

ANGEWANDTE CHEMIE

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«

HERAUSGEGEBEN VON DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

83. JAHRGANG 1971

HEFT 20

SEITE 773-812

Synthese von Peptid-Naturstoffen: Problematik des heutigen Forschungsstandes^[**]

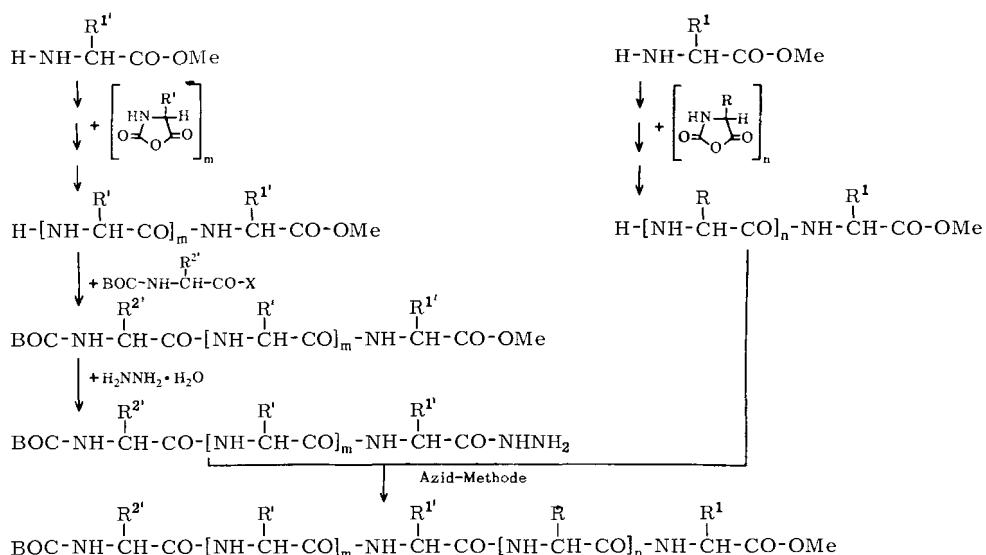
Von Erich Wünsch^[*]

Die Synthese von Peptid-Naturstoffen ist neuerdings wieder in den Brennpunkt des Interesses getreten. Es erscheint daher gerechtfertigt, den gegenwärtigen Forschungsstand einer kritischen Betrachtung zu unterziehen und gleichzeitig den Versuch zu machen, die Lösung der vor uns liegenden Probleme nicht dem Zufall zu überlassen. Es soll der Versuch unternommen werden, die bisher gebräuchlichen Darstellungsverfahren in vier Strategien zu ordnen, deren Vorteile darzulegen und Nachteile aufzudecken. Letztlich muß es das Ziel der Peptid-Naturstoffsynthese bleiben, eine echte und saubere Stoffsynthese zu sein.

1. Einleitung

Die Peptid-Naturstoffsynthese hat seit dem ersten Schritt, der künstlichen Darstellung des Oxytocins^[1], in der von Schwwyzer et al.^[2] durchgeführten Synthese des ACTHs

(Adrenocorticotropes Hormon) einen Höhepunkt und einen vorläufigen Abschluß gefunden. Seit diesem Zeitpunkt geht die stürmische Weiterentwicklung auf dem Gebiet in vier Richtungen voran:



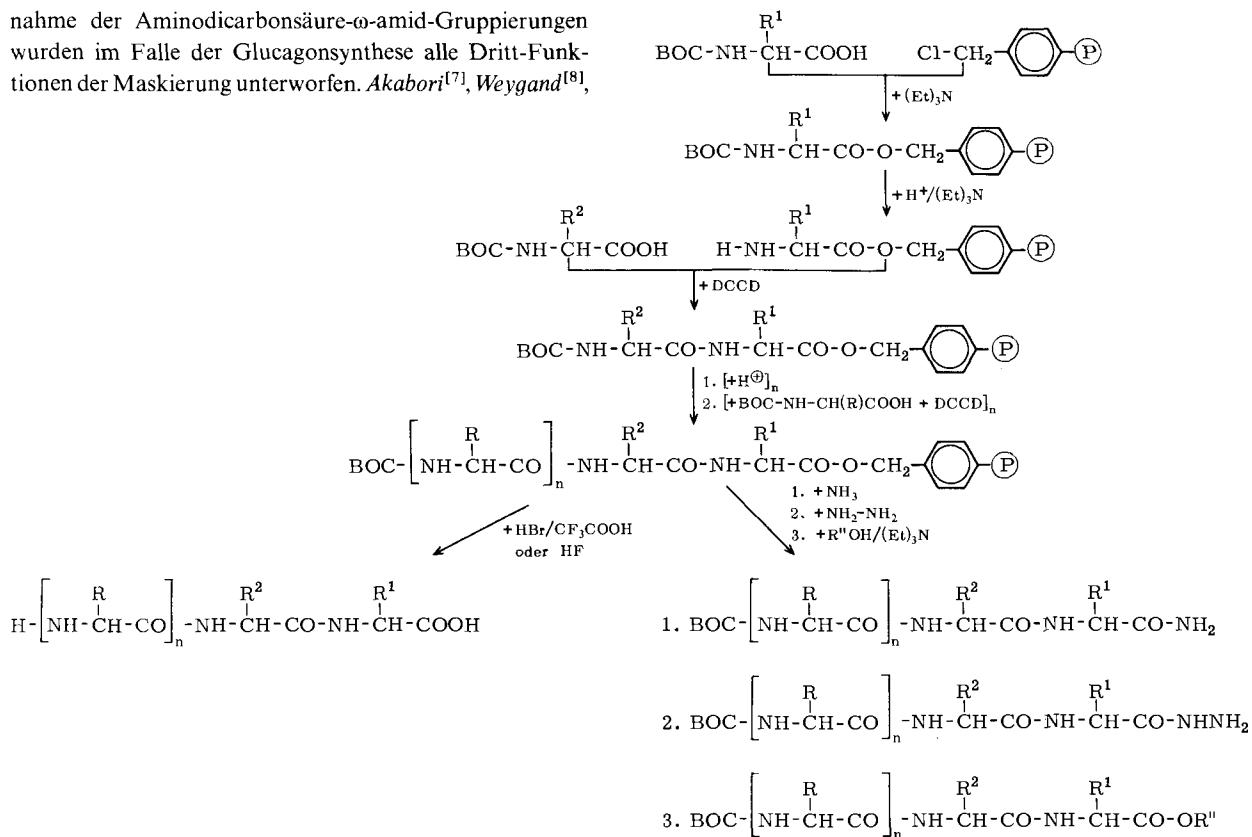
Schema 1. Strategie II unter Anwendung der *N*-Carbonsäureanhydrid-Methode. Me = Methyl, BOC = tert.-Butyloxycarbonyl, X = -Succinimidyl. Seitenkettenenschutz für Lysin: *N*_ε-Benzylloxycarbonyl; Seitenkettenenschutz für Cystein: S-Acetamidomethyl.

[*] Priv.-Doz. Dr. E. Wünsch
Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung
8 München 15, Schillerstraße 46

[**] In gekürzter Form als Hauptvortrag gehalten: 8th Internat. Congress of Biochemistry, Interlaken, Sept. 1970; Abstracts, herausgeg. von J. G. Gregory, S. 72.

Strategie I, die konventionelle Synthese unter weitestgehender Maskierung der Seitenketten-Funktionen mehrfunktioneller Aminosäuren (im folgenden kurz Dritt-Funktionen genannt), mit der die Totalsynthesen des Glucagons^[3, 4] und der Calcitonine^[5, 6] gelangen. Mit Aus-

nahme der Aminodicarbonsäure- ω -amid-Gruppierungen wurden im Falle der Glucagonsynthese alle Dritt-Funktionen der Maskierung unterworfen. *Akabori*^[7], *Weygand*^[8],



Schema 2. Festkörper-Synthese nach *Merrifield*. Alle Dritt-Funktionen mit Ausnahme der ω -Amid-Funktion müssen maskiert werden. \textcircled{P} = Polymer, DCCD = Dicyclohexylcarbodiimid, Et = Äthyl, BOC = tert.-Butyloxycarbonyl.

Chillemi^[9] und neuerdings *Geiger*^[10] mit ihren Mitarbeitern haben zusätzlich auch diese ω -Amid-Funktion in „geschützter“ Form in die Synthese einbezogen.

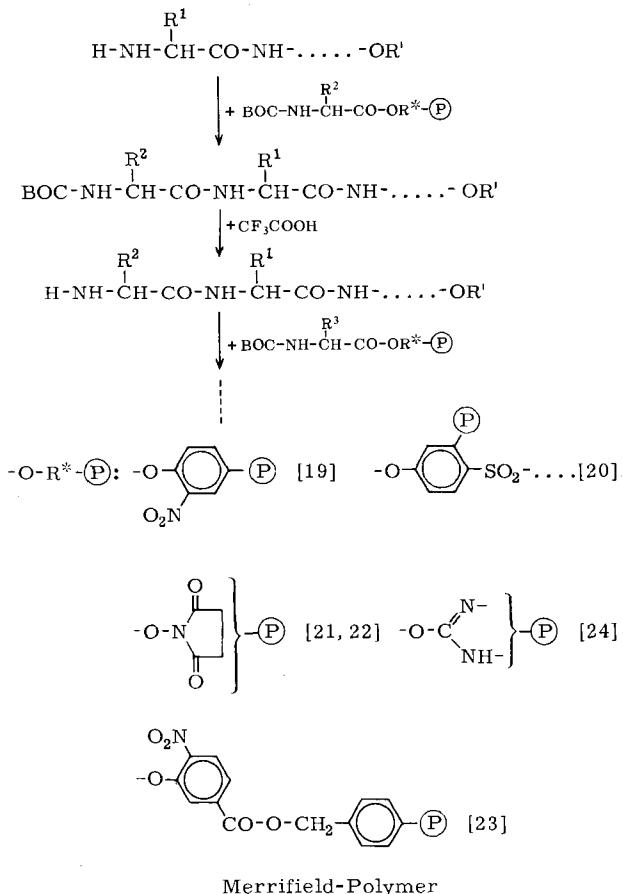
Strategie II, die konventionelle Synthese unter geringstmöglicher Maskierung der Dritt-Funktionen mehrfunktioneller Aminosäuren. Sie basiert auf der systematisch gelenkten Verknüpfung mittels *N*-Carbonsäure-anhydripen. *Denkewalter, Hirschmann et al.*^[11, 12] konnten zeigen, daß lediglich die ω -Amino- und Mercapto-Funktionen blockiert werden müssen.

Selbstverständlich sind fließende Übergänge – was die Maskierung der Dritt-Funktionen betrifft – zwischen beiden Polen der konventionellen Peptidsynthese (Strategie I und II) möglich; mit einer relativ minimalen Maskierung der Dritt-Funktionen sind insbesondere die Arbeiten von *K. Hofmann*^[13] an der Ribonuclease-Synthese ausgezeichnet.

Beiden konventionellen Synthese-Strategien ist bis auf wenige Ausnahmen gemeinsam:

1. der Aufbau zunächst von größeren Peptidbruchstücken,
2. die anschließende Verknüpfung dieser Bruchstücke zu größeren Einheiten. Im Hinblick auf die angewandte Technik ist dies bei Strategie II nur mittels der Azid-Methode möglich (Schema 1).

Strategie III, die „Festkörper-Synthese“, die von *Merrifield*^[14, 15] aus der Taufe gehoben wurde und in einigen Varianten angeboten wird. Allen „Festkörper-Synthesen“ (mit Ausnahme der Verfahren nach *Letsinger*^[16] und



Schema 3. Strategie IV. Unten: Beispiele für die Gruppe —O—R*—P. P = Polymer, BOC = tert.-Butyloxycarbonyl.

neuerdings nach *Merrifield*^{[17][*]}) ist gemeinsam: Eine Maskierung der carboxyendständigen Aminosäure des Naturstoff-Peptids unter gleichzeitiger Aufhängung an ein Polymer. Die Festkörper-Verfahren bedienten sich ursprünglich ausnahmslos des „stufenweisen“ Aufbaus der Peptidsequenz. Sowohl die altbekannte „Merrifield-Methode“ als auch das „Shemyakin-Verfahren“^[18] laufen mit der eindeutigen Zielsetzung der Erstellung der Gesamtsequenz ab (Schema 2).

Strategie IV, die „Polymer-Reagens-Synthese“, die von *Katchalsky*^[19] und *Wieland*^[20] anhand von Polymer-Nitro-phenylestern bzw. -Sulfonyl-phenylestern eingeführt und neuerdings von *Blout*^[21] und *Fridkin*^[22] mit den Polymerhydroxysuccinimid-estern, von *Panse* und *Laufer*^[23] mit modifizierten Polymer-Nitro-phenylestern und – noch vor diesen drei Autoren – indirekt von *Frankel*^[24] mit der Verwendung von Polymer-Carbodiimiden fortgesetzt wurde. Allen diesen Synthesen ist gemeinsam die Umsetzung von Acylaminosäuren oder -peptiden zu polymer-aktivierten Carboxyderivaten und deren Verknüpfung mit Aminokomponenten verschiedenster Art und Größe (Schema 3).

2. Kritische Diskussion der vier Synthese-Strategien

2.1. Strategie I

Die konventionelle Synthese unter globaler Verwendung von Schutzgruppen lässt den Aufbau von Peptid-Fragmenten, wie letztlich auch die sukzessive Verknüpfung dieser Fragmente zur Gesamteinheit, unter praktisch vollständiger Ausschaltung von Nebenprodukten zu; da auch das Problem der racemisierungsfreien Verknüpfung heute als weitgehend gelöst anzusehen ist^[25, 26], scheint dieses Verfahrensprinzip für den Aufbau von Peptidsequenzen mit bis zu 30 Aminosäureresten das Urteil „sehr gut“ zu verdienen. Von dieser Sequenzgröße an hat Strategie I mit erheblichen Schwierigkeiten hinsichtlich der Löslichkeit der Peptidketten zu kämpfen; ihr maximales Ziel dürfte daher – im gegenwärtigen Stadium und in Abhängigkeit von der Eigenart der aufzubauenden Peptidsequenz – im Bereich von 30–50 Aminosäureresten liegen.

2.2. Strategie II

Die konventionelle Synthese der geringstmöglichen Maskierung der Dritt-Funktionen besitzt nicht die Sicherheit des nebenproduktfreien Aufbaus der als erstes angestrebten Teilsequenzen; man wird deshalb mehr oder minder gezwungen sein, den stufenweisen Aufbau der Peptid-Fragmente mittels *N*-Carboxy-aminosäure-anhydriden zum Zweck der Reindarstellung einer Teilsequenz hin und wieder zu unterbrechen. Für den weiteren Aufbau müssen die als *N*-Acyl-Peptidester erhaltenen Fragmente mit Ausnahme des C-terminalen Bruchstücks in *N*-Acyl-Peptidhydrazide übergeführt werden^[27–29]; ob die von *Denke-*

[*] Bei diesen Verfahren [16, 17] wird die aminoendständige Aminosäure mit dem Polymer verknüpft.

walter, *Hirschmann* et al.^[11] hierzu entwickelte Technik generell ohne Nebenreaktionen verläuft, muß abgewartet werden. Diese *N*-Acyl-Peptidhydrazide werden dann nach der Azid-Technik nacheinander auf das carboxyendständige Bruchstück aufgeknüpft^[27–29] (vgl. Schema 1). Diese Einschränkung der Verknüpfungstechnik auf die Azid-Methode muß als eindeutiger Nachteil der Strategie II gewertet werden; es ist seit langem bekannt, daß die Azid-Methode sowohl hinsichtlich der Ausbeute nicht die glücklichste Errungenschaft darstellt als auch zu Nebenreaktionen als Folge einer Azid-Isocyanat-Umlagerung Anlaß gibt. Vor allem sind hierbei auftretende Harnstoff-Derivate kaum von den „richtig geknüpften“ Peptidsequenzen trennbar.

Unbestreitbare Vorteile dieses Verfahrens-Prinzips liegen auf drei Gebieten:

der günstigen und billigen Darstellung der Verknüpfungsmaterialien (*N*-Carboxy-aminosäure-anhydride);

der sehr hohen Reaktivität der *N*-Carboxy-aminosäure-anhydride und damit der relativ schnellen Verknüpfung;

der günstigeren Löslichkeitseigenschaften der nach diesem Prinzip hergestellten Fragmente (gegenüber den nach Strategie I erhältlichen Fragmenten).

2.3. Strategie III

Die Festkörper-Synthese der verschiedensten Variationen überrascht zunächst von der Idee her: von der Einfachheit und letztlich der Möglichkeit der automatisierten oder mechanisierten Synthese von Peptiden. Bei genauerer Betrachtung aber zeigt die Festkörper-Synthese „Geburtsfehler“, die zum einen in der Aufbau-Technik, zum anderen – bis heute – in einer ungenügenden analytischen Methodik begründet sind.

1. Bei einem stufenweisen Anbau von *N*-Acylaminosäuren („Kopfkomponenten“) an die Aminokomponente, die mit der Carboxy-Funktion an ein entsprechendes Polymer „aufgehängt“ ist, kann die gewünschte *N*-Acylaminoacylierung nur mit einem Überschuß an Aktiv-Kopfkomponente quantitativ gestaltet werden (oft werden 5 mol und mehr an Kopfkomponente eingesetzt). Diese Technik birgt – insbesondere bei Anwendung „anhydrid-artiger“ Aktivierungszustände – eine erhebliche Gefahr einer *N*-Acylaminoacylierung von Peptidbindungen in sich^[30], einschließlich aller möglichen Folgeerscheinungen dieser „Diacylamin-Bildung“, z. B. Kettenverkürzung^[31] und -verlängerung^[32] (vgl. Schema 4).

2. Wie unter 1 angedeutet, basiert die Festkörper-Synthese auf einer quantitativen Umsetzung der Amino-Komponente und daraus folgend auch einer hundertprozentigen Demaskierung der gebildeten *N*-Acyl-Peptid-Derivate. Eine sichere quantitative Aussage über diese beiden Reaktionsschritte ist – bis heute – nur nach Abspaltung der Peptidkette vom Polymer möglich (vgl. dazu 4), und dies nach dem heutigen Stand der analytischen Methodik mit einer Fehlergrenze von $\pm 2\%$. Diese Fehlergrenze ist jedoch für eine gesicherte Festkörper-Synthese von Peptid-Naturstoffen mit über 15 Aminosäureresten zu groß; sie sollte in der Größenordnung von $\pm 0.1\%$ liegen. Unabhängig

davon bleibt der für eine solche Bestimmung gegenwärtig erforderliche Zeitaufwand bestehen; er schmälert die Einfachheit der Festkörper-Synthese erheblich.

Interessante Direkt-Bestimmungen nicht umgesetzter *N*- α -Aminogruppen im Reaktionsansatz wurden beschrieben: sowohl der übliche Edman-Abbau mit folgender massenspektrometrischer Verdünnungsanalyse^[33] oder mit Szintillations-Analyse bei Verwendung radioaktiv markierter Isothiocyanate^[34] als auch die bekannte spektrophotometrische Verfolgung einer 2-Hydroxy-1-naphthaldehyd-Reaktion^[35] stützen sich jedoch primär auf chemische Umsetzungen dieser „frei-verbliebenen“ Aminogruppen ohne sichere Kenntnis des dabei umgesetzten Anteils. Diese Bestimmungsverfahren sind daher von Grund auf mit dem gleichen Fehler „Unsicherheit“ belastet wie die zu bestimmende Reaktion selbst.

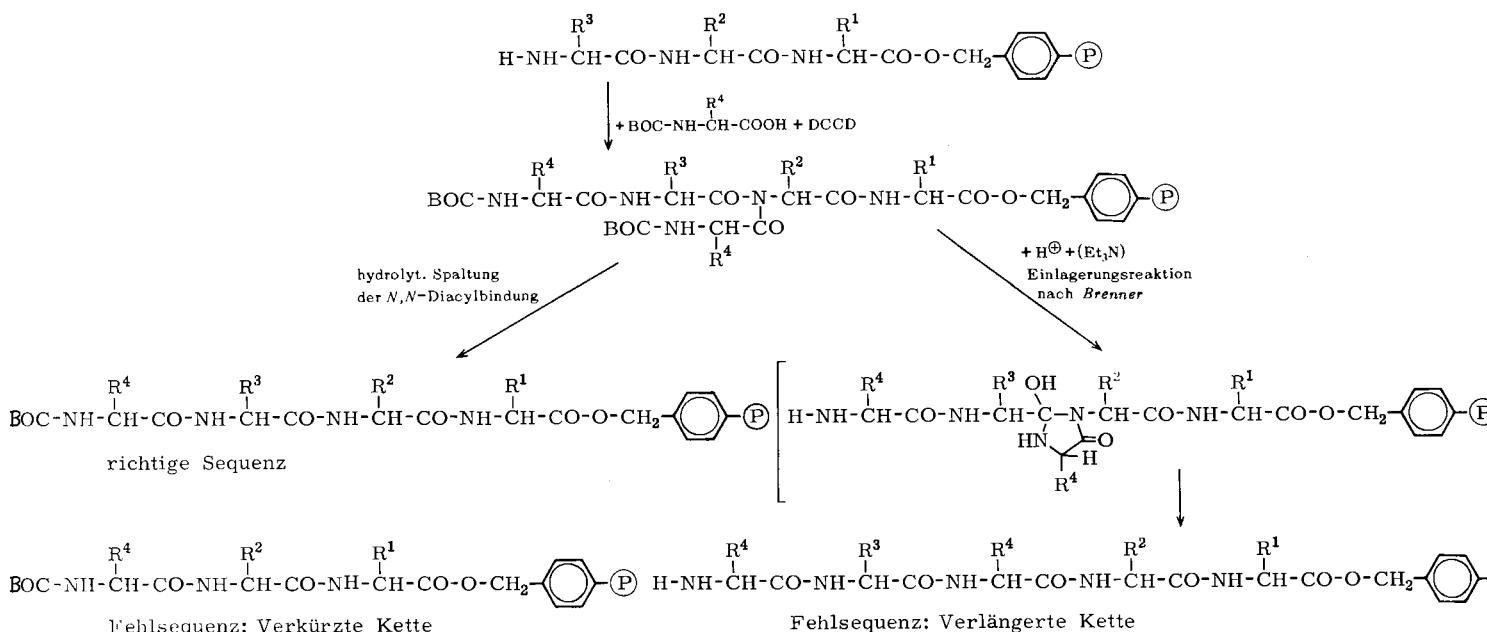
4. Alle bisherigen Festkörper-Synthesen bedienen sich jeweils eines Polymers relativ willkürlicher Korngröße mit wahllos verteilten „Aufhäng-Gruppierungen“ – dies herstellungsbedingt! Das bedeutet:

Von Charge zu Charge hinsichtlich Quellbarkeit und Polymergröße mit Sicherheit auftretende Unterschiede des Trägermaterials;

im Zuge der fortschreitenden Peptid-Synthese eine Gefahr sterischer Hinderungseffekte bei zu hoher „Beladungsdichte“;

fragwürdige Anwendung der „Äquivalent-Analyse“ zur Ermittlung des jeweiligen peptidchemischen Umsatzes (nach Absatz 2).

Die unter 1 bis 4 genannten „Geburtsfehler“ der Festkörper-Synthese müssen unter allen Umständen ausgemerzt



Schema 4. Strategie III: Unerwünschte *N*-Aminoacylierung einer Peptidbindung und Folgereaktionen. \oplus = Polymer, DCCD = Dicyclohexylcarbodiimid. Et = Äthyl, BOC = tert.-Butyloxycarbonyl.

3. Die Festkörper-Synthese beruht ferner auf einer Quellbarkeit bzw. Löslichkeit des Aminokomponenten-Polymers mit bzw. in Lösungsmitteln. Als physikalische Konstante ist die Quellbarkeit oder Löslichkeit zunächst dem Festkörper zuzuschreiben. Während des Aufbaus höhermolekularer Peptidketten dürfte diese physikalische Konstante jedoch mehr und mehr von der Peptidkette beeinflußt werden; zieht man die Erfahrungen der konventionellen Synthese unter globaler Verwendung von Schutzgruppen (Strategie I) heran, so kann erwartet werden, daß bei einer Kettenlänge von 30–50 Aminosäureresten das Peptid und nicht mehr das Polymer die Quellbarkeit oder Löslichkeit des Komplexes bestimmt. Selbstverständlich wird hierbei die „Beladung“ des Polymers als Zusatzfaktor einzukalkulieren sein.

(Das im engen Zusammenhang mit der Quellbarkeit des jeweiligen Peptid-Polymers stehende Diffusions-Phänomene der Kopfkomponente wird in Abschnitt 2.4 diskutiert.)

werden, um diese Synthese-Strategie, vor allen Dingen für den Aufbau von Peptid-Naturstoffen, zum Idealfall werden zu lassen.

2.4. Merrifield-Technik

Die viel zitierte „Merrifield-Technik“ (vgl. Schema 2), so wie sie von Merrifield, Stewart und Jernberg^[36, 37] niedergelegt ist, stellt eine spezielle Variante der Festkörper-Synthese dar; sie besitzt daher die obengenannten „allgemeinen Geburtsfehler“. Darüber hinaus aber zeigt sie weitere Besonderheiten, die einer kritischen Betrachtung bedürfen, schon deshalb, weil die „Merrifield-Technik“ insbesondere in ihrer automatisierten oder mechanisierten Ausstattung mehr als andere Verfahren Eingang in viele Laboratorien gefunden hat im Hinblick auf die ihr zugeschriebene Schnelligkeit, höchste Einfachheit und vollendete Mechanisie-

rungsmöglichkeit. Kernpunkte der „Merrifield-Technik“ sind:

1. Die Aufhängung der carboxyendständigen Aminosäure an ein Polymer unter Benzylester-Bildung. Hierzu werden mit wenigen Ausnahmen *N*-BOC-Aminosäuren mit einem chlormethylierten Phenyl-Polymer (Polystyrol-Copolymersat mit 2% Divinylbenzol) auf üblichem Wege zur Umsetzung gebracht.
2. Nach Abspaltung der *N*-Schutzgruppe wird das Aminokomponenten-Polymer einem üblichen stufenweisen Anbau mit *N*-BOC-Aminosäuren nach dem Carbodiimid- oder dem Nitrophenylester-Verfahren^[38] unterworfen. (Mehrfunktionelle Aminosäuren müssen unter Maskierung der Dritt-Funktion eingesetzt werden.) Dieser stufenweise Anbau erfolgt in zeitlich gleichbleibendem Rhythmus (z. B. 2 oder 4 Std.) und ohne Reinheitskontrolle der Zwischenstufen.
3. Dem „unkontrolliert vollzogenen“ Aufbau der Peptidkette folgt die Ablösung vom Trägermaterial durch protensolvolytische Spaltung der Benzylester-Bindung, z. B. mit Bromwasserstoff/Trifluoressigsäure oder wasserfreiem, flüssigem Fluorwasserstoff^[39, 40]; Dritt-Funktions-Maskierungen auf Benzyl-Basis – mit Ausnahme der *N*^{im}-Benzyl-Gruppierung – werden gleichzeitig mitgespalten (*N*^{im} = *N*-1 im Imidazolteil von Histidin).

Die Abspaltung vom Festkörper durch Ammonolyse^[38] bzw. Hydrazinolyse^[41] unter gleichzeitiger Peptid-Amid- bzw. -Hydrazid-Bildung oder unter Umesterung durch basenkatalysierte Alkoholyse (Racemisierung?), wobei z. B. Peptid-Methylester resultieren^[42], ist möglich, doch mit gesichertem Erfolg nur dann, wenn keine Aminodicarbonäure- oder Aminodicarbonsäure- ω -amid-Reste oder durch diese Prozeduren spaltbare Peptidbindungen in der aufgebauten Sequenz auftreten. Die Spaltung der Polymer-Benzylester-Bindung durch Hydrogenolyse oder alkalische Hydrolyse dürfte wenig sinnvoll sein.

Diese Synthese-Praxis birgt zahlreiche Fehler-Quellen in sich.

Zu 1: Die Umsetzung der Benzylchlorid-Gruppen des Polymers ist unvollständig; restliche Benzylchlorid- oder Benzylammonium-Gruppierungen können im Zuge des Syntheseablaufs durchaus zu Nebenreaktionen Anlaß geben.

Loffet^[43] schlägt neuerdings vor, durch Einsatz von Tetramethylammonium-hydroxid als Base das Entstehen der quartären Salze am Polymer zu vermeiden.

Methionin- und *N*^{im}-Benzyl-histidin-benzylester-Polymer sind nur durch Veresterung mit den Hydroxymethyl-Festkörpern zugänglich – freigebliebene Hydroxy-Funktionen werden anschließend durch Veresterung mit Acetanhydrid „neutralisiert“. (Diese Herstellungstechnik des Aminokomponenten-Polymers sollte generell Vorzug haben^[38, 44].)

Zu 2: Der zeitlich fixierte stufenweise Anbau von *N*-BOC-Aminosäuren dürfte eine der Hauptfehlerquellen der „Merrifield-Technik“ sein. Abgesehen von der oben erwähnten Möglichkeit der Diacylierung der Peptidbindungen ist eine zeitliche Begrenzung des Verknüpfungsschrittes – auch unter hohem Überschuß an Kopfkomponente –

ungeeignet zur quantitativen Herstellung der Peptidbindung.

Die jeweiligen Umsetzungsgeschwindigkeiten sind heute und mit Sicherheit auch in der nächsten Zeit faktisch nicht vorauszusagen, da sie nicht nur von den beiden an der Verknüpfung beteiligten Aminosäuren abhängig sind, sondern (hier speziell für die Festkörper-Synthese) sowohl von der Größe und Art des Aminokomponenten-Polymers, d. h. der Konformation der Peptidkette einschließlich des Festkörpers^[34], als auch von der Diffusionsgeschwindigkeit der Kopfkomponenten (und eventuell auch des Dicyclohexylcarbodiimids) im gequollenen Aminokomponenten-Polymer.

Zu letzterem Phänomen sagt *Klostermeyer*^[45]: „Merkwürdigerweise war diese Möglichkeit bei der Entwicklung der Methode nie berücksichtigt worden, was auch Professor *Merrifield* in einem persönlichen Gespräch beim IX. Europäischen Peptidsymposium im April 1968 in Orsay bestätigte.“

Der Diffusionseffekt hat natürlich erhebliche Konsequenzen für die Brauchbarkeit der Merrifield-Synthese: Sie wird dem Anspruch, universell anwendbar und mechanisierbar zu sein, nicht gerecht. Dies wäre nur möglich, wenn jeder Reaktionsschritt unter Standardbedingungen quantitativ verliefe.

Eine diffusionskontrollierte Reaktion ist jedoch u. a. von der Porengröße des Trägers abhängig, diese fällt nicht nur bei jeder Charge des Rohmaterials unterschiedlich aus, sie ändert sich auch während der Synthese von Schritt zu Schritt. Damit ist es grundsätzlich nicht möglich, die Einzelschritte einer größeren Synthese vor Versuchsbeginn so zu programmieren, daß der Syntheseerfolg sicher ist. Um die Methode allgemeiner brauchbar zu machen, wäre ein echter Syntheseautomat mit Selbstkontrolle der Einzelschritte erforderlich; für ihn fehlen die analytischen Voraussetzungen.“

Aus diesen Gründen müssen die Umsetzungsgeschwindigkeiten immer aufs neue für den jeweils vorliegenden Fall bestimmt werden^[33, 46, 47]. Diesen Tatbestand zeigt eine Arbeit von *Hagenmaier*^[48] auf (vgl. Tabelle 1).

Bei der Synthese des Dodecapeptids (Leu-Ala)₆ verlaufen z. B. die Aufknüpfungen von BOC-Alanin bzw. -Leucin in den Positionen 7 bzw. 10 selbst nach dreimaliger Reaktion über insgesamt 12 Stunden – dies ist nach *Weygand*^[33] zweckmäßiger zur Erzielung maximaler Ausbeuten als einmalige Reaktion über noch längere Zeiten – nur zu 79 bzw. 76%^[*].

Dies führt zwangsläufig, falls die nicht umgesetzten Amino-Gruppen nicht mehr oder in späteren Synthese-Stadien wiederum reagieren, zu „verstümmelten Peptiden“ (truncated-sequences) bzw. „Peptiden mit Fehlstellen“ (failure-sequences)^[**] (vgl. Schema 5).

[*] Gemäß indirekter Bestimmung freier Amino-Gruppen nach *Dorman* [49], deren Sicherheit fraglich sein kann. Die vorgenommene Acetylierung mit Acetanhydrid zu 19 bzw. 14.4% bestätigt aber einen hohen nicht umgesetzten Anteil (vgl. Tabelle 1).

[**] Diese Fehlstellen-Peptide können ihren Ursprung natürlich auch einer „Diacylamin-Bildung“ verdanken; vgl. Abschnitt 2.3 und Schema 3.

Die Größenordnung der „Fehlstellen-Sequenzen“ konnten E. Bayer et al.^[50] z. B. anhand einer relativ einfachen Festkörper-Synthese von (Ala-Phe)₆ demonstrieren: Unter Anwendung der „Partial-Hydrolyse-Technik“ wurden als

die N^{im} -Benzyl-Schutzgruppe des Histidins. Die Entfernung der beiden letztgenannten Maskierungen des Cysteins und Histidins (wie auch der N_{ω} -Tosyl-Schutzgruppe des Arginins) mittels Natrium in flüssigem Ammoniak verläuft

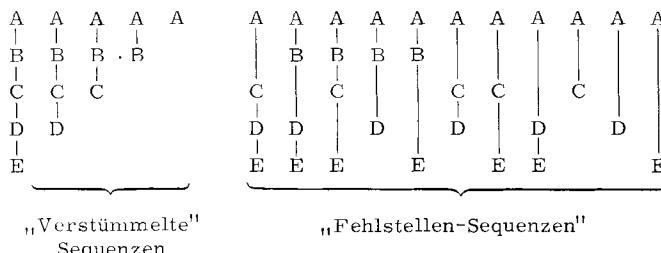
Tabelle 1. Bestimmung der freien Aminogruppen während der Synthese von (Leu-Ala)₆ [48].

| Aminosäure-Sequenz | Ala | Leu | Ala | Leu | Ala | Leu | Ala | Leu | Ala | Leu | Ala | Leu |
|--|------|------|------|-------|------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-----|
| Verknüpfungsschritt | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | |
| Freie Aminogruppen nach Abspaltung der Schutzgruppen (2 mmol = 100%) | 2.05 | 1.96 | 2.05 | 2.04 | 1.92 | 1.85 | 1.85 | 1.52 | 1.55 | 1.08 | 1.01 | |
| Freie Aminogruppen nach der 1. Reaktion in mmol | 0.01 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.48 | 0.09 | 0.77 | 0.137 | 0.79 | 0.29 | 0.535 | |
| in % | 0.5% | 4% | 4% | 4% | 25% | 5% | 42% | 9% | 51% | 27% | 53% | |
| Freie Aminogruppen nach der 2. Reaktion in mmol | 0 | 0 | 0.01 | 0.01 | 0.08 | 0.037 | 0.388 | 0.076 | 0.543 | 0.26 | 0.23 | |
| in % | 0% | 0% | 0.5% | 0.5% | 4% | 2% | 21% | 5% | 35% | 24% | 23% | |
| Freie Aminogruppen nach der 3. Reaktion [a] | | | | | | 0.388 | | | 0.26 | 0.21 | | |
| in mmol | | | | | | 21% | | | 24% | 21% | | |
| Freie Aminogruppen nach der 1. Acetylierung in mmol | | | | 0.015 | | 0.037 | | 0.052 | 0.19 | | | |
| in % | | | | 0.8% | | 2% | | 3.5% | 17.5% | | | |
| Freie Aminogruppen nach der 2. Acetylierung in mmol | | | | | | | 0.104 | | | | | |
| in % | | | | | | | 9.6% | | | | | |

[a] Reaktionszeit 8 Stunden.

„Fehlsequenz“ mindestens 9.3% Phenylalanyl-phenylalanin aufgefunden.

Zu 3: Die Abspaltung der aufgebauten Peptidkette vom Träger, mit Bromwasserstoff/Trifluoressigsäure, ist eine



Schema 5. Synthese des Pentapeptids A-B-C-D-E: Unerlaubte Sequenzen.

relativ harte Reaktionsbedingung, die z. B. das Indol-System im Tryptophan nicht ohne weitgehende Schäden übersteht. Auch kann die bei dieser Operation auftretende starke Anhäufung von Benzyl-Kationen zu Benzylierungsreaktionen führen, die bei entsprechenden sterischen Voraussetzungen durch „Kationenfänger“ nicht immer gebändigt werden können. Dritt-Funktions-Maskierungen auf Benzyl-Basis, d. h. Schutzgruppen für die ω -Carboxy-, ω -Amino- und Hydroxy-Funktion, werden gleichzeitig abgespalten, eine Tatsache, die einen beabsichtigten „Teilsequenzaufbau“ meist ausschließt. Darüber hinaus aber bleiben die bei Anwendung der „Merrifield-Technik“ ferner benutzten Dritt-Funktions-Maskierungen unangegriffen: Die Nitro- oder Tosyl-Gruppe an der Guanido-Funktion des Arginins, die S-Benzyl-Maskierung des Cysteins sowie

wenig erfolgreich^[51–54], sie ist von der Methode her schon unerfreulich.

Inzwischen wurden andere S- bzw. N^{im} -Derivate der beiden Aminosäuren von der konventionellen Synthese her übernommen, nach dem jeweiligen Autor^[55–58] teils mit, teils ohne Erfolg. Die größte Chance dürfte den S- und N^{im} -Schutzgruppen zukommen, die gegenüber den Abspaltungsbedingungen der Peptidkette vom Trägerharz stabil sind^[59–61].

Die Abspaltung der Peptidkette vom Träger mit flüssigem Fluorwasserstoff bei 0°C ist zwar erfolgversprechender – nach Weber^[56] aber „sehr aufwendig“: Neben der Lösung der Polymer-Benzylester-Bindung und Abspaltung aller N- und O-Schutzgruppen auf Benzyl- bzw. tert.-Butyl-Basis werden auch die Nitro-guanido- und die S-Methoxy-benzyl-Maskierung aufgehoben^[59]. Als fluorwasserstoffresistent werden N^{im} -Benzyl- und -Dinitrophenyl-, 4-Nitro-benzylester- und S-Alkyl-thio-Gruppierungen genannt; auch das Indol-System des Tryptophans scheint unbehelligt zu bleiben^[62].

Zusammenfassend muß festgestellt werden:

In ihrer gegenwärtigen Form ist die „Merrifield-Technik“ für den einwandfreien Aufbau von höheren Naturstoff-Peptiden (von mehr als 15 Aminosäuren) nicht geeignet. Das auch nach Reinigungsoperationen *stets nur isolierte Peptidgemisch* kann den Reinheitsforderungen einer geglückten Stoffsynthese nicht entsprechen. Die bei den bisherigen Versuchen erzielte geringe biologische Aktivität nach dieser Technik synthetisierter höherer Peptid-Naturstoffe^[63, 64] lässt es sogar offen, ob der Strukturvorschlag einer Verbindung damit bestätigt werden kann.

Ob nach den bestehenden Grundsätzen der „Merrifield-Technik“ der Aufbau von Peptidfragmenten mit 10–15 Aminosäureresten von Fall zu Fall möglich ist, soll an dieser Stelle offengelassen werden.

2.5. Strategie IV

Über die Verwendung der Polymer-Reagens-Synthese zur Darstellung von Peptid-Naturstoffen liegt erst wenig Material vor^[65]; ein abschließendes Urteil kann daher noch nicht gefaßt werden.

In einer kritischen Betrachtung muß darauf hingedeutet werden, daß die Verwendung von Polymer-Derivaten zur Aktivierung der Carboxy-Verbindung ihre Grenzen aufgrund sterischer Probleme haben dürfte. Für die Peptid-Naturstoffsynthese könnte dies von entscheidender Bedeutung sein.

3. Ausblick

Eine Kritik an den vier Prinzipien zur Synthese von Peptid-Naturstoffen wäre ungerechtfertigt, wenn sie nicht mit Vorschlägen verbunden würde, auf welche Art die Nachteile umgangen und die Vorteile weiterentwickelt werden könnten.

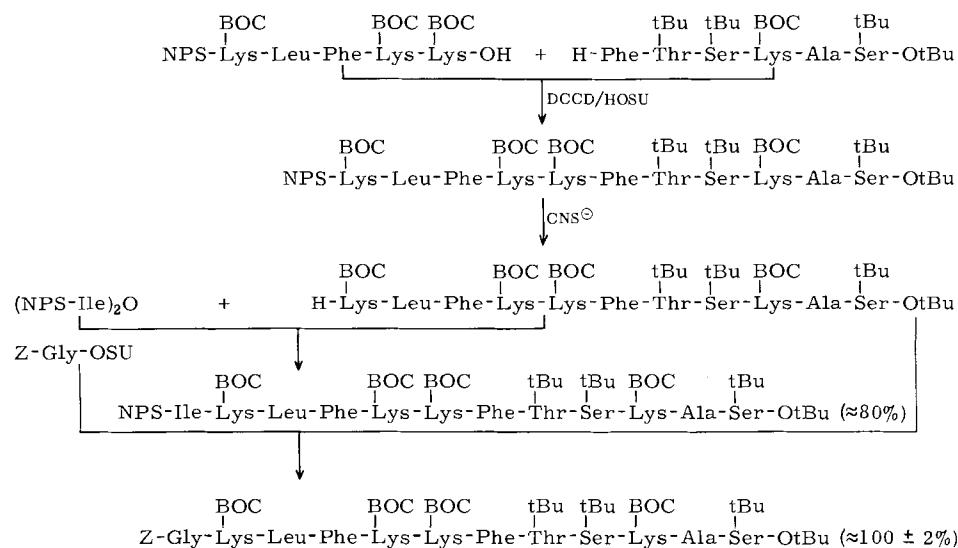
3.1. Vorschläge für Strategie I

Mit der konventionellen Synthese unter globaler Verwendung von Schutzgruppen wird man nur dann zu Peptid-Naturstoffen mit mehr als 50 Aminosäureresten vorstoßen können, wenn es z. B. gelingen sollte, die Löslichkeit der synthetisierten Peptidketten erheblich zu verbessern.

konnte nunmehr gezeigt werden, daß die Löslichkeit des Sekretin-Fragments 12–27 durch die Anwesenheit von vier protonierten Argininresten soweit beeinflußt wird, daß eine exakte Reindarstellung des Hexadecapeptidamid-Derivats – L-Arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-alanyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-glutaminyl-L-arginyl(hydrobromid)-L-leucyl-L-leucyl-L-glutaminyl-glycyl-L-leucyl-valinamid-hydrobromid – durch Gelfiltration an Sephadex G-15 im wäßrigen Milieu wie auch die Umsetzung mit Carboxy-Komponenten, z. B. in Dimethylformamid, möglich sind^[67].

Dieses Ergebnis hat uns ermuntert zu versuchen, mit „bifunktionellen“ Schutzgruppen die Löslichkeit der synthetisierten Peptidketten erheblich zu steigern; z. B. soll in einer Arbeitsrichtung angestrebt werden, „künstliche“ Arginin-Funktionen im Peptidverband zu schaffen, wodurch letztlich ein Syntheseverlauf in Analogie zur aufgezeigten Sekretin-Synthese erreicht würde.

Als zweite Möglichkeit könnte man die weitgehende Unlöslichkeit synthetisch aufgebauter Peptid-Fragmente der carboxyendständigen Sequenz nutzen und diese unlöslichen Teilstücke als „eigenes Trägermaterial“ für eine Festkörper-Synthese einsetzen. Damit wäre eine Vereinigung zweier Synthese-Prinzipien hergestellt. Versuche, die wir in meinen Laboratorien an der Synthese des Phagen-fd-Hüllprotein-Monomers (49 Aminosäuren) durchgeführt haben, lassen diese Möglichkeit durchaus gegeben erscheinen. Ein Tridecapeptid-Derivat der Sequenz 37–49 konnte nach dem Prinzip der Festkörper-Synthese – in Dichlormethan gequollen – mit Kopfkomponenten umgesetzt werden:



Schema 6. Zur Synthese der Sequenz 38–49 des Phagen-fd-Hüllproteins. BOC = tert.-Butyloxycarbonyl, NPS = *p*-Nitrophenylsulfonyl, tBu = tert.-Butyl, HOSU = Hydroxysuccinimid, Z = Benzyloxycarbonyl, DCCD = Dicyclohexylcarbodiimid.

Unsere Arbeiten auf dem Glucagon-Gebiet hatten aufgezeigt, daß die Anwesenheit durch Protonierung geschützter Argininreste in der Sequenz die Löslichkeit der aufgebauten Fragmente in den gebräuchlichen Lösungsmitteln erheblich steigert^[66]. Anhand einer neuen Sekretin-Synthese

mit Benzyloxycarbonyl-glycin-hydroxysuccinimid-ester gelang dies in quantitativer Größenordnung, mit dem symmetrischen Anhydrid des Nitrophenylsulfonyl-isoleucins nur zu etwa 80%, obgleich freie, z. B. acylierbare, Aminogruppen noch vorhanden waren (vgl. Schema 6)^[68].

3.2. Vorschläge für Strategie II

Die konventionelle Synthese unter geringstmöglicher Maskierung von Dritt-Funktionen ist bislang lediglich von *Hirschmann et al.*^[27-29, 69, 70] bei Versuchen zur Synthese der Ribonuclease S, genauer gesagt des S-Proteins, herangezogen worden; es fehlt daher an allgemeiner Erfahrung, so daß eine kritische Betrachtung erschwert ist. Zwei Möglichkeiten der Weiterentwicklung dieses Synthese-Prinzips sollten aber ins Auge gefaßt werden:

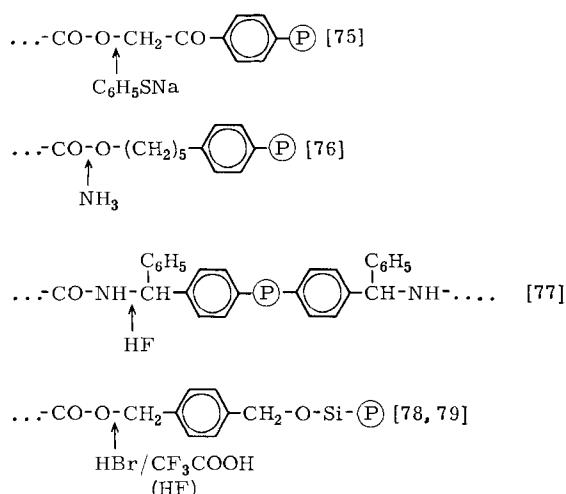
Der Aufbau von Fragmenten unter Benutzung der von *K. Hofmann*^[71] begründeten Acyl-Hydrazid-Methode, womit eine spätere Hydrazinolyse umgangen würde, und der Ersatz der Azid-Methode zur Vereinigung der Fragmente durch andere racemisierungsfreie Verknüpfungsmethoden^[72]. Dabei wäre aber mit Sicherheit ein Komromiß hinsichtlich der Maskierung oder Nicht-Maskierung der Dritt-Funktionen erforderlich. Dies würde bedeuten, daß es nur ein konventionelles Synthese-Prinzip gibt, dessen Grenzen die beiden Strategien I und II darstellen.

3.3. Vorschläge für Strategie III

Seit man erkannt hat, welche Fehler und Phänomene die Festkörper-Synthese belasten, ist man auf der Suche nach Verbesserungen sowohl der methodischen Grundlagen als auch der analytischen Bestimmungsverfahren:

1. einer Variation der „Aufhängen-Gruppierung“ mit dem Ziel einer verbesserten Abspaltung der Peptidkette vom Träger und einer Verkürzung der u. a. diffusionsbedingten Reaktionszeiten;
2. einer Änderung der Umsetzungsmethodik mit dem Ziel einer Verbesserung des nucleophilen Reaktionsschritts oder einer Korrektur der Erstumsetzung;
3. einer Erweiterung der analytischen Bestimmungsverfahren für die jeweilige Stufe der Synthese, um mit Sicherheit eine Fehlergrenze von $\pm 0.1\%$ zu erreichen.

Zu 1: Die relativ leichte nucleophile Spaltbarkeit der Peptid-Phenacylester-Bindung^[73, 74] hat *Weygand*^[75] für eine neue Festkörper-Technik herangezogen (vgl. Schema 7).



Schema 7. Neue Festkörper-Typen. P = Polymer.

Diese günstige Abtrennung vom Harz ermöglicht zusätzlich sowohl eine rasche Isolierung der aufgebauten Fragmente zu deren Reinheitsprüfung als auch die Erstellung „noch seitenketten-geschützter“ Peptid-Zwischenprodukte. Darüber hinaus ist ein erneutes Aufhängen einer bereits abgetrennten Peptidkette an das Polymer möglich. Für eine Abspaltung der Peptidkette vom Festkörper unter gleichzeitiger Amid-Bildung haben *E. Bayer*^[76] und *Merrifield*^[77] zweckmäßige Vorschläge erarbeitet; während *Bayer* durch Anknüpfen aliphatischer längerkettiger Alkoholreste an die Phenylgruppen des Polystyrols ein geeignetes^[*] Harz erhält, schlägt *Merrifield* die Verwendung von polymerem Diphenylmethylamin als Trägermaterial vor. Die Abspaltung der aufgebauten Peptidkette mit Fluorwasserstoff erbringt im letzteren Fall direkt das Peptid-Amid (vgl. Schema 7).

Letztlich haben *Felix* und *Merrifield*^[17] eine Verfahrensverbesserung der Polymer-Benzylloxycarbonyl-Technik nach *Letsinger*^[16] erprobt, die sich als Verknüpfungsschritt der Azid-Methode bei Verwendung intermediärer BOC-Hydrazide bedient. Eine stark verringerte Abhängigkeit vom „trügerischen“ Diffusions-Effekt sehen *E. Bayer* et al. in der Verwendung von „pellicularen“ Festkörpern. Hierzu benutzen die Autoren „glas-beads“ von ca. 100 nm Durchmesser, die mit einer dünnen Schicht Merrifield-Polymer überzogen sind^[50], oder poröse Glasperlen, Quarzkugeln oder Silicagel, die mit ihren Silanol-Gruppen der Oberfläche mit *p*-Bis(hydroxymethyl)benzol als Monoäther kovalent verbunden werden, so daß eine Benzylalkohol-Gruppierung zum Aufspüren der Erst-Aminosäure unter Benzylester-Bildung frei bleibt^[76, 78, 79] (vgl. Schema 7). Insbesondere diese Technik soll nach den Autoren eine Festkörper-Synthese im Säulenverfahren ermöglichen und auch automatisierbar sein. Aufgrund der durch schnelle Diffusion der Kopskomponenten verkürzten Reaktionszeiten sollen nicht nur bessere Ausbeuten erzielt, sondern darüber hinaus der Anteil an Fehlsequenzen reduziert werden können.

Zu 2: Basierend auf den Fortschritten der racemisierungsfreien Verknüpfungstechnik haben *Weygand* et al.^[80] die Fragment-Verknüpfung auch für die Festkörper-Synthese erprobt. Trotz der erwarteten und auch eingetretenen Verlängerung der Reaktionszeiten war diese Umsetzungstechnik erfolgreich – vor allen Dingen hat man doch stets die Wahl, diejenige Peptid-Bindung der aufzubauenden Sequenz zu knüpfen, die aufgrund empirischer Ergebnisse eine begünstigte Umsetzung erwarten läßt. Der eindeutige Vorteil der Fragment-Anknüpfung liegt in der weitgehenden Begrenzung des Anteils von Fehlsequenzen verglichen mit dem stufenweisen Anbau^[81].

In der „Mukaiyama-Technik“^{[82][**]} sieht *Merrifield*^[83] einen Fortschritt in der Verknüpfungsmethodik, auch wenn weiterhin stufenweise gearbeitet wird. Es bleibt zu prüfen, ob diese Methode zur Fragment-Verknüpfung geeignet ist.

Eine Korrektur der vorgenommenen Erst-Umsetzung bei einem üblichen stufenweisen Anbau-Verfahren wird fast

[*] Aminolyse der Esterbindung in flüssigem Ammoniak/Dimethylformamid.

[**] Herstellung der Peptid-Bindung aus den Komponenten mit Triphenylphosphoran und Dipyridyl-disulfid.

ausschließlich darin erblickt, „frei gebliebene Amino-Funktionen auszuschließen“. Es scheint jedoch, falls die Feststellungen von *Hagenmaier*^[48] richtig sein sollten, nicht immer möglich zu sein, dies selbst durch sinnvoll ausgeklügelte Acylierungsreaktionen quantitativ zu erzielen, z. B. mit 3-Nitrophthalsäureanhydrid^[84] oder mit dem innermolekularen Anhydrid der 3-Sulfo-propionsäure^[85]. Die der Aminoacylierung entronnene Amino-Funktion dürfte ihr Überleben weitgehend den bestehenden räumlichen Verhältnissen verdanken. Unter diesen Voraussetzungen ist eine uneingeschränkte Möglichkeit der nucleophilen Öffnungsreaktion von Acylierungsreagentien von der Molekülgröße des Acetanhydrids aufwärts mit Sicherheit zu verneinen.

Es bliebe zu prüfen, ob Desaminierungsreaktionen nicht bessere Aussichten auf Erfolg haben könnten. Es darf in diesem Zusammenhang auf Desaminierungsversuche mit Difluoramin^[86] verwiesen werden: Diese in ihrer Technik noch unausgereifte und schwierige präparative Möglichkeit würde mit Sicherheit das sterische Problem umgehen. Bei der Kleinheit des HNF_2 -Moleküls sollte jede frei gebliebene Amino-Funktion „erreicht“ werden können.

Zu 3: Analytische Verfahren zur Schnellbestimmung des jeweiligen umgesetzten Anteils (Knüpfungs- und Entacylierungsschritt) sind trotz verschiedener Ansätze kaum gediehen. Die Verwendung ^{14}C -markierter BOC-Aminosäuren^[1] ist auf die Dauer gesehen zu kostspielig^[87]. Alle anderen Verfahren bedienen sich der für die bisher verwendeten Festkörper ungeeigneten „Äquivalent-Analyse“, Farbreaktionen^[88] mit einer „zu erheblichen“ Fehlergrenze oder chemischer Umsetzungen, belastet mit dem gleichen Fehler wie die zu bestimmende Reaktion selbst (siehe Abschnitt 2.3).

4. Schluß

Die vorstehende kritische Betrachtung über den gegenwärtigen Stand der Synthese von Peptiden sollte mit einer Feststellung abgeschlossen werden: Für die noch vor uns liegenden Probleme der Synthese von Eiweiß-Naturstoffen wird wohl kaum eine „Synthese-Strategie“ allein generell Gültigkeit besitzen; es wird vielmehr sequenzbedingt einmal dieses, das andere Mal jenes Verfahren Vorrang haben, und es scheint mir durchaus möglich, daß die letzte Chance in einer sinnvollen Kombination der genannten Strategien in ihren bunten Verfahrensdetails zu suchen sein wird.

Ein eingegangen am 12. März 1971 [A 843]

[*] Aus ^{14}C -BOC-Azid auf übliche Weise erhalten.

[1] V. du Vigneaud, C. Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts u. P. G. Katsoyannis, J. Amer. Chem. Soc. 76, 3115 (1954).

[2] R. Schwyzer u. P. Sieber, Nature 199, 172 (1963).

[3] E. Wünsch, Z. Naturforsch. 22b, 1269 (1967).

[4] E. Wünsch, G. Wendelberger, E. Jaeger u. R. Scharf, Peptides, Proc. 9th Europ. Peptide Sympos., Orsay 1968, S. 229, North Holland Publ., Amsterdam 1968.

[5] W. Rittel, M. Brugger, B. Kamber, B. Riniker u. P. Sieber, Helv. Chim. Acta 51, 2057 (1968).

[6] P. Sieber, M. Brugger, B. Kamber, B. Riniker u. W. Rittel, Helv. Chim. Acta 51, 2057 (1968).

[7] S. Akabori, S. Sakakibara u. Y. Shimonishi, Bull. Chem. Soc. Jap. 34, 739 (1961).

- [8] F. Weygand, W. Steglich, J. Bjarnason, R. Akhtar u. N. M. Khan, Tetrahedron Lett. 1966, 3483.
- [9] P. G. Pietta, F. Chillemi u. A. Corbellini, s. [4], dort S. 104.
- [10] W. König u. R. Geiger, Chem. Ber. 103, 2041 (1970).
- [11] R. G. Denkewalter, H. Schwam, R. G. Strachan, T. E. Beesley, D. F. Veber, E. F. Schoenewaldt, H. Borkemeyer, W. J. Paleveda, T. A. Jacob u. R. Hirschmann, J. Amer. Chem. Soc. 88, 3163 (1966).
- [12] R. Hirschmann et al., J. Org. Chem. 32, 3415 (1967).
- [13] K. Hofmann, M. J. Smithers u. F. M. Finn, J. Amer. Chem. Soc. 88, 4107 (1966).
- [14] R. B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149 (1963).
- [15] G. R. Marshall u. R. B. Merrifield, Biochemistry 4, 2396 (1965).
- [16] R. L. Letsinger u. M. L. Kornet, J. Amer. Chem. Soc. 85, 3045 (1963).
- [17] A. M. Felix u. R. B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 92, 1385 (1970).
- [18] M. M. Shemyakin, Y. A. Ovchinnikov, A. A. Kiriushkin u. I. V. Kozhevnikova, Tetrahedron Lett. 1965, 2323.
- [19] M. Fridkin, A. Patchornik u. E. Katchalski, J. Amer. Chem. Soc. 87, 4646 (1965); 88, 3164 (1966).
- [20] Th. Wieland u. Ch. Birr, Angew. Chem. 78, 303 (1966); Angew. Chem. internat. Edit. 5, 310 (1966).
- [21] D. A. Laufer, T. M. Chapman, D. I. Marlborough, V. M. Voldya u. E. R. Blout, J. Amer. Chem. Soc. 90, 2696 (1968).
- [22] M. Fridkin, 2nd Amer. Peptide Sympos., Cleveland, Ohio, August 1970.
- [23] G. P. Panse u. D. A. Laufer, 2nd Amer. Peptide Sympos., Cleveland, Ohio, August 1970.
- [24] Y. Wolman, S. Kivity u. M. Frankel, Chem. Commun. 1967, 629.
- [25] E. Wünsch u. F. Drees, Chem. Ber. 99, 110 (1966).
- [26] F. Weygand, D. Hoffmann u. E. Wünsch, Z. Naturforsch. 21b, 426 (1966).
- [27] R. G. Denkewalter, D. F. Veber, F. W. Holly u. R. Hirschmann, J. Amer. Chem. Soc. 91, 502 (1969).
- [28] R. G. Strachan et al., J. Amer. Chem. Soc. 91, 503 (1969).
- [29] S. R. Jenkins et al., J. Amer. Chem. Soc. 91, 505 (1969).
- [30] M. Brenner, Peptides, Proc. 8th Europ. Peptide Sympos., Nordwijk, September 1966, S. 1, North Holland Publ., Amsterdam 1967.
- [31] F. Weygand u. E. Wünsch, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [32] A. R. Mitchell u. R. W. Roeske, J. Org. Chem. 35, 1171 (1970).
- [33] F. Weygand u. R. Obermeier, Z. Naturforsch. 23b, 1390 (1968).
- [34] S. Hörnle u. W. Geising, Belgian-German Joint Biochemical Meeting, Liège, Januar 1971; Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 352, 5 (1971).
- [35] K. Esko, S. Karlsson u. J. Porath, Acta Chem. Scand. 22, 3342 (1968).
- [36] R. B. Merrifield, J. M. Stewart u. N. Jernberg, Anal. Chem. 38, 1905 (1966).
- [37] J. M. Stewart u. J. D. Young: Solid Phase Peptide Synthesis. W. H. Freeman u. Co., San Francisco 1969.
- [38] M. Bodanszky u. J. T. Sheehan, Chem. Ind. (London) 1964, 1423.
- [39] S. Sakakibara u. Y. Shimonishi, Bull. Chem. Soc. Jap. 38, 1412 (1965).
- [40] J. Lenard u. A. B. Robinson, J. Amer. Chem. Soc. 89, 181 (1967).
- [41] M. Ohno u. C. B. Anfinsen, J. Amer. Chem. Soc. 89, 5994 (1967).
- [42] H. C. Beyermann, H. Hindriks u. E. W. B. De Leer, Chem. Commun. 1968, 1668.
- [43] A. Loffet, Belgian-German Joint Biochemical Meeting, Liege, Januar 1971.
- [44] J. Schreiber, s. [30], dort S. 107.
- [45] H. Klostermeyer, Habilitationsschrift, Universität Aachen 1970.
- [46] S. Karlsson, G. Lindeburg u. U. Ragnarson, Acta Chem. Scand. 24, 337 (1970).
- [47] S. Hörnle, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 348, 1355 (1967).
- [48] H. Hagenmeier, Tetrahedron Lett. 1970, 283.
- [49] L. D. Dorman, Tetrahedron Lett. 1969, 2319.
- [50] E. Bayer, H. Eckstein, K. Häggele, W. A. König, W. Brüning, H. Hagenmeier u. W. Parr, J. Amer. Chem. Soc. 92, 1735 (1970).
- [51] H. Zahn, T. Okuda u. Y. Shimonishi, s. [30], dort S. 108.
- [52] R. B. Merrifield u. A. Marglin, s. [30], dort S. 85.
- [53] P. G. Katsoyannis, Diabetes 13, 339 (1964).
- [54] W. F. Benisek, M. A. Raftery u. R. D. Cole, Biochemistry 6, 3780 (1967).

- [55] K. Hammerström, W. Lunkenheimer u. H. Zahn, *Makromol. Chem.* 133, 41 (1970).
- [56] U. Weber, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 350, 1421 (1969).
- [57] F. Weygand, W. Steglich u. P. Pietta, *Chem. Ber.* 100, 3841 (1967).
- [58] D. A. Ontjes u. C. B. Anfinsen, *Peptides*, Proc. 1st Amer. Peptide Sympos., Yale University, August 1968, S. 79, M. Dekker, New York 1970.
- [59] N. Inukai, K. Nakano u. M. Murakami, *Bull. Chem. Soc. Jap.* 41, 182 (1968).
- [60] E. Wünsch u. R. Spangenberg, *Peptides*, Proc. 10th Europ. Peptide Sympos., Abano 1969, im Druck.
- [61] S. Shaltiel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 178 (1967).
- [62] G. R. Marshal, s. [37], dort S. 36.
- [63] B. Gute u. R. B. Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* 91, 501 (1969).
- [64] Ch. H. Li u. D. Yamashiro, *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 7608 (1970).
- [65] M. Fridkin, A. Patchornik u. E. Katchalski, *J. Amer. Chem. Soc.* 90, 2953 (1968).
- [66] E. Wünsch, *Habilitationsschrift*, Techn. Universität München 1967.
- [67] E. Wünsch, G. Wendelberger u. P. Thamm, *Chem. Ber.*, im Druck.
- [68] E. Wünsch u. P. Thamm, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [69] D. F. Veber et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 91, 506 (1969).
- [70] R. Hirschmann et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 91, 507 (1969).
- [71] K. Hofmann, A. Lindenmann, M. Z. Magee u. N. H. Khan, *J. Amer. Chem. Soc.* 74, 470 (1952).
- [72] D. F. Veber, Vortrag Int. Congress Biochemistry, September 1970, Interlaken.
- [73] I. C. Sheehan u. G. D. Davies jr., *J. Org. Chem.* 29, 2006 (1964).
- [74] G. C. Stelakatos, A. Paganou u. L. Zervas, *J. Chem. Soc.* 1966, 1121.
- [75] F. Weygand, s. [4], dort S. 183.
- [76] E. Bayer, E. Breitmaier, G. Jung u. W. Parr, 2nd Amer. Peptide Sympos., Cleveland 1970.
- [77] R. B. Merrifield, Diskussionsbemerkung beim 2nd Amer. Peptide Sympos., Cleveland 1970.
- [78] E. Bayer in: *Zwanzig Jahre Fonds der Chemischen Industrie*, S. 157, herausgeg. vom Verband der Dtsch. Chem. Industrie, Frankfurt 1970.
- [79] E. Bayer, H. Hagenmaier, W. Parr, H. Eckstein, G. Jung, D. Hunziker u. R. Sievers, s. [60].
- [80] F. Weygand u. U. Ragnarson, *Z. Naturforsch.* 21b, 1141 (1966).
- [81] N. Izumiya, T. Kato, N. Mitsuyasu, K. Noda, S. Terada u. O. Abe, 2nd Amer. Peptide Sympos., Cleveland 1970.
- [82] T. Mukaiyama, R. Matzueda u. M. Suzuki, *Tetrahedron Lett.* 1970, 1901.
- [83] R. B. Merrifield, 2nd Amer. Peptide Sympos., Cleveland 1970.
- [84] Th. Wieland, *Chr. Birr u. H. Wissenbach, Angew. Chem.* 81, 782 (1969); *Angew. Chem. internat. Edit.* 8, 764 (1969).
- [85] H. Wissmann u. R. Geiger, *Angew. Chem.* 82, 937 (1970); *Angew. Chem. internat. Edit.* 9, 908 (1970).
- [86] C. L. Bungardner, K. J. Martin u. J. P. Freeman, *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 97 (1963).
- [87] E. Wünsch u. F. Drees, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [88] M. C. Koshla, R. R. Smeby u. F. M. Bumpus, 2nd Amer. Peptide Sympos., Cleveland 1970.

Vanadium- und Chrom-Katalysatoren für die Äthylenpolymerisation

Von G. Henrici-Olivé und S. Olivé^[*]

Dieser Fortschrittsbericht enthält eine Literaturübersicht über lösliche Katalysatorsysteme auf der Basis von Vanadium und Chrom, die durch eine kombinierte Untersuchung der magnetischen Eigenschaften und der Polymerisationsaktivität solcher Systeme ergänzt wird. Es zeigt sich, daß Vanadium aktive Spezies mit den Oxidationsstufen $V(III)$ und $V(II)$ bildet, Chrom hingegen nur mit $Cr(II)$. Für den Polymerisationsverlauf werden Modelle vorgeschlagen. – Ein Vergleich mit heterogenen Systemen (Phillips-Katalysator) führt zu einigen allgemeinen Prinzipien über die Aktivität von Katalysatoren und die Eigenschaften der damit hergestellten Polymeren.

1. Einleitung

Die Katalysatoren zur industriellen Herstellung von linearem Polyäthylen enthalten als Übergangsmetall meistens Titan oder Chrom. Titan ist eine der Komponenten der klassischen Ziegler-Systeme^[1], während Chrom den wichtigsten Bestandteil des Phillips-Katalysators^[2] darstellt. Für Vanadium, das im Periodensystem zwischen diesen beiden Metallen steht, sollte man ähnliche katalytische Aktivität erwarten. Tatsächlich beschreiben zahlreiche Veröffentlichungen und Patente vanadium-haltige katalytische Systeme zur Polymerisation von Äthylen. Bisher hat jedoch noch kein derartiges System kommerzielle Bedeu-

tung erlangt, wahrscheinlich deshalb, weil die Molekulargewichte der damit erhaltenen Produkte sehr hoch sind. Die spezifische Verwendung von Vanadium-Systemen scheint in der Copolymerisation von Äthylen und Propylen^[3, 4] zu liegen. Außerdem wird der Name des Vanadiums für immer mit dem ersten Fall einer stereospezifischen Polymerisation eines α -Olefins mit einem homogenen Katalysator verbunden sein (syndiotaktisches Polypropylen^[5, 6]).

Die Kenntnisse, die man heute über den Mechanismus der Äthylenpolymerisation an den technischen, heterogenen Titan-Katalysatoren besitzt, wurden durch die Untersuchungen mit homogenen Systemen^[7, 8] entscheidend gefördert. Es wird heute allgemein angenommen, daß das katalytisch aktive Zentrum aus einer alkylierten Titan-Spezies besteht, welche eine Koordinationslücke aufweist, an der das Monomere koordinativ gebunden werden

[*] Dr. G. Henrici-Olivé und Dr. S. Olivé
Monsanto Research S. A.
Eggibühlstraße 36
CH-8050 Zürich