

## SYNTHESE VON CASEIN-PEPTIDEN NACH DER MERRIFIELD-METHODE

L-VAL-L-ASP-L-GLU-L-GLU-L-GLU-D,L-SER-L-ILE-L-ALA-L-MET-L-GLU-L-LYS

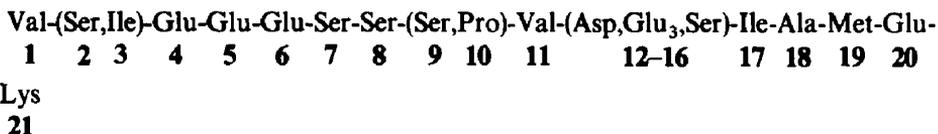
K. H. NEY und K. P. POLZHOFER  
Unilver Forschungslaboratorium Hamburg

(Received in Germany 1 July 1968; Received in the UK for publication 9 July 1968)

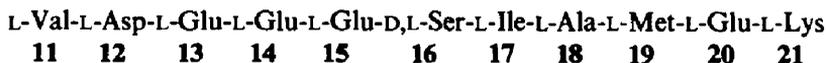
**Zusammenfassung**—Das Casein-Peptid L-Val-L-Asp-L-Glu-L-Glu-D,L-Ser-L-Ile-L-Ala-L-Met-L-Glu-L-Lys wurde nach der Merrifield-Methode synthetisiert. Nach der Abspaltung vom Kunstharz erhielt man 21.7 g Rohpeptid. Das Rohpeptid wurde durch wiederholte Ionenaustauscherchromatographie und Gelfiltration gereinigt. Die Ausbeute an analysenreinem Peptid, bezogen auf die C-terminale Aminosäure im Harz, betrug 4.9 g, das sind 28%. Über die Synthese von Casein-Peptiden wurde in der Literatur bisher noch nicht berichtet.

**Abstract**—The casein peptide L-val-L-asp-L-glu-L-glu-D,L-ser-L-ile-L-ala-L-met-L-glu-L-lys was synthesized by Merrifield's solid-phase method. After cleavage from the resin, 21.7 g crude peptide was obtained. The peptide was purified by repeated ion-exchange chromatography and gel-filtration. The yield of analytical grade peptide, related to the C-terminal amino acid on the resin, was 4.9 g (28%). So far, the synthesis of casein peptides has not yet been mentioned in the literature.

EINER der wenigen Beiträge zur Strukturaufklärung von Casein-Peptiden ist die Arbeit von Schormüller *et al.*<sup>1</sup> Aus einem trypsinresistenten Peptidgemisch des  $\alpha$ -Caseins isolierten die Autoren säulenchromatographisch 3 Phosphor-Peptide. Das grösste der erhaltenen Bruchstücke wurde durch saure Partialhydrolyse weiter gespalten. Durch Aminosäure-Analysen und Endgruppenbestimmungen konnte eine Partialstrukturformel des Phosphor-Peptides aufgestellt werden:



Für die Herstellung des Undecapeptids der C-terminalen Sequenz 11–21, das von uns als Modellsubstanz benötigt wurde, wählten wir das Merrifield-Verfahren<sup>2</sup>; die Reihenfolge der Aminosäuren zwischen 12 und 16 setzten wir willkürlich fest:



### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Für die Peptidsynthese am Kunstharz ersetzten wir das Schüttelgefäss nach Merrifield durch einen Rundkolben mit eingeschmolzener Glasfritte<sup>3</sup>, durch die Lösungsmittel und Reaktionsprodukte rascher abgesaugt werden konnten als bisher. Ein

besonderer Aufsatz mit Anschlussstücken für die einzelnen Lösungsmittel-Reservoirs gestattet die Zufuhr der Lösungen unter vollständigem Ausschluss von Luftfeuchtigkeit. So können Peptidsynthesen auch im Kältebad ausgeführt werden.

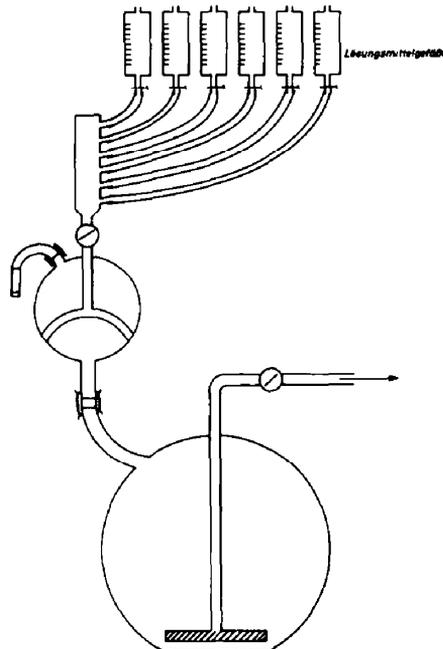


ABB. 1 Apparatur für die Merrifield-Synthese.

Die für die Peptidsynthese benötigten Boc-Aminosäuren\* wurden durch Umsetzung der Aminosäuren mit Boc-Azid und NaOH bei konstantem pH<sup>4</sup> erhalten. Boc- $\gamma$ -Bzl-L-Glu und Boc- $\beta$ -Bzl-L-Asp wurden nach dem Magnesiumoxid-Verfahren<sup>5</sup> hergestellt. Die funktionellen Gruppen in den Seitenketten von Asp, Glu, Ser und Lys wurden als Benzylester, Benzyläther und Benzyloxycarbonyl-Verbindungen vor Nebenreaktionen während der Kettenverlängerung geschützt. Diese Schutzgruppen werden gleichzeitig mit dem Peptid vom Harz abgespalten.

Als Träger wurden Bio-Beads S-X 2<sup>†</sup> benutzt. Durch Chlormethylierung mit Chlormethylmethyläther und SnCl<sub>4</sub> erhielten wir ein Harz mit einem Chlormethylgehalt von 1.24 mMol/g.

Das Triäthylammoniumsalz der C-terminalen Aminosäure wurde mit dem Chlormethylpolymeren 48 Std. in siedendem Äthanol umgesetzt. Um eine Überladung des Harzes an Peptid zu vermeiden, wurde um etwa 20% weniger N<sup>α</sup>-t-Butyloxycarbonyl-N<sup>ε</sup>-Z-L-Lys-Triäthylammoniumsalz eingesetzt, als der Theorie entsprach.

Die Kupplungen der einzelnen Boc-Aminosäuren wurden mit äquimolaren Mengen DCCI in Methylenchlorid bei Raumtemperatur ausgeführt. Eine Reaktionsdauer

\* Abkürzungen: Boc- = t-Butyloxycarbonyl; Z- = Benzyloxycarbonyl; Bzl- = Benzyl; DCCI = N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid.

† Fa. Bio-Rad, München; Copolymerisat aus Styrol und 2% Divinylbenzol in Perlforn, Siebzahl 200-400 mesh.

von 2 Std. erwies sich als ausreichend. Der entstehende N,N'-Dicyclohexylharnstoff wurde nach der Kupplung mit einem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ -Gemisch ausgewaschen.

Bei der Behandlung des Peptidharzes mit  $\text{HBr}$ /Trifluoressigsäure würde Methionin durch entstehendes Benzylbromid zur Benzylsulfonium-Verbindung umgewandelt werden. Deshalb wurde der Suspension des Peptidharzes in Trifluoressigsäure vor dem Einleiten des Bromwasserstoffs Methyläthylsulfid\* zugesetzt.

Von einigen Autoren<sup>3</sup> wurde die Vermutung geäußert, dass, entgegen der Vorschrift von Merrifield<sup>2</sup>, bereits 20–30 Min. genügen würden, um das Peptid mit Bromwasserstoff vom Harz abzuspalten; auf diese Weise könnte man reinere Peptide als bisher (Abspaltungsdauer 90 Min.) erhalten. Wir stellten fest, dass schon nach 15 Min. die Hauptmenge des Peptides vom Harz entfernt worden war; nach weiteren 65 Min. konnten nur noch Spuren Peptid aus den Trifluoressigsäure-Lösungen isoliert werden. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der beiden so gewonnenen Rohpeptid-Fractionen zeigten keinerlei Unterschiede in der Zusammensetzung der Komponenten.

Durch Gelfiltration an Sephadex G-15 wurde eine grobe Trennung des Undecapeptids von niedermolekularen Stoffen erreicht. Die Feinreinigung des Peptides erfolgte durch Ionenaustauscher-Chromatographie an Dowex  $1 \times 2$  mit einem Pyridin/Collidin/Acetat-Puffer; die Elution des sauren Peptides gelang durch Variation des pH-Wertes zwischen 8.3 und 3.9 (linearer Essigsäure-Gradient). Aus dem Bild 2 kann ersehen werden, welche Fractionen vereinigt und durch nochmalige Ionenaustauscher-Chromatographie und Gelfiltration weiter gereinigt wurden.

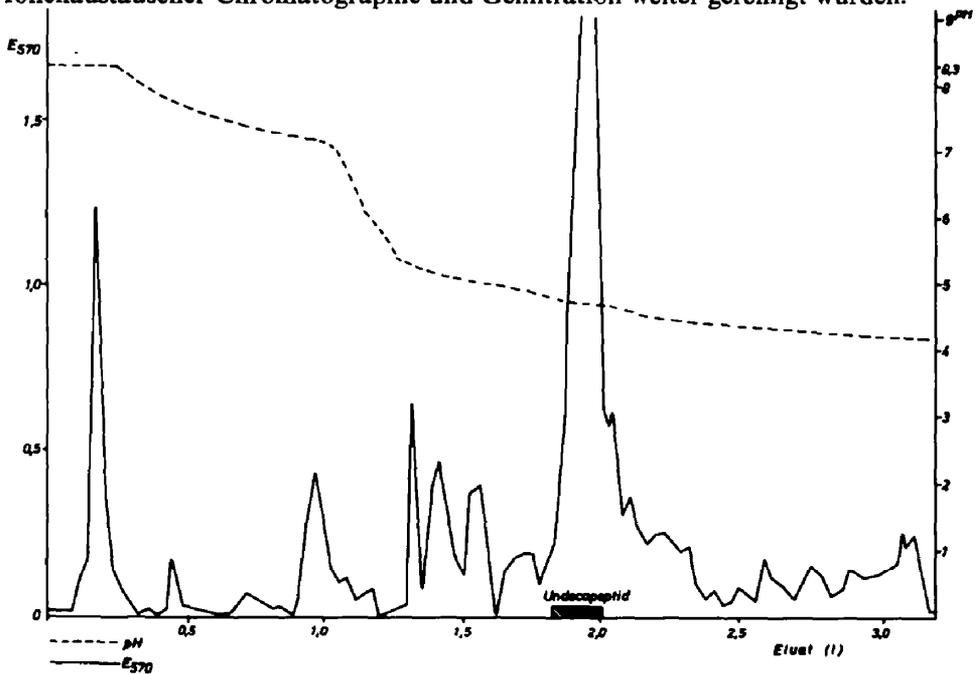


ABB. 2 Ionenaustauscher-Chromatographie an Dowex  $1 \times 2$  (200–400 mesh). Säule:  $70 \times 2.5$  cm; Puffer: Pyridin/Eisessig/2,4,6-Collidin/ $\text{H}_2\text{O}$ , pH = 8.3; Gradient: Steigende Essigsäurekonzentration (bis 1N); Eluiergeschwindigkeit: 10 ml/Std.  $\text{cm}^2$ ; Fractionen: je 3 ml; Nachweis: Ninhydrin-Reaktion.

\* Fluka AG, Buchs SG.

Nach sämtlichen Reinigungsoperationen konnte durch Papier- und Dünnschichtchromatographie, Elektrophorese und quantitative Aminosäure-Analyse in Tabelle 1 die Einheitlichkeit des Casein-Peptides bestätigt werden.

TABELLE 1. MOLVERHÄLTNIS DER AMINOSÄUREN IM PEPTID

	Glu	Ser	Ala	Asp	Ile	Val	Lys	Met	Thr*	Met-O*	NH <sub>3</sub>
Theor.	4	1	1	1	1	1	1	1	—	—	—
Gef.	4·00	1·00	1·04	1·04	1·06	1·12	1·22	0·22	0·31	0·31	0·47

\* Thr und Met-O (Methioninsulfoxid) entstehen unter den Bedingungen der Hydrolyse aus Met.

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

*Lösungsmittelgemische.* n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24 (v/v) (BPEW); Chloroform/Methanol/Eisessig 90:10:5 (v/v) (CME).

*Pyridin/Acetat-Puffer.* Pyridin/Eisessig/Wasser 1:10:289 (v/v), pH = 3·6; Pyridin/Eisessig/Wasser 25:1:225 (v/v), pH = 6·4; Pyridin/Eisessig/Wasser 4:1:995 (v/v), pH = 5·5.

Für die Papierelektrophorese wurde das Beckman-Gerät (Durrum-Zelle, Modell R, Serie D) verwendet; Spannungsgefälle = 20 V/cm.

Quantitative Aminosäure-Analysen wurden nach Hannig<sup>6</sup> auf einem Aminosäure-Analysator von Dr. Bender—Dr. Hobein, München, ausgeführt. Die Peptide wurden 20 Std. bei 110° in 6N HCl i. Vak. in der Ampulle hydrolysiert.

*Boc-Aminosäuren.* Boc- $\gamma$ -Bzl-L-Glu und Boc- $\beta$ -Bzl-L-Asp wurden in 30% iger Ausbeute aus  $\gamma$ -Bzl-L-Glu<sup>7</sup> bzw.  $\beta$ -Bzl-L-Asp<sup>8</sup> nach dem Magnesiumoxid-Verfahren<sup>5</sup> hergestellt. L-Val, O-Bzl-D,L-Ser, L-Ile, L-Ala, L-Met und N<sup>z</sup>-Z-L-Lys wurden mit der pH-Stat-Reaktion<sup>4</sup> in die Boc-Derivate übergeführt. Die pH-Werte (s. Tabelle 2) wurden während der Reaktionsdauer genau eingehalten.

TABELLE 2. ANGABEN ZUR pH-STAT-REAKTION

Aminosäure	pH	Ausbeute an Boc-Aminosäure
Ala	10·1	85%
Ile	9·8	92%
Met	9·7	90%
Val	9·5	56%
O-Bzl-Ser	9·1	80%
N <sup>z</sup> -z-Lys	10·2	65%

Die Reinheit der Boc-Aminosäuren wurde dünnschichtchromatographisch und durch Messung der optischen Drehung geprüft. Bedingungen für die Dünnschichtchromatographie: Sorptionsschicht = Kieselgel G; Fließmittel = CME.

*N<sup>z</sup>-Boc-N<sup>z</sup>-Z-L-Lys-Polymeres.* 50 g chlormethyliertes Polystyryl-2% Divinylbenzol-Harz (1·24 mMol) Chlormethyl/g wurden mit einer Lösung von 19·0 g (50 mMol) N<sup>z</sup>-Boc-N<sup>z</sup>-Z-L-Lys und 7 ml (50 mMol) Triäthylamin in 200 ml abs. Äthanol 48 Std. am Rückfluss gekocht. Das veresterte Harz wurde abgesaugt, mit Äthanol, Wasser, Methanol und Äther gewaschen und bei 1–2 Torr und 40° getrocknet. Die Menge der C-terminalen Aminosäure im Harz wurde aus der Gewichtszunahme des Polymeren (7·95 g) und durch eine Chlorid-Bestimmung nach Volhard im HCl·N<sup>z</sup>-Z-L-Lys-Polymeren errechnet. Das Harz enthielt danach 0·42 mMol Aminosäure/g.

*N<sup>z</sup>-Boc-Val- $\beta$ -Bzl-Asp- $\gamma$ -Bzl-Glu- $\gamma$ -Bzl-Glu- $\gamma$ -Bzl-Glu-O-Bzl-Ser-Ile-Ala-Met- $\gamma$ -Bzl-Glu-N<sup>z</sup>-Z-Lys-Polymeres.* 30 g N<sup>z</sup>-Boc-N<sup>z</sup>-Z-L-Lys-Polymeres (12·6 mMol Aminosäure) wurden in das von uns entwickelte Schüttelgefäß (s. Abb. 1) gegeben und in 150 ml Eisessig suspendiert. Für jede Aminosäurekupplung wurden die Schritte 1–13 des Arbeits-Schemas der Tabelle 3 durchlaufen. Nach der letzten Peptidkupplung wurde bei Schritt Nr. 12 unterbrochen, das Peptidharz mit Äther gewaschen und bei 1–2 Torr und 40° getrocknet.

TABELLE 3. SCHEMA DER ARBEITSGÄNGE EINER AMINOSÄUREKUPPLUNG

Schritt Nr.	Lösungsmittel	Anzahl der Waschschrirte	Lösungsmittelvolumen pro Waschschrirte (ml)	Schüttelzeit pro Waschschrirte (Min.)	Reaktion
1	Eisessig	3	150	3	—
2	1N HCl in Eisessig	1	200	30	Abspaltung der Boc-Schutzgruppe
3	Eisessig	3	150	3	—
4	Äthanol	3	150	3	—
5	CHCl <sub>3</sub>	3	150	3	—
6	10% Et <sub>3</sub> N in CHCl <sub>3</sub>	1	200	20	Neutralisation des Hydrochlorids
7	CHCl <sub>3</sub>	3	150	3	—
8	Äthanol	3	150	3	—
9	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3	150	3	—
10	Boc-Aminosäure/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1	150	10	—
11	DCCI/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1	50	120	Aminosäure-Kupplung
12	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3	150	3	—
13	Äthanol	3	150	3	—

Um die Ausbeuten der einzelnen Kupplungsschritte zu verfolgen, wurden nach jedem Arbeitsgang 50 mg Peptidharz mit 6N HCl bei 110° und 12 Torr 20 Std. hydrolysiert und die Aminosäuren quantitativ bestimmt. Für die anschliessende Chlorid-Bestimmung nach Volhard wurden die Filtrate Nr. 6–9 verwendet. Die Chlorid-Werte lagen zwischen 12·6 und 12·3 mMol Chlorid; die Boc-Aminosäuren wurden in der 2·5 fachen molaren Menge, bezogen auf die einzelnen Volhard-Werte, eingesetzt. DCCI wurde in der gleichen molaren Menge wie die Boc-Aminosäuren zugesetzt.

*Val-Asp-Glu-Glu-Glu-Ser-Ile-Ala-Met-Glu-Lys-di-trifluoacetat.* Die Abspaltung des Peptides vom Harz sowie die Entfernung der Schutzgruppen mit Bromwasserstoff wurden im Reaktionsgefäss unter Ausschluss von Feuchtigkeit durchgeführt. Man suspendierte das Peptidharz in 150 ml Trifluoressigsäure, gab 10 ml Methyläthylsulfid zu und leitete 20 Min. einen mässigen, trockenen Bromwasserstoff-Strom durch die Suspension. Der Bromwasserstoff wurde vorher durch einen CaCl<sub>2</sub>-Trockenturm und durch eine 10%ige Lösung von Resorcin in Trifluoressigsäure geleitet. Das Harz wurde abgesaugt und dreimal mit je 100 ml Trifluoressigsäure nachgewaschen. Das Filtrat wurde eingengt und dreimal mit je 50 ml Trifluoressigsäure i.Vak. bei 30° eingedampft. Der Rückstand wurde mit absolutem Äther versetzt und gut durchgerieben. Die gelblich gefärbte Ätherlösung wurde von der pulvrigen Substanz dekantiert und der Rückstand viermal auf die gleiche Weise behandelt. Der Rückstand wurde i.Vak. über P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> getrocknet und ausgewogen: 21·7 g Rohpeptid.

*Gelfiltration.* Zur Reinigung wurde 1 g Rohpeptid an einer Sephadex G-15-Säule (Gel-Höhe: 90 cm, Durchmesser der Säule: 2·5 cm) mit 0·2N Essigsäure als Elutionsmittel von den niedermolekularen Substanzen befreit. Die ninhydrinpositiven Fraktionen wurden vereinigt und am Rotavapor bei max. 40° eingengt. Der Rückstand wurde gefriergetrocknet.

*Ionenaustauscherchromatographie.* Der Anionenaustauscher Dowex 1 × 2 (200–400 mesh) wurde in der Acetat-Form mit dem Startpuffer Pyridin/Eisessig/2,4,6-Collidin/H<sub>2</sub>O 10:0·4:10:980 (v/v), pH = 8·3, in ein Sephadex-Chromatographierohr (100 cm × 2·5 cm) eingeschlämmt und mit mindestens 3 Säulenvolumina Puffer nachgewaschen (Füllhöhe: 70 cm). Dann wurde das Lyophilisat der Gelfiltration aufgetragen. Die Gradientenapparatur wurde mit 2 l Startpuffer, pH = 8·3 (Gefäss I), und 2 l Startpuffer, 1N an Essigsäure, pH = 3·9 (Gefäss II), gefüllt und an die Säule angeschlossen. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 10 ml/Std. cm<sup>2</sup>, wobei Fraktionen zu je 3 ml gesammelt wurden. 0·1 ml jeder Fraktion wurde für die Ninhydrin-Reaktion—nach vorhergehender Hydrolyse mit NaOH—verwendet. Das erhaltene Elutionsdiagramm zeigt Abb. 2. Durch pH-Messungen in den einzelnen Fraktionen wurde der Gradientenverlauf zwischen pH 8·3 und pH 3·9 festgestellt. Die Fraktionen zwischen 1·825 und 2·0131 wurden

vereinigt, i. Vak. eingedampft und nochmals an Dowex 1  $\times$  2 in der oben beschriebenen Weise chromatographiert. Die Essigsäure-Endkonzentration des Elutionsmittels wurde im zweiten Versuch auf 0.5N herabgesetzt.

Gelchromatographie an Sephadex G-25 (fine). Durch erneute Gelchromatographie an einer Sephadex G-25-Säule (90  $\times$  2.5 cm) wurde das Peptid von Puffer befreit, der durch Gefrier-trocknung der Eluate der Ionenaustauscherchromatographie nicht vollständig entfernt werden konnte. Bei dieser Gelchromatographie wurde ausserdem die Einheitlichkeit des Peptides kontrolliert. Mit 0.2N Essigsäure als Elutionsmittel (Fließgeschwindigkeit: 7 ml/Std. cm<sup>2</sup>) konnte in den Fraktionen (je 3 ml) nur ein einzelner Peak festgestellt werden. Nach Eindampfen der essigsäuren Lösung i. Vak. bei 40° und anschliessender Gefrier-trocknung erhielt man 227 mg (28%) einer weissen, pulvrigen Substanz, die dünnschicht- und papierchromatographisch einheitlich war.

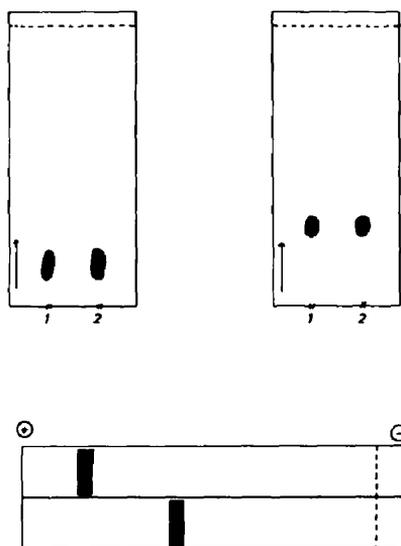


Abb. 3 Chromatographisches und elektrophoretisches Verhalten des Casein-Peptides.

Auch durch Papierelektrophorese (s. Abb. 3) und quantitative Aminosäure-Analyse (Glu 4.0; Ser 1.0; Ala 1.04; Asp 1.04; Val 1.12; Ile 1.06; Lys 1.22; Met 0.84) wurde die Einheitlichkeit des Undecapeptides bewiesen.

*Danksagung*—Herrn Dr. W. Schulz danken wir sehr für die Durchführung der quantitativen Aminosäure-Analysen, Herrn A. Runge für die gewissenhafte Ausführung der Versuche.

#### LITERATUR

- <sup>1</sup> J. Schormüller, R. Hans und H.-D. Belitz, *Z. Lebensm. Unters. u.-Forsch.* **131**, 65 (1966).
- <sup>2</sup> R. B. Merrifield, *Biochem.* **3**, 1385 (1964).
- <sup>3</sup> M. C. Khosla, R. S. Smeby und F. M. Bumpus, *Science, Washington* **156**, 253 (1967).
- <sup>4</sup> E. Schnabel, *Liebigs Ann.* **702**, 188 (1967).
- <sup>5</sup> R. Schwyzer, P. Sieber und H. Kappeler, *Helv. Chim. Acta* **42**, 2622 (1959).
- <sup>6</sup> K. Hannig, *Clin. Chim. Acta* **4**, 51 (1959).
- <sup>7</sup> St. Guttmann und R. A. Boissonnas, *Helv. Chim. Acta* **41**, 1852 (1958).
- <sup>8</sup> L. Benoiton, *Canad. J. Chem.* **40**, 570 (1962).