

- (1967); R. J. Stedman & L. S. Miller, *J. org. Chemistry* 32, 35 (1967); R. J. Stedman & L. D. Davis, *Tetrahedron Letters* 1968, 1871; J. W. ApSimon, P. V. Demarco, D. W. Mathieson, W. G. Craig, A. Karim, L. Saunders & W. B. Whalley, *Tetrahedron* 26, 119 (1970); C. W. Jefford & B. Waegell, *Bull. Soc. chim. belges* 79, 427 (1970).
- [20] N. S. Bhacca & D. H. Williams, «Applications of NMR.-Spectroscopy in Organic Chemistry», S. 163, Holden Day, San Francisco 1964; J. D. Connolly & R. McCrindle, *Chemistry & Ind.* 1965, 379; D. H. Williams & N. S. Bhacca, *Tetrahedron* 21, 1641, 2021 (1965).
- [21] H. Dürr, *Liebigs Ann. Chem.* 703, 109 (1967).
- [22] S. Sternhell, *Rev. Pure Appl. Chemistry* 14, 15 (1964); F. P. Johnson, A. Meleva & S. Sternhell, *Austr. J. Chemistry* 19, 1523 (1966).
- [23] M. Karplus, *J. Chem. Physics* 30, 11 (1959); *J. Amer. chem. Soc.* 85, 2870 (1963); W. A. Thomas, *Annual Review of NMR.-Spectroscopy* (E. F. Mooney), Vol. 1, S. 72, Academic Press, London and New York 1968.
- [24] M. Chérest, H. Felkin & N. Prudent, *Tetrahedron Letters* 1968, 2199.
- [25] A. Bowers, T. G. Halsall, E. R. H. Jones & A. J. Lemin, *J. chem. Soc.* 1953, 2548.

104. L-Leucyl-sarkosyl-L-phenylalanin, Synthese und Wirkung auf die Aminopeptidasen I und II von *Bacillus stearothermophilus*

von Rolf Jost, Aung Tun-Kyi, Erwin Stoll und Herbert Zuber

Institut für Molekularbiologie und Biophysik,
Bidenössische Technische Hochschule Zürich, 8049 Zürich

(8. 2. 72)

Summary. The synthesis of L-leucyl-sarcosyl-L-phenylalanine is described. This tripeptide resists hydrolysis by the aminopeptidasen AP I and AP II from *Bacillus stearothermophilus*. The peptide is a reversible inhibitor of both enzymes. The inhibition constant for AP I is 5×10^{-3} mol/l and 1.5×10^{-3} mol/l for AP II.

In the hydrolysis of leucine *p*-nitroanilide we observed noncompetitive inhibition by leucyl-sarcosyl-phenylalanine with both enzymes.

With dipeptide substrates however, the inhibitory effect of leucyl-sarcosyl-phenylalanine was drastically reduced by saturating substrate concentrations.

Abkürzungen

Bpoc: 2-*p*-Biphenyl-yl-iso-propyloxycarbonyl-; DCCI: N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid; LNA: Leucin-*p*-nitroanilid; Hepes: N-(2-hydroxyäthyl)piperazin-N'-2-äthansulfonat; NMM: N-Methylmorpholin; DCHA: Dicyclohexylammonium -.

Enzyme

AP I: Thermophile Aminopeptidase aus *Bacillus stearothermophilus* (Mol.-Gew. 400000). Das Enzym besitzt eine breite Spezifität bezüglich Oligopeptiden. Es hydrolysiert LNA mässig gut.

AP II: Eine weitere Aminopeptidase aus *B. stearothermophilus* mit geringem Mol.-Gew. Das Enzym besitzt eine relativ geringe Aktivität gegenüber Di- und Tripeptiden, dagegen eine sehr hohe Aktivität gegenüber LNA.

Spezifische und reversible Aminopeptidaseinhibitoren sind bis heute unbekannt geblieben.

In dieser Arbeit beschreiben wir erste Versuche, mikrobielle Aminopeptidasen durch ein substratanaloges, jedoch nicht hydrolysierbares Tripeptid zu hemmen.

Leucyl-sarkosyl-phenylalanin unterscheidet sich von einem guten AP I Substrat wie Leucyl-glycyl-phenylalanin durch die N-Methyl-Gruppe in der ersten Peptidbindung.

N-Methylierung von Peptidbindungen, mit dem Ziele, synthetische Peptide vor der Inaktivierung durch Aminopeptidasen im Zielgewebe dieser Peptide zu schützen, wurde beim Oxytocin und Vasopressin versucht. Die dabei erhaltenen Derivate wiesen allesamt eine sehr geringe biologische Aktivität auf. Über ihre Peptidaseresistenz, ihre mögliche Wirkung als Inhibitoren sowohl der Peptidasen als auch des Hormonrezeptors wurde nichts berichtet [1] [2].

Mit der Synthese von Leucyl-sarkosyl-phenylalanin griffen wir ferner die Feststellung von *Bergman et al.* [3] auf, wonach das Dipeptid Glycyl-sarkosin durch eine Hefedipeptidase nicht abgebaut werden konnte.

Wir verwendeten bei der Synthese die Bpoc-gruppe als Aminoschutzfunktion [4] und führten die Kondensationen nach der Methode von *König & Geiger* [5] mit DCCI und 1-Hydroxybenztriazol durch.

Versuche, das Dipeptid mit Hilfe des N-Hydroxysuccinimidesters von Boc-Leucin herzustellen, ergaben sehr schlechte Ausbeuten (das Dipeptid Boc-Leu-Gly-OEt wurde unter denselben Reaktionsbedingungen ohne Nebenprodukt in über 90proz. Ausbeute gewonnen), so dass wir der DCCI-Hydroxybenztriazol-methode den Vorzug gaben, obgleich unser Produkt nicht in sehr reiner Form anfiel und mühsame Reinigungsoperationen nötig waren.

Die Identität des geschützten Zwischenproduktes Bpoc-Leu-Sar-OMe konnte anhand des NMR.-Spektrums (Fig. 1) sichergestellt werden.

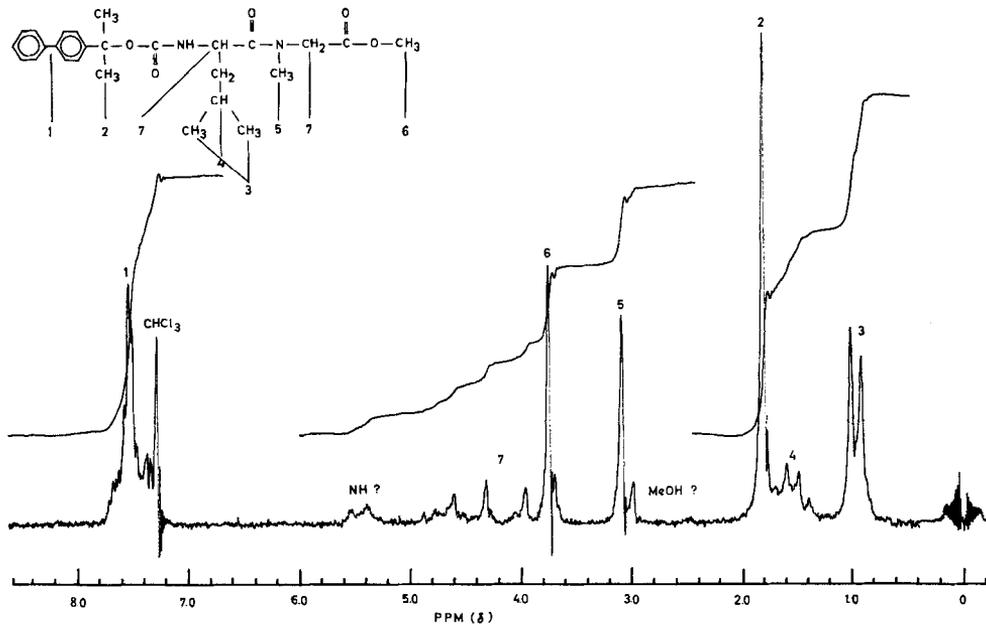


Fig. 1. NMR.-Spektrum von Bpoc-Leu-Sar-OMe (50 mg in 0,5 ml CDCl₃), aufgenommen mit dem Gerät Varian T 60.

Es gelang uns bisher nicht, eines der Zwischenprodukte zu kristallisieren, weshalb wir auf eine Charakterisierung derselben vorläufig verzichteten.

Das Endprodukt, freies H-Leu-Sar-Phe-OH, wurde als Lyophilisat charakterisiert.

Die geringe Tendenz von N-Methylpeptiden zu kristallisieren, ist seit einiger Zeit bekannt [6] und wird durch das Verhalten von Bpoc-Leu-Sar-OMe sowie Bpoc-Leu-Sar-Phe-OMe, die beide stets als Öle ausfielen, neuerdings illustriert.

Welche ist nun die Wirkung der Aminopeptidasen auf das freie Tripeptid? Abbauprobversuche mit AP I und AP II, die unter optimalen Bedingungen für die Aktivität beider Enzyme, bei hoher Enzymkonzentration (10–15 $\mu\text{g/ml}$) und bei sättigender Peptidkonzentration (50 mM) durchgeführt wurden, ergaben die völlige Aminopeptidaseresistenz des Tripeptides. Die Aktivität beider Enzyme gegenüber LNA wurde durch Zugabe von Leucyl-sarkosyl-phenylalanin merklich herabgesetzt, sofern die Konzentration dieses Inhibitors 0,5 mM oder höher war.

Dabei erwies sich die Hemmung von AP I als relativ schwach. Um eine 50proz. Hemmung der Hydrolyse einer 1 mM LNA-Lösung in 50 mM Hepes, pH 7,5, durch AP I zu erzielen, mussten 5 mM an Inhibitor zugesetzt werden.

Die gleiche Antwort (50proz. Hemmung) liess sich im Falle der AP II-katalysierten Reaktion bereits mit 1,5 mM Tripeptid erzielen.

In beiden Fällen war die Hemmung reversibel, was durch Präinkubation der Enzyme mit dem Inhibitor in hoher Konzentration (Hemmung über 90%) und anschliessendem Verdünnen gezeigt werden konnte.

Nach dem Verdünnen des Inhibitors sowie des Enzyms mit 1 mM Substratlösung, wurde die Enzymaktivität ermittelt und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Inaktivierung der Aminopeptidasen durch das Tripeptid ausgeschlossen werden konnte.

Der geringen Löslichkeit von LNA wegen (bis zu 2 mM in 50 mM Hepes-puffer, pH 7,5), liess sich der Einfluss des Substrates auf die Hemmung nur in einem sehr engen Konzentrationsbereich untersuchen. Ausserdem zeigte sich, dass sowohl AP I als auch AP II eine sehr ausgeprägte Substrathemmung durch LNA erfahren, sobald die Substratkonzentration 1 mM überschritten hat.

Fig. 2 zeigt die Wirkung steigender Konzentrationen des Peptidinhibitors auf die AP II-katalysierte LNA-Hydrolyse bei zwei verschiedenen Substratkonzentrationen. Offensichtlich vermag eine erhöhte Substratkonzentration die Hemmung nicht wesentlich zu verändern. Dieses Ergebnis lässt eine kompetitive Hemmung ausschliessen. Der *Lineweaver-Burk* plot derselben Reaktion (Fig. 3) lässt neben dem nichtkompetitiven Fall allerdings auch den der gemischten Hemmung zu, jedoch scheint uns der nichtkompetitive Fall unseren Daten am besten zu entsprechen.

Ebenfalls mit LNA als Substrat bestimmten wir die Inhibitionskonstanten nach der grafischen Methode von *Dixon* [7]. Es ergaben sich die Werte von 5×10^{-3} Mol/l für AP I und $1,5 \times 10^{-3}$ Mol/l für AP II. Beide Werte liegen in der Grössenordnung der *Michaelis*konstanten von Peptidsubstraten dieser Enzyme. Wir ermittelten für AP I und das Dipeptidsubstrat Alanyl-alanin eine K_m von 4×10^{-3} Mol/l und für AP II und das Dipeptid Leucyl-alanin einen Wert von 3×10^{-3} Mol/l. Es blieb zu untersuchen, ob die Bindung unseres Peptidinhibitors ans Enzym in analoger Weise erfolgt, wie diejenige der Peptidsubstrate Alanyl-alanin oder Leucyl-alanin. In diesem Falle

müsste sich eine Hemmung vom kompetitiven Typ ergeben, ganz im Gegensatz zum Resultat mit LNA als Substrat.

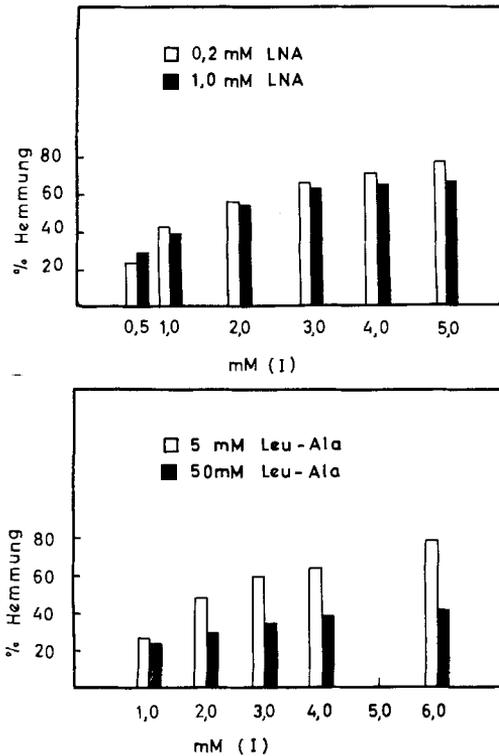


Fig. 2. Hemmung der AP II-katalysierten Hydrolyse von LNA (oben) und Leucyl-alanin (unten), durch steigende Konzentrationen von Leucyl-sarkosyl-phenylalanin.

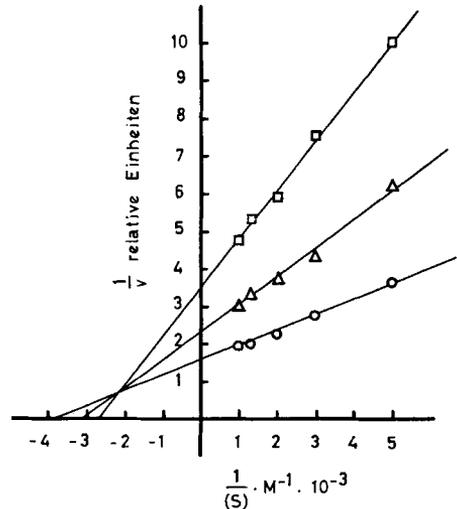


Fig. 3. Lineweaver-Burk plot der AP II-katalysierten Hydrolyse von LNA. (○) ungehemmte Reaktion, (Δ) 1 mM Leu-Sar-Phe, (□) 3 mM Leu-Sar-Phe

Wir verfolgten die Hydrolyse der beiden Dipeptide durch AP I bzw. AP II in An- und Abwesenheit des Inhibitors auf dem Elutionschromatogramm eines automatischen Aminosäureanalysators. Es zeigte sich, dass die Hemmung der Hydrolyse von Alanyl-alanin durch AP I bei 40 und bei 50°, in Hepes-puffer, pH 7,5, durch hohe Substratkonzentrationen (20–40 mM) weitgehend aufgehoben wurde.

In ähnlicher Weise wurde die Hemmung der AP II-katalysierten Hydrolyse von Leucyl-alanin durch sättigende Substratkonzentration deutlich herabgesetzt, wenn gleich nicht aufgehoben (Fig. 2).

Die automatische Aminosäureanalyse als Mittel zur enzymkinetischen Analyse ist ein Notbehelf. Die erforderliche Genauigkeit, die für aussagekräftige *Lineweaver-Burk* plots nötig ist, wurde in diesem Fall nicht erreicht.

Obwohl Hinweise dafür bestehen, muss es doch vorläufig dahingestellt bleiben, ob Leucyl-sarkosyl-phenylalanin den Peptidabbau durch AP I und AP II auf kompetitive Weise hemmt.

Unterstützt durch den *Schweizerischen Nationalfonds*, Projekt Nr. 3.379.70. Die Mikroanalyse verdanken wir Herrn Dr. H. Frohofer, Chemisches Institut der Universität Zürich. Wir danken Herrn Prof. R. Schwyzer für seine Unterstützung im peptidsynthetischen Teil der Arbeit. Herrn Dr. G. Tesser danken wir für wertvolle praktische Winke bei der Synthese.

R. J. verdankt der *Berner Forschungskommission des Schweizerischen Nationalfonds* ein Ausbildungsstipendium. Er dankt im Besonderen Herrn Prof. J. Rudinger für stimulierende Diskussionen und kritische Sichtung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

AP I wurde gereinigt, wie von *Roncari & Zuber* bereits beschrieben [8]. Die Isolierung von AP II soll später beschrieben werden. Die enzymkatalysierte Hydrolyse von LNA wurde im *Zeiss-P.M.Q.-II*-Spektrophotometer bei 405 nm messend verfolgt. Alle Enzymreaktionen wurden in 50 mM Hepes-puffer, pH 7,5 und in Anwesenheit von 1 mM CoCl_2 durchgeführt. Die eingesetzte Enzymmenge betrug im Falle von AP I stets 0,2 bis 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Hemmversuche wurden mit diesem Enzym sowohl bei 40 als auch bei 55° durchgeführt. Für die AP II-katalysierte Hydrolyse von LNA wurden 0,1 bis 0,3 $\mu\text{g/ml}$ Enzymprotein benötigt, wogegen wir für die Peptidhydrolyse 1 bis 2 $\mu\text{g/ml}$ einsetzten.

Für die Hemmversuche erstellten wir eine 100 mM-Lösung des Inhibitorpeptides in Hepes-puffer, deren pH anschliessend auf 7,5 gebracht wurde. Enzym und Inhibitor wurden in die im Eisbad befindlichen Teströhrchen pipettiert und danach mit 1,0 ml Substratlösung versetzt. Nach der Inkubation im Wasserbad von 40 bzw. 55° wurden die Röhrchen schnell im Eisbad gekühlt und anschliessend die Extinktionen bei 405 nm bestimmt.

Die Aktivität von AP I gegenüber 1 mM LNA betrug bei 55° 6,5 $\mu\text{Mol/Min./mg}$, diejenige von AP II bei 40° 30 $\mu\text{Mol/Min./mg}$.

Die Bestimmung der Enzymaktivität gegenüber Dipeptiden erfolgte durch automatische Aminosäureanalyse auf dem *Beckmann* Analysator, Modell 121. Wir benutzten zu diesem Zweck eine 15 cm lange Kolonne mit *Dowex-50* als Kationenaustauscher, die mit 0,38N Natriumzitratt-puffer (pH 4,26) eluiert wurde.

Wir prüften die Resistenz von Leucyl-sarkosyl-phenylalanin gegenüber AP I und AP II auf folgende Weise: 15 μg AP I wurden mit 100 μl Leucyl-sarkosyl-phenylalanin (100 mM in Hepes-puffer, pH 7,5) in Anwesenheit von 1 mM CoCl_2 bei 55° inkubiert.

Zur Kontrolle der Enzymaktivität führten wir eine entsprechende Probe mit der gleichen Konzentration des Substratpeptides Glycyl-leucyl-tyrosin mit.

Auf gleiche Weise wurden 15 μg AP II mit dem Inhibitorpeptid bei 40° inkubiert und auch hier wurde eine Kontrollreaktion mit Glycyl-leucyl-tyrosin als Substrat mitgeführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten von 5 Min. bis 2 Std. wurden 3 μl -Proben entnommen und durch Dünnschichtchromatographie in C (s. weiter unten) auf freie Aminosäuren geprüft. Nach 2 Std. wurde die gesamte Probe auf den Aminosäureanalysator gegeben und analysiert. AP I bewerkstelligte unter diesen Bedingungen den vollständigen Abbau von Glycyl-leucyl-tyrosin in etwa 10 Min., wogegen AP II die volle Zeit dazu benötigte.

Keines der beiden Enzyme setzte jedoch Leucin, Sarkosin oder Phenylalanin in nachweisbarer Menge aus dem Tripeptid Leucyl-sarkosyl-phenylalanin frei.

Smp. sind unkorrigiert und wurden im Gerät der Firma *Büchi*, Flawil (Apparat nach Dr. *Tottoli*) bestimmt. Dünnschichtchromatographie führten wir auf künstlichen Kieselgelplatten *Merck* F 254 (mit Fluoreszenzindikator) durch. Die Flecken wurden im UV. bei 254 nm (Bpoc-derivate absorbieren hier sehr stark) lokalisiert und mit *Reindel-Hoppe*- sowie Ninhydrinreagens sichtbar gemacht. Wir verwendeten folgende Fließmittel (Verhältnis in Volumenteilen):

- A. Chloroform/Methanol/Essigsäure 95:3:2
- B. Chloroform/Methanol/Ammoniak 50:47:3
- C. *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 40:10:10
- D. *t*-Butanol/88proz Ameisensäure/Wasser 70:15:15

Bpoc-Leucin war von der Firma *Fluka*, Buchs.

Als Lösungsmittel bei den Kupplungen diente Dimethylformamid. Dieses wurde nach Ablauf der Reaktionen am Hochvakuum entfernt. Das Produkt, gelöst in wenig Essigester, wurde durch Zusatz von wenigen Tropfen Essigsäure und nach Stehen bei 4° von auskristallisiertem Dicyclohexylharnstoff befreit und aufgearbeitet. Die saure Extraktion nahmen wir nach einem Vorschlag

von *Spangenberg et al.* [9] mittelst $K_2SO_4/KHSO_4$ 2:1 vor. Die alkalische Extraktion wurde durch Schütteln mit einer gesättigten wässrigen Lösung von $NaHCO_3$ ausgeführt.

Danach wurde die Essigesterphase neutral gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft.

Die öligen Rückstände wurden aus verschiedenen Lösungsmitteln umgelöst und schliesslich durch Chromatographie an *MN*-Kieselgel (*Macherey und Nagel*) in Chloroform gereinigt. Alle Versuche, die dünn-schichtchromatographisch in zwei Laufmitteln und aus 5proz. Lösungen aufgetragenen und rein befundenen Produkte zu kristallisieren, blieben erfolglos.

Die beiden Esterhydrochloride $HCl.H-Sar-OMe$ und $HCl.H-Phe-OMe$ wurden nach der Methode von *Brenner & Huber* [10] erhalten. Smp. nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol $HCl.H-Sar-OMe$: 124–125°. Rf in B 0,70
 $HCl.H-Phe-OMe$: 162–164° in Übereinstimmung mit Lit.

Bpoc-Leu-Sar-OMe: 5 g *Bpoc-Leucin DCHA-salz* (9 mMol) wurden mit 1,27 g (9 mMol) $HCl.H-Sar-OMe$ in DMF gelöst. Nach kurzer Zeit wurden 1,2 g (9 mMol) 1-Hydroxybenztriazol und 2,04 g (9,9 mMol) DCCI zugesetzt.

Das Gemisch wurde 12 Std. im Eisbad gerührt und dann aufgearbeitet: 2,4 g (etwa 70%) eines Öles, das nach Ausfällung aus Essigester mittels Petroläther und nach mehreren säulenchromatographischen Reinigungen dünn-schichtchromatographisch einheitlich war. Rf in A = 0,65, in B = 0,85. NMR.-Spektrum siehe Fig. 1.

2,4 g *Bpoc-Leu-Sar-OMe* wurden in 1 Std. bei Zimmertemperatur mit 6,5 mMol 1 N NaOH in Dioxan/Wasser 1:1 verseift. Rf-Wert des Produktes: 0,35 (in A). Nach dem Abdampfen des Dioxans wurde das pH der wässrigen Lösung mit 5 N H_2SO_4 im Eisbad sorgfältig herabgesetzt, bis das Peptid als gallertige Masse ausfiel und in Essigester transferiert werden konnte. Nach dem Neutralwaschen und Trocknen der organischen Phase wurden durch Abdampfen des Lösungsmittels 1,8 g öliges *Bpoc-Leu-Sar-OH* gewonnen (etwa 4 mMol), das sofort mit 860 mg (4 mMol) $HCl.H-Phe-OMe$, 440 mg (4 mMol) 1-Hydroxybenztriazol und 906 mg (4,4 mMol) DCCI in DMF zum geschützten Tripeptid *Bpoc-Leu-Sar-Phe-OMe* umgesetzt wurde. Nach der Aufarbeitung und säulenchromatographischen Reinigung erhielten wir 2,1 g (etwa 3,5 mMol) eines Öls. Rf in A = 0,5, in B = 0,8.

2,1 g öliges *Bpoc-Leu-Sar-Phe-OMe* wurden in der beschriebenen Weise verseift und nach der Aufarbeitung in 5 M HCl in trockenem Essigester gelöst. Diese Lösung wurde 10 Min. gerührt und hierauf mit kaltem und trockenem Diäthyläther versetzt. Das gefällte Tripeptidhydrochlorid wurde mit Diäthyläther gewaschen und im Vakuum über NaOH getrocknet: 1,1 g (3 mMol).

H-Leu-Sar-Phe-OH H_2O : 768 mg (2 mMol) $HCl.H-Leu-Sar-Phe-OH$ wurden in 0,1 N Essigsäure gelöst und durch eine kleine Säule mit schwach basischem Anionenaustauscher (*Merck* II, 5 meq./g) filtriert.

Das Filtrat wurde lyophilisiert. Wir erhielten 670 mg (1,8 mMol) feinflockiges, glänzend weisses Lyophilisat. Dieses Material schmilzt unscharf bei 102–106°. Rf in C = 0,45, in D = 0,65.

Aminosäureanalyse nach Hydrolyse mit 6 N HCl (24 Std. bei 110°), wobei das Ergebnis auf Phenylalanin = 1,0 bezogen wird: Phe = 1,00, Leu = 0,96, Sar = 0,92.

Aufgrund der Elementaranalyse nehmen wir einen Wassergehalt von 1 an.

$C_{18}H_{29}O_5N_3$ Ber. C 58,81 H 7,92 N 11,41% Gef. C 59,23 H 8,03 N 11,27%

$[\alpha]_{589}^{25} = +32,3^\circ$ ($c = 1$ in Wasser).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *R. L. Huguenin & R. A. Boissonnas*, *Helv.* 44, 213 (1961).
- [2] *K. Jošt, J. Rudinger & F. Šorm*, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* 26, 2496 (1961).
- [3] *M. Bergmann, L. Zervas, H. Schleich & F. Leinert*, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 212/213, 72 (1932).
- [4] *P. Sieber & B. Iselin*, *Helv.* 51, 622 (1968).
- [5] *W. König & R. Geiger*, *Chem. Ber.* 103, 788 (1970).
- [6] *J. Rudinger*, in *Peptides, Proceedings of the Fifth European Symposium*, p. 154. Edited by G. T. Young, Pergamon Press, Oxford, London, New-York, Paris (1963).
- [7] *M. Dixon*, *Biochem. J.* 55, 170 (1953).
- [8] *G. Roncari & H. Zuber*, *Int. J. Protein Res.* 1, 45 (1969).
- [9] *R. Spangenberg, R. Tamm & E. Wiensch*, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 352, 655 (1971).
- [10] *M. Brenner & W. Huber*, *Helv.* 36, 1109 (1953).