



УДК 577.112.6 : 577.152.1'145.02

© 1991 г.

А. Н. Семенов, И. В. Ломоносова, В. И. Березин*,
М. И. Титов

КАТАЛИЗИРУЕМОЕ ПЕРОКСИДАЗОЙ И ЛАККАЗОЙ УДАЛЕНИЕ ФЕНИЛГИДРАЗИДНОЙ ЗАЩИТНОЙ ГРУППЫ В МЯГКИХ УСЛОВИЯХ

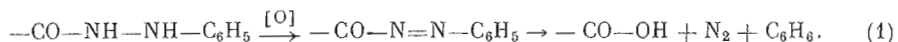
Совместное советско-германское предприятие «Константа», Москва;

* Научно-производственный кооператив «Биотехсервис», Москва

Предложен новый ферментативный способ удаления фенилгидразидной защитной группы с использованием ферментов класса оксидоредуктаз — пероксидазы и лакказы. Ферментативное деблокирование протекает при нейтральных или близких к нейтральным значениям pH при комнатной температуре. В качестве окислителей используются такие мягкие агенты, как кислород воздуха или 1 мМ H_2O_2 . Показано, что триптофан, тирозин и метионин — аминокислоты, наиболее чувствительные к окислению — не подвергаются модификации в процессе ферментативного деблокирования.

Неоднократно делались попытки использовать фенилгидразид в качестве защиты для карбоксильной группы при синтезе пептидов [1]. Были разработаны способы мягкого и селективного введения этой защиты при помощи ферментов [2—5]. Было также показано, что фенилгидразидная группа относится к типу так называемых потенциально активируемых защитных групп и может быть использована как для защиты, так и для последующей активации карбоксильной группы [4, 6]. Серию прекрасных работ по ферментативному синтезу пептидов с использованием фенилгидразидной защиты опубликовал Куллманн [7—9].

Тем не менее фенилгидразидная защита не нашла широкого применения в практике пептидного синтеза, главным образом вследствие того, что удаление этой защиты протекает в довольно жестких условиях. Все предложенные на сегодняшний день методы деблокирования включают в себя химическое окисление фенилгидразида до высокоактивного неустойчивого фенилдиимида с последующим самопроизвольным его распадом:



В качестве окислителей на первой стадии используют перманганат калия [2], хлорное железо [2, 3], иод [6], бромсукцинимид [4], двуокись марганца [1], тетраацетат свинца [4], ацетат меди [2]. При этом реакция с хлорным железом протекает в кислой среде, что ограничивает использование *трет*-бутильных и *трет*-бутилоксикарбонильных защитных групп. Реакция с двуокисью марганца приводит к окислению метионина на 67% [1], реакция с ацетатом меди протекает при 96—97° С [2]. Использование иода может вызывать модификацию циклических структур гистидина и тирозина [10]. Бромсукцинимид модифицирует триптофан [11]. Триптофан также может подвергаться неспецифическому окислению [12].

Таким образом, следует сделать вывод, что в настоящее время отсутствуют общие методы мягкого и селективного удаления фенилгидразидной защитной группы, пригодные для использования в пептидном синтезе.

В настоящей работе нами впервые показано, что для удаления фенилгидразидной защиты можно использовать ферменты класса оксидоредуктаз — пероксидазу и лакказу. При этом реакция деблокирования протекает в водном растворе при нейтральных или слабокислых значениях pH и при комнатной температуре. В качестве окислителей используются

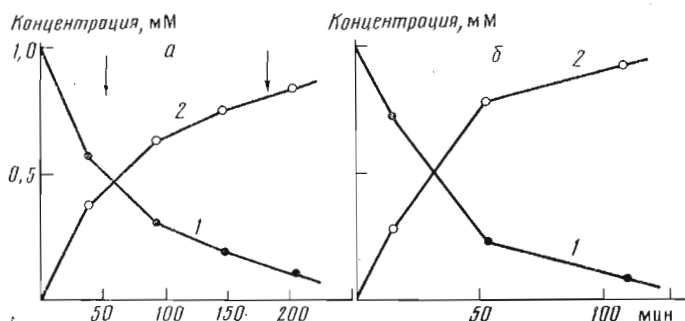


Рис. 1. Кинетика реакции деблокирования пептида Phe-Trp-Gly-NHNHC₆H₅, катализируемой пероксидазой (а) и лакказой (б). Приведено изменение в реакционной смеси концентрации защищенного трипептида (1) и деблокированного трипептида Phe-Trp-Gly (2). Условия реакции: 0,2 М натрий-ацетатный буфер, рН 4,0, 2% DMSO, объем смеси 1 мл, концентрация фермента $2,3 \cdot 10^{-6}$ М (а) и 50 мкг/мл (б). Исходная концентрация H₂O₂ (а) 0,88 мМ, стрелками отмечено добавление в реакционную среду 50 мкл 17,6 мМ H₂O₂

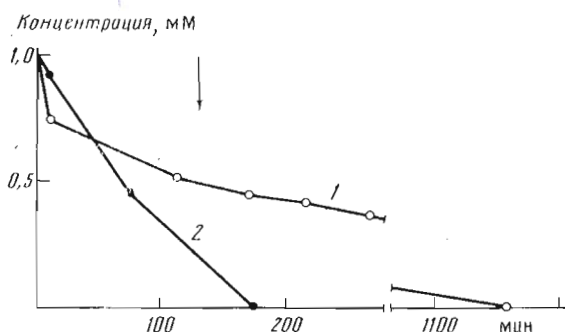


Рис. 2. Кинетика реакции деблокирования дипептида Glu(NHNHC₆H₅)-Gly-OMe, катализируемой пероксидазой (1) и лакказой (2). Условия реакции как на рис. 1

чрезвычайно мягкие агенты — разбавленная (не более 10^{-3} М) перекись водорода или кислород воздуха.

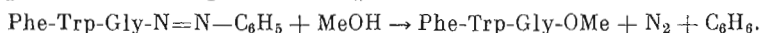
Способ ферментативного удаления фенилгидразидной защитной группы был апробирован нами на примере реакции деблокирования модельного трипептида Phe-Trp-Gly-NHNHC₆H₅. Продукт реакции идентифицирован методом ВЭЖХ путем сравнения с трипептидом, полученным независимым способом.

На рис. 1а представлены кинетические кривые, описывающие изменение во времени концентрации защищенного трипептида Phe-Trp-Gly-NHNHC₆H₅ (кривая 1) и деблокированного продукта Phe-Trp-Gly (кривая 2). Видно, что за 3,5 ч катализируемый пероксидазой процесс деблокирования протекает практически полностью. Важно отметить, что побочные продукты в реакционной смеси не обнаруживаются. На рис. 1б представлены аналогичные кинетические кривые, описывающие процесс деблокирования модельного трипептида в присутствии лакказы.

В отдельном эксперименте было показано, что в условиях ферментативного деблокирования не происходит изменений в структуре триптофана, метионина и тирозина — аминокислот, наиболее чувствительных к окислению.

Механизм ферментативного деблокирования, по-видимому, также включает в себя стадию окисления до высокоактивного и неустойчивого фенилдиимида с последующим самопроизвольным его распадом (см. реакцию 1). В пользу этого предположения указывают два экспериментальных факта: 1) в реакционной смеси методом ВЭЖХ зафиксировано образование бензола, 2) в присутствии метанола среди продуктов реакции появ-

ляется Phe-Trp-Gly-OMe, что можно объяснить участием метанола на стадии распада активированного фенилгидрида:



Нами также показано, что пероксидазу и лакказу можно использовать для удаления фенилгидразидной защиты, блокирующей боковые карбоксильные группы (рис. 2). Для этой цели был синтезирован модельный дипептидный субстрат Glu(NHNHC₆H₅)-Gly-OMe, в котором γ-карбоксильная группа глутаминовой кислоты защищена фенилгидразидом. Из рис. 2 видно, что в случае, например, лакказы процесс деблокирования протекает полностью за 3 ч.

Таким образом, в настоящей работе впервые показано, что удаление фенилгидразидной защитной группы можно выполнять с использованием ферментов в мягких условиях. Введение в арсенал методов пептидного синтеза защит, селективно удаляемых в мягких окислительных условиях, способствует построению полностью ортогональной системы защитных групп. Кроме того, настоящая работа является первым примером использования ферментов класса оксидоредуктаз для целей пептидного синтеза.

Экспериментальная часть

В работе использовали пероксидазу из хрена (КФ 1.11.1.7; *R_z* 2,8; производство НПО «Биолар», г. Олайне), лакказу из *Coriolus hirsutus* (КФ 1.10.3.2; производство НПК «Биотехсервис», Москва; уд. акт. 80 ед./мг (2,5 мг/мл)), фенилгидразин (Союзреактив), глицин, фенилаланин, глутаминовую кислоту, триптофан, метионин, тирозин, дициклогексилкарбодиимид, *para*-нитрофенол (Fluka). Субстраты были синтезированы методами классического пептидного синтеза в растворе. Анализ реакционной смеси проводили методом ВЭЖХ на хроматографе Gilson с использованием колонки (4,6 × 250 мм) Chromatronix ODS в градиенте 0,05 М фосфатный буфер (рН 3,0) — ацетонитрил. Количественную обработку хроматограмм выполняли на интеграторе Hewlett Packard] HP 3996A. Условия реакции приведены в подписях к рисункам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kelly R. B. // J. Org. Chem. 1963. V. 28. № 2. P. 453—459.
2. Milne H. B., Halver J. E. // J. Amer. Chem. Soc. 1957. V. 79. № 3. P. 637—645.
3. Milne H. B., Peng C.-H. // J. Amer. Chem. Soc. 1957. V. 79. № 3. P. 645—653.
4. Milne H. B., Most C. F. // J. Org. Chem. 1968. V. 33. № 1. P. 169—175.
5. Čerovsky V., Jost K. // Collect. Czech. Chem. Commun. 1984. V. 49. № 11. P. 2257—2264.
6. Milne H. B., Kilday W. // J. Org. Chem. 1965. V. 30. № 1. P. 64—68.
7. Kullmann W. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 17. P. 8234—8240.
8. Kullmann W. // J. Org. Chem. 1982. V. 47. № 27. P. 5300—5309.
9. Kullmann W. // J. Protein Chem. 1983. V. 2. № 4. P. 289—296.
10. Торчинский Ю. М. Сера в белках. М.: Химия, 1977. С. 50.
11. Kitagawa H., Harada T. // J. Biochem. 1975. V. 77. № 3. P. 575—583.
12. Alexander N. M. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1973. V. 54. № 2. P. 614—620.

Поступила в редакцию
31.1.1991

A. N. SEMENOV, I. V. LOMONOSOVA, V. I. BEREZIN*, M. I. TITOV

PEROXIDASE- AND LACCASE-CATALYZED REMOVAL OF PHENYLHYDRAZIDE PROTECTING GROUP UNDER MILD CONDITIONS

USSR-Germany Joint Venture «Constanta», Moscow;

* Science Engineering Co-operative «Biotechservis», Moscow

A new enzymatic way of removing phenylhydrazide protecting group by the oxidoreductase (peroxidase, laccase) treatment is suggested. The enzymatic oxidation occurs in aqueous solutions at neutral or nearly neutral pH values at room temperature, with the air oxygen or 1 mM hydrogen peroxide as mild oxidizing agents. It was shown that tryptophan, tyrosine and methionine, amino acids most sensitive to oxidation, are not affected during the enzymatic deprotection.