



УДК 577.112.6:577.152.34'135

СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ В ОРГАНИЧЕСКОЙ СРЕДЕ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СУБТИЛИЗИНА 72, ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА КРИОГЕЛЕ ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА

© 2005 г. А. В. Беляева*, А. В. Бачева**, Е. С. Оксенойт**, Е. Н. Лысогорская**,
В. И. Лозинский*, И. Ю. Филиппова***

*Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва;

**Химический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119992, Москва, В-234, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 14.01.2005 г. Принята к печати 14.04.2005 г.

Сериновая протеиназа субтилизин 72 (КФ 3.4.21.14), иммобилизованная на криогеле поливинилового спирта, была использована в качестве катализатора в синтезах *N*-защищенных *n*-нитроанилидов пептидов общей формулы Z/Woc-Xaa-Phe-pNA (Xaa = Leu, Ala), Z-Ala-Xaa-Yaa-pNA (Xaa = Leu, Ala; Yaa = Leu, Phe), Z-Ala-Ala-Xaa-Yaa-pNA (Xaa = Leu, Arg, Gly; Yaa = Phe, Leu, Gly, Asp, Glu), проводимых в смесях диметилформамид–ацетонитрил. Получен ряд защищенных ди-, три- и тетрапептидов с выходом до 99%. Установлено, что стереоселективность синтеза в исследованных условиях сохраняется. Показано, что активация карбоксильной группы ацилирующего компонента оказывает позитивное влияние на скорость конденсации.

Ключевые слова: субтилизин иммобилизованный; криогель поливинилового спирта; пептидный синтез, ферментативный.

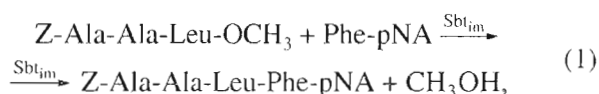
ВВЕДЕНИЕ

Известно, что ценные сведения о каталитических свойствах гидролитических ферментов в среде органических растворителей можно получить при изучении катализа реакций этерификации и переэтерификации [1–4]. В случае протеолитических ферментов – это катализ реакций расщепления и образования пептидных связей. При этом кинетически контролируемый пептидный синтез [5], катализируемый сериновыми протеиназами, успешно протекает в безводных или почти безводных средах. Значительную инактивацию протеиназ обычно можно предотвратить, используя их в виде суспензии или в иммобилизованном виде [6, 7]. Ковалентная иммобилизация – это один из наиболее эффективных методов стабилизации данных ферментов от инактивирующего действия смесей полярных органических растворителей с низким содержанием воды. В частности, было показано, что иммобилизация сериновой протеиназы субтилизин 72 на криогеле поливинилового спирта (ПВС) (макропористый гель, образующийся в ре-

зультате замораживания-оттаивания водного раствора ПВС [8]) достаточно эффективно стабилизирует фермент для работы в таких условиях [9]. Цель данной работы – поиск оптимальных условий ферментативного синтеза пептидов, катализируемого иммобилизованным субтилизином (Sbt_{im}), в органической среде, выяснение влияния активации карбоксильной группы ацилирующих агентов на скорость образования продукта в выбранных условиях и расширение диапазона синтезируемых соединений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее [10] на примере модельной реакции



катализируемой субтилизином 72, иммобилизованным на криогеле ПВС, при исследовании зависимости эффективности пептидного синтеза от соотношения DMF/MeCN в реакционной среде было установлено, что в диапазоне концентраций 30–80% DMF реакция протекает наиболее эффективно. Поэтому в данной работе все синтезы, катализируемые иммобилизованным субтилизином, проводили при соотношении DMF/MeCN, равном 60 : 40

Сокращения: pNA – *n*-нитроанилид; PhCl – хлорфенил; Cam – карбамоилметил, –CH₂–CO–NH₂; Sbt_{im} – иммобилизованный субтилизин; ССР – стандартная смесь растворителей DMF/MeCN, 60 : 40 (по объему).

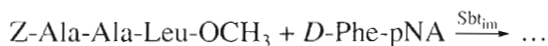
Автор для переписки (тел.: (095) 9395529; факс: (095) 9328846; эл. почта: irfilipp@genebec.msu.su).

(об.%) (здесь, и далее – стандартная смесь растворителей, ССР), как наиболее оптимальном и для активности биокатализатора, и для растворимости исходных соединений. Реакции проводили при эквимолярном соотношении amino- и карбоксильного компонентов (в дальнейшем под концентрацией исходных компонентов будет иметься в виду парциальная концентрация amino- и карбоксильного компонентов), а соотношение фермент-субстрат варьировали от 1 : 6000 до 1 : 25600 (здесь, и далее моль/моль).

Было исследовано влияние концентрации исходных реагентов на скорость образования продукта пептидной конденсации на примере модельной реакции (1), катализируемой иммобилизованным субтилизином, в диапазоне концентраций субстратов 0.5–200 мМ (рис. 1). Концентрация фермента оставалась постоянной и составила 7.8 мкМ. Из диаграммы видно, что чем выше концентрации исходных реагентов, тем выше скорость образования продукта. Так, разница выходов через 5 мин и 20 мин для концентрации субстратов 2 мМ и 200 мМ составила 18 и 30%, соответственно. Таким образом, для наиболее эффективного проведения синтезов желательно использовать максимально высокие концентрации субстратов (подразумевается, что максимально возможно высокие концентрации субстратов ограничены их растворимостью).

Одним из преимуществ ферментативного пептидного синтеза является его строгая стереоселективность. Однако в органической среде не исключены некоторые изменения пространственной структуры зоны связывания активного центра фермента, поэтому важным представлялось проверить, сохраняется ли стереоспецифичность реакций в используемых нами условиях. Известно [11, 12], что в ряде случаев возможно катализируемое субтилизином образование пептидной связи между аминокислотными остатками, один из которых находится в *D*-конфигурации. Так, Черовски и сотр. [11] было показано, что в случае больших избытков аминоконпонента, содержащего *D*-аминокислоту, возможно образование продукта конденсации, катализируемой субтилизином Карлсберг в органической среде.

С целью проверки стереоспецифичности ферментативного синтеза, катализируемого субтилизином, иммобилизованным на криогеле ПВС, мы провели реакции, аналогичные модельной, используя amino- и ацилкомпоненты, содержащие в *P*₁- и *P*'₁-положении остатки *D*-аминокислот вместо соответствующих *L*-аминокислот:



С использованием *n*-нитроанилида *D*-аминокислоты даже через трое суток не было отмечено

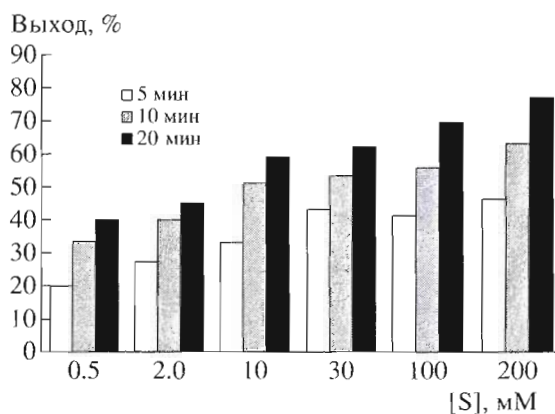


Рис. 1. Зависимость от концентрации исходных веществ выхода Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA через 5, 10 и 20 мин.

появления продукта реакции, что свидетельствовало о сохранении стереоселективности фермента при эквимолярном соотношении исходных реагентов в безводной органической среде.

В условиях, подобранных для модельной реакции, с помощью иммобилизованного субтилизина с достаточно высокими выходами был синтезирован ряд ди- и трипептидов (табл. 1). Реакции проводили при начальной концентрации исходных реагентов 100 мМ и в ряде случаев 200 мМ.

На примере синтезов пептидов (1)–(5) было исследовано влияние длины ацилирующего компонента (числа аминокислотных остатков, входящих в его состав) на скорость образования продукта реакции. Действительно, длина ацилирующего компонента даже в условиях высоких концентраций субстрата оказывала заметное влияние на эффективность синтеза. Так, аналитический выход защищенного дипептида Z-Leu-Phe-pNA (1) через 19 ч составил 76%, а защищенного трипептида Z-Ala-Leu-Phe-pNA (4) уже через полчаса – 98% при концентрации начальных реагентов 100 мМ. Синтез дипептида (1) удалось также провести и при более высокой концентрации исходных реагентов – 200 мМ, в этом случае выход продукта составил 77% за 2 ч (данные не приведены в таблице), что косвенным образом свидетельствует о том, что концентрация исходных реагентов играет решающую роль на скорость образования конечного продукта. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными по синтезу пептидов с помощью субтилизина, адсорбированного на целите [13]. Согласно этим данным, более длинные пептидные фрагменты легче синтезируются субтилизином, что можно предположить из данных работы [14], согласно которым этот фермент обладает достаточно протяженным центром связывания. В случае использования субтилизина, иммобилизованного на криогеле ПВС, сохраняются те же закономерности.

Таблица 1. Пептиды, синтезированные с помощью субтилизина 72, иммобилизованного на криогеле ПВС

Карбоксильный компонент	Аминокомпонент	Продукт реакции		Время реакции, ч	Содержание, %
		Структура	Номер		
Z-Leu-OMe	Phe-pNA	Z-Leu-Phe-pNA	(1)	19	76
Вос-Leu-OCam	То же	Вос-Leu-Phe-pNA	(2)	2	99
Вос-Ala-OCam	»	Вос-Ala-Phe-pNA	(3)	0.5	99
Z-Ala-Leu-OMe	»	Z-Ala-Leu-Phe-pNA	(4)	0.5	98
Z-Ala-Ala-OMe	Leu-pNA	Z-Ala-Ala-Leu-pNA	(5)	2	94
Z-Ala-Ala-Leu-OH	Phe-pNA	Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA	(6)	1	63
Z-Ala-Ala-Leu-OMe	То же	»	(6)	1	93
Z-Ala-Ala-Arg-OH	»	Z-Ala-Ala-Arg-Phe-pNA	(7)	24	26
Z-Ala-Ala-Arg-OMe	»	»	(7)	24	82
Z-Ala-Ala-Arg-OMe	Glu-pNA	Z-Ala-Ala-Arg-Glu-pNA	(8)	24	87
Z-Ala-Ala-Arg-OMe	Asp-pNA	Z-Ala-Ala-Arg-Asp-pNA	(9)	24	34
Z-Ala-Ala-Lys-OH	Phe-pNA	Z-Ala-Ala-Lys-Phe-pNA	(10)	2	90*
Z-Ala-Ala-Glu-OH	»	Z-Ala-Ala-Glu-Phe-pNA	(11)	2	98*
Z-Ala-Ala-Lys-OH	Asp-pNA	Z-Ala-Ala-Lys-Asp-pNA	(12)	2	98*
Z-Ala-Ala-Glu-OH	»	Z-Ala-Ala-Glu-Asp-pNA	(13)	4	74*
Z-Ala-Ala-Gly-OMe	Phe-pNA	Z-Ala-Ala-Gly-Phe-pNA	(14)	2	56
Z-Ala-Ala-Leu-OMe	Gly-pNA	Z-Ala-Ala-Leu-Gly-pNA	(15)	2	70

* Данные работы [10]. Условия реакций: DMF/MeCN 60 : 40 об. %, [E] 7.8 мкМ, [S] 100 мМ для продуктов (1–4), 200 мМ для (5–7), 150 мМ для (8, 9), 30 мМ для (10–13) и 50 мМ для (14, 15), +20°C.

Влияние активации карбоксильной группы на ход синтеза было исследовано на примере синтеза дипептидов (1) и (2). Как и ожидалось, реакции с участием карбамоилметильных эфиров протекают быстрее, чем при использовании метильных эфиров. Так, выход дипептида (2) при использова-

нии карбамоилметилового эфира (Вос-Leu-OCam) в качестве ацилдонора уже за 0.5 ч достиг количественного и составил 99%, в то время как при использовании метилового эфира (Z-Leu-OMe) за 19 ч выход продукта (1) составил 76%. В контрольном опыте – синтезе с карбамоилметильным эфиром в отсутствие фермента – в тех же условиях образование продукта не наблюдалось даже через 3 сут после начала реакции.

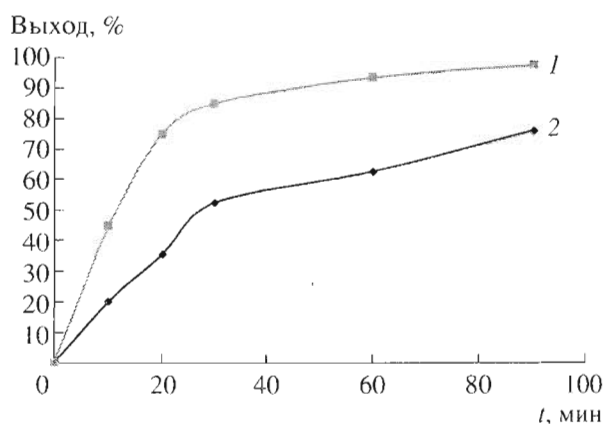


Рис. 2. Синтез Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA в ССР, катализируемый иммобилизованным субтилизином, при использовании в качестве карбоксильных компонентов Z-Ala-Ala-Leu-OMe (1) и Z-Ala-Ala-Leu-OH (2), концентрации исходных реагентов 200 мМ, [E] : [S] = 1 : 25600.

Детально кинетика накопления продукта реакции была исследована на примере реакций синтеза тетрапептида Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA (6) (рис. 2). Наибольшие различия в скорости накопления продукта наблюдались в первые 60 мин проведения реакции. Так, выходы за 30 мин составили 52% при использовании в качестве ацилирующего компонента Z-Ala-Ala-Leu-OH и 85% для Z-Ala-Ala-Leu-OMe, а через 1.5 ч разница в выходах сократилась до 10%. Таким образом, использование эфиров в качестве ацилирующих агентов позволяет добиться увеличения скорости синтеза пептидов по сравнению с ацилирующими компонентами со свободной карбоксильной группой. Эти данные хорошо согласуются с общими представлениями о механизме катализа сериновыми протеиназами реакции пептидного синтеза и коррелируют с данными, полученными ранее в работе [10] при более низкой концентрации этих же субстратов 30 мМ и другом соотношении [E] : [S] = 1 : 1000.

Как известно, химический синтез пептидов, содержащих полифункциональные аминокислоты, представляет наибольшую сложность из-за необходимости защиты боковых функциональных групп. Одним из преимуществ использования ферментов в синтезе такого рода пептидов является возможность снизить не только количество стадий, но и избежать опасности рацемизации при каждом шаге блокирования или снятия защиты.

Ранее было показано [10], что при использовании иммобилизованного субтилизина в органической среде с минимальным содержанием воды можно эффективно синтезировать *N*-ацилированные тетрапептиды, содержащие Lys и остатки Asp и Glu в P_1 - и P'_1 -положениях, без защиты боковых ионогенных групп полифункциональных аминокислот (10)–(13). Реакции проводили без активации карбоксильного компонента.

Нами был проведен ряд синтезов тетрапептидов (7)–(9), содержащих Arg в P_1 -положении. В синтезах пептида (7) концентрация исходных реагентов составляла 200 мМ, а в случае синтезов пептидов (8), (9) – 150 мМ (табл. 1). Соединение (7) синтезировали, используя в качестве карбоксильного компонента трипептид со свободной карбоксильной группой и его эфирный аналог. В случае реакции с ацилдонором, содержащим свободную карбоксильную группу, реакция протекала значительно менее эффективно, чем в случае эфирного аналога. Аналитический выход продукта реакции через сутки в первом случае составил 26, а во втором – 82%.

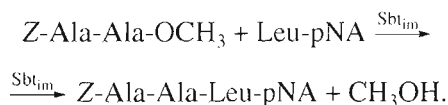
Нам удалось осуществить синтез тетрапептидов (8) и (9), содержащих в P_1 - и P'_1 -положениях равноценно заряженные аминокислотные остатки (Arg и дикарбоновых аминокислот Glu и Asp соответственно). Выход продуктов через сутки составил 87 и 34% соответственно. Возможность протекания такого синтеза можно объяснить спецификой биокаталитической системы. При работе в безводной органической среде можно ожидать, что заряда на ионогенных группировках не будет, следовательно, электронейтральные гидрофобные аминокислотные остатки будут хорошо связываться в активном центре субтилизина. Приведенные данные также свидетельствуют о том, что остаток Arg в P_1 -положении субстрата неблагоприятно влияет на эффективность синтеза соответствующих пептидов по сравнению с Lys и Glu [10] (ср. синтез пептидов (7)–(9) и (10)–(13), табл. 1).

Также были проведены синтезы тетрапептидов (14), (15), содержащих Gly в P_1 - и P'_1 -положениях. Следует отметить, что реакции с участием пептидов, содержащих Gly в P'_1 -положении протекали эффективнее, чем реакции синтеза пептидов, содержащих Gly в P_1 -положении. Выход *Z*-Ala-Ala-Gly-Phe-pNA

(14) за 2 ч составил 56, а *Z*-Ala-Ala-Leu-Gly-pNA (15) за это же время – 70%. Таким образом, мы показали, что субтилизин, иммобилизованный на криогеле ПВС, способен катализировать синтез пептидов, содержащих Gly в P_1 - и P'_1 -положениях. В то же время при попытке синтезировать в данной системе пептид, содержащий остаток Pro в P'_1 -положении, даже через 3 сут после начала реакции не наблюдалось образования продукта ферментативного синтеза (не показано).

Также были предприняты попытки синтезировать пептиды, содержащие фрагмент Gly–Gly, который часто встречается в физиологически активных пептидах. В качестве ацилирующих компонентов использовались как фрагмент со свободной карбоксильной группой, так и эфиры различной природы (Boc-Met-Gly-Gly-OH, Boc-Gly-Gly-OCam, *Z*-Trp-Ala-Gly-Gly-PhCl). Однако спустя 3 сут после начала реакции ни в одном из случаев не было отмечено образование продукта реакции. Это явление, вероятно, связано с невозможностью субстрата эффективно связываться с молекулой фермента из-за отсутствия в них объемных боковых радикалов.

Возможности изученной биокаталитической системы были продемонстрированы на примере препаративного синтеза хромогенного пептидного субстрата сериновых протеиназ – *Z*-Ala-Ala-Leu-pNA. Пептид *Z*-Ala-Ala-Leu-pNA был синтезирован по кинетически контролируемой реакции из двух фрагментов с помощью иммобилизованного субтилизина:



При проведении реакции исходные соединения растворяли в ССР. Начальная концентрация реагентов в реакционной среде составляла 200 мМ. При эквимольном соотношении amino- и карбоксильного компонентов и соотношении [E] : [S] = 1 : 5300 за 2 ч аналитический выход продукта реакции составил 100%. Через сутки биокатализатор отделяли от реакционной смеси, промывали ССР, все промывки объединяли и упаривали на роторном испарителе. Продукт охарактеризован данными ВЭЖХ и аминокислотного анализа, а также тестирован как субстрат для определения гидролитической активности нативного субтилизина 72 с положительным результатом.

Таким образом, при помощи субтилизина 72, иммобилизованного на криогеле ПВС, в ССР с выходами 26–99% проведен синтез ряда *n*-нитроанилидов ди-, три- и тетрапептидов, в том числе содержащих основные и кислые аминокислотные остатки без защиты боковых ионогенных групп полифункциональных аминокислот (табл. 2).

Таблица 2. Аминокислотный анализ пептидов, синтезированных под действием субтилизина 72, иммобилизованного на криогеле ПВС

Пептид	Аминокислотный анализ, нмоль							Время удерживания, мин (градиент)
	Ala	Leu	Gly	Arg	Asp	Glu	Phe	
Z-Leu-Phe-pNA (1)		2.4					2.3	21.9 (A)
Вос-Leu-Phe-pNA (2)		1.6					1.8	14.1 (A)
Вос-Ala-Phe-pNA (3)								13.5 (A)
Z-Ala-Leu-Phe-pNA (4)	1.1	1.1					0.8	21.5 (A)
Z-Ala-Ala-Leu-pNA (5)	13.9	6.7						16.8 (A)
Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA (6)	10.4	5.5					5.2	19 (B)
Z-Ala-Ala-Arg-Phe-pNA (7)	3.3			1.4			1.3	17.9 (C)
Z-Ala-Ala-Arg-Glu-pNA (8)	4.5			2.2		2.1		17 (C)
Z-Ala-Ala-Arg-Asp-pNA (9)	43			24	23.5			17 (C)
Z-Ala-Ala-Gly-Phe-pNA (14)	2.3		1.6				1.0	24.5 (D)
Z-Ala-Ala-Leu-Gly-pNA (15)	2.7	1.3	1.9					15.5 (D)

Нами было установлено, что использование активированных карбоксильных компонентов способствует более быстрому образованию продукта конденсации. Проведенные исследования указывают на то, что субтилизин, иммобилизованный на криогеле ПВС, в подобранных оптимальных условиях синтеза в практически безводной органической среде обладает хорошим потенциалом как катализатор образования пептидной связи между аминокислотными остатками различной природы, причем стереоселективность синтеза в исследованных условиях сохраняется.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: сериновую протеиназу *Bacillus subtilis*, штамм 72 (молекулярный вес 27500 Да), выделенную из коммерческого препарата культуральной жидкости и очищенную по методике [15]; поливиниловый спирт 16/1 (ПВС, M_r 69 000) (НПО "Азот", Северодонецк, Украина); ацетонитрил для ВЭЖХ "ос. ч." (Лекбиофарм, Россия), содержащий не более 0.01% воды, DMF и ТЕА "ч.д.а." (Реахим, Россия), дополнительно очищенные по методу [16]; CaCl_2 (Sigma, США), Трис (ICN Biomedicals, США) и трифторуксусную кислоту (Fluka Chemie AG, Швейцария) квалификации "ч.д.а."; Phe-pNA (Serva, Германия), Leu-pNA (Bachem Bioscience Inc., США) и Asp-pNA (Bachem Bioscience Inc., США) квалификации "ч.д.а."; Сам-эфиры аминокислот и пептидов были любезно предоставлены Ю.В. Митиным (Институт белка РАН, г. Пущино); остальные производные аминокислот и пептидов были синтезированы в нашей лаборатории по стандартным методикам [17].

Контроль за ходом реакции и анализ пептидов проводили на жидкостном хроматографе Altex Model 110A (США): 1) на колонке Microsorb-MV C_8 (4.6 × 250 мм) (Rainin Instrument Company, Inc., США) при элюции водным раствором 0.1%-ной CF_3COOH в линейном градиенте ацетонитрила (скорость потока 1 мл/мин) от 20 до 100% за 35 мин (A) и от 10 до 70% за 26.2 мин (B). Детекцию осуществляли при 220 и 280 нм. 2) на колонке Nucleosil C_{18} (4.6 × 250 мм, Биохиммак, Россия) при элюции водным раствором 0.1%-ной CF_3COOH в линейном градиенте ацетонитрила (скорость потока 1 мл/мин) от 20 до 80% за 35 мин (C) и от 10 до 80% за 42 мин (D).

Аминокислотный анализ выполняли на автоматическом аминокислотном анализаторе Hitachi-835 (Япония) после кислотного гидролиза пептидов и белков 5.7 М HCl при 105°C в вакуумированных ампулах в течение 24 и 48 ч.

Получение субтилизина, иммобилизованного на криогеле ПВС (Sbt_{im}). Приготовление реакционноспособных альдегидсодержащих производных криогеля ПВС и ковалентное присоединение к ним фермента проводилось по методу [6]. Количество иммобилизованного белка оценивалось по данным аминокислотного анализа и составило 5.4 мг белка на 1 г носителя.

Синтезы пептидов с использованием иммобилизованного субтилизина

Определение влияния концентрации исходных реагентов на скорость синтеза. Из раствора 75 мг (0.16 ммоль) Z-Ala-Ala-Leu-OMe и 46 мг (0.16 ммоль) Phe-pNA в 400 мкл смеси MeCN/DMF, 40 : 60 (об.%) (ССР) последовательным разбавлением этой же смесью растворителей готовили растворы исход-

ных компонентов с концентрацией 0.5–200 мМ. К препарату иммобилизованного субтилизина (8 мг, содержание белка – 0.043 мг), предварительно промытому ацетонитрилом (1 × 1 мл) и ССР (2 × 1 мл), добавляли 200 мкл раствора Z-Ala-Ala-Leu-OMe и Phe-pNA соответствующей концентрации. Реакционную смесь встряхивали на орбитальном шейкере при 20–22°C, периодически отбирали 5–10 мкл пробы для анализа с помощью ВЭЖХ. Перед нанесением на колонку пробы разбавляли стартовым элюентом до конечной концентрации 0.5–0.7 мМ. Время удерживания в градиенте (В): Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA – 19.0 мин. Аминокислотный анализ Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA: Ala 10.4 нмоль, Leu 5.5 нмоль, Phe 5.2 нмоль.

Конденсация Z-Ala-Ala-Leu-OMe (Z-Ala-Ala-Leu-OH) и Phe-pNA. К препарату иммобилизованного субтилизина (10 мг, содержание белка – 0.054 мг), предварительно промытому MeCN (1 × 1 мл) и ССР (2 × 1 мл), добавляли 125 мкл 400 мМ раствора Z-Ala-Ala-Leu-OCH₃ (Z-Ala-Ala-Leu-OH) и 125 мкл 400 мМ раствора Phe-pNA в ССР. Реакционную смесь встряхивали на орбитальном шейкере при 20°C, периодически отбирали 5 мкл пробы для ВЭЖХ. Перед нанесением на колонку пробы разбавляли 1.7 мл стартового элюента (20% раствором ацетонитрила в воде).

Пептиды Z(Вос)-Xaa-Phe-pNA (Xaa = Leu, Ala), Z-Ala-Xaa-Yaa-pNA (Xaa = Leu, Ala; Yaa = Leu, Phe), Z-Ala-Ala-Arg-Phe-pNA, Z-Ala-Ala-Gly-Phe-pNA и Z-Ala-Ala-Leu-Gly-pNA получали аналогично.

Конденсация Z-Ala-Ala-Arg-OMe с Glu-pNA. К препарату иммобилизованного субтилизина (10 мг, содержание белка 0.05 мг), предварительно промытому MeCN (1 × 1 мл) и ССР (2 × 1 мл), добавляли раствор Z-Ala-Ala-Arg-OMe (19.1 мг, 37.5 мкмоль) в 100 мкл ССР и HCl × Glu-pNA (37.5 мкмоль) с добавлением 37.5 мкмоль триэтиламина в 150 мкл ССР. Реакционную смесь встряхивали на орбитальном шейкере при 20°C, периодически отбирали 5 мкл пробы для ВЭЖХ. Время удерживания продукта в градиенте (С): Z-Ala-Ala-Arg-Glu-pNA – 17.0 мин.

Препаративный синтез Z-Ala-Ala-Leu-pNA (5). К навеске субтилизина, иммобилизованного на криогеле ПВС (245 мг, содержание белка 1.3 мг), приливали 625 мкл ССР Z-Ala-Ala-OMe (88 мг, 250 мкмоль) и Leu-pNA (63 мг, 250 мкмоль). Реакционную смесь встряхивали на орбитальном шейкере при 37°C в течение 1 сут, периодически отбирая 5 мкл пробы для анализа с помощью ВЭЖХ. Биокатализатор отделяли, промывали ССР

(4 × 0.8 мл), реакционную смесь и все промывки объединяли и упаривали на роторном испарителе. Полученный раствор приливали по каплям при тщательном перемешивании к 3 мл 0.1 М HCl, разбавляли 10 мл холодной воды. Полученный осадок промывали водой на стеклянном фильтре и высушивали в вакууме над NaOH. Выход 98 мг (74%). Время удерживания в градиенте (В) 16.8 мин.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 03-03-32847) и INTAS (грант № 01-0673).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gupta M.N., Roy I. // Eur. J. Biochem. 2004. V. 271. P. 2575.
2. Unen D., Enghersen J., Reinhoudt D.N. // Biotechn. Bioeng. 2001. V. 75. P. 154–158.
3. Novick S., Dordick J. // Biotechn. Bioeng. 2000. V. 68. P. 665–671.
4. Krishna S.H. // Biotechnol. Adv. 2002. V. 20. P. 239.
5. Jakubke H.-D. // Collection. 1999. V. 1. P. 47–67.
6. de Gomez-Puyou M.T., Gomez-Puyou A. // Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 1998. V. 33 (1). P. 53–89.
7. Khmelnsky Yu.L., Rich J.O. // Current Opinion in Chemical Biology. 1999. V. 3. P. 47–53.
8. Лозинский В.И. // Успехи химии. 1998. V. 67. P. 641–655.
9. Филиппова И.Ю., Бачева А.В., Байбак О.В., Плиева Ф.М., Лысогорская Е.Н., Оксенойт Е.С., Лозинский В.И. // Изв. АН. Сер. хим. 2001. № 10. С. 1811–1816.
10. Бачева А.В., Байбак О.В., Беляева А.В., Лысогорская Е.Н., Оксенойт Е.С., Лозинский В.И., Филиппова И.Ю. // Биоорганическая химия. 2003. Т. 29. С. 502–508.
11. Klein J.U., Prykhodzka A., Cerovsky V. // J. Peptide Sci. 2000. V. 6. P. 541–549.
12. Wescott C.R., Klibanov A.M. // Biochim. et Biophys. Acta. 1994. V. 1206. P. 1–9.
13. Stepanov V.M., Terent'eva E.Yu., Voyushina T.L., Gololobov M.Yu. // Bioorg. Med. Chem. 1995. V. 3. P. 479–485.
14. Гололобов М.Ю., Морозова И.П., Воюшина Т.Л., Тимохина Е.А., Степанов В.М. // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 228–240.
15. Акпаров В.Х., Белянова Л.П., Баратова Л.А., Степанов В.М. // Биохимия. 1979. Т. 44. С. 886–890.
16. Гордон А., Форд Р. Спутник химика: Пер. с англ. М.: Мир, 1976. С. 443–444.
17. Гершкович А.А., Кибирев В.К. Химический синтез пептидов. Киев: Наукова Думка, 1992.

Peptide Synthesis in Organic Media with the Use of Subtilisin 72 Immobilized on a Poly(Vinyl Alcohol) Cryogel

A. V. Belyaeva*, A. V. Bacheva**, E. S. Oksenoit**,
E. N. Lysogorskaya**, V. I. Lozinskii*, and I. Yu. Filippova**#

#Phone: +7 (095) 939-5529; fax: +7 (095) 932-8846; e-mail: irfilipp@genebee.msu.su

*Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 28, Moscow, 117813 Russia

**Department of Chemistry, Moscow State University, Vorob'evy Gory, Moscow, 119992 Russia

Subtilisin 72 serine protease (EC 3.4.21.14) immobilized on a poly(vinyl alcohol) cryogel was used as a catalyst in the syntheses of *N*-protected peptide *p*-nitroanilides of the general formulas Z(or Boc)-Xaa-Phe-pNA (Xaa = Leu or Ala), Z-Ala-Xaa-Yaa-pNA (Xaa = Leu or Ala; Yaa = Leu or Phe), and Z-Ala-Ala-Xaa-Yaa-pNA (Xaa = Leu, Arg, or Gly; Yaa = Phe, Leu, Gly, Asp, or Glu). The syntheses were carried out in DMF-acetonitrile mixtures. A number of protected di-, tri-, and tetrapeptides were prepared in yields up to 99%. The syntheses were found to retain stereoselectivity under the conditions studied. The activation of carboxyl group of the acylating component was shown to have a positive effect upon the coupling rate. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: enzymatic peptide synthesis, poly(vinyl alcohol) cryogel, subtilisin immobilized