



УДК 577.112.6:577.152.4'135

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ В ПЕПТИДНОМ СИНТЕЗЕ В ОРГАНИЧЕСКОЙ СРЕДЕ

© 2003 г. И. Ю. Филиппова[#], Е. Н. Лысогорская*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119992, Москва, В-234, Воробьевы горы*

Поступила в редакцию 31.10.2002 г. Принята к печати 06.12.2002 г.

Показано, что модифицированные протеиназы в полярных органических растворителях способны катализировать синтез широкого круга пептидов различной длины и структуры как в растворе, так и на твердой фазе. В качестве биокатализаторов, пригодных для проведения ферментативного пептидного синтеза в полярных органических растворителях (ацетонитриле, диметилформамиде, этаноле), рассмотрены модифицированные протеиназы – пепсин, сорбированный на целите, субтилизин в форме нековалентного комплекса с додецилсульфатом натрия, а также субтилизин и термоллизин, ковалентно иммобилизованные на криогеле поливинилового спирта. Особенно перспективно использование субтилизина в форме нековалентного комплекса с додецилсульфатом натрия и иммобилизованного субтилизина для проведения сегментной конденсации между пептидными компонентами, содержащими остатки трифункциональных аминокислот (Lys, Arg, His, Glu, Asp) с незащищенными ионогенными группами в боковой цепи.

Ключевые слова: ферментативный пептидный синтез; органические растворители, пепсин; субтилизин; термоллизин.

ВВЕДЕНИЕ

Протеиназы широко распространены в природе и играют важную роль в процессах жизнедеятельности. Использование протеиназ для практических целей основано, главным образом, на их способности катализировать реакции протеолиза – гидролитического расщепления пептидных связей. Эта функция протеолитических ферментов к настоящему времени исследована глубоко и всесторонне. Гораздо менее изучена их способность катализировать реакции образования пептидных связей, которая отмечена, между тем, для целого ряда протеиназ различных классов [1–3]. Очевидно, что исследование синтазных свойств протеолитических ферментов может представлять большой интерес с точки зрения расширения традиционных представлений о протеиназах как гидролазах. С другой стороны, способность протеиназ катализировать реакции образования пептидных связей представляет принципиальный интерес для разработки новых методов ферментативного синтеза.

Одним из перспективных подходов для исследования протеиназ как синтаз *in vitro* является изучение их ферментативных свойств в реакциях образования пептидных связей в органических

растворителях. Использование органических растворителей как среды для проведения ферментативного пептидного синтеза позволяет существенно сдвинуть термодинамическое равновесие реакций в сторону образования продукта и минимизировать нежелательные побочные реакции вторичного гидролиза целевых соединений. Наиболее подходящими для осуществления реакций ферментативного пептидного синтеза служат полярные органические растворители, так как большинство аминокислот, их производных и пептидов не растворяется в неполярных средах. Между тем, именно полярные органические растворители оказывают наибольшее инактивирующее влияние на ферменты, лишая их необходимой для осуществления каталитических функций гидратной оболочки. Исходя из этого, задача данной работы – исследование синтазной активности протеиназ различных классов в зависимости от метода модификации ферментов, а следовательно, и их способности адаптации к условиям функционирования в полярных органических средах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве объектов исследования были выбраны различные по своему каталитическому механизму протеолитические ферменты: аспартильная протеиназа – пепсин (КФ 3.4.23.1), металлопротеиназа – термоллизин (КФ 3.4.24.4) и сериновая

Сокращения: Dnp – 2,4-динитрофенил; MeCN – ацетонитрил; все аминокислоты – L-ряда.

[#] Автор для переписки (эл. почта: irfilipp@genebee.msu.su; тел.: (095) 939-5529).

протеиназа – субтилизин (КФ 3.4.21.14). Пепсин и термолизин осуществляют общий основной катализ, при котором субстрат образует промежуточное тетраэдрическое соединение, не связанное ковалентно с ферментом. Обе эти протеиназы

могут участвовать только в термодинамически контролируемом синтезе пептидной связи (схема 1, уравнение (1)) [4]. Роль фермента в этом случае сводится лишь к ускорению достижения равновесия реакции синтез–гидролиз.

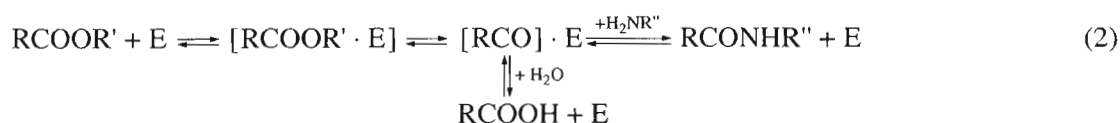


Схема 1. Образование пептидной связи, катализируемое протеиназами: (1) – термодинамически контролируемый синтез; (2) – кинетически контролируемый синтез.

Субтилизин – типичный представитель протеиназ, катализ которыми протекает с образованием промежуточного ковалентного соединения фермента с ацильным фрагментом субстрата – т. н. ацилфермента; при этом в качестве нуклеофила выступает функциональная группа активного центра (схема 1, уравнение (2)). Субтилизин может катализировать синтез пептидов как по термодинамически, так и по кинетически контролируемому пути (схема 1, соответственно уравнения (1) и (2)) [4].

Для стабилизации ферментов в неводных системах применяли известные приемы ковалентной и нековалентной модификации. В случае пепсина использовали его осаждение на поверхности инертного неорганического носителя [5]. Субтилизин и термолизин были модифицированы путем ковалентной иммобилизации на криогеле поливинилового спирта [6]. Помимо этого, субтилизин также был исследован в форме растворимого в органической среде нековалентного гидрофобного ионного комплекса с SDS [7].

Ниже более подробно рассмотрены особенности поведения модифицированных протеиназ в реакциях пептидного синтеза в различных органических средах.

Пепсин как катализатор синтеза пептидов в органической среде

Для адаптации фермента к функционированию в органических растворителях пепсин в виде раствора в 25 мМ цитратном буфере (pH 4.5) осаждали на пористом инертном неорганическом носителе и высушивали до постоянной массы [5]. В качестве носителей пепсина использовали силохром С-80, аминсилохром, макропористое стекло и целит.

Для оценки синтазной активности пепсина была выбрана реакция образования гексапептида Z-Ala-Ala-Phe-Leu-Ala-Ala-OMe (I) из двух трипептидов Z-Ala-Ala-Phe-OH и H-Leu-Ala-Ala-OMe по

схеме 2. Структура и длина исходных фрагментов соответствовали специфичности пепсина, что обеспечивало хорошее связывание с активным центром фермента.

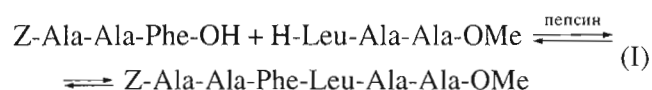


Схема 2. Синтез модельного гексапептида (I), катализируемый пепсином, осажденным на целите, в органической среде.

Синтез проводили в MeCN, хлористом метиле, этаноле, этилацетате. Оптимальным оказалось использование фермента, осажденного на целите, в MeCN ([S]/[E] 10³ : 1). Реагирующие пептиды, содержащие заряженные группы и имеющие меньшую длину по сравнению с продуктом реакции, лучше растворимы в воде и поэтому концентрируются в водной “микрофазе”, непосредственно контактирующей с ферментом [8]. Таким образом, повышается локальная концентрация реагирующих веществ вблизи активного центра фермента, и, следовательно, реакция синтеза протекает более эффективно по сравнению с водно-органической средой. Так, например, гексапептид (I) при проведении синтеза в MeCN был получен с выходом 90%, в то время как в 1 М ацетатном буфере (pH 4.6), содержащем 20% (об.) DMF, выход этого соединения не превышал 60%.

Как было показано в специальном опыте, прочного связывания фермента ни с одним из носителей не наблюдалось – белок легко смывался уже при суспендировании катализатора в 1 М ацетатном буфере, pH 3.5. Однако в условиях реакции пепсин удерживался носителем, будучи нерастворимым в органической фазе. Такая фиксация фермента на носителе за счет осаждения его на поверхности позволяла использовать одну и ту же порцию пепсина, осажденного на целите, в четырех циклах синтеза гексапептида Z-Ala-Ala-Phe-Leu-Ala-Ala-OMe в ацетонитриле. Выход продукта несколько снижался от цикла к циклу и составлял соответственно 90, 86, 80 и 71%. Сни-

жение выхода продукта синтеза можно объяснить частичной инактивацией фермента органическим растворителем и, кроме того, постепенным переходом воды в органическую фазу.

Эффективность пепсина как катализатора реакций сегментной конденсации в органических средах была продемонстрирована на примере синтеза (с выходом 70–90%) различных тетра-, пента-, гекса-, окта- и декапептидов, содержащих в положении P_1 остатки Phe, Tyr, Trp, а в позиции P'_1 – остатки Phe, Tyr, Trp, Leu, Phe(NO)₂.

Специфичность пепсина, катализирующего синтез пептидов в органических растворителях, в данной серии опытов качественно не изменялась. Остаток Trp в положении P'_1 хорошо связывался с активным центром фермента, что обеспечивало достаточную скорость синтеза (24 ч) и хороший выход Z-Ala-Ala-Phe*Trp-Ala-Ala-OMe* (90%). Введение Trp в положение P_1 менее соответствовало специфичности пепсина (соединение Z-Ala-Ala-Trp*Leu-Ala-Ala-OMe и Z-Ala-Ala-Trp*Phe-Ala-Ala-OMe; выход 20 и 50% соответственно за 24 ч), что согласовывалось с данными по специфичности гидролиза связей в белковых субстратах [9, 10]. Образование связей между Tyr и Phe (Leu) или Phe (Leu)–Tyr протекало с меньшими выходами (50–60%) (соединения Z-Ala-Ala-Phe*Tyr-Ala-Ala-OMe, Z-Ala-Ala-Tyr*Leu-Ala-Ala-OMe, Z-Ala-Ala-Tyr*Phe-Ala-Ala-OMe). Однако значительное увеличение времени реакции до 72 ч позволило достичь равновесного состояния и повысить выход описанных соединений до 85–90%. Оказалось возможным введение в положение P'_1 остатка Phe(NO₂) (соединение Z-Ala-Ala-Phe*Phe(NO)₂-OMe, выход 70%). Возможность эффективного проведения реакции конденсации для более длинных гидрофобных пептидов была показана на примере синтеза пептидов Z-Ala-Ala-Phe*Trp-Ala-Leu-Ala-Phe-OMe (выход 80%), Boc-Trp-Ala-Leu-Ala-Phe*Leu-Ala-Ala-OMe (выход 80%), Boc-Trp-Ala-Leu-Ala-Phe*Trp-Ala-Leu-Ala-Phe-OMe (выход 70%).

Таким образом, в результате проведенных экспериментов впервые было установлено, что пепсин, сорбированный на поверхности неорганических носителей, проявляет высокую каталитическую активность в органических растворителях и является эффективным катализатором синтеза гидрофобных гекса- и октапептидов, получение которых в водно-органических средах затруднено или невозможно.

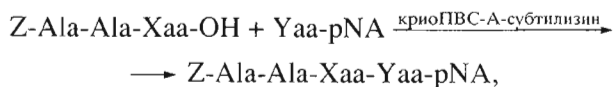
Синтазная активность субтилизина и термолизина, ковалентно иммобилизованных на криогеле поливинилового спирта

Одним из способов адаптации ферментов к функционированию в органической среде является их ковалентная иммобилизация на твердом носителе. В качестве матрицы для иммобилизации субтилизина и термолизина был использован криогель поливинилового спирта (ПВС) – сверхмакропористый носитель, получаемый при замораживании–оттаивании водного раствора поливинилового спирта [11]. Криогели характеризуются высокой гидрофильностью, что позволяет им удерживать воду внутри полимерной подложки, даже находясь в безводной среде полярных органических растворителей.

Были получены препараты иммобилизованного субтилизина на производных криогеля, содержащих реакционноспособные альдегидные (криоПВС-А), эпоксидные (криоПВС-Э) [6] или винилсульфоновые (криоПВС-ВС) группы. Содержание субтилизина на носителе зависело от способа иммобилизации и составляло от 0.1 (для криоПВС-Э) до 13.7 (для криоПВС-А) мг белка на 1 г носителя. Термолизин ковалентно присоединяли только к альдегидсодержащему носителю [6], содержание фермента на носителе составило 3.5 мг/г.

Препараты иммобилизованных катализаторов отличались высокой стабильностью в ряде полярных органических растворителей. Так, например, в смеси DMF/MeCN = 90/10 (об. %) иммобилизованный субтилизин за двое суток сохранял 60% исходной активности, в то время как нативный субтилизин, суспендированный в такой же смеси органических растворителей, за это время практически полностью инактивировался. Чрезвычайно высокую стабильность проявлял препарат иммобилизованного термолизина. Спустя 1 год хранения в MeCN биокатализатор сохранил 65% исходной активности.

Синтазная активность субтилизина, иммобилизованного на криогеле ПВС с использованием глутарового альдегида, была продемонстрирована в смесях DMF/MeCN с содержанием DMF от 60 до 95% на примере получения с выходами 90–98% N-ацилированных тетрапептидов общей формулы Z-Ala-Ala-Xaa-Yaa-pNA (Xaa = Leu, Lys, Glu; Yaa = Phe, Asp) (схема 3) [6, 12].



где Xaa = Leu, Lys, Glu; Yaa = Phe, Asp.

Схема 3.

Для осуществления ферментативной реакции не требовались активация карбоксильной компоненты и защита боковых радикалов ионогенных аминокислот.

* Звездочкой отмечена образуемая связь.

Синтазная активность иммобилизованного термолизина была изучена в среде DMF/MeCN = 25/75 (об. %) на примере реакции, представленной на схеме 4:

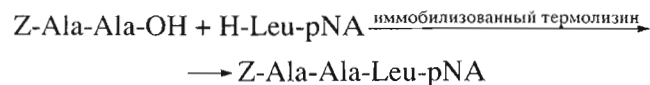


Схема 4.

При эквимольном соотношении amino- и карбоксильного компонентов и соотношении $[E]/[S] = 1 : 750$ выход продукта составил 90% за 1 ч. После двукратного использования в синтезе и 6-ти месяцев хранения в буфере (pH 7.8) иммобилизованный термолизин катализировал синтез Z-Ala-Ala-Leu-pNA в органических растворителях с выходом 80%. Эти данные свидетельствуют о высокой эффективности иммобилизованного термолизина как катализатора синтеза пептидов в органической среде.

SDS-субтилизин в реакциях пептидного синтеза в органической среде

Более удобными для проведения ферментативных реакций в органической среде служат гомогенные системы, в которых фермент находится в растворенном состоянии.

Одним из подходов для сольюбилизации фермента в органической среде является получение комплекса фермента с анионным детергентом, например, додецилсульфатом натрия (SDS) при концентрациях детергента ниже его критической концентрации мицеллообразования. За счет образования так называемых гидрофобных ионных пар между заряженными группами на поверхности фермента и молекулами поверхностно-активного вещества происходит гидрофобизация поверхности белка, в результате чего ферменты приобретают способность растворяться в органических растворителях [13].

Нами был получен комплекс субтилизина с SDS и проведено детальное изучение синтетических возможностей SDS-субтилизина, катализирующего разнообразные реакции образования пептидной связи в этаноле и изопропанолe [14].

Изучение синтазной активности субтилизина показало, что он является весьма эффективным катализатором образования пептидной связи [14, 15].

С высокими выходами (до 98%) были получены Z-защищенные амиды и *n*-нитроанилиды тетра- и пентапептидов, содержащих в P_1 - и P'_1 -положениях остатки гидрофобных аминокислот – Gly, Ala, Leu, Met, Phe, Phe(NO₂), Trp и Tyr. Ацилирующие компоненты, в P_1 -положения которых были введены остатки *D*-Leu, Pro и β-разветвленного Ile, не вступали в реакцию. Под действием SDS-субтилизина была получена также серия три-, тетра- и гексапептидов, содержащих одновременно *N*- и *C*-концевые хромогенные и флуорогенные группы – *o*-аминобензоильную, *n*-нитроанилидную, *n*-нитробензиламидную или остаток 2,4-динитрофенилэтилендиаминa.

Высокий биосинтетический потенциал SDS-субтилизина позволил разработать метод ферментативной конденсации пептидов, закрепленных на твердом носителе [16]. Этот способ позволяет объединить достоинства методологии химического твердофазного пептидного синтеза с преимуществами ферментативного образования пептидных связей. Нами продемонстрирована принципиальная возможность такого подхода на примере ферментативного наращивания пептидной цепи, связанной с аминсилохромом, по схеме (3 + 3 + 3) за счет последовательного присоединения на каждой стадии пептидных блоков строения A-Ala-Ala-Xaa-OMe (A = Z, Boc, Dnp; Xaa = Leu, Glu(OMe)).

Особенности поведения протеиназ в органических растворителях (на примере субтилизина)

Основываясь на результатах тестирования модифицированного различным образом субтилизина как катализатора синтеза пептидов в органической среде, нам удалось выявить некоторые особенности его поведения по сравнению с нативным ферментом.

На примере реакции получения Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA из Z-Ala-Ala-Leu-OMe и Phe-pNA (схема 5) изучали влияние содержания DMF в среде и структуры ацилирующего компонента на синтазную активность нативного и ковалентно и нековалентно модифицированного субтилизина.

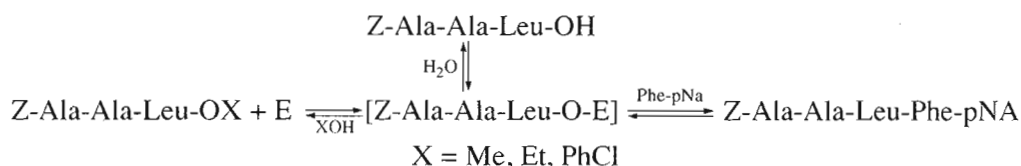


Схема 5.

Было установлено, что в 60% DMF кривые накопления продукта синтеза, катализируемого как нативным субтилизином, так и субтилизином, иммобилизованным на криогеле ПВС с помощью глутарового альдегида (криоПВС-А), мало различались. За 3 ч выход Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA достигал максимальных значений (90%) и затем практически не изменялся. При увеличении содержания DMF до 95% картина была иной. При проведении реакции под действием нативного субтилизина выход целевого продукта уменьшался примерно в три раза, и уже через 3–5 ч синтез останавливался из-за потери ферментом каталитической активности [17]. Под действием криоПВС-А-субтилизина даже после 72 ч в 95% DMF синтез не прекращался, и выход целевого пептида составил 75% [6].

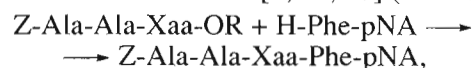
В среде EtOH/DMF синтез пептида Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA проводили под действием SDS-субтилизина ([S]/[E] 5000 : 1), исходя из Z-Ala-Ala-Leu-OR (R = H, Me или PhCl) и Phe-pNA [15]. Во всех случаях уже за 2 ч достигались практически количественные выходы, и заметного влияния активации карбоксильной группы ацилирующего компонента на скорость образования продукта не прослеживалось. Видимо, во всех случаях первой и наиболее быстрой стадией реакции являлась (пере)этерификация ацилирующего компонента этанолом из-за его большого избытка в системе. Действительно, анализ состава реакционных смесей за более короткие времена реакции показал наличие в реакционной смеси, наряду с исходным ацилирующим компонентом, и его этилового эфира.

В смеси 60% DMF/MeCN синтез пептида Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA проводили под действием субтилизина, иммобилизованного на криогеле ПВС с помощью глутарового альдегида. За 30 мин выход продукта составил 60% в случае Z-Ala-Ala-Leu-OMe и 24% при использовании Z-Ala-Ala-Leu-OH. За 2 ч разница в выходах сократилась до 10%, а через 3 ч, независимо от структуры ацилирующего компонента, выход продукта был практически одинаковым.

Таким образом, проведение реакций образования пептидной связи в органических средах с использованием модифицированных субтилизинов дает возможность практически с одинаковой эффективностью использовать в качестве ацилирующих компонентов как эфиры N-защищенных пептидов, так и их аналоги со свободными карбоксильными группами. По-видимому, такое протекание реакции обусловлено тем, что в системах с низким содержанием воды ацилирующий компонент оказывается незаряженным и эффективно взаимодействует с активным центром фермента. В случае проведения ферментативного пептидного синтеза в среде, содержащей этанол, одинаковая эффективность SDS-субтилизина по отношению к ацилирующим компонентам с защищен-

ными и свободными карбоксильными группами, вероятно, связана с наличием в реакционной смеси большого избытка дополнительного нуклеофила – этанола, и протеканием реакции этерификации. Очевидно, что для более полного понимания происходящих процессов требуется проведение кинетических исследований.

Отмеченная особенность катализа субтилизином реакций образования пептидной связи в органических средах с минимальным содержанием воды была продемонстрирована на примере синтеза N-ацилированных тетрапептидов, содержащих в P₁-положении незащищенные основные и кислые аминокислотные остатки [6, 12, 15] (схема 6).



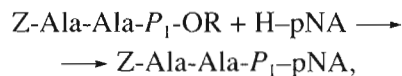
где Xaa = Lys, Arg, His, Glu или Asp; R = H или Me.

Схема 6.

В соответствии с литературными данными по специфичности субтилизина, трипептиды, содержащие остатки Arg или Lys на C-конце (в P₁-положении), оказались весьма эффективными ацилирующими компонентами. Выход продуктов достигал 70% уже через 2 ч при использовании как активированных, так и неактивированных ацилирующих компонентов. В случае пептида Z-Ala-Ala-His-Phe-pNA реакция протекала несколько медленнее.

При введении в P₁-положение остатка Glu выход продукта за 6 ч составил 84% и, как следовало из масс-спектральных данных, в ходе синтеза наблюдалось образование единственного продукта, в котором γ-карбоксильная группа Glu не была этерифицирована. Эффективными оказались как диметилловый эфир трипептида Z-Ala-Ala-Glu(OMe)-OMe, так и его аналог со свободными α- и γ-карбоксильными группами, одинаково быстро вступающие в реакцию с H-Phe-pNA. Замена Glu на Asp приводила к снижению выхода.

Под действием субтилизина (в форме комплекса с SDS и ковалентно иммобилизованного на криогеле ПВС с помощью глутарового альдегида) в органической среде удалось провести пептидный синтез между фрагментами, содержащими одновременно полифункциональные аминокислотные остатки без защиты боковых ионогенных групп как в P₁-, так и в P₁'-положениях [6, 15] (схема 7).



где P₁ = Arg, Lys, Glu; P₁' = Arg, Glu, Asp;

R = H или Me.

Схема 7.

Данные по синтезу таких производных представлены в таблице. В гидролитических реакциях возможность расщепления субтилизином связей между разноименно заряженными полифункциона-

Синтез *n*-нитроанилидов тетрапептидов, содержащих остатки Arg, Lys, Glu и Asp в P_1 - и P_1' -положениях, катализируемый иммобилизованным на криоПВС-субтилизином (опыты 1, 2)* и SDS-субтилизином (опыты 3–6)**

Номер опыта	Ацилирующий компонент	Аминокислотный компонент	Продукт	Время, ч	Выход, %
1	Z-Ala-Ala-Lys-OH	Asp-pNA	Z-Ala-Ala-Lys-Asp-pNA	2	98
2	Z-Ala-Ala-Glu-OH	Asp-pNA	Z-Ala-Ala-Glu-Asp-pNA	4	74
3	Z-Ala-Ala-Glu-OH	Arg-pNA	Z-Ala-Ala-Glu-Arg-pNA	24	52
4	»	»	»	120	92
5	Z-Ala-Ala-Lys-OH	Glu-pNA	Z-Ala-Ala-Lys-Glu-pNA	24	38
6	»	»	»	120	83

* Концентрация ацилирующего и аминокислотного компонента – 30 мМ, 80 мг биокатализатора (содержание субтилизина – 0.3 мг), DMF/MeCN 60/40 (об. %), 20°C.

** Концентрация ацилирующего и аминокислотного компонента – 31 мМ, 6 мкМ SDS-субтилизин в этаноле, 20°C.

нальными аминокислотными остатками Glu, Asp, Lys и Arg в P_1 - и P_1' -положениях не отмечалась.

Состав синтезируемых соединений подтвержден данными аминокислотного анализа, а в ряде случаев – и масс-спектральными данными.

Таким образом, полученные результаты существенно расширяют представления о функциональных возможностях протеиназ как синтаз. Известно, что эффективность ферментов как инструментов пептидного синтеза связана, главным образом, с их стерео- и региоизбирательностью. Одна из основных причин, лимитирующих использование протеиназ для синтеза пептидов различного состава, заключается в отсутствии “универсальной” пептидиллигазы с произвольной специфичностью. Поэтому для целенаправленного синтеза пептидов с заданной последовательностью необходимо наличие большого набора ферментов. Данные, полученные в ходе изучения субтилизина как катализатора образования пептидной связи, свидетельствуют о “расширении” субстратной специфичности этого фермента в органических средах. Изменяя условия введения биокатализатора и среду проведения синтеза, удается увеличить синтетический потенциал фермента, что создает предпосылки для разработки эффективных методов получения пептидов различной структуры.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 00-03-32803а и 00-04-48455).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Canova-Davis E., Lessler T.J., Ling V.T. // *Anal. Biochem.* 1991. V. 196. P. 39–45.
2. Antonov V.K., Ginodman L.M., Rumsh L.D., Kapitannikov Y.V., Barshevskaya T.N., Yavashev L.P., Gurova A.G., Volkova L.I. // *Eur. J. Biochem.* 1981. V. 117. P. 195–200.
3. Fruton J.S. // *Adv. Enz.* 1982. V. 53. P. 239–306.
4. Jakubke H.-D. // *Enzymatic Synthesis. Future Aspects in Peptide Chemistry / Eds W. Voelter, G. Fisher. Collection Symp. Series.* 1999. V. 1. P. 47–67.
5. Анисимова В.В., Лысогорская Е.Н., Филиппова И.Ю., Оксенойт Е.С., Степанов В.М. // *Биоорг. химия.* 1994. Т. 20. С. 316–322.
6. Филиппова И.Ю., Бачева А.В., Байбак О.В., Плюева Ф.М., Лысогорская Е.Н., Оксенойт Е.С., Лозинский В.И. // *Изв. АН. Сер. хим.* 2001. № 10. С. 1811–1816.
7. Getun I.V., Filippova I.Yu., Lysogorskaya E.N., Oksenoit E.S., Anisimova V.V., Kolobanova S.V., Bacheva A.V., Stepanov V.M. // *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 1997. V. 7. P. 2691–2696.
8. Cassels J.M., Halling P.J. // *Biotechnol. Bioeng.* 1989. V. 33. P. 1489–1494.
9. Зинченко А.А., Румиш Л.Д., Антонов В.К. // *Биоорг. химия.* 1976. Т. 2. С. 803–810.

10. Powers J.C., Harley A.D., Myers D.V. // Acid Proteases. Structure, Function and Biology / Ed. J. Tang. New York; London: Plenum Press, 1977. P. 141–157.
11. Лозинский В.И. // Успехи химии. 2002. Т. 71. С. 559–585.
12. Bacheva A.V., Plieva F.M., Lysogorskaya E.N., Filippova I.Yu., Lozinsky V.I. // Bioorg. & Med. Chem. Lett. 2001. V. 11. P. 1005–1008.
13. Meyer J.D., Kendrick B.S., Matsuura J.E., Ruth J.A., Bryan P.N., Manning M.C. // Int. J. Peptide Protein Res. 1996. V. 47. P. 177–181.
14. Гетун И.В., Филиппова И.Ю., Лысогорская Е.Н., Бачева А.В., Оксенойт Е.С. // Биоорг. химия. 1999. Т. 25. С. 591–596.
15. Getun I.V., Filippova I.Yu., Lysogorskaya E.N., Oksenoit E.S. // J. Mol. Catalysis. B: Enzymatic. 2001. V. 15. P. 105–110.
16. Колобанова С.В., Филиппова И.Ю., Лысогорская Е.Н., Оксенойт Е.С., Степанов В.М. // Биоорг. химия. 2001. Т. 27. С. 348–352.
17. Bacheva A.V., Filippova I.Yu., Lysogorskaya E.N., Oksenoit E.S. // J. Mol. Catalysis. B: Enzymatic. 2000. V. 11. P. 89–96.

Modified Proteases for Peptide Synthesis in Organic Media

I. Yu. Filippova[#] and E. N. Lysogorskaya

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

Faculty of Chemistry, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119992 Russia

We showed that modified proteases could catalyze synthesis of a wide variety of peptides of various lengths and structures both in solution and on solid phase in organic solvents. The following modified proteases were studied as catalysts for enzymatic peptide synthesis in polar organic solvents (acetonitrile, dimethylformamide, and ethanol): pepsin sorbed on celite, a noncovalent complex of subtilisin with sodium dodecylsulfate, and subtilisin or thermolysin covalently immobilized on a cryogel of polyvinyl alcohol. The use of the noncovalent complex of subtilisin with sodium dodecylsulfate and immobilized subtilisin is especially promising for the segment condensation of peptide fragments containing residues of trifunctional amino acids with unprotected ionogenic groups in side chains, such as Lys, Arg, His, Glu, and Asp. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: enzymatic peptide synthesis, organic solvents, pepsin, subtilisin, thermolysin