



DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

PATENTSCHRIFT 144 538

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(11)	144 538	(44)	22.10.80	Int. Cl. ³ 3(51) C 07 C 103/52
(21)	WP C 07 C / 213 883	(22)	26.06.79	

(71) siehe (72)

(72) Kuhl, Peter, Dr. Dipl.-Chem.; Könnecke, Andreas, Dipl.-Chem.;
Döring, Günter, Dipl.-Biol.; Jakubke, Hans-Dieter, Prof. Dr.,
DD

(73) siehe (72)

(74) Dr. Peter Nenning, Karl-Marx-Universität, Büro für Neuerer-,
Patentwesen und Industrieverbindungen, 701 Leipzig,
Goethestraße 3-5

(54) Verfahren zur Herstellung von Peptiden

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Peptiden, die nach vollständiger bzw. partieller Abspaltung der Schutzgruppen als Wirkstoffe bzw. als Zwischenprodukte von Wirkstoffen dienen können. Ziel der Erfindung ist die Herstellung sterisch einheitlicher Peptide. Durch die Erfindung wird die sonst bei enzymatischen Peptidsynthesen in Puffersystemen unter Zusatz von mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmitteln auftretende Enzymschädigung entscheidend zurückgedrängt und durch leichte Abtrennung der Protease aus dem Reaktionsansatz eine mehrfache Wiederverwendung des Biokatalysators ermöglicht. Die Peptide werden hergestellt aus einer selektiv geschützten Aminosäure oder einem selektiv geschützten Peptid, bei denen die in Reaktion tretende Carboxygruppe unblockiert ist oder eine Estergruppe trägt, und einer selektiv geschützten Aminosäure oder einem selektiv geschützten Peptid einschließlich der entsprechenden Amide, bei denen die in Reaktion tretende Aminogruppe ungeschützt ist, in einem protease-spezifischen Puffersystem mit einer löslichen oder immobilisierten Protease unter Zusatz von mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmitteln oder Mischungen solcher Lösungsmittel. Diese Peptide können nach Abspaltung der Schutzgruppen als Pharmaka oder nach partieller Deblockierung als Zwischenprodukte zur Synthese anderer therapeutisch nutzbarer Peptidwirkstoffe eingesetzt werden.

Titel der Erfindung

VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON PEPTIDEN

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Peptiden, die nach vollständiger bzw. partieller Abspaltung der Schutzgruppen als Wirkstoffe bzw. als Zwischenprodukte von Wirkstoffen dienen können.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zur Herstellung von Peptiden können verschiedene organisch-chemische Verfahren, wie die Azid-Methode, das Anhydrid-Verfahren, die Dicyclohexylcarbodiimid-Methode, das variantenreiche Verfahren der Aktivester und viele andere mehr eingesetzt werden (vgl. Übersicht: WUNSCH, E. (1974) Synthese von Peptiden, in Houben-Weyl, Bd. 15, 1/2, Methoden der organischen Chemie, MÜLLER, E. (Hrsg.) Georg Thieme Verlag, Stuttgart). Bei der Herstellung von Peptiden mit Hilfe dieser genannten Verfahren treten verschiedene Schwierigkeiten auf, die durch Racemisierung, Nebenreaktionen, aufwendige Temperatursteuerung, komplizierte Reinigungsverfahren usw. gekennzeichnet sind. Ein besonders schwerwiegender Nachteil der herkömmlichen Verfahren ist das nach wie vor ungelöste Problem der Vermeidung von Racemisierung, insbesondere bei Fragmentkondensationen. Für den Aufbau langkettiger biologisch aktiver Peptidwirkstoffe ist ein racemisierungsfreier Verlauf der Kupplungsreaktion

von entscheidender Bedeutung, da sich Stereoisomere nicht mehr vollständig abtrennen lassen. Da die optische Reinheit der Syntheseprodukte Voraussetzung für die volle biologische Aktivität der Peptidwirkstoffe ist, ergeben sich eminente Nachteile bei der industriellen Anwendung der genannten organisch-chemischen Verfahren.

Neben den chemosynthetischen Peptidsynthese-Methoden wurden auch Verfahren beschrieben, bei denen Proteasen als Katalysatoren für die Knüpfung der Peptidbindung Verwendung fanden (BERGMANN, M. u. FRAENKEL-CONRAT, H. (1937), J. Biol. Chem., 112, 707). Durch den Einsatz von proteolytischen Enzymen als Katalysatoren bei der Peptidknüpfungsreaktion wird eine Ausschaltung der Racemisierung sowie anderer Nebenreaktionen erreicht und darüber hinaus ist eine einfache Prozeßsteuerung möglich. Bei den bekannten Verfahren der enzymatischen Peptidsynthese (Übersicht: ISOWA, Y. (1978). Yuki Gosei Kagaku Kyokaishi, 36, 195 - 205) erfolgt die Knüpfung der Peptidbindung in Gegenwart proteolytischer Enzyme unter Verwendung geeigneter Puffersysteme unter Zusatz von mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmitteln, um die Reaktanden weitgehend in Lösung zu halten. Weiterhin hat es sich gezeigt, daß durch mit Wasser mischbare organische Cosolventien das Gleichgewicht der proteasekatalysierten Reaktion in Richtung der Synthese verschoben wird (G. A. HOMANDBERG, J. A. MATTIS u. M. LASKOWSKI, Jr. (1978). Biochemistry, 17, 5220; K. INOUE et al. (1979). J. Amer. Chem. Soc., 101, 751). Die Verwendung von mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmitteln besitzt aber den Nachteil, daß a) durch den Zusatz hoher Anteile solcher Lösungsmittel, wie Methanol, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, Tetrahydrofuran u. a. die eingesetzte Protease geschädigt wird und b) eine Rückgewinnung des Biokatalysators zum Zweck eines wiederholten Einsatzes aus solchen Reaktionsmischungen bei industriellen Prozeßführungen praktisch nichtmöglich ist. Darüber hinaus können Alkohole als Cosolventien bei der enzymatischen Peptidsynthese, wenn sie in sehr hohen Anteilen zugesetzt werden, auch als Reaktionspartner fungieren (R. G. INGALLS et al. (1975). Biotech.

Bioeng., 17, 1627 - 1637) und durch die resultierenden Ester-
derivate das Endprodukt verunreinigen.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Herstellung von optisch einheit-
lichen Peptiden durch den Einsatz von löslichen und immobi-
lisierten Proteasen unter Reaktionsbedingungen, die eine mehr-
fache Wiederverwendung der Biokatalysatoren gewährleisten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Durch die Erfindung soll die sonst bei enzymatischen Peptid-
synthesen unter Zusatz mit Wasser mischbarer organischer Co-
solventien mögliche Schädigung des Enzyms und die damit ver-
bundene Verminderung der katalytischen Wirksamkeit entschei-
dend reduziert und gleichzeitig eine mehrfache Wiederverwen-
dung des Biokatalysators ermöglicht werden.

Erfindungsgemäß werden Peptide hergestellt aus einer selektiv
geschützten Aminosäure oder einem selektiv geschützten Peptid,
deren in Reaktion tretende Carboxygruppe unblockiert ist oder
eine Estergruppierung trägt, und einer selektiv geschützten
Aminosäure oder einem selektiv geschützten Peptid einschließ-
lich der entsprechenden Amide, bei denen die in Reaktion tre-
tende Aminogruppe unblockiert ist, in einem proteasespezifische
Puffersystem unter Zusatz von mit Wasser nicht mischbaren or-
ganischen Lösungsmitteln oder Mischungen solcher Lösungsmittel
in Gegenwart löslicher oder immobilisierter Proteasen. Nach
beendeter Peptidsynthese, Produktabtrennung und Aufarbeitung
können die Schutzgruppen erforderlichenfalls nach bekannten
Methoden partiell oder total abgespalten werden.

Im Gegensatz zu bekannten enzymatischen Peptidsynthesen in
Puffersystemen unter Zusatz von mit Wasser mischbaren orga-
nischen Lösungsmitteln wird durch die erfindungsgemäße Verwen-
dung von mit Wasser nicht mischbaren Cosolventien das in der
Pufferphase befindliche Enzym keinen schädigenden Einflüssen
ausgesetzt, und gleichzeitig kann das Enzym nach der Kupplungs-
reaktion durch Phasentrennung zurückgewonnen werden. Durch die

verwendeten inerten, mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel werden unerwünschte Nebenreaktionen, wie sie z. B. bei der literaturbekannten Verwendung von Alkoholen möglich sind, vollständig ausgeschlossen. Der Einsatz immobilisierter Proteasen ermöglicht weiterhin enzymatische Peptidsynthese ohne Produktausfällung. Die nachgewiesene mehrfache Wiederverwendung sowohl des löslichen als auch des immobilisierten Enzyms besitzt eine hohe ökonomische Relevanz. Die Erfindung eignet sich sowohl für den schrittweisen Aufbau eines Peptids als auch für Fragmentkondensationen, wobei zur Blockierung derjenigen funktionellen Gruppen, die selektiv geschützt werden sollen, die in der Peptidchemie gebräuchlichen Schutzgruppen einschließlich polymere Harze mit geeigneten Ankergruppen herangezogen werden können. Als Enzym sind alle bekannten Proteasen einsetzbar, wobei die Auswahl des als Katalysator verwendeten Enzyms in Abhängigkeit vom Syntheseobjekt aufgrund der Substratspezifität erfolgen muß. Interessanterweise konnten mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens auch N^ε-tert.-Butyloxy-carbonyl-geschützte Carboxykomponenten mit Chymotrypsin als Katalysator erfolgreich verknüpft werden, obgleich in der Literatur solche Umsetzungen nicht gelangen. Die Erfindung soll nachstehend an 6 Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

In den Beispielen werden die Aminosäuren nach den international gültigen Regeln abgekürzt. Zusätzlich werden folgende Abkürzungen verwendet:

Ac	Acetyl
Z	Benzyloxycarbonyl
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl
OMe	Methylester
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol

Beispiel 1

Synthese von Ac-Leu-Phe-Leu-NH₂

a) mit gelöstem Chymotrypsin

66,9 mg (0,2 mmol) Ac-Leu-Phe-OMe und 26 mg (0,2 mmol) Leu-NH₂ werden in 1,5 ml 1,1,2-Trichlorethen gelöst, unter Rühren mit 0,5 ml einer 0,1 mM Lösung von Chymotrypsin in NaHCO₃/Na₂CO₃-Puffer (0,2 M, pH 10) versetzt und 20 Min. bei Raumtemperatur gerührt. Das ausgefallene Produkt wird abgefrittet und nacheinander mit Wasser, 1 N HCl, Wasser, NaHCO₃-Lösung sowie noch zweimal mit Wasser gewaschen. Anschließend wird das Produkt bei 110 °C 1 Std. getrocknet.

Ausb. 72,8 mg (84 % d. Th.)

F. 284 - 285 °C

b) mit immobilisiertem Chymotrypsin

Zu einer Suspension von 100 mg an Kieselgel fixiertem Chymotrypsin (entsprechend ca. 2 mg Chymotrypsin) in 1 ml 0,2 M Carbonatpuffer (pH 9,7) werden 66,9 mg (0,2 mmol) Ac-Leu-Phe-OMe und 26 mg (0,2 mmol) Leu-NH₂, gelöst in 1,5 ml Dichlormethan, gegeben und 1,5 Std. bei Raumtemperatur intensiv gerührt. Die Reaktionsmischung wird auf eine Glasfritte gebracht und das geschützte Peptid mit 7mal 1 ml Methanol vom immobilisierten Enzym abgelöst. Das Filtrat wird i. Vak. zur Trockne gebracht, auf eine Fritte überführt und wie unter a) aufgearbeitet.

Ausb. 55 mg (64 %)

F. 284 - 285 °C

2 1 3 8 8 3

Beispiel 2

Synthese von Z-Ala-Phe-Leu-NH₂

a) mit gelöstem Chymotrypsin

76,9 mg (0,2 mmol) Z-Ala-Phe-OMe und 26 mg (0,2 mmol) Leu-NH₂ werden mit 0,5 ml Tetrachlorkohlenstoff und 0,5 ml einer 0,6 mM Lösung von Chymotrypsin in NaHCO₃/Na₂CO₃-Puffer (0,2 M, pH 10) versetzt und bei Raumtemperatur 1,5 Std. gerührt. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert und nacheinander mit Wasser, 1 N HCl, Wasser, NaHCO₃-Lösung sowie noch zweimal mit Wasser gewaschen. Anschließend wird das Produkt bei 110 °C 1 Std. getrocknet.
Ausb. 69,8 mg (72 % d. Th.) F. 224 - 226 °C

b) mit immobilisiertem Chymotrypsin

76,9 mg (0,2 mmol) Z-Ala-Phe-OMe werden in 1,5 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst und dazu 26 mg (0,2 mmol) Leu-NH₂, gelöst in 1,2 ml NaHCO₃/Na₂CO₃-Puffer (0,2 M, pH 10), sowie 250 mg an Kieselgel gebundenes Chymotrypsin (entsprechend ca. 5 mg Chymotrypsin) zugefügt. Nach 2stdg. Rühren bei Raumtemperatur wird der Niederschlag auf eine Glasfritte überführt, das Produkt mit 8mal 1 ml Methanol vom immobilisierten Enzym abgetrennt und wie unter 1b) aufgearbeitet.
Ausb. 67,6 mg (70 % d. Th.) F. 224 - 226 °C

Beispiel 3

Synthese von Boc-Leu-Phe-Leu-NH₂

a) mit gelöstem Chymotrypsin

78,5 mg (0,2 mmol) Boc-Leu-Phe-OMe und 260 mg (2 mmol) Leu-NH₂ werden mit 1,5 ml einer Mischung aus 1,1,2-Trichlorethen und Petrolether (30 - 50 °C) im Verhältnis

1 : 2 sowie 1 ml einer 0,6 mM Lösung von Chymotrypsin in $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Puffer (0,2 M, pH 10) versetzt und 2 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Das ausgefallene Produkt wird abgefrittet und nacheinander mit Wasser, 1 N HCl, Wasser, NaHCO_3 -Lösung sowie mit der für die Reaktion verwendeten organischen Lösungsmittelmischung gewaschen. Das Produkt wird über P_2O_5 im Exsikkator getrocknet.

Ausb. 84,2 mg (86 % d. Th.)

F. 205 - 208 °C

$$[\alpha]_D^{23} - 48^\circ \text{ (c = 0,5, Ethanol)}$$

b) mit immobilisiertem Chymotrypsin

78,5 mg (0,2 mmol) Boc-Leu-Phe-OMe werden in 1 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst und dazu 109,7 mg (0,845 mmol) Leu-NH₂ gelöst in 1 ml Carbonatpuffer (0,2 M, pH 10), sowie 250 mg an Kieselgel fixiertes Chymotrypsin (entsprechend ca. 5 mg Enzym) gegeben und 4 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abtrennen des Reaktionsproduktes vom immobilisierten Enzym mit 5mal 1 ml Methanol und Einengen des Filtrates wird wie üblich aufgearbeitet.

Ausb. 35,3 mg (36 % d. Th.)

F. 203 - 208 °C

$$[\alpha]_D^{23} - 49^\circ \text{ (c = 0,45, Ethanol)}$$

c) mit gelöstem Papain

75,6 mg (0,2 mmol) Boc-Leu-Phe-OH und 26 mg (0,2 mmol) Leu-NH₂ werden in 0,5 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst, unter Rühren mit 1,5 ml einer 1,5 mM Lösung von Papain (12 IE/mg) in McIlvaine-Puffer versetzt und 24 Std. bei 30 °C gerührt. Das ausgefallene Produkt wird abgefrittet und nacheinander mit Wasser, 0,5 N HCl, 7proz. Ammoniaklösung und Wasser gewaschen. Das Peptid wird über P_2O_5 getrocknet.

Ausb. 76 mg (78 % d. Th.)

F. 205 - 207 °C

$[\alpha]_D^{25} - 48,8^\circ$ (c = 0,5, Ethanol)

Ein chemosynthetisch nach der DCC/HOBt-Methode erhaltenes Vergleichs-peptid wurde in 61proz. Ausb. erhalten:

F. 205 - 207 °C

$[\alpha]_D^{25} - 44,3^\circ$ (c = 0,5, Ethanol)

Beispiel 4

Synthese von Boc-Ala-Phe-Leu-NH₂

Analog dem Beispiel 3a) werden 70,1 mg (0,2 mmol) Boc-Ala-Phe-OMe und 260 mg (2 mmol) Leu-NH₂ mit Chymotrypsin als Katalysator umgesetzt.

Ausb. 68,6 mg (76,5 % d. Th.)

F. 186 - 188 °C

Beispiel 5

Synthese von Boc-Gly-Gly-Phe-Leu-NH₂

Analog dem Beispiel 3a) werden 78,7 mg (0,2 mmol) Boc-Gly-Gly-Phe-OMe und 260 mg (2 mmol) Leu-NH₂ mit Chymotrypsin als Katalysator umgesetzt (Reaktionszeit: 1 Std.).

Ausb. 59,1 mg (60 % d. Th.)

F. 163 - 165 °C

Beispiel 6

Wiederholte Verwendung des Enzyms zur Synthese von Ac-Leu-Phe-Leu-NH₂

a) mit gelöstem Chymotrypsin

200,7 mg (0,6 mmol) Ac-Leu-Phe-OMe und 78 mg (0,6 mmol) Leu-NH₂ werden mit 0,5 ml Dichlormethan und 1,5 ml einer 0,1 mM Lösung von Chymotrypsin in Carbonatpuffer (0,2 M, pH 10) versetzt und 20 Min. bei Raumtemperatur gerührt. Das ausgefallene Produkt wird abgefrittet und analog Beispiel 1a) aufgearbeitet.

Ausb. 202,0 mg (78 % d. Th.)

F. 284 - 285 °C

Dem nach der Abtrennung des Produktes erhaltenen Filtrat wird die wäßrige Phase entnommen und diese zur Umsetzung von 133,8 mg (0,4 mmol) Ac-Leu-Phe-OMe mit 52 mg (0,4 mmol) Leu-NH₂ in 0,25 ml Dichlormethan verwendet.

Ausb. 131,2 mg (76 % d. Th.)

F. 284 - 285 °C

Das bei der Abtrennung des Produktes erhaltene wäßrige Filtrat wird einem dritten Ansatz zur Reaktion von 66,9 mg (0,2 mmol) Ac-Leu-Phe-OMe und 26 mg (0,2 mmol) Leu-NH₂ in Gegenwart von 0,2 ml Dichlormethan zugegeben.

Ausb. 64,6 mg (74 % d. Th.)

F. 284 - 285 °C

b) mit immobilisiertem Chymotrypsin

Das bei Beispiel 1b) nach der Produktabtrennung resultierende immobilisierte Chymotrypsin wird zur Umsetzung von 66,9 mg (0,2 mmol) Ac-Leu-Phe-OMe mit 26 mg (0,2 mmol) Leu-NH₂ verwendet. Es wird wie unter 1b) beschrieben aufgearbeitet.

Ausb. 53,6 mg (62 % d. Th.)

F. 284 - 285 °C

E r f i n d u n g s a n s p r u c h

1. Verfahren zur Herstellung von Peptiden, bei welchem eine selektiv geschützte Aminosäure oder ein selektiv geschütztes Peptid, deren in Reaktion tretende Carboxygruppe unblockiert ist oder eine Estergruppierung trägt, mit einer selektiv geschützten Aminosäure oder einem selektiv geschützten Peptid einschließlich der entsprechenden Amide, bei denen die in Reaktion tretende Aminogruppe unblockiert ist, in einem proteasespezifischen Puffersystem mit einem proteolytischen Enzym umgesetzt wird, wobei nach beendeter Kupplung und beschriebener Aufarbeitung erforderlichenfalls die Schutzgruppen nach bekannten Methoden partiell oder total abgespalten werden, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung unter Zusatz von mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmitteln oder Mischungen solcher Lösungsmittel durchgeführt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß immobilisierte Proteasen eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß gelöste oder immobilisierte Proteasen mehrfach wiederverwendet werden.
4. Verfahren nach Punkt 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als mit Wasser nicht mischbare Lösungsmittel vorzugsweise die folgenden Solventien eingesetzt werden: Dichlormethan, Tetrachlorkohlenstoff, 1,1,2-Trichlorethen, Petrolether.