



УДК 577.112.6:577.152.34'135

## СИНТЕЗ ТРИ- И ТЕТРАПЕПТИДОВ, КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ СУБТИЛИЗИНОМ В ВИДЕ СУСПЕНЗИИ В ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЯХ

© 1998 г. И. В. Гетун, И. Ю. Филиппова<sup>#</sup>, Е. Н. Лысогорская,  
С. В. Колобанова, Е. С. Оксенойт, В. В. Анисимова, В. М. Степанов

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

Поступила в редакцию 04.07.97 г. Принята к печати 27.12.97 г.

Изучено поведение субтилизина 72 в апротонных растворителях – ацетонитриле, диоксане и тетрагидрофуране. Показано, что фермент частично растворяется в тетрагидрофуране, однако это сопровождается его глубокой инактивацией. В ацетонитриле и диоксане субтилизин образует низкоконцентрированную суспензию. После переноса в воду активность субтилизина, выдержанного в ацетонитриле, на порядок выше, чем в диоксане, и сохраняется длительное время. Изучена реакция синтеза Z-Ala-Ala-Leu-pNA из Z-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub> и Leu-pNA, катализируемая низкоконцентрированной суспензией субтилизина в ацетонитриле. Аналогично осуществлен синтез *n*-нитроанилидов тетрапептидов Z-Ala-Ala-P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'-pNA, где P<sub>1</sub>, P<sub>1</sub>' = Leu или Phe ([S] : [E] = 10<sup>5</sup> : 1), и трипептидов Z-Ala-Ala-Leu-pNA, Z-Ala-Ala-Phe-pNA и Z-Ala-Ala-Phe-NH<sub>2</sub> в ацетонитриле, катализируемый концентрированной суспензией субтилизина ([S] : [E] = 10<sup>3</sup> : 1). Показано, что увеличение концентрации фермента приводит к образованию в значительных количествах продуктов повторного присоединения нуклеофила: Z-Ala-Ala-Leu-Leu-pNA, Z-Ala-Ala-Phe-Phe-pNA и Z-Ala-Ala-Phe-Phe-NH<sub>2</sub> с выходами 13, 33, 40% соответственно; поэтому возможно применение таких реакционных систем для создания длинных гидрофобных пептидов, синтез которых в водно-органических смесях лимитируется низкой растворимостью исходных компонентов в водно-буферных растворах.

*Ключевые слова:* ферментативный синтез, пептидный синтез, субтилизин.

В последнее время интенсивно развивается ферментативный пептидный синтез в органических растворителях. Существенным его преимуществом является глубокое смещение равновесия в сторону синтеза пептидной связи, а также улучшение растворимости субстратов, что создает предпосылки для синтеза протяженных пептидов.

Протеолитический фермент субтилизин (сериновая протеиназа, КФ 3.4.21.14) успешно применяется при синтезе пептидов в органической среде, будучи сорбированным на макропористом стекле или на силохроме [1–5]. В некоторых случаях катализ образования пептидной связи наблюдался под действием фермента, суспендированного в безводном органическом растворителе [6–9]. Предполагается, однако, что в такого рода реакциях существенную роль в стабилизации фермента играет вода, содержащаяся в растворителях, а также имеющаяся на поверхности фер-

мента [2, 3, 7–10]. В синтезе используются довольно большие количества ферментов (по сравнению с ферментативным синтезом в водной среде), однако в катализе, по-видимому, участвуют только молекулы поверхностного слоя [8, 11].

Целью работы было исследование поведения субтилизина в отсутствие носителя в апротонных органических растворителях – ацетонитриле, тетрагидрофуране и диоксане, изучение стабильности, активности и способности фермента катализировать синтез пептидов в этих растворителях. Ацетонитрил был выбран потому, что в этом растворителе, как правило, проводят синтез с сорбированными на твердых носителях ферментами [1–5]. Диоксан и тетрагидрофуран часто используют при работе с суспендированными ферментами [10, 12–14]. Оценка, тем более количественная, состояния фермента, находящегося в растворенном состоянии в среде органических растворителей, не содержащих воды, весьма сложна и неоднозначна, поскольку трудно разграничить, присутствует ли фермент в растворе или в мелкодисперсном состоянии. Так, в работе [15]

Сокращения: Z – бензилоксикарбонил, pNA – *n*-нитроанилид. Все аминокислоты – L-ряда.

<sup>#</sup>Автор для переписки (факс: (095) 932-88-46).

Ченом с соавторами оценивалась растворимость субтилизина Карлсберг в этаноле. Она составила 45 мкг/мл (1.5 мкМ), однако строгого доказательства того, что эти данные относились к истинному раствору, а не к суспензии фермента, не приводится.

В данной работе для изучения состояния фермента лиофильно высушенный субтилизин помещали в органический растворитель, при этом наблюдалось образование суспензии, а возможно, и частичное растворение фермента. Суспензию перемешивали, центрифугировали 10 мин при 16000g, после чего определяли содержание и активность фермента в полученном супернатанте, который в дальнейшем мы будем называть низкоконцентрированной суспензией.

Количественно содержание субтилизина в органических растворителях оценивалось спектрофотометрически и по результатам аминокислотного анализа. Согласно полученным данным (рис. 1), УФ-спектр субтилизина в тетрагидрофуране в наибольшей степени соответствовал спектру белка, растворенного в воде, и имел характерный максимум поглощения при 280 нм, что указывает на образование субтилизином истинного раствора. Содержание субтилизина в тетрагидрофуране составило 20 мкМ.

В спектре пробы субтилизина в диоксане отчетливого максимума при 280 нм не наблюдалось; значение  $A_{280}$  составило 0.35, что соответствует 11.7 нмоль/мл (табл. 1). Вероятно, в диоксане наряду с растворенным ферментом присутствовала и его взвесь.

В УФ-спектре пробы субтилизина в ацетонитриле максимума при 280 нм не наблюдалось, вид спектра свидетельствовал о сильном светорассеянии. Вероятно, субтилизин, по крайней мере основная его часть, существует в ацетонитриле в виде суспензии, а не истинного раствора. После повторного центрифугирования суспензии субтилизина в ацетонитриле при 10000g и 4°C спектр полученного супернатанта принял вид (рис. 1, кривая 5), видимо, в результате осаждения, по крайней мере частичного, белка, хотя осадка наблюдать не удалось из-за малого его содержания. Появился небольшой максимум при 280 нм, однако минимум при 260 нм был выражен неявно. Вероятно, и после повторного центрифугирования фермент в ацетонитриле находился в виде мелкодисперсной суспензии, хотя нельзя исключить, что часть его все же образовывала истинный раствор. Оценка концентрации фермента по поглощению при 280 нм в появившемся пике за вычетом вклада в спектр светорассеяния составила 0.36 нмоль/мл.

Мы оценили содержание субтилизина в ацетонитриле и диоксане также по данным аминокислотного анализа (табл. 1). Различия в величинах,

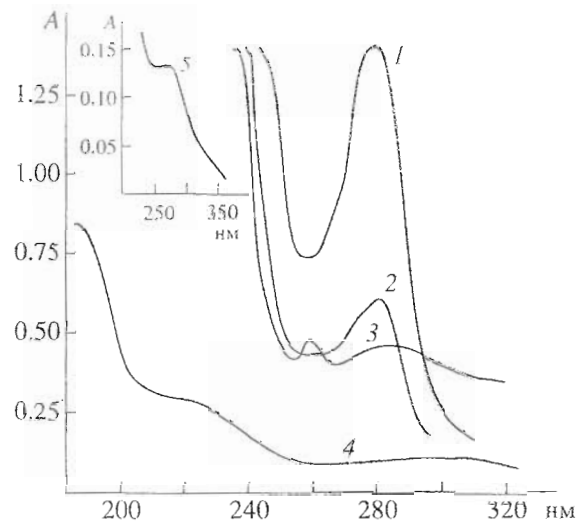


Рис. 1. УФ-спектры раствора субтилизина в воде (1) и низкоконцентрированной суспензии субтилизина в тетрагидрофуране (2), диоксане (3) и ацетонитриле (4). Кривая 5 получена после повторного центрифугирования суспензии субтилизина в ацетонитриле.

полученных этими двумя способами, очевидно, свидетельствуют о вкладе в поглощение мелкодисперсной суспензии фермента в органическом растворителе. Следует отметить, что при спектральной оценке растворимости субтилизина его молярный коэффициент поглощения в органическом растворителе принимался равным этой величине для белка в воде. Кроме того, ошибка при определении малых значений молярного коэффициента и малых концентраций аминокислот очень велика. Таким образом, речь идет о полуквантитативной оценке содержания фермента.

Сохранение субтилизином активности после выдерживания его взвеси или раствора в диоксане, тетрагидрофуране и ацетонитриле определяли по способности субтилизина гидролизовать стандартный хромогенный субстрат – Z-Ala-Ala-Leu-pNA после разбавления пробы фермента в органическом растворителе большим объемом воды. Определенная таким образом удельная активность субтилизина, который контактировал с

Таблица 1. Содержание субтилизина в органических растворителях

Растворитель	Содержание субтилизина, определенное спектрально, мкМ	Содержание субтилизина, определенное по данным аминокислотного анализа, мкМ
Тetraгидрофуран	20.0	—
Диоксан	11.7	5.3
Ацетонитрил	0.36	0.1

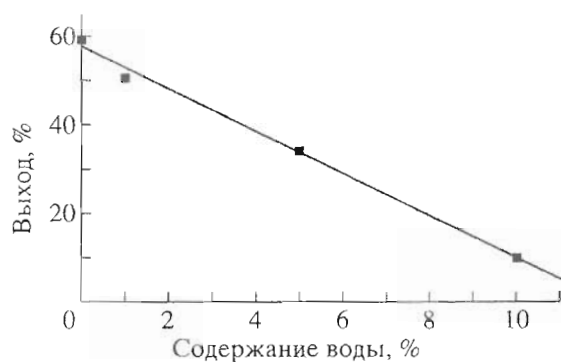


Рис. 2. Зависимость выхода Z-Ala-Ala-Leu-pNA от содержания воды в ацетонитриле ([S] 35 мМ, [E] 35 нМ, 2% DMF, 2 сут).

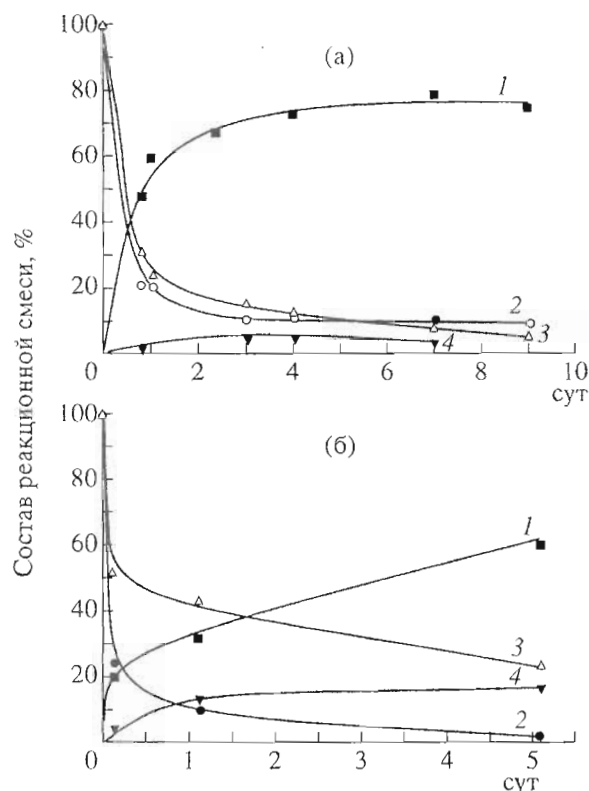
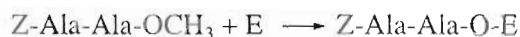
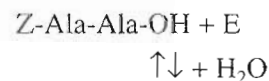


Рис. 3. Синтез Z-Ala-Ala-Leu-pNA с низкоконцентрированной суспензией субтилизина в безводном ацетонитриле (а) и в ацетонитриле, содержащем 5% воды (б). 1 – Z-Ala-Ala-Leu-pNA; 2 – Z-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub>; 3 – Leu-pNA; 4 – Z-Ala-Ala-OH.

органическим растворителем в течение 15 ч, составляла 0.72 (диоксан), 0.034 (тетрагидрофуран) и 6.9 (ацетонитрил) мкмоль/мин  $OE_{280}$ . Активность фермента, выдержанного в ацетонитриле, сопоставима с удельной активностью раствора субтилизина в воде (7–8 мкмоль/мин  $OE_{280}$ ), что свидетельствует об отсутствии денатурации в этих условиях. Значительная потеря активности

наблюдалась при инкубации фермента в диоксане и практически полная – в тетрагидрофуране. В связи с этим в дальнейшем тетрагидрофуран в синтезах не использовали.

С помощью низкоконцентрированной суспензии субтилизина была проведена кинетически контролируемая реакция образования *n*-нитроанилида Z-Ala-Ala-Leu-pNA в диоксане и ацетонитриле (схема 1).



#### Схема 1

Концентрация исходных соединений Z-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub> и H-Leu-pNA составляла 250 мМ, отношение [S]/[E] в ацетонитриле – 10<sup>6</sup> : 1, в диоксане – 10<sup>4</sup> : 1 (содержание фермента оценивали по величине  $A_{280}$ ). За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ. В диоксане за 3 ч синтез прошел лишь на 4%, в то время как в ацетонитриле выход продукта реакции составил 50%. По-видимому, такое различие в скорости синтеза связано со значительной денатурацией фермента в диоксане и коррелирует с данными по активности после перенесения в воду пробы фермента, выдержанного в этом растворителе.

Мы исследовали влияние воды на выход продукта реакции в ацетонитриле, добавляя в реакционную среду от 0 до 10% воды (рис. 2). Зависимость состава реакционной смеси от времени при синтезе Z-Ala-Ala-Leu-pNA в безводном ацетонитриле и ацетонитриле с содержанием воды 5% представлена на рис. 3. Наличие воды в системе (рис. 3б) уменьшает выход основного продукта и приводит к появлению Z-Ala-Ala-OH – продукта гидролиза карбоксильного компонента Z-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub> (схема 1). Наибольший выход Z-Ala-Ala-Leu-pNA достигался при проведении реакции без добавления воды; через 7 сут он составлял 78% (рис. 3а). В препаративном варианте выход этой реакции составил 70% (табл. 2).

В безводном ацетонитриле, содержащем 22% диметилформаида, с помощью низкоконцентрированной суспензии субтилизина (отношение [S]/[E] – 10<sup>5</sup> : 1) исходя из эфиров Z-Ala-Ala-Leu-OCH<sub>3</sub> и Z-Ala-Ala-Phe-OCH<sub>3</sub> и *n*-нитроанилидов Leu-pNA или Phe-pNA были синтезированы *n*-нитроанилиды ряда пептидов (табл. 2). Синтезы тетрапептидов проходили заметно быстрее и с большими выходами по сравнению с синтезом модельного трипептида Z-Ala-Ala-Leu-pNA. Это объясняется тем, что при синтезе тетрапептидов аминокислотный остаток в P<sub>1</sub>-положении (лей-

Таблица 2. Синтез пептидов в безводном ацетонитриле с помощью суспензии субтилизина

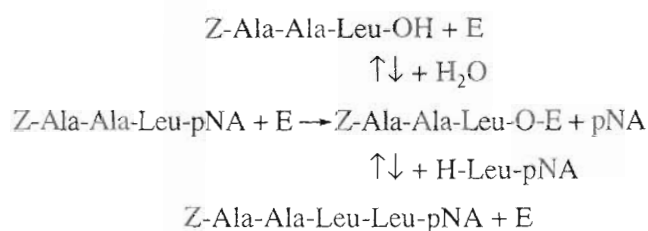
Ацилирующий компонент	Амино-компонент	Продукт	ВЭЖХ, время удерживания, мин	[S]/[E]	t, сут	Выход, %	Аминокислотный состав, нмоль в образце***		
							Ala	Leu	Phe
Z-Ala-Ala-OMe	H-Leu-pNA	Z-Ala-Ala-Leu-pNA	25	10 <sup>6</sup> : 1	7	78(70)*	29.6(2)	15.4(1)	–
Z-Ala-Ala-Leu-OMe	H-Leu-pNA	Z-Ala-Ala-Leu-Leu-pNA	27	10 <sup>5</sup> : 1	7	96(90)*	3.3(2)	3.2(2)	–
Z-Ala-Ala-Leu-OMe	H-Phe-pNA	Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA	27	10 <sup>5</sup> : 1	7	96(90)*	8.1(2)	4.2(1)	4.1(1)
Z-Ala-Ala-Phe-OMe	H-Leu-pNA	Z-Ala-Ala-Phe-Leu-pNA	27	10 <sup>5</sup> : 1	7	92	0.7(2)	0.4(1)	0.4(1)
Z-Ala-Ala-Phe-OMe	H-Phe-pNA	Z-Ala-Ala-Phe-Phe-pNA	27	10 <sup>5</sup> : 1	7	90	1.2(2)	–	1.2(2)
Z-Ala-Ala-OMe	H-Leu-pNA	Z-Ala-Ala-Leu-pNA	25	10 <sup>3</sup> : 1	5	77(42)**	–	–	–
		Z-Ala-Ala-Leu-Leu-pNA	27			13(35)**	1.6(2)	1.1(2)	–
Z-Ala-Ala-OMe	H-Phe-pNA	Z-Ala-Ala-Phe-pNA	25	10 <sup>3</sup> : 1	5	67	0.9(2)	–	0.5(1)
		Z-Ala-Ala-Phe-Phe-pNA	27			33	–	–	–
Z-Ala-Ala-OMe	H-Phe-NH <sub>2</sub>	Z-Ala-Ala-Phe-NH <sub>2</sub>	16	10 <sup>3</sup> : 1	3	56	–	–	–
		Z-Ala-Ala-Phe-Phe-NH <sub>2</sub>	21			41	10.2(2)	–	9.5(2)

\* В скобках приведен препаративный выход пептида.  
 \*\* В скобках указаны выходы при увеличении количества фермента в 6 раз.  
 \*\*\* В скобках приведено число аминокислотных остатков.

цин или фенилаланин) в большей степени, чем аланин, соответствует специфичности субтилизина и, кроме того, в P<sub>4</sub>-положении находится гидрофобная бензилоксикарбонильная группа, способная встраиваться в S<sub>4</sub>-гидрофобный карман фермента. Уже через 2 сут содержание целевых пептидов превышало 80%, а через 6 сут – 90%. *n*-Нитроанилиды Z-Ala-Ala-Leu-Leu-pNA и Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA были синтезированы препаративно с выходом 90%. Необходимо отметить, что для выделения образующихся продуктов потребовалось лишь осаждение их водой из реакционной смеси.

С тем чтобы оценить влияние количества субтилизина на протекание реакции в ацетонитриле, мы провели синтез амида и *n*-нитроанилидов трипептидов – Z-Ala-Ala-Leu-pNA, Z-Ala-Ala-Phe-pNA и Z-Ala-Ala-Phe-NH<sub>2</sub> с высококонцентрированной суспензией фермента (табл. 2). Под высококонцентрированной суспензией мы понимаем пробу фермента, полученную путем добавления навески лиофильно высушенного субтилизина непосредственно в органический растворитель без центрифугирования. Концентрация исходных веществ в синтезах *n*-нитроанилидов составила 50 мМ, а в синтезе амида – 67 мМ, отношение [S]/[E] – 10<sup>3</sup> : 1 (на три порядка выше, чем в синтезах с низкоконцентрированной суспензией фермента). Возрастание содержания фермента привело к значительному ускорению реакции: очевидно, что в реакции участвует только по-

верхностный слой фермента, и поэтому для ее ускорения необходимо большее количество фермента. Так, выход Z-Ala-Ala-Leu-pNA уже через 7 ч составил 70%, тогда как при использовании низкоконцентрированной суспензии субтилизина такой выход достигался только через 3 сут. Однако в этих условиях наблюдалось образование наряду с основным побочного продукта, содержащего два остатка лейцина, -Z-Ala-Ala-Leu-Leu-pNA (схема 2).



**Схема 2**

Согласно данным ВЭЖХ, через 5 сут содержание в реакционной смеси основного продукта – Z-Ala-Ala-Leu-pNA составило 77%, а Z-Ala-Ala-Leu-Leu-pNA – 13%, при этом Z-Ala-Ala-Leu-OCH<sub>3</sub> израсходовался полностью. Увеличение количества фермента в пробе в 6 раз приводило через 4.5 сут к увеличению выхода побочного продукта – Z-Ala-Ala-Leu-Leu-pNA – с 13 до 35%. В ходе синтеза Z-Ala-Ala-Phe-pNA и Z-Ala-Ala-Phe-NH<sub>2</sub> были также обнаружены продукты повторного присо-

единения *l*-нитроанилида или амида фенилаланина (табл. 2).

Выход продукта повторного присоединения нуклеофила в проведенных синтезах уменьшался в ряду  $Z\text{-Ala-Ala-Phe-Phe-NH}_2 > Z\text{-Ala-Ala-Phe-Phe-pNA} > Z\text{-Ala-Ala-Leu-Leu-pNA}$  (табл. 2). Необходимо отметить, что в синтезе  $Z\text{-Ala-Ala-Phe-pNA}$  и  $Z\text{-Ala-Ala-Phe-NH}_2$  ([S]/[E] 1000 : 1) в процессе реакции выпадали осадки, которые могли захватывать фермент и препятствовать дальнейшему ходу реакции. Действительно, результаты аминокислотного анализа осадков свидетельствовали о наличии в них фермента, причем молярное отношение пептид – белок составляло примерно 1000 : 1, что указывало на почти полное осаждение субтилизина.

Таким образом, показано, что низкоконцентрированная суспензия субтилизина в ацетонитриле способна катализировать синтез три- и тетрапептидов с достаточно высокими выходами. При этом содержание фермента в реакционной среде на 2–3 порядка ниже, чем при использовании ферментов, сорбированных на носителе [1–5]. Возрастающие отношения молярных концентраций субстрата к ферменту до  $10^3 : 1$  (высококонцентрированная суспензия) сопровождается образованием наряду с целевыми пептидами продуктов повторного присоединения.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы субтилизин 72, выделенный в лаборатории [16, 17], ацетонитрил и тетрагидрофуран для ВЭЖХ ос. ч. (“Лекбиофарм”, Россия), содержащие не более 0.01 и 0.005% воды соответственно, диоксан, абсолютированный по методу [18]. Хромогенный субстрат  $Z\text{-Ala-Ala-Leu-pNA}$  был получен по методу [19]. Анализ пептидов осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Altex Model 110A (США) на колонке  $C_8$  (4 × 250 мм). Элюцию проводили в линейном градиенте концентрации ацетонитрила в воде, содержащей 0.1% трифторуксусной кислоты, от 20 до 70%. Скорость элюции 1 мл/мин, время элюции 25 мин, детекция – 220 и 280 нм. При расчете состава реакционной смеси не делали поправку на различие молярных коэффициентов поглощения компонентов. После кислотного гидролиза в стандартных условиях (5.7 М HCl, 105°C, 48 ч) гидролизаты анализировали на аминокислотном автоматическом анализаторе Hitachi-835 (Япония). Поглощение исследуемых растворов измеряли на спектрофотометрах Specord UV VIS (Германия), Shimadzu (Япония), Ultrospec III (Швеция).

**Растворение субтилизина.** К 1.2 мг субтилизина добавляли 1 мл соответствующего органического растворителя и перемешивали полученные

суспензии на магнитной мешалке в течение 14 ч, затем центрифугировали 10 мин на центрифуге (Eppendorf, Германия) при 16 000g, отделяли супернатанты, снимали их УФ-спектры и определяли  $A_{280}$ . Суспензию субтилизина в ацетонитриле дополнительно центрифугировали 20 мин при 4°C на центрифуге Yanetzki K23 (Польша) при 10 000g.

**Определение активности субтилизина.** К 0.5 мл раствора  $Z\text{-Ala-Ala-Leu-pNA}$  в DMF (концентрация 0.5 мг/мл), термостатированного при 37°C, добавляли 2 мл 50 мМ трис-HCl-буфера, pH 8.2, затем вносили 50 или 100 мкл супернатанта раствора фермента в органическом растворителе, инкубировали раствор при 37°C до пожелтения, останавливали реакцию прибавлением 1 мл 1 М лимонной кислоты и определяли  $A_{410}$ . В контрольных пробах порядок добавления фермента и лимонной кислоты был обратным. Удельную активность рассчитывали по формуле

$$\text{удельная активность} = (A_{410} - A_{410}^k) V^{np} / (A_{280} t V^f 8.2),$$

где  $A_{410}$  – поглощение раствора при 410 нм;  $A_{280}$  – поглощение супернатанта фермента при 280 нм;  $A_{410}^k$  – поглощение контрольного раствора;  $V^{np}$  – объем пробы, мл;  $t$  – время реакции, мин;  $V^f$  – объем пробы фермента, мл; 8.2 – молярный коэффициент поглощения субстрата ( $\text{мкМ}^{-1} \text{см}^{-1}$ ).

### *Синтезы с низкоконцентрированной суспензией субтилизина в ацетонитриле*

**Приготовление низкоконцентрированной суспензии субтилизина в ацетонитриле.** К 1 мг субтилизина добавляли 2 мл ацетонитрила, суспензию перемешивали 10 мин, центрифугировали 5 мин при 16 000g на центрифуге Eppendorf, отделяли супернатант от осадка и определяли величину  $A_{280}$  для супернатанта.

**$Z\text{-Ala-Ala-Leu-pNA}$ .** К смеси 100 мкл 0.1 М раствора  $H\text{-Leu-pNA}$  в ацетонитриле и 100 мкл 0.1 М раствора  $Z\text{-Ala-Ala-OCH}_3$  в ацетонитриле, содержащем 8% DMF, добавляли 100 мкл низкоконцентрированной суспензии субтилизина в ацетонитриле. Реакционную смесь перемешивали при 20°C, отбирая 10 мкл пробы для ВЭЖХ.

**Препаративный синтез  $Z\text{-Ala-Ala-Leu-pNA}$ .** К смеси 1 мл 0.1 М раствора  $H\text{-Leu-pNA}$  в ацетонитриле и 1 мл 0.1 М раствора  $Z\text{-Ala-Ala-OCH}_3$  в ацетонитриле, содержащем 8% DMF, добавляли 1 мл низкоконцентрированной суспензии субтилизина в ацетонитриле ( $A_{280}$  0.27). Реакционную смесь перемешивали 7 сут при 20°C. Упаривали на ротонном испарителе, маслообразный остаток растворяли в 10 мл этилацетата, промывали 0.1 М HCl (3 × 2 мл) и водой (3 × 2 мл). Этилацетатный раствор суши-

ли над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривали и сушили в вакуумном эксикаторе над  $\text{NaOH}$ . Выход 36 мг (70%).

**Z-Ala-Ala-Leu-Leu-pNA.** К 5 мг (11 мкмоль) Z-Ala-Ala-Leu-OCH<sub>3</sub> и 3 мг (11 мкмоль) H-Leu-pNA добавляли 200 мкл DMF, 500 мкл низкоконцентрированной суспензии субтилизина в ацетонитриле ( $A_{280}$  0.09). Реакционную смесь перемешивали при 20°C.

**Препаративный синтез Z-Ala-Ala-Leu-Leu-pNA.** К смеси 23 мг (55 мкмоль) Z-Ala-Ala-Leu-OCH<sub>3</sub> и 14 мг (55 мкмоль) H-Leu-pNA добавляли 1 мл DMF, 3.5 мл низкоконцентрированной суспензии субтилизина в ацетонитриле ( $A_{280}$  0.19). Реакционную смесь перемешивали 5 сут при 20°C. Упаривали на роторном испарителе, к образовавшемуся осадку добавляли 1 мл DMF и осаждали осадок 1 мл воды. Осадок промывали водой (3 × 1 мл) и сушили в вакуумном эксикаторе над  $\text{KOH}$ . Выход 30 мг (90%).

Синтез **Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA** проводили аналогично, добавляя низкоконцентрированную суспензию субтилизина в ацетонитриле с  $A_{280}$  0.15 и перемешивая реакционную смесь при 20°C. Препаративный выход 30 мг (90%).

**Z-Ala-Ala-Phe-Leu-pNA** получали аналогично, добавляя низкоконцентрированную суспензию субтилизина в ацетонитриле с  $A_{280}$  0.15 и перемешивая реакционную смесь 6 сут при 20°C. Через 2 сут в реакционной смеси наблюдали образование осадка. В отдельном опыте реакционную смесь через 5 сут центрифугировали, отделяли осадок от супернатанта, промывали осадок 0.1 М  $\text{HCl}$  (3 × 200 мкл), водой (3 × 200 мкл), 3% раствором  $\text{NaHCO}_3$  (3 × 200 мкл), водой (3 × 200 мкл) и сушили в вакуумном эксикаторе над  $\text{NaOH}$ .

**Z-Ala-Ala-Phe-Phe-pNA** получали как описано для Z-Ala-Ala-Phe-Leu-pNA.

*Синтезы с высококонцентрированной суспензией субтилизина в ацетонитриле*

**Конденсация Z-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub> и H-Leu-pNA.** К смеси 500 мкл 0.1 М раствора H-Leu-pNA в ацетонитриле и 500 мкл 0.1 М раствора Z-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub> в ацетонитриле, содержащем 8% DMF, добавляли 0.5 мг (или 3 мг) субтилизина и перемешивали 14 сут при 20°C. Через 5 сут пик с временем удерживания 27 мин собирали, упаривали и проводили аминокислотный анализ.

**Конденсацию Z-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub> и H-Phe-pNA** осуществляли аналогично.

**Конденсация Z-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub> и H-Phe-NH<sub>2</sub>.** К 15 мг (50 мкмоль) Z-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub> и 8 мг (50 мкмоль) H-Phe-NH<sub>2</sub> добавляли 250 мкл DMF, 500 мкл ацетонитрила, 0.5 или 1.2 мг субтилизина.

Реакционную смесь перемешивали 2 сут при 20°C. Через 12 ч наблюдали выпадение осадка. Через 2 сут к реакционной смеси добавляли 1 мл DMF и из образовавшегося раствора отбирали пробу для ВЭЖХ. Пик с временем удерживания 21 мин собирали, упаривали и проводили аминокислотный анализ.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 97-03-33039а) и грантом № 03.0003Н-333 ГНТП "Новейшие методы биоинженерии".

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Terent'eva E.Yu., Voyushina T.L., Stepanov V.M. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1995. V. 5. P. 2523-2526.
2. Юсупова М.П., Новгородова С.А., Степанов В.М. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 523-527.
3. Юсупова М.П., Новгородова С.А., Степанов В.М. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 589-595.
4. Voyushina T.L., Terent'eva E.Yu., Stepanov V.M. // Biomed. Biochim. Acta. 1991. V. 50. P. 209-212.
5. Stepanov V.M., Voyushina T.L., Terent'eva E.Yu., Gololobov M.Yu. // Bioorg. Med. Chem. 1995. V. 3. P. 479-485.
6. Wescott C.R., Klivanov A.M. // Biochim. Biophys. Acta. 1994. V. 1206. P. 1-9.
7. Narayan V.S., Klivanov A.M. // Biotechnol. Bioeng. 1993. V. 41. P. 390-393.
8. Dordick J.S. // Enzyme Microb. Technol. 1989. V. 11. P. 194-211.
9. Yennavar N.H., Yennavar H.P., Farber G.K. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 7326-7336.
10. Wangikar P.P., Graycar T.P., Estell D.A., Clark D.S., Dordick J.S. // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 12231-12237.
11. Russell A.J., Klivanov A.M. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 11624-11626.
12. Sasaki T., Kise H. // Biosci. Biotech. Biochem. 1994. V. 58. P. 1050-1053.
13. Chatterjee S., Russell A.J. // Enzyme Microb. Technol. 1993. V. 15. P. 1022-1029.
14. Khmelnsky Yu.L., Welch S.H., Clark D.S., Dordick J.S. // J. Am. Chem. Soc. 1994. V. 116. P. 2647-2648.
15. Chen S.-T., Chen S.-Y., Chen-Chen T., Chiou S.-H., Wang K.-T. // J. Prot. Chem. 1995. V. 14. P. 205-215.
16. Акпаров В.Х., Белянова Л.П., Баратова Л.А., Степанов В.М. // Биохимия. 1979. Т. 44. С. 886-890.
17. Гололобов М.Ю., Морозова И.П., Степанов В.М. // Биохимия. 1990. Т. 56. С. 33-40.
18. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. Пер. с англ. М.: Мир, 1976.
19. Люблинская Л.А., Вокушина Т.Л., Степанов В.М. // Биоорганическая химия. 1982. Т. 8. С. 1620-1624.

## The Synthesis of Tri- and Tetrapeptides Catalyzed by Subtilisin Suspensions in Organic Solvents

I. V. Getun, I. Yu. Filippova, E. N. Lysogorskaya, S. V. Kolobanova, E. S. Oksenoit, V. V. Anisimova, and V. M. Stepanov

*Department of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia*

The behavior of subtilisin 72 in some aprotic solvents (acetonitrile, dioxane, and tetrahydrofurane) was studied. The enzyme was shown to be partially soluble in tetrahydrofurane, but it is rendered profoundly inactive in this solution. In acetonitrile and dioxane, subtilisin formed dilute suspensions whose activities were measured after dilution with water. Under these conditions, subtilisin suspended in acetonitrile manifested an activity that was an order of magnitude higher than that of its dioxane suspension, and this activity continued for a long time. Z-Ala-Ala-Leu-pNA was synthesized from Z-Ala-Ala-OCH<sub>3</sub> and Leu-pNA under the catalysis by dilute suspension of subtilisin in acetonitrile. *p*-Nitroanilides of tetrapeptides, Z-Ala-Ala-P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'-pNA, where P<sub>1</sub> and P<sub>1</sub>' were either Leu or Phe, were similarly synthesized in acetonitrile under catalysis by dilute subtilisin suspension at [S] : [E] = 10<sup>5</sup> : 1. *p*-Nitroanilides of tripeptides, Z-Ala-Ala-Leu-pNA, Z-Ala-Ala-Phe-pNA, and Z-Ala-Ala-Phe-NH<sub>2</sub>, were also synthesized in the presence of a concentrated subtilisin suspension at [S] : [E] = 10<sup>3</sup> : 1. It was shown that the increase in enzyme concentration resulted in the double coupling of nucleophile, and Z-Ala-Ala-Leu-Leu-pNA, Z-Ala-Ala-Phe-Phe-pNA, and Z-Ala-Ala-Phe-Phe-NH<sub>2</sub> were obtained with 13, 33, and 40% yields, respectively. Therefore, such reaction systems can be used for creating long hydrophobic peptides whose synthesis in water-organic mixtures is difficult due to the poor solubility of starting components in aqueous buffer solutions.

*Key words: enzymic synthesis, peptide synthesis, subtilisin*