



УДК 577.152.341:543.544

ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ БИОСПЕЦИФИЧЕСКОГО СОРБЕНТА
ДЛЯ АМИНОПЕПТИДАЗЛюблинская Л. А., Юсупова М. П., Ваганова Т. И.,
Иванова Н. М., Степанов В. М.Всероссийский научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Проведен синтез биоспецифического сорбента для аминокептидаз — Н-Thr(Bu^t)-Phe-Pro-Gly-аминосилохрома по новому методу, основанному на принципах твердофазного синтеза, с наращиванием лиганда непосредственно на матрице сорбента. В качестве вставки между аминосилохромом и лигандом — Н-Thr(Bu^t)-Phe-Pro-OH, конкурентным ингибитором аминокептидаз, использовали глицин, к которому последовательно карбодимидным методом присоединяли ацилированные аминокислоты. В результате получен сорбент с содержанием лиганда 138 мкмоль/г сухого сорбента. Биоспецифическая хроматография на тетрапептидаминосилохроме позволила очистить лейцинаминопептидазу *Aspergillus oryzae* в 17 раз с выходом 64%, лейцинаминопептидазу *Bacillus thuringiensis* — в 9,8 раза с таким же выходом и фенилаланинаминопептидазу *Trichoderma koningii* — в 16,6 раза с выходом 84%.

В настоящее время наиболее предпочтительным методом препаративной химии ферментов стала аффинная хроматография. Однако для аминокептидаз она применяется сравнительно недавно из-за отсутствия подходящих лигандов, не гидролизующихся сорбированным ферментом во время хроматографии. Такими лигандами могут служить природные конкурентные ингибиторы на основе статина [1, 2], а также аналоги субстратов лейцинаминопептидаз [3, 4].

Цюбер и соавт. [5] обнаружили, что пептид Н-Thr(Bu^t)-Phe-Pro-OH является хорошим конкурентным ингибитором для лейцинаминопептидаз из почек свиньи. Позднее было показано, что он избирательно ингибирует лейцинаминопептидазы из почек свиньи и хрусталика глаза быка с константами ингибирования $1 \cdot 10^{-5}$ М, но не взаимодействует с аминокептидазой М из почек свиньи и аминокептидазой *I B. stearothermophilus* [6]. Сродство этого пептида к ряду аминокептидаз и устойчивость к их действию, а также к гидролизу другими протеолитическими ферментами делают его перспективным лигандом для аффинной хроматографии аминокептидаз.

Люблинская и соавт. [7, 8] синтезировали Н-Thr(Bu^t)-Phe-Pro-АН-сфазу 4В и Н-Thr(Bu^t)-Phe-Pro-Gly-аминосилохром и использовали их для выделения лейцинаминопептидазы *Asp. oryzae*. Ими наблюдалась специфическая десорбция фермента L-лейцинамидом, свидетельствующая об участии активного центра в связывании лейцинаминопептидазы с сорбентом. Сорбенты, содержащие этот лиганд, оказались эффективными при выделении лейцинаминопептидазы *Asp. oryzae* [9].

Недостатком этих сорбентов была трудоемкость получения трипептида Thr(Bu^t)-Phe-Pro обычными методами многостадийного пептидного синтеза. Кроме того, в зависимости от метода присоединения 83–98% пептида не вступало в реакцию с носителем, что приводило к большим потерям ценного соединения. Ввиду этого мы синтезировали аналогичный сорбент — Н-Thr(Bu^t)-Phe-Pro-Gly-аминосилохром (тетрапептидаминосилохром) — техникой твердофазного синтеза, наращивая лиганд непосредственно на матрице сорбента. В качестве вставки между лигандом и матри-

Использованы сокращения аминокислот, предложенные комиссией IUPAC-IUB по биохимической номенклатуре. Все аминокислоты L-ряда, Nps — o-нитрофенилсульфенил-.

Таблица 1

Ступенчатое присоединение N-ациламинокислот
к аminosилохрому С-80

Аминокислота	Присоединение аминокислот	
	мкмоль/г сухого сорбента	% от содержания предыдущей аминокислоты
Gly	215	53,7 *
Pro	206	96,4
Phe	178	86,5
Thr	138	77,5

* Отнесено к содержанию аминогрупп в аminosилохроме С-80.

цей использовали глицин. Удлинение лиганда на один аминокислотный остаток способствовало лучшему связыванию фермента с сорбентом в процессе хроматографии. В качестве твердой фазы использовали аminosилохром С-80 — продукт обработки силохрома γ -аминопропилтриэтоксисилоном, который и ранее применяли в качестве матрицы при получении сорбентов [8]. Это производное двуокиси кремния устойчиво в органических растворителях, к действию ферментов, допускает большие скорости потока, что существенно при выделении ферментов.

Последовательное присоединение аминокислот к аminosилохрому проводили карбодиимидным методом. Взаимодействие N-защитенных аминокислот с дициклогексилкарбодиимидом дает труднорастворимую дициклогексилмочевину, которая, оседая на сорбенте, препятствует проникновению реагентов и растворителя в поры силохрома и затрудняет присоединение лиганда. Избежать этого помогла предварительная обработка бензилоксикарбониламинокислот дициклогексилкарбодиимидом с удалением образовавшейся дициклогексилмочевины [10]. Получающиеся при этом активированные производные, вероятно всемо симметричные ангидриды бензилоксикарбониламинокислот, без выделения вводили в реакцию с аminosилохромом. Такой прием стандартизировал методику присоединения ациламинокислот к сорбенту и позволил получить носитель с высоким содержанием лиганда (табл. 1). Защитную бензилоксикарбонильную группу удаляли обработкой бромистым водородом в ледяной уксусной кислоте. Исключение составлял *O*-трет-бутиловый эфир треонина, при введении которого бензилоксикарбонильная группа неприемлема, так как в условиях ее снятия будет проходить гидролиз кислотолабильной эфирной связи *O*-трет-бутилового эфира треонина. В этом случае для защиты аминогруппы применяли *o*-нитрофенилсульфенильную группу (Nps), легко удаляемую обработкой тиомочевинной в смеси метанол — уксусная кислота (4 : 1) [11].

Как видно из табл. 1, присоединение глицина к носителю прошло на 54%. После повторной обработки аminosилохрома N-бензилоксикарбонилглицином содержание глицина на 1 г сорбента осталось неизменным. По-видимому, это объясняется тем, что непрореагировавшие аминогруппы аminosилохрома стерически недоступны для образования пептидной связи. Однако не исключено, что они могли бы электростатически взаимодействовать с хроматографируемыми белками, мешая избирательной сорбции на сорбенте. Уменьшение неспецифической сорбции достигалось ацилированием уксусным ангидридом аминогрупп силохрома, не вступивших в реакцию с N-бензилоксикарбонилглицином. Последующее присоединение пролина и фенилаланина к глициламиноилохрому составляло соответственно 96,4 и 86,5% от содержания предыдущей аминокислоты. Более низкий выход на стадии присоединения *O*-трет-бутилтреонина (77,5%) частично объясняется разрушением треонина при гидролизе образца перед аминокислотным анализом.

Полученный сорбент содержал 138 мкмоль пептида на 1 г сухого силохрома. Это многократно превышало содержание связанного лиганда в

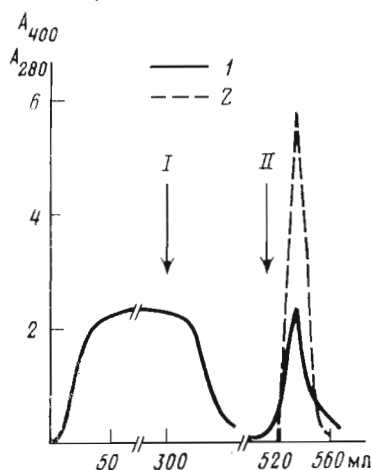
Очистка аминопептидаз на Н-Thr(Bu^t)-Phe-Pro-Gly-аминосилохроме

Аминопептидаза	Нанесено			Элюировано			Выход по активности, %	Очистка, n раз
	Белок, ОЕ ₂₈₀	Активность		Белок, ОЕ ₂₈₀	Активность			
		общая, мкмоль/мин	удельная, мкмоль/мин ОЕ ₂₈₀		общая, мкмоль/мин	удельная, мкмоль/мин ОЕ ₂₈₀		
<i>Asp. oryzae</i>	870	68,3	0,078	32,8	44,0	1,34	64	17
<i>B. thuringiensis</i>	186	48,8	0,26	12,5	31,0	2,54	64	9,8
<i>T. koningii</i>	57,6	52,1	0,9	3,0	38,0	12,3	66	13,6
	285	172	0,6	14,4	145	10,0	84	16,6

ранее синтезированном сорбенте — Н-Thr(Bu^t)-Phe-Pro-АН-сефарозе 4В (4,3 мкмоль/мл сорбента) [9].

Повышенное содержание лиганда позволяло использовать микроколонки, что значительно сокращало время хроматографии. С другой стороны, наличие большого числа свободных аминогрупп лиганда должно было приводить к возникновению подобных процессов — ионообменной и, возможно, гидрофобной хроматографии. Для снижения электростатического взаимодействия и нежелательной неспецифической сорбции примесных белков и особенно пигментов сорбцию аминопептидаз проводили в 1 М NaCl.

Тетрапептидаминосилохром был применен для очистки лейцинаминопептидаз *Aspergillus oryzae* и *Bacillus thuringiensis*, а также фенилаланин-



Хроматография аминопептидазы *Asp. oryzae* (600 мг) на Н-Thr(Bu^t)-Phe-Pro-Gly-аминосилохроме (колонка 1×17 см), уравновешенном 1 М NaCl рН 5,6, с 10⁻⁵ М СоСl₂ (буфер А). Контроль по белку (A_{280} , 1) и по активности (A_{400} , 2). Стрелками указано начало промывания буфером А (I) и 15% изопропиловым спиртом в буфере А (II)

аминопептидазы *Trichoderma koningii*. Все три фермента сорбировались на колонке количественно, что указывало на их специфическое взаимодействие с лигандом.

Ввиду того что многие протеолитические ферменты склонны к связыванию гидрофобных пептидов, следовало учитывать возможность взаимодействия с лигандом примесных белков. Действительно, при хроматографии на тетрапептидаминосилохроме фенилаланинаминопептидазы *T. koningii* было замечено, что наряду с ней сорбировалась сериновая протеиназа, расщепляющая пептидные связи гидрофобных аминокислот, в частности отщепляющая *n*-нитроанилин от Z-Ala-Ala-Leu-pNA. Снижение вклада гидрофобной сорбции на сорбенте, в частности сорбции сериновой протеиназы в описанном выше опыте, достигалось максимальным насыщением сорбента аминопептидазами, которые, обладая более сильным сродством к лиганду, вытесняли другие ферменты. Хроматография в таких

условиях приводила к повышению степени очистки аминоксипептидаз и к увеличению их выхода. Например, в случае хроматографии фенилаланин-аминоксипептидазы *T. koningii* степень очистки возрасала с 13,6 до 16,6 раза, а выход увеличивался с 66 до 84% (см. табл. 2).

Большое влияние на эффективность очистки оказывают пигменты, которые, как правило, присутствуют во всех исследуемых препаратах. Несмотря на то что с сорбентом связывалась небольшая часть пигментов, от опыта к опыту происходило их постепенное накопление на колонке, что ухудшало качество очистки аминоксипептидаз. Степень очистки аминоксипептидаз на тетрапептидаминосилохроме зависит от чистоты наносимого препарата и колеблется для лейцинаминноксипептидазы *Asp. oryzae* от 12 до 21, а для фенилаланинаминноксипептидазы *T. koningii* — от 13 до 33 раз (рисунки).

Все три аминоксипептидазы проявляли несколько различающееся сродство к сорбенту, поэтому их элюировали буферными растворами, содержащими разные концентрации изопропилового спирта (15–25%).

Несмотря на избирательность сорбента по отношению к хроматографируемым аминоксипептидазам, для полной очистки их необходимо было провести еще гель-фильтрацию, после чего получали практически гомогенные ферменты [12]. Так, фенилаланинаминноксипептидаза *T. koningii* после аффинной хроматографии, по данным электрофореза в полиакриламидном геле, содержала всего одну дополнительную зону белка с более низким молекулярным весом. Последний легко отделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-75.

Применение биоспецифического сорбента в сочетании с другими методами очистки ферментов позволило получить все три аминоксипептидазы в практически гомогенном состоянии и с высокими выходами, чего нельзя было добиться при использовании обычных методов выделения ферментов.

Синтезированный тетрапептидаминосилохром — сорбент многократного использования (на одном образце удается провести не менее 30 опытов) — сорбирует аминоксипептидазы, различающиеся физико-химическими свойствами и происхождением. Очевидно, он может служить аффинным сорбентом для выделения лейцинаминноксипептидаз из других источников.

Экспериментальная часть

В работе использовали *N*-бензилоксикарбониламиноксипептиды (Reanal, Венгрия), *n*-нитроанилид лейцина (Serva, ФРГ), *n*-нитроанилид фенилаланина, а также аминосилохром С-80, содержащий 400 мкмоль аминоксипептидных групп на 1 г сухого сорбента, производства НПО «Биохимреактив» (г. Олайне).

Промывание сорбента на всех стадиях проводили при 20°С и слабом перемешивании в течение 5 мин. После присоединения каждой последующей аминоксипептиды и стандартных промывок отбирали аликвоту модифицированного силихрома, дополнительно промывали эфиром, высушивали и гидролизовали 24 ч 5,7 н. НСl при 105°С. Аминоксипептидный состав определяли на автоматическом анализаторе фирмы Bio Cal BC 200 (ФРГ) *.

Использовали предварительно очищенную активированным углем и последовательной хроматографией на QAE-сефадексе А-50 и DEAE-сефадексе лейцинаминноксипептидазу *Asp. oryzae* [13] и лейцинаминноксипептидазу из диализованной культуральной жидкости *B. thuringiensis var. finitimus*. Фенилаланинаминноксипептидазу получали из экстракта *T. koningii* с последующим осаждением сульфатом аммония и очисткой на акрилексе Р-60 и QAE-сефадексе А-50. Активность аминоксипептидаз определяли по расщеплению *n*-нитроанилидов лейцина и фенилаланина [13].

Z-Gly-аминосилохром. 10 г аминосилохрома (4 ммоль аминоксипептидных групп) выдерживали 10 мин в 30 мл абс. диметилформамида, обрабатывали 1,68 мл

* Авторы благодарят Е. А. Тимохину за выполнение аминоксипептидного анализа образцов сорбента.

(12 ммоль) триэтиламина, промывали 25 мл диметилформамида и повторно обрабатывали 0,84 мл (6 ммоль) триэтиламина, промывали абс. диметилформамидом (3×25 мл). 2,51 г (12 ммоль) Z-глицина и 2,49 г (12 ммоль) дициклогексилкарбодиимида в 10 мл абс. диметилформамида перемешивали 10 мин при 0° С. Дициклогексилмочевину отфильтровывали, фильтратом обрабатывали в течение 2 ч аминоксилохром при перемешивании. Отмывали смолу от избытка реагентов абсолютным диметилформамидом (3×25 мл) и проводили повторную обработку Z-глицином, активированным дициклогексилкарбодиимидом, в тех же условиях. Z-Gly-аминосилохром промывали диметилформамидом (3×25 мл), спиртом (3×30 мл), хлористым метиленом (3×30 мл). Аликвоту для аминокислотного анализа промывали эфиром (3×20 мл) и высушивали в вакууме. Содержание глицина составляло 215 мкмоль на 1 г сухого сорбента (54%).

Ацетилирование непрореагировавших аминогрупп Z-Gly-аминосилохрома. К 10 г Z-Gly-аминосилохрома (1,85 ммоль аминогрупп) в 30 мл абс. диметилформамида прибавляли 2,4 мл (17 ммоль) триэтиламина, перемешивали 3 мин и добавляли 1,6 мл (17 ммоль) свежеперегнанного уксусного ангидрида. Через 2 ч смолу промывали диметилформамидом (3×30 мл), спиртом (3×30 мл), хлористым метиленом (3×30 мл) [14].

H-Gly-аминосилохром. 10 г Z-Gly-аминосилохрома промывали уксусной кислотой (3×30 мл) и обрабатывали 30 мин 20 мл HBr/AsOH. Промывали уксусной кислотой (4×20 мл), спиртом (3×30 мл), хлористым метиленом (3×30 мл). 10 г H-Gly-аминосилохрома (2,15 ммоль аминогрупп) обрабатывали 0,91 мл (6,45 ммоль) триэтиламина в 20 мл хлористого метилена, промывали 20 мл хлористого метилена и повторно обрабатывали 0,45 мл (3,22 ммоль) триэтиламина в 20 мл хлористого метилена. Промывали 20 мл хлористого метилена и абсолютным диметилформамидом (3×30 мл). Аналогично H-Gly-аминосилохрому получали H-Pro-Gly- и H-Phe-Pro-Gly-аминосилохром. Содержание пролина и фенилаланина на 1 г сухого сорбента составляло 206 и 178 мкмоль соответственно (см. табл. 1).

Nps-Thr(Bu')-Phe-Pro-Gly-аминосилохром. 10 г H-Phe-Pro-Gly-аминосилохрома (1,78 ммоль аминогрупп) в 10 мл хлористого метилена обрабатывали 5 мин 0,315 мл (2,25 ммоль) триэтиламина, промывали хлористым метиленом (2×20 мл) и 10 мл абс. диметилформамида. 1,21 г (3,75 ммоль) Nps-Thr(Bu')-OH [15] и 0,77 г (3,75 ммоль) дициклогексилкарбодиимида в 5 мл абс. диметилформамида перемешивали 15 мин при 0° С. Дициклогексилмочевину отфильтровывали, фильтрат прибавляли к модифицированному силохрому, выдерживали 2 ч, затем промывали хлористым метиленом (5×20 мл), спиртом (3×20 мл) и хлористым метиленом (3×20 мл). Содержание треонина составляло 138 мкмоль на 1 г сухого сорбента (78%).

H-Thr(Bu')-Phe-Pro-Gly-аминосилохром. 10 г Nps-Thr(Bu')-Phe-Pro-Gly-аминосилохрома (1,38 ммоль Nps-групп) промывали абсолютным метанолом (3×15 мл), 10 мл смеси абс. метанол — уксусная кислота (4 : 1), обрабатывали 45 мин 3,07 г (40 ммоль) тиомочевины в 30 мл смеси абс. метанол — уксусная кислота (4 : 1). Промывали смолу метанолом (5×20 мл) и хлористым метиленом (3×20 мл).

Хроматография лейцинаминопептидазы Asp. oryzae. На колонку с тетрапептидаминосилохромом (1×17 см), уравновешенным 1 М NaCl в 0,05 М ацетатном буфере, pH 5,6, с 10⁻⁵ М CoCl₂, со скоростью 7,5 мл/30 мин наносили 600 мг (870 ОЕ₂₈₀) в 300 мл того же буфера (см. табл. 2). Колонку промывали буфером со скоростью 4 мл/10 мин до минимального поглощения при 280 нм (210 мл). Фермент элюировали 15% раствором изопропилового спирта в исходном буфере.

Хроматография лейцинаминопептидазы B. thuringiensis. На колонку с тетрапептидаминосилохромом (1×17 см), уравновешенным 1 М NaCl в 0,05 М боратном буфере, pH 7,5, с 10⁻⁵ М CoCl₂, наносили диализованную против этого буфера культуральную жидкость *B. thuringiensis* (186 ОЕ₂₈₀ в 155 мл) со скоростью 6 мл/10 мин (см. табл. 2). Промывали буфером

(62 мл) с той же скоростью и элюировали аминопептидазу при добавлении 20% изопропилового спирта к исходному буферу.

Хроматография фенилаланинаминопептидазы *T. koningii*. На колонку (1×2,4 см) с тетрапептидаминосилохромом, уравновешенным 1 М NaCl в 0,05 М боратном буфере, pH 8,0, с 10^{-5} М CoCl₂, наносили аминопептидазу (285 ОЕ₂₈₀) в 75 мл того же буфера со скоростью 6 мл/ч, промывали колонку буфером (123 мл) до минимального поглощения при 280 нм. Аминопептидазу элюировали 25% изопропиловым спиртом с 1 М NaCl в 0,05 М боратном буфере, pH 8,8, с 10^{-5} М CoCl₂ со скоростью 3 мл/10 мин (см. табл. 2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Tobe H., Kojima F., Aoyagi T., Umezawa H. *Biochim. et biophys. acta*, 1980, v. 613, № 2, p. 459–468.
2. Röhm K. H. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1982, B. 363, № 6, S. 641–649.
3. Turková J., Valentová O., Coupek J. *Biochim. et biophys. acta*, 1976, v. 420, № 2, p. 309–315.
4. Kettner Ch., Rodriguez-Absi J., Glover G. J., Prescott J. M. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1974, v. 162, № 1, p. 56–63.
5. Jost R., Masson A., Zuber H. *FEBS Lett.*, 1972, v. 23, № 2, p. 211–214.
6. Jost R. *FEBS Lett.*, 1973, v. 29, № 1, p. 7–9.
7. Люблинская Л. А., Ваганова Т. И., Оксенойт Е. С., Баландина Г. Н., Филиппова И. Ю., Степанов В. М. Всес. симпозиум «Методы получения высокоочищенных ферментов». Тез. докл. Вильнюс, 1978, с. 84.
8. А. с. № 1074877 (СССР). Способ получения биоспецифического сорбента для очистки аминопептидаз/Степанов В. М., Люблинская Л. А., Ваганова Т. И., Юсупова М. П., Иванова Н. М., Оксенойт Е. С. Заявл. 9.06.81, № 32972222/23-04.— Опубл. в Б. И., 1984, № 7.
9. Люблинская Л. А., Ваганова Т. И., Иванова Н. М., Юсупова М. П., Оксенойт Е. С., Якушева Л. Д., Степанов В. М. *Биоорганич. химия*, 1984, т. 10, № 2, с. 188–194.
10. Hagenmaier H., Frank H. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1972, B. 353, № 12, S. 1973–1976.
11. Kessler W., Iselin B. *Helv. chim. acta*, 1966, v. 49, № 4, p. 1330–1344.
12. Ваганова Т. И., Люблинская Л. А., Иванова Н. М., Юсупова М. П. II Всес. симпозиум по химии протеолитических ферментов. Тез. докл. Углич, 1979, с. 64–65.
13. Иванова Н. М., Ваганова Т. И., Стронгин А. Я., Степанов В. М. *Биохимия*, 1977, т. 42, № 5, с. 843–849.
14. Стюарт Дж., Янг Дж. *Твердофазный синтез пептидов*. М.: Мир, 1971, с. 80–81.
15. Wünsch E., Fontana A. *Chem. Ber.*, 1968, B. 101, № 1, S. 323–325.

Поступила в редакцию
6.IV.1984

SOLID-PHASE SYNTHESIS OF BIOSPECIFIC SORBENT FOR AMINOPEPTIDASES

LYUBLINSKAYA L. A., YUSUPOVA M. P., VAGANOVA T. I.,
IVANOVA N. M., STEPANOV V. M.

Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow

A biospecific sorbent for aminopeptidases, H-Thr(Bu^t)-Phe-Pro-Gly-aminosilochrom, has been prepared relying on a new solid-phase related procedure that involves the elongation of the ligand directly on the sorbent matrix. The role of the spacer between aminosilochrom and the ligand, H-Thr(Bu^t)-Phe-Pro-OH (aminopeptidase competitive inhibitor), played a glycine residue. Acylamino-acids were sequentially attached to the latter by the carbodiimide method. The prepared sorbent has 138 μ mole ligand/g dry sorbent. Biospecific chromatography on the title sorbent afforded 17-fold purified *Aspergillus oryzae* leucine aminopeptidase and 9,8-fold purified *Bacillus thuringiensis* leucine aminopeptidase in 64% yields; phenylalanine aminopeptidase from *Trichoderma koningii* was purified 16,6-fold in a 84% yield.