



УДК 543.544:577.112

ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ ЗАЩИЩЕННЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ В ДИМЕТИЛФОРМАМИДЕ

© 1997 г. А. С. Карнуп[#], В. М. Ширяев, В. Н. Медведкин*, Ю. В. Митин

Институт белка РАН, 142292, Пущино Московской обл.;

* Институт биотехнологических исследований, Монреаль, Канада

Поступила в редакцию 12.05.96 г.

Предложен метод аналитической и препаративной эксклюзионной жидкостной хроматографии крупных водонерастворимых защищенных пептидов на гелях Toyopearl HW-40, HW-50, HW-55 и HW-60 с использованием диметилформамида в качестве элюента. Исследованы селективность этих гелей и молекулярно-массовые диапазоны разделения защищенных пептидов в диметилформамиде. Показано, что молекулярно-массовые диапазоны разделения на Toyopearl HW в диметилформамиде (для защищенных пептидов) и в водных буферных растворах (для белков и пептидов) сильно различаются.

Ключевые слова: гель-фильтрация, Toyopearl HW, защищенные пептиды, DMF.

Синтез биологически активных пептидов – одно из важнейших направлений в биоорганической химии. Уже давно получение небольших синтетических пептидов (до 10 а. о.) [1] считается относительно простой процедурой. Однако при синтезе крупных пептидов (20–50 а. о. и более) часто возникают значительные трудности [2], связанные, в частности, с отсутствием эффективных методов очистки промежуточных защищенных пептидов от исходных соединений и побочных продуктов, образующихся почти на каждой стадии синтеза. В большинстве случаев защищенные, а потому сильногидрофобные пептиды длиной более 5–7 а. о. растворимы только в полярных органических растворителях, таких, как DMF и DMSO. В связи с этим сужается спектр способов их очистки [3]. Для этих целей удобна гель-фильтрация (эксклюзионная жидкостная хроматография) в органических растворителях. Наиболее успешными были попытки очистки небольших защищенных пептидов с помощью такого варианта гель-фильтрации на модифицированных (метилированных) гелях сефадекс G-25 и G-50 (Pharmacia, Швеция) [4, 5] в этаноле и смеси хлороформ–метанол, на сефадекссах LH-20 [3, 6–8] и LH-60 (Pharmacia, Швеция) [3, 7] в диоксане [6] и DMF [3, 6–8] и на силикагелях в DMF [8]. В большинстве встречающихся в литературе случаев верхний предел рабочего интервала молекулярных масс (верхний предел эксклюзии) используемых носителей не превышает в среднем 3000 Да (около 15 а. о.). В работе [8] приводятся экспери-

ментальные данные по гель-фильтрации защищенных пептидов с массами до 5417 Да в DMF.

Для преодоления указанного барьера верхнего предела эксклюзии при гель-фильтрации защищенных пептидов в органических растворителях нами были исследованы полужесткие поливиниловые гели серии Toyopearl HW (Toyo Soda, Япония): Toyopearl HW-40, HW-50, HW-55 и HW-60. Эти гели, известные уже более 10 лет, обладают хорошей механической и химической стабильностью и совместимы со многими органическими растворителями [9]. Однако до сих пор описано лишь несколько случаев их применения для хроматографии в органических растворителях (метанол и DMSO) [9–11]. Гель-фильтрация защищенных пептидов в DMF на гелях Toyopearl HW впервые была осуществлена в 1994 г. [12, 13].

Цель данной работы – оценка пригодности носителей Toyopearl HW для гель-фильтрации в DMF крупных защищенных пептидов и определение базовых параметров (селективности, эффективности, молекулярно-массового диапазона разделения) этих гелей в таком варианте гель-фильтрации. DMF в качестве элюента был выбран в силу его высокой растворяющей способности по отношению к защищенным пептидам, химической инертности и широкой применимости в пептидном синтезе.

Колонки с четырьмя носителями Toyopearl (HW-40F, HW-50F, HW-55F и HW-60F) были откалиброваны защищенными пептидами (рис. 1, 2, табл. 1), синтез которых описан в работах [13, 14]. Время одной хроматографической процедуры – около 30 мин. Разрешение $R_s = 1$ двух соседних

Сокращения: Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил, а. о. – аминокислотный остаток, т. т. – теоретическая тарелка.

[#] Автор для переписки (e-mail: karnup@sun.ipr.serpukhov.su).

пиков достигалось при разнице молекулярных масс в 1.5–2 раза. Однако можно надеяться на улучшение разрешения при использовании гелей с меньшим размером гранул [9]. Селективность (S) (табл. 2) и молекулярно-массовый диапазон разделения для каждого геля в DMF (табл. 3) были определены из калибровочных графиков (рис. 2). Относительная подвижность защищенных пептидов в геле выражена через коэффициент доступности, K_{av} [15], определяемый соотношением

$$K_{av} = \frac{V_i - V_0}{V_t - V_0},$$

где V_i – объем выхода пика, V_t – полный геометрический объем колонки, V_0 – свободный объем колонки.

Обычно при эксклюзионной хроматографии в водных средах величину V_0 определяют по объему элюции голубого декстрана. Однако в случае эксклюзионной хроматографии в органических средах применение голубого декстрана невозможно по причине его нерастворимости в большинстве органических растворителей. В нашей работе выход из сложившейся ситуации был найден в использовании высокомолекулярной фракции растворимого в DMF Тгp-содержащего защищенного полипептида ELW (см. табл. 1 и “Экспер. часть”) в качестве маркера свободного объема.

Эффективность (N , т. т.), удельная эффективность (N_m , т. т./м) и характеристическая эффективность (N_c , т. т.) для каждой колонки были определены как описано в работе [8] и приведены в табл. 2.

Из полученных данных следует, что гель-фильтрацией на гелях Тоуорепарл HW в DMF можно разделять защищенные пептиды с молекулярными массами приблизительно от 400 до 14000 Да. В этом диапазоне молекулярных масс изученные гели проявляют удовлетворительную селективность по молекулярным массам. Необходимо отметить, что молекулярно-массовые диапазоны разделения гелей Тоуорепарл HW в DMF существенно уже, чем молекулярно-массовые диапазоны разделения этих же гелей в водных средах (см. табл. 3), хотя объем материала носителей при переводе из водной среды в DMF изменяется незначительно (увеличивается приблизительно на 10%) [9]. Причины таких резких различий пока неясны.

На рис. 1 показано разделение защищенных синтетических пептидов на четырех исследованных носителях в DMF.

Наиболее эффективного разделения защищенных пептидов гель-фильтрацией в DMF можно достичь последовательной хроматографией на носителях Тоуорепарл HW-40 и HW-60, характеризующихся наибольшей селективностью в исследованных условиях (см. рис. 2 и табл. 2) и дополняющими друг друга молекулярно-массовыми ди-

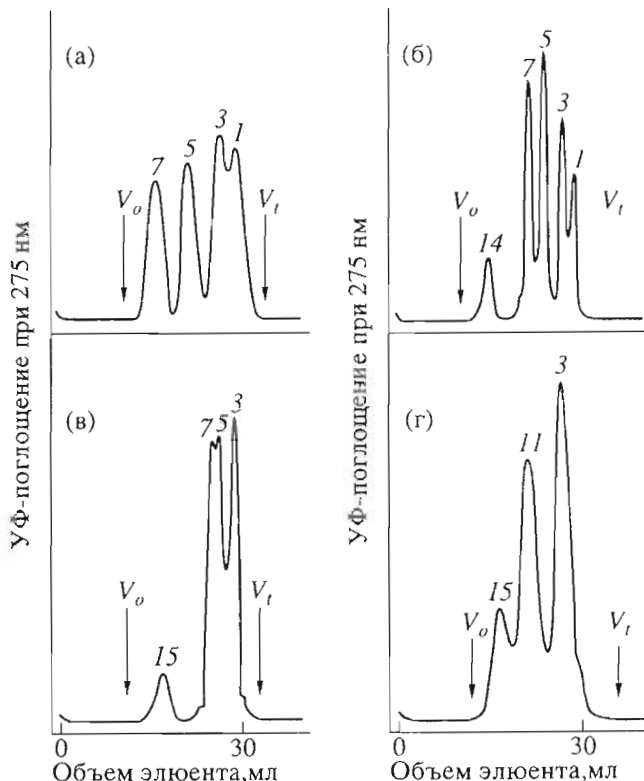


Рис. 1. Разделение смесей защищенных пептидов на колонках с носителями Тоуорепарл HW-40 F (10 × 425 мм) (а), HW-50 F (10 × 440 мм) (б), HW-55 F (10 × 415 мм) (в), HW-60 F (10 × 446 мм) (г). Скорость потока 1 мл/мин. Элюент – DMF. Цифры над пиками соответствуют номерам защищенных пептидов (табл. 1).

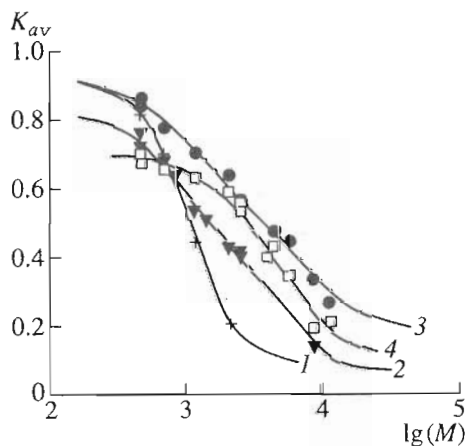


Рис. 2. Калибровочные графики колонок с носителями Тоуорепарл HW-40 (1), HW-50 (2), HW-55 (3) и HW-60 (4). Для калибровки колонок использовались синтетические защищенные пептиды (табл. 1).

апазонами разделения (см. рис. 2 и табл. 3). Однако следует иметь в виду, что воспроизводимость результатов хроматографии на Тоуорепарл HW-60 сильно зависит от содержания воды в DMF. Хотя такая зависимость не исследовалась нами детально, было замечено, что в присутствии следовых

Таблица 1. Относительная подвижность (K_{av}) защищенных пептидов на колонках с носителями Toyopearl HW в DMF

Номер	Защищенный пептид (аминокислота)*	M, Да	Число а. о.	K_{av} для марки носителя			
				40F	50F	55F	60F
1	Lys	469	1	0.821	0.769	0.843	0.675
2	Tyr	469	2	–	–	0.871	0.704
3	Ala-Ala-Lys-Pro	709	4	0.704	0.731	0.785	0.655
4	Ala-Ala-Lys-Tyr-Ala	840	5	–	0.643	–	–
5	(Ala-Ala-Lys-Pro) ₂	1177	8	0.445	0.541	0.71	0.630
6	(Tyr-Pro-Pro-Trp-Gly) ₂	1439	10	–	0.515	–	–
7	(Ala-Ala-Lys-Pro) ₄	2114	16	0.206	0.434	0.644	0.593
8	(Ala-Lys-Lys-Ala-Lys-Pro) ₂	2549	14	–	0.412	–	0.532
9	(Ala-Ala-Lys-Pro) ₅	2583	20	–	0.424	0.570	0.560
10	(Tyr-Pro-Pro-Trp-Gly) ₄	2638	20	–	0.409	–	–
11	(Ala-Ala-Lys-Pro) ₈	3989	32	–	–	–	0.401
12	(Ala-Ala-Lys-Pro) ₉	4457	36	–	–	0.480	0.435
13	(Lys-Lys-Ser-Pro) ₈	5824	32	–	–	0.450	0.349
14	(Ala-Ala-Lys-Pro) ₁₈	8675	72	–	0.142	0.340	0.192
15	(Lys-Lys-Ser-Pro) ₁₆	11408	64	–	–	0.271	0.210
16	Полипептид ELW**	1×10^6	6000	0	0	0	0

* N^α – Fmoc; N^ε – Boc(Lys); OBU^t(Tyr, Thr, Ser).

** Фракция с наибольшей молекулярной массой для высокомолекулярного статистического сополимера, состоящего из остатков Glu(OBU^t), Leu и Trp (см. "Экспер. часть").

Таблица 2. Параметры колонок Toyopearl HW

Марка носителя	Размеры колонки, мм	Размер частиц, мкм	N, т. т.	N _m , т. т./м	N _c , т. т.	S*
HW-40 F	10 × 425	30–60	775	1823	485	0.95
HW-50 F	10 × 440	30–60	1469	3339	1571	0.51
HW-55 F	10 × 415	30–60	1063	2561	2063	0.45
HW-60 F	10 × 446	30–60	725	1626	1484	0.53

* Для молекулярных масс, указанных в табл. 3 (для DMF).

количеств воды в DMF защищенные пептиды элюируют значительно раньше, чем в свежеперегнанном ("безводном") DMF. Этому недостатка практически лишены остальные исследованные носители: Toyopearl HW-40, HW-50 и HW-55.

Таблица 3. Молекулярно-массовые диапазоны разделения (Да) на исследованных гелях Toyopearl HW белков и пептидов в воде и защищенных пептидов в DMF

Марка носителя	В воде*	В DMF
HW-40	100–10000	400–3100
HW-50	500–80000	450–10500
HW-55	1000–700000	500–14500
HW-60	5000–1000000	1200–13500

* Данные работы [9].

Из рис. 2 видно, что верхний участок графика селективности для геля Toyopearl HW-60 (кривая 4) выходит на "плато" при значении $K_{av} \sim 0.7$. Это говорит о том, что реальный доступный полный внутренний объем пор носителя HW-60 в DMF составляет около 80% полного геометрического объема колонки, что на ~10–15% меньше, чем для гелей HW-50, HW-55 и HW-40, для которых эта величина составляет около (0.90–0.95)V_t. Это явление можно объяснить, например, остаточной сорбцией молекул воды в порах носителя после перевода геля из водной среды в среду DMF. В этом случае реальный доступный объем пор уменьшался бы за счет воды, структурированной на внутренней поверхности пор носителя. Такое структурирование не исключено, так как на поверхности носителя много OH-групп [9]. Этот вопрос, однако, требует дополнительного исследования.

Таким образом, гели Toyopearl HW успешно применимы для эксклюзионной жидкостной хроматографии крупных защищенных пептидных фрагментов с молекулярными массами в диапазоне примерно 400–14000 Да в среде DMF. Такой вариант гель-фильтрации может быть также использован как инструмент для мониторинга реакции конденсации защищенных пептидных фрагментов. С практической точки зрения наиболее удобными как для разделения крупных защищенных пептидов, так и для мониторинга реакции конденсации крупных защищенных пептидных фрагментов являются гели Toyopearl HW-50 и HW-55.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Стеклянные колонки были упакованы носителями TSK-Toyopearl HW-40 F, HW-50 F, HW-55 F и HW-60 F (Toyo Soda, Япония) гравитационным методом, описанным в руководстве [9]. Параметры полученных колонок приведены в табл. 2.

Хроматографию проводили при 20–22°C на установке FPLC System (Pharmacia, Швеция) с детекцией по УФ-поглощению при 275 нм и скоростью потока 0.5–1 мл/мин. В качестве элюента использовали свежеперегнанный DMF.

В работе использовали набор синтетических защищенных пептидов тандемного строения (см. табл. 1) [13, 14]. Препараты защищенных пептидов наносили на колонку в объеме 10–200 мкл при концентрации образца 5–20 мг/мл. Каждый эксперимент повторяли 3–5 раз при разных концентрациях и объемах образца.

Свободный объем (V_0) колонок определяли с помощью высокомолекулярной фракции защищенного полипептида ELW (см. ниже). Эффективность колонок определяли исходя из ширины хроматографической зоны [8, 15] при гель-фильтрации Fmoc-Tyr(Bu')-Ala-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH и ацетона. Значения эффективности (табл. 2) рассчитаны по результатам 3–5 экспериментов для каждой колонки.

Защищенный полипептид ELW – статистический высокомолекулярный сополимер, состоящий из остатков Glu(OBzl), Leu и Trp в мольном соотношении 82.5 : 16 : 1.5 – был синтезирован N-карбоксиянгидридным методом [16, 17] из N-карбоксиянгидридов соответствующих α -L-аминокислот. Аликвоту образца полипептида ELW деблокировали по стандартной методике (low-NF), описанной в работе [18], и фракционировали гель-фильтрацией на колонке TSK-Toyopearl HW-60F (16 × 950 мм) в K-фосфатном буфере (0.02 M KH_2PO_4 /0.2 M KCl, pH 7.0). При этом около 10% образца элюировало узким пиком в свободном объеме. Среднюю молекулярную массу фракций деблокированного полипептида определяли, измеряя стоксов радиус

макромолекул методом гель-фильтрации в денатурирующих условиях [19] (pH 6.5, 10 M мочевины, K-фосфатный буфер; в спектре кругового дихроизма сигнал в дальней УФ-области отсутствует) на колонке Toyopearl HW-60F (10 × 240 мм) и используя известную зависимость молекулярной массы от стоксова радиуса для полипептидов в состоянии статистического клубка [19]. Первые фракции образца (не считая части образца, элюирующего с V_0) имели молекулярную массу около 10^6 Да.

Величину V_0 анализируемых колонок при гель-фильтрации в DMF определяли по объему элюции выходящих узким пиком первых фракций защищенного полипептида ELW.

Авторы признательны Л.В. Клименко и А.Г. Раевской за техническую помощь. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Международного научного фонда (грант № NKM 300).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bodanszky M., Du Vigneaud V.J. // J. Am. Chem. Soc. 1959. V. 81. P. 5688–5691.
2. Вольпина О.М., Михалева И.И., Иванов В.Т. // Биоорг. химия. 1982. Т. 8. С. 5–49.
3. Дейгин В.И., Ульяшин В.В., Иванов В.Т., Нефедов П.П., Жмакина Т.П., Беленький Б.Г. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. С. 616–627.
4. Mutt V., Nystrom E., Sjovall J. // J. Chromatogr. 1966. V. 24. P. 205–207.
5. Nystrom E., Sjovall J. // J. Chromatogr. 1966. V. 24. P. 208–212.
6. Gut V., Cimrova M. // Collect. Czech. Chem. Commun. 1969. V. 34. P. 1620–1623.
7. Zeiger A.R., Anfinsen C.B. // J. Am. Chem. Soc. 1973. V. 95. P. 880–886.
8. Ulyashin V.V., Deigin V.I., Ivanov V.T., Ovchinnikov Yu.A. // J. Chromatogr. 1981. V. 215. P. 263–277.
9. TSK-Toyopearl. Information Bulletin. 4602 MU-201 A. Tokyo: Toyo Soda Mfg. Co., Ltd., 1990.
10. TSK-Toyopearl. Separation of Saccharides on Toyopearl. Gel Filtration, Ion Exchanger. Information Bulletin. 2409 MU-107 A. Tokyo: Toyo Soda Mfg. Co., Ltd., 1985.
11. Misaki A. // Carbohydr. Res. 1984. V. 129. P. 209–277.
12. Medvedkin V., Permyakov E., Klimenko E., Mitin Yu., Matsushima N., Nakayama S., Kretsinger R. // Protein Eng. 1995. V. 8. P. 63–70.
13. Medvedkin V., Klimenko E., Mitin Yu., Kretsinger R., Shabanowitz J., Zabolotskikh V., Podgornova N. // Int. J. Pept. Protein Res. 1994. V. 44. P. 477–484.
14. Медведкин В.Н., Клименко Л.В., Митин Ю.В., Подгорнова Н.Н., Быстриченко А.В., Федченко М.Г., Заболотских В.Ф., Поздеева В.В. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. С. 983–984.
15. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. С. 109–167.

16. Карнуп А.С., Уверский В.Н., Медведкин В.Н. // Биоорганич. химия. 1996. Т. 22. С. 563–574.
17. Goodman M., Peggion E. // Pure Appl. Chem. 1981. V. 53. P. 699–714.
18. Blacklock T., Hirschmann R., Veber D. // The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology. V. 9 / Eds S. Udenfriend, J. Meienhofer. N.Y.: Acad. Press, 1993. P. 39–102.
19. Uversky V. // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 13288–13298.

Gel Filtration of Protected Synthetic Peptides in Dimethylformamide

A. S. Karnoup*, V. M. Shiryaev*, V. N. Medvedkin**, and Yu. V. Mitin*

**Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia*

***Biotechnology Research Institute, 6100 Avenue Royalmount, Montreal, Quebec, H4P 2R2, Canada*

Abstract—For large water-insoluble protected peptides, a novel method of analytical and preparative size exclusion liquid chromatography on Toyopearl HW-40, HW-50, HW-55, and HW-60 gels was proposed, with DMF as an eluent. The selectivity and molecular mass ranges of these gels were determined for separation of protected peptides in DMF. The molecular mass ranges of Toyopearl HW gels for protected peptides in DMF were found to differ significantly from those for peptides and proteins in aqueous buffer solutions.

Key words: gel filtration, Toyopearl HW, protected peptides, dimethylformamide.