



УДК 577.112.6 : 577.152.34'135

© 1991 г.

Т. Л. Воюшина, Е. Ю. Терентьева, В. Ф. Позднев,
А. В. Гайда, М. Ю. Гололобов, Л. А. Люблинская,
В. М. Степанов

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ АЦИЛПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ *n*-НИТРОАНИЛИДЫ ОСНОВНЫХ АМИНОКИСЛОТ

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

Предложен метод синтеза ацилированных пептидов, содержащих на С-конце *n*-нитроанилиды аргинина или лизина, с помощью реакции ацильного переноса, катализируемой сериновой протеиназой *Bacillus subtilis*, шт. 72. Карбоксильными компонентами являются эфиры ацилди- и трипептидов, в состав которых могут входить как *L*-, так и *D*-аминокислоты. Синтез проводили при избытке карбоксильного компонента. Увеличение концентрации диметилформамида в реакционной системе способствует подавлению ферментативного омыления исходного эфира ацилпептида и вторичного гидролиза продукта по образованной связи. Вследствие инактивации фермента при высокой концентрации диметилформамида оптимальное количество последнего в реакционной смеси составляет 70—80%.

Для количественного определения протеиназ, по специфичности близких к трипсину, в частности ферментов системы гемостаза, удобны хромогенные субстраты — пептиды, содержащие в С-концевом положении *n*-нитроанилид аргинина или лизина. Химический синтез таких пептидов осложнен известной лабильностью *n*-нитроанилидной группы в условиях снятия защитных групп, а также необходимостью защиты функциональных групп боковых цепей аргинина и особенно лизина.

В литературе описаны ферментативные реакции образования пептидной связи, в которых донорами аминокрупп служили производные аргинина и лизина. В качестве катализаторов использовались химотрипсин [1, 2], трипсин [3], карбоксипептидаза Y [1, 4], а также папаин [5]. В нашей лаборатории разработан способ синтеза *n*-нитроанилидов N-ацилпептидов, катализируемый сериновыми протеиназами семейства субтилизина, в том числе и сериновой протеиназой *Bacillus subtilis*, шт. 72, исходя из эфиров N-ацилпептидов и *n*-нитроанилидов гидрофобных аминокислот [6]. Он основан на так называемом кинетическом подходе, заключающемся в ферментативном переносе ацильной части активированного по карбоксильной группе производного аминокислоты или пептида на нуклеофильный акцептор — аминокомпонент. Если аминокомпонентами являются *n*-нитроанилиды гидрофобных аминокислот, продукт реакции — *n*-нитроанилид N-ацилированного три- или тетрапептида выпадает в осадок, что предохраняет его от дальнейших превращений. Пептиды же, содержащие остатки аргинина и лизина, хорошо растворимы в реакционных системах, поэтому побочные реакции при их синтезе более вероятны, что делает необходимым изучение кинетики накопления различных компонентов. Что касается свойств сериновой протеиназы *B. subtilis*, шт. 72, то показано, что этот фермент обладает широкой специфичностью [7]. Это позволяло надеяться, что он может быть использован в качестве катализатора при синтезе пептидов, содержащих *n*-нитроанилиды аргинина и лизина. Выяснению этой возможности и по-

Сокращения: pNA — *n*-нитроанилидная группа. Все аминокислоты, кроме особо указанных, *L*-ряда.

Рис. 1. Зависимости содержания компонентов реакционных смесей от времени при синтезе Z-Ala-Ala-Leu-Arg-pNA (а) и Z-Ala-Ala-Phe-Arg-pNA (б). [DMF] = 20%. Условия эксперимента см. в «Экспер. части». 1 — Z-Ala-Ala-Xaa-OCH₃; 2 — Z-Ala-Ala-Xaa-OH; 3 — Z-Ala-Ala-Xaa-Arg-pNA, Xaa = Leu (а) или Phe (б)

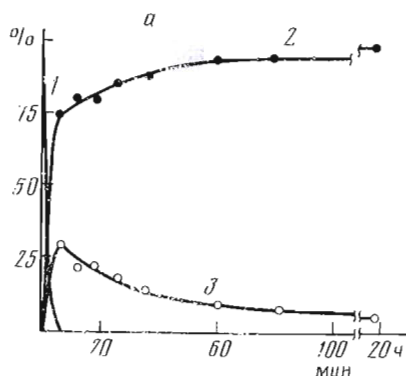


Рис. 2. Зависимость содержания компонентов реакционных смесей от времени при синтезе Z-D-Ala-Leu-Arg-pNA (а) и Z-D-Ala-Leu-Lys-pNA (б). [DMF] = 20%. Условия эксперимента см. в «Экспер. части». 1 — Z-D-Ala-Leu-OCH₃; 2 — Z-D-Ala-Leu-OH; 3 — Z-D-Ala-Leu-Xaa-pNA; Xaa = Arg (а) или Lys (б)

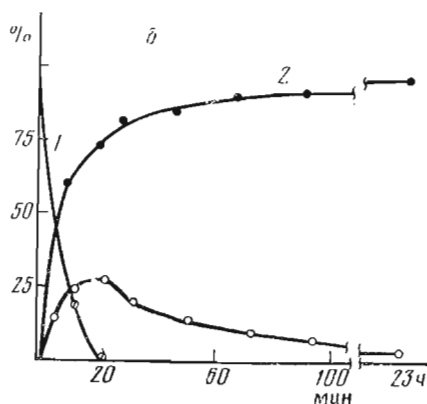


Рис. 1

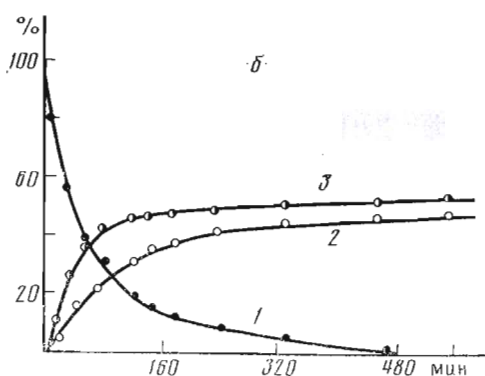
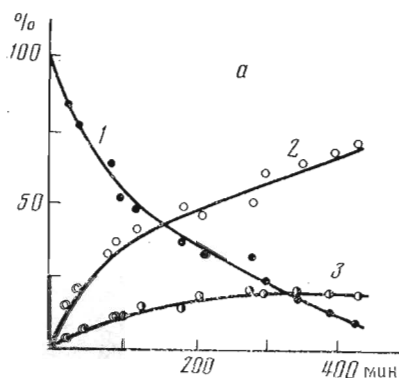


Рис. 2

следующей оптимизации разрабатываемого подхода и посвящена данная работа.

Для ферментативного ацилирования *n*-нитроанилида аргинина применялись эфиры *N*-ацилпептидов — Z-Ala-Ala-Leu-OCH₃ и Z-Ala-Ala-Phe-OCH₃, хорошо соответствующие специфичности используемой протеиназы [7]. При высоком содержании воды в реакционной среде (20% DMF) наблюдается образование *n*-нитроанилида тетрапептида Z-Ala-Ala-Leu-Arg-pNA, однако его выход в этих условиях невысок (если не оговорено специально, выход целевого продукта синтеза определялся по степени превращения аминокомпонента). Максимальный выход продукта (25%) достигается уже через 4,5 мин (табл. 1). Далее начинается гидролиз целевого пептида по синтезированной связи, который приводит к его расщеплению на Z-Ala-Ala-Leu-OH и Arg-pNA за 20 ч (рис. 1а). Следует отметить, что параллельно с переносом ацильной группы на нуклеофил происходит ее перенос на воду с образованием Z-Ala-Ala-Leu-OH.

Таблица 1

Синтез Arg(Lys)-содержащих пептидов реакцией ацильного переноса на Хаа-pNA (где Хаа = Arg или Lys), катализируемой сериновой протеиназой *B. subtilis*

Синтезируемый пептид	Концентрация исходных компонентов			[DMF], %	Время, реакции, ч	Выход продукта, %
	RCOOCH ₃ , мМ	[Хаа-pNA], мМ	[E], мкМ			
Z-Ala-Ala-Leu-Arg-pNA	38,8	19,4	0,24	20	0,075	25
	152	76	8,7	83	22	84 (50) *
Z-Ala-Ala-Phe-Arg-pNA	38,8	19,4	0,24	40	0,36	35
	168	88	9,6	80	0,08	30
Z-Ala-Ala-Arg-pNA	168	88	9,6	80	4	37
Z-D-Ala-Leu-Arg-pNA	40	20	0,17	20	7	20
Z-D-Ala-Leu-Lys-pNA	40	20	0,19	20	8	50
Z-D-Ala-Leu-Arg-pNA	200	100	138	70	7	70 (46) *

* Выход при выделении в препаративном опыте.

Качественно аналогичная картина наблюдается при ацилировании *n*-нитроанилида аргинина эфиром Z-Ala-Ala-Phe-OCH₃ при тех же соотношениях исходных компонентов. Вследствие большей гидрофобности Z-Ala-Ala-Phe-OCH₃ для более полного его растворения использовался 40% DMF. Выход Z-Ala-Ala-Phe-Arg-pNA достигает максимальной величины — 35% за 22 мин (табл. 1), после чего, как и в предыдущем случае, начинает сказываться вторичный гидролиз продукта по синтезированной связи (рис. 1б). Таким образом, обе эти реакции представляют собой типичные случаи кинетически контролируемого синтеза.

Небольшой выход целевого пептида в растворах с высоким содержанием воды обусловлен скорее всего значительной ролью гидролитических процессов. Увеличение концентрации DMF с 40 до 92% приводит к более чем двукратному уменьшению содержания продукта гидролиза в реакционной смеси. При этом, однако, остается более 20% непрореагировавшего исходного сложного эфира. Спустя 10—20 мин процентный состав реакционной смеси перестает меняться. Иначе говоря, в этих условиях, несмотря на наличие в растворе непрореагировавших исходных веществ, реакция останавливается. Это можно объяснить инактивацией фермента в присутствии высокой концентрации DMF. Действительно, при выдерживании сериновой протеиназы *B. subtilis* в 92% DMF ее активность резко падает (табл. 2). Таким образом, чтобы компенсировать инактивацию органическим растворителем для получения высокого выхода *n*-нитроанилида тетрапептида, потребовалось бы использование высоких концентраций фермента.

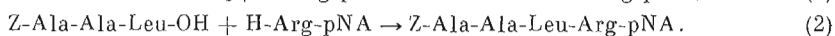
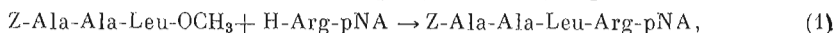
При концентрации DMF порядка 80% наблюдается значительно меньшее падение активности сериновой протеиназы, и в 83% DMF выход Z-Ala-Ala-Leu-Arg-pNA составил 40% через 5 мин, а через 22 ч вырос еще на 44% и составил 84%. Следует отметить, что через 4 ч в реакционной смеси уже не обнаруживается Z-Ala-Ala-Leu-OCH₃ и ацилирующим

Таблица 2

Влияние диметилформамида на стабильность субтилизна *B. subtilis*, шт. 72

Содержание DMF, %	Время инкубации, ч	Остаточная активность, %
62	0,5	50
	2	16
	4,5	1,25
92	0,5	18
	0,75	3,5

агентом становится Z-Ala-Ala-Leu-OH. Иначе говоря, происходит переход от кинетического к равновесному синтезу, и таким образом, Z-Ala-Ala-Leu-Arg-pNA является совокупным продуктом двух реакций:



Это предположение подтверждается тем, что в аналогичных условиях в 78% DMF выход продукта прямой конденсации Z-Ala-Ala-Leu-OH с Arg-pNA составил (за 5 ч) 52%, т. е. величину того же порядка, что и «дополнительное» возрастание общего выхода продукта за счет реакции 2. Сдвиг равновесия, необходимый для осуществления прямого синтеза по реакции 2, очевидно, осуществляется за счет изменения pK_a карбоксильного компонента, вызванного присутствием органического растворителя в реакционной смеси [8].

Изучение специфичности используемой протеиназы показало [7], что N-защищенные производные дипептидов могут выступать в качестве гидролизуемых субстратов, хотя значительно уступают по кинетическим параметрам аналогичным производным трипептидов. Поэтому представляло интерес исследовать возможность использования эфиров ацилдипептидов в качестве карбоксильных компонентов в реакциях ацильного переноса. Так, при ацилировании Arg-pNA производным Z-Ala-Ala-OCH₃ в 80% DMF выход *n*-нитроанилида трипептида составил 30% через 5 мин и почти не изменился (37%) за 4 ч. Использование 5-кратного избытка карбоксильного компонента и увеличение концентрации фермента в 10 раз практически не привело к повышению выхода целевого продукта. Невысокий выход Z-Ala-Ala-Arg-pNA, по-видимому, объясняется отсутствием прямой конденсации Arg-pNa и Z-Ala-Ala-OH, так как последний, вероятно, ацилирует фермент с крайне низкой скоростью. Аналогичный эффект малой эффективности Z-Ala-Ala-OH в равновесном пептидном синтезе, катализируемом субтилизином Карлсберг, ранее нами был уже установлен [6].

Известно, что в ряде случаев наличие *D*-аминокислоты в пептидных субстратах положительно сказывается на эффективности их гидролиза, катализируемого ферментами типа трипсина [9, 10]. Поэтому представляло интерес изучить возможность применения описанного выше подхода для синтеза *n*-нитроанилидов N-ацилпептидов, содержащих *D*-аминокислоты.

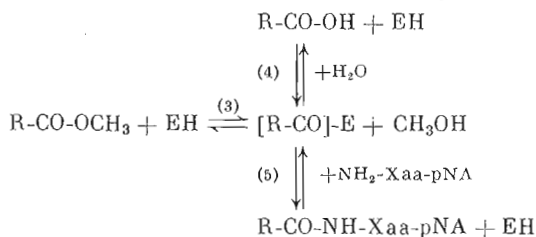
Ранее сообщалось, что *D*-аминокислоты могут входить в состав нуклеофильного акцептора [11—13]. Появились также работы, в которых показана возможность проведения ферментативного синтеза с использованием карбоксильных компонентов, содержащих *D*-аминокислоты, занимающую положение P_1 [14, 15]. По мнению авторов, наблюдаемое в этом случае снижение стереоспецифичности субтилизина обусловлено нарушением гидрофобных взаимодействий фермента и субстрата, вызванных высокой концентрацией органических растворителей в реакционной среде. Ранее нами было описано применение сериновой протеиназы *B. subtilis*, шт. 72, как катализатора в реакциях синтеза пептидной связи, однако производное *D*-аминокислоты использовалось только в качестве аминокомпонента [16]. Сходство многих свойств различных субтилизинов позволило предположить, что сериновая протеиназа *B. subtilis*, шт. 72, может катализировать синтез пептидов также исходя из карбоксильных компонентов, содержащих *D*-аминокислоты.

Для определения оптимальных условий реакции Z-*D*-Ala-Leu-OCH₃ + H-Arg-pNa → Z-*D*-Ala-Leu-Arg-pNA исследовали изменение состава реакционной смеси во времени (рис. 2а). Наличие *D*-аминокислоты в карбоксильном компоненте, по-видимому, ухудшает его реакционную способность. При высоком содержании воды в реакционной среде (20%-ный DMF) выход Z-*D*-Ala-Leu-Arg-pNA за 7 ч составил ~20% (табл. 1). Эффективнее протекает ацилирование этим же эфиром дипептида *n*-нитроанилида лизина (рис. 2б), выход Z-*D*-Ala-Leu-Lys-pNA за 8 ч составил ~50% (табл. 1). Как и в ранее описанных реакциях, параллельно с ферментативным синтезом протекает и ферментативный гидролиз эфир-

ной связи в карбоксильном компоненте. Вторичный гидролиз продукта по синтезированной связи в этих случаях менее выражен, чем при синтезе *n*-нитроанилидов ацилтетрапептидов. Однако тот факт, что, несмотря на наличие исходного донора ацильной группы в реакционной смеси, концентрация продукта синтеза начиная с некоторого момента не возрастает, указывает на одновременное протекание двух процессов: синтеза и вторичного гидролиза продукта по синтезированной связи.

Таким образом, была показана возможность синтеза ацилированных пептидов с С-концевым *n*-нитроанилидом аргинина (или лизина) в результате реакции, катализируемой сериновой протеиназой *B. subtilis*, шт. 72. Выходы полученных соединений, а также условия их синтеза суммированы в табл. 1.

Результаты экспериментов можно объяснить следующим образом. Реакции с участием сериновых протеиназ протекают через образование ацилфермента. В этом случае справедлива следующая схема:



где ЕН — фермент.

Образовавшийся по реакции (3) ацилфермент $[R-CO]-E$ подвергается нуклеофильной атаке водой (реакция (4)) или аминокислотой $NH_2-X-pNA$ (реакция (5)). В первом случае происходит гидролиз ацилфермента, во втором — его аминолиз и образование пептидной связи. Максимальный выход целевого продукта при этом определяется некоторыми ключевыми параметрами, зависящими от соотношений следующих начальных скоростей: а) аминолиза и гидролиза ацилфермента; б) гидролиза донора ацильной группы и вторичного гидролиза синтезируемого продукта [17]. Первый параметр отражает относительную реакционную способность аминокислоты, второй — эффективность гидролиза продукта по сравнению с гидролизом исходного сложного эфира. Кроме того, к снижению выхода целевого пептида может приводить инактивация фермента под действием DMF. Высокое содержание воды (80 %) в реакционной смеси способствует протеканию гидролитических процессов (реакции (4) и (5)). Повышение концентрации DMF слабо изменяет активность воды [8] и поэтому должно незначительно влиять на соотношение скоростей реакций (4) и (5). При этом относительная эффективность гидролиза продукта (реакции (4) и (5)) по сравнению с гидролизом карбоксильного компонента (реакции (3) и (4)) существенно уменьшается, что приводит к возрастанию выхода целевого продукта.

Количественная оценка различного влияния органических растворителей на эстеразную и амидазную активности протеиназ недавно была дана для трипсина [18]. Однако при содержании DMF в реакционной смеси более 90% фермент быстро инактивируется, что приводит к уменьшению выхода целевого продукта. Отсюда следует, что при синтезе описываемых соединений данным способом должна наблюдаться некоторая оптимальная концентрация DMF; в рассматриваемом случае она равна 70—80%. При этом содержании органического растворителя, с одной стороны, фермент еще достаточно активен, а с другой — вклад гидролитических процессов снижен. Поэтому эти условия были использованы для препаративного получения Z-Ala-Ala-Leu-Arg-pNA и Z-D-Ala-Leu-Arg-pNA. Выходы выделенных из реакционной смеси продуктов составили 50 и 46% соответственно в расчете на исходный *n*-нитроанилид аргинина.

Интенсивность вторичного гидролиза синтезируемого пептида зависит и от его структуры. Остатки лейцина и фенилаланина хорошо соответствуют первичной специфичности сериновой протеиназы *B. subtilis*, шт. 72,

а остаток аргинина не связывается с подцентром S_1 [19]. В результате рассматриваемый пептид занимает в активном центре фермента ориентацию, благоприятную для последующего расщепления связей Leu—Arg и Phe—Arg:

S_4	S_3	S_2	S_1	S'_1	S'_2
Z	Ala	Ala	Leu	Arg	pNA
Z	Ala	Ala	Phe	Arg	pNA
	Z	D-Ala	Leu	Arg	pNA
	Z	D-Ala	Leu	Lys	pNA

Как следует из рис. 1 и 2, гидролиз тетрапептидных производных по синтезированным связям протекает значительно быстрее, чем трипептидных. Причина этого, вероятно, состоит в положительном влиянии на скорость реакции лучшего связывания более длинной пептидной цепочки.

Таким образом, предложен препаративный метод синтеза ацилированных пептидов с С-концевым остатком *n*-нитроанилида аргинина или лизина в результате реакции, катализируемой сериновой протеиназой *B. subtilis*, шт. 72, причем в состав карбоксильного компонента могут входить как *L*-, так и *D*-аминокислоты. К достоинствам метода, на наш взгляд, следует отнести возможность использования в качестве аминокомпонентов *n*-нитроанилидов аргинина и лизина без предварительной защиты боковых функциональных групп, а также применение как катализатора этого синтеза сериновой протеиназы *B. subtilis*, шт. 72. Фермент производится отечественным штаммом и легко очищается до гомогенного состояния.

Экспериментальная часть

Использована сериновая протеиназа *B. subtilis*, шт. 72 (удельная активность по стандартному субстрату Z-Ala-Ala-Leu-pNA 33,3 мкмоль/(мг·мин)), выделенная в нашей лаборатории из препарата культуральной жидкости [20]. Производные аминокислот и пептидов: H-Arg-pNA [21], Z-Ala-Ala-OCH₃, Z-D-Ala-Leu-OCH₃, Z-Ala-Ala-Phe-OCH₃, Z-Ala-Ala-Leu-OCH₃ [22] — получены по методам, описанным ранее. Индивидуальность синтезированных соединений подтверждали с помощью ТСХ на силуфол (ЧСФР) в системе *n*-бутанол — пиридин — вода — уксусная кислота (10 : 15 : 12 : 3) (обнаружение в УФ-свете, вингидрином и KI), а также методом ВЭЖХ. 2HCl·H-Lys-pNA — препарат фирмы Serva (ФРГ).

Обращенно-фазовая ВЭЖХ проводилась на приборе Gilson 704 (Франция) с использованием колонок Ultrasphere ODS (4,6 × 250 мм, 5 мкм, Beckman, США). Растворы А и Б для хроматографирования содержали 0,05% трифторуксусную кислоту и 0,05% триэтиламин. Концентрация ацетонитрила 5% в растворе А и 90% в растворе Б (все проценты объемные). Разделение проводили в линейном градиенте раствора Б в растворе А от 30 до 60% за 25 мин. Скорость элюции 1,5 мл/мин. Детекция при 215 и 315 нм. Молярные коэффициенты поглощения всех соединений при каждой длине волны считали одинаковыми. Оптическую активность измеряли на поляриметре марки Perkin—Elmer 241. Кислотный гидролиз проводили в стандартных условиях (5,7 н. HCl, 110° С, 24 ч), гидролизат анализировали на автоматическом аминокислотном анализаторе Biotronik LC 5001 (ФРГ).

Построение типичной кинетической кривой. Смесь 9,09 мг (20 мкмоль) Z-Ala-Ala-Leu-OCH₃ и 3,75 мг (10 мкмоль) H-Arg-pNA растворяли в 100 мкл DMF, прибавляли 400 мкл 0,1 М NH₄HCO₃ (рН 8,4) и 3,6 мкг (0,12 нмоль) сериновой протеиназы *B. subtilis*, шт. 72, в 7 мкл воды. Реакционную смесь инкубировали при 37° С. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты реакционной смеси по 7 мкл и разбавляли метанолом до 200 мкл, после чего центрифугировали и определяли концентрации компонентов реакционной смеси методом ВЭЖХ с регистрацией при 215 нм. На основе этих данных проводили построение кинетических кривых.

Определение влияния DMF на стабильность фермента. Фермент инкубировали в 62 или 92% растворе DMF, содержащем в начальный момент времени 39 мМ Z-Ala-Ala-Phe-OCH₃. Через определенные промежутки времени отбирали пробы, в которых определяли активность фермента по стандартному методу [22]. В отдельных опытах было показано, что перенос фермента из концентрированного раствора DMF в раствор, используемый при определении ферментативной активности, не приводит к реактивации протеиназы.

Синтез Z-Ala-Ala-Leu-Arg-pNA. К смеси 250 мг (600 мкмоль) Z-Ala-Ala-Leu-OCH₃ и 100 мг (300 мкмоль) Arg-pNA добавляли 3 мл DMF, 0,75 мл воды и 0,2 мл раствора протеиназы с концентрацией 5 мг/мл. Смесь перемешивали 24 ч, затем к реакционной смеси добавляли 15 мл этилацетата, органический слой отделяли, промывали 0,5 н. HCl (5 × 3 мл), водой и упаривали. Сухой остаток растворяли в DMF и наносили на колонку (1 × 10 см), заполненную сорбентом Диасорб-сульфо (0,3 ммоль сульфогрупп на 1 г сорбента), уравновешенным 0,5 н. Na-ацетатным буфером (pH 6,5), а затем промытым водой и DMF. Связывание контролировали по поглощению элюата при 315 нм. Сорбированный пептид элюировали 25% водным изопропанолом, содержащим 1 М NaCl и подкисленным соляной кислотой до pH 2,0. Пептид экстрагировали из элюата этилацетатом, растворитель упаривали, остаток растворяли в небольшом количестве спирта, разбавляли дистиллированной водой и лиофильно высушивали. Выход Z-Ala-Ala-Leu-Arg-pNA 122,5 мг (50%), $[\alpha]_{D^{20}} -0,239^{\circ}$ (с 1, DMF).

Синтез Z-D-Ala-Leu-Arg-pNA. Смесь 71,3 мг (~200 мкмоль) Z-D-Ala-Leu-OCH₃ и 31,1 мг (85 мкмоль) Arg-pNA растворяли в 0,7 мл DMF, добавляли 0,3 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,9, и 2 мг сериновой протеиназы. Реакционную смесь перемешивали 5,5 ч, после чего добавляли 76,1 мг (~200 мкмоль) Z-D-Ala-Leu-OCH₃, 2 мг фермента и перемешивали еще 2 ч. Реакционную смесь разбавляли 4 мл этилацетата, органический слой отделяли, промывали и обрабатывали аналогично описанному выше. Выход Z-D-Ala-Leu-Arg-pNA 28 мг (46%), $[\alpha]_{D^{20}} -0,034^{\circ}$ (с 1, DMF).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kullmann W. // J. Prot. Chem. 1983. V. 2. № 4. P. 289—301.
2. Aso K. // Agric. Biol. Chem. 1989. V. 53. № 3. P. 729—733.
3. Kullmann W. // J. Org. Chem. 1982. V. 47. № 27. P. 5300—5303.
4. Widmer F., Breddam K., Johansen J. // Carlsberg Res. Commun. 1980. V. 45. № 5. P. 453—463.
5. Schellenberger V., Schellenberger U., Mitin Yu. V., Jakubke H.-D. // Monatsch. Chem. 1989. B. 120. № 5. S. 437—443.
6. Воюшина Т. Л., Люблинская Л. А., Степанов В. М. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 6. С. 738—744.
7. Гололобов М. Ю., Морозова И. П., Воюшина Т. Л., Тимохина Е. А., Степанов В. М. // Биохимия. 1991. Т. 56. № 3. С. 230—240.
8. Hommandberg G., Mattis J., Laskowski M. // Biochemistry. 1978. V. 17. № 24. P. 5220—5224.
9. Cs.-Szabo G., Pozsgay M., Elodi P. // Thrombosis Res. 1980. V. 20. № 2. P. 199—206.
10. Pozsgay M., Cs.-Szabo G., Bajusz S., Simonsson R., Gaspar R., Elodi P. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 115. № 2. P. 491—495.
11. Stoineva I., Petkov D. // FEBS Lett. 1985. V. 183. № 1. P. 103—106.
12. West J. B., Wong C.-H. // J. Org. Chem. 1986. V. 51. № 14. P. 2728—2735.
13. Barbas C. F. III, Wong C.-H. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1987. № 8. P. 533—534.
14. Margolin A., Tai D., Klivanov A. // J. Amer. Chem. Soc. 1987. V. 109. № 12. P. 7885—7887.
15. Riva S., Chopineau J., Kieboom A., Klivanov A. // J. Amer. Chem. Soc. 1988. V. 110. № 2. P. 584—589.
16. Воюшина Т. Л. Сериновые и металлопротеиназы в ферментативном синтезе пептидов: Дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ, 1988.
17. Гололобов М. Ю., Борисов И. Л., Швабас В. К. // Биохимия, 1987. Т. 52. № 4. С. 584—591.
18. Blanch W. // Enzyme Microb. Technol. 1990. V. 12. № 10. P. 189—195.
19. Gololobov M. Yu., Morozova I. P., Vojushina T. L., Timokhina E. A., Stepanov V. M. // Biochim. et biophys. acta. In Press.

20. Гололобов М. Ю., Морозова И. П., Степанов В. М. // Биохимия. 1991. Т. 56. № 1. С. 33—40.
21. Позднев В. Ф. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 5. С. 583—589.
22. Bosshard H. R., Schechter J., Berger A. // Helv. chim. acta. 1973. V. 56. № 2. P. 717—723.

Поступила в редакцию
7.XII.1990

T. L. VOYUSHINA, E. Yu. THERENT'EVA, V. F. POZDNEV, A. V. GAIDA,
M. Yu. GOLOLOBOV, L. A. LYUBLINSKAYA, V. M. STEPANOV

**ENZYMATIC SYNTHESIS OF ACYLPEPTIDES CONTAINING
p-NITROANILIDES OF BASIC AMINO ACIDS**

All-Union Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow

A method is suggested for synthesis of acylpeptides, containing arginine or lysine *p*-nitroanilides at the C-terminus, via the acyl transfer reaction catalized by the *Bacillus subtilis* serine proteinase. Acyldi- and acyltripeptide ethers with *L*- and *D*-amino acids were used as the carboxyl component taken in a twofold excess. When the concentration of dimethylformamide increases, the hydrolysis of the initial ether and the reaction product diminishes. Because of the enzyme inactivation by dimethylformamide the latter's optimal concentration is 70—80%.