



УДК 577.112.6:577.152.34'135

## ФЕРМЕНТАТИВНАЯ БЛОЧНАЯ КОНДЕНСАЦИЯ ПЕПТИДОВ НА ТВЕРДОЙ ФАЗЕ В ОРГАНИЧЕСКОЙ СРЕДЕ

© 2001 г. С. В. Колобанова, И. Ю. Филиппова<sup>#</sup>, Е. Н. Лысогорская,  
А. В. Бачева, Е. С. Оксенойт, В. М. Степанов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,  
119899, Москва, В-234, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 19.12.2000 г. Принята к печати 19.02.2001 г.

Изучена блочная конденсация пептидов на твердой фазе (аминосилохроме) в органической среде, катализируемая субтилизином в составе комплекса с додецилсульфатом натрия. На аминсилохроме, содержащем в качестве спейсера Phe-Met-Gly-Gly, исследована эффективность ферментативного присоединения трипептидов общей формулы X-Ala-Ala-Y-OMe (где X = Z, Boc, Dnp; Y = Leu, Glu(OMe)) в зависимости от содержания спейсера на носителе и структуры ацилирующего компонента. Проведена ферментативная трехстадийная последовательная конденсация трипептидных блоков на аминсилохроме, содержащем в качестве спейсера Met-Ala-Gly, и получены с удовлетворительными выходами пептидааминосилохромы Dnp-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Glu(OMe)-Met-Ala-Gly-A и Dnp-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Glu(OMe)-Ala-Ala-Leu-Met-Ala-Gly-A, где A – аминсилохром. На исследованных примерах показано, что присоединение второго и третьего блоков проходит с большим выходом, чем на первом шаге, и не зависит от аминокислотного состава ацилирующего компонента.

*Ключевые слова:* ферментативный пептидный синтез; твердый носитель; SDS–субтилизин; органические растворители.

### ВВЕДЕНИЕ

Блочная конденсация пептидов является удобным методом синтеза протяженных пептидов и небольших белков. В последнее время была показана эффективность такого подхода при создании различных пептидных библиотек [1–3]. Однако в твердофазном варианте химического пептидного синтеза использование этой стратегии лимитируется опасностью возможной рацемизации продукта конденсации [4]. Применение ферментов вследствие их стерео- и региоизбирательности может оказаться весьма полезным для решения этой проблемы при блочной конденсации пептидов на твердой фазе. Субстратсвязывающие центры протеиназ достаточно протяженны и включают 7–8 аминокислотных остатков (по 3–4 остатка слева и справа от атакуемой связи), поэтому протеиназы наиболее эффективны для катализа реакции образования связи между пептидными

блоками [5–7]. Последовательная конденсация пептидных фрагментов, закрепленных на твердом носителе, с использованием протеиназ может быть перспективным методом для синтеза протяженных биологически активных пептидов, сочетающим преимущества твердофазного метода синтеза и очевидные достоинства биокаталитического способа образования пептидной связи.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами была показана принципиальная возможность использования субтилизина-72 в составе комплекса с додецилсульфатом натрия (SDS–субтилизин) для конденсации пептидных фрагментов, закрепленных на аминсилохроме [8]. В настоящей работе изучено влияние на выход продуктов ферментативной конденсации аминокислотного состава и длины как пептидаспейсера, так и наращиваемой пептидной цепи. Проведено трехстадийное последовательное присоединение трипептидных блоков при помощи SDS–субтилизина:

Сокращения: Dnp – 2,4-динитрофенил; pNA – *n*-нитроанилид; A – аминсилохром. Все аминокислоты – *L*-ряда.

<sup>#</sup> Автор для переписки (эл. почта: irfilipp@genebec.msu.su; факс: (095) 932-8846).

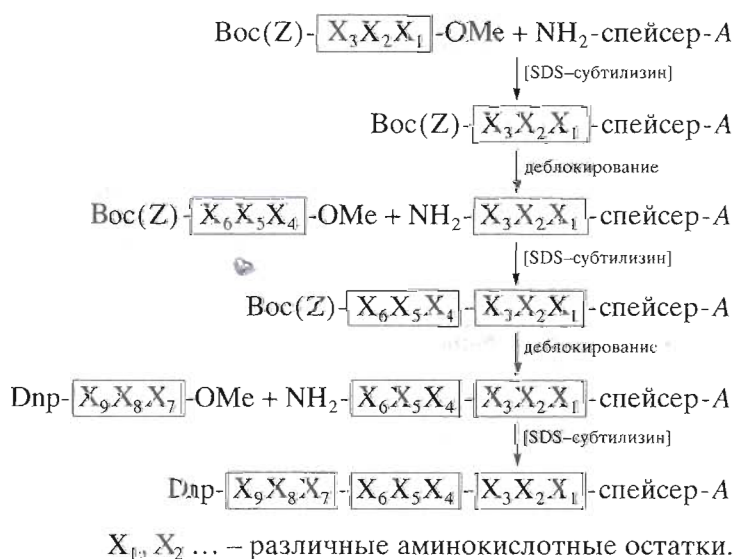
**Таблица 1.** Зависимость выхода реакции ферментативного присоединения Dnp-Ala-Ala-Leu-OMe к H-Phe-Met-Gly-Gly-аминосилохрому от содержания спейсера на носителе

Характеристика H-Phe-Met-Gly-Gly-аминосилохрома			Выход ферментативной реакции*, %
Условия присоединения спейсера		Содержание спейсера на носителе, мкмоль/г	
Избыток Boc-Phe-Met-Gly-Gly-OH**	Время, ч		
3/3***	2/24***	89	11
3	24	37	29
3	2	23	40
1.5	24	16	48
1.5	2	12	58

\* Условия реакции: 25 мг H-Phe-Met-Gly-Gly-аминосилохрома, 5-кратный избыток Dnp-Ala-Ala-Leu-OMe (по отношению к пептиду-спейсеру) в 75 мкл DMSO, 175 мкл раствора SDS-субтилизина (концентрация 2.2 мг/мл) в 96% этаноле, 20°C, 72 ч.

\*\* См. "Эксперимент. часть"; указан избыток по отношению к аминокетам аминсилохрома (моль/моль).

\*\*\* Двукратная обработка с промежуточной промывкой растворителем.



Субстратная специфичность и протяженность зоны связывания субстрата в протеиназах диктуют определенные условия для осуществления катализа образования пептидной связи между компонентом, закрепленным на твердой фазе, и пептидом в растворе. Немаловажным фактором в твердофазном пептидном ферментативном синтезе является длина спейсера, отделяющего реагирующие группы от носителя [9, 10]. Нами было показано, что катализируемая SDS-субтилизином конденсация Dnp-Ala-Ala-Leu-OMe с трипептидным спейсером Met-Gly-Gly, закрепленным на аминсилохроме, при нагрузке на носитель 16 мкмоль/г проходила только на 33% [8]. Низкая эффективность синтеза могла быть связана как с аминокислотным составом пептида-спейсера, так и с доступностью последнего для фермента. Поскольку известно, что фенилаланин наиболее предпочтителен для субтилизина в положении P<sub>1</sub> [11, 12], мы ввели

его в состав пептида-спейсера и исследовали в качестве вставки тетрапептид Phe-Met-Gly-Gly. Для оценки зависимости выхода ферментативного синтеза от нагрузки пептида-спейсера на носителе были получены пептидаминсилохромы с различным содержанием спейсерного пептида – от 12 до 89 мкмоль на 1 г носителя и проведена ферментативная конденсация с Dnp-Ala-Ala-Leu-OMe. Выход реакции существенно зависел от содержания Phe-Met-Gly-Gly на носителе и был максимальным при самом низком содержании спейсерного пептида (табл. 1).

Влияние структуры ацилирующего компонента на выход ферментативной реакции исследовалось на примере Phe-Met-Gly-Gly-аминосилохрома, содержащего 37 мкмоль пептида на 1 г сорбента. В реакции, катализируемую SDS-субтилизином, вводили Dnp-Ala-Ala-Leu-OMe, Boc-Ala-Ala-Leu-OMe или Z-Ala-Ala-Glu(OMe)-OMe в смеси 96% этанола и

**Таблица 2.** Ферментативная конденсация пептидов на Phe-Met-Gly-Gly-аминосилохроме (содержание спейсера – 37 мкмоль/г)\*

Ацилирующий компонент	Выход, %
Woc-Ala-Ala-Leu-OMe	24
Z-Ala-Ala-Glu(OMe)-OMe	30
Dnp-Ala-Ala-Leu-OMe	29

\* Условия реакции: 50 мг H-Phe-Met-Gly-Gly-аминосилохрома, 5-кратный избыток ацилирующего компонента (по отношению к пептиду-спейсеру) в 150 мкл DMSO, 350 мкл раствора SDS-субтилизина (концентрация 2.2 мг/мл) в 96% этаноле, 20°C, 72 ч.

диметилсульфоксида (DMSO) (7 : 3 по объему). Концентрация ацилирующего компонента в реакционной смеси в 5 раз превышала концентрацию аминок компонента (пептида-спейсера). Соотношение молярных концентраций фермента и пептида-спейсера составило 1 : 70, время реакции – 72 ч. Содержание пептидов на носителе определяли по данным аминокислотного анализа. Выход ферментативной пришивки во всех случаях существенно не менялся (табл. 2). Аналогичные результаты были получены нами ранее при использовании пептида-спейсера Met-Ala-Gly с содержанием 30 мкмоль/г носителя [8]. Таким образом, на первом шаге ферментативная конденсация проходила с примерно одинаковыми невысокими выходами независимо от аминокислотного состава ацилирующего компонента и пептида-спейсера (при сопоставимом содержании спейсера на носителе). Введение остатка Phe в состав пептида-спейсера не оказало существенного влияния на выход ферментативной конденсации. Вероятно, определяющим фактором эффективности синтеза является содержание спейсера на носителе, а не его аминокислотный состав и длина.

Перед следующим шагом ферментативной конденсации непрореагировавшие аминокгруппы аце-

тилировали уксусным ангидридом и удаляли Woc-группы 4 M HCl в диоксане, Z-защиту – 40% HBr в ледяной уксусной кислоте. Деблокирование аминокгрупп пептидов проходило на 97 ± 3%.

На втором шаге проводили ферментативную конденсацию пептидилполимеров (табл. 3) с трипептидами различного состава при соотношении молярных концентраций SDS-субтилизина и аминок компонента 1 : 20. Выходы пептидов определяли на основании данных аминокислотного анализа и спектрофотометрически по поглощению Dnp-группы после гидролиза пептидиламиносилохрома субтилизином (для Dnp-содержащих пептидов) [8]. Данные, полученные этими двумя способами, совпадали (в пределах 2–3%). Из табл. 3 видно, что выход ферментативной реакции существенно увеличился на втором шаге по сравнению с первым. Эффективность синтеза второго цикла присоединения, как и на первом шаге, практически не зависела от длины и аминокислотного состава спейсерного пептида.

Третью стадию ферментативного присоединения Dnp-Ala-Ala-Leu-OMe проводили с Ala-Ala-Glu(OMe)-Ala-Ala-Leu-Met-Ala-Gly-аминосилохромом и с Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Glu(OMe)-Met-Ala-Gly-аминосилохромом с выходами 57 и 83% соответственно. Выходы пептидиламиносилохромов определяли спектрофотометрически по поглощению Dnp-группы при 360 нм после гидролиза субтилизином. Этот способ оценки содержания пептида на носителе оказался весьма оправданным для протяженных пептидов с повторяющимися аминокислотами, расчет аминокислотного состава которых затруднен.

Таким образом, впервые показана возможность наращивания трипептидных блоков (3+3+3) на пептиде-спейсере, закрепленном на твердой фазе (аминосилохроме), в среде органических растворителей под действием SDS-субтилизина. Установлено, что присоединение второго и третьего блоков

**Таблица 3.** Выход второй и третьей стадий ферментативной конденсации трипептидных фрагментов на твердой фазе под действием SDS-субтилизина\*

Ацилирующий компонент	Продукт	Выход, %
Dnp-Ala-Ala-Leu-OMe	Dnp-Ala-Ala-Leu↓Ala-Ala-Leu-Phe-Met-Gly-Gly-A**	78
	Dnp-Ala-Ala-Leu↓Ala-Ala-Glu(OMe)-Phe-Met-Gly-Gly-A**	55
	Dnp-Ala-Ala-Leu↓Ala-Ala-Glu(OMe)-Met-Ala-Gly-A**	63
Woc-Ala-Ala-Leu-OMe	Woc-Ala-Ala-Leu↓Ala-Ala-Glu(OMe)-Met-Ala-Gly-A***	75
Z-Ala-Ala-Glu(OMe)-OMe	Z-Ala-Ala-Glu(OMe)↓Ala-Ala-Leu-Met-Ala-Gly-A***	78
Dnp-Ala-Ala-Leu-OMe	Dnp-Ala-Ala-Leu↓Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Glu(OMe)-Met-Ala-Gly-A***	83
	Dnp-Ala-Ala-Leu↓Ala-Ala-Glu(OMe)-Ala-Ala-Leu-Met-Ala-Gly-A***	57

\* Условия реакции: 5-кратный избыток ацилирующего компонента (по отношению к аминок компоненту), 175 мкл раствора SDS-субтилизина (концентрация 2.2 мг/мл) в 96% этаноле, 20°C, 72 ч.

\*\* Содержание спейсера Phe-Met-Gly-Gly – 37 мкмоль/г.

\*\*\* Содержание спейсера Met-Ala-Gly – 30 мкмоль/г.

проходит с большим выходом, чем на первом шаге, причем аминокислотный состав пептидаспейсера и ацилирующих компонентов на исследованных примерах не влияют на эффективность ферментативного синтеза.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали сериновую протеиназу *Bacillus subtilis*, штамм 72 (субтилизин-72) (удельная активность по стандартному субстрату Glp-Ala-Ala-Leu-pNA 70 мкмоль/мин на 1 ед.  $A_{280}$ ), выделенную из препарата культуральной жидкости [13]; аminosилохром с содержанием аминокрупп 170 мкмоль/г, полученный по методике [14] из силохрома С-80 (средний размер пор 440–450 Å; Ставрополь, Россия). Производные пептидов были синтезированы в нашей лаборатории по стандартным методикам: Z-Ala-Ala-Glu(OMe)-OMe [15], Boc-Ala-Ala-Leu-OMe [16], Dnp-Ala-Ala-Leu-OMe [17], Boc-Met-Ala-Gly, Boc-Phe-Met-Gly-Gly [18]. Гомогенность полученных соединений подтверждали данными аминокислотного анализа, ВЭЖХ, ТСХ на пластинах Silufol (Чехия) в системах *n*-бутанол–пиридин–вода–уксусная кислота, 10 : 15 : 12 : 3, *n*-бутанол–вода–уксусная кислота, 4 : 2 : 2, хлороформ–метанол, 9 : 1.

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометрах Specord UV VIS (Германия) и Shimadzu UV-1601 (Япония).

Аминокислотный состав полученных соединений подтверждали данными аминокислотного анализа, который 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 SDS–субтилизин получали по методике, описанной в работах [19, 20].

**Вос-Phe-Met-Gly-Gly-аминосилохром.** 500 мг предварительно прокаленного аminosилохрома выдерживали 10 мин в 2 мл хлористого метилена, вакуумировали при 0°C и обрабатывали 354 мкл (2.45 ммоль) триэтиламина. Раствор декантировали, сорбент промывали хлористым метиленом (3 × 2 мл), абс. DMF (3 × 2 мл), прибавляли 1.8 мл раствора Вос-Phe-Met-Gly-Gly-OH (255 мкмоль, 130 мг) в абс. DMF, 0.2 мл раствора 1.5 М DCC в абс. DMF и встряхивали 18 ч. Раствор декантировали, сорбент промывали абс. DMF (3 × 2 мл), этанолом (3 × 2 мл) и хлористым метиленом (3 × 2 мл). Пептидилполимер сушили в вакуумном эксикаторе над NaOH. Содержание пептида, определенное по данным аминокислотного анализа, составило 37 мкмоль на 1 г носителя.

**Вос-Phe-Met-Gly-Gly-аминосилохромы** с различным содержанием пептидаспейсера получали аналогично, варьируя время реакции и избыток ацилирующего компонента (табл. 1).

**Ацетилирование свободных аминокрупп.** К 500 мг пептидиламиносилохрома в 2 мл абс. DMF прибавляли 70 мкл (670 мкмоль) свежеперегнанного уксусного ангидрида, встряхивали 3 мин, добавляли 95 мкл (670 мкмоль) триэтиламина и встряхивали 2 ч. Сорбент промывали абс. DMF (3 × 2 мл), этанолом (3 × 2 мл) и хлористым метиленом (3 × 2 мл). Сушили в вакуум-эксикаторе над NaOH. Полноту ацетилирования оценивали по результатам пикринового теста [18].

**HCl × H-Phe-Met-Gly-Gly-аминосилохром (удаление Вос-группы).** К 500 мг пептидиламиносилохрома прибавляли 2 мл 4 М раствора HCl в диоксане, встряхивали 30 мин. Раствор декантировали, сорбент промывали DMF (3 × 2 мл), этанолом (3 × 2 мл), хлористым метиленом (3 × 2 мл) и сушили в вакуумном эксикаторе над NaOH. Количество свободных аминокрупп оценивали с помощью пикринового теста [18].

**Вос-Ala-Ala-Leu-Phe-Met-Gly-Gly-аминосилохром.** К 50 мг HCl × H-Phe-Met-Gly-Gly-аминосилохрома (содержание Phe-Met-Gly-Gly – 37 мкмоль на 1 г носителя) прибавляли 3.5 мг (9.5 мкмоль) Вос-Ala-Ala-Leu-OMe в 150 мкл DMSO и 10 мкл 1 М раствора триэтиламина в 96% этаноле. Смесь вакуумировали, добавляли 350 мкл раствора SDS–субтилизина (концентрация 2.2 мг/мл) в 96% этаноле и встряхивали 72 ч при 20°C. Раствор декантировали, сорбент промывали DMSO (3 × 500 мкл), этанолом (3 × 500 мкл), хлористым метиленом (3 × 500 мкл). Пептидиламиносилохром сушили в вакуумном эксикаторе над NaOH. Содержание пептида, определенное по данным аминокислотного анализа, составило 9 мкмоль на 1 г носителя.

**Z-Ala-Ala-Glu(OMe)-Phe-Met-Gly-Gly-аминосилохром** (содержание пептида – 11 мкмоль на 1 г носителя), **Dnp-Ala-Ala-Leu-Phe-Met-Gly-Gly-аминосилохром** (содержание пептида – от 7 до 12 мкмоль на 1 г носителя), **Dnp-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Leu-Phe-Met-Gly-Gly-аминосилохром** (содержание пептида – 7 мкмоль на 1 г носителя), **Dnp-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Glu(OMe)-Phe-Met-Gly-Gly-аминосилохром** (содержание пептида – 6 мкмоль на 1 г носителя) получали аналогично (выходы приведены в табл. 3).

**Вос-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Glu(OMe)-Met-Ala-Gly-аминосилохром**, **Z-Ala-Ala-Glu(OMe)-Ala-Ala-Leu-Met-Ala-Gly-аминосилохром**, **HBr × H-Ala-Ala-Glu(OMe)-Ala-Ala-Leu-Met-Ala-Gly-аминосилохром** и **HCl × H-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Glu(OMe)-Met-Ala-Gly-аминосилохром** получали по методикам [8].

**Dnp-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Glu(OMe)-Ala-Ala-Leu-Met-Ala-Gly-аминосилохром.** К 25 мг HBr × Ala-Ala-Glu(OMe)-Ala-Ala-Leu-Met-Ala-Gly-аминосилохрома прибавляли 2.0 мг (4.5 мкмоль) Dnp-Ala-Ala-Leu-OMe в 75 мкл DMSO и 5 мкл 1 М раствора триэтиламина в 96% этаноле. Смесь ваку-

умировали, добавляли 175 мкл раствора SDS-субтилизина (концентрация 2.2 мг/мл) в 96% этаноле и встряхивали 72 ч при 20°C. Раствор декантировали, сорбент промывали DMSO (3 × 500 мкл), этанолом (3 × 500 мкл), хлористым метиленом (3 × 500 мкл). Пептидиламиносилохром сушили в вакуумном эксикаторе над NaOH. Содержание пептида, определенное спектрофотометрически после ферментативного гидролиза субтилизином [8], составило 4 мкмоль на 1 г носителя.

**Dnp-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Glu(OMe)-Met-Ala-Gly-аминосилохром** получали аналогично, исходя из 25 мг HCl × H-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Glu(OMe)-Met-Ala-Gly-аминосилохрома и 2 мг (4.5 мкмоль) Dnp-Ala-Ala-Leu-OMe. Содержание пептида, определенное спектрофотометрически [8], составило 5 мкмоль на 1 г носителя.

### БЛАГОДАРНОСТИ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Meldal M., Svendsen I., Juliano L., Nery E.D., Scharfstein J.J. // *J. Peptide Sci.* 1998. V. 4. P. 83–91.
- Spetzler J.C., Westphal V., Winther J.R., Meldal M. // *J. Peptide Sci.* 1998. V. 4. P. 128–137.
- Renil M., Ferreras M., Delaisse J.M., Foged N.T., Meldal M. // *J. Peptide Sci.* 1998. V. 4. P. 195–210.
- Стюарт Дж., Янг Дж. Твердофазный синтез пептидов: Пер. с англ. М.: Мир, 1971.
- Stepanov V.M. // *Pure and Appl. Chem.* 1996. V. 68. P. 1035–1039.
- Gill I., Lopez-Fandino R., Jorba L., Vulfson E.N. // *Enz. Microb. Techn.* 1996. V. 18. P. 162–183.
- Cerovsky V., Bordusa F. // *J. Pept. Res.* 2000. V. 55. P. 325–329.
- Колобанова С.В., Филиппова И.Ю., Лысогорская Е.Н., Гетун И.В., Бачева А.В., Оксенойт Е.С., Степанов В.М. // *Биоорганическая химия.* 2000. Т. 26. С. 411–416.
- Slomczynska U., Albericio F., Cardenas F., Giralte E. // *Biomed. Biochim. Acta.* 1991. V. 50. P. 67–73.
- Könnecke A., Dettlaff S., Jakubke H.-D. // *Monatsh. Chem.* 1982. V. 113. P. 331–337.
- Gololobov M.Yu., Morozova I.P., Voyushina T.L., Timokhina E.A., Stepanov V.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1992. V. 1118. P. 267–276.
- Moree W.J., Sears P., Kawashiro K., Witte K., Wong C.-H. // *J. Am. Chem. Soc.* 1997. V. 119. P. 3942–3947.
- Гололобов М.Ю., Морозова И.П., Степанов В.М. // *Биохимия.* 1991. Т. 56. С. 33–40.
- Stepanov V.M., Rudenskaya G.N., Gaida A.V., Osterman A.L. // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 1981. V. 5. P. 177–186.
- Лысогорская Е.Н., Филиппова И.Ю., Абдель Малак К.А., Лавренова Г.И., Анисимова В.В., Оксенойт Е.С., Степанов В.М. // *Биоорганическая химия.* 1992. Т. 18. С. 1081–1088.
- Воюшина Т.Л., Люблинская Л.А., Степанов В.М. // *Биоорганическая химия.* 1985. Т. 11. С. 738–744.
- Юсупова М.П., Новгородова С.А., Степанов В.М. // *Биоорганическая химия.* 1996. Т. 22. С. 523–527.
- Гершкович А.А., Кибирев В.К. *Химический синтез пептидов.* Киев: Наукова думка, 1992.
- Meyer J.D., Kendrick B.S., Matsuura J.E., Ruth J.A., Bryan P.N., Manning M. // *Int. J. Peptide Protein Res.* 1996. V. 47. P. 177–181.
- 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.

## The Enzymatic Segment Condensation of Peptides on a Solid Phase in Organic Medium

S. V. Kolobanova, I. Yu. Filippova<sup>#</sup>, E. N. Lysogorskaya, A. V. Bacheva, E. S. Oksenoit, and V. M. Stepanov

Moscow State University, Chemical Faculty, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

The segment condensation of peptides on a solid phase (Aminosilochrom) in organic medium catalyzed by a subtilisin complex with sodium dodecylsulfate was studied. The dependence of the efficiency of the enzymatic coupling of tripeptides with the basic structure X-Ala-Ala-Y-OMe [where X = Z, Boc, or Dnp and Y = Leu or Glu(OMe)] on the spacer content on the support and on the structure of the acylating component was investigated. The tripeptide segments were successively coupled to Aminosilochrom containing the Met-Ala-Gly spacer, and the peptidylaminosilochroms Dnp-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Glu(OMe)-Met-Ala-Gly-A and Dnp-Ala-Ala-Leu-Ala-Ala-Glu(OMe)-Ala-Ala-Leu-Met-Ala-Gly-A (A is the Aminosilochrom residue) were obtained in satisfactory yields. It was shown by these examples that the second and third segments are attached in yields higher than that for the first segment and the coupling efficiency does not depend on the amino acid composition of the acylating component. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* enzymatic peptide synthesis, solid support, SDS-subtilisin, organic solvents

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (095) 932-8846; e-mail: irfilipp@genebee.msu.su.