



УДК 577.112.6+577.152.344

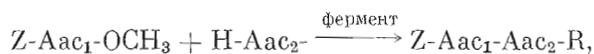
СИНТЕЗ ЛЕЙЦИН- И МЕТИОНИНЭНКЕФАЛИНА
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПАПАИНА

Запевалова Н. П., Горбунова Е. Ю., Митин Ю. В.

Институт белка Академии наук СССР, Пущино Московской обл.

Тиоловая протеиназа папаин использована для синтеза лейцин- и метионинэнкефалина. Синтез проведен в щелочной среде, когда опасность вторичного гидролиза пептидов минимальна. Исходными веществами для синтеза служили метиловые эфиры N-защищенных аминокислот. Наилучший результат при синтезе лейцин- и метионинэнкефалинов получен при конденсации с использованием папаина дипептида Woc-Tyr-Gly-OCH_3 с соответствующими трипептидами, полученными также ферментативным методом. Выход пентапептидов на последней стадии синтеза составляет 89% (лейцинэнкефалин) и 79% (метионинэнкефалин). Оба продукта реакции остаются в растворе в течение всего процесса.

В последнее время особое внимание уделяется синтезу пептидов с помощью протеолитических ферментов. Опубликован ряд работ, посвященных синтезу различных пептидов с использованием таких протеиназ, как химотрипсин, трипсин, термоллизин, папаин и др. [1–6]. Ферментативный синтез пептидов привлекает тем, что он не требует специального активирования карбоксильной группы аминокислоты и, как следствие, не нуждается в защите боковых функциональных групп. Синтез проводится в водной среде, стереоспецифичен и свободен от рацемизации. В большинстве случаев ферментативного синтеза пептидов продукт реакции подбирают таким образом, чтобы он был нерастворимым, выпадал в осадок, сдвигая тем самым равновесную ферментативную реакцию в сторону синтеза. В тех случаях, когда продукт реакции остается в растворе, процесс проводят быстро, в течение нескольких минут, и затем сразу же выделяют синтезированный пептид, чтобы избежать его вторичного гидролиза [7]. Этот так называемый «синтез в условиях кинетического контроля» [8] осуществляют, используя алкиловые эфиры N-защищенных аминокислот или пептидов в качестве карбоксильного компонента. Реакция протекает по схеме

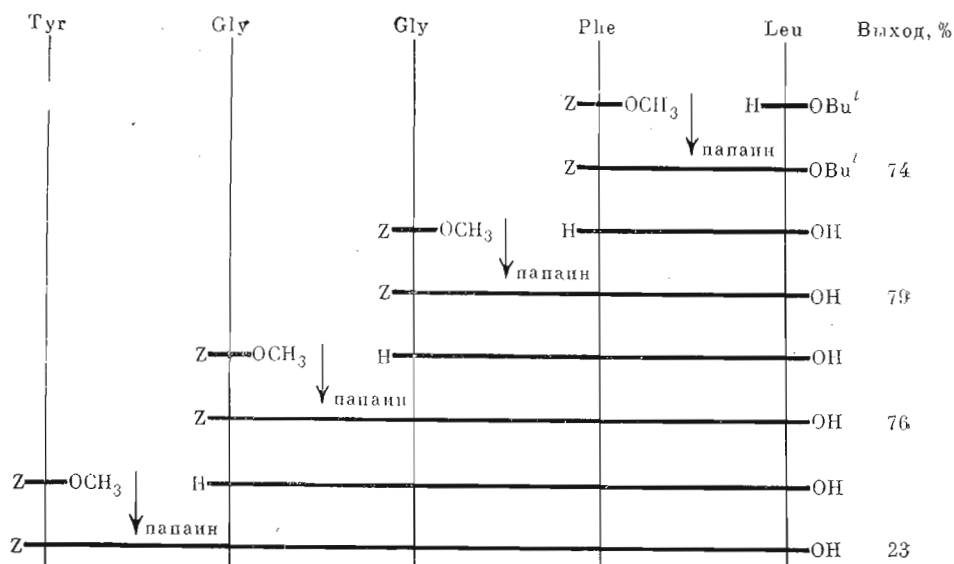


здесь Aac — аминокислотный остаток, Z — защитная группа, R — NH_2 , аминокислота или пептид.

Мы применили для синтеза пептидов тиоловую протеиназу папаин. Папаин обладает широкой специфичностью, взаимодействует с пептидными связями, образованными всеми L-аминокислотами, кроме пролина. Изучив влияние различных факторов на пептидный синтез в присутствии папаина, мы нашли, что в щелочной области (pH 8–9,5) папаин позволяет синтезировать растворимые пептиды, не вызывая вторичного гидролиза полученного пептида [9]. В настоящем сообщении мы представляем синтез энкефалина как пример использования протеолитического фермента папаина для синтеза биологически активного пептида.

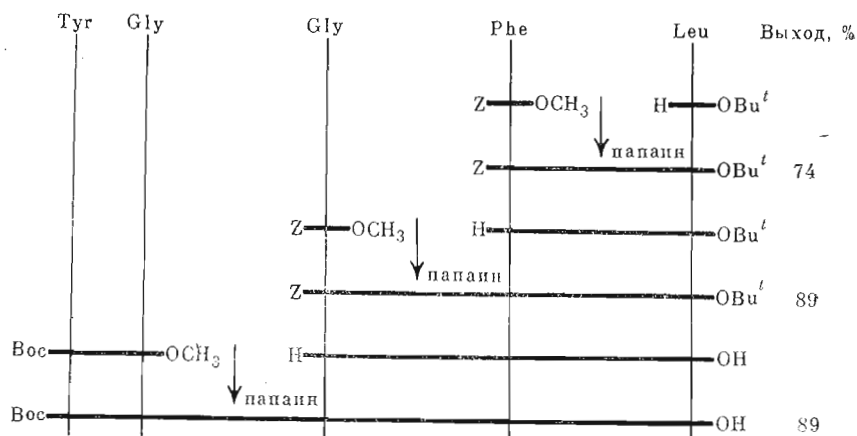
Ферментативный синтез энкефалина был описан ранее [6, 10], однако в этих работах папаин был использован ограниченно вследствие опасности вторичного гидролиза, так как синтез проводили в нейтральной среде при pH 6. Все синтезируемые пептиды подбирались нерастворимыми, для чего специально вводились гидрофобные защитные группы. Такой синтез мало чем отличается от химического.

В своей работе мы, наоборот, старались так подобрать схему синтеза, чтобы синтезируемые пептиды оставались по возможности в растворе. Такой подход к снижению ограничений, свойственных ферментативному синтезу, и сводит к минимуму число защитных групп. Мы предприняли синтез лейцинэнкефалина по схеме



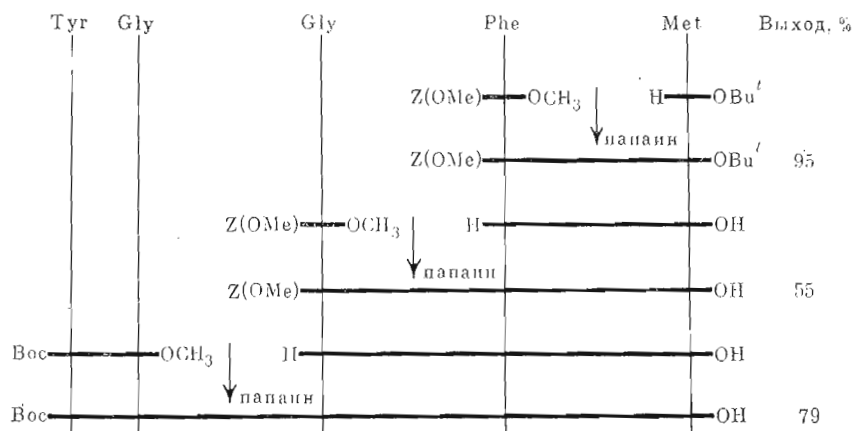
Эта схема наглядно демонстрирует принципиальную возможность ступенчатого наращивания пептидной цепи с использованием папаина на каждой стадии. Однако последняя стадия синтеза протекала неудовлетворительно вследствие очень плохой растворимости Z-Tyr-OCH₃ в фосфатном буфере, содержащем 25% метанола. По этой причине выход пентапептида оказался низким (23%). Другой недостаток этой схемы синтеза связан с трудностью отделения трипептида Z-Gly-Phe-Leu-OH от Z-Gly-OH, который получается в результате гидролиза Z-Gly-OCH₃, взятого в избытке.

Учитывая, сказанное, мы изменили схему и синтезировали пентапептид конденсацией дипептида с трипептидом.



По этой схеме с участием папаина образованы три пептидные связи. Что касается дипептида Вос-Tyr-Gly-OCH₃, то он может быть синтезирован либо химически, либо с помощью другого протеолитического фермента — химотрипсина [6].

При синтезе метионинэнкефалина целесообразно использовать *n*-метоксикарбообензоксигруппу Z(OMe) вместо карбообензоксигруппы, чтобы избежать трудностей, связанных с гидрогенолизом метионинсодержащих пептидов. Z(OMe)-защита легко удаляется ацидолизом. Синтез метионинэнкефалина провели по схеме



Описанный ранее синтез пентапептида [14] из Вос-Tyr-Gly-OH и H-Gly-Phe-Leu-N₂H₂Ph не увенчался успехом, что объяснялось недостаточно низкой растворимостью образующегося пентапептида. Для того чтобы уменьшить растворимость, автор вынужден был усилить гидрофобность пептида, введя бензильную группу в гидроксил тирозина. В нашем случае нет необходимости заботиться о том, чтобы продукт реакции выпал из раствора. Наоборот, синтезируемый пентапептид находится все время в растворе, выход пентапептидов на последней стадии синтеза достаточно высокий (79 и 89%). В этом ярко проявляется преимущество синтеза пептидов, катализируемого папаином в щелочной среде.

Результаты синтеза (табл. 1, 2) позволяют сделать вывод, что папаин можно с успехом применять для ферментативного синтеза энкефалина в растворе в щелочной среде исходя из метиловых эфиров *N*-защищенных аминокислот.

Экспериментальная часть

В работе использовали папаин (Merck, США) с уд. акт. 3,5 ед/мг, производные аминокислот (Reanal, Венгрия; Fluka, Швейцария). Хроматографию проводили на пластинках «Silufol» (ЧССР) в системах растворителей: хлороформ – метанол, 9:1 (I), хлороформ – метанол – уксусная кислота, 18:2:1 (II), хлороформ – метанол, 97:3 (III), хлороформ – метанол – уксусная кислота, 80:20:1 (IV), хлороформ – метанол – гексан – бензол, 9:4:10:5 (V). Элементный анализ делали на анализаторе Per-

Таблица 1

Пептиды, полученные с помощью папаина

Исходные соединения	рН реакции	Время реакции, мин	Продукт синтеза	Выход, %
Z-Phe-OCH ₃ +Leu-OBu ^t	9,0	120	Z-Phe-Leu-OBu ^t	74
Z-Gly-OCH ₃ +Phe-Leu-OH	8,1	60	Z-Gly-Phe-Leu-OH	79
Z-Gly-OCH ₃ +Phe-Leu-OBu ^t	9,0	60	Z-Gly-Phe-Leu-OBu ^t	89
Z-Gly-OCH ₃ +Gly-Phe-Leu	9,2	60	Z-Gly-Gly-Phe-Leu-OH	76
Вос-Tyr-Gly-OCH ₃ +Gly-Phe-Leu	9,5	60	Вос-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH	89
Z(OMe)-Phe-OCH ₃ +Met-OBu ^t	8,9	90	Z(OMe)-Phe-Met-OBu ^t	95
Z(OMe)-Gly-OCH ₃ +Phe-Met	9,5	120	Z(OMe)-Gly-Phe-Met-OH	55
Вос-Tyr-Gly-OCH ₃ +Gly-Phe-Met	9,6	30	Вос-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH	79

Свойства пептидов, полученных с помощью папаина

Пептид	Т. пл., °С	R _f (система)	[α] _D (с) в этаноле	Элементный анализ *			Аминокислотный анализ *
				С	Н	N	
Z-Phe-Leu-OBu ^t	90-92 (94-95 [12])	0,42 (V)					
Z-Gly-Phe-Leu-OBu ^t	108-112	0,88 (I)	-5,0(0,2)	63,87 (63,94)	6,61 (6,66)	8,98 (8,95)	Gly 1,09(1), Phe 1,06(1), Leu 0,86(4)
Z-Gly-Phe-Leu-OH	104-107	0,57 (I)	-8,0(0,2)				
Z-Gly-Gly-Phe-Leu-OH	87-88	0,78 (II) ***	+5,3(0,38)	61,55 (61,58)	6,61 (6,51)	10,37 (10,64)	Gly 2,22(2), Phe 0,95(1), Leu 0,82(1)
Вос-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH·H ₂ O	148-150	0,39 (I)	-1,0 ** (0,2)	58,06 (58,84)	6,69 (6,98)	9,96 (10,40)	Gly 1,90(2), Leu 0,94(1), Phe 1,22(1), Tyr 0,92(1)
Z(OMe)-Phe-Met-OBu ^t	Масло	0,48 (III)					Phe 1,10(1), Met 0,90(1)
Z(OMe)-Gly-Phe-Met-OH	165-168	0,37 (I)	-11,5 (0,2)	57,88 (58,01)	6,08 (6,04)	7,91 (8,12)	Phe 0,96(1), Met 0,88(1), Gly 1,45(1)
Вос-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH	128-129	0,23 (I) 0,74 (IV)	-2,5 ** (0,2)	56,68 (57,05)	6,53 (6,40)	10,40 (10,40)	Gly 1,96(2), Phe 1,04(1), Met 1,00(1), Tyr 1,61(1)
Вос-Tyr-Gly-OCH ₃	129-132	0,54 (I)	+1,4 (2,0)	57,84 (57,94)	7,08 (6,87)	7,86 (7,95)	

* В скобках приведены рассчитанные величины.

** Измерено при 579 нм.

*** Хроматография проводилась на пластинках с Al₂O₃ (Merck).

kin — Elmer 240 В (США), удельное вращение измеряли на спектрополю-
риметре Perkin — Elmer 141 М (США), аминокислотный анализ проводи-
ли на анализаторе Durrum D 500 (США). Буферный раствор для синтеза
пептидов содержал 0,2 М KH_2PO_4 , 0,2 М EDTA, 0,2 М дитиотреит, рН уста-
навливали добавлением 0,2 М КОН.

Синтез пептидов с помощью папаина. В 2 мл буферного раствора вно-
сили 0,2 ммоль аминокомпонента, 0,2–0,6 ммоль метилового эфира карбо-
бензоксиаминокислоты (карбоксильный компонент), 0,2–0,4 мл метанола
и доводили рН до требуемого значения. Затем при интенсивном размещи-
вании полученного раствора (эмульсии, суспензии) добавляли 10 мг па-
паина. Реакцию вели обычно при комнатной температуре, за ходом реак-
ции следили с помощью тонкослойной хроматографии. После исчезновения
исходного эфира карбобензоксиаминокислоты раствор подкисляли до
~рН 2, экстрагировали этилацетатом, органический слой промывали
водой. В том случае, когда аминокомпонентом служил *трет*-бутиловый
эфир аминокислоты или пептида, органический слой промывали также
насыщенным раствором бикарбоната натрия. После удаления растворителя
и высушивания полученного пептида его кристаллизовали из подходящего
растворителя.

Химический синтез исходных эфиров. Z-Gly-OCH₃, Z-Phe-OCH₃, Z-Tyr-
OCH₃ получены по описанной в литературе методике [13, 14]. Z(OMe)-
Phe-OCH₃, Z(OMe)-Gly-OCH₃ синтезированы из Z(OMe)N₃ и метиловых
эфиров фенилаланина и глицина по аналогии с описанной методикой [15].

ЛИТЕРАТУРА

1. Morigara K., Oka T. Biochem. J., 1977, v. 163, № 3, p. 531–542.
2. Oka T., Morigara K. J. Biochem., 1977, v. 82, № 4, p. 1055–1062.
3. Isowa Y., Ohmori M., Sato M., Mori K. Bull. Chem. Soc. Jap., 1977, v. 50, № 10, p. 2766–2772.
4. Widmer F., Johansen J. T. Carlsberg Res. Communs, 1979, v. 44, № 1, p. 37–46.
5. Kuhl P., Könnecke A., Döring G., Daumer H., Jakubke H.-D. Tetrahedron Lett., 1980, v. 21, № 10, p. 893–896.
6. Kullmann W. J. Biol. Chem., 1981, v. 256, № 3, p. 1301–1304.
7. Oka T., Morigara K. J. Biochem., 1978, v. 84, № 5, p. 1277–1283.
8. Fastrez J., Fersht A. R. Biochemistry, 1973, v. 12, № 11, p. 2025–2034.
9. Mitin Yu. V., Zapevalova N. P., Gorbunova E. Yu. Int. J. Peptide and Protein Res., 1984, v. 23, № 5, p. 528–534.
10. Kullmann W. Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1979, v. 91, № 2, p. 693–698.
11. Kullmann W. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 17, p. 8234–8238.
12. Wang K.-T., Li C. H. J. Org. Chem., 1971, v. 36, № 17, p. 2419–2422.
13. Weygand F., Steglich W., Oeltermeyer W. Chem. Ber., 1970, v. 103, № 6, p. 1655–1660.
14. Kinoshita M., Klostermeyer H. Justus Liebig's Ann. Chem., 1966, v. 696, p. 226–231.
15. Schröder E., Klieger E. Justus Liebig's Ann. Chem., 1964, v. 673, p. 196–207.

Поступила в редакцию
20.XII.1984

SYNTHESIS OF LEUCINE- AND METHIONINEENKEPHALIN USING PAPAINE

ZAPEVALOVA N. P., GORBUNOVA E. Yu., MITIN Yu. V.

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

Thiol protease papain has been used for synthesis of leucine-and methionineen-
kephalin from methyl esters of N-protected amino acids. The synthesis was carried
out in basic medium, minimizing the hazard of the secondary peptide hydrolysis. The
reaction products remain in solution during the whole process. The yields at the final
stage of the synthesis were 89% (leucineenkephalin) and 79% (methionineenkephalin).