



УДК 577.152.34/135:577.112.6

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ПЕПТИДНЫХ СУБСТРАТОВ
СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ

Люблинская Л. А., Вологина Т. А., Степанов В. М.

Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов, Москва

Описано использование термолизина и металлопротеиназы *Bacillus subtilis* для получения ряда хромогенных субстратов сериновых протеиназ — *n*-нитроанилидов ацилированных трипептидов — путем конденсации *N*-бензилоксикарбонилпроизводных глицил-глицина, аланил-аланина, глицил-аланина или *трет*-бутилоксикарбонил-аланил-аланина с *n*-нитроанилидами *L*- или *DL*-лейцина и *L*-фенилаланина. Выход продуктов реакции составляет 76–94%. Замечена способность термолизина катализировать образование пептидной связи *n*-нитроанилида *L*-лейцина с метиловым эфиром *трет*-бутилоксикарбонил-аланил-аланина в качестве карбоксильного компонента.

Ферментативный синтез пептидов, известный уже давно, в последнее время привлекает все большее внимание как удобный в препаративном отношении способ получения многих модельных и физиологически активных пептидов. Мы применили этот метод к получению хромогенных специфических субстратов сериновых протеиназ — *n*-нитроанилидов ацилированных пептидов. Эти соединения общей формулы X-A-B-C-pNA, где X — защитная бензилоксикарбонильная или *трет*-бутилоксикарбонильная группировка, pNA — *n*-нитроанилидный остаток, A, B — остатки глицина или аланина, а C — остаток лейцина или фенилаланина, хорошо соответствуют специфичности ряда внутри- и внеклеточных сериновых протеиназ микроорганизмов [1–3] и с успехом используются для их определения. При этом протеиназы расщепляют связь между остатком лейцина или фенилаланина и *n*-нитроанилином, что приводит к образованию характерного поглощения света при 400–410 нм. Ранее нами были разработаны способы получения *n*-нитроанилидов защищенных пептидов, основанные на конденсации ацилированных пептидов X-A-B с *n*-нитроанилидами лейцина или фенилаланина методом смешанных ангидридов или карбодимидным методом с добавлением одного эквивалента *N*-оксисукцинимид [4]. Эти способы давали, как правило, хорошие результаты, однако не гарантировали от рацемизации остатка B, требовали применения абсолютных растворителей и высокоочищенных конденсирующих агентов. Учитывая особенность строения субстратов данного типа, мы предположили, что более удобным окажется их ферментативный синтез, при котором конденсация *n*-нитроанилида гидрофобной аминокислоты — лейцина или фенилаланина и ацилдипептида катализировалась бы металлопротеиназой, в частности термолизином.

Эффективность термолизина в реакциях синтеза пептидов продемонстрировали Ока и Морихара [5], причем было установлено, что фермент проявляет ту же специфичность, что и в реакциях гидролиза, и катализировать образование пептидной связи с участием аминокислотной группы гидрофобной аминокислотного остатка [6]. Сдвиг равновесия в сторону образования пептидной связи обеспечивается удалением продукта из сферы реакции в виде осадка или экстракцией органическим растворителем при проведении процесса в гетерофазной системе [7].

Использованы сокращения аминокислот и их производных в соответствии с правилами, предложенными Комиссией IUPAC-IUB по биохимической номенклатуре. -pNA — *n*-нитроанилид, DMF — диметилформамид. Все аминокислоты, кроме указанных особо, *L*-ряда.

Исходные вещества	Количество ммоль	DMF, мкл	5·10 ⁻³ M CaCl ₂ , мкл	Фермент *	Время и температура реакции	Выход, %	Аминокислотный состав	[α] _D ²⁰ (сl, DMF)
Z-Ala-Ala-OH	100	100	620	Термолизин, 1 мг	3 мин, 25° С	94,5	Ala : Leu, 1,86 : 1	-9
H-Leu-pNA	100							
Z-Ala-Ala-OH	100	100	700	То же	20 мин, 37° С	93,3	Ala : Leu, 1,97 : 1	-9
H-DL-Leu-pNA	400							
Z-Gly-Gly-OH	100	100	700	»	17 ч, 37° С	84	Gly : Leu, 1,97 : 1	-7
H-Leu-pNA	100							
Вос-Ala-Ala-OH	100	80	160	»	2 ч, 37° С	76	Ala : Leu, 1,81 : 1	-12
H-Leu-pNA	100							
Вос-Ala-Ala-OMe	100	100	200 ^{2*}	»	4 ч, 37° С	67,5	Ala : Leu, 2,01 : 1	-12
H-Leu-pNA	100							
Вос-Ala-Ala-OMe	100	100	200 ^{3*}	» 0,5 мг	15 мин, 25° С	36,8	Ala : Leu, 1,93 : 1	-13
H-Leu-pNA	100							
Z-Ala-Ala-OH	100	100	250 ^{2*}	» 1 мг	30 мин, 25° С	88,5	Ala : Phe, 1,81 : 1	+18
HBr·H-Phe-pNA ^{4*}	100							
Z-Gly-Ala-OH	200	250	680	»	15 мин, 25° С	79,5	Gly:Ala:Leu, 0,98:1:1,04	-9
H-Leu-pNA	200							
Вос-Ala-Ala-OH	3840	2500	6000	<i>B.subtilis</i> , 500 мкл	30 мин, 25° С	53	Ala : Leu, 2,04 : 1	-12
H-Leu-pNA	3840			» 5 мкл	5 мин, 25° С	85	Ala : Leu, 1,98 : 1	
Z-Ala-Ala-OH	25	25	180	» 10 мкл	15 мин, 25° С	85	Ala : Leu, 1,90 : 1	
H-DL-Leu-pNA	100	30	180	» 10 мкл	15 мин, 25° С	84	Ala : Leu, 1,90 : 1	
Вос-Ala-Ala-OH	25	25	50	» 10 мкл	15 мин, 25° С	84	Ala : Leu, 1,90 : 1	
H-DL-Leu-pNA	100							

^{1*} Термолизин фирмы «Serva» (0,70Е₂₆₀/мг), металлопротеиназа *B.subtilis*, удельная активность по азоказенну — 8 ед. акт./ОЕ₂₆₀ (в 1 мл 10,8 ОЕ₂₆₀).

^{2*} Реакционная смесь дополнительно содержит 50 мкл этилацетата, что, однако, не приводит к образованию гетерогенной смеси.

^{3*} Реакционная смесь вместо DMF содержит хлороформ.

^{4*} Реакционная смесь содержит 100 ммоль триэтиламина.

Значительное повышение гидрофобности продукта конденсации по сравнению с исходными (аминокислотным — *n*-нитроанилидом лейцина или фенилаланина и карбоксильным — бензилоксикарбонил- или *трет*-бутилоксикарбонилдипептидом) приводит к его меньшей растворимости и выпадению в избранных нами условиях в осадок. Это обеспечивает высокий, как правило близкий к количественному, выход *n*-нитроанилида ацилированного трипептида (см. таблицу).

Реакция обычно проводилась при эквимольных соотношениях реагентов, избыток аминокислоты требовался лишь в случае введения в реакцию *n*-нитроанилида *DL*-лейцина. Стереоспецифичность конденсации, катализируемой термолизинем или аналогичным ферментом, позволяет использовать *n*-нитроанилид *DL*-лейцина, причем выход оставался достаточно высоким, а полученный продукт — *n*-нитроанилид бензилоксикарбонил-аланил-аланил-*L*-лейцина не отличался по углу оптического вращения и другим характеристикам от соединения, синтезированного из *L*-изомера [4].

Одним из доказательств оптической чистоты полученных соединений является их исчерпывающий ферментативный гидролиз. Например, гидролиз субтиллизином *n*-нитроанилида бензилоксикарбонилглицил-аланил-лейцина, как было показано методом ТСХ, проходит полностью, что может служить подтверждением отсутствия рацемизации остатка С в условиях ферментативного синтеза.

Вводимое в реакцию количество фермента обеспечивает достаточно быстрое достижение равновесия. В стандартных условиях (см. «Экспери-

ментальную часть») образование осадка *n*-нитроанилида бензилоксикарбонил-аланил-аланил-лейцина начинается уже через 15 с, а через 3 мин реакция практически заканчивается. В других случаях повышение температуры и увеличение времени реакции в каждом конкретном примере определяется выпадением осадка. Присутствие в реакционной смеси органического растворителя, обычно диметилформамида, существенно снижает активность фермента, однако этот эффект перекрывается избыточным его содержанием в инкубационной смеси. В препаративных опытах избыток фермента может быть значительно уменьшен. Это несколько замедляет образование осадка, но практически не влияет на выход конечного продукта. Более того, слишком быстрая конденсация может привести к выпадению маслянистого осадка, который кристаллизуется только при стоянии на холоду, тогда как замедленный процесс нередко сразу дает кристаллический осадок.

Практически такие же результаты, как термоллизин, дает металлопротеиназа *Bacillus subtilis* — фермент, по специфичности близкий термоллизину [8]. Реакции, катализируемые этим ферментом, в изученных условиях протекали с высокими скоростями и хорошими выходами (см. таблицу).

Выход продукта реакции в выбранных в каждом конкретном случае условиях, по-видимому, практически полностью определяется его растворимостью и растворимостью исходных веществ. Некоторые, как правило малосущественные, изменения выхода защищенного трипептида, очевидно, определяются тем, что из-за различий в растворимости исходных ацилированных дипептидов приходится изменять содержание диметилформамида в реакционной смеси, что отражается на растворимости и, следовательно, на выходе конечного продукта.

Особый интерес представляет реакция метилового эфира ацилдипептида с *n*-нитроанилидом лейцина, также приводящая к получению *n*-нитроанилида ацилтрипептида с высоким выходом. Эта реакция удобна в препаративном отношении, так как позволяет исключить из схемы синтеза стадию омыления исходного эфира ацилдипептида. Реакция проходит и в гомогенной (диметилформамид), и в гетерофазной (хлороформ) системах. Уменьшение выхода в последнем случае, вероятнее всего, связано с хорошей растворимостью конечного продукта в хлороформе, что приводит к уменьшению количества выпавшего осадка. Отделение органической фазы и извлечение растворенного вещества затруднено из-за незначительного объема реакционной смеси в описываемых условиях. Механизм этой реакции детально не исследовался, однако известно, что термоллизин не способен катализировать гидролиз эфиров пептидов. В контрольном опыте по омылению метилового эфира *трет*-бутилоксикарбонил-аланил-аланина термоллизинным методом ТСХ было обнаружено некоторое превышение уровня омыления ацилдипептида в присутствии фермента над спонтанным омылением эфира в условиях, используемых для ферментативного синтеза. Скорее всего это объясняется присутствием примеси серповой протеиназы в использовавшемся образце термоллизина. Наблюдающийся уровень омыления метилового эфира невелик, поэтому нет оснований предполагать, что образование продукта обязательно протекает через стадию предварительного омыления эфира ацилированного пептида. По-видимому, синтез трипептидного производного в данном случае — результат аминолиза эфира ацилдипептида с участием аминогруппы *n*-нитроанилида лейцина, причем оба компонента сорбируются в зоне связывания субстрата на поверхности фермента.

Экспериментальная часть

В работе использованы кристаллический термоллизин (Serva, ФРГ) и чистая металлопротеиназа из культуральной жидкости *B. subtilis* штамм 163 [8], выделенная в нашей лаборатории* с удельной активностью по азаказину 8 ед. акт./ОЕ₂₃₀ (1 мл содержит 10,8 ОЕ₂₃₀).

* Авторы благодарят Л. С. Изотову за работу по выделению фермента.

Производные аминокислот и пептидов: H-Leu-pNA (Serva), Z-Gly-Gly-OH (Reanal); Z-Ala-Ala-OH, Вос-Ala-Ala-OH, Вос-Ala-Ala-OMe [9], HBr·H-Phe-pNA [10], DL-Leu-pNA [11] — получены по методам, описанным ранее. Гомогенность полученных соединений подтверждали с помощью ТСХ на пластинках марки «Силуфол» в системе *n*-бутанол — пиридин — вода — уксусная кислота (10 : 15 : 12 : 3), обнаружение в УФ-свете нингидрином и KI. Оптическую активность измеряли на поляриметре марки Jouan (Франция).

Кислотный гидролиз проводили в стандартных условиях (5,7 н. HCl, 110° С, 24 ч), гидролизат анализировали на автоматическом аминокислотном анализаторе Durrum D-500 (США).

Ниже приведено несколько типичных методов получения пептидов с помощью термолизина и металлопротеиназы *B. subtilis*. Остальные синтезы проводили аналогично (см. таблицу).

Z-Ala-Ala-Leu-pNA. Аналитический вариант. Смесь 29,5 мг (100 мкмоль) Z-Ala-Ala-OH и 25,2 мг (100 мкмоль) H-Leu-pNA растворяли в 100 мкл диметилформамида и медленно при перемешивании прибавляли 620 мкл $5 \cdot 10^{-2}$ М раствора CaCl₂, доведенного до pH 7,3 0,1 н. NaOH. Сразу же, продолжая перемешивание, вносили 1 мг кристаллического термолизина. Через 15 с (25° С) раствор заметно мутнел, а через 3 мин выпадал осадок. Реакционную смесь выдерживали при 5° С в течение 12 ч, образовавшийся осадок отделяли центрифугированием и промывали в центрифужной пробирке 0,5 н. NaHCO₃ (3×1 мл), водой (1×1 мл), 5% лимонной кислотой (3×1 мл), водой (2×1 мл), высушивали и взвешивали. Выход 49,9 мг.

Препаративный вариант. Смесь 353 мг (1200 мкмоль) Z-Ala-Ala-OH и 302 мг (1200 мкмоль) H-Leu-pNA растворяли в 1,5 мл диметилформамида, при перемешивании прибавляли 4,5 мл $5 \cdot 10^{-2}$ М раствора CaCl₂, pH 7,3, и вносили 3,5 мг термолизина. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при 25° С, разбавляли 3 мл воды и оставляли на 12 ч в 5° С. Осадок промывали как обычно и высушивали. Выход 594 мг.

Вос-Ala-Ala-Leu-pNA. а) Смесь 1 г (3,84 ммоль) Вос-Ala-Ala-OH и 0,97 г (3,84 ммоль) H-Leu-pNA растворяли в 2,5 мл диметилформамида и медленно прибавляли при перемешивании 6 мл $5 \cdot 10^{-2}$ М раствора CaCl₂, pH 7,4, затем вносили 0,5 мл раствора металлопротеиназы *B. subtilis*. Через 3 мин раствор мутнел, а через 15 мин выпадал осадок. Перемешивали при комнатной температуре еще 15 мин и выдерживали при 5° С в течение 4 ч. Осадок отфильтровывали и промывали на фильтре: 0,5 н. NaHCO₃ (4×25 мл), водой (1×25 мл), 5% лимонной кислотой (4×25 мл), водой (2×25 мл), высушивали в эксикаторе. Выход 1,02 г.

б) К раствору 27,4 мг (100 мкмоль) Вос-Ala-Ala-OMe и 25,2 мг (100 мкмоль) H-Leu-pNA в 100 мкл хлороформа добавляли 200 мкл $5 \cdot 10^{-2}$ М CaCl₂ и при энергичном перемешивании вносили 0,5 мг термолизина. Перемешивали при 25° С 15 мин и оставляли на 12 ч при 5° С. Осадок отделяли центрифугированием и промывали в центрифужной пробирке как обычно, высушивали и взвешивали. Выход 18,1 мг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lyublinskaya L. A., Belyaev S. V., Strongin A. Ya., Matyash L. F., Levin E. D., Stepanov V. M. *Analyt. Biochem.*, 1974, v. 62, № 2, p. 371–376.
2. Изотова Л. С., Городецкий Д. И., Янонис В. В., Баратова Л. А., Белянова Л. П., Тимохина Е. А., Стронгин А. Я., Степанов В. М. *Биоорганическая химия*, 1978, т. 4, № 3, с. 397–403.
3. Markaryan A. N., Ostoslavskaya V. I., Svyadas V. K., Yakusheva L. D., Lyublinskaya L. A., Strongin A. Ya., Stepanov V. M. *Int. J. Biochem.*, 1981, v. 13, № 2, p. 201–206.
4. Люблинская Л. А., Якушева Л. Д., Степанов В. М. *Биоорганическая химия*, 1977, т. 3, № 2, с. 273–279.
5. Oka T., Morihara K. J. *Biochem.*, 1980, v. 88, № 3, p. 807–813.
6. Isowa Y., Ohmori M., Ichikawa T., Kurita H., Sato M., Mori K. *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1977, v. 50, № 10, p. 2762–2765.
7. Kuhl P., Könnicke A., Döring G., Däume H., Jakubke H.-D. *Tetrahedron Lett.*, 1980, № 21, p. 893–896.
8. Ваганова Т. И., Ласовецкая Л. В., Стронгин А. Я., Люблинская Л. А., Степанов В. М. *Биохимия*, 1976, т. 41, № 12, с. 2229–2236.

9. Bosshard H. R., Schechter J., Berger A. *Helv. chim. acta*, 1973, v. 56, № 2, p. 717—723.
10. Раменский Е. В., Ботвинник М. М., Бейсембаева Р. У. *Химия природн. соедин.*, 1968, т. 4, № 1, с. 23—27.
11. Tuppy H., Wiesbauer U., Wintersberger E. *Z. Physiol. Chem.*, 1962, B. 329, S. 278—288.

Поступила в редакцию
9.VI.1982

ENZYMATIC SYNTHESIS OF PEPTIDE SUBSTRATES FOR SERINE PROTEINASES

LYUBLINSKAYA L. A., VOYUSHINA T. L., STEPANOV V. M.

Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow

Thermolysin and metalloproteinase from *Bac. subtilis* were used to prepare the following peptide substrates of serine proteinases: Z-Gly-Gly-Leu-pNA, Z-Ala-Ala-Leu-pNA, Z-Gly-Ala-Leu-pNA, Z-Ala-Ala-Phe-pNA, Boc-Ala-Ala-Leu-pNA by condensation of Z- or Boc dipeptide derivatives with respective p-nitroanilides (L- or DL-Leu-pNA and L-Phe-pNA). The yields of optically pure products were 76—95%. Thermolysin was found to catalyze also the coupling of Z-Ala-Ala-OME with Leu-pNA.