



УДК 577.152.344'135

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ *n*-НИТРОАНИЛИДОВ
ПИРОГЛУТАМИЛПЕПТИДОВ — ХРОМОГЕННЫХ
СУБСТРАТОВ ПЕПСИНА*Лысогорская Е. Н., Филиппова И. Ю., Бойцова С. Е.,
Оксенойт Е. С., Люблинская Л. А., Степанов В. М.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет*

Ферментативным методом с помощью химо tripsина и термолизина синтезированы *n*-нитроанилиды пироглутамилпептидов общей формулы $\langle \text{Glu-P}_1\text{-P}'_1 \rangle\text{-pNA}$, где $\text{P}_1 = \text{Phe}$, $\text{Phe}(\text{NO}_2)$, Tyr , $\text{P}'_1 = \text{Leu}$, Phe . Пепсин и аспергиллопепсин А расщепляют в полученных субстратах связь $\text{P}_1\text{-P}'_1$. *n*-Нитроанилиды пироглутамилпептидов использованы для определения активности пепсина и аспергиллопепсина А двухферментным методом, сущность которого состоит в том, что образующийся при гидролизе пепсином *n*-нитроанилид аминокислоты ($\text{P}'_1\text{-pNA}$) подвергается исчерпывающему гидролизу вторым ферментом — лейцинаминопептидазой. Выделяющийся *n*-нитроанилин определяется спектрофотометрически.

При изучении субстратной специфичности и механизма действия ферментов, их выделении и очистке используются синтетические субстраты. Описан ряд синтетических субстратов пепсина и других карбоксильных протеиназ общей формулы $\text{A-P}_1\text{-P}'_1\text{-B}$ с различными группами А и В при довольно ограниченном наборе остатков P_1 и P'_1 (Phe , Tyr , Leu , $\text{Phe}(\text{NO}_2)$), отвечающих специфичности этих ферментов [1]. В качестве группировки А используют ацетильные, карбобензоксид-, *трет*-бутилоксикарбонильные, дансильные и другие ацильные остатки. Иногда обходятся без группировки В, используя в качестве субстратов ацилированные пептиды со свободной карбоксильной группой [2]. Однако, как правило, применяют те или иные способы защиты карбоксильной группы, превращая кислоту в амид или эфир, причем нередко группировка В выбирается так, чтобы сделать субстрат более гидрофильным и, следовательно, легко растворимым в воде. Последняя задача весьма актуальна, поскольку гидрофобные аминокислоты в положении P_1 или P'_1 , соответствующие специфичности карбоксильных протеиназ, обычно делают субстрат труднорастворимым, что вынуждает проводить определение активности ферментов в присутствии органических растворителей, способных ингибировать, а иногда и инактивировать протеиназы. Повышению растворимости субстратов способствуют группировки В, содержащие остатки пиридина, аминопропиломорфолина и т. д. [3, 4].

В то же время до сих пор не описано достаточно удобных хромогенных субстратов, которые позволили бы контролировать активность ферментов этого класса по появлению в результате гидролиза хромофорного продукта или такого соединения, которое после несложной обработки давало бы характерное поглощение в видимой или ультрафиолетовой части спектра.

Для наблюдения за ходом гидролиза субстратов пепсином наиболее часто применяют пингидриновый метод [5], а также реакция с триштробензолсульфокислотой [6]. Силвер [7] использовал метод, основанный на различиях в УФ-спектрах поглощения исходного субстрата (Ac-Phe-Tyr

Сокращения: $\langle \text{Glu}$ — пироглутаминовая кислота, pNA — *n*-нитроанилид, $\text{Phe}(\text{NO}_2)$ — *n*-нитрофенилаланин, DCC — *N,N'*-дициклогексилкарбодимид, Dit — диодитиозин, DMF — диметилформамид. Все аминокислоты — *L*-ряда.

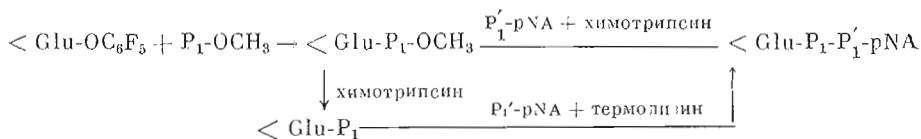
ОСН₃) и одного из продуктов гидролиза (Тур-ОСН₃), однако этот метод мало чувствителен, так как изменение молярного коэффициента поглощения при ферментативном превращении невелико ($\Delta\epsilon_{278}=470-550$). Производные *n*-нитрофенилаланина, предложенные для этой цели [8], неудобны, в особенности для массовых измерений активности, поскольку и в этом случае изменение поглощения в УФ-области, сопровождающее гидролиз, мало.

Получение хромогенных субстратов пепсина, подобных тем, которые успешно используются для других классов ферментов, например сериновых протеиназ [9], вряд ли возможно, поскольку карбоксильные протеиназы ограничены в своей специфичности пептидными связями в строгом смысле этого термина и не гидролизуют аналоги пептидов типа, например, *n*-нитроанилидов и т. д. Отдельные наблюдения, относящиеся к гидролизу сложноэфирных связей между гидрофобными аминокислотами и оксикислотами, скорее подтверждают это правило и во всяком случае не создают предпосылок для получения удобных субстратов. Учитывая это, мы предприняли синтез таких пептидных субстратов пепсина и некоторых других карбоксильных протеиназ, в которых группировка P₁'-В представляла бы хромогенный субстрат другого фермента, в исследованном нами случае — аминопептидазы.

С этой целью мы синтезировали серию *n*-нитроанилидов пироглютамилпептидов общей формулы <Glu-P₁-P₁'-pNA (где P₁=Phe, Phe(NO₂), Тур, P₁'=Leu, Phe) и исследовали их применимость в качестве субстратов для пепсина и аспергиллопепсина А.

Остаток пироглутаминовой кислоты выполняет роль защитной группы, поскольку известно, что свободная аминогруппа субстрата ингибирует пепсин [10]. Обычно введение пироглутаминовой кислоты придает пептидам гидрофильность и способствует повышению их растворимости в воде.

n-Нитроанилиды пироглутамилпептидов синтезировали по схеме



Метилловые эфиры пироглутамиламино кислот получали, используя активированный пентафторфениловый эфир пироглутаминовой кислоты. Это позволило не защищать гидроксильную группу тирозина (P₁), поскольку показано, что можно практически избежать *O*-ацилирования, если использовать в качестве карбоксильного компонента пентафторфениловые эфиры аминокислот или пептидов и проводить реакцию в диметилформамиде или тетрагидрофуране [11].

n-Нитроанилиды пироглутамилпептидов были получены ферментативным методом из пироглутамиламино кислот и *n*-нитроанилидов фенилаланина или лейцина с помощью термолизина, а также из эфиров пироглутамиламино кислот и соответствующих *n*-нитроанилидов с помощью химотрипсина (табл. 1).

Ферментативный метод синтеза, успешно разрабатываемый в последнее время [12], в ряде случаев удобен для получения веществ в препаративных количествах. Существенно и то, что он позволяет иметь оптически чистые продукты. Последнее особенно важно для получения субстратов протеиназ.

Для синтеза *n*-нитроанилидов пироглутамилпептидов могли быть использованы химотрипсин, поскольку ароматические аминокислоты, занимающие положение P₁, отвечают специфичности этого фермента, или термолизин, специфичности которого соответствуют гидрофобные остатки P₁'. Синтез проводили с эквимольными количествами исходных веществ, растворенными в минимальном количестве диметилформамида и буфера. Конечные концентрации реагентов составили 0,2–0,3 М, концентрация химотрипсина — 50–70 мкМ, термолизина — 50–100 мкМ. В реакции с

Ферментативный синтез *n*-нитроанилидов пироглутамилпептидов

Используемый фермент	Карбоксильный компонент	Аминокислотный компонент	Концентрация исходных реагентов, М		Время реакции, ч	Выход, %	Содержание DMF, %
			Концентрация нитроанилида	Концентрация пептида			
Химотрипсин	<Glu-Phe-OCH ₃	HBr-Phe-pNA	0,164	62	24	70	60
	<Glu-Phe-OCH ₃	Leu-pNA	0,33	50	1	79	50
	<Glu-Tyr-OCH ₃	HBr-Phe-pNA	0,20	71	24	60	60
	<Glu-Tyr-OCH ₃	Leu-pNA	0,33	53	1	93	50
	<Glu-Phe(NO ₂)-OCH ₃	HBr-Phe-pNA	0,28	50	1	74	60
	<Glu-Phe(NO ₂)-OCH ₃	Leu-pNA	0,28	46	1	71	50
Термолизин	<Glu-Phe	Leu-pNA	0,40	91	16	74	50
	<Glu-Tyr	Leu-pNA	0,30	83	18	62	57
	<Glu-Phe	HBr-Phe-pNA	0,24	136	3	88	50
	<Glu-Tyr	HBr-Phe-pNA	0,24	139	16	74	37

Таблица 2

Константы *n*-нитроанилидов пироглутамилпептидов, полученных ферментативно

Название соединения	[α] _D ²⁰ , град (с 0,5; DMF)	Т. пл., °С	R _f в системах *		Аминокислотный состав
			А	Б	
<Glu-Phe-Phe-pNA	+120	209–211	0,82	0,76	Glu 1,0, Phe 1,96
<Glu-Phe-Leu-pNA	-25	205–208	0,82	0,80	Glu 1,0, Phe 1,0, Leu 0,96
<Glu-Tyr-Phe-pNA	+9	209–211	0,84	0,79	Glu 1,0, Tyr 0,94, Phe 1,06
<Glu-Tyr-Leu-pNA	+11	213–215	0,90	0,87	Glu 1,01, Tyr 0,99, Leu 1,0
<Glu-Phe(NO ₂)-Phe-pNA	+10	206–208	0,78	0,75	Glu 1,0, Phe(NO ₂) 1,2, Phe 1,4
<Glu-Phe(NO ₂)-Leu-pNA	-10	204–205	0,87	0,84	Glu 1,0, Phe(NO ₂) 0,75, Leu 1,1

* Состав систем см. в «Экспериментальной части».

Таблица 3

Кинетические константы гидролиза пепсином *n*-нитроанилидов пироглутамилпептидов [E]₀ = 0,9 мг/мл (25 мкМ), 37°С, pH 4,0; 0,1 М ацетатный буфер

Субстрат	[S], мМ	Содержание DMF, %	k _{кат} , с ⁻¹	K _m , мМ	k _{кат} /K _m , мМ ⁻¹ ·с ⁻¹
<Glu-Phe-Phe-pNA	0,04–1,14	1–23	0,019	0,58	0,0327
<Glu-Phe-Leu-pNA	0,05–1,6	0,5–18	0,014	0,56	0,0250
<Glu-Tyr-Phe-pNA	0,04–1,1	1–20	0,011	0,66	0,0165
<Glu-Tyr-Leu-pNA	0,07–1,0	0,5–15	0,010	0,61	0,0163
<Glu-Phe(NO ₂)-Phe-pNA	0,08–1,3	1–17	0,012	0,48	0,025
<Glu-Phe(NO ₂)-Leu-pNA	0,08–1,35	1–17	0,012	0,61	0,019
Ac-Phe-Tyr [13]			0,046	1,95	
Ac-Phe-Tyr-OCH ₃ [13]			0,013	2,35	
Ac-Phe-Dit [13]			0,002	0,075	

химотрипсином использовали 0,2 М карбонатный буфер, pH 9,9, с термолизинном — 0,2 М трис-HCl-буфер, pH 9,5. В случае с термолизинном в реакцию вводили пироглутамиламиноокислоты с незащищенной карбоксильной группой, что требовало дополнительной стадии омыления эфиров. Однако широта специфичности термолизина делает его перспективным в ферментативном методе синтеза соединений указанного типа с иными остатками в положении P₁. Применение химотрипсина позволило нам вводить в синтез метиловые эфиры пироглутамиламиноокислот без их предварительного омыления.

Выбранные нами условия реакции удовлетворяли одному из важнейших требований ферментативного синтеза — разница в растворимости ис-

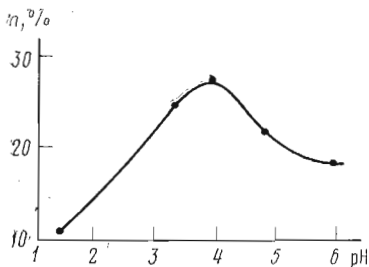


Рис. 1

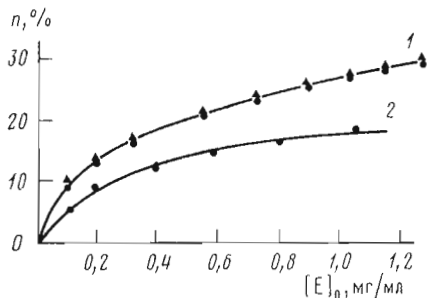


Рис. 2

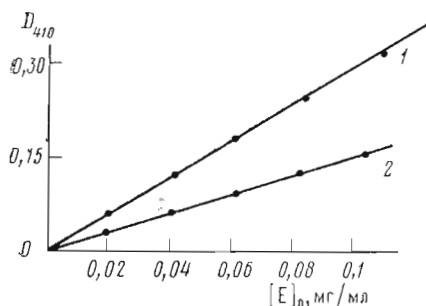


Рис. 3

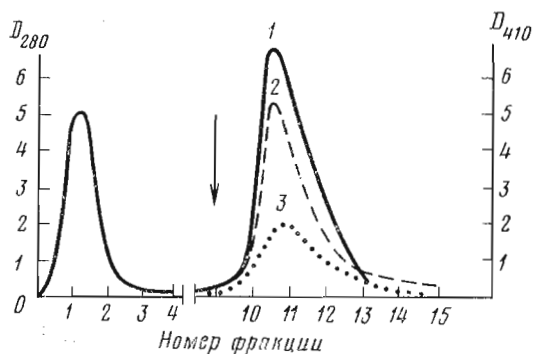


Рис. 4

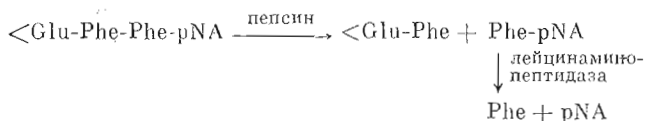
Рис. 1. Зависимость степени гидролиза (n) $\langle \text{Glu-Phe-Leu-pNA}$ пепсином от pH. $[S]_0$ 1,1 мМ, $[E]_0$ 26 мкМ, 37° С, 15 мин

Рис. 2. Зависимость гидролиза $\langle \text{Glu-Phe-Leu-pNA}$ от концентрации пепсина (1) и аспергиллопепсина А (2); результаты, полученные двухферментным методом, обозначены точками; методом с тринитробензолсульфокислотой – треугольниками

Рис. 3. Определение активности пепсина (1) и аспергиллопепсина А (2) по субстрату $\langle \text{Glu-Phe-Leu-pNA}$ двухферментным методом

Рис. 4. Определение аспергиллопепсина А при его препаративной очистке на бутилрафин-сефарозе (по методике [16], стрелкой указано начало элюции 20% изопропанолом, содержащим 1 М NaCl, pH 4,1): 1 – контроль по белку (D_{280}), 2 – активность по $\langle \text{Glu-Phe-Leu-pNA}$ (двухферментный метод, D_{410}) 3 – активность по гемоглобину (D_{280})

торый определяют спектрофотометрически, пользуясь тем, что его УФ-спектр ($\lambda_{\text{макс}}$ 385 нм) отличается от УФ-спектров n -нитроанилидов ($\lambda_{\text{макс}}$ 315 нм). Количество образовавшегося n -нитроанилина равно количеству n -нитроанилидов фенилаланина или лейцина в пепсиновом гидролизате субстрата.



Гидролиз аминокептидазой проводили при pH 8–9, что обеспечивало инактивацию пепсина.

Аналогичные подходы применялись при определении активности некоторых металлоэндопептидаз. При определении активности энкефалиназы по нафтиламидному субстрату в качестве одного из продуктов реакции выделялся нафтиламид лейцина, который затем расщеплялся аминокептидазой М. Количество образовавшегося нафтиламида регистрировалось по реакции диазотирования [14]. Ваганова и сотр. [15] определяли активность металлоэндопептидаз по n -нитроанилиду Woc-Ala-Ala-Leu , в котором эти ферменты расщепляли связь аланил–лейцин. Гидролизат обрабатывали лейцинаминопептидазой из *Aspergillus oryzae* и определяли образующийся при этом n -нитроанилин.

Мы исследовали применимость двухферментного метода для определения свиного пепсина и родственного ему аспергиллопепсина А [16]. Параллельно количество освобождающихся при гидролизе аминокрупп *n*-нитроанилида лейцина определялось по реакции с тринитробензолсульфокислотой (рис. 2). Совпадение данных подтверждает достоверность предложенного метода. Линейная зависимость количества образовавшегося *n*-нитроанилина от концентрации пепсина и аспергиллопепсина А позволяет использовать двухферментный метод для количественного определения карбоксильных протеиназ (рис. 3). Двухферментный метод был применен для определения аспергиллопепсина А в процессе его препаративной очистки аффинной хроматографией на бацитрацин-сефарозе по методике, описанной нами в работе [16] (см. рис. 4). Пики активности, определяемой по гемоглобину и двухферментным методом, совпадают.

Таким образом, *n*-нитроанилиды пироглутамилпептидов являются удобными субстратами для определения активности карбоксильных протеиназ.

Экспериментальная часть

Все температуры плавления даны без исправления. Гомогенность полученных соединений контролировали с помощью ТСХ на пластинках марки Silufol в системах: *n*-бутанол—пиридин—вода—уксусная кислота, 10:15:12:3 (А); этилацетат—пиридин—уксусная кислота—вода, 3:40:12:22 (Б); изопропанол—аммиак—вода, 14:1:15 (В); хлороформ—метанол, 9:1 (Г). Оптическое вращение определяли на поляриметре Roussel-Jouan (Франция). Элементный анализ (С, Н, N) пептидов удовлетворительно соответствовал вычисленному элементному составу. Аминокислотный анализ выполняли на автоматическом анализаторе Durrum (США) после гидролиза 5,7 в. HCl при 105° С в течение 48 ч.

В работе использовали химотрипсин (КФ 3.4.21.1), термолизин (КФ 3.4.24.4), лейцинаминопептидазу (микросомную из почек свиньи, тип VI, КФ 3.4.11.1) — препараты фирмы Serva (ФРГ); очищенные препараты пепсина свиньи (КФ 3.4.23.1) и аспергиллопепсина А [16], тринитробензолсульфокислоту (Serva, ФРГ), *n*-нитроанилид лейцина (Serva, ФРГ).

<Glu-OC₆F₅. К суспензии 5,6 г (40 ммоль) пироглутаминовой кислоты и 7,36 г (40 ммоль) пентафторфенола в 180 мл абс этилацетата при 0° С добавляли 8,65 г (42 ммоль) дициклогексилкарбодиимида в 20 мл абс. этилацетата. Перемешивали 30 мин при 0° С и 4 ч при 20° С. Дициклогексилмочевину отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме. Кристаллическое вещество промывали на фильтре абс. петролейным эфиром. Сушили над парафином. Выход 10,65 г (90%). R_f 0,5 (Г). Вещество вводили в последующие реакции без дополнительной очистки.

<Glu-Tyr-OCH₃. К раствору 3,54 г (12 ммоль) <Glu-OC₆F₅ в 15 мл абс. тетрагидрофурана добавляли 2,34 г (12 ммоль) Tyr-OCH₃, встряхивали 2 мин. Выпавший осадок промывали на фильтре тетрагидрофураном, сушили над щелочью. Выход 3,1 г (91%), т.пл. 168–170° С, R_f 0,7 (Б), 0,77 (А), [α]_D²⁰ +18° (с 1, DMF).

<Glu-Phe-OCH₃. К 3,4 г (18 ммоль) Phe-OCH₃ прибавляли 5,8 г (18 ммоль) <Glu-OC₆F₅ в 20 мл абс. тетрагидрофурана, перемешивали 20 мин, упаривали в вакууме, остаток растворяли в 80 мл этилацетата и промывали 5% лимонной кислотой (4×3 мл), водой (4×3 мл). Из промывных вод дополнительно экстрагировали пептид смесью этилацетата и *n*-бутанола, 8:1 (4×3 мл). Объединенные экстракты упаривали, промывали лимонной кислотой и водой. Этилацетатный раствор и экстракты объединяли, сушили безводным сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Масло закристаллизовалось на холоду под абс. эфиром. Выход 2,9 г (55%), т.пл. 28–30° С, R_f 0,83 (А), 0,79 (Б), [α]_D²⁰ +16,5 (с 1, DMF).

<Glu-Phe(NO₂)-OCH₃ получали аналогично <Glu-Phe-OCH₃ из <Glu-OC₆F₅ и Phe(NO₂)-OCH₃. Выход 51%, т.пл. 176–178° С, R_f 0,70 (А), 0,81 (Б), [α]_D²⁰ +20° (с 0,5, DMF).

<Glu-Phe. К раствору 1 г (3,38 ммоль) <Glu-Phe-OCH₃ в 27 мл 0,1 М бикарбоната аммония (рН 8,0) прибавляли 10 мл раствора химотрипсина

(с 1 мг/мл) в воде. Реакционную смесь перемешивали 5 ч при 37° С, затем упаривали в вакууме. Образовавшееся масло кристаллизовали обработкой эфиром и спиртом с последующей отгонкой растворителей в вакууме. Сушили над фосфорным ангидридом. Выход 0,820 г (82%), т.пл. 159–161° С, R_f 0,48 (А), $[\alpha]_D^{20} +12$ (с 0,5, DMF – вода, 1:1).

<Glu-Tyr получали аналогично из <Glu-Tyr-OCH₃. Выход 83%, т.пл. 183–184° С; R_f 0,44 (А), $[\alpha]_D^{20} +12$ (с 0,5, DMF – вода, 1:1).

<Glu-Phe-Phe-pNA (синтез с химотрипсином). К 58 мг (200 мкмоль) <Glu-Phe-OCH₃ и 74 мг (200 мкмоль) HBr-Phe-pNA в 0,5 мл диметилформамида добавляли 0,2 мл 1 М раствора триэтиламина в диметилформамиде, 0,5 мл 0,2 М карбонатного буфера (рН 9,9), 1,5 мг химотрипсина и оставляли на 24 ч при 37° С, затем на 1 ч при 0° С. Выпавший осадок центрифугировали, промывали 5% лимонной кислотой (4×0,6 мл) и водой (4×0,6 мл), отделяя осадок центрифугированием, затем сушили над щелочью. Выход 71 мг (70%). Аналогично получали <Glu-Tyr-Phe-pNA, <Glu-Phe-Leu-pNA, <Glu-Phe(NO₂)-Phe-pNA, <Glu-Phe(NO₂)-Leu-pNA, <Glu-Tyr-Leu-pNA. Константы и выходы соединений приведены в табл. 1 и 2.

<Glu-Phe-Leu-pNA (синтез с термолизинном). К 26,7 мг (100 мкмоль) <Glu-Phe и 25,1 мг (100 мкмоль) Leu-pNA в 125 мкл диметилформамида прибавляли 125 мкл 0,2 М трис-НСl-буфера, рН 9,5, содержащего 0,05 М Са²⁺ и 0,8 мг термолизина. Оставляли реакционную смесь на 16 ч при 37° С и на 1 ч при 0° С. Осадок центрифугировали, промывали 5% лимонной кислотой (4×0,5 мл) и водой (4×0,5 мл), высушивали над щелочью. Выход 74%. Аналогично получали <Glu-Phe-<Phe-pNA, <Glu-Tyr-Phe-pNA, <Glu-Tyr-Leu-pNA. Константы и выходы соединений представлены в табл. 1 и 2.

Кинетика гидролиза субстратов. Измерение начальных скоростей ферментативного гидролиза *n*-нитроанилидов пироглутамилпептидов проводили по реакции с тринитробензолсульфокислотой. К 3 мл 0,1 М раствора тетрабората натрия (рН 9,0) добавляли 0,2 мл анализируемого раствора и 50 мкл 0,1 М водного раствора тринитробензолсульфокислоты. Через 40 мин определяли поглощение при 420 нм растворов на спектрофотометре СФ-16. Для каждого субстрата ставили опыты при пяти различных концентрациях. Кинетические параметры гидролиза рассчитывали графическим методом в координатах Иди – Хофсти.

Определение активности пепсина по субстрату <Glu-Phe-Leu-pNA двухферментным методом. К 1 мл раствора субстрата (концентрация 1 мг/мл в 15% диметилформамиде) добавляли 0,1 мл раствора пепсина концентрации 0,01–0,1 мг/мл, инкубировали 15 мин при 37° С, затем добавляли 1 мл трис-НСl-буфера, рН 8,7, и 30 мкл рабочего раствора лейцинаминопептидазы (50 мкл коммерческого раствора в 1 мл трис-НСl-буфера, рН 7,6). Через 40 мин измеряли поглощение растворов при 410 нм.

Активность аспергиллопепсина по этому субстрату определяли аналогично.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hofmann T. Adv. Chem. Ser., 1974, v. 136, p. 146–185.
2. Sachdev F., Fruton J. S. Biochemistry, 1969, v. 8, № 22, p. 4465–4471.
3. Inouye K., Fruton J. S. Biochemistry, 1966, v. 5, № 7, p. 2473–2479.
4. Тиходеева А. Г., Зинченко А. А., Румш Л. Д., Антонов В. К. Докл. АН СССР, 1974, т. 214, № 2, с. 355–360.
5. Kullmann W. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 16, p. 8234–8238.
6. Mokrasch L. S. Anal. Biochem., 1967, v. 18, № 1, p. 64–71.
7. Silver M. S. J. Amer. Chem. Soc., 1965, v. 87, № 3, p. 886–894.
8. Inouye K., Fruton J. S. J. Amer. Chem. Soc., 1967, v. 89, № 12, p. 3129–3135.
9. Люблинская Л. А., Якушева Л. Д., Степанов В. М. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 2, с. 273–279.
10. Hollands T. K., Fruton J. S. Biochemistry, 1969, v. 8, № 3, p. 575–582.
11. Гурин С. К., Швачкин Ю. П. Ж. общ. химии, 1979, т. 49, вып. 2, с. 451–455.
12. Jakubke H. D., Kuhl R. Pharmazie, 1982, В. 37, Н. 2, S. 80–106.

13. Baker L. E. J. Biol. Chem., 1954, v. 211, № 2, p. 701-707.
14. Almenoff J., Orlovski M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1981, v. 102, № 1, p. 206-214.
15. Ваганова Т. П., Ласговецкая Л. В., Стронгина А. Я., Люблинская Л. А., Степанов В. М. Биохимия, 1976, т. 41, № 12, с. 2229-2236.
16. Ковалева Г. Г., Юсупова М. П., Балакина Г. Н., Лысоговская Е. Н., Степанов В. М. Биохимия, 1977, т. 42, № 3, с. 534-539.

Поступила в редакцию
25.VIII.1982

ENZYME-CATALYZED SYNTHESIS OF PYROGLUTAMYLPEPTIDE *p*-NITROANILIDES — CHROMOGENEOUS PEPSIN SUBSTRATES

LYSOGORSKAYA E. N., PHILIPPOVA I. Yu., BOYTSOVA S. E.,
OKSENOIT E. S., LYUBLINSKAYA L. A., STEPANOV V. M.

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

Pyroglutamylpeptide *p*-nitroanilides of the common formula $\langle \text{Glu-P}_1\text{-P}^* \text{-pNA} \rangle$, where $\text{P}_1 = \text{Phe}$, $\text{Phe}(\text{NO}_2)$, or Tyr , $\text{P}^* = \text{Leu}$ or Phe , were synthesized with the help of chymotrypsin and thermolysin. It was shown that pepsin and aspergillopepsin cleave $\text{P}_1\text{-P}^*$ bond in the obtained substrates. An optimum pH for the hydrolysis was near pH 4. Pyroglutamylpeptide *p*-nitroanilides were used for measuring pepsin and aspergillopepsin activity by the two-enzyme method. This method involves complete hydrolysis of aminoacid *p*-nitroanilide, obtained as a result of pepsin action, by the second enzyme — leucine aminopeptidase. The resulting *p*-nitroanilide can be determined spectrophotometrically. The method was used for measuring aspergillopepsin activity in the process of its purification on a preparative scale.