



УДК 547.964.07+577.156

**СИНТЕЗ ПЕПТИДНЫХ СУБСТРАТОВ СУБТИЛИЗИНА  
И ИХ АНАЛОГОВ \****Люблинская Л. А., Якушева Л. Д., Степанов В. М.**Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики  
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва*

Осуществлен синтез ряда пептидных субстратов субтилизина — *n*-нитроанилидов *N*-карбобензоксипроизводных глицил-глицил-лейцина, аланил-аланил-лейцина, глицил-глицил-фенилаланина, аланил-аланил-фенилаланина, аланил-лейцина и глицил-лейцина, позволяющих следить за ходом ферментативного гидролиза спектрофотометрически. Взаимодействием *n*-нитрофенилового эфира карбобензоксиглицил-глицил-*D*-лейцина с гексаметилендиаминсефарозой 4В получен сорбент, применимый для биоспецифической хроматографии субтилизина. Синтезирована *N*-(карбобензоксипроизводного глицил-глицил-лейцина)-антрапириловая кислота, оказавшаяся конкурентным ингибитором субтилизина.

Субтилизины — сериновые протеиназы, продуцируемые *Bacillus subtilis* и некоторыми близкими видами, получили широкое практическое применение. Данная работа посвящена получению серии пептидных субстратов и их аналогов, которые могут быть использованы для спектрофотометрического определения активности субтилизинов, синтеза биоспецифических сорбентов, а также для отбора продуцентов мутантных форм субтилизина.

Как показали Морихара и сотр. [1, 2], субтилизин легко гидролизует амидные связи, образованные карбоксильными группами остатков лейцина и фенилаланина. Существенно, чтобы этим остаткам предшествовало два-три аминокислотных звена, участвующих в образовании фермент-субстратного комплекса. Необходимо также блокирование *N*-концевой аминогруппы, присутствие которой затрудняет гидролиз пептидных субстратов субтилизином [1, 2].

Для определения активности протеолитических ферментов удобны *n*-нитроанилиды аминокислот и пептидов, при гидролизе которых образуется *n*-нитроанилин, характерно отличающийся по спектру поглощения от субстрата (рис. 1) [3—5]. В качестве хромогенных субстратов субтилизина нами синтезированы *n*-нитроанилиды *N*-карбобензоксипроизводных глицил-глицил-лейцина [6], аланил-аланил-лейцина, глицил-глицил-фенилаланина, аланил-аланил-фенилаланина, глицил-лейцина и аланил-лейцина. *n*-Нитроанилиды трипептидов были получены конденсацией соответствующих карбобензоксидипептидов с *n*-нитроанилидами лейцина

\* Принятые сокращения: ONp — *n*-нитрофенокси-; HONSu — *N*-оксисукцинимид; DCC — *N,N'*-дициклогексилкарбодимид; DMF — диметилформамид; Ant — антрапириловая кислота; -NHPHNO<sub>2</sub> — *n*-нитроанилид. Все аминокислоты, кроме указанных особо, *L*-ряда.

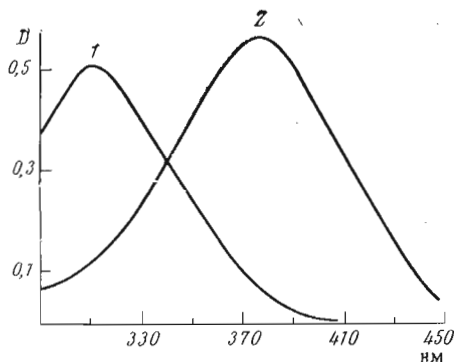


Рис. 1

Рис. 1. Спектры поглощения Z-Gly-Gly-Leu-NHPhNO<sub>2</sub> (1) и *n*-нитроанилина (2) (0,05 M Трис-HCl-буфер, pH 8,5, содержащий 7,5% ацетонитрила)

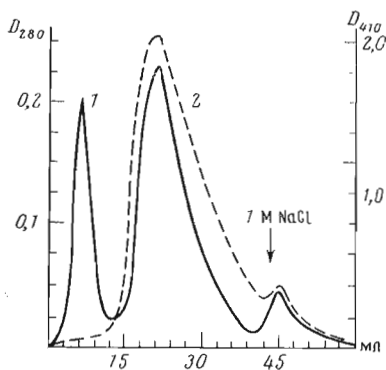
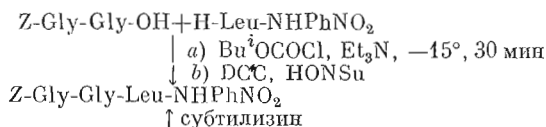


Рис. 2

Рис. 2. Хроматография субтилизина А на гексаметилендиаминсефарозе 4В с присоединенным Z-Gly-Gly-D-Leu (0,1 M боратный буфер, pH 9,56): 1 — D<sub>280</sub>; 2 — D<sub>410</sub> (протеолитическая активность по расщеплению Z-Gly-Gly-Leu-NHPhNO<sub>2</sub>)

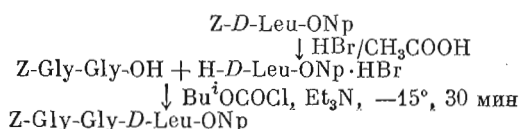
и фенилаланина методом смешанных ангидридов с использованием изобутилового эфира хлоругольной кислоты (а) или карбодимидным методом с добавлением одного эквивалента N-оксисукцинимида (b) [7, 8]:



*n*-Нитроанилиды дипептидов получены конденсацией карбобензоксинаминокислот с *n*-нитроанилидом лейцина в присутствии дициклогексилкарбодимида и одного эквивалента N-оксисукцинимида. Полученные *n*-нитроанилиды полностью гидролизуются субтилизином при pH 9,5 с образованием соответствующих карбобензоксиди- и трипептидов и *n*-нитроанилина и могут быть использованы для колориметрического определения субтилизина, а также для локализации субтилизина после диск-электрофореза в полиакриламидном геле [6]. Кинетические характеристики этих субстратов будут даны в других сообщениях, однако следует отметить, что *n*-нитроанилиды дипептидов являются значительно худшими субстратами субтилизина по сравнению с *n*-нитроанилидами трипептидов. Замена глицина аланином в субстратах существенно облегчает их гидролиз субтилизином. Эти наблюдения находятся в хорошем соответствии с существующими представлениями о роли вторичных взаимодействий в образовании субтилизином фермент-субстратного комплекса [9].

В последние годы быстро развивается метод биоспецифической (аффинной) хроматографии ферментов на сорбентах, представляющих собой ковалентно связанные с носителем субстраты или аналоги субстратов [10, 11]. Для получения сорбента, способного избирательно связывать субтилизин, методом смешанных ангидридов мы синтезировали *n*-нитрофениловый эфир карбобензоксиглицил-глицил-*D*-лейцина по схеме 1.

Схема 1



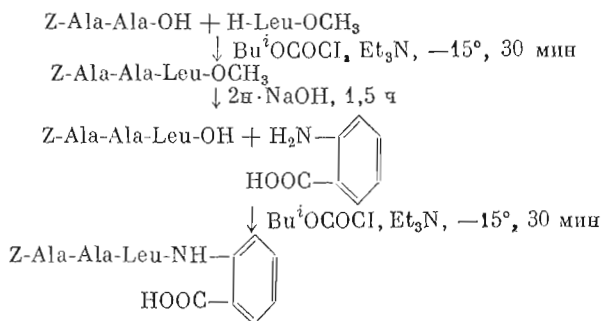
Выход *n*-нитрофенилового эфира карбобензокситрипептида составил 78%.

Для получения специфического сорбента сефарозу 4В активировали бромцаном и обрабатывали гексаметилендиамином [12]. Полученное производное, содержащее ковалентно связанный гексаметилендиамин, вводили в реакцию с *n*-нитрофениловым эфиром карбобензоксиглицил-глицил-*D*-лейцина в 50% водном диметилформамиде при pH 9. Содержание лиганда составило 6—7 мкмоль на 1 мл влажного сорбента.

Хроматография субтилизина А на полученном сорбенте показывает (рис. 2), что от субтилизина отделяются балластные белки. Прочного связывания фермента не наблюдается, по-видимому, вследствие того, что данный аналог субстрата относительно слабо взаимодействует с ферментом. Фермент, однако, движется по колонке значительно медленнее балластных белков, что обеспечивает его очистку.

Для отбора мутантов *Bacillus subtilis*, синтезирующих измененные формы субтилизина, представляют интерес субстраты или аналоги субстратов, содержащие факторы роста бактерий. С этой целью нами был синтезирован пептид, отвечающий структурным требованиям, предъявляемым к субстратам субтилизина, который включал остаток антралиловой кислоты. *N*-(Карбобензоксипалил-аланил-лейцил)-антралиловая кислота была получена по схеме 2.

#### Схема 2



Очистка полученного соединения осложнялась тем, что антралиловая кислота хорошо растворима в различных органических растворителях и лишь ограниченно в воде. Применение для этой цели хроматографии на сефадексе LH-20 в 96% этаноле позволило выделить *N*-(карбобензоксипалил-аланил-лейцил)-антралиловую кислоту с выходом 44%, считая на сырой продукт конденсации. При этом выяснилось (рис. 3), что среди продуктов реакции содержится значительная примесь *N*-(карбобензоксипалил-аланил)-антралиловой кислоты, идентифицированной по характерному аминокислотному составу. Образование этого соединения, по-видимому, объясняется внутримолекулярной перегруппировкой с отщеплением лейцина [13].

Вопреки ожиданиям, *N*-(карбобензоксипалил-аланил-лейцил)-антралиловая кислота оказалась устойчивой к действию субтилизина. Более того, как было показано Л. Ф. Матяш и С. В. Беляевым в нашей лаборатории, этот пептид является конкурентным ингибитором субтилизина с  $K_i$

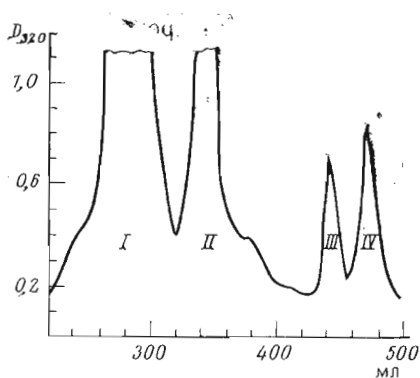


Рис. 3. Хроматография Z-Ala-Ala-Leu-Ant-OH на сефадексе LH-20: I — Z-Ala-Ala-Leu-Ant-OH; II — Z-Ala-Ala-Ant-OH; III — смесь веществ из I и II пиков и антралиловой кислоты; IV — антралиловая кислота

$1,4 \cdot 10^{-4}$  М. Мы предполагаем, что устойчивость связи лейцил — антралиловая кислота к атаке субтилизином обусловлена тем, что при взаимодействии этого пептида с ферментом карбоксильная группа антралиловой кислоты сближается с имидазольной группой гистидина в активном центре и искажает тем самым ансамбль серин — гистидин — аспарагиновая кислота, которым обусловлена активность субтилизина.

### Экспериментальная часть

Все температуры плавления даны без исправления. Гомогенность полученных соединений контролировали с помощью ТСХ на пластинках марки «Силуфол». Использовали следующие системы растворителей: пиридин — *n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 15 : 10 : 12 : 3 (А); метанол — хлороформ, 1 : 9 (Б); хлороформ — уксусная кислота — метанол — петролейный эфир, 45 : 5 : 5 : 5 (В). ВХ соединений проводили на хроматографической бумаге Filtrak № 14 (ГДР) в системе пиридин — *n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 15 : 10 : 12 : 3 (Г). Электрофорез осуществляли на хроматографической бумаге «Ленинградская» (средняя) марки Б в течение 30 мин при градиенте потенциала 27 В/см. Использовали пиридин-ацетатный буфер, рН 5,6 (8 мл пиридина, 2 мл уксусной кислоты и 990 мл воды). Измерение оптической активности исследуемых соединений выполняли на регистрирующем поляриметре Jasco ORD/UV-5 (Япония). Кислотный гидролиз проводили в стандартных условиях (5,7 н. HCl, 105°, 22 ч), после чего аминокислотный состав определяли хроматографией на бумаге или с помощью автоматического аминокислотного анализатора типа Bio Cal BC-200 (ФРГ).

В работе были использованы субтилизин А (субтилопептидаза АКФ 3.4.4.16) фирмы Serva (ФРГ), *n*-нитроанилид лейцина производства Московского химического завода им. Войкова и фирмы Serva (ФРГ), сефароза 4В (Pharmacia, Швеция).

Ниже приведены типовые методики получения пептидов методом смешанных ангидридов (метод *a*) и карбодимидным методом (метод *b*). Характеристики синтезированных соединений приведены в таблице.

*Z-Gly-Gly-Leu-NHPhNO<sub>2</sub>* (метод *a*). К раствору 1,57 г (5,9 ммоль) карбобензоксиглицил-глицина в 15 мл сухого DMF при  $-15^\circ$  прибавляли 0,84 мл (6 ммоль) триэтиламина и через 10 мин 0,84 мл (6 ммоль) изобутилового эфира хлоругольной кислоты. Через 30 мин смешивали с охлажденным до  $-15^\circ$  раствором *n*-нитроанилида лейцина, полученным прибавлением 0,84 мл (6 ммоль) триэтиламина к 1,96 г (5,9 ммоль) бромгидрата *n*-нитроанилида лейцина [14] в 5 мл сухого DMF. Перемешивали 1 ч при охлаждении и 1 ч при  $20^\circ$ , оставляли на ночь в холодильнике. Отфильтровывали осадок соли триэтиламина, фильтрат упаривали в вакууме. Полученное масло растворяли в 75 мл этилацетата и последовательно промывали 15 мл воды, 0,5 н. NaHCO<sub>3</sub> (3 × 15 мл), водой (1 × 15 мл), 0,5 н. HCl (3 × 15 мл), водой (2 × 15 мл), высушивали над сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Остаток перекристаллизовывали из смеси этилацетат — петролейный эфир. Выход 2,1 г.

*Z-Ala-Ala-Leu-NHPhNO<sub>2</sub>* (метод *b*). К раствору 0,588 г (2 ммоль) карбобензоксисаланил-аланина [15], 0,502 г (2 ммоль) *n*-нитроанилида лейцина и 0,230 г (2 ммоль) *N*-оксисукцинимида в 10 мл сухого DMF при перемешивании и охлаждении до  $-15^\circ$  прибавляли 0,412 г (2 ммоль) DCC. Перемешивали 40 мин при  $-10 \div -15^\circ$  и затем при  $4^\circ$  в течение ночи. Осадок дидиклогексилмочевины отфильтровывали, промывали DMF, объединенные фильтраты упаривали в вакууме. Получившийся остаток растворяли в 200 мл этилацетата и промывали 30 мл воды, 0,5 н. NaHCO<sub>3</sub> (2 × 30 мл), водой (1 × 30 мл), 0,5 н. HCl (2 × 30 мл), водой (2 × 30 мл), высушивали над сульфатом натрия. Растворитель упаривали в вакууме,

Константы и выходы полученных соединений

№	Соединения	Метод синтеза*	Выход, %	Т. пл., °C	R <sub>f</sub> в системах				[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> , град (с 1; DMF)	Найдено, %			Вычислено, %			
					А	Б	В	Г		С	Н	Н	С	Н	Н	
										Брутто-формула						
1	Z-Gly-Gly-Leu-NHPhNO <sub>2</sub>	a	71,5	152—154	0,80	0,21	0,49		-5,9	57,75	5,87	13,70	57,72	5,84	14,02	C <sub>4</sub> H <sub>29</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>
2	Z-Ala-Ala-Leu-NHPhNO <sub>2</sub>	b	84	205	0,83	0,21	0,66		-8,0	59,59	6,33	13,21	59,49	6,30	13,28	C <sub>26</sub> H <sub>33</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>
3	Z-Gly-Gly-Phe-NHPhNO <sub>2</sub>	b	83	181—182	0,80	0,48	0,50		+35,0	61,01	5,77	13,39	60,97	5,10	13,13	C <sub>27</sub> H <sub>27</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>
4	Z-Ala-Ala-Phe-NHPhNO <sub>2</sub>	b	60,2	214—216	0,83	0,61	0,83		+19,0	61,99	5,91	12,30	62,02	5,56	12,47	C <sub>29</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>
5	Z-Gly-Leu-NHPhNO <sub>2</sub>	b	73	222 (разл.)	0,85	0,55	0,80		-13,0	60,08	5,66	12,20	59,72	5,92	12,66	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>
6	Z-Ala-Leu-NHPhNO <sub>2</sub>	b	67	189	0,81	0,59	0,81		+8,0	60,91	6,40	12,50	60,51	6,18	12,37	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>
7	H-D-Leu-ONp·HBr		66	185—186 (разл.)				0,48	+13,9	43,22	5,18	8,52	43,27	5,41	8,41	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ·HBr
8	Z-Gly-Gly-D-Leu-ONp	a	78,2	70—72				0,95	-33,4	57,91	5,61	11,30	57,62	5,60	11,19	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>
9	Z-Ala-Ala-Leu-OMe	a	90,6	77—79				0,92	-25,8	59,83	7,27	10,10	59,86	7,36	9,97	C <sub>21</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>
10	Z-Ala-Ala-Leu-OH		89,0	147—149				0,90	-17,8	58,82	7,44	9,97	58,97	7,12	10,31	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>
11	Z-Ala-Ala-Leu-Ant-OH	a	44	—				0,96	-20,9	61,74	7,01	11,00	61,48	6,51	10,65	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>

\* a — метод смешанных ангидридов; b — карбодимидный метод с использованием одного эквивалента N-оксикунинагида.

оставшееся твердое вещество перекристаллизовывали из кипящего этилацетата. Выход 0,882 г.

*H-D-Leu-ONp·HBr*. К 5 г (13 ммоль) *n*-нитрофенилового эфира карбобензоксид-*D*-лейцина прибавляли 15 мл 40% бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте, выдерживали 20 мин при 20° и осаждали 100 мл сухого эфира. Выдерживали 1 ч при охлаждении и фильтровали выпавший осадок. Многократно промывали осадок сухим эфиром, перекристаллизовывали из этилового спирта. Выход 2,84 г.

*Присоединение гексаметилендиамина к активированной сефарозе 4В*. Смешивали 20 мл сефарозы 4В, отмытой на воронке с пористым фильтром, с раствором 5 г  $\text{BrCN}$  в 20 мл холодной воды. При энергичном перемешивании прибавляли охлажденный раствор 4 М  $\text{NaOH}$  и поддерживали рН 11, добавляя при этом кусочки льда, чтобы температура не поднималась выше 20°. Через 12 мин фильтровали на охлажденной льдом воронке с пористым фильтром, промывали 300 мл холодного раствора 0,1 М  $\text{NaHCO}_3$ . Через 2 мин обрабатывали раствором 4,68 г гексаметилендиамина в 10 мл холодной воды, оттитрованным 6 н.  $\text{HCl}$  до рН 10. Оставляли при перемешивании при 4° на 15 ч. Промывали на воронке с пористым фильтром холодной дистиллированной водой до рН 6–6,2.

*Получение специфического сорбента для хроматографии субтилизина*. Суспендировали 5 мл сефарозы с присоединенным гексаметилендиаминном в 4 мл 50% водного DMF (по объему 1 : 1) и при перемешивании за 1,5 ч прибавляли порциями по 4 мл раствор 0,2 г *n*-нитрофенилового эфира карбобензоксиглицил-глицил-*D*-лейцина в 50% водном DMF (0,2 г пептида растворяли в 12 мл сухого DMF, отбирали порции по 2 мл и разбавляли 2 мл воды непосредственно перед прибавлением к суспензии сефарозы). Прибавлением триэтиламина поддерживали рН  $9 \pm 0,1$ . Перемешивали 2 ч при 20°, поддерживая рН 9, оставляли при 4° на ночь при перемешивании. Промывали на воронке с пористым фильтром при очень слабом вакууме последовательно 50% водным DMF (400 мл), смесью 1 : 1 50% водного DMF и 0,1 М  $\text{NaHCO}_3$  (400 мл), 0,1 М  $\text{NaHCO}_3$  (200 мл), водой до рН 6. Отбирали пробу влажной сефарозы (0,0331 г) и гидролизовали в стандартных условиях. Гидролизат фильтровали и упаривали в вакууме. По данным аминокислотного анализа, в пробе содержится 0,162 мкмоль лейцина (1 остаток) и 0,300 мкмоль глицина (2 остатка).

*Хроматография субтилизина А (рис. 2)*. Растворяли 5 мг субтилизина А в 1 мл 0,1 М боратного буфера (рН 9,56), содержащего 0,03%  $\text{CaCl}_2$ . Наносили на колонку 0,8 мл полученного раствора, собирали фракции по 3 мл, скорость элюции 7–8 мл/ч. Содержание белка определяли по поглощению при 280 нм. Для определения протеолитической активности смесь 0,5 мл раствора белка, 0,5 мл 3 мМ раствора *n*-нитроанилида карбобензоксиглицил-глицил-лейцина и 2 мл буфера (0,05 М Трис- $\text{HCl}$ , рН 8,5) инкубировали при 40° в течение 30 мин. Останавливали реакцию прибавлением 1 мл 2 М цитратного буфера, рН 5. Измеряли оптическую плотность при 410 нм.

*Z-Ala-Ala-Leu-OH*. К раствору 1,5 г (3,58 ммоль) метилового эфира карбобензоксипалил-аланил-лейцина в 10 мл метанола прибавляли 3,6 мл (7,16 ммоль) 2 н.  $\text{NaOH}$ , перемешивали 1,5 ч при 20°, подкисляли 6 н.  $\text{HCl}$  до рН 4. Прозрачный раствор упаривали в вакууме. Остаток экстрагировали кипящим этилацетатом (45 мл), фильтровали, фильтрат упаривали в вакууме. Выход 1,3 г.

*Z-Ala-Ala-Leu-Anl-OH*. К раствору 1,02 г (2,5 ммоль) карбобензоксипалил-аланил-лейцина в 5 мл сухого DMF при  $-15^\circ$  прибавляли 0,35 мл (2,5 ммоль) триэтиламина и через 10 мин 0,35 мл (2,5 ммоль) изобутилового эфира хлоругольной кислоты. Через 30 мин смешивали с охлажденным до  $-15^\circ$  раствором триэтиламмониевой соли антрапиловой кислоты, полученным прибавлением 0,35 мл (2,5 ммоль) триэтиламина к 0,36 г (2,5 ммоль) антрапиловой кислоты в 2 мл сухого DMF. Перемешивали 1 ч при охлаждении и 1 ч при 20°, оставляли на ночь в холодильнике. Отфильтровывали

осадок хлоргидрата триэтиламина, фильтрат упаривали в вакууме. Масло растворяли в 25 мл этилацетата и промывали водой с pH 3 (10 × 6 мл), водой (1 × 5 мл), 0,5 н. NaHCO<sub>3</sub> (2 × 6 мл), водой (1 × 6 мл), высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали в вакууме. Выход неочищенного вещества 1,16 г (84%). Для дальнейшей очистки использовали хроматографию на сефадексе LH-20 (рис. 3). На колонку с сефадексом LH-20 в 96% этаноле (3 × 148 см, объем 1 л) наносили раствор 1 г вещества в 50 мл 96% этанола (скорость элюции 10—12 мл/ч), собирали фракции по 3 мл. За ходом элюции следили спектрофотометрически по поглощению при 320 нм. Состав каждого пика определяли электрофорезом на бумаге. Пробы вещества из первого и второго пиков (по 3 мл) упаривали в вакууме и гидролизovali в стандартных условиях. Аминокислотный состав определяли хроматографией на бумаге. Собирали вещество, выходящее в первом пике, упаривали в вакууме, получали аморфный продукт. Выход 0,44 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Morihara K., Oka T., Tsuzuki H. (1970) Arch. Biochem. and Biophys., 138, 515—525.
2. Morihara K., Tsuzuki H., Oka T. (1974) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 42, 1000—1006.
3. Erlanger B. F., Kokowsky N., Cohen W. (1964) Arch. Biochem. and Biophys., 95, 271—278.
4. Bundy H. F. (1962) Anal. Biochem., 3, 431—435.
5. Nishi N., Tokura S., Noguchi J. (1970) Bull. Chem. Soc. Jap., 43, 2900—2907.
6. Ljublinskaya L. A., Belyaev S. V., Strongin A. Ya., Matyash L. F., Levin E. D., Stepanov V. M. (1974) Anal. Biochem., 62, 371—376.
7. Wunsch E., Dress F. (1966) Chem. Ber., 99, 110—120.
8. Weygand F., Hoffmann D., Wunsch E. (1966) Z. Naturforsch., 21, 426—428.
9. Morihara K., Oka T. (1973) FEBS Lett., 33, 54—56.
10. Cuatrecasas P., Anfinsen C. B. (1971) Annu. Rev. Biochem., 40, 259—278.
11. May S. W., Zaborsky O. R. (1974) Separ. and Purif. Meth., 3, 1—86.
12. Cuatrecasas P. (1970) J. Biol. Chem., 245, 3059—3065.
13. Noguchi J., Kawai M., Hamada M. (1974) Isr. J. Chem., 12, 87—101.
14. Tuppy H., Wiesbauer U., Wintersberger E. (1962) Z. Physiol. Chem., 329, 278—288.
15. Bosshard H. R., Schechter I., Berger A. (1973) Helv. chim. acta, 56, 717—723.

Поступила в редакцию  
5.VIII.1976

#### SYNTHESIS OF SUBTILISIN PEPTIDE SUBSTRATES AND THEIR ANALOGS

LJUBLINSKAYA L. A., YAKUSHEVA L. D., STEPANOV V. M.

*Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow*

The following peptide substrates for spectrophotometric assay of subtilisin were synthesized: Z-Gly-Gly-L-Leu-pNA, Z-L-Ala-L-Ala-L-Leu-pNA, Z-Gly-Gly-L-Phe-pNA, Z-L-Ala-L-Ala-L-Phe-pNA, Z-Gly-L-Leu-pNA and Z-L-Ala-L-Leu-pNA. A sorbent well suited for subtilisin affinity chromatography was prepared by coupling Z-Gly-Gly-D-Leu p-nitrophenyl ester with hexamethylenediaminesepharose 4B. A synthetic compound containing anthranilic acid residue (Ant), Z-Ala-Ala-Leu-Ant, appeared to be a competitive inhibitor of subtilisin.