



УДК 577.112.6:577.152.34'135

НАТИВНЫЙ И МОДИФИЦИРОВАННЫЙ СУБТИЛИЗИН 72 КАК КАТАЛИЗАТОР СИНТЕЗА ПЕПТИДОВ В СРЕДАХ С НИЗКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ВОДЫ

© 2003 г. А. В. Бачева*, О. В. Байбак**, А. В. Беляева*, Е. Н. Лысогорская*,
Е. С. Оксенойт*, В. И. Лозинский**, И. Ю. Филиппова*#

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
119992, Москва, В-234, Воробьевы горы;

**Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва

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

Изучена каталитическая эффективность нативного субтилизина, его нековалентного комплекса с полиакриловой кислотой и субтилизина, ковалентно иммобилизованного на криогеле поливинилового спирта, в реакциях ферментативной пептидной конденсации в смесях органических растворителей с низким содержанием воды, в зависимости от состава среды, времени реакции и концентрации биокатализатора. Установлено, что в средах, содержащих более 80% DMF, синтетическая активность модифицированных субтилизинов выше, чем у нативного фермента. Обнаружено, что в органических растворителях при ферментативном синтезе, катализируемом как нативным, так и иммобилизованным субтилизином, возможно использование в качестве ацилирующего компонента *N*-ацилпептидов со свободной карбоксильной группой.

В присутствии иммобилизованного фермента с выходами 70–98% в среде DMF–MeCN без активации карбоксильного компонента и защиты боковых ионогенных групп полифункциональных аминокислот получена серия *n*-нитроанилидов тетрапептидов общей формулы Z-Ala-Ala-Xaa-Yaa-pNA, где Xaa = Leu, Lys, Glu; Yaa = Phe, Asp.

Ключевые слова: иммобилизованный субтилизин; комплекс субтилизин–полиакриловая кислота; криогель поливинилового спирта; ферментативный пептидный синтез в органических растворителях.

ВВЕДЕНИЕ

Использование органических растворителей в качестве реакционной среды для изучения синтазной активности протеиназ позволяет, прежде всего, реализовать возможность сдвига термодинамического равновесия реакции в сторону синтеза, минимизировать побочные реакции гидролиза образующегося пептидного продукта, а также расширить диапазон используемых субстратов [1]. Систематическое исследование биокаталитических свойств протеиназ как синтаз может позволить выявить такие их свойства, обнаружение которых затруднено в рамках традиционных представлений об этих ферментах как гидролазах.

Изучение стабильности и активности протеиназ проводилось чаще всего на примерах катализа реакций гидролиза специфических пептидных субстратов [2–4]. Исследования протеиназ как

синтаз в средах с высоким содержанием органических растворителей немногочисленны, а сведения о влиянии различных способов их модификации на каталитическую эффективность в реакции синтеза пептидов весьма ограничены [5–8].

Цель данной работы – изучение влияния различных методов модификации субтилизина 72 на его способность катализировать пептидный синтез в органических средах различного состава.

Мы провели сравнение синтазной активности трех препаратов субтилизина: нативного субтилизина, субтилизина в виде комплекса с полианионом – полиакриловой кислотой (ПАК-субтилизина) и субтилизина, иммобилизованного на криогеле поливинилового спирта (криоПВС-субтилизина) в неводных средах. Поскольку известно [9], что комплексообразование с полианионами защищает ферменты от инактивации органическими растворителями, мы применили этот подход как пример нековалентной модификации. Для ковалентной модификации субтилизина использовали известный способ стабилизации ферментов от неблагоприятных внешних воздействий, заключающийся в иммобилизации на инертной матрице. Для

Сокращения: Abz – о-аминобензойная кислота; pNA – *n*-нитроанилид; DeD – 2,4-динитрофенилэтилендиамин. Все аминокислоты – *L*-ряда.

Автор для переписки (эл. почта: irfilipp@genebee.msu.su; тел.: (095) 939-55-29).

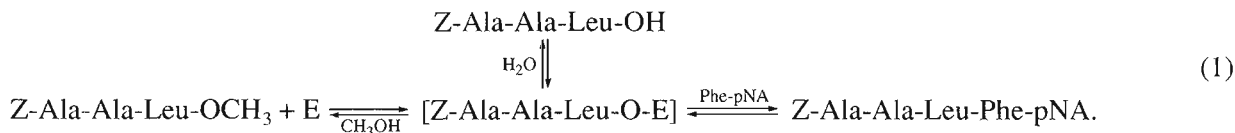
минимизации проблемы затрудненной диффузии субстратов и продуктов иммобилизацию проводили на макропористом носителе – криогеле ПВС. Этот носитель получают в результате замораживания, выдерживания в замороженном состоянии и последующем оттаивании концентрированных водных растворов ПВС [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Субтилизин 72 (К.Ф. 3.4.21.14) – внутриклеточная щелочная сериновая протеиназа [11], про-

дуцируемая микроорганизмом *Bacillus subtilis*, штамм 72 и катализирующая разнообразные реакции образования пептидной связи и этерификации [12–15]. Фермент отличается доступностью, легкостью выделения и очистки, устойчивостью к неблагоприятным воздействиям и широкой субстратной специфичностью.

Способность нативного и модифицированного субтилизинов катализировать образование пептидной связи в тройных системах MeCN/DMF/H₂O с переменным составом была исследована на примере реакции:



Выбор данной реакции обусловлен тем, что структура исходных компонентов хорошо соответствует специфичности субтилизина. Образование тетрапептида по реакции (1) было подробно изучено ранее для субтилизина Карлсберг в водно-органических средах [16] и для суспензии субтилизина 72 в безводных органических растворителях [17–19]. Соотношение amino- и карбоксильного компонентов в наших исследованиях было эквимолярным (30 мМ), а молярное соотношение [S]/[E] составило $\approx 10^3 : 1$. В исследованных системах растворителей продукт реакции находился в растворе, а фермент – в виде суспензии, что облегчало отделение целевого пептида от фермента. На рис. 1 представлены кривые зависимости выхода продукта от времени реакции.

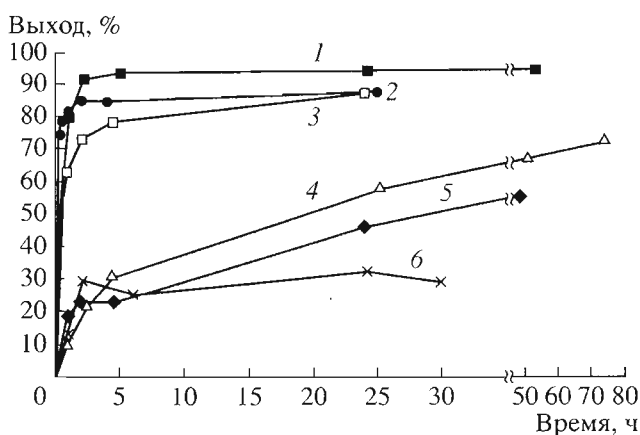


Рис. 1. Синтез Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA в смесях MeCN/DMF/5% H₂O с различным содержанием DMF, катализируемый: суспензией субтилизина (1, 6), криоПВС-А-субтилизином (2, 4), суспензией ПАК-субтилизина (3, 5) при содержании DMF 60% (1, 2, 3) и 95% (4, 5, 6).

При содержании DMF 60% выход продукта синтеза под действием суспензии нативного субтилизина довольно быстро (примерно за 2–3 ч) достигал максимальных значений и затем практически не менялся (рис. 1, 1). Если сравнивать кривые накопления продукта для нативного и модифицированных субтилизинов в этой смеси, то видно, что наибольшие различия наблюдались за первые 2–5 ч проведения реакции. В случае использования ПАК-субтилизина реакция протекала наиболее медленно (рис. 1, 3). Через сутки во всех трех случаях достигался максимальный выход.

При увеличении содержания DMF до 95% в реакционной среде скорость накопления тетрапептида заметно снижалась, но значительной разницы в выходах продукта реакции, катализируемой тремя препаратами фермента, за первые 2–3 ч не наблюдалось. По сравнению со средой, содержащей 60% DMF, выход Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA в случае катализа нативным субтилизином уменьшался примерно в три раза, и уже через 3–5 ч накопление продукта прекращалось (кривая 6). В реакции, катализируемой ПАК-субтилизином, синтез не останавливался через 3 ч, а продолжался, по крайней мере, в течение 2 сут. Самую высокую “операционную стабильность” в данных условиях проявлял криоПВС-субтилизин: даже после 48 ч синтез не прекращался (кривая 4) и через 3 сут выход продукта составил 74%.

Представленные на рис. 2 кривые зависимости выхода Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA от содержания DMF в реакционной смеси давали возможность выделить два диапазона концентраций DMF, между которыми выход продукта для всех исследованных биокатализаторов заметно снижался: 30–80 и 90–95%. При этом 80% содержание DMF являлось некоторым пороговым значением в отношении проявляемой синтазной активности как нативного, так и модифицированных субтилизинов.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в средах с высоким содержанием DMF потеря активности немодифицированного фермента происходит довольно быстро, а его модификация (как ковалентная, так и нековалентная) предохраняет субтилизин от инактивации. Необходимо отметить, что стабилизирующий эффект ковалентной фиксации по отношению к денатурирующему действию DMF более заметен, чем при комплексообразовании с ПАК.

Мы сравнили влияние различных методов иммобилизации субтилизина на его синтазную активность. Иммобилизацию субтилизина проводили различными способами: используя криоПВС-гель, активированный глutarовым альдегидом (криоПВС-А), эпихлоргидрином (криоПВС-Э) [15] и дивинилсульфоном (криоПВС-ВС). На криоПВС-А фермент иммобилизовали как в присутствии обратимых конкурентных ингибиторов сериновых протеиназ Ас-Трп-ОН и VzI-Tyr-NH₂ (субтилизин-криоПВС-А + Ас-Трп-ОН, субтилизин-криоПВС-А + VzI-Tyr-NH₂), так и без них. Каталитическая эффективность различных препаратов иммобилизованного субтилизина была проверена на модельной реакции (1) в смеси 60% DMF/40% MeCN (рис. 3).

Наилучшей и практически одинаковой синтетической активностью обладали образцы биокатализатора, полученные иммобилизацией субтилизина на криоПВС-А. При этом с наибольшей скоростью накопление продукта происходило в реакции, катализируемой субтилизин, иммобилизованным на криоПВС-А в присутствии VzI-Tyr-NH₂ (выход Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA составил 66% за 10 мин проведения реакции). Субтилизин, иммобилизованный на криоПВС-ВС, был несколько менее эффективен в пептидном синтезе (за 30 мин синтеза достигался 64% выход продукта). Несмотря на то что препарат субтилизина, иммобилизованного на криоПВС-Э, содержал самое низкое количество фермента и, как следствие, соотношение [E]/[S] было почти на порядок ниже и составляло примерно 1/10⁴, синтез все же шел (хотя и с невысокой скоростью), и за 96 ч выход модельного пептида составил 71%.

Зависимость выхода продукта от количества введенного в реакцию субтилизина была изучена для препарата субтилизин-криоПВС-А в смеси 80% DMF/MeCN (рис. 4). Кривая зависимости выхода Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA от концентрации иммобилизованного фермента лежала несколько ниже, чем для суспендированного, однако возможность повторного использования иммобилизованного биокатализатора после синтеза [14, 15] и легкость его отделения от реакционной смеси (что приводит к уменьшению загрязнения пепти-

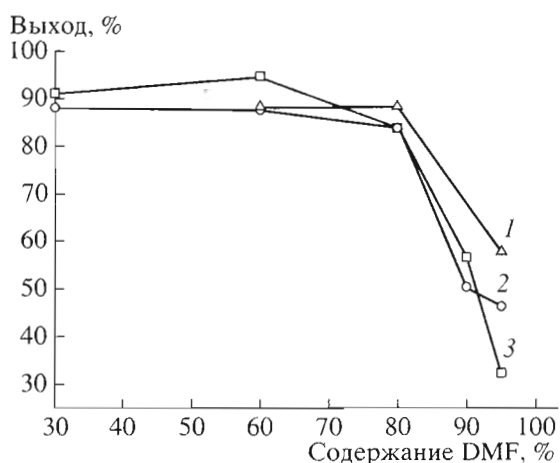


Рис. 2. Зависимость выхода Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA в смесях MeCN/DMF/5% H₂O с различным содержанием DMF через 24 ч проведения реакции, при катализе криоПВС-А субтилизин (1), суспензией ПАК-субтилизина (2), суспензией субтилизина (3).

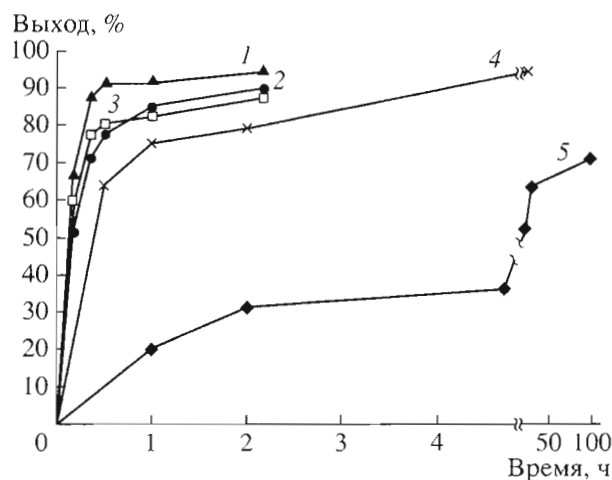


Рис. 3. Зависимость выхода Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA от времени для различных образцов иммобилизованного субтилизина: субтилизин-криоПВС-А + VzI-Tyr-NH₂ [S]/[E] 1.8 × 10³ : 1 (1); субтилизин-криоПВС-А + Ас-Трп-ОН, [S]/[E] 2 × 10³ : 1 (2); субтилизин-криоПВС-А, [S]/[E] 1.1 × 10³ : 1 (3); субтилизин-криоПВС-В, [S]/[E] 0.7 × 10³ : 1 (4); субтилизин-криоПВС-Э, [S]/[E] 0.9 × 10⁴ : 1 (5).

да ферментом) придавали иммобилизованному ферменту значительное преимущество.

Известно [16], что, как в водных растворах, так и в водно-органических смесях, при пептидном синтезе с помощью сериновых протеиназ активация карбоксильного компонента необходима для достижения хороших выходов продукта за относительно короткое время. В этом случае реакция идет по кинетически контролируемому пути и все-

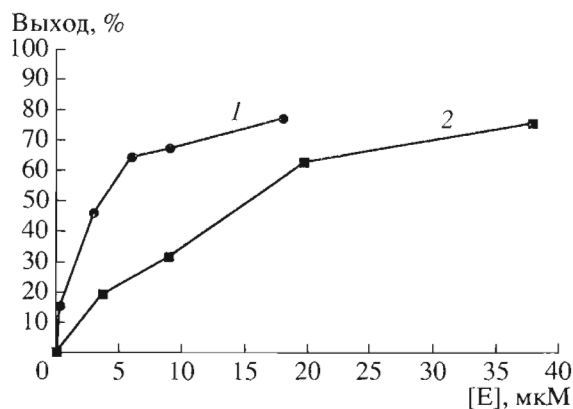
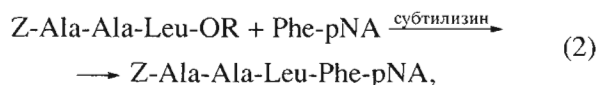


Рис. 4. Зависимость выхода Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA за 2 ч реакции от концентрации: суспендированного субтилизина (1) и иммобилизованного криоПВС-А-субтилизина (2).

гда остается риск вторичного гидролиза продукта. При использовании в качестве ацилдонора фрагмента со свободной карбоксильной группой реакция идет очень медленно и с небольшим выходом.

На примере получения тетрапептида по реакции (2), катализируемой суспензией нативного фермента в смеси 60% DMF/MeCN/5% H₂O и криоПВС-А-субтилизином в смеси 60% DMF/MeCN, нами было изучено влияние структуры карбоксильного компонента на эффективность синтеза (рис. 5).



где R = H, Me.

Наибольшие различия в скорости накопления продукта наблюдались в первые 60 мин

проведения реакции. В реакции, катализируемой нативным субтилизином, за 30 мин выход продукта составил 67% при использовании в качестве ацилдонора метилового эфира трипептида и 32% – для пептида со свободной карбоксильной группой. Подобным же образом протекал синтез (2) под действием иммобилизованного субтилизина. Выходы за 30 мин составили 60% в случае Z-Ala-Ala-Leu-OMe и 24% для компонента со свободной карбоксильной группой. За 2 ч разница в выходах сократилась до 10–15%, а через 3 ч, независимо от структуры ацилирующего компонента, выход продукта был практически одинаковым и составил 95% (рис. 5).

Таким образом, было обнаружено, что при применении немодифицированного и иммобилизованного субтилизина в органической среде не только эфир трипептида Z-Ala-Ala-Leu-OMe, но и его аналог со свободной карбоксильной группой может быть эффективен в качестве ацилирующего агента. По-видимому, такое протекание реакции связано с низким содержанием воды в системе и сдвигом равновесия в сторону образования продуктов, а также с тем, что в данном случае карбоксильная группа ацилирующего компонента недиссоциирована и эффективно взаимодействует с активным центром фермента.

При химическом синтезе наибольшую сложность представляет получение пептидов, содержащих полифункциональные аминокислоты, из-за необходимости защиты их боковых функциональных групп. Использование ферментов как катализаторов при синтезе такого рода пептидов позволяет снизить не только количество стадий, но и опасность рацемизации на каждом шаге блокирования/удаления защиты. Ранее было продемонстрировано, что в органической среде субти-

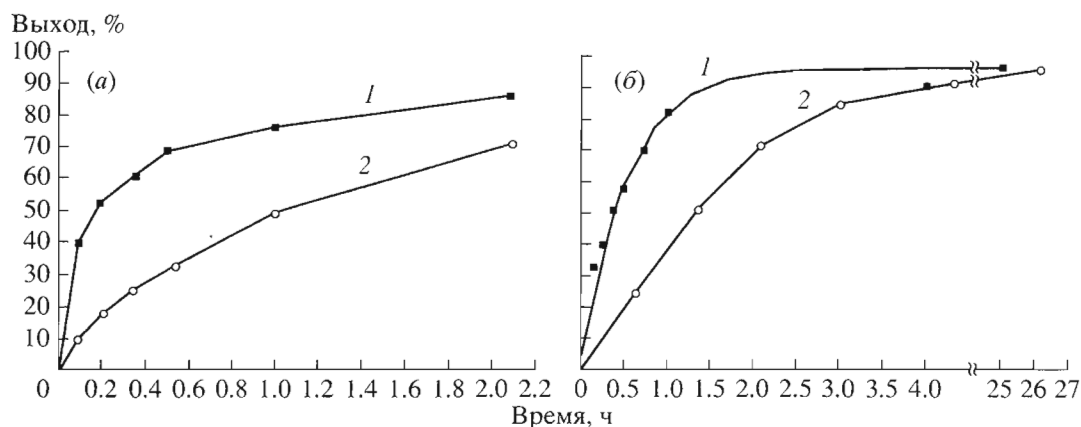


Рис. 5. Синтез Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA в смеси 60% DMF/MeCN/H₂O, катализируемый суспензией субтилизина (а), иммобилизованным криоПВС-А-субтилизином (б) при использовании в качестве карбоксильных компонентов Z-Ala-Ala-Leu-OMe (1) и Z-Ala-Ala-Leu-OH (2). Условия: [S] 30 мМ.

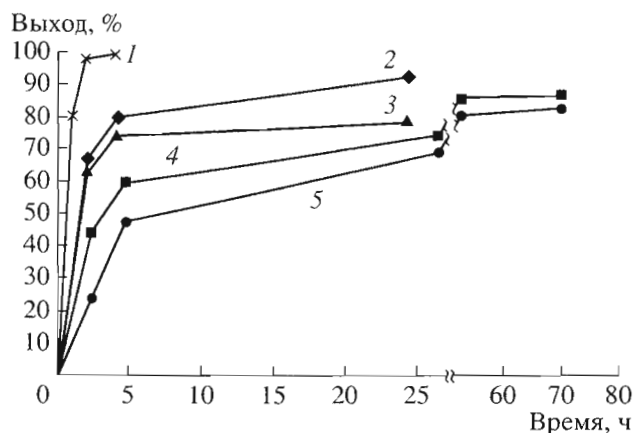


Рис. 6. Синтез, катализируемый криоПВС-А-субтилизином, в смеси 60% DMF/40% MeCN тетрапептида Z-Ala-Ala-Xaa-Yaa-pNA, в котором Xaa = Lys, Yaa = Asp (1), Xaa = Leu, Yaa = Asp (2), Xaa = Glu, Yaa = Asp (3), Xaa = Glu, Yaa = Phe (4), Xaa = Lys, Yaa = Phe (5). Условия: [S]/[E] = 0.8×10^3 ; [S] 30 мМ.

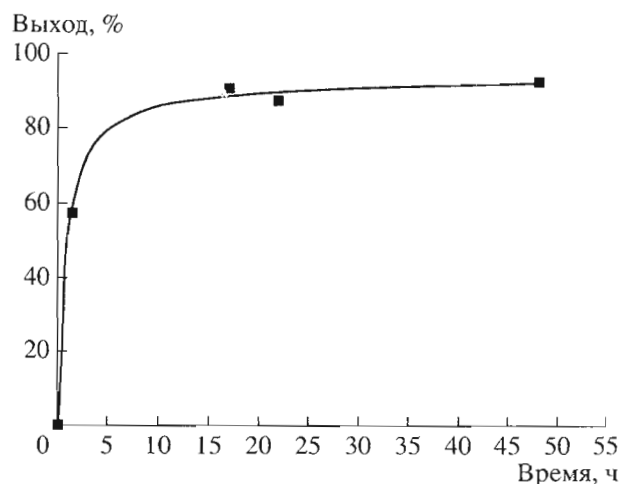
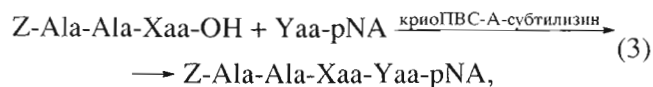


Рис. 7. Зависимость выхода Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-Ala-Ala-DeD от времени в системе 60% DMF/40% MeCN криоПВС-А-субтилизином. Условия: [S]/[E] = 1×10^3 , [S] 30 мМ.

лизин в форме гидрофобного ионного комплекса с SDS способен катализировать образование связей Arg-Arg, Glu-Arg и Lys-Glu в смеси 30% DMSO/EtOH [19]. В настоящей работе показано, что при использовании субтилизина, иммобилизованного на криогеле ПВС с использованием глутарового альдегида, в органической среде с минимальным содержанием воды можно существенно повысить эффективность синтеза *N*-ацилированных тетрапептидов, содержащих основные и кислые аминокислотные остатки в P_1 - и P'_1 -положениях:



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

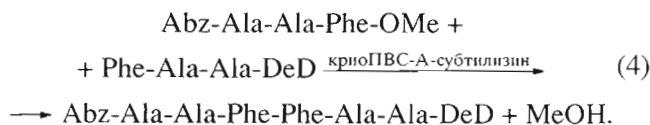
Реакции проводили без активации карбоксильного компонента и защиты боковых ионогенных групп полифункциональных аминокислот (рис. 6).

n-Нитроанилиды защищенных тетрапептидов были получены с высокими выходами, причем во всех случаях наблюдалось образование единственного продукта реакции. Индивидуальность синтезированных пептидов подтверждена данными ВЭЖХ и аминокислотного анализа.

Успешное использование Z-Ala-Ala-Lys-OH и Z-Ala-Ala-Glu-OH как ацилдоноров и Asp-pNA в качестве аминокислотного компонента в смесях полярных органических растворителей существенно расширяет представления о синтетическом потенциале субтилизина, иммобилизованного на криогеле ПВС. Нами показана возможность образования связи между разноименно заряженными аминокислотными остатками Lys и Asp (рис. 6, 1), а также между двумя остатками дикарбоновых аминокислот Glu и Asp (рис. 6, 3),

хотя известно [12, 20], что для субтилизина 72 в P_1 -положении предпочтительны гидрофобные аминокислотные остатки. Такое "нестандартное" поведение иммобилизованного субтилизина в синтезе связано, вероятно, с тем, что в среде органических растворителей боковые ионогенные группы аминокислотных остатков не заряжены. Кроме того, нельзя исключать влияние матрицы криогеля ПВС и связанной с ней воды на распределение исходных веществ и продуктов реакции в реакционной смеси.

Одной из областей практического применения ферментативного синтеза пептидов является получение субстратов протеиназ различных классов. Нами была изучена реакция синтеза флуорогенного субстрата аспартильных протеиназ под действием субтилизина, иммобилизованного на криоПВС-А:



Реакция проводилась в смеси 60% DMF/40% MeCN при эквимолярном соотношении amino- и карбоксильного компонента и соотношении [E]/[S] составило $1/10^3$. В P_4 -положении карбоксильного компонента находился флуорофор – остаток антралиновой кислоты (Abz), объемный гидрофобный заместитель, хорошо удовлетворяющий специфичности субтилизина в этом положении. Аминокислотный компонент содержал на C-конце остаток 2,4-динитрофенилэтилендиамина (DeD), являющегося тушителем флуоресценции. Кривая накопления продукта приведена на рис. 7.

Значительная скорость накопления продукта (90% выход за 17 ч) и отсутствие побочной реакции вторичного гидролиза создают предпосылки для препаративного синтеза этого практически важного субстрата.

Для демонстрации возможностей ферментативного синтеза в смесях органических растворителей нами был проведен препаративный синтез Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA, катализируемый суспензией нативного субтилизина в смеси 80% DMF/MeCN/5% H₂O при эквимолярном соотношении amino- и карбоксильного компонентов (30 мМ), соотношение [S]/[E] составило 5000 : 1. Через сутки фермент отделяли центрифугированием, и выход продукта составил 73%. Кроме того, в смеси 60% DMF/40% MeCN при эквимолярном содержании amino- и карбоксильного компонента и соотношении [E]/[S] = 1/10³ был проведен препаративный синтез Z-Ala-Ala-Lys-Asp-pNA, катализируемый субтилизином, иммобилизованным на криоПВС-А. Поскольку, по данным ВЭЖХ, содержание продукта в реакционной смеси через сутки составляло около 100%, дополнительной очистки не требовалось. Препаративный выход составил 93%.

Таким образом, было показано, что нативный субтилизин 72 в виде суспензии, а также комплекс ПАК-субтилизин и фермент, иммобилизованный на криоПВС-геле, способны катализировать реакции образования пептидной связи в смеси органических растворителей с низким содержанием воды. Иммобилизованный фермент обладает рядом преимуществ по сравнению с нативным и ПАК-субтилизином. Стабильность при хранении, возможность многократного использования биокатализатора, а также способность образовывать связи между производными пептидов и аминокислот, содержащих остатки ионогенных аминокислот без защит боковых функциональных групп, делают иммобилизованный субтилизин перспективным биокатализатором реакций синтеза пептидных связей в средах с высоким содержанием органических растворителей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: сериновую протеиназу *B. subtilis*, штамм 72, выделенную из коммерческого препарата культуральной жидкости и очищенную по методике [20]; ацетонитрил для ВЭЖХ "ос. ч." (Лексбиофарм, Россия), содержащий не более 0.01% воды, DMF и ТЕА "ч. д. а." (Реахим, Россия), дополнительно очищенный по методу [21]; производные аминокислот и пептидов были синтезированы в нашей лаборатории по стандартным методикам [22]; остальные реактивы квалификации "ч. д. а."

Пептиды анализировали на жидкостном хроматографе Altex Model 110A (США): 1) на колон-

ке Microsorb-MV C₈ (4.6 × 250 мм) (Rainin Instrument Company, Inc., США) при элюции раствором 0.1% CF₃COOH в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (скорость потока 1 мл/мин) от 20 до 100% за 35 мин (А) и от 10 до 70% за 26.2 мин (В). Детекцию осуществляли при 220 и 280 нм; 2) на колонке Nucleosil C₁₈ (4.6 × 250 мм, Биохиммак, Россия) при элюции раствором 0.1% CF₃COOH в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (скорость потока 1 мл/мин) от 20 до 80% за 35 мин (С) и от 10 до 80% за 42 мин (D). При расчете состава реакционной смеси не вводили поправку на различие молярных коэффициентов поглощения компонентов.

Аминокислотный анализ выполняли на автоматическом аминокислотном анализаторе Hitachi-835 (Япония) после кислотного гидролиза 5.7 М HCl при 105°C в вакуумированных ампулах в течение 24 и 48 ч.

Комплекс ПАК-субтилизин. К раствору субтилизина 72 (1 мг, 35 нмоль) в 100 мкл 0.05 М Трис-HCl-буфера (рН 8.2), содержащего 1.5 мМ CaCl₂, приливали 100 мкл раствора полиакриловой кислоты (56 мг/мл) в 0.05 М Трис-HCl-буфера с рН 8.2 и перемешивали 1 мин.

Субтилизин, иммобилизованный на криогеле ПВС. Приготовление реакционноспособных альдегидсодержащих, эпоксисодержащих и дивинилсульфонсодержащих производных криогеля ПВС и ковалентное присоединение к ним ферментов проводилось по методу [15]. Количество иммобилизованного белка оценивалось по данным аминокислотного анализа.

Синтезы под действием суспензии нативного субтилизина

Конденсация Z-Ala-Ala-Leu-OMe и Phe-pNA. К смеси 60 мкл 200 мМ раствора Z-Ala-Ala-Leu-OMe в DMF и 60 мкл 200 мМ раствора Phe-pNA в DMF и 260 мкл MeCN добавляли 20 мкл раствора субтилизина (5 мг/мл) в 0.05 М Трис-HCl-буфере (рН 7.8), содержащем 1.5 мМ CaCl₂. Реакционную смесь перемешивали при 20°C и периодически отбирали 10 мкл пробы для ВЭЖХ. Время удерживания Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA в градиенте А. Т(А) – 30 мин.

Конденсацию Z-Ala-Ala-Leu-OH и Phe-pNA проводили аналогично.

Препаративный синтез Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA. К раствору Z-Ala-Ala-Leu-OMe (25.3 мг, 60 мкмоль) и Phe-pNA (17.1 мг, 60 мкмоль) в смеси 1.6 мл абс. DMF и 0.3 мл MeCN добавляли 0.1 мл раствора субтилизина (5 мг/мл) в 0.05 М Трис-HCl-буфере (рН 7.8), содержащем 1.5 мМ CaCl₂. Реакционную смесь перемешивали на магнитной мешалке в течение 24 ч при 20°C. Нерастворимый белок удаляли центрифугированием в течение 10 мин при

16000 g. Супернатант добавляли по каплям при тщательном перемешивании к 12 мл 0.5 М HCl. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием, растворяли в 0.4 мл DMF и повторяли процедуру осаждения 0.5 М HCl. Полученный осадок центрифугировали, промывали водой и высушивали в вакууме над NaOH. Выход составил 30 мг (73%). Аминокислотный состав (нмоль): Ala 10.4, Leu 5.4, Phe 5.2. $T(A)$ – 30 мин.

Синтез Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA, катализируемый суспензией комплекса ПАК–субтилизин, проводили аналогично методике для нативного фермента, добавляя 20 мкл раствора комплекса ПАК–субтилизин в 0.05 М Трис-HCl-буфере, содержащем 1.5 мМ CaCl₂.

Синтезы под действием иммобилизованного субтилизина

Конденсация Z-Ala-Ala-Leu-OMe и Phe-pNA. К препарату иммобилизованного субтилизина (80 мг, содержание белка – 0.3 мг), предварительно промытому MeCN (1 × 1 мл) и смесью MeCN/DMF соответствующего состава (2 × 1 мл), добавляли 160 мкл MeCN, 120 мкл DMF, 60 мкл 200 мМ раствора Z-Ala-Ala-Leu-OCH₃ в DMF и 60 мкл 200 мМ раствора Phe-pNA в DMF. Реакционную смесь встряхивали на орбитальном шейкере при 20°C, периодически отбирали 5 мкл пробы для ВЭЖХ. $T(B)$ Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA – 25.5 мин. Аминокислотный состав (нмоль): Ala 10.4, Leu 5.5, Phe 5.2.

Конденсацию Z-Ala-Ala-Leu-OH и Phe-pNA проводили аналогично.

Z-Ala-Ala-Lys-Phe-pNA, Z-Ala-Ala-Glu-Phe-pNA, Z-Ala-Ala-Lys-Asp-pNA, Z-Ala-Ala-Glu-Asp-pNA, Z-Ala-Ala-Leu-Asp-pNA и Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-Ala-Ala-DeD получали аналогично.

Z-Ala-Ala-Lys-Phe-pNA: $T(C)$ – 25.2 мин; аминокислотный состав (нмоль): Ala 7.8, Lys 3.8, Phe 3.9.

Z-Ala-Ala-Glu-Phe-pNA: $T(C)$ – 27 мин; аминокислотный состав (нмоль): Ala 8.3, Glu 4.0, Phe 4.1.

Z-Ala-Ala-Leu-Asp-pNA: $T(C)$ – 26 мин; аминокислотный состав (нмоль): Ala 9.6, Leu 4.9, Asp 4.7.

Z-Ala-Ala-Lys-Asp-pNA: $T(D)$ – 24 мин; аминокислотный состав (нмоль): Ala 6.4, Lys 3.1, Asp 3.3.

Z-Ala-Ala-Glu-Asp-pNA: $T(D)$ – 26 мин; аминокислотный состав (нмоль): Ala 8.8, Glu 4.1, Asp 4.5.

Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-Ala-Ala-DeD: $T(C)$ – 19.7 мин; аминокислотный состав (нмоль): Ala 6.4, Phe 3.0.

Препаративный синтез Z-Ala-Ala-Lys-Asp-pNA. К раствору Z-Ala-Ala-Lys-OH · HCl (28 мг, 60 мкмоль) в 300 мкл абс. DMF и 300 мкл 200 мМ раствора Asp-pNA · HCl в абс. DMF (60 мкмоль) добавляли 540 мкл DMF, 800 мкл MeCN и 60 мкл 1 М раствора TEA в DMF. Полученный раствор приливали к навеске субтилизина, иммобилизованного

на криоПВС-А (405 мг, содержание белка 1.8 мг), и реакционную смесь встряхивали при 20°C 24 ч. Затем биокатализатор отделяли от реакционной смеси, промывали смесью MeCN/DMF, 4/6 по объему (4 × 3 мл), реакционную смесь и все промывки объединяли и упаривали на роторном испарителе. Маслообразный остаток кристаллизовали под ацетоном при +4°C. Выход составил 39 мг (93%). Аминокислотный состав (нмоль): Ala 10.6, Lys 5.4, Asp 4.4; $T(C)$ – 21 мин; масс-спектрометрический анализ: молекулярная масса (MH^+ , m/z) – 658.4; расчитанная – 657.7.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 00-03-32803а, 02-04-06281 и 00-04-48455) и частично гранта ИНТАС № 01-673.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Klibanov A.M. // Nature. 2001. V. 409. P. 241–246.
2. Gill I., Lopez-Fandino R., Jorba X., Vulfson E.N. // Enzyme Microb. Technol. 1996. V. 18. P. 163–183.
3. Dordick J.S. // Biotechnol. Prog. 1992. V. 8. P. 259–267.
4. Wong C.-H. // Trends Biotechnol. 1992. V. 10. P. 378–381.
5. Novick S.J., Dordick J.S. // Biotechnol. Bioeng. 2000. V. 68. P. 665–671.
6. Dordick J.S., Khmelnsky Y.L., Sergeeva M.V. // Curr. Opin. Microbiol. 1998. V. 1. P. 311–318.
7. Wang P., Sergeeva M.V., Lim L., Dordick J.S. // Nat. Biotechnol. 1997. V. 15. P. 789–793.
8. Blanco R.M., Bastida A., Cuesta C., Alvaro G., Fernandez-Lafuente R., Rosell C.M., Guisan J.M. // Biomed. Biochim. Acta. 1991. V. 50. P. S110–113.
9. Kudryashova E.V., Gladilin A.K., Vakurov A.V., Heitz F., Levashov A.V., Mozhaev V.V. // Biotechnol. Bioeng. 1997. V. 55. P. 267–277.
10. Лозинский В.И. // Успехи химии. 1998. Т. 67. С. 641–655.
11. Руденская Г.Н. // Биооргани. химия. 1994. V. 20. P. 475–484.
12. Stepanov V.M. // Pure & Appl. Chem. 1996. V. 68. P. 1335.
13. Stepanov V.M., Terent'eva E.Y., Voyushina T.L., Gololobov M.Y. // Bioorg. & Med. Chem. 1995. V. 3. P. 479–485.
14. 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.
15. Филиппова И.Ю., Бачева А.В., Байбак О.В., Плиева Ф.М., Лысогорская Е.Н., Оксенойт Е.С., Лозинский В.И. // Изв. АН. Сер. хим. 2001. № 10. С. 1811–1816.
16. Воюшина Т.Л., Люблинская Л.А., Степанов В.М. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. С. 738–744.
17. Getun I.V., Filippova I.Yu., Lysogorskaya E.N., Okse-noit E.S., Anisimova V.V., Kolobanova S.V., Bacheva A.V., Stepanov V.M. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1997. V. 7. P. 2691–2696.

18. Гетун И.В., Филиппова И., Лысогорская Е.Н., Колобанова С.В., Оксенойт Е.С., Анисимова В.В., Степанов В.М. // Биоорганич. химия. 1998. Т. 24. С. 306–312.
19. Getun I.V., Filippova I.Yu., Lysogorskaya E.N., Oksenoit E.S. // J. Mol. Cat. B: Enzymatic. 2001. V. 15. P. 105–110.
20. Гололобов М., Морозова И.П., Воюшина Т.Л., Тимохина Е.А., Степанов В.М. // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 230–239.
21. Гордон А., Форд Р. Спутник химика: Пер. с англ. М.: Мир, 1976.
22. Гершкович А.А., Кибирев В.К. Химический синтез пептидов. Киев: Наукова думка, 1992.

Native and Modified Subtilisin 72 as a Catalyst for Peptide Synthesis in Media with a Low Water Content

A. V. Bacheva*, O. V. Baibak, A. V. Belyaeva*, E. N. Lysogorskaya*,
E. S. Oksenoit*, V. I. Lozinskii**, and I. Yu. Filippova*#**

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

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

** Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 28, Moscow, 117813 Russia

The catalytic efficiencies of native subtilisin, its noncovalent complex with polyacrylic acid, and the subtilisin covalently immobilized in a cryogel of polyvinyl alcohol were studied in the reaction of peptide coupling in mixtures of organic solvents with a low water content in dependence on the medium composition, reaction time, and biocatalyst concentration. It was established that, in media with a DMF content >80%, the synthase activity of modified subtilisins is higher than that of the native subtilisin. The use of *N*-acylpeptides with a free carboxyl group was found to be possible in organic solvents during the enzymatic synthesis catalyzed by both native and immobilized subtilisin. A series of tetrapeptide *p*-nitroanilides of the general formula Z-Ala-Ala-Xaa-Yaa-pNA (where Xaa is Leu, Lys, or Glu and Yaa is Phe or Asp) was obtained in the presence of immobilized enzyme in yields of 70–98% in DMF–MeCN without any activation of the carboxyl component and without protection of side ionogenic groups of polyfunctional amino acids. 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 in organic solvents, immobilized subtilisin, subtilisin–polyacrylic acid complex, subtilisin–polyvinyl alcohol cryogel complex