



УДК 577.112.6;577.152.34.135

ЭТЕРИФИКАЦИЯ *N*-БЕНЗИЛОКСИКАРБОНИЛАЛАНИНА СОРБИТОМ, КАТАЛИЗИРУЕМАЯ ПАПАИНОМ

© 1999 г. Ю. В. Митин[#], И. А. Кашпаров, П. Куль*, Д. Шеллер**

Институт белка РАН, 142292, Пущино Московской обл.;

* Технический университет Дрездена, Институт биохимии;

** Институт органической химии, Дрезден, Германия

Поступила в редакцию 25.05.98 г.

Принята к печати 19.10.98 г.

Синтез эфира *N*-бензилоксикарбонилаланина с сорбитом (Cbz-Ala-OGlc-ol) проведен в присутствии папаина при 40°C при 10-кратном и более молярном избытке сорбита. Максимальный выход эфира получен при содержании воды 5% и pH 3–4. Для обеспечения гомогенности среды в реакционную смесь добавляли 20% диметилсульфоксида. Эфир *N*-бензилоксикарбонилаланина хорошо растворяется в воде и может быть использован в качестве субстрата трипсина.

Ключевые слова: папаин; ферментативная этерификация; трипсин.

Эфиры аминокислот, способные к образованию водородной связи с трипсином по его S₂ положению, проявляют хорошие субстратные свойства даже при отсутствии положительного заряда в боковом радикале аминокислоты. Такие эфиры можно использовать для катализируемого трипсином синтеза пептидов [1]. Типичными представителями такого типа эфиров являются карбоксамидометилловые эфиры (Сам-эфиры) [2, 3]. Однако применение Сам-эфиров для этих целей затруднено из-за их низкой растворимости в воде. Недавно мы описали катализируемый папаином синтез глицерилловых эфиров *N*-защищенных аминокислот [4], растворимость которых в воде выше растворимости соответствующих Сам-эфиров. Однако растворимость в воде глицерилловых эфиров гидрофобных аминокислот (Phe, Leu, Tyr и др.) также была низкой. Мы предположили, что эфиры высших полиолов, в частности легко доступного сорбита, будут обладать более высокой растворимостью.

Химический синтез эфиров полиолов затруднен вследствие их полифункциональности, поэтому мы решили для этих целей использовать ферментативный подход. Существующие приемы ферментативного синтеза эфиров аминокислот [5–8] не могут быть применены к синтезу эфиров на основе сорбита. Наиболее подходящим ферментом казался папаин, обладающий очень широкой специфичностью, использованный нами ранее в синтезе глицерилловых эфиров [4]. Глице-

рин при этом выступал одновременно в качестве растворителя. Сорбит же представляет собой кристаллическое вещество с температурой плавления 94–96°C, трудно растворимое в обычных органических растворителях и ограниченно растворимое в воде, поэтому для создания гомогенной среды мы использовали в качестве добавки диметилсульфоксид (DMSO) (до 40%) и водный буфер (до 25% воды в инкубационной смеси). Другие органические растворители (диметилформамид, ацетонитрил, тетраметилмочевина) не дают желаемого эффекта.

Влияние концентрации диметилсульфоксида в реакционной смеси на выход эфира бензилоксилаланина представлено на рис. 1. Максимальный выход продукта получен при содержании DMSO 20%, при меньшей его концентрации часть сорби-

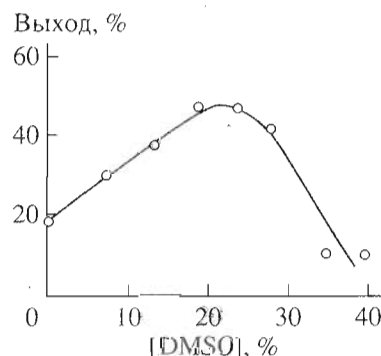


Рис. 1. Зависимость выхода Cbz-Ala-OGlc-ol от концентрации DMSO. Условия: 0.25 М Cbz-Ala-OH, 10% H₂O (в буфере А), 20 мг/мл папаина, 40°C, 20 ч.

[#] Автор для переписки (факс: (095) 924-04-93; e-mail: mitin@vega.protres.ru).

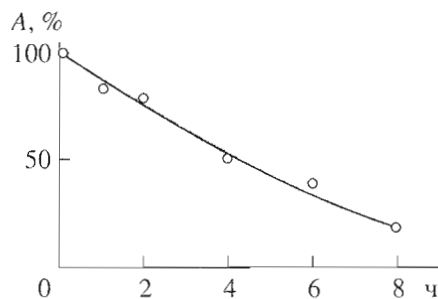


Рис. 2. Изменение активности папаина во времени. Условия: 0.2 М Cbz-Ala-OH, 10.6% H₂O (в буфере А), 21.2% DMSO, 20 мг/мл папаина, 40°C.

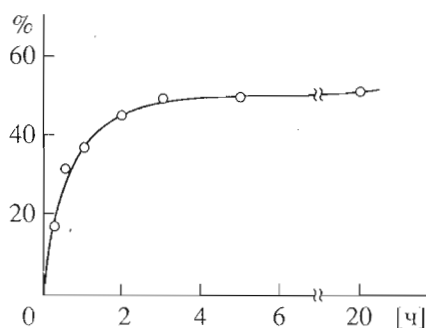


Рис. 4. Зависимость выхода Cbz-Ala-OGlc-ol от времени. Условия: 0.2 М Cbz-Ala-OH, 10.5% H₂O (в буфере А), 19% DMSO, 20 мг/мл папаина, 40°C.

та выкристаллизовывается и система остается гетерогенной, а падение выхода Cbz-Ala-OGlc-ol при повышении концентрации DMSO, вероятно, можно объяснить его денатурирующим воздействием на папаин. Следует отметить, что даже при оптимальном содержании DMSO в системе (20%) активность папаина со временем быстро падает и через 9–10 ч фермент практически полностью инактивируется (рис. 2).

Содержание воды в системе также сильно влияет на выход Cbz-Ala-OGlc-ol (рис. 3), что понятно, так как мы имеем дело с равновесной реакцией. Чем меньше воды, тем больше выход эфира, однако при концентрации воды менее 5% выход Cbz-Ala-OGlc-ol резко падает по причине инактивации папаина. Равновесие в реакции Cbz-Ala-OH + Glc-ol \rightleftharpoons Cbz-Ala-OGlc-ol + H₂O наступает при 40°C через 3–4 ч (рис. 4), то есть когда папаин еще достаточно активен (около 50% активности, рис. 2). Добавление свежей порции папаина не сказывается на выходе эфира.

При выбранных концентрациях DMSO и воды выход Cbz-Ala-OGlc-ol в зависимости от мольного отношения сорбит–Cbz-Ala-OH представлен на рис. 5, из которого ясно, что более чем 10-крат-

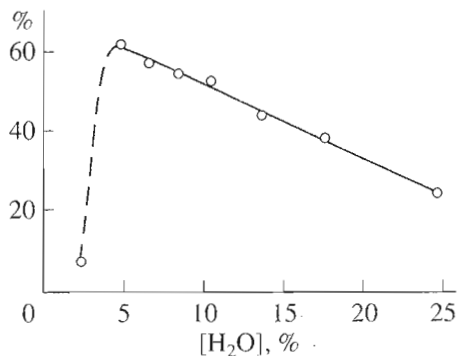


Рис. 3. Зависимость выхода Cbz-Ala-OGlc-ol от концентрации воды. Условия: 0.2 М Cbz-Ala-OH, 20% DMSO, 20 мг/мл папаина (буфер А), 40°C, 5 ч.

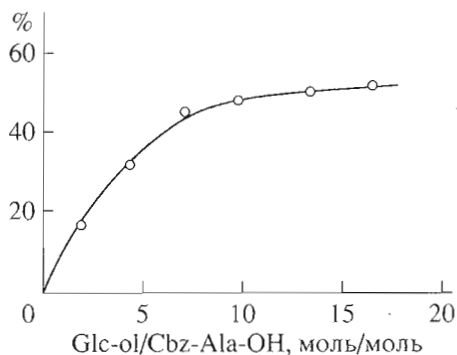


Рис. 5. Зависимость выхода Cbz-Ala-OGlc-ol от мольного отношения сорбит/Cbz-Ala-OH. Условия: 20.7% DMSO, 20 мг/мл папаина, 10.3% H₂O (в буфере А), 40°C, 19 ч.

ный мольный избыток сорбита нецелесообразен. Зависимость выхода Cbz-Ala-OGlc-ol от pH определить довольно трудно: наблюдается значительный разброс точек (рис. 6), но все же можно сделать вывод, что оптимальное значение кажущегося pH лежит в интервале 3–4.

Следует отметить, что эфиры сорбита лучше всего получаются для простых аминокислот: гли-

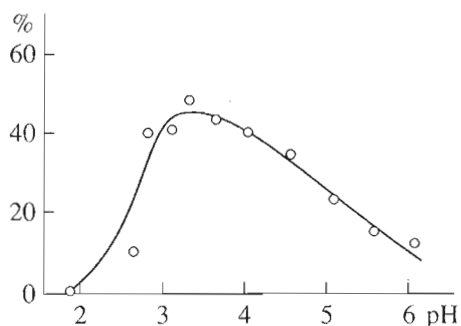
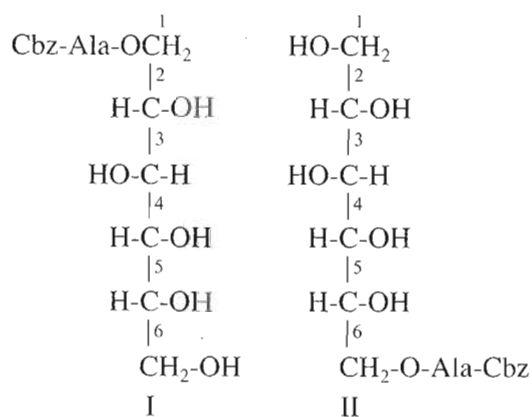


Рис. 6. Зависимость выхода Cbz-Ala-OGlc-ol от pH буфера. Условия: 0.2 М Cbz-Ala-OH, 10.3% H₂O, 20.6% DMSO, 20 мг/мл папаина, 40°C, 16 ч. Буфер: 1 М лимонная кислота + 1 М NaOH.

цина, аланина, серина (выход 40–50%), для таких аминокислот, как фенилаланин, лейцин, метионин выход эфира составляет всего ~10–20%.

При фракционировании реакционной смеси после синтеза Cbz-Ala-OGlc-ol с помощью ВЭЖХ (см. “Эксперимент. часть”), был получен единственный пик продукта, строение которого было определено с помощью ЯМР (табл. 1).



Видно, что полученный эфир является смесью структур I и II. Структуры определены с помощью одно- и двумерной ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии. В качестве стандартного соединения использовали *D*-сорбит. Полученные данные для сорбита, а также для полиольной части Cbz-Ala-OGlc-ol приведены в табл. 1.

Для оценки эфиров полиолов в качестве субстратов трипсина мы сравнили скорости гидролиза ряда эфиров аланина общей структуры Cbz-Ala-OCH₂(CHОН)_{*n*}-CH₂ОН при *n* = 0, 1, 2, 3, 4. Для сравнения выбран эфир Cbz-Ala-OSam, являющийся довольно хорошим субстратом трипсина [3]. Как видно из табл. 2, эфиры полиолов по своей реакционной способности уступают Сам-эфиру. Но, начиная с эфира глицерина, все изученные эфиры имеют приблизительно одинаковую относительную скорость гидролиза 0.31–0.36.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали производные аминокислот (Reanal, Венгрия и Fluka, Швейцария), сорбит (Реахим, Россия), эритрит – (Fluka, Швейцария), адонит – Chemapol (Чехия). ТСХ проводили на пластинках (Merck, Германия) в системе хлороформ–метанол–уксусная кислота (80 : 20 : 2), ВЭЖХ – на хроматографе LKB (Швеция), колонка Sерагоп С18 (Чехия), градиент Н₂О → метанол (15–100%, 20 мин, 0.1% TFA), 1 мл/мин, детектирование при 254 нм. В работе использован автотитратор Radiometer (Дания). ЯМР-анализ для растворов в DMSO-*d*₆ проведен на установке DR × 500 Bruker (Германия). ¹H-спектр при 500 МГц, ¹³C-спектр при 125 МГц.

Таблица 1

Номер атома	<i>D</i> -Сорбит		Структура I		Структура II	
	δ(¹ H)	δ(¹³ C)	δ(¹ H)	δ(¹³ C)	δ(¹ H)	δ(¹³ C)
1(1')	3.45, 3.34	62.52	4.17/4.00	66.50	3.46, 3.34	62.47
2	3.54	73.78	3.77	70.72	3.55	73.62
3	3.67	68.83	≤3.68	69.43	≥3.68	68.58
4	3.39	72.31	≤3.41	72.15	≥3.41	71.09
5	3.48	71.45	3.46	71.48	3.72	68.55
6(6')	3.57, 3.36	63.42	3.58, 3.36	63.37	4.23, 4.15	67.21

Таблица 2. Относительная скорость гидролиза эфиров полиолов Cbz-Ala-OCH₂(CHОН)_{*n*}-CH₂ОН в присутствии трипсина (условия – см. “Эксперимент. часть”)

Название полиола	<i>V</i> _{отн}
Карбоксиамидометанол (Сам-ОН)	1.00
Этиленгликоль	0.14
Глицерин	0.32
<i>мезо</i> -Эритрит	0.34
Адонит (<i>D</i> -рибит)	0.36
<i>D</i> -Сорбит	0.31

Типовая методика синтеза Cbz-Ala-OGlc-ol.

Смесь 2 г (11 ммоль) сорбита, 0.22 г (1 ммоль) Cbz-Ala-ОН, 0.6 мл DMSO и 0.3 мл 1 М цитрат-фосфатного буфера, рН 3.8 (буфер А), нагревали до образования гомогенной массы. Раствор охлаждали до 40°С и к нему добавляли 0.2 мл раствора 50 мг папаина и 20 мг цистеина в буфере А. Смесь (3 мл) оставляли на ночь. К реакционной смеси добавляли 10% раствор NaHSO₄, встряхивали с 30 мл эфира. Раствор экстрагировали *n*-бутанолом (40 мл × 2). Бутанольный раствор промывали водой (20 мл), бутанол отгоняли в вакууме, остаток растирали с эфиром, затем Cbz-Ala-OGlc-ol очищали с помощью колоночной хроматографии в системе хлороформ–метанол–уксусная кислота (80 : 20 : 2). Выход 0.18 г (47%), т. пл. 109–113°С, *R*_ф 0.29.

Аналогично синтезировали Cbz-Gly-OGlc-ol, выход 25%, *R*_ф 0.25, т. пл. 86–90°С; Cbz-Ser-OGlc-ol, выход 40%, *R*_ф 0.19, вязкий.

Для сравнения реакционной способности эфира Cbz-аланина с сорбитом синтезировали также эфир с эритритом: выход 23%, *R*_ф 0.48, т. пл. 106–110°С, с адонитом: выход 62%, *R*_ф 0.50, т. пл. 95–97°С, с этиленгликолем [9] и глицерином [4].

Для определения изменения активности папаина в ходе синтеза отбирали аликвоты реакционной массы (по 50 мг), растворяли их в 0.05 мл 1 М К-фосфатного буфера, рН 6.2, и добавляли 2 мл 0.05 М раствора этилового эфира бензоиларгинина в том же буфере, титровали 0.1 М NaOH.

Гидролиз эфиров полиолов в присутствии трипсина. К раствору 50 мкмоль эфиров Cbz-Ala-OR (см. табл. 2) в 0.2 мл ацетонитрила, добавляли 1.7 мл буфера Б, затем раствор 2 мг трипсина – в 0.1 мл того же буфера. Титрование производили 0.1 н. NaOH. Буферный раствор готовили из 50 мл 0.05 М CaCl₂ добавлением 0.2 мл 1 М лимонной кислоты и 0.5 М NaOH до pH 6.0.

ЯМР-анализ Cbz-Ala-остатка в структурах I и II: ¹H-спектр: δ 7.72 (д, -NH-), 7.31–7.36 (м, -C₆H₅), 5.03 (с, C₆H₅-CH₂-), 4.11/4.13 (квинтет, -NHCH(CH₃)- в I/II), 1.28/1.29 (д, -NHCH(CH₃)- в I/II). ¹³C-спектр: δ 172.86/172.95 (-CO-O- в I/II), 155.83 (-O-CO-NH-), 136.94; 128.36; 127.83; 127.77 (аром. С), 65.46 (C₆H₅-CH₂-O-), 49.37 (-NH-CH(CH₃)-), 17.12 (-CH₃).

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и немецкого научно-исследовательского общества (гранты № 96-03-00039 и 436 Rus 113/402/0 (R)).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mitin Yu.V., Zapevalova N.P., Gorbunova E.Yu. // Biomed. Biochim. Acta. 1991. V. 50. P. 74–79.
2. Mitin Yu.V., Gorbunova E.Yu., Evgrafova N.I., Zapevalova N.P. Peptides, 1992. B. V. Leiden: Escom Science Publishers, 1993. P. 417–418.
3. Митин Ю.В., Запеевалова Н.П., Зайцева О.Р., Горбунова Е.Ю. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 310–315.
4. Mitin Yu.V., Braun K., Kuhl P. // Biotech. Bioeng. 1997. V. 54. P. 287–290.
5. Cantacuzene D., Pascal F., Guerreiro C. // Tetrahedron. 1987. V. 43. P. 1823–1826.
6. Kiese H., Shirato H. // Tetrahedron Lett. 1985. V. 26. P. 6081–6084.
7. Kiese H., Hayakawa A., Noritomi H. // Biotechnol. Lett. 1987. V. 9. P. 543–548.
8. Tai D.-F., Fu S.-L., Chuang S.-F., Tsai H. // Biotechnol. Lett. 1989. V. 11. P. 173–176.
9. Cantacuzene D., Guerreiro C. // Tetrahedron Lett. 1987. V. 28. P. 5153–5156.

Papain-catalyzed Esterification of *N*-Benzyloxycarbonylalanine with Sorbitol

Yu. V. Mitin^{*,#}, I. A. Kashparov^{*}, P. Kuhl^{**}, and D. Scheller^{***}

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

^{**}Institute of Biochemistry, Technical University of Dresden, Dresden, 01062 Germany

^{***}Institute of Organic Chemistry, Dresden, 01062 Germany

N-Benzyloxycarbonylalanine was esterified with sorbitol in the presence of papain at 40°C at a tenfold and higher molar excess of sorbitol to give Cbz-Ala-OGlc-ol. The highest yield of the ester was obtained at 5% water concentration and pH 3–4. To insure the homogeneity of the reaction mixture, 20% DMSO was added. The resulting ester is readily soluble in water and can be used as a trypsin substrate.

Key words: papain, enzymic esterification, trypsin

[#] To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (095) 924-0493; e-mail: mitin@vega.protres.ru.