

Enzymatische Hydrolyse hydrophiler Ester durch Lipasen - eine milde Carboxydeblockierung von Peptiden und Glycopeptiden

Günther Braum, Peter Braun, Danuta Kowalczyk und Horst Kunz*

Institut für Organische Chemie, Universität Mainz, Becher-Weg 18-20, D-(W)-6500 Mainz, Germany.

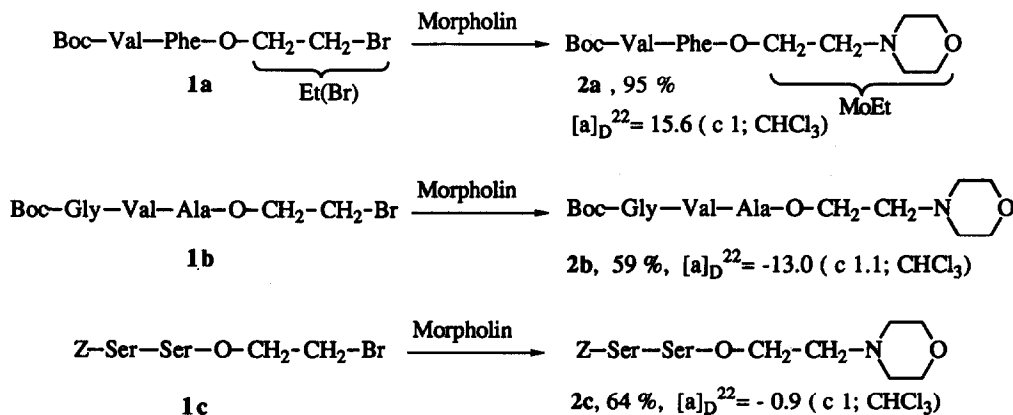
Key words: Enzymatic protecting group technique, lipase-catalyzed hydrolysis, polar esters, peptides, glycopeptides.

Abstract: The markedly hydrophilic 2-(N-morpholino)ethyl (MoEt) esters of protected peptides and glycopeptides are selectively and efficiently cleaved by lipases in water/acetone (10:1) at pH 7.

In der Synthese polyfunktioneller empfindlicher Natur- und Wirkstoffe, z. B. der Glycopeptide, spielen selektiv abspaltbare Schutzgruppen eine entscheidende Rolle.¹ Enzymatische Prozesse, die in der Regel unter neutralen, allenfalls schwach sauren oder schwach basischen Bedingungen ablaufen, sind in jüngster Zeit erfolgreich zu selektiven Schutzgruppenabspaltungen herangezogen worden.² In der Peptidchemie nutzte man die Esterhydrolyse durch Proteasen,³ wobei konkurrierend natürlich auch die unerwünschte Spaltung von Peptidbindungen eintreten kann. Solchen Beschränkungen unterliegen Esterhydrolysen nicht, wenn sie durch Lipasen katalysiert werden. Die enzymatische Spaltung von Peptid-⁴ und Glycopeptid-n-heptylestern⁵ durch Lipasen ließ sich in diesem Sinne zu einer leistungsfähigen Deblockierung der Carboxylfunktion ausnutzen. Der Heptylester wurde in diesen Untersuchungen gewählt, um den emulgierenden und hydrophoben Charakter der natürlichen Substrate der Lipasen, der Fettsäureester, zu imitieren. Da die Esteraseaktivität der Lipasen durch organische Cosolventien herabgesetzt wird und geschützte Peptide hydrophober Aminosäuren in wäßriger Lösung kaum emulgiert oder benetzt werden, sind Heptylester solcher hydrophober Peptide durch Lipasen nur sehr langsam oder gar nicht hydrolysierbar.⁴ Kurzkettige Alkylester von Aminosäuren wie Methyl ester werden von Lipasen kaum als Substrate akzeptiert,⁶ so daß die enzymatische Deblockierung der Carboxylfunktion durch Esterhydrolasen strukturabhängig begrenzt wird.

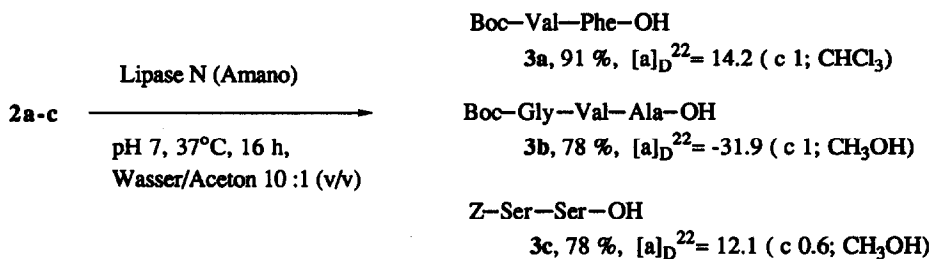
Wir fanden nun, daß ausgesprochen hydrophile Ester von geschützten Aminosäuren und Peptiden, wie die 2-(N-Morpholino)ethyl(MoEt)-Ester, von Lipasen als Substrate angenommen und hydrolysiert werden.⁷

Zur Synthese von (Morpholino)ethylestern geht man von 2-Halogenethylestern, z. B. von 2-Bromethylestern^{1,8} von geschützten Aminosäuren und Peptiden aus, die über das Chlorosulfit-Verfahren von Brenner⁹ leicht zugänglich sind. Durch Rühren der Bromethylester **1** in Morpholin bei Raumtemperatur entstehen die geschützten Peptid-(morpholino)ethylester **2** ohne Nebenreaktion. Die (Morpholino)ethylester **2** lösen sich in verdünnter Säure und werden nach Einstellen der wäßrigen Lösung auf pH 9 mit Dichlormethan extrahiert. Verluste treten bei diesen bisher noch nicht optimierten Versuchen bei den polaren Vertretern (**2b**, **2c**) wegen deren Wasserlöslichkeit allenfalls durch unvollständige Extraktion auf. Morpholin ist schwach basisch ($pK_A \sim 8.3$) und verursacht keine Racemisierung. Die Bedingungen während der Umwandlung und bei der Aufarbeitung illustrieren, daß die (Morpholino)ethylester **2** sowohl gegen Säuren als auch gegen Basen stabil sind. Sie lassen sich daher bei Peptidsynthesen mit einer Vielzahl von Schutzgruppen in orthogonal stabilen Kombinationen anwenden.



Schema 1

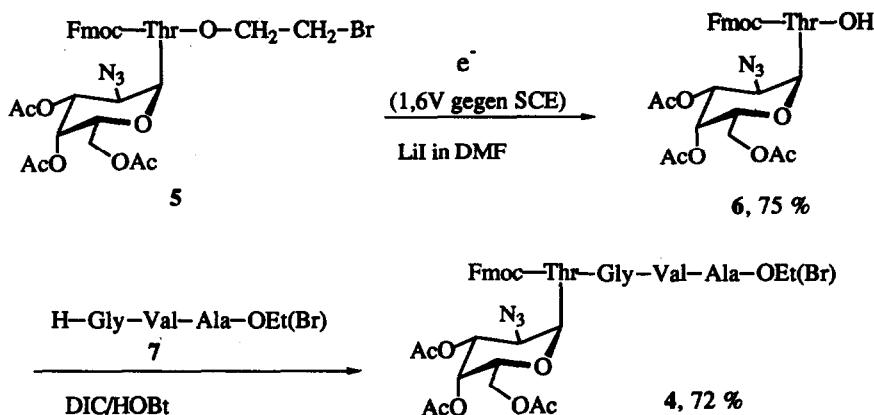
Zur enzymatischen Hydrolyse der Peptid-(morpholino)ethylester **2** wurde ohne optimierende Vorversuche die bei den *n*-Heptylestern^{4,5} bewährte Lipase N (Amano Pharmaceutical Corp.) aus *Rhizopus niveus* eingesetzt, wobei in der Lipase-Präparation enthaltene Reste von Proteasen durch Vorinkubation mit Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) inhibiert werden. Die so vorbehandelte Enzymlösung in Natriumphosphat-Puffer bewirkt bei pH 7 und 37°C und Zusatz von 9% (v/v) Aceton innerhalb von 16h eine vollständige Hydrolyse der Peptid-(morpholino)ethylester **2**. Nach Entfernen von Verunreinigungen durch Ausschütteln der wäßrigen Lösung bei pH 8.5 mit Ether sind die carboxydeblockierten Peptide **3** nach Ansäuern auf pH 4 durch Extraktion mit Essigsäureethylester rein zu isolieren.



Schema 2

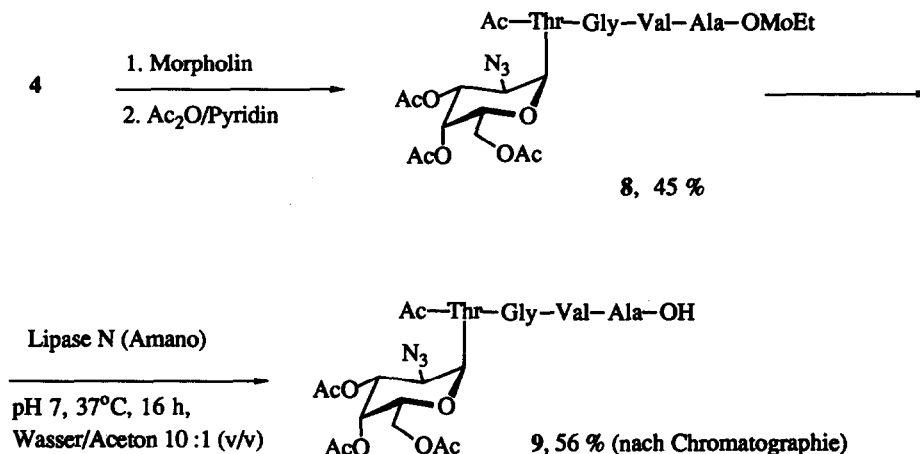
Wegen der milden, neutralen Reaktionsbedingungen der Lipase-katalysierten Hydrolyse eignen sich die (Morpholino)ethylester als Schutzgruppen in der Glycopeptidsynthese. Mit dem Ziel, photoaktivierbare Substrate für den Galactosylrezeptor¹⁰ aufzubauen, wurde der Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-geschützte¹¹ Glycotetrapeptid-bromethylester **4** synthetisiert.¹² Er enthält die Sequenz A⁴-A⁷ von menschlichem Glycophorin A mit M-Blutgruppenspezifität¹³ und einen O-glycosidisch an Threonin gebundenen 2-Azido-galactosyl-Rest. In der Synthese von **4** wird die elektrochemische Spaltung von 2-Brom- bzw. 2-Iodethylestern unter potentiostatischen Bedingungen (für 2-Iodethylester bei -1.6 V gegen die Standard-Kalomel-Elektrode) in Gegenwart von Lithium-iodid als Leitsalz in Dimethylformamid^{12,14} genutzt, um die selektive Carboxydeblockierung des O-Glycosyl-Threoninesters **5** zu erreichen. Der reduktiven Eliminierung ist dabei ein Finkelstein-Austausch vom 2-Brom- zum 2-Iodethylester vorgelagert. In diesem schonenden und kontrollierten Verfahren wird die Azidofunktion nicht angegriffen. Ebenso bleiben die Fmoc- und die Acetyl-Schutzgruppen und die O-glycosidische Bindung unangetastet. Die Kondensation des erhaltenen Produkts **6** mit dem aus **1b** durch N-terminale Deblockierung mit Trifluoressigsäure gewonnenen Tripeptidesters **7** unter der Wirkung von

Diisopropylcarbodiimid (DIC)/1-Hydroxy-benzotriazol (HOBt)¹⁵ liefert das gewünschte O-(2-Azido-galactosyl)-Threonin-Tetrapeptid **4**.¹²



Schema 3

Durch Behandeln von **4** mit Morpholin werden simultan die Fmoc-Gruppe entfernt¹⁶ und der Bromethyl- in den (Morpholino)ethylester umgewandelt. Da die Umwandlung des Bromethylesters zunächst nicht erwartet wurde, ist diese Reaktion bereits nach 30 Minuten abgebrochen worden. Höhere Ausbeuten an (Morpholino)ethylester sind bei längeren Reaktionszeiten einfach zu erreichen. Nachfolgende Acetylierung liefert den Glycopeptid-(morpholino)ethylester **8**.¹⁷



Schema 4

Die Lipase-katalysierte Hydrolyse des (Morpholino)ethylesters **8** verläuft selektiv. Weder die Azidofunktion noch die Essigsäureesterfunktionen im Kohlenhydrateil des carboxydeblockierten Glycopeptids **9**¹⁸ werden angegriffen.

Die Stabilität der (Morpholino)ethylester und ihre selektive enzymatische Spaltbarkeit neben säure- (Boc), basen- (AcO) und reduktionsempfindlichen (Z, N₃) Funktionen sind günstige Eigenschaften für einen selektiven Schutz der Carboxylgruppe in Peptid- und Glycopeptidsynthesen. Hervorzuheben ist besonders, daß die (Morpholino)ethylester von Peptiden und Glycopeptiden keine ausgesprochen unpolaren Molekülregionen

enthalten, die Ähnlichkeit zu den natürlichen Substraten der Lipasen simulieren. Daß sie von diesen normalerweise in der Lipid-Wasser-Grenzfläche wirkenden Enzymen als Substrate akzeptiert werden, war deshalb durchaus nicht vorauszusehen. Ihre Spaltung verläuft sogar rascher als die entsprechender Heptylester. Da sie eine Löslichkeit oder zumindest eine Benetzbarkeit der Substrate in wäßriger Phase gewährleisten, können Morpholinoethylester von hydrophoben Peptiden, z. B. **2a**, deren entsprechende n-Heptylester nicht reagieren,⁴ durch Lipasen effektiv gespalten werden.

Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

Literatur und Anmerkungen

1. Übersichten: a) Kunz, H.; Brill, W. K.-D. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* (Tokyo), 1992, 4,71; b) Kunz, H.; Waldmann, H. in *Comprehensive Organic Synthesis* (Hrsg. Trost, B.M.; Fleming, I.) Vol. 6 (Hrsg. Winterfeldt, E.) Pergamon Press, Oxford, 1991, 631.
2. Übersicht: Waldmann, H. *Kontakte* (Merck) 1991, 2, 33.
3. Übersichten: Herrmann, P. *Wissensch. Zeitschr. Univ. Halle*, 1987, 36, 17; b) Glass, J. D. in *The Peptides* (Hrsg. Udenfried, S.; Meienhofer, J.) Vol. 9, Academic Press, San Diego, 1987, S. 167.
4. Braun, P.; Waldmann, H.; Vogt, W.; Kunz, H. *Synlett* 1990, 105; sowie *Liebigs Ann. Chem.* 1991, 165.
5. Braun, P.; Waldmann, H.; Kunz, H. *Synlett* 1992, 39.
6. West, J. B.; Wong, C.-H. *Tetrahedr. Lett.* 1987, 28, 1629.
7. Deutsche Patentanmeldung, Hoechst AG (Erf. Kunz, H.; Braum, G.; Braun, P.) P 4133 139.7, 7. Okt. 1991.
8. a.) Kunz, H.; Buchholz, M. *Chem. Ber.* 1979, 112, 2145; b) Buchholz, M.; Kunz, H. *Liebigs Ann. Chem.* 1983, 1859.
9. Brenner, M.; Huber, W. *Helv. Chim. Acta* 1953, 36, 1109.
10. Ashwell, G.; Harford, J. *Annu. Rev. Biochem.* 1982, 51, 531.
11. Carpino, L. A.; Han, G. Y. *J. Am. Chem. Soc.* 1970, 92, 5748.
12. Kunz, H.; Braum, G. unveröffentlichte Resultate, Braum, G. Dissertation Universität Mainz, 1991.
13. Tomita, M.; Marchesi, V. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, 72, 2964.
14. Kunz, H.; Friedrich, S. unveröffentlichte Ergebnisse; Friedrich, S. Diplomarbeit, Universität Mainz 1982.
15. König, W.; Geiger, R. *Chem. Ber.* 1970, 103, 788.
16. Schultheiß-Reimann, P.; Kunz, H. *Angew. Chem.* 1983, 95; 64; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1983, 22, 62; *Angew. Chem. Suppl.* 1983, 39.
17. **8**: $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = 54.4$ (c 1, CHCl₃); ¹³C-NMR (CDCl₃): δ 97.92 (C-1); 56.87 (COO-CH₂-CH₂-N); 56.37 (N-CH₂; Morpholin); 43.36 (CH₂, Gly); 31.36 (β -C, Val); 19.0 (CH₃, Ala); 16.77 (γ -CH₃, Thr).
18. **9**: $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = 56.2$ (c 0.5, MeOH); ¹³C-NMR(DMSO-d₆): δ 98.02 (C-1); 42.00 (CH₂, Gly); 30.75 (β -CH, Val); 18.93 (CH₃, Ala); 16.93 (γ -CH₃, Thr).

(Received in Germany 26 February 1993)