



УДК 577.112.6:577.152.342'44

КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ ТЕРМОЛИЗИНОМ СИНТЕЗ МЕТИЛОВЫХ ЭФИРОВ АЦИЛИРОВАННЫХ ПЕПТИДОВ В КОНЦЕНТРИРОВАННЫХ ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Люблинская Л. А., Вейцова С. Е., Степанов В. М.

Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Описано использование термолизина для синтеза метиловых эфиров ацилированных ди- и трипептидов путем конденсации бензилоксикарбонильных производных аланил-аланина, аланина и аспарагиновой кислоты или бензоилглицил-глицина с хлоргидратами метиловых эфиров лейцина или фенилаланина в водных растворах при концентрациях реагентов 1–5 М. Выходы продуктов реакции составили 55–91%. С выходом 85% получен предшественник аспартама – метиловый эфир бензилоксикарбониласпартил-фенилаланина.

Термолизин (КФ 3.4.24.4) – металлопротеиназа *Bacillus thermoproteolyticus* используется как катализатор образования пептидной связи [1–3]. Общая схема синтеза с участием этого фермента такова:



где X и Y – защитные группы, А и В – аминокислотные или пептидные остатки.

В силу специфичности термолизина в положении В образующегося пептида должен находиться остаток гидрофобной аминокислоты – фенилаланина, лейцина, изолейцина, валина. Сдвиг равновесия в этой реакции достигается за счет выпадения продукта в осадок, поэтому в качестве X и Y выбирают, как правило, гидрофобные защитные группы. Действительно, хорошие выходы дают реакции между такими производными, в которых X – бензилоксикарбонильная, бензоильная, *трет*-бутилоксикарбонильная группы, а Y – амидная, фенилгидразидная, *п*-нитроанилидная, *трет*-бутилоксигруппы.

Использование гидрофобных соединений требует присутствия в реакционной смеси значительных количеств органического растворителя, что снижает активность фермента.

Мы нашли, что при катализируемом термолизином синтезе метиловых эфиров некоторых ацилированных пептидов можно добиться высоких концентраций исходных реагентов в реакционной среде, не прибегая к добавлению органических растворителей. С этой целью ацилированная аминокислота или пептид растворяется в эквимольном количестве концентрированной (1,5–6 н.) гидроокиси натрия. К полученному таким образом концентрированному раствору натриевой соли карбоксильного компонента прибавляется эквимольное количество аминоконпонента – хлоргидрата метилового эфира лейцина или фенилаланина, что обеспечивает рН, близкий к нейтральному, – условие, необходимое для успешного действия термолизина.

Буферная емкость, создаваемая высокими концентрациями аминокислот и карбоксильного компонента, столь велика, что отпадает необходимость использования дополнительных буферных смесей. После установления рН 6,5–6,8 прибавлением необходимого количества 6 н. NaOH в реакционную смесь вводится 20–30 нмоль термолизина на 1 ммоль исходных

Использованы сокращения аминокислот и их производных в соответствии с правилами, предложенными Комиссией по биохимической номенклатуре при IUPAC–IUB. Все аминокислоты, кроме указанных особо, L-ряда.

Синтез метиловых эфиров ацилированных пептидов, катализируемый термолизином

Исходные вещества		Содержание воды		Концентрация исходных соединений, М	Термолизин		Выход, %
амино- и карбоксильный компоненты	количество, ммоль	мл	ммоль		мг	нмоль *	
Z-Ala-Ala-OH	3	2100	120	1-1,5	4	42	91
H-Phe-OMe	3			1-1,5			
Z-Ala-Ala-OH	1	700	40	1-1,5	2	21	83
H-Leu-OMe	1			1-1,5			
Bz-Gly-Gly-OH	1	270	15	3,5	3	31	55
H-Phe-OMe	1			3,5			
Z-Ala-OH	1	180	10	5,0	3	31	70
H-Phe-OMe	1			5,0			
Z-Asp-OH	2	800	44	2,5	14	147	85
H-Phe-OMe	4			5,0			
Z-Asp-OH	2	800	44	2,5	14	147	80
D,L-Phe-OMe	4			5,0			

* Содержание фермента оценено, учитывая, что $A_{230}=1,7$ для 0,1%-ного раствора чистого термолизина [4] и $A_{230}=0,65$ для 0,1%-ного раствора используемого нами препарата термолизина (Serva, ФРГ).

Таблица 2

Зависимость выхода продукта от концентрации исходных реагентов в катализируемом термолизином синтезе бензилоксикарбониласпартама *

Исходные реагенты				Содержание воды		Выход, %
Z-Asp-OH		H-Phe-OMe		мл	ммоль	
количество, ммоль	концентрация, М	количество, ммоль	концентрация, М			
1	2,5	2	5,0	0,4	22	85
1	1,75	2	3,5	0,6	33	64
1	0,8	2	1,6	1,2	66	20

* Содержание термолизина в реакционной смеси 7 мг (74 нмоль).

соединений. Реакция протекает при комнатной температуре, причем продукт синтеза выпадает в осадок.

Таким образом нами был получен ряд метиловых эфиров ацилированных пептидов (табл. 1). Надо отметить, что для столь высоких концентраций исходных веществ трудно оперировать понятием «молярность». Ввиду этого мы рассчитали точное содержание воды в реакционной смеси и, соответственно, приводим в табл. 1 лишь приблизительные молярные концентрации исходных реагентов.

Как видно из табл. 1, содержание воды в реакционной смеси удалось свести к минимуму, и таким образом была достигнута концентрация исходных соединений порядка 1-5 М. Оптимальное содержание воды и исходных реагентов в реакционной среде подбиралось в зависимости от растворимости карбоксильного компонента. Так, синтезы с участием бензилоксикарбонильных производных аланина и аспарагиновой кислоты проводились при концентрациях исходных соединений порядка 2-5 М. Использование же в качестве карбоксильного компонента менее растворимого бензилоксикарбонилаланил-аланина повлекло за собой увеличение содержания воды в реакционной смеси, и концентрации исходных веществ составили 1-1,5 М.

Возможность резкого снижения содержания воды в реакционной среде обуславливается тем, что карбоксильный компонент вводится в реакцию в виде его натриевой соли, обычно хорошо растворимой в воде.

Повышение концентраций вступающих в синтез соединений не обязательно ведет к значительному увеличению выхода. Так, по методике Изова и Ичикава [5] при синтезе метиловых эфиров бензилоксикарбонилдипептидов концентрации исходных соединений составляли 0,1 М, а содержание воды в реакционной смеси — ~560 ммоль на 1 ммоль исходных реагентов (ср. табл. 1), дипептид Z-Ala-Phe-OMe был получен с выходом 61%. По разработанной нами методике достигается 70%-ный выход. Однако, как мы уже отмечали, предлагаемый нами подход позволяет отказаться от использования дополнительных буферов, что упрощает выделение продуктов реакции, и, главное, применять гораздо меньшие количества термолиза, чем в работах [5, 6], где использовали 570 ммоль фермента на 1 ммоль исходных соединений. Как видно из табл. 1, количество катализирующего синтез термолизина обычно можно снизить до 20—30 ммоль на 1 ммоль исходных реагентов.

Одним из преимуществ ферментативного синтеза пептидов является его региоселективность, которая позволяет не блокировать боковые функциональные группы участвующих в образовании пептидной связи аминокислотных остатков. В синтезе метилового эфира бензилоксикарбониласпартил-фенилаланина, являющегося предшественником аспартама, региоспецифичность термолизина позволяет оставить незащищенной β -карбоксильную группу остатка аспарагиновой кислоты. В синтезе используются 2 эквивалента метилового эфира фенилаланина, один из которых расходуется на образование соли с синтезируемым дипептидом по β -карбоксильной группе аспарагиновой кислоты. Именно это соединение, обладая незначительной растворимостью в воде, выпадает в осадок в избранных условиях реакции. После разложения соли в ледяной уксусной кислоте и осаждения бензилоксикарбониласпартама водой из концентрированного уксуснокислого раствора выход продукта составил 85%.

Впервые ферментативный синтез бензилоксикарбониласпартама по аналогичной схеме был описан Изова и сотр. [6]. Авторы сообщают, что получали продукт с выходом до 96% в водной среде (pH 6–8) при концентрациях исходных реагентов 0,2 М (Z-Asp-OH) и 0,4 М (HCl·H-Phe-OMe). Наши попытки воспроизвести эту методику оказались неудачными. Более того, при подборе оптимальных условий синтеза бензилоксикарбониласпартама выявилась четкая зависимость выхода целевого продукта от концентрации исходных реагентов, что демонстрирует таблица 2: уменьшение концентрации исходных реагентов в 1,5 раза ведет к ощутимому, а в 3 раза — к резкому снижению выхода.

В свете этих данных интересна хорошо воспроизводимая методика получения бензилоксикарбониласпартама, предложенная Петковым и Стойневой [7], которые проводили синтез в водном растворе (pH 6,8), используя 0,2 М аспарагиновую кислоту, но значительный избыток метилового эфира фенилаланина — его концентрация составляла 0,8 М.

Участие в синтезе бензилоксикарбониласпартама 2 эквивалентов аминок компонента в сочетании со стереоспецифичностью термолизина делает возможным использование в реакции метилового эфира DL-фенилаланина [6]. При этом L-производное непосредственно участвует в образовании пептидной связи, а H-D-Phe-OMe расходуется на образование соли с синтезирующимся дипептидом. После разложения аддукта в ледяной уксусной кислоте выход оптически чистого Z-Asp-Phe-OMe составил 80% (табл. 1).

Экспериментальная часть

В работе использован кристаллический термолизин фирмы Serva (ФРГ). Исходные соединения — Z-Asp-OH, Z-Ala-OH, Z-Ala-Ala-OH, HCl·H-Phe-OMe, Bz-Gly-Gly-OH получены нами по описанным методам. HCl·H-Leu-OMe — препарат фирмы Reanal (ВНР).

Гомогенность полученных соединений контролировали с помощью ТСХ на пластинках марки Silufol в системе *n*-бутанол — пиридин — вода — уксусная кислота

Физико-химические характеристики полученных соединений

Соединение	$[\alpha]_D^{20}$ (с 1, DMF), град*	Т. пл., °С	Аминокислотный состав	n_f
Z-Ala-Ala-Phe-OMe	+11	171	Ala : Phe 1,94 : 1,06	0,86
Z-Ala-Ala-Leu-OMe	+13	185	Ala : Leu 1,90 : 1,10	0,81
Z-Ala-Phe-OMe	-9	128	Ala : Phe 0,93 : 1,07	0,81
Bz-Gly-Gly-Phe-OMe	+6	112	Gly : Phe 1,92 : 1,08	0,80
Z-Asp-Phe-OMe	-22	127	Asp : Phe 1,00 : 1,04	0,66

* Измерение угла вращения выполнено на спектрополяриметре марки Hilger (Англия).

(10:15:12:3), вещества обнаруживали нишгидрином или Cl_2/KI . Кислотный гидролиз проводили в стандартных условиях (5,7 н. HCl, 110°С, 24 ч), гидролизаты анализировали на автоматическом аминокислотном анализаторе BC-200 (ФРГ) или Biotronic LC 5001 (ФРГ).

Z-Ala-Ala-Phe-OMe. К раствору 784 мг (3 ммоль) Z-Ala-Ala-OH в 2 мл (3 ммоль) 1,5 н. NaOH прибавляли 645 мг (3 ммоль) HCl·H-Phe-OMe и, после полного растворения, 4 мг термолизина. Реакционную смесь перемешивали при 20°С. Через 10–15 мин начинал выпадать осадок, который в течение 1 ч заполнял весь объем. Через 4–4,5 ч осадок переносили на фильтр и промывали 0,5 н. лимонной кислотой, водой, 0,5 М NaHCO₃, снова водой. Продукт высушивали в вакуум-эксикаторе над NaOH. Выход 1,3 г (91%).

Z-Ala-Phe-OMe. К раствору 223 мг (1 ммоль) Z-Ala-OH в 0,15 мл (1 ммоль) 6 н. NaOH прибавляли 215 мг (1 ммоль) HCl·H-Phe-OMe и, после полного растворения, 3 мг термолизина. Реакционную смесь перемешивали при 20°С в течение 1 сут, после чего переносили на фильтр и промывали 0,1 н. лимонной кислотой, водой, 0,5 М NaHCO₃, снова водой. Продукт высушивали в вакууме над NaOH. Выход 290 мг (70%).

Z-Asp-Phe-OMe. К раствору 532 мг (2 ммоль) Z-Asp-OH в 0,66 мл (4 ммоль) 6 н. NaOH прибавляли 860 мг (4 ммоль) HCl·H-Phe-OMe. После полного растворения в смесь добавляли 14 мг термолизина и перемешивали при 20°С. В течение 1–2 ч выпадал осадок, который выдерживали при этой температуре 24 ч, после чего переносили на фильтр и промывали холодной водой. Осадок высушивали в вакууме над NaOH. Выход 1,03 г (85%).

1 г полученного Z-Asp-Phe-OMe·H-Phe-OMe перемешивали с 3,5 мл ледяной уксусной кислоты до полного растворения. К раствору при охлаждении на ледяной бане прибавляли 17–18 мл воды. Выпавший осадок выдерживали 4 ч при 4°С, затем переносили на фильтр и промывали ледяной водой. Осадок высушивали в вакууме над NaOH. Выход 600 мг (85%).

Остальные пептиды получены аналогично (табл. 3).

ЛИТЕРАТУРА

1. Oka T., Morihara K. J. Biochem., 1980, v. 88, № 3, p. 807–813.
2. Fruton J. Carlsberg Res. Commun., 1984, v. 49, № 1, p. 231–239.
3. Люблинская Л. А., Воюшина Т. Л., Степанов В. М. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 12, с. 1620–1623.
4. Ohta J., Ogura J., Wada A. J. Biol. Chem., 1966, v. 241, № 12, p. 5919–5923.
5. Isowa Y., Ichikawa T. Bull. Chem. Soc. Jap., 1979, v. 52, № 3, p. 796–800.

6. Isowa Y., Ohmori M., Ichikawa T., Mori K., Nonaka Y., Kihara K., Oyama K., Satoh H., Nishimura S. Tetrahedron Lett., 1979, v. 29, № 28, p. 2611-2612.
7. Petkov D. D., Stoineva I. B. Tetrahedron Lett., 1984, v. 25, № 34, p. 3751-3754.

Поступила в редакцию
19.II.1986

После доработки
28.III.1986

THERMOLYSIN-CATALYZED SYNTHESIS OF METHYL ESTERS OF ACYLATED PEPTIDES IN CONCENTRATED AQUEOUS SOLUTIONS

LYUBLINSKAYA L. A., BOYTSOVA S. E., STEPANOV V. M.

*Institute of Genetics and Selection of Industrial
Microorganisms, Moscow*

Thermolysin was used to prepare the following peptides: Z-Ala-Ala-Phe-OMe, Z-Ala-Ala-Leu-OMe, Bz-Gly-Gly-Phe-OMe, Z-Ala-Phe-OMe, and Z-Asp-Phe-OMe by condensation of Z- or Bz-dipeptide and amino acid derivatives with L-Leu and L- or DL-Phe methyl esters hydrochlorids. The reactions were carried out in aqueous solutions at 1-5 M reagent concentrations, resulting in 55-91% yields of optically pure products. Z-Asp-Phe-OMe, an aspartam precursor, was obtained in a 85% yield.