

Papainkatalysierte kinetisch kontrollierte Peptidsynthese. Verwendung von Alkylestern des Arginins als Aminokomponente

**Volker Schellenberger^{1,*}, Ute Schellenberger¹, Yuri V. Mitin²
und Hans-Dieter Jakubke¹**

¹ Sektion Biowissenschaften der Karl-Marx-Universität Leipzig, Wissenschaftsbereich Biochemie, DDR-7010 Leipzig, Deutsche Demokratische Republik

² Institut für Eiweißforschung, Akademie der Wissenschaften der UdSSR, SU-142292 Pushchino, Moskau, UdSSR

Papain-Catalyzed Kinetically Controlled Peptide Synthesis. The Use of Arginine Esters as Amino Component

Summary. The papain-catalyzed reaction of esters of *Z*-alanine with various arginine esters was investigated. Using H-Arg-OPrⁱ as a nucleophile the expected dipeptide product results in high yield. Otherwise, reactions with arginine esters of primary alcohols provide products undergoing further reactions. This allows the synthesis of N-protected peptide esters containing two or more arginine residues in a one-step reaction. The influence of reaction conditions on the process was investigated.

Keywords. Enzymatic peptide synthesis; Arginine peptides; Papain.

Abkürzungen

Die IUPAC/IUB-Regeln für Aminosäure- und Peptidderivate wurden befolgt; vgl. Eur. J. Biochem. **53**, 1 (1975). Die verwendeten Aminosäuren hatten (*L*)-Konfiguration. —Gly-Gly-OH = Glykolylglycinester, —OCam = Carboxamidomethylester, —OBuⁱ = Isobutylester, —OMe = Methylester, —OPrⁱ = Isopropylester, Z = Benzyloxycarbonyl.

Einleitung

Ungeachtet des hohen Standes der chemischen Peptidsynthese ist in den letzten Jahren ein zunehmendes Interesse an der Verwendung von Proteasen für die Peptidsynthese zu verzeichnen. Hauptziele dieser Entwicklung sind die Verhinderung von Racemisierung und der mögliche Verzicht auf den Schutz von Aminosäureseitenkettenfunktionen.

In der Literatur werden die Verfahren der gleichgewichtskontrollierten und der kinetisch kontrollierten enzymatischen Peptidsynthese unterschieden [1, 2]. Bei der kinetisch kontrollierten Reaktionsführung wird die Carboxykomponente in schwach aktivierter Form, meist als Alkylester, eingesetzt. Dieses Verfahren bietet

die Vorteile kurzer Reaktionszeiten, niedrigen Enzymbedarfs und die Möglichkeit der Synthese löslicher hydrophiler Peptide in homogener Phase. Letzteres hat besondere Bedeutung in Hinblick auf die Synthese von Peptiden mit ungeschützten Seitenkettenfunktionen.

Im Rahmen der vorgestellten Arbeit berichten wir über die Möglichkeit des Einsatzes von Rohprodukten der Cysteinprotease Papain für die Synthese argininhaltiger Peptide, ausgehend von *Z*-geschützten Alaninalkylestern und seitenkettenungeschützten Argininalkylestern.

Experimenteller Teil

Für die Synthesen wurde Papain (3.5 Anson-Einheiten/g E. Merck) ohne weitere Reinigung verwendet. *Z*-Ala-OCam [3] und *Z*-Ala-OGlo-Gly-OH [4] wurden nach beschriebenen Verfahren erhalten, während die Synthesen von *Z*-Ala-OMe, H-Arg-OMe·HCl, H-Arg-OPrⁱ·HCl und H-Arg-OBuⁱ·HCl nach Standardmethoden [5] erfolgten. Alle Reagenzien waren analysenrein.

Papainkatalysierte Reaktionen

Die papainkatalysierten Synthesen wurden im Autotitrator TTT 1 c gekoppelt mit dem Schreiber SBR 2 c (Radiometer) bei Raumtemperatur durchgeführt. Während der Reaktionen wurde der *pH* durch Zugabe von 2.3 *N* KOH konstant gehalten. Der dadurch bedingte Verdünnungsfehler lag unter 5% und wurde bei der Auswertung vernachlässigt. Die Reaktanten wurden in 4 ml H₂O/Methanol 4:1 (*v/v*) gelöst. Durch Zugabe von 100 μ l Papainlösung (15 mg/ml, in 5 *mM* Cystein) wurde die Reaktion gestartet. Nach 32 min wurden weitere 80 μ l einer Papainlösung (75 mg/ml, in 5 *mM* Cystein) zugesetzt. Die Enzymlösungen wurden täglich frisch hergestellt.

HPL-Kontrolle

Die chromatographische Kontrolle der Reaktionen erfolgte mit einem LKB-System, bestehend aus: Pumpe 2150, Controller 2152, Photometer Uvicord SD 2158, Säule 7.5·150 mm TSK CM-3SW 10 μ m und dem Computerintegrator SP 4100 (Spectra Physics). Der Druckabfall bei 1.5 ml/min betrug 9–11 bar. Die Elution erfolgte mit einem linearen Salzgradienten von 0–1.8 *M* NaCl in 0.1 *M* Acetatpuffer *pH* 4.75/Methanol 9:1 (*v/v*). Die Retentionszeiten der einzelnen Verbindungen sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Die Extinktion wurde bei 258 nm verfolgt.

Da alle interessierenden Verbindungen das gleiche chromophore System besitzen, wurden identische Extinktionskoeffizienten angenommen. Die Probenaufgabe erfolgte über einen 100- μ l-Schleifeninjektor, der kalibriert wurde. Die Standardabweichung der so bestimmten Peakflächen liegt bei 3%.

Zu den Analysezeiten wurden der Reaktionsmischung 100 μ l entnommen, sofort mit 400 μ l Methanol verdünnt und in flüssigem Stickstoff bis zur HPLC-Analyse aufbewahrt.

Aminosäureanalysen

Die Verbindungen wurden am Säulenauslauf gesammelt und in einem Heliumstrom eingetrocknet. Der Rückstand wurde 22 h bei 120 °C in 200 μ l 6 *N* HCl hydrolysiert. Die Analyse erfolgte mit dem Aminosäureanalysator Durrum D500. Die ermittelten Verhältnisse von Alanin zu Arginin sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Arginin wurde in veresterter Form mit dem Ziel eingesetzt, Peptidester mit C-terminalem Arginin zu synthetisieren. Derartige Verbindungen bieten die Möglich-

Tabelle 1. Retentionszeiten und Aminosäureverhältnis der Argininverbindungen

Syntheseprodukt	Retentionszeit (min)	Verhältnis Ala/Arg
Z-Ala-Arg-OMe	12.8	1.62 ^a
Z-Ala-Arg-Arg-OMe	16.7	1.73
Z-Ala-Arg-Arg-OH	11.7	1.78
Z-Ala-Arg-Arg-Arg-OMe	19.3	2.77
Z-Ala-Arg-OPr ⁱ	13.8	2.99 ^a
Z-Ala-Arg-OBu ⁱ	16.4	1.06
Z-Ala-Arg-Arg-OBu ⁱ	19.3	2.05

^a Das Aminosäureverhältnis ist durch H-Arg-OMe bzw. H-Arg-OPrⁱ verfälscht, das gleichzeitig eluiert wird, aber bei 258 nm nicht absorbiert

keit der weiteren trypsin-katalysierten Umsetzung. Zum anderen besitzen sie als potentielle Proteasesubstrate eine erhebliche Bedeutung. Als Katalysator wurde ein Rohprodukt aus sprühgetrocknetem Papayalatex verwendet, das sehr hohe proteolytische Aktivität besitzt und sich durch seinen niedrigen Preis für präparative Zielstellungen anbietet.

Als Modellreaktion wurde die Verknüpfung von Z-Ala-OCam mit H-Arg-OMe ausgewählt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden dem Reaktionsgemisch Proben entnommen und mittels HPLC an einer sauren Matrix analysiert. Abb. 1 zeigt ein Chromatogramm des Ansatzes nach 45 min Reaktionszeit. Offensichtlich entstehen verschiedene Produkte, die sich in der Anzahl der geladenen Funktionen unterscheiden. Naheliegende Erklärung für das Ergebnis ist der Ablauf des Prozesses in Form einer Kettenreaktion, wie in Schema 1 dargestellt. Aus der Reihenfolge der Elution bei der Chromatographie sowie aus dem Verhältnis zwischen Alanin und Arginin für die einzelnen Substanzen konnte eine Zuordnung der Peaks zu den einzelnen Reaktionsprodukten gemäß Schema 1 erfolgen. Die Konzentration der Produkte zu

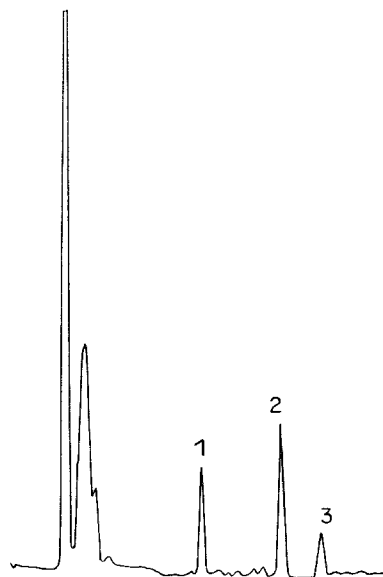
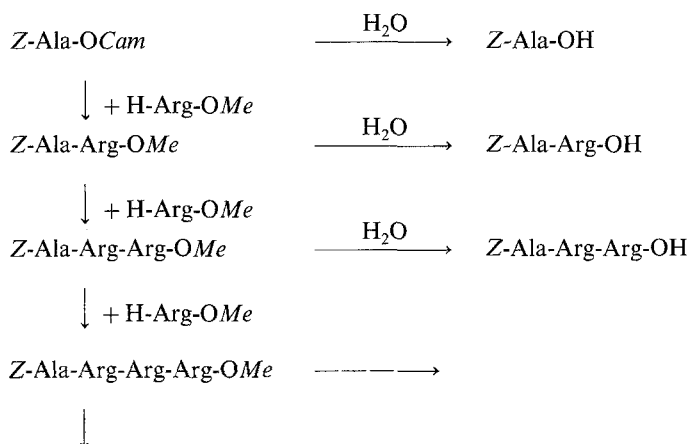


Abb. 1. HPLC-Chromatogramm der Reaktion von Z-Ala-OCam und H-Arg-OMe nach 45 min; Trennbedingungen wie im experimentellen Teil beschrieben; Elutionsfolge: (1) Z-Ala-Arg-Arg-OH, (2) Z-Ala-Arg-Arg-OMe, (3) Z-Ala-Arg-Arg-Arg-OMe

Tabelle 2. Zeitlicher Verlauf der papainkatalysierten Umsetzung von *Z*-Ala-OCam mit verschiedenen Argininestern bei *pH* 8.0

Nucleophil	Produkt	Gehalt (%) nach			
		2 min	10 min	30 min	45 min
H-Arg-OMe	<i>Z</i> -Ala-Arg-OMe	68	40	26	0
	<i>Z</i> -Ala-Arg-Arg-OMe	8.5	26	36	29
	<i>Z</i> -Ala-Arg-Arg-OH	0	0	1	11
	<i>Z</i> -Ala-Arg-Arg-Arg-OMe	0	0	2	7
H-Arg-OPri	<i>Z</i> -Ala-Arg-OPri	87	87	87	87
H-Arg-OBu ^t	<i>Z</i> -Ala-Arg-OBu ^t	72	53	29	3
	<i>Z</i> -Ala-Arg-Arg-OBu ^t	7	24	39.5	29
	<i>Z</i> -Ala-Arg-Arg-OH	0	0	0	6.5
	<i>Z</i> -Ala-Arg-Arg-Arg-OBu ^t	0	0	0	4

**Schema 1.** Ablauf der papainkatalysierten Umsetzung von *Z*-Ala-OCam mit H-Arg-OMe

den verschiedenen Zeitpunkten ist in Tabelle 2 zusammengefaßt. Danach wird *Z*-Ala-OCam schnell und in guter Ausbeute zum *Z*-Ala-Arg-OMe umgesetzt, der deutlich langsamer weiter reagiert. Dies steht im Einklang mit vorhandenen Daten zur Spezifität von Papain, wonach hydrophobe Reste in P₂-Position des Substrates, wie die *Z*-Gruppe bei *Z*-Ala-OCam, besonders günstig sind [6, 7]. Außerdem werden Carboxamidomethylester von Papain wesentlich schneller umgesetzt als die entsprechenden Methylester [8].

Gemäß Schema 1 entsteht im Verlauf der Reaktion eine Reihe von Substraten S_x . Die Konzentrationen dieser einzelnen Peptidestersubstrate durchlaufen Maxima, die durch gleiche Geschwindigkeit von Bildung und Umsetzung des Peptidesters charakterisiert sind. Im Maximum gilt für das Verhältnis der Konzentrationen der Substrate:

$$\frac{[S_{n+1}]}{[S_n]} = \frac{[N] (k_{cat}/K_M)_n}{p (k_{cat}/K_M)_{n+1}} \quad (1)$$

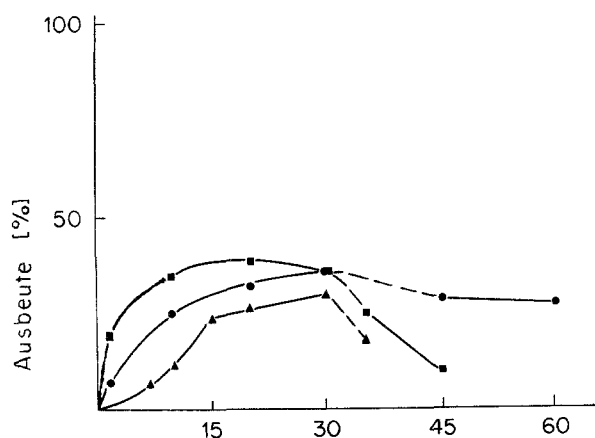


Abb. 2. Konzentration von *Z*-Ala-Arg-Arg-OMe für die Reaktionen von H-Arg-OMe mit (●) *Z*-Ala-OCam, (■) *Z*-Ala-Glo-Gly-OH, (▲) *Z*-Ala-OMe

Dabei entspricht die Partitionskonstante p der Nucleophilkonzentration, bei der Aminolyse und Hydrolyse des Acylenzyms in gleicher Geschwindigkeit erfolgen [11]. Die Theorie kinetisch kontrollierter Peptidsynthesen ist unter [9, 10] erläutert.

Gemäß Gl. (1) lassen sich die Ausbeuteverhältnisse der einzelnen Peptidester über die Nucleophilkonzentration $[N]$, die Nucleophileffizienz p und über die Spezifitätskonstanten k_{cat}/K_M der einzelnen Peptidester beeinflussen.

Einfluß der Art des Substratesters

Carboxamidomethylester wurden von Martinez et al. [3, 12] als Carboxylschutzgruppen vorgeschlagen. Aufgrund ihrer glycinamidähnlichen Struktur werden sie von Serin- und Cysteinproteasen besser hydrolysiert als die entsprechenden Methylester [8, 13] und sind daher vorzügliche Substrate für die enzymatische Peptidsynthese [8]. Die Eignung der Glykolyglycinester für die kinetisch kontrollierte Peptidsynthese, die gleichfalls aus ihrer peptidähnlichen Struktur resultiert, wurde von Mitin et al. [4] gezeigt. Um den Einfluß der Abgangsgruppe der C-Komponente auf den Reaktionsverlauf zu untersuchen, wurde *Z*-Alanin in Form seines Methyl-, Carboxamidomethyl- und Glykolyglycinesters mit H-Arg-OMe umgesetzt. Der zeitliche Verlauf der Konzentration an *Z*-Ala-Arg-Arg-OMe für die drei Reaktionen ist in Abb. 2 dargestellt. *Z*-Ala-OGlo-Gly-OH wird am schnellsten umgesetzt, so daß bereits nach 2 min die Konzentration an *Z*-Ala-Arg-OMe ihr Maximum deutlich überschritten hat und bei 44% liegt. Infolgedessen wird auch die maximale Konzentration an *Z*-Ala-Arg-Arg-OMe schneller und auf dem höchsten Niveau erreicht. *Z*-Ala-OMe ist die schlechteste der drei C-Komponenten.

Um den Einfluß der Art des Argininesters zu untersuchen, wurde *Z*-Ala-OCam auch mit H-Arg-OPrⁱ und H-Arg-OBuⁱ umgesetzt. Die Ergebnisse dieser Reaktionen sind ebenfalls in Tabelle 2 dargestellt. Es zeigt sich, daß Papain Ester sekundärer Alkohole im untersuchten Zeitraum nicht angreift, so daß sich *Z*-Ala-Arg-OPrⁱ in hoher Konzentration akkumuliert. Der Reaktionsverlauf mit H-Arg-OBuⁱ unterscheidet sich nur geringfügig von der Reaktion des entsprechenden Methylesters.

Einfluß von pH und Nucleophilkonzentration

Unter sonst gleichen Bedingungen wurde die Reaktion von *Z*-Ala-OCam mit H-Arg-OMe bei pH 7.0, 8.0 und 9.0 durchgeführt. Bei pH 7.0 wurden deutlich

Tabelle 3. Papainkatalysierte Umsetzung von 0.03 M *Z*-Ala-OCam mit unterschiedlichen Konzentrationen an H-Arg-OMe bei pH 9.0

H-Arg-OMe	Produkt	Gehalt (%) nach			
		2 min	30 min	35 min	45 min
100 mM	<i>Z</i> -Ala-Arg-OMe	76	14	3	2
	<i>Z</i> -Ala-Arg-Arg-OMe	6	48	45	30
	<i>Z</i> -Ala-Arg-Arg-OH	0	3	7	16
	<i>Z</i> -Ala-Arg-Arg-Arg-OMe	0	4	7	11
300 mM	<i>Z</i> -Ala-Arg-OMe	80	53	23	4
	<i>Z</i> -Ala-Arg-Arg-OMe	6	30	48	53
	<i>Z</i> -Ala-Arg-Arg-OH	0	0	2	4
	<i>Z</i> -Ala-Arg-Arg-Arg-OMe	0	0	6	16

schlechtere Ausbeuten erreicht, während die Reaktionsführung bei pH 9.0 zu einer leichten Verbesserung führt. Diese Ergebnisse liegen in Übereinstimmung mit Befunden zum pH-Einfluß auf kinetisch kontrollierte Synthesen, ausgehend von Edukten mit ungeladenen Seitenketten [14]. Danach ist der pH-Effekt auf den Reaktionsverlauf im wesentlichen mit einer Verschiebung des Protonierungsgleichgewichts der α -Aminogruppe des Nucleophils zu erklären.

Bei pH 9.0 wurde eine Synthese ausgehend von der dreifachen Nucleophilkonzentration durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die Resultate zeigen, daß H-Arg-OMe die papainkatalysierte Umsetzung schwach hemmt. Das Verhältnis von Synthese zu Hydrolyse wird für die Einzelreaktionen günstiger. Dementsprechend lassen sich höhere Konzentrationen der verschiedenen Peptidester erreichen. Die erhöhte Nucleophilkonzentration verzögert den Abbruch der Kettenreaktion, und nach 45 min liegen noch 73% des eingesetzten *Z*-Ala-OCam als Verbindung der allgemeinen Formel *Z*-Ala-(Arg)_{*n*}-OMe vor.

Die vorgestellten Ergebnisse belegen die Eignung von Papayalatex-Präparaten für die kinetisch kontrollierte Synthese von Argininpeptiden. Der Reaktionsverlauf läßt sich durch geeignete Kombinationen von Alkoholteil der C-Komponente und des Nucleophils sowie über die Reaktionsbedingungen in weiten Grenzen manipulieren.

Dank

Für die Unterstützung bei der Durchführung der HPLC-Analysen möchten wir uns bei Dr. Evgeni Maximov und Dr. Leonid Vinokurov vom Institut für Eiweißforschung in Pushchino bedanken.

Literatur

- [1] Jakubke H.-D., Kuhl P., Könnecke A. (1985) *Angew. Chem. Int. Edn. Engl.* **24**: 85
- [2] Fruton J. S. (1982) In: Meister A. (ed.) *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.*, Vol. 53. Wiley, New York, p. 239
- [3] Martinez J., Laur J., Castro B. (1983) *Tetrahedron Lett.* **24**: 5219

- [4] Mitin Y. V., Gorbunova E. Y., Ogiy S. A., Kuhl P. (1985) *Bioorg. Khim.* **11**: 709
- [5] Wünsch E. (1974) Synthese von Peptiden. In: Müller E. (ed.) Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie, Vol. 15. Thieme, Stuttgart
- [6] Ohno M., Saruwatari J., Watanabe M. (1977) *J. Biochem.* **82**: 645
- [7] Lowe G. (1976) *Tetrahedron* **32**: 291
- [8] Kuhl P., Zacharias U., Burckhardt H., Jakubke H.-D. (1985) *Monatsh. Chem.* **117**: 1195
- [9] Gololobov M. Y., Borisov I. L., Svedas V. K. (1987) *Biokhimiya* **52**: 584
- [10] Kasche V. (1986) *Enzyme Microb. Technol.* **8**: 4
- [11] Könnecke A., Schellenberger V., Hofmann H.-J., Jakubke H.-D. (1984) *Pharmazie* **39**: 785
- [12] Martinez J., Laur J., Castro B. (1985) *Tetrahedron* **41**: 739
- [13] Cohen S. G., Torem B., Vaidya V., Ehret A. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**: 4722
- [14] Schellenberger V., Könnecke A., Jakubke H.-D. (1984) In: Ragnarsson U. (ed.) *Peptides*. Almqvist & Wiksell, Stockholm, p. 201

Eingegangen 11. Juli 1988. Angenommen 25. Juli 1988