



УДК 577.156.1

**СИНТЕЗ СУБСТРАТОПОДОБНЫХ ИНГИБИТОРОВ
КЛОСТРИДИОПЕПТИДАЗ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
С ФЕРМЕНТАМИ***Балаевская Т. О., Соловьева Н. И., Орехович В. Н.**Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва*

Осуществлен синтез хлорметилкетонов — аналогов синтетических субстратов клостридиопептидаз. Методом смешанных ангидридов из соответствующих N-защитенных пептидов и бромгидрата аминометилхлорметилкетона (глицилхлорметилкетон) получено четыре хлорметилкетона с различной длиной пептидной цепи: Z-Gly-CH₂Cl (I), Z-Pro-Gly-CH₂Cl (II), Z-Gly-Pro-Gly-CH₂Cl (III) и Z-Pro-Gly-Pro-Gly-CH₂Cl (IV). Изучено действие этих соединений на клостридиопептидазы I и II из *Clostridium histolyticum*. Установлено, что увеличение пептидной цепи хлорметилкетона приводит к усилению его ингибиторных свойств. Соединения (III) и (IV) вызывают практически полное торможение коллагенолитической активности. Ингибирующий эффект этих соединений на коллагенолитическую и пептидазную активности различен. Синтетический субстрат снижает степень торможения. Исследованные хлорметилкетоны практически не влияют на активности трипсина и карбокси-пептидазы А и частично инaktivируют химотрипсин и катесин В. Обсуждается вопрос о специфическом взаимодействии исследуемых хлорметилкетонов с областью активного центра клостридиопептидаз*.

Важным подходом к исследованию активных центров ферментов является создание субстратоподобных необратимых ингибиторов и изучение их действия на соответствующие ферменты. В качестве ингибиторов широко применяются аналоги субстратов, содержащие реакционноспособные группировки, например хлорметилкетоны. Этот тип соединений ранее был успешно использован для изучения активных центров трипсина, химотрипсина, эластазы, субтилизина и других протеиназ [1, 2].

Мы выбрали этот подход для исследования активных центров клостридиопептидаз I и II, выделенных нами ранее из *Clostridium histolyticum* [3]. Клостридиопептидазы — ферменты, специфически гидролизующие нативный коллаген и синтетические пептиды с коллагеноподобной последовательностью при нейтральных значениях pH. Синтетические субстраты с последовательностью Gly-Pro-X-Gly-Pro-Y (X и Y — остатки любой из аминокислот) клостридиопептидазы гидролизуют по связи X-Gly. К настоящему времени известно несколько клостридиопептидаз, отличающихся друг от друга по химическим, физико-химическим и каталитическим свойствам [3—7]. Выделенная нами клостридиопептидаза I по ряду характеристик аналогична клостридиопептидазе А (КФ 3.4.24.3) [3].

Данные о строении активного центра клостридиопептидаз очень ограничены. Известно, что это металлозависимые ферменты [8, 9]; предпо-

* Предварительные результаты были доложены на 9-й конференции Федерации европейских биохимических обществ (ФЕБО) [10].

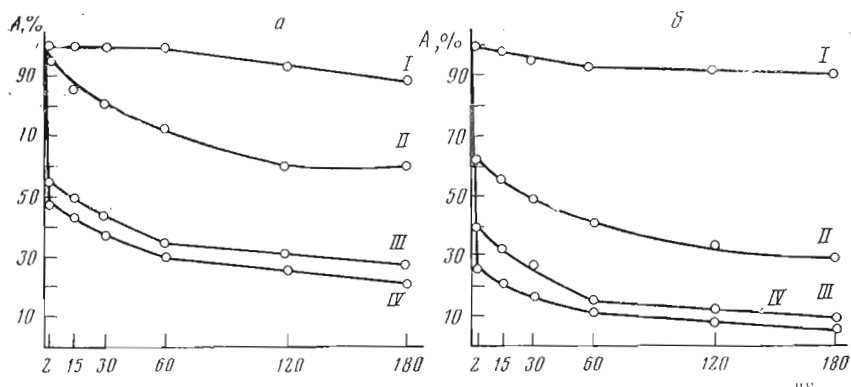


Рис. 1. Действие хлорметилкетонов Z-Gly-CH₂Cl (I), Z-Pro-Gly-CH₂Cl (II), Z-Gly-Pro-Gly-CH₂Cl (III) и Z-Pro-Gly-Pro-Gly-CH₂Cl (IV) на коллагенолитическую активность (A) клостридиопептидаз I (a) и II (б). [E] 10⁻⁶ М, [I] 1,5·10⁻⁵ М; буфер 0,05 М медиал-ацетатный, рН 7,3, содержащий 10⁻³ М CaCl₂

лагается участие в активном центре ферментов остатков лизина и гистидина [10, 11] и, возможно, тирозина [12].

С учетом данных о субстратной специфичности клостридиопептидаз нами были синтезированы хлорметилкетоны (I)–(IV) с различной длиной пептидной цепи: Z-Gly-CH₂Cl (I), Z-Pro-Gly-CH₂Cl (II), Z-Gly-Pro-Gly-CH₂Cl (III), Z-Pro-Gly-Pro-Gly-CH₂Cl (IV). Синтезы с хорошим выходом осуществлены методом смешанных ангидридов [13] из соответствующих N-защитенной аминокислоты или пептидов, полученных по методикам [14–16], и бромгидрата глицилхлорметилкетона (V). Выбор бензилоксикарбонильной группы в качестве защиты аминогруппы обусловлен тем, что большинство изученных ранее [16] синтетических субстратов клостридиопептидазы имеет именно эту защитную группу на N-конце пептидной цепи и, кроме того, она удовлетворяет требованиям синтеза галоидметилкетонов. Синтез соединения (I) проходил через стадию получения диазокетона [17], имеющего характерный ИК-спектр с четким максимумом при 2400 см⁻¹ (–N₂) [18]. Насыщение эфирного раствора диазокетона хлористым водородом для образования хлорметилкетона было ограничено 5–10 мин; более длительное насыщение, применяемое обычно в данном случае, приводило к образованию неоднородной смеси. Очистка соединений (I)–(III) с помощью переосаждения позволяет получить гомогенные продукты. Окончательная очистка соединения (IV) достигается при дополнительном хроматографировании на колонке с силикагелем.

Аналитические и физико-химические свойства хлорметилкетонов представлены в табл. 1. Синтезированные соединения довольно устойчивы в сухом виде и в водном растворе, содержащем 1–6% этилового спирта; в трис-НСl и медиал-ацетатном буферах, содержащих 1–6% этилового спирта, при рН выше 7,0 стабильность этих соединений несколько снижается.

Изучение действия хлорметилкетонов на клостридиопептидазы I и II проводили при рН 7,3–7,5, поскольку при рН ниже 7,0 эффект торможения коллагенолитической активности значительно снижается. Исследовали действие хлорметилкетонов как на коллагенолитическую, так и на пептидазную активности клостридиопептидаз. Установлено (рис. 1), что наиболее сильным ингибирующим действием на коллагенолитическую активность ферментов обладает соединение (IV), которое вызывает торможение активности клостридиопептидаз I и II на 75 и 95% соответственно. Соединение (III) обладает близким к этим значениям ингибирующим эффектом. Хлорметилкетон (I) практически не оказывает ингибирующего

Аналитические и физико-химические свойства хлорметилкетонов

Соединение	Брутто-формула	M	Т. пл., °C	R _f	Выход, %	Элементный состав					
						Рассчитано, %			Найдено, %		
						C	H	N	C	H	N
Z-Gly-CH ₂ Cl (I)	C ₁₁ H ₁₁ ClNO ₃	241,5	59—60	0,82	55	54,65	4,97	5,80	54,43	5,04	6,11
Z-Pro-Gly-CH ₂ Cl (II)	C ₁₆ H ₁₉ ClN ₂ O ₄	338,5	78,5—81,5	0,70	30	56,72	5,61	8,27	56,53	5,78	8,12
Z-Gly-Pro-Gly-CH ₂ Cl (III)	C ₁₈ H ₂₂ ClN ₃ O ₅	395,5	98—101	0,52	45	54,61	5,56	10,61	54,39	5,69	10,28
Z-Pro-Gly-Pro-Gly-CH ₂ Cl (IV)	C ₂₃ H ₂₉ ClN ₄ O ₆	492,5	—	0,45	35	56,04	5,80	11,30	55,97	6,10	11,22

* Система хлороформ—метанол, 9:1.

действия, тогда как соединение (II) вызывает 40 и 70% инактивацию ферментов I и II соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что с увеличением длины пептидной цепи ингибитора и приближением ее размеров к размерам синтетического субстрата клостридиопептидаз (гексапептиду) эффект ингибирования возрастает. Эти данные в известной мере могут указывать на возможное взаимодействие исследуемых хлорметилкетонов с областью активного центра. Кроме того, протеолитическая активность клостридиопептидазы II снижается хлорметилкетонами в большей степени, чем активность клостридиопептидазы I (рис. 1).

Большая часть исследований проводилась с соединением (III). При исследовании его влияния на коагенолитическую и пептидазную активности клостридиопептидазы I установлено, что последняя ингибируется в меньшей степени (рис. 2). Например, при соотношении фермент — ингибитор 1 : 150 торможение протеолитической активности составляет 70%, в то время как пептидазная активность ингибируется всего на 35%. Увеличение концентрации ингибитора в 5 раз приводит к снижению пептидазной активности на 60%, тогда как коагенолитическая активность ингибируется на 95% при использовании 3-кратного увеличения избытка ингибитора. Эффект ингибирования пептидазной активности для клостридиопептидазы II был примерно таким же.

В присутствии синтетического субстрата Z-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Gly-OSN₃ обнаружено значительно меньшее торможение коагенолитической активности, чем в отсутствие его (рис. 3). Защитное действие синтетического субстрата может быть связано с экранированием функциональных групп фермента.

Полученные данные о различном эффекте ингибирования коагенолитической и пептидазной активностей, защитном действии субстрата, а также о неполном торможении пептидазной активности обоих ферментов под действием исследуемых хлорметилкетонов позволяют предположить, что рассматриваемые соединения взаимодействуют не с каталитическими группами активного центра клостридиопептидаз, а, возможно, с группами субстратсвязывающего участка. Однако наличие четвертичной структуры в молекуле фермента в известной мере осложняет интерпретацию полученных данных [19].

При изучении специфичности синтезированных хлорметилкетонов (табл. 2) было установлено, что указанные соединения не вызывают инактивацию трипсина и карбоксипептидазы А, в то время как активность хомотрипсина снижается на 50—70%. Аналогичные данные были получены для катепсина В. В последнем случае ингибирующее действие хлорметилкетонов осуществляется за счет неспецифического алкилирования функциональных групп ферментов и не зависит от длины пептидной цепи хлорметилкетонов (ср. [20]).

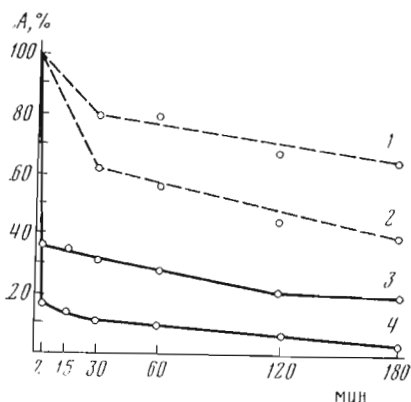


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость коллагенолитической (1, 2) и пептидазной (3, 4) активностей клостридиопептидазы I от концентрации Z-Gly-Pro-Gly-CH₂Cl (III). [E] $5 \cdot 10^{-6}$ M, [E]/[I] 1:150 (1), 1:750 (2), 1:150 (3), 1:450 (4). Буфер 0,05 M медиал-ацетатный, pH 7,3, содержащий 10^{-3} M CaCl₂

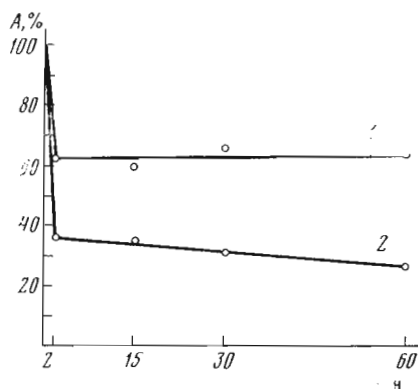


Рис. 3

Рис. 3. Изменение коллагенолитической активности клостридиопептидазы I под действием ингибитора (III) в присутствии (1) и в отсутствие (2) синтетического субстрата. [E] $5 \cdot 10^{-6}$ M, [S] $7,5 \cdot 10^{-3}$ M и [I] $7,5 \cdot 10^{-4}$ M. Буфер — 0,01 M трис-HCl, pH 7,5, содержащий 10^{-3} M CaCl₂

Полученные нами хлорметилкетоны являются первыми субстратоподобными ингибиторами с реакционноспособной группировкой для клостридиопептидаз. Эти соединения обладают определенным избирательным действием по отношению к клостридиопептидазам и взаимодействуют с областью активного центра фермента.

Экспериментальная часть

В работе были использованы препараты клостридиопептидаз, выделенные из свежей культуральной среды *Cl. histolyticum*, а также из коммерческого препарата фирмы Serva (ФРГ), полученного из того же источника. Метод выделения и очистки ферментов описан в работе [7]. Из обоих препаратов были получены в гомогенном состоянии два фермента — клостридиопептидазы I и II, имеющие молекулярные массы 100 000 и 80 000 соответственно. Кроме того, использовали кристаллические препараты трипсина (Spofa, Чехословакия) и химотрипсина (Олайнский завод химреактивов), карбоксипептидазы А (Reanal, Венгрия) и катепсина В (любезно предоставлен Э. А. Дилакян, Институт биологической и медицинской химии АМН СССР).

Кислоторастворимый коллаген выделяли из кожи крыс [7]. В работе использовали 0,02% коллаген в 0,01 M трис-HCl-буфере, pH 7,6, содержащем 0,27 M CaCl₂.

Коллагенолитическую активность определяли с помощью метода вискозиметрии. В вискозиметр типа Оствальда вносили 1,3 мл раствора коллагена, добавляли 0,1 мл (10 или 50 мкг) раствора клостридиопептидазы I или клостридиопептидазы II в 0,05 M медиал-ацетатном буфере (pH 7,3) или в 0,01 M трис-HCl-буфере, pH 7,5 (оба содержат 10^{-3} M CaCl₂) и следили за изменением вязкости во времени. Коллагенолитическую активность выражали в условных единицах [21].

Пептидазную активность клостридиопептидаз определяли по гидролизу пептидной связи между остатками аланина и глицина в молекуле этилового эфира бензилоксикарбонилглицил-пролил-аланил-глицил-пролил-глицина [22]. Этот субстрат был синтезирован нами (синтез будет опубликован отдельно). Гидролиз проводили 15 мин при 29° C в 0,3 мл 0,05 M медиал-ацетатного буфера, pH 7,6, содержащего 10^{-3} M CaCl₂, при кон-

Действие хлорметилкетонов на протеиназы
 Приведена остаточная активность (%) через 4 ч инкубации;
 [E]/[I] 1 : 150

Соединение	Клостридио- пептидаза I	Трипсин	Химотрип- син	Катепсин В	Карбокси- пептидаза А
Z-Gly-CH ₂ Cl (I)	80	80	34,5	23	93
Z-Pro-Gly-CH ₂ Cl (II)	43,5	90	50	54	93
Z-Gly-Pro-Gly-CH ₂ Cl (III)	17,4	90	50	54	93
Z-Pro-Gly-Pro-Gly-CH ₂ Cl (IV)	15,3	86,5	46	50	80

центрации субстрата $3,33 \cdot 10^{-3}$ М, клостридиопептидазы I — $3,3 \cdot 10^{-7}$ М и клостридиопептидазы II — $4 \cdot 10^{-8}$ М. О степени гидролиза судили по нарастанию аммиачного азота [23].

Взаимодействие клостридиопептидаз с хлорметилкетонами осуществляли при 20° С в 0,01 М трис-НСl-буфере (рН 7,5) или в 0,05 М медиал-ацетатном буфере, рН 7,3. Оба буфера содержали 10^{-3} М СаСl₂. Хлорметилкетоны растворяли в смеси этанола с буфером и добавляли к раствору фермента (10^{-6} — $5 \cdot 10^{-6}$ М), используя соотношения фермент — ингибитор, равные 1 : 150, 1 : 450 и 1 : 750. Конечная концентрация этанола в пробе составляла 1—6%. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты (0,1 мл) и определяли остаточные коллагенолитическую и пептидазную активности. В качестве контроля использовали пробы, содержащие соответствующие количества этанола.

Действие хлорметилкетона на клостридиопептидазу в присутствии синтетического субстрата. К 250 мкг клостридиопептидазы I в 0,3 мл 0,01 М трис-НСl-буфера, рН 7,5, содержащего 10^{-3} М СаСl₂, добавляли 2,250 мг Z-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Gly-ОСН₃ в 0,1 мл буфера и через 1 мин — 150 мкг ингибитора (III) в 0,1 мл смеси этанола с буфером. Конечные концентрации в 0,5 мл инкубационной смеси: фермента — $5 \cdot 10^{-6}$ М, синтетического субстрата — $7,5 \cdot 10^{-3}$ М, ингибитора (III) — $7,5 \cdot 10^{-4}$ М. Мольные соотношения фермент — субстрат — ингибитор составляли 1 : 1500 : 150. Через определенные промежутки времени определяли коллагенолитическую активность. В качестве контроля использовали пробы, содержащие синтетический субстрат и этанол.

Взаимодействие хлорметилкетонов (I)–(IV) с трипсином, химотрипсином, карбоксипептидазой А и катепсином В проводили при 20° С в течение 4 ч и соотношении фермент — ингибитор, равном 1 : 150. С трипсином, химотрипсином и карбоксипептидазой А реакцию проводили при рН 7,05; конечная концентрация ферментов при этом составляла $1 \cdot 10^{-5}$ М. С катепсином В реакцию проводили при рН 6,7 и концентрации фермента $5 \cdot 10^{-6}$ М. Активности вышеуказанных ферментов определяли по стандартным методикам, используя синтетические субстраты [24–26].

Бензилкарбонилглицил-хлорметилкетон (I). Хлорангидрид бензилкарбонилглицина [17] (6 г, 26 ммоль) растворяли в безводном эфире, обрабатывали при 0° С эфирным раствором диазометана (52 ммоль), реакционную смесь оставляли на 12 ч при тех же условиях. Эфирный раствор промывали насыщенным раствором NaHCO₃, водой и сушили над безводным Na₂SO₄. Растворитель удаляли упариванием, полученный диазокетон переосаждали из этилацетата гексаном. Через раствор диазокетона в безводном эфире пропускали сухой HCl в течение 5–10 мин, затем растворитель быстро удаляли упариванием, а остаток переосаждали из этилацетата гексаном, в результате чего были получены белые кристаллы хлорметилкетона (I).

Бромгидрат глицилхлорметилкетона (V). Хлорметилкетон (I) (0,5 г, 2 ммоль) обрабатывали 3 мл насыщенного раствора HBr в ледяной уксусной кислоте до прекращения выделения CO₂ (5 мин). Полученный бромгидрат осаждали безводным эфиром (200 мл), осадок дважды промывали эфиром и высушивали. Бромгидрат гомогенен по данным хроматографии на пластинках (2,5×7,5 см) с силикагелем марки «Woelm» (ФРГ) с добавлением гипса в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 10 : 3 : 1. Выход 0,39 г (60%).

Бензилоксикарбонилпролил-глицилхлорметилкетон (II). Бензилоксикарбонилпролин (0,3 г, 1,2 ммоль), растворенный в ацетонитриле (10 мл), и *N*-метилморфолин (0,13 мл, 1,2 ммоль) охлаждали до -20° С, добавляли изобутилхлорформат (0,16 мл, 1,2 ммоль) и затем через 30 мин раствор бромгидрата (V) (0,225 г, 1,2 ммоль) и *N*-метилморфолина (0,16 мл, 1,2 ммоль) в ацетонитриле. После 30-минутного перемешивания при -20° С температуру смеси доводили в течение 1 ч до 20° С и оставляли в этих условиях еще на 3 ч. Растворитель упаривали в вакууме, остаток растворяли в этилацетате, промывали 1 н. NaHCO₃, 10% лимонной кислотой, водой и сушили над безводным Na₂SO₄. При переосаждении продукта из этилацетата смесью эфира и гексана получали порошок белого цвета. Контроль за гомогенностью осуществляли как описано выше, в системе хлороформ — метанол (9 : 1).

Бензилоксикарбонилглицил-пролил-глицилхлорметилкетон (III) получали аналогично соединению (II) из бензилоксикарбонилглицил-пролина (0,32 г, 1,05 ммоль) [15] и бромгидрата (V) (0,2 г, 1,05 ммоль).

Бензилоксикарбонилпролил-глицил-пролил-глицилхлорметилкетон (IV) получали как описано выше, из бензилоксикарбонилпролил-глицил-пролина (0,58 г, 1,5 ммоль) [16] и бромгидрата (V) (0,28 г, 1,5 ммоль). Очищали полученный продукт на колошке с силикагелем марки КСК (200 меш) в системе хлороформ — метанол (9 : 1).

ЛИТЕРАТУРА

1. Powers J. C. Reaction of serine proteases with halomethyl ketones.— In: Methods in Enzymology. N. Y.— London: Acad. Press, 1977, v. 46, p. 197—204.
2. Drenth J., Kalk K. H., Swen H. M. Binding of chloromethyl ketone substrate analogues to crystalline papain.— Biochemistry, 1976, v. 15, № 17, p. 3731—3738.
3. Соловьева Н. И., Балаевская Т. О., Максеева О. С., Орехович В. И. Выделение и свойства трех коллагеназ *Cl. histolyticum*.— Вopr. мед. химии, 1980, № 5, с. 674—677.
4. Harper E., Seifter S., Hospelhorn V. Evidence for subunits in bacterial collagenase.— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1965, v. 18, № 4, p. 627—632.
5. Yoshida E., Noda H. Isolation and characterization of collagenases I and II from *Cl. histolyticum*.— Biochim. et biophys. acta, 1965, v. 105, № 3, p. 562—574.
6. Kono T. Purification and partial characterization of collagenolytic enzymes from *Cl. histolyticum*.— Biochemistry, 1968, v. 7, № 3, p. 1106—1111.
7. Lwebuga-Mukasa J. S., Harper E., Taylor P. Collagenase enzymes from clostridium: characterization of individual enzymes.— Biochemistry, 1976, v. 15, № 21, p. 4736—4741.
8. Gallop P. M., Seifter S., Meilman E. Studies on collagen. I. The partial purification assay and mode of activation of bacterial collagenase.— J. Biol. Chem., 1957, v. 227, № 2, p. 891—906.
9. Seifter S., Gallop P. M., Klein L., Meilman E. Studies on collagen. II. Properties of purified collagenase and its inhibition.— J. Biol. Chem., 1959, v. 234, № 2, p. 285—293.
10. Solovyeva N. I., Balayevskaya T. O., Orekhovich V. N. Studies on chemical modifications of clostridiopeptidase A.— Abstracts 9th FEBS Meeting, Budapest, 1974, p. 93.
11. Takahashi S., Seifter S. Dye-sensitized photo-inactivation of collagenase A.— Biochim. et biophys. acta, 1970, v. 214, № 2, p. 556—558.
12. Соловьева Н. И., Орехович В. И. Влияние модифицирующих агентов на коллагеназу II.— Биохимия, 1969, т. 33, вып. 3, с. 620—626.
13. Thompson R. C., Blout E. R. Peptide chloromethyl ketones as irreversible inhibitors of elastase.— Biochemistry, 1973, v. 12, № 1, p. 44—47.
14. Berger A., Kurtz J., Katchalski E. Poly-L-proline.— J. Amer. Chem. Soc., 1954, v. 76, № 21, p. 5552—5560.

15. Шибнев В. А., Козаренко Т. Д., Порошин К. Т. Об эфирах пептидов, содержащих L-пролин и глицин.— Изв. АН СССР, 1960, № 8, отд. хим. наук, с. 1500–1506.
16. Порошин К. Т., Шибнев В. А., Козаренко Т. Д. Синтез пептидов, содержащих L-пролин и глицин.— Изв. АН СССР, 1969, № 4, отд. хим. наук, с. 736–738.
17. Shaw E. Site-specific reagents for chymotrypsin and trypsin.— In: Methods in Enzymology, v. 11. N. Y.— London: Acad. Press, 1967, p. 684–686.
18. Беллами Л. Соединения с ненасыщенными связями при атомах азота. Диазогруппа.— В кн.: Инфракрасные спектры сложных молекул. М.: Изд-во иностр. лит., 1963, с. 392–393.
19. Левдикова Г. А., Орехович В. Н., Соловьева Н. И., Шпикитер В. О. Диссоциация молекул коллагеназы на субъединицы.— Докл. АН СССР, 1963, т. 153, № 3, с. 725–727.
20. Keilova H. On the specificity and inhibition of cathepsins B and D.— In: Tissue proteinases / A. J. Barrett, J. T. Dingle, eds. Amsterdam: North-Holland Publishing Co., 1971, p. 1–25.
21. Власова Е. В., Соловьева Н. И. Простой способ получения высокоактивного препарата коллагеназы.— Вопр. мед. хим., 1962, № 4, с. 424–429.
22. Соловьева Н. И., Орехович В. Н., Шибнев В. А., Лазарева А. В. Действие коллагеназы *Cl. histolyticum* на гекса- и полипептиды.— Биохимия, 1970, т. 35, вып. 3, с. 579–584.
23. Yemm B. W., Cocking E. C. The determination of amino acids with ninhydrin.— Analyst., 1955, v. 80, № 2, p. 209–214.
24. Hummel B. C. W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin.— Can. J. Biochem. and Physiol., 1959, v. 37, № 12, p. 1393–1396.
25. Iodice A. A., Leong V., Weinstock J. M. Separation of cathepsins A and D. of skeletal muscle.— Arch. Biochem. and Biophys., 1966, v. 117, № 3, p. 477–486.
26. Barrett A. J. A new assay for cathepsin B1 and other thiol proteinases.— Anal. Biochem., 1972, v. 47, № 1, p. 280–293.

Поступила в редакцию
10.III.1981
После доработки
20.IV.1981

SYNTHESIS OF SYBSTRATE-LIKE CLOSTRIDIOPEPTIDASE INHIBITORS AND STUDIES ON THEIR INTERACTION WITH ENZYMES

BALAYEVSKAYA T. O., SOLOV'eva N. I., OREKHOVICH V. N.

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Synthesis of chloromethyl ketones, analogs of clostridiopeptidase synthetic substrates, has been carried out from the corresponding N-protected peptides and glycine chloromethyl ketone hydrobromide via mixed anhydrides. Four chloromethyl ketones with peptide chains of various length were obtained and their action on clostridiopeptidase I and II from *Cl. histolyticum* was examined. The chloromethyl ketones manifested a selective inhibitory action towards clostridiopeptidases and interacted with the enzyme active sites.