



УДК 577.112.3:546.11.3

## ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ ГЕТЕРОГЕННЫМ ИЗОТОПНЫМ ОБМЕНОМ С ГАЗООБРАЗНЫМ ТРИТИЕМ В РАСТВОРЕ

*Петренко Б. В., Золотарев Ю. А., Мясоедов Н. Ф.*

*Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва*

Приводятся данные о влиянии на уровень включенной радиоактивности аминокислот и пептидов условий проведения реакции гетерогенного изотопного обмена с газообразным тритием в растворе. Наиболее легко обмен проходит у гистидина и фенилаланина и их остатков в пептидах. Описано получение АСТН(5-7)-пептида с молекулярной активностью 272 ТБк/моль.

В настоящее время возрастает потребность в пептидах, меченных радиоактивными изотопами, и поэтому актуальной становится разработка и совершенствование методов их получения. Наибольшее распространение получили следующие методы: каталитическое дегалогенирование галоидтирозинового [1-4] или галоидфенилаланинового [5, 6] остатков в пептидах и гетерогенный каталитический обмен с тритийсодержащими растворителями [7]. В последнее время все более широкое применение получает метод гетерогенного каталитического изотопного обмена с газообразным тритием в растворе. Поскольку этот метод успешно применяется для введения тритиевой метки в аминокислоты [8], компоненты нуклеиновых кислот [9], липиды [10], углеводы [11], было интересно определить границы его применимости для пептидов.

Для этого были исследованы условия протекания гетерогенного изотопного обмена с газообразным тритием в растворе для шести различных аминокислот на катализаторах платиновой группы, из которых наиболее часто применяют палладий и платину или их окислы. Как видно из табл. 1, достигаемая величина радиоактивности аминокислот зависит от их строе-

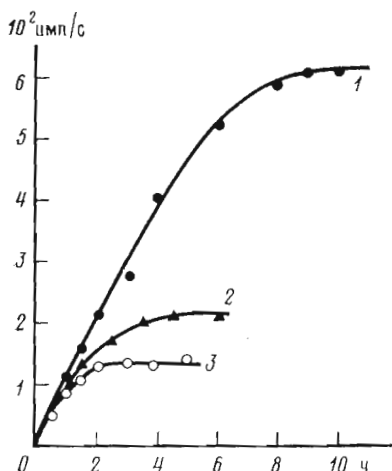


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость включения трития в фенилаланин (1), валин (2) и лизин (3) от времени процесса обмена с газообразным тритием в растворе (0,1%  $^3\text{H}_2$ , 400 гПа, 5% Pd/BaSO<sub>4</sub>, pH 6,0)

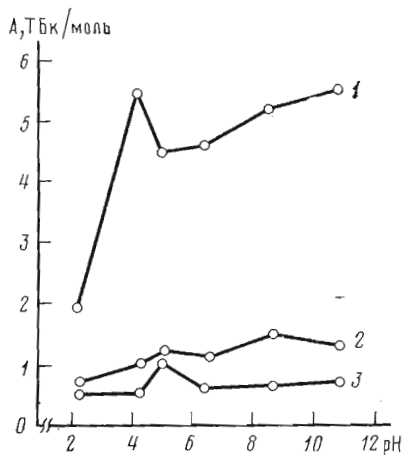


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость включения трития в Glu-His-Phe (1), His-HCl (2), Gly-His (3) от pH реакционной среды (0,1%  $^3\text{H}_2$ , 400 гПа, 5% Pd/BaSO<sub>4</sub>, 5 ч)

Сокращение: АСТН – адренокортикотропный гормон.

**Зависимость включения трития в аминокислоты от природы  
используемого катализатора \***

Катализатор	Меченая аминокислота		
	Символ	Выход, %	Активность, ГБК/моль
5% Pd/CaCO <sub>3</sub>	Phe	95	1480
	Val	100	8
5% Pd/BaSO <sub>4</sub>	Phe	95(95)**	703(1570),
	Val	100	17
	His	100	1250
5% Pd/BaSO <sub>4</sub> (Линдлар)	Phe	95	104
	Val	100	8
Pd-чернь ***	Phe	85	340
	Val	100	10
5% Ru/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Phe	50	85
5% Ru/уголь	Phe	0	0
5% Rh/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Phe	Гидрирование	0
5% Rh/уголь	Phe		

\* Условия изотопного обмена: 0,1% <sup>3</sup>H<sub>2</sub>, 400 гПа, 6 мкмоль аминокислоты, 6 ч, pH 6,5, ~29 мг катализатора.

\*\* В скобках приведены результаты с использованием 81 мг катализатора.

\*\*\* Количество катализатора 14,5 мг.

Таблица 2

**Включение трития в аминокислоты при различных значениях pH растворителя  
с использованием в качестве катализатора 5% Pd/CaCO<sub>3</sub> (А) и 5% Pd/BaSO<sub>4</sub> (Б) \***  
Приведена молярная активность в ГБК/моль

pH	Val		Phe		Lys		Ser		Cys		Glu		His
	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б	
1,0	10	20	1420	122	44	9	20	9	6	4	13	4	268
3,0	9	23	1140	118	17	26	12	10	10	1	46	39	333
5,0	9	68	1150	69	36	9	48	31	9	2	35	10	481
7,0	8	17	1480	283	34	15	54	42	8	10	28	12	444
8,0	13	89	1110	337	56	59	126	72	10	19	40	22	518
10,0	12	78	950	285	41	41	118	50	9	13	25	11	518

\* Выход меченых аминокислот 95—100%, для Cys — 80% (для Б), 85% (для А). Условия обмена: 0,1 <sup>3</sup>H<sub>2</sub>, 400 гПа, 6 ч.

**Включение трития в различные**

Соединение **	Выход, %	Молярная активность, ГБК/моль	Распределение активности, %		
			Ala	Glu	
GlcNAcβ1→4MurNAc-D-Ala-D-Glu-NH <sub>2</sub> (I)	90	7,9	65	30	
GlcNAcβ1→4MurNAc-Ala (II)	85	2,4	95		
GlcNAcβ1→4MurNAc-Ala-D-Gly (III)	90	18,1	44	50	
Trp-Ala-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu (IV)	75	10,7	40	10	
Брадикинин ***	85	32,2			
His	100	60			
His-Leu (V)	95	28			
<Glu-His-Pro-NH <sub>2</sub> (VI)	95	370	Не определяли		
Glu-His-Phe (VII)	95	272		6	
Met-Glu-His-Phe (VIII)	80	3,7		3	
Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (IX)	95	19		3	

\* Условия изотопного обмена: 185 ГБК 100% <sup>3</sup>H<sub>2</sub>, 400 гПа, 6 ч, 5% Pd/BaSO<sub>4</sub>, pH 8,6, отношение

\*\* Конфигурационный символ L-аминокислот опущен. Углевод-пептидные связи в соедине

\*\*\* Реакция в метаноле.

ния и природы катализатора. Ароматические аминокислоты имеют довольно высокую активность, что объясняется легкостью обмена бензильных атомов водорода [8]. При этом обмен не сопровождается рацемизацией, что было подтверждено анализом с применением лигандообменной хроматографии на асимметрических сорбентах, заряженных ионами  $\text{Cu}^{2+}$  [12]. Использование родиевых и рутениевых катализаторов привело к полному или частичному гидрированию бензольного ядра фенилаланина. Изменение соотношения вещество — катализатор в сторону увеличения количества катализатора сопровождается незначительным ростом активности аминокислоты. При сравнении данных, полученных для валина и фенилаланина, видно, что для алифатических аминокислот предпочтительнее использование в качестве катализатора палладия на сульфате бария, в случае ароматических аминокислот лучшие результаты дает палладий, нанесенный на карбонат кальция. Эти два катализатора и были выбраны для дальнейших исследований условий реакции изотопного обмена.

Для определения оптимального времени реакции изотопного обмена изучали кинетику включения трития в аминокислоты (рис. 1). Максимальная молярная активность достигается для лизина за  $\sim 2$  ч, для валина за  $\sim 3$  ч, а для фенилаланина за  $\sim 9$  ч. В дальнейших исследованиях изотопный обмен проводили в течение 6 ч.

Данные табл. 2 и рис. 2 показывают зависимость включения метки в аминокислоты от значения pH растворителя (0,1 М фосфатный буфер). Для большинства аминокислот имеется два максимума включения в кислот и щелочной области, причем для кислых аминокислот большее включение наблюдается в кислой области, а для основных — в щелочной (см. табл. 2).

Достигнутая степень радиоактивности аминокислот сильно зависит от их природы. Наибольшее включение трития наблюдается в фенилаланин и гистидин (табл. 2, рис. 2). Известно, что если у фенилаланина обмениваются бензильные водороды, то в гистидине тритий включается в основном во 2-е и 5-е положения имидазольного ядра [13].

Мы показали, что включение в этих условиях трития в пептиды, содержащие гистидин, зависит от природы соседних аминокислотных остатков, что, вероятно, связано с координированием имидазольного цикла на поверхности катализатора. Активность гистидинового фрагмента возрастает при наличии рядом с гистидином глутаминовой или пироглутаминовой кислоты. Аналогичные результаты были получены при использовании 100%-ного трития (табл. 3). Основная радиоактивность в этих пептидах приходится на гистидин, причем активность АСТН(5-7)-пептида (VII) примерно в 10 раз выше, чем для гистидиллейцина (V), а активность пироглутамилсодержащего пептида (VI) еще выше.

Таблица 3

пептиды и гликопептиды \*

Распределение активности, %							
Ser	Gly	Asp	Arg	Pro	Phe	Met	His
15 27	10 3	25	16	8	46		95
		Не определяли				49	75
	1			6	16	1	80
					42		78

нис соединение — катализатор 1 : 2 моль/моль.  
 ниях (I) — (III) амидные, через  $\text{COOH}$ -группу мурамовой кислоты.

Метод изотопного обмена со 100% газообразным тритием в применении к метионину позволил получить [<sup>3</sup>H]метионин с выходом 23% и молярной радиоактивностью 20 ТБк/моль. Рацемизация при изотопном обмене здесь также не наблюдалась.

Результаты по применению разработанного метода на ряде пептидов и гликопептидов приведены в табл. 3. Для гликопептидов достигнутый уровень активности зависит от состава и изменяется от 2,4 до 18,1 ТБк/моль. Тритиевая метка включается в основном в аминокислотные остатки. Содержащие гистидин пептиды (VII) — (IX) (фрагменты АСТН) имеют молярную активность в диапазоне 3,7—272 ТБк/моль. Низкая степень включения трития в пептиды (VIII) и (IX) объясняется, вероятно, наличием в них остатка метионина, который отравляет катализатор. Основная доля трития включается в остаток гистидина. Анализ аминокислот, выделенных после кислотного гидролиза меченых соединений (6 н. HCl, 106° С, 48 ч), с помощью лигандообменной хроматографии по методу [12] показал отсутствие рацемизации.

### Экспериментальная часть

В работе использовали *L*-аминокислоты (Sigma, США). Гликопептиды (I) — (III), синтезированные по методике [14], предоставлены лабораторией химии пептидов ИВХ АН СССР. Брاديкинин и пептиды (IV) и (VI) — производства Serva (США). Фрагменты АСТН — пептиды (V), (VII) — (IX) синтезированы по методике [15].

Для ТСХ использовали пластинки с *F*-целлюлозой (Merck, ФРГ) и Silufol UV-254 (ЧССР) и системы растворителей: изобутанол — ацетон — 12% аммиак, 15:9:9 (А) и изопропанол — вода — муравьиная кислота, 20:5:1 (Б).

Радиоактивность препаратов измеряли на сцинтилляционном счетчике РЖС-20 с эффективностью регистрации β-излучения ~30% в диоксановом сцинтилляторе [16]. Для определения радиохимической чистоты препаратов хроматограмму, проявленную в системе А или Б, детектировали на сканирующем счетчике, изготовленном в лаборатории ИМГ АН СССР.

Реакцию гетерогенного каталитического изотопного обмена с низкопроцентным тритием проводили на установке, описанной в работе [17]. Для реакции применяли специальную гребенку с семью ампулами. В ампулу помещали по 6,8 мкмоль аминокислоты (пептида или гликопептида) в 0,1 М фосфатном буферном растворе (0,2 мл) и по ~29 мг катализатора (соотношение вещество — катализатор 1:2 моль/моль). Ампулу с раствором замораживали в жидком азоте, вакуумировали до давления  $1 \cdot 10^{-3}$  гПа и заполняли газообразным 0,1% тритием до давления 400 гПа. Реакцию проводили при 20° С с перемешиванием.

По окончании реакции тритий удаляли, катализатор отфильтровывали, промывали 0,1 н. водным раствором аммиака (2×1 мл). Фильтрат упаривали и остаток растворяли в 0,3 мл воды.

Реакцию изотопного обмена со 100% тритием проводили на установке [18] по вышеописанной методике. После упаривания фильтрата остаток растворяли в 50 мл воды и упаривали досуха. Последнюю операцию повторяли дважды до полного удаления лабильного трития.

Выделение меченых соединений. Аминокислоты и пептиды (кроме отмеченных ниже) выделяли с использованием ТСХ на силуфоле UV-254 в системе А. Для очистки меченого нонапептида (IV) применяли ионообменную хроматографию на DEAE-целлюлозе (колонка 1,2×250 см) с элюированием в градиенте концентрации ацетата аммония 0,05—0,5 М. Скорость потока 16 мл/ч. Фракции, содержащие продукт, объединяли, упаривали досуха. Остаток растворяли в 20% водном этаноле.

Для очистки [<sup>3</sup>H]брاديкинина использовали горизонтальный электрофорез на бумаге Wathman 3 MM (1000 В, 33 В/см, 1 ч). Зону хроматограммы, соответствующую продукту, отделяли и пептид элюировали метанолом.

Очистку меченых гликопептидов проводили с использованием ионообменной хроматографии на колонке (9×230 мм) с даэксом 50×8 (H<sup>+</sup>) с элюцией водой при скорости потока 44 мл/ч. Фракции, содержащие гликопептид, объединяли, упаривали до 1 мл и хроматографировали на колонке (12×250 мм) с даэксом 2×8 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>). Элюцию осуществляли в градиенте концентрации CH<sub>3</sub>COOH (0,05–0,35 н.). Скорость потока 56 мл/ч. Фракции, содержащие продукт, объединяли, упаривали до суха, остаток растворяли в 10 мл 20% водного этанола.

Полученные <sup>3</sup>H-соединения гидролизovali 6 н. HCl. Аминокислоты разделяли с помощью двумерной ТСХ на пластинках с F-целлюлозой (1 — система А, 2 — система Б) и анализировали, определяя радиоактивность и степень рацемизации.

При определении радиохимической чистоты препаратов не менее 95% радиоактивности содержалось в зонах, соответствующих по хроматографической подвижности исходным соединениям. Полученные препараты, меченные тритием, хранились при 5° С в 20% водном этаноле.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Morgat J. L., Hung L. T., Fromageot P.* Biochim. et biophys. acta, 1970, v. 207, № 2, p. 374–376.
2. *Eberle A., Hubscher W., Schwyzer R.* Helv. chim. acta, 1977, B. 60, № 8, S. 2895–2898.
3. *Brundish D. E., Wade R. J.* Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1973, v. 23, p. 2875–2879.
4. *Петренко Б. В., Золотарев Ю. А., Мясоедов Н. Ф., Беспалова Ж. Д., Молокоедов А. С., Ярыгин К. Н.* Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 12, с. 1615–1619.
5. *Brundish D. E., Wade R. J.* Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1976, v. 20, p. 2186–2189.
6. *Керн Д., Теллаи Н., Мэзэ П.* В кн.: Органические соединения, меченные радиоактивными изотопами. Прага, 1977, с. 89–92.
7. *Evans E. A.* Tritium and its compounds. London: Butterworths, 1974, p. 291–310.
8. *Evans E. A.* Tritium and its compounds. London: Butterworths, 1974, p. 310–316.
9. *Noll S., Kiessling M., Heise K.-H.* Isotopenpraxis, 1977, B. 13, № 9, S. 324–327.
10. *Шевченко В. П., Мясоедов Н. Ф., Волгин Ю. В., Бергельсон Л. Д.* Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 9, с. 1338–1345.
11. *Evans E. A., Sheppard H. C., Turner J. C., Warrell D. C.* J. Label. Comp., 1974, v. 10, № 4, p. 569–587.
12. *Zolotarev Yu. A., Myasoedov N. F., Penkina V. I., Dostovalov I. N., Petrenik O. V., Davankov V. A.* J. Chromatogr., 1981, v. 207, № 2, p. 231–236.
13. *Levine-Pinto H., Pradelles P., Morgat J. L., Fromageot P.* J. Label. Comp. Radiopharm., 1980, v. 17, № 2, p. 231–245.
14. *Ростовцева Л. П., Андропова Т. М., Малькова В. П., Сорокина Н. Б., Иванос В. Т.* Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 12, с. 1843–1858.
15. *Пономарева-Степная М. А., Алфеева Л. Ю., Максимова Л. А., Незавибатько В. П., Каменский А. А., Антонова Л. В., Ашмарин П. П.* Хим.-фармацевт. ж., 1981, № 10, с. 37–42.
16. *Kinard F. E.* Rev. Sci. Instrum., 1957, v. 28, № 3, p. 293–295.
17. *Шевченко В. П., Мясоедов Н. Ф., Бергельсон Л. Д.* Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 3, с. 730–734.
18. *Михайлов К. С., Лавров О. В., Мясоедов Н. Ф.* В кн.: Органические соединения, меченные радиоактивными изотопами. Прага, 1977, с. 253–258.

Поступила в редакцию 25.I.1983

После доработки 16.III.1983

#### LABELLING OF AMINO ACIDS AND PEPTIDES IN SOLUTION BY HETEROGENEOUS ISOTOPIC EXCHANGE WITH GASEOUS TRITIUM

PETRENIC B. V., ZOLOTAREV Yu. A., MYASOEDOV N. F.

*Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The reaction of heterogeneous isotopic exchange with gaseous tritium has been used for labelling amino acids, peptides and glycopeptides on palladium, rhodium and ruthenium catalysts. Data are presented on the effects of the amino acid structure, the chosen catalyst, pH and duration of the reaction upon the incorporation of radioactivity into amino acids. The palladium catalysts have proved to be the most effective. The procedure is described for obtaining L-[<sup>3</sup>H]methionine with a molar activity of 20 TBq/mol. In glycopeptides, the label is predominantly incorporated in the amino acid residues. The exchange occurs most readily for histidine and phenylalanine, either free or in the respective peptides. The isotopic exchange in peptides does not involve racemization. The procedure is described for obtaining ACTH (5–7) with a molar activity of 272 TBq/mol.