



УДК 577.112.6.03:542.951.1

КИНЕТИКА И МЕХАНИЗМ СИНТЕЗА ПЕПТИДОВ В РАСТВОРЕ

© 2002 г. Е. А. Пермяков[#], С. Е. Пермяков, В. Н. Медведкин*Институт биологического приборостроения РАН,
142290, Пущино, Московская обл.*

Поступила в редакцию 16.02.2001 г. Принята к печати 20.06.2001 г.

Кинетику реакции Вос-Хаа-фторфениловых эфиров (где Хаа – аминокислоты Ala, Val, Phe, Ser, Leu, Gly, Met, Pro или Ile) с лейцинамидом (LeuNH₂) исследовали, используя изменения флуоресценции при 375 нм фторфенилового хромофора в ходе реакции. Обнаружено, что экспериментальные кинетические данные не описываются простой схемой реакции второго порядка. Измерения кинетических параметров реакции при различных начальных концентрациях реагентов показали, что ее скорость может быть описана формулой $v = k C_N^a C_{AE}^b$ (где k – константа скорости реакции, C_N – концентрация LeuNH₂, C_{AE} – концентрация фторфенилового эфира). Для фторфениловых эфиров Вос-защищенных Ala, Val, Phe, Ser и Leu порядки реакции a и b были близки соответственно к 1/2 и 3/2; для Gly, Met и Pro – к 1/2 и 1, в то время как для Ile – к 1 и 2. Полученные экспериментально формулы для скорости реакции могут быть выведены теоретически исходя из одной и той же схемы цепных реакций с различными путями дезактивации активных промежуточных состояний.

Ключевые слова: синтез пептидов, кинетика реакции; механизм образования пептидной связи; фторфениловые эфиры пептидов; флуоресценция.

ВВЕДЕНИЕ

Образование химической связи между двумя аминокислотами – одна из фундаментальных химических реакций, изучаемых науками о жизни. Особенно интенсивно в настоящее время исследуется механизм образования пептидной связи в ходе синтеза белка на рибосоме. Недавние успехи в расшифровке пространственной структуры рибосомы привели к важным открытиям в этой области, которые безусловно вызовут новую волну интереса к детальному изучению механизма образования пептидной связи [1].

Одновременно изучается механизм образования пептидной связи и вне рибосомы. Например, недавно обнаружено, что аминокислоты могут быть активированы для образования пептидной связи в геохимически приемлемых условиях (водная среда, 100°C, pH 7–10) с помощью окиси углерода в присутствии катализатора [2]. Авторы этой работы напрямую связывают обнаруженный механизм образования пептидной связи с возможностью абиогенного синтеза белков и происхождением жизни на Земле.

Знание кинетики и механизма реакции образования пептидной связи имеет также большое

практическое значение, особенно в комбинаторной пептидной химии. Недостаточность информации подобного рода приводит к неудачным результатам в формировании пептидных библиотек [3].

К сожалению, в литературе за последние годы имеется мало публикаций, посвященных кинетике пептидного синтеза в растворе. Основное внимание уделяется твердофазному синтезу пептидов и развитию в связи с этим инструментальных методов, таких, например, как спектроскопия в ближнем диапазоне инфракрасного излучения [4].

В настоящей работе мы изучали механизм образования пептидной связи в органическом растворителе. Использование органического растворителя связано в основном с выбранным методом активации аминокислот – с применением пентафторфениловых эфиров (Pfr-эфиры). В дальнейшем мы планируем провести аналогичные эксперименты в водной среде, используя предложенные нами ранее гидрофильные аналоги – *n*-сульфотетрафторфениловые эфиры [5, 6].

Хотя активированные эфиры защищенных аминокислот широко используются в синтезе пептидов, механизм образования ими пептидной связи далеко не ясен [7, 8]. Большинство кинетических исследований в этой области были выполнены на основании предположения о том, что реакция подчиняется механизму второго порядка [7]. Этот подход был применен в большинстве сравнительных исследований, когда задача не требовала изменения начальных концентраций реагентов. Напри-

Сокращения: СНА – циклогексиламин; Pfr – пентафторфенил; Tfr – 2,3,5,6-тетрафторфенил; Tfc – *n*-хлортетрафторфенил.

[#] Автор для переписки (эл. почта: permyakov@ibp.serpuhov.su; тел.: (095) 924-57-49; факс: (827) 79-05-22).

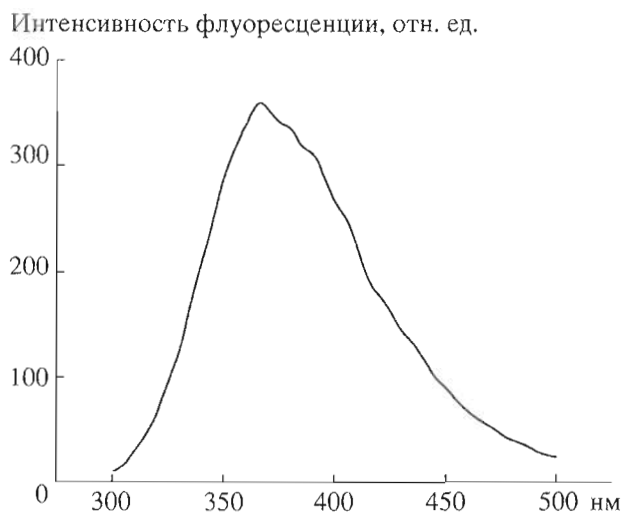


Рис. 1. Спектр флуоресценции BocAlaOPfr в диметилформамиде при возбуждении 280.4 нм.

мер, Ковач с соавт. [9–11], используя предположение о втором порядке реакции образования пептидной связи, получили богатую информацию о зависимости рацемизации от относительного параметра активации эфира.

Детальное обсуждение возможных механизмов образования пептидной связи дано в работе [12]. Авторы получили константы скорости для 41 реакции аминолиза *n*-нитрофениловых эфиров *N*-защищенных аминокислот в диметилформамиде. За исключением реакции с производными пролина в качестве нуклеофилов, все константы скорости аппроксимировали произведением двух парциальных констант скоростей. Показано, что аминолиз в диметилформамиде следует кинетике первого порядка по отношению к амину. Во всех случаях наблюдали линейную зависимость константы скорости псевдо-первого порядка от концентрации амина. Это говорит о том, что скорости этих реакций зависят от концентраций амина и активированного эфира. Кемп с соавт. обнаружили 10%-ное увеличение констант скорости второго порядка при использовании низких концентраций нуклеофила. Этот эффект был объяснен возможным присутствием следов диметиламина в реакционной смеси.

Хорики и Мураками [13] исследовали каталитическое действие калиевой соли 1-гидроксипентриазола на образование пептидной связи в тетрагидрофуране, где диметиламин очевидно отсутствовал. Для реакции 2,3,5-трифторфенилового эфира *Z*-фенилаланина с *n*-нитроанилидом аланина (без катализатора) они обнаружили существенное отклонение от механизма реакции второго порядка и заключили, что эта реакция следует более сложному механизму. Ранее Менгер и Смит получили аналогичные результаты, изучая реак-

ционную способность различных ароматических эфиров [14]. Порядки реакции по каждому из компонентов в этой работе не определяли. Сложность механизма образования амидной связи и близкородственных реакций хорошо задокументирована в органической химии (см. [15] в качестве обзора).

В наших экспериментах по исследованию относительной реакционной способности фторароматических эфиров с различными уровнями замещения фтором было невозможно измерять скорости всех реакций при одних и тех же концентрациях реагентов [6, 16]. Для увеличения скорости реакции или для получения подходящего уровня флуоресцентного сигнала нам приходилось менять начальные концентрации как нуклеофила, так и активированного эфира. При этом обнаружилась существенная зависимость константы скорости второго порядка от начальных концентраций реагентов. Это обстоятельство потребовало измерения порядков реакции по обоим компонентам [16]. Было найдено, что для стандартной реакции фторароматических эфиров Boc-аланина с лейцинамидом или метиловым эфиром валина скорость реакции определяется выражением:

$$v = kC_N^{1/2}C_{AE}^{3/2}, \quad (1)$$

где k – константа скорости реакции, C_N – концентрация нуклеофила, C_{AE} – концентрация активированного эфира. Это выражение говорит о сложном, возможно, цепном механизме реакции.

В настоящей работе представлены результаты дальнейших исследований в этой области. Полученные данные показывают, что не только скорости, но и порядки реакции зависят от конкретной пары производных аминокислот. По-видимому, существует несколько параллельных путей образования пептидной связи, выбор которых зависит от природы взаимодействующих аминокислот.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активированные фторфениловые эфиры дают сходные спектры излучения (для примера – спектр флуоресценции BocAlaOPfr, рис. 1). Реакция активированного фторфенилового эфира с производными аминокислот вызывает уменьшение интенсивности флуоресценции при 375 нм, что и было использовано для изучения кинетики реакций [16]. На рис. 2 показано изменение флуоресценции в ходе реакции BocAlaOTfr с LeuNH₂ (для Pfr-эфиров результаты аналогичны, но флуоресцентный сигнал меньше). Теоретическая кривая, рассчитанная согласно уравнению (1), подогнана к экспериментальным точкам путем вариации константы скорости k . Порядки реакции 1/2 и 3/2 в формуле (1) были получены из логарифмических зависимостей начальной скорости v от кон-

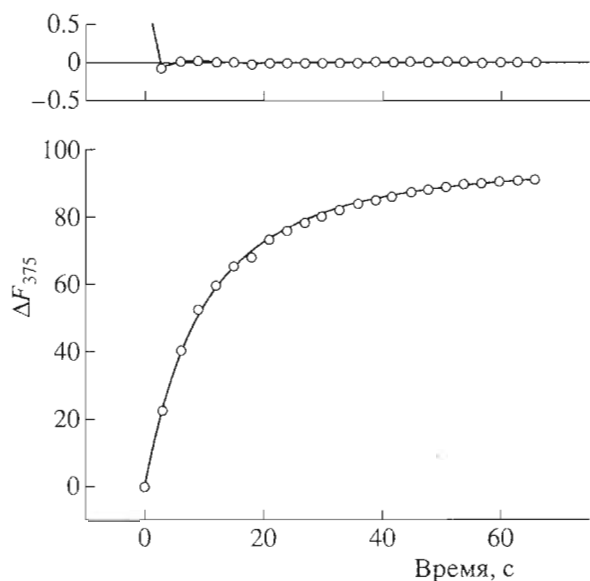


Рис. 2. Изменение интенсивности флуоресценции при 375 нм в зависимости от времени в ходе реакции BocAlaOTfc (1.5 мМ) с LeuNH₂ (10 мМ) в диметилформамиде в присутствии 40 мМ триэтиламина при 20°C. Точки – экспериментальные данные, кривая – теоретическая, рассчитанная согласно уравнению (1). Вверху – распределение разностей между экспериментальными и теоретическими величинами.

центрации реагентов (рис. 3) как описано в нашей более ранней работе [16]. Критериями корректности выражения (1) для описания экспериментальных данных были: хорошее качество подгонки экспериментальных данных расчетной кривой (рис. 2, верхняя панель) и независимость константы скорости *k* от концентрации реагентов (рис. 4).

Аналогичные измерения были проведены для реакций лейцинамида с активированными эфирами другого типа – пентафторфениловыми ряда Boc-защищенных аминокислот: Ala, Gly, Met, Phe, Ile, Pro, Ser, Leu, а также с пентафторфенилацетатом (AcOPfp). Порядки реакции и константы скорости для этих реакций (полученные описанным выше методом) приведены в таблице. Хорошо видно, что в большинстве случаев порядки реакции составляют 1/2 и 3/2 (Ala, Val, Phe, Ser, Leu, Ac). В некоторых случаях порядки реакций могут составлять 1/2 и 1 (Gly, Met, Pro) и даже 1 и 2 (Ile). Обычные порядки реакции 1 и 1 были найдены, когда лейцинамид заменяли на более сильный нуклеофил – циклогексиламин (СНА), который в первом приближении можно рассматривать как топологический аналог большинства аминокислот (см. два примера в нижней части таблицы).

Отметим, что в наших экспериментах наблюдаемые закономерности не зависели от природы фторароматического эфира. Например, Pfp-, Tf- и Tfc-эфиры BocAla в реакции с LeuNH₂ дают аналогичные порядки реакции, хотя скорости реак-

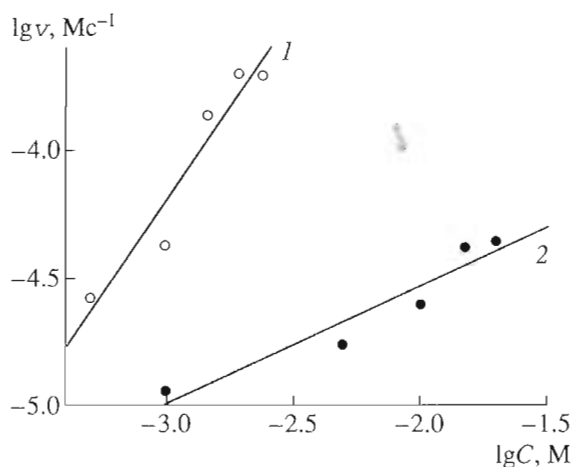


Рис. 3. Зависимость начальной скорости образования пептидной связи в реакции LeuNH₂ с BocAlaOTfc в логарифмических координатах от концентрации реагентов LeuNH₂ (кривая 1, C_{AE} 0.5 мМ) и BocAlaOTfc (кривая 2, C_N 20 мМ). Реакцию проводили в диметилформамиде в присутствии 40 мМ триэтиламина при 20°C.

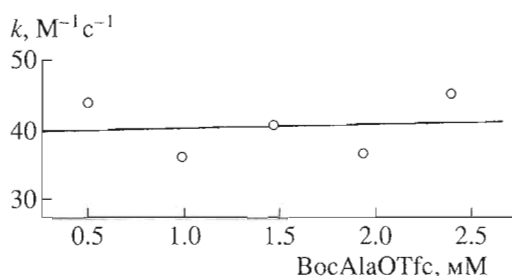
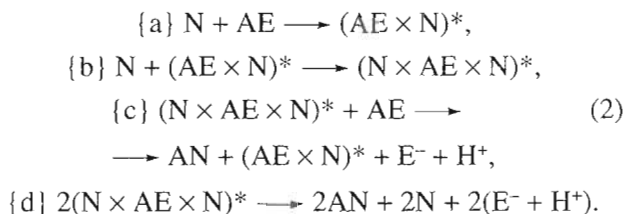


Рис. 4. Зависимость константы скорости реакции BocAlaOTfc с LeuNH₂ (20 мМ) в диметилформамиде в присутствии 40 мМ триэтиламина от концентрации BocAlaOTfc.

ции у них различны из-за разной степени электрофильности уходящей группы.

Полуцелые порядки реакции характерны для цепных процессов с различными механизмами обрыва цепи [17]. Такие цепные реакции обычно предполагают участие свободных радикалов, которые не могут существовать в исследуемых нами системах. Для реакций с порядками 1/2 и 3/2 ранее мы предложили следующий механизм:



{a} Образование активированного тетраэдрического комплекса (AE × N)* между активированным фторфениловым эфиром AE и аминокислотой N.

Порядки и константы скорости реакции синтеза пептидов в диметилформамиде в присутствии 40 мМ триэтиламина*

АЕ	N	a	b	k, M ⁻¹ c ⁻¹
ВосAlaOPfp	LeuNH ₂	0.70 (1/2)	1.53 (3/2)	33.6 ± 8.3
ВосGlyOPfp	»	0.55 (1/2)	0.92 (1)	0.86 ± 0.12**
ВосMetOPfp	»	0.52 (1/2)	1.04 (1)	0.36 ± 0.06**
ВосValOPfp	»	0.51 (1/2)	1.60 (3/2)	0.32 ± 0.04
ВосPheOPfp	»	0.67 (1/2)	1.31 (3/2)	16.9 ± 3.0
ВосIleOPfp	»	0.79 (1)	1.83 (2)	28.2 ± 4.8
ВосProOPfp	»	0.46 (1/2)	1.11 (1)	0.18 ± 0.01**
ВосSerOPfp	»	0.56 (1/2)	1.31 (3/2)	8.2 ± 1.0
ВосLeuOPfp	»	0.57 (1/2)	1.36 (3/2)	10.6 ± 1.6
AcOPfp	»	0.58 (1/2)	1.49 (3/2)	7.7 ± 1.5
ВосIleOPfp	СНА	0.72 (1)	1.13 (1)	2.1 ± 2.0
AcOPfp	»	0.90 (1)	0.89 (1)	19.3 ± 3.5

* Экспериментальные кинетические данные аппроксимировали выражением $v = kC_N^a C_{AE}^b$, где k – константа скорости реакции, C_N – концентрация нуклеофильного реагента, C_{AE} – концентрация активированного эфира; k , a и b определяли по методу, описанному в работе [16].

** M^{-1/2} c⁻¹.

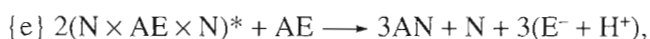
{b} Взаимодействие, следующее за этой инициацией цепи, аминокислоты N и комплекса (AE × N)* с образованием тройного активированного комплекса (N × AE × N)*. О возможности образования такого комплекса неоднократно упоминалось в работе Джонсона с соавт. [15].

{c} Взаимодействие тройного активированного комплекса (N × AE × N)* с активированным фторфениловым эфиром АЕ, что приводит к образованию продукта реакции AN, промежуточного соединения (AE × N)*, фенолята E⁻ и свободно-го протона H⁺.

{d} Взаимодействие двух тройных активированных комплексов (N × AE × N)* друг с другом, приводящее к их распаду на продукт реакции AN, свободную аминокислоту N, E⁻ и H⁺.

Эта гипотетическая схема реакций приводит к выражению (1) для скорости реакции. Активированные промежуточные состояния (помеченные звездочкой) могут представлять собой заряженные дипольные активированные промежуточные состояния.

Меняя последнюю реакцию схемы (2) (деактивацию активированного промежуточного состояния), мы можем получать различные порядки реакции. Например, если реакцию {d} заменить реакцией



выражение для скорости реакции превратится в

$$v = kC_N^{1/2} C_{AE}, \quad (3)$$

а если реакцию {d} заменить на реакцию



выражение для скорости реакции будет выглядеть как

$$v = kC_N C_{AE}^2. \quad (4)$$

Таким образом, полученные экспериментальные данные могут быть описаны одной и той же кинетической схемой (2) с добавлением, по меньшей мере, двух дополнительных реакций дезактивации активированных промежуточных состояний ({e} и {f}). Можно думать, что для реакций активированных эфиров Вос-защищенных Ala, Val, Phe, Ser, Leu и пентафторфенилацетата с LeuNH₂ процесс дезактивации идет в основном по пути {d}, для Gly, Met, Pro – по пути {e}, в то время как для Ile – по пути {f}.

Важным выводом проведенной нами работы является заключение о том, что прямой способ сравнения различных реакций пептидного синтеза с использованием кажущихся констант скоростей реакции часто оказывается неприемлем – механизм реакции в каждом конкретном случае может быть различным. Возможным решением этой проблемы может стать сравнение начальных скоростей этих реакций.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали фторфенолы 99% чистоты (Пермский филиал Института прикладной химии), Вос-защищенные аминокислоты и гидрохлорид лейцинамида (Reanal, Венгрия). Фторфениловые эфиры Вос-защищенных аминокислот синтезировали по ранее описанным методикам [6, 10, 18, 19]. Диметилформамид перегоняли под вакуумом с добавлением 0.5 г нингидрина на 1 л растворителя, хранили при 4°C. Триэтиламин перегоняли над гидроксидом калия.

Спектры флуоресценции измеряли при 20°C на лабораторном спектрофлуориметре, конструкция которого была описана ранее [20]. Флуоресценцию активированных эфиров возбуждали при 280.4 или 296.7 нм. Свет флуоресценции собирали с передней поверхности кварцевой кюветы. Для изучения кинетики реакций измеряли интенсивность флуоресценции при 375 нм как функцию времени после смешения растворов. Кажущиеся константы скорости реакций активированных эфиров определяли согласно механизмам реакций, описанным выше, с использованием схемы нелинейной регрессии [21].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nisen P., Hansen J., Ban N., Moore P.B., Steitz T.A. // *Science*. 2000. V. 289. P. 920–930.
2. Huber C., Wachtershauser G. // *Science*. 1998. V. 281. P. 670–672.
3. Boutin J.A., Gesson I., Henlin J.M., Bertin S., Lambert P.H., Volland J.P., Fauchere J.L. // *Mol. Divers.* 1997. V. 3. P. 43–60.
4. Fischer M., Tran C.D. // *Anal. Chem.* 1999. V. 71. P. 2255–2261.
5. Медведкин В.Н., Заболотских В.Ф., Пермьяков Е.А., Митин Ю.В., Сорокина М.Н., Клименко Л.В. // *Биоорган. химия*. 1995. Т. 21. С. 686–690.
6. Medvedkin V.N., Klimenko L.N., Mitin Y.V., Podgornova N.N., Bystrichenko A.V., Zabolotskikh V.F., Korobeinikova L.I., Pozdeeva V.V. // *Int. J. Peptide Protein Res.* 1994. V. 44. P. 477–484.
7. Gross E., Meienhofer J. *The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology*. New York: Academic Press, 1979. V. 1.
8. Atherton E., Sheppard R.C. *Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach*. Oxford: IRL Press at Oxford University Press, 1989.
9. Kovacs J., Cover R.E., Johnson R.H., Kalas T.J., Mayers G.L., Roberts J.E. // *J. Org. Chem.* 1973. V. 38. P. 2518–2521.
10. Kovacs J., Holleran E.M., Hui K.Y. // *J. Org. Chem.* 1979. V. 45. P. 1060–1065.
11. Kovacs J., Kim S., Holleran E., Gorycki P. // *J. Org. Chem.* 1985. V. 50. P. 1397–1502.
12. Kemp D.S., Choong S.L.H., Pekaar J. // *J. Org. Chem.* 1974. V. 39. P. 3841–3847.
13. Horiki K., Murakami A. // *Heterocycles*. 1989. V. 28. P. 615–622.
14. Menger F.M., Smith J.H. // *J. Am. Chem. Soc.* 1972. V. 94. P. 3824–3829.
15. Johnson S.L. // *Adv. Phys. Org. Chem.* 1967. V. 5. P. 237–330.
16. Permyakov E.A., Medvedkin V.N., Klimenko L.V., Mitin Y.V., Permyakov S.E. // *Int. J. Peptide Protein Res.* 1994. V. 44. P. 472–476.
17. Эмануэль Н.М., Кнорре Д.Г. *Химическая кинетика*. М.: Высшая школа, 1969.
18. Kisfaludy L., Cerpini M.Q., Racoczy B., Kovacs J. *Peptides, Proceedings of the Eighth Peptide Symposium*. Amsterdam: North Holland Publishing Co., 1967. P. 25–27.
19. Kisfaludy L., Roberts J.E., Johnson R.H., Mayuers G.L., Kovacs J. // *J. Org. Chem.* 1970. V. 35. P. 3563–3565.
20. Permyakov E.A., Burstein E.A., Sawada Y., Yamazaki Y. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1977. V. 491. P. 149–154.
21. Reich J.A., Wangerman G., Falk M., Rohde K. // *Eur. J. Biochem.* 1972. V. 26. P. 368–379.

Kinetics and Mechanism of the Peptide Synthesis in Solution

E. A. Permyakov[#], S. E. Permyakov, and V. N. Medvedkin[#]Phone: +7 (095) 924-5749, fax: (827) 79-0522, e-mail: permyakov@ibp.serpukhov.su

Institute of Biological Instrumentation, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

The kinetics of the reaction of Boc-Xaa fluorophenyl esters (where Xaa = Ala, Val, Phe, Ser, Leu, Gly, Met, Pro, or Ile) with leucinamide was studied measuring changes in the fluorescence emission at 375 nm of the fluorophenyl chromophore accompanying the reaction. It was found that the experimental kinetic data couldn't be described by a simple scheme of the second order reaction. The measurements of the kinetic parameters of the reaction at various initial concentrations of reagents indicated that the reaction rate can be expressed as:

$v = k C_N^a C_{AE}^b$, where k is the reaction rate constant, C_N is the concentration of leucinamide, and $LeuNH_2$, C_{AE} is the concentration of fluorophenyl ester. The a and b reaction orders were close to 1/2 and 3/2 for Xaa = Ala, Val, Phe, Ser, or Leu, 1/2 and 1 for Gly, Met, or Pro, and 1 and 2 for Ile. The experimental equations for the reaction rate can theoretically be derived from a single scheme of chain reactions with various deactivation ways for active intermediates. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: fluorescence; mechanism of the peptide bond formation; peptide fluorophenyl esters; peptide synthesis, reaction kinetics