DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) Wirtschaftspatent

(19) DD (11) 274 235 A1

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

4(51) C 12 P 21/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 P / 318 275 3 (22) 25.07.88 (44) 13.12.89

(71) Karl-Marx-Universität Leipzig, Karl-Marx-Platz, Leipzig, 7010, DD
(72) Schellenberger, Volker, Dr. rer. nat Dipl.-Biochem.; Kucharski, Ariane, Dipl.-Biochem.; Schellenberger, Ute, Dipl.-Biochem.; Jakubke, Hans-Dieter, Prof. Dr. sc. nat., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Peptiden

(55) Peptide, Schutzgruppenabspaltung, Enzymsubstrat, Peptidwirkstoff, sterisch einheitliche Peptide, Acyldonoraminosäure, Protease, Serinprotease, Biokatalysator, enzymatische Peptidsynthese

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Peptiden, die nach vollständiger bzw. partieller Schutzgruppenabspaltung als Enzymsubstrate oder Peptidwirkstoffe bzw. als Zwischenprodukte von Wirkstoffen dienen können. Aufgabe der Erfindung ist die Herstellung sterisch einheitlicher Peptide in homogener Phase unter Bedingungen der Zurückdrängung unerwünschter proteasekatalysierter Bindungsspaltungen sowohl in den Edukten als auch im Produkt. Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß N-Acylaminosäureester mit hohem K_{cat}/K_M-Werten im Überschuß eingesetzt werden, die die Sekundärhydrolyse entscheidend zurückdrängen und darüber hinaus den Einbau von Acyldonoraminosäuren gestatten, die nicht der literaturbekannten Proteasespezifität entsprechen, wodurch eine entscheidende Verbreiterung des Einsatzes von Serinproteasen wie alpha-Chymotrypsin als Biokatalysatoren für enzymatische Peptidsynthesen resultiert.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Peptiden aus Aminosäuren oder entsprechenden Peptiden, die mit einer alpha-Aminoschutzgruppe blockiert sind und deren in Reaktion tretende Carboxylgruppe verestert vorliegt, **dadurch gekennzeichnet,** daß ein Acylaminosäureester eingesetzt wird, dessen K_{cat}/K_M-Wert größer ist als der des gebildeten Peptids und als Reaktionspartner eine Aminokomponente verwendet wird, deren in Reaktion tretende Aminofunktion unblockiert ist und in deren Sequenz proteasesensitive Peptidbindungen enthalten sind, wobei in wäßriger Lösung, die gegebenenfalls organische Lösungsmittelanteile und/oder Puffersubstanzen enthält, in Anwesenheit eines Enzyms gearbeitet wird, wobei nach Erreichen des Produktmaximums bzw. bei noch nicht vollständigem Esterverbrauch die Kupplungsreaktion durch Säurezugabe bzw. Filtration des immobilisierten Enzyms gestoppt und nach üblicher Aufarbeitung Schutzgruppen erforderlichenfalls partitiell oder vollständig entfernt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß als Enzym eine Serinprotease wie Chymotrypsin, Elastase o. dgl. bzw. eine Cysteinprotease wie Papain o. dgl. verwendet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß der Acyldonorester im Vergleich zur Aminokomponente im Überschuß eingesetzt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 2, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Protease an einen unlöslichen Träger gebunden ist.
5. Verfahren nach Anspruch 1–3, **dadurch gekennzeichnet,** daß die C-terminale Acyldonoraminosäure nicht der literaturbekannten Proteasespezifität entspricht.

Anwendungsbereich der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Peptiden, die nach gegebenenfalls vollständiger bzw. partitieller Abspaltung der Schutzgruppen als Enzymsubstrate oder Wirkstoffe bzw. als Intermediate von Wirkstoffen dienen können.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zur Herstellung von Peptiden können mehr als 140 verschiedene organisch-chemische Verfahren (vgl. Übersichten: Wünsch, E. [1974] Synthese von Peptiden, Houben-Weyl, Bd. 15, 1/2, Methoden der organischen Chemie, Müller, E. (Hrsg.) Georg Thieme Verlag, Stuttgart; Jakubke, H.-D., und Jeschkeit, H., Aminosäuren, Peptide, Proteine, 3. Aufl., Akademie-Verlag, Berlin [1982]) eingesetzt werden. Bei chemischen Peptidsynthesen werden häufig unerwünschte Nebenreaktionen beobachtet, die ausbeuteverringernd wirken und langwierige Reinigungsprozesse erforderlich machen. Ein besonders schwerwiegender Nachteil der herkömmlichen chemischen Verfahren ist das ungelöste Problem der Racemisierung, die insbesondere bei der chemischen Verknüpfung von Peptidsegmenten in Erscheinung tritt (vgl. u. a. Meienhofer, J., [1981] Biopolymers 20, 1761–1784). Da sich Diastereomere kaum vollständig abtrennen lassen und die chirale Integrität für die biologische Wirkung eine notwendige Voraussetzung ist, besitzen die industriellen Verfahren zur Synthese von Peptiden mittels chemischer Kupplungsmethoden deutliche Nachteile. Weiterhin müssen bei allen chemischen peptidsynthetischen Operationen die Drittfunktionen von Aminosäurebausteinen wegen der Gefahr von Nebenreaktionen reversibel blockiert werden. Zur Umgehung der aufgezeigten Schwierigkeiten bietet sich der Einsatz von Biokatalysatoren für die Katalyse der Knüpfung von Peptidbindungen an (vgl. Übersichten: Jakubke, H.-D., und Kuhl, P., [1982] Pharmazie 37, 89–106; Fruton, J. S., [1982] Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 53, 239–306; Jakubke, H.-D., Kuhl, P., und Könnecke, A., (1985) Angew. Chem. 97, 79–87). Durch die Stereo- und Regioselektivität der als Biokatalysatoren eingesetzten Proteasen wird einerseits die optische Reinheit der Syntheseprodukte gewährleistet, und andererseits ermöglicht der hohe Grad der Reaktionskontrolle einen weitgehenden Verzicht auf den Schutz von Drittfunktionen.
Allgemein unterscheidet man zwischen gleichgewichtskontrollierten und kinetisch kontrollierten enzymkatalysierten Peptidsynthesen. Während es sich bei der ersten Variante um die direkte Umkehrung der Proteolyse handelt, werden bei kinetisch kontrollierten Synthesen als Carboxykomponenten in der Regel Alkylester eingesetzt, die die notwendige temporäre Acylierung der als Biokatalysatoren nur verwendbaren Serin- oder Cysteinproteasen begünstigen. Die kinetisch kontrollierte enzymatische Peptidsynthese besitzt wegen der Kürze der Reaktionsdauer und des geringeren Enzymbedarfs deutliche Vorteile gegenüber der gleichgewichtskontrollierten enzymatischen Peptidsynthese (vgl. Übersicht: Jakubke, H.-D., [1987] in: The Peptides [S. Udenfriend and J. Meienhofer, Hrsg.) Vol. 9, S. 103–165, Academic Press, New York). Bei Synthesen in homogener Phase besteht jedoch die permanente Gefahr, daß die als Biokatalysatoren verwendeten Proteasen unerwünschte Bindungsspaltungen katalysieren.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Herstellung chiral einheitlicher Peptide auf kostengünstige Weise, in guter Ausbeute, bei einfacher Reaktionsführung.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von chiral einheitlichen Peptiden in homogener Phase unter Einsatz von Biokatalysatoren unter Bedingungen der Zurückdrängung unerwünschter proteasekatalysierter Bindungsspaltungen anzugeben. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß Peptide hergestellt werden aus einer selektiv geschützten Aminosäure oder einem selektiv geschützten Peptid, dessen in Reaktion tretende Carboxylgruppe als Ester vorliegt, und einer Aminokomponente, bei der die in die Reaktion tretende Aminogruppe unblockiert ist, in Gegenwart löslicher oder immobilisierter Serien- oder Cysteinproteasen, wobei als Reaktionsmedium Wasser dient oder ein geeigneter Puffer, dem gegebenenfalls Anteile organischer Lösungsmittel zugesetzt sein können. Dazu werden N-Acylaminosäureester in Gegenwart von Proteasen mit Aminokomponenten umgesetzt, die selbst proteolysesensitive Spaltstellen enthalten. Nach Abstoppen der Reaktion nach Erreichen des Produktmaximums bzw. vor vollständigem Esterverbrauch und nach üblicher Aufarbeitung können die Schutzgruppen erforderlichenfalls nach bekannten Methoden partitiell oder vollständig entfernt werden. Im Gegensatz zu bekannten kinetisch kontrollierten proteasekatalysierten Synthesen unter Einsatz von Serien- und Cysteinproteasen und einfachen Alkylestern, wie Methyl- und Ethylestern, wird durch die erfindungsgemäße Verwendung von N-Acylaminosäureestern mit hohem K_{cat}/K_M-Werten in Abhängigkeit von der Art der Estergruppierung und den Reaktionsbedingungen der Aufbau von Peptiden ermöglicht, in denen sich neben der neugeknüpften Bindung noch weitere proteasesensitive Spaltstellen befinden. Darüber hinaus muß die C-terminale Acyldonoraminosäure nicht der literaturbekannten Proteasespezifität entsprechen, wodurch die Gefahr der Sekundärhydrolyse zusätzlich verringert wird.
Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Peptiden besitzt gegenüber bisher bekannten Verfahren der proteasekatalysierten kinetisch kontrollierten Peptidsynthese den Vorteil, daß unter den neuen Synthesebedingungen ein lösliches Peptidprodukt trotz proteasesensitiver Peptidbindungen in der Sequenz in hoher Ausbeute erhalten werden kann. Es ist allgemein üblich und vorherrschende Meinung, daß ein in homogener Phase gebildetes Peptid mit proteasesensitiven Spaltstellen einer synchron zur Bildung verlaufenden Proteolyse unterliegt. Es wird erstmals gezeigt, daß möglich ist, Enzymsubstrate für diejenige Protease zu synthetisieren, die die Peptidknüpfungsreaktion in homogener Lösung katalysiert. Unerwartet führt die proteasekatalysierte Kupplungsreaktion zu guten Ausbeuten an Peptid in sehr kurzen Reaktionszeiten bei Raumtemperatur. Die Erfindung soll nachstehend an Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

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

pNA	4-Nitroanilid
Glt	Glutalryl
Mal	Maleyl (3-Carboxyacryloyl)
OMe	Methylester
OBz1	Benzylester
ONb	4-Nitrobenzylester
DMSO	Dimethylsulfoxid

Beispiel 1
Synthese von Glutaryl-L-leucyl-L-phenylalanin-4-nitroanilid
a) ausgehend von Glt-Leu-OBz1
500µl Wasser/DMSO (9:1, v/v), enthaltend 20mM Glt-Leu-OBz1 und 5mM Phe-pNA, wurden am *p*H-Stat auf *p*H 9 gestellt, und danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,15mg Chymotrypsin bei 25°C gestartet. Nach 5min wurde durch Zugabe von 6N HCl auf *p*H 3 gestellt und damit die Reaktion gestoppt. Die Ausbeute wurde durch HPLC analytisch bestimmt und betrug 34% d.Th.
b) ausgehend von Glt-Leu-ONb
Wie Beispiel 1a, aber mit 20mM Glt-Leu-ONb anstelle von Glt-Leu-OBz1. Nach 5min 63% d.Th.

Beispiel 2
Synthese von Maleyl-L-leucyl-L-phenylalanin-4-nitroanilid
a) ausgehend von Mal-Leu-OMe
Wie Beispiel 1a, aber mit 20mM Mal-Leu-OMe anstelle von Glt-Leu-OBz1. Nach 10min 3% d.Th.
b) ausgehend von Mal-Leu-OBz1
Wie Beispiel 1a, aber mit 20mM Mal-Leu-OBz1 anstelle von Glt-Leu-OBz1. Nach 5min 65% d.Th.
c) ausgehend von Mal-Leu-ONb
Wie Beispiel 1a, aber mit 20mM Mal-Leu-ONb anstelle von Glt-Leu-OBz1. Nach 5min 80,5% d.Th.