



УДК 577.112.6:577.152.34'135

СИНТЕЗ *n*-НИТРОАНИЛИДОВ АЦИЛИРОВАННЫХ ПЕПТИДОВ,  
КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ ТЕРМОЛИЗИНОМВолошина Т. Л., Любимская Л. А., Тимохина Е. А.,  
Степанов В. М.*Всероссийский научно-исследовательский институт генетики  
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва*

Осуществлен катализируемый термолизином синтез *n*-нитроанилидов ацилдицептидов общей формулы Z-A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>-pNA (A<sub>1</sub>-Thr, Ala, Val, Leu; A<sub>2</sub>=Leu, Phe), а также ступенчатый синтез *n*-нитроанилидов ацилтетрапептидов общей формулы Z-A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>-A<sub>3</sub>-A<sub>4</sub>-pNA (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>=Gly, Ala; A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>=Ala, Leu, Phe) из Z-A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>-OH и A<sub>3</sub>-pNA и далее из Z-A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>-A<sub>3</sub>-OH и A<sub>4</sub>-pNA. Показано, что увеличение растворимости продукта в реакционной среде приводит к снижению его выхода. Минимальное количество термолизила, которое обеспечивает препаративный выход пептида, зависит от структуры аминно- и карбоксильного компонентов. Молярное соотношение фермента и исходных компонентов во многих случаях может быть увеличено до 1 : 10<sup>6</sup> по сравнению с обычно используемым 1 : 10<sup>3</sup>–1 : 10<sup>4</sup>.

Протеиназы нередко используются в качестве катализаторов синтеза пептидной связи. Описано применение сериновых, тиоловых и металлопротеиназ при синтезе пептидных субстратов протеиназ, биологически активных пептидов и их фрагментов, а также при полусинтезе и модификации белков [1–3]. Ферментативный синтез пептидов обладает рядом преимуществ по сравнению с химическим: обеспечивает стереоспецифичность реакции, не требует применения абсолютных органических растворителей и конденсирующих реагентов, позволяет расширить набор защитных групп или совсем не защищать боковые функциональные группы.

Однако ферментативный метод синтеза имеет ряд ограничений и ставит ряд проблем, к числу которых относятся возможность вторичного гидролиза продуктов реакции ферментом, эффективность использования фермента и стабильность последнего в условиях реакции. Сдвиг равновесия в сторону синтеза пептида наиболее часто достигается выведением продукта из реакционной среды, обычно за счет образования осадка. Условия реакции в этом случае должны быть подобраны так, чтобы растворимости исходных компонентов и продукта в реакционной смеси существенно различались.

Этот подход был применен нами при синтезе хромогенных субстратов микробных сериновых протеиназ — *n*-нитроанилидов ацилтрипептидов в присутствии металлопротеиназы — термолизиона [4]. В данной работе описано получение ряда *n*-нитроанилидов ацилированных ди-, три- и тетрапептидов (табл. 1, 2). Карбоксильными компонентами при синтезе служили бензилоксикарбонильные производные аминокислот, ди- и трипептидов, аминокислотами — *n*-нитроанилиды аминокислот. Реакцию проводили при эквимолярных соотношениях реагентов в водном диметилформамиде, причем содержание органического растворителя выбиралось таким образом, чтобы обеспечить хорошую растворимость исходных соединений и возможно более полное осаждение продукта реакции. Как правило, реакционная смесь до добавления фермента представляла собой насыщенный раствор наименее растворимого компонента, обычно *n*-нитроанилида аминокислоты. Продукт реакции, обладающий еще более

Использованы сокращения аминокислот, предложенные комиссией IUPAC — IUB по биохимической номенклатуре. pNA — *n*-нитроанилид, DMF — диметилформамид. Все аминокислоты *L*-ряда.

## Условия синтеза и выходы нитроанилидов ацилпептидов (20° С, 48 ч)

Пептид	S : E, моль/моль	DMF, %	Концентрация исходных соединений, М	Выход, %
Z-Thr-Leu-pNA	1,36·10 <sup>4</sup>	23	0,23	20
	1,66·10 <sup>4</sup>	25	0,60	33
	2,00·10 <sup>4</sup>	40 *	0,20	29
	2,17·10 <sup>4</sup>	59 **	0,74	38
Z-Thr-Phe-pNA	1,40·10 <sup>4</sup>	37	0,71	6
Z-Ala-Phe-pNA	1,23·10 <sup>4</sup>	43	0,43	84
Z-Phe-Leu-pNA	2,38·10 <sup>4</sup>	58	0,59	81
Z-Val-Leu-pNA	1,61·10 <sup>4</sup>	57	0,70	6
	7,57·10 <sup>3</sup>	55	0,56	7
	2,80·10 <sup>4</sup>	56 *	0,23	6
Z-Gly-Gly-Phe-pNA	1,13·10 <sup>4</sup>	25	0,16	60
Z-Gly-Ala-Phe-pNA	3,78·10 <sup>4</sup>	32	0,19	98
Z-Gly-Ala-Leu-pNA	1,13·10 <sup>4</sup>	27	0,18	87
Z-Ala-Ala-Ala-pNA ***	2,85·10 <sup>4</sup>	25	0,25	43
Z-Ala-Ala-Leu-pNA ***	1,6·10 <sup>4</sup>	25	0,25	80
Z-Ala-Ala-Phe-pNA ***	2,80·10 <sup>5</sup>	40	0,33	76
Z-Ala-Ala-Leu-Ala-pNA ***	2,38·10 <sup>4</sup>	20	0,17	24
Z-Gly-Gly-Phe-Leu-pNA	3,30·10 <sup>3</sup>	39	0,13	77
Z-Gly-Ala-Phe-Leu-pNA	1,50·10 <sup>3</sup>	27	0,06	92
Z-Gly-Ala-Leu-Phe-pNA	2,18·10 <sup>3</sup>	47	0,22	71

\* Вместо DMF использовали 1,4-бутандиол.

\*\* Вместо DMF использовали этиленгликоль.

\*\*\* Реакцию проводили при 37° С в течение 18 ч.

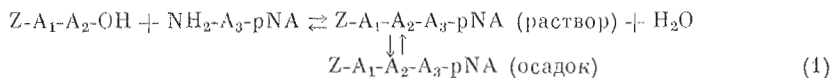
Таблица 2

## Влияние растворимости пептидов на их выход

Пептид	Растворимость (нмоль/мл), определенная методом				Максимальный выход, %
	осаждения		растворения		
	А	Б	А	Б	
Z-Ala-Ala-Phe-pNA	37	31	—	—	82
Z-Ala-Ala-Leu-pNA	98	93	108	86	85
Z-Gly-Gly-Phe-Leu-pNA	93	98	93	83	77
Z-Val-Leu-pNA	163	107	—	—	6
Z-Ala-Ala-Ala-pNA	223	260	—	—	43
Z-Ala-Ala-Leu-Ala-pNA	—	—	420	424	29
Z-Thr-Leu-pNA	700	800	—	—	33

Примечание. А — по данным спектрофотометрии, Б — по данным аминокислотного анализа.

низкой растворимостью, выпадал в осадок. Протекающую реакцию для трипептидов схематически можно изобразить следующим образом:



Очевидно, что на положение равновесия, а следовательно, и на выход продукта существенное влияние оказывает растворимость последнего в реакционной среде. Поэтому выходы пептидов, растворимость которых при выбранных нами условиях синтеза (концентрация исходных соединений, температура, природа растворителя) превышает некоторую критическую величину (~100 нмоль/мл), будут довольно низки. Так, максимальные выходы пептидов, заметно растворимых в реакционной среде, — Z-Thr-Leu-pNA (700 нмоль/мл), Z-Ala-Ala-Leu-Ala-pNA [5] (420 нмоль/мл), Z-Ala-Ala-Ala-pNA (~240 нмоль/мл) — составили соответственно 33, 29 и 43% (табл. 2). На первый взгляд, растворимость этих пептидов в реакционной среде незначительна. Следует, однако, учитывать, что сравнительно небольшая концентрация пептидного продукта реакции в растворе

Гидролиз *n*-нитроанилидов ацилпептидов субтилизином

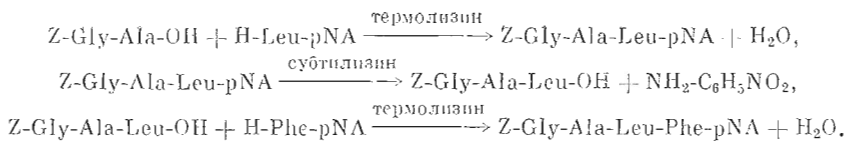
Пептид	Время гидролиза, ч	Содержание этанола, %	Выход продукта, %
Z-Gly-Gly-Phe-pNA	72	30	92
Z-Gly-Ala-Phe-pNA	24	25	89
Z-Gly-Ala-Leu-pNA	72	20	87
Z-Ala-Ala-Leu-pNA	1	26	69
Z-Ala-Ala-Ala-pNA	5	33	63

Примечание. Условия гидролиза: 0,1 М NH<sub>2</sub>НСО<sub>2</sub>, рН 7,9; указанное количество этанола; 1 мг субтилизина на 50–100 мкмоль пептида, 37° С.

находится в равновесии с несравненно большими концентрациями исходных соединений, что и приводит к существенному снижению выхода. Выходы остальных синтезируемых пептидов хорошие и лежат в пределах 70–90% (табл. 1).

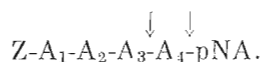
Еще один фактор, влияющий на выход реакции, — различие растворимости исходных соединений и продукта реакции. В благоприятном случае при синтезе Z-Ala-Ala-Leu-pNA [4] растворимость целевого продукта — 100 нмоль/мл, а растворимость исходного H-Leu-pNA — 30 мкмоль/мл. Более того, при совместном растворении исходных компонентов реакции за счет образования соли Z-Ala-Ala-COO<sup>-</sup>·NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-Leu-pNA растворимость *n*-нитроанилида резко возрастает (>340 мкмоль/мл) и растворимости исходных компонентов и продукта реакции оказываются различающимися на три-четыре порядка, что и обеспечивает сдвиг равновесия в сторону образования продукта. Низкий выход Z-Val-Leu-pNA (табл. 1, 2), обладающего сравнительно невысокой растворимостью (~100 нмоль/мл), очевидно, объясняется малой специфичностью термолитина для карбоксильного компонента Z-Val-OH, что замедляет реакцию. Этот результат согласуется с данными Фрутона о начальных скоростях ферментативного синтеза различных пептидов [6].

*n*-Нитроанилидная группа может быть использована как ферментативно удаляемая в мягких условиях С-защитная группировка. С этой целью *n*-нитроанилиды ацилированных трипептидов гидролизовали субтилизином (табл. 3). Полученные таким образом ацилированные трипептиды использовались в качестве карбоксильных компонентов в следующей стадии конденсации с *n*-нитроанилидами аминокислот в присутствии термолитина. Типичная схема ступенчатого удлинения пептидной цепи путем последовательного проведения трех ферментативных реакций выглядела следующим образом:



По этой схеме был синтезирован ряд *n*-нитроанилидов ацилтетрапептидов (табл. 1).

Синтезированные защищенные *n*-нитроанилиды тетрапептидов могли бы быть использованы как субстраты сериновых протеиназ из различных источников. Однако ферментативное отщепление *n*-нитроанилина от *n*-нитроанилидов Z-тетрапептидов Z-Gly-Gly-Phe-Leu-pNA, Z-Gly-Ala-Leu-Phe-pNA и Z-Gly-Ala-Phe-Leu-pNA провести не удается, так как все использованные для этой цели протеиназы ( $\alpha$ -химотрипсин, сериновые протеиназы из *Bacillus licheniformis* и *Thermoactinomyces vulgaris*) гидролизуют пептиды одновременно по двум связям:



В описанном методе синтеза пептидов роль фермента сводится к ускорению достижения равновесия реакции (1), поэтому его количество может быть весьма малым. Однако применяемые в эксперименте концентрации протеиназ обычно значительно выше, чем это представляется необходимым по теоретическим соображениям. Так, при синтезах, катализируемых термолизиним, использовались следующие молярные соотношения фермента и одного из исходных компонентов: 1:860 [7], 1:1600 [8], 1:6900 [9],  $1:40^4$  [10],  $1:2,5 \cdot 10^4$  [6]. Нет сомнения, что использование столь больших относительных количеств фермента не являлось следствием экспериментов по оптимизации условий синтеза, а выбиралось в каждом случае исходя из необходимости компенсации понижения его активности в присутствии органических растворителей, высоких концентраций исходных соединений и продукта реакции.

Состояние фермента после реакции ферментативного синтеза почти не исследовалось. По-видимому, единственной работой, в которой описано повторное использование фермента в синтезе, является получение бензил-оксикарбониласпартама в присутствии термолизина и Z-Тур-D-Leu-NH<sub>2</sub> в присутствии  $\alpha$ -химотрипсина [9].

В описанном нами ранее ферментативном синтезе хромогенного субстрата сериновых протеиназ Z-Ala-Ala-Leu-pNA из Z-Ala-Ala-OH и H-Leu-pNA [4] было обнаружено, что после отделения продукта реакции практически весь фермент активен [11] и находится в фильтрате. Добавление фильтрата, содержащего активный фермент, к раствору новой порции исходных соединений дает *n*-нитроанилид ацилтрипептида с хорошим выходом (табл. 4, опыт 1). Полученный после отделения продукта реакции фильтрат был использован в синтезе того же пептида третий раз. Таким образом, одна порция фермента использовалась последовательно три раза, при этом выход продукта реакции от цикла к циклу существенно не изменялся. Очевидно, что в условиях проведения данной реакции не наблюдается необратимой инактивации термолизина, поэтому не требуется использования больших количеств фермента.

Ранее нами было показано, что при катализируемом сериновыми протеиназами синтезе пептидов из эфиров *N*-ацилпептидов можно использовать очень малые количества фермента, например субтилизина. Хорошие выходы были получены при молярном соотношении фермента и исходных соединений  $1:40^6$  [5].

В описанном нами ранее синтезе Z-Ala-Ala-Leu-pNA [4] выход продукта при молярном соотношении термолизина и исходных  $1:5,6 \cdot 10^3$  при 20°С (1 ч) составил 93%. Мы предположили, что хороший выход продукта в данном случае может быть достигнут при существенном снижении используемого количества фермента за счет повышения температуры и некоторого увеличения времени реакции. Действительно, при уменьшении количества термолизина на два порядка (молярное соотношение термолизина и исходных компонентов  $1:5,6 \cdot 10^5$ ) и одновременном увеличении

Таблица 4

Синтез Z-Ala-Ala-Leu-pNA, катализируемый термолизиним, при трехкратном использовании фермента

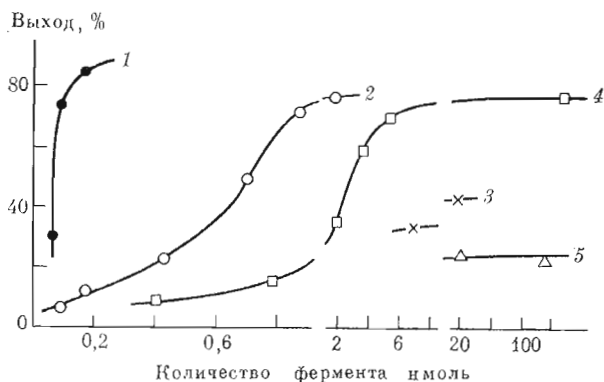
Условия проведения реакции см. в «Экспер. части»

Номер опыта	E : S, моль/моль	Температура реакции, °С	Выход, % на цикле *		
			1	2	3
1	$1:6 \cdot 10^4$ **	20	80	82	80
2	$1:5,6 \cdot 10^5$	37	85	90	88 ***
3	$1:5,6 \cdot 10^6$	37	74	39	—

\* В каждом цикле к фильтрату добавлялась новая порция исходных соединений по 0,5 ммоль. Время реакции на каждом цикле 18 ч.

\*\* Использовали навеску сухого фермента.

\*\*\* Время реакции 68 ч.

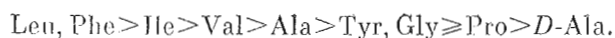


Зависимость выхода пептидов при их синтезе в присутствии термоллизина из соответствующих N-ацилпептида (0,5 ммоль) и *n*-нитроанилида аминокислоты (0,5 ммоль) от количества фермента (условия — см. «Экспер. часть»): 1 — Z-Ala-Ala-Leu-pNA, 2 — Z-Ala-Ala-Phe-pNA, 3 — Z-Ala-Ala-pNA, 4 — Z-Gly-Gly-Phe-Leu-pNA, 5 — Z-Ala-Ala-Leu-Ala-pNA

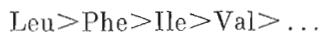
времени реакции от 1 до 18 ч при 37°С выход существенно не снизился и составил ~85% (табл. 4, опыт 2). Более того, оказалось возможным повторное использование столь малых количеств фермента для получения *n*-нитроанилида ацилтрипептида с хорошим выходом на каждом цикле. Дальнейшее снижение количества фермента (молярное соотношение 1 : 5,6 · 10<sup>6</sup>) обеспечивает хороший выход только на первом цикле (табл. 4, опыт 3). Снижение выхода на следующих циклах, возможно, обусловлено потерями фермента за счет его инактивации или частичной сорбции на осадке.

При синтезе других *n*-нитроанилидов N-ацилпептидов в присутствии термоллизина молярное соотношение фермента и исходных компонентов составило 1 : 10<sup>3</sup> — 1 : 10<sup>4</sup> (табл. 1). При попытке уменьшить содержание термоллизина в смеси оказалось, что минимальное количество фермента, необходимое для достижения хорошего выхода, сильно зависит от соответствия структуры продукта специфичности фермента (рисунок).

Как показали Морихара и соотр. [10], при синтезе амидов ацилпептидов, катализируемом термоллизином, выход падает в зависимости от аминокислоты в положении P<sub>1</sub>' в ряду

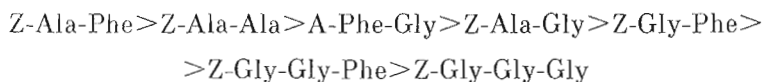


Этими авторами использовались достаточно высокие количества фермента (молярное соотношение фермента и исходных реагентов 1 : 10<sup>4</sup>). Значительное уменьшение содержания фермента позволяет уловить более тонкую разницу в его специфичности. Так, за одинаковое время ~70% выход Z-Ala-Ala-Leu-pNA достигается при молярном соотношении ~1 : 5,6 · 10<sup>6</sup> (0,087 нмоль фермента на 0,5 ммоль исходных компонентов), а Z-Ala-Ala-Phe-pNA — при соотношении ~1 : 5,6 · 10<sup>5</sup> (0,87 нмоль фермента на 0,5 ммоль исходных компонентов) (рисунок, кривые 1, 2). Следовательно, замена лейцина на фенилаланин в аминокомпоненте оказывается неблагоприятной для термоллизина. Видимо, приведенный выше ряд специфичности термоллизина по отношению к аминокислоте в положении P<sub>1</sub>' может быть уточнен следующим образом:



Вейн и Фрутоном [6] показано, что при синтезах, катализируемых термоллизином, начальная скорость реакции зависит от аминокислот в положениях P<sub>1</sub> и P<sub>2</sub> карбоксильного компонента. Наиболее предпочтительны в этих положениях гидрофобные аминокислоты и неблагоприятен глицин. Так, при молярном соотношении E : S, равном 1 : 2,5 · 10<sup>4</sup>, начальная ско-

рость конденсации анилида лейцина с пептидами падает в ряду



Однако увеличение количества фермента в 10 раз компенсирует уменьшение соответствия карбоксильного компонента специфичности фермента и при соотношении 1 : 2500 реакция синтеза Z-Gly-Gly-Phe-Leu-NHC<sub>6</sub>H<sub>5</sub> быстро достигает положения равновесия.

Наши результаты качественно согласуются с этими данными. Так, при конденсации Z-Gly-Gly-Phe-OH с H-Leu-pNA для достижения ~70% выхода потребовалось 5,28 нмоль фермента на 0,5 ммоль исходных, т. е. в 60 раз большее количество термолизина, чем при синтезе Z-Ala-Ala-Leu-pNA из H-Leu-pNA и Z-Ala-Ala-OH, в котором в положении P<sub>2</sub> вместо глицина находится остаток аланина (молярное соотношение 1 : 9,46·10<sup>4</sup> и 5,6·10<sup>6</sup> соответственно) (рисунок, кривые 1, 4). Следует напомнить, что растворимость и максимальные выходы при синтезе этих двух пептидов близки. Однако в случае несоответствия карбоксильного компонента специфичности фермента даже очень высокие концентрации последнего не могут обеспечить удовлетворительный выход продукта за время опыта. Так, в описанном выше синтезе Z-Val-Leu-pNA при молярном соотношении термолизина и исходных компонентов 1 : 7,6·10<sup>3</sup> выход продукта не превышает 7%, хотя растворимость этого пептида (~100 нмоль/мл) достаточно мала, чтобы обеспечить хороший его выход. В то же время максимальные выходы более растворимых пептидов, Z-Ala-Ala-Ala-pNA и Z-Ala-Ala-Leu-Ala-pNA, структуры которых соответствуют приведенной выше специфичности фермента по отношению к положениям P<sub>1</sub> и P<sub>2</sub>, несколько выше: 43 и 29% соответственно (рисунок, кривые 3, 5).

Следует отметить, что в описанном методе синтеза концентрации исходных реагентов в реакционной смеси достаточно высоки (0,2—0,7 М). Вследствие этого pH среды в значительной мере определяется исходными компонентами. Так, при конденсации Z-Ala-Ala-OH и H-Leu-pNA pH реакционной среды, определенный прямым измерением, до добавления фермента равен 6,3, а после синтеза — 7,3. В данном случае это соответствует интервалу активности термолизина и поэтому сдвиг pH не снижает эффективности реакции. Однако данный факт следует иметь в виду при катализируемом ферментами синтезе в концентрированных растворах.

Таким образом, при благоприятных условиях (низкой растворимости конечного продукта в реакционной среде, хорошем соответствии структуры карбоксильного и аминокислотного компонента специфичности фермента и соответствию pH реакционной смеси интервалу активности фермента) концентрация его при синтезе может быть существенно снижена за счет повышения температуры и увеличения времени реакции без уменьшения выхода продукта.

### Экспериментальная часть

В работе использованы термолизин (Serva, ФРГ), субтилзин Карлсберг (Novo, Дания), Z-Val, Z-Gly-Gly (Reanal, ВНР), Z-Gly-Ala, Z-Ala-Ala, Z-Thr получены в нашей лаборатории по стандартным методикам. Количество термолизина (нмоль), вводимого в реакцию, рассчитывали исходя из известной для 0,1% раствора чистого термолизина величины A<sub>280</sub>=1,7 [12] и соответствующей величины A<sub>280</sub>=1,04 для 0,1% раствора использованного нами препарата. Гомогенность полученных соединений подтверждали ТСХ на пластинках марки «Силуфол» в системах *n*-бутанол — пиридин — вода — уксусная кислота, 10 : 15 : 12 : 3 (А) и метанол — хлороформ, 1 : 9 (Б). Вещества детектировали в УФ-свете, 0,4% раствором индикатора в ацетоне и 1% раствором KI после хлорирования. 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 Biotronik LC 5000 (ФРГ). Аминокислотный состав полученных пептидов определяли в каждом случае. Характеристики полученных соединений приведены в табл. 5.

## Характеристики полученных соединений

Пептид	$R_f$ в системах		$[\alpha]_D^{20}$ , град (с 1, DMF)	Аминокислотный состав	
	А	Б			
Z-Ala-Phe-pNA	0,83	0,45	+28	Ala : Phe	0,92 : 1,07
Z-Phe-Leu-pNA	0,84	0,60	+4	Leu : Phe	1,00 : 1,01
Z-Thr-Leu-pNA	0,83	0,37	-7	Thr : Leu	1,00 : 0,99
Z-Val-Leu-pNA	0,84	0,58	+15	Val : Leu	1,00 : 0,99
Z-Ala-Ala-Leu-OH	0,67	0,22	-14	Ala : Leu	2,01 : 1,01
Z-Gly-Ala-Leu-OH	0,66	0,13	-13,5	Gly : Ala : Leu	1,01 : 1,02 : 0,97
Z-Gly-Gly-Phe-OH	0,64	0,18	+6	Gly : Phe	1,95 : 1,05
Z-Gly-Ala-Phe-OH	0,65	0,15	-4	Gly : Ala : Phe	1,05 : 0,98 : 0,98
Z-Gly-Gly-Phe-pNA	0,82	0,22	+35	Gly : Phe	1,97 : 1,03
Z-Gly-Ala-Phe-pNA	0,83	0,24	+21	Gly : Ala : Phe	1,01 : 1,01 : 0,99
Z-Gly-Ala-Leu-pNA	0,82	0,23	+7	Gly : Ala : Leu	0,97 : 0,98 : 1,05
Z-Ala-Ala-Ala-pNA	0,85	0,22	-16		
Z-Ala-Ala-Leu-pNA	0,83	0,21	-9	Ala : Leu	1,97 : 1,07
Z-Ala-Ala-Phe-pNA	0,83	0,61	+18	Ala : Phe	1,94 : 1,05
Z-Gly-Gly-Phe-Leu-pNA	0,85	0,24	-6	Gly : Leu : Phe	2,02 : 0,95 : 1,03
Z-Gly-Ala-Phe-Leu-pNA	0,86	0,30	-18,5	Gly : Ala : Leu : Phe	1,00 : 1,04 : 0,94 : 1,03
Z-Gly-Ala-Leu-Phe-pNA	0,86	0,27	+2,5	Gly : Ala : Leu : Phe	1,10 : 1,00 : 1,03 : 1,09
Z-Ala-Ala-Leu-Ala-pNA	0,82	0,25	-35	Ala : Leu	2,95 : 1,04

Растворимость полученных пептидов определяли следующим образом. Навеску пептида суспендировали в 25% водном DMF и смесь перемешивали 18 ч при 37° С (метод растворения) либо навеску пептида растворяли в DMF, выдерживали 30 мин при 37° С и разбавляли раствор водой до конечной концентрации DMF 25% (метод осаждения). В обоих случаях осадок отфильтровывали, количество растворенного пептида определяли с помощью аминокислотного анализа после кислотного гидролиза аликвоты раствора либо спектрофотометрически по формуле

$$c = \frac{A_{315} \cdot P}{15\,000},$$

где  $c$  — молярная концентрация пептида,  $P$  — разведение, 15 000 — молярный коэффициент поглощения  $n$ -нитроанилидов пептидов.

Ниже приведены типовые методики синтеза и гидролиза  $n$ -нитроанилидов ацилпептидов в присутствии термоллизина и субтилизина.

*Z-Thr-Leu-pNA*. 127 мг (0,5 ммоль) *Z-Thr-OH* и 124 мг (0,5 ммоль) *H-Leu-pNA* растворяли в 200 мкл DMF, затем по каплям при перемешивании добавляли 600 мкл воды и 1,7 мг (30 нмоль) термоллизина. Смесь перемешивали 48 ч при 20° С и добавляли 3 мл этилацетата. Органический слой промывали последовательно 0,5 М  $\text{NaHCO}_3$  (5×0,5 мл), водой (2×0,5 мл), 0,5 н.  $\text{HCl}$  (5×0,5 мл), водой (5×0,5 мл), раствор высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали в вакууме. Выход 82 мг (33%). Остальные пептиды, указанные в табл. 1, получали аналогично описанному ранее [4].

*Z-Ala-Ala-Phe-pNA*. Смесь 148 мг (0,5 ммоль) *Z-Ala-Ala-OH* и 143 мг (0,5 ммоль) *H-Phe-pNA* растворяли в 500 мкл DMF, инкубировали при 37° С и при перемешивании по каплям добавляли воду и аликвоту стандартного раствора термоллизина с концентрацией 0,5 мг/мл (8,8 нмоль/мл). При определении зависимости эффективности реакции от количества фермента (рисунок) количество добавляемой воды определялось по формуле 1000 мкл —  $V$  раствора фермента.

Смесь перемешивали 18 ч при 37° С, затем выдерживали 1–2 ч при 4° С для лучшего формирования осадка. Осадок промывали на фильтре последовательно 0,5 М  $\text{NaHCO}_3$  (5×25 мл), водой (2×25 мл), 0,5 н.  $\text{HCl}$  (5×25 мл), водой (5×25 мл) и высушивали над  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Пептиды, перечисленные в подписи к рисунку, получали аналогично из соответствующих  $n$ -нитроанилидов аминокислот и ди- и трипептидов.

Синтез *Z-Ala-Ala-Leu-pNA* с повторным использованием фермента (табл. 4). 148 мг (0,5 ммоль) *Z-Ala-Ala-OH* и 125 мг (0,5 ммоль) *H-Leu-pNA* растворяли в 500 мкл DMF, инкубировали при 37° С и по каплям при перемешивании прибавляли 1400 мкл воды и 100 мкл раствора термоллизина с концентрацией 0,5 мг/мл (0,9 нмоль). Смесь выдерживали 18 ч при 37° С, затем 1–2 ч при 4° С, осадок отфильтровывали и промывали как описано выше. Фильтрат добавляли к раствору 148 мг (0,5 ммоль) *Z-Ala-Ala-OH* и 125 мг (0,5 ммоль) *H-Leu-pNA* в 400 мкл DMF. К реакционной смеси по каплям при перемешивании добавляли воду, объем которой определяли по формуле

$$1500 \text{ мкл} - V \text{ фильтрата.}$$

Смесь выдерживали 18 ч при 37° С, затем 1–2 ч при 4° С. Далее осадок промывали как описано выше. Фильтрат использовали при синтезе третьей порции пептида. Суммарный выход определяли, объединяя все три порции осадка. Выход 695 мг (88%).

Гидролиз *p*-нитроанилидов субтиллизином. 275 мг (0,53 ммоль) *Z-Gly-Ala-Leu-pNA* растворяли в 60 мл этанола, при перемешивании добавляли 240 мл 0,1 н.  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 7,9, и 9 мг субтиллизина. Смесь перемешивали 18 ч при 37° С, затем спирт отгоняли, *p*-нитроанилин экстрагировали этилацетатом (3×50 мл), водную фазу подкисляли 6 н. HCl до pH 1–2 и пептидный продукт экстрагировали этилацетатом (5×50 мл). Выход *Z-Gly-Ala-Leu-OH* после отгонки растворителя 181 мг (87%).

Условия гидролиза других *p*-нитроанилидов ацилпептидов субтиллизином приведены в табл. 3.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Fruton J. S. // Adv. Enzymol. 1982. V. 53. P. 239–306.
2. Kullmann W. W. // J. Prot. Chem. 1985. V. 4. № 1. P. 1–22.
3. Jakubke H.-D., Kuhl P. // Pharmazie. 1982. V. 37. № 2. P. 89–106.
4. Люблинская Л. А., Воюшина Т. Л., Степанов В. М. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 12. С. 1620–1624.
5. Воюшина Т. Л., Люблинская Л. А., Степанов В. М. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 6. 738–744.
6. Wayne S. I., Fruton J. S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 11. P. 3241–3244.
7. Kullmann W. W. // J. Prot. Chem. 1984. V. 2. № 4. P. 289–301.
8. Isoya J., Ohmori M., Ichikawa T., Kurita H., Sato M., Mori K. // Bull. Chem. Soc. Japan. 1977. V. 50. № 10. P. 2762–2765.
9. Petkov D. D., Stoineva I. B. // Tetrahedron Lett. 1984. V. 25. № 34. P. 3751–3754.
10. Oka T., Morichara K. // J. Biochem. 1980. V. 88. № 3. P. 807–813.
11. Люблинская Л. А., Ласговецкая Л. В., Шехватова Г. В., Ваганова Т. И., Степанов В. М. // Химия природн. соедин. 1976. № 1. С. 75–80.
12. Ohta J., Ogura J., Wade A. // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. № 12. P. 5919–5924.

Поступила в редакцию  
29.VII.1986

После доработки  
24.XI.1986

#### SYNTHESIS OF ACYLPEPTIDES *p*-NITROANILIDES CATALYZED BY THERMOLYSIN

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

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

Termolysin-catalysed synthesis of *p*-nitroanilides of acyldipeptides of general formula  $Z-A_1-A_2-pNA$  ( $A_1=\text{Thr, Ala, Val, Leu}$ ;  $A_2=\text{Leu, Phe}$ ) and stepwise synthesis of *p*-nitroanilides of acyltetrapeptides of general formula  $Z-A_1-A_2-A_3-A_4-pNA$  ( $A_1, A_2=\text{Gly, Ala}$ ;  $A_3, A_4=\text{Ala, Leu, Phe}$ ) from  $Z-A_1-A_2-OH$  and  $A_3-pNA$  and then from  $Z-A_1-A_2-A_3-OH$  and  $A_4-pNA$  have been carried out; pNA group was eliminated enzymatically. Increase in solubility of the product in the reaction mixture diminishes its yield. Minimal amount of thermolysin providing a substantial yield of reaction product depends on structure of both amino and carboxylic components. In many cases the molar ratio of the enzyme and starting substances could be decreased to  $1:10^6$  as compared with the generally used ration  $1:10^3 - 1:10^4$ .