



УДК 577.112.6:577.152.34'135

СЕГМЕНТНАЯ КОНДЕНСАЦИЯ ПЕПТИДОВ НА ТВЕРДОЙ ФАЗЕ С ПОМОЩЬЮ СУБТИЛИЗИНА В КОМПЛЕКСЕ С ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТОМ НАТРИЯ

© 2000 г. С. В. Колобанова, И. Ю. Филиппова[#], Е. Н. Лысогорская,
И. В. Гетун, А. В. Бачева, Е. С. Оксенойт, **В. М. Степанов**

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
119899, Москва, В-234, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 05.11.99 г. Принята к печати 09.12.99 г.

Впервые показана принципиальная возможность проведения сегментной конденсации пептидов на твердой фазе в органической среде под действием субтилизина в составе комплекса с додецилсульфатом натрия. В результате двухстадийной ферментативной конденсации пептидных фрагментов на аминоксилороме, содержащем в качестве спейсера Met-Ala-Gly, получены пептидиламиноксилоромы Dnp(или Boc)-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Glu(OMe)-Met-Ala-Gly-A, Z-Ala-Ala-Glu(OMe)-Ala-Ala-Leu-Met-Ala-Gly-A, где A – аминоксилором. Продемонстрирована возможность отщепления присоединенных к носителю пептидов с помощью BrCN по остатку Met.

Ключевые слова: ферментативный пептидный синтез; твердый носитель; SDS–субтилизин.

ВВЕДЕНИЕ

Биокаталитический способ образования пептидной связи в последнее время рассматривается как перспективный метод для масштабирования и упрощения синтеза коротких пептидов, в том числе биологически активных соединений и лекарственных препаратов. Использование ферментов позволяет проводить пептидный синтез в мягких условиях, без защиты боковых функциональных групп исходных веществ и опасности рацемизации, исключает применение экологически вредных конденсирующих агентов. Применение протеиназ для блочной конденсации пептидов, в том числе с использованием твердого носителя для закрепления растущей пептидной цепи, открывает возможности сочетания достоинств биокаталитического способа образования пептидной связи и неоспоримых преимуществ твердофазного метода синтеза.

В литературе описаны лишь немногочисленные примеры катализируемой ферментами конденсации эфиров пептидов с аминокислотами или пептидами, связанными с твердым носителем в водно-органической среде [1, 2]. Однако фрагментная конденсация пептидов под действием ферментов в водных растворах осложняется протеканием нежелательных реакций вторичного

гидролиза, а также низкой растворимостью исходных пептидных компонентов. Проведение синтеза в безводном органическом растворителе позволяет частично решить эти проблемы.

Известные способы использования ферментов в органических средах либо сорбированными на носителях, либо в виде суспензий непригодны для твердофазного ферментативного пептидного синтеза. Довольно простой в техническом исполнении способ превращения субтилизина BPN' в форму, растворимую в полярных органических растворителях, описан в работах [3–5]. Метод заключается в получении комплекса фермента с ионным детергентом – додецилсульфатом натрия (SDS). Это создает предпосылки для использования подобных комплексов в качестве катализаторов образования пептидной связи в среде органических растворителей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Субтилизины – представители класса сериновых протеиназ, обладая широкой субстратной специфичностью, являются крайне перспективными для синтеза различных биологически активных пептидов и ингибиторов [6, 7].

В нашей лаборатории было показано, что субтилизин-72 образует комплекс с SDS (SDS–субтилизин) и может успешно применяться для синтеза пептидов в органических растворителях, причем специфичность субтилизина в составе комплекса с SDS в синтезе качественно не изменяется по

Сокращения: Dnp – 2,4-динитрофенил; Hse – гомосерин; pNA – *p*-нитроанилид. Все аминокислоты – *L*-ряда.

[#] Автор для переписки (e-mail: irfilipp@genebee.msu.su; факс: (095) 932-8846).

сравнению с нативным ферментом [8]. В настоящей работе изучена возможность использования SDS-субтилизина в твердофазном варианте пептидного синтеза.

Свойства носителя имеют весьма важное значение для успешного твердофазного синтеза пептидов. Носители полимерной природы, которые обычно используются в химическом синтезе [9], мало пригодны для ферментативного варианта. Это связано с возможной сорбцией фермента на поверхности полимера вследствие гидрофобных контактов между боковыми цепями аминокислотных остатков белка и гидрофобными группами носителя. Поэтому для успешного протекания ферментативной реакции необходим носитель с достаточно гидрофильной матрицей. Мелдал с сотр. использовали смолы на основе поперечносшитого полиэтиленгликоля, характеризующиеся высокой степенью набухания в органических растворителях [10]. Однако авторами описано использование таких носителей только для ферментативного гидролиза пептида, присоединенного к смоле химическим методом [10–12]. Сломжинская с сотр. показали, что подходящим носителем является стекло CPG 1270 и CPG 3000 с большим размером пор и жесткой структурой [2].

Мы выбрали в качестве носителя, пригодного для ферментативной реакции, аminosилохром – аминированное производное макропористого кремнезема, поверхность которого насыщена гидроксильными силанольными группами (Si-OH). Аminosилохром и сорбенты на его основе широко используются для хроматографического разделения протеиназ [13, 14]. Этот носитель инертен ко всем реагентам, используемым в синтезе пептидов, не набухает ни в органических растворителях, ни в водно-органической смеси и поэтому присоединение пептида происходит практически только на поверхности носителя.

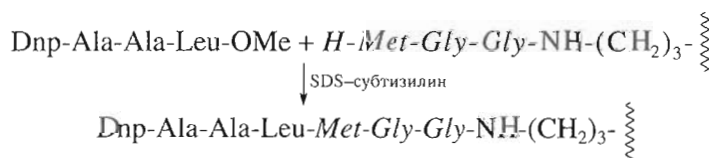
Для продуктивного катализа реакции образования пептидной связи требуется эффективное связывание фермента с пептидными компонентами. Протеиназы имеют достаточно протяженную зону связывания, поэтому важна длина спейсера (вставки между твердой фазой и растущей пептидной цепью), а также необходимо, чтобы аминокислотный состав спейсера соответствовал специфичности фермента. Кеннеке с сотр. показали, что катализируемая химотрипсином реакция образования пептидной связи между Z-Leu-Phe-OMe и Leu, иммобилизованным на аминированном сили-

кагеле, идет лишь в том случае, если длина вставки между нуклеофилом и твердой фазой составляет семь аминокислотных остатков [1]. По данным Сломжинской, для проведения конденсации пептидных фрагментов с помощью папаина на стекле CPG 3000 достаточно более короткого спейсера – 3-(4-гидроксиметилфенокси)пропионовой кислоты, хотя реакция между Fmoc-Glu-Leu-Ala-OMe с H-Leu-AB-CPG 3000 (где AB – спейсер) протекала с невысоким выходом (48%) [2].

Мы выбрали в качестве спейсера трипептид Met-Gly-Gly с аминокислотной последовательностью, не противоречащей специфичности субтилизина. Присутствие на N-конце пептида-спейсера остатка Met позволяло в дальнейшем отщепить полученный продукт с помощью BrCN [15]. Восзащищенный трипептид присоединяли к аminosилохрому карбодиимидным методом. Непрореагировавшие аминокислотные группы аminosилохрома ацетилировали уксусным ангидридом [9]; Восзащиту удаляли 4 M HCl в диоксане. Содержание пептида, определенное по данным аминокислотного анализа, составило 15 мкмоль на 1 г аminosилохрома.

Чтобы оценить, удовлетворяет ли длина спейсера возможности протекания ферментативной реакции на аminosилохроме, мы подвергли обработке субтилизином (в условиях гидролиза) “модельный” Dnp-Ala-Ala-Leu-Met-Gly-Gly-аминилохром, полученный химическим способом с помощью дициклогексилкарбодиимида. Выход продуктов реакции гидролиза оценивали спектрофотометрически, измеряя поглощение гидролизата при 360 нм (Dnp-группа). Выход составил 67% (от содержания Dnp-пептида на аminosилохроме). Причиной того, что ферментативный гидролиз не прошел на 100%, является, скорее всего, недоступность для субтилизина некоторого количества субстрата, связанного с твердой матрицей (в силу диффузионных и конформационных ограничений), хотя нельзя исключить и частичную рацемизацию пептида в процессе химического синтеза. Тем не менее такой способ анализа позволяет довольно просто проводить экспресс-оценку эффективности реакции конденсации. Таким образом, было установлено, что длина пептида-спейсера, равная трем аминокислотным остаткам, достаточна для прохождения ферментативной реакции на аminosилохроме.

“Модельный” пептидиламинилохром был затем получен ферментативным способом с использованием SDS-субтилизина:



Для улучшения растворимости исходных соединений конденсацию проводили в этаноле, содержащем 30% диметилсульфоксида (DMSO). В специальном опыте было показано, что DMSO не влиял на активность и растворимость SDS-субтилизина. Реакцию проводили при 20°C в течение 72 ч, используя 5–10-кратный избыток ацилирующего компонента по отношению к аминокомпоненту (пептиду-спейсеру), концентрация SDS-субтилизина – 52 мкМ. Эффективность конденсации определяли спектрофотометрически (A_{360}) путем гидролиза пептидиламиносилохрома субтилизином. Выход продуктов гидролиза составил 33%. Таким образом, была показана принципиальная возможность использования SDS-субтилизина для ферментативной конденсации на твердой фазе.

Используя в качестве спейсера трипептид Met-Ala-Gly (содержание на носителе 30 мкмоль/г), мы изучили зависимость эффективности реакции ферментативной конденсации Dnp-Ala-Ala-Leu-OMe с пептидиламиносилохромом от концентрации фермента и времени реакции (табл. 1). Оценку проводили спектрофотометрически по поглощению Dnp-содержащих пептидов после гидролиза пептидиламиносилохромов субтилизином. Было показано, что максимальная эффективность реакции – 57% – достигалась через 72 ч и при соотношении молярных концентраций SDS-субтилизина и пептида-спейсера в реакционной смеси 1 : 100. Следует отметить, что концентрация фермента в

Таблица 1. Зависимость эффективности ферментативного присоединения Dnp-Ala-Ala-Leu-OMe к H-Met-Ala-Gly-аминосилохрому от концентрации комплекса SDS-субтилизин и времени реакции*

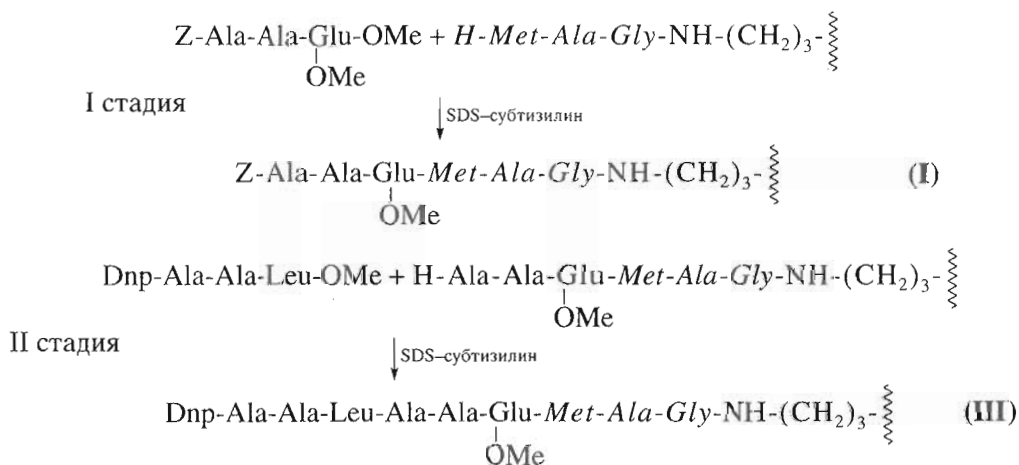
[SDS-субтилизин], мкМ	Время реакции, ч	Выход, %**
12	72	13
18	72	27
52	24	10
52	48	33
52	72	57
52	120	57

* Условия реакции: 50 мг H-Met-Ala-Gly-аминосилохрома, 7,5 мкмоль Dnp-Ala-Ala-Leu-OMe в 150 мкл DMSO, 10 мкл 1 М TEA в 96% этаноле, 350 мкл раствора SDS-субтилизина в 96% этаноле соответствующей концентрации, 20°C.

** Рассчитан как отношение содержания синтезированного пептида на аминосилохроме к содержанию спейсерного пептида (30 мкмоль/г). Содержание Dnp-пептида определяли спектрофотометрически после гидролиза субтилизином.

реакционной смеси (52 мкМ), при которой наблюдался наибольший выход продукта реакции, была максимально возможной из-за ограниченной растворимости комплекса в этаноле.

В подобранных условиях мы провели двухстадийный ферментативный синтез пептидиламиносилохрома (III) (табл. 2):



По аналогичной схеме были получены пептидиламиносилохромы (IV), (V) (см. табл. 2). Обработку полученных пептидиламиносилохромов осуществляли традиционными методами, применяемыми в химическом твердофазном пептидном синтезе. После первой стадии реакции ферментативной конденсации непрореагировавшие аминокислотные группы ацетилировали уксусным ангидридом [9], затем проводили отщепление N-защитных групп 4 M HCl в диоксане (удаление Boc-защиты) или 40% HBr в ледяной уксусной кислоте (удаление Z-защиты)

[16], которое проходило количественно. Соотношение молярных концентраций SDS-субтилизина и аминокислотного компонента составляло для соединений (I) и (II) ~1 : 50, а для соединений (III)–(V) – ~1 : 20. Содержание пептидов на носителе определяли на основании данных аминокислотного анализа после кислотного гидролиза аликвоты каждого пептидилполимера. Для удобства оценки выхода ферментативной реакции ацилирующий компонент на каждой стадии подбирался таким образом, чтобы в его состав входил остаток аминокис-

Таблица 2. Ферментативный синтез пептидов на Met-Ala-Gly-аминосилохроме*

Номер пептидил-аминосилохрома	Присоединяемый фрагмент	Содержание пептида на носителе, мкмоль/г	Выход пептидил-аминосилохрома, %
(I)	Z-Ala-Ala-Glu(OMe)-OMe	8	27
(II)	Woc-Ala-Ala-Leu-OMe	9	30
(III)	Dnp-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Glu(OMe)-OMe**	5	63
(IV)	Woc-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Glu(OMe)-OMe**	6	75
(V)	Z-Ala-Ala-Glu(OMe)-Ala-Ala-Leu-OMe**	7	78

* Условия реакции: [E] 52 мкМ, 72 ч, содержание спейсерного пептида 30 мкмоль/г.

** Присоединение в две стадии по трипептидному блоку на каждой стадии; приведен выход продукта на последней стадии.

лоты, не присутствующий в исходном пептидила-аминосилохроме. В тех случаях, когда в состав присоединенного пептида входила аминокислота, содержащаяся в спейсере, ее количество в аминокислотном анализе было завышено и при оценке выхода пептида не учитывалось. В Dnp-содержащем пептидилполимере (III) степень ферментативного присоединения к носителю определяли еще и спектрофотометрическим методом (после гидролиза субтилизином). Включение пептида, рассчитанное по данным аминокислотного анализа и спектрофотометрически, полностью совпадало.

Следует отметить, что ферментативная конденсация на второй стадии (пептидиламиносилохромы (III)–(V)) проходила с лучшим выходом, чем на первой (пептидиламиносилохромы (I), (II)), т.е. увеличение длины аминокислотного компонента, связанного с твердым носителем, делало его более доступным для фермента.

Возможность отщепления от носителя с помощью BrCN продуктов ферментативной реакции была продемонстрирована на примере Dnp-Ala-Ala-Leu-Met-Gly-Gly-аминосилохрома и Dnp-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Glu(OMe)-Met-Ala-Gly-аминосилохрома (III). После отщепления от аминсилохрома (обработка BrCN в 70% муравьиной кислоте в течение 48 ч) пептиды Dnp-Ala-Ala-Leu-Hse-OH и Dnp-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Glu(OMe)-Hse-OH были получены с выходами 85 и 80% соответственно. Выделение отщепленных пептидов осуществляли с помощью ВЭЖХ. Аминокислотный состав полученных соединений определяли на основании данных аминокислотного анализа кислотных гидролизатов фракций, собранных после ВЭЖХ (см. "Эксперимент. часть").

Таким образом, впервые показана принципиальная возможность проведения ферментативной сегментной конденсации пептидов в органической среде при помощи субтилизина в составе комплекса с додецилсульфатом натрия на твердом носителе – аминсилохроме, содержащем трипептидный спейсер. В разработанных условиях проведены двухстадийные ферментативные кон-

денсации пептидных фрагментов по схеме (3 + 3) с удовлетворительными выходами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали сериновую протеиназу *Bacillus subtilis*, штамм 72 (субтилизин-72) (уд. акт. по стандартному субстрату Glp-Ala-Ala-Leu-pNA 70 мкмоль/мин на OE₂₈₀), выделенную из препарата культуральной жидкости [17]; аминсилохром с содержанием аминокислотных групп 150 мкмоль на 1 г вещества, полученный по методике [13] из силохрома С-80 (средний размер пор 440–450 Å; Реахим, Россия); производные аминокислот и пептидов, синтезированные в нашей лаборатории по стандартным методикам [16].

Анализ пептидов проводили на жидкостном хроматографе Altex Model 110A (США) на колонке Ultrasphere ODS C₁₈ (4.6 × 250 мм; Beckman, США) при элюции раствором 0.1% водной CF₃COOH в линейном градиенте ацетонитрила (скорость потока 1 мл/мин) от 20 до 70% за 25 мин. Детекцию осуществляли при 215 и 280 нм.

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометрах Specord UV VIS (Германия) и Shimadzu UV-1601 (Япония).

Центрифугирование осуществляли на центрифуге 5415 С фирмы "Eppendorf" (Германия) при 16000 об/мин.

Аминокислотный состав полученных соединений подтверждали данными аминокислотного анализа, который выполняли на автоматическом аминокислотном анализаторе Hitachi-835 (Япония) после кислотного гидролиза 5.7 М HCl при 105°C в вакуумированных ампулах в течение 24 и 48 ч.

Ацетилирование непрореагировавших групп на аминсилохроме после первой стадии ферментативной конденсации осуществляли по известной методике [9].

Получение комплекса SDS–субтилизин. К 1 мл раствора лиофилизованного субтилизина-72 (2 мг, 70 нмоль) в 1 мМ CaCl₂ (pH 5.5) добавляли 500 мкл 7 мМ раствора SDS в воде, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 1 ч. Реакци-

онную смесь центрифугировали 15 мин при 16000 об/мин. К осадку добавляли от 100 мкл до 1 мл 96% этанола и перемешивали 1 ч. Полученный раствор центрифугировали 5 мин при 16000 об/мин, измеряли оптическое поглощение супернатанта при 280 нм. Активность SDS-субтилизина определяли по гидролизу Glp-Ala-Ala-Leu-pNA по методике [18].

Вос-Met-Gly-Gly-аминосилохром (присоединение спейсера). 500 мг предварительно прокаленного аминсилохрома выдерживали 10 мин в 2 мл хлористого метилена, вакуумировали при 0°C и обрабатывали 312 мкл (2.25 ммоль) триэтиламина. Раствор декантировали, сорбент промывали хлористым метиленом (3 × 2 мл), абс. DMF (3 × 2 мл), прибавляли 1.8 мл раствора Вос-Met-Gly-Gly-OH (225 мкмоль, 82 мг) в абс. DMF, 0.2 мл раствора 1.4 М DCC в абс. DMF и встряхивали 18 ч. Раствор декантировали, сорбент промывали абс. DMF (3 × 2 мл), этанолом (3 × 2 мл) и хлористым метиленом (3 × 2 мл). Пептидилполимер сушили в вакуумном эксикаторе над NaOH. Содержание пептида, определенное по данным аминокислотного анализа, составило 16 мкмоль на 1 г носителя.

Вос-Met-Ala-Gly-аминосилохром получали аналогично исходя из 500 мг аминсилохрома и 85 мг (225 мкмоль) Вос-Met-Ala-Gly-OH. Содержание пептида 30 мкмоль на 1 г носителя.

H-Met-Gly-Gly-аминосилохром (удаление Bp-группы). К 500 мг пептидиламинсилохрома прибавляли 2 мл 4 М раствора HCl в диоксане, встряхивали 30 мин. Раствор декантировали, сорбент промывали DMF (3 × 2 мл), этанолом (3 × 2 мл), хлористым метиленом (3 × 2 мл) и сушили в вакуумном эксикаторе над NaOH. Количество свободных аминокислотных групп, которое оценивали с помощью пикринового теста [16], составило 15 мкмоль на 1 г носителя.

H-Met-Ala-Gly-аминосилохром получали аналогично, количество свободных аминокислотных групп составило 30 мкмоль на 1 г носителя.

Dnp-Ala-Ala-Leu-Met-Gly-Gly-аминосилохром (химический синтез) получали по методике, аналогичной для синтеза Вос-Met-Gly-Gly-аминосиллохрома, из 100 мг H-Met-Gly-Gly-аминосиллохрома и 1.5 мг (4.5 мкмоль) Dnp-Ala-Ala-Leu-OH. Выход 100%. Содержание пептида 15 мкмоль на 1 г носителя.

Катализируемый SDS-субтилизином синтез Dnp-Ala-Ala-Leu-Met-Gly-Gly-аминосиллохрома. К 100 мг H-Met-Gly-Gly-аминосиллохрома (содержание пептида 15 мкмоль на 1 г носителя) прибавляли 150 мкл раствора Dnp-Ala-Ala-Leu-OMe (7.5 мкмоль, 3.4 мг) в DMSO и 10 мкл 1 М раствора триэтиламина в 96% этаноле. Смесь вакуумировали, добавляли 350 мкл раствора SDS-субтилизина (концентрация 2.2 мг/мл) в 96% этаноле и

встряхивали 72 ч при 20°C. Раствор декантировали, сорбент промывали DMSO (3 × 500 мкл), этанолом (3 × 500 мкл), хлористым метиленом (3 × 500 мкл). Пептидиламинсилохром сушили в вакуумном эксикаторе над NaOH. Содержание пептида, определенное спектрофотометрически (после гидролиза субтилизином), составило 5 мкмоль на 1 г носителя.

Типовая методика синтеза пептидиламинсилохромов (I)-(V), катализируемого SDS-субтилизином (табл. 2). К 50 мг H-Met-Gly-Gly-аминосиллохрома (содержание пептида 30 мкмоль/г носителя) прибавляли 150 мкл раствора метилового эфира соответствующего пептида (7.5 мкмоль) в DMSO и 10 мкл 1 М раствора триэтиламина в 96% этаноле. Смесь вакуумировали, добавляли 350 мкл раствора SDS-субтилизина (2.2 мг/мл, конечная концентрация 52 мкМ) в 96% этаноле и встряхивали 72 ч при 20°C. Раствор декантировали, сорбент промывали DMSO (3 × 500 мкл), этанолом (3 × 500 мкл), хлористым метиленом (3 × 500 мкл). Пептидиламинсилохром сушили в вакуумном эксикаторе над NaOH.

Пептидиламинсилохромы (III)-(V) получали аналогично, исходя из 25 мг соответствующих гексапептидиламинсилохромов.

Эффективность ферментативной реакции рассчитывали по содержанию пептида на носителе, которое определяли на основании аминокислотного анализа. В Dnp-содержащем пептидиламинсилохроме (III) степень ферментативного присоединения к носителю оценивали также спектрофотометрически (после гидролиза субтилизином) (см. ниже).

H-Ala-Ala-Glu(OMe)-Met-Ala-Gly-аминосиллохром (удаление Z-группы). К 50 мг пептидиламинсилохрома (I) прибавляли 500 мкл 40% раствора HBr в ледяной уксусной кислоте, встряхивали 30 мин. Раствор декантировали, сорбент промывали DMF (3 × 500 мкл), этанолом (3 × 500 мкл), хлористым метиленом (3 × 500 мкл) и сушили в вакуумном эксикаторе над NaOH. Количество свободных аминокислотных групп оценивали с помощью пикринового теста [16], оно составило 8 мкмоль на 1 г носителя.

Типовая методика гидролиза субтилизином пептидиламинсилохромов, содержащих Dnp-группу (определение выхода продуктов реакции получения Dnp-содержащих пептидиламинсилохромов). 10 мг пептидиламинсилохрома в 150 мкл абс. DMF вакуумировали, прибавляли 200 мкл 0.05 М Трис-HCl-буфера, pH 8.2, 150 мкл раствора субтилизина (концентрация 1 мг/мл) в том же буфере и встряхивали 20 ч при 20°C. К смеси прибавляли 500 мкл буфера, аликвоту раствора отбирали и измеряли поглощение при 360 нм. Содержание пептида в гидролизате рассчитывали по концентрации Dnp-групп, исполь-

зую коэффициент молярного поглощения, равный $15000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Отщепление Dnp-содержащих пептидов от аминсилохрома с помощью BrCN [15]. К 20 мг пептидиламинсилохрому прибавляли 500 мкл раствора BrCN (концентрация 40 мг/мл) в 70% муравьиной кислоте. Смесь встряхивали в темноте 48 ч при 20°C, добавляли 500 мкл воды, отделяли от твердого остатка и измеряли поглощение раствора при 360 нм. Выходы Dnp-Ala-Ala-Leu-Hse-OH и Dnp-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Glu(OMe)-Hse-OH составили 85 и 80% соответственно. Затем раствор высушивали в вакуумном эксикаторе над NaOH. Сухой остаток растворяли в смеси 50 мкл ацетонитрила, 100 мкл воды и 3 мкл CF₃COOH и анализировали с помощью ВЭЖХ. Времена удерживания: Dnp-Ala-Ala-Leu-Hse-OH – 22 мин, Dnp-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Glu(OMe)-Hse-OH – 23 мин. Аминокислотный анализ (нмоль в образце): Dnp-Ala-Ala-Leu-Hse-OH – Ala 1.4, Leu 0.7, Hse 0.6; Dnp-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Glu(OMe)-Hse-OH – Ala 4.0, Leu 1.2, Glu 0.8, Hse 0.9.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 97-03-33039а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kōnnecke A., Dettlaff S., Jakubke H.-D. // *Monatsh. Chem.* 1982. V. 113. P. 331–337.
2. Slomczynska U., Albericio F., Cardenas F., Giralt E. // *Biomed. Biochim. Acta.* 1991. V. 50. P. 67–73.
3. Meyer J.D., Kendric B.S., Matsuura J.E., Ruth J.A., Bryan P.N., Manning M. // *Int. J. Peptide Protein Res.* 1996. V. 47. P. 177–181.
4. Kendric B.S., Meyer J.D., Matsuura J.E., Carpenter J.F., Manning M. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1997. V. 347. P. 113–118.
5. Wangikar P.P., Michels P.C., Clark D.S., Dordick J.S. // *J. Am. Chem. Soc.* 1997. V. 119. P. 70–76.
6. Moree W.J., Sears P., Kawashiro K., Witte K., Wong C.-H. // *J. Am. Chem. Soc.* 1997. V. 119. P. 3942–3947.
7. Potetinova J.V., Voyushina T.L., Stepanov V.M. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997. V. 7. P. 705–710.
8. Getun I.V., Filippova I.Yu., Lysogorskaya E.N., Oksenoit E.S., Anisimova V.V., Kolobanova S.V., Bacheva A.V., Stepanov V.M. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997. V. 7. P. 2691–2696.
9. Стюарт Дж., Янг Дж. Твердофазный синтез пептидов: Пер. с англ. М.: Мир, 1971.
10. Renil M., Ferreras M., Delaisse J.M., Foged N.T., Meldal M. // *J. Peptide Sci.* 1998. V. 4. P. 195–210.
11. Meldal M., Svendsen I., Juliano L., Nery E.D., Scharfstein J.J. // *J. Peptide Sci.* 1998. V. 4. P. 83–91.
12. Spetzler J.C., Westphal V., Winther J.R., Meldal M. // *J. Peptide Sci.* 1998. V. 4. P. 128–137.
13. Stepanov V.M., Rudenskaya G.N., Gaida A.V., Osterman A.L. // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 1981. V. 5. P. 177–186.
14. Люблинская Л.А., Юсупова М.П., Ваганова Т.И., Иванова Н.М., Степанов В.М. // *Биоорганическая химия.* 1984. Т. 10. С. 1490–1495.
15. Дарбре А. Практическая химия белка: Пер. с англ. М.: Мир, 1989.
16. Гершкович А.А., Кибирев В.К. Химический синтез пептидов. Киев: Наукова думка, 1992.
17. Гололобов М.Ю., Морозова И.П., Степанов В.М. // *Биохимия.* 1991. Т. 56. С. 33–40.
18. Люблинская Л.А., Хайду И., Баландина Г.Н., Филиппова И.Ю., Маркарян А.Н., Лысогорская Е.Н., Оксеноит Е.С., Степанов В.М. // *Биоорганическая химия.* 1987. Т. 13. С. 748–753.

The Solid Phase Coupling of Peptide Segments Catalyzed by the Subtilisin–Sodium Dodecyl Sulfate Complex

S. V. Kolobanova, I. Yu. Filippova[#], E. N. Lysogorskaya,
I. V. Getun, A. V. Bacheva, E. S. Oksenoit, and V. M. Stepanov[†]

Lomonosov State University, Chemical Department, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

The subtilisin–sodium dodecyl sulfate complex was shown to catalyze the coupling of peptide segments on a solid phase in organic medium. By a two-stage enzymic condensation of peptide fragments on aminosilochrom (A) containing Met-Ala-Gly as a spacer, Dnp(or Boc)-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Glu(OMe)-Met-Ala-Gly-A and Z-Ala-Ala-Glu(OMe)-Ala-Ala-Leu-Met-Ala-Gly-A were obtained. It was shown that the condensation products can be split off from the support using the Met residue cleavage by BrCN.

Key words: enzymic peptide synthesis, solid support, S₁S₃-subtilisin

[#] To whom correspondence should be addressed; e-mail: irfilipp@genebee.msu.su; fax: +7 (095) 932-8846.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 6. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.