



УДК 577.112.4

ТРАНСФОРМАЦИЯ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОГО ОКСИТОЦИНОИЛЛИЗИНА В ОКСИТОЦИН

© 1996 г. К. В. Мальцев[#], С. В. Швец, Н. А. Лукьянова, А. В. Григорьев, А. И. МирошниковИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 11.10.95 г.

Исследованы различные способы получения окситоцина из его генно-инженерного предшественника окситоциноиллизина. Для отщепления С-концевого лизина в окситоциноиллизине изучена возможность использования наряду со стандартной карбоксипептидазой В аналогичной карбоксипептидазы из гепатопанкреаса камчатского краба. Найдено, что наиболее эффективным методом получения окситоцина является аммонолиз метилового эфира окситоциновой кислоты. Исследовано применение обращенно-фазовой ВЭЖХ для постадийного контроля продуктов при получении генно-инженерного окситоцина.

Ключевые слова: окситоциноиллизин, дезамидоокситоцин, окситоцин, гепатопанкреас, карбоксипептидаза, амидирование.

Широко используемый в практической медицине пептидный гормон окситоцин и его аналоги в настоящее время получают исключительно химическим синтезом. Альтернативным способом, который экономически может составить конкуренцию традиционному химическому синтезу, является микробиологический синтез с помощью техники рекомбинантных ДНК.

С использованием нескольких рекомбинантных штаммов-продуцентов ранее были получены гибридные белки, обработка трипсином которых с последующим замыканием дисульфидных связей приводит к одному и тому же продукту – окситоциноиллизину [1–3]. Следующими этапами его превращения в окситоцин являются отщепление С-концевого лизина и амидирование нового С-концевого остатка глицина в дезамидоокситоцине (окситоциновой кислоте) (рис. 1). Этому и посвящена настоящая работа.

Для отщепления С-концевого остатка лизина в окситоциноиллизине были исследованы два фермента: карбоксипептидаза В из поджелудочной железы млекопитающих (СРВр) и карбоксипептидаза из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschatica* (СРВс). СРВр обычно применяется для отщепления в пептидах и белках С-концевых основных аминокислотных остатков. Согласно [4], СРВс также может успешно использоваться для этих целей. В настоящей работе особый интерес к СРВс обусловлен ее доступностью по сравнению с СРВр, что имеет большое значение, учитывая масштабы производства ок-

ситоцина. Сравнительное изучение карбоксипептидаз (СРВр и СРВс) с подбором оптимальных условий проведения реакции гидролиза не выявило каких-либо значительных преимуществ одного из ферментов. Определено, что при концентрации окситоциноиллизина 2–10 мг/мл в 50 мМ трис-НСI-буфере, рН 7.2, отщепление лизина проходит количественно при весовом соотношении фермент–субстрат 1 : 1000 для обеих карбоксипептидаз.

Второй этап трансформации – амидирование карбоксильной группы окситоциновой кислоты – может быть выполнен по крайней мере тремя способами (рис. 1):

1) аммонолизом активированной N-защищенной окситоциновой кислоты с последующим удалением N-концевой защитной группы,

2) фотолитическим удалением в присутствии гидразина остатка амида 2-(2-нитрофенил)глицина, предварительно присоединенного к С-концевому остатку глицина окситоциновой кислоты с помощью карбоксипептидазы Y,

3) аммонолизом метилового (или этилового) эфира окситоциновой кислоты.

Согласно первому способу, для блокирования α -аминогруппы N-концевого остатка цистеина окситоциновой кислоты была использована третбутилоксикарбонильная защита (Вос). Наибольший выход N-ацилированного продукта (95%) наблюдался в реакционной смеси изопропанол-вода, 2 : 1 (по объему) в присутствии 5% триэтиламина и при молярном соотношении окситоциновая кислота – Вос₂O 1 : 3. Активацию карбоксильной группы С-концевого остатка глицина

[#] Автор для переписки.

N-защитенной окситоциновой кислоты проводили путем превращения ее в пентафторфениловый эфир обработкой дипентафторфенилпирокарбонатом, широко используемым в пептидном синтезе. В качестве растворителя использовали DMF, поскольку в других менее полярных растворителях N-Вос-окситоциновая кислота не растворялась. При концентрации Вос-окситоциновой кислоты 25 мг/мл соответствующий пентафторфениловый эфир образовывался с выходом 90% при добавлении трехкратного молярного избытка дипентафторфенилпирокарбоната. Аммонолиз полученного пентафторфенилового эфира легко и практически с количественным выходом проходил под действием раствора аммиака в органических растворителях (DMF, метанол, этанол). Для удаления *трет*-бутилоксикарбонильной группы в реакционную смесь добавляли равный объем TFA. Выход на этой стадии составил 90%.

В качестве второго способа синтеза окситоцина из окситоциновой кислоты мы использовали метод транспептидации, предложенный Бреддом и сотр. (см., например, [5]), заключающийся в присоединении к окситоциновой кислоте с помощью карбоксипептидазы Y амида 2-(2-нитрофенил)глицина с последующим фотохимическим расщеплением продукта реакции в присутствии гидразина. Мы показали, что этот метод может быть эффективно использован и для получения окситоцина из его генно-инженерного предшественника. Выход окситоцина исходя из окситоциновой кислоты составил 90%.

Третий способ заключался в превращении окситоциновой кислоты в метиловый или этиловый эфир стандартными методами и аммонолизе полученных эфиров. Этот способ, с нашей точки зрения, наиболее удобен для получения окситоцина, поскольку аминокислотный состав окситоциновой кислоты в данном случае не предполагает каких-либо заметных побочных реакций. Выход сложных эфиров окситоциновой кислоты в 0.25 M растворе HCl в метаноле или этаноле достигал максимума (95%) через 1.5 ч при комнатной температуре. Дальнейшее увеличение времени реакции приводило к заметной деструкции пептида. Образование же самого окситоцина из эфира окситоциновой кислоты в процессе аммонолиза требовало высокой концентрации аммиака в органическом растворителе и достаточно длительного времени (обычно 12–24 ч). Реакционный раствор после образования сложного эфира упаривали и полученный остаток растворяли в 5 M растворе аммиака в метаноле. Выход на стадии аммонолиза составил 85%.

При трансформации окситоциноиллизина в окситоцин постадийный контроль за проведением ферментативных и химических реакций осуществляли при помощи ВЭЖХ. Отсутствие в молекуле окситоцина кислых и основных аминокис-

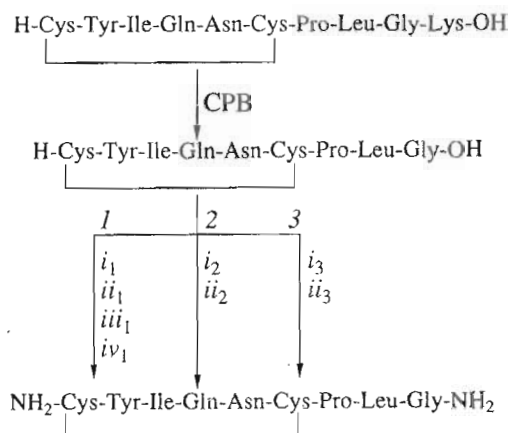


Рис. 1. Схема способов трансформации окситоциноиллизина в окситоцин: i_1 – $(\text{Вос})_2\text{O}$; ii_1 – $(\text{C}_6\text{F}_5\text{OCO})_2\text{O}$; iii_1 – NH_3 ; iv_1 – CF_3COOH (1); i_2 – CPY + амид 2-(2-нитрофенил)глицина; ii_2 – $h\nu$ + $\text{NH}_2\text{-NH}_2$ (2); i_3 – MeOH/HCl ; ii_3 – NH_3 (3).

лотных остатков, амидированная С-концевая карбоксильная группа и близость молекулярных масс окситоцина и промежуточных продуктов делают малоэффективными ионообменную и эксклюзионную ВЭЖХ, поэтому мы использовали аналитическую обращенно-фазовую (оф) ВЭЖХ, при которой промежуточные продукты трансформации и окситоцин хорошо различаются по хроматографической подвижности. Элюирование продуктов во всех случаях проводили нарастающим градиентом ацетонитрила в 0.1% растворе TFA.

На рис. 2 изображена совмещенная хроматограмма окситоциноиллизина, окситоциновой кислоты, окситоцина, а также промежуточных продуктов амидирования окситоциновой кислоты: N-Вос-окситоциновой кислоты, пентафторфенилового эфира N-Вос-окситоциновой кислоты, N-Вос-окситоцина и метилового эфира окситоциновой кислоты.

Подлинность полученного каждым методом окситоцина была подтверждена офВЭЖХ в сравнении со стандартным синтетическим образцом, анализом N-концевой аминокислотной последовательности, а также определением молекулярной массы (1007.2) с помощью времяпролетной масс-спектрометрии.

Для очистки окситоцина была использована препаративная офВЭЖХ с элюцией нарастающим градиентом ацетонитрила в 0.1% TFA (рис. 3). Во всех полученных нами образцах окситоцина, кроме примесей, обусловленных побочными реакциями и продуктами деградации, содержалось до 10% дезамидоокситоцина – наиболее близкородственной и трудноудаляемой хроматографическими методами примеси [6, 7]. Поэтому выбор крутизны градиента и скорости потока в первую очередь определялся эффективностью отделения

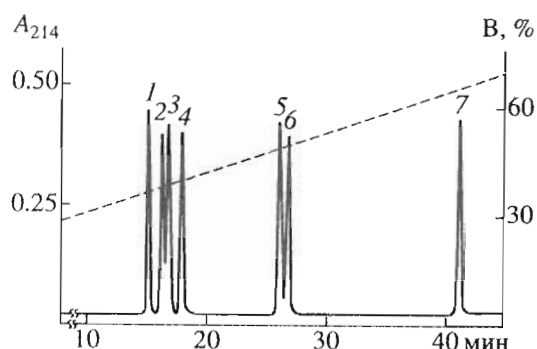


Рис. 2. Совмещенная хроматограмма исходного, промежуточных и конечного продуктов, получаемых в процессе трансформации окситоциноиллизина в окситоцин тремя исследованными способами (см. рис. 1): 1 – окситоциноиллизин, 2 – окситоцин, 3 – окситоциновая кислота, 4 – метиловый эфир окситоциновой кислоты, 5 – Вос-окситоцин, 6 – Вос-дезамидоокситоцин, 7 – активированный эфир Вос-дезамидоокситоцина. Хроматограмма составлена на основе суммирования данных, полученных с помощью аналитической офВЭЖХ при анализе процессов, происходящих на всех стадиях трансформации окситоциноиллизина в окситоцин.

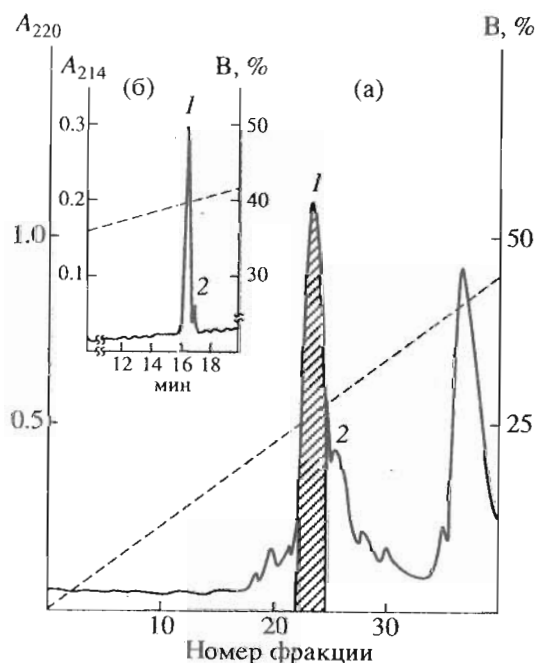


Рис. 3. а – очистка окситоцина с помощью препаративной офВЭЖХ (условия – см. “Экспер. часть”): 1 – окситоцин; 2 – окситоциновая кислота; заштрихованная область – собранная фракция очищенного окситоцина, подвергнутая дальнейшей лиофилизации. б – анализ заштрихованной фракции с помощью аналитической офВЭЖХ: 1 – окситоцин, 2 – окситоциновая кислота.

именно этого вещества. Фракции с содержанием окситоцина не менее 95% (по данным аналитической офВЭЖХ) объединяли и лиофилизовали. На стадии хроматографической очистки выход окситоцина, полученного различными способами, составил 62.5%.

Итоговый выход окситоцина в препаративных вариантах исходя из окситоциновой кислоты по способам 1, 2, 3 составил 48, 56 и 50% соответственно. Несмотря на то что наибольший выход окситоцина достигнут по способу 2, более простым и приемлемым методом получения окситоцина является амидирование метилового эфира окситоциновой кислоты.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали карбоксипептидазу В из поджелудочной железы свиньи и карбоксипептидазу У (Boehringer–Mannheim, Австрия), дипентафторфенилкарбонат, ди-*трет*-бутилпирокарбонат, трис, аммиак, соляную кислоту, уксусную кислоту, TFA, DMF, DMSO, EDTA, триэтиламин, пиридин, изопропанол, метанол, ацетонитрил для жидкостной хроматографии, гидразин (“Союзреактив”, СССР). Окситоциноиллизин, карбоксипептидаза из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschatica*, а также 2-(2-нитрофенил)глицинамид были получены в ИБХ РАН, синтетический окситоцин (удельная активность 463 ед./мг) предоставлен НПО “Вектор” (Россия). Вода была очищена на установке Milli-Q (Millipore, США).

Ферментативный гидролиз окситоциноиллизина карбоксипептидазой В и карбоксипептидазой из гепатопанкреаса камчатского краба проводили в одинаковых условиях: 50 мМ трис-НСl (рН 7.2), 25°C, 40 мин при исходной концентрации субстрата 5 мг/мл и весовом соотношении фермент–субстрат 1 : 1000. Реакцию останавливали добавлением уксусной кислоты до 10%.

Вос-окситоциновую кислоту получали обработкой окситоциновой кислоты трехкратным молярным избытком ди-*трет*-бутилпирокарбоната в растворе изопропанол–вода, 2 : 1, в присутствии 5% триэтиламина (по объему) при концентрации пептида 25 мг/мл в течение 3 ч при комнатной температуре.

Карбоксильную группу Вос-окситоциновой кислоты активировали обработкой трехкратным молярным избытком дипентафторфенилкарбоната в DMF при концентрации Вос-окситоциновой кислоты 25 мг/мл в течение 1 ч при комнатной температуре.

Для аммонолиза пентафторфенилового эфира Вос-окситоциновой кислоты к реакционной смеси добавляли равный объем 2 М раствора аммиака в DMF и инкубировали 30 мин при комнатной температуре.

Вос-защитную группу с N-концевого цистеина окситоцина снимали добавлением в реакционную смесь равного объема TFA с последующим инкубированием ее при комнатной температуре в течение 2 ч.

Транспептидазную реакцию [5] с образованием окситоциноил-2-(2-нитрофенил)глицинамида осуществляли в 50% DMSO, содержащем 5 мМ EDTA, при pH 6.0 и весовом соотношении 2-(2-нитрофенил)глицинамид-дезамидоокситоцин-карбокисептидаза Y 1500 : 500 : 1.

Для фотохимического расщепления окситоциноил-2-(2-нитрофенил)глицинамида реакционную смесь, содержащую 7 мг/мл пептида и 10-кратный избыток гидразина (pH 9.5) в 50% метаноле, в емкости из стекла Pyrex¹ в атмосфере азота подвергали облучению с расстояния 20 см ртутной лампой среднего давления (ртутная лампа типа SP200, Bausch & Lomb, Rochester, США). Время фотолиза составило 20 мин.

Метиловый эфир окситоциновой кислоты получали в 0.25 М растворе HCl в метаноле в течение 1.5 ч при концентрации пептида 25 мг/мл.

Полученный сложный эфир дезамидоокситоцина подвергали аммонолизу 5 М раствором аммиака в метаноле при концентрации пептида 25 мг/мл в течение 18 ч при комнатной температуре.

Аналитическую офВЭЖХ осуществляли на колонке Ultrasphere ODS (4.6 мм × 7.5 см; Beckman, США), используя систему для ВЭЖХ (Waters, США), включающую два насоса Model 510, автоматический градиентный контроллер Model 680, инжектор УБК, детектор Model 441, интегратор Model 740. Элюенты: А – 1.0% раствор TFA; В – 0.1% раствор TFA в 80% ацетонитриле. Элюцию вели со скоростью потока 0.8 мл/мин следующим образом: концентрацию элюента В в А повышали от 0 до 20% за 1 мин, а далее вели элюцию линейным градиентом элюента В от 20 до 70% в течение 45 мин; детектирование фракций – по УФ-поглощению при длине волны 214 нм.

Масс-спектрометрический анализ проводили на опытном образце времяпролетного масс-ре-

флектрона с электрогидродинамическим источником [8].

Препаративную офВЭЖХ окситоцина осуществляли с применением технологии радиальной компрессии, используя картридж Prep PAK 500 C18 (Waters, США) и систему для препаративной ВЭЖХ Delta-Prep 3000 с детектором Lambda-Max Model 481 и интегратором Model 740 (Waters, США). Элюенты А и В те же, что и в аналитическом варианте. Элюцию проводили линейным градиентом от 0 до 45% элюента В в А в течение 120 мин со скоростью потока 70 мл/мин, детектирование – по УФ-поглощению при длине волны 220 нм. Собирали фракции объемом 400 мл. Полученные препараты окситоцина лиофилизовали на лиофильной сушилке Delta 1A (Christ, ФРГ).

Авторы благодарят О.А. Миргородскую за проведение масс-спектрометрического анализа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гуревич А.И., Качалина Т.А., Каюшин А.Л., Коростелева М.Д., Мирошников А.И. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 629–632.
2. Гуревич А.И., Мальцев К.В. // II Российский национальный конгресс "Человек и лекарство". Тез. докл. М.: РЦ "Фармединфо", 1995. С. 149.
3. Гуревич А.И., Качалина Т.А., Каюшин А.Л., Коростелева М.Д., Мальцев К.В., Миргородская О.А., Мирошников А.И. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 15–20.
4. Руденская Г.Н., Купенко О.Г., Исаев В.А., Степанов В.М., Дунаевский Я.Е. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 249–255.
5. Henriksen D.B., Rolland M., Jakobsen M.H., Buchardt O., Breddam K. // Peptide Res. 1992. V. 5. P. 321–324.
6. Григорьева В.Д., Штац В.Д. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. С. 1157–1160.
7. Maxi F., Siehr W. // J. Pharm. Biomed. Anal. 1989. V. 7. P. 211–216.
8. Mirgorodskaya O.A., Shevchenko A.A., Dodonov A.F., Chernushevich I.V., Miroshnikov A.I. // Anal. Chem. 1994. V. 66. P. 99–107.

Conversion of Recombinant Oxytocinoyllysine into Oxytocin

K. V. Mal'tsev,¹ S. V. Shvets, N. A. Luk'yanova, A. V. Grigor'ev, and A. I. Miroshnikov

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7, Moscow, 117871 Russia*

Abstract—Various methods for obtaining oxytocin from its recombinant precursor oxytocinoyllysine were studied. For splitting off the C-terminal lysine residue in oxytocinoyllysine, the carboxypeptidase B and an analogous carboxypeptidase from king crab hepatopancreas were used. Ammonolysis of oxytocinic acid methyl ester proved to be the most efficient method for the last stage of the oxytocin preparation. Reversed-phase HPLC was used for the product analysis at each stage of the recombinant oxytocinoyllysine conversion into oxytocin.

Key words: oxytocinoyllysine, deamidoxytocin, oxytocin, hepatopancreas, carboxypeptidase, amidation.

¹ To whom correspondence should be addressed.