



УДК 577.156.07

## АФФИННЫЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОТЕИНАЗ, СОДЕРЖАЩИЕ В КАЧЕСТВЕ ЛИГАНДОВ МОРФОЛИДЫ ТРИПЕПТИДОВ

© 1997 г. А. В. Кузнецова, Г. Н. Руденская<sup>#</sup>, А. М. Богачева, Т. Л. Воюшина, В. М. Степанов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119899, Москва  
Поступила в редакцию 25.04.97 г. После доработки 20.06.97 г.

Синтезированы новые аффинные сорбенты, в которых в качестве лигандов использованы морфолиды трипептидов – Н-Ala-Ala-Leu-Mгp и Н-D-Ala-Leu-Arg-Mгp – аналоги субстратов субтилизиноподобных протеиназ и калликреина соответственно. Эти сорбенты были использованы для выделения и очистки ряда протеиназ: трипсина, пепсина, α-химотрипсина, тромбина, калликреина, термитазы. Они оказались также эффективными при выделении протеолитических ферментов из сложных смесей: мочи детей, страдающих гломерулонефритом, препарата гепатопанкреаса камчатского краба, корней одуванчика. Предполагается, что лиганды, являясь конкурентными ингибиторами ряда протеиназ, взаимодействуют с зоной связывания субстрата в этих ферментах.

*Ключевые слова:* аффинная хроматография, морфолиды трипептидов, очистка протеиназ, синтез пептидов.

Аффинная хроматография – удобный метод выделения протеолитических ферментов. Он основан на функциональных различиях белков, их способности связывать те или иные лиганды, специфичен и позволяет выделить нужный фермент из множества других. Ранее в нашей лаборатории были разработаны аффинные сорбенты широкой специфичности, содержащие лиганды общего типа, которые могут быть использованы для выделения ряда протеиназ различных классов. Эти сорбенты с антибиотиками-полипептидами грамицидином С [1, 2] и бацитрацином [2, 3] в качестве лигандов используются для выделения протеолитических ферментов из различных источников. Для более избирательного извлечения протеиназ необходимы пептидные лиганды, лучше соответствующие основной специфичности фермента.

Протеиназы, как правило, образуют множественные контакты с субстратом, поэтому в качест-

ве аффинных лигандов мы синтезировали производные трипептидов. Чтобы предотвратить гидролиз лигандов протеиназами, были использованы нерасщепляемые циклические амиды – морфолиды. Лиганд, рассчитанный на связывание субтилизина, Н-Ala-Ala-Leu-Mгp (I), представляет собой производное трипептида, гидрофобная С-концевая кислота которого – лейцин – соответствует первичной специфичности субтилизина и аналогичных протеиназ.

Другой лиганд – Н-D-Ala-Leu-Arg-Mгp (II) содержит С-концевой аргинин, т.е. соответствует специфичности трипсиноподобных протеиназ. Для эффективного связывания с калликреином в положение P2 был помещен объемный остаток лейцина. Заметим, что *n*-нитроанилид со сходной структурой пептидной части молекулы – D-Val-Leu-Arg-pNA – является субстратом для определения активности калликреина [4].

### СИНТЕЗ СОРБЕНТОВ СЕФАРОЗА-AALmгp-I И СЕФАРОЗА-AALmгp-II

Синтезированный нами N-замещенный трипептид – предшественник лиганда I – Z-Ala-Ala-Leu-Mгp следует отнести к слабым ингибиторам (по отношению к субтилизину-72 K;  $1.4 \times 10^{-4}$  M). Можно предположить, что с таким лигандом, закрепленным на носителе, фермент будет связываться относительно слабо, однако это позволит десорбировать протеиназы в более мягких условиях.

Синтез лиганда проводили конденсацией бензил-оксикарбонилаланилаланина с морфолидом

Сокращения: Mгp – остаток морфолина; HOBt – 1-гидроксибензотриазол; pNA – *n*-нитроанилид; Glp – пироглутаминовая кислота; Dnp – динитрофенил; все аминокислоты – L-ряда, кроме оговоренных D-аминокислот; Rmгp и Lmгp – морфолиды аргинина и лизина соответственно. Синтезированные сорбенты – сефароза-AALmгp-I – АН-сефароза с лигандом Н-Ala-Ala-Leu-Mгp, присоединенным по аминогруппам аффинного носителя через *n*-бензохинон; сефароза-AALmгp-II – СН-сефароза с тем же лигандом, присоединенным по карбоксильным группам носителя; сефароза-ALRmгp – СН-сефароза с лигандом Н-D-Ala-Leu-Arg-Mгp, присоединенным по карбоксильным группам носителя.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: 939-55-41, факс: 939-31-81, e-mail: rudenskaya@biorg.chem.msu.su).

лейцина в присутствии дициклогексилкарбодиимида и 1 экв. 1-оксibenзотриазола [5]. В тех же условиях получали морфолид *трет*-бутилокси-карбониллейцина (схема 1).

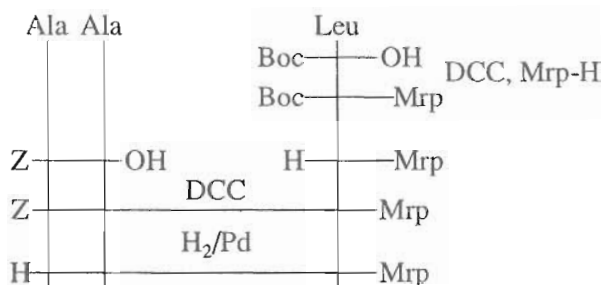


Схема 1. Синтез лиганда I.

После удаления защитной группы H-Ala-Ala-Leu-Mgp присоединяли к носителю двумя способами:

1) по аминогруппам АН-сефарозы – путем реакции с *n*-бензохиноном [6]. Полученный аффинный сорбент (сефароза-AALmр-I), по данным аминокислотного анализа, содержал 9 мкмоль лиганда на 1 г сорбента, что соответствует модификации 25% активных аминогрупп АН-сефарозы;

2) к СН-сефарозе лиганд присоединяли путем образования амидной связи между карбоксильными группами носителя и аминогруппой пептида в присутствии водорастворимого карбодиимида (сефароза-AALmр-II) (схема 2). Для блокирования непрореагировавших активированных карбоксильных групп и подавления связывания ферментов по ионообменному механизму полученная сефароза-AALmр-II была обработана моноэтаноломином. Степень включения лиганда I составила 25 мкмоль/г сорбента, что отвечает 60%-ной модификации COOH-групп (схема 2).

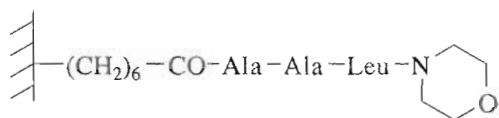


Схема 2. Предполагаемое строение сефарозы-AALmр-II.

Необходимо отметить большую емкость сефарозы-AALmр-I по сравнению с сефарозой-AALmр-II по отношению к ферментам. Мы предполагаем, что это обусловлено неоднозначной реакцией АН-сефарозы с *n*-бензохиноном в первом случае (схема 3), в результате чего могли образоваться два типа мест связывания протеиназ. Первые (а) соответствуют специфичности субтилизиновых протеиназ, а вторые (б) заканчиваются остатком бензохинона и обуславливают малоспецифичную гидрофобную сорбцию ферментов.

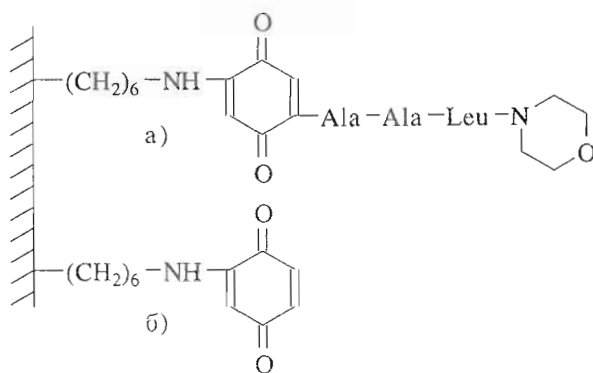


Схема 3. Предполагаемое строение сефарозы-AALmр-I.

### Синтез сорбента сефароза-ALRmр

Аналог субстрата калликрейна, H-D-Ala-Leu-Arg-Mgp (II), содержит на С-конце не расщепляемый протеиназами морфолид аргинина и является слабым обратимым ингибитором трипсина ( $K_i = 2.4 \times 10^{-4}$  М). N-Вос-замещенный морфолид аргинина, так же как и аффинный лиганд, синтезирован карбодиимидным методом (схема 4). Присоединение лиганда (II) к СН-сефарозе проводили с использованием водорастворимого карбодиимида, как и при синтезе сефарозы-AALmр-II, после чего активированные карбоксильные группы блокировали моноэтаноломином для подавления неспецифических ионных взаимодействий. По данным аминокислотного анализа, около 25% свободных COOH-групп смолы прореагировали с лигандом (II); степень включения лиганда – 10 мкмоль/г сорбента.

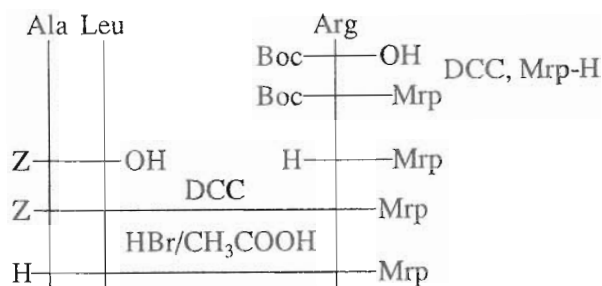


Схема 4. Синтез лиганда II.

### МОДЕЛЬНЫЕ ОПЫТЫ ПО ХРОМАТОГРАФИИ ОЧИЩЕННЫХ ПРОТЕИНАЗ

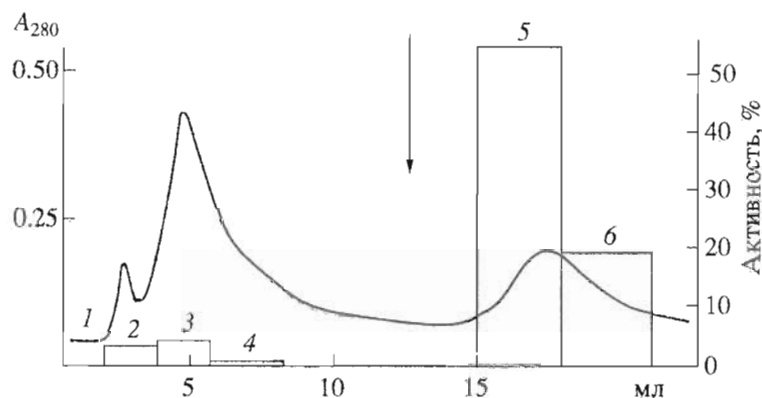
Для оценки специфичности и емкости сорбентов на них проводили хроматографию коммерческих препаратов протеиназ различных классов в условиях полного насыщения ферментом (табл. 1). Сефароза-AALmр-I обладает наибольшей емкостью по отношению к термитазе, папаину и пепсину;

**Таблица 1.** Очистка коммерческих препаратов протеиназ на сефарозе-ALMpr-I (объем колонки 22 мл)

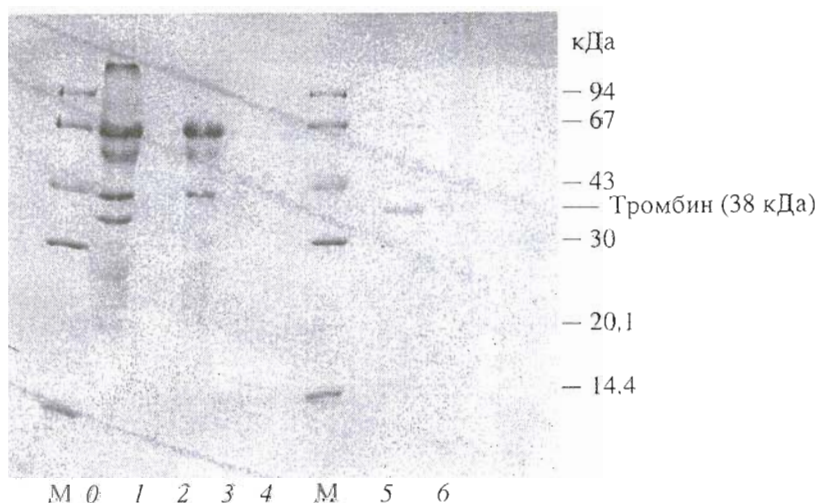
| Фермент               | Нанесено          |                      | Получено          |                      | Выход по активности, % | Емкость сорбента, мг/мл |
|-----------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|------------------------|-------------------------|
|                       | Белок, $OE_{280}$ | Активность, ед. акт. | Белок, $OE_{280}$ | Активность, ед. акт. |                        |                         |
| Термитаза             | 69                | 46                   | 56                | 47                   | 100                    | 2.5                     |
| $\alpha$ -Химотрипсин | 34                | 0.20                 | 4                 | 0.14                 | 70                     | 0.18                    |
| Трипсин               | 17                | 3.2                  | 8                 | 0.8                  | 25                     | 0.36                    |
| Папаин                | 40                | 2.5                  | 28                | 2.1                  | 84                     | 1.3                     |
| Пепсин                | 20                | 148                  | 16                | 106                  | 72                     | 0.72                    |

химотрипсина и трипсина сорбируется в несколько раз меньше. Все эти протеиназы способны гидролизовать белки и пептиды по связям гидрофобных аминокислот и, вероятно, могут взаимодействовать с ароматическим кольцом бензохинона

сорбента. Такая неспецифическая сорбция ферментов может привести к увеличению локальной концентрации их на поверхности сорбента, а значит, облегчит взаимодействие протеиназ с пептидным лигандом.



**Рис. 1.** Хроматография препарата тромбина на сефарозе-ALMpr. Условия: колонка размером  $0.5 \times 17$  см, буфер А. Стрелкой показано начало элюции буфером Е. Столбики отражают активность тромбина во фракциях 1-6 (% по отношению к активности наносимого на колонку препарата).



**Рис. 2.** Электрофоретический анализ фракций, полученных при хроматографии препарата тромбина на сефарозе-ALMpr (рис. 1): 0 – исходный препарат тромбина, 1-4 – фракции, не сорбирующиеся на сефарозе-ALMpr, 5, 6 – фракции элюата. М – маркеры (сверху вниз): фосфорилаза В, бычий сывороточный альбумин, овальбумин, карбангидраза, соевый ингибитор трипсина,  $\alpha$ -лактальбумин фирмы Pharmacia (Швеция).

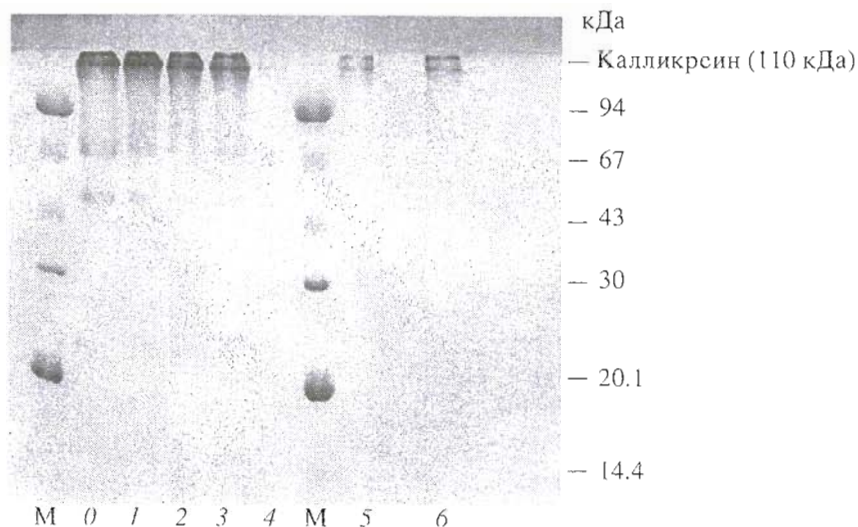


Рис. 3. Электрофоретический анализ фракций, полученных при хроматографии препарата калликреина на сефарозе-ALRmtr: 0 – исходный препарат калликреина, 1–4 – фракции, не сорбирующиеся на сефарозе-ALRmtr, 5, 6 – фракции элюата. М – маркеры (см. подпись к рис. 2).

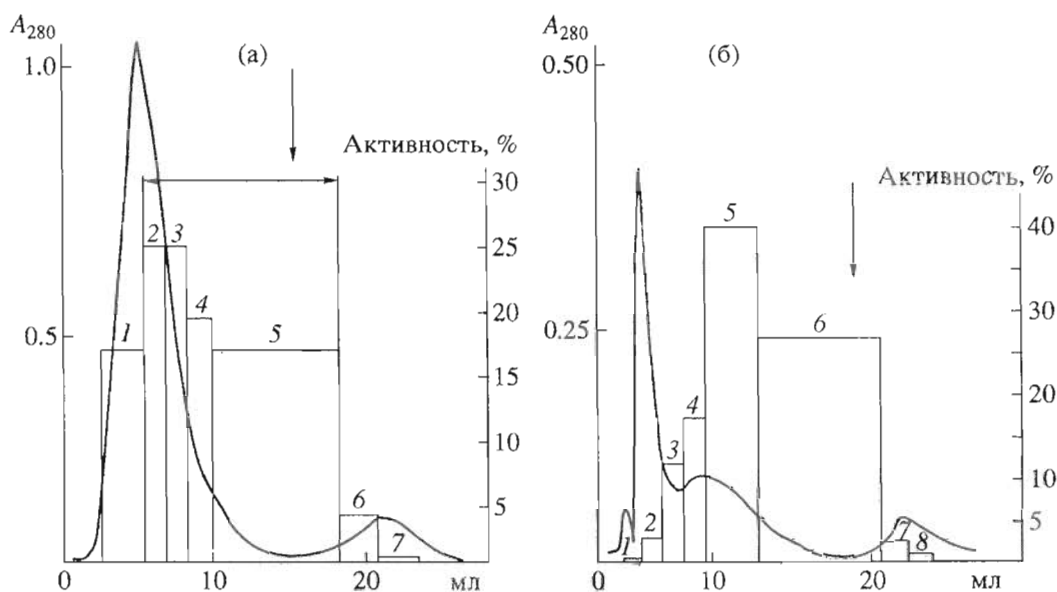


Рис. 4. Хроматография коммерческого препарата трипсина на сефарозе-ALRmtr (а) и рехроматография фракций 2–5 (б). Условия см. в подписи к рис. 1.

Применение сефарозы-ALRmtr позволило получить гомогенные препараты ферментов системы свертывания крови – калликреина и тромбина, а также трипсина. При хроматографии частично очищенного тромбина на сефарозе-ALRmtr (рис. 1) примеси не связывались с сорбентом и элюировались при промывании колонки стартовым буфером. Тромбин удерживался сорбентом и элюировался 25% изопропиловым спиртом с выходом по активности 73% и степенью очистки 3.4 раза. Как показал электрофорез в денатури-

рующих условиях (рис. 2), фракции 5 и 6 содержали практически гомогенный тромбин ( $M$  38 кДа).

В выбранных условиях емкость сефарозы-ALRmtr по отношению к тромбину составила 0.14 мг/мл сорбента. Наибольшее сродство (0.68 мг/мл) сефароза-ALRmtr имела к калликреину – ферменту, аналогом субстрата которого является лиганд. При хроматографии частично очищенного калликреина плазмы крови кролика, проведенной в режиме полного насыщения сорбента этим ферментом (рис. 3), часть последнего десорбировалась при промывании колонки стартовым

Таблица 2. Очистка некоторых протеиназ из природных источников на сефарозе-AALmp-I (объем колонки 22 мл)

| Образец | Фермент                 | Источник                                 | Получено                 |                      |                                      | Выход по активности, % | Степень очистки |
|---------|-------------------------|--|--------------------------|----------------------|--------------------------------------|------------------------|-----------------|
|         |                         |  | Белок, ОЕ <sub>280</sub> | Активность, ед. акт. | Уд. акт., ед. акт./ОЕ <sub>280</sub> |                        |                 |
| 1       | Субтилизин              | <i>Th. vulgaris</i> ИНМИ-4А              | 49                       | 101                  | 2.1                                  | 74                     | 16              |
| 2       | »                       | <i>Actinomyces</i> sp.                   | 42                       | 22                   | 0.5                                  | 73                     | 18              |
| 3       | »                       | <i>B. licheniformis</i> , 72             | 36                       | 119                  | 3.3                                  | 68                     | 2               |
| 4       | Сериновая протеиназа    | Корни одуванчика                         | 28                       | 0.9                  | 0.03                                 | 90                     | 17              |
| 5       | Трипсин РС              | Гепатопанкреас камчатского краба         | 37                       | 9.2                  | 0.26                                 | 158                    | 4               |
| 6       | Сериновая протеиназа РС |  | 33                       | 5.5                  | 0.17                                 | 87                     | 2               |
| 7       | Карбоксипептидаза РС    |  | 33                       | 3.4                  | 0.07                                 | 100                    | 2               |
| 8*      | Калликреин              | Моча детей, страдающих гломерулонефритом | 7.3                      | 1.8                  | 0.08                                 | 22                     | 15              |
| 9*      | Кининаза X              |  | 35                       | 0.6                  | 0.05                                 | 57                     | 8               |
| 10*     | Лейцинаминопептидаза    |  | 35                       | 8.6                  | 0.24                                 | 55                     | 7               |

\* Объем колонки 18 мл.

буфером, а часть связывалась прочно и элюировалась только 25% изопропиловым спиртом. По данным электрофореза, фракции элюата 5 и 6 содержали гомогенный калликреин (рис. 3, фракции 5, 6).

Еще менее прочно связывался с сефарозой-AALmp бычий трипсин, который десорбировался уже при промывании колонки стартовым буфером. Фракции 2–5 (отмечены на рис. 4а стрелкой) далее объединяли и рехроматографировали. Вероятно, очистка трипсина проходила в условиях, близких к фронтальной хроматографии; при

этом обнаруживался пик, содержащий трипсин (фракции 4, 5 на рис. 4б), дополнительно очищенный в три раза.

#### ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОТЕИНАЗ ИЗ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ

В табл. 2 суммированы результаты выделения протеиназ из природных источников – культуральных жидкостей микроорганизмов, экстрактов растительного и животного происхождения. Как и следовало ожидать исходя из специфичности лиганда, с сефарозой-AALmp-I хорошо взаимодействовали бактериальные субтилизины (табл. 2, № 1–3). На рис. 5 в качестве примера приведена типичная хроматограмма высушенной культуральной жидкости *Bacillus subtilis* на сефарозе-AALmp-II. Интересно, что при увеличении нагрузки наибольшая степень очистки (18 раз) наблюдается во фракции 2 (выход по активности 37%) при промывании колонки стартовым буфером. Вероятно, это связано с тем, что лиганд является слабым ингибитором субтилизина, а в результате присоединения к матрице – сефарозе константа ингибирования повышается по крайней мере еще на порядок. Такой процесс динамической сорбции на аффинной колонке можно рассматривать как фронтальную хроматографию субтилизина.

Интересные результаты были получены при выделении протеолитических ферментов из мочи детей, больных хроническим гломерулонефритом (табл. 2, № 8–10). При этом заболевании в моче появляется большое количество различных белков, в том числе и протеолитических ферментов. Мы наблюдали главным образом за ферментами

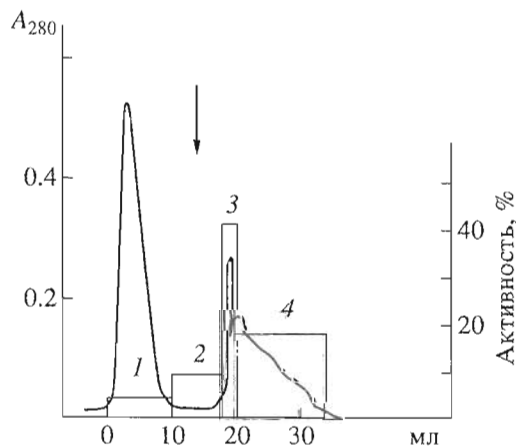


Рис. 5. Хроматография препарата субтилизина-72 из культуральной жидкости *B. subtilis* на сефарозе-AALmp-II. Условия: колонка размером 1 × 4 см, буфер С. Стрелкой показано начало элюции буфером Е. Столбики отражают активность субтилизина во фракциях (% по отношению к активности наносимого на колонку препарата).

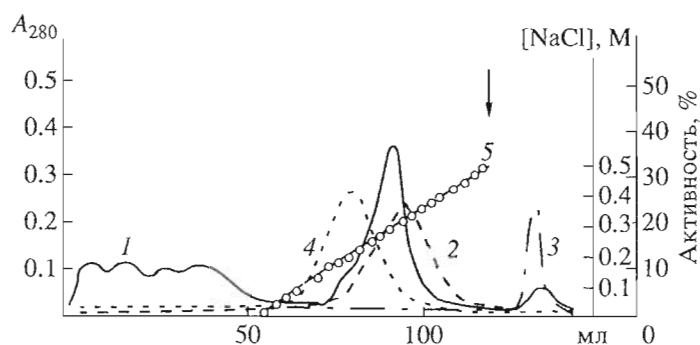


Рис. 6. Хроматография мочи ребенка, больного хроническим гломерулонефритом, на сефарозе-AALmгp-I. Условия: колонка размером 1,5 × 10 см, буфер А. Поглощение при 280 нм (1); активности: лейцинаминопептидазы (2), калликреина (3), кининазы X (4). 5 – концентрация NaCl в буфере А. Стрелкой показано начало элюции буфером Е.

калликреин-кининовой системы, наиболее быстро реагирующей на патологические изменения в организме. Выявлено значительное увеличение активности калликреина, кининазы X и лейцинаминопептидазы. Эти ферменты не имели сродства к грамицидин С- и бацитрацин-сефарозе. Гидрофобная, ионообменная хроматография и гель-фильтрация на ранних стадиях выделения этих ферментов неэффективны ввиду несоизмеримо большего количества белков, присутствующих в моче больных, в частности сывороточного альбумина, иммуноглобулинов и  $\alpha_1$ -антитрипсина.

На рис. 6 приведена аффинная хроматография на колонке с сефарозой-AALmгp-I мочи ребенка, страдающего хроническим гломерулонефритом, предварительно диализованной против дистиллированной воды. Все три протеиназы задерживаются на сорбенте. Градиентом концентрации NaCl (0–0,5 М) элюируются вместе кининаза X (химотрипсиноподобный фермент) с выходом по активности 57% и степенью очистки 8 раз и лейцинаминопептидаза с выходом 55% и 7-кратной очисткой. Калликреин более прочно удерживается сорбентом и десорбируется 25% изопропиловым спиртом в 1 М NaCl с выходом 22% и степенью очистки 14 раз. Сродство калликреина к данному сорбенту неожиданно, так как для связывания с этим ферментом субстрат обычно имеет в Р1-положении остаток аргинина.

Из гепатопанкреаса камчатского краба на сефарозе-AALmгp-I (рис. 7) удалось успешно выделить три фермента. Карбоксипептидаза РС [7], сериновая протеиназа РС [8] и трипсин РС демонстрируют заметное сродство к сефарозе-AALmгp-I. Первые два фермента элюируются 1 М NaCl, не разделяясь, а трипсин РС краба сорбируется более прочно и элюируется только при добавлении 25% изопропанола. При рехроматографии фракции, содержащей карбоксипептидазу РС и сериновую протеиназу РС, в тех же условиях в отсутствие трипсина более прочно связывается с сорбентом сериновая протеиназа РС. Таким образом,

используя своеобразную специфичность сорбента, за две последовательные хроматографические стадии можно разделить три фермента.

В некоторых случаях пептидная природа лиганда аффинного сорбента ограничивает его использование для разделения сложных ферментных смесей. Тогда срок действия сорбента уменьшается из-за постепенного гидролиза лиганда протеиназами. Было замечено, что при разделении смеси протеиназ гепатопанкреаса камчатского краба на сефарозе-ALRmгp эффективными оказались лишь первые два опыта. Возможно, это результат гидролиза лиганда протеиназами, входящими в состав гепатопанкреаса краба.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: трипсин (КФ 3.4.21.4; Reanal, Чехия),  $\alpha$ -химотрипсин (КФ 3.4.21.1; Biojar

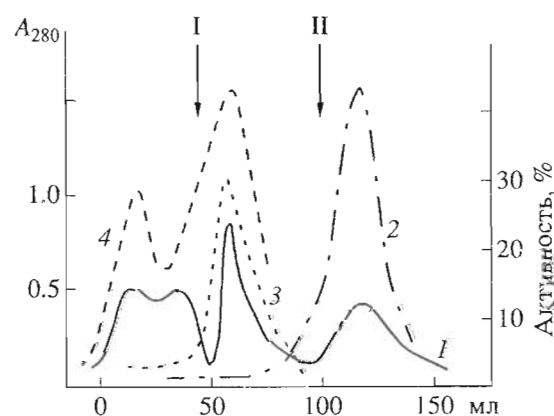


Рис. 7. Хроматография протеиназ гепатопанкреаса камчатского краба на сефарозе-AALmгp-I. Условия: колонка размером 3 × 3,5 см, буфер А с 5 мМ ацетатом кальция. Поглощение при 280 нм (1); активности: трипсина (2), сериновой протеиназы РС (3), карбоксипептидазы РС (4). Стрелками показано начало элюции буферами В (I) и Е (II).

Олайн, Латвия), папаин (КФ 3.4.22.2; Merck, Германия), тромбин (КФ 3.4.21.5; Каунас, Литва), частично очищенную термитазу (приготовлена в нашей лаборатории [9]), калликреин (КФ 3.4.21.35) [10], пепсин (КФ 3.4.23.1; мясокомбинат, Москва), субтилизин (КФ 3.4.21.14; ВНИИ Генетика, Москва); аминокислоты и их производные (Reanal, Венгрия); CN-Sepharose-4В емкостью 10–14 мкмоль/мл геля и АН-Sepharose-4В емкостью 6–10 мкмоль/мл геля (Pharmacia, Швеция).

Активность ферментов измеряли по гидролизу следующих субстратов: Z-Ala-Ala-Leu-pNA (субтилизин и термитаза), Glp-Ala-Ala-Leu-pNA (фермент из корней одуванчика, кининаза X и сериновая протеиназа РС краба), Suc-Phe-pNA ( $\alpha$ -хитотрипсин), Z-D-Ala-Leu-Arg-pNA (каликреин и тромбин), Leu-pNA (лейцинаминопептидаза), Bz-D,L-Arg-pNA (трипсины быка и краба), Glp-Phe-Ala-pNA (папаин), Dnp-Ala-Ala-Leu-Arg (карбоксипептидаза РС), гемоглобин (пепсин) [11].

*Определение активности ферментов по гидролизу *n*-нитроанилидных субстратов [12]*

К 2.5 мл буфера А последовательно прибавляли 50 мкл раствора субстрата концентрацией 5 мг/мл DMF и аликвоту фермента, смесь инкубировали в термостате при 37°C до появления слабой желтой окраски. Реакцию останавливали добавлением 0.2 мл 50% уксусной кислоты и измеряли поглощение раствора при 410 нм. За 1 ед. акт. принимали количество фермента, высвобождающее 1 мкмоль *n*-нитроанилина в 1 мин. Удельную активность фермента рассчитывали по отношению активности к количеству белка, выраженному в оптических единицах ( $\lambda$  280 нм).

Электрофорез проводили в 12.5% ПААГ с SDS, белки-маркеры – препараты фирмы Pharmacia (Швеция).

Аминокислотный состав пептидов определяли на аминокислотном анализаторе Hitachi-835 (Япония) после гидролиза пептида 5.7 М HCl при 105°C в течение 24 ч.

Контроль за ходом реакции осуществляли по ТСХ на пластинах Silufol в системах бензол–ацетон–уксусная кислота (50 : 25 : 1) (БАУ) и бутанол–уксусная кислота–вода (4 : 1 : 5) (БУВ).

Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР пептида Z-Ala-Ala-Leu-Mrp регистрировали на спектрофотометре Bruker AC-300 (Германия) с рабочей частотой по водороду 300.13 МГц относительно растворителя DMSO ( $\delta$  2.5 м. д.), пептида H-D-Ala-Leu-Arg-Mrp – на спектрофотометре Bruker AC-200 с рабочей частотой 200.13 МГц относительно D<sub>2</sub>O при 50°C ( $\delta$  5.2 м. д.).

Буферные растворы: 0.05 М трис-HCl, pH 8.0 (А); 0.05 М трис-HCl, 1 М NaCl, pH 8.0 (В); 0.05 М трис-HCl, pH 6.8 (С); 0.05 М трис-HCl, 1 М NaCl,

pH 6.8 (D); 0.05 М трис-HCl, 1 М NaCl, 25% изопропанол, pH 8.0 (Е).

**Вос-Leu-Mrp.** К 1 г (4.3 ммоль) Вос-Leu-OH в 5 мл THF прибавляли 0.7 г (5.16 ммоль) HOBT в 3 мл смеси THF-DMF (1 : 10). После охлаждения смеси льдом прибавляли раствор DCC (1.062 г, 5.16 ммоль) в 3 мл THF, а затем 473 мкл (5.4 ммоль) морфолина. Реакционную смесь перемешивали 15 ч при комнатной температуре. Выпавший осадок мочевины отделяли на стеклянном фильтре, фильтрат упаривали и маслянистый остаток растворяли в 120 мл этилацетата. Этилацетатный раствор промывали последовательно водой, насыщенным раствором гидрокарбоната натрия и снова водой (3 × 40 мл), сушили над сульфатом магния, а затем упаривали. Выход продукта 81%.

**H-Leu-Mrp.** Маслообразный Вос-Leu-Mrp (0.91 г, 3 ммоль) растворяли в 15 мл 3.4 М HCl в диоксане (45 ммоль). Смесь перемешивали 3 ч при 20°C, а затем упаривали. Остаток упаривали с метанолом (2 × 6 мл). H-Leu-Mrp сушили в вакуум-эксикаторе над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Выход продукта 90%.

**Z-Ala-Ala-Leu-Mrp.** К 0.926 г (3.15 ммоль) Z-Ala-Ala-OH в 20 мл THF прибавляли 0.425 г (3.15 ммоль) HOBT в 5 мл THF-DMF (5 : 1). После охлаждения льдом к смеси прибавляли по каплям 2 мл раствора DCC в THF (0.779 г, 3.78 ммоль), а затем 0.749 г (3.15 ммоль) H-Leu-Mrp · HCl и 484 мкл (3.46 ммоль) триэтиламина и перемешивали 2 ч при охлаждении льдом, а затем еще 15 ч при 20°C. Осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали на стеклянном фильтре, фильтрат упаривали досуха, остаток растворяли в минимальном количестве этилацетата и снова отфильтровывали осадок мочевины. Далее доводили объем этилацетата до 130 мл и промывали последовательно водой, насыщенным раствором гидрокарбоната натрия и снова водой (3 × 35 мл). Этилацетатный раствор сушили сульфатом магния, а затем упаривали растворитель в вакууме. Выход продукта 58%. *R<sub>f</sub>* 0.9 (БАУ). Аминокислотный состав (ммоль): Ala – 13.0, Leu – 6.5. <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO),  $\delta$ , м. д.: 7.33 (1H, с, Ph Z-группы), 5.05 (1H, с, CH<sub>2</sub> в PhCH<sub>2</sub>CO), 4.09, 4.3 (м, 2CH, 2Ala), 4.72 (т,  $\alpha$ -CH, Leu), 3.6 (м, CH<sub>2</sub>O в N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O), 3.15 (м, CH<sub>2</sub>N в N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O), 3.4 (м, NH), 1.6 (м, CH, Leu), 1.45 (м, CH<sub>2</sub>, Leu), 1.2 (м, 2CH<sub>3</sub>, 2Ala), 0.89 (д, 2CH<sub>3</sub>, Leu).

**H-Ala-Ala-Leu-Mrp.** 0.508 г Z-Ala-Ala-Leu-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O растворяли в 7 мл этанола и после деаэрирования раствора током аргона прибавляли 50 мг палладиевого катализатора. Реакцию проводили в токе водорода, перемещивая смесь 8 ч при комнатной температуре и поддерживая pH 2–3 прибавлением HCOOH. Далее катализатор отфильтровывали, а растворитель упаривали в вакууме. Выход продукта 95%.

**Woc-Arg-Mrp.** К 1.555 г (5 ммоль) Woc-Arg-OH в 5 мл свежеперегнанного DMF прибавляли 0.675 г (5 ммоль) HOBT, охлаждали смесь до 0°C и по каплям прибавляли раствор 1.545 г (7.5 ммоль) DCC в 3 мл DMF, а затем 880 мкл (10 ммоль) морфолина. Смесь перемешивали 2 ч при 0°C и оставляли на 4 сут при 20°C. Каждые сутки добавляли DCC (по 1.2 г). После того как реакция прошла на 95% (по ТСХ в системе БУВ), отфильтровали на стеклянном фильтре выпавшую дициклогексилмочевину, упарили DMF и избыток морфолина. Маслообразный остаток растворяли в 50 мл бутанола, насыщенного водой, и экстрагировали продукт промывкой водой (8 × 10 мл). Водный слой упаривали в вакууме, остаток сушили в вакуум-эксикаторе над NaOH. Выход продукта 80%.  $R_f$  0.33 (БУВ).

**Z-D-Ala-Leu-Arg-Mrp.** К 1.4 г (4 ммоль) маслообразного Woc-Arg-Mrp прибавляли 742 мкл (10 ммоль) трифторуксусной кислоты. После растворения масла перемешивали 10 ч при комнатной температуре, а затем упаривали трифторуксусную кислоту в вакууме. 1 г (3.14 ммоль) Z-D-Ala-Leu-OH растворяли в 10 мл свежеперегнанного ацетонитрила, прибавляли 0.424 г (3.14 ммоль) HOBT, а затем раствор в 5 мл ацетонитрила 0.392 г (3.14 ммоль) Arg-Mrp и 683 мкл (6.28 ммоль) N-метилморфолина. Смесь охлаждали до 0°C, по каплям прибавляли раствор 1.3 г (6.28 ммоль) DCC в 5 мл ацетонитрила и перемешивали на магнитной мешалке 2 ч при 0°C, а затем 48 ч при 20°C. Выпавший осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали на стеклянном фильтре, а фильтрат упаривали. Остаток растворяли в воде, подкисленной HCl до pH 3. После декантации водного слоя выпавшее желтое масло растворяли в 50 мл этилацетата и экстрагировали продукт водой (3 × 10 мл). Далее водный экстракт упаривали в вакууме и продукт высушивали в вакуум-эксикаторе над NaOH. Выход продукта 25%. Аминокислотный состав (ммоль): Ala – 5.4, Leu – 5.5, Arg – 5.3.

**H-D-Ala-Leu-Arg-Mrp.** В колбу, снабженную хлоркальциевой трубкой, помещали 0.4 г (0.7 ммоль) Z-D-Ala-Leu-Arg-Mrp и прибавляли 2.3 мл 31% HCl в ледяной уксусной кислоте. После растворения вещества перемешивали реакционную смесь на магнитной мешалке ночь при комнатной температуре. На следующий день прибавляли 10 мл охлажденного абсолютного эфира и оставляли на 1 ч в холодильнике. Выпавшее желтое масло промывали эфиром (3 × 5 мл), а затем 2 раза добавляли абсолютный эфир и упаривали его в вакууме. Продукт в виде желтоватого масла сушили над NaOH в вакуум-эксикаторе. Выход 90%. Аминокислотный состав (ммоль): Ala – 4.0, Leu – 4.0, Arg – 4.0.  $^1\text{H-ЯМР}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$ , м. д.: 4.85 (т,  $\alpha$  CH, Leu), 4.4 (т, CH, Arg), 4.2 (к, CH, Ala), 3.7 (т,  $\text{CH}_2\text{O}$  в  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}$ ), 3.25 (т,  $\text{CH}_2\text{N}$  в

$\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}$ ), 3.5 (м, NH-группы), 1.65 (м,  $\text{CH}_2$  и CH, Leu), 1.6 (д,  $\text{CH}_3$ , Ala), 1.6–1.8 (м,  $\text{CH}_2$ , Arg), 0.95 (д,  $2\text{CH}_3$ , Leu).

**Синтез сорбента АН-сефароза-Ala-Ala-Leu-Mrp (сефароза-AALmrp-I).** Набухшую и промытую от консервирующих добавок сефарозу (6.0 г, 24 мл) уравнивали буфером В. Предварительно смешивали растворы 44 мг (0.4 ммоль, 2-кратный избыток) *n*-бензохинона и 0.2 ммоль пептида H-Ala-Ala-Leu-Mrp в 5 мл этилового спирта с 42 мкл (0.3 ммоль) триэтиламина. Эту смесь прибавляли к сефарозе и перемешивали 20 ч на магнитной мешалке. Сорбент последовательно отмывали от непрореагировавших исходных веществ 25% водным этанолом и изопропанолом, а затем буфером А. Для определения включения лиганда аликвоту сорбента промывали, высушивали, а затем гидролизовали 5.7 М HCl при 105°C в течение 24 ч и анализировали на аминокислотном анализаторе Hitachi-835 (Япония). Степень включения лиганда 9 мкмоль/г сухого геля.

**Синтез сорбентов СН-сефароза-Ala-Ala-Leu-Mrp (сефароза-AALmrp-II) и СН-сефароза-D-Ala-Leu-Arg-Mrp (сефароза-ALRmrp).** К навеске 2.6 г СН-сефарозы после набухания и промывки 0.5 М NaCl прибавляли 0.488 г (1.15 ммоль) метил-*n*-толуолсульфоната  $\text{N}^\alpha$ -(2-морфолиноэтил)карбодиимида, растворенного в 3 мл 50% диоксана, а затем 0.23 ммоль пептида H-Ala-Ala-Leu-N( $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ) $_2\text{O}$  в 250 мкл 50% диоксана. Доводили pH до 5.4–5.6 (прибавив в реакционную смесь несколько капель конц. HCl) и медленно перемешивали 20 ч при 20°C, затем гель отделяли и промывали, как и в случае синтеза на основе АН-сефарозы. Степень включения лиганда 25 мкмоль/г сухого геля. Аналогично синтезировали сорбент СН-сефароза-D-Ala-Leu-Arg-Mrp (сефароза-ALRmrp). Степень включения лиганда в нем составила 10 мкмоль/г сухого геля.

**Хроматография протеиназ.** Синтезированный сорбент, отмытый от избытков реагентов, помещали в хроматографическую колонку размером 1 × 4 см и промывали элюирующим буфером Е, а затем стартовым буфером А или С. Наносили исследуемые смеси белков в стартовом буфере А или С, промывали колонку до отсутствия поглощения при 280 нм и десорбировали белковые фракции сначала градиентом NaCl (0–1 М) в буфере А, буфером В или С, а затем элюирующим буфером Е.

Степень очистки белков рассчитывали по соотношению отдельных протеиназ в исходной смеси и после хроматографии на колонке.

Емкость аффинных сорбентов по отношению к протеиназам определяли по количеству белка, десорбирующегося с колонки при промывании сорбентов элюирующим буфером.



Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 96-04-49904) и Российской государственной программы "Инженерная энзимология" (грант № 2-28).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Степанов В.М., Лобарева Л.С., Руденская Г.Н., Боровикова В.П., Ковалева Г.Г., Лавренова Г.Н. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. С. 831–835.
2. Руденская Г.Н. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. С. 213–227.
3. Stepanov V.M., Rudenskaya G.N. // J. Appl. Biochem. 1983. V. 5. P. 420–428.
4. Raband M., Lefebor F., Daniel V. // Clin. Chim. Acta. 1978. V. 90. P. 53–60.
5. Гершкович А.А., Кибирев В.К. Химический синтез пептидов. Киев: Наук. думка, 1992.
6. Brandt J., Anderson L.O., Porath J. // Biochim. Biophys. Acta. 1975. V. 386. P. 196–207.
7. Руденская Г.Н., Купенко О.Г., Исаев В.А., Степанов В.М., Дунаевский Я.Е. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 249–255.
8. Руденская Г.Н., Исаев В.А., Степанов В.М., Дунаевский Я.Е., Баратова Л.А., Калбина Т.С., Нурминская М.В. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 1119–1132.
9. Степанов В.М., Руденская Г.Н., Нестерова Н.Г., Куприянова Т.И., Хохлова Ю.М., Усайте И.А., Логинова Л.Г., Тимохина Е.А. // Биохимия. 1980. Т. 45. С. 1871–1880.
10. Зыкова В.П., Пасхина Т.С. // Докл. АН СССР. 1965. Т. 165. С. 14–39.
11. Anson M. // J. Gen. Physiol. 1938. V. 22. P. 79–88.
12. Люблинская Л.А., Гайда И., Баландина Г.Н., Филиппова И.Ю., Макарян А.Н., Лысогорская Е.Н., Оксенойт Е.С., Степанов В.М. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. С. 748–756.

## Affine Sorbents with Tripeptide Morpholide Ligands for Protease Isolation

A. V. Kuznetsova, G. N. Rudenskaya, A. M. Bogacheva, T. L. Voyushina, and V. M. Stepanov<sup>†</sup>

*Moscow State University, Chemistry Department, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia*

**Abstract**—New affine sorbents were synthesized involving tripeptide morpholides H-Ala-Ala-Leu-Mrp and H-D-Ala-Leu-Arg-Mrp as ligands that mimic substrates of subtilisin-like proteases and kallikrein, respectively. These were used for the isolation and purification of several proteases: trypsin, pepsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, thrombin, kallikrein, and termitase and were also efficient in the isolation of proteolytic enzymes from complex mixtures, such as the urine of children suffering from glomerulonephritis, hepatopancreas of Kamchatka crab, and dandelion roots. The ligands are competitive inhibitors of a number of proteases, and therefore, they were supposed to interact with the substrate binding sites in these enzymes.

*Key words:* affinity chromatography, tripeptide morpholides, protease purification, peptide synthesis