im Rohprodukt der Synthese der HIV-Protease-Sequenz 59-99 A, x = Fehlstellen (ausgelassene Aminosäuren).

Abb. 27. Fehlsequenzen-Peptide im Rohprodukt der Synthese der HIV-Protease-Sequenz 59-99 A. x = Fehlstellen (ausgelassene Aminosäuren).

## 8. Ausblick

Die neuen polymeren Träger ermöglichen im Durchflußreaktor die Synthese auch längerer Polypeptide innerhalb weniger Tage, mit 8  $\mu\text{m}$ -Trägern kann die Dauer eines Synthesecyclus sogar auf 1–2 min verringert werden.

Durch neue analytische Methoden wie die Kapillarzonen-elektrophorese und die Ionenspray-Massenspektrometrie sowie durch die kontinuierliche UV-spektroskopische Verfolgung der Synthese können schwierige Sequenzen und Fehler im Synthesegang erkannt werden. Die bisherige „black box“ der Trägersynthese wird durchsichtig und eine Optimierung kritischer Stufen möglich. Bei dem geringen Zeitaufwand derartiger Peptidsynthesen kann zunächst eine Preview-Synthese in kleinerem Maßstab durchgeführt werden. Die genaue analytische Untersuchung enthüllt die Schwachstellen des Synthesekonzepts, und danach kann die Strategie für die eigentliche Synthese festgelegt werden. Dadurch wird schon am Polymer ein reineres Peptid aufgebaut und die sonst oft erfolglose oder zumindest mühsame Endreinigung erleichtert. Das Durchflußverfahren kann auch leichter als das Batch-Verfahren in einen größeren Maßstab übertragen werden.

In Pilotsynthesen wurden von uns Proteine mit bis zu 120 Aminosäureresten wie HIV-Protease<sup>[130]</sup>, Humaninsulin, Metallothionein<sup>[129]</sup> sowie Cardiodilatin<sup>[132]</sup> an Tentakel-polymeren aufgebaut, analytisch die kritischen Stufen ermittelt und die Strategien für die optimierten Synthesen festgelegt.

Diese Untersuchungen zeigen eindeutig, daß die Totalsynthese von Proteinen bis zu Molmassen von über 10 000 Da möglich ist und die analytischen Methoden zum Nachweis der Reinheit zur Verfügung stehen. Es wird wesentlich von der Weiterentwicklung der Träger und der analytischen Methoden abhängen, ob die Trägersynthese auch zu noch größeren Proteinen vordringen kann. Zum Verständnis der biologischen Aktivität von Proteinen werden die jetzt bereits erschlossenen Synthesebereiche wertvolle Beiträge liefern und somit zur Entschlüsselung noch verborgener Zusammenhänge in der belebten Natur beitragen.

Die hier vorgestellten Arbeiten aus dem Tübinger Laboratorium waren nur durch die engagierte Mitarbeit vieler Generationen junger Chemiker möglich. Wenn hier nun einige hervorgehoben werden, soll dies die Beiträge der nur in den Literaturzitaten erwähnten Mitarbeiter nicht schmälern. In der Periode von 1966 bis 1973 seien die Herren Professoren G. Jung, H. Hagenmaier, W. Voelter, W. Parr und H. Eckstein sowie Herr Dr. B. Hemmasi erwähnt, vor allem bei den ersten Gehversuchen der Polypeptidsynthese an festen Trägern bis zum Apoferrodoxin und dem wichtigen Nachweis der Fehlsequenzen. Von 1971 bis 1976 wurde gemeinsam mit Professor M. Mutter die Flüssigphasenmethode entwickelt. Alle oben genannten Mitarbeiter haben inzwischen eigene Arbeitsgebiete der Peptidchemie erschlossen und herausragende Arbeit geleistet. Zur Entwicklung der HPLC und der gaschromatographischen Racemisierungskontrolle haben die Herren Dr. Umann, Dr. Frank, Dr. Hupe und Nicholson entscheidend beigetragen. In jüngerer Zeit ist die Entwicklung der monodispersen Träger und der Polystyrol-Polyethylenglycol-Polymere mit Dr. W. Rapp durchgeführt und gemeinsam mit Herrn Zhang die Synthese langerer Polypeptide erschlossen worden.

*Es sei auch allen Förderern dieser Arbeit gedankt, dem Land Baden-Württemberg, der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie, dem Bundesminister für Forschung und Technologie sowie den Firmen Hoffmann-LaRoche, Basel, Hoechst AG, Frankfurt, Diamalt AG, München, und BACHEM, USA.*

Eingegangen am 21. Mai 1990 [A 804]

- [1] R. B. Merrifield, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 21 (1962) 412.
  - [2] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 2149.
  - [3] R. B. Merrifield, *Biochemistry* 3 (1964) 1385.
  - [4] E. T. Kaiser, *Angew. Chem.* 100 (1988) 945; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) 913.
  - [5] E. T. Kaiser, F. J. Kezdy, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16 (1987) 561.
  - [6] M. Mutter, S. Vuilleumier, *Angew. Chem.* 101 (1989) 551; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28 (1989) 535.
  - [7] M. Bodanszky, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 88 (1960) 655.
  - [8] R. Schwyzer, P. Sieber, *Nature (London)* 199 (1963) 172.
  - [9] E. Wünsch, *Angew. Chem.* 83 (1971) 773; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 10 (1971) 786.
  - [10] E. Gross, J. Meienhofer (Hrsg.): *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Academic Press, New York 1975.

- [11] M. Bodanzky, M. A. Ondetti: *Peptides Synthesis*, Interscience, New York 1966, S. 162.
- [12] K. Hofmann, P. G. Katsoyannis in H. Neurath (Hrsg.): *The Proteins*, Vol. I, 2. Aufl., Academic Press, New York 1963.
- [13] G. Barany, R. B. Merrifield in [10], S. 100.
- [14] S. Moore, A. Felix, J. Meienhofer, C. W. Smith, R. Walter, *J. Med. Chem.* 20 (1977) 495.
- [15] T. Wieland, C. Birr, F. Flor, *Angew. Chem. 83* (1971); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 10* (1971) 336.
- [16] H. Hagenmaier, H. Frank, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 356 (1972) 1973.
- [17] E. Atherton, D. L. Clive, R. C. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975) 6584.
- [18] R. B. Merrifield, *Endeavour* 24 (1965) 3.
- [19] K. Kovács, B. Penke in H. Hanson, H. D. Jakubke (Hrsg.): *Peptides 1972*, North Holland, Amsterdam 1973, S. 187.
- [20] M. Bodanszky, K. W. Funk, *J. Org. Chem.* 38 (1973) 1296.
- [21] R. L. Letsinger, M. J. Kornet, V. Mahadevan, D. M. Jerina, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 5163.
- [22] a) E. Bricas (Hrsg.): *Peptides 1968*, North-Holland, Amsterdam 1968; b) F. Weygand in [22a], S. 183.
- [23] S. S. Wang, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 6488.
- [24] E. Bayer, E. Breitmaier, G. Jung, W. Parr, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 352 (1971) 759.
- [25] R. C. Sheppard, B. J. Williams, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1982, 587.
- [26] F. Albericio, G. Barany, *Int. J. Pept. Protein Res.* 30 (1987) 206.
- [27] M. S. Bernatowicz, S. B. Daniels, H. Köster, *Tetrahedron Lett.* 30 (1989) 4645.
- [28] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 3787.
- [29] E. Wünsch, *Methoden Org. Chem. (Houben-Weyl)* 4th Ed. 15 (1974) 1.
- [30] H.-D. Jakubke, H. Jeschkeit: *Aminosäuren, Peptide, Proteine*, Verlag Chemie, Weinheim 1982.
- [31] J. M. Stewart, J. D. Young: *Solid Phase Peptide Synthesis*, Freeman, San Francisco 1969.
- [32] E. Atherton, R. C. Sheppard: *Solid Phase Peptide Synthesis, a Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford 1989.
- [33] M. Bodanszky: *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer, Berlin 1984.
- [34] C. Birr: *Aspects of the Merrifield Peptide Synthesis*, Springer, Berlin 1979.
- [35] R. Geiger in H. Tscheche (Hrsg.): *Modern Methods in Protein Chemistry*, Vol. 2, de Gruyter, Berlin 1985, S. 399.
- [36] R. B. Merrifield, *Adv. Enzymol.* 32 (1969) 221.
- [37] A. Loffet, J. Close in [22a], S. 189.
- [38] A. Dryland, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1968, 125.
- [39] M. Mutter, V. N. R. Pillai, H. Anzinger, E. Bayer, C. Toniolo in K. Brunfeldt (Hrsg.): *Peptides 1980*, Scriptor, Copenhagen 1981, S. 660.
- [40] C. M. Deber, V. J. Hruby, K. D. Kopple (Hrsg.): *Peptides Structure and Function*, Pierce Chem. Comp., Rockford, IL, USA 1985.
- [41] S. B. H. Kent in [40], S. 407.
- [42] E. Atherton, R. C. Sheppard in [40], S. 415.
- [43] A. G. Ludwick, L. W. Jelinski, D. Live, A. Kintanar, J. J. Dumais, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 6493.
- [44] C. Toniolo, G. M. Bonora, E. P. Heimer, A. M. Felix, *Int. J. Pept. Protein Res.* 30 (1987) 232.
- [45] V. N. R. Pillai, M. Mutter, *Acc. Chem. Res.* 14 (1981) 122.
- [46] M. Gausepohl, W. Frank, W. Rapp, E. Bayer, unveröffentlicht.
- [47] E. Bayer, H. Eckstein, K. Hägele, W. A. König, W. Brüning, H. Hagenmaier, W. Parr, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 1735.
- [48] E. Bayer, H. Hagenmaier, G. Jung, W. A. König in [22a], S. 162.
- [49] E. Bayer in B. Weinstein, S. Laude (Hrsg.): *Peptides, Chemistry and Biochemistry*, Marcel Dekker, New York 1970.
- [50] E. Bayer, *Chem. Labor Beitr.* 20 (1969) 193.
- [51] E. Bayer, H. Hagenmaier, G. Jung, W. Parr, H. Eckstein, P. Hunziker, R. E. Sievers in E. Nesvabada (Hrsg.): *Peptides 1969*, North-Holland, Amsterdam 1971, S. 65.
- [52] E. Bayer, P. Hunziker, M. Mutter, R. E. Sievers, R. Uhmann, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 265.
- [53] H. Hagenmaier, *Tetrahedron Lett.* 1974, 283.
- [54] B. W. Erickson, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 3757.
- [55] a) J. Wolman (Hrsg.): *Peptides 1973*, Wiley, New York 1973; b) E. Bayer in [55a], S. 247.
- [56] M. Goodman in [55a], S. 250.
- [57] V. Gut, J. Rudinger in [22a], S. 185.
- [58] R. H. Andreatta, H. Rink, *Helv. Chim. Acta* 56 (1973) 1205.
- [59] M. N. Shemyakin, Y. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin, I. V. Kozhevnikova, *Tetrahedron Lett.* 1965, 2323.
- [60] E. Bayer, *Nachr. Chem. Tech.* 20 (1972) 495.
- [61] M. Mutter, H. Hagenmaier, E. Bayer, *Angew. Chem. 83* (1971) 883; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 10 (1971) 811.
- [62] E. Bayer, M. Mutter, *Nature (London)* 237 (1972) 512.
- [63] M. Mutter, E. Bayer in E. Gross, J. Meienhofer (Hrsg.): *The Peptides*, Vol. 2, Academic Press, New York 1970, S. 285.
- [64] M. Mutter, E. Bayer, *Angew. Chem.* 86 (1974) 101; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 13 (1974) 149.
- [65] E. Bayer, M. Mutter, *Chem. Ber.* 107 (1974) 1344.
- [66] M. Mutter, R. Uhmann, E. Bayer, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1975, 901.
- [67] E. Bayer, M. Mutter, R. Uhmann, J. Polster, H. Mauser, *J. Am. Chem. Soc.* 96 (1974) 7333.
- [68] M. Mutter, *Macromolecules* 10 (1977) 1413.
- [69] M. Mutter, F. Maser, K.-H. Altmann, C. Toniolo, G. M. Bonora, *Bio-polymers* 24 (1985) 1057.
- [70] M. Mutter, H. Mutter, E. Bayer, *Pept. Chem. Struct. Biol. Proc. Am. Pept. Symp.* 5th 1977, 403.
- [71] M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* 1978, 2843.
- [72] W. Schoknecht, K. Albert, G. Jung, E. Bayer, *Liebigs Ann. Chem.* 1982, 1514.
- [73] E. Bayer, M. Mutter, G. Holzer, *Pept. Chem. Struct. Biol. Proc. Am. Pept. Symp.* 4th 1975, 425.
- [74] E. Atherton, M. J. Gait, R. C. Sheppard, B. J. Williams, *Bioorg. Chem.* 8 (1979) 351.
- [75] E. Atherton, J. Holder, M. Meldal, R. C. Sheppard, R. M. Valero, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1988, 2887.
- [76] E. Atherton, C. J. Logan, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1981, 538; *Tetrahedron* 44 (1988) 843.
- [77] L. A. Carpino, G. Y. Han, J. Am. Chem. Soc. 92 (1970) 5748; *J. Org. Chem.* 37 (1972) 3404.
- [78] A. Warshavsky, R. Kaliv, A. Doshe, H. Berkowitz, A. Patchornik, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 4249.
- [79] E. Tsuchida, H. Nishide, N. Shimidzu, A. Yamada, M. Keneko, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* 2 (1981) 621.
- [80] E. Bayer, B. Hemmäsi, K. Albert, W. Rapp, M. Dengler in V. J. Hruby, D. H. Rich (Hrsg.): *Peptides: Structure and Function*, Pierce Chem. Comp., Rockford, IL, USA 1983, S. 87.
- [81] E. Bayer, W. Rapp, DE-A 3714258 (1988).
- [82] E. Bayer, M. Dengler, B. Hemmäsi, *Int. J. Pept. Protein Res.* 25 (1985) 178.
- [83] E. Bayer, W. Rapp in W. Voelter, E. Bayer, Y. A. Ovchinnikov, V. I. Ivanov (Hrsg.): *Chemistry of Peptides and Proteins*, de Gruyter, Berlin 1986, S. 3.
- [84] E. Bayer, H. Hellstern, H. Eckstein, *Z. Naturforsch. C* 42 (1987) 455.
- [85] W. Rapp, *Dissertation*, Universität Tübingen 1985.
- [86] W. Rapp, L. Zhang, R. Häbich, E. Bayer in G. Jung, E. Bayer (Hrsg.): *Peptides 1988*, de Gruyter, Berlin 1989, S. 199.
- [87] E. Bayer, K. Albert, H. Willisch, W. Rapp, B. Hemmäsi, *Macromolecules* 23 (1990) 1937.
- [88] Tentakelpolymer sind erhältlich als TentaGel® durch W. Rapp Polymere, Tübingen.
- [89] J. Ugelstad, P. C. Mork, *Adv. Colloid Interface Sci.* 13 (1980) 101.
- [90] F. K. Hansen, J. Ugelstad, *J. Polym. Sci.* 16 (1978) 1953; *ibid.* 17 (1979) 3033.
- [91] E. Bayer, W. Rapp, unveröffentlicht.
- [92] E. Bayer, *10th Int. Symp. Column Liquid Chromatogr.* 1980 (San Francisco), Abstract 504.
- [93] E. Bayer, G. Jung, I. Halasz, I. Sebastian, *Tetrahedron Lett.* 1970, 4503.
- [94] R. P. W. Scott, K. K. Chan, P. Kucna, P. Zolty, *J. Chromatogr. Sci.* 9 (1971) 577.
- [95] R. Frank, H. Gausepohl in H. Tscheche (Hrsg.): *Modern Methods in Protein Chemistry*, Vol. 3, de Gruyter, Berlin 1988, S. 41.
- [96] E. Atherton, E. Brown, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1981, 1151.
- [97] A. Dryland, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1986, 125.
- [98] M. T. W. Hearn, *Methods Enzymol.* 104 (1984) 190.
- [99] R. A. Houghton, J. M. Ostresh, *Biochromatography* 2 (1986) 80.
- [100] B. Pfleiderer, K. Albert, K. D. Lork, K. K. Unger, H. Brückner, E. Bayer, *Angew. Chem.* 101 (1989) 336; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28 (1989) 327.
- [101] G. Schomburg, F. Wecke, F. Müller, M. Oreans, *Chromatographia* 16 (1982) 87.
- [102] J. F. K. Huber, Vortrag bei der ANAKON, Baden-Baden, Mai 1987.
- [103] H. Hulpke, U. Werthmann, *Chromatographia* 13 (1980) 395.
- [104] S.-L. Wu, A. Figueroa, B. L. Karger, *J. Chromatogr.* 371 (1986) 3.
- [105] S. Shaltiel, *Methods Enzymol.* 104 (1984) 69.
- [106] C. Horvath, B. A. Preiss, S. R. Lipsky, *Anal. Chem.* 39 (1967) 1422.
- [107] K. K. Unger, G. Gilje, J. N. Kinkel, M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr.* 359 (1986) 61.
- [108] I. Mazsaroff, M. A. Rounds, F. F. Regnier, *J. Chromatogr.* 411 (1987) 452.
- [109] L. Varády, K. Kalghatgi, C. Horvath, *J. Chromatogr.* 458 (1988) 207.
- [110] E. Bayer, W. Rapp, *14th Int. Symp. Column Liquid Chromatogr.* 1990 (Boston).
- [111] J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Science (Washington)* 222 (1983) 266.
- [112] J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298.
- [113] A. S. Cohen, A. Paulus, B. L. Karger, *Chromatographia* 24 (1987) 15.
- [114] S. Hjerten, M.-D. Zhu, *J. Chromatogr.* 327 (1985) 157.
- [115] A. Chrambach, M. J. Dann, B. J. Radola, *Advances in Electrophoresis*, Vol. 2, VCH, Weinheim 1988.
- [116] E. Bayer in H. Tscheche (Hrsg.): *Modern Methods in Protein Chemistry*, Vol. 4, 1990, im Druck.
- [117] K. A. Gobb, M. Novotny, *Anal. Chem.* 61 (1989) 2226; P. D. Grossmann, J. C. Colburn, H. H. Lauer, R. G. Nielsen, R. M. Riggan, G. S. Sittampalam, E. C. Richard, *ibid.* 61 (1989) 1186.

- [118] G. J. M. Bruin, J. P. Chang, R. H. Kuhlmann, K. Zegers, J. C. Kraak, H. Poppe, *J. Chromatogr.* 471 (1989) 429.  
 [119] A. P. Bruins, T. R. Covey, J. D. Henion, *Anal. Chem.* 59 (1987) 2642.  
 [120] S. F. Wong, C. K. Meng, J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.* 92 (1988) 546.  
 [121] Anonymus, 1989. The API III Book. Selbstverlag Fa. SCIEX, Division of MDS Health Group Ltd., Toronto, Canada.  
 [122] E. D. Lee, T. R. Covey, W. Muck, J. D. Henion, *J. Chromatogr.* 458 (1988) 313.  
 [123] H. Zeppezauer, W. Rapp, E. Bayer, unveröffentlicht.  
 [124] K.-H. Wiesmüller, G. Jung, G. Hess, *Vaccine* 7 (1989) 29.  
 [125] K. Deres, H. Schild, K.-H. Wiesmüller, G. Jung, H.-G. Rammensee, *Nature (London)* 342 (1989) 561.  
 [126] E. Bayer, W. Rapp, L. Zhang, A. Beck-Sickinger, K. Deres, K.-H. Wiesmüller, G. Jung, unveröffentlicht.  
 [127] R. D. Smith, J. A. Loo, C. G. Edmonds, C. J. Barringe, H. R. Udseth,
- Anal. Chem. 62 (1990) 882.  
 [128] I. Jardine, *Nature (London)* 345 (1990) 747.  
 [129] E. Bayer, W. Rapp, L. Zhang, unveröffentlicht.  
 [130] E. Bayer, W. Rapp, L. Zhang, *21st Europ. Pept. Symp. 1990* (Barcelona).  
 [131] J. Schneider, S. B. H. Kent, *Cell* 54 (1988) 363.  
 [132] W. Rapp, K. Nokohara, *21st Europ. Pept. Symp. 1990* (Barcelona).  
 [133] E. Bayer, H. Hagenmaier, G. Jung, *Tetrahedron* 24 (1968) 4853.  
 [134] B. Gutte, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 1348.  
 [135] S. Sano, M. Kurihara, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 350 (1969) 1183.  
 [136] C. H. Li, D. Yanashiro, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 7608.  
 [137] J. Sharp, A. B. Robinson, M. D. Kamen, *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 6097.  
 [138] N. Izumiya, M. Waki, T. Kato, M. Ono, H. Aoyagi, N. Mitsayasu in J. Meienhofer (Hrsg.): *Chemistry and Biology of Peptides*, Science Publ., Ann Arbor, MI, USA 1972, S. 269.

## WUT ZUR LÜ KE



**Hat schon wieder ein anderer die Angewandte?  
 Statt vor Wut zu kochen: Lückenlos auf dem  
 neuesten Stand mit einem persönlichen  
 Abonnement!**

*Anruf oder Fax genügt*



Tel. (06201) 602216, Fax (06201) 602328  
 Postfach 101161, D-6940 Weinheim