

Peptidsynthesen mit immobilisierten Enzymen II. Immobilisiertes Trypsin, Thermolysin und Papain¹⁶

**Andreas Könnecke*, Marion Hänslers, Volker Schellenberger und
Hans-Dieter Jakobke**

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

(Eingegangen 20. August 1982. Angenommen 25. Oktober 1982)

*Peptide Synthesis by Means of Immobilized Enzymes II. Immobilized Trypsin,
Thermolysin and Papain¹⁶*

Model studies were performed on the utility of covalently immobilized trypsin, thermolysin and papain for peptide bond formation. Trypsin and thermolysin catalyzed the formation of peptide bonds with nearly the same efficiency as the soluble proteases and they could be re-used successfully for further coupling experiments. The possibility of using immobilized trypsin and papain for kinetically controlled peptide bond formation was investigated. With the serine type enzyme trypsin excellent product yields were obtained starting with ester carboxyl components and an economical ratio of substrates. Experiments with the thiol protease papain were unsatisfactory because the once formed product is hydrolyzed as fast as the starting ester substrate used.

(Keywords: Immobilized enzymes; Papain; Peptide synthesis; Thermolysin; Trypsin)

Einleitung

Das in den letzten Jahren wiedererwachte Interesse an der Einbeziehung proteolytischer Enzyme für peptidsynthetische Operationen dokumentiert sich wohl am deutlichsten durch die Häufung jüngst erschienener Übersichtsarbeiten zu dieser Problematik¹⁻⁷. Die Hauptvorteile der proteasekatalysierten Knüpfung von Peptidbindungen bestehen in der stereospezifischen Wirkung der Biokatalysatoren und in der Möglichkeit, auf jeglichen Seitenkettenschutz verzichten zu können. Somit wird die Problematik der Racemisierung bei Segment-

kondensationen eliminiert, Löslichkeitsprobleme bei längeren vollgeschützten Segmenten treten in den Hintergrund und semisynthetische Manipulationen werden mit Hilfe der Proteasen um ein Vielfaches erleichtert beziehungsweise überhaupt erst möglich. Als Nachteil ist zu nennen, daß auf Grund der Substratspezifität der Proteasen bislang nur spezielle Knüpfungen enzymkatalysiert realisierbar sind. Deshalb wird nach einem Satz für die Peptidsynthese geeigneter proteolytischer Enzyme unterschiedlicher Substratspezifität gesucht, mit dessen Hilfe die verschiedensten Kupplungen enzymkatalysiert realisierbar wären⁸.

Obwohl der Aufbau von Enkephalinen durch ausschließlich enzymatische Knüpfung der Peptidbindungen beschrieben wurde⁹, dürfte die Zukunft der Kombination bewährter chemischer mit neuen enzymatischen Methoden gehören. Unter diesem Gesichtspunkt wurden in unserem Laboratorium weitere methodische Untersuchungen, etwa die Anwendbarkeit von Proteasen für Segmentkondensationen bei der Fest-¹⁰ und Flüssigphasen-Peptidsynthese¹¹, durchgeführt. Die allgemeinen Charakteristika immobilisierter Enzyme¹²⁻¹⁴ veranlaßten uns zum Studium der Eignung immobilisierter Proteasen für die Peptidbindungsknüpfung. Am Beispiel immobilisierten α -Chymotrypsins konnte gezeigt werden, daß es nahezu ebenso effektiv wie das gelöste Enzym die Peptidbindungsbildung katalysiert¹⁵⁻¹⁸. Der immobilisierte Biokatalysator kann mehrfach verwendet werden und die Syntheseprodukte sind im Falle kovalenter Fixierung des Enzyms nicht durch proteolytische Aktivitäten oder denaturiertes Protein verunreinigt.

Auch andere Arbeitsgruppen beschrieben den Einsatz immobilisierter Proteasen für die Peptidsynthese. *Oyama et al.* verwendeten gebundenes Thermolysin zur Synthese von *Z*-Asp-Phe-OMe*, einem Vorläufer des Süßstoffs Aspartam¹⁹. Zur semisynthetischen Umwandlung von Schweine- in Humaninsulin wurden immobilisiertes Trypsin²⁰ und Carboxypeptidasen²¹ benutzt, immobilisiertes Trypsin diente zur Einführung der N'-geschützten Hydrazidgruppe in Modellpeptide²². Weiterhin ist die Plastein-Bildung durch immobilisiertes Chymotrypsin beschrieben worden^{23,24}.

In dieser Arbeit berichten wir über Modellstudien zur Anwendung von immobilisiertem Trypsin, Thermolysin und Papain zur Peptidbindungsknüpfung.

* Abkürzungen: Die IUPAC/IUB-Regeln für Aminosäure- und Peptidderivate wurden befolgt; vgl. *Eur. J. Biochem.* **53**, 1 (1975). Die verwendeten Aminosäuren hatten *L*-Konfiguration. *Boc* = *tert*-Butyloxycarbonyl, *Z* = Benzyloxycarbonyl, *Ac* = Acetyl, *Bz* = Benzoyl, —OMe = Methyl ester, —OEt = Ethylester, —OBu^t = *tert*-Butylester.

Ergebnisse und Diskussion

Wie bei den Untersuchungen mit immobilisiertem α -Chymotrypsin gaben wir auch bei Trypsin, Thermolysin und Papain der kovalenten Bindung der Enzyme an das polymere Trägermaterial den Vorzug, da hiermit der Ablösung der Enzyme unter den für die Peptidbindungsknüpfung angewandten Reaktionsbedingungen vorgebeugt wird.

Zur kovalenten Fixierung von Trypsin existiert eine fast unüberschaubare Fülle von Publikationen, z. B. Lit.^{12,13,25-27}. Diese Untersuchungen manifestieren die Schwierigkeit, Trypsin mit einer hinreichend hohen relativen Aktivität zu binden, was unter anderem der starken Autolysetendenz des Enzyms²⁸ zugeschrieben werden könnte. Obwohl im Rahmen von Untersuchungen zur tryptischen Semisynthese von Humaninsulin gezeigt wurde, daß die Autolyse des löslichen Trypsins durch Zusatz hoher Konzentrationen von mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln sowie von Calciumsalzen nahezu völlig unterdrückt werden kann²⁹, bietet das Enzym in immobilisierter Form Vorteile wie beispielsweise die Wiederverwendbarkeit und den möglichen Einsatz für (semi)kontinuierliche Verfahren. Die von uns angewandten kovalenten Fixierungsvarianten an Kieselgel (Acylierung der Lysinreste des Proteins) und an Enzacryl AA (Diazokupplung vorzugsweise an Tyrosinreste des Enzyms) ergaben mit relativen Esteraseaktivitäten, bezogen auf natives Trypsin, von 46% und 70% gegenüber *Bz-Arg-OEt* als Substrat Präparationen mit überaus zufriedenstellender Aktivität. Thermolysin wurde in Anlehnung an eine publizierte Vorschrift³⁰ an Enzacryl AH gebunden, Papain wurde an mit Glutarsäuredichlorid aktiviertes Aminopropyl-Kieselgel und an Enzacryl AA fixiert.

Die in Tab. 1 zusammengefaßten Resultate dokumentieren die Eignung von immobilisiertem Trypsin und Thermolysin zur Peptidbindungsknüpfung. Die Auswahl der Modellpeptide erfolgte in Anlehnung an erfolgreiche Kupplungsexperimente mit den gelösten Proteasen^{31,32}. Bei den Experimenten mit *Z-Lys-OMe* als Carboxylkomponente wurden den Syntheseansätzen 12,5% (*v/v*) Dimethylformamid als Lösungsvermittler zugesetzt und damit gute Ausbeuten erzielt. Einige Versuche im wäßrig-organischen Zweiphasensystem mit Tetrachlorkohlenstoff als organische Komponente ergaben keine verbesserten Ausbeuten. Bei den durch immobilisiertes Thermolysin katalysierten Kupplungen besaßen die Carboxylkomponenten im Puffer eine ausreichende Löslichkeit, so daß die Auswahl von Cosolventien ebenso wie bei der Kombination Trypsin/*Bz-Arg-OEt* gänzlich entfiel. Mit dem trägerfixierten Thermolysin konnten in der gleichen Reaktionszeit, die für das lösliche Enzym angewandt wurde, gute Produkt-

Tabelle 1. *Synthese von Modellpeptiden mittels immobilisiertem Trypsin und Thermolysin*

| Peptid ^a | Enzym | Trägermaterial | Menge gebundenes Enzym (mg) | Ausbeute (%) |
|-------------------------------------|-------------|----------------|-----------------------------|--------------|
| Z-Lys + Leu-NH ₂ | Trypsin | Kieselgel | 6 | 71 |
| Z-Lys + Leu-NH ₂ | Trypsin | Enzacryl AA | 2,5 | 66 |
| Bz-Arg + Leu-Ala-NH ₂ | Trypsin | Kieselgel | 4 | 76 |
| Z-Phe + Leu-NH ₂ | Thermolysin | Enzacryl AH | 0,6 | 84 |
| Z-Ala-Phe + Leu-NH ₂ | Thermolysin | Enzacryl AH | 0,5 | 48 |
| Z-Leu-Met + Leu-NH ₂ | Thermolysin | Enzacryl AH | 0,4 | 65 |
| Z-Leu-Met + Ile-Ala-NH ₂ | Thermolysin | Enzacryl AH | 0,5 | 69 |

^a Das + bedeutet die enzymkatalysiert gebildete Peptidbindung.

^b Bezogen auf die Carboxylkomponente.

ausbeuten erhalten werden. Bei keinem der angeführten Versuche ist eine Optimierung angestrebt worden.

Alle in Tab. 1 aufgeführten Modellpeptide fielen während der Kupplungsreaktion aus, wodurch das Gleichgewicht in Richtung Synthese verschoben wurde. Zur Isolierung der Reaktionsprodukte machte es sich dadurch jedoch erforderlich, diese nach beendeter Kupplung mit einem organischen Lösungsmittel, Methanol oder Dimethylformamid wurden verwendet, vom immobilisierten Enzym abzulösen. Die Behandlung mit einem reinen organischen Lösungsmittel stellt zweifellos eine extreme Beanspruchung der gebundenen Protease dar, aber ungeachtet dessen war es möglich, immobilisiertes α -Chymotrypsin unter derartigen Bedingungen wiederholt zur Peptidbindungsknüpfung einzusetzen¹⁶. Es galt zu untersuchen, ob dies auch mit immobilisiertem Trypsin und Thermolysin möglich wäre, denn erst der Nachweis der Wiederverwendbarkeit kann den zur Immobilisierung notwendigen Aufwand kompensieren und die Vorteile des Einsatzes des Biokatalysators in immobilisierter Form demonstrieren.

Die in Tab. 2 zusammengestellten Ergebnisse weisen nach, daß immobilisiertes Trypsin und Thermolysin mit sehr guten Resultaten für mehrfache Kupplungen verwendet werden können. Auch bei dem hohen *pH*-Wert von 10,5, wie er für die tryptischen Kupplungen angewandt wurde und bei dem eine partielle Auflösung des Kieselgels und damit eine Ablösung des Enzyms vom Träger zu befürchten war, ergab sich nach fünf Verwendungen der Enzympräparation eine im Rahmen der Fehlergrenze (ca. $\pm 3\%$) liegende Produktausbeute. Sicher

Tabelle 2. Mehrfache Verwendung von immobilisiertem Trypsin und Thermolysin zur Peptidbindungsknüpfung

| Peptid | Enzym | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | Verwendung |
|----------------------------------|----------------------|-----------------|----|----|----|----|------------|
| | | (Ausbeute in %) | | | | | |
| Z-Lys + Leu-NH ₂ | Trypsin ^a | 71 | 73 | 75 | 72 | 72 | |
| Z-Lys + Leu-NH ₂ | Trypsin ^b | 66 | 67 | 70 | 68 | 67 | |
| Bz-Arg + Leu-Ala-NH ₂ | Trypsin ^a | 76 | 70 | 70 | — | — | |
| Z-Phe + Leu-NH ₂ | Thermolysin | 84 | 78 | 81 | 70 | — | |

^a Kieselgel als Trägermaterial.

^b Enzacryl AA als Trägermaterial.

liegt die eingesetzte Initialenzymmenge über der zur erfolgreichen Katalyse der Kupplung notwendigen Enzymmenge, womit geringe Verluste durch Ablösung und/oder durch Inaktivierung nach fünf Wiedernutzungen noch nicht merkbar-ins Gewicht fallen.

Untersuchungen zur Operations- und Langzeitstabilität des immobilisierten Trypsins ergaben, daß nach 6 Monaten Aufbewahrung in bidestilliertem Wasser bei 4 °C die Esteraseaktivität des Trypsin-Kieselgel-Konjugates auf 38% der anfänglich gemessenen abgesunken war. Nach 12 Monaten betrug die Aktivität nur noch 14%, mit dieser Präparation konnten aber bei Einsatz der gleichen Enzymmenge noch 50% d. Th. Z-Lys-Leu-NH₂ erhalten werden. Beim Enzacryl AA-Trypsin fiel die Aktivität nach 6 Monaten auf 45% und Z-Lys-Leu-NH₂ entstand mit 53% Ausbeute. Nach den fünf in Tabelle 2 angeführten Verwendungen besaß die Enzympräparation noch 71% der Ausgangsaktivität. Diese Befunde bezeugen die geringere Stabilität des immobilisierten Trypsins im Vergleich zum Chymotrypsin, das sich noch nach 2—3 Jahren ohne Unterschiede im Umsatz zur Peptidbindungsknüpfung verwenden ließ³³.

Das Gleichgewicht einer proteasekatalysierten Reaktion kann generell durch Unlöslichkeit des Reaktionsproduktes, durch einen hohen Überschuß eines Substrates sowie durch Zusätze hoher Konzentrationen von mit Wasser mischbaren Cosolventien thermodynamisch in Richtung Synthese verschoben werden. Als Alternative ist bei Einsatz esterolytischer Proteasen und Estern als Carboxylkomponenten eine kinetisch kontrollierte Reaktionsführung möglich^{11, 18, 31, 34, 35}. Die mechanistische Grundlage dafür besteht in dem unterschiedlichen Acylierungspotential von Estern und Amiden infolge der differenzierten Aktivierung der Carbonylfunktion. In Übereinstimmung mit der

chemischen Reaktivität steht die Tatsache, daß Serinproteasen mit Peptidestern wesentlich schneller Acylenzym-Intermediate bilden als mit Peptidamiden oder Peptiden. In der Hydrolysekinetik kommt dies darin zum Ausdruck, daß bei Estern die Acylenzymbildung so rasch erfolgt, daß die Deacylierung geschwindigkeitsbestimmend ist. Bei Peptiden und Peptidamiden dagegen ist die Acylierung der Protease der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Unter den Bedingungen der kinetischen Synthesekontrolle, das Reaktionsprodukt bleibt hier in Lösung, ist demnach die Protease solange mit Ester-Carboxylkomponente substratgesättigt, solange diese in einer der Enzymkonzentration vergleichbaren Menge vorliegt. Erst dann steht wieder „freies“ Enzym zur Verfügung, welches das Reaktionsprodukt wieder hydrolytisch spalten kann. Es findet also eine kinetische Akkumulation des Reaktionsproduktes mit einer über der thermodynamischen Gleichgewichtskonzentration liegenden Konzentration statt. Das Ausmaß der Produktsynthese hängt dabei primär vom Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten der um das Acylenzym konkurrierenden Reaktionen der Aminolyse und Hydrolyse ab³⁴.

Die Vorzüge der Anwendung immobilisierter Proteasen zur Peptidbindungsknüpfung werden bei der kinetisch kontrollierten Reaktionsführung besonders deutlich, da die Reaktionsprodukte in Lösung bleiben und die Behandlung mit organischen Lösungsmitteln zur Ablösung der Produkte entfällt. Am Beispiel Kieselgel-gebundenen α -Chymotrypsins konnte gezeigt werden, daß *Ac*-Phe-Ala-NH₂ mit guter Ausbeute aus nahezu äquimolaren Mengen *Ac*-Phe-OMe und H-Ala-NH₂ kinetisch kontrolliert entstand¹⁸.

Unter veränderten experimentellen Bedingungen blieb *Bz*-Arg-Leu-Ala-NH₂ in Lösung und wir untersuchten dessen kinetisch kontrollierte Bildung aus *Bz*-Arg-OEt und H-Leu-Ala-NH₂ unter Katalyse von immobilisiertem Trypsin und Papain analytisch mit Hilfe der reversed-phase Hochdruckflüssigkeitschromatographie (RPHPLC). Beim Einsatz des Trypsin-Enzacyl AA-Konjugats als Biokatalysator war bereits nach 1 min *Bz*-Arg-OEt nicht mehr nachweisbar und das Umsatzmaximum betrug 89% d. Th. *Bz*-Arg-Leu-Ala-NH₂. Im Gegensatz zur raschen Produktsynthese erfolgt die anschließende tryptische Hydrolyse des Reaktionsproduktes relativ langsam. Nach 5 min waren 86%, nach 10 min nur noch 79% *Bz*-Arg-Leu-Ala-NH₂ chromatographisch nachweisbar (Tab. 3). Bemerkenswert ist, daß die Reaktion mit dem immobilisierten Enzym ebenso schnell wie bei Verwendung des gelösten Enzyms³¹ abläuft. Von präparativer Signifikanz ist die relativ ausgeprägte Plateauphase des Reaktionsproduktes, bevor dessen hydrolytische Spaltung merklich ins Gewicht fällt. Bei Verringerung der

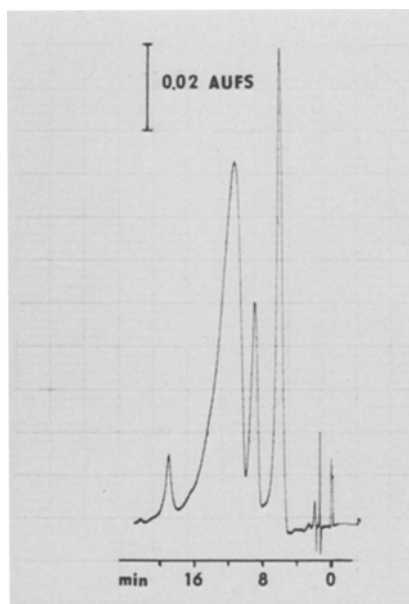


Abb. 1. RPHPLC-Chromatogramm eines kinetisch kontrollierten Reaktionsansatzes, Elutionsfolge: *Bz*-Arg-OH, *Bz*-Arg-Leu-Ala-NH₂, *Bz*-Arg-OEt, H-Leu-Ala-NH₂, Fluß 1,24 ml/min, *T* 22 °C, Δp 51 bar, UV-Detektion 220 nm 0,2 AUFS, 0,25 cm/min Papiervorschub

Tabelle 3. Zeitabhängigkeit der kinetisch kontrollierten Bildung von *Bz*-Arg-Leu-Ala-NH₂ mit immobilisiertem Trypsin

| Zeit (min) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 9 | 10 |
|-------------------------|----|----|------|----|----|------|----|----|----|
| Umsatz (%) ^a | 89 | 88 | 86,5 | 86 | 86 | 84,5 | 84 | 81 | 79 |

^a Bezogen auf *Bz*-Arg-OEt, analytisch mit RPHPLC bestimmt.

Reaktandenkonzentration (0,05 *M* *Bz*-Arg-OEt, 0,1 *M* H-Leu-Ala-NH₂) findet die Synthesereaktion nur in untergeordnetem Maße statt und es dominiert die Hydrolyse des Estersubstrates. Das bestätigt den Befund³¹, daß zur tryptischen Peptidbindungsbildung die Reaktandenkonzentration $\geq 0,1$ *M* sein sollte.

Die Versuche zur kinetisch kontrollierten Synthese von *Bz*-Arg-Leu-Ala-NH₂ mit immobilisiertem Papain verliefen weniger erfolgreich. Die in Tab. 4 zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß es nicht

Tabelle 4. *Zeitabhängigkeit der Umsetzung von Bz-Arg-OEt mit H-Leu-Ala-NH₂ katalysiert durch immobilisiertes Papain*

| <i>pH</i> -Wert | Zeit (min) | Bz-Arg-OEt (%) | Bz-Arg-OH (%) | Bz-Arg-Leu-Ala-NH ₂ (%) |
|-----------------|------------------|-------------------|------------------|---------------------------------------|
| 7,3 | 30 | 64 | 23 | 13 |
| | 60 ^a | 42 | 45 | 13 |
| | 120 ^a | 35 | 51 | 14 |
| 7,7 | 5 | 76,5 | 9,5 | 14 |
| | 10 | 67,5 | 13 | 19,5 |
| | 15 ^a | 67 | 12,5 | 20,5 |
| 8,9 | 5 | 76,5 | 8,5 | 15 |
| | 10 | 61 | 14 | 25 |
| | 20 | 45 | 26 | 29 |
| | 40 | 14,5 | 56,5 | 29 |

^a Bz-Arg-OH teilweise ausgefallen.

zu einer kinetisch kontrollierten Produktakkumulation kommt. In Abhängigkeit vom *pH*-Wert stellt sich eine relativ konstante Produktkonzentration ein, Bz-Arg-OEt wird langsam verbraucht und in gleichem Maße steigt die Konzentration von Bz-Arg-OH an.

Beim Papain ist das Verhältnis der Acylierungsgeschwindigkeiten durch Ester- und Amidsubstrate viel geringer als auf Grund der unterschiedlichen chemischen Reaktivität zu erwarten wäre, was auf zusätzliche Wasserstoffbrücken des Amidsubstrates mit der Carbonylgruppe von Asp₁₅₈ des Enzyms zurückgeführt wird³⁶. Bei dem Substratpaar Bz-Arg-OEt/Bz-Arg-NH₂ beträgt das Verhältnis der Acylierungsgeschwindigkeiten nur 17³⁶ und das Verhältnis der proteolytischen Konstanten k_{cat}/K_m 4³⁷; dagegen als Vergleich für Ac-Phe-OMe/Ac-Phe-NH₂ und Chymotrypsin rund 2000 bzw. 36 500³⁸.

Auf Grundlage dieser Befunde lassen sich die Ergebnisse der Syntheserversuche so interpretieren, daß die Produktbildung bis zu einer bestimmten Konzentration erfolgt, bei welcher dann das Estersubstrat und das Reaktionsprodukt um das Enzym konkurrieren und somit eine kinetisch kontrollierte Akkumulation des Produkts ausbleibt.

Folglich ist zur erfolgreichen Durchführung kinetisch kontrollierter Peptidsynthesen nicht jede esterolytische Protease geeignet. Als zusätzliche Randbedingung muß erfüllt sein, daß die Acylierung des Enzyms durch das Estersubstrat erheblich schneller als durch das Reaktionsprodukt erfolgt.

Experimenteller Teil

Materialien und Methoden

Die Enzyme Trypsin (EC 3.4.21.4) und Thermolysin (EC 3.4.24.4) waren Handelsprodukte der Fa. Boehringer (Mannheim BRD), Papain (EC 3.4.22.2) mit 1 Anson-Einheit/g war ein Produkt der Fa. Merck (Darmstadt, BRD). Enzaeryl AA und AH (Koch & Light, England), Kieselgel Si 60, 70—230 mesh (Merck), *Bz*-Arg-OEt·HCl (Fluka, Scheiz), *Z*-Lys(*Boc*)-OH·*DCHA* sowie weitere Aminosäuren und Derivate (Reanal, Ungarn) wurden von den jeweiligen Firmen bezogen. Alle weiteren Reagenzien und Lösungsmittel waren entweder analysenrein oder wurden nach bekannten Verfahren gereinigt und getrocknet bzw. synthetisiert.

Z-Lys-OMe·HCl wurde aus *Z*-Lys(*Boc*)-OH durch Veresterung mit Diazomethan und anschließender acidolytischer Entfernung der *Boc*-Gruppe mit 1,2 *N* HCl in *AcOH* als Öl erhalten; Gesamtausbeute 90—95% d. Th. *Z*-Ala-Phe-OH und *Z*-Leu-Met-OH entstanden durch Subtilisin-katalysierte Deblockierung der entsprechenden durch Mischanhydridkupplung¹⁶ synthetisierten *Z*-Dipeptidmethylester³⁹. H-Ile-Ala-NH₂ und H-Leu-Ala-NH₂·HCl wurden aus den durch Mischanhydridkupplung dargestellten *Boc*-Dipeptidmethylestern durch Ammonolyse mit NH₃ in *MeOH* und folgende Abspaltung der *Boc*-Gruppe mit HCl/*AcOH* erhalten.

Die Einheitlichkeit aller Substrate wurde dünnschichtchromatographisch auf Silufol-Fertigfolien (Kavalier, CSSR) in den Laufmitteln CHCl₃/*MeOH* (9:1), CHCl₃/*Me*₂CO/*MeOH* (7:2:1) und *n*-BuOH/*AcOH*/H₂O (4:1:1) und/oder durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie geprüft. Für die analytische reversed-phase Hochdruckflüssigkeitschromatographie (RPHPLC) stand ein Liquochrom 307 mit einem OE 308 UV-Detektor mit variabler Wellenlänge und einem stopped-flow Injektionssystem (Labor MIM, Ungarn) sowie ein Dukol UV-Festwellendetektor (254 nm) der Fa. Carl Zeiss (DDR) zur Verfügung. Die Trennungen erfolgten an einer Hewlett-Packard-Fertigsäule 200 × 4,6 mm, gepackt mit Lichrosorb RP-18, 10 μm und isokratischer Elution mit *MeOH*/*MeCN*/0,1% H₃PO₄ (67,5 + 2,5 + 30, *v/v/v*). Das Elutionsmittel wurde mit Ultraschall im Wasserstrahlvakuum entgast und bei Flußraten von 0,8—1,5 ml/min betrug der Druckabfall 35—65 bar bei 26—28 °C Säulensäuletemperatur. Das chemische Tailing und Peakverbreiterung bei Trennungen von Verbindungen mit basischen Aminosäuren wurde in Kauf genommen, da die Auflösung hinreichend gut war (Abb. 1). Die Kapazitätsfaktoren *k'* einiger Substrate und Produkte betragen: *Z*-Phe-OH 0,88; *Z*-Phe-Leu-NH₂ 1,06; *Z*-Leu-Met-OH 0,88; *Z*-Leu-Met-Leu-NH₂ 3,59; *Z*-Leu-Met-Ile-Ala-NH₂ 4,32; *Z*-Lys-OMe 0,38; *Z*-Lys-Leu-NH₂ 4,47; *Bz*-Arg-OH 2,20; *Bz*-Arg-OEt 5,00; *Bz*-Arg-Leu-Ala-NH₂ 3,82. Als Totzeit wurde die Retentionszeit von *MeOH* verwendet.

Immobilisierung

Trypsin: Die kovalente Bindung an Kieselgel 60 erfolgte nach der N-Hydroxysuccinimidoester-Methode^{40,41}, ausgehend von 3-Aminopropylkieselgel mit ca. 0,7 mmol NH₂-Gruppen/g¹⁰. 1 g Kieselgel-Aktivester-Konjugat und 100 mg Trypsin wurden in 0,1 *M* Boratpuffer *pH* 8,4 2 h bei Raumtemperatur umgesetzt und wie üblich proteinfrei gewaschen. Der Proteingehalt betrug laut Aminosäureanalyse 11 mg/g Kieselgel mit einer relativen Aktivität von 46%

und einer Aktivität von 190 U/g, bestimmt mit *Bz-Arg-OEt* bei *pH* 7,9 am Autotitrator TTT 1 d (Radiometer, Dänemark). Zur Immobilisierung an Enzacryl AA wurden 500 mg Trägermaterial in 50 ml 2 *N* HCl mit 20 ml 4% NaNO₂-Lösung bei 0 °C diazotiert, mit 0,1 *M* Phosphatpuffer *pH* 7 gewaschen und in 8 ml dieses Puffers mit 50 mg Trypsin während 2 h bei Raumtemperatur gekuppelt, anschließend mit 0,01% Phenollösung in 10%iger NaAc-Lösung 15 min gerührt und dann gewaschen. Es wurden 52 mg/g Träger an Protein mit einer relativen Aktivität von 70% und einer Aktivität von 1400 U/g gebunden.

Thermolysin: Dieses Enzym wurde wie beschrieben³⁰ an Enzacryl AH fixiert, wobei jedoch 100 mg der kommerziellen Enzympräparation in 10 ml Phosphatpuffer (25 mM, *pH* 8) suspendiert und durch Zentrifugation von Calciumsalzen abgetrennt wurden. Der Überstand mit einem Proteingehalt von ca. 5 mg/ml wurde zur Immobilisierung an 1 g aktivierten Träger verwendet, wobei 10 mg/g Trägermaterial an Protein gebunden wurden; auf eine Aktivitätsbestimmung wurde verzichtet.

Papain: Zur Bindung an Kieselgel 60 wurden 1 g 3-Aminopropyl-Kieselgel in 20 ml CH₂Cl₂ mit 1,5 ml Glutarsäuredichlorid und 0,11 ml Triethylamin aktiviert, gründlich mit CH₂Cl₂ gewaschen und im Vak. getrocknet. Der aktivierte Träger wurde mit 15 ml Enzymlösung in 0,05 *M* Boratpuffer *pH* 8,3 (60 U/ml) 0,5 h gerührt. Die gebundene Enzymaktivität betrug lediglich 35 U/g, titrimetrisch mit *Bz-Arg-OEt* bei *pH* 7,4 bestimmt. Die Immobilisierung an Enzacryl AA wurde wie für Trypsin beschrieben durchgeführt, wobei 10 ml Enzymlösung mit 1 g Träger über Nacht bei 4 °C umgesetzt wurden. Die gebundene Aktivität betrug 240 U/g Träger.

Enzymatische Synthesen

Alle Syntheserversuche mit den immobilisierten Proteasen wurden in 2 ml-Ansätzen bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei den Enzacryl-Enzym-Konjugaten konnte auf Grund deren mechanischer Stabilität magnetisch gerührt werden, was bei den Kieselgel-gebundenen Enzymen zur Pulverisierung des Trägers führt und hierfür deshalb ein Mikrorührer verwandt wurde. Für die kinetisch kontrollierten Synthesen fanden Reaktionsgefäße mit Frittenboden Anwendung, womit die Reaktion einfach durch Absaugen der Reaktionslösung unterbrochen werden kann.

Trypsin: Die Ansätze enthielten 0,12 *M* *Z-Lys-OMe*·HCl und 0,18 *M* *H-Leu-NH₂*·HCl in 1 *M* Carbonatpuffer, *pH* 10,5 bzw. 0,1 *M* *Bz-Arg-OEt*·HCl und 0,2 *M* *H-Leu-Ala-NH₂*·HCl in 0,5 *M* Carbonatpuffer, *pH* 10,5 sowie die in Tab. 1 angegebene Menge immobilisiertes Trypsin. Um *Z-Lys-OMe* in Lösung zu halten, waren außerdem 12,5% Dimethylformamid erforderlich. Nach 45 bzw. 15 min Rühren wurde abgesaugt und das ausgefallene Reaktionsprodukt mit Methanol vom immobilisierten Enzym abgelöst. Nach Einengen des methanolischen Filtrats wurde der Rückstand in dest. Wasser gelöst, auf eine 2 × 6 cm-Amberlite IRA 400-Austauschersäule aufgegeben, mit Wasser eluiert, das Eluat im Vak. eingengt und die Ausbeute gravimetrisch bestimmt. *Bz-Arg-Leu-Ala-NH₂* enthielt nach dieser Aufarbeitung noch ca. 7% *Bz-Arg-OH* (laut RPHPLC), das nicht am Austauscher gebunden wurde. *Z-Lys-Leu-NH₂* war RPHPLC-einheitlich und schmolz bei 140–145 °C (Zers.), $[\alpha]_D^{23} - 10,2^\circ$ (*c* = 1, *MeOH*). 0,1 *M* *Bz-Arg-OEt*·HCl und 0,2 *M* *H-Leu-Ala-NH₂*·HCl in 0,2 *M* Carbonatpuffer, *pH* 10,5 mit 20% Dimethylformamid und 40 U Enzacryl-AA-Trypsin wurden zur kinetisch kontrollierten Synthese von *Bz-Arg-Leu-Ala-*

NH₂ (Tab. 3) eingesetzt. Die *pH*-Werte in den Reaktionsansätzen wurden mit 4 *N* NaOH korrigiert.

Thermolysin: 0,05 *M* Z-Phe-OH bzw. Z-geschützte Dipeptidsäure, 0,08 *M* Nucleophil und Enzacyl-AH-Thermolysin (Tab. 1) in 0,2 *M* Tris-Maleat-Puffer, *pH* 7,0, wurden 20 h gerührt, dann abgesaugt und das Reaktionsprodukt mit einigen Portionen vorgekühltem Dimethylformamid vom immobilisierten Enzym abgelöst. Das Filtrat wurde mit dem 10–15fachen Volumen dest. Wasser versetzt und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt, das ausgefallene Peptid abgesaugt, mit 1 *N* HCl und gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen und im Vak. getrocknet. Nach Überprüfung der Einheitlichkeit wurde die Ausbeute gravimetrisch bestimmt.

Papain: 0,1 *M* Bz-Arg-OEt·HCl und 0,12 *M* H-Leu-Ala-NH₂·HCl wurden in 0,1 *M* Phosphatpuffer *pH* 7,3 und 7,7 sowie in Carbonatpuffer *pH* 8,9 (0,1 *M*) mit 10 U, 22 U Kieselgel-Papain und 22 U Enzacyl-AA-Papain umgesetzt. Um das bei den ersten Synthesen bemerkte Ausfallen von Bz-Arg-OH zu vermeiden, wurden bei *pH* 8,9 20% Dimethylformamid zugesetzt. Die Umsatzbestimmung erfolgte hierbei ausschließlich analytisch mit RPHPLC.

Literatur

- 1 *Isowa Y.*, *Yuki Gosei Kagaku Kyokaiishi* **36**, 195 (1978); *C.A.* **89**, 18465 (1978).
- 2 *Brtnik F.*, *Jost K.*, *Chem. Listy* **74**, 951 (1980).
- 3 *Glass J. D.*, *Enzyme Microb. Technol.* **3**, 2 (1981).
- 4 *Morihara K.*, *Taupakushitsu Kakusan Koso* **26**, 1979 (1981); *C.A.* **95**, 216416 (1981).
- 5 *Fرتون J. S.*, in: *Adv. Enzymol.* Vol. 53 (*Meister A.*, Hrsg.), S. 239. New York: John Wiley, 1982.
- 6 *Jakubke H.-D.*, *Kuhl P.*, *Pharmazie* **37**, 89 (1982).
- 7 *Chaiken I. M.*, *Komoriya A.*, *Ohno M.*, *Widmer F.*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **7**, 385 (1982).
- 8 *Könnecke A.*, *Jakubke H.-D.*, *Monatsh. Chem.* **112**, 1099 (1981).
- 9 *Kullmann W.*, *J. Biol. Chem.* **255**, 8234 (1980); **256**, 1301 (1981).
- 10 *Könnecke A.*, *Detlaff S.*, *Jakubke H.-D.*, *Monatsh. Chem.* **113**, 331 (1982).
- 11 *Könnecke A.*, *Pchalek V.*, *Jakubke H.-D.*, in Vorbereitung.
- 12 *Immobilized Enzymes, Research and Development* (*Chibata I.*, Hrsg.). Tokyo: Kodansha Ltd. 1978.
- 13 *Immobilized Enzymes, Methods in Enzymology*, Vol. 44 (*Mosbach K.*, Hrsg.). New York: Academic Press. 1976.
- 14 *Izumi Y.*, *Chibata I.*, *Itoh T.*, *Angew. Chem.* **90**, 187 (1978).
- 15 *Kuhl P.*, *Könnecke A.*, *Döring G.*, *Däumer H.*, *Jakubke H.-D.*, *Tetrahedron Lett.* **1980**, 893.
- 16 *Teil I. Könnecke A.*, *Bullerjahn R.*, *Jakubke H.-D.*, *Monatsh. Chem.* **112**, 469 (1981).
- 17 *Kuhl P.*, *Könnecke A.*, *Döring G.*, *Jakubke H.-D.*, DDR WP 144 538.
- 18 *Jakubke H.-D.*, *Bullerjahn R.*, *Hänslers M.*, *Könnecke A.*, *Proc. 4th Int. Symp. on Affinity Chromatography and Related Techniques*, in *Analytical Chemistry Symposia Series*, Vol. 9 (*Gribnanu T. J. C.*, *Visser J.*, *Nivard R. J. F.*, Hrsg.), S. 529. Amsterdam: Elsevier. 1982.
- 19 *Oyama K.*, *Nishimura S.*, *Nonaka Y.*, *Kihara K.*, *Hashimoto T.*, *J. Org. Chem.* **46**, 5241 (1981).

- 20 *Markussen J.*, Dän. Offenl. 3104949.
- 21 *Breddam K., Widmer F., Johansen J. T.*, Eur. Pat. Appl. 0045187.
- 22 *Yagisawa S.*, J. Biochem. **89**, 491 (1981).
- 23 *Varanini Z., Pallavicini C., Fincati G., Dal Belin Peruffo A.*, Industrie Alimentari **18**, 735 (1979).
- 24 *Karube I., Yugeta Y., Suzuki S.*, J. Mol. Catal. **9**, 445 (1980).
- 25 *Brown E., Minier F.*, Makromol. Chem. **176**, 2523 (1975); *Brown E., Racois A.*, J. Chem. Res. (S) **1977**, 52; *Brown E., Tonet J.*, J. Chem. Res. (S) **1979**, 290.
- 26 *Manecke G., Pohl R.*, Makromol. Chem. **179**, 2361 (1978); *Manecke G., Vogt H.-G., Polakowski D.*, Makromol. Chem. Suppl. **3**, 107 (1979); *Manecke G., Heydolph S.*, Makromol. Chem. **182**, 2641 (1981).
- 27 *Rudel M., Gabert A.*, Acta Biol. Med. Germ. **38**, 41 (1979).
- 28 *Gabel D., Kasche V.*, Acta Chem. Scand. **27**, 1971 (1973).
- 29 *Inouye K., Watanabe K., Tochino Y., Kobayashi M., Shigeta Y.*, Biopolymers **20**, 1845 (1981).
- 30 *Epton R., Hippert B. L., Thomas T. H.*, Methods Enzymol. **44**, 95 (1976).
- 31 *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.
- 32 *Oka T., Morihara K.*, J. Biochem. **88**, 807 (1980).
- 33 *Könnecke A., Jakubke H.-D.*, unpubliziert.
- 34 *Fastrez J., Fersht A. R.*, Biochemistry **12**, 2025 (1973); *Fersht A. R., Blow D. M., Fastrez J.*, Biochemistry **12**, 2035 (1973).
- 35 *Widmer F., Johansen J. T.*, Carlsberg Res. Commun. **44**, 37 (1979); *Breddam K., Widmer F., Johansen J. T.*, Carlsberg Res. Commun. **46**, 121 (1981).
- 36 *Asbóth B., Polgár L.*, Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **12**, 329 (1977).
- 37 *Whitaker J. R., Bender M. L.*, J. Amer. Chem. Soc. **87**, 2728 (1965).
- 38 *Zerner B., Bond R. P. M., Bender M. L.*, J. Amer. Chem. Soc. **86**, 3674 (1964).
- 39 *Könnecke A., Jakubke H.-D.*, in Vorbereitung.
- 40 *Lynn M.*, in: Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies and Peptides (*Weetall H. H.*, Hrsg.). New York: Marcel Dekker. 1975.
- 41 *Cuatrecasas P., Parikh I.*, Biochemistry **11**, 2291 (1972).