



УДК 577.112.6:577.152.344'17

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ПАПАИНА  
В СИНТЕЗЕ ПЕПТИДОВ

Митин Ю. В., Огий С. А. \*, Тертых В. А. \*

*Институт белка Академии наук СССР, Пушкино Московской обл.;**\* Отделение химии поверхности Института физической химии  
им. Л. В. Писаржевского Академии наук УССР, Киев*

Иммобилизованный на кремнеземе папаин использовали для синтеза пептидов. На примере синтеза модельного трипептида бензоилаланил-валил-глицина изучено влияние на выход конечного продукта рН, температуры, количества иммобилизованного фермента, концентрации реагентов. Максимальные выходы (~50%) были получены в области рН 8–9,5. В условиях синтеза вторичный гидролиз конечного продукта не наблюдался.

Специфичность ферментов, высокая каталитическая активность делает их полезными в тонком органическом синтезе [1]. Особый интерес в последнее время вызывает синтез пептидов, катализируемый протеиназами [2–7], что объясняется рядом преимуществ такого подхода перед химическим синтезом. Использование ферментов не требует защиты боковых функциональных групп аминокислот, позволяет проводить синтез в мягких условиях, получать оптически чистые продукты.

Используемый в ферментативном синтезе «равновесный» подход предполагает смещение равновесия реакции, катализируемой ферментом, в сторону образования пептидной связи [1]. Это может достигаться подбором условий, при которых продукт выпадает в осадок. Таким путем были получены некоторые биологически активные пептиды [5, 7, 8]. При этом применялись специальные защитные группы, понижающие растворимость синтезируемого пептида в воде. Вместе с тем требование низкой растворимости конечного продукта ограничивает применение ферментов для синтеза пептидов. Добавление органического растворителя или использование двухфазной системы (вода — не смешивающийся с водой органический растворитель) также может приводить к смещению равновесия ферментативной реакции, что позволяет получать пептиды с хорошим выходом [1, 9, 10]. Однако прибавление органического растворителя может неблагоприятно сказаться на активности и специфичности фермента [1, 10, 11].

Так называемый метод кинетического контроля дает возможность проводить синтез пептидов даже в случае образования растворимого конечного продукта [1], хотя при этом имеет место вторичный гидролиз, значительно понижающий выход пептида [2, 3].

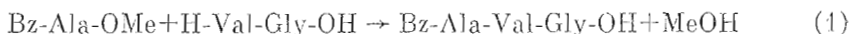
Тиоловая протеиназа — папаин особенно привлекателен для синтеза пептидов. Фермент дешев и доступен, широкая специфичность папаина позволяет использовать его для получения целого ряда пептидов. Кроме того, ранее было показано [12], что при щелочных значениях рН (8–9,5) фермент обладает ничтожной пептидазной активностью при сохранении значительной эстеразной активности. Это позволило разработать метод синтеза пептидов с использованием папаина без угрозы вторичного гидролиза, причем выход пептидов не зависит от того, будут ли конечные продукты выпадать в осадок, или они после окончания реакции остаются в растворе [6].

Представляет интерес использование в синтезе пептидов папаина, иммобилизованного на твердой матрице. Применение иммобилизованного фермента позволяет легко отделять его от исходных реагентов и продуктов реакции, многократно использовать препарат.

Свойства пептида Vz-Ala-Val-Gly-OH, синтезированного ферментативным и химическим путем

Метод синтеза	Т. пл., °С	$R_f(A)$	$R_f(B)$	Аминокислотный анализ		
				Gly	Ala	Val
Ферментативный	240–245	0,25	0,19	0,9(1)	1,04(1)	1,02(1)
Химический	239–245	0,23	0,19	0,93(1)	1,04(1)	1,02(1)

В настоящей работе на примере модельной реакции



изучен синтез пептида, катализируемый иммобилизованным папаином при щелочных значениях pH. Изучено влияние температуры, pH, концентрации реагентов и количества иммобилизованного фермента на выход конечного продукта.

Полученный в реакции (1) трипептид по свойствам идентичен химически синтезированному Vz-Ala-Val-Gly-OH (таблица).

В качестве носителя для иммобилизации папаина использовали дисперсный кремнезем, сплехром, с размером частиц 0,1–0,2 мм. Выбор носителя определялся устойчивостью к органическим растворителям, отсутствием набухания и хорошей фильтруемостью. Кроме того, свойства поверхности кремнезема достаточно хорошо изучены, что облегчает проведение иммобилизации ферментов с помощью различных органических реагентов.

В работе [6] было показано, что избыток карбоксильного компонента (по сравнению с аминокислотным компонентом) приводит к увеличению выхода, поэтому в реакции (1) использовали соотношение карбоксильного и аминокислотного компонентов 2 : 1. К сожалению, используемый в качестве карбоксильного компонента Vz-Ala-OMe плохо растворяется в воде. Для повышения его растворимости в реакционную смесь добавляли метиловый спирт (30 об. %). Синтезируемый трипептид Vz-Ala-Val-Gly-OH после окончания реакции оставался в растворе. Максимальные выходы конечного продукта составляли 44–51%.

Зависимость выхода пептида от величины pH имеет вид кривой с максимумом при pH 9 (рис. 1). Область pH 8–9,5 является оптимальной для ферментативного синтеза с использованием иммобилизованного папаина. При pH < 8 выход конечного продукта существенно уменьшается. Эти результаты согласуются с ранее полученными данными для синтеза пептидов с использованием растворимого папаина [6].

Максимальный выход в реакции (1) достигался за 40 мин (рис. 2). Дальнейшая инкубация реакционной смеси не приводит к увеличению выхода пептида. Вторичный гидролиз при pH 9 отсутствует. Даже через 2 сут концентрация пептида в реакционной смеси оставалась практически неизменной.

На рис. 3 представлена зависимость выхода продукта от количества иммобилизованного фермента. Для получения максимального выхода в условиях реакции (1) достаточно 200–250 мг иммобилизованного папаина. Дальнейшее увеличение количества фермента не приводило к увеличению выхода Vz-Ala-Val-Gly-OH.

Влияние начальных концентраций реагентов при их эквимольном соотношении на синтез Vz-Ala-Val-Gly-OH показано на рис. 4. Выход возрастает при увеличении концентраций до 0,1–0,2 М. Дальнейшее увеличение концентрации нецелесообразно.

Из температурной зависимости (рис. 5) видно, что максимальный выход трипептида достигается при 40–50° С. Иммобилизованный папаин сохраняет частичную активность при 70° С, в то время как растворимый почти полностью инактивируется при 60° С. Это можно объяснить, по-видимому, стабилизацией папаина при иммобилизации.

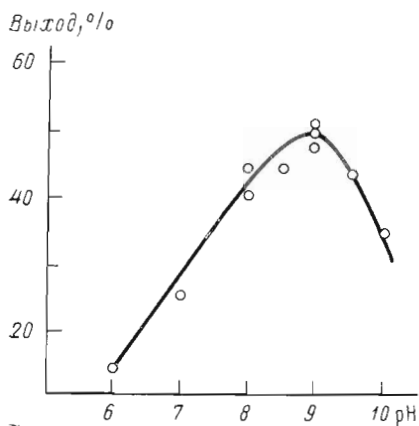


Рис. 1

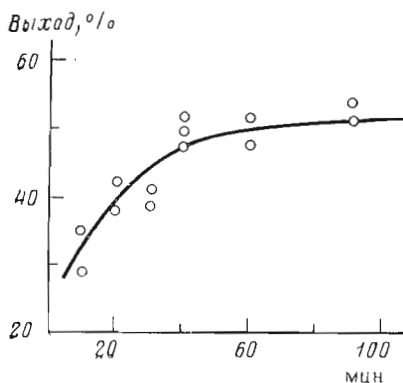


Рис. 2

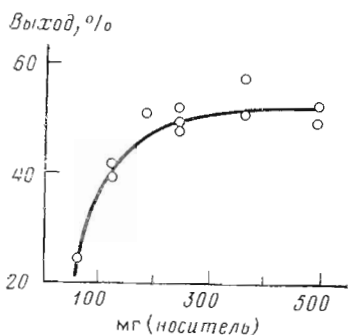


Рис. 3

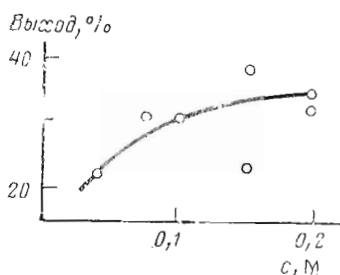


Рис. 4

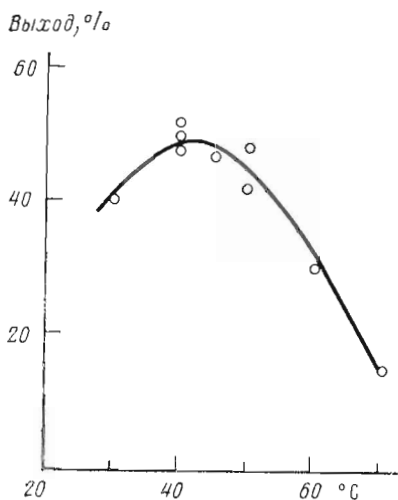


Рис. 5

Рис. 1. Зависимость выхода Bz-Ala-Val-Gly-OH от pH реакционной смеси (40 мин; 240 мг иммобилизованного папаина, 0,2 ммоль Bz-Ala-OMe, 0,4 ммоль H-Val-Gly-OH)

Рис. 2. Зависимость выхода Bz-Ala-Val-Gly-OH от времени (pH 9; остальные условия как на рис. 1)

Рис. 3. Влияние количества иммобилизованного папаина на выход Bz-Ala-Val-Gly-OH (условия как на рис. 1, pH 9)

Рис. 4. Влияние концентраций карбоксильного и аминок компонента на выход Bz-Ala-Val-Gly-OH (условия как на рис. 1, pH 9, эквимолярное соотношение карбоксильного и аминок компонентов)

Рис. 5. Температурная зависимость выхода Bz-Ala-Val-Gly-OH (условия как на рис. 1, pH 9)

Как отмечалось выше, одно из преимуществ иммобилизованного фермента перед растворимым — возможность его многократного использования. При проведении реакции (1) с одной и той же порцией иммобилизованного папаина были получены следующие выходы: 51, 50, 46 и 45%. Тенденция к некоторому уменьшению выхода, вероятно, связана с действием метанола (30 об.%) на фермент. Неблагоприятное влияние органического растворителя на фермент отмечено во многих работах [1, 10, 11]. Однако попытки проводить синтез с меньшим содержанием органического

растворителя не дали хороших результатов, так как Bz-Ala-OMe не растворялся полностью в реакционной среде, и это приводило к значительному увеличению времени реакции и уменьшению выхода продукта. Кроме того, сходимость результатов оставляла желать лучшего.

Полученные в настоящей работе зависимости выхода синтезируемого пептида от pH, температуры, количества фермента в основном совпадают с данными, полученными в работе [6] для растворимого папаина.

Таким образом, полученные результаты позволяют считать, что иммобилизованный папаин может использоваться для синтеза пептидов. Можно ожидать, что более эффективным, по-видимому, будет использование его для водорастворимых производных аминокислот и пептидов [13]. Отсутствие вторичного гидролиза в реакции (1) делает проведение синтеза в таких условиях особенно привлекательным. Это может позволить осуществлять синтез с применением колоночной техники.

### Экспериментальная часть

В работе использовали папаин (КФ 3.4.22.2; Merck, ФРГ), производные аминокислот (Reanal, Венгрия; Союзреактив), пентафторфенол отечественного производства, [ $^{14}\text{C}$ ]аланин (ЧССР). ТСХ проводили на пластике Silufol (ЧССР). Использовали следующие системы: хлороформ — метиловый спирт, 9:1 (А), хлороформ — метиловый спирт — уксусная кислота, 9:0,5:0,1 (Б). Высоковольтный электрофорез на бумаге осуществляли на приборе ОЕ-201 (Венгрия) в 30% уксусной кислоте. При этом электрофоретическую подвижность ( $E$ ) определяли относительно глицина. Для измерения радиоактивности соединений использовали сцинтилляционный счетчик LS-100С (Beckmann, США).

**Иммобилизация папаина.** В качестве носителя использовали силихром С-120 отечественного производства с размером частиц 0,1–0,2 мм. Силохром обрабатывали  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисилолом для введения аминогрупп. Поверхность аминокремнезема активировали затем хлористым диануром [14]. 1 г носителя помещали в раствор 200–250 мг фермента (5–6 мг/мл) в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 7, и инкубировали 3 ч при 20°С. Отмывку производили раствором 1 М NaCl в 0,1 М Na-фосфатном буфере (pH 7) и контролировали спектрофотометрически ( $\lambda$  280 нм). Активность полученного препарата иммобилизованного папаина, определяемая по методу [15], составляла 70–90 ед./г носителя. Препарат хранили при 4°С в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 7, с добавлением 0,2 М дитиотрепта.

**Bz-Ala-OMe (I).**  $\alpha$ -Аланин бензоилировали по методике [16] и этирифицировали, используя диазометан. Выход 80%, т. пл. 57–60°С (этилацетат — гексан),  $R_f$  0,75 (А).

**H-Val-Gly-OH (II).** 3,5 г (8,5 ммоль) пентафторфенилового эфира бензилоксикарбонилвалина [17] растворяли в 30 мл диметилформамида, добавляли 2 экв. триэтиламина и 3,3 г (8,65 ммоль) соли нитробензилowego эфира глицина с бензолсульфокислотой (III), перемешивали 2 ч при 20°С, добавляли этилацетат и промывали растворами 10%  $\text{KHSO}_4$ , водой, насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  и снова водой до нейтральных значений pH. Этилацетатный слой упаривали с добавлением диоксиана. Выход 2,9 г (74%), т. пл. 159–161°С (спирт),  $R_f$  0,84 (А).

Полученный продукт растворяли при слабом нагревании в 140 мл смеси спирт — диоксан, 3:1, и гидрировали над Pd-чернью 20 ч, фильтрат упаривали, продукт промывали эфиром. Выход 1 г (92%),  $E_{\text{ср}}$  0,82.

**Bz-Ala-Val-Gly-OH.** Ферментативный синтез. 0,4 ммоль Bz-[ $^{14}\text{C}$ ]Ala-OMe растворяли в 0,6 мл метилового спирта. Добавляли 1,4 мл 0,2 М К-фосфатного буфера, pH 6–10, содержащего 0,2 М дитиотрепт и 0,1 М EDTA, 0,2 ммоль H-Val-Gly-OH и 100–500 мг иммобилизованного папаина. Реакцию проводили в термостатирующей ячейке при 40°С. Для предотвращения деструкции носителя применяли механическую мешалку. Величину pH поддерживали постоянной, титруя реакционную смесь 4 н. КОН. После окончания реакции pH среды доводили до 3–4 добавлением 6 н. HCl.

Аликвоты (10 мкл) хроматографировали в системе В. При необходимости хроматографию повторяли. Пластинку разрезали на части и определяли распределение радиоактивности по длине пластинки. Выход рассчитывали как отношение радиоактивности пятна, соответствующего синтезируемому пептиду, к общей радиоактивности на пластинке.

*Bz-Ala-Val-Gly-OH*. Химический синтез. *Вос-Val-Gly-ONb* (IV). 3,2 г (8 ммоль) пентафторфенилового эфира Вос-валина [17] растворили в 15 мл диметилформамида, добавляли 2 экв. триэтиламина и 2,6 г (8 ммоль) соли (III), перемешивали 2 ч при 20° С, после чего растворяли в этилацетате и обрабатывали как при синтезе (II). Выход 2,38 г (72%), т. пл. 103–105° С (этанол — гексан),  $R_f$  0,74 (А).

*HCl-H-Val-Gly-ONb* (V). 2,38 г (5,76 ммоль) соединения (IV) растворяли в 3 мл диоксана и добавляли 5 мл 5 н. HCl в диоксане, выдерживали 1 ч, упаривали, остаток растирали с эфиром. Выход 1,92 г (95%), т. пл. 81–85° С,  $E_{Gly}$  0,74.

*Вос-Ala-Val-Gly-ONb* (VI). 1,9 г (5,35 ммоль) пентафторфенилового эфира Вос-аламина [17] растворили в 10 мл диметилформамида, добавляли 2 экв. триэтиламина и 1,9 г (5,5 ммоль) соединения (V), перемешивали 4 ч при 20° С, добавляли этилацетат и обрабатывали так же, как при выделении соединения (II). Выход 1,95 г (72%), т. пл. 167–169° С (этанол),  $R_f$  0,47 (А).

*Вос-Ala-Val-Gly-OH* (VII). 1,9 г (4 ммоль) соединения (VI) растворяли в этаноле с добавлением диоксана до полного растворения, гидрировали 4 ч над Pd-чернью, фильтрат упаривали, продукт промывали эфиром. Выход 1,21 г (88%), т. пл. 198–201° С,  $R_f$  0,26 (А).

*CF<sub>3</sub>COOH-H-Ala-Val-Gly-OH* (VIII). К 1,2 г (3,65 ммоль) соединения (VII) добавляли 5 мл CF<sub>3</sub>COOH, через 30 мин упаривали, остаток растирали с эфиром. Выход 1,22 г (97%),  $E_{Gly}$  0,71.

*Bz-Ala-Val-Gly-OH*. Соединение (VIII) бензоилировали по стандартной методике [16]. Свойства пептида приведены в таблице.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Martinek K., Semenov A. N. J. Appl. Biochem., 1981, v. 3, p. 93–126.
2. Marihara K., Oka T. Biochem. J., 1977, v. 163, № 3, p. 531–542.
3. Oka T., Morihara K. J. Biochem., 1978, v. 84, № 5, p. 1277–1283.
4. Oka T., Morihara K. J. Biochem., 1977, v. 82, № 4, p. 1055–1062.
5. Kullmann W. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 91, № 2, p. 693–698.
6. Mitin Yu. V., Zapevalova N. P., Gorbunova E. Yu. Int. J. Peptide and Protein Res., 1984, v. 23, № 5, p. 528–534.
7. Isowa Y., Ohmori M., Sato M., Mori K. Bull. Chem. Soc. Japan, 1977, v. 50, № 10, p. 2766–2772.
8. Kullmann W. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 17, p. 8234–8238.
9. Хмельницкий Ю. А., Мартинек К. Биоорганическая химия, 1984, т. 10, № 5, с. 626–631.
10. Köpcke A., Bullerjahn R., Jakubke H.-D. Monatsh. Chem., 1981, v. 112, p. 469–481.
11. Ingalls R. G., Squires R. G., Butler L. C. Biotechnol. and Bioeng., 1975, v. XII, p. 1627–1637.
12. Whitaker J. R., Bender M. L. J. Amer. Chem. Soc., 1965, v. 87, № 12, p. 2728–2737.
13. Митин Ю. В., Горбунова Е. Ю., Огий С. А., Куль П. Биоорганическая химия, 1985, т. 11, № 5, с. 709–710.
14. Янишпольский В. В., Тертых В. А., Любинский Г. В. Укр. биохим. журн., 1979, т. 51, № 4, с. 324–329.
15. Colovick S. P., Kaplan N. O. Methods in Enzymology. N. Y.: Acad. Press, 1970, v. XIX, p. 958–959.
16. Гринштейн Дж., Виппс М. Химия аминокислот и пептидов. М.: Мир, 1965, с. 724.
17. Kisfaludy L., Löw M., Nieki O., Szirtes T., Schön I. Liebigs Ann. Chem., 1973, p. 1421–1429.

Поступила в редакцию  
12.V.1985

#### USE OF IMMOBILIZED PAPAIN FOR PEPTIDE SYNTHESIS

MITIN Yu. V., OGGY S. A., TERTYKH V. A.\*

Institute of Protein Research, Academy of Sciences of the USSR,  
Pushchino, Moscow Region; \*Institute of Physical Chemistry,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

A thiol protease, papain, covalently bound to silica gel has been used for synthesis of peptides. The effects of pH, temperature, amount of the immobilized enzyme, and concentration of reagents was studied in a model reaction. The highest yields (44–51%) were obtained at pH 8–9.5. Secondary hydrolysis of the product was not observed in the reaction conditions.