

Synthese von N-geschütztem Eledoisin (6-11)-Hexapeptid unter Verwendung von Proteasen als Biokatalysatoren

Peter Kuhl^{a,*}, Günter Döring^a, Klaus Neubert^b
und Hans-Dieter Jakubke^a

^a Sektion Biowissenschaften, Bereich Biochemie, Karl-Marx-Universität, DDR-7010 Leipzig, Deutsche Demokratische Republik

^b Sektion Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität, DDR-4020 Halle (Saale), Deutsche Demokratische Republik

(Eingegangen 29. August 1983. Angenommen 6. Dezember 1983)

Synthesis of N-Protected Eledoisin (6-11)-hexapeptide Using Proteases as Biocatalysts

Papain and α -chymotrypsin were used for the protease-catalyzed assembly of *Boc*-protected eledoisin (6-11)-hexapeptide by (2 + 4)- and (3 + 3)-segment condensation, respectively, in aqueous-organic solvent systems. As C-components, chemically synthesized *Boc*-protected peptide methyl esters were employed. The nucleophilic tetrapeptide amide was prepared by papain-catalyzed (2 + 2)-segment coupling, while the *Z*-protected C-terminal dipeptide amide could be obtained by α -chymotrypsin- and thermolysin-catalyzed peptide bond formation. In addition, the influence of various reaction conditions, such as solvent composition, nucleophile concentration and reaction time, on the yield of the *Boc*-protected eledoisin (6-11)-hexapeptide was determined.

[*Keywords: Enzymic synthesis in biphasic systems; Peptide synthesis; α -Chymotrypsin; Papain; Thermolysin; Protected Eledoisin (6-11)-hexapeptide*]

Abkürzungen: Es wurden die IUPAC/IUB-Regeln für Aminosäure- und Peptidderivate befolgt; vgl. Eur. J. Biochem. **53**, 1 (1975). Die verwendeten Aminosäuren hatten mit Ausnahme von Glycin *L*-Konfiguration. *Boc* = *tert*-Butyloxycarbonyl-, *Z* = Benzyloxycarbonyl-, *Ac* = Acetyl-, *-OMe* = Methylester.

Einleitung

Mit der Verwendung proteolytischer Enzyme als Biokatalysatoren konnte das Arsenal peptidsynthetischer Methoden durch eine Variante bereichert werden, die insbesondere wegen der Stereospezifität des Reaktionsverlaufs sowie einer ökonomischen und umweltfreundlichen Verfahrensweise in der jüngsten Vergangenheit zunehmend Bedeutung

erlangt hat. Umfangreiche Untersuchungen an zahlreichen Modellreaktionen unter Einbeziehung verschiedener, in ausreichender Menge zugänglicher Proteasen haben hierzu entscheidend beigetragen (für eine Übersicht siehe¹⁻³). Die enzymatische Synthese einer Vielzahl von Oligopeptiden hat andererseits einen vertieften Einblick in die Substratspezifität und den Wirkungsmechanismus von Proteasen ermöglicht⁴⁻⁶. Die durch chemische Methoden nicht zu übertreffende Stereospezifität proteasekatalysierter Peptidsynthesen macht sie für die Gewinnung biologisch aktiver Peptide besonders interessant. Erste Ergebnisse liegen vor bei der Synthese von [Leu]- und [Met]-Enkephalin⁷⁻¹⁰, [Asn¹, Val⁵]-Angiotensin II¹¹, Caerulein¹², C-terminalem Cholecystokinin-Octapeptid¹³ und Dynorphin (1-8)¹⁴, wobei nur im Falle der Enkephaline und des Dynorphins jeder Peptidknüpfungsschritt enzymkatalysiert erfolgte. Die Darstellung geschützter C-terminaler Teilsequenzen bzw. Analoga des Eledoisins durch pepsinkatalysierte (2 + 4)- bzw. (3 + 4)-Segmentverknüpfung wurde von *Isowa et al.* in einem Patent mitgeteilt¹⁵.

Eledoisin gehört zu den Peptiden mit Substanz P-ähnlicher Struktur, die aus verschiedenen Amphibienarten bzw. Octopoden isoliert wurden¹⁶. Da alle diese Peptide sich durch eine schnell einsetzende Stimulierung glattnuskulärer Organe auszeichnen, wurden sie als Tachykinine bezeichnet. Sie weisen eine weitgehende Übereinstimmung des C-terminalen Sequenzbereichs auf, woraus ein annähernd gleiches Wirkungsprofil resultiert. Wie Struktur-Wirkungs-Untersuchungen belegen, ist das C-terminale Hexapeptid des Eledoisins in Übereinstimmung mit anderen Tachykininen hinsichtlich seiner glattnuskulären und hypotensiven Wirkung voll aktiv¹⁷.

In der vorliegenden Arbeit möchten wir über unsere Ergebnisse bei der Anwendung proteasekatalysierter Syntheseschritte zur Herstellung des N-geschützten Eledoisin (6-11)-Hexapeptids in einem wäßrig-organischen Zweiphasensystem berichten.

Synthesen und Ergebnisse

Eine Übersicht der zur Synthese von *Boc*-geschütztem Eledoisin(6-11)-Hexapeptid beschrittenen Wege gibt die Abb. 1. Zur Darstellung geeigneter Ausgangsverbindungen für eine enzymatische Segmentverknüpfung erfolgte zunächst der Aufbau des N-geschützten C-terminalen Dipeptidamids **1** in einer α -chymotrypsinkatalysierten Reaktion von *Z*-Leu-*OMe* als C-Komponente mit H-Met-NH₂ in Gegenwart eines Zweiphasensystems aus Carbonatpuffer (*pH* 10) und Tetrachlormethan. Alternativ hierzu konnte **1** auch unter Verwendung von *Z*-Leu-OH in einer thermolysinkatalysierten Reaktion im Lösungsmittelsystem Tris-

Maleat-Puffer ($pH\ 7$)/Essigester mit befriedigender Ausbeute — wenn gleich auch in wesentlich längerer Reaktionszeit — erhalten werden. Nach Abspaltung der *Z*-Gruppe mit HBr /Eisessig und Umsetzung mit nach dem Mischanhydrid-Verfahren hergestelltem *Boc*-Ile-Gly-*OMe* **2** in Gegenwart von Papain als Katalysator in einer Mischung von

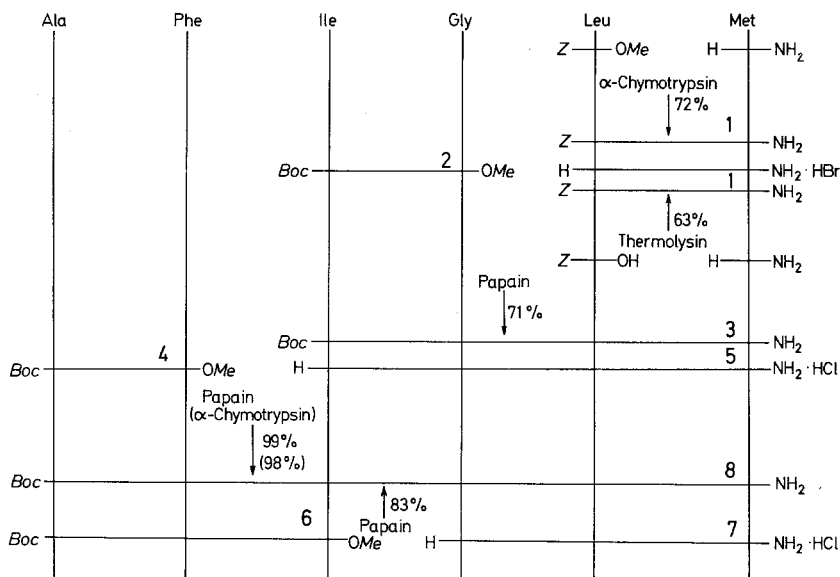


Abb. 1. Synthese von *Boc*-geschütztem Eledoisin (6-11)-Hexapeptidamid

McIlwaine-Puffer ($pH\ 5,5$)/Tetrachlormethan wurde das Tetrapeptid *Boc*-Ile-Gly-Leu-Met-NH₂ **3** erhalten. Über den Einfluß des Verhältnisses C- zu N-Komponente und der Reaktionsdauer auf die Bildung von **3** durch papainkatalysierte (2 + 2)-Segmentkondensation haben wir an anderer Stelle bereits berichtet¹⁸.

Die Darstellung des N-terminalen Dipeptids *Boc*-Ala-Phe-*OMe* **4** erfolgte wiederum durch Chemosynthese nach dem Mischanhydrid-Verfahren, sollte prinzipiell aber auch durch eine proteasekatalysierte Reaktion möglich sein. Die acidolytische Abspaltung der *Boc*-Gruppe von **3** führte zum Tetrapeptidhydrochlorid H-Ile-Gly-Leu-Met-NH₂·HCl **5**, das als N-Komponente für die (2 + 4)-Verknüpfungen zu **8** diente.

Tabelle 1. *Papainkatalysierte Synthese des Boc-geschützten Eledoisin (6-11)-Hexapeptids 8 aus Boc-Ala-Phe-OMe 4 und H-Ile-Gly-Leu-Met-NH₂·HCl 5 in Abhängigkeit vom CCl₄-Anteil und der Nucleophilkonzentration^a*

CCl ₄ (%, v/v)	20	30	40	40	40	50	60
5 (mmol)	0,2	0,4	0,2	0,3	0,4	0,4	0,2
Ausbeute (%) ^b	52	89	67	85	98	99	70

^a Gesamtvolumen 2 ml, 0,2 M *McIlwaine*-Puffer (pH 5,5), 0,2 mmol **4**, 2,12 µmol Papain, 4 h.

^b Vor der säulenchromatographischen Reinigung.

Tabelle 2. *α-Chymotrypsinkatalysierte Synthese des Boc-geschützten Eledoisin (6-11)-Hexapeptids 8 aus Boc-Ala-Phe-OMe 4 und H-Ile-Gly-Leu-Met-NH₂·HCl 5 in Abhängigkeit vom CCl₄-Anteil^a*

CCl ₄ (%, v/v)	20	40	50	60	80
Ausbeute (%) ^b	22	30	37	43 (98) ^c	16

^a Gesamtvolumen 2 ml, 0,2 M Carbonatpuffer (pH 10), je 0,2 mmol **4** und **5**, 0,6 µmol α-Chymotrypsin, 2 h.

^b Vor der säulenchromatographischen Reinigung.

^c In Klammern Ausbeute bei Verwendung von 0,4 mmol **5**.

Da für alle Segmentverknüpfungen Papain bzw. α-Chymotrypsin als Katalysator in Frage kam, setzten wir als C-Komponenten die entsprechenden N-geschützten Peptidmethylester ein, da ihre im Vergleich zu den freien Peptidsäuren höhere Reaktivität bei Verwendung von Serin¹⁹- und Thiolproteasen²⁰ literaturbekannt ist. Als Lösungsmittelsystem erwies sich auch für (2 + 4)- und (3 + 3)-Segmentkondensationen Tetrachlormethan zusammen mit einem proteasespezifischen Puffer im Volumenverhältnis von etwa 1 : 1 als vorteilhaft (Tab. 1 und 2). Die relativ geringe Löslichkeit der synthetisierten Peptidderivate in diesem Reaktionsmedium — es erfolgte jeweils Produktausfällung — ermöglicht eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts in Richtung Synthese.

Eine weitere bedeutende Ausbeuteverbesserung brachte der Einsatz der N-Komponente im Überschuß; so resultierte z. B. bei der α-chymotrypsinkatalysierten Darstellung von **8** in Gegenwart von 60% (hier wie im folgenden stets Volumenteile) Tetrachlormethan bei doppelter Konzentration von **5** eine nahezu quantitative Ausbeute. Dagegen konnten mit 30% Methanol bzw. 75% Trichlorethen/Petroläther (2:1) unter Verwendung von Papain bzw. α-Chymotrypsin als Katalysator nur Ausbeuten von weniger als 10% erzielt werden. Ebenso

führte eine von 4 auf 2 h verkürzte Reaktionszeit der papainkatalysierten Umsetzung zu einer Ausbeuteverminderung von 52 auf 42%.

Entsprechend der Primärspezifität von Papain, wonach eine aromatische Gruppe in P₂-Position ein Substrat für eine Peptidbindungsknüpfung besonders geeignet erscheinen läßt, bot sich die Synthese von **8** auch durch (3 + 3)-Segmentkondensation an (siehe Tab. 3). Wie wir fanden, ist dabei in Gegenwart von 10 bis 50% Tetrachlormethan die Ausbeute an **8** unabhängig vom Lösungsmittelanteil; sie kann aber

Tabelle 3. *Einfluß verschiedener Reaktionsparameter auf die Ausbeute der papainkatalysierten (3 + 3)-Verknüpfung zum Boc-geschützten Eledoisin (6-11)-Hexapeptid 8^a*

Organisches Lösungsmittel	%, v/v	Zeit (h)	7 (mmol)	Ausbeute (%)
CCl ₄	10–50	4	0,2	46
CCl ₄	30	4	0,4	83
CCl ₄	30	6–8	0,2	62
MeOH	50	4	0,2	17
Essigester	15	4	0,2	27

^a 0,2 mmol **6**, übrige Reaktionsbedingungen siehe Tab. 1.

durch Verlängerung der Reaktionszeit und insbesondere durch Verdopplung der Nucleophilkonzentration noch günstiger gestaltet werden. Demgegenüber führt die Herabsetzung der Reaktandenkonzentration auf die Hälfte zu einem Ausbeuterückgang auf 30%.

Als unvorteilhaft erwies sich die (4 + 2)-Synthesekonzeption. Abgesehen von den in der C-Komponente auf Grund der Primär- und Sekundärspezifität der verwendeten Proteasen potentiell vorhandenen Spaltstellen und der dadurch bedingten Uneinheitlichkeit des erhaltenen Produkts, ergaben sich vor allem Probleme durch die Schwerlöslichkeit des Tetrapeptidesters *Boc-Ala-Phe-Ile-Gly-OMe*. Auch die Wahl anderer Lösungsmittelsysteme, z. B. 50% Methanol oder Essigester, führte in unbefriedigender Ausbeute (unter 20 bzw. 30%) zu Rohprodukten, die zudem noch unumgesetzte Esterkomponente enthielten.

Die dargestellten Ergebnisse belegen die erfolgreiche Anwendbarkeit proteasekatalysierter Peptidbindungsknüpfungen zur Synthese des Boc-geschützten Eledoisin (6-11)-Hexapeptids durch Segmentkondensation. Der Vorteil der papainkatalysierten Synthese im wäßrig-organischen Zweiphasensystem zeigt sich insbesondere darin, daß bei einem äquimolaren Reaktandenverhältnis im Vergleich zu Umsetzungen in methanolischer Lösung deutliche Ausbeutesteigerungen erzielt werden

können, wobei Tetrachlormethan ein geeignetes Cosolvens darstellt. Die besten Ergebnisse bei der Darstellung des Hexapeptids werden durch eine papain- oder α -chymotrypsinkatalysierte (2 + 4)-Segmentverknüpfung erzielt.

Experimenteller Teil

Materialien und Methoden

Für die proteasekatalysierten Reaktionen wurden folgende Enzyme verwendet: α -Chymotrypsin (EC 3.4.21.1) des VEB Berlin Chemie, Thermolysin (EC 3.4.24.4) der Firma Boehringer (Mannheim, BRD) und Papain (EC 3.4.22.2) der Firma Merck (Darmstadt, BRD).

Die Schmelzpunkte wurden auf dem Mikroheiztisch nach *Boëtius* bestimmt, die optischen Drehungen am Polamat A des VEB Carl-Zeiss Jena. Für die Dünnschichtchromatographie wurden Silufol-Fertigfolien (Kavalier, ČSSR) benutzt. Als Laufmittelsysteme dienten Chloroform/Methanol (9:1), *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) und *n*-Butanol/Eisessig/Essigester/Wasser (1:1:1:1). Die Synthese der *Boc*-Aminosäuren erfolgte nach der Methode von *Schnabel*²¹ unter Verwendung von *Boc*-N₃. *Z*-Leu-OMe wurde aus *Z*-Leu-OH durch Veresterung mit Methanol in Gegenwart von Sulfurylchlorid erhalten²². Die Verbindungen **2**, **4** und **6** entstanden durch Mischanhydridkupplung unter Verwendung von Chlorameisensäure-isobutylester und *N*-Ethylmorpholin als Reagentien und Tetrahydrofuran als Lösungsmittel. Zur Darstellung von **7** wurde von enzymatisch synthetisiertem **1** die *Z*-Gruppe mit HBr/AcOH entfernt, das Produkt mit *Boc*-Gly-OH nach dem Mischanhydrid-Verfahren gekuppelt und anschließend die *Boc*-Gruppe mit HCl/AcOH abgespalten.

Enzymatische Synthesen

Z-Leu-Met-NH₂ **1**

a) mit α -Chymotrypsin

55,9 mg (0,2 mmol) *Z*-Leu-OMe werden in 1 ml Tetrachlormethan gelöst, mit 59,3 mg (0,4 mmol) Met-NH₂ in 1 ml Carbonatpuffer (0,2 *M*; *pH* 10) sowie 10 mg α -Chymotrypsin versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 ml 1 *N* HCl gestoppt und das ausgefallene Produkt auf eine Glasfritte gebracht. Man wäscht nacheinander mit H₂O, 1 *N* HCl, H₂O, 5proz. NaHCO₃-Lösung sowie H₂O und trocknet im Vak.-Exsikkator (P₄O₁₀). Es werden 57 mg (72% d. Th.) **1** erhalten, Schmp. 210–212 °C, $[\alpha]_D^{20} - 12,2^\circ$ (*c* = 1, DMF).

b) mit Thermolysin

53,1 mg (0,2 mmol) *Z*-Leu-OH werden in Essigester gelöst, mit einer Lösung von 2 mg Thermolysin in 0,2 ml Tris-Maleat-Puffer (0,2 *M*; *pH* 7) versetzt und 20 h in einem thermostatierten Reaktionsgefäß bei 37 °C gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer im Vakuum abgedampft und der Rückstand wie oben beschrieben aufgearbeitet. Man erhält 50 mg (63% d. Th.) **1**, Schmp. 211–214 °C, $[\alpha]_D^{20} - 12,8^\circ$ (*c* = 1, DMF).

Boc-Ile-Gly-Leu-Met-NH₂ 3

60 mg (0,2 mmol) **2** werden in 0,5 ml Tetrachlormethan gelöst und mit 0,1 ml 2-Mercaptoethanol versetzt. Nach Zugabe von 136,9 mg (0,4 mmol) HBr·Leu-Met-NH₂ in 1 ml *McIlvaine*-Puffer (0,2 *M*; *pH* 5,5), 0,2 ml 2 *N* NaOH und 0,2 ml einer Lösung von Papain (10,6 *mM*) im Puffer rührt man 4 h bei Raumtemperatur, arbeitet nach Zugabe von 2 ml 1 *N* HCl wie oben beschrieben auf, wäscht das Produkt mit Tetrachlormethan und wenig Essigester und kristallisiert aus EtOH/H₂O um. Man erhält 69 mg (65% d. Th.) **3** vom Schmp. 214–215 °C, $[\alpha]_D^{25} - 35^\circ$ (*c* = 1, AcOH).

C₂₄H₄₅N₅O₆S (531,70). Ber. C 54,17 H 8,55 N 13,17.

Gef. C 54,16 H 8,52 N 12,57.

Boc-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH₂ 8 durch (2 + 4)-Segmentverknüpfung

a) mit Papain

70,1 mg (0,2 mmol) **4** werden in 1 ml Tetrachlormethan und 0,1 ml 2-Mercaptoethanol gelöst. Nach Zugabe von 187,2 mg (0,4 mmol) HCl·Ile-Gly-Leu-Met-NH₂ **5**, 0,5 ml *McIlvaine*-Puffer (0,2 *M*, *pH* 5,5), 0,2 ml 2 *N* NaOH und 0,2 ml einer 10,6 *mM* Lösung von Papain im Puffer rührt man 4 h bei Raumtemperatur. Nach oben beschriebener Aufarbeitung und Waschen mit wenig Essigester erhält man 149 mg (99% d. Th.) Rohprodukt. Dieses wird in DMF/AcOH (1 : 1) aufgenommen, auf eine Sephadex LH 20-Säule aufgetragen und mit einem kontinuierlichen Butanol/AcOH-Gradienten eluiert. Anschließend erfolgt eine zweite säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel 60 sowie Umkristallisation aus AcOH/Ether. Das so erhaltene **8** ist dünnschichtchromatographisch einheitlich, Schmp. 230–240 °C, $[\alpha]_D^{25} - 28^\circ$ (*c* = 0,25, DMF). Lit.¹⁵: Schmp. 231–238 °C, $[\alpha]_D^{25} - 26,6^\circ$ (*c* = 0,5, DMF).

b) mit α -Chymotrypsin

70,1 mg (0,2 mmol) **4** werden in 1,2 ml Tetrachlormethan gelöst. Nach Zugabe einer Lösung von 187,2 mg (0,4 mmol) HCl·Ile-Gly-Leu-Met-NH₂ **5** in 0,2 ml 2 *N* NaOH und 0,6 ml Carbonatpuffer (0,2 *M*; *pH* 10) sowie von 15 mg α -Chymotrypsin rührt man 2 h bei Raumtemperatur. Anschließend wird mit 2 ml 1 *N* HCl versetzt. Nach oben beschriebener Aufarbeitung erhält man 148 mg (98% d. Th.) Rohprodukt, das nach säulenchromatographischer Reinigung identisch mit dem unter a) charakterisierten **8** ist.

Boc-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH₂ 8 durch (3 + 3)-Segmentverknüpfung

92,7 mg (0,2 mmol) Boc-Ala-Phe-Ile-O Me **6** werden in 0,6 ml Tetrachlormethan gelöst und mit 0,1 ml 2-Mercaptoethanol versetzt. Nach Zugabe von 142 mg (0,4 mmol) HCl·Gly-Leu-Met-NH₂ **7** in 0,9 ml *McIlvaine*-Puffer (0,2 *M*; *pH* 5,5), 0,2 ml 2 *N* NaOH und 0,2 ml einer Lösung von Papain (10,6 *mM*) im Puffer rührt man 4 h bei Raumtemperatur. Anschließend versetzt man mit 2 ml 1 *N* HCl und arbeitet nach obigen Angaben auf. Man erhält 125 mg (83% d. Th.) Rohprodukt, das der oben beschriebenen säulenchromatographischen Reinigung unterworfen wird und danach übereinstimmende analytische Daten (siehe oben) zeigt.

Literatur

- ¹ *Fruton J. S.*, Adv. Enzymol. **53**, 239 (1982).
- ² *Jakubke H.-D., Kuhl P.*, Pharmazie **37**, 89 (1982).
- ³ *Chaiken I. M., Komoriya A., Ohno M., Widmer F.*, Appl. Biochem. Biotechnol. **7**, 385 (1982).
- ⁴ *Bozler H., Wayne S. I., Fruton J. S.*, Int. J. Peptide Protein Res. **20**, 102 (1982).
- ⁵ *Wayne S. I., Fruton J. S.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **80**, 3241 (1983).
- ⁶ *Petkov D. D., Stoineva I.*, Arch. Biochem. Biophys., im Druck.
- ⁷ *Kullmann W.*, J. Biol. Chem. **255**, 8234 (1980).
- ⁸ *Kullmann W.*, J. Biol. Chem. **256**, 1301 (1981).
- ⁹ *Widmer F., Breddam K., Johansen J. T.*, in: Peptides 1980 (*Brunfeldt K.*, Hrsg.), S. 46. Copenhagen: Scriptor. 1981.
- ¹⁰ *Widmer F., Breddam K., Johansen J. T.*, Carlsberg Res. Commun. **45**, 453 (1980).
- ¹¹ *Isowa Y., Ohmori M., Sato M., Mori K.*, Bull. Chem. Soc. Japan **50**, 2766 (1977).
- ¹² *Takai H., Sakato K., Nakamizo N., Isowa Y.*, in: Peptide Chemistry 1980 (*Okawa K.*, Hrsg.), S. 213. Osaka: Protein Research Foundation. 1981.
- ¹³ *Kullmann W.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**, 2840 (1982).
- ¹⁴ *Kullmann W.*, J. org. Chemistry **47**, 5300 (1982).
- ¹⁵ *Isowa Y., Nagasawa T., Kuroiwa K., Narita K.*, Schwz. Pat. 597158, 31. März 1978, ref.: C.A. **89**, 24823 (1978).
- ¹⁶ *Bertaccini G.*, Pharmacol. Rev. **28**, 127 (1976).
- ¹⁷ *Bergmann J., Bienert M., Niedrich H., Mehlig B., Oehme P.*, Experientia **30**, 401 (1974).
- ¹⁸ *Kuhl P., Döring G., Jakubke H.-D.*, Pharmazie **38**, 371 (1983).
- ¹⁹ *Oka T., Morihara K.*, J. Biochem. **82**, 1055 (1977); *Morihara K., Oka T.*, in: Peptide Chemistry 1977 (*Shiba T.*, Hrsg.), S. 79, Proc. 15th Symp. on Peptide Chemistry, Protein Research Foundation, Osaka, 1978.
- ²⁰ *Döring G., Kuhl P., Jakubke H.-D.*, Monatsh. Chem. **112**, 1165 (1981).
- ²¹ *Schnabel K.*, Liebigs Ann. Chem. **702**, 188 (1967).
- ²² *Taschner E., Wasielewski C.*, Liebigs Ann. Chem. **640**, 136 (1961).