



УДК 577.112.6:577.152.342'.22

СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ, КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ ПАПАИНОМ, В ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЯХ С МИНИМАЛЬНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ВОДЫ

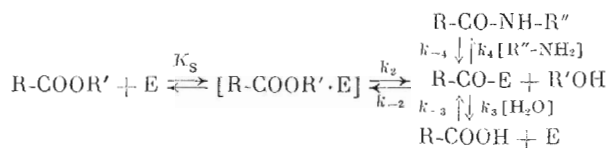
*Митин Ю. В., Шелленбергер Ф. *, Якубке Г.-Д. **

Институт белка Академии наук СССР, Пушкино Московской обл.;

** Университет им. К. Маркса, Лейпциг, ГДР*

Исследован катализируемый папаином синтез модельного пептида Z-Ala-Val-OBu^t в ацетонитриле, содержащем 0–5% воды. В качестве карбоксильного компонента использовался Z-Ala-OSn₂CONH₂. Найдено, что оптимальной концентрацией воды является 0,3–0,5%, при этом скорость реакции в 50–100 раз меньше, чем в воде, но выход пептида может достигать 99,5%. Изучено также влияние концентрации реагентов и температуры на ход реакции.

Один из методов ферментативного синтеза пептидов — кинетически контролируемый метод — основан на использовании эфиров N-защитенных аминокислот и пептидов в качестве карбоксильного компонента [1]. Схема процесса может быть представлена следующим образом:



При условии $k_4[\text{R''-NH}_2] > k_3[\text{H}_2\text{O}]$ пептид R-CO-NH-R' может быть получен с удовлетворительным выходом [2–4]. Лимитирующим фактором процесса является обычно низкая растворимость в воде карбоксильного компонента R-COOR', а также аминокомпонента R'-NH₂. Последнее особенно часто встречается в том случае, когда в качестве аминокомпонента используют трет-бутиловые эфиры аминокислот и пептидов. В условиях синтеза (рН 8–9) гидрофобные аминокомпоненты плохо растворяются в воде, и это затрудняет проведение синтеза. К тому же синтезируемый пептид также обычно плохо растворяется в воде. Для преодоления этих трудностей в реакционную смесь приходится добавлять органические растворители (спирты, диметилформамид, дioxан и др.). Как известно, органические растворители могут вызывать инактивацию ферментов, нарушая их пространственную структуру, поэтому добавление органических растворителей обычно ограничено 30–40%. Лишь в некоторых случаях удается проводить синтез пептидов при содержании органических растворителей 60–80% [5, 6]. Добавление органических растворителей снижает скорость синтеза, однако позволяет добиться гомогенности среды, что существенно облегчает работу.

Другим преимуществом системы, содержащей органический растворитель, должно быть уменьшение концентрации воды в реакционной среде и, следовательно, уменьшение вероятности нежелательного гидролиза промежуточного активированного соединения R-CO-E. Однако при обычных используемых концентрациях органических растворителей это преимущество не может быть реализовано, так как даже при содержании воды 20–40% ее молярная концентрация (10–20 М) намного превышает концентрацию аминокомпонента (обычно 0,1–0,2 М).

Недавно была опубликована работа Исова с соавторами, в которой была показана возможность использования ряда протолитических ферментов для синтеза пептидов в органических растворителях в условиях

Реакционная способность эфира Вос- или Z-Ala-OR при синтезе Вос- или Z-Ala-Val-OBu^t, катализируемом папаином в ацетонитриле
Приведен выход пептида в процентах *

R	Время реакции, ч		
	2	6	24
Sam	23	46	92
Bzl	28	43	71
Pac **	6	14	78
CH ₃	8	10	18

* Условия: 5 мг папаин/полиамид, 0,4 мл CH₃CN, 0,3% H₂O, 0° С, 10 мМ Вос(Z)-Ala-OR, 4 мМ H-Val-OBu^t.
** Pac — фенацил(CH₂COOC₆H₅).

термодинамического равновесия [7]. Кроме того, имеются данные о синтезе пептидов в бензоле с использованием хмотрипсина, модифицированного полпэтиленгликолем [8]. Мы исследовали возможность синтеза пептидов, катализируемого папаином (КФ 3.4.22.2), в органических растворителях при очень низком содержании воды. В качестве модельного пептида был выбран Z-Ala-Val-OBu^t, отличающийся высокой гидрофобностью. Этот пептид не растворим в воде, но хорошо растворяется в большинстве органических растворителей. В качестве карбоксильного компонента мы использовали карбоксамидометилловый эфир Z-Ala-OCH₂CONH₂(Z-Ala-OSam) [9, 10]. Из табл. 1 видно, что из исследованных эфиров Сам-эфир как субстрат дает наилучший результат. Впрочем, бензиловые эфиры также являются хорошими субстратами, лишь немного уступающими Сам-эфирам. В качестве органического растворителя наилучшим оказался ацетонитрил.

Мы изучили реакцию синтеза модельного пептида при разных концентрациях воды в интервале 0—80%, при этом оказалось, что папаин катализирует синтез даже в практически безводной среде, т. е. в растворителе, высушенном общепринятым способом — перегонкой над P₂O₅. Конечно, скорость синтеза в «безводном» ацетонитриле гораздо ниже (в 50—100 раз), чем в водной среде, но тем не менее пептид получается с хорошим выходом. Без папаина в этих условиях реакция не идет. На рис. 1 представлено влияние содержания воды на соотношение скоростей реакций синтеза пептида и гидролиза Z-Ala-OSam. Видно, что при содержании воды в реакционной среде в интервале 5—50% происходит только гидролиз Сам-эфира, а пептид не образуется. В интервале концентрации воды 50—80% происходит образование пептида, хотя в значительной степени протекает и гидролиз Сам-эфира. Самым интересным оказался интервал концентраций воды 0,1—5%. Здесь идет в основном синтез, причем максимальный эффект достигается при содержании воды <1%. При концентрации воды менее 1% синтез преобладает над гидролизом настолько явно, что в этих условиях можно ожидать высоких выходов пептидов (рис. 2). Действительно, в этой области концентрации воды пептид Z-Ala-Val-OBu^t был получен с выходом до 99,5%. Обычно органические растворители, приготовленные традиционным способом и хранящиеся без особых предосторожностей, содержат 0,1—0,3% воды. Этого достаточно, чтобы проводить в них синтез пептидов, катализируемый папаином. Однако для надежности следует контролировать содержание воды и, если необходимо, добавлять ее, поддерживая концентрацию 0,3—0,5%.

Использование иммобилизованного папаина позволяет достичь наилучшего эффекта при синтезе пептидов в органических растворителях. При этом нет необходимости получать папаин, ковалентно присоединенный к носителю. Поскольку папаин не растворяется в органических растворителях, вполне достаточно использовать фермент, сорбированный на инерт-

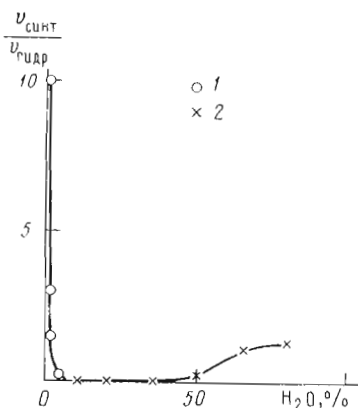


Рис. 1

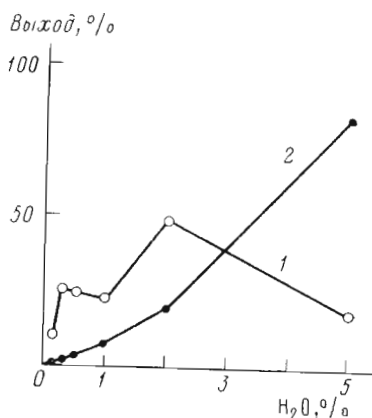


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость отношения скорости синтеза $Z\text{-Ala-Val-OBu}^t$ из $Z\text{-Ala-OSam}$ к скорости гидролиза последнего от концентрации воды в реакционной смеси. Растворитель — ацетонитрил, общий объем 0,4 мл, 0°C , 30 мМ $Z\text{-Ala-OSam}$, 20 мМ H-Val-OBu^t . 1 — 5 мг папаин/полиамид, 6 ч; 2 — 2 мг папаин/полиамид, 1 ч

Рис. 2. Зависимость выхода $Z\text{-Ala-Val-OBu}^t$ (1) и $Z\text{-Ala-OH}$ (2) от концентрации воды в ацетонитриле в интервале 0,15–5%. Условия см. в подписи к рис. 1

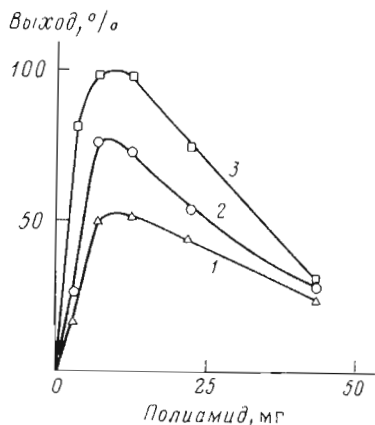


Рис. 3

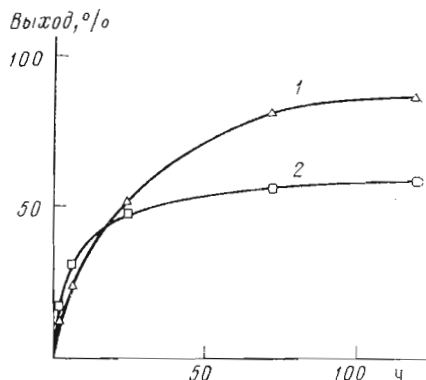


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость выхода $Z\text{-Ala-Val-OBu}^t$ от количества полиамида. Условия см. в подписи к рис. 1, папаин 0,2 мг, время реакции 2 (1), 6 (2) и 24 (3) ч

Рис. 4. Выход $Z\text{-Ala-Val-OBu}^t$ при температуре реакции 0°C (1) и 20°C (2). Условия см. в подписи к рис. 1; 5 мг папаин/полиамид, 15 мМ H-Val-OBu^t

ном носителе. В качестве носителя может служить силикагель, активированный уголь, ионообменные смолы, полиамид и т. д. Мы нашли, что наиболее удобным носителем является полиамид, обычно применяемый для тонкослойной хроматографии. Мы использовали два способа нанесения папаина на полиамид: 1) водный раствор папаина смешивали с полиамидом, затем воду удаляли сначала медленной экстракцией этилацетатом, затем азеотропной отгонкой с диоксаном в вакууме; 2) смесь водного раствора папаина с полиамидом замораживали и подвергали лиофильной сушке. На рис. 3 представлена зависимость выхода пептида от соотношения полиамид — папаин. Видно, что максимальный выход достигается при соотношении 40–50 мг носителя на 1 мг фермента. Папаин, не сорбированный на носителе, в этих условиях не катализирует синтез.

Интересно, что при пониженной температуре ($-10 - 0^\circ\text{C}$) процесс хотя и протекает медленнее, чем при 20 или 30°C , но со временем достигается бо́льшая степень конверсии. Это, вероятно, можно объяснить сравнительно медленной инактивацией папаина при низкой температуре, в то время как при 20°C инактивация наступает быстрее; по этой причине процесс пре-

Влияние растворителей, добавленных к ацетонитрилу в соотношении 1 : 3, на ход синтеза Z-Ala-Val-OBu^t

Добавляемый растворитель	Выход Z-Ala-Val-OBu ^t , % (считая на H-Val-OBu ^t)	Выход Z-Ala-OH, % (считая на Z-Ala-OCam)
—	86	37
Этиленгликоль	9	7
1,4-Бутандиол	22	9
2,3-Бутандиол	32	21
N-Метилацетамид	29	47
Целлозольв	16	10
Диметилформамид	31	13
Нитрометан	52	35
Трихлорэтилен	85	60
Толуол	84	19

кращается, хотя в растворе еще присутствуют и исходный Cam-эфир и аминокомпонент (рис. 4).

Данные по влиянию добавки различных растворителей к ацетонитрилу (табл. 2) свидетельствуют, что большинство растворителей, за исключением толуола и трихлорэтилена, ухудшают процесс. К сожалению, добавление такого хорошего растворителя для пептидов, как диметилформамид, заметно снижает выход пептида.

Таким образом, папаин может катализировать синтез гидрофобных пептидов в органических растворителях при содержании воды <1%. Использование этого процесса для синтеза некоторых пептидов будет описано в других сообщениях.

Экспериментальная часть

В работе использовали папаин (Merck, ФРГ) без дополнительной очистки, HCl-H-Val-OBu^t, дитиотреит (Reanal, ВНР), полиамид для тонкослойной хроматографии (Woelm, ФРГ), который промывали последовательно водой, спиртом, этилацетатом и сушили в вакууме, флуорескамин (Fluka, Швейцария). Z-Ala-OCam синтезировали по описанной методике [9]. Все используемые растворители очищали по стандартным методикам, содержание воды в ацетонитриле определяли по поглощению в УФ-области при 280 нм.

Нанесение папаина на полиамид. Способ 1. К раствору 10 мг папаина в 0,2 мл 0,12 М Na-фосфатного буфера, содержащего 1 М NaCl, pH 7,0, добавляли 10 мг дитиотреита и 0,1 г полиамида при 20°С, тщательно растирали, затем приливали 10 мл этилацетата и перемешивали 5 мин. Этилацетат декантировали, к остатку приливали 10 мл диоксана и отгоняли на ротационном испарителе при температуре бани не выше 35°С. Азеотропную сушку с диоксаном повторяли еще раз.

Способ 2. (Использовали при определении влияния соотношения папаин — носитель на выход пептида.) К раствору 1,3–21,0 мг папаина в 0,2 мл Na-фосфатного буфера, содержащего 1 М NaCl, pH 7, добавляли 10 мкл 10% раствора дитиотреита в ацетонитриле и 0,2 г полиамида. Смесь тщательно перемешивали, замораживали и лиофилизовали.

Определение концентрации аминокомпонента проводили с помощью флуорескамина, используя спектрофотометр Specord UV VIS (ГДР). В кювету вносили 0,1 мл 10 мМ раствора триэтилamina в метаноле, 2–10 мкл реакционной смеси (содержащей 10–100 нмоль аминокрупп) и 25 мкл 10 мМ раствора флуорескамина в ацетоне, тщательно перемешивали тефлоновой палочкой, через 1 мин добавляли 0,9 мл метанола, перемешивали и измеряли поглощение при 400 нм. Поглощение имеет линейную зависимость от концентрации H-Val-OBu^t с $\epsilon = 5130 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Определение продукта гидролиза. Концентрацию Z-Ala-OH в реакционной смеси определяли потенциометрическим титрованием, используя титратор ТТТ 60 (Radiometer, Дания). В сосуд титратора вводили 7 мл 0,1 М NaCl в 70% ацетоне, pH 9,5 поддерживали титрованием 10 мМ NaOH в 70% ацетоне. Пробы 2–5 мкл из реакционной смеси вводились каждые 3 мин, регистрировался расход раствора NaOH.

Синтез модельного пептида, катализируемый папаином, проводили в плотно завинчивающемся тефлоновом сосуде, который встряхивался в термостатируемом алюминиевом блоке. Перед отбором проб реакционную смесь центрифугировали 1 мин при 500 об/мин. Пробы отбирали через коническое отверстие в крышке сосуда, которое затем закрывали штифтом из дюрала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Morihara K., Oka T. // Biochem. J. 1977. V. 163. № 3. P. 531-542.
2. Mitin Yu. V., Zapevalova N. P., Gorbunova E. Yu. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1984. V. 23. № 5. P. 528-534.
3. Widmer F., Breddam K., Johansen T. // Peptides. 1980/Ed. Brunfeldt K. Copenhagen: Scriptor, 1981. P. 46-55.
4. Oka T., Morihara K. // J. Biochem. 1977. V. 82. № 4. P. 1055-1066.
5. Homandberg G. A., Mattis J. A., Laskowski M. // Biochemistry. 1978. V. 17. № 20. P. 5220-5227.
6. Sakina K., Ueno Y., Oka T., Morihara K. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1986. V. 28. № 6. P. 411-419.
7. Isowa Y., Kakutani M., Yaguchi M. // Peptide Chemistry, 1981. Osaka: Protein Research Foundation, 1982. P. 25-30.
8. Matsushima A., Okada M., Inada Y. // FEBS Lett. 1984. V. 178. № 2. P. 275-277.
9. Martinez J., Laur J., Castro B. // Tetrahedron. 1985. V. 41. № 4. P. 739-743.
10. Kuhl P., Zacharias U., Burckhardt H., Jakubke H.-D. // Mh. Chem. 1986. V. 117. № 10. P. 1195-1204.

Поступила в редакцию
10.IV.1987

PAPAIN-CATALYZED SYNTHESIS OF PEPTIDES IN ORGANIC SOLVENTS WITH A MINIMAL WATER CONTENT

MITIN Yu. V., SCHELLENBERGER F.*, JAKUBKE H.-D.*

*Institute of Protein Research, Academy of Sciences of the USSR,
Pushchino, Moscow Region:*

* *K: Marx University, Leipzig, GDR*

Synthesis of a model peptide, Z-Ala-Val-OBu^t, catalyzed by papain in acetonitrile containing 0-5% water was studied. Z-Ala-OCH₂CONH₂ was used as a carboxyl component. The optimal concentration of water was found to be 0,3-0,5%. Under these conditions the reaction rate is 50 to 100 times lower than in water but the yield of the peptide can be as high as 99,5%. Effect of reagent concentrations and temperature on the reaction was also studied.