

## Solubilisierende Schutzgruppen für enzymatische Peptidsynthesen Untersuchungen mit Polyoxyethylen-gebundenen Substraten

Andreas Könnecke\*, Volker Pchalek und Hans-Dieter Jakubke

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

(Eingegangen 1. März 1984. Angenommen 11. Mai 1984)

### *Solubilizing Protective Groups for Enzymatic Peptide Syntheses. Studies with Polyoxyethylene-Supported Substrates*

The utility of amino acids and dipeptides esterified to solubilizing polyoxyethylene supports as substrates for protease-mediated peptide bond formation was studied using free and immobilized  $\alpha$ -chymotrypsin as a catalyst. Poor yields were obtained with  $N^2$ -protected amino acid or dipeptide polyoxyethylene esters as carboxyl components, most probably due to a shielding of the active site of the acyl enzyme intermediate by the polymer favouring hydrolytic cleavage. Experiments with polyoxyethylene esters as nucleophiles gave good results with free chymotrypsin, immobilized chymotrypsin predominantly caused hydrolysis of the ester carboxyl component due to unfavourable interactions between the soluble and insoluble polymers.

(*Keywords: Chymotrypsin; Enzymatic peptide synthesis; Liquid phase peptide synthesis; Solubilizing protective groups; Polyoxyethylene*)

*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, *-OMe* = Methylester, *-OPOE* = Polyoxyethylenester, *POE* =  $\alpha$ -Hydroxy- $\omega$ -hydroxypoly(oxyethylen) = Polyoxyethylen, *DCC* = *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid, *NEM* = *N*-Ethylmorpholin.

### Einleitung

Für proteasekatalysierte Peptidbindungsknüpfungen ist es erforderlich, die Substrate in oft hoher Konzentration in wäßrigem Medium gelöst zur Umsetzung zu bringen<sup>1,2</sup>. Zur Verbesserung der Löslichkeit hydrophober Oligopeptidsubstrate werden in der Regel mit Wasser mischbare

organische Lösungsmittel zugesetzt, wobei jedoch gleichzeitig die katalytische Aktivität der Protease meist negativ beeinflußt wird<sup>3</sup>. In Extremfällen kann ein so hoher Anteil an organischen Lösungsmittel erforderlich werden, der zur Inaktivierung der Protease führt, z. B. bei der geplanten Synthese des Substanz P-(6-11)-Hexapeptids ausgehend von *BOC-Gln-Phe-Phe-OMe* als schwerlöslicher Carboxylkomponente<sup>4</sup>.

Die Einbeziehung hydrophiler solubilisierender Schutzgruppen bietet eine generelle Alternative zur Überwindung von Löslichkeitsproblemen in wäßrigem Medium<sup>5,6</sup>.

Die Entwicklungen der Flüssigphasen-Peptidsynthese an Polyoxyethylen-Trägern haben gezeigt, daß neben anderen Vorteilen auch Löslichkeitsschwierigkeiten bei konventionellen Peptidsynthesen partiell überwunden werden können<sup>7</sup>. Aufgrund seines hydrophob-hydrophilen Charakters verbessert der Polyoxyethylen-Träger ebenfalls die Wasserlöslichkeit der Peptidderivate, was bisher für physikochemische Studien<sup>8</sup> und für die Peptidchemosynthese in Wasser<sup>9</sup> genutzt wurde.

In dieser Mitteilung berichten wir über Untersuchungen zur Anwendbarkeit von esterartig an Polyoxyethylen gebundenen Substraten für die chymotrypsinkatalysierte Peptidsynthese.

### Ergebnisse und Diskussion

Für die Untersuchungen wurde als Kompromiß Polyoxyethylen der nominalen Molmasse 6000 gewählt. Polyoxyethylene höheren Polymerisationsgrades versprechen zwar eine bessere Wasserlöslichkeit, jedoch ist das hohe Molekulargewicht wiederum ungünstig für die Bereitung hinreichend konzentrierter Lösungen für die enzymatischen Umsetzungen.

#### *Polyoxyethylenester als Carboxylkomponenten*

Der erste Teil der Untersuchungen sollte Aufschluß über die Eignung von *POE*-Estern anstelle der bisher erfolgreich eingesetzten niederen Alkylester als Carboxylkomponenten für enzymatische Peptidbindungsknüpfungen geben. Ermutigende Voraussetzung für derartige Experimente war der Befund, daß zwischen Aminosäurealkyl- und -*POE*-Estern keine signifikanten Unterschiede in der Hydrolysegeschwindigkeit durch Chymotrypsin bestehen. Wir nutzten dies neben der dafür konventionell angewandten Aminosäureanalyse zur Bestimmung des Beladungsgrades der Polymere durch einfache und zeitsparende Endpunktstittation am *pH*-Stat mit Chymotrypsin als Katalysator. Beide Methoden ergaben unter Berücksichtigung inhärenter Fehlerquellen vergleichbare Ergebnisse (Tab. 1).

Die chymotryptischen Kupplungsversuche von *BOC*- bzw. *Z-Phe*-

Tabelle 1. Beladungsgrade der BOC- und Z-Phenylalanin-Polyoxyethylenester

Beladungsgrad	BOC-Phe-OPOE		Z-Phe-OPOE	
	a	b	a	b
mmol/g Polymer	0,295	0,317	0,341	0,312
% d. Th. <sup>c</sup>	89	95	102	94

<sup>a</sup> Bestimmt durch Aminosäureanalyse.

<sup>b</sup> Bestimmt durch chymotryptische Hydrolyse am pH-Stat.

<sup>c</sup> Bezogen auf MW 6000 (0,333 mmol OH-Gruppen/g POE).

Tabelle 2. Polyoxyethylenester als Carboxylkomponenten für chymotryptische Peptidbindungsknüpfungen<sup>a</sup>

Carboxylkomponente (mM)	Nucleophil (mM)	Chymotrypsin ( $\mu$ M)	Ausbeute (% d. Th.)
Z-Phe-OPOE (10)	H-Leu-NH <sub>2</sub> (20)	40	42
Z-Phe-OPOE (10)	H-Leu-NH <sub>2</sub> (100)	40	48
BOC-Phe-OPOE (20)	H-Leu-NH <sub>2</sub> (40)	40	10
BOC-Phe-OPOE (20)	H-Leu-NH <sub>2</sub> (200)	40	37
BOC-Phe-OPOE (20)	H-Leu-Ala-NH <sub>2</sub> (30)	40	14
Ac-Leu-Phe-OPOE (10)	H-Leu-NH <sub>2</sub> (25)	50	<3
Ac-Leu-Phe-OPOE (20)	H-Leu-NH <sub>2</sub> (250)	50	<3

<sup>a</sup> In 0,2 M Phosphatpuffer pH 8, bei Ac-Leu-Phe-OPOE in 0,05 M Puffer.

OPOE und Ac-Leu-Phe-OPOE mit H-Leu-NH<sub>2</sub> als Aminokomponente wurden bei pH 8 in 0,2 M Phosphatpuffer durchgeführt, da bei pH 10, für Chymotrypsin empfohlen und bewährt<sup>1</sup>, eine signifikante alkalikatalysierte Hydrolyse gemessen wurde. Die Versuche waren so konzipiert, daß die Reaktionsprodukte als im Ansatz schwerlöslich ausfallen sollten. Trotz neunfachen Nucleophilüberschuß blieben die Kupplungsausbeuten unbefriedigend (Tab. 2). Auch das Dipeptidamid H-Leu-Ala-NH<sub>2</sub> als Nucleophil lieferte lediglich 14% d. Th. BOC-Phe-Leu-Ala-NH<sub>2</sub>. Besonders überraschte die unter 3% d. Th. liegende Ausbeute bei der Kupplung von Ac-Leu-Phe-OPOE mit H-Leu-NH<sub>2</sub>, da diese Sequenz der Spezifität

des Chymotrypsins optimal angepaßt ist<sup>10</sup> und der entsprechende Methylester gute Umsätze liefert.

Polyoxyethylen liegt auf Grund seiner Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden in wäßrigem Medium stark hydratisiert vor. Möglicherweise wird nach dem Übergang vom tetrahedralen Intermediat zum Acylenzym durch das Polymer eine hohe effektive Wasserkonzentration in direkter Nähe des hydrophoben aktiven Zentrums lokalisiert, wodurch dessen hydrolytische Spaltung begünstigt und es förmlich vor dem nucleophilen Angriff der Aminokomponente abgeschirmt wird.

### *Polyoxyethylenester als Aminokomponente*

Im zweiten Teil der Untersuchungen wurde am Beispiel einer 2 + 2-Segmentverknüpfung zum Tetrapeptid *Z-Pro-Phe-Leu-Gly-OH* geprüft, ob sich Proteasen unter kinetischer Reaktionskontrolle für die Flüssigphasen-Peptidsynthese in wäßrigem Medium eignen. Dazu wurde *Z-Pro-Phe-OMe* mit *H-Leu-Gly-OPOE* in Phosphatpuffer chymotryptisch gekuppelt und der Reaktionsverlauf analytisch mittels HPLC verfolgt. Die in Tabelle 3 zusammengestellten Resultate zeigen, daß in Abhängigkeit vom Substratverhältnis befriedigende bis sehr gute Umsätze zu erzielen sind.

Aus einem Reaktionsansatz mit äquimolarem Reaktandenverhältnis wurden nach 60 min durch Extraktion und anschließende Kristallisation 70% d. Th. Polymerpeptide isoliert. In sehr guter Übereinstimmung mit dem analytisch ermittelten Umsatz lag der Anteil an Tetrapeptid laut Aminosäureanalyse bei 52%.

Als Voraussetzung für den Einsatz von Proteasen für die Flüssigphasen-Methode muß erfüllt sein, daß der Polyoxyethylenester nicht während der Reaktion enzymatisch gespalten wird, wobei sowohl die Substratspezifität der eingesetzten Protease als auch die zu synthetisierende Sequenz

Tabelle 3. *Chymotryptische 2 + 2-Segmentkondensation mit Polyoxyethylengebundener Aminokomponente*<sup>a</sup>

<i>Z-Pro-Phe-OMe</i> (mM)	<i>H-Leu-Gly-OPOE</i> (mM)	Reaktionszeit (min)						
		5	10	15	20	25	40	60
		Ausbeute (% d. Th.)						
71,4	35,7	44	60	—	82	91	87	—
35,7	35,7	60	64	65	62	62	58	51
17,9	35,7	47	54	63	59	—	52	38

<sup>a</sup> Enzymkonzentration 36  $\mu$ M, Phosphatpuffer 0,2 M pH 8 mit 11% (v/v) Methanol, um *Z-Pro-Phe-OMe* zu lösen.

zu berücksichtigen sind. Auf Grund der Substratspezifität von Chymotrypsin war eine Spaltung hinter Glyzin nicht zu erwarten und vor den Kupplungsexperimenten wurde nachgewiesen, daß unter den angewandten Reaktionsbedingungen *BOC-Leu-Gly-OPOE* durch Chymotrypsin nicht hydrolytisch gespalten wird.

Da bei den obigen Experimenten die Reaktionsprodukte in Lösung bleiben, war der Einsatz des Biokatalysators in immobilisierter Form im Hinblick auf mögliche kontinuierliche Prozeßführungen von Interesse<sup>11</sup>.

Versuche unter den als optimal ermittelten Reaktionsbedingungen ergaben jedoch nur Ausbeuten unter 3% d. Th. und es dominierte die hydrolytische Spaltung von *Z-Pro-Phe-OMe* zu *Z-Pro-Phe-OH*. Offensichtlich sind für dieses Verhalten wiederum ungünstige Wechselwirkungen zwischen festem und löslichem Polymer<sup>12</sup> verantwortlich zu machen. Hinweise darauf sind auch den unterschiedlichen Hydrolysegeschwindigkeiten von *Z-Phe-OPOE* durch lösliches und immobilisiertes Chymotrypsin zu entnehmen, mit dem löslichen Biokatalysator liegt die Hydrolysegeschwindigkeit um zwei Zehnerpotenzen höher.

## Experimenteller Teil

### *Materialien und Methoden*

$\alpha$ -Chymotrypsin (EC 3.4.21.1, 45 U/mg) (Worthington, Freehold, U.S.A.), Polyoxyethylen 6000 (Merck, BRD), Fluram und *tert.*-Butyloxycarbonylhydrazid (Fluka, Schweiz), Aminosäuren (Reanal, Ungarn) sowie analysenreine Lösungsmittel und Reagenzien verschiedenen Ursprungs wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden auf Silufol-Fertigfolien (Kavalier, ČSSR) mit den Laufmitteln  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9 : 1 und *n*-BuOH/*AcOH*/ $\text{H}_2\text{O}$ /Pyridin 30 : 6 : 24 : 20 ausgeführt. Als Sprühreagenzien fanden Fluram, Ninhydrin, Kaliumiodid/Stärke und *Dragendorff-Bürger*-Reagenz Anwendung. Für titrimetrische Analysen wurde ein Autotitratort TTT 1 d (Radiometer, Dänemark) eingesetzt. Die analytische HPLC wurde an einem Liquochrom 307 (Labor MIM, Ungarn) mit stopped-flow-Injektion und variabler UV-Detektion in Kombination mit einer Hewlett-Packard-Fertigsäule  $200 \times 4,6$  mm, gepackt mit Lichrosorb RP-18, 10  $\mu\text{m}$ , ausgeführt. Als Elutionsmittel diente *MeOH*-/*MeCN*/0,1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  67,5 + 2,5 + 30 (*v* + *v* + *v*). Mit *MeOH* als *t*<sub>0</sub>-Marker betragen die *k'*-Werte für *Z-Pro-Phe-OH* 1,23 und für *Z-Pro-Phe-Leu-Gly-OH* 1,89. Die Aminosäureanalysen führte Herr Dr. P. Klosek an einem Analysator Kd-1200 E (ZNSP, ČSSR) aus. *Z-Pro-Phe-OMe* und immobilisiertes Chymotrypsin (Hydroxysuccinimidester-Methode, makroporöses Glas mit 20 nm Porendurchmesser als Träger, 20 mg Protein/g Träger) wurden wie beschrieben dargestellt<sup>13</sup>.

### *Synthese der Polyoxyethylenester*

*BOC-Phe-OPOE*, *Z-Phe-OPOE* und *BOC-Gly-OPOE* wurden analog *BOC-Ala-OPOE* durch pyridinkatalysierte Umsetzung der symmetrischen Anhydride der N-geschützten Aminosäuren mit *POE* in Dichlormethan dargestellt<sup>14</sup>, zwei-

mal aus Dichlormethan mit Ether gefällt und aus Ethanol kristallisiert. *BOC-Gly-OPOE* enthielt laut Aminosäureanalyse 0,267 mmol *Gly/g* entsprechend 80% Beladung (vgl. Tab. 1).

*H-Leu-Gly-OPOE*: Von *BOC-Gly-OPOE* wurde die Schutzgruppe mit 1,2 N HCl in AcOH entfernt (7,5 ml/g Polymer, 0,5 h) und das Produkt nach Einengen im Vak. mit Ether gefällt und aus Ethanol kristallisiert. 1,69 g (7,32 mmol) *BOC-Leu-OH* wurden in 20 ml Dichlormethan bei 0 °C mit 3,7 mmol *DCC* 0,5 h voraktiviert und zu einer mit *NEM* neutralisierten Lösung von 4,6 g (1,23 mmol) *H-Gly-OPOE*·HCl in 30 ml Dichlormethan filtriert. Nach 2,5 h blieb der Fluramtest negativ und es wurde eingengt, mit Ether gefällt, aus Ethanol kristallisiert und die *BOC*-Gruppe entfernt; 3,9 g *H-Leu-Gly-OPOE*·HCl mit 0,260 mmol *Leu/g* entsprechend 78% Beladung.

*Ac-Leu-Phe-OPOE*: *BOC-Phe-OPOE* wurde deblockiert und wie oben beschrieben mit *BOC-Leu-OH* bis zur negativen Fluramreaktion gekuppelt (3 h). Nach erneuter Entfernung der Schutzgruppe und Reinigung wurden 740 mg *H-Leu-Phe-OPOE*·HCl in 2 ml Essigsäureanhydrid gelöst und mit 0,5 ml Pyridin versetzt, nach 1 h im Vak. eingengt, zweimal umgefällt und kristallisiert; 700 mg *Ac-Leu-Phe-OPOE* mit 95% Beladung (titrimetrisch), Fluramnegativ.

#### *Chymotryptische Kupplungsversuche*

Alle Experimente wurden im 2–5 ml-Maßstab durchgeführt, die Reaktandenkonzentrationen sind Tabelle 2 und 3 zu entnehmen.

Bei den Versuchen in Tabelle 2 betrug die Reaktionszeit 20 min, wonach die Polymerester verbraucht waren. Die ausgefallenen Produkte wurden abgesaugt, alternierend mit 1 N HCl und gesätt. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung sowie mit Wasser gewaschen, im Vak. getrocknet und die Ausbeute gravimetrisch bestimmt.

Der zeitliche Verlauf der Versuche mit *H-Leu-Gly-OPOE* als Aminokomponente wurde analytisch mittels HPLC verfolgt. Zu bestimmten Zeiten wurden den Reaktionsansätzen 20 µl-Proben entnommen, mit 15 µl 0,5 N NaOH versetzt und 1 h bei 80 °C verseift, mit 15 µl 0,5 N HCl neutralisiert und mit Methanol verdünnt, um ausgefallenes Produkt zu lösen. Nach Filtration zur Entfernung denaturierten Proteins wurde ein Aliquot analysiert, wobei chemosynthetisches *Z-Pro-Phe-Leu-Gly-OH* als Referenz diente.

Die nicht optimierte Isolierung der Polymerpeptide aus den Reaktionsansätzen erfolgte nach Sättigen mit NaCl durch wiederholte Extraktion mit Dichlormethan. Nach dem Trocknen der vereinigten Extrakte über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde im Vak. eingengt, der Rückstand zweimal aus Ethanol kristallisiert und im Vak. bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

#### Literatur

- <sup>1</sup> *Jakubke H.-D., Kuhl P.*, Pharmazie **37**, 89 (1982).
- <sup>2</sup> *Chaiken I. M., Komoriya A., Ohno M., Widmer F.*, Appl. Biochem. Biotechnol. **7**, 385 (1982).
- <sup>3</sup> *Jones J. B., Beck J. F.*, in: Application of Biochemical Systems in Organic Chemistry (*Jones J. B., Sih C. J., Perlman D.*, Hrsg.), Part I, S. 107 ff. New York: Wiley, 1976; *Jones J. B., Pliura D. H.*, Can. J. Chem. **59**, 2921 (1981); *Inouye K., Watanabe K., Tochino Y., Kobayashi M., Shigeta Y.*, Biopolymers **20**, 1845 (1981); *Kuhl P., Wilsdorf A., Jakubke H.-D.*, Monatsh. Chem. **114**, 571 (1983); *Könnecke A., Schellenberger V., Jakubke H.-D.*, Z. Chem. **24**, 185 (1984).

- <sup>4</sup> Döring G., Karl-Marx-Universität Leipzig, Dissertation, 1981.
- <sup>5</sup> Kuhl P., Könnecke A., Walpuski J., Pchalek V., Jakubke H.-D., DDR-WP 255 382.
- <sup>6</sup> Widmer F., Ohno M., Smith M., Nelson N., Anfinsen C. B., in: Peptides 1982, Proc. 17th Eur. Peptide Symp. (Blaha K., Mallon P., Hrsg.), S. 374 ff. Berlin: W. de Gruyter. 1983.
- <sup>7</sup> Mutter M., Bayer E., in: The Peptides, Analysis, Synthesis and Biology (Gross E., Meienhofer J., Hrsg.), Vol. 2, S. 286 ff. New York: Academic Press. 1980.
- <sup>8</sup> Pillai V. N. R., Mutter M., Acc. Chem. Res. **14**, 122 (1981).
- <sup>9</sup> Royer G. P., Anantharmaiah G. M., J. Amer. Chem. Soc. **101**, 3394 (1979).
- <sup>10</sup> Jakubke H.-D., Däumer H., Könnecke A., Kuhl P., Fischer J., Experientia **36**, 1039 (1980).
- <sup>11</sup> Könnecke A., Hänslar M., Schellenberger V., Jakubke H.-D., Monatsh. Chem. **114**, 433 (1983).
- <sup>12</sup> Könnecke A., Dettlaff S., Jakubke H.-D., Monatsh. Chem. **113**, 331 (1982).
- <sup>13</sup> Könnecke A., Bullerjahn R., Jakubke H.-D., Monatsh. Chem. **112**, 469 (1981).
- <sup>14</sup> Mutter H., Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Dissertation, 1978.