

ANGEWANDTE CHEMIE

104. Jahrgang 1992

Heft 4

Seite 375–500

Methoden der multiplen Peptidsynthese und ihre Anwendungen

Von Günther Jung und Annette G. Beck-Sickinger

Neue synthetische
Methoden (87)

Professor Ernst Bayer zum 65. Geburtstag gewidmet

Die rasch fortschreitende Entwicklung in der Biotechnologie neuer Proteine, in der Immunologie und in der auf Inhibitoren und Antagonisten basierenden Pharmaforschung führen zu einem immensen Bedarf an synthetischen Peptiden. Durch multiple Methoden können heute 100–150 völlig verschiedene Peptide mit Kettenlängen bis etwa 20 Aminosäuren gleichzeitig hergestellt werden. Die erzielten Ausbeuten und Qualitäten reichen aus, um ein verlässliches Screening auf biologische Aktivität *in vitro* und *in vivo* durchzuführen; dasselbe gilt für Syntheseoptimierungen, Sekundärstrukturvergleiche und Konformationskartierungen. Mit speziellen multiplen Methoden gelingt die Epitopkartierung auch größerer Proteine zur Diagnostik und Impfstoffentwicklung anhand von einigen hundert freien oder an Stäbchen gebundenen Peptiden, die für Immunoassays einsetzbar sind. Multiple Methoden der Peptidsynthese ermöglichen auch den Aufbau von sogenannten Peptidbibliotheken. Diese können Hunderttausende von Peptiden umfassen, wodurch sich neue Perspektiven für das Screening nach Leitstrukturen eröffnen. Mit einer speziellen Peptidsynthese, die die Verwendung von photolabilen Schutzgruppen und photolithographischen Verfahren kombiniert, können Peptidbibliotheken auf Plättchen für miniaturisierte Immunoassays aufgebaut werden. Lipopeptid-Antigen-Konjugate, die komplettete Proteinsequenzen aus überlappenden Peptidsegmenten umfassen, machen die Herstellung peptidspezifischer und monoklonaler Antikörper sowie ein gezieltes Screening auf Epitope von B-, T-Helfer- und T-Killer-Zellen möglich. Anwendungen auf dem Gebiet der AIDS-Diagnostik, der Impfstoffentwicklung, oder dem Screening nach Hormonanaloga demonstrieren die Perspektiven, die sich durch die multiplen Synthesemethoden eröffnen.

1. Peptidsynthese im Wandel der Zeit

Die Peptidchemie erlebt momentan einen besonders rasanten Aufschwung. Die vielfältigen Forschungsmöglichkeiten, mit synthetischen Peptiden biologische Problemstellungen zu lösen, werden in zunehmendem Maß erkannt^[1–8]. Die Peptidchemie ist – wie kaum ein anderes Teilgebiet der Organischen Chemie – in intensive interdisziplinäre Kooperationen eingebunden. Die Forschungsgebiete der modernen Peptidchemie umfassen Synthese und Analytik, Isolierung

und Strukturaufklärung, Konformationsuntersuchung und Molecular Modeling. Die Arbeiten werden projektorientiert zusammen mit Forschergruppen in der Pharmakologie, Physiologie, Immunologie, Biologie und Biophysik durchgeführt.

Es werden vermehrt Peptide mit ungewöhnlichen Aminosäuren^[9–15], abgewandelten Peptidbindungen^[16–21], Linker- oder Spacermolekülen^[22, 23] und Peptidmimetica^[24–26] hergestellt. Die wichtigsten Ergebnisse der medizinischen Chemie der Agonisten und Antagonisten von Peptidwirkstoffen und Inhibitoren wurden kürzlich von R. Hirschmann^[26a] zusammengefaßt. Große Fortschritte werden in der Immunologie auf der molekularen Ebene der Erken-

[*] Prof. Dr. G. Jung, Dr. A. G. Beck-Sickinger
Institut für Organische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 18, W-7400 Tübingen

nungsmechanismen mit synthetischen Peptiden^[27a, b] und synthetischen Vaccinen^[27c–e] erzielt.

Der Peptidchemiker muß sich stets neuen Herausforderungen in immer kürzeren Zeitabschnitten stellen^[28, 29]. Es besteht ein erhöhter Bedarf an neuen Strategien, schnelleren Synthesemöglichkeiten (vgl. Übersicht von E. Bayer^[28a]), besseren Kupplungsreagentien und Schutzgruppen sowie im besonderen an Methoden, die gleichzeitig sehr viele Peptide in kurzer Zeit herstellen und analysieren.

Wir möchten hier die neueren Entwicklungen der multiplen Peptidsynthese (MPS) vorstellen und auch die Möglichkeiten der modernen Analytik einer Vielzahl von Polypeptiden (multiple Peptidanalytik, MPA) referieren. Diese Methoden sollen jeweils mit charakteristischen Anwendungsbeispielen illustriert werden.

1.1. Synthetische Proteinteilsequenzen

F. Anderer stellte im Jahre 1963^[30] virusneutralisierende Antikörper mit der C-terminalen Hexapeptidsequenz des Tabakmosaikvirus-Hüllproteins her; seither spielen synthetische Proteinteilsequenzen eine dominierende Rolle bei der Festlegung von antigenen Determinanten. Durch die genetischtechnologische Forschung und durch Sequenzierautomaten nimmt die Zahl der Proteinsequenzen stark zu, so daß die Sequenzen nur noch mit speziellen Programmen und Datenbanken^[31] erfäß- und vergleichbar sind. Die chemische Synthese kurzer Teilbereiche von Proteinen ist heute – trotz genetischtechnologischer Fortschritte – eine der schnellsten Möglichkeiten, experimentelle Informationen über Bindungsdomänen, aktive Zentren und Modifikationen zu erhalten.

Interessanterweise hatte R. B. Merrifield^[32, 33] die entscheidende Idee zur automatisierbaren Peptidsynthese an fester Phase kurz nach Anderers Versuchen. Die Merrifield-Synthese^[28, 33–36] war Voraussetzung zur schnellen Herstellung vieler Peptide. Durch Seitenkettenmutagenese gelingt die Biosynthese sequenzabgewandelter Peptidwirkstoffe und Proteine; eine gezielte Variation mit nichtproteinogenen Aminosäuren wird nahezu ausschließlich mit chemischen Methoden durchgeführt. Da viele Proteine diagnostisch und therapeutisch interessant sind (und wegen des wachsenden Bedarfs an Proteinen in der biochemischen Grundlagenforschung), gelingt es mit herkömmlichen Methoden der Frag-

mentkondensation^[37–39] schon lange nicht mehr, genügend synthetische Peptide innerhalb eines akzeptablen Zeitraums herzustellen.

1.2. Niedermolekulare Peptidwirkstoffe

Die Zahl hochaktiver Peptidwirkstoffe, die als Basis für Pharmaentwicklungen dienen oder in natürlicher Sequenz zur Therapie eingesetzt werden, steigt steil an. Unser Körper „kennt“ und reagiert auf viel mehr Peptide, als wir bislang erahnten! Bombesin, Endotheline, epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Magainine, Neuropeptid Y – dies sind einige der vielen hochaktiven Peptidwirkstoffe, die in den letzten Jahren peptidchemisch bearbeitet wurden. Aber auch das Abwandeln von „Dauerbrennern“ wie Renin, Atrialem Natriuretischem Faktor, Somatostatin, Cholecystokinin, Pepstatin, Calcitonin, Bradykinin, Enkephalin, Angiotensin, Vasopressin, Oxytocin wird weiterhin intensiv untersucht^[1–8]. Die Kenntnis der Struktur-Wirkungs-Beziehungen, die den Zusammenhang zwischen Aminosäuresequenz, Peptidkonformation und biologischer Aktivität erschließen, ist sowohl für die Aufklärung der Grundlagen von Signalerkennung und Übermittlung von Informationen als auch für pharmakologische Therapieansätze von Bedeutung. Das Verstehen von Agonismus und Antagonismus eines Peptidhormons ist nur über systematisch variierte Peptid- und Nichtpeptidanaloga erlernbar.

1.3. Analytik auf dem Vormarsch

Durch verbesserte biologische und biochemische Methoden sowie solchen der instrumentellen Analytik ist der Zugang zu neuen Wirkstoffen im picomolaren und noch geringer konzentrierten Bereich möglich. Zur vollautomatischen Gasphasensequenzierung nach Edman^[40, 41] benötigt man weniger als 100 pmol Protein, und durch HPLC-on-line-Kopplung können Polypeptide mit weit über 10 000 Da im Ionspray-Massenspektrometer^[40, 42] ebenfalls in picomolarer Lösung analysiert werden. Zur Aminosäurenanalyse genügen in speziellen Fällen sogar wenige Femtomol^[40, 43]. Somit können natürliche Polypeptide immer häufiger im picomolaren Maßstab sequenziert, danach in mg-Mengen

Günther Jung, geboren 1937 in Tübingen, studierte Chemie und promovierte 1967 bei E. Bayer an der Universität Tübingen. Nach seiner Habilitation auf dem Gebiet der Naturstoffchemie erhielt er 1971 die Lehrbefugnis für Organische Chemie und Biochemie. Verschiedene Rufe nach auswärts lehnte er ab. Er verbrachte 1967/68 als Assistant Professor an der University of Houston. Für seine wissenschaftlichen Arbeiten auf dem Gebiet der Lantibiotika erhielt er die Max-Bergmann-Medaille 1989. Seine Forschungsgebiete sind die Strukturaufklärung, Wirkungsweise und Biosynthese größerer Polypeptidantibiotika und Siderophore, Struktur-Wirkungs-Beziehungen des Neuropeptids Y, Modelle für Transmembrankanäle, Multiple Peptidsynthesemethoden, B-, T-Helfer- und T-Killer-Zell-Epitopkartierungen, Entwicklung totalsynthetischer Peptidvaccine.

Annette G. Beck-Sickinger, geboren 1960 in Aalen, studierte Chemie (Diplom 1986) und Biologie (Diplom 1990) an der Universität Tübingen. Nach einem Forschungsaufenthalt (1988) bei R. A. Houghten (Scripps Clinic & Research Foundation, La Jolla, Kalifornien) promovierte sie 1989 bei G. Jung. Von 1990 bis 1991 war sie als Postdoktorandin an der ETH Zürich bei Prof. Carafoli tätig. Gegenwärtig arbeitet sie an ihrer Habilitation. Ihre Forschungsschwerpunkte liegen auf den Gebieten der Peptid-Protein-Wechselwirkungen, des Photocrosslinking und der Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Neuropeptiden.

synthetisiert und über synthetische Analoga in ihrer biologischen Aktivität untersucht werden^[27, 44, 45].

2. Multiple Peptidsynthese – die logische Konsequenz

Um der rasch anwachsenden Nachfrage nach vielen, völlig verschiedenen synthetischen Peptidsequenzen gerecht zu werden, entwickelten ab 1985 mehrere Gruppen unabhängig voneinander unterschiedliche Konzepte einer multiplen Peptidsynthese (Tabellen 1 und 2). Unter der multiplen Peptidsynthese (MPS), auch als simultane multiple Peptidsynthese (SMPS) bezeichnet, versteht man die gleichzeitige Synthese vieler Peptidsequenzen unterschiedlicher Länge und beliebiger Aminosäurenzusammensetzung.

zierung ist ebenfalls möglich. Häufig werden die multiplen Synthesemethoden in der Hormon- und Inhibitorforschung eingesetzt. Zur Identifizierung relevanter Seitenketten kann jede einzelne Aminosäure eines Peptidwirkstoffes systematisch und mehrfach ausgetauscht werden, Kettenlängen können variiert sowie *N*- und *C*-Termini modifiziert werden (Abb. 1)^[46]. *N*-terminale Modifikation wie Acetylierungen, Biotinylierungen, Succinimidylierungen oder Kupplungen zur Immunogenherstellung konnten bisher schon durch Aufteilung des Peptidharzes nach herkömmlichen Festphasensynthesen erhalten werden. Modifikationen im *C*-terminalen Bereich gelingen dagegen nur beim Einsetzen von multiplen Methoden oder bei nacheinander durchgeführten Synthesen. So kann in der multiplen Peptidsynthese dasselbe Peptid gleichzeitig an verschiedenen Ankermolekülen hergestellt und nach Abspaltung vom Harz als Peptidsäure, Peptid-

Tabelle 1. Übersicht über die Methoden der multiplen Peptidsynthese (MPS) für Konzentrationen größer 50 µM.

Methode	Tea bag		R ^a MPS	PS-PE-Copolymer-Filme	Continuous Flow Peptide Synthesis (CF-SP-MPS)	Synthesizer PSSM-8
Polymer	PS-DVB	PS-DVB	PS-DVB	PS-PE-Film	PS-DVB	PS-DVB
Anzahl	<150	<150	25	10	10	8
Menge	50–500 µmol	50–500 µmol	50–100 µmol	500 µmol	20–400 µmol	5–400 µmol
Schutzgruppe	Boc	Fmoc	Fmoc/Boc		Fmoc/Boc	
Aktivierung	DIC	TBTU/HOBt	beliebig	symm. Anhydrid	HOBt/DIC	HOBt/DIC TBTU. und andere
Wasch- cyclus	manuell am Schüttler	automatisch Labortec 411	manuell am Schüttler	manuell	manuell mit verbundenen Reaktoren	automatisch
Computer- programm	notwendig	notwendig	hilfreich			enthalten
Kontrolle	Pikrinsäure		Ninhydrin		Bromphenolblau	
Literatur	[49]	[52]	[79]	[90]	[81]	[77]

PS = Polystyrol, PE = Polyethylen, DVB = Divinylbenzol, Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, Fmoc = Fluorenylmethoxycarbonyl, TBTU = *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetrafluorborat, HOBt = 1-Hydroxybenzotriazol, DIC = Diisopropylcarbodiimid.

Tabelle 2. Übersicht über die Methoden der multiplen Peptidsynthese für kleine Mengen und Diagnostica.

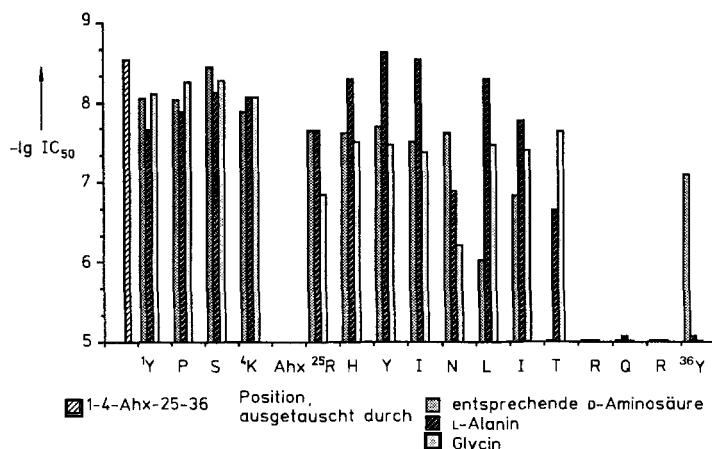
Methode	Methoden mit Pipettierrobotern		Multiple Säulchen	Pepscan	Spots auf Papier	Cellulose Rondelle	Cellulose Papier	Baumwolle Rondelle
Polymer	PS-DVB	PS-DVB	Macrosorb-SPR	PE-Stäbe	Cellulose	Cellulose	Cellulose	Cellulose
Anzahl	90 oder 144	48	96	96/Block	96	10	4	10
Menge	5–25 µmol/ Gefäß	25–50 µmol/ Gefäß	7 µmol/ Kartusche	300 nmol/ Pin	100 nmol/ Fleck	4–6 µmol/ Rondelle	3 µmol/cm ² / Stoff: Ø 3 cm	
Schutzgruppe	Fmoc	Fmoc	Fmoc	Fmoc	Fmoc	Fmoc	Fmoc	
Aktivierung	DIC/HOBt oder TBTU	PyBOP/HOBt	Dhbt-ester	Pfp-ester	DIC/HOBt, TBTU	DIC/HOBt, TBTU	DIC/HOBt	DIC/HOBt
Wasch- cyclus	automatisch TECAN 5032 (Zinsser SMPS 532)	automatisch GilsonM222 Abimed AMS 422	manuell mit Multi- pipette	manuell	manuell	automatisch mit Durch- flußsynthesizer	manuell	manuelle Waschschritte durch Zentrifugation
Computer- programm	enthalten	enthalten		notwendig	notwendig	notwendig		
Kontrolle			Dhbt		Bromphenol- blau	Bromphenol- blau	Bromphenol- blau	Bromphenol- blau
Literatur	[72]	[75]	[78]	[62]	[71]	[83]	[82]	[88]

PyBOP = (Benzotriazo-1-yl)-*N*-oxytritypyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat, Dhbt = 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin, Pfp = Pentafluorphenyl.

Die verschiedenen Ansätze unterscheiden sich grundsätzlich durch die eingesetzten polymeren Träger, die Anzahl der möglichen Peptide und die Menge der erhaltenen Produkte. Werden mehr als 10 mg Produkt erhalten, so kann neben der stets notwendigen Charakterisierung auch eine effiziente Reinigung durchgeführt werden, eine nachfolgende Modifi-

amid, alkyliertes Amid, Hydrazid oder als vollgeschütztes Fragment erhalten werden.

Das systematische Abtasten eines Proteins von Antipeptid- und Antiprotein-Antikörpern bezeichnet man als Epitopkartierung, wobei überwiegend kontinuierliche B-Zellepitope erfaßt werden. Mit kurzen, freien Peptiden, die



yPSK-Ahx-RHYINLITRQRY	APSK-Ahx-RHYINLITRQRY	GPSK-Ahx-RHYINLITRQRY
YpSK-Ahx-RHYINLITRQRY	YASK-Ahx-RHYINLITRQRY	YGSK-Ahx-RHYINLITRQRY
YpsK-Ahx-RHYINLITRQRY	YPAK-Ahx-RHYINLITRQRY	YPGK-Ahx-RHYINLITRQRY
YpsK-Ahx-RHYINLITRQRY	YPSA-Ahx-RHYINLITRQRY	YPSG-Ahx-RHYINLITRQRY
YPSK-Ahx-RHYINLITRQRY	YPSK-Ahx-AHYINLITRQRY	YPSK-Ahx-GHYINLITRQRY
YPSK-Ahx-RHYINLITRQRY	YPSK-Ahx-RAYINLITRQRY	YPSK-Ahx-RGYINLITRQRY
YPSK-Ahx-RHYINLITRQRY	YPSK-Ahx-RHAHNLTTRQRY	YPSK-Ahx-RHGNLTTRQRY
YPSK-Ahx-RHYINLITRQRY	YPSK-Ahx-RHYANLTTRQRY	YPSK-Ahx-RHYGNLTTRQRY
YPSK-Ahx-RHYINLITRQRY	YPSK-Ahx-RHYANILTRQRY	YPSK-Ahx-RHYIGLITRQRY
YPSK-Ahx-RHYINLITRQRY	YPSK-Ahx-RHYINAITRQRY	YPSK-Ahx-RHYINGITRQRY
YPSK-Ahx-RHYINLITRQRY	YPSK-Ahx-RHYINLATRQRY	YPSK-Ahx-RHYINLGTQRY
YPSK-Ahx-RHYINLIIQRQRY	YPSK-Ahx-RHYINLIARQRY	YPSK-Ahx-RHYINLIGRQRY
YPSK-Ahx-RHYINLIIQRQRY	YPSK-Ahx-RHYINLITAQRY	YPSK-Ahx-RHYINLITGQRY
YPSK-Ahx-RHYINLITRQRY	YPSK-Ahx-RHYINLITRARY	YPSK-Ahx-RHYINLITRQRY
YPSK-Ahx-RHYINLITRQRY	YPSK-Ahx-RHYINLITRQAY	YPSK-Ahx-RHYINLITRQGY
YPSK-Ahx-RHYINLITRQRY	YPSK-Ahx-RHYINLITRQRA	YPSK-Ahx-RHYINLITRQRG

Abb. 1. Oben: Identifizierung der mit dem Rezeptor (Kaninchennieren-Cortex) interagierenden Aminosäuren des Hormons Neuropeptid Y(NPY). Durch MPS wurden 48 Analoga der hochaffinen 17-Peptid-Sequenz YPSK-Ahx-RHYINLITRQRY-NH₂ (Ahx = 6-Aminohexansäure) hergestellt, indem jeweils eine Position der Sequenz durch die korrespondierende D-Aminosäure, L-Alanin oder Glycin ausgetauscht wurde. Dabei hat sich gezeigt, daß das C-terminale Tetrapeptidamid RQRY-NH₂ essentiell für die Interaktion ist, da ein Austausch in diesen vier Positionen zu einer starken Abnahme der Affinität führt [57 a]. Die Abbildung zeigt auf der x-Achse die oben angegebene natürliche Aminosäurenfolge. Rezeptorbindungsdaten der Analoga sind als -lg IC₅₀-Werte (pIC₅₀; IC₅₀ = Konzentration in [M] der halbmaximalen Inhibition der Bindung von ¹²⁵I-NPY) in Form von Balken dargestellt. Unten: Sequenzen der Analoga. Linke Spalte: Kleinbuchstabe symbolisiert die Position, die durch die D-Aminosäure ausgetauscht wurde; mittlere Spalte: Austausch durch L-Alanin A; rechte Spalte: Austausch durch Glycin G.

die gesamte Proteinsequenz abdecken, können zudem T-Helferzellepitope (12–17 Aminosäuren Länge) und T-Killerzellepitope (8–10 Aminosäuren Länge) systematisch gesucht werden (T-Zellepitopkartierung). Ferner ist eine Konformationskartierung möglich, bei der die Faltungstendenz (Bildung von Sekundärstrukturen) einer Proteinkette mittels überlappenden Proteinteilstücke (15–20 Aminosäuren Länge) systematisch mit experimentellen, konformationsanalytischen Methoden untersucht wird. Diese und andere Proteinkartierungen (Mapping) sind um so genauer, je mehr definierte Einzelpeptide die gesamte Proteinsequenz überlappend umfassen. Häufig genügt allerdings weniger als ein Milligramm pro Einzelpeptid für die Kartierung eines Proteins im immunologischen oder biochemischen Test. Die Länge der Proteinteilsequenzen und die Rasterbreite sind dabei den jeweiligen Fragestellungen anzupassen und bestimmen die Anzahl der zu synthetisierenden Peptide (Abb. 2).

Wird beispielsweise das Nef-Protein des HIV-Virus, das aus 208 Aminosäuren (AS) besteht, mit Hexapeptidsegmenten und einem Raster von 1 untersucht^[47], so sind hierfür

203 Peptide notwendig. Allgemein gilt für die Anzahl *n* der benötigten Peptide Gleichung (a).

$$n = \frac{\text{Anzahl der AS des Proteins} - \text{Anzahl der AS des Peptidsegments}}{\text{Rasterzahl}} + 1 \quad (\text{a})$$

Eine solche Feinrasterung mit überlappenden Teilequenzen wird insbesondere zur Bestimmung von Immunglobulin-bindungsstellen durchgeführt (Abb. 2). Zur Untersuchung der Immunogenität von Proteinsegmenten werden längere Peptide, jedoch ein weniger dichtes Raster benötigt. So konnte das P6-Protein von *Haemophilus influenza* Typ b, das aus 134 Aminosäuren besteht, mit einem Raster von 4 und einer Peptidsegmentlänge von 20 Aminosäuren durch 28 Peptide immunologisch charakterisiert werden^[48].

3. Verschiedene Synthesekonzepte – ein Ziel

3.1. Peptidsynthese im „Teebeutel“

Die Tea-bag(Teebeutel)-Methode von R. A. Houghten zählt, obwohl erstmals 1985 publiziert^[49], bereits zu den älteren Methoden der multiplen Peptidsynthese. Sie ist für bis zu 150 verschiedene Peptide mit einer Ausbeute von jeweils etwa 50 mg geeignet. Die Separation des polymeren Trägers wird durch dessen Einschweißen in Polypropylennetze vor der Festphasenpeptidsynthese durchgeführt. Für jedes Peptid wird ein solches tea bag benötigt, das solvensbeständig mit Tusche gekennzeichnet und mit ca. 100 mg Polymer gefüllt ist^[50]. Normalerweise wird Polystyrol-1%-Divinylbenzol als Träger verwendet, aber prinzipiell könnten auch andere Polymerträger oder Polymergemische, sofern die kleinste Partikelgröße die Porenweite des Netzes nicht unterschreitet, eingesetzt werden (Abb. 3, S. 380).

Das Abspalten der α-Aminoschutzgruppe und das Waschen erfolgt für alle tea bags gemeinsam in einer Polypropylenschraubflasche, die der Anzahl der Peptide und dem Waschvolumen angepaßt ist. Das Waschvolumen pro Beutel beträgt 3–5 mL. Zur Kupplung werden die tea bags nach der zu kuppelnden Aminosäure sortiert und parallel in getrennten Reaktionsgefäßen mit der aktivierten Aminosäure behandelt. Zum Auswaschen überschüssiger Reagenzien wird zweimal separat gewaschen, wonach die tea bags wieder vereinigt werden können. Um die Diffusion im Harz zu erleichtern, findet sowohl das Waschen als auch die Kupplung unter starkem Schütteln statt.

Die Tea-bag-Methode ist prinzipiell unabhängig von der Schutzgruppenstrategie und der Aktivierung. R. A. Houghten entwickelte die Methode für die *tert*-Butoxycarbonyl(Boc)/Benzyl(Bzl)-Strategie mit *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid(DIC)-Aktivierung^[49, 51]. Von uns wird die vorteilhaftere Fmoc-/Bu-Strategie und die Aktivierung mit *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-tetrafluorborat (TBTU) eingesetzt^[52]; schnellere Kupplungsreaktionen sowie der Verzicht auf halogenierte Lösungsmittel sprechen für diese Variante.

Im Vergleich zu anderen parallelen Synthesemethoden beträgt die Ausbeute bei der Tea-bag-Methode mindestens 30–50 mg Rohpeptid bei einer Peptidlänge von mehr als zehn Aminosäuren. Dies genügt für eine ausführliche Analytik,

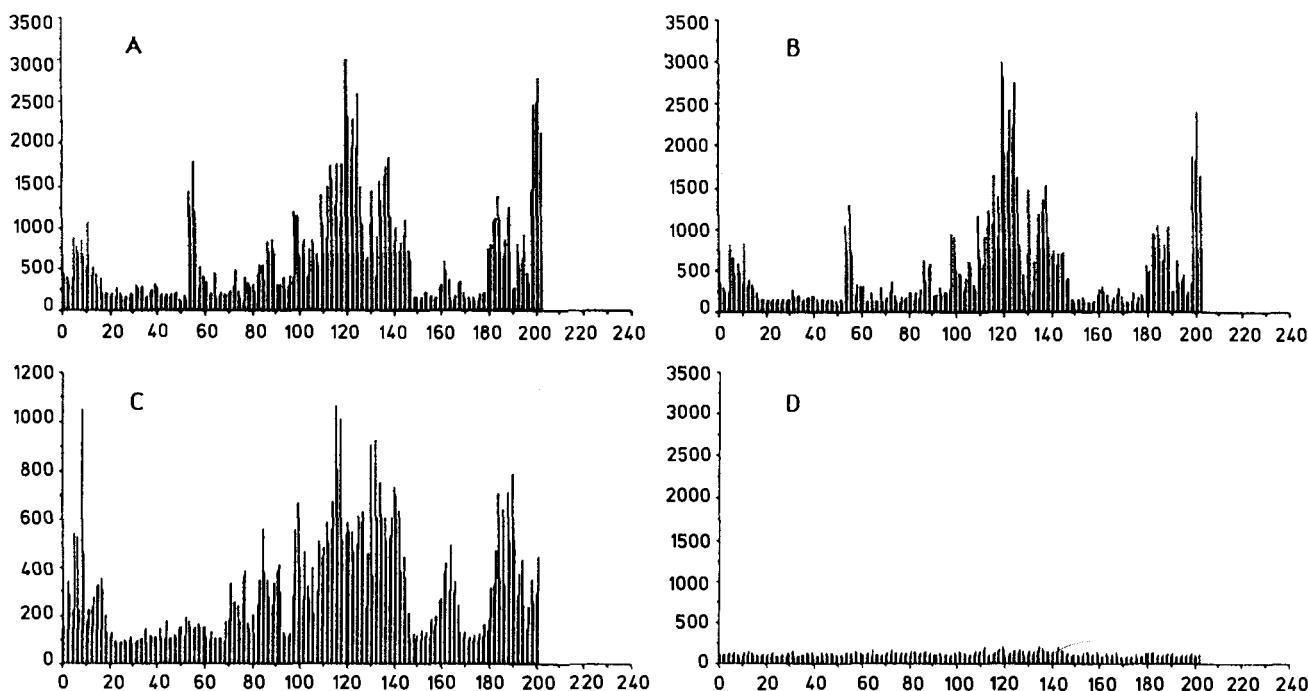


Abb. 2. Epitopkartierung des HIV-Nef-Proteins mit Pepscan-ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) nach F. Gombert et al. (vergleiche Abschnitt 3.2.1) [47]. Die kontinuierlichen B-Zell-Epitope der drei Nef-Proteine aus verschiedenen HIV-Isolaten SF2 (A), BRU (B) und MAL (C) wurden an Peptidstäbchen gebunden (siehe Abb. 5) synthetisiert und mit Antikörpern, die gegen das Nef-Protein gerichtet sind, direkt aus HIV-positiven Einzelseren (Verdünnung 1:1200) bestimmt. Serum D ist ein HIV-negatives Kontrollserum. Aufgetragen wurden auf der y-Achse die ELISA-Werte (optische Dichte \times 1000 bei 405 nm) gegen die Peptidnummern (x-Achse). Mehrere Sätze von unterschiedlich langen Peptiden (vgl. dazu Abb. 6) lieferten nach dem Test einer repräsentativen Zahl HIV-positiver Seren eine sehr klare Eingrenzung relevanter Epitope [47]. Die Stärke und Häufung positiver ELISA-Werte auf bestimmten Sequenzabschnitten zeigt kontinuierliche B-Zellepitope an, gegen die Anti-Nef-Antikörper gerichtet sind. Ein kontinuierliches Epitop umfaßt einen Proteinteilbereich mit einer Kette aus direkt aufeinanderfolgenden Aminosäuren. Die Spezifität und Bindungsstärke der häufiger vorkommenden Antikörper gegen diskontinuierliche Epitope aus z.B. zwei nebeneinanderliegenden Proteinteilbereichen verschiedener Sequenzabschnitte kann oft besser sein; trotzdem bewähren sich ELISA-Tests mit Peptidanlagen hervorragend in der Praxis.

für spektroskopische Untersuchungen einschließlich NMR-Studien und für viele biologische Tests.

Die Variabilität dieser Methode ist besonders hervorzuheben: Lösungsmittel, Aktivierung der Aminosäuren, Kupplungsschemata und weitere Syntheseparameter können sowohl von Kupplung zu Kupplung als auch während eines Synthesecyclus für bestimmte Peptide variiert werden. Daher eignet sich dieses Verfahren insbesondere für methodische Untersuchungen^[53]. Verschiedene Basen zur Neutralisation^[51], mehrere Kupplungsreagentien^[53a] und unterschiedliche Reagentien zum Endcapping nicht gekuppelter N^{α} -Aminogruppen^[53b] konnten mit dieser Methode systematisch getestet werden. Aufgrund der Synthese von über hundert Peptiden konnte auf die aminosäure- und positionsabhängige Kupplungseffizienz geschlossen werden^[54].

Hinweise zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Fibronogen^[55], Magainin-2^[56] und Neuropeptid Y^[46, 57] sowie zur Aufklärung von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen^[58] konnten durch die Herstellung vieler Peptidanaloge nach der Tea-bag-Methode erhalten werden. Auch zur Konformations-Kartierung von Proteinen wurde die Tea-bag-Methode bereits eingesetzt^[59a, c]. Die Flexibilität dieser Methode und die relativ großen Produktmengen haben sich hierbei als vorteilhaft erwiesen (Abb. 4, S. 381). Versuche, die Konformation aus dem Verhalten der Peptide in der HPLC-Chromatographie vorherzusagen, wurden jüngst publiziert^[60]. So wurde beispielsweise die Änderung des Verhaltens amphiphiler Helices bezüglich des Austausches von Aminosäuren untersucht^[61]. Für solche Studien benötigt man – um statistisch signifikante Aussagen zu erhalten – eine

Vielzahl ähnlicher Peptide, die nur über multiple Synthesemethoden erhalten werden kann.

Ein weiterer Vorteil der Strategie nach Houghten sind die niedrigen Etablierungskosten; so sind Geräteinvestitionen unnötig. Ein großer Nachteil dagegen ist die Arbeitsintensität, da sämtliche Schritte (Waschen, Sortieren der Beutel etc.) manuell durchgeführt werden. Eine perfekte computerunterstützte Berechnung der Synthesecyclen, insbesondere für das Sortieren, ist unerlässlich. Auch die Kupplungskontrolle^[54b, c] ist in der Praxis für eine größere Anzahl von Peptiden undurchführbar. Eine Erleichterung bietet die in unserem Arbeitskreis ausgearbeitete Kombination der Teabag-Methode mit einem Halbautomaten zur Peptidsynthese (Labortec-Bachem, Bubendorf), der eine Automatisierung der Waschschriften ermöglicht^[52] (Abb. 3c).

3.2. Peptidsynthese ohne sichtbare Peptidmengen?

3.2.1. Peptidsynthese an Stäbchen

Peptidsynthese ohne wägbare Mengen an Peptid? – Dieses Konzept entwickelten Geysen et al.^[62], wobei einige hundert Peptide nach dieser Methode parallel synthetisiert werden können. Jedoch verbleiben die Peptide nicht nur während, sondern auch nach der Synthese am Träger und lediglich die Schutzgruppen werden abgespalten.

Als Träger werden aminofunktionalisierte Polyethylenstäbchen (Durchmesser 4 mm, Länge 40 mm) verwendet. Jeweils 96 dieser sogenannten Pins sind auf einem Block in

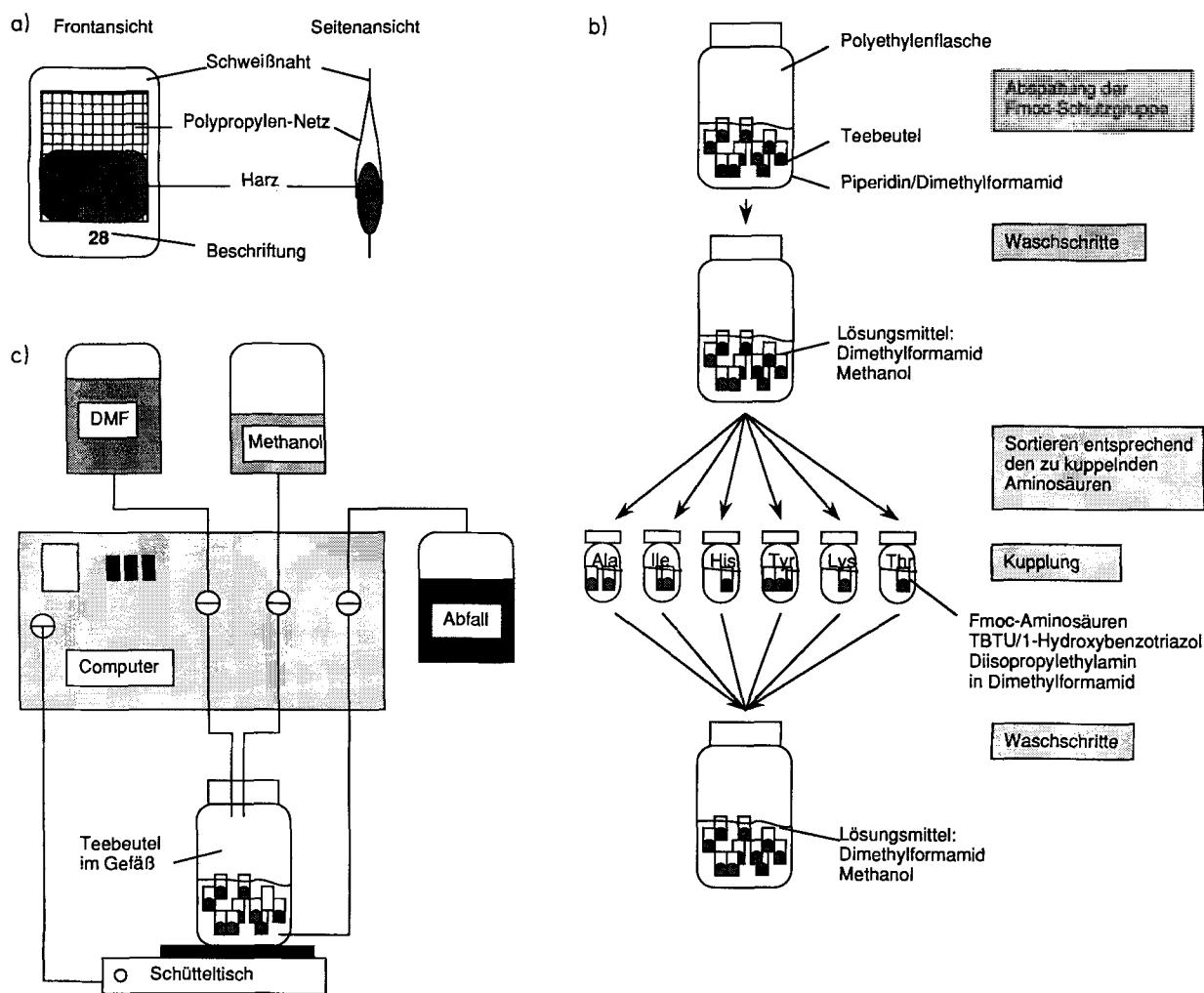


Abb. 3. Schematische Darstellung a) eines tea bags, b) der Abfolge der Syntheseschritte einer multiplen Peptidsynthese und c) der halbautomatischen Syntheseapparatur [52]. a) Polypropylennetz (64μ Porenweite) wird mit Tusche beschriftet und zu Taschen (3×4 cm) geschweißt [49]. Nach Einfüllen des polymeren Trägers und Schließen der letzten Schweißnaht wird der Beutel auf Dichtigkeit geprüft und in der Synthese eingesetzt. Pro Beutel wird ein Peptid erhalten. b) Das Abspalten der N^{α} -Schutzgruppe und die gesamten Waschschritte erfolgen für alle tea bags einer multiplen Synthese in einem gemeinsamen Reaktionsgefäß. Zur Kupplung werden die Beutel bezüglich der Aminosäuren sortiert und in getrennten Gefäßen mit aktivierter, N^{α} -geschützter Aminosäure behandelt. c) Das Waschen der Beutel erfolgt automatisch, wobei Zugabe und Absaugen der Lösungsmittel mit einer computergesteuerten Ventilanlage durchgeführt wird [52]. TBTU = O -(Benzotriazol-1-yl)- N,N,N',N' -tetramethyluronium-tetrafluorborat, DMF = Dimethylformamid, Fmoc = Fluorenylmethoxycarbonyl.

8 Reihen à 12 Stäbchen fixiert (Abb. 5). Die Pins sind so angeordnet, daß sie exakt in die Löcher der Platten, die für den Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) verwendet werden, passen. Wasch- und Deblockierungsschritte werden in großen Wannen vorgenommen. Die Mengen und die Verteilung der zu kuppelnden Fmoc-Aminosäuren werden von einem Computerprogramm berechnet. Eine wesentliche Erleichterung konnten wir mit computererzeugten Schablonen erreichen, die das Pipettieren in dimethylformamidstabile ELISA-Platten schnell und fehlerfrei ermöglichen. Nach der Aktivierung werden die Blöcke in die Platten gestellt, und die Kupplung kann erfolgen. Die Polyethylenstäbchen können nicht quellen oder schrumpfen, adsorbierte Moleküle sind aus diesem Grund schwierig zu entfernen. Deshalb ist das intensive Waschen nach jedem Reaktionsschritt in den Synthesecyclen von entscheidender Bedeutung. In einer neueren Variante der Pinmethode werden nicht die Stäbchen selbst, sondern abnehmbare Köpfchen funktionalisiert; somit sind die Blöcke wiederverwendbar.

Die Bedeutung der Pinmethode liegt im immunanalytischen Bereich^[63–65]. Antikörper gegen große Proteine kön-

nen mit überlappenden Tetra- bis Nonapeptidsequenzen im sogenannten Pepscan getestet werden^[65]. Mono- oder polyclonale Seren werden in ELISA-Platten verteilt und mit der Stäbchenplatte inkubiert. Entsprechend spezifische Antikörper in den Antiseren binden vorzugsweise nur an Peptidstäbchen mit der Sequenz eines kontinuierlichen B-Zell-Epitops. Die direkte Anwendung auf Humanseren erfordert etwas Erfahrung, um Unspezifitäten zu unterdrücken. Da sich die synthetischen Peptide – jeweils um nur eine Aminosäure versetzt – über das gesamte Protein erstrecken, ergeben sich sehr genaue B-Zell-Epitopanalysen. Im Falle monoklonaler Antikörper kann die kontinuierliche Bindungsregion bis auf die Aminosäure genau bestimmt werden (Abb. 6, S. 382).

Das VP1-Protein des Erregers der Maul- und Klauenseuche^[62], das FeLVgp70-Protein^[66], das Epstein-Barr-Virus-Kapselprotein^[64] und verschiedene Proteine von HIV-Subtypen^[47, 67] sind nur einige Beispiele von Proteinen, die bislang auf ihre Antikörperbindungsstellen untersucht wurden.

Ist die Primärsequenz des Proteins, gegen das ein monoklonaler Antikörper gerichtet ist, nicht bekannt oder handelt

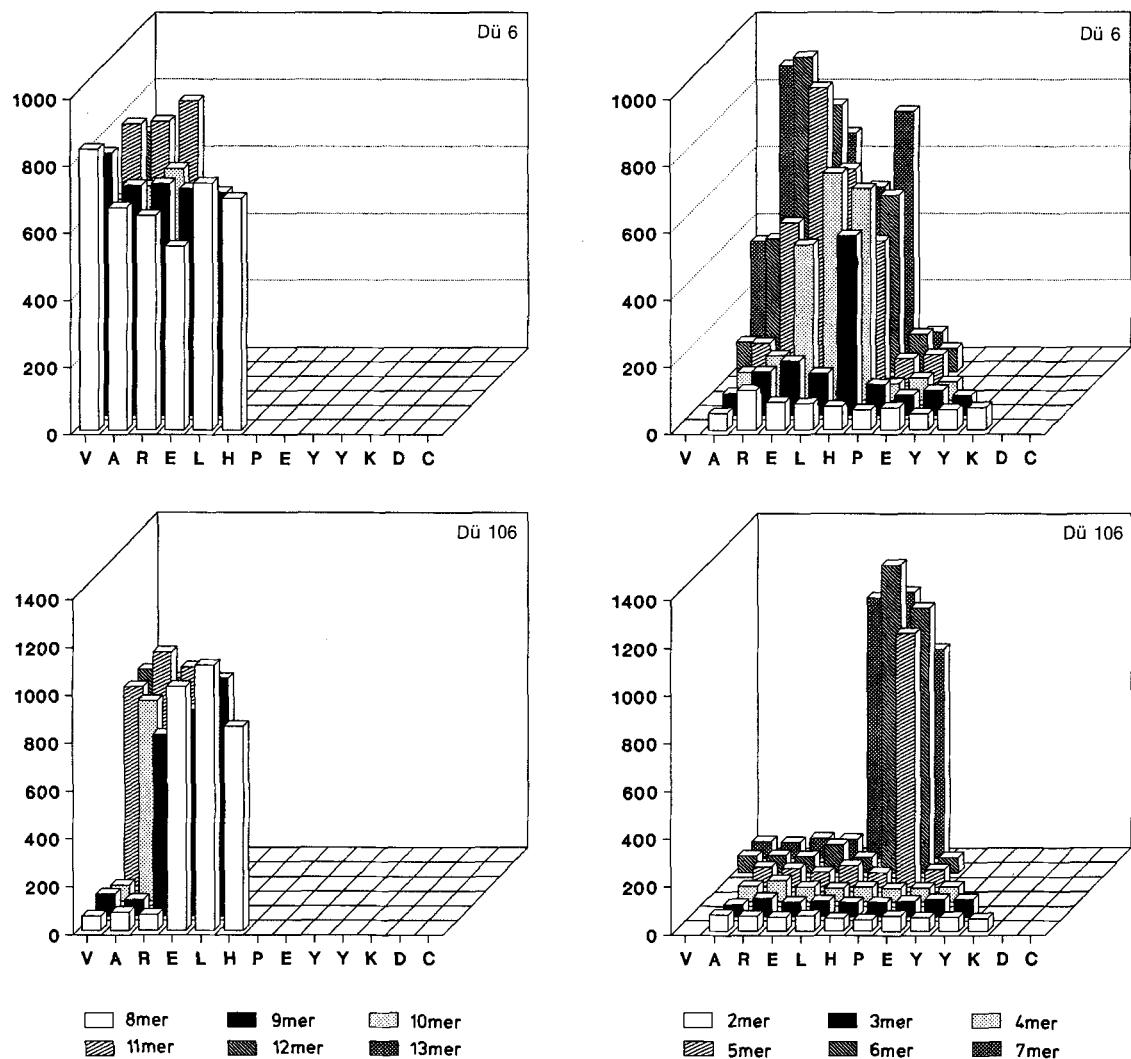


Abb. 6. Epitopfeinkartierung am Beispiel zweier monoklonaler Antikörper gegen das HIV-1-Nef-Protein (R. Spohn, Universität Tübingen, persönliche Mitteilung). Die hierfür verwendeten 2mer bis 13mer-Peptide (8–13mer links, 2–7mer rechts) wurden durch Pinsynthese (vgl. Abb. 5) hergestellt und im Pepscan-ELISA getestet. Auf der x-Achse ist die Sequenz des getesteten Proteinbereiches aufgetragen. (C-terminale Konsensussequenz des Nef-Proteins von verschiedenen HIV-1-Isolaten bezogen auf HIV-Bru 193–206). Jeder Balken repräsentiert ein Peptid, wobei eine Zuordnung zur N-terminalen Aminosäure erfolgt. Die y-Achse gibt die Absorption im ELISA in mOD (OD = optische Dichte = Absorption) bei 405 nm an; dies ist ein Maß für die Stärke der Bindung zum Antikörper. Oben: Zur Gewinnung des monoklonalen Antikörpers (DÜ 6) wurde eine Maus mit dem Lipopeptid-Immunogen (vgl. [27b]) Pam₃Cys-VARELHPEYYKDC ohne weitere Adjuvantien oder Carrier immunisiert. Der erhaltene monoklonale Antikörper erkennt das Nef-Protein, die minimale Sequenz ist das Tripeptid H-P-E. Unten: Der monoklonale Antikörper (DÜ 106) wurde durch Immunisierung mit dem Nef-Protein erhalten. Die minimale Sequenz ist das Pentapeptid P-E-Y-Y-K.

bieten die gut in der Selektivität ihrer Abspaltung untersuchten, besonders säurelabilen Ankergruppen^[69], wie beispielsweise 4-(2',4'-Dimethoxyphenylhydroxymethyl)-phenoxy- und 2-Methoxy-4-alkoxybenzyl-Anker.

Die rationelle Synthesemethode an der Stäbchenplatte ist also zur Herstellung von Peptiden für immunochemische Untersuchungen gut geeignet. Die Methode ist besonders effektiv zur Identifizierung von Epitopen, die von monoklonalen Antikörpern oder polyklonalen Seren erkannt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Anfangsbeladungen und der fehlenden Reinheitskontrollen muß von einer Quantifizierung abgeraten werden^[70]. Da pro Stäbchen maximal 300 nmol Peptid synthetisiert werden, ist die Peptidsynthese an Stäbchen für Struktur-Wirkungs-Untersuchungen von Hormonanaloga meist nicht geeignet.

3.2.2. Spot-Synthese

Eine kostengünstige Methode zur Herstellung von polymergebundenen Peptiden wurde kürzlich von R. Frank

et al.^[71] zum Screening von Seren vorgestellt. Auf Cellulosepapier (55 × 105 cm) wird die erste Aminosäure gekuppelt. Dazu werden die Kupplungsreagentien als 1 µL-Aliquote im Abstand von 1 cm auf das Papier pipettiert. Für die Waschschritte, den Acetylierungs- und den Deblockierungsschritt wird der gesamte Papierstreifen in entsprechende Lösungen getaut. Nach dem letzten Schritt, einem Ethanolbad, wird das Papier getrocknet. Die Kupplung der nächsten Aminosäure erfolgt – manuell oder aber mit einem Pipettierroboter – abermals durch Verteilen der Aliquote auf die entsprechenden Flecken. Zum Abspalten der Seitenschutzgruppen (20% Trifluoressigsäure, 1% Triisobutylsilan) werden die Peptide nicht vom Papier gelöst, so daß die Streifen direkt für immunologische Tests verwendet werden können. Die peptidtragenden Papierstreifen können somit ähnlich wie die geblotteten Membranen des Westernblots behandelt und getestet werden. R. Frank et al.^[54] zeigen dies am Beispiel der Epitopanalyse der immunogenen Region des Cytomegalievirus (hCMV) anhand von 49 parallel auf Papierstreifen synthetisierten Peptiden. Sollen freie Peptide erhalten werden,

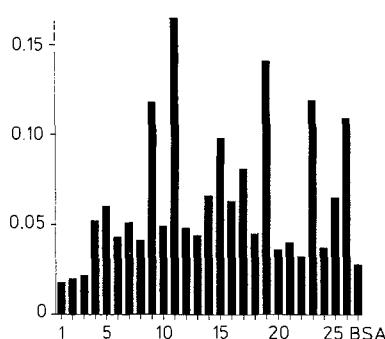
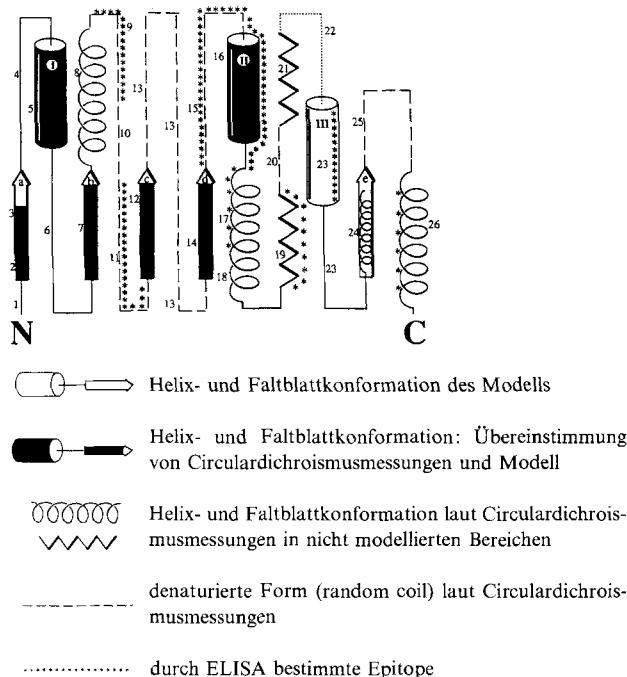
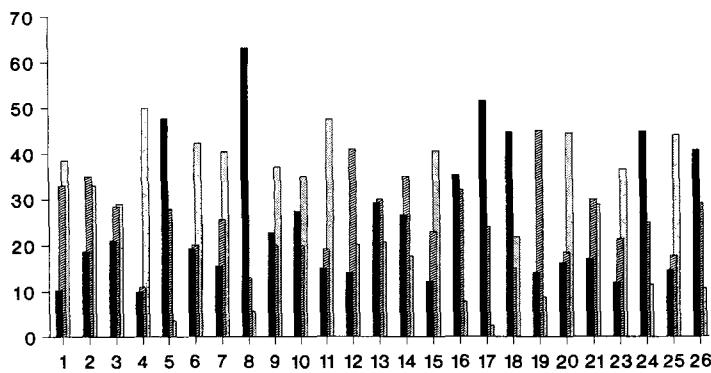


Abb. 4. Konformationskartierung (oben) und Epitopkartierung (unten) der aus 376 Aminosäuren bestehenden Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase [59 a]. Mit sequenziellen Peptiden (Länge 15–17 Aminosäuren) gelang eine Verfeinerung des durch Moleküldynamikssimulation ermittelten dreidimensionalen Modells [59 b] (Mitte). 26 Peptide wurden nach der Tea-bag-Methode hergestellt, analytisch charakterisiert und mit Circular dichroismus (CD) untersucht. Abb. 4 oben zeigt auf der y-Achse die aus den CD-Spektren berechneten prozentualen Anteile der verschiedenen Konformationen für jedes Peptid (schwarze Balken = α -Helix, gestreifte = β -Faltblatt, gepunktete = ungeordnete (coil) Konformation; x-Achse = Peptidnummern). In Abb. 4 unten ist die Erkennung der Peptide durch ein Anti-Thymidinkinase-Serum dargestellt. Im Modell an der Oberfläche liegende Bereiche (B-Zell-Epitope) werden besser erkannt als Peptide aus inneren Segmenten des Proteins. x-Achse: Peptidnummern, BSA = Rinderserumalbumin als Negativkontrolle; y-Achse: ELISA-Werte, relative Absorptionswerte.

es sich um ein diskontinuierliches Epitop, dann kann dieses Epitop auch durch Peptide imitiert werden, die in der Proteinsequenz gar nicht vorkommen. Solche antikörperbindenden Peptide werden als *Mimotope* bezeichnet^[65]. Durch Kombinationen von D- und L-Aminosäuren, immer kontrolliert durch den Antikörperbindungstest (Pepscan-ELISA), wird ein Mimotope entwickelt. Allerdings ist eine hohe Spezifität des monoklonalen Antikörpers notwendig, da mit dem Screening üblicherweise auf Dipeptidebene begonnen wird^[65]. Trägergebundene Mimotope können beispielsweise zur Isolierung von Antikörpern aus Antiseren durch Affinitätschromatographie oder zur Blockierung einer Antikörperbindungsstelle eingesetzt werden. Auch für das Screening nach neuen Leitstrukturen sind sie interessant.

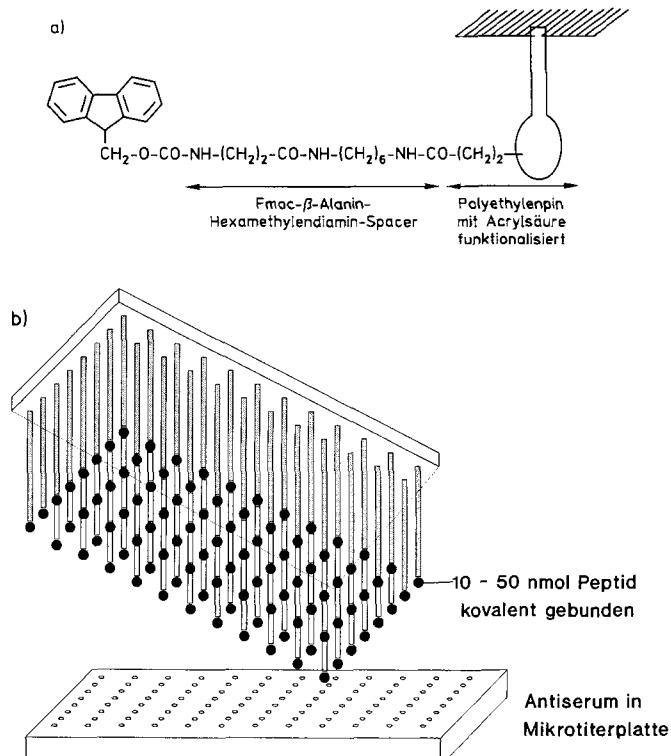


Abb. 5. Schematische Darstellung a) eines Pins und b) des Blocks für die Pin-synthese. Die Polyethylenstäbchen (4×40 mm) werden mit Acrylsäure funktionalisiert; als Spacer wird N^{θ} -Fmoc- β -alanyl-1,6-diaminohexan eingeführt. Die Peptidsynthese erfolgt in DMF-stabilen Polyethylen-Mikrotiterplatten. Mit einem Pepscan-ELISA werden die am Pin kovalent gebundenen Peptide in üblichen Mikrotiterplatten auf die Bindungsfähigkeit von Antikörpern untersucht (vgl. Abb. 2). Nach erfolgtem Test werden die Pins mit Detergents gewaschen und stehen für das Erproben neuer Seren zur Verfügung. Ein Block kann für bis zu 50 Tests eingesetzt werden.

Um mit der Pinmethode freie Peptide zu erhalten, muß entweder ein säurelabiles Ankermolekül vor der ersten Aminosäure auf die Polyethylenstäbchen gekuppelt werden oder es müssen spezielle enzymatische oder acidolytische Spaltstellen C-terminal eingeführt werden. R. van der Zee et al.^[68a, b] schlagen als C-terminale Spaltsequenz Asp-Pro-Gly oder Lys-Gly vor; erstere kann mit Ameisensäure, die zweite mit Trypsin gespalten werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Spaltung einer Lys-Pro-Polymer-Sequenz durch Diketopiperazinbildung im Neutralen, allerdings liegt danach nicht die freie Peptidsäure, sondern das C-terminale Diketopiperazinaddukt vor^[68c]. Eine bessere Alternative

wird vor die erste Aminosäure eine Spaltstelle geschaltet^[68c], die Spots werden ausgestanzt und die Peptide abgespalten.

3.3. Vollautomaten auf Erfolgskurs

Viele Arbeitsgänge müssen bei Tea-bag- und Pinsynthesen manuell durchgeführt werden; dies verhinderte bislang den Einzug der multiplen Methoden in viele Laboratorien. Da sich jedoch bei den multiplen Peptidsynthesen (Tabellen 1 und 2), wie bei Festphasensynthesen^[32–36] im allgemeinen, die Deblockierungs-, Wasch- und Kupplungsschritte bei jedem Synthesecyclus wiederholen, sollte auch die SMPS automatisierbar sein. Zwei Methoden wurden inzwischen unabhängig voneinander erfolgreich realisiert. In beiden Fällen wurde ein handelsüblicher Pipettierroboter modifiziert und für die Anforderungen der multiplen Peptidsynthese programmiert (Abb. 7).

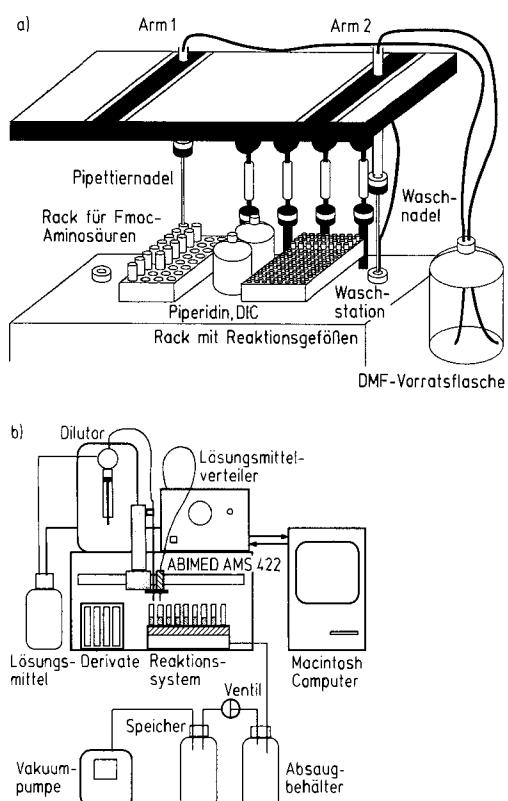


Abb. 7. Schematische Darstellung der vollautomatischen, multiplen Peptidsyntheseapparaturen auf der Basis von PC-gesteuerten Pipettierrobotern: a) nach Schnorrenberg [72]: Der Roboter mit zwei in x-, y- und z-Richtung beweglichen Armen pipettiert Reagenzien und Derivate gemäß der gewünschten Sequenz. Als Systemflüssigkeit dient DMF. Das Absaugen erfolgt mit der zweiten Nadel (Waschnadel), die mit einem Platinnetz versehen ist. b) Nach Gausepohl [75]: Die Zugabe von Reagenzien erfolgt ebenfalls mit einer Pipettieradel. Die Synthese findet in Fritten statt, so daß das Lösungsmittel durch Anlegen von Vakuum abgesaugt werden kann. (Für das Überlassen dieser Abbildung sei Dr. H. Gausepohl, ABIMED, herzlich gedankt.)

G. Schnorrenberg et al.^[72] verwendet einen modifizierten Tecan RSP 5032 (Zinsser SMPS 532), ein Gerät mit zwei in x-, y- und z-Richtung frei beweglichen Nadeln an zwei Armen. Nadel 1 wird für die Zugabe der Reagenzien, der aktivierte Aminosäuren und der Lösungsmittel verwendet. Nadel 2 ist mit einem Edelstahlsieb versehen und saugt die Lösungsmittel ab. Als Reaktionsgefäß dienen je nach Pro-

grammierung beliebige Glasgefäße oder 1.5 mL-Kunststoffgefäße (Eppendorf-Tubes). Als polymerer Träger wird, wie bei der Tea-bag-Methode, quellbares, 1% quervernetztes Polystyrol-Divinylbenzol verwendet, und die in Dimethylformamid/1-Hydroxybenzotriazol vorgelösten Fmoc-Aminosäuren werden mit *N,N*'-Diiopropylcarbodiimid aktiviert. Der Synthesecyclus und die sequenzabhängige Aminosäurenverteilung werden über einen Personalcomputer (PC) gesteuert (Abb. 7 a).

Viele erfolgreiche Anwendungen, wie Untersuchungen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Endothelin^[73a] und zu T-Zell-Epitopen des Influenza-Nucleoproteins^[73b, c], sowie der mögliche Einsatz unterschiedlicher Aktivierungsmethoden von Aminosäuren^[74] belegen die Eignung dieses Roboters zur multiplen Peptidsynthese. Durch die Verwendung einer Gefäßhalterung zum simultanen Absaugen verringert sich in einer neueren Gerätversion des SMPS 532 der Lösungsmittelverbrauch und die Zeit zur Synthese von 48 Dekapeptiden von drei Tagen auf nur einen Tag.

Der von Gausepohl et al.^[75] entwickelte, multiple Synthesizer (Abimed AMS 422) beruht auf einem Laborroboter Gilson M 222. Das durch einen PC gesteuerte Einarmgerät wird zusätzlich zur Reagensverteilungsnadel mit sechs weiteren Nadeln ausgerüstet, die Reagenzien und Lösungsmittel in die 6 × 8 Reaktionsgefäß parallel verteilen. Der Boden der Reaktionsgefäß ist eine Fritte, so daß der Absaugvorgang ventilsteuert über eine automatisch zugeschaltete Vakuumpumpe für alle Reaktionsgefäß gleichzeitig ausgeführt werden kann (Abb. 7 b). Dadurch können die Cycluszeiten entscheidend verringert werden. Der Einsatz von bis zu 50 mg polymerem Träger pro Reaktionsgefäß sowie die Verteilung von Fmoc-Aminosäuren und Aktivierungsmitteln für die Synthese von Peptid-Polypropyleneins wurde beschrieben^[75b]. Zur Aktivierung wurde zuerst Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat (BOP)/N-Methylmorpholin eingesetzt; neuerdings wird das weniger-toxische Benzotriazol-1-yl-oxy-tripyrroolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP) verwendet^[76].

Die automatische multiple Peptidsynthese mit Laborrobotern ist bis heute nur mit der Fmoc-Strategie möglich. Offene Gefäße machen den Einsatz von Trifluoressigsäure unmöglich, die jedoch bei der Boc-Strategie bei jedem Cyclus notwendig ist. Die parallele, vollautomatische Synthese von acht Peptiden in Mengen von 5–400 µmol wurde kürzlich von K. Nokihara et al. vorgestellt^[77]. Auf acht Schienen werden Reaktionsgefäß, Vorratsgefäß und Aminosäuredervative bereitgestellt. Jede Schiene dient zur Synthese eines Peptides und enthält den kompletten Satz an Reagenzien für eine Synthese. Acht Nadeln auf einem in x-Richtung beweglichen Arm pipettieren Lösungsmittel und Reagenzien. Die Software ist bezüglich der Aktivierungsmethoden und der Ansatzgrößen sehr variabel. Eine gleichzeitige Synthese ist jedoch – bedingt durch das Basisgerät – auf acht Peptide limitiert, und eine Erweiterung ist nicht möglich.

A. Holm und M. Meldal^[78a] reduzierten den Arbeitsaufwand der manuellen, parallelen Synthese durch das Verwenden eines Halbautomaten. In bis zu 96 Gefäße werden Lösungen und Lösungsmittel gleichzeitig über bis zu 96 Anschlüsse gegeben; das Absaugen erfolgt durch Unterdruck. Als polymerer Träger wird Macrosorb-SPR (7 µM) verwendet, die Reagentienzugabe erfolgt manuell durch Zupipettie-

ren, zur Aktivierung werden Fmoc-Aminosäuren-Dhbt-Ester (Dhbt = 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin) eingesetzt und der bei der Umsetzung entstehende Farbstoff kann spektroskopisch verfolgt werden. Diese Methode wurde zur Synthese von 20 Tetrapeptid-Enzymsubstraten bei jeweils 100 mg Harz pro Gefäß eingesetzt^[78].

H. Wolfe stellte 1987 einen Halbautomaten R^aMPS (DuPont) zur parallelen Synthese von 25 Peptiden an je 50 mg Polystyrol vor^[79]. Die Reagentien werden ebenfalls manuell durch Pipettieren zugegeben; abgesaugt werden alle Gefäße parallel über eine Vakuumapparatur. Dies war das erste Gerät, bei dem zumindest eine Halbautomatisierung der multiplen Peptidsynthese realisiert wurde, jedoch ist es gegenüber den heutigen Weiterentwicklungen sowohl bezüglich der Menge als auch bezüglich der Automation und der Anzahl der Peptide nicht mehr konkurrenzfähig. Es mag allerdings für Laboratorien, die maximal 25 Peptide gleichzeitig benötigen, eine sehr kostengünstige Alternative sein. Eine multiple Variante der Durchflusssynthese bei niedrigem Druck^[80] stellte Krchňák et al.^[81] vor. Er verwendet dabei bis zu zehn Reaktoren, die jeweils 40–500 mg quellbares Polystyrol-1%-Divinylbenzol enthalten. Die Waschlösungen aus den Reservoirs werden gleichzeitig über Ventile in die entsprechenden Kupplungsgefäße eingeleitet. Das gesamte System steht unter Stickstoffüberdruck. Die als 1-Hydroxybenzotriazolester in situ aktivierte Aminosäuren werden manuell jeweils den entsprechenden Reaktoren zugegeben. Sowohl die Anwendung der Fmoc- als auch der Boc-Strategie der Peptidsynthese sind beschrieben^[81].

3.4. Cellulose als Träger bei multiplen Synthesen

Funktionalisiertes Papier eignet sich ebenfalls als Träger für die multiple Peptidsynthese. J. Eichler et al.^[82] verwenden Papierstreifen (Whatman 540), die mit 1–2 µmol pro cm² an N-terminal geschützten Aminosäuren beladen wurden, wobei die Boc/Bzl- und auch die Fmoc/tBu-Strategie anwendbar sind. Die synthetisierten Peptide können entweder vom Papier abgespalten werden oder nach Entfernen der Seitenketten-Schutzgruppen zu Antikörperbindungstests mit ELISA am Papier (dot blot) verbleiben. Kupplungscyclen, Anwendungen und Vorteile entsprechen denen der Teabag-Synthese (vgl. Abschnitt 3.1). Weitere Vorteile liegen in der einfacheren Handhabung – Schneiden statt Schweißen und Füllen (wie bei den tea bags) – sowie in den niedrigeren Kosten durch die Verwendung billigerer Materialien und dem geringen Verbrauch an Lösungsmittel zum Waschen. Vorerst sind noch wenig Erfahrungen mit dem Trägermaterial Cellulose in der Peptidsynthese und -analytik gesammelt worden, aber die geringe mechanische Stabilität und Polyfunktionalität des Trägers müssen in Kauf genommen werden.

R. Frank et al.^[83, 84] beschreiben die multiple Synthese an nummerierten Cellulose-Papierblättchen (vg. Abschnitt 3.2.2), wobei an jedem Blättchen halbautomatisch im Durchflusssynthesizer ein Peptid synthetisiert wird. Diese Methode eignet sich insbesondere für systematische Sequenzvariationen, da vor jeder Kupplung die Papierblättchen in Säulen (Durchmesser 1.55 cm, Whatman 3 MM) gestapelt werden müssen. Pro Säule kann nur eine Aminosäure gekuppelt werden. Ein Computerprogramm liefert die richtige Zusammen-

stellung für eine minimale Cyclenanzahl. Die Peptide stehen entweder am Cellulose-Träger für immunologische Tests oder nach Abspaltung als freie Peptide, z.B. für Tests zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen, zur Verfügung^[85]. Allylische Ankergruppen^[86] wurden zur parallelen Herstellung von geschützten Segmenten des Parathyroidhormons eingesetzt^[87]. Eine Ausbeute von nur 8–10 mg Rohpeptid schränkt die Anwendungsmöglichkeiten der Papierblättchen als Trägermaterial etwas ein; bedingt durch die gerätespezifische Säule kann die Größe der Filterblättchen nicht beliebig variiert werden. Wie bei den bereits beschriebenen automatischen Methoden ist die Flexibilität bezüglich Synthesestrategie und Kupplungsreagentien limitiert, die Chemikalien- und Zeitersparnis ist jedoch sehr groß.

Mechanisch wesentlich stärker belastbar als Papier ist Baumwolle, die reinste Form der Cellulose. Lebl et al. nutzten dieses Trägermaterial schon lange zur Festphasensynthese^[88] und auch zur kontinuierlichen Peptidsynthese (CPPS)^[88]. Baumwollstücke (Ø 3 cm) wurden zur multiplen Synthese von überlappenden Fragmenten des Corticotropin Releasing Factor (CRF) verwendet, wobei Dekapeptide in Ausbeuten von 4–6 mg erhalten werden konnten^[89]. Interessant an dieser Methode sind die Waschschrifte; das Lösungsmittel wird durch Zentrifugieren entfernt, vergleichbar mit dem Schleudern von Wäschestücken. Die effiziente Methode des Zentrifugierens von Peptidharzen wurde bereits von Birr bei seinem automatischen Zentrifugalreaktor zur Peptidsynthese eingesetzt^[36].

3.5. Polystyrol-Polyethylen-Filme – ein neuer Weg?

Mit dem Ppropfcopolymer Polystyrol-Polyethylen (PS-PE) wurde eine weitere Variante der multiplen Peptidsynthese möglich^[90]. Dazu wird auf einem Polyethylenfilm Styrol durch γ-Bestrahlung polymerisiert. Kleine Filmstückchen (1.5 × 3 cm) können, wie die tea bags, gemeinsam gewaschen und deblockiert werden, die Kupplungen erfolgen gleichzeitig in getrennten Gefäßen. Aufgrund der kovalenten Bindung des Polystyrols an Polyethylen ergibt sich kein Harzverlust, und die Herstellung der Polypropylenbeutel durch Schweißen entfällt ebenfalls.

Die Peptidausbeuten pro Gramm PS-PE-Film sollen denen der Tea-bag-Synthese entsprechen, so daß alle unter Abschnitt 3.1 beschriebenen Anwendungen prinzipiell durchführbar sind. Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Melittin-Analoga^[91] und des parathyroiden Hormons (PTH)^[92] wurden bereits mit Syntheseprodukten dieser Methode untersucht.

4. Multiple Abspaltung

Bei den bereits zahlreichen Konzepten der multiplen Peptidsynthese muß sofort die Frage nach der multiplen Abspaltung der Peptide vom polymeren Träger gestellt werden. Dieses Problem stellt sich bei den Pins (Pepscan) als Träger nicht, da die Peptide für die meisten Anwendungen an die Stäbchen gebunden bleiben, und lediglich die Seitenschutzgruppen entfernt werden. Dies wird bei der verwendeten Fmoc-Strategie mit Trifluoressigsäure durchgeführt. Die einzige, kommerziell erhältliche „multiple Abspaltungsap-

paratur“ wurde für die Tea-bag-Methode und die Boc-Strategie entwickelt. Damit können 24 Peptidharze gleichzeitig in Teflongefäßen mit Fluorwasserstoff behandelt werden^[93]. Bei allen anderen publizierten Methoden wird das wichtige Problem der multiplen Abspaltung nicht diskutiert.

Ein wesentlicher Vorteil der Fmoc-Strategie gegenüber der Boc-Strategie ist die Verwendung von Trifluoressigsäure anstelle von Fluorwasserstoff, denn so können übliche Glas- und Kunststoffgeräte für das gleichzeitige Abspalten der vielen Peptide eingesetzt werden. Nach einer optimierten multiplen Methode wird in unserem Arbeitskreis die Peptid-Harz-Aufschämmung in der Lösung mit dem Abspaltreagens einfach in unten mit Glaswolle gestopfte Pasteurpipetten überführt und die Peptidlösung, in Trifluoressigsäure mit Kationenfängerzusatz (Scavenger), durch Drücken des Pipettenhüttchens vom Harz abfiltriert. Anschließend wird das Peptid wie üblich mit Ether ausgefällt. Von überdurchschnittlicher Kapazität sollten – bedingt durch die große Anzahl von Peptiden – Zentrifuge und Gefriertrockner sein.

5. Multiple Analytik – eine Herausforderung

Seit Merrifield die Peptidsynthese an polymeren Trägern entwickelte, stellt sich die Frage, wie rein die Syntheseprodukte sind. Die Merrifield-Synthese konnte ihren eigentlichen Siegeszug erst durch die Entwicklung der HPLC und den damit verbundenen Reinigungsmöglichkeiten antreten

(vgl. dazu^[28a]). Neben der größtmöglichen Trennleistung von chromatographischen Methoden erfordert die multiple Peptidanalytik die Bearbeitung einer Vielzahl von Analyseproben in kurzer Zeit.

Reversed-phase-HPLC (Umkehrphasen-HPLC, RP-HPLC) mit automatischem HPLC-Probengeber und On-line-UV-Spektrometer^[40, 94] sind notwendige Voraussetzungen, ebenso wie die vollautomatische Peptidhydrolyse mit On-line-Aminosäurenanalytik^[40, 43, 95]. Die ebenfalls mit einem Probenwechsler erhältliche Kapillarzonenelektrophorese (CZE)^[96, 97] ist eine neuere Möglichkeit zur raschen hochauflösenden analytischen Untersuchung einer Vielzahl synthetischer Peptide^[98]. Eine der besten Methoden zur On-line-Peptidanalytik ist die derzeit zur Routineanwendung kommende Kombination von Flüssigkeitschromatographie (LC) oder von CZE und Massenspektrometrie^[40, 42, 99]. Hohe Empfindlichkeit, sanfte Ionisierung und Detektion hoher Molekülmassen werden bei Elektro- und Ionspray-Ionisierung erhalten, so daß diese Methoden sich zur Analytik von Peptidlösungen besonders gut eignen (Abb. 8)^[98, 100, 101]. Für die HPLC-Komponente ist eine Microbore-HPLC-Einheit aufgrund ihrer geringen Flußrate zu bevorzugen, da bei mehr als 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ das anfallende Solvens vom Vakuumsystem nicht mehr entfernt werden kann. Aber auch mit einer normalen HPLC und einem T-Splitter kann gearbeitet werden, wobei gleichzeitig UV- und Massenspektren aller Peaks aufgenommen werden. Bei Verwendung eines automatischen Probenaufgebers und ohne

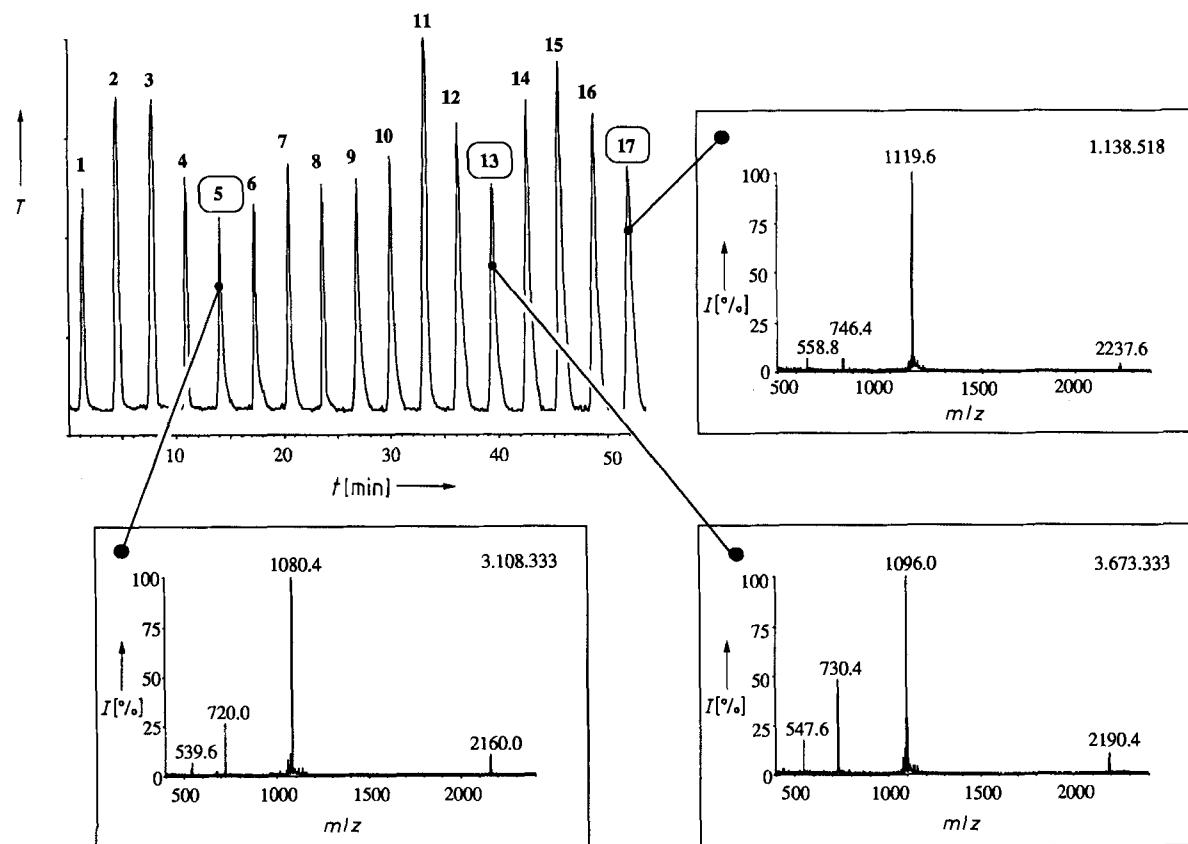


Abb. 8. Analyse von 17 Peptidproben mit Ionspray-Massenspektrometrie innerhalb von 55 min[100]. Die gelösten Peptide (50 pmol) werden mit einem Autosampler alle 1–3 min injiziert. Im Spektrometer wird der Totalionenstrom T aufgenommen, und nach Ende des Laufs können die einzelnen Massenpeaks getrennt analysiert werden. Bei dieser Ionisierungsmethode, die sich besonders für Peptide und Proteine eignet, entstehen mehrere, mehrfach geladene Molekülionen. Folgende Massen wurden hier detektiert. Peptid 5: 2159 am $(M + H)^{\oplus}$ 2160, $(M + 2H)^{2\oplus}$ 1080.4, $(M + 3H)^{3\oplus}$ 720.0, $(M + 4H)^{4\oplus}$ 539.6. Peptid 13: 2189.4 am $(M + H)^{\oplus}$ 2190.4, $(M + 2H)^{2\oplus}$ 1096.0, $(M + 3H)^{3\oplus}$ 730.4, $(M + 4H)^{4\oplus}$ 547.6. Peptid 17: 2236.6 am $(M + H)^{\oplus}$ 2237.6, $(M + 2H)^{2\oplus}$ 1119.6, $(M + 3H)^{3\oplus}$ 746.4, $(M + 4H)^{4\oplus}$ 558.8.

On-line-HPLC-Betrieb lassen sich 60 Peptidlösungen pro Stunde massenspektrometrisch analysieren.

6. Peptidbibliotheken – oder wie man Tausende von Peptiden synthetisiert

In Peptidbibliotheken können Tausende von Einzelpeptiden gespeichert sein, die als Mischungen oder einzeln lokalisiert hergestellt werden. Die Übersicht in Tabelle 3 faßt die bisher publizierten Arbeiten zu diesem stark beachteten Thema zusammen. Die Pharmaindustrie hofft über Peptidbibliotheken rasch zu vielen neuen Leitstrukturen zu kommen.

Ebenfalls durch Kuppeln von Aminosäurenmischungen synthetisierten Gras-Masse et al.^[104] 7.5×10^5 Analoga einer HIV-gp120-Sequenz. Jedes Peptid besteht aus 22 Aminosäuren, die ausgetauschten Positionen spiegeln die variablen Aminosäuren der verschiedenen HIV-Isolate wider, die konservierten Positionen bleiben erhalten. Diese sogenannten Mixotope^[104] sind somit keine zufälligen Sequenzen, sondern Analoga des Basispeptids. In der Entwicklung von synthetischen Vaccinen kann solch ein Ansatz von Vorteil sein. Ein multipler Austausch bei konstanten, sogenannten natürlichen Ankerpositionen wurde auch zur Identifizierung von Okta- und Nonapeptidmotiven der an MHC-I-Molekül gebundenen Peptide herangezogen, die von cytotoxischen T-Lymphozyten erkannt werden^[27a, 44].

Tabelle 3. Übersicht über die Methoden zum Erstellen von Peptidbibliotheken mit einer Anzahl von über 1000 Peptiden.

Methode	lichtgesteuerte Synthese	Expression in Phage	Separationsmethode	Bibliothek freier Peptide	Mixotope
Polymer	aminierte Glasplättchen	pIII-Protein des Fusionsphagen	Polymerkörner	PS-DVB	PS-DVB
Prozedur [a]	photolabile <i>N</i> ^α -Schutzgruppe (Nvoc), Entfernung durch einen Prozeß der Photolithographie HOBr/DIC-Kupplung	Random modifizierte Phagen ((NNK) _n -Inserion in pIII-Protein) Expression von Hexapeptiden	SPS mit Fmoc- oder Boc-Strategie, beliebige Aktivierung, Separation der Körner vor der Kupplung, Deprotektion und Waschschritte erfolgen gemeinsam	Tea-bag-SPS, Fmoc- oder Boc-Strategie, beliebige Aktivierung, Kupplung von Aminosäurenmischungen an bestimmten Positionen	SPS, Fmoc- oder Boc-Strategie, beliebige Aktivierung, Kupplung von Aminosäurenmischungen an bestimmten Positionen
Screening	Fluoreszenz gelabelte Antikörper werden im Fluoreszenzmikroskop detektiert	Selektion und Subklonierung von Phagen, Erkennung durch Antikörper	Enzymmarkierte Antikörper katalysieren Farbreaktion und färben Polymerkörner nach Bindung an	Kombination von Biotest und nächstem Synthesecyclus	nicht notwendig
Identifikation	Synthese an lokalisierten Spots, gezielt ansteuerbar	DNA-Sequenzierung des Phagengenoms	Peptidsequenzierung von positiv identifizierten Peptid-Polymerkörnern	definierte Peptidsequenzen im letzten Bioassay	definierte Synthesemischung
Applikation	Screening von Antikörpern oder löslichen Rezeptoren	Screening von Antikörpern oder löslichen Rezeptoren	Screening von Antikörpern oder löslichen Rezeptoren	Screening von Antikörpern oder löslichen Rezeptoren	Impfung, Immunisierung
Literatur	[110]	[109a, 108]	[106, 107]	[105]	[104]

[a] SPS = Solid-Phase Peptide Synthesis.

Die ersten Veröffentlichungen zur parallelen, unseparierten Peptidsynthese wurden 1990 beschrieben^[102]. Inspiriert von der „mixed“-Synthese bei Oligonucleotiden^[103] wurden an bestimmten Positionen – statt einzelner Derivate-Mischungen verschiedener Aminosäuren aktiviert und eingesetzt. Die daraus resultierenden Analoga wurden mit präparativer HPLC aufgetrennt, analysiert und charakterisiert; so wurde die parallele Synthese von sechs Analoga beschrieben^[102]. Werden kleine Mengen (< 0.1–1 mg) von Analoga eines Peptides gewünscht, so scheint diese Methode vielversprechend. Die HPLC-Isolierung der Komponenten entspricht gleichzeitig ihrer Reinigung. Probleme treten bei sehr ähnlichen Derivaten und vielen Nebenprodukten, die durch einfache RP-HPLC nicht mehr getrennt werden können, auf. Dies ist häufig nicht vorherzusehen, insbesondere wenn mehrere Positionen gleichzeitig und mehrfach ausgetauscht werden und wenn das Laufverhalten im chromatographischen Prozeß bei größeren Peptiden auch von der Sekundärstruktur beeinflußt wird. Zudem führt die strukturbedingte ungleichmäßige Kupplung der Aminosäuren zu ungleicher Produktverteilung.

Auf demselben Prinzip beruht die von Houghten et al. vorgeschlagene Methode zum Aufbau einer Peptidbibliothek^[105] und zur Identifizierung einer bestimmten, im biologischen Test aktiven Sequenz. Für ein Oligopeptid einer bestimmten Länge werden „feste Aminosäuren“, „definierte Positionen“ und „Mixpositionen“ unterschieden. Feste Aminosäuren charakterisieren bereits bekannte essentielle Sequenzpositionen und bleiben deshalb in allen Peptiden erhalten. Die Anzahl der definierten Positionen bestimmt die Zahl der Peptidmischungen, die bei Houghten mit der Tea-bag-Methode^[49–51] hergestellt werden. Bei einer definierten Position werden 20 sogenannte Bibliotheksteilbestände (Sublibraries) benötigt, die an dieser Stelle definiert eine der 20 Aminosäuren enthalten. Zwei definierte Positionen führen zu 400, drei zu 8000 Peptidmischungen. Werden nicht nur proteinogene Aminosäuren eingesetzt, so steigt die Anzahl der resultierenden Peptide rapide an. Die verbleibenden Positionen (Mixpositionen) werden als Mischung aller Derivate gekuppelt. Jeder Bibliotheksteilbestand enthält somit bei 20 Aminosäuren und *n*-Mixpositionen eine Mischung aus 20^n Peptiden. Zur Identifizierung eines biologisch akti-

ven Peptids erfolgt weder eine Analyse noch eine Auftrennung der Mischungen, ausschließlich der biologische Test entscheidet, in welchem Bibliotheksteilbestand, d.h. in welchem tea bag, das aktive Peptid ist. Die so ermittelte definierte Position zählt nun zu den festen Aminosäuren beim nächsten Synthesecyclus, und ist ein neues Peptidbuch der Oligopeptidbibliothek. Pro unbekannter Aminosäurenposition ist somit eine multiple Peptidsynthese notwendig (Tabelle 4).

Nur die Seitenschutzgruppen werden abgespalten. Eine Separierung entfällt, lediglich die biologische Aktivität der Analoga ist entscheidend. Wird das Polymer in Form von Körnern eingesetzt, so befindet sich auf jedem Korn nur ein definiertes Peptid sowie dessen synthesebedingte Fehlsequenzen. Wird das Peptid dieses einzelnen Polymerkorns von einem Antikörper erkannt, kann durch einen zweiten Antikörper, der ein Fluorophor oder ein Enzym trägt, der Polymer-Peptid-Antikörper-Komplex angefärbt werden.

Tabelle 4. Anzahl und Gehalt der einzelnen Peptide in einer Peptidmischung beim Erstellen von Peptidbibliotheken in Abhängigkeit von der Anzahl der variablen Positionen.

Anzahl der variablen Positionen	sechs	fünf	vier	drei	zwei	eine	keine [a]
<i>Bei 20 Aminosäuren:</i>							
Anzahl der Peptide in der Mischung	64000000	3200000	160000	8000	400	20	1
1 mg enthalten pro Peptid:	16 pg	300 pg	6 ng	125 ng	2.5 µg	50 µg	1 mg
bei Masse von 660 amu (Hexapeptid)	25 fmol	0.5 pmol	9.4 pmol	190 pmol	4 nmol	75 nmol	1.5 µmol
Molarität pro Peptid bei 1 mg mL ⁻¹	2.5 × 10 ⁻¹¹	5 × 10 ⁻¹⁰	9 × 10 ⁻⁹	9 × 10 ⁻⁷	4 × 10 ⁻⁶	8 × 10 ⁻⁵	1.5 × 10 ⁻³
<i>Bei 40 Aminosäuren (inklusive D-Aminosäuren): Anzahl der Peptide in der Mischung</i>							
1 mg enthalten pro Peptid:	0.25 pg	10 pg	390 pg	16 ng	625 ng	25 µg	
bei Masse von 660 amu (Hexapeptid)	0.4 fmol	15 fmol	590 fmol	23 pmol	1 nmol	40 nmol	
Molarität pro Peptid bei 1 mg mL ⁻¹	4 × 10 ⁻¹³	1.5 × 10 ⁻¹¹	5.9 × 10 ⁻¹⁰	2.3 × 10 ⁻⁸	10 ⁻⁶	4 × 10 ⁻⁵	

[a] Normale Synthese.

Limitierend für die Anzahl der Mixpositionen ist die Empfindlichkeit des biologischen Testsystems, die unter anderem durch die Bindungskonstante definiert ist. Beispielsweise bei fünf Mixpositionen enthält 1 mg Peptidmischung lediglich 300 pg jedes Einzelpeptids. Bei Hexapeptidmischungen in Lösungen von 1 mg pro mL entspricht dies einer Konzentration von 5×10^{-10} mol L⁻¹ (Tabelle 4); somit ist ein Test nur bei höchst affinen Rezeptorsystemen sinnvoll.

Gut sortierte Peptidbibliotheken ermöglichen das Finden von aktiven Analoga, von Liganden an Rezeptoren oder Antikörpern und das Austesten von Kreuzreaktivitäten. Nicht polymergebundene Peptidmischungen können auch für Untersuchungen an membranständigen Proteinen eingesetzt werden. Sollen allerdings Proteinsegmente untersucht werden, so ist der Arbeitsaufwand immens. Die Probleme der unterschiedlichen prozentualen Anteile der Analoga, bedingt durch ungleichmäßige Kupplung, sind auch hier vorhanden.

Um diese Probleme zu umgehen, separierten zuerst Furka et al.^[106] und danach Lam et al.^[107] die polymeren Träger zu den Kupplungen jedes der 20 Aminosäurenderivate. Gleichmäßigeres Kuppeln kann so erreicht werden, da die Konkurrenz zwischen schnell und langsam ablaufenden Kupplungen entfällt. Danach wird das Polymer wieder gemischt, gewaschen und gemeinsam die N-terminale Schutzgruppe entfernt. Das Polymer wird auf jedes der Aminosäurengefäße für die nächste Kupplung rein statistisch verteilt. Furka et al.^[106] setzen diese Portionierung-Mischungs-Methode zuerst beispielhaft für Synthese, Abspaltung und anschließende chromatographische Trennung von neun Tetrapeptiden, die durch Sequenzierung identifiziert wurden, ein. Diese Methode eignet sich zur manuellen Herstellung von extrem vielen harzgebundenen Oligopeptiden innerhalb kürzester Zeit. Lam et al.^[107] legten ebenfalls eine Bibliothek von Oligopeptiden an, die am polymeren Träger gebunden bleiben.

Unter dem Mikroskop werden die als positiv identifizierten Peptid-Polymeren von Polymerkörnern mit nichtbindenden Peptiden (ohne Antikörper) separiert und die Sequenz des Peptids über Edman-Abbau identifiziert. Die Methode zeichnet sich durch große Effizienz und Praktikabilität aus, da sie in jedem Peptidlabor ohne aufwendige Apparatur und mit Standardmethoden durchgeführt werden kann.

Über folgende Beschränkungen muß man sich bei der Portionierung-Mischungs-Methode allerdings bezüglich der Ansatzgrößen im Klaren sein. Eine übliche Beladung von 0.5 mmol pro g bedeutet etwa 200 pmol Peptid pro Polymerkorn. Die Zahl der Polymerkörner sollte gegenüber der Zahl der Peptide etwa zehn mal größer sein, da die Beladung pro Korn schwankt, und man praktisch doch mehr als ein Korn zur Detektion und Analyse braucht. Unter der Annahme, daß jeweils zehn mit einem definierten Peptid beladene Körner mit 200 mesh Größe und nur die 20 proteinogenen Aminosäuren in jeder Position eingesetzt werden, resultiert ein Bedarf an 10 g Peptidharz bei Pentapeptidbibliotheken, 150 g bei Hexa-, 3 kg bei Hepta- und bereits über 50–100 kg bei Oktapeptidbibliotheken. Werden gleichzeitig auch D-Aminosäuren für mehrere Positionen miteinbezogen, dann würde für große Bibliotheken tonnenweise Harz benötigt. Ein Ausweg aus solchen absurdem Verhältnissen ist auch hier das Erstellen von Bibliotheksteilbeständen mit festen oder definierten Positionen sowie die Verwendung sehr kleiner Harzkörner. Diese Möglichkeiten sind durch die Empfindlichkeit und Kapazität der biologischen Tests und der instrumentellen Analytik eingeschränkt.

In molekularbiologischen Laboratorien wurde von Scott und Smith^[108] sowie Devlin et al.^[109] eine völlig andere Art von Epitopbibliothek entwickelt. Fusionsphagen in *E. coli* werden durch -(KKN)₁₅- transformiert, wobei K einer Mischung aller vier Desoxynucleotide entspricht, N einer Mischung von Guanidin und Thymidin. Jedes Triplett KKN

kann für alle 20 Aminosäuren codieren, jedoch nur für ein Stoppcodon. Der Einbau erfolgt in dem vom Phagen codierten Gen-III-Protein, das an einem definierten Ende der Phagenoberfläche exprimiert wird. Die Identifizierung der aktiven Peptidsequenz erfolgt wieder auf der Ebene der DNA. Phagen, die an Biotin-gelabelte Antikörper binden, werden über Streptavidin isoliert (Affinitätsreinigung), vermehrt und ihre DNA sequenziert. Da das Restriktionsenzymmuster des Phagen und die Einbaustelle bekannt sind, ist die Sequenzierung weniger aufwendig als erwartet. Für gentechnologisch arbeitende Laboratorien, die Epitopbibliotheken benötigen, kann dies die einfachere Methode sein. Inwiefern jedoch Wechselwirkungen mit der Phagenoberfläche sowie Sekundärstrukturänderungen des Liganden im Protein die gewünschte Erkennung beeinträchtigen können, muß noch untersucht werden.

Die parallele Synthese von Tausenden von Oligopeptiden an definierten Orten im Mikrometermaßstab ist mit der Peptidsynthese nach Fodor et al.^[110] möglich. In diesem kürzlich referierten^[111], neuartigen Konzept wird als *N*-terminale, photolabile Schutzgruppe Nitroveratryloxycarbonyl verwendet. Mit Matrizen ist eine Bestrahlung und somit eine Schutzgruppenabspaltung von nur $100 \times 100 \mu\text{m}$ großen quadratischen Flächen möglich; die Kupplung der nächsten Aminosäure erfolgt anschließend. Die geeignete Wahl und Kombination der Matrizen ermöglicht die Synthese von 100×100 verschiedenen Peptiden pro cm^2 . Da die Steuerung der Maske analog dem Prozeß der Photolithographie durchgeführt wird, ist eine genaue Zuordnung der Positionen möglich. Die Detektion erfolgt durch ein biologisches Testsystem, beispielsweise am Fluoreszenzmikroskop durch Antikörper, die ein Fluoreszenzlabel tragen. Beeindruckend ist die Präzision der Methode, die Effizienz und die Anwendung der photolithographischen Technik in der Peptidsynthese. Als problematisch könnte sich eine unvollständige photolytische Schutzgruppenabspaltung bei der Synthese längerer Peptide erweisen. Die Etablierung in Routine-labors ist nicht ohne weiteres möglich und mit hohen Investitions- und Personal-kosten verbunden. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß diese Mikrotechnik, insbesondere im Bereich der Biosensorik, Fortschritte bringt.

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Methoden zur Erstellung von Peptidbibliotheken eröffnen eine neue Dimension der Peptidsynthese. Die Selektion erfolgt durch biologische Testsysteme, die Peptide selbst werden dazu häufigträgergebunden eingesetzt, entweder C-terminal am Träger der Synthese oder in einem Protein am Phagen. Dies beinhaltet zwei Einschränkungen: die Blockierung des C-Terminus bei der Detektion darf nicht hinderlich sein, und das biologische Testsystem muß in löslicher oder solubilisierbarer Form aktiv sein. Beide Voraussetzungen sind für Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen meist gegeben. Insbesondere für das Screening und die Identifizierung der Bindungsstelle von monoklonalen Antikörpern haben sich alle Methoden bereits bewährt.

Tests an membrangebundenen Rezeptoren oder ganzen Zellen erfordern jedoch freie Peptidmischungen, wobei die Einzelpeptide in möglichst noch detektierbaren Mengen enthalten sein sollten. Einzig bei der Variante von Houghten^[105] ist dies bisher möglich, jedoch mit wesentlich größerem synthetischen Aufwand.

7. Natürliche Peptidbibliotheken und die Zukunft multipler Peptidsynthesen

Peptidbibliotheken wurden nicht vom Menschen erfunden. Die Natur demonstriert die Wechselwirkungen von Einzelpeptiden aus natürlichen Oligopeptidbibliotheken eindrucksvoll bei der hochspezifischen Differenzierung von körpereigenen und körperfremden Proteinen. Vor kurzem gelang es erstmals durch Isolierung und sogenannte Pool-Sequenzierung die individuenspezifischen Sequenzmotive von natürlich prozessierten Selbstpeptiden einiger definierter MHC-Klasse-I-Allele zu bestimmen^[27a]. Tausende dieser Selbstpeptide erscheinen ständig als Abbauprodukte körpereigener zellulärer Proteine, an der Zelloberfläche gebunden, in einer Spalte der Moleküle des Major Histocompatibility Complex (MHC; Gewebeverträglichkeitskomplex). Die membrangebundenen Proteine der MHC-Klasse-I präsentieren kurze Peptide den T-Killerzellrezeptoren (cytotoxische T-Lymphocyten, CTL). MHC-Klasse-II-Proteine präsentieren etwas längere Peptide dem T-Helferzellrezeptor, über den die B-Zellen zur Antikörperproduktion stimulierbar sind. Die Bindungsverhältnisse im Spalt der MHC-Klasse-I-Moleküle sind inzwischen sehr gut bekannt^[112]. Die Sequenzmotive der hochkomplexen natürlichen Peptid-

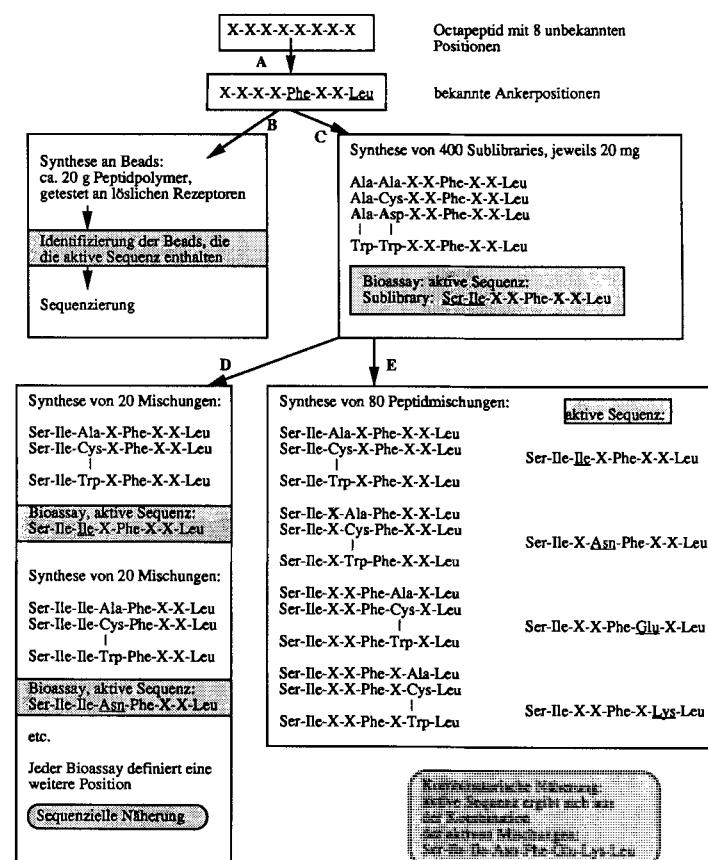


Abb. 9. Mögliche Identifizierung von aktiven Sequenzen am Beispiel des K^b -restriktierten CTL-Epitops Ovalbumin 258–276. Als Bioassay dient die Bindung an den MHC-Klasse-I-Rezeptor der Killerzellen. Position 5 (Phe) und 8 (Leu) sind als Ankerpositionen für die Bindung in der Spalte des MHC-Klasse-I-Moleküls aus der Literatur bekannt [27a]. Eine entsprechende Peptidbibliothek kann entweder nach der Proportionierung-Mischungs-Methode B oder mit freien Peptiden in Bibliotheksteilbeständen (Sublibraries) C erstellt werden. Hierfür müssen 400 Sublibraries mit jeweils zwei definierten Sequenzen und vier variablen Positionen X synthetisiert werden. Die variablen Positionen können entweder sequenziell (D) oder durch Kombination (E) identifiziert werden. In beiden Fällen benötigt man 80 weitere Peptidmischungen.

mischungen zeigen bestimmte Ankeraminosäuren (Abb. 9) in konstanten Positionen in Okta- oder Nonapeptiden. Diese Aminosäureseitenketten der Ankermoleküle passen in Allele-spezifische Taschen der MHC-Spalte, während zwischen den Ankerpositionen eine oft sehr große Variabilität der Aminosäuren auftritt^[27a].

Aus unseren körpereigenen umfangreichen Peptidbibliotheken können Peptide somit mit zwei aufeinanderfolgenden Erkennungsprozessen selektiert werden. Erstens lässt die Bindung in der MHC-Spalte nur bestimmte Motive von Peptidsequenzen zu, und zweitens wird bei Zell-Zell-Kontakt durch ternäre Wechselwirkungen von MHC, Peptid und T-Zellrezeptor entschieden, ob es sich um ein körpereigenes oder körperfremdes Peptid handelt. Die Zelle, die beispielsweise ein virales Fremdpeptid trägt, wird dann vom Immunsystem durch Killerzellen umgebracht oder eine T-Helferzell-vermittelte Antikörperreaktion setzt gegen ein Hüllprotein des Virus ein.

Dem Peptidchemiker kommt bei den in den einleitenden Abschnitten diskutierten interdisziplinären Forschungsprojekten eine entscheidende Schlüsselstellung zu. Er hat spezielle Erfahrungen und sieht die Möglichkeiten für neue Varianten des Einsatzes der multiplen Synthesemethoden und der neueren Analytik. Somit trifft in den allermeisten Fällen er die Entscheidung, welche Strukturvariationen durchgeführt werden. Die wertvollen „Werkzeuge“, die der Peptidchemiker für die Pharmakologie, Immunchemie, Molekulärbiologie, Physiologie und Biophysik bisher zur Verfügung stellte, waren maßgeschneidert und trugen zur raschen Entwicklung dieser Gebiete bei. Der erfolgreiche Einsatz von multiplen Peptidsynthesemethoden wird diesen Forschungsbereichen weitere Bereiche erschließen, deren experimentelle Zugänglichkeit noch vor kurzem utopisch erschien.

Als große Einsatzgebiete der Produkte der multiplen Peptidsynthese, die in dieser Übersicht nur kurz angesprochen werden können, seien folgende genannt. Die Vaccinentwicklung kann durch Auffinden der oben diskutierten, natürlich prozessierten und auf MHC-I- und II-Molekülen präsentierten Peptiden aus viralen, bakteriellen oder körpereigenen Proteinen auf die molekulare Ebene verlegt werden^[27b, c]. Man kann Vergleiche zwischen den Bioassayergebnissen von natürlichen Isolaten und denen synthetischer Peptidmischungen durchführen. Durch systematische Variationen kann die Faltungstendenz längerer Peptide durch Austausch von Aminosäuren experimentell schneller und genauer studiert werden. Es wird raschere Entwicklungen von Enzyminhibitoren geben, und das Screening auf neue Enzyme oder Enzymspezifitäten kann sogar unter Einbeziehung von Backbone-Modifikationen und ungewöhnlichen Aminosäuren durchgeführt werden.

Die multiplen Peptidsynthesemethoden werden mit Sicherheit überraschende neue Möglichkeiten auf Gebieten wie der Biosensorik und vor allem der Automation des Screenings auf Leitstrukturen in der Pharmaforschung bieten.

Für die finanzielle Unterstützung projektorientierter eigener Forschungen mit Bezug zur multiplen Peptidsynthese sei dem Bundesministerium für Forschung und Technologie, der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 323) und dem Fonds der Chemischen Industrie gedankt. Ohne das Engagement und die wesentlichen ideellen und experimentellen Beiträge von K.-H. Wiesmüller, F. Gombert, R. Spohn, W. Tröger, H. Dürr, H.

Drechsel, E. Hoffmann, J. Metzger, S. Stefanović und W. Beck hätten die multiplen Methoden der Peptidsynthese und -analytik in unserem Arbeitskreis nicht den hohen Standard erreicht. A. G. Beck-Sickinger dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ein Forschungsstipendium.

Ein eingegangen am 21. Oktober 1991[A 858]

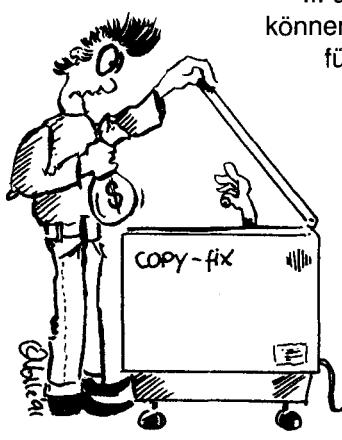
- [1] *Peptides 1988, Proc. 20th Eur. Pept. Symp.* (Hrsg.: G. Jung, E. Bayer), de Gruyter, Berlin, 1989; sowie dort zitierte frühere Proceedings.
- [2] *Peptides 1990, Proc. 21st Eur. Pept. Symp.* (Hrsg.: E. Giralt, D. Andreu), Escom, Leiden, 1991.
- [3] *Peptides: Chemistry and Biology, Proc. 10th Am. Pept. Symp.* (Hrsg.: G. R. Marshall), Escom, Leiden, 1988.
- [4] a) *Peptides, Chemistry, Structure and Biology, Proc. 11th Am. Pept. Symp.* (Hrsg.: J. E. Rivier, G. R. Marshall), Escom, Leiden, 1990; b) *Peptides, Proc. 12th Am. Pept. Symp.* (Hrsg.: J. Smith, J. E. Rivier), Escom, Leiden, 1992.
- [5] a) *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis: Peptides, Polypeptides and Oligonucleotides, Macro-Organic Reagents and Catalysts – 1990* (Hrsg.: R. Epton), SPCC, Birmingham, 1990; b) *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis and Related Technologies: Peptides, Polypeptides and Oligonucleotides, 1991* (Hrsg.: R. Epton), Intercept, Andover, 1992.
- [6] a) *Peptide Chemistry 1987, Proc. 25th Symp. Pept. Chem.* (Hrsg.: T. Shiba, S. Sakakibara), Protein Research Foundation, Osaka, 1988; b) *Peptide Chemistry 1988, Proc. 26th Symp. Pept. Chem.* (Hrsg.: M. Ueki), Protein Research Foundation, Osaka, 1989.
- [7] a) *Forum Peptides, Proc. 1st Int. Forum Pept.* (Hrsg.: B. Castro, J. Martinez), Centre de Pharmacologie – Endocrinologie, Montpellier, 1984; b) *Second Forum on Peptides, Colloque INSERM, Vol. 174* (Hrsg.: A. Aubry, M. Marraud, B. Vitoux), John Libbey Eurotext, London, 1989.
- [8] *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 1–9.* (Hrsg.: J. Meienhofer et al), Academic, London, 1979–1987.
- [9] a) D. C. Roberts, F. Vellaccio in [8], Vol. 5, 1983, S. 341–449; b) B. Castro in *Peptides* (Hrsg.: B. Penke, A. Török), de Gruyter, Berlin, 1988, S. 409–417.
- [10] a) C. Toniolo, *Biopolymers* 1989, 28, 247–257; b) *Int. J. Pept. Protein Res.* 1990, 35, 287–300.
- [11] M. Crisma, G. Valle, G. M. Bonora, C. Toniolo, F. Lelj, V. Barone, F. Fraternali, P. M. Hardy, H. L. S. Maia, *Biopolymers* 1991, 31, 637–641.
- [12] J. Gante, *Synthesis* 1989, 405–413.
- [13] H. Heimgartner, *Angew. Chem.* 1991, 103, 271–297; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1991, 103, 297–323.
- [14] K. Noda, Y. Shimohigashi, N. Izumiya in [8], Vol. 5, 1983, S. 285–339.
- [15] a) *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids* (Hrsg.: G. C. Barrett), Chapman and Hall, London, 1985; b) *Amino Acids: Chemistry, Biology and Medicine* (Hrsg.: G. Lubec, G. A. Rosenthal), Escom, Leiden, 1990.
- [16] R. M. Freidinger, *Trends Pharm. Sci. Rev.* 1989, 10, 270–274.
- [17] a) A. F. Spatola in *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins Vol. 7* (Hrsg.: B. Weinstein), Dekker, New York, 1983, S. 267–357; b) D. B. Shorman, A. F. Spatola, W. S. Wire, T. F. Burks, T. M. D. Nguyen, P. W. Schiller, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989, 162, 1126–1132.
- [18] a) D. Tourwé, Janssen Chim. Acta 1985, 3–18; b) J. S. Davies in *Amino Acids and Peptides, Vol 21* (Hrsg.: J. H. Jones), R. Soc. Chem., London, 1990, S. 129–173.
- [19] A. Aubry, D. Bayenil, J.-P. Mangeot, J. Vidal, S. Sterin, A. Collet, A. Lecoq, M. Marraud, *Biopolymers* 1991, 31, 793–801.
- [20] a) M. Goodman in [4a], S. 3–29; b) J. M. Bormann, M. Goodman, *Int. J. Pept. Protein Res.* 1984, 23, 610–620; c) L. Gazerro, M. Pinori, A. S. Verdini in [5a], S. 403–412.
- [21] N. Delaet, M. Elseviers, D. Tourwé, G. Van Binst in [5a], S. 473–480.
- [22] G. Jung, A. G. Beck-Sickinger, H. Dürr, W. Gaida, G. Schnorrenberg, *Biopolymers* 1991, 31, 613–619.
- [23] M. Elseviers, L. Van Der Auwera, H. Pepermans, D. Tourwé, G. Van Binst, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988, 154, 515–521.
- [24] a) B. A. Morgan, J. A. Gainor, *Annu. Rep. Med. Chem.* 1989, 24, 243–252; b) S. L. Harbeson, D. H. Rich, *J. Med. Chem.* 1989, 32, 1378–1392.
- [25] a) G. Hölzemann, *Kontakte (Darmstadt)* 1991, 3–12; b) G. Hölzemann, *ibid.* 1991, 55–63.
- [26] a) R. Hirschmann, *Angew. Chem.* 1991, 103, 1305–1327; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1991, 30, 1278–1301; b) W. F. Degrado, *Adv. Protein Chem.* 1988, 39, 51–124.
- [27] a) K. Falk, O. Rötzschke, S. Stevanović, G. Jung, H.-G. Rammensee, *Nature* 1991, 351, 290–296; b) K.-H. Wiesmüller, G. Jung, G. Hess, *Vaccine* 1989, 7, 29–33; c) K. Deres, H.-J. Schild, K.-H. Wiesmüller, G. Jung, H.-G. Rammensee, *Nature* 1989, 342, 561–564; d) K.-H. Wiesmüller, K. Deres, H. Schild, H. G. Rammensee, G. Jung in [2], S. 857–859; e) H. Schild, K. Deres, K.-H. Wiesmüller, G. Jung, H.-G. Rammensee, *Eur. J. Immunol.* 1991, 21, 2649–2654.

- [28] a) E. Bayer, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 117–133; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 113–129; b) W. Rapp, L. Zhang, R. Häbich, E. Bayer in [1], S. 199–201.
- [29] T. Wieland, M. Bodansky, *The world of peptides, A brief history of peptide chemistry*, Springer, Berlin, **1991**.
- [30] a) F. Anderer, *Z. Naturforsch. B* **1963**, *18*, 1010–1014; b) *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, *71*, 246–248.
- [31] a) F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. B. Williams, E. F. Myer, Jr., M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, M. Tarsani, *J. Mol. Biol.* **1977**, *112*, 535–542; b) M. G. Dayhoff, R. M. Schwartz, H. R. Chen, W. C. Barker, L. T. Hunt, B. C. Orcutt, *Nucleic Acid Sequence Databank 1981, DNA 1*, 51–58; c) *The Swiss Protein Sequence Databank, EMBL, EMBL Data Library and Amos Bairach* (University Geneva).
- [32] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [33] a) R. B. Merrifield, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1969**, *32*, 221–296; b) G. Barany, R. B. Merrifield in [8], Vol. 2, **1979**, S. 1–284.
- [34] J. M. Stewart, J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Company, New York, **1984**.
- [35] E. Atherton, R. C. Sheppard, *Solid Phase Peptide Synthesis, a Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, **1989**.
- [36] C. Birr, *Aspects of the Merrifield Peptide Synthesis*, Springer, Berlin, **1979**.
- [37] E. Wünsch et al., *Methoden Org. Chem.*, (Houben-Weyl) 4th Ed. **1974**, Band 15a, b.
- [38] a) H.-D. Jakubke, H. Jeschkeit, *Aminosäuren, Proteine, Peptide, Eine Einführung*, Akademie Verlag, Berlin, **1982**; b) J. Jones, *The Chemical Peptide Synthesis*, University Press, Oxford, **1991**.
- [39] M. Bodansky, *Peptide Chemistry, A Practical Textbook*, Springer, Berlin, **1988**.
- [40] a) *Techniques in Protein Chemistry* (Hrsg.: T. E. Hugli), Academic, San Diego, **1989**; b) *Techniques in Protein Chemistry II* (Hrsg.: J. J. Villafranca), Academic, San Diego, **1991**.
- [41] a) *Modern Methods in Protein Research – Review Articles Vol. 2* (Hrsg.: H. Tschesche), de Gruyter, Berlin, **1985**; b) F. Lottspeich in [41 a], S. 347–352; c) *Methods in Protein Sequence Analysis* (Hrsg.: B. Wittmann-Liebold), Springer, Berlin **1989**; d) *Advanced Methods in Protein Microsequence Analysis* (Hrsg.: B. Wittmann-Liebold, J. Salnikow, V. A. Erdmann), Springer, Berlin, **1986**.
- [42] a) A. P. Bruins, T. R. Covey, J. D. Henion, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2642–2646; b) A. P. Bruins, L. O. G. Weidolf, J. D. Henion, W. L. Buddle, *ibid.* **1989**, *59*, 2647–2652.
- [43] a) K. Ashman, A. Bosserhoff in [41 a], S. 155–172; b) F. G. Nolan, N. J. Dovichi, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2803–2805; c) W. A. König in *Modern Methods in Protein and Nucleic Acid Research – Review Articles* (Hrsg.: H. Tschesche), de Gruyter, Berlin, **1990**, S. 213–230.
- [44] a) O. Rötzschke, K. Falk, K. Deres, H. Schild, M. Norda, J. Metzger, G. Jung, H.-G. Rammensee, *Nature* **1990**, *348*, 252–254; b) O. Rötzschke, K. Falk, S. Stevanović, G. Jung, P. Walden, H.-G. Rammensee, *Eur. J. Immunol.* **1992**, im Druck; c) K. Falk, O. Rötzschke, K. Deres, J. Metzger, G. Jung, H.-G. Rammensee, *J. Exp. Med.* **1991**, *174*, 425–434; d) O. Rötzschke, K. Falk, H. Schild, M. Norda, H.-G. Rammensee, K. Deres, J. Metzger, S. Stevanović, K.-H. Wiesmüller, G. Jung in [4 b], im Druck.
- [45] a) H.-P. Weil, A. G. Beck-Sickinger, J. Metzger, S. Stevanović, G. Jung, M. Josten, H.-G. Sahl, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *194*, 217–223; b) *Nisin and Novel Lantibiotics* (Hrsg.: G. Jung, H.-G. Sahl), Escom, Leiden, **1991**.
- [46] A. G. Beck-Sickinger, G. Jung, W. Gaida, H. Köppen, G. Schnorrenberg, R. Lang, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *194*, 449–456.
- [47] F. Gombert, W. Blecha, M. Tähtinen, A. Ranki, S. Pfeiffer, W. Tröger, R. Braun, N. Müller-Lantzsch, G. Jung, H. Rübsamen-Waigmann, K. Krohn, *Virology* **1990**, *176*, 458–466.
- [48] H. Rotering, A. G. Beck-Sickinger, K.-H. Wiesmüller, W. Dorner, G. Jung, *J. Infect. Dis.*, eingereicht.
- [49] R. A. Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 5131–5135.
- [50] R. A. Houghten, *Trends Biotechnol.* **1987**, *5*, 322–324.
- [51] R. A. Houghten, J. H. Cuervo, J. M. Ostresh, M. K. Bray, N. D. Frizzell in [3], S. 166–172.
- [52] A. G. Beck-Sickinger, H. Dürr, G. Jung, *Pept. Res.* **1991**, *4*, 88–92.
- [53] a) J. Ježek, R. A. Houghten in [2], S. 74–75; b) R. A. Houghten, N. Lynam in [1], S. 214–216.
- [54] a) K. Büttner, O. Arad, J. Ostresh, R. A. Houghten in [5 a], S. 325–336; b) O. Arad, R. A. Houghten, *Pept. Res.* **1990**, *3*, 42–50.
- [55] Z. M. Ruggeri, R. A. Houghten, S. R. Russel, T. S. Zimmermann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 5708–5712.
- [56] J. H. Cuervo, B. Rodriguez, R. A. Houghten in [4 a], S. 124–126.
- [57] a) A. G. Beck-Sickinger, W. Gaida, G. Schnorrenberg, R. Lang, G. Jung, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *36*, 522–530; b) A. G. Beck-Sickinger, W. Gaida, G. Schnorrenberg, G. Jung in [2], S. 646–648; c) A. G. Beck-Sickinger, W. Gaida, G. Schnorrenberg, R. E. Lang, J. Metzger, G. Jung in [5 a], S. 447–451.
- [58] a) C. Pinilla, J. R. Appel, R. A. Houghten in [2], S. 860–861; b) G. L. Jones, H. Edmundson, R. Lord, L. Spencer, R. Mollard, A. Saul in [5 a], S. 497–510; c) R. A. Houghten, J. R. Appel, J. M. Sitarik in [3], S. 543–546; d) W. Van't Hof, P. C. Driedijk, M. van den Berg, A. G. Beck-Sickinger, G. Jung, R. C. Aalberse, *Mol. Immunol.* **1991**, 1225–1232.
- [59] a) N. Zimmermann, A. G. Beck-Sickinger, G. Folkers, S. Krickl, I. Mülller, G. Jung, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *200*, 519–528; b) G. Folkers, S. Krickl, S. Trumpp-Kallmeyer, *Arch. Pharm. (Weinheim Ger.)* **1989**, *322*, 409–413; c) A. G. Beck-Sickinger, G. Jung in *Nisin and Novel Lantibiotics* (Hrsg.: G. Jung, H.-G. Sahl), Escom, Leiden **1991**, S. 218–230.
- [60] a) R. A. Houghten, S. T. DeGrav, *J. Chromatogr.* **1987**, *386*, 223–228; b) R. A. Houghten, J. Ostresh, *Biochromatography* **1987**, *2*, 80–84; c) K. Büttner, J. Ostresh, R. A. Houghten in [4 a], S. 423–425.
- [61] a) K. Büttner, R. A. Houghten in [2], S. 478–480; b) S. E. Blondelle, K. Büttner, R. A. Houghten in [2], S. 738–739.
- [62] H. M. Geysen, R. H. Meloen, S. J. Barteling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3998–4002.
- [63] W. M. M. Shaaper, H. Lankhof, D. J. A. Meijer, W. C. Puijk, R. H. Meloen in *Peptides 1986, Proc. 19th Eur. Pept. Symp.* (Hrsg.: D. Theodoropoulos), de Gruyter, Berlin, **1987**, S. 577–580.
- [64] J. M. Middeldorp, R. H. Meloen, *J. Virol. Methods* **1988**, *24*, 147–159.
- [65] a) H. M. Geysen, S. J. Rodda, T. J. Mason, G. Tribbick, P. G. Schoofs, *J. Immunol. Methods* **1987**, *102*, 259–274; b) H. M. Geysen, S. J. Rodda, T. J. Mason, *Mol. Immunol.* **1986**, *23*, 709–715.
- [66] K. Singh, P. Sheridan, L. Aldwin, D. E. Nitecki in [4 a], S. 898–899.
- [67] a) F. O. Gombert, R. Schauder, W. Tröger, G. Jung, H. Rübsamen-Waigmann, W. Blecha, S. Pfeiffer, K. Krohn, M. Tähtinen, V. Ovod, A. Ranki, L. Shi, P. Wernet in [2], S. 872–875; b) U. Rudén, P. A. Brolden, Z. Trojnar, B. Wahren in [2], S. 911–913; c) M. Korkolainen, A. Närvenäen, V. Varnies, F. Lillo, S. Kontilo, R. Resculdani, A. Visconti, M.-L. Huhtala in [5 a], S. 511–518.
- [68] a) R. Van der Zee, W. Van Eden, R. H. Meloen, A. Noordzij, J. D. A. Van Embden, *Eur. J. Immunol.* **1989**, *19*, 43–47; b) V. Van Eden, A. Noordzij, E. H. Hensen, R. Van der Zee, J. D. A. Van Embden, R. H. Meloen in *Vaccine 89 – Modern Approaches to New Vaccines, Including Prevention of AIDS* (Hrsg.: R. A. Lermer, H. Ginsberg, R. M. Chanock, F. Brown), Cold Spring Harbour Laboratories, **1989**, S. 33–37; c) A. M. Bray, N. J. Maeji, H. M. Geysen, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 5811–5814.
- [69] a) H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787–3790; b) K. Barlos, D. Gratos, J. Kallitsis, G. Papaphotin, P. Sotiria, Y. Wenqing, W. Shafer, *ibid.* **1989**, *30*, 3943–3946; c) P. Sieber, *ibid.* **1987**, *28*, 2107–2110; d) M. Mergler, R. Nyfeler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Gross, *ibid.* **1988**, *29*, 4009–4012; e) M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *ibid.* **1988**, *29*, 4005–4008.
- [70] J. M. Carter, J. A. Lyon in [4 a], S. 721–723.
- [71] R. Frank, S. Güler, S. Krause, W. Lindenmaier in [2], S. 151–152.
- [72] G. Schnorrenberg, H. Gerhardt, *Tetrahedron* **1989**, *45*, 7759–7764.
- [73] a) G. Schnorrenberg, R. E. Lang in [4 a], S. 1029–1030; b) G. Schnorrenberg, K.-H. Wiesmüller, A. G. Beck-Sickinger, H. Drechsel, G. Jung in [2], S. 202–203; c) K.-H. Wiesmüller, K. Deres, L. Shi, D. Wei, P. Wernet, G. Jung in [5 b], im Druck.
- [74] H. Drechsel, K.-H. Wiesmüller, U. Treffer, G. Jung, *Int. J. Pept. Protein Res.*, eingereicht.
- [75] a) H. Gausepohl, M. Kraft, C. Boulin, R. W. Frank in [4 a], S. 1003–1004; b) H. Gausepohl, M. Kraft, C. Boulin, R. W. Frank in [5 a], S. 487–490.
- [76] H. Gausepohl, M. Kraft, C. Boulin, R. W. Frank in [2], S. 206–207.
- [77] K. Nokihara, R. Yanamoto, M. Hazana, V. Wakizawa, S. Nakamura in [5 b], im Druck.
- [78] a) A. Holm, M. Meldal in [1], S. 208–210; b) M. Meldal, K. Breddam in [5 a], S. 533–536.
- [79] H. R. Wolfe, *Manual to RAMPS multiple peptide synthesis system*, DuPont/NEN Co., Wilmington, DE, **1987**.
- [80] A. Dryland, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1986**, 125–137.
- [81] a) V. Krchnák, J. Vágner, O. Mach, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1989**, *33*, 209–213; b) V. Krchnák, J. Vágner, *Pept. Res.* **1990**, *3*, 182–193; c) in [2], S. 200–201.
- [82] J. Eichler, M. Beyermann, M. Bienert, M. Lebl in [1], S. 205–207.
- [83] B. Blankenmeyer-Menge, R. Frank, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 5871–5874.
- [84] R. Frank, R. Döring, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 6031–6040.
- [85] a) T. Böldicke, F. Maywald, E. Wingender, J. Collins, R. Frank in [1], S. 220–222; b) T. Böldicke, S. Kindt, F. Maywald, G. Fitzlaff, M. Böcher, R. Frank, J. Collins, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *175*, 259–264.
- [86] a) H. Kunz, B. Dombo, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 732–734; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 711–713; b) C. Birr, G. Becker, T. Nebe, H. Nguyen-Trong, T. Müller, M. Schramm, H. Kunz, B. Dombo, W. Kosch in [4 a], S. 1031–1033.
- [87] B. Blankenmeyer-Menge, R. Frank in [5 a], S. 465–472.
- [88] a) M. Lebl, V. Gut, J. Eichler in [4 a], S. 1059–1060; b) M. Lebl, J. Eichler, *Pept. Res.* **1989**, *2*, 297–300.
- [89] J. Eichler, J. Furkert, M. Bienert, W. Rohde, M. Lebl, in [2], S. 156–157.
- [90] a) R. H. Berg, K. Almdal, W. Batsberg Pedersen, A. Holm, J. P. Tam, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8024–8026; b) R. H. Berg, K. Almdal, W. Batsberg Pedersen, A. Holm, J. P. Tam, R. B. Merrifield in [5 a], 453–459.
- [91] R. H. Berg, K. Almdal, W. Batsberg Pedersen, A. Holm, J. P. Tam, R. B. Merrifield in [4 a], S. 1036–1037.
- [92] R. H. Berg, K. Almdal, W. Batsberg Pedersen, A. Holm, J. P. Tam, R. B. Merrifield in [2], S. 149–150.

- [93] a) R. A. Houghten, M. K. Bray, S. T. DeGraw, C. J. Kiroy, *Int. J. Pep. Protein Res.* **1986**, 27, 675–680; b) R. A. Houghten, S. T. DeGraw, M. K. Bray, S.R. Holtmann, N. D. Frizzell, *BioTechniques* **1986**, 4, 522–528.
- [94] a) *High Performance Liquid Chromatography of Proteins and Peptides* (Hrsg.: M. T. W. Hearn, F. E. Regnies, C. T. Wehr), Academic, New York, **1983**; b) *High Performance Liquid Chromatography in Protein and Peptide Chemistry* (Hrsg.: F. Lottspeich, A. Henschen, K. Hupe), de Gruyter, Berlin, **1981**; c) M.T. W. Hearn *Adv. Chromatogr.* **1982**, 20, 1–82.
- [95] D. Dupont, P. Keim, A. Chui, M. L. Bozzini, K. J. Wilson, *Applied Biosystems User Bulletin* **1988**, 2, 1–8.
- [96] a) F. Foret, P. Boček in *Advances in Electrophoresis*, Vol. 3 (Hrsg.: A. Chambach, M. J. Dunn, B. J. Radok), **1989**, VCH, Weinheim, S. 271–347; b) R. A. Wallingford, A. G. Ewing *Adv. Chromatogr.* **1989**, 29, 1–76.
- [97] a) J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Science* **1983**, 222, 266; b) J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Anal. Chem.* **1981**, 53, 1298–1302; c) A. S. Cohen, A. Paulus, B. L. Karger, *Chromatographia* **1987**, 24, 15–24.
- [98] E. Bayer in *Modern Methods in Protein- and Nucleic Acid Research, Review Articles* (Hrsg.: H. Tschesche), de Gruyter, Berlin, **1990**, S. 133–148.
- [99] M. Grolo, T. Takeuchi, D. Ishii, *Adv. Chromatogr.* **1989**, 30, 167–199.
- [100] J. Metzger, G. Jung in [2], S. 341–342.
- [101] J. Metzger, G. Jung in *Chemistry of Peptides and Proteins*, Vol. 6, (Hrsg.: D. Brandenburg, V. Ivanov, W. Voelter), Attempto, Tübingen, **1992**, im Druck.
- [102] F. S. Tjoeng, D. S. Towery, J. W. Bullock, D. E. Whipple, K. F. Fok, M. H. Williams, M. E. Zupec, S. P. Adams, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, 35, 141–146.
- [103] a) D. E. Woods, A. F. Markham, A. T. Ricker, G. Goldberger, H. R. Cotten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, 79, 5661–5665; b) M. D. Edge, A. R. Greene, G. R. Heathcliffe, P. A. Meacak, W. Schuch, D. B. Scanlan, T. C. Atkinson, C. R. Newton, A. F. Markham, *Nature* **1981**, 292, 756–762.
- [104] H. Gras-Masse, J.-C. Ameisen, C. Boutillon, F. Rouaix, M. Bossus, B. Deprez, A. Capron, A. Tartar in [4b], im Druck.
- [105] R. A. Houghten, C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, J. H. Cuervo, *Nature* **1991**, 354, 84–86.
- [106] a) A. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibó, *Int. J. Pep. Protein Res.* **1991**, 37, 487–493; b) *Abstr. 14th Int. Congr. Biochem. Vol. 5*, Prag, Tschechoslowakei, **1988**, S. 47; c) *Abstr. 10th Int. Symp. Med. Chem.*, Budapest, Ungarn, **1988**, S. 288.
- [107] a) K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, 354, 82–84; K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, F. Al-Obeidi, U. J. Hruby, *Abstr. 12th Am. Pept. Symp.*, Boston, MA, USA, **1991**, LW3.
- [108] J. K. Scott, G. P. Smith, *Science* **1990**, 249, 386–390.
- [109] a) J. J. Devlin, L. C. Panganiban, P. E. Devlin, *Science* **1990**, 249, 404–406; b) S. E. Cwirla, E. A. Peters, R. W. Barrett, W. J. Dower, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 6378–6382.
- [110] S. P. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, 251, 767–773.
- [111] G. Kiedrowski, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 839–840; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 840–841.
- [112] Auf der Grundlage der Röntgenstrukturanalyse des MHC-Klasse I-Proteins HLA-A2 (M. A. Saper, P. J. Bjorkman, D. C. Wiley, *J. Mol. Biol.* **1991**, 219, 277–319) wurde mittels Moleküldynamiksimulation ein Nonapeptid-HLA-A2-Komplex untersucht (N. Zimmermann, O. Rötzsche, K. Falk, D. Rognan, G. Folkers, H.-G. Rammensee, G. Jung, *Angew. Chem.* **1992**, 104, im Druck). Als Einstieg in Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen von viralen Killerzellepitopen wurde erstmals ein Nonapeptid mit Retro-inverso-Gln-Arg-Peptidbindung synthetisiert (H. Dürr, M. Goodman, G. Jung, *Angew. Chem.* **1992**, 104, im Druck).

Nur Kopieren ist teurer...

... und zudem mühsamer! Diplomanden und Doktoranden können als studentische Mitglieder der GDCh die "Angewandte" für zehn Mark und ein paar Zerquetsche jeden Monat druckfrisch frei Haus erhalten. Das sind weniger als acht Pfennige pro Seite!



Interessiert?

Dann rufen Sie doch einfach bei Beate Schork an (Tel. 0 62 01 / 6 06 - 1 99) oder schicken ihr ein Fax (0 62 01 / 6 06 - 1 84). Aber natürlich können Sie ihr auch schreiben:

VCH-Leserservice, Postfach 10 11 61, 6940 Weinheim

