



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **236 346 A1**4(51) **C 12 P 21/06**
C 07 K 1/06**AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 P / 275 387 6	(22)	22.04.85	(44)	04.06.86
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Martin-Luther-Universität Halle–Wittenberg, 4020 Halle, Universitätsplatz 10, DD
(72)	Hermann, Peter, Prof. Dr.; Greiner, Georg, Dipl.-Chem., DD

(54)	Verfahren zur enzymatischen Abspaltung von Thiol-Schutzgruppen
------	--

(57) Die Erfindung bezieht sich auf die enzymatische Abspaltung von Thiol-Schutzgruppen bei Aminosäure- und Peptidderivaten im Rahmen der Peptidsynthese. Das Verfahren dient der Gewinnung von Peptidderivaten, die Thiol-Komponenten enthalten, bei hoher Reinheit der Produkte, hoher Ausbeute und schonenden Reaktionsbedingungen. Die Erfindung beinhaltet die enzymatische Abspaltung von S-Phenacetamidomethyl- oder S-Phenoxyacetamidomethyl-Gruppen in einem Zwei-Stufen-Prozeß, wobei Enzyme vom Typ der Penicillinamidohydrolasen zum Einsatz kommen. Die Enzympräparate können auch in immobilisierter Form angewendet werden.

Patentanspruch:

1. Verfahren zur enzymatischen Abspaltung von Thiol-Schutzgruppen **gekennzeichnet dadurch**, daß als Thiol-Schutzgruppen solche verwendet werden, die als S-Acylamidomethyl-Gruppen zunächst enzymatisch an der Säureamidbindung der Schutzgruppe gespalten werden und dann die verbleibende S-Aminomethylthioverbindung spontan unter Freisetzung der Thiol-Funktion hydrolysiert wird, wobei Enzyme vom Amidohydrolase-Typ eingesetzt werden, die besonders auf den an der S-Acylamidomethyl-Schutzgruppe beteiligten Acylrest eingestellt sind.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Thiol-Schutzgruppen die S-Phenacetamidomethyl- und die S-Phenoxyacetamidomethyl-Gruppen und weitere S-Acylamidomethyl-Gruppen, die ebenfalls enzymatisch gespalten werden können, eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Enzyme solche vom Typ der Penicillinamidohydrolasen aus Mikroorganismen verwendet werden.
4. Verfahren nach Punkten 1–3, **gekennzeichnet dadurch**, daß dies Verfahren vorzugsweise zur Synthese von Peptiden, Peptidderivaten und Aminosäurederivaten eingesetzt wird, deren Thiol-haltigen Bausteine zeitweise durch Schutzgruppen blockiert sein müssen.
5. Verfahren nach Punkten 1–4, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Abspaltung der Acylgruppe und die nachfolgende Freisetzung der Thiol-Funktion in Wasser oder in Mischungen mit Wasser und organischen Lösungsmitteln im pH-Bereich 6–10 erfolgt.
6. Verfahren nach Punkten 1–5, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Enzyme auch in immobilisierter Form eingesetzt werden können.
7. Verfahren nach Punkten 1–6, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Enzymwirkung im Temperaturbereich 283–323 K zur Anwendung kommt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren der Peptidsynthese und ihrer Randgebiete, soweit die Aminosäure Cystein bzw. ihre Homologen (wie z. B. Homocystein), die entsprechenden Desaminoderivate oder Decarboxyverbindungen Verwendung finden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zur Verwendung thiolgruppen-haltiger Verbindungen bei der Peptidsynthese ist es notwendig, die SH-Funktion temporär zu schützen. In der Fachliteratur sind dazu etwa 100 Schutzgruppen beschrieben (Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 1–15, The Royal Society of Chemistry, London 1968–1984; E. Wünsch [Ed.]: Synthese von Peptiden, Houben-Weyl Vol. 15/1 und 15/2, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1974). Allgemein ist bekannt, daß die Abspaltung von Thiolschutzgruppen drastische Bedingungen erfordert (z. B. Natrium in flüssigem Ammoniak, flüssiger Fluorwasserstoff, Iod in Methanol, Quecksilbersalze, Trifluormethansulfonsäure), wobei häufig Nebenreaktionen beobachtet werden, welche Ausbeute und Reinheit der Produkte beeinträchtigen.

Die vorteilhaften Eigenschaften von S-Acylamidomethyl-Schutzgruppen als S-Schutzgruppen bei der Synthese thiolhaltiger Peptide bzw. ihrer Disulfidderivate (D. F. Veber, J. D. Milkowski, R. G. Denkwalter, R. Hirschmann: Tetrahedron Lett. **1968**, 3057; D. F. Veber, J. D. Milkowski, S. L. Varga, R. G. Denkwalter, R. Hirschmann: J. Amer. Chem. Soc. **94**, 9456 [1972]; H. Arold, M. Eule in: Peptides 1972 [Eds. H. Hanson, H.-D. Jakubke] p. 78, North-Holland. Publ. Co, Amsterdam 1973; P. Hermann, E. Schreier: *ibid.* p. 123; R. G. Denkwalter, D. F. Veber, F. W. Holly, R. Hirschmann: J. Amer. Chem. Soc. **91**, 502 [1969]; P. Hermann, E. Schreier; J. prakt. Chem. **316**, 719 [1974]) werden durch die bisher bekannten Abspaltungsmethoden (z. B. Hg^{2+} -Ionen, I_2 in Methanol) eingeschränkt.

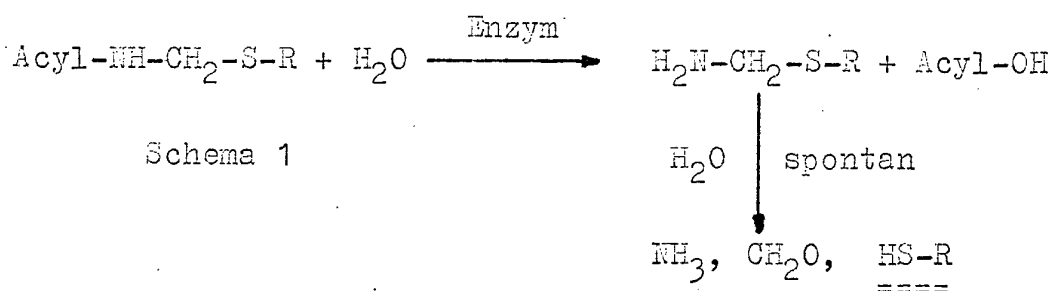
Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist, unter Beibehaltung der S-Acylamidomethyl-Schutzgruppen für die Thiol-Funktion, bei der Synthese Thiol-haltiger Aminosäure- und Peptidderivate eine schonende, selektive, ökonomisch befriedigende Abspaltungsmethode für Thiolschutzgruppen einzuführen, die hochreine Produkte liefert.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Enzyme zur Abspaltung von S-Acylamidomethyl-Gruppen einzusetzen und damit die Mängel der bisherigen Verfahrensweise zu überwinden.

Merkmale der Erfindung sind deshalb gemäß Schema 1



1. Die Abspaltung der S-Schutzgruppe in einem Zweistufenprozeß ablaufen zu lassen, wobei nur der erste Schritt enzymkatalysiert abläuft, der zweite Schritt spontan erfolgt und die gewünschte Thiolverbindung liefert.
2. In der 1. Phase solche Enzyme einzusetzen, die vom Amidohydrolase-Typ sind und deren Spezifität besonders auf den Acylrest der zu spaltenden Bindung ausgerichtet ist.
3. Solche Acylamidomethyl-Schutzgruppen einzusetzen, deren Acylrest den Erfordernissen der Spezifität der einzusetzenden Enzyme vom Amidohydrolase-Typ entspricht.

Erfindungsgemäß werden Enzyme vom Typ der Penicillinamidohydrolasen (EC 3.5.1.11) aus Mikroorganismen eingesetzt. Es werden Peptide, die Thiol-haltige Bausteine enthalten, unter Verwendung von S-Phenylacetamidomethyl- oder S-Phenoxyacetamidomethyl-Schutzgruppen oder anderen S-Acylamidomethyl-Schutzgruppen, die eine oben geschilderte Substratfunktion besitzen, aufgebaut und zum gewünschten Zeitpunkt der Synthese in wäßriger Lösung oder in der Mischung von Wasser mit organischen Lösungsmitteln im pH-Bereich der optimalen Wirkung dem katalytischen Einfluß der Penicillinamidohydrolasen ausgesetzt. Dies kann im homogenen oder heterogenen System erfolgen, wobei auch die Penicillinamidohydrolasen an lösliche oder unlösliche makromolekulare Träger gebunden oder anderweitig immobilisiert sein können. Reaktionstemperatur und Enzym/Substrat-Verhältnis werden durch Vorversuche ermittelt und optimiert. Die nach diesem Abspaltungsprozeß erhaltenen Thiol-Verbindungen können in gewünschter Weise weiter umgesetzt werden, z. B. zu Disulfiden.

Ausführungsbeispiele

1. In einer Inertgasatmosphäre werden bei pH 7 und 310 K in 10%igem Dimethylformamid 0,2 mmol tert.-Butyloxycarbonyl-S-Phenoxyacetamidomethyl-L-cystein mit 1 mg teilgereinigter Penicillinamidohydrolase aus Bakterien (T. A. Savidge, M. Cole: Methods Enzymol. **43**, 705 [1975]) oder Pilzen (H. Vanderhaeghe: Methods Enzymol. **43**, 721 [1975]) inkubiert. Nach Erreichen des quantitativen Umsatzes wird das entstandene tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein nach bekannter Verfahren zum Disulfid oxydiert, isoliert und nach Rekristallisation aus Essigsäureethylester/Hexan werden in 90%iger Ausbeute Kristalle von Di-tert.-butyloxycarbonyl-L-cystin vom Fp. 418–419 K erhalten. Das Präparat ist in mehreren Lösungsmittelgemischen chromatographisch einheitlich.
2. Analog wie im Beispiel 1 werden 0,2 mmol S-Phenacetamidomethyl-glutathion, die nach bekannten Verfahren aus tert.-Butyloxycarbonyl-L-glutamyl-(α -tert.-butylester)- γ -S-phenacetamidomethyl-L-cysteinyl-glycin gewonnen wurden, mit 1 mg Penicillinamidohydrolase aus Bakterien inkubiert. Das entstandene Glutathion wurde mit Wasserstoffperoxid zum Disulfid oxydiert und durch Säulenchromatographie an einem Molsieb gereinigt. In 77%iger Ausbeute wird Glutathion-disulfid mit einem Fp. 448–453 K erhalten. $[\alpha]_D^{20} = -105^\circ$.
3. Tert.-butyloxycarbonyl-S-phenacetamidomethyl-L-cystein wurde bei pH 7,6 und 318 K in Gegenwart von 1 % Dimethylformamid durch eine immobilisierte Penicillinamidohydrolase (kovalent gebunden an Copolymerisat von 2-Hydroxyethylmethacrylat und Ethylendimethacrylat welches durch Epoxydgruppen modifiziert war) analog Beispiel 1 zu tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein umgesetzt.
4. S-Phenacetamidomethyl- β -mercaptopropionsäure (10^{-13} mol/l) wurde bei pH 8 und 298 K durch Penicillinamidohydrolase aus Bakterien zu β -Mercaptopropionsäure umgesetzt.