

Modelluntersuchungen zur pepsinkatalysierten Peptid- synthese im wäßrig-organischen Zweiphasensystem **

Peter Kuhl*, Andreas Wilsdorf und Hans-Dieter Jakubke

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

(Eingegangen 5. November 1982. Angenommen 20. Dezember 1982)

Model Studies on Pepsin-Catalyzed Peptide Synthesis in a Biphasic Aqueous-Organic System

The usefulness of biphasic aqueous-organic solvent systems for pepsin-catalyzed synthesis of model peptides *Z-X-Phe-Phe-OMe* (*X* = Ala, Gln, Leu) has been demonstrated by coupling the corresponding *Z-X-Phe-OH* with *H-Phe-OMe*. The influence of various organic solvents on pepsin activity was examined. Some examples are given for the influence of nucleophile and enzyme concentration, buffer *pH* and organic solvent portion on product yield. Tetrachloromethane and mixtures of ethyl acetate/*n*-hexane proved to be especially useful allowing syntheses in good yields and within comparatively short reaction times of 2–6 hours.

(*Keywords: Enzymic synthesis in biphasic systems; Pepsin-catalyzed peptide bond formation; Peptide synthesis*)

Einleitung

Das im Magen der Wirbeltiere vorkommende Pepsin ist ein proteolytisches Enzym, dessen katalytische Wirkung bei der Knüpfung von Peptidbindungen schon vor nahezu hundert Jahren im Experiment beobachtet werden konnte. So erhielt im Jahre 1886 *Danilevski*¹ bei der Einwirkung eines Rohenzymextraktes des Magens auf Proteinpartialhydrolysate unlösliche Eiweißprodukte, die später als Plastein bezeichnet wurden und deren Entstehung wiederholt den Gegenstand näherer Untersuchungen bildete².

** *Abkürzungen:* für Aminosäure- und Peptidderivate vgl. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *J. Biol. Chem.* **247**, 977 (1972); *Ac* = Acetyl-, *Z* = Benzyloxycarbonyl-, *—OMe* = Methyl ester.

Pepsin spaltet bzw. knüpft vorzugsweise Peptidbindungen zwischen aromatischen Aminosäuren. Peptidsubstrate vom Typ $A-X-Y-B$, wobei $X-Y$ die zu spaltende Bindung darstellt, werden hydrolysiert, wenn $X = \text{Phe}$ und $Y = \text{Phe, Tyr}$ oder Trp sind. Wesentlich langsamere Reaktionen erfolgen, wenn sich in den Positionen X und Y andere hydrophobe Aminosäuren (z. B. Met, Leu) befinden³.

Als proteasekatalysierte Peptidsynthesen gegen Ende der siebziger Jahre verstärktes Interesse fanden, wurde auch Pepsin zur Darstellung verschiedener Oligopeptidderivate herangezogen⁴⁻⁹. Die Reaktionen erfolgten in Citrat-, *Michaelis*- oder *McIlwaine*-Puffer (pH -Bereich 2-5), wobei aus Löslichkeitsgründen in vielen Fällen mit Wasser mischbare Lösungsmittel (Methanol, Ethanol, *DMF*, Dioxan) zugesetzt wurden. Die dadurch ebenfalls erhöhte Produktlöslichkeit wirkt sich aber einerseits infolge verminderter Produktausfällung ungünstig auf die Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes in Richtung Peptidsynthese aus, zum anderen begünstigt sie die Sekundärhydrolyse des gebildeten Peptids.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das für verschiedene proteasekatalysierte Peptidsynthesen erfolgreich verwendete wäßrig-organische Zweiphasensystem¹⁰⁻¹³ hinsichtlich seiner Anwendbarkeit für die pepsinkatalysierte Synthese an geeigneten Modellreaktionen zu untersuchen.

Synthesen und Ergebnisse

Um Aussagen zum Einfluß der für die Reaktionen im Zweiphasensystem vorgesehenen organischen Lösungsmittel auf die katalytische Wirksamkeit des Pepsins zu erhalten, bestimmten wir zunächst die zeitliche Änderung der hydrolytischen Aktivität unter Bedingungen, wie sie bei der Synthese vorliegen. Pepsin wurde dazu in einer Konzentration von 2,5 mg/ml in 0,1 *M* Citratpuffer (pH 4,5) gelöst und bei 40 °C mit den in Tabelle 1 aufgeführten Lösungsmitteln intensiv gerührt. Zum Vergleich ermittelten wir ebenfalls den Einfluß der mit Wasser mischbaren Lösungsmittel Methanol und Dimethylformamid bei einer für Syntheseversuche häufig verwendeten Konzentration von 20% (v/v). Zu Beginn und in den angegebenen Zeitabständen wurden 50 μ l-Proben aus der wäßrigen Phase entnommen, und nach Verdünnung mit 0,01 *N* HCl erfolgte die Aktivitätsbestimmung nach der Methode von *Northrop*¹⁴ mit Hämoglobin als Substrat. Die nach Einwirkung der verschiedenen Lösungsmittel gefundenen spezifischen Aktivitäten des Pepsins wurden auf den in reinem Citratpuffer erhaltenen Anfangswert bezogen und sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1. *Einfluß organischer Lösungsmittel auf die hydrolytische Aktivität von Pepsin in 0,1 M Citratpuffer (pH 4,5)*

Lösungsmittel	% (v/v)	Zeit (h)			
		Spezifische Aktivität (%)			
		1	3	5	24
Citratpuffer	100	100	98	95	90
Tetrachlormethan	50	90	68	64	58
Essigester	50	78	65	60	30
Chloroform	50	68	27	12	0
<i>DMF</i>	20	96	93	91	85
Methanol	20	93	89	85	82

Während die Aktivität in reinem Citratpuffer nach 24 h auf 90% des Anfangswertes abgefallen war, führte die Einwirkung von Gemischen aus Citratpuffer und den mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmitteln zu einem erheblichen Aktivitätsverlust, der sich besonders drastisch beim Chloroform manifestierte. Bereits nach 5 h war die Aktivität auf etwa ein Zehntel abgesunken. Tetrachlormethan und Essigester hatten demgegenüber eine wesentlich weniger ungünstige Wirkung und wurden daher im folgenden als organische Lösungsmittel im wäßrig-organischen Zweiphasensystem verwendet.

Die geringsten Aktivitätsverluste traten in Gegenwart von 20% (v/v) Methanol und *DMF* auf. Vergleicht man analoge Untersuchungen zum Einfluß organischer Lösungsmittel auf die Serinprotease α -Chymotrypsin¹⁵, so ergibt sich für Pepsin ein anderes Bild. Unter der Einschränkung, daß in beiden Fällen unterschiedliche Aktivitätsbestimmungsmethoden und Reaktionsbedingungen verwendet wurden, kann festgestellt werden, daß Methanol und *DMF* bei vergleichbarer Einwirkungsdauer die Pepsinaktivität im Gegensatz zu den Befunden beim α -Chymotrypsin nur unwesentlich herabsetzen. Von verschiedenen Autoren sind mit Wasser mischbare Lösungsmittel zur Verbesserung der Löslichkeit der Carboxykomponente bei pepsinkatalysierten Peptidsynthesen eingesetzt worden^{5,7,8}. Die aus der Verwendung dieser Lösungsmittel sich möglicherweise ergebenden Nachteile wurden einleitend bereits erwähnt.

Die Untersuchung der pepsinkatalysierten Peptidsynthese erfolgte zunächst im Lösungsmittelsystem Citratpuffer/Essigester anhand der Modellreaktion

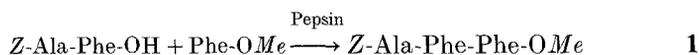


Tabelle 2. Pepsinkatalysierte Synthese von **1** aus *Z*-Ala-Phe-OH und *H*-Phe-OMe im System 0,1 M Citratpuffer (pH 4,5)/Essigester (50%, v/v)^a

Vers.	Substrat (mmol)	Nucleophil (mmol)	Pepsin (μ mol)	Zeit (h)	Ausbeute (%)
1	0,05	0,2	0,3	6	42
2	0,05	0,2	2 \times 0,3	24	84
3	0,05	0,1	2 \times 0,3	24	55
4	0,05	0,2	2 \times 0,15	24	53
5	0,2	0,8	2 \times 0,3	24	78
6	0,2	0,8	2 \times 0,15	24	38

^a Gesamtvolumen 4 ml, Reaktionstemperatur 40 °C.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Der sich bildende Peptidester **1** löste sich gut in der organischen Phase, so daß während der gesamten Reaktion keine Ausfällung erfolgte. Zur Erzielung einer guten Ausbeute war bei einem Substrat-Nucleophil-Verhältnis von 1:4 eine Reaktionszeit nötig, die den aus der Literatur bekannten Angaben für Reaktionen in homogener Phase entspricht⁸. Eine Verringerung der Nucleophil- bzw. Enzymmenge auf die Hälfte bewirkte erwartungsgemäß eine deutliche Ausbeuteverminderung. Da die Pepsinaktivität in Gegenwart von Essigester bei längeren Reaktionszeiten beträchtlich abnimmt (vgl. Tab. 1), wurde nach 6 h nochmals die gleiche Menge Pepsin wie zu Beginn hinzugegeben.

Unter den in Tabelle 2, Vers. 2 genannten Reaktionsbedingungen führte bei Verwendung von nur 0,3 μ mol Pepsin die Reaktion von *Z*-Gln-Phe-OH mit *H*-Phe-OMe zu *Z*-Gln-Phe-Phe-OMe **2** in einer Ausbeute von 66%.

Untersuchungen der pH-Abhängigkeit der pepsinkatalysierten Synthese von **1** bestätigten, daß der optimale Wert in einem relativ engen Bereich um pH 4,5 liegt (vgl. Tab. 3). Dies steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen, die von *Morihara* und *Oka* bei der pepsinkatalysierten Synthese von *Z*-Gly-Phe-Leu-NHC₆H₅ in einem homogenen Lösungsmittelsystem erhalten wurden⁸. Wie orientierende Versuche zeigten, nimmt die Löslichkeit von *Z*-Ala-Phe-OH in Citratpuffer unterhalb pH 4,5 deutlich ab, so daß die Reaktionsgeschwindigkeit in einem für die Pepsinaktivität günstigen pH-Bereich durch die geringe Substratkonzentration in der wäßrigen Phase begrenzt wird.

Tabelle 4 zeigt den Einfluß der Lösungsmittelzusammensetzung auf die Ausbeute an **1**. Optimale Ergebnisse wurden in Gegenwart von 50% (v/v) Essigester erreicht. Während geringere Mengen organisches Lö-

Tabelle 3. *Abhängigkeit der Ausbeute an 1 vom pH-Wert des Puffers^a*

pH	3,0	4,0	4,5	5,3	5,8
Ausbeute (%)	38	55	83	60	27

^a Übrige Reaktionsbedingungen entsprechend Tab. 2, Vers. 2.

Tabelle 4. *Abhängigkeit der Ausbeute an 1 vom Volumenanteil des organischen Lösungsmittels^a*

Essigester (% v/v)	20	40	50	80	95
Ausbeute (%)	77	80	84	51	0

^a Übrige Reaktionsbedingungen entsprechend Tab. 2, Vers. 2.

sungsmittel bis zu 20% die Ausbeute nicht wesentlich verschlechterten, erwies sich eine weitere Erhöhung der Essigestermenge als ungünstig. Mögliche Erklärungen hierfür sind einmal in der komplexen Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten einer Peptidsynthesereaktion in einem biphasischen wäßrig-organischen System von den Verteilungskoeffizienten der Reaktionspartner in den beiden Phasen, dem Volumenverhältnis zwischen organischer und wäßriger Phase und von vorgelagerten ionischen Gleichgewichten zu suchen¹⁶, zum anderen ist mit einem zunehmenden ungünstigen Einfluß des organischen Lösungsmittels auf die Enzymkonformation zu rechnen.

Bei der pepsinkatalysierten Synthese von **1** im biphasischen System sollte der gebildete Peptidester infolge Extraktion in die organische Phase einer Rückspaltung durch Sekundärhydrolyse weitgehend entzogen sein, da diese nur unter der katalytischen Wirkung des in der wäßrigen Phase befindlichen Pepsins erfolgen kann. Um dies zu überprüfen, bestimmten wir das Ausmaß der pepsinkatalysierten Hydrolyse von **1** sowohl in Citratpuffer/Essigester als auch in reinem Citratpuffer nach 24 h (Tab. 5). Nicht hydrolysiertes **1** wurde isoliert und durch Auswägen bestimmt. Die Identifizierung der Spaltprodukte erfolgte dünnschichtchromatographisch. Wie wir fanden, beträgt das Ausmaß der Hydrolyse im System Citratpuffer/Essigester im Vergleich zu demjenigen in reinem Puffer weniger als ein Viertel.

Durch Verwendung von Tetrachlormethan anstelle von Essigester konnte eine beträchtliche Verkürzung der Reaktionszeit erreicht werden. Unter vergleichbaren Bedingungen wurde **1** bereits nach 1 h in einer Ausbeute von 88% erhalten (Tab. 6). Demgegenüber benötigen

Tabelle 5. Pepsinkatalysierte Hydrolyse von **1** in Abhängigkeit vom Lösungsmittelsystem^a

Lösungsmittelsystem	Gesamtvolumen (ml)	Pepsin (μmol)	1 eingesetzt wiedergef. (mg)		Hydrolys. Anteil (%)
0,1 M Citratpuffer (pH 4,5)	4	0,3	20	11	45
0,1 M Citratpuffer (pH 4,5)/Essigester (50%, v/v)	4	0,3	20	18	10

^a Reaktionstemperatur 40 °C, Zeit 24 h.Tabelle 6. Pepsinkatalysierte Synthese im System 0,1 M Citratpuffer (pH 4,5)/Tetrachlormethan (50%, v/v)^a

Verb.	Substrat (mmol)	Nucleophil (mmol)	Pepsin (μmol)	Zeit (h)	Ausbeute (%)
1	0,05	0,2	0,3	0,5	59
	0,05	0,2	0,3	1	88
	0,05	0,2	0,3	2	88
	0,05	0,2	0,15	2	89
	0,05	0,2	0,07	2	67
	0,05	0,1	0,3	2	88
	0,05	0,055	0,3	2	70
	2	0,05	0,2	0,3	2

^a Gesamtvolumen 4 ml, Reaktionstemperatur 40 °C.

bisher in der Literatur beschriebene pepsinkatalysierte Synthesen vielfach Reaktionszeiten von 24 h und mehr. Ebenso war es möglich, eine geringere Enzymmenge einzusetzen oder den Nucleophilüberschuß bedeutend zu reduzieren. Tetrachlormethan besitzt im Vergleich zu Essigester ein geringeres, aber ausreichendes Lösevermögen für *Z*-Ala-Phe-OH, so daß eine günstigere Verteilung des Substrats zwischen wäßriger und organischer Phase gegeben ist. Da Verbindung **1** in dem verwendeten Lösungsmittelsystem ausfällt, ergibt sich zusätzlich ein synthesesfördernder Effekt.

Nach den in Tabelle 6 angegebenen Bedingungen wurde auch Verbindung **2** bereits in 2 h mit einer Ausbeute von 52% hergestellt.

Tabelle 7. *Pepsinkatalysierte Synthese im System 0,1 M Citratpuffer (pH 4,5)/Essigester/n-Hexan^a*

Verb.	Substrat (mmol)	Nucleophil (mmol)	Gesamt- volumen (ml)	Puffer (%, v/v)	Essigester/ n-Hexan (%, v/v)	Zeit (h)	Ausbeute (%)
1	0,2	0,8	6	33	67 (1:1)	2	68
3	0,1	0,4	16	12	88 (1:6)	6	73

^a Unter Verwendung von 0,3 μ mol Pepsin, Reaktionstemperatur 40 °C.

Die Verwendung von Lösungsmittelkombinationen erlaubt es, bei unterschiedlicher Löslichkeit der Peptidsubstrate in einem bestimmten organischen Lösungsmittel (z. B. Trichlorethen) durch Zugabe einer schlecht lösenden Komponente (z. B. Petrolether) die jeweilige Sättigungskonzentration einzustellen¹⁷. Bei der pepsinkatalysierten Synthese von **1** und von *Z*-Leu-Phe-Phe-*OMe* **3** aus *Z*-Leu-Phe-OH und H-Phe-*OMe* erbrachte die Kombination Essigester/*n*-Hexan gute Resultate (Tab. 7). Während für die Darstellung von **1** Katalysatormenge und Reaktionsdauer im Vergleich zu Vers. 5, Tabelle 2 erheblich gesenkt werden konnten, war die Synthese von **3** erst bei Verwendung eines Essigester/*n*-Hexan-Gemisches möglich.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß ein wäßrig-organisches Zweiphasensystem für die pepsinkatalysierte Synthese von Peptidderivaten des Typs *Z*-*X*-Phe-Phe-*OMe* (*X* = Ala, Gln, Leu) ein geeignetes Reaktionsmedium darstellt. Eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts in Richtung des gewünschten Peptidprodukts kann dabei entweder durch dessen Extraktion in die organische Phase (z. B. *X* = Ala, organisches Lösungsmittel Essigester) erfolgen oder durch die Verwendung von Lösungsmitteln bzw. deren Kombinationen, in denen der gebildete Peptidester ausfällt. In letzterem Falle lassen sich bei verminderter Nucleophil- und Enzymkonzentration sowie wesentlich verkürzter Reaktionszeit gleichbleibend gute Ausbeuten erzielen.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden auf dem Mikroheiztisch nach *Boëtius* bestimmt, die optischen Drehungen am Polamat A des VEB Carl Zeiss Jena. Spektroskopische Messungen wurden am Spektralphotometer VSU 2 vom VEB Carl Zeiss Jena durchgeführt. Für die Dünnschichtchromatographie wurden Silufol-Fertigplatten (Kavalier, ČSSR) benutzt. Als Laufmittelsysteme dienten A: Chloroform/*MeOH* (9:1), B: Chloroform/*MeOH* (3:1), C: Chloroform/Aceton/

Tabelle 8. *Physikalische Daten der enzymatischen Syntheseprodukte*

Verb.	Schmp. ^a (°C)	[α] _D ²² (in DMF)	R_F -Werte			
			A	B	C	D
1	184—186	—21,0 ($c = 1$)	0,76	0,90	0,74	0,86
2	224—226	—9,4 ($c = 0,5$)	0,53	0,81	0,41	0,81
3	129—132	—40,1 ($c = 0,5$)	0,83	0,91	0,81	0,88

^a Nach Kristallisation aus Essigester/*n*-Hexan.

MeOH (7:2:1), D: *n*-Butanol/*Ac*OH/H₂O (3:1:1). Pepsin (EC 3.4.23.1) (3 × krist., vom Rind, 3 420 ΔA_{280} -Einheiten/mg) der Firma Serva (Heidelberg, BRD) wurde ohne weitere Reinigung verwendet. Die Bestimmung der hydrolytischen Aktivität erfolgte nach der Methode von Northrop¹⁴ mit Hämoglobin als Substrat. Der Proteingehalt wurde auf der Grundlage von $E_{280}^{1\%} = 14,8$ und einem Molekulargewicht von 35 000 bestimmt¹⁸.

Allgemeine Vorschrift für die pepsinkatalysierte Peptidsynthese

Carboxy- und Aminokomponente werden entsprechend den Angaben in den Tabellen mit dem organischen Lösungsmittel und einer Lösung von Pepsin in 0,1 *M* Citratpuffer (*pH* 4,5) versetzt und während der angegebenen Zeit in einem thermostatierten Reaktionsgefäß bei 40 °C gerührt. Anschließend wird mit 1 *N* NaOH neutralisiert, das organische Lösungsmittel im Rotationsverdampfer im Vak. entfernt und das ausgefallene Produkt auf eine Glasfritte gebracht. Man wäscht nacheinander mit 1 *N* HCl, H₂O, 5% NaHCO₃-Lösung sowie H₂O und trocknet das erhaltene Produkt im Vak.-Exsikkator P₄O₁₀.

Literatur

- ¹ *Damilevski A. J.*, zit. n. *Henriques V., Gjaldbak I. K.*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **71**, 485 (1911).
- ² *Arai S., Fujimaki M.*, Ann. Nutr. Alim. **32**, 701 (1978).
- ³ *Fرتون J. S.*, Adv. Enzymol. **53**, 239 (1982).
- ⁴ *Pellegrini A., Luisi P. L.*, in: Peptides. Proc. 5th Amer. Peptide Sympos. (*Goodman M., Meienhofer J.*, Hrsg.), S. 556. New York: J. Wiley. 1977.
- ⁵ *Pellegrini A., Luisi P. L.*, Biopolymers **17**, 2573 (1978).
- ⁶ *Isowa Y., Ohmori M., Ichikawa T., Kurita H., Sato M., Mori K.*, Bull. Chem. Soc. Japan **50**, 2762 (1977).
- ⁷ *Isowa Y., Nagasawa T., Kuroiwa K., Narita K.*, Schwz. Pat. 597 158, 31. März 1978; C. A. **89**, 24823 (1978).
- ⁸ *Morihara K., Oka T.*, J. Biochem. **89**, 385 (1981).
- ⁹ *Tseng M. J., Wu Sh. H., Chen Sh. T., Wang K. T.*, J. Chin. Biochem. Soc. **10**, 36 (1981).
- ¹⁰ *Semenov A. N., Martinek K.*, Bioorg. Chim. **6**, 1559 (1980).
- ¹¹ *Jakubke H.-D., Kuhl P.*, Pharmazie **37**, 89 (1982).

- ¹² Kuhl P., Zapevalova N. P., Könnecke A., Jakubke H.-D., Monatsh. Chem., im Druck.
- ¹³ Kuhl P., Jakubke H.-D., Z. Chem. **22**, 407 (1982).
- ¹⁴ Northrop J. H., Kunitz M., Herriott R. M., Crystalline Enzymes, 2. Aufl., S. 305. New York: Columbia Univ. Press. 1948.
- ¹⁵ Kuhl P., Walpuski J., Jakubke H.-D., Pharmazie **37**, 766 (1982).
- ¹⁶ Semenov A. N., Martinek K., Berezin I. V., Bioorg. Chim. **6**, 600 (1980).
- ¹⁷ Kuhl P., Posselt S., Jakubke H.-D., Pharmazie **36**, 463 (1981).
- ¹⁸ Kassell B., Meitner P. A., in: Methods in Enzymology (Perlmann G. E., Lerand L., Hrsg.), XIX, S. 345. New York: Academic Press. 1970.