

Grundprinzipien der proteasekatalysierten Knüpfung der Peptidbindung

Von Hans-Dieter Jakubke*, Peter Kuhl und Andreas Könnecke

Die stereospezifische Knüpfung von Peptidbindungen, frei von Nebenreaktionen unter milden Bedingungen verlaufend, ist immer noch ein anspruchsvolles Anliegen peptidsynthetischer Bemühungen. Der nahegelegende Gedanke, den von der Natur zur Proteinbiosynthese verwendeten Biokatalysator, die ribosomale Peptidyl-Transferase, für diese Zielsetzung zu nutzen, ist nicht realisierbar. Die Tatsache jedoch, daß es auch für die natürliche Spaltung von Proteinen eigene Enzyme, die Proteasen, gibt, hat in Verbindung mit der grundsätzlichen Reversibilität solcher Spaltungsreaktionen zu einem interessanten Synthesekonzept geführt. Proteasen katalysieren normalerweise den enzymatischen Abbau von Proteinen und Peptiden durch hydrolytische Spaltung der Peptidbindung in einer exergonischen Reaktion. Durch Anwendung physikochemischer Prinzipien zur Beeinflussung der Gleichgewichtslage, der Produktkonzentration und reaktionskinetischer Parameter gelingt es aber, die katalytische Wirkung von Proteasen für die Peptidsynthesereaktion zu nutzen. Ziel dieses Beitrages ist eine zusammenfassende Darstellung der dabei verwendeten Methoden mit dem Versuch ihrer Systematisierung. An praktisch relevanten Wirkstoffen wie z. B. Aspartam und Humaninsulin werden die Prinzipien solcher Synthesen demonstriert.

1. Einleitung

Zum bemerkenswerten Fortschritt der Peptidforschung in den letzten drei Dezennien hat die Peptidsynthese einen entscheidenden Beitrag geleistet^[1–3]. Neben der strukturbestätigenden Totalsynthese nativer Peptidwirkstoffe sowie der Darstellung von Analoga, die für das Studium der Struktur-Wirkungs-Beziehungen notwendig sind, steht die Semisynthese von Proteinen^[4] ebenso im Blickpunkt des Interesses wie chemische Veränderungen an Peptid- und Proteinwirkstoffen zur Modifizierung physiologischer oder pharmakologischer Effekte.

Die Bildung der Peptidbindung soll unter idealen Bedingungen mit hoher Geschwindigkeit ohne Racemisie-

rung und Nebenreaktionen und in möglichst quantitativer Ausbeute bei Einsatz äquimolarer Mengen an Carboxy- und Aminokomponente verlaufen. Diesen Anforderungen wird keine der mehr als 130 Varianten der chemischen Verknüpfung voll gerecht. Selbst bei Einhaltung bewährter Synthesekonzepte und Verwendung erprobter Kupplungsreaktionen mit nachgewiesener Racemisierungssicherheit in einfachen Modellsystemen kann eine absolute Ausschaltung der Racemisierung bei anspruchsvollen Segmentverknüpfungen nicht garantiert werden. Für die Verbesserung der Peptidsynthese spielt demzufolge die Vermeidung unerwünschter Nebenreaktionen eine große Rolle. Dies legt den Gedanken nahe, zur Knüpfung der Peptidbindung Enzyme einzusetzen, da diese stereospezifische Reaktionen ermöglichen. Bedauerlicherweise scheidet die ribosomale Peptidyl-Transferase für eine praktische Nutzung aus, da sie als integraler Bestandteil des Ribosoms nur im koordinierten Zusammenwirken mit weiteren am Elongationsschritt beteiligten Faktoren voll wirksam ist^[5].

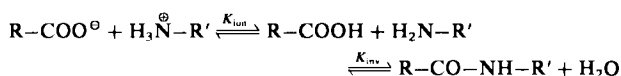
[*] Prof. Dr. H.-D. Jakubke, Dr. P. Kuhl, Dr. A. Könnecke
Sektion Biowissenschaften der Karl-Marx-Universität,
Wissenschaftsbereich Biochemie
Talstraße 33, DDR-7010 Leipzig (Deutsche Demokratische Republik)

Ausgehend von Überlegungen zum chemischen Gleichgewicht diskutierte *van't Hoff*^[6] bereits 1898 die Möglichkeit, bei der Knüpfung der Peptidbindung Proteasen einzusetzen, die normalerweise die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen katalysieren. Etwa 40 Jahre später erbrachten *Bergmann* und *Fraenkel-Conrat*^[7,8] den experimentellen Beweis dafür, daß die Reversibilität proteasekatalysierter Reaktionen prinzipiell zur Knüpfung der Peptidbindung genutzt werden kann. *Bergmann* und seine Schüler, insbesondere *Fruton*, leiteten aus den Erkenntnissen über die hydrolytische Wirkung der Proteasen sowie deren Substrat- und Stereospezifität die richtigen Schlußfolgerungen für die enzymatische Peptidsynthese ab, die aber mit der Aufklärung der Grundprinzipien der Proteinsynthese in vivo entscheidend an Bedeutung einbüßte. Abgesehen von weiterführenden Grundlagenstudien wurde erst Mitte der siebziger Jahre der eindeutige Nachweis erbracht, daß Proteasen als Biokatalysatoren für die Darstellung von Peptiden im präparativen Maßstab mit Erfolg angewendet werden können. Die Verwendung von Biokatalysatoren bei Peptidsynthesen folgt dem allgemeinen Trend der Nutzung von Enzymen für organische Synthesen^[9], wobei die Vielfalt der Übersichten^[10–19] die ungewöhnlich starke Resonanz unterstreicht, die die proteasekatalysierte Peptidsynthese in den letzten zehn Jahren erfahren hat.

Die enzymatische Knüpfung der Peptidbindung kann primär sowohl thermodynamisch als auch kinetisch kontrolliert werden, wobei aus energetischer Sicht signifikante Unterschiede zu verzeichnen sind. Ausgehend von den grundlegenden Prinzipien der proteasekatalysierten Knüpfung der Peptidbindung wird der Versuch unternommen, die gegenwärtigen Möglichkeiten und Grenzen dieser neuen Synthesevariante systematisch darzulegen.

2. Thermodynamisch kontrollierte Peptidsynthesen

Die thermodynamisch kontrollierte Knüpfung der Peptidbindung ist die direkte Umkehrung der proteasekatalysierten hydrolytischen Spaltung von Peptiden^[10–13]. Da anstelle von Aktivitäten Konzentrationen benutzt werden, handelt es sich nicht um eine exakte thermodynamische Behandlung. Im Unterschied zur Hydrolyse ist die Synthese endergon, verläuft unter Abnahme der Entropie und ist energetisch so ungünstig, daß die Gleichgewichtskonstante K_{syn} für die Verknüpfung zweier ungeschützter Aminosäuren $< 10^{-5}$ ist. Da die ionisierten Formen beider Substrate nicht reaktiv sind, müssen bei der thermodynamischen Kontrolle zwei Gleichgewichte berücksichtigt werden:



Dem „Umwandlungsgleichgewicht“ der ungeladenen Substrate in das Produkt ist ein „Ionisierungsgleichgewicht“ vorgelagert. Unter Einbeziehung der Konzentration von Wasser in die Gleichgewichtskonstante ergibt sich für den Gesamtprozeß:

$$K_{\text{syn}} = K_{\text{ion}} \cdot K_{\text{inv}} = [\text{R-CO-NH-R}'] \cdot ([\text{R-COO}^\ominus] \cdot [\text{H}_3\text{N}^\oplus\text{-R}'])^{-1}$$

Für ein gegebenes Substratpaar bei einem bestimmten pH-Wert liegen K_{ion} und K_{inv} fest. Folglich ist die im Umwandlungsgleichgewicht vorhandene Peptidkonzentration abhängig von den Konzentrationen der im vorgelagerten Ionisierungsgleichgewicht gebildeten ungeladenen Substrate; deren Konzentrationen sind durch ihre pK-Werte determiniert. Die pK-Werte von N- und C-geschützten Aminosäuren sowie von längeren Segmenten unterscheiden sich derartig von denen freier Aminosäuren, daß im Ionisierungsgleichgewicht ausreichend hohe Konzentrationen an ungeladenen Substraten vorliegen, um im Umwandlungsgleichgewicht meßbare Konzentrationen an Peptid zu liefern.

Die Rolle der Protease besteht nun einzig und allein darin, als Biokatalysator die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung bei der Bildung der Peptide zu erhöhen. Die Effektivität wird um so höher sein, je spezifischer die Protease für die Substrate ist. Deshalb sollten Reaktionsbedingungen gewählt werden, die eine möglichst hohe katalytische Aktivität der Protease gewährleisten. Das pH-Optimum der Synthese liegt dabei, wenn man von pepsinkatalysierten Kupplungen absieht, bei pH-Werten, die zwischen den pK-Werten der α -Carboxy- und der Aminogruppe der Substrate liegen, in der Regel zwischen pH 6 und 7. Die erforderlichen Zeiten zur vollständigen Einstellung des Umwandlungsgleichgewichts werden sowohl von der Konzentration und der katalytischen Aktivität der Protease als auch von der Affinität der Protease zu den Substraten bestimmt: Sie können Minuten bis mehrere Tage betragen.

Der Anwendungsbereich thermodynamisch kontrollierter Peptidsynthesen erstreckt sich auf alle Proteasen in Verbindung mit C-ungeschützten Carboxykomponenten. Bei Segmentkondensationen sind bei Einsatz unspezifischer Proteasen kompetitive Peptidbindungsspaltungen zu befürchten; auch bei hochspezifischen Proteasen können solche Nebenreaktionen auftreten, falls in der Sequenz der Segmente zusätzlich Aminosäurebausteine enthalten sind, die der Substratspezifität der Protease entsprechen.

Für die zusätzliche Beeinflussung thermodynamisch kontrollierter Peptidbindungsknüpfungen gibt es zwei prinzipielle Wege:

- Vergrößerung von K_{ion} durch Veränderung der pK-Werte der Substrate und
- Erhöhung der Peptidkonzentration unter Berücksichtigung des Massenwirkungsgesetzes.

Beide Möglichkeiten können wiederum unterschiedlich realisiert werden, wobei in der Praxis meist konzentrierte Beeinflussungen des Synthesegleichgewichts bevorzugt werden; aus didaktischen Gründen sollen sie nachfolgend jedoch gesondert erörtert werden.

2.1. Vergrößerung von K_{ion}

Bei gegebenen Reaktionsbedingungen gelingt es auf zwei Wegen, die Differenz der pK-Werte zwischen Amino- und Carboxykomponente zu verringern, wobei K_{ion} erhöht und damit $K_{\text{syn}} = K_{\text{ion}} \cdot K_{\text{inv}}$ effektiv vergrößert wird.

2.1.1. Verwendung von organischen Lösungsmitteln, die mit Wasser mischbar sind^[20]

Mit Wasser mischbare organische Lösungsmittel verringern die Acidität der α -Carboxygruppe der Carboxykomponente, dagegen wird der pK-Wert der Aminogruppe des Nucleophils kaum beeinflusst. So beträgt der pK-Wert von Acetursäure (Ac-Gly) in Wasser 3.60, in 80proz. (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) dagegen 6.93, während die pK-Werte von Gly-NH₂ mit 8.20 bzw. 8.10 nahezu konstant bleiben. Da pK_{app}-Werte in organischen Lösungsmitteln von limitierter Signifikanz sind, sollten unter gleichen Bedingungen gemessene pK-Werte aussagekräftiger sein. In Wasser ist ΔpK für Acetursäure/Gly-NH₂ 4.60, in 80proz. (v/v) DMSO nur 1.11. Durch andere Cosolventien lassen sich Veränderungen der pK-Werte um ein bis zwei Einheiten erreichen, womit eine signifikante Erhöhung von K_{syn} erzielt wird. Für die chymotryptische Kupplung von 1 mM Z-Trp mit 100 mM Gly-NH₂ bei pH 6.7 beträgt K_{syn} 0.45 M⁻¹ in Wasser, 2.12 M⁻¹ in 60proz. (v/v) Glycerin und sogar 38 M⁻¹ in 85proz. (v/v) 1,4-Butandiol.

Problematisch ist, daß die katalytische Aktivität der Protease mit steigender Konzentration an Cosolvens abnimmt und damit die Zeit zur Einstellung des Umwandelungsgleichgewichts zunimmt. Mit 50proz. (v/v) Ethanol, Dimethylformamid (DMF), DMSO, Dioxan, Aceton und Acetonitril wird Chymotrypsin inaktiviert, so daß keine Synthese abläuft. Nur enzymstabilisierende Polyalkohole lassen sich in höheren Konzentrationen verwenden, ohne daß eine Inaktivierung eintritt^[21]; die katalytische Aktivität wird aber in jedem Falle herabgesetzt^[22-25]. Die Substratspezifität erfährt dabei keine signifikante Veränderung^[20].

2.1.2. Verwendung von Zweiphasen-Systemen

In Systemen aus einer wäßrigen und einer mit Wasser nichtmischbaren Phase (unpolares organisches Lösungsmittel) werden die pK-Werte der Substrate ebenfalls so beeinflusst^[23], daß K_{ion} ansteigt. In Abhängigkeit vom Verhältnis α der Volumina der organischen und der wäßrigen Phase und vom Verteilungskoeffizienten P erhöht sich der pK-Wert der Carboxykomponente und vermindert sich der pK-Wert der Aminokomponente jeweils um den Betrag $\lg(1 + \alpha \cdot P)$.

Das Enzym in der wäßrigen Phase ist nur der Sättigungskonzentration des organischen Lösungsmittels in Wasser ausgesetzt und wird in der Regel weit weniger inhibiert als durch mit Wasser unbegrenzt mischbare Lösungsmittel^[24,25]. Diesem Vorteil stehen längere Zeiten bis zur Gleichgewichtseinstellung gegenüber, wobei vermutlich die zusätzlichen Verteilungsgleichgewichte geschwindigkeitsbestimmend werden. Die Löslichkeit der Substrate in der apolaren organischen Phase begrenzt die generelle Anwendbarkeit von Zweiphasen-Systemen für die enzymatische Peptidsynthese.

2.2. Beeinflussung der Produktbildung unter Berücksichtigung des Massenwirkungsgesetzes

Die ersten experimentellen Befunde über die Möglichkeit, die proteasekatalysierte Peptidhydrolyse umzukehren,

basieren auf der geringen Löslichkeit der Produkte, wodurch sie dem Umwandelungsgleichgewicht entzogen werden und sich akkumulieren können^[11]. Das Produkt kann auch durch Extraktion oder spezifische Komplexierung aus dem Gleichgewicht entfernt werden.

2.2.1. Bildung unlöslicher Produkte

Werden hinreichend hohe Substratkonzentrationen eingesetzt, so daß sich in dem durch K_{inv} bestimmten Gleichgewicht eine Peptidkonzentration bilden kann, die über der maximalen Löslichkeit liegt, so kommt es infolge Präzipitation zu einer Akkumulation des Produkts. Dies läßt sich anhand des Massenwirkungsgesetzes ableiten (vgl. auch^[23]): Reagieren zwei in gleicher Konzentration vorliegende Substrate A und B unter Bildung eines Produkts C miteinander, so stellt sich in der Lösung das Gleichgewicht $A + B \rightleftharpoons C$ ein, dessen Gleichgewichtskonstante durch Gleichung (1) beschrieben wird.

$$K = [C]([A] \cdot [B])^{-1} = [C] \cdot [A]^{-2} \quad (1)$$

Fällt ein Teil des Produkts C als Niederschlag aus, so gilt Gleichung (2).

$$K_{app} = ([C]_i + [C]_s) \cdot [A]^{-2} \quad (2)$$

wobei $[C]_i$ die Maximalkonzentration des Produkts in der Lösung und $[C]_s$ die auf das Gesamtvolumen bezogene Konzentration des nichtgelösten Produkts sind. Ausgehend von einer Anfangskonzentration $[A]_0$ ergibt die Massenbilanz Gleichung (3)

$$[A]_0 - [A] = [C]_i + [C]_s \quad (3)$$

mit $[A]$ als Gleichgewichtskonzentration des Substrats A in Lösung. Durch Einsetzen der Beziehung (3) in Gleichung (2) erhält man

$$K_{app} = ([A]_0 - [A]) \cdot [A]^{-2} \quad (4)$$

Ersetzt man hierin $[A]$ durch den aus Gleichung (1) gewonnenen Ausdruck $[A] = \left(\frac{[C]_i}{K} \right)^{1/2}$ mit $[C] = [C]_i$, so gelangt man nach Umformung zu Gleichung (5).

$$K_{app} = \frac{K}{[C]_i} [A]_0 - \left(\frac{K}{[C]_i} \right)^{1/2} \quad (5)$$

Danach ist die apparente Gleichgewichtskonstante für eine Reaktion, bei der ein Teil des Produkts aufgrund seiner begrenzten Löslichkeit im System ausfällt, um so größer, je höher die Anfangskonzentration der Substrate und je geringer die Löslichkeit des Produkts im System ist.

Bei Einsatz einer Komponente im Überschuß kann eine fast quantitative Umsetzung des anderen Substrats erreicht werden. Diese Variante ist in der Praxis sehr populär, weil die Randbedingung der geringeren Löslichkeit des Produkts im Vergleich zu der der Substrate sehr oft erfüllt ist.

2.2.2. Extraktion der Produkte

In Zweiphasen-Systemen wird das Produkt dem Gleichgewicht entzogen, wenn es aufgrund günstiger Lage des Verteilungsgleichgewichts in eine nicht mit Wasser mischbare apolare Phase extrahiert und damit akkumuliert wird. Von Martinek et al.^[23] wurde eine Beziehung für eine Reaktion $A + B \rightleftharpoons C + D$ abgeleitet [Gl. (6)].

$$K_{\text{biphas}} = K_{\text{aq}} \frac{(1 + \alpha P_C) \cdot (1 + \alpha P_D)}{(1 + \alpha P_A) \cdot (1 + \alpha P_B)} \quad (6)$$

wobei $\alpha = V_{\text{org}}/V_{\text{aq}}$ und P der Verteilungskoeffizient ist. Sie zeigten, daß die Funktion $K_{\text{biphas}}(\alpha)$ bei einem bestimmten Verhältnis der Verteilungskoeffizienten ein Extremum aufzuweisen vermag. Mit anderen Worten, die effektive Gleichgewichtskonstante kann größer oder kleiner sein als diejenige, die sich für die Reaktion in jeder der beiden Phasen allein ergibt.

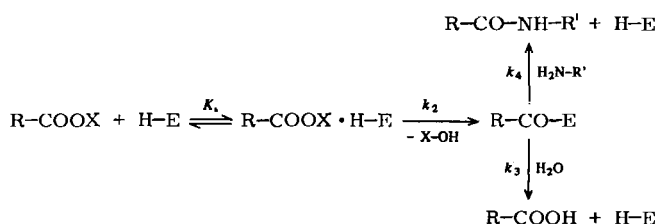
In vielen Fällen ist jedoch das Produkt in der organischen Phase wenig löslich, es präzipitiert und wird so aus dem Gleichgewicht entfernt^[24–28]. Dies kann zusätzlich auch dadurch erreicht werden, daß man Lösungsmittelkombinationen verwendet, die es ermöglichen, die Sättigungskonzentration eines Substrats einzustellen, so daß das Produkt mit verlängerter Peptidkette im System zu meist eine noch geringere Löslichkeit hat^[24].

2.2.3. Spezifische Komplexierung der Produkte

Gibt es Verbindungen, die das Produkt spezifisch komplexieren, so kann es dem Gleichgewicht durch deren Zugabe entzogen und dadurch akkumuliert werden^[29] (vgl. Abschnitt 4.7).

3. Kinetisch kontrollierte Synthesen

Bei der Untersuchung des Katalysemechanismus von Serin- und Cystein-Proteasen wurde am Beispiel von Chymotrypsin und Papain festgestellt, daß acylierte Enzymzwischenstufen $R-CO-E$ in Gegenwart von Nucleophilen kompetitiv durch Wasser und das Nucleophil H_2N-R' desacyliert werden^[30–32]. Wird als Nucleophil ein Aminosäure- oder Peptidderivat verwendet, so wird bei der aminolytischen Desacylierung eine neue Peptidbindung geknüpft (Schema 1). Ist $k_2 \gg k_3 + k_4$ und $k_4[H_2N-R'] > k_3[H_2O] = k'_3$, dann wird das Peptidprodukt kinetisch kontrolliert akkumuliert, wobei dessen Konzentration höher wird als sie im thermodynamischen Gleichgewicht wäre. Besonders geeignete Carboxykomponenten für diesen Typ enzymkatalysierter Peptidsynthesen sind



Schema 1. Durch Serin- und Cystein-Proteasen (H-E) katalysierte Peptidsynthese mit $R-COOX$ als Acyldonor (Carboxykomponente) und H_2N-R' als C-geschützte Aminosäure oder Peptid (Aminokomponente); X = Alkyl.

Acylaminosäurealkylester, falls sie der Substratspezifität der jeweiligen Protease entsprechen, da sie in der Regel die Randbedingung $k_2 \gg k_3 + k_4$ erfüllen. Außerdem ist k_2 für Estersubstrate erheblich größer als k_2 der gebildeten Peptide^[33–35], wodurch die Produktbildung ein Maximum durchläuft (Abb. 1), ehe die langsamere Sekundärhydrolyse des Produkts stärker einsetzt.

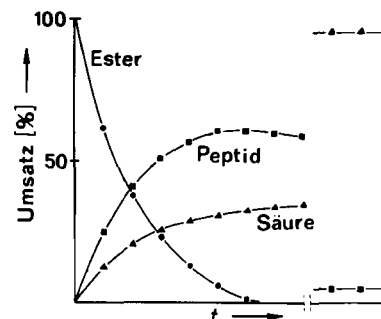


Abb. 1. Charakteristischer Verlauf einer kinetisch kontrollierten Peptidsynthese unter Verwendung eines N-geschützten Aminosäure- oder Peptidalkylesters als Acyldonor.

Der Anwendungsbereich kinetisch kontrollierter Synthesen ist auf Serin- und Cystein-Proteasen in Verbindung mit vorzugsweise Acylaminosäureestern als Carboxykomponenten begrenzt. Charakteristisch sind kurze Reaktionszeiten bei geringem Enzymbedarf. Im Unterschied zur thermodynamisch kontrollierten Äquilibrierung durchläuft das Estersubstrat aber nur einmal die Stufe der reaktiven acylierten Enzymzwischenstufe, auf der sich das Verhältnis zwischen Peptidbildung und hydrolytischer Spaltung entscheidet.

3.1. Nucleophilspezifität der Proteasen

Die Substratbindungsstellen der aktiven Zentren der Proteasen haben eine unterschiedliche Spezifität für die als Nucleophile verwendeten Aminosäure- und Peptidderivate, wodurch maßgeblich k_4 und damit der Erfolg kinetisch kontrollierter Peptidsynthesen beeinflusst wird^[13,32,36–41].

Ein Acylenzym wird durch Hydrolyse und Aminolyse zerlegt, für deren Geschwindigkeiten v_3 und v_4 sich aus Schema 1

$$\frac{v_3}{v_4} = \frac{\frac{d[R-COOH]}{dt}}{\frac{d[R-CO-NH-R']}{dt}} = \frac{k'_3[R-CO-E]}{k_4[H_2N-R'][R-CO-E]} \quad (7)$$

ergibt, was vereinfacht in

$$\frac{d[R-COOH]}{d[R-CO-NH-R']} = \frac{k'_3}{k_4[H_2N-R']} = \frac{p}{[H_2N-R']} \quad (8)$$

übergeht. In Gleichung (8) wurde der Quotient k'_3/k_4 durch die „Partitionskonstante“ p ersetzt, die der für $d[R-COOH] = d[R-CO-NH-R']$ erforderlichen Nucleophilkonzentration entspricht^[40]; aus dem Acylenzym entstehen dann zu jeweils 50% das Peptid und die Acylamino-

säure. In Tabelle 1 sind einige Partitionskonstanten zusammengestellt. Die Werte veranschaulichen die Eignung von p als Effizienzparameter verschiedener Nucleophile und lassen zugleich erkennen, daß p keine universelle Konstante ist, da sie ebenfalls vom Acylteil des Acylenzyms abhängt. Zumindest läßt sich die Größenordnung der zur Peptidsynthese erforderlichen Nucleophilkonzentration direkt an p ablesen. Streng gültig ist Gleichung (8) nur für den Fall, daß im interessierenden Bereich ein linearer Zusammenhang zwischen Nucleophilkonzentration und p besteht. Dies trifft auf die Mehrzahl der untersuchten Fälle zu. Es sind aber auch Abweichungen vom linearen Zusammenhang gefunden worden^[39], deren exakte mathematische Behandlung erheblich komplizierter ist, da hier p zusätzlich eine Funktion der Nucleophilkonzentration wird.

Tabelle 1. Partitionskonstanten p einiger Acylchymotrypsine [a].

Nucleophil	Ac-Phe-CT [b]	p [mol · L ⁻¹ · 10 ⁻³]	
		Ac-Tyr-CT [c]	Mal-Phe-CT [40]
Gly-NH ₂	90.0	104.7	95.0
Ala-NH ₂	22.7	23.0	35.5
Val-NH ₂		21.4	73.3
Leu-NH ₂		19.3	20.2
Arg-NH ₂			0.15

[a] CT=Chymotrypsin; Mal=Maleyl-(3-Carboxy-acryloyl-). [b] δ-CT; berechnet nach [32]. [c] α-CT; berechnet nach [39].

3.2. Einfluß des Reaktionsmediums

Nur die nichtprotonierte Form des Nucleophils reagiert bei der aminolytischen Desacylierung des Acylenzyms. Deshalb ist anstelle der totalen die effektive Nucleophilkonzentration zu berücksichtigen, die sich aus dem pK -Wert des Nucleophils und dem pH-Wert des Milieus ergibt. Da die pK -Werte der α-Aminogruppen von Aminosäure- und Peptidderivaten bei etwa 8 liegen, empfiehlt sich für die Durchführung kinetisch kontrollierter Peptidsynthesen ein $pH \geq 8$. Die Partitionskonstante p ist ebenfalls vom pH-Wert abhängig. Für die Proteasen Trypsin und Chymotrypsin ergab sich eine synthesesfördernde Verringerung von p im alkalischen Medium^[37]. Organische Lösungsmittel und ionische Zusätze sowie die Temperatur können auch Auswirkungen auf die Partitionskonstante p haben.

4. Ausgewählte Anwendungsbeispiele

Im Vergleich zu den erprobten chemischen Kupplungsmethoden stecken aus verständlichen Gründen proteasekatalysierte Synthesestrategien noch in den Kinderschuhen. Der überwiegende Teil der Untersuchungen zur Eignung proteolytischer Enzyme für die Knüpfung der Peptidbindung wurde anfangs anhand von Modellreaktionen durchgeführt, wobei in der Regel der methodische Aspekt gegenüber dem Gesichtspunkt der praktischen Nutzung dominierte und die Substrate meist so gewählt wurden, daß sie der Spezifität der Protease entsprachen. In jüngster Zeit mehrten sich die Beispiele von Synthesen von Peptidwirkstoffen unter ausschließlicher oder partieller Nutzung pro-

teasekatalysierter Kupplungsschritte. Auf dem Sektor der Semisynthese sind durch die Einbeziehung von Proteasen beispielhafte Fortschritte möglich geworden^[4,42].

Einige ausgewählte Beispiele sollen die Strategie und Taktik sowie die gegenwärtigen Möglichkeiten der Verwendung proteolytischer Enzyme für die Synthese von Peptid- und Proteinwirkstoffen illustrieren.

4.1. Aspartam

Die Vorstufe für den Peptidsüßstoff Aspartam (Asp-Phe-OMe), Z-Asp-Phe-OMe, läßt sich durch thermolysin-katalysierte Verknüpfung von Z-Asp mit Phe-OMe thermodynamisch kontrolliert erhalten. Es bildet sich ein unlösliches Salz mit dem Enantiomer der Aminokomponente, Z-Asp-Phe-OMe-Phe-OMe, und dadurch resultiert eine Gleichgewichtsverschiebung fast quantitativ in Richtung Synthese^[43]. Hierbei findet die Strategie des Minimalschutzes eine glückliche Ergänzung durch die mögliche Salzbildung. Die enzymatische Synthese ist damit chemischen Methoden, die den Einsatz β-geschützter Asparaginsäurederivate erfordern, überlegen.

4.2. Leucin-Enkephalin

Die kinetisch kontrollierte Synthese von Leu-Enkephalin, Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu, wurde durch schrittweise C-terminale Verlängerung des Peptids unter Katalyse durch die Serin-Exoprotease Carboxy-Peptidase Y (CPD-Y) realisiert^[44]. Dabei wurden Aminosäureamide als Nucleophile eingesetzt, da freie Aminosäuren geringe Ausbeuten liefern und Aminosäureester schwer kontrollierbare Folgereaktionen eingehen^[45]. Daraus folgt der umständlich erscheinende Weg, die C-terminale Amidgruppe mit CPD-Y selektiv zu entfernen und anschließend das Peptid zu verestern, bevor es erneut als Substrat im nächsten Kupplungsschritt eingesetzt werden kann. Als „Schutzgruppe“ für die α-Aminofunktion wurde das mit Trypsin leicht entfernbare Bz-Arg verwendet^[17,46].

4.3. Dynorphin(1-8)

Dynorphin(1-8), Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile, formal ein C-terminal verlängertes Leu-Enkephalin, wurde durch Kombination thermodynamisch und kinetisch kontrollierter Kupplungen mit Papain, Chymotrypsin und Trypsin als Biokatalysatoren synthetisiert^[47]. Zu diesem Zweck wurden vier Dipeptide enzymatisch aufgebaut, die danach zu zwei Tetrapeptidsegmenten kondensiert wurden. Anschließend Segmentverknüpfung der Tetrapeptide Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-Phe-OEt und Leu-Arg-Arg-Ile-NH-NH-C₆H₅ durch Chymotrypsin führte zum teilgeschützten Octapeptid, das nach Deblockierung biologisch aktives Dynorphin(1-8) ergab (Abb. 2). Als Carboxyschutz fand durchweg die Phenylhydrazidgruppe Anwendung, die papainkatalysiert in Boc-Aminosäuren eingeführt werden kann^[48] und leicht oxidativ entfernbar oder in einen Ester überführbar^[49] ist.

Dieses Beispiel demonstriert zwei wesentliche Vorteile der enzymatischen Peptidsynthese: Segmente können ohne Racemisierungsrisiko zwischen beliebigen Aminosäuren

lig unterdrückt. Derartige Verfahren werden kommerziell zur Produktion von Humaninsulin genutzt.

Als Substrate können auch Des-Ala^{B30} [54, 58, 59] oder Des-Octapeptid^{B23-B30}-Insulin^[21, 60] dienen, wobei Verknüpfungen mit synthetischen Peptiden einen einfachen Zugang zu Insulinanaloga^[61] eröffnen. Als Enzyme wurden neben Trypsin die lysinspezifische *Achromobacter-Protease*^[54, 58, 59] und CPD-Y^[55] verwendet. Die Vorteile der enzymatischen Semisynthese gegenüber chemischen Methoden werden an diesen Beispielen offenkundig, da fast alle mit Blockierung und Deblockierung verbundenen Probleme bei Verwendung von Proteasen entfallen.

4.7. Ribonuclease-S-Peptid(1-15)

Ein Beispiel für die spezifische Komplexierung des gebildeten Peptids, wodurch es aus dem Synthesegleichgewicht entfernt wird, ist die clostripainkatalysierte Verknüpfung der synthetischen Ribonuclease-S-Peptidsegmente 1-10 und 11-15. Das gebildete Peptid 1-15 wird durch natives Ribonuclease(21-124)-S-Protein komplexiert^[29].

5. Anwendung immobilisierter Proteasen

Für künftige Anwendungen der enzymatischen Peptidsynthese dürfte der Einsatz immobilisierter Proteasen von technisch-ökonomischer Bedeutung sein. Grundlegende Studien zur Anwendbarkeit immobilisierter Proteasen wurden mit kovalent gebundenem Chymotrypsin, Trypsin, Thermolysin und Papain sowohl kinetisch als auch thermodynamisch kontrolliert durchgeführt^[62-64]. Dabei zeigte sich, daß die immobilisierten Biokatalysatoren nahezu die gleiche Effizienz wie die nativen Enzyme aufweisen. Im Gegensatz zu ersten Befunden^[64] ist auch immobilisiertes Papain ausgezeichnet für kinetisch kontrollierte Synthesen bei hohen pH-Werten geeignet^[37].

Der für die Immobilisierung notwendige Aufwand kann durch die mehrfache Verwendung der immobilisierten Enzyme kompensiert werden; diese wird in Abhängigkeit von der Stabilität der immobilisierten Protease besonders bei kurzen Reaktionszeiten, die für kinetisch kontrollierte Reaktionen charakteristisch sind, garantiert. In Modellstudien^[37, 62-64] konnte die mehrfache Verwendbarkeit unter verschiedenen Reaktionsbedingungen nachgewiesen werden. Ein weiterer bedeutender Vorteil immobilisierter Enzyme ist, daß die Produkte nicht mit proteolytisch aktivem oder denaturiertem Enzym verunreinigt sind. Darüber hinaus rücken kontinuierliche Verfahren in den Bereich der Möglichkeiten.

Von praktischem Interesse scheint bisher die Synthese der Aspartam-Vorstufe durch ionisch gebundenes Thermolysin in einer Reaktionsmischung aus über 99% (v/v) Ethylacetat zu sein, wofür jedoch lange Reaktionszeiten erforderlich sind^[65].

Die thermodynamisch kontrollierte Verknüpfung von Des-Ala^{B30}-Insulin mit Thr-OtBu in Gegenwart hoher Konzentrationen mit Wasser mischbarer organischer Lösungsmittel wird ebenfalls effektiv durch kovalent gebundene *Achromobacter-Protease*^[66] und auch durch Trypsin^[67] katalysiert.

6. Kriterien für die Syntheseplanung

Im Gegensatz zur Synthese von Di- und Tripeptiden erfordert der Aufbau längerer Peptidsequenzen eine exakte Syntheseplanung, wobei die Art der Verknüpfungsmethode zunächst eine untergeordnete Rolle spielt. Unter der Strategie der Peptidsynthese wird gewöhnlich die Reihenfolge der Verknüpfung der Aminosäurebausteine verstanden, die entweder durch schrittweisen Aufbau vom C- oder N-Terminus oder durch Kondensation vorgefertigter Blöcke (Segmentkondensation) erreicht werden kann. Ein schrittweiser Aufbau vom N-Terminus ausgehend, wie bei der ribosomalen Proteinbiosynthese, verbietet sich wegen der permanenten Racemisierungsgefahr bei der Chemosynthese. Neben den gravierenden Löslichkeitsproblemen beim Aufbau von Polypeptiden mit globalem Seitenkettenschutz ist die Racemisierungsgefahr die Hauptursache für die Vielfalt an unterschiedlichen Synthesestrategien bei der chemischen Peptidsynthese.

Enzymkatalysierte Kupplungsreaktionen verlaufen zwar stereospezifisch (racemisierungsfrei) und erfordern nur einen minimalen Seitenkettenschutz, womit die beiden oben genannten Probleme gelöst sind, doch erweist sich die Substratspezifität als ein neues Hemmnis für eine universell anwendbare Aufbaustrategie. Eine Protease ist in ihrem Anwendungsbereich im Vergleich zu einer chemischen Verknüpfungsmethode erheblich limitiert, denn deren generelle Verwendbarkeit wird höchstens durch sterische Faktoren der zu verknüpfenden Komponenten beeinflusst. Dieser Nachteil wird aber durch andere Vorteile kompensiert. Hierzu zählen nicht nur die beiden obengenannten Faktoren (stereospezifischer Reaktionsverlauf und weitgehender Verzicht auf den Schutz von Seitenkettenfunktionen trifunktioneller Aminosäurebausteine), sondern auch milde und ökologisch vorteilhafte Reaktionsbedingungen. Betrachtet man das Potential der prinzipiell für die Knüpfung der Peptidbindung geeigneten proteolytischen Enzyme, so sollten Exopeptidasen für die schrittweise Synthese von kürzeren Peptiden und Segmenten vorzugsweise Verwendung finden, während die Kondensation zu größeren Blöcken unter der Katalyse von Endopeptidasen angepaßter Substratspezifität sinnvoll erscheint. Exopeptidasen haben den großen Vorteil, daß beim schrittweisen Aufbau sowohl vom C-Terminus (Amino-Peptidasen) als auch vom N-Terminus (Carboxy-Peptidasen) die innenständigen Peptidbindungen der wachsenden Ketten nicht mehr proteolytisch durch die Biokatalysatoren gespalten werden. Für präparative Zielsetzungen dürften Amino-Peptidasen weniger gut geeignet sein, da Substrat und Produkt freie α -Aminofunktionen tragen, was die Produktisolierung erschwert; bei nicht stark ausgeprägter Substratspezifität können unerwünschte Verknüpfungen stattfinden. Weitaus günstigere Eigenschaften weisen Carboxy-Peptidasen auf, insbesondere die Serin-Protease Carboxy-Peptidase Y (vgl. Abschnitt 4.2). Da aber auch beim Einsatz von CPD-Y verschiedene präparative Einschränkungen deutlich wurden, ist es sehr günstig, daß für die Synthese kurzkettiger Peptide Endopeptidasen ebenfalls geeignet sind, zumal durch eine sinnvolle Schutzgruppenkombination solche Enzyme selbst für die Synthese von Dipeptiden Verwendung finden können. Darüber hinaus ermöglichen Endopeptidasen geringerer Spezifität auch, wie am Beispiel papainkatalysier-

ter Oligopeptidsynthesen demonstriert^[68], den schrittweisen Aufbau.

Komplikationsfreie Segmentverknüpfungen erfordern Endopeptidasen hoher Substratspezifität und die Abwesenheit der die Spezifität determinierenden Aminosäurebausteine in den zu vereinigenden Segmenten in anderen Positionen als der Verknüpfungsstelle. Neben der lysinspezifischen *Achromobacter*-Protease katalysiert Trypsin die Knüpfung von Peptidbindungen nach Lysin- und Argininresten, wodurch Segmentverknüpfungen unter den genannten Voraussetzungen nur an Carboxykomponenten mit einem der genannten basischen Aminosäurereste in *C-terminaler* Position vollzogen werden können. Diese Einschränkung führt zwangsläufig zu der Schlußfolgerung, auch mit weniger spezifischen Proteasen Segmentkupplungen zu katalysieren, wobei zwecks Vermeidung unerwünschter Kettenspaltungen bestimmte synthesebegünstigende Manipulationen, wie bereits in den Abschnitten 2 und 3 besprochen, erforderlich sind. Beispiele für den Aufbau biologisch aktiver Oligopeptide unter ausschließlicher Nutzung proteasekatalysierter Kupplungsschritte (vgl. Abschnitt 4.2 und 4.3) sind bekannt. Ohne dieses anspruchsvolle Synthesekonzept abwerten zu wollen, ist in naher Zukunft nicht damit zu rechnen, daß chemosynthetische Kupplungsmethoden generell durch enzymkatalysierte Varianten ersetzt werden; vielmehr werden die enzymkatalysierten Kupplungen zu einer erheblichen Bereicherung des Methodenarsenals des Peptidsynthetikers führen.

Bei einem vorgegebenen Syntheseeziel muß zunächst geprüft werden, ob für die Unterteilung in Segmente günstige Kombinationen von Aminosäurebausteinen vorhanden sind, die proteasekatalysierte Segmentverknüpfungen ermöglichen. Der Segmentaufbau sollte am vorteilhaftesten in Kombination mit bewährten chemischen Kupplungsmethoden vorgenommen werden. So sind chemisch einfach durchzuführende Verknüpfungen ohne Racemisierungsrisiko enzymatischen Varianten durchaus vorzuziehen; Segmente mit einer Häufung von Aminosäurebausteinen ohne schutzbedürftige Drittfunktionen erscheinen dafür besonders geeignet. Hingegen erfordern Segmente mit überwiegend trifunktionellen Aminosäureresten bei weitgehendem Verzicht auf semipermanenten Seitenkettenschutz den Einsatz von Proteasen mit angepaßter Substratspezifität. Auf diese Weise resultieren Segmente mit einer für proteasekatalysierte Blockverknüpfungen ausreichenden Löslichkeit.

Bei Verwendung von Serin- und Cystein-Proteasen ergibt sich ein weiterer Entscheidungszwang: Soll die Carboxykomponente als Acylaminosäure oder soll ein die Acylierung begünstigendes Derivat (z. B. Alkylester) verwendet werden? Wenngleich einer kinetisch kontrollierten Reaktion mit geringem Enzymbedarf und kurzen Reaktionszeiten der Vorzug gegeben werden sollte, wird die Entscheidung im Einzelfall durch die übergeordnete Gesamtsynthesekonzeption bestimmt. Einer ungünstigen Nucleophil-spezifität läßt sich unter Umständen durch thermodynamische Kontrolle, verbunden mit entsprechenden Synthesebedingungen, besser begegnen als es die Erfordernisse einer kinetisch kontrollierten Reaktion zulassen.

Für Synthesen von biologisch aktiven Peptiden und von Segmenten mit überwiegend hydrophoben Aminosäurebausteinen ist es oftmals angebracht, die resultierende schlechte Löslichkeit der Edukte durch Einsatz solubilisie-

render Schutzgruppen zu umgehen^[69]. Die Einführung löslichkeitsvermittelnder Reste in die klassischen N^α- und C^α-Schutzgruppen kann nicht als Lösung des Problems angesehen werden: für enzymkatalysierte Peptidsynthesen ist ein völlig andersartiger Schutzgruppentyp erforderlich. Selbst Polyoxyethylenester, die sich für Chemosynthesen im wäßrigen Medium bewährten^[70], sind als Carboxykomponenten weniger gut geeignet, während so blockierte Aminokomponenten problemlos umgesetzt werden konnten^[71]. Generell sind unter milden Bedingungen abspaltbare Gruppierungen gefragt, wie es beispielsweise bei Verwendung von Bz-Arg- oder Bz-Phe-Resten als α-Aminoschutzgruppen, die tryptisch bzw. chymotryptisch abgespalten werden können, möglich ist^[17, 46, 72]. Solubilisierende Estergruppierungen an Carboxykomponenten begünstigen die Löslichkeit der Edukte bei kinetisch kontrollierten Reaktionen. Nach der Umsetzung geht der Löslichkeitsvermittelnde Effekt zwangsläufig verloren. Möglicherweise sind nichtionische solubilisierende Estergruppierungen geladenen Resten vorzuziehen.

Die Verbesserung der Löslichkeit von Edukten und Produkten hat unmittelbare Bedeutung für kontinuierliche Prozeßführungen mit immobilisierten Proteasen, deren Einsatz immer dann gerechtfertigt erscheint, wenn der für die Immobilisierung erforderliche Aufwand durch die mehrfache Verwendung des Biokatalysators kompensiert wird.

Schließlich erhebt sich die Frage, ob Proteasen auch als Katalysatoren für die Knüpfung von Peptidbindungen bei Synthesen an einer zweiten Phase geeignet sind. Einfache Modellstudien mit einer polymergebundenen Aminokomponente zeigten, daß Polyoxyethylen als lösliches Polymer gut geeignet ist^[71]. Bei Silicagel als unlöslicher Polymermatrix ergeben sich Einschränkungen durch die geringere Mobilität des fixierten Nucleophils sowie durch sterische Wechselwirkungen zwischen Enzym und Polymer^[73]. Durch Verwendung von Spacern sowie von Polymeren mit einer hohen Nucleophilbeladungskapazität sollte diesen Limitationen erfolgreich begegnet werden können.

7. Schlußbetrachtungen und Ausblick

Ausgehend von den klassischen Studien zur Reversibilität proteasekatalysierter Reaktionen konnte in den letzten zehn Jahren der überzeugende Nachweis erbracht werden, daß proteolytische Enzyme prinzipiell als Biokatalysatoren für die Knüpfung der Peptidbindung im präparativen Maßstab eingesetzt werden können und somit für die biotechnologische Synthese von Peptid- und Proteinwirkstoffen praktische Bedeutung haben. Die Stereospezifität der Proteasen garantiert stereochemisch einheitliche Produkte und erfordert nur minimalen semipermanenten Schutz von Seitenkettenfunktionen trifunktioneller Aminosäurebausteine. Es ist jedoch nicht möglich, Proteasen bei der Synthese jedes beliebigen Peptids oder Proteins einzusetzen. Deshalb ist es eine wichtige Aufgabe, Proteasen abgestufter Substratspezifität strategisch-taktisch entsprechend der jeweiligen Produktsequenz auszuwählen, wobei die Vorzüge sowohl der thermodynamisch als auch der kinetisch kontrollierten Reaktionen optimal zu nutzen sind. Die für biotechnologische Verfahren charakteristischen umwelt-

freundlichen Reaktionsbedingungen, gekoppelt mit dem Vorteil einer kontinuierlichen Prozeßführung beim Einsatz immobilisierter Proteasen, sollten ein wichtiger Anreiz sein, die enzymkatalysierte Peptidsynthese methodisch weiter zu vervollkommen, um auf diese Weise das Rüstzeug des Peptidsynthetikers zu verbessern und zu vermehren.

Eingegangen am 21. August 1984 [A 519]

- [1] E. Gross, J. Meienhofer: *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 1-6, Academic Press, New York 1979-1984.
- [2] E. Wünsch: *Synthese von Peptiden*. in Houben-Weyl-Müller: *Methoden der organischen Chemie*, Bd. 15, Teil 1 und 2, Thieme, Stuttgart 1974.
- [3] H.-D. Jakubke, H. Jeschkeit: *Aminosäuren, Peptide, Proteine*, Verlag Chemie, Weinheim 1982.
- [4] R. E. Offord in K. Bláha, P. Maloň: *Peptides 1982*, de Gruyter, Berlin 1983, S. 31.
- [5] H.-G. Gassen, *Angew. Chem.* 94 (1982) 15; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21 (1982) 23.
- [6] J. H. van't Hoff, *Z. Anorg. Chem.* 18 (1898) 1.
- [7] M. Bergmann, H. Fraenkel-Conrat. *J. Biol. Chem.* 119 (1937) 707.
- [8] M. Bergmann, H. Fraenkel-Conrat. *J. Biol. Chem.* 124 (1938) 1.
- [9] J. B. Jones, *Methods Enzymol.* 44 (1976) 831; C. J. Sih, C.-S. Chen, *Angew. Chem.* 96 (1984) 556; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 570.
- [10] H.-D. Jakubke, P. Kuhl, *Pharmazie* 37 (1982) 97.
- [11] J. S. Fruton in A. Meister: *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 53 (1982) 239.
- [12] I. M. Chaiken, A. Komoriya, M. Ohno, F. Widmer, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 7 (1982) 385.
- [13] D. D. Petkov, *J. Theor. Biol.* 98 (1982) 419.
- [14] Y. Isowa, *Yuki Gosei Kagaku Kyokai Shi* 36 (1978) 195; *Chem. Abstr.* 89 (1978) 18465.
- [15] F. Brtník, K. Jost, *Chem. Listy* 74 (1980) 951.
- [16] K. Morihara, *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 26 (1981) 1979; 29 (1984) 49; *Chem. Abstr.* 95 (1981) 216416 bzw. 100 (1984) 81610.
- [17] J. D. Glass, *Enzyme Microb. Technol.* 3 (1981) 2.
- [18] D. Konopińska, F. Muzalewski, *Mol. Cell. Biochem.* 51 (1983) 165.
- [19] Z. Wang, *Shengwu Wuxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan* 54 (1983) 53; *Chem. Abstr.* 100 (1984) 82164.
- [20] G. A. Homandberg, J. A. Mattis, M. Laskowski, Jr., *Biochemistry* 17 (1978) 5220.
- [21] K. Inouye, K. Watanabe, Y. Tochino, M. Kobayashi, Y. Shigeta, *Biopolymers* 20 (1981) 1845.
- [22] A. Könnicke, V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, *Z. Chem.* 24 (1984) 185; A. Könnicke, M. Hänsler, H. D. Jakubke, unveröffentlicht.
- [23] K. Martinek, A. N. Semenov, *J. Appl. Biochem.* 3 (1981) 93; *Usp. Khim.* 50 (1981) 1376.
- [24] P. Kuhl, A. Wilsdorf, H.-D. Jakubke, *Monatsh. Chem.* 114 (1983) 571.
- [25] P. Kuhl, J. Walpuski, H.-D. Jakubke, *Pharmazie* 37 (1982) 766.
- [26] P. Kuhl, H.-D. Jakubke, *Z. Chem.* 22 (1982) 407.
- [27] H.-D. Jakubke, P. Kuhl, A. Könnicke, G. Döring, J. Walpuski, A. Wilsdorf, N. P. Zapevalova in K. Bláha, P. Maloň: *Peptides 1982*, de Gruyter, Berlin 1983, S. 43.
- [28] G. Döring, P. Kuhl, H.-D. Jakubke, *Monatsh. Chem.* 112 (1981) 1165.
- [29] G. A. Homandberg, A. Komoriya, I. M. Chaiken, *Biochemistry* 21 (1982) 3385.
- [30] M. L. Bender, G. E. Clement, C. R. Gunter, F. J. Kezdy, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 3697.
- [31] L. J. Brubacher, M. L. Bender, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27 (1967) 176.
- [32] J. Fastrez, A. R. Fersht, *Biochemistry* 12 (1973) 2025; A. R. Fersht, D. M. Blow, *J. Fastrez, ibid.* 12 (1973) 2035.
- [33] J. R. Whitaker, M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.* 87 (1965) 2728.
- [34] M. L. Bender, F. J. Kezdy, *Annu. Rev. Biochem.* 34 (1965) 49.
- [35] B. Asboth, L. Polgar, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* 12 (1977) 329.
- [36] S. A. Bizzozero, B. A. Rovagnati, H. Dutler, *Helv. Chim. Acta* 65 (1982) 1707.
- [37] V. Schellenberger, A. Könnicke, H.-D. Jakubke in U. Ragnarsson: *Peptides 1984*, Almquist & Wiksell, Stockholm, im Druck.
- [38] W. Kullmann, *Biochem. J.* 220 (1984) 405.
- [39] L. Riechmann, V. Kasche, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120 (1984) 686.
- [40] A. Könnicke, V. Schellenberger, H.-J. Hofmann, H.-D. Jakubke, *Pharmazie* 39 (1984) 785.
- [41] D. D. Petkov, I. Stoineva, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118 (1984) 317.
- [42] H. Zahn, V. K. Naithani, H.-G. Gattner, E. E. Büllesbach, P. M. Thamm, *Naturwissenschaften* 68 (1981) 56; D. J. Saunders, D. Brandenburg, C. Shang-chuan, W. Chih-chen, *Endeavour* 6 (1982) 146.
- [43] Y. Isowa, M. Ohmori, T. Ichikawa, K. Mori, Y. Nonaka, K. Kihara, K. Oyama, *Tetrahedron Lett.* 1979, 2611.
- [44] F. Widmer, K. Breddam, J. T. Johansen in K. Brunfeldt: *Peptides 1980*, Scriptor, Copenhagen 1981, S. 46.
- [45] K. Breddam, F. Widmer, J. T. Johansen, *Carlsberg Res. Commun.* 48 (1983) 231.
- [46] C. Meyers, J. D. Glass, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 2196.
- [47] W. Kullmann, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 5300.
- [48] H. B. Milne, F. H. Carpenter, *J. Org. Chem.* 33 (1968) 4476.
- [49] H. B. Milne, W. Kilday, *J. Org. Chem.* 30 (1965) 64.
- [50] F. Widmer, S. Bayne, G. Houen, B. A. Moss, R. D. Rigby, R. G. Whittaker, J. T. Johansen in U. Ragnarsson: *Peptides 1984*, Almquist & Wiksell, Stockholm, im Druck.
- [51] P. Kuhl, G. Döring, K. Neubert, H.-D. Jakubke, *Monatsh. Chem.* 115 (1984) 423.
- [52] P. Kuhl, A. Könnicke, G. Döring, H. Däumer, H.-D. Jakubke, *Tetrahedron Lett.* 1980, 893.
- [53] A. Jonczyk, H.-G. Gattner, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 362 (1981) 1591.
- [54] K. Morihara, T. Oka in S. Sakakibara: *Peptide Chemistry 1982*, Protein Research Foundation, Osaka 1983, S. 231.
- [55] K. Breddam, F. Widmer, J. T. Johansen, *Carlsberg Res. Commun.* 46 (1981) 361.
- [56] K. Rose, J. Gladstone, R. E. Offord, *Biochem. J.* 220 (1984) 189, zit. Lit.
- [57] R. Obermeier, G. Seipke in W. Voelter, E. Bayer, Y. A. Ovchinnikov, E. Wünsch: *Chemistry of Peptides and Proteins*, Vol. 2, de Gruyter, Berlin 1984, S. 3.
- [58] K. Morihara, T. Oka, H. Tsuzuki, *Nature (London)* 280 (1979) 412.
- [59] K. Morihara, T. Oka, H. Tsuzuki, Y. Toshiharu, T. Kanaga, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92 (1980) 396.
- [60] K. Inouye, K. Watanabe, K. Morihara, Y. Tochino, T. Kanaya, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 751.
- [61] Y.-S. Zhang, *Trends Biochem. Sci.* 8 (1983) 16.
- [62] A. Könnicke, R. Bullerjahn, H.-D. Jakubke, *Monatsh. Chem.* 112 (1981) 469.
- [63] H.-D. Jakubke, R. Bullerjahn, M. Hänsler, A. Könnicke in T. C. J. Gribs-nau, J. Visser, R. J. F. Nivard: *Analytical Chemistry Symposia Series*, Vol. 9, Elsevier, Amsterdam 1982, S. 529.
- [64] A. Könnicke, M. Hänsler, V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, *Monatsh. Chem.* 114 (1983) 433.
- [65] K. Oyama, S. Nishimura, Y. Nonaka, K. Kihara, T. Hashimoto, *J. Org. Chem.* 46 (1981) 5241.
- [66] R. Muneyuki, T. Oka, K. Morihara in T. Shioiri: *Peptide Chemistry 1981*, Protein Research Foundation, Osaka 1982, S. 113.
- [67] H.-D. Jakubke, A. Könnicke, *Methods Enzymol.*, im Druck.
- [68] Y. V. Mitin, N. P. Zapevalova, E. Y. Gorbunova, *Int. J. Pept. Protein Res.* 23 (1984) 528.
- [69] P. Kuhl, J. Walpuski, H.-D. Jakubke, *Pharmazie* 39 (1984) 280.
- [70] G. P. Royer, G. M. Anantharamaiah, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 3394.
- [71] A. Könnicke, V. Pchalek, H.-D. Jakubke, *Monatsh. Chem.*, im Druck.
- [72] R. W. Holley, *J. Am. Chem. Soc.* 77 (1955) 2552.
- [73] A. Könnicke, S. Dettlaff, H.-D. Jakubke, *Monatsh. Chem.* 113 (1982) 331.