



УДК 577.112.6:577.152.342*31

© 1992 г. Е. Н. Лысогорская, И. Ю. Филиппова,
К. А. Абдель Малак, Г. И. Лавренова, В. В. Анисимова,
Е. С. Оксенойт, В. М. Степанов

ПЕПСИН В ФЕРМЕНТАТИВНОМ СИНТЕЗЕ ЭФИРОВ И *n*-НИТРОАНИЛИДОВ ПЕПТИДОВ

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

Показано, что пепсин свиньи может быть успешно использован для препаративного синтеза эфиров и *n*-нитроанилидов три-, тетра-, пента- и гексапептидов общей формулы Z-X-Y-B, где X=Ala-Phe, Phe-Met, Ala-Ala-Glu, Ala-Ala-Phe, Ala-Ala-Leu, Ala-Ala-Trp, Ala-Ala-Met, Y=Ala, Leu, Val, Phe, Arg, Ala-Ala, Gly-Gly, Leu-Ala-Ala, Phe-Ala-Ala, B=OMe, pNA. Реакции проводились с эквимольными соотношениями аминокислот и карбоксильного компонента (за исключением синтеза с Arg-pNA, в котором карбоксильный компонент брался в двукратном избытке) в 0,5 М ацетатном буфере, pH 4,5, содержащем 10–20% диметилформамида, причем концентрации компонентов составляли 59 мМ. Изучена зависимость эффективности синтеза от концентрации пепсина и времени реакции. Молярное соотношение пепсина – исходные компоненты составляло 1:1700 для синтеза *n*-нитроанилидов и 1:3·10³ для эфиров пептидов. Равновесие реакции синтез – гидролиз достигалось при 20°C через 1 ч. Выходы составляли от 50 до 90%.

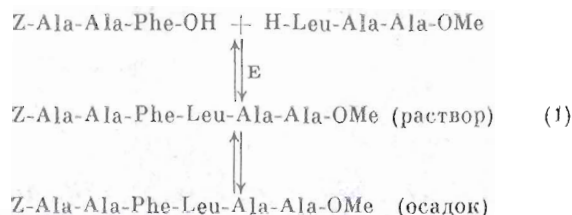
В последнее время протеолитические ферменты нашли широкое применение в качестве катализаторов образования пептидных связей. Их использование обусловлено отсутствием побочных реакций и рацемизации, которые обычно осложняют процессы химического синтеза пептидов. Реакции ферментативного синтеза проходят в мягких условиях, а образующиеся пептиды можно легко выделить и очистить [1, 2].

Несмотря на доступность, стабильность, довольно широкую специфичность, пепсин по сравнению с другими протеиназами до настоящего времени находил ограниченное применение в реакциях синтеза пептидных связей. При этом удовлетворительные выходы пептидов достигались, как правило, при использовании высоких концентраций пепсина. Молярные соотношения пепсина и пептидных фрагментов составляли в большинстве случаев 1:400, а иногда и 1:4 [3–6]. Авторы обычно не обсуждали причины использования таких больших количеств пепсина, хотя очевидно, что наличие высоких концентраций фермента может приводить к нежелательным побочным реакциям. Принимая во внимание эти соображения, мы решили проверить поведение пепсина в реакциях ферментативного синтеза.

В качестве модельной системы была выбрана конденсация трипептидов Z-Ala-Ala-Phe-OH и H-Leu-Ala-Ala-OMe в водно-органической

Сокращения: pNA – *n*-нитроанилид, DMF – диметилформамид, DMSO – диметилсульфоксид. Все аминокислоты *L*-ряда.

среде:



Структура и длина исходных фрагментов соответствовали специфичности пепсина, что обеспечивало хорошее связывание с активным центром фермента. Чтобы сохранить постоянным значение pH реакционной среды, эксперименты проводились в 1 М ацетатном буфере, pH 4,6. Концентрации исходных трипептидов составляли 60 мМ в 18–20% диметилформамиде. Специальные исследования показали, что присутствующий в реакционной среде в этой концентрации DMF не ингибирует пепсин в течение длительного времени (6 ч), что согласуется с литературными данными [4].

Продукт реакции, защищенный гексапептид, лишенный ионогенных групп и обладающий большей длиной цепи по сравнению с исходными фрагментами, гораздо хуже растворялся в реакционной среде и выпадал в осадок. Этим достигалось смещение равновесия (1) в сторону синтеза. Образовавшийся осадок отделяли и промывали для удаления непрореагировавших исходных веществ. В результате получали практически чистое производное гексапептида, о чем свидетельствовали данные аминокислотного анализа, ВЭЖХ, тонкослойной хроматографии. Препаративный выход гексапептида составлял 55–58%, хотя, по данным ВЭЖХ, в реакционной смеси содержалось ~75% продукта. Никаких других веществ, которые могли бы быть результатом реакции транспептидации или других побочных реакций, не обнаружено.

Из закона действующих масс следует, что с понижением растворимости продукта в реакционной среде конденсация должна протекать более полно. На примере синтеза *n*-нитроанилидов пептидов было установлено, что с хорошими препаративными выходами (80–90%) получают пептиды, растворимость которых не превышает 100 мкМ [7]. Определенное нами значение растворимости Z-Ala-Ala-Phe-Leu-Ala-Ala-OMe в буфере, содержащем 18% DMF, составило 400 мкМ. Уменьшение содержания органического растворителя в реакционной смеси до 10% привело к понижению растворимости продукта и увеличению его препаративного выхода до 85%. Полученные результаты хорошо согласуются с описанной выше схемой.

Для уменьшения растворимости синтезируемых пептидов в некоторых случаях [4, 6] в реакционную смесь вводили неорганические соли, например NaCl или Na₂SO₄. Конденсация Z-Ala-Ala-Phe-OH и H-Leu-Ala-Ala-OMe в буфере, содержащем 1 М NaCl, прошла с хорошим препаративным выходом (70%), хотя в этом случае реакционная смесь содержала 30% DMF.

Зависимость эффективности синтеза от концентрации пепсина и времени реакции. Мы изучили зависимость выхода гексапептида от количества пепсина, введенного в реакцию, и нашли, что после достижения молярного соотношения пептид-пепсин $3 \cdot 10^5 : 1$ выход не менялся и составлял 55–58% (табл. 1). Дальнейшее увеличение содержания пепсина в реакционной среде в 200 раз не изменяло выход. Таким образом, было показано, что для эффективного катализа образования пептидной связи достаточно небольших концентраций пепсина. При снижении содержания пепсина скорость образования осадка замедлялась. В случае

Зависимость выхода Z-Ala-Ala-Phe-Leu-Ala-Ala-OMe
от концентрации пепсина

[Пепсин], мкМ	[Пептид]/[Пепсин], М/М	Выход продукта	
		мг	%
35	$1,7 \cdot 10^3 : 1$	22,0	62
3,5	$1,7 \cdot 10^4 : 1$	20,0	58
1,75	$3,4 \cdot 10^4 : 1$	22,0	62
0,35	$1,7 \cdot 10^5 : 1$	19,0	53
0,175	$3,4 \cdot 10^5 : 1$	20,0	58
0,035	$1,7 \cdot 10^6 : 1$	5,0	14
0,0175	$3,4 \cdot 10^6 : 1$	0,9	2,5
0,0035	$1,7 \cdot 10^7 : 1$	0,2	0,6

большого количества фермента ($[S] : [E] = 6 \cdot 10^4 : 1$) осадок пептида образовывался уже через несколько секунд после прибавления пепсина. При соотношении субстрат — фермент $6 \cdot 10^5 : 1$ равновесие реакции синтеза-гидролиза (1) достигалось через 1 ч. Это согласуется с представлениями о том, что в равновесном синтезе положение равновесия зависит от термодинамических факторов. При уменьшении количества фермента требуется более продолжительное время для достижения равновесного выхода продукта реакции.

Пепсин как катализатор синтеза различных пептидов. С помощью пепсина была синтезирована серия пептидов (табл. 2). На их выход влиял ряд факторов: соответствие исходных соединений специфичности пепсина, длина синтезируемого пептида, растворимость образующихся продуктов реакции. Как и следовало ожидать, соединения (I) — (VIII), где в положениях P_1 и P_1' (номенклатура Шехтера — Бергера [8]) находятся гидрофобные аминокислоты (фенилаланин, лейцин, метионин), были получены с достаточно высокими выходами. Существенно более низкий выход пептида (X) по сравнению с пептидом (IV) отражает влияние вторичной специфичности — остатки глицина в P_2' и P_3' — положениях менее предпочтительны, чем аланин, что согласуется с данными по специфичности пепсина в реакциях гидролиза. Отсутствие взаимодействия с S_2' и S_3' подцентрами фермента объясняет, почему Phe-OSn₃ как аминокислота в пептиде (XI) хуже, чем эфир трипептида (III). Использование в качестве аминокислотного компонента защищенного трипептида при синтезе соединений (V) и (VI) компенсирует этот недостаток.

Заметное влияние на эффективность протекания синтеза оказало введение С-концевой *n*-нитроанилидной группировки (соединения (XII) — (XIX)). *n*-Нитроанилиды аминокислот, кроме аминокислотного остатка, способного связываться в подцентре S_1 , содержат гидрофобную *n*-нитроанилидную часть, взаимодействующую с подцентром S_2 субстрат-связывающей области фермента. Вследствие этого *n*-нитроанилиды аминокислот в качестве аминокислотных компонентов лучше соответствующих эфиров. Кроме того, наличие в структуре пептидов остатка *n*-нитроанилина ухудшало их растворимость по сравнению с метиловыми эфирами и, следовательно, более глубоко сдвигало равновесие в сторону синтеза. По-видимому, вследствие сочетания этих двух факторов с удовлетворительными выходами был получен ряд *n*-нитроанилидов тетрапептидов. Таким образом, пепсин можно успешно использовать для катализа об-

Синтез пептидов с использованием пепсина *

Пептид		[DMF], %	Выход, %
Z-Ala-Ala-Phe-Leu-Ala-Ala-OMe	(I)	18	62
Boc-Phe-Met-Phe-Ala-Ala-OMe	(II)	18	59
Z-Ala-Phe-Leu-Ala-Ala-OMe	(III)	18	53
Z-Ala-Ala-Phe-Phe-Ala-Ala-OMe	(IV)	18	58
Z-Ala-Ala-Phe-Phe-OMe	(V)	18	78
Z-Ala-Ala-Leu-Phe-OMe	(VI)	18	66
Z-Ala-Ala-Leu-Phe-Ala-Ala-OMe	(VII)	24	59
Z-Ala-Ala-Leu-Leu-Ala-Ala-OMe	(VIII)	23	64
Boc-Ile-Phe-Phe-Ala-Ala-OMe	(IX)	33	15
Z-Ala-Ala-Phe-Phe-Gly-Gly-OMe	(X)	18	39
Z-Ala-Phe-Phe-OMe	(XI)	11	47
Z-Ala-Ala-Glu-Leu-pNA	(XII)	8	60
Z-Ala-Ala-Trp-Leu-pNA	(XIII)	20	30
Z-Ala-Ala-Met-Leu-pNA	(XIV)	20	76
Z-Ala-Ala-Phe-Arg-pNA	(XV)	23	49
Z-Ala-Ala-Phe-Phe-pNA	(XVI)	20	70
Z-Ala-Ala-Phe-Leu-pNA	(XVII)	20	90
Z-Ala-Ala-Phe-Ala-pNA	(XVIII)	20	80
Z-Ala-Ala-Phe-Val-pNA	(XIX)	20	76
Z-Ala-Ala-Phe-Ala-Ala-pNA	(XX)	25	77
Z-Ala-Ala-Phe-Phe-Ala-Ala-pNA	(XXI)	33	67

* Стрелкой указано место синтезируемой связи.

разования пептидной связи между фенилаланином в P_1 и различными остатками в положении P_1' .

Особого внимания заслуживает образование связи Phe-Ala (пептид (XVIII)), поскольку гидролиз связи Хаа-Ala пепсином маловероятен. Довольно неожиданной оказалась возможность введения остатка аргинина

нина в положении P_1' . В результате реакции между Z-Ala-Ala-Phe-OH и H-Arg-pNA получен с выходом 26% *n*-нитроанилид тетрапептида Z-Ala-Ala-Phe-Arg-pNA, что было показано с помощью анализа реакционной смеси методом ВЭЖХ. Положительно заряженная гуанидиногруппа продукта образует соль с молекулой ацилирующего компонента. В соответствии с этим выход достигал 49%, если 2 моль Z-Ala-Ala-Phe-OH реагировали с 1 моль Arg-pNA, тогда как дальнейшее повышение количества аминокомпонента не улучшало выход. По-видимому, выход пептида ограничивался его заметной растворимостью в 20% диметилформамиде. Если необходимо, соль можно легко разложить подкислением и выделить целевой пептид. Очевидно, что аргинин не принадлежит к остаткам, соответствующим специфичности пепсина в положении P_1' , в реакциях как гидролиза, так и образование пептидной связи. В случае соединения (XII) удалось ввести в положение P_1 заряженный остаток глутаминовой кислоты. Этот остаток не является предпочтительным для связывания в S_1 -подцентре пепсина, хотя для определения активности фермента используется субстрат Z-Glu-Tyr-OH [9, 10].

С высокими выходами были получены и *n*-нитроанилиды пента- и гексапептидов (XX, XXI), причем их синтез протекал эффективнее, чем в случае соответствующих эфиров пептидов (IV).

Заслуживает специального рассмотрения количество пепсина, вводимого в реакцию синтеза *n*-нитроанилидов пептидов. Как уже упоминалось, приводимое в литературе молярное отношение пепсин — реагенты, использовавшиеся для синтеза пептидов, иногда достигало высоких значений. Нам удалось снизить относительное количество пепсина и достичь отношения фермент-субстрат 1:1700. Однако это отношение значительно отличается от соответствующего значения для случая синтеза эфиров (табл. 1), что указывает на относительно низкую активность пепсина в синтезе *n*-нитроанилидов. В ряде случаев мы обнаружили, что существенное снижение эффективности пепсина в синтетических реакциях связано с его соосаждением с образующимся осадком целевого пептида. Более детально это явление будет рассмотрено нами в дальнейшем.

n-Нитроанилиды пептидов, полученные в результате реакций, катализируемых пепсином, можно использовать в качестве хромогенных субстратов для определения активности протеолитических ферментов. Так, Z-Ala-Ala-Phe-Arg-pNA подходит для определения трипсина и других протеиназ с близкой специфичностью. Z-Ala-Ala-Phe-Ala-pNA соответствует требованиям специфичности папаина и родственных ферментов.

Экспериментальная часть

В работе использовали очищенный препарат пепсина свиньи (КФ 3.4.23.1).

Все температуры плавления даны без исправления. Гомогенность полученных пептидов контролировали с помощью ТСХ на пластинках Silufol (Чехо-Словакия) в системах: *n*-бутанол — вода — пиридин — уксусная кислота, 15:12:10:3 (А), *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 3:1:1 (В), хлороформ — метанол, 9:1 (С). Соединения, содержащие пептидную связь и аминокгруппу, давали положительную реакцию со свободным хлором, и их обнаруживали с помощью 0,05 М раствора KI. Соединения со свободной α -аминогруппой обнаруживали нингидриновым реактивом.

Анализ пептидов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе Gilson 704 в следующих условиях: колонка 4,6×250 мм, носитель — Ultrasphere ODS C18, элюция раствором 0,05% трифторуксусной кислоты — 0,05% триэтиламина в линейном градиенте концентрации ацетонитрила от 30 до 62%, скорость потока 1,5 мл/мин, детекция при 215 нм, для *n*-нитроанилидов — при 315 нм.

Аминокислотный анализ выполняли на автоматическом анализаторе Hitachi-835 (Япония) после кислотного гидролиза 5,7 н. соляной кислотой при 105° С в течение 48 ч.

Оптическое вращение определяли на спектрополяриметре фирмы Perkin — Elmer (США).

Z-Ala-Ala-Phe-Leu-Ala-Ala-OMe (I). 22 мг (50 мкмоль) *Z-Ala-Ala-Phe-OH* и 16,5 мг (50 мкмоль) *HCl·H-Leu-Ala-Ala-OMe* растворяли в 150 мкл DMF, содержащего 50 мкмоль триэтиламина. К полученному раствору прибавляли 600 мкл 1 М ацетатного буфера (pH 4,6) при перемешивании на магнитной мешалке и небольшом нагревании (до 35° С). Затем в реакционную смесь вносили 100 мкл стандартного раствора пепсина (1 мг/мл) в 0,1 М ацетатном буфере (pH 4,7). Смесь оставляли при перемешивании при 20° С на 20 ч, затем осадок центрифугировали, промывали последовательно 3% NaHCO_3 (3×300 мкл), водой (300 мкл), 0,1 М HCl (3×300 мкл) и водой (300 мкл). Сушили в вакууме над NaOH . Выход 22 мг (62%). Пептиды (II) — (XI) были получены аналогично. Характеристики эфиров пептидов представлены в табл. 3.

Z-Ala-Ala-Phe-Leu-pNA (XVII). 22 мг (50 мкмоль) *Z-Ala-Ala-Phe-OH* и 12,5 мг (50 мкмоль) *Leu-pNA* растворяли в 200 мкл DMF и 700 мкл

Таблица 3

Характеристики синтезированных эфиров пептидов

Пептид	R_f			Т. пл., °С	Аминокислотный анализ *		
	А	В	С				
(I)	0,90	0,70	0,75	210–212	Phe (1) 9,0	Leu (1) 10,1	Ala (4) 40,0
(II)	0,80	0,87	0,86	208–210	Met (1) 1,5 **	Phe (2) 5,9	Ala (2) 5,1
(III)	0,92	0,76	0,66	208–210	Phe (1) 5,8	Leu (1) 8,4	Ala (3) 16,1
(IV)	0,80	0,79	0,84	199–201	Phe (2) 6,0	Ala (4) 12,7	
(V)	0,91	0,77	0,66	198–200	Phe (2) 7,5	Ala (2) 8,8	
(VI)	0,88	0,75	0,67	185–187	Phe (1) 4,7	Leu (1) 6,5	Ala (2) 12,2
(VII)	0,88	0,76		239–241	Phe (1) 3,8	Leu (1) 4,2	Ala (4) 15,8
(VIII)	0,87	0,77	0,54	246–248	Leu (2) 16,5	Ala (4) 31,7	
(IX)		0,84	0,87	218–220	Ile (1) 2,7	Phe (2) 5,4	Ala (2) 5,3
(XI)	0,92	0,78	0,76	190–192	Phe (2) 14,3	Ala (1) 8,5	

* В нмблах, в скобках — число аминокислотных остатков.

** Значение занижено из-за разрушения метионина при гидролизе.

Характеристики синтезированных *n*-нитроанилидов пептидов

Пептид	R_f		$[\alpha]_D^{20}$, град	Аминокислотный анализ *		
	A	B				
(XII)	0,72	0,86	—	Leu(1) 14,6	Glu(1) 13,8	Ala(2) 25,7
(XV)	0,73	0,65	—13,5 (с 1,3, DMF)	Ala(2)	Phe(1)	Arg(1)
(XVI)	0,85	0,85	+23,7 (с 1,3, DMSO)	Ala(2) 6,5	Phe(2) 6,4	—
(XVII)	0,80	0,78	—9,4 (с 1,3, DMSO)	Ala(2) 11	Leu(1) 5,2	Phe(1) 5,2
(XVIII)	0,80	0,77	—25,3 (с 1,3, DMF)	Ala(3) 6,1	Phe(2) 2,3	—
(XIX)	0,85	0,85	—7,8 (с 1,3, DMSO)	Ala(2) 15,3	Val(1) 6,5	Phe(1) 7,4
(XX)	0,80	0,84	—	Ala(4) 31,7	Phe(2) 8,5	—
(XXI)	0,88	0,87	—	Ala(2) 15,7	Phe(2) 6,8	—

* В ммольх, в скобках — число аминокислотных остатков.

0,5 М ацетатного буфера, pH 5, при перемешивании на магнитной мешалке и небольшом нагревании (до 35° С). Затем в реакционную смесь вносили 100 мкл раствора пепсина в 0,1 М ацетатном буфере (концентрация 10 мг/мл). Сразу выпадал осадок. Перемешивание продолжали 1 ч при 37° С. Затем образовавшийся осадок центрифугировали и промывали 3% раствором NaHCO_3 (3×500 мкл), водой (500 мкл), 0,1 М HCl (3×500 мкл) и 500 мкл воды. Сушили в вакуумном эксикаторе над P_2O_5 . Выход 30 мг (90%). Другие *n*-нитроанилиды были получены аналогично. Пептиды (XIII) и (XIV) были получены в аналитических количествах и идентифицированы ВЭЖХ. Время выхода для (XIII) 25,7 мин, для (XIV) 23,5 мин.

Z-Ala-Ala-Phe-Arg-pNA (XV). 176 мг (400 мкмоль) *Z-Ala-Ala-Phe-OH* и 75 мг (200 мкмоль) *Arg-pNA* растворяли в 600 мкл DMF и 1000 мкл 0,5 М ацетатного буфера, pH 5, при перемешивании на магнитной мешалке и небольшом нагревании (до 35° С). Затем в реакционную смесь вносили 400 мкл раствора пепсина в 0,1 М ацетатном буфере (концентрация 10 мг/мл). Через несколько минут выпадал осадок. Перемешивание продолжали 1 ч при 37° С. Затем реакцию останавливали добавлением триэтиламина до pH 8,0. Образовавшийся осадок центрифугировали. Супернатант, по данным ВЭЖХ, содержал 8% продукта реакции. Осадок промывали 0,1 М HCl (4×500 мкл) и этилацетатом, подкисленным HCl (4×200 мкл). Осадок кипятили с 2 мл этилацетата, отделяли центрифугированием, высушивали в вакуум-эксикаторе. Выход 67 мг (49%).

Все *n*-нитроанилиды пептидов представляли собой кристаллические вещества с температурами плавления выше 250° С. Характеристики полученных соединений представлены в табл. 4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fruton J. S. // *Adv. Enzymol.* 1982. V. 53. P. 239-306.
2. Jakubke H.-D. // *Peptides*. 1987. V. 9. № 3. P. 103-165.
3. Morihara K., Oka T. // *J. Biochem.* 1981. V. 89. № 2. P. 385-395.
4. Kuhl P., Jakubke H.-D. // *Monatshefte Chem.* 1983. B. 114. S. 571-579.
5. Pellegrini A., Luisi P. // *Biopolymers*. 1978. V. 17. № 7. P. 2573-2580.
6. Isowa Y., Ichikawa T. // *Bull. Chem. Soc. Japan*. 1979. V. 52. № 3. P. 796-800.
7. Воюшина Т. Л., Люблинская Л. А., Тимошина Е. А., Степанов В. М. // *Биоорг. химия*. 1987. Т. 13. № 5. С. 615-622.
8. Schechter J., Berger A. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1967. V. 27. № 2. P. 157-162.
9. Зинченко А. А., Румш Л. Д., Антонов В. К. // *Биоорг. химия*. 1976. Т. 2. № 8. С. 803-810.
10. Suzuki T., Furukohri T. // *J. Protein Chem.* 1990. V. 9. № 1. P. 69-73.

Поступила в редакцию
20.III.1992

E. N. LYSOGORSKAYA, I. YU. FILIPPOVA, C. A. ABDEL MALAK, G. I. LAVRENOVA,
V. V. ANISIMOVA, E. S. OKSENOIT, V. M. STEPANOV

PEPSIN AS A CATALYST IN ENZYMATIC SYNTHESIS OF PEPTIDES p-NITROANILIDES AND ESTERS

Moscow State University, Chemistry Department, Moscow

Pepsin was shown to catalyze synthesis of esters or *p*-nitroanilides tri-, tetra-, penta- and hexapeptides of general formula Z-X-Y-B, where X=Ala-Phe, Phe-Met, Ala-Ala-Glu, Ala-Ala-Phe, Ala-Ala-Leu, Ala-Ala-Trp, Ala-Ala-Met. Y=Ala, Leu, Val, Phe, Arg, Ala-Ala, Gly-Gly, Leu-Ala-Ala, Phe-Ala-Ala. B=OMe, pNA. The reactions were carried out in dimethylformamide - water solutions at pH 4.6 by equimolar ratio of amino- and carboxyl components (with the exception of Arg-pNA taken in 2-fold excess). The amount of pepsin in the reaction approached 1:1700 enzyme: substrate molar ratio although it might be improved - up to 1:3·10⁵ for relatively long peptides.