

Дизайн и синтез на Boc-Thr[Z-Phe(NO₂)]-OMe като субстрат за моделните реакции на ензимо-химичен семисинтез на човешки инсулин

Станислав Байрямов

Design and synthesis of Boc-Thr(Z-Phe(NO₂)-O)-OMe as a substrate for the model reactions of chemo-enzymatic semisynthesis of human insulin: In the paper we describe the synthesis of Boc-Thr(Z-Phe(NO₂)-O)-OMe as a substrate for the model biomimetic reactions, trying to prove the role of the acyl transfer and acyl migration, during the trypsin-catalyzed chemo-enzymatic semisynthesis of human insulin. The substrates were designed to mimic the aminolysis reaction between the acyl-enzyme intermediate (trypsin-DAI or trypsin-Des-(Ala-B30)-Porcine insulin), formed during the first stage of the chemo-enzymatic semisynthesis and H-Thr-OMe. We propose that actually it proceeds via transesterification (O-O-Acyl transfer) reaction with consequently forming of a precursor of the human insulin methyl ester, and intramolecular rearrangement by aminolysis (O-N-Acyl migration) with the human insulin methyl ester creation. We hope that the designed and synthesized substrate will be successful for the kinetic studies of the models reactions for the elucidation of the mechanism of trypsin action during the chemoenzymatic semisynthesis of human insulin. We hope that the mechanism will contribute to the revealing and evaluation of the prodrugs role in the conventional drug therapy, as well as to discover a novel class of prodrugs, transforming to real drugs by a variety types of synthon and functionality migration in the human body.

Key words: chemo-enzymatic semisynthesis, human insulin, porcine insulin, trypsin., model reactions, biomimetic chemistry, acyl transfer, acyl migration.

ВЪВЕДЕНИЕ

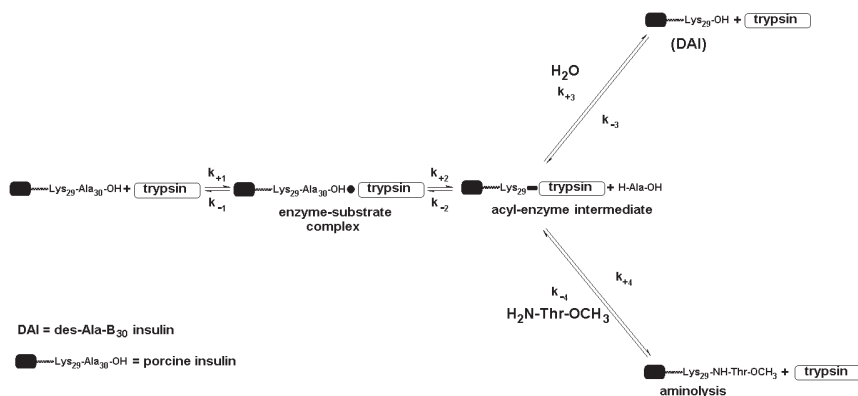
Семисинтезът на човешки инсулин от свинския му предшественик е един от методите за промишлено получаване на човешки инсулин. Един от най-успешните начини на това превръщане е въведен и разработен от Jan Markussen. Методът на Jan Markussen [1÷7] представлява директна трансформация (превръщане) на свински инсулин в човешки с помощта на трипсин, при което се осъществява едноетапна замяна на Ala³⁰ с Thr³⁰ в В-веригата. Цялата реакция протича на 1 етап. При този синтезен протокол свинският инсулин, разтворен в разтвор на CH₃COOH се инкубира с трипсин, разтворен във воден разтвор на калциев ацетат (Ca(OAc)₂) и излишък от H-Thr-OMe разтворен в органичен разтворител. Поради факта, че не е ясен точният механизъм на протичане на семисинтезната реакция, се налага провеждането на механистични изследвания със синтезирани нискомолекулни пептидомиметици на инсулина с цел-оптимизиране на реакционните условия, както и увеличаване добивите на крайния продукт.

Целта на настоящата работа е дизайн и синтез на субстрат за моделните реакции на ензимо-химичен семисинтез на човешки инсулин с цел-провеждането на кинетични изследвания, които биха могли да дадат принос за механистични изследвания на тази реакция.

ИЗЛОЖЕНИЕ

Ензимният семисинтез на човешки инсулин (HI) се провежда чрез ензимно транспептидиране на свински инсулин, т.е. директен метод за ензимна трансформация на свински / говежди инсулин в човешки инсулин (Фиг.1). Предполага се, че реакцията протича като аминоклизи на получения десаланилинсулиниленим (дес-Ala³⁰-инсулинил-ензим, E-des-Ala³⁰-PI). Поради ниския рН на протичане на реакцията (рН~5-6) обаче, се предполага, че тя протича като трансестерификация на десаланилинсулиниленизима и последваща миграция на десаланилинсулиновата група (дес-Ala³⁰-инсулинил-синтона) при алкално третиране. Доказването на този трансестерификационен механизъм, чрез кинетични изследвания на моделната реакция ще бъде описано в друга работа. Установяването на този механизъм ще позволи да се подберат условия за

провеждане на реакцията на трансестерификация, което ще създаде възможности за подобряване на условията на реакцията на ензимен семисинтез на човешки инсулин.

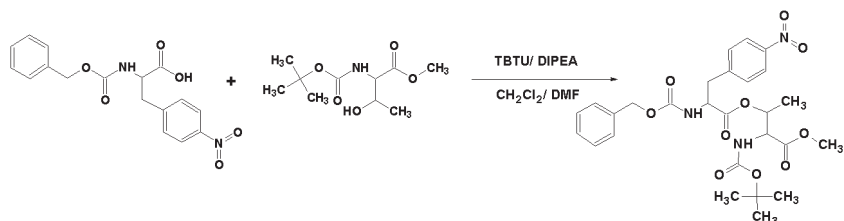


Фиг.1. Реакционна схема на ензимохимичен семисинтез на човешки инсулин, посредством директно транспептидиране на свинския му предшественик.

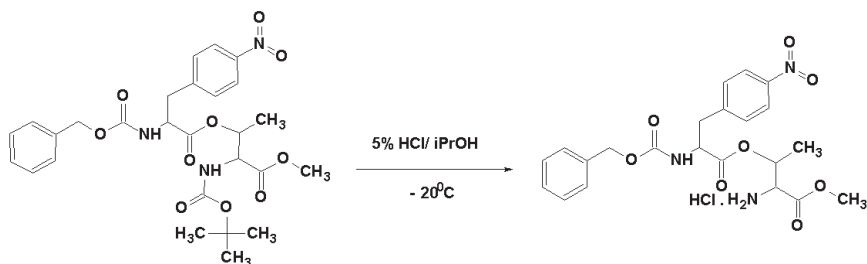
Реакцията може да се моделира като се използва N^{α} -защитен *p*-нитрофенилаланин като мимика на дес-Ala³⁰-инсулина, който при реакция с Н-Thr-ОМе да дава аналог на Нl-ОМе (метилов естер на човешкия инсулин). За полупостоянна защита на алфа-аминогрупата на *p*-нитрофенилаланина беше избрана карбобензоксигрупа (бензилоксикарбонилна група, Z), за да бъде стабилна при всичките условия на синтез и провеждане на кинетичните експерименти. L-Thr беше защитен при алфа-аминогрупата с временната Вос-защита, стабилна в алкална и нестабилна в кисела среда. Причината за това е, че в условията на синтез на субстрата, тази група трябва да бъде стабилна, а непосредствено преди кинетичните експерименти е необходимо тя да бъде свалена в кисела среда. Алфа-карбоксилната група беше защитена с полупостоянна защита посредством метилиране.

Защитените по този начин аминокиселини: Z-Phe(NO₂)-OH и Вос-Thr-ОМе кондензират помежду си с помощта на TBUT/DIPEA в смесена среда от два разтворителя: CH₂Cl₂/DMF, при което се аминокиселинира страничната HO-група на L-Thr с образуване на естерна връзка. По този начин се получава пептидомиметик на дипептида: Z-Phe(NO₂)-Thr-ОМе (като естер, подобен на депсипептидите) (Фиг.2). По-нататък Вос-групата на треонина се сваля, като се получава свободна аминокиселина като хлороводородна сол* (синтез на H-Thr(Z-Phe(NO₂)-O)-ОМе.HCl) (Фиг.3). Именно по този начин се подготвя субстратът за кинетични изследвания на моделната реакция, при която след алкализирание на средата и освобождаване на аминокиселината от нейната сол, би трябвало да се реализира O-N-ацилна миграция, която се осъществява (както се предполага) и при семисинтеза на човешки инсулин.

* Данните от анализа на съединението, получено вследствие на свалянето на Вос-групата и получаването на свободна аминокиселина като хлороводородна сол ще бъдат дадени в друга публикация, тъй като по този начин субстратът непосредствено се подготвя за кинетични изследвания на моделната реакция.



Фиг.2. Синтез на Boc-Thr(Z-Phe(NO₂)-O)-OMe като субстрат за моделните реакции на ензимо-химичен семисинтез на човешки инсулин.



Фиг.3. Синтез на H-Thr(Z-Phe(NO₂)-O)-OMe.HCl, вследствие деблокиране на α-NH₂ групата при треониновия остатък на неговия предшественик*.

Дизайнираният по този начин субстрат беше синтезиран, прилагайки по-долу описаната опитна постановка.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

Обърнато-фазовите HPLC-анализи са извършени на течен хроматограф "Waters", снабден с абсорбционен детектор модел 441 при дължина на вълната 254 nm и колона Nucleosil 100-5C₁₈ (12.5 cm x 4.6 mm) за аналитични цели.

¹H и ¹³C NMR спектрите са снети и обработени на Bruker Avance II+ 600MHz spectrometer, използвайки BBO или TBI сондиране и изследване. Химичните отмествания са изразени в единици ppm и константите на спин-спиново взаимодействие са обозначени в Hz. Прецизните определения на ¹H и ¹³C NMR спектрите са извършени чрез изчисляване на 2D хомоядрената корелация (COSY), DEPT-135 и 2D обрнатите (противоположните) детектирани хетероядрени (C–H) корелации (HSQC and HMBC). TLC анализите са проведени с използване на силикагелни пластинки Kieselgel 60 F₂₅₄, закупени от Merck, като за индикация на петната и визуална детекция са използвани 5% разтвор на H₂SO₄ в метанол или етанол, а също така алкохол разтвор на нинхидрин, както и разтвор на фосфор-молибденова киселина. За провеждане на TLC анализите бяха използвани следните системи от разтворители: CH₂Cl₂ : MeOH (9:1) или (9.5:0.5). Крайните продукти бяха определени чрез елементарен анализ, използвайки автоматични анализатори: Carlo Erba Elemental Analyzer Model 1106 (Carlo Erba, Milan, Italy) и Perkin-Elmer Elemental Analyzer Model 240 (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, Connecticut).

Опитна постановка:

Синтез на Boc-Thr(Z-Phe(NO₂)-O)-OMe: Към 3.44гр. (0.01mol, Mw=344.32g/mol) Z-Phe(NO₂)-OH, разтворени в дихлорметан и диметилформамид (9:1 v/v), се прибавят бавно на капки 1.74ml (1.29g, d₄²⁰=0.742, 0.01mol, Mw=129.25g/mol) DIPEA, на ледена баня (при 0°C) и при енергично разбъркване. След 10-15 мин. към

реакционната смес се добавят 3.21гр. (0.01mol, Mw=321.08g/mol) TBTU. След около 30 мин. към получения разтвор се добавят 2.57гр. (0.011mol, Mw=233.26g/mol) Boc-Thr-OMe, като реакционната смес се оставя за 10 мин. при 0°C, след което бавно и постепенно се допуска реакционната температура да се повиши и да се изравни със стайната. Реакционната смес се оставя да се разбърква при стайна температура за 2.5-3 часа след което разтворителят се изпарява. Полученото масло се разтваря отново в дихлорметан, промива се по няколко пъти с 0.2N HCl, наситен разтвор на натриев бикарбонат (~10% NaHCO₃) и наситен разтвор на NaCl. Органичният слой се суши над Na₂SO₄, след което се изпарява под вакуум. Сухият остатък (масло) кристализира и се прекристализира из етилов спирт или етер, след което се филтрува и суши под вакуум на стайна температура.

Добив: 5,37гр. (96%). Rf-0.83. (CH₂Cl₂ : MeOH - 9:1), Rf-0.67. (CH₂Cl₂ : MeOH – 9.5:0.5). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 15.63(CH₃, β-CH₃, Thr); 28.28 (3-CH₃, Boc, Thr); 37.84(CH₂, β-CH₂, Phe); 53.44(CH₃, COOCH₃, Thr); 54.51(CH, α-CH, Phe); 55.87(CH, α-CH, Thr); 67.03(CH₂, Z, Phe); 70.53(CH, β-CH, Thr); 79.84(C, Boc, Thr); 123.58(3-CH and 5-CH, Ar, Phe(NO₂)); 127.40(4-CH, Ar, Z, Phe); 127.87(2-CH and 6-CH, Ar, Z, Phe); 128.55(3-CH and 5-CH, Ar, Z, Phe); 130.26(2-CH and 6-CH, Ar, Phe(NO₂)); 136.26(1-C, Ar, Z, Phe); 144.13(1-C, Ar, Phe(NO₂)); 146.98(4-C, Ar, Phe(NO₂)); 152.52(CO, Boc, Thr); 155.49(CO, Z, Phe); 169.41(CO, Phe); 172.72(C, COOCH₃, Thr).

Елементен анализ: Anal. Calculated for C₂₇H₃₃N₃O₁₀: (Mw = 559,57 g/mol); C-57.95%, H-5.94%, N-7.51%; found: C-57.89%, H-5.97%, N-7.53%. Rt = 11,523 min. Flow rate: 0,8ml/min (CH₃CN : 20mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ buffer - 50:50).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наред с рекомбинантните ДНК-технологии, с помощта на които биосинтетично се получава човешкият инсулин, семисинтезът на човешки инсулин от свинския му предшественик по метода на Jan Markussen е един от начините за промишлено получаване на човешки инсулин. Механизмът на тази реакция все още не е напълно изяснен, поради което е необходимо да се проведат допълнителни кинетични изследвания на биомиметичната реакция с нискомолекулни субстрати. В настоящата работа авторът описва синтез на Boc-Thr(Z-Phe(NO₂)-O)-OMe като субстрат за моделните реакции на ензимо-химичен семисинтез на човешки инсулин, с помощта на които, авторът се надява да допринесе за механистичните изследвания относно тази важна за индустрията ензимна реакция, с която се инженеря инсулиновата молекула.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Markussen, J. US patent 4,343,898. Priority, Feb.11, 1980.
- [2] Markussen, J. and K. Schaumburg. (1983). Reaction mechanism in trypsin catalyzed synthesis of human insulin studied by ¹⁷O-NMR spectroscopy. In Blaha, K. and Malon, P. (eds.) Peptides 1982. Proceedings of the 17th European Peptide Symposium. 387-394. (Berlin, New York: Walter de Gruyter).
- [3] Markussen, J. and Volund, A.(1983). Kinetics of tryptic transpeptidation of insulins. In Hruby, V. J. and Rich, D. H. (eds.) Peptides. Structure and Function. Proceedings of the eighth American Peptide Symposium. 207-210. (Rockford Ill.: Pierce Chemical Company).
- [4] Markussen, J. and Volund, A.(1983). Kinetics of trypsin catalysis in the industrial conversion of porcine insulin to human insulin. In Porter, R. And Clark, S. (eds.) Enzymes in Organic Synthesis. Ciba Foundation Symposium 111, 188-203. (London: Pitman).
- [5] Markussen, J., Jorgensen, K. H., Sorensen, A. R. and Thim, L. (1985). Single chain des-(B30) insulin. Intramolecular crosslinking of insulin by trypsin catalyzed transpeptidation. Int. J. Pept. Protein Res., 26, 70-77.

[6] Markussen, J., Fiil, N., Thim, L., Norris, K., Voigt, H. O., Ammerer, G. And Hansen, M. T. Danish patent application 2665 of 1984 and 582 of 1985. Priority, May.30, 1984.

[7] Markussen, J. (1984). Semisynthesis of human insulin. In Lerner, J. and Pohl, S. (eds.) Methods in Diabetes Research. Vol.1, 403-411. (New York: John Wiley & Sons).

За контакти:

Гл. ас. д-р Станислав Байрямов, Катедра "Ремонт, надеждност, механизми, машини, логистични и химични технологии", Русенски университет "Ангел Кънчев", тел.: 082-888 228, 082-888 459, e-mail: sbayryamov@uni-ruse.bg

Докладът е рецензиран