



УДК 577.112.6:577.152.34'135

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОЕ ПРИСОЕДИНЕНИЕ ОСТАТКОВ АРГИНИНА К ПЕПТИДАМ, КАТАЛИЗИРУЕМОЕ СУБТИЛИЗИНОМ II*. ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ АЦИЛИРУЮЩЕГО И НУКЛЕОФИЛЬНОГО КОМПОНЕНТОВ И МАЛЫХ КОЛИЧЕСТВ ВОДЫ В ОРГАНИЧЕСКОМ РАСТВОРИТЕЛЕ

© 1996 г. М. П. Юсупова, С. А. Новгородова*, В. М. Степанов[#]

ГосНИИгенетика, 113545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1;

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

Поступила в редакцию 24.11.95 г. После доработки 11.03.96 г.

Исследована реакция $\text{Dnp}(Z)\text{-Ala}_2\text{-Xaa-OCH}_3$ (Xaa = Ile, Val) с амидом или *n*-нитроанилидом аргинина, катализируемая сорбированным на макропористом стекле субтилизином в органических растворителях, которая приводит к образованию пептидов, содержащих от одного до четырех остатков аргинина: $\text{Dnp}(Z)\text{-Ala}_2\text{-Xaa-(Arg)}_{1-4}\text{-NH}_2$. Показана зависимость числа присоединяющихся к пептиду остатков аргинина от содержания воды в органических растворителях, природы аминокислотного остатка Xaa в положении P_1 ацилирующего компонента и характера N-защитной группы. Реакцию можно использовать для синтеза аргининсодержащих субстратов конвертаз и катепсинов В, L, О. Получен хромогенный субстрат дуоденазы Z-Ala₂-Ile-Arg₂-pNA.

Ключевые слова: ферментативный синтез, субтилизин, органический растворитель, аргининсодержащие пептиды.

Пары остатков аргинина в пептидной цепи служат сигналом протеолитического процессинга предшественников физиологически активных пептидов (нейропептидов, гормонов, факторов роста) [2]. Ввиду этого синтез последовательности -Arg₂- представляет значительный интерес для получения, во-первых, пептидов, содержащих сигнал процессинга, во-вторых, специфических субстратов ферментов процессинга – субтилизиноподобных сериновых эндопротеиназ эукариот – фурина и др. [2–6]. Способностью гидролизовать пептидные связи, следующие за парами основных аминокислот, обладают также дуоденаза [7] и катепсины В, L, О [8].

Пептиды, содержащие последовательности -Arg₂-, -Arg₃- и -Arg₄-, были получены нами в ходе реакции конденсации $\text{Dnp}(Z)\text{-Ala}_2\text{-Leu-OCH}_3$ с амидом аргинина, катализируемой сорбированным на макропористом стекле субтилизином в смеси органических растворителей [1]. Данная работа посвящена дальнейшему изучению влияния некоторых факторов (природы ацилирующего компонента и нуклеофила, присутствия малых

концентраций воды в органических растворителях) на ход этой аномальной реакции и более широкому ее применению для синтеза аргининсодержащих субстратов протеиназ.

В качестве ацилирующих компонентов использовали метиловые эфиры N-защищенных пептидов $\text{Dnp}(Z)\text{-Ala}_2\text{-Xaa-OCH}_3$ (I), где Xaa – аминокислоты с разветвленной боковой цепью – валин и изолейцин. Эфиры (I) вводили в реакцию с трехкратным мольным избытком амида аргинина в присутствии субтилизина 72, сорбированного на макропористом стекле CPG-10 [9] (мольное отношение E : S = 1 : 160 для Dnp-пептидов и 1 : 600 для Z-пептидов), в смеси DMSO–ацетонитрил, содержащей менее 0.07%* воды (в дальнейшем такие растворители будем называть сухими).

В реакционной смеси были идентифицированы пептиды, содержащие от одного до четырех остатков аргинина (рис. 1). Аналогично реакции с производными лейцина, рассмотренной нами ранее [1], в 35% растворе DMSO в ацетонитриле шел синтез продуктов с одним и двумя остатками аргинина (схема). При снижении концентрации DMSO до

* Здесь и далее концентрации растворителей приведены в объемных процентах.

* Сообщение I см. [1].

Сокращения: Dnp – 2,4-динитрофенил, Z – бензилоксикарбонил, DMSO – диметилсульфоксид, pNA – *n*-нитроанилид, H–O–E – субтилизин. Все аминокислоты – L-ряда.

[#] Автор для переписки.

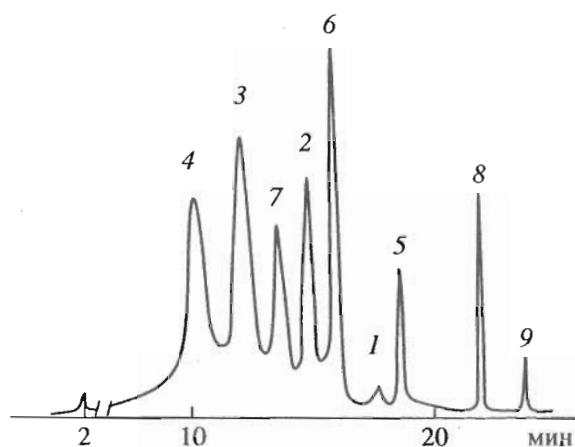


Рис. 1. Разделение продуктов реакции $\text{Dnp-Ala}_2\text{-Val-OCH}_3$ с амидом аргинина в 25% растворе DMSO в ацетонитриле методом ВЭЖХ на колонке Zorbax С8. Условия синтеза и разделения N-защищенных пептидов – см. "Экспер. часть". Через 96 ч после начала реакции смесь содержала $\text{Dnp-Ala}_2\text{-Val-Arg}_n\text{-NH}_2$ с $n = 1$ (1), 2 (2), 3 (3), 4 (4), $\text{Dnp-Ala}_2\text{-Val-Arg}_n\text{-OH}$ с $n = 1$ (5), 2 (6), 3 (7), $\text{Dnp-Ala}_2\text{-Val-OH}$ (8) и $\text{Dnp-Ala}_2\text{-Val-OCH}_3$ (9).

25% происходило также образование пептидов с тремя и четырьмя остатками аргинина:

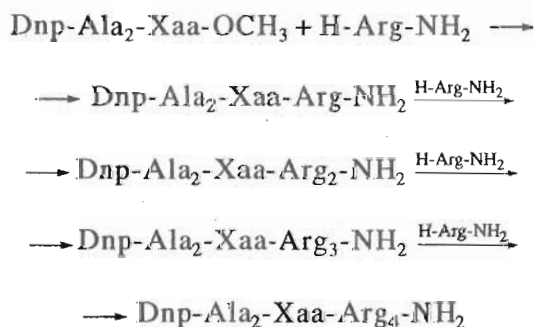


Схема.

Побочными продуктами реакции являлись пептиды со свободной карбоксильной группой, образующиеся с небольшими выходами за счет гидролиза ацилфермента водой, присутствующей в растворителях. Их идентифицировали методами ВЭЖХ и электрофореза. Очевидно, рассматриваемые реакции идут по схеме, предложенной ранее для реакции с $\text{Dnp(Z)-Ala}_2\text{-Leu-OCH}_3$ [1].

В работе [1] показано, что последовательное присоединение остатков аргинина достигается за счет перераспределения реагентов между органической фазой и водной микрофазой на поверхности сорбента. В результате в непосредственном окружении фермента создается 5–6-кратный мольный избыток амида аргинина по отношению к ацилирующему компоненту. Это направляет реакцию в сторону образования продуктов, содержащих несколько остатков аргинина.

Влияние природы P_1 -остатка ацилирующего компонента

В 35% растворе DMSO в ацетонитриле $\text{Dnp(Z)-Ala}_2\text{-Xaa-Arg-NH}_2$ образовывались с наибольшей скоростью, если в положении Xaa находился остаток Leu. Скорость процесса можно оценить по суммарному выходу продуктов, содержащих один и два остатка аргинина. Для Dnp-производных при $\text{Xaa} = \text{Leu}$ выход достигал 97% уже через 3 ч, при $\text{Xaa} = \text{Val}$ он составил 82% через 24 ч, при $\text{Xaa} = \text{Ile}$ – 47% за 24 ч (таблица). Точно так же для соответствующих Z-производных скорость образования пептидов, содержащих изолейцин, была заметно ниже скорости синтеза продукта с остатком лейцина (таблица).

Напротив, присоединение второго остатка аргинина к $\text{Dnp(Z)-Ala}_2\text{-Xaa-Arg-NH}_2$ происходило легче для соединений, у которых $\text{Xaa} = \text{Ile}$ или Val . Так, накопление $\text{Dnp-Ala}_2\text{-Xaa-Arg}_2\text{-NH}_2$, где $\text{Xaa} = \text{Ile}$ или Val , за 24 ч шло в 3.5–4 раза быстрее, чем $\text{Dnp-Ala}_2\text{-Leu-Arg}_2\text{-NH}_2$. Еще большую разницу в скоростях накопления наблюдали для соответствующих Z-пептидов (таблица).

Снижение концентрации DMSO до 25% открывало возможность последовательного присоединения трех или четырех остатков аргинина к исходным эфирам (I). Однако и в этих условиях присоединение первого остатка аргинина происходило быстрее для производных с $\text{Xaa} = \text{Leu}$, что хорошо видно при сравнении суммарных выходов Dnp-пептидов за 3 ч: 81, 27 и 5% при $\text{Xaa} = \text{Leu}$, Val и Ile . Для Z-защищенных пептидов наблюдали аналогичную картину (таблица). Синтез пептидов с двумя остатками аргинина происходил иначе. Скорости накопления $\text{Dnp(Z)-Ala}_2\text{-Xaa-Arg}_2\text{-NH}_2$, где $\text{Xaa} = \text{Val}$ и Ile , были выше скорости накопления продукта с $\text{Xaa} = \text{Leu}$ (таблица).

Скорость синтеза пептидов с двумя остатками аргинина в свою очередь определяет скорость образования пептидов, содержащих последовательности $-\text{Arg}_3-$ и $-\text{Arg}_4-$. Синтез пептидов, содержащих лейцин, шел медленнее, чем с производными валина и изолейцина (таблица). Таким образом, вне зависимости от состава растворителей присоединение второго и последующих остатков аргинина происходило легче, если в положении P_1 субстратов (I) находились неспецифические для подцентра связывания S_1 субтилизина остатки валина или изолейцина. Этот эффект можно объяснить следующим образом.

При ацилировании серина в активном центре субтилизина эфиры трипептидов (I) связываются так, чтобы остаток Xaa занимал подцентр S_1 фермента. β -Разветвленные боковые цепи остатков изолейцина или валина мало подходят для размещения в этом подцентре, что подтверждается чрезвычайно низкими величинами $k_{\text{cat}}/K_m = 0.0015 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$, рассчитанными для гидролиза связи $\text{Ile-Tyr(NO}_2)$ субтилизином BPN^{I}

Влияние природы аминокислотного остатка Хаа на выход Arg-содержащих пептидов в реакции Dnp(Z)-Ala₂-Хаа-OCH₃ с Arg-NH₂, катализируемой субтилизином*

Продукты реакции **	n	E : S	Выход (%) при времени синтеза, ч							Время удерживания, мин***
			3	24	48	72	96	144	192	
Dnp-Ala ₂ -Leu-Arg _n -NH ₂	1	1 : 160	78/96	64/89	30/86	16/80	12/79	5/78	3/-	15.3
	2		3/1	28/7	50/11	52/14	43/15	26/17	17/-	10.6
	3		0/0	1/0	5/0	10/0	14/0	22/0	20/-	7.9
	4		0/0	0/0	0/0	1/0	3/0	8/0	13/-	6.2
Z-Ala ₂ -Leu-Arg _n -NH ₂	1	1 : 160	79/82	75/82	68/80	63/79	59/74	-	-	20.7
	2		1/0	10/1	18/4	20/5	19/5	-	-	15.7
	3		0/0	0/0	0/0	3/0	5/0	-	-	12.3
Dnp-Ala ₂ -Ile-Arg _n -NH ₂	1	1 : 50	1/2	4/20	1/6	1/4	1/-	1/-	-	15.9
	2		4/4	51/27	43/41	28/42	17/-	9/-	-	11.5
	3		0/0	3/0	11/0	13/0	12/-	8/-	-	8.6
	4		0/0	0/0	3/0	7/0	13/-	11/-	-	6.9
Z-Ala ₂ -Ile-Arg _n -NH ₂	1	1 : 600	10/13	14/43	0/39	0/31	0/23	0/22	0/-	19.5
	2		2/2	41/16	49/26	42/35	38/45	32/47	29/-	13.9
	3		0/0	1/0	6/0	10/0	11/0	13/0	14/-	11.1
	4		0/0	0/0	0/0	1/0	3/0	6/0	8/-	8.9
Dnp-Ala ₂ -Val-Arg _n -NH ₂	1	1 : 160	19/43	8/62	3/58	1/52	2/50	2/43	-	17.9
	2		8/2	66/20	33/29	14/36	8/39	6/47	-	14.8
	3		0/0	8/0	23/0	27/0	17/0	10/0	-	12.2
	4		0/0	0/0	4/0	13/0	14/0	11/0	-	10.2

* Условия реакции: мольное отношение Dnp(Z)-Ala₂-Хаа-OCH₃ и Arg-NH₂ 1 : 3, содержание DMSO в ацетонитриле – 25% (выход приведен в числителе) и 35% (выход приведен в знаменателе).

** Данные по выходам лейцинсодержащих пептидов получены в работе [1].

*** ВЭЖХ. Условия разделения – см. “Экспер. часть”.

[10]. Использование метиловых эфиров (I) позволяет ускорить образование ацилфермента [Dnp(Z)-Ala₂-Хаа-O-E] (II), который далее реагирует с амидом аргинина с образованием Dnp(Z)-Ala₂-Хаа-Arg-NH₂ (схема). В полученном пептиде субтилизин может атаковать пептидную и амидную связи. При Хаа = Ile расщепление связи Ile-Arg, при котором подцентр S₁ должен быть занят изолейцином, снова может привести к образованию ацилфермента типа (II), однако с точки зрения специфичности субтилизина эта реакция неблагоприятна. Напротив, связь Arg-NH₂ может быть легко атакована ферментом, так как аргинин в положении P₁ субстрата хорошо связывается в подцентре S₁ [10]. Это приводит к преобладающему разрыву связи Arg-NH₂ с образованием ацилфермента типа [Dnp(Z)-Ala₂-Хаа-Arg-O-E] (III), который далее взаимодействует со второй молекулой амида аргинина или гидролизуется водой (последнее менее вероятно из-за низкой концентрации воды в реакционной смеси).

Действительно, в водном растворе при pH 8.0 Z-Ala₂-Ile-Arg-NH₂ гидролизуется субтилизином, давая в качестве единственного продукта Z-Ala₂-Ile-Arg-OH.

Если ацилирующий компонент (I) (схема) в положении P₁ содержит специфичный для субтилизина остаток лейцина, то образование ацилферментного комплекса [Dnp(Z)-Ala₂-Leu-O-E] происходило значительно легче, на что указывает скорость синтеза соответствующего производного (Dnp(Z)-Ala₂-Leu-Arg-NH₂) (таблица). Реакция же фермента с Dnp(Z)-Ala₂-Leu-Arg-NH₂ с большей вероятностью происходит с образованием ацилфермента типа (II), а не типа (III), поскольку для подцентра S₁ субтилизина остаток лейцина предпочтительнее аргинина [10]. Это и объясняет, почему при Хаа = Leu пептиды, содержащие два остатка аргинина, – Dnp(Z)-Ala₂-Leu-Arg₂-NH₂, образуются с меньшими выходами, чем при Хаа = Val или Ile.

Продукт, содержащий два остатка аргинина, далее может ацилировать субтилизин так, что C-концевой остаток аргинина свяжется в подцентре S₁. Это не противоречит специфичности фермента. При взаимодействии со следующей молекулой амида аргинина образуются пептиды, содержащие три остатка аргинина, – Dnp(Z)-Ala₂-Хаа-Arg₃-NH₂.

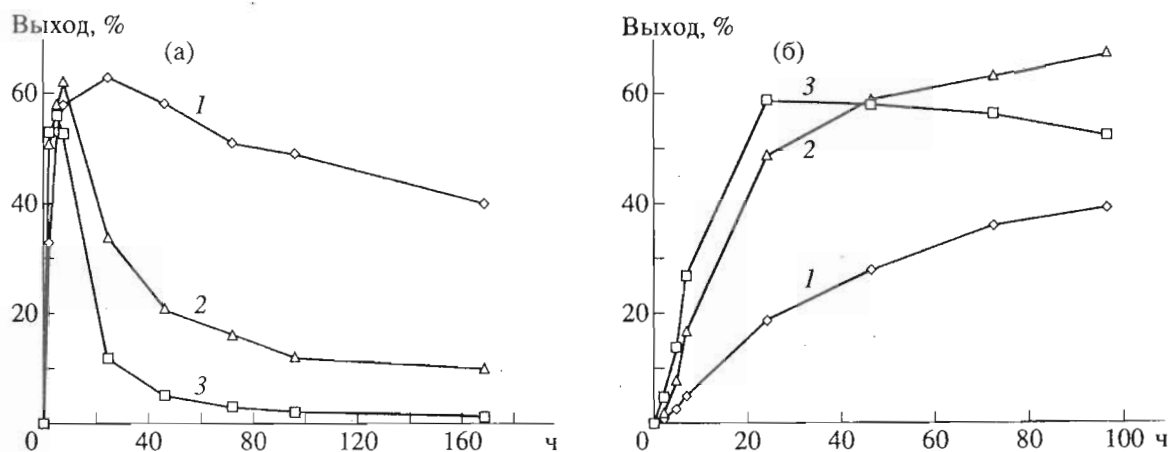


Рис. 2. Влияние малых концентраций воды на скорость накопления Dnp-Ala₂-Val-Arg-NH₂ (а) и Dnp-Ala₂-Val-Arg₂-NH₂ (б) в реакции Dnp-Ala₂-Val-OCH₃ с амидом аргинина. Концентрация воды: 0 (1), 0,5 (2), 1% (3). Условия синтеза – см. "Экспер. часть".

Аналогично происходит присоединение четвертой молекулы амида аргинина с образованием Dnp(Z)-Ala₂-Xaa-Arg₄-NH₂.

Влияние N-защитной группы

Было замечено, что в реакциях с Dnp-производными максимальный выход пептидов с двумя и более остатками аргинина выше, чем для соответствующих Z-производных (таблица). Более того, при взаимодействии Z-Ala₂-Leu-OCH₃ с амидом аргинина пептид с четырьмя остатками аргинина вообще не был обнаружен. Эти различия в выходах соответствующих пептидов, по-видимому, обусловлены более низкой растворимостью Dnp-пептидов в органических растворителях по сравнению с аналогичными Z-пептидами, что способствует их осаждению и, следовательно, приводит к более высокому выходу.

Влияние воды в малых концентрациях на скорость реакции присоединения остатков аргинина

Как было отмечено ранее [1], аномальная реакция последовательного присоединения нескольких остатков аргинина отражает процессы, происходящие при синтезе пептидов в органических растворителях в присутствии сорбированных ферментов. Следует подчеркнуть особую роль воды, которая распределяется между органической фазой, полярной поверхностью сорбента и ферментом. Фермент окружен слоем гидратной воды, которая не только стабилизирует фермент и увеличивает его подвижность, но и предохраняет его от инактивации при прямом контакте с органическим растворителем.

Активность суспендированных в сухих органических растворителях ферментов, в том числе субтилизина BPN', повышается при внесении в си-

стему малых (до 2%) количеств воды [11]. Аналогичный эффект проявляется и в случае сорбированного на носителе субтилизина 72. С целью изучения влияния малых концентраций воды на присоединение остатков аргинина мы провели ряд экспериментов, добавляя рассчитанное количество воды в органический растворитель.

Внесение до 2% воды в 35% раствор DMSO в ацетонитриле привело к увеличению начальной скорости реакции эфиров (I) с амидом аргинина и ускорению накопления тетра- и пентапептидов (рис. 2, 3). Начальная скорость образования Dnp-Ala₂-Val-Arg-NH₂ в присутствии 0,5 и 1% воды в 1,5 раза выше, чем в безводных растворителях (рис. 2а). Аналогичную зависимость наблюдали и для Z-Ala₂-Ile-Arg-NH₂ (рис. 3а).

В еще большей степени от концентрации воды зависит начальная скорость синтеза пептидов с двумя остатками аргинина (рис. 2б, 3б). Dnp-Ala₂-Val-Arg₂-NH₂ образовывался в 3 раза быстрее в присутствии 0,5% и в 6–7 раз быстрее в присутствии 1% воды по сравнению с реакцией в сухих растворителях (рис. 2б). Можно полагать, что введение воды в реакционную смесь, не изменяя существенных черт процесса, значительно углубляет его. Так, при 1% содержании воды образуется Dnp-Ala₂-Val-Arg₃-NH₂ (11% за 72 ч), а при 2% воды – Z-Ala₂-Ile-Arg₃-NH₂ (5% за 96 ч); в сухих растворителях такие структуры не наблюдали.

Таким образом, введение 0,5–2% воды в реакционную смесь ускоряет образование аргининсодержащих пептидов и тем самым открывает возможность протекания цепи последовательных реакций, вследствие чего в смеси одновременно накапливается несколько продуктов. Медленнее, но с образованием меньшего набора продуктов протекает реакция в сухих органических растворителях, что и было использовано для выделения Dnp-Ala₂-Val-Arg-NH₂ и Z-Ala₂-Ile-Arg-NH₂.

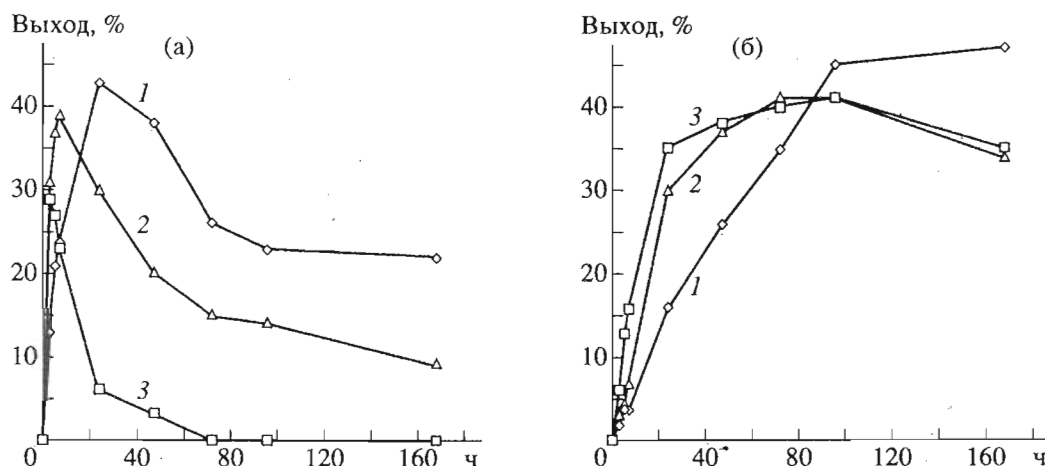


Рис. 3. Влияние малых концентраций воды на скорость накопления Z-Ala₂-Ile-Arg-NH₂ (а) и Z-Ala₂-Ile-Arg₂-NH₂ (б) в реакции Z-Ala₂-Ile-OCH₃ с амидом аргинина. Концентрация воды: 0 (1), 1 (2), 2% (3). Условия синтеза – см. “Экспер. часть”.

Следует подчеркнуть, что добавление воды к органическим растворителям способствует гидролизу ацилирующего компонента на каждой стадии реакции. Гидролиз Z-Ala₂-Ile-OCH₃ до Z-Ala₂-Ile-OH за 24 ч составил 18, 24 и 37% для смесей, содержащих 0, 1 и 2% H₂O соответственно. Это не только приводит к падению выходов амидов аргининсодержащих пептидов, но и увеличивает число побочных продуктов реакции – пептидов со свободной карбоксильной группой. Таким образом, добавление воды в систему редко представляет практическую ценность.

Влияние природы нуклеофила

Влияние природы нуклеофила на ход синтеза аргининсодержащих пептидов было изучено на примере реакции Z-Ala₂-Ile-OCH₃ с *n*-нитроанилидом аргинина, содержащим вместо гидрофильной амидной гидрофобную *n*-нитроанилидную группу. Несмотря на увеличение мольного избытка *n*-нитроанилида аргинина от 2 до 10-кратного и уменьшение концентрации DMSO в ацетонитриле до 20%, не удалось наблюдать образование продуктов с несколькими остатками аргинина. *n*-Нитроанилид замещенного пептида Z-Ala₂-Ile-Arg-pNA образовывался с практически количественным выходом (98–99%).

Отличие этой реакции от конденсации с амидом аргинина заключается в следующем. Для присоединения второго остатка аргинина необходимо образование ацилферментного комплекса [Z-Ala₂-Ile-Arg-O-E]. Возможность образования такого комплекса подтверждена тем, что субтилизин при pH 8.0 гидролизует Z-Ala₂-Ile-Arg-pNA до Z-Ala₂-Ile-Arg-OH (обычно наряду с последним образуется и Z-Ala₂-Ile-OH, но с примерно вдвое меньшим выходом). Однако Z-Ala₂-Ile-Arg-pNA в

отличие от соответствующего амида содержит гидрофобную *n*-нитроанилидную группу и поэтому стремится перейти из водной микрофазы, окружающей фермент, в органический растворитель, что уменьшает вероятность его дальнейшего взаимодействия с ферментом.

Хромогенный субстрат протеиназ, содержащий два остатка аргинина Z-Ala₂-Ile-Arg₂-pNA, был получен из Z-Ala₂-Ile-Arg-NH₂ и *n*-нитроанилида аргинина в присутствии субтилизина 72, сорбированного на CPG-10 (E : S = 1 : 700), в смеси DMSO–ацетонитрил 20 : 80 с выходом 99%. При этом в реакционной смеси не были обнаружены продукты дальнейшего присоединения аргинина.

Присоединение *n*-нитроанилида аргинина к Z-Ala₂-Ile-OCH₃ и Z-Ala₂-Ile-Arg-NH₂ в рассмотренных выше реакциях происходило количественно и существенно быстрее, чем присоединение амида аргинина, что может объясняться разницей в связывании субтилизином амида и *n*-нитроанилида аргинина.

Синтезированный пептид Z-Ala₂-Ile-Arg₂-pNA был гидролизован дуоденазой [7]. В соответствии со специфичностью этого фермента происходило отщепление *n*-нитроанилина, который определяли спектрофотометрически. Для этой реакции были рассчитаны

$$k_{\text{cat}} = 1.08 \times 10^{-1} \text{ с}^{-1},$$

$$K_m = 3.3 \times 10^{-4} \text{ М и } k_{\text{cat}}/K_m = 327 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}.$$

Таким образом, на протекание аномальной реакции – присоединения нескольких остатков аргинина к N-защищенным эфирам трипептидов в присутствии сорбированного субтилизина в среде органических растворителей – существенно влияет как специфичность подцентров связывания аминокислотных остатков S₁ и S₁' субтилизина,

так и природа компонентов реакционной смеси, определяющая их распределение между органической фазой и водной микрофазой, окружающей фермент. Увеличение содержания воды в органическом растворителе, с одной стороны, повышает скорость образования продуктов, с другой – ускоряет гидролитические процессы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы термолизин, макропористое стекло марки CPG-10 (Serva, Германия), диметилсульфоксид, содержащий не более 0.1% воды, и ацетонитрил, содержащий не более 0.05% воды (Merck, Германия). Субтилизин 72 выделен в нашей лаборатории [12]. *n*-Нитроанилид аргинина синтезирован по методу [13]. Гомогенность полученных соединений подтверждали высокоэффективной жидкостной хроматографией на приборе Gilson 704, используя колонку (4.6 × × 250 мм) Zorbax C8 (Du Pont Instruments, США). Растворы для хроматографии (приготовленные на обработанной ультрафиолетом бидистиллированной воде) содержали трифторуксусную кислоту и триэтиламин (по 0.05%), метанол (5% для раствора А и 90% для раствора Б). Dnp-Пептиды разделяли в градиенте концентрации раствора Б, добавляемого в раствор А. При этом концентрация Б линейно возрастала от 30% в начальный момент времени (0 мин) до 40% за 10 мин и далее от 40 до 75% за следующие 15 мин (30–40–75% Б за 0–10–25 мин); для валинсодержащих пептидов градиент 20–30–75% Б за 0–10–25 мин. Z-Пептиды разделяли в градиенте 25–35–70% Б за 0–15–30 мин; Z-пептиды, содержащие *n*-нитроанилидную группу, анализировали в линейном градиенте 20–65% Б за 0–15 мин на колонке (4.6 × 45 мм) Ultrasphere ODS (Beckman, США). Детектирование Dnp-пептидов проводили при 360 нм, *n*-нитроанилидов Z-пептидов – при 315 нм, остальных пептидов – при 220 нм. Молярный коэффициент поглощения практически не зависит от структуры пептида. ТСХ на пластинках (Silufol, Чехия) вели в системе *n*-бутанол–вода–пиридин–уксусная кислота (15 : 12 : 10 : 3), проявляли раствором нингидрина или Cl₂/KI. После кислотного гидролиза в стандартных условиях (5.7 М HCl, 105°C, 24–72 ч) гидролизаты анализировали на автоматическом аминокислотном анализаторе Biotronik LC 5001 (Германия). Амиды пептидов и аналогичные пептиды со свободной карбоксильной группой разделяли методом электрофореза на бумаге Filtrak при 500 В и силе тока 5 мА в системе пиридин–уксусная кислота–вода (1 : 4 : 995) с pH 5.6.

Катализатор – субтилизин 72, сорбированный на CPG-10, получали по методу [9].

Arg-NH₂ получали из Arg-OCH₃ по методу [14], Dnp-Ala₂-Val-OCH₃, Dnp-Ala₂-Ile-OCH₃ и Dnp-Ala₂-Leu-OCH₃ – по методу [15].

Z-Ala₂-Ile-OCH₃ получали аналогично Z-Ala₂-Leu-OCH₃ [1], увеличив количество термолизина в 3 раза. Выход 74%; время удерживания 27.8 мин, R_f 0.87.

Z-Ala₂-Ile-Arg-NH₂. 392 мг (1.6 ммоль) Arg-NH₂ · 2HCl растворяли в 4.1 мл DMSO и 0.5 мл триэтиламина, прибавляли 337 мг (0.8 ммоль) Z-Ala₂-Ile-OCH₃ и 7.6 мл ацетонитрила. После полного растворения пептида вносили 100 мг CPG-10, содержащего 14.4 мг субтилизина 72, и встряхивали смесь на качалке при 20°C. Через 5 сут, когда выход Z-Ala₂-Ile-Arg-NH₂ составил 40%, катализатор отделяли на стеклянном фильтре, промывали 35% раствором DMSO в ацетонитриле (промытый катализатор использовали в повторных синтезах). Фильтраты объединяли, подкисляли 6 М HCl до pH 2 и упаривали в вакууме. К остатку прибавляли 200 мл воды, экстрагировали этилацетатом (100 мл × 3), затем насыщенным водной *n*-бутанолом (100 мл × 10). Бутанольный слой промывали водой (5 мл × 3) и упаривали досуха. Остаток растворяли в 10 мл метанола и осаждали продукт 50 мл эфира. Кристаллы отделяли на фильтре, промывали эфиром и сушили в вакууме над KOH. Выход 23%; время удерживания 19.5 мин, R_f 0.59.

Аналогично получали **Z-Ala₂-Ile-Arg-NH₂** (при увеличении количества катализатора в 2.7 раза и внесении 0.04% воды в реакционную смесь); выход при синтезе 69%, после выделения 35%; время удерживания 13.9 мин, R_f 0.61.

Z-Ala₂-Ile-Arg-pNA. К раствору 58 мг (0.16 ммоль) Arg-pNA · HBr в 0.6 мл DMSO и 0.02 мл триэтиламина прибавляли 51 мг (0.12 ммоль) Z-Ala₂-Ile-OCH₃ и 2.4 мл ацетонитрила. После полного растворения пептида вносили 25 мг CPG-10, содержащего 4.8 мг субтилизина 72, и встряхивали смесь на качалке 2 сут при 20°C. Выход продукта составил 99%. После окончания реакции катализатор отделяли на фильтре, промывали 20% раствором DMSO в ацетонитриле. Фильтраты объединяли, подкисляли 6 М HCl и упаривали в вакууме. К остатку прибавляли 100 мл 0.1 М HCl, экстрагировали насыщенным водной *n*-бутанолом (100 мл × 2). Бутанольный слой промывали 15 мл 0.1 М HCl, водой (15 мл × 6) и упаривали досуха. Остаток растворяли в 10 мл метанола и осаждали продукт 50 мл эфира. Кристаллы отделяли на фильтре, промывали эфиром и сушили над KOH. Выход 92%; время удерживания 10.5 мин, R_f 0.73. Аналогично синтез проводили с 2- и 10-кратным избытком Arg-pNA · HBr.

Z-Ala₂-Ile-Arg-pNA получали аналогично Z-Ala₂-Ile-Arg-pNA, используя в качестве ацилирующего компонента Z-Ala₂-Ile-Arg-NH₂ и 1.5-кратный избыток Arg-pNA · HBr. Выход 55%; время удерживания 8.9 мин, R_f 0.64.

Кинетику накопления продуктов в реакции Dnp(Z-)-Ala₂-Xaa-OCH₃ (Xaa = Ile, Val) с амидом

аргинина, катализируемой субтилизином 72, изучали по методу, описанному для Dnp-Ala₂-Leu-OCH₃ [1]. При использовании в качестве ацилирующего компонента Z-Ala₂-Ile-OCH₃ количество катализатора уменьшали в 3.7 раза. При проведении реакции в присутствии 0.5–2% воды соответствующее ее количество вносили перед добавлением катализатора.

Гидролиз Z-Ala₂-Ile-Arg-NH₂ субтилизином 72. Смесь 10 мкл 86 мкМ раствора субтилизина 72 и 1 мл 2 мМ раствора субстрата в 0.05 М боратном буфере (рН 8.0) перемешивали 40 мин при 20°C; отбирали пробы по 50 мкл до внесения фермента и через 1, 15 и 40 мин после добавления фермента. К каждой пробе прибавляли 20 мкл 0.01 М HCl и анализировали методом ВЭЖХ. Аналогично проводили гидролиз Z-Ala₂-Ile-Arg₂-NH₂, Z-Ala₂-Ile-Arg-pNA, Z-Ala₂-Ile-Arg₂-pNA и при рН 7.4 Dnp-Ala₂-Val-Arg-NH₂.

Состав всех синтезированных соединений был подтвержден аминокислотным анализом.

Авторы выражают благодарность Т.И. Ворытцовой (ИБХ РАН) за проведение гидролиза хромогенного субстрата дуоденазой и расчет кинетических констант, Е.А. Тимохиной (ГосНИИ-генетика) за определение аминокислотного состава синтезированных пептидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Юсупова М.П., Новгородова С.А., Степанов В.М. // Биоорганич. химия. 1996. Т. 22. С. 523–527.
2. Smeekens S.P. // Bio/Technology. 1993. V. 11. P. 182–186.
3. Jean F., Basak A., Rondeau N., Benjannet S., Hendy G.N., Seidah N.G., Chretien M., Lasure C. // Biochem. J. 1993. V. 292. P. 891–900.
4. Vindrola O., Lindberg I. // Neuropeptides. 1993. V. 25. P. 151–160.
5. Hosaka M., Murakami K., Nakayama K. // Biomed. Res. 1994. V. 15. P. 383–390.
6. Yanagita M., Hoshino H., Nakayama K., Takeuchi T. // Endocrinology. 1993. V. 133. P. 639–644.
7. Антонов В.К., Ворытцова Т.И., Замолотчикова Т.С. // Докл. РАН. 1992. Т. 324. С. 1318–1328.
8. Velasco G., Ferrando A.A., Puente X.S., Sanchez L.M., Lopezotin C. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 27136–27142.
9. Reslow M., Adlercreutz P., Mattiasson B. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 177. P. 313–318.
10. Gron H., Meldal M., Breddam K. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 6011–6018.
11. Wangicar P.P., Graycar T.P., Estell D.A., Clark D.S., Dordick J.S. // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 12231–12237.
12. Гололобов М.Ю., Морозова И.П., Степанов В.М. // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 33–40.
13. Позднев В.Ф. // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. С. 583–589.
14. Гринштейн Дж., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов: Пер. с англ. М.: Мир, 1965. С. 624.
15. Юсупова М.П., Котлова Е.К., Тимохина Е.А., Степанов В.М. // Биоорганич. химия. 1995. Т. 21. С. 33–38.

Sequential Attachment of Arginine Residues to Peptides Catalyzed by Subtilisin.

2. Effect of the Nature of Acylating and Nucleophilic Components and Small Water Concentrations in Organic Solvent

M. P. Yusupova*, S. A. Novgorodova**, and V. M. Stepanov*

*State Research Institute of Genetics, Pervyi Dorozhnyi pr. 1, Moscow, 113545 Russia

**Moscow State University, Chemical Faculty, Moscow, Vorob'evy gory, 119899 Russia

Abstract—The reaction of Dnp(or Z)-Ala₂-Xaa-OCH₃ (Xaa = Ile or Val) with arginine amide or *p*-nitroanilide was studied in organic solvents, which was catalyzed by subtilisin sorbed on macroporous glass. It resulted in the formation of peptides containing one to four arginine residues: Dnp(or Z)-Ala₂-Xaa-(Arg)₁₋₄-NH₂. The number of arginine residues attached to the peptide depended on the water content in organic solvents, nature of the amino acid residue Xaa in the P₁ position of the acylating component, and the type of the *N*-protective group. The reaction can be used for synthesizing arginine-containing substrates of convertases and cathepsins B, L, and O. A chromogenic substrate for duodenase Z-Ala₂-Ile-Arg₂-pNA was obtained.

Key words: enzymic synthesis, subtilisin, organic solvent, arginine-containing peptides.