



УДК 577.112.6; 577.152.34'135

© 1994 Ю. В. Митин, Н. П. Запезалова,  
О. Р. Зайцева, Е. Ю. Горбунова

## НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СУБСТРАТЫ ТРИПСИНА В ФЕРМЕНТАТИВНОМ СИНТЕЗЕ ПЕПТИДОВ

*Институт белка РАН, Пушкино Московской обл.*

Ключевые слова: пептиды, синтез ферментативный, трипсин.

Изучена конденсация пептидов, катализируемая трипсином в водной среде. В качестве доноров ацила использовали карбоксамидометилловые эфиры (Сам-эфиры). Пептиды, использованные для конденсации, не содержали положительно заряженных групп лизина и аргинина. Гидрофобные аминокислоты, за исключением валина и изолейцина, являются наиболее подходящими в качестве С-концевых остатков в Сам-эфирах, использованных для реакции. Конденсация не происходит, если глутаминовая или аспарагиновая кислоты занимают первое или второе положение в аминокомпоненте. Процесс отличается полным отсутствием вторичного гидролиза. Осуществлен синтез ряда водорастворимых пептидов (от гепта- до тетрадекапептидов).

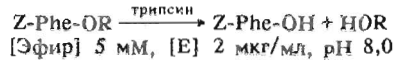
Протеолитические ферменты (трипсин, химотрипсин, папаин и т. д.) могут быть с успехом использованы для синтеза пептидов в водной или водно-органической среде [1, 2]. С помощью ферментов можно синтезировать сравнительно короткие пептиды без особых проблем. К сожалению, довольно часто протеиназы нельзя применять для синтеза длинных пептидов из-за опасности вторичного гидролиза. Атака фермента может быть направлена на любую связь сшитого пептида, соответствующую специфичности фермента. Вторичный гидролиз приводит к значительному снижению выхода синтезируемого пептида и к появлению большого числа побочных продуктов.


Во избежание вторичного гидролиза применяют, в частности, условия, при которых фермент реализует свою эстеразную активность, но не может выступать как протеиназа. Наиболее удобными соединениями для таких экспериментов являются неспецифические субстраты трипсина.

В соответствии с существующими представлениями связывание субстратов трипсином осуществляется благодаря ионным и гидрофобным взаимодействиям в активном центре [3]. Известно, что трипсин может катализировать гидролиз этиловых эфиров некоторых нейтральных аминокислот [4, 5], что позволяет использовать последние для синтеза пептидов в присутствии трипсина, однако этот вариант синтеза требует большой концентрации фермента [6].

Недавно мы предположили, что в связывании субстрата трипсином важную роль играет также водородная связь в S<sub>2</sub>'-положении [7]: эфиры аминокислот и пептидов, которые способны образовывать такую водородную связь, являются

Сокращения: Сам-эфиры — карбоксамидометилловые эфиры. Все аминокислоты — L-ряда.

Катализируемый трипсином гидролиз эфиров, образующих водородную связь в положении S<sub>2</sub>'

R	$v \cdot 10^3, \text{ M} \cdot \text{мин}^{-1}$	R	$v \cdot 10^3, \text{ M} \cdot \text{мин}^{-1}$
$-\text{CH}_2-$ 	4,0	$-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH}$	12,0
$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$	5,7	$-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$ (Сам)	22,0
$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$	0,85	$-\text{CH}(\text{CONH}_2)_2$	3,0
		$-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$	5,4
		$\text{C}_6\text{H}_5$ (для сравнения)	0,6

хорошими субстратами трипсина (табл. 1). Влияние этой водородной связи ясно видно при сопоставлении скоростей гидролиза моноэфира этиленгликоля и бензилкарбонилфенилаланина и его метилированного аналога (табл. 1).

Эфиры нейтральных аминокислот, способные образовывать водородную связь в положении S<sub>2</sub>', обладают достаточно высокой реакционной способностью, чтобы их можно было использовать для ферментативного синтеза пептидов в присутствии трипсина. Что касается пептидов, синтезируемых таким путем, то они не являются субстратами трипсина и не подвержены вторичному гидролизу.

Наиболее подходящими для ферментативного синтеза оказались карбоксиметилловые эфиры (Сам-эфиры). Эти соединения можно легко синтезировать, исходя из иодацетамида и N-защищенных аминокислот или пептидов [8]. Используя Сам-эфиры и трипсин, мы синтезировали различные ди-, три- и тетрапептиды нейтральных аминокислот, причем полученные пептиды могли содержать также лизин или аргинин при условии защиты боковых групп [7]. Отсутствие вторичного гидролиза в таком процессе позволило нам использовать Сам-эфиры для синтеза водорастворимых пептидов с относительно длинными цепями. Самым выгодным подходом для этой цели представляется фрагментарная конденсация с помощью трипсина. Исходные пептидные фрагменты можно синтезировать с помощью химических методов, используя Сам-эфиры как защитную группу для С-концевых аминокислот. Затем полученные фрагменты следует соединить с помощью трипсина в пептидную цепь заданного строения. Прежде всего необходимо было выяснить, как влияет строение С-концевой аминокислоты Сам-эфира на выход продукта конденсации. Мы синтезировали с использованием пентафторфениловых эфиров ряд трипептидов  $\text{Woc-Ala-Glu-Axx-OCam}$  (Ахх — различные аминокислоты) (табл. 2) и изучили их конденсацию, катализируемую трипсином, с тетрапептидом  $\text{Ile-Ala-Glu-Phe}$  (табл. 3). Из полученных данных можно сделать вывод, что С-концевые гидрофобные аминокислоты или гидрофобные производные аминокислот: Phe, Tyr, Ala, Met, Ser(Bzl), Asp(OBzl), за исключением Ile и Val, наиболее предпочтительны для катализируемой трипсином конденсации. Следует отметить, что в случае С-концевых Ile или Val преобладает только гидролиз соответствующих Сам-эфиров, синтез практически отсутствует.

Полученные результаты, естественно, вызывают вопрос: не объясняется ли этот эффект присутствием химотрипсина в используемом препарате трипсина. Трипсин фирмы Serva, который мы использовали, обладает химотриптической активностью менее 0,17%. Мы проверили, что химотрипсин в такой концентрации вызывает эффект несравненно меньший, чем наблюдаемый нами. Аналогичные результаты получены с трипсином фирмы Merck, обладающим химотриптической активностью менее 0,005%.

В случае, когда в качестве С-концевых в Сам-эфирах выступают гидрофильные аминокислоты, такие, как Asp, Ser, Thr, Glu, конденсация протекает очень медленно и выход пептида (HP) невелик (табл. 3). Таким образом, свободные

Сам-эфиры пептидов, Вос-Ala-Glu-Axx-ОСам, использованные для конденсации фрагментов в присутствии трипсина

Аxx	т. пл., °С	R <sub>f</sub> (система)	Аxx	т. пл., °С	R <sub>f</sub> (система)
Ala	Аморф.	0,60 (Б)	Trp	Аморф.	0,24 (А)
Leu	136—138	0,65 (Б)	Lys(Вос)	»	0,58 (В)
Phe	169—171	0,23 (А)	Met	»	0,43 (А)
Tyr	Аморф.	0,17 (А)	Val	88—91	0,32 (А)
Ser(Bzl)	151—152	0,27 (А)	Ile	Аморф.	0,72 (Б)
Ser	Аморф.	—	Ala <sup>2*</sup>	»	0,41 (Б)
Asp(OBzl)	108—110	0,36 (А)	Thr <sup>3*</sup>	193—194	0,12 (А)
Asp	Аморф.	0,12 (А)	Phe <sup>4*</sup>	114—116	0,34 (А)

\* Результаты элементарного анализа пептидов соответствуют рассчитанным величинам; состав хроматографических систем см. «Экспер. часть».

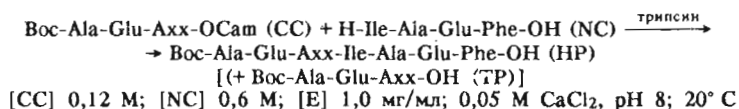
<sup>2\*</sup> Пептид Вос-Ser-Asp-Axx-ОСам.

<sup>3\*</sup> Пептид Вос-Ala-Val-Asp-Axx-ОСам.

<sup>4\*</sup> Пептид Вос-Ser-Asp-Gly-Thr-Axx-ОСам.

Таблица 3

Влияние природы С-концевого аминокислотного остатка Сам-эфира пептида (С-компонент, СС) на результат его катализируемой трипсином конденсации с N-компонентом (NC)



Аxx	Время реакции, мин	Выход HP, %	R <sub>f</sub> HP; R <sub>f</sub> TP (система)
Ala	20	82	0,83; 0,63 (Г)
Leu	2	85	0,08; 0,40 (В)
Phe	2	72	0,20; 0,33 (В)
Tyr	2	85	0,42; 0,65 (Б)
Ser(Bzl)	40	84	0,40; 0,70 (Б)
Ser	30	58	0,57; 0,90 (Г)
Asp(OBzl)	100	81	0,52; 0,72 (Б)
Asp	210	45 *	0,75; 0,95 (Г)
Trp	20	37	0,20; 0,34 (В)
Lys(Вос)	90	56	0,20; 0,57 (В)
Met	15	67	0,74; 0,95 (Е)
Val	150	12	0,31; 0,60 (Б)
Ile	150	0 **	—; 0,67 (Д)

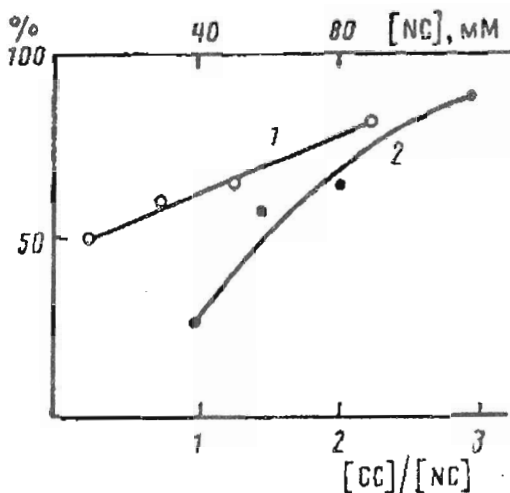
\* [СС] 0,25 M; [NC] 0,12 M.

\*\* [E] 2,5 мг/мл.

β- или γ-карбоксильные группы в положении Р<sub>1</sub> вызывают снижение скорости реакции, в то время как эти группы в положении Р<sub>2</sub> не влияют на процесс.

В противоположность этому свободные карбоксильные группы в аминоконпоненте гораздо сильнее влияют на результат конденсации. Так, например, Вос-Ala-Glu-Phe-ОСам невозможно ввести в реакцию с Glu-Phe или с Ala-Glu-Phe, в то время как конденсация с Ala-Ala-Glu-Phe протекает очень легко и соот-

Зависимость выхода продукта катализируемой трипсином конденсации Сам-эфира с пептидом от концентрации компонентов (1) и их соотношения (2).  
 CC—*Вос-Ala-Glu-Phe-OСam*,  
 NC — *H-Ala-Ala-Glu-Phe-OH*.  
 Для (1)  $[CC]/[NC] = 2$ , для  
 (2)  $[NC] = 50$  мМ



ветствующий гептапептид получается с выходом 74% за 2 мин. Это означает, что необходимо избежать наличия свободных карбоксильных групп в положении 1 и 2 аминокомпонента.

Выход продукта конденсации в значительной степени зависит от концентрации компонентов, а также их соотношения (рисунок). Тройной избыток Сам-эфира гарантирует достаточно высокий выход продукта. Напротив, концентрация трипсина слабо влияет на выход пептида, однако регулирует скорость процесса (табл. 4).

Для демонстрации возможностей метода мы провели синтез октапептида (I), декапептида (II) последовательности 2—11 секретина, ундекапептида (III) последовательности 1—11 тимозина и тетрадекапептида (IV), модифицированного фрагмента тимозина (табл. 5). Исходные пептидные фрагменты были синтезированы с помощью пентафторфениловых эфиров. Конденсация пептидных фрагментов проводилась в водной среде без применения каких-либо органических растворителей.

Таким образом, показано, что трипсин можно с успехом использовать для конденсации Сам-эфиров пептидов с пептидами, имеющими свободную  $\alpha$ -аминогруппу. Метод позволяет соединять пептидные фрагменты в воде при выполнении следующих требований:

1) пептидный Сам-эфир может иметь любую аминокислоту в качестве С-концевой, за исключением валина, изолейцина и пролина. Особенно подходящими являются фенилаланин, тирозин, лейцин и аланин;

2) аспарагиновая и глутаминовая кислоты не могут занимать положение 1 или 2 в аминокомпоненте;

3) необходимо защищать  $\epsilon$ -аминогруппу лизина и гуанидиногруппу аргинина, чтобы исключить вторичный гидролиз синтезируемого пептида. Боковые группы остальных аминокислот можно не защищать;

4) следует использовать избыток пептидного Сам-эфира, чтобы получить высокий выход продукта конденсации.

### Экспериментальная часть

В работе использовали аминокислоты и их производные фирм Reanal (Венгрия) и Serva (Германия); трипсин, обработанный дифенилкарбамоилхлоридом, 35 ME/мг (Serva). Аминокислотный анализ проводили на анализаторе Biotronic LC-3000, элементный анализ — на анализаторе Perkin — Elmer 240B. Оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin — Elmer 141M. Конденсацию, катализируемую трипсином, проводили в автотитраторе Radiometer TTT1.

Влияние концентрации трипсина на скорость образования гептапептида  
 BocAlaGluPhe-AlaAlaGluPheOH

(дефисом обозначена синтезированная пептидная связь)  
 Условия см. в подписи к табл. 3

[E], мг/мл	Время реакции, мин	Выход гептапептида, %
1,32	2	74
0,08	25	69
0,007	160	66

Таблица 5

Пептиды, полученные фрагментной конденсацией в присутствии трипсина  
 (дефисом обозначена синтезированная пептидная связь)

Пептид *	Время, мин	Выход, %	R <sub>f</sub> (E) **
BocAlaValAspThr-SerSerGluIleOH (I)	80	73	0,40
BocSerAspGlyThrPhe-ThrSerGluLeuSerOCH <sub>3</sub> (II)	240	50	0,15
BocSerAspAla-AlaValAspThrSerSerGluIleOH (III)	45	64	0,29
BocAlaGluPhe-SerAspAlaAlaValAspThrSerSerGluIleOH (IV)	3	53	0,78

\* Результаты аминокислотного анализа соответствуют рассчитанным величинам.  
 \*\* Для пептида (II) — система Г.

Для ТСХ на пластинках Silufol (Kavalier, ЧСФР) применяли системы растворителей: хлороформ — метанол, 9 : 1 (А), хлороформ — метанол, 8 : 2 (Б), хлороформ — метанол — уксусная кислота, 90 : 10 : 1 (В), *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 1 (Г), хлороформ — метанол — уксусная кислота, 90 : 30 : 2 (Д), хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода, 8 : 4 : 1 : 1 (Е).

Гептапептид Boc-Ala-Glu-Leu-Ile-Ala-Glu-Phe-OH. 0,195 г (0,4 ммоль) Boc-Ala-Glu-Leu-OSam и 0,128 г (0,2 ммоль) CF<sub>3</sub>COOH·H-Ile-Ala-Glu-Phe-OH растворяли в 3 мл 50 мМ CaCl<sub>2</sub>, доводили до pH 8 добавлением 5 н. NaOH. При интенсивном перемешивании прибавляли 3 мг трипсина и поддерживали pH 8 автоматическим титрованием 1 н. NaOH, через 2 мин раствор выливали в 20 мл 10% KHSO<sub>4</sub> и экстрагировали *n*-бутанолом (2×20 мл). Бутанольный раствор промывали 20 мл воды, упаривали в вакууме. Остаток обрабатывали горячим этилацетатом (2×25 мл), при этом экстрагировался только Boc-Ala-Glu-Leu-OH, в остатке оставался хроматографически чистый Boc-Ala-Glu-Leu-Ile-Ala-Glu-Phe-OH, выход 0,16 г (85%).

Аналогично синтезировали другие пептиды, представленные в табл. 3 и 5.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jakubke H.-D. // Peptides. 1987. V. 9. P. 103—147.
2. Kallmann W. Enzymatic Peptide Synthesis. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, 1987.
3. Клесов А. А. // Биоорганическая химия. 1977. Т. 3. № 8. С. 1100—1110.
4. Seydoux F., Yon J. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1971. V. 44. № 3. P. 745—751.
5. Vajda J., Szabo J. // Acta biochim. et biophys. Acad. sci. hung. 1976. V. 11. № 4. P. 287—294.
6. Widmer F., Ohno M., Smith M., Nelson N., Anfinsen Ch. B. // Peptides 1982. Proceedings 17 Eur. Pept. Symp. / Ed. K. Blaha, P. Malon. B.: Walter de Gruyter, 1983. P. 375—379.

7. Mitin Yu. V., Zapevalova N. P., Gorbunova E. Yu. // *Biomed. et biochim. acta.* 1991. V. 50. № 10/11. P. 74—79.
8. Martinez J., Laur J., Castro B. // *Tetrahedron Lett.* 1983. V. 24. № 4. P. 5219—5222.
9. Kisfaludy L., Low M., Nyeki O., Szirtes T., Schon J. // *Liebigs Ann. Chem.* 1973. P. 1421—1429.

Поступила в редакцию  
15.X.1993

*Yu. V. Mitin, N. P. Zapevalova, O. R. Zaitseva, E. Yu. Gorbunova*

### NONSPECIFIC TRYPSIN SUBSTRATES IN ENZYMATIC PEPTIDE SYNTHESIS

*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow  
Region*

Trypsin — catalyzed coupling of peptide segments in aqueous medium was studied. Carboxamido methyl esters (Cam esters) of peptides were used as acyl donors. Peptide segments involved in the coupling do not contain positively charged residues (Lys, Arg). Hydrophobic amino acids (except isoleucine and valine) are preferable as C-terminals in the peptide Cam esters used for the reaction. The coupling cannot take place if glutamic or aspartic acids occupy positions 1 or 2 in the amine component. Threefold excess of Cam ester provides a high yield of the coupling product. The coupling is free of secondary hydrolysis. A series of water soluble peptides (from hepta- to tetradecapeptides) were synthesized by this method.