



УДК 577.112.6:577.152.342\*31.03

© 1994 В. В. Анисимова, Е. Н. Лысогорская,  
И. Ю. Филиппова, Е. С. Оксенойт, В. М. Степанов

### КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ ПЕПСИНОМ СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ В ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЯХ

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
химический факультет*

Ключевые слова: пепсин; пептиды, синтез ферментативный.

Пепсин свиный, осажденный на неорганических носителях, способен катализировать образование пептидной связи в органических растворителях. На примере модельной реакции конденсации трипептидов Z-Ala-Ala-Phe-OH и H-Leu-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub> была изучена зависимость синтеза от природы носителя, типа органического растворителя, времени, концентрации фермента, а также ионной силы и pH буфера, используемого для нанесения белка. С хорошими выходами синтезированы пептиды Z-Ala-Ala-Xaa-Yaa-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub>, где Xaa = Phe, Tyr, Trp; Yaa = Leu, Phe, Tyr, Trp.

Катализируемый протеиназами синтез пептидов удобен для препаративного получения пептидов небольшой длины, в особенности таких, которые содержат аминокислотные остатки с функциональными группами в боковых цепях. Пепсин, несмотря на его весьма широкую специфичность, нечасто применяется как катализатор образования пептидной связи [1—4]. Во всех случаях катализируемый пепсином синтез является равновесным, поэтому при проведении реакции в растворе ее успех определяется выпадением продукта в осадок, что требует специального подбора условий. С другой стороны, как было обнаружено нами [5, 6], пепсин может соосаждаться с образующимся в ходе реакции пептидом, что приводит к необходимости применения значительных количеств фермента и создает опасность загрязнения продукта реакции белком. Можно было предполагать, что указанные ограничения снимутся при проведении реакции пептидного синтеза в органических растворителях в присутствии пепсина, осажденного на поверхности носителя — по методу, хорошо оправдавшему себя в случаях сериновых и металлопротеиназ [7—10]. В органической среде активность воды понижается и вероятность гидролиза образующегося продукта синтеза уменьшается. Кроме того, концентрирование исходных соединений в гидратной оболочке фермента позволяет уменьшить время достижения равновесного состояния. Однако в литературе имеются данные лишь об использовании пепсина в синтезе ди- и трипептидов в бифазных системах вода — органический растворитель [4, 11].

Цель данной работы — развитие метода синтеза пептидов, катализируемого пепсином, распределенным на поверхности носителя, в органических растворителях. На примере модельной реакции конденсации трипептидов были подобраны

Сокращения: pNa — *n*-нитроанилид, Abz — *o*-аминобензоил. Все аминокислоты *L*-ряда.

Таблица 1

Синтез Z-Ala-Ala-Phe-Leu-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub> (I), катализируемый пепсином, осажденным на различных носителях  
Условия см. в «Экспер. части»

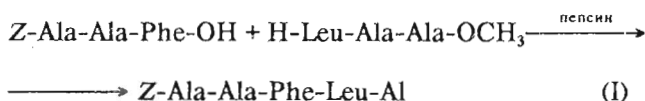
Носитель	Выход, %
Целит	90
Силохром С-80	40
Аминосилохром	60
Макропористое стекло	65

Таблица 2

Влияние растворителя на выход гексапептида (I) в реакции конденсации Z-Ala-Ala-Phe-OH и H-Leu-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub>  
Условия см. в «Экспер. части»

Растворитель	Выход, %
Ацетонитрил	90
Хлористый метилен	55
Этилацетат	45
Этанол	4

оптимальные условия катализируемого пепсином синтеза пептидов в органической среде:



При конденсации исходных соединений пептид Z-Ala-Ala-Phe-OH связывается с ферментом в соответствии с его специфичностью, так, что гидрофобный остаток фенилаланина занимает зону S<sub>1</sub> активного центра пепсина (по номенклатуре, предложенной Шехтером и Бергером [12]). При этом остатки аланина располагаются в зонах S<sub>2</sub> и S<sub>3</sub>, бензилоксикарбонил — в зоне S<sub>4</sub>. Пептид H-Leu-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub> занимает в активном центре пепсина участки S'<sub>1</sub> — S'<sub>3</sub>, причем и в этом случае размещение гидрофобного остатка лейцина в зоне S'<sub>1</sub> отвечает специфичности фермента. Протяженность субстратов обеспечивает продуктивное связывание с активным центром фермента.

В качестве носителей пепсина были испробованы силохром С-80, аминосилохром, макропористое стекло и целит (табл. 1). Синтез пептида наблюдался во всех случаях, однако лучший результат был получен при использовании фермента, осажденного на целите, и в дальнейших исследованиях именно он использовался как носитель.

Для приготовления катализатора раствор пепсина в цитратном буфере (рН 4,5) насаивали на носитель, а затем высушивали. Выбор цитратного буфера был обусловлен нелетучестью лимонной кислоты, а значение рН 4,5 находилось в области рН-оптимума реакций синтеза, катализируемых пепсином в водной среде [13, 14]. После высушивания приготовленный катализатор содержал пепсин, осажденный на пористом неорганическом материале, причем фермент, очевидно, находился в водно-солевой оболочке, покрывающей поверхность носителя.

Как было показано в специальном опыте, прочного связывания фермента ни с одним из носителей не наблюдалось — белок легко смывался уже при суспендировании катализатора в 1 М ацетатном буфере (рН 3,5). Однако в условиях реакции пепсин удерживался носителем, будучи нерастворимым в органической фазе. Такое «закрепление» фермента на носителе за счет осаждения его на поверхности позволяло использовать одну и ту же порцию пепсина, осажденного на целите, в четырех циклах синтеза гексапептида (I) в ацетонитриле. Выход продукта несколько понижался от цикла к циклу и составил соответственно 90, 86, 80, 71%.

Синтез модельного гексапептида проводили в ацетонитриле, хлористом метиле, этаноле, этилацетате (табл. 2). Ацетонитрил оказался наиболее подходящим растворителем для проведения синтеза, катализируемого осажденным пепсином. С одной стороны, ацетонитрил достаточно полярен и растворяет исходные пептиды, содержащие незащищенные амино- и карбоксильные группы, с другой — возможность многократного использования одной и той же порции

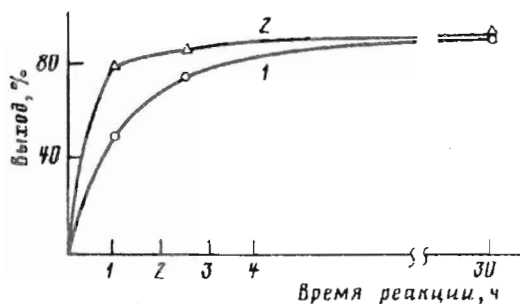


Рис. 1

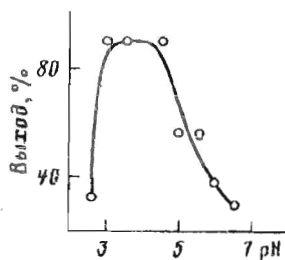


Рис. 2



Рис. 3

Рис. 1. Накопление продукта конденсации Z-Ala-Ala-Phe-OH и H-Leu-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub>. Пепсин осажден на целите в 10 (1) и 25 мМ цитратном буфере (2). Условия см. в «Экспер. части»

Рис. 2. pH-Зависимость выхода Z-Ala-Ala-Phe-Leu-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub>. E — 7,5 нмоль пепсина на 25 мг целита; время реакции 20 ч, остальные условия см. в «Экспер. части»

Рис. 3. Зависимость выхода Z-Ala-Ala-Phe-Leu-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub> от содержания фермента в реакционной смеси. Пепсин осажден на 50 мг целита, время реакции 2 ч, остальные условия см. в «Экспер. части»

катализатора показала, что гидратная оболочка удерживается носителем и пепсином и не переходит в органическую фазу. В противоположность ацетонитрилу этанол, вероятно, слишком хорошо растворял воду, находящуюся в микроокружении фермента, и, кроме того, мог ингибировать пепсин, что привело к неблагоприятному протеканию реакции синтеза модельного пептида. Несколько хуже, чем в ацетонитриле, конденсации трипептидов прошли в этилацетате и хлористом метиле.

На протекание реакции влияло содержание солей в гидратной оболочке носителя. Нанесение белка на целит в буферном растворе, вероятно, позволяло поддерживать постоянное значение pH в микроокружении пепсина и, кроме того, стабилизировало гидратную оболочку, предотвращая переход воды в органическую фазу. Так, синтез пептида (I) не имел места, если пепсин, катализирующий его, наносили на целит не в буферном растворе, а просто в подкисленной до pH 4,5 воде, несмотря на то что фермент не был инактивирован. Последнее было доказано тем, что пепсин, смытый с поверхности носителя и переведенный в воду, расщеплял флуорогенный субстрат Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-pNA [15]. Используемый субстрат обладает свойством внутримолекулярного тушения флуоресценции, остаток антраиловой кислоты является флуорогенной группой, а остаток л-нитроанилида — тушителем. При расщеплении под действием пепсина связи Phe — Phe тушитель и флуорофор оказываются принадлежащими разным молекулам, и происходит разгорание флуоресценции.

Нами была подобрана оптимальная концентрация солей в гидратной оболочке катализатора. Содержание солей варьировали, нанося на целит одинаковые объемы раствора пепсина в цитратных буферах с различной ионной силой. Достижение равновесия реакции синтеза-гидролиза зависело от концентрации буфера. Так, если в качестве катализатора использовали фермент, нанесенный в 25 мМ буфере, при молярном соотношении субстратов и фермента 100 : 1 кривая накопления продукта выходила на плато уже через 1 ч. Если пепсин был нанесен в 10 мМ буфере, равновесное состояние достигалось позднее — примерно через 2,5 ч после начала реакции (рис. 1). Однако, если гидратная оболочка содержала большее количество солей (фермент наносили в 50 мМ буфере), конденсация протекала хуже, и через 24 ч выход продукта составил 60%.

Реакции, катализируемые пепсином в органической среде, протекают в достаточно широком диапазоне значений pH буфера, в котором происходило нанесение фермента на целит (рис. 2). Как видно из представленной зависимости, оптимум лежит в области pH 3—4,5, аналогично тому, что наблюдали в реакциях синтеза, катализируемых пепсином в водно-органической среде [13, 14].

Обычно в реакциях, катализируемых пепсином в водно-органической среде, используется довольно большое количество фермента. Молярные соотношения между субстратами и ферментом [S] : [E] составляют от 400 : 1 до 4 : 1 [1—4]. Нами ранее было показано, что концентрацию пепсина при проведении синтеза в воде можно значительно снизить и довести соотношение [S] : [E] до 100 000 : 1 [13]. В случае конденсаций в ацетонитриле 90%-ный выход гексапептида (I) достигался за 2 ч при молярном соотношении субстрат — фермент 1000 : 1 (рис. 3). Вероятно, это соотношение можно улучшить, увеличив время реакции. В случаях использования в реакциях синтеза пептидов в органических растворителях других протеиназ (субтилизина, термолизина, химотрипсина) молярные соотношения субстрат — фермент составляли обычно величины примерно того же порядка [7—10].

Необходимость увеличения относительного содержания фермента при переходе от водных растворов к органическим растворителям с малым содержанием воды, по-видимому, связана с тем, что в последнем случае фермент, участвующий в синтезе, распределяется на поверхности неорганического носителя. При этом велика вероятность того, что помимо одиночных молекул осаждаются и «кластеры», состоящие из большого числа молекул пепсина; в последних активными будут только молекулы поверхностного слоя.

Специфичность пепсина, катализирующего синтез пептидов в органических растворителях, в данной серии опытов качественно не изменялась, и фермент образовывал пептидную связь между гидрофобными аминокислотами так же, как это наблюдалось в водно-органических смесях [13, 14]. В ацетонитриле при катализе пепсином, осажденным на целите, была синтезирована серия пептидов строения Z-Ala-Ala-Xaa-Yaa-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub>, где Xaa = Phe, Tug, Tgr; Yaa = Leu, Phe, Tug, Trp (табл. 3). Остаток триптофана в положении P<sub>1</sub> хорошо связывался с активным центром фермента, что обеспечивало достаточно высокую скорость синтеза и хороший выход продукта (соединение II). В положении P<sub>1</sub> триптофан, вероятно, менее соответствовал специфичности пепсина (соединения IV и V), что согласуется с данными по гидролизу белковых субстратов [16]. Однако значительное увеличение времени реакции позволило достичь равновесного состояния и повысить выход пептидов (IV) и (V). Образование связей Tug-Phe(Leu) или Phe(Leu)-Tug протекало с меньшими выходами (соединения III, IV, VII) независимо от того, какое положение (P<sub>1</sub> или P<sub>2</sub>) в активном центре пепсина занимал остаток тирозина.

Оказалось возможным ввести в положение P<sub>1</sub> остаток *n*-нитрофенилаланина (соединение VIII). Синтез более коротких пептидов (соединения IX и X) за небольшое время проходил с меньшей эффективностью. Аналогичные результаты были получены при синтезе соединений (IX) и (X) в растворе [13]. За 72 ч,

Характеристика пептидов, синтезированных с помощью осажденного на целите пепсина (30° С)

Номер пептида	Пептид	Время реакции, ч	Выход <sup>***</sup> , %	ВЭЖХ, время удерживания, мин	Аминокислотный анализ <sup>****</sup> , нмоль/в образце				
					Phe	Leu	Ala	Tyr	Ile
I	Z-Ala-Ala-Phe- ↓ Leu-Ala-Ala-OCH <sub>3</sub>	20	90	18,5	0,8(1)	0,8(1)	3,5(4)		
II	Z-Ala-Ala-Phe- ↓ Trp-Ala-Ala-OCH <sub>3</sub>	24 <sup>**</sup>	90	20,0	1,3(1)	1,3(1)	6,3(4)		
III	Z-Ala-Ala-Phe- ↓ Tyr-Ala-Ala-OCH <sub>3</sub>	20	50(60)	15,0	2,1(1)	2,1(1)	9,7(4)	2,0(1)	
IV	Z-Ala-Ala-Trp- ↓ Leu-Ala-Ala-OCH <sub>3</sub>	18 <sup>**</sup>	20(90)	19,5		1,7(1)	6,9(4)		
V	Z-Ala-Ala-Trp- ↓ Phe-Ala-Ala-OCH <sub>3</sub>	20	55(90)	20,1	1,2(1)	1,2(1)	5,1(4)		
VI	Z-Ala-Ala-Tyr- ↓ Leu-Ala-Ala-OCH <sub>3</sub>	2	60(85)	13,1		1,4(1)	5,6(4)	1,1(1)	
VII	Z-Ala-Ala-Tyr- ↓ Phe-Ala-Ala-OCH <sub>3</sub>	20	50(90)	14,4	1,6(1)	1,6(1)	7,4(4)	1,6(1)	
VIII	Z-Ala-Ala-Phe- ↓ Phe(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub>	5	50(70)	21,8	0,2(1)	0,2(1)	0,6(2)		
IX	Z-Ala-Ala-Phe- ↓ Phe-OCH <sub>3</sub>	2	20(70)	23,0	1,4(2)	1,4(2)	1,6(2)		
X	Вос-Ile-Phe- ↓ Leu-Ala-Ala-OCH <sub>3</sub>	14 <sup>**</sup>	25(70)	17,9	2,6(1)	2,6(1)	5,8(2)		2,5(1)

\* Аналитические опыты, выход определяли методом ВЭЖХ. Сирелкой . заны образующиеся в синтезе связи.

\*\* Температура реакции 18° С.

\*\*\* В скобках приведен выход пептида при времени реакции 72 ч.

\*\*\*\* В скобках приведено число аминокислотных остатков; содержание триптофана и *и*-нигрофенилаланина не определялось.

вероятно, устанавливалось равновесие этих процессов, и пептиды (VIII—X) образовывались с хорошими выходами.

Таким образом, в данной работе показана возможность использования пепсина, распределенного на поверхности неорганических носителей, в реакциях синтеза пептидной связи в системах с малым содержанием воды. Наиболее подходящим носителем оказался целит, а растворителем — ацетонитрил. Подобраны оптимальные условия для проведения конденсаций в органической среде, синтезирована серия пептидов различной длины.

### Экспериментальная часть

В работе применяли очищенный по методике [17] препарат пепсина свиньи (КФ 3.4.23.1); макропористое стекло CPG-10-500 (Serva, ФРГ), силохром С-80 (Союзреактив, Ставрополь), целит 535 (LPC, Великобритания), аминсилохром С-80 (Биолар, Олайне). Использованные пептиды синтезированы в нашей лаборатории обычными методами.

Аминокислотный анализ выполняли на автоматическом анализаторе Hitachi-835 (Япония) после кислотного гидролиза 5,7 н. HCl при 105° С в течение 48 ч. Гидролиз пептидов, содержащих остатки тирозина, проводили в соляной кислоте с 0,01% фенолом.

Обращенно-фазовую ВЭЖХ осуществляли на приборе Gilson 704 (Франция) на колонке (4,6 × 250 мм) Ultrasphere ODS (Beckman, США). Растворы А и Б для хроматографирования содержали 0,05% трифторуксусную кислоту и 0,05% триэтиламин. Концентрация ацетонитрила составляла 5% в растворе А и 90% в растворе Б (все проценты объемные). Разделение проводили в линейном градиенте раствора Б в растворе А от 30 до 60% за 25 мин. Скорость элюции 1,5 мл/мин. Детекция при 215 и 280 нм.

Флуоресценцию измеряли на приборе Hitachi MPF-4 (Япония) ( $\lambda_{возб}$  340 нм,  $\lambda_{исп}$  415 нм, 20° С).

*Получение катализатора.* На 50 мг целита наслаивали 400 мкл раствора, содержащего 1 мг пепсина в 25 mM цитратном буфере, pH 4,5, затем высушивали в вакуумном эксикаторе над NaOH до постоянного веса.

*Смывание пепсина с носителя.* 5 мг целита, содержащего осажденный пепсин, быстро промывали на стеклянном фильтре 1 мл 1 М ацетатного буфера, pH 3,5. Промывку повторяли дважды тем же объемом буфера. 100 мкл фильтрата прибавляли к 2 мл 2 mM раствора субстрата Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-pNA в 1 М ацетатном буфере, pH 3,5, содержащем 2% DMF. О количестве элюированного пепсина судили по начальной скорости гидролиза субстрата [15], измеряя возрастание флуоресценции за 15 мин (при 20° С). Относительное количество смывого фермента определяли по формуле

$$E_c/E_0 = A_c \cdot 10/A_0,$$

где  $A_c$  — флуоресценция при гидролизе субстрата пепсином, смывым с целита;  $A_0$  — флуоресценция общего количества пепсина, находящегося на целите (для определения  $A_0$  5 мг целита, содержащего осажденный пепсин, суспендировали в 2,1 мл раствора субстрата и через 15 мин измеряли флуоресценцию).

*Синтез Z-Ala-Ala-Phe-Leu-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub> (I), катализируемый пепсином, осажденным на различных носителях.* 30 нмоль пепсина осаждали на 50 мг носителя при pH 4,5 из 400 мкл 25 mM цитратного буфера и добавляли к реакционной смеси, содержащей по 2,5 мкмоль исходных трипептидов в ацетонитриле с 5% DMF (объем 500 мкл; 30° С, 24 ч).

*Конденсация Z-Ala-Ala-Phe-OH и H-Leu-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub> в различных растворителях.* К 50 мг целита, содержащего 30 нмоль пепсина, прибавляли по 250 мкл 10 mM растворов пептидов в исследуемом растворителе, содержащем 5% DMF (30° С, 3 ч).

*Синтез пептидов (I)–(X)*. К 50 мг целита, содержащего 3 нмоль пепсина, прибавляли по 250 мкл 10 мМ растворов исходных пептидов или производных аминокислот в ацетонитриле с 5% DMF. В случаях синтезов соединений (VI), (VIII), (IX) 50 мг целита содержали 30 нмоль пепсина.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morihara K., Oka T. // *J. Biochem.* 1981. V. 89. № 2. P. 385–395.
2. Kuhl P., Wilsdorf A., Jakubke H.-D. // *Monatshfte Chem.* 1983. B. 114. № 3. S. 571–579.
3. Pellegrini A., Luisi P. // *Biopolymers.* 1978. V. 17. № 7. P. 2573–2580.
4. Isova Y., Ichikawa T. // *Bull. Chem. Soc. Jap.* 1979. V. 52. № 3. P. 796–800.
5. Abdel Malak C. A., Filippova I. Y., Lysogorskaya E. N., Anisimova V. V., Lavrenova G. I., Stepanov V. M. // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1992. V. 39. № 5. P. 443–449.
6. Филиппова И. Ю., Лысогорская Е. Н., Анисимова В. В., Абдель Малак К. А., Лавренова Г. И., Оксенойт Е. С., Степанов В. М. // *Биохимия.* 1993. Т. 58. Вып. 6. С. 921–927.
7. Reslow M., Adlercreutz P., Mattiasson B. // *Eur. J. Biochem.* 1988. V. 177. № 2. P. 313–318.
8. Kise H., Hayakawa A., Noritomi H. // *J. Biotechnol.* 1990. V. 14. № 2. P. 239–254.
9. Clares P., Adlercreutz P., Mattiasson B. // *J. Biotechnol.* 1990. V. 15. № 3. P. 323–338.
10. Cassells J. M., Halling P. J. // *Biotechnol. and Bioeng.* 1989. V. 33. № 6. P. 1489–1494.
11. Bemquerer M. P., Theobaldo F. C., Tomimaga M. // *Biomed. et biochim. acta.* 1991. V. 50. № 10/11. P. 94–97.
12. Schechter J., Berger A. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1967. V. 27. № 2. P. 157–162.
13. Лысогорская Е. Н., Филиппова И. Ю., Абдель Малак К. А., Лавренова Г. И., Анисимова В. В., Оксенойт Е. С., Степанов В. М. // *Биоорганическая химия.* 1992. Т. 18. № 8. С. 1081–1088.
14. Abdel Malak C. A., Lavrenova G. I., Lysogorskaya E. N., Filippova I. Yu., Terenteva E. Yu., Stepanov V. M. // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1993. V. 41. № 2. P. 97–101.
15. Филиппова И. Ю., Лысогорская Е. Н., Оксенойт Е. С., Комаров Ю. Е., Степанов В. М. // *Биоорганическая химия.* 1986. Т. 12. № 9. С. 1172–1180.
16. Зинченко А. А., Румиц Л. Д., Антонов В. К. // *Биоорганическая химия.* 1976. Т. 2. № 6. С. 803–810.
17. Соловьева Т. А., Беляев С. В., Степанов В. М. // *Химия природных соединений.* 1977. № 3. С. 398–403.

Поступила в редакцию  
30.VI.1993

*V. V. Anisimova, E. N. Lysogorskaya, I. Y. Filippova,  
E. S. Oksenoit, V. M. Stepanov*

#### PEPSIN-CATALYZED SYNTHESIS OF PEPTIDES IN ORGANIC SOLVENTS

*Department of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

The porcine pepsin immobilized on inorganic supports catalyzes the peptide bond formation in organic solvents. Dependence of the peptide bond formation between Z-Ala-Ala-Phe-OH and H-Leu-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub> upon the porous material, organic solvent, reaction time, enzyme concentration, ionic strength and pH was studied. Syntheses of peptides of the general formula Z-Ala-Ala-Xaa-Yaa-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub>, where Xaa = Phe, Tyr, Trp; Yaa = Leu, Phe, Tyr, Trp, were carried out.