



УДК 577.152.341\*61.01

**С-КОНЦЕВОЕ АМИДИРОВАНИЕ АЦИЛАМИНОКИСЛОТ  
И ПЕПТИДОВ МЕТОДОМ ТРАНСПЕПТИДАЦИИ,  
КАТАЛИЗИРУЕМОЙ КАРБОКСИПЕПТИДАЗОЙ Y****Капитанников Ю. В., Попов А. А., Шимбаревич Е. В.,  
Руми Л. Д., Антонов В. К.***Институт биорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Исследована катализируемая карбоксипептидазой Y реакция ацильного переноса остатков ациламино кислот и пептидов с соответствующих эфиров на аммиак и амиды аминокислот. Выход амидов ациламино кислот и пептидов в ряде случаев достигал 90%.

Известно, что многие биологически активные пептиды содержат С-концевую карбоксамидную группу, важную для их активности. К таким пептидам относятся, например, кальцитонин, вещество Р, гастрин и мн. др. [1]. Получение достаточно больших пептидов химическим синтезом часто оказывается трудным и дорогостоящим делом. Поэтому в последние годы значительное внимание уделяется попыткам получения биологически активных пептидов методами генной инженерии. Этот путь предполагает, однако, осуществление посттрансляционной модификации в тех случаях, когда целевой пептид содержит группировки, не образующиеся при трансляции. Отсюда очевидна важность разработки методов модификации пептидов и, в частности, способов С-концевого амидирования.

В природе С-концевое амидирование пептидов осуществляется из соответствующих предшественников пептидов, содержащих С-концевой остаток глицина, с помощью фермента глицинамиднооксигеназы [2], функционирующей в присутствии аскорбиновой кислоты и кислорода. Этот фермент был недавно выделен из щитовидной железы, гипофиза и поджелудочной железы млекопитающих [2, 3], причем содержание его в клетках чрезвычайно мало. Изучение действия амидирующего фермента на модельных пептидах показало наличие специфичности главным образом к гидрофобным аминокислотам, предшествующим С-концевому глицину.

Мы попытались осуществить амидирование пептидов, используя реакцию ацильного переноса (транспептидации), катализируемую карбоксипептидазой Y [4]. Карбоксипептидаза Y (КФ 3.4.16.1) — фермент, продуцируемый дрожжами, — катализирует отщепление С-концевых аминокислот пептидов и белков. Она обладает довольно широкой специфичностью, предпочтительно отщепляя остатки гидрофобных аминокислот и в меньшей степени аланина, глутаминовой кислоты, метионина и пролина. Фермент катализирует также гидролиз сложноэфирной и амидной связи С-концевой аминокислоты в молекулах эфиров или амидов пептидов [5].

Имеются две принципиальные возможности использования реакции транспептидации для получения амидов: перенос ацильного остатка с эфи-

---

Использованы сокращения аминокислот и их производных в соответствии с правилами, предложенными комиссией по биохимической номенклатуре при IUPAC — IUB. Все аминокислоты L-ряда.

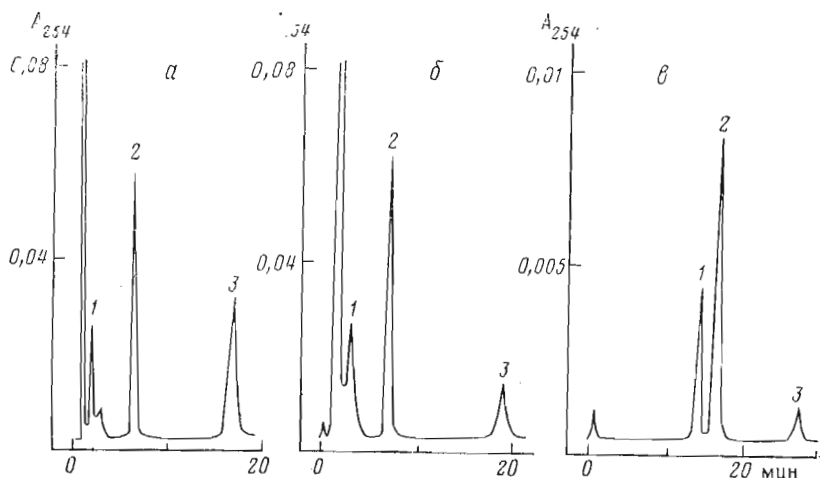


Рис. 1. Хроматограммы проб реакций амидирования (рН 9,5), катализируемых карбоксипептидазой Y: а) 1 — Z-Met-OMe; 2 — Z-Met-NH<sub>2</sub>; 3 — Z-Met-OH (время реакции 190 мин); б) 1 — Z-Phe-OMe; 2 — Z-Phe-NH<sub>2</sub>; 3 — Z-Phe-OH (60 мин); в) 1 — Z-Gly-Leu-OH; 2 — Z-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>; 3 — Z-Gly-Leu-OMe (20 мин)

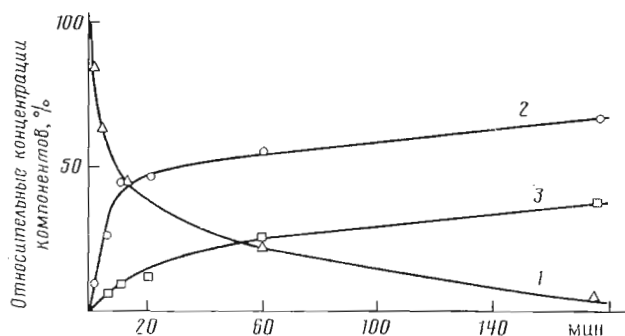
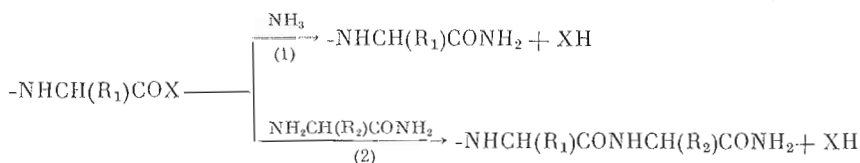


Рис. 2. Динамика образования продуктов Z-Met-NH<sub>2</sub> (2) и Z-Met-OH (3) и расхода субстрата Z-Met-OMe (1) в реакции амидирования Z-Met-OMe, катализируемой карбоксипептидазой Y (рН 9,5)

ра или пептида на аммиак (1) или на амид аминокислоты (2):



где X — CH<sub>3</sub>O— или —NHCH(R<sub>3</sub>)COOH

При этом в качестве донора в обоих случаях может быть использован эфир N-ацилпептида или свободный пептид. В литературе имеются лишь два сообщения [6, 7], где в качестве акцептора в реакции транспептидации был использован аммиак.

Мы исследовали перенос ацильного остатка с эфиров N-ациламинокислот на аммиак, а также перенос на этот акцептор N-концевой аминокислоты с дипептида Z-Phe-Ala-OH. Кроме того, был исследован перенос ацильного остатка с эфиров N-ациламинокислот и N-ацилдипептидов на амиды аминокислот.

Контроль за ходом процесса транспептидации осуществляли методом ВЭЖХ, используя в качестве стандартов предварительно синтезированные продукты реакции (рис. 1).

Условия переноса ациламинокислот с эфиров на аммиак выбирали так, чтобы снизить до минимума гидролиз образующегося амида. Как

Катализируемый карбоксипептидазой Y перенос ацильных остатков эфиров N-ациламинокислот на аммиак  
 $[E]=1,12 \cdot 10^{-6}$  М, 25° С, рН 9,5; 5% MeOH

Субстрат	Концентрация субстрата, мМ	Время реакции, мин	Выход амида, %	Образование ацламинокислоты, %
Z-Phe-OMe	8,7	160	90	10
Z-Ala-OMe	12,0	35	90	0
Z-Glu-OMe	6,6	10	80	20
Z-Met-OMe	9,2	190	62	38
Вос-Tyr-OMe	3,9	5	26	74
Z-Pro-OMe	5,2	1200	15	60
Z-Gly-OMe	5,2	90	12	30

Таблица 2

Катализируемый карбоксипептидазой Y перенос ацильных остатков эфиров N-ациламинокислот на аммиак в органических растворителях и в емеслях органический растворитель — вода

Субстрат	Концентрация субстрата, мМ	Концентрация фермента, мкМ	Растворитель **	Время реакции, мин	Выход амида, %
Z-Phe-OMe	6,4	8,1 *	CCl <sub>4</sub> — H <sub>2</sub> O (1 : 2)	60	90
	16,0	2,8 **	DMF	60	30
	49,0	6,3 *	EtOAc — H <sub>2</sub> O (1 : 1)	240	21
	16,0	2,8 **	Ацетонитрил	60	10
Z-Met-OMe	7,9	14,0 **	DMF	180	5
	6,7	8,1 *	CCl <sub>4</sub> — H <sub>2</sub> O (1 : 2)	60	3
	82,0	6,3 *	EtOAc — H <sub>2</sub> O (1 : 1)	240	25

\* Акцептор — NH<sub>4</sub>Cl.

\*\* Фермент сорбирован на биогеде; акцептор — бензоат аммония (насыщенный раствор).

\*\*\* Фермент сорбирован на полиамиде; акцептор — бензоат аммония (насыщенный раствор).

\*\* В присутствии воды — рН 9,3.

известно, эстеразная и пептидазная активности карбоксипептидазы Y имеют различные рН-оптимумы [8]. В щелочной среде пептидазная активность фермента низка, хотя эстеразная активность остается достаточно высокой. Поэтому реакцию транспептидации осуществляли при рН 9,5. На рис. 2 представлена динамика образования продуктов и расхода субстрата в реакции амидирования Z-Met-OMe, катализируемой карбоксипептидазой Y. Как видно, в выбранных условиях за время полного исчерпания исходного эфира не наблюдается заметного снижения концентрации продукта транспептидации.

Относительные скорости накопления амида и образования свободной ациламинокислоты сильно зависят от природы субстрата (табл. 1). Выходы амидов достигают в ряде случаев 80—90%. Отметим, что специфичность, проявляемая карбоксипептидазой Y в реакции транспептидации, заметно отличается от таковой при реакции гидролиза эфиров N-ациламинокислот [9].

Мы исследовали также катализируемую карбоксипептидазой Y транспептидацию в среде органического растворителя или в смеси органического растворителя с водой. При использовании безводных сред фермент вводили в реакцию в виде сорбционно иммобилизованного на полиамиде или биогеде препарата. Как видно из табл. 2, лишь в одном случае (CCl<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O) удалось получить высокий выход целевого амида.

Попытки получить амид при переносе остатка Z-Phe- с Z-Phe-Ala на аммиак оказались безуспешными. Ни в одном случае выход целевого амида не превышал 10%.

Катализируемый карбоксипептидазой Y перенос ацильных остатков метиловых эфиров Z-Phe и Z-Gly-Leu на амиды аминокислот \*

Субстрат (концентрация, мМ)	Акцептор (концентрация, мМ)	Концентрация фермента, мМ	Растворитель	pH	Выход амида, %	Образование свободной кислоты, %
Z-Phe-OMe (71)	Leu-NH <sub>2</sub> (667)	16,0	EtOAc - H <sub>2</sub> O (1 : 1)	7,5	25	0
Z-Gly-Leu-OMe (52)	Met-NH <sub>2</sub> (62)	4,9	То же	9,2	30	0
			0,2 М глициновый буфер	9,4	64	26

\* Время реакции 20 мин.

Несколько лучшие результаты были получены при переносе ацильного остатка с эфиров N-ациламинокислот и дипептидов на амид аминокислоты (табл. 3). Проведение реакции в смеси этилацетат — вода (1 : 1) при двух значениях pH (7,5 и 9,2) показало, что в этих условиях увеличение основности среды лишь слабо сказывается на выходе целевого пептида. В водной среде перенос остатка N-ацилдипептида Z-Gly-Leu- на Met-NH<sub>2</sub> позволяет получить амид трипептида с выходом 64% (рис. 16).

Таким образом, полученные нами результаты показывают возможность амидирования ациламинокислот и пептидов с использованием реакции транспептидации, катализируемой карбоксипептидазой Y, с применением в качестве акцептора аммиака или амидов аминокислот.

### Экспериментальная часть

Использовали карбоксипептидазу Y из пекарских дрожжей (НПО «Биолар», Олайне) с активностью 40 ед./мг белка по этиловому эфиру N-ацетилтирозина [4], аминокислоты и их производные (Reanal, Венгрия), биогель P-100 (Bio-Rad, США), полиамид (Ferah, Berlin).

TFA-Met-NH<sub>2</sub> получен обработкой *n*-нитрофенилового эфира *N*-трет-бутил-оксикарбонилметонина водным раствором аммиака с последующим снятием Восзащиты трифторуксусной кислотой.

Z-Gly-Leu-OMe и Z-Phe-Leu-NH<sub>2</sub> получены карбодимидным методом. Анализ реакционной смеси проводили методом ВЭЖХ с использованием колонки (2 × 50 мм) с силикагелем Silasorb 600 (5 мкм; Chemapol, ЧССР); элюент — гексан — *n*-бутанол — уксусная кислота — триэтиламин (50 : 2,5 : 1 : 0,005 по объему). Наносимый объем 10 мкл, скорость элюции 0,2 мл/мин.

*Иммобилизация карбоксипептидазы Y на биоэле P-100 и полиамиде.* К 0,5 мл 23 мМ водного раствора карбоксипептидазы Y добавляли 100 мг биоэля P-100 или полиамида, предварительно выдержанных в 0,1 М фосфатном буфере, pH 9,5. Смесь перемешивали 30 мин и затем лиофильно высушивали.

*Получение амидов N-ациламинокислот (приводятся типичные методики)*

*Z-Met-NH<sub>2</sub>.* 7 мг (23 мкмоль) Z-Met-OMe в 125 мкл метанола добавляли к 2,4 мл 0,1 М Na-бикарбонатного буфера, pH 9,5, содержащего 0,1 М KCl, 1 мМ EDTA и 4 М NH<sub>4</sub>Cl. Затем в реакционную смесь вносили 20 мкл 0,26 мМ раствора карбоксипептидазы Y, инкубировали 190 мин. Хроматограмма реакционной смеси приведена на рис. 2а.

*Z-Phe-NH<sub>2</sub>.* А. 7 мг (22 мкмоль) Z-Phe-OMe в 1 мл CCl<sub>4</sub> добавляли к 2 мл 0,05 М боратного буфера, pH 9,5, содержащего 0,05 М KCl и 4 М NH<sub>4</sub>Cl. Затем в реакционную смесь вносили 0,5 мл 23 мМ раствора карбоксипептидазы Y и инкубировали при встряхивании 60 мин. Хроматограмма реакционной смеси приведена на рис. 2б.

Б. К раствору 3 мг (9,6 мкмоль) Z-Phe-OMe в 1 мл ацетонитрила, насыщенного аммиаком, добавляли 100 мг препарата карбоксипептидазы Y, иммобилизованной на биоэле P-100, и инкубировали при встряхивании 60 мин. Хроматограмма реакционной смеси приведена на рис. 2б.

*Получение амидов N-ацилпептидов (приведена типичная методика).* Анализ реакционной смеси проводили методом ВЭЖХ на колонке Zorbax ODS (6,2 × 250 мм), 5 мкм. Элюент — CH<sub>3</sub>OH — H<sub>2</sub>O — CF<sub>3</sub>COOH (50 : 50 : 0,1 по объему). Наносимый объем 50 мкл, скорость элюции 1,5 мл/мин.

*Z-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>.* 5 мг (15 мкмоль) Z-Gly-Leu-OMe в 10 мкл MeOH добавляли к 265 мкл 0,2 М глицинового буфера, pH 9,4, содержащего 0,1 М KCl и 5 мг (17,8 мкмоль) TFA-Met-NH<sub>2</sub>. Затем в реакционную смесь вносили 10 мкл 0,14 мМ раствора карбоксипептидазы Y, инкубировали 20 мин и состав смеси анализировали хроматографически (рис. 2в).

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Bodanszki M., Kwei J. Z.* // *Gastrointestinal hormones* / Ed. G. B. Jerzy Glass. N. Y.: Raven Press, 1980. P. 413—432.
2. *Murthy A. S. N., Mains R. E., Eipper B. A.* // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. № 4. P. 1815—1822.
3. *Bradbury A. F., Smyth D. G.* // *Biogenetics of neurohormonal peptides* / Ed. Hakan-son R. L.: Acad. Press, 1985. P. 171—186.
4. *Breddam K., Johansen J. T., Ottesen M.* // *Carlsberg Res. Commun.* 1984. V. 49. P. 457—462.
5. *Hayashi R.* // *Methods Enzymol.* 1976. V. 45. P. 568—587.
6. *Widmer F., Breddam K., Johansen J. T.* // *Carlsberg Res. Commun.* 1981. V. 46. P. 97—106.
7. *Tomaoki H.* // Preparation of peptides with C-terminal proline amide. Europ. Patent O 197 794. 1986. P. 1—18.
8. *Hayashi R., Bai Y., Hata T.* // *J. Biochem.* 1975. V. 77. № 1. P. 69—79.
9. *Breddam K.* // *Carlsberg Res. Commun.* 1986. V. 51. P. 83—128.

Поступила в редакцию  
8.XII.1987

### THE C-TERMINAL AMIDATION OF ACYLAMINO ACIDS AND PEPTIDES BY CARBOXYPEPTIDASE Y-CATALYZED TRANSPEPTIDATION

КАПИТАНИКОВ Ю. В., ПОПОВ А. А., ШИМБАРЕВИЧ Е. В.,  
РУМШ Л. Д., АНТОНОВ В. К.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The carboxypeptidase Y-catalyzed reaction of acyl transfer of acylamino acid and peptide residues from the corresponding esters to ammonia and to amides of amino acids has been studied, and conditions for obtaining amides of amino acids and peptides with the yields up to 90% found.