



УДК 577.152.344/435:577.112.6

***n*-НИТРОАНИЛИДЫ [ПИРОГЛУТАМИЛПЕПТИДОВ — ХРОМОГЕННЫЕ СУБСТРАТЫ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ**

Люблинская Л. А., Хайду И., Валандина Г. Н.*,
Филиппова И. Ю.*, Маркарян А. Н., Лысогорская Е. Н.*,
Оксенойт Е. С.*, Степанов В. М.*

*Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов;*

** Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет*

Синтезированы *n*-нитроанилиды пироглутамилтрипептидов общей формулы Glp-A-B-C-pNA (где А, В — остатки аланина или глицина, С — остаток лейцина или фенилаланина) с использованием карбодимидного метода и метода активированных эфиров. Glp-Ala-Ala-Leu-pNA получен также ферментативно с помощью термоллизина. Синтезированные соединения обладают значительно более высокой растворимостью в воде по сравнению с их бензилоксикарбонильными аналогами. Показано, что *n*-нитроанилиды пироглутамилпептидов являются субстратами ряда сериновых протеиназ: субтилизина ВРН', α -химотрипсина, эластазы, протеиназы из *Thermoactinomyces vulgaris*, *Streptomyces rutgersensis*, внутриклеточной протеиназы из *Halobacterium halobium*. Использование подобных субстратов особенно перспективно при работе с ферментами, обладающими высокой чувствительностью к органическим растворителям.

Для определения активности протеолитических ферментов применяются синтетические пептидные субстраты, содержащие хромогенные группы, что позволяет следить за ходом гидролиза спектрофотометрически [1—3]. Ранее для бактериальных сериновых протеиназ типа субтилизина был предложен ряд синтетических субстратов, представляющих собой *n*-нитроанилиды бензилоксикарбонилтрипептидов общей формулы Z-A-B-C-pNA, где А, В — остатки аланина или глицина, а С — остаток лейцина или фенилаланина. Отщепление *n*-нитроанилидной группы приводит к характерному изменению в спектре поглощения [4, 5]. Остаток С должен отвечать первичной специфичности анализируемой протеиназы, соответствуя зоне S_1 в центре связывающей субстрата, тогда как остатки А и В должны удовлетворять требованиям вторичной специфичности сериновой протеиназы (зоны S_2 и S_3). Последнее особенно важно в случае сериновых протеиназ микроорганизмов, в частности субтилизина.

Однако рассматриваемые соединения гидрофобны, и для их растворения необходимо использовать водно-органические системы, содержащие до 20% диметилформамида, присутствие которого влияет на каталитическую активность ферментов, оказывая ингибирующее действие. Иногда, например в случае сериновой протеиназы галофильной бактерии *Halobacterium halobium*, фермент полностью неактивен в присутствии диметилформамида такой концентрации [6]. Таким образом, область применения указанных субстратов ограничена, и их использование не позволяет определить истинные значения удельной активности ферментов.

С целью повышения растворимости субстратов в воде мы синтезировали ряд производных пептидов, аналогичных описанным выше, но содержащих в качестве защитной группы вместо гидрофобной бензилоксикарбонильной группировки гидрофильный остаток пироглутаминовой кислоты.

Сокращения: pNA — *n*-нитроанилид, Glp — пироглутаминовая кислота, DCC — N,N'-дихлорогексилкарбодимид, Z — бензилоксикарбонильная группа. Все аминокислоты *L*-ряда.

Удельная активность сериновых протеиназ при гидролизе пептидных субстратов

Протеиназа	Субстрат	Удельная активность, мкмоль/(мин·ОЕ ₂₈₀)			
		Диметилформамид, %			
		20	10	4	1
Субтилизин ВРН'	Z-Ala-Ala-Leu-pNA	1,3	—	—	—
	Glp-Ala-Ala-Leu-pNA	0,38	1,4	—	3,0
	Glp-Ala-Ala-Phe-pNA	0,03	0,09	—	0,26
	Z-Gly-Gly-Phe-pNA	0,06	—	—	—
	Glp-Gly-Gly-Phe-pNA	0,01	0,03	0,05	—
α -Химотрипсин	Z-Ala-Ala-Leu-pNA	0,008	—	—	—
	Glp-Ala-Ala-Leu-pNA	0,03	0,20	—	0,34
	Glp-Ala-Ala-Phe-pNA	1,5	3,3	—	3,6
	Z-Gly-Gly-Phe-pNA	0,01	—	—	—
	Glp-Gly-Gly-Phe-pNA	0,008	0,06	0,08	—
Панкреатическая эластаза из <i>Th. vulgaris</i>	Z-Ala-Ala-Leu-pNA	0,04	—	—	—
	Glp-Ala-Ala-Leu-pNA	0,04	0,12	—	0,36
	Z-Ala-Ala-Leu-pNA	3,0	—	—	—
	Glp-Ala-Ala-Leu-pNA	3,9	23,5	—	108,7
	Glp-Ala-Ala-Phe-pNA	6,0	29,7	—	76,7
из <i>S. rutgersensis</i> *	Z-Ala-Ala-Leu-pNA	0,20	—	—	—
	Glp-Ala-Ala-Leu-pNA	0,24	—	—	6,3
из <i>H. halobium</i> **	Z-Ala-Ala-Leu-pNA	0	—	—	—
	Glp-Ala-Ala-Leu-pNA	—	—	—	5

* Данные работы [8].

** Данные работы [6].

n-Нитроанилиды пироглутамилпептидов синтезировали двумя путями. В первом случае остаток пироглутаминовой кислоты вводили конденсацией *N*-оксисукцинимидного эфира пироглутаминовой кислоты с натриевой солью аланилаланина или глицилглицина с последующим сочетанием пироглутамилпептидов с *n*-нитроанилидами лейцина или фенилаланина карбодимидным методом в присутствии одного эквивалента *N*-оксисукцинимиды. В этом варианте синтеза очистка промежуточных соединений — Glp-Ala-Ala и Glp-Gly-Gly — была в значительной степени затруднена их высокой растворимостью в воде, что не позволило применить обычные экстракционные методы выделения пептидов. Для очистки пироглутамилдипептидов использовали ионообменную хроматографию на катионообменнике дауэкс 50 в H^+ -форме. В выбранных условиях на смоле сорбировались Ala-Ala или Gly-Gly, а пироглутамилзащищенные пептиды элюировались, не задерживаясь на колонке. За ходом элюции следили хроматографически. Фракции, содержащие пироглутамилпептиды, упаривали и пептиды кристаллизовали из смеси этанол — эфир, 1:4. Получение пироглутамилпептидов по этой схеме достаточно трудоемко.

Более перспективен другой путь, сочетающий ферментативный и химический методы конденсации фрагментов на различных этапах синтеза. Этот подход был использован в синтезе Glp-Ala-Ala-Leu-pNA. Z-Ala-Ala конденсировали с Leu-pNA с помощью термолизина [7]. Реакция проходила в водно-органической среде, сдвиг равновесия в сторону образования пептидной связи достигался удалением продукта из сферы реакции в виде осадка. Время реакции обычно не превышало 30 мин. Строгая стереоселективность ферментативного метода синтеза гарантировала отсутствие рацемизации остатка Leu.

Бензилкарбонильную группу удаляли действием бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте, затем бромгидрат *n*-нитроанилида трипептида сочетали с пентафторфениловым эфиром пироглутаминовой кислоты. Введение остатка пироглутаминовой кислоты на последней стадии синтеза позволило обойти трудности, возникшие в предыдущем случае.

Кинетические константы гидролиза субстратов субтилизином BPN' при различных концентрациях диметилформаида (25° С, рН 8,5)

Субстрат	Диметил- формаид, %	$ S \cdot 10^3$, М	$[E] \cdot 10^3$, М	$K_m \cdot 10^3$, М	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_m , с ⁻¹ ·М ⁻¹
Glp-Ala-Ala-Leu-pNA	10	2,0-10,0	0,03	1,13	3,5	3097
	5	1,8-9,1	0,02	0,9	4,2	4660
	1	0,8-4,0	0,035	0,8	4,2	5250
Z-Ala-Ala-Leu-pNA	0,2	0,8-4,0	0,03-0,04	0,143	1,76	12 440
	20	2,6-11,7	0,03	1,86	2,91	1600
	15	0,1-0,5	0,1-0,5	0,55	0,60	1100

Синтезированные *n*-нитроанилиды пироглутамилпептидов использовались в качестве субстратов при определении протеолитической активности субтилизина BPN', α -химотрипсина, эластазы, протеиназы из *Thermoactinomyces vulgaris*, внеклеточной сериновой протеиназы А из *Streptomyces rutgersensis* (SRPA) [8] и сериновой протеиназы из *Halobacterium halobium* [6].

Все изученные ферменты расщепляют связь между остатками лейцина или фенилаланина и *n*-нитроанилидным остатком.

Значения удельной активности ферментов, определенные при гидролизе полученных субстратов, и субстратов, описанных ранее, сопоставлены в табл. 1.

Пироглутамилпроизводные пептидов хорошо растворяются в воде (наибольшей растворимостью (5 мг/мл) обладает Glp-Ala-Ala-Leu-pNA). Это позволило значительно снизить концентрацию диметилформаида, необходимого для растворения субстратов, и, таким образом, практически исключить влияние органического растворителя на активность ферментов.

Обычно использовали 1%-ный диметилформаид, что вызвано стремлением ускорить растворение субстрата в воде, улучшив его смачиваемость. Во всех случаях с уменьшением концентрации диметилформаида скорость гидролиза резко возрастает. Так, в случае субтилизина BPN' уменьшение концентрации диметилформаида в 20 раз (с 20 до 1%) сопровождается увеличением удельной активности фермента по гидролизу Glp-Ala-Ala-Leu-pNA в 8 раз, удельная активность панкреатической эластазы в этих же условиях возрастает в 9 раз, а протеиназ *Th. vulgaris* и *S. rutgersensis* [8] — примерно в 25 раз.

Исследование кинетики гидролиза Glp-Ala-Ala-pNA субтилизином BPN' (табл. 2) показало, что начальные скорости гидролиза подчиняются уравнению Михаэлиса — Ментен.

Изменение концентрации диметилформаида сказывается прежде всего на константе Михаэлиса. При снижении концентрации диметилформаида от 20 до 0,2% K_m уменьшается в 13 раз. Каталитическая константа гидролиза не претерпевает при этом столь значительных изменений. Отношение k_{cat}/K_m при снижении концентрации диметилформаида в 100 раз увеличивается в 7,8 раза, что хорошо согласуется с результатами, полученными при определении удельной активности по этому субстрату в присутствии различных концентраций диметилформаида (табл. 1). Полученные данные позволяют сделать вывод, что диметилформаид является ингибитором исследованных сериновых протеиназ в реакциях гидролиза низкомолекулярных пептидных субстратов.

Из табл. 1 видно, что в сопоставимых условиях, т. е. в присутствии 20% диметилформаида, *n*-нитроанилиды пироглутамилпептидов гидролизуются рядом ферментов примерно так же (α -химотрипсин, панкреатическая эластаза, протеиназа из *Thermoactinomyces vulgaris*) или несколько хуже (субтилизин BPN'), чем соответствующие бензилоксикарбонилзащищенные производные. Это, видимо, следует объяснить отсутствием выгодного в ряде случаев гидрофобного взаимодействия бензилоксикарбонильной группы в положении P_4 субстрата с зоной S_4 в центре связы-

вания фермента [9]. Однако при уменьшении концентрации диметилформамида снижается его ингибирующее действие и сразу же проявляется превосходство пироглутамилсодержащих пептидов над бензилоксикарбонильными производными, нерастворимыми в этих условиях.

Со снижением концентрации диметилформамида уменьшается влияние аминокислотного остатка в положении P_1 субстрата на удельную активность фермента. Так, обычно α -химотрипсин с наибольшей скоростью гидролизует субстраты, содержащие в положении P_1 остаток фенилаланина [10]. Как видно из табл. 1, в присутствии 20% диметилформамида удельная активность α -химотрипсина по гидролизу Glp-Ala-Ala-Phe-pNA в 50 раз выше, чем по гидролизу Glp-Ala-Ala-Leu-pNA. При уменьшении содержания диметилформамида в инкубационной смеси до 1% это различие в значительной степени нивелируется. Удельная активность фермента по гидролизу Glp-Ala-Ala-Leu-pNA в этих условиях возрастает в 11 раз, тогда как по гидролизу Glp-Ala-Ala-Phe-pNA — только в 2,4 раза. Таким образом, в присутствии 1% диметилформамида удельная активность α -химотрипсина по гидролизу Glp-Ala-Ala-Phe-pNA только в 10 раз выше, чем по гидролизу субстрата, содержащего в положении P_1 остаток лейцина.

Как видно из этих данных, ингибирующее влияние диметилформамида на фермент проявляется особенно ярко для субстратов, содержащих в положении P_1 аминокислотный остаток, менее соответствующий специфичности фермента. Это эквивалентно влиянию диметилформамида на первичную специфичность протеиназ. Очень отчетливо такая тенденция прослеживается на примере сериновой протеиназы из *Th. vulgaris*. В присутствии 20% диметилформамида фермент в стандартных условиях определения активности почти с одинаковой скоростью гидролизует Z-Ala-Ala-Leu-pNA и Glp-Ala-Ala-Leu-pNA, тогда как скорость гидролиза Glp-Ala-Ala-Phe-pNA примерно в 2 раза выше. На основании этих результатов можно заключить, что в положении P_1 субстрата фермент предпочитает остаток фенилаланина.

При снижении концентрации диметилформамида до 1% резко возрастает удельная активность фермента при гидролизе Glp-Ala-Ala-Leu-pNA (в 28 раз), тогда как для Glp-Ala-Ala-Phe-pNA этот эффект не столь значителен (12,8 раза). Это приводит к инверсии первичной специфичности фермента, т. е. при низких концентрациях диметилформамида сериновая протеиназа из *Th. vulgaris* с большей скоростью гидролизует субстрат, содержащий в положении P_1 остаток лейцина.

Приведенный выше пример показывает, что необходимо с достаточной осторожностью подходить к данным по определению первичной специфичности протеолитических ферментов при действии на низкомолекулярные синтетические субстраты в присутствии диметилформамида. Этот растворитель в значительной степени препятствует гидрофобным взаимодействиям, необходимым как для поддержания структуры белковой молекулы, так и для образования фермент-субстратного комплекса, и может также мешать образованию водородных связей. Таким образом, в присутствии значительных концентраций диметилформамида могут быть получены искаженные сведения о первичной специфичности фермента, а некоторые протеиназы оказываются полностью неактивными в этих условиях.

Так, в нашей лаборатории выделена сериновая протеиназа из *H. halobium* [6], сохраняющая стабильность в 3 М растворе NaCl. Она полностью неактивна по отношению к Z-Ala-Ala-Leu-pNA, субстрату, требующему для растворения около 20% диметилформамида, однако с высокой скоростью гидролизует Glp-Ala-Ala-Leu-pNA в присутствии 1% диметилформамида (табл. 1).

Таким образом, синтезированные соединения могут быть использованы наряду с их бензилоксикарбонильными аналогами в качестве субстратов для широкого круга сериновых протеиназ. Особенно перспективно их использование при работе с ферментами, обладающими высокой чувствительностью к органическим растворителям.

Экспериментальная часть

Все температуры плавления даны без исправления. Гомогенность полученных соединений подтверждена с помощью ТСХ на пластинках Silufol в системах: *n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 4 : 5 : 1 (А); *n*-бутанол — вода — пиридин — уксусная кислота, 15 : 12 : 10 : 3 (Б). Оптическую активность измеряли на поляриметре Roussel Jouan (Франция).

Кислотный гидролиз проводили в 5,7 н. HCl (105° С, 24 ч), гидролизат анализировали на автоматическом аминокислотном анализаторе Durrum D-500 (США).

В работе использовали субтилизин ВРН' (КФ 3.4.4.16), эластазу (КФ 3.4.4.7), α -химотрипсин (КФ 3.4.21.4) и термоллизин (КФ 3.4.24.4) (все — Serva, ФРГ), протеназу из *Th. vulgaris* (КФ 3.4.4.16) [11].

Пироглутамилаланил-аланин. К суспензии 2 г (15,5 ммоль) пироглутаминовой кислоты в 20 мл абс. этилацетата при постоянном перемешивании прибавляли 1,73 г (15,5 ммоль) *N*-оксисукцинимид и раствор 3,7 г (18 ммоль) DCC в 5 мл абс. этилацетата. Реакционную смесь перемешивали 24 ч (20° С), фильтровали, фильтрат упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 20 мл диметилформамида и прибавляли к раствору 2 г (12,5 ммоль) аланилаланина и 1,0 г (12,5 ммоль) NaHCO₃ в 5 мл воды. Поддерживали pH раствора 8—9 прибавлением 1,73 мл (12,5 ммоль) триэтиламина. Перемешивали 40 ч (20° С), подкисляли 2 н. HCl до pH 5 и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 60 мл воды и хроматографировали на колонке (3 × 15 см) со смолы дауэкс 50 × 8 в H⁺-форме. Продукт элюировали водой, pH 5,6, за ходом элюции следили хроматографически. Фракции, содержащие Glp-Ala-Ala, упаривали в вакууме, остаток кристаллизовали из смеси 10 мл этанола и 40 мл эфира, осадок промывали этилацетатом, эфиром и высушивали в вакууме. Выход 2 г (59%), т. пл. 223° (с разл.), $[\alpha]_D^{20}$ — 88° (с 0,5; вода), R_f 0,42 (А), 0,52 (Б). C₁₁H₁₇N₃O₅ (анализ С, Н, N).

Пироглутамилглицил-глицин синтезировали по вышеприведенной методике. Выход 38%, т. пл. 186° (с разл.), $[\alpha]_D^{20}$ — 12° (с 0,5; вода), R_f 0,25 (А), 0,43 (Б). C₉H₁₅N₃O₆ (анализ С, Н, N).

***n*-Нитроанилид пироглутамилаланил-аланил-лейцина.** Раствор 0,2 г (0,74 ммоль) Glp-Ala-Ala, 0,18 г (0,74 ммоль) Leu-pNA и 0,08 г (0,74 ммоль) *N*-оксисукцинимид в 10 мл абс. диметилформамида смешивали с 0,2 г (0,9 ммоль) DCC в 5 мл абс. диметилформамида. Реакционную смесь перемешивали 3 ч при 0° С, затем 20 ч при 20° С, фильтровали и упаривали в вакууме. Остаток растворяли при слабом нагревании в 5 мл бутанола. К раствору добавляли 10 мл этилацетата и смесь оставляли на холоду на 24 ч. Отделяли дициклогексимочевину, к раствору добавляли 5 мл бутанола, промывали раствор 1% NaHCO₃, сушили над Na₂SO₄ и упаривали в вакууме досуха. Остаток кристаллизовался под эфиром. Выход 0,22 г (60%), т. пл. 261—264°; $[\alpha]_D^{23}$ — 16° (с 0,5; диметилформамид), R_f 0,86 (А), 0,86 (Б). C₂₃H₃₂N₆O₇ (анализ С, Н, N).

По аналогичной методике синтезировали: ***n*-нитроанилид пироглутамилаланил-аланил-фенилаланина** (выход 50%, т. пл. 213—217° С, $[\alpha]_D^{20}$ — 16° (с 0,5; диметилформамид); R_f 0,86 (А); 0,76 (Б). C₂₀H₃₀N₆O₇ — анализ С, Н, N) и ***n*-нитроанилид пироглутамилглицил-глицил-фенилаланина** (выход 59%, $[\alpha]_D^{20}$ +16° (с 0,5; диметилформамид); R_f 0,86 (А); 0,77 (Б). C₂₄H₂₆N₆O₇ — анализ С, Н, N).

***n*-Нитроанилид бензилоксикарбонилаланил-аланил-лейцина.** К раствору 1,47 г (5 ммоль) Z-Ala-Ala и 1,26 г (5 ммоль) Leu-pNA в 6 мл диметилформамида прибавляли по каплям 16 мл воды, содержащей 0,05 М CaCl₂ (pH 7,8), затем вносили 2,5 мг термоллизина. Через 30 мин прибавляли 10 мл воды и оставляли реакционную смесь на 14 ч при 4° С. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали 0,5 н. раствором NaHCO₃ (3 × 20 мл), водой (3 × 20 мл), 5% раствором лимонной кислоты (5 × 40 мл), затем водой (5 × 40 мл) и сушили в вакууме над щелочью. Выход 2,47 г (94%); R_f 0,83 (Б).

Бромидрат *n*-нитроанилида аланил-аланил-лейцина. К 1,05 г (2 ммоль) Z-Ala-Ala-Leu-pNA прибавляли 5 мл НВг в ледяной уксусной кислоте, перемешивали 1 ч при 20° С. При добавлении абс. эфира образо-

вывался осадок, его отделяли, промывали абс. эфиром. Выход 0,88 г (93%); R_f 0,64 (Б).

n-Нитроанилид пироглутамилаланил-аланил-лейцина. К раствору 295 мг (1 ммоль) пентафторфенилового эфира пироглутаминовой кислоты [11] и 474 мг (1 ммоль) HBr-Ala-Ala-Leu-pNA в смеси 1 мл абс. тетрагидрофурана и 3 мл абс. этилацетата прибавляли 0,139 мл (1 ммоль) абс. триэтиламина и оставляли реакционную смесь на 14 ч при 4° С. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали абс. тетрагидрофураном. Фильтрат упаривали в вакууме, образовавшееся масло экстрагировали 100 мл смеси этилацетат — бутанол (9:1) и промывали водой (3 × 3 мл), 0,1 н. HCl (3 × 3 мл), водой (4 × 3 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄ и упаривали в вакууме досуха. Образовавшийся кристаллический осадок промывали горячим этилацетатом и сушили в вакууме над щелочью. Выход 350 мг (69%).

Кинетические измерения. Начальные скорости гидролиза Glp-Ala-Ala-Leu-pNA и Z-Ala-Ala-Leu-pNA субтилизинном BPN' определяли на многоканальном спектрофотометре Gemsaeс (США) при длине волны 410 нм и 25° С, считая ϵ для *n*-нитроанилина равным 8900 М⁻¹·см⁻¹. Реакционная смесь содержала 440 мкл 10 мМ трис-HCl, 1 мМ CaCl₂, 100 мМ KCl-буфера (рН 8,5), 50 мкл субстрата в том же буфере, содержащем от 20 до 0,2% диметилформамида и 10 мкл раствора субтилизина (0,5—1 мкг). Конечная концентрация субстрата в смеси варьировала от 0,75·10⁻⁴ до 12,7·10⁻⁴ М.

Кинетические параметры гидролиза рассчитаны по методу наименьших квадратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Erlanger B. F., Kokowsky N., Cohen W. // Arch. Biochem. and Biophys. 1961. V. 95. № 2. P. 271—278.
2. Bundy H. F. // Anal. Biochem. 1962. V. 3. № 3. P. 431—435.
3. Kasajirek E., Fric P., Mališ F. // FEBS Lett. 1974. V. 40. № 2. P. 353—356.
4. Люблинская Л. А., Якушева Л. Д., Степанов В. М. // Биоорганич. химия. 1977. Т. 3. № 2. С. 273—279.
5. Якушева Л. Д., Люблинская Л. А., Степанов В. М. // Биоорганич. химия. 1978. Т. 4. № 12. С. 1660—1664.
6. Izotova L. S., Strongin A. Ya., Chekulaeva L. M., Sterkin V. E., Ostoslavskaya V. I., Luyblinskaya L. A., Timochina E. A., Stepanov V. M. // J. Bacteriology. 1983. V. 155. № 2. P. 826—830.
7. Люблинская Л. А., Воюшина Т. Л., Степанов В. М. // Биоорганич. химия. 1982. Т. 8. № 12. С. 1620—1624.
8. Калугер С. В., Боровикова В. П., Лавренова Г. И., Степанов В. М., Шлокене А. П., Гуреев М. П., Ужжуренас А. П. // Биохимия. 1983. Т. 48. № 9. С. 1483—1490.
9. Morihara K., Oka T., Tsuzuki H. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1969. V. 35. № 1. P. 210—214.
10. Антонов В. К. // Биоорганич. химия. 1980. Т. 6. № 6. С. 805—839.
11. Степанов В. М., Руденская Г. Н., Нестерова Н. Г., Куприянова Т. Н., Хохлова Ю. М., Усайте И. А., Логина Л. Г., Тимохина Е. А. // Биохимия. 1980. Т. 45. № 10. С. 1871—1880.
12. Лысогоорская Е. Н., Филиппова И. Ю., Бойцова С. Е., Оксенойт Е. С., Люблинская Л. А., Степанов В. М. // Биоорганич. химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 470—477.

Поступила в редакцию
15.X.1986

p-NITROANILIDES OF PYROGLUTAMYLPEPTIDES AS CHROMOGENIC SUBSTRATES OF SERINE PROTEINASES

LUYBLINSKAYA L. A., HAIDU I.*, BALANDINA G. N.*, FILIPPOVA I. Yu.*,
MARKARYAN A. N., LYSOGORSKAYA E. N.*, OKSENOIT E. S.*, STEPANOV V. M.

Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms:

**Department of Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow*

p-Nitroanilides of pyroglutamylpeptides of the common structure Glp-A-B-C-pNA (where A, B = Ala or Gly, C = Leu or Phe) have been synthesised by means of carbodiimide or activated ester methods. Glp-Ala-Ala-Leu-pNA was obtained by combination of chemical and enzymatic methods of peptide synthesis. The compounds were better soluble in water than their benzyloxycarbonyl analogues. The synthesised pyroglutamyl tripeptide *p*-nitroanilides can be used as substrates in the assay of proteolytic activity for a wide range of serine proteinases: subtilisin BPN', α -chymotrypsin, elastase, proteinase from *Thermoactinomyces vulgaris*, intracellular proteinase A from *Streptomyces rutgersensis*, proteinase from *Halobacterium halobium*. The use of the substrates is especially promising in case of enzymes highly sensitive to organic solvents.