



УДК 577.152.344'135

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СУБСТРАТЫ АСПАРТАТНЫХ ПРОТЕИНАЗ
С ВНУТРЕННИМ ТУШЕНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИФилитова И. Ю., Лысогорская Е. Н., Оксенойт Е. С.,
Комаров Ю. Е., Степанов В. М.*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет*

Комбинацией химического и ферментативного методов синтеза получены антранилолтетрапептиды общей формулы $Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-B$ ($B=pNA, -Ded, -Nba$), в структуре которых использован принцип внутримолекулярного тушения флуоресценции. Показано, что гидролиз пепсином и аспергиллопепсином А полученных субстратов проходит по связи $Phe-Phe$ и сопровождается возрастанием флуоресценции в 8,5 раза для $Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-Ded$, в 4,5 раза для $Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-pNA$ и в 2,5 раза для $Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-Nba$. Определены кинетические характеристики ферментативного гидролиза субстратов. Протеолитические коэффициенты, характеризующие предложенные субстраты, сопоставимы со значениями $k_{кат}/K_m$ для лучших известных в настоящее время субстратов аспартатных протеиназ.

Карбоксильные протеиназы строго ограничены в своей специфичности пептидными связями и не обладают практически ни эстеразной, ни амидазной активностью. Следствием этого является отсутствие для данного класса протеиназ удобных чувствительных методов контроля за ходом ферментативного гидролиза, основанных на использовании хромогенных синтетических субстратов, таких, как, например, *n*-нитроанилиды.

В последнее время при изучении ферментов различных классов все шире применяются флуоресцентные субстраты, позволяющие значительно повысить чувствительность измерений. Особого внимания заслуживают субстраты, в структуре которых использован принцип внутримолекулярного тушения флуоресценции [1]. В таких соединениях флуорофор и тушитель находятся в составе одной молекулы. После разрыва пептидной связи в субстрате соответствующим ферментом фрагмент молекулы, содержащий группу-тушитель, отщепляется, и происходит резкое возрастание интенсивности флуоресценции продукта гидролиза, несущего флуоресцирующую группу. Разгорание флуоресценции может быть легко измерено, что обеспечивает возможность создания быстрых и весьма чувствительных методов изучения ферментативных реакций. Синтетические пептидные субстраты с внутренним тушением флуоресценции были применены для изучения аминопептидазы Р [1, 2], лейцинаминопептидазы [3], дипептидилкарбоксипептидазы [4], нейтральных металлопротеиназ — термолитина [5, 6] и энкефалиназ А и В [7, 8]. В случае карбоксильных протеиназ подобный подход был лишь частично реализован Дейрапом и Даниом [9].

В данной работе описан синтез соединений общей формулы $Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-B$ (I), в структуре которых используется принцип внутримолекулярного тушения флуоресценции; исследована применимость синтезированных соединений в качестве субстратов для пепсина и аспергиллопепсина А.

В качестве группы-флуорофора был выбран остаток антраниловой кислоты (Abz). Антраниловая кислота имеет высокий квантовый выход флуо-

Сокращения: Abz — 2-аминобензойная (антраниловая) кислота, pNA — *n*-нитроанилин, Ded — 2,4-динитрофенилэтилендиамин, Nba — 4-нитробензилламин, Nbz — 2-нитробензойная кислота, $CMES$ — *N*-циклогексил-*N'*-(2-морфолиноэтил)карбодимид-метил-*n*-толуолсульфонат, DCC — дициклогексилкарбодимид, TFA — трифторуксусная кислота, DMF — диметилформамид. Все аминокислоты *L*-ряда.

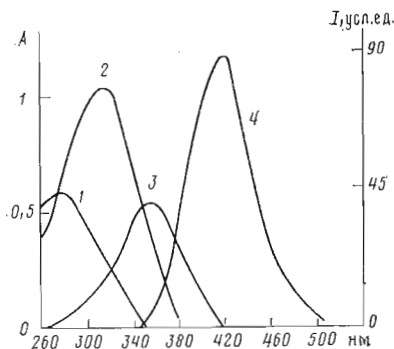


Рис. 1

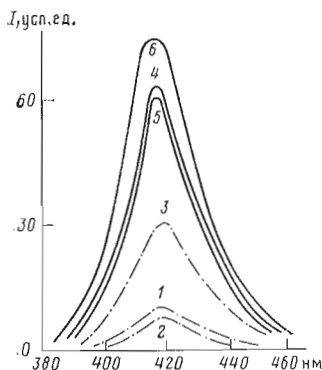


Рис. 2

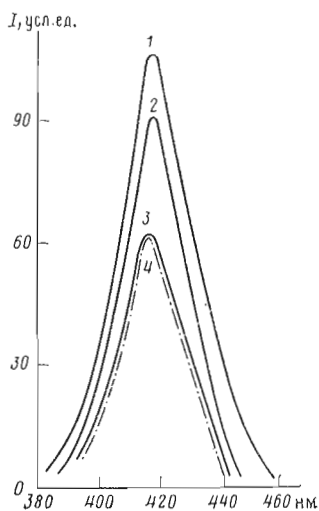


Рис. 3

Рис. 1. Спектры поглощения Phc-Nba (1), Phc-pNA (2), Phc-Ded (3) и флуоресцентный спектр иссушения антрациловой кислоты ($\lambda_{\text{воб}} 340 \text{ нм}$) (4)

Рис. 2. Флуоресцентные спектры испускания субстратов (1а) (1), (1б) (2), (1в) (3) и продуктов их гидролиза пепсином (4-6 соответственно). Концентрация субстратов 5 мкМ; 0,1 М ацетатный буфер, pH 3,5, содержащий 2% DMF

Рис. 3. Флуоресцентные спектры испускания антрациловой кислоты (1), соединения (VI) (2), модельной эквимольной смеси пептида (VI) и Phc-pNA (3) и пепсинового гидролизата пептида (1а) (3); модельной эквимольной смеси пептида (VI) и Phc-Ded (4) и пепсинового гидролизата пептида (1б) (4). Концентрация всех соединений — 5 мкМ в 0,1 М ацетатном буфере, pH 3,5, содержащем 2% DMF

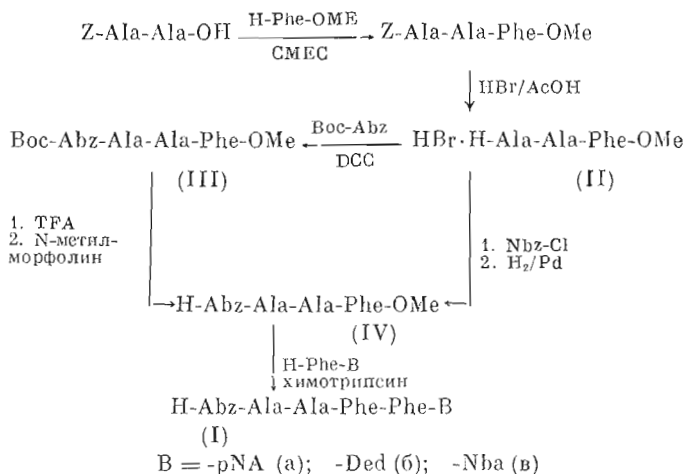
ресценции, небольшой размер и обладает более выраженной гидрофильностью по сравнению с широко используемой дансильной группой.

В качестве групп-тушителей флуоресценции (В) мы использовали остатки *n*-нитроанилина (pNa), 2,4-динитрофенилэтилендиамина (Ded) и *n*-нитробензиламина (Nba) (соответственно соединения (1а), (1б), (1в)). При выборе группы тушителей мы исходили из представления о том, что эффективное тушение может наблюдаться не только за счет внутримолекулярного донорно-акцепторного взаимодействия, но и в результате резонансного переноса энергии [10]. Необходимым условием такого переноса является перекрывание спектра поглощения тушителя со спектром испускания флуорофора. Из рис. 1 видно, что это условие выполняется для Phc-pNa ($\lambda_{\text{макс}} 315 \text{ нм}$) и более эффективно для Phc-Ded ($\lambda_{\text{макс}} 360 \text{ нм}$).

Аминокислотная последовательность соединений (1а-в) была выбрана нами в соответствии с требованиями специфичности пепсина, согласно которым положения P_1 и P_1' в молекуле субстрата должны занимать гидрофобные остатки фенилаланина*. Введение двух остатков аланина улучшает связывание субстрата с ферментом.

Синтез соединений (1а-в) осуществлялся по схеме, предусматривающей комбинацию химического и ферментативного методов образования пептидной связи.

* P_1, P_1' — аминокислоты, образующие расщепляемую связь.



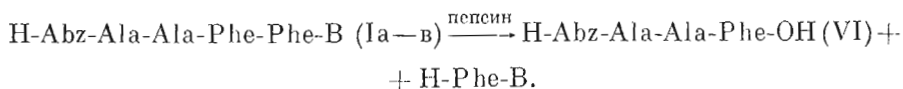
Синтез флуоресцентных субстратов аспаргатных протеиназ

Как видно из приведенной схемы, синтез антранилоилтрипептида (IV) может быть осуществлен двумя путями: либо ацилированием соединения (II) *o*-нитробензоилхлоридом — Nbz-Cl с последующим гидрированием образующегося нитропроизводного (V) в присутствии палладиевого катализатора, либо конденсацией соединения (II) с *N*-*трет*-бутилоксикарбонилантраниловой кислотой (Boc-Abz) в присутствии DCC. Оба пути синтеза обеспечивают получение промежуточного пептида (IV) с хорошими выходами.

Заключительной стадией синтеза являлась ферментативная конденсация в присутствии химотрипсина эфира антранилоилтрипептида (IV) с остатком фенилаланина, несущего группу-тушитель В. Использование ферментативного метода на этой стадии позволило исключить этап омыления метилового эфира трипептида, необходимый при химическом синтезе, а также обеспечивало высокую степень оптической чистоты конечных пептидов. Ферментативную конденсацию проводили в водно-органической среде (0,2 М карбонатный буфер, pH 9,9 — DMF). Концентрация исходных реагентов составляла 0,1–0,2 М, концентрация фермента — 30–60 мкМ. Смещение равновесия реакции в сторону образования пептидной связи определялось двумя факторами: ускорением образования ацилфермента за счет активации карбоксильного компонента, содержащего сложноеэфирную группу, и выпадением в осадок образующегося продукта.

Соединения (Ia–в) представляли собой кристаллические вещества с высокими температурами плавления. Их чистота была подтверждена ТСХ, а также результатами аминокислотного анализа.

Полученные соединения подвергались гидролизу пепсином. Методами ТСХ и электрофореза было установлено, что, как и ожидалось, в результате гидролиза образуются антранилоилтрипептид и амидированное производное фенилаланина, содержащее группу-тушитель В, т. е. в молекуле субстрата расщепляется единственная связь между остатками фенилаланина в положениях P_1 и P_1' :



Гидролиз соединений (Ia–в) сопровождался возрастанием флуоресценции. При одинаковой для всех соединений концентрации (5 мкМ) флуоресценция после обработки пепсином увеличивалась в 4,5; 8,5 и 2,5 раза в случае гидролиза соединений (Ia), (Iб) и (Iв) соответственно (рис. 2). Таким образом, наибольшее разгорание флуоресценции мы наблюдали для соединения (Iб), в котором, как мы и предполагали, внутреннее тушение флуоресценции должно быть максимальным. Из-за незначи-

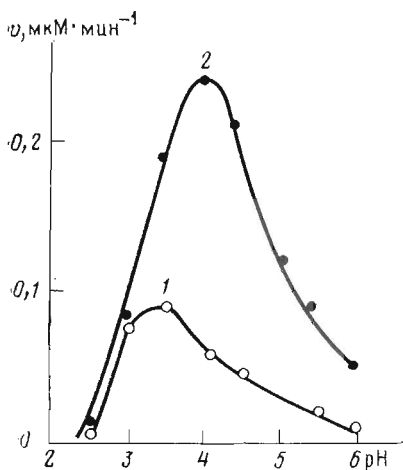


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость скорости гидролиза субстрата (Ia) пепсином (1) и аспергиллопепсином А (2) от рН. $[S]=5$ мкМ; концентрация пепсина $0,48$ нМ, концентрация аспергиллопепсина А $1,2$ нМ

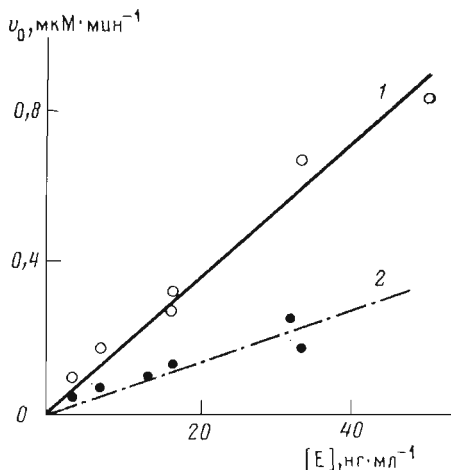


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость начальной скорости гидролиза субстратов (Ia) (1) и (Iб) (2) от концентрации пепсина. Концентрация субстратов — 5 мкМ в $0,1$ М ацетатном буфере, содержащем 2% DMF

тельного увеличения флуоресценции в соединении (Iв) мы отказались от использования его в качестве субстрата.

Было исследовано влияние рН на гидролиз пепсином соединений (Ia) и (Iб). Установлено, что зависимость флуоресценции продуктов гидролиза производного (Ia) от рН имеет вид S-образной кривой с точкой перегиба при рН 3,3, соответствующей pK_a аминокислотной группы антраилоилового остатка (для аминокислотной группы антраилоилового остатка $pK_a=3,4$ [10]). На рис. 3 приведены флуоресцентные спектры испускания антраилоилового остатка (Abz), Abz-Ala-Ala-Phe-OH (VI), специально приготовленной эквимольной смеси продуктов гидролиза субстратов (пептида (VI) и Phe-B) и пепсиновых гидролизатов субстратов (Ia) и (Iб). Из рисунка видно, что флуоресценция модельной эквимольной смеси и гидролизатов одинакова, но меньше, чем флуоресценция соединения (VI). Это связано с проявлением «эффекта внутреннего фильтра», т. е. с поглощением части возбуждающего излучения ($\lambda_{\text{возб}} 340$ нм) присутствующими в растворе Phe-PNA ($\lambda_{\text{макс}} 345$ нм) или Phe-Ded ($\lambda_{\text{макс}} 360$ нм). Phe-Ded поглощает и в области испускания антраилоилового остатка ($\lambda_{\text{исп}} 415$ нм), что также сказывается на уменьшении флуоресценции. Наличие этого эффекта наложит серьезные ограничения на допустимый диапазон концентраций субстратов. При всех измерениях использовались их концентрации, не превышающие 6 мкМ.

Существенное влияние на флуоресценцию оказывали также и растворители. Уксусная кислота и диметилсульфоксид снижали ее интенсивность. Используемый нами DMF, напротив, сам обладал заметной флуоресценцией [11], что следовало иметь в виду, если в процессе измерений менялась его концентрация. Так, при увеличении содержания DMF от 2 до 5% диапазон концентраций субстрата, в котором сохранялась линейная зависимость флуоресценции, расширялся до 25 мкМ.

Кинетические характеристики субстратов были определены при рН 3,5, когда скорость их гидролиза пепсином была максимальной (рис. 4). Начальная скорость гидролиза соединений (Ia) и (Iб) являлась линейной функцией концентраций фермента от 3 до 50 нг/мл (рис. 5) и подчинялась уравнению Михаэлиса — Ментен. Графики зависимости скорости гидролиза от концентрации субстратов (Ia) и (Iб) в координатах Лайнуивера — Бэрка представлены на рис. 6, а, б. Константы Михаэлиса иссле-

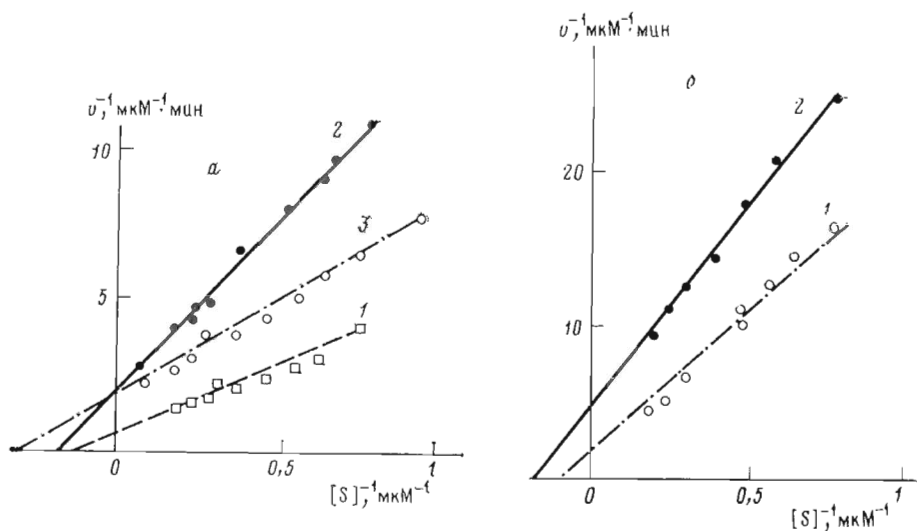


Рис. 6. Зависимость скорости гидролиза субстратов (Ia) (а) и (Iб) (б) аспергиллопепсином А в 0,1 М ацетатном буфере, рН 4,0, содержащем 2% DMF (1), и пепсином в том же буфере рН 3,5, содержащем 2% DMF (2) и 1% DMF (3), от концентрации субстратов в координатах Лайнуивера – Бэрка

двух субстратов практически одинаковы, однако *n*-пिटроанилидный субстрат гидролизует пепсином несколько быстрее (таблица). Полученные константы являются кажущимися, поскольку при приготовлении растворов субстратов использовался 2% DMF, который ингибирует фермент [12]. Снижение концентрации DMF до 1% приводит к улучшению значений K_m и k_{cat} (таблица). Влияние DMF на связывание субстратов с ферментом особенно заметно при сравнении кинетических характеристик, полученных для соединений (Ia), (Iб) и их ближайшего аналога <Glu-Ala-Ala-Phe-Leu-pNa, исследованного нами ранее [13]. Из таблицы видно, что k_{cat} для этих субстратов близки, в то время как значения K_m различаются в 100 раз.

Нужно отметить, что определенные нами характеристики для (Ia) и (Iб) практически совпадают с кинетическими константами, полученными Агарвалем и Ричем для гептапептидного субстрата Phe-Ala-Ala-Phe(NO₂)-Phe-Val-Leu-OM4P* [14], в котором положения P_1-P_4 занимают аминокислоты, сходные по структуре с остатками, содержащимися в предложенных нами субстратах. Соединения (Ia) и (Iб) более эффективно связываются с пепсином, чем пиридиловые эфиры защищенных тетрапептидов, которые в настоящее время считаются одними из лучших субстратов аспаргатных протеиназ [9, 15]. Синтезированные нами субстраты имеют более низкие значения k_{cat} , однако их протеолитические коэффициенты близки значениям k_{cat}/K_m , полученным для Dns-Ala-Ala-Phe-Phe-OP4P⁺ [9]* и Z-Ala-Ala-Phe-Phe-OP4P* [15].

Полученные соединения подвергались также гидролизу родственным пепсином ферментом класса карбоксильных протеиназ — аспергиллопепсином А из *Aspergillus awamori* [16]. Результаты во многом аналогичны данным, полученным для пепсина. С помощью ТСХ было показано, что продуктами гидролиза аспергиллопепсином субстратов (Ia) и (Iб) являются, как и в случае с пепсином, Phe-pNA или Phe-Ded и соединение (VI). Максимальная скорость гидролиза субстратов аспергиллопепсином А наблюдается при рН 4,0 (рис. 4). В широком диапазоне концентраций фермента (от 0,04 до 0,5 мкг/мл) сохраняется линейная зависимость скорости гидролиза от концентрации фермента. Кинетические константы гидролиза аспергиллопепсином субстратов (Ia) и (Iб) были определены по методу Лайнуивера — Бэрка (рис. 6, а, б). Так же как и в случае с пеп-

* OM4P — 4-оксиметилпиридин, OP4P⁺ — 4-(γ-оксипропил)-N-метилпиридиний, OP4P — 4-(γ-оксипропил)пиридин (аббревиатура оригинальных работ).

Кинетические характеристики гидролиза пептидных субстратов пеницином и аспергиллопепсином А
 [S]=1-5 мкМ; 0,1 М ацетатный буфер; 22° С

| Субстрат | DMF, % | Пеницин [E]=0,48 нМ | | | | Аспергиллопепсин А [E]=9,4 нМ | | | | Литература |
|--|--------|---------------------|----------------------|------------------------------------|---|-------------------------------|----------------------|------------------------------------|---|---------------|
| | | pH | K _m , мкМ | k _{cat} , с ⁻¹ | k _{cat} /K _m , с ⁻¹ /мкМ | pH | K _m , мкМ | k _{cat} , с ⁻¹ | k _{cat} /K _m , с ⁻¹ /мкМ | |
| Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-pNA | 1 | 3,5 | 3,6±0,7 | 21,2±1,5 | 5889 | | | | | Данная работа |
| » | 2 | 3,5 | 5,9±0,5 | 18,4±0,8 | 3119 | 4,0 | 7,6±1,8 | 2,5±0,8 | 329 | То же |
| Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-Ded | 2 | 3,5 | 5,6±0,5 | 7,0±0,3 | 1250 | 4,0 | 9,0±1,0 | 0,9±0,2 | 100 | » |
| <Glu-Ala-Ala-Phe-Leu-pNA | 20 | 3,0 | 5,50 | 18,5 | 33,6 | 4,0 | 660 | 0,326 | 0,49 | [13] |
| Dns-Ala-Ala-Phe-Phe-OP4P+ | | 3,1 | 39 | 288 | 7510 | | | | | [9] |
| Z-Ala-Ala-Phe-Phe-OP4P | | 3,1 | 40 | 282 | 7050 | | | | | [15] |
| Phe-Ala-Ala-Phe(NO ₂)-Phe-Val-Leu-OM4P | | 3,5 | 5,2±1,5 | 18,0±3 | 3462 | | | | | [14] |
| Ac-Ala-Ala-Lys-Phe(NO ₂)-Ala-Ala-NH ₂ * | | | | | | 4,5 | 180 | 46,6 | 260 | [17] |

* Субстрат гидролизвался пенициллопепсином.

сином, полученные значения K_m на два порядка ниже значения этой константы для $\langle \text{Glu-Ala-Ala-Phe-Leu-pNa} \rangle$ (таблица). [13]. По своим кинетическим характеристикам предложенные нами субстраты сопоставимы с одним из лучших субстратов для грибных аспаргатных протеиназ — $\text{Ac-Ala-Ala-Lys-Phe}(\text{NO}_2)\text{-Ala-Ala-NH}_2$ [17].

Экспериментальная часть

Все температуры плавления даны без исправления. Гомогенность полученных соединений контролировали с помощью ТСХ на пластинках марки Silufol в системах: *n*-бутанол — вода — пиридин — уксусная кислота, 15:12:10:3 (А), *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 200:35:20 (Б), бензол — ацетон — уксусная кислота, 100:25:4 (В), хлороформ — метанол, 9:1 (Г). Электрофорез проводили на бумаге FN-11 в течение 2 ч при 1000 В в приборе Labor (ВНР) в системе муравьиная кислота — уксусная кислота — вода, 4:29:967 (рН 2,5). Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре Hitachi MPF-4 (Япония). Оптическое вращение определяли на поляриметре марки Roussel Jouan (Франция). Аминокислотный анализ выполняли на автоматическом анализаторе Durrum D-500 (США) после кислотного гидролиза соответствующего пептида 5,7 н. HCl при 105°С (48 ч).

В работе использовали очищенные препараты пепсина свиньи (КФ 3.4.23.1), аспергиллопепсина А (КФ 3.4.23.6) [16], химотрипсина (КФ 3.4.11.1), *n*-нитроанилид фенилаланина (Олайне).

Woc-Abz. К раствору 0,8 г (20 ммоль) гидроксида натрия в 12 мл воды прибавляли 2,74 г (20 ммоль) антраниловой кислоты, 5,2 г (24 ммоль) ди-*трет*-бутилдикарбоната и 10 мл этанола. Реакционную смесь нагревали в течение 3 ч, после чего разбавляли 200 мл воды. Избыток ди-*трет*-бутилдикарбоната экстрагировали петролейным эфиром (4×30 мл). Раствор подкисляли твердой лимонной кислотой до рН 3,0 и оставляли на ночь при 0°С. Осадок отфильтровывали, промывали горячей водой и сушили в вакууме над щелочью. Выход 3,7 г (78%), т. пл. 156–158°С, R_f 0,8 (А), 0,76 (Б), 0,8 (В). Найдено, %: С 60,98; Н 6,33; N 5,93. $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{N}$. Вычислено, %: С 60,76; Н 6,33; N 5,91.

Woc-Abz-Ala-Ala-Phe-OMe (III). К раствору 1,7 г (4,4 ммоль) бромгидрата пептида (II) в 5 мл абс. хлористого метилена при 0°С и перемешивании прибавляли 0,6 мл (4,4 ммоль) абс. триэтиламина. Через 15 мин добавляли 1,19 г (5 ммоль) *Woc-Abz* и 1,03 г (5 ммоль) DCC в 10 мл абс. хлористого метилена. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0°С и оставляли на 48 ч при 20°С. Дидцклогексилмочевину отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в 100 мл этилацетата и промывали 5% лимонной кислотой, водой, 3% NaHCO_3 , водой. Этилацетатный слой сушили безводным сульфатом натрия и упаривали в вакууме досуха. После многократной обработки остатка абс. эфиром с последующей отгонкой его в вакууме получили 1,4 г кристаллического вещества. Выход 63%, т. пл. 164–166°С, R_f 0,8 (А), 0,72 (Б), 0,62 (Г), $[\alpha]_D^{20} - 15^\circ$ (с 1; DMF). Найдено, %: С 62,28; Н 6,77; N 10,83. $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_7\text{N}_4$. Вычислено, %: С 62,22; Н 6,67; N 10, 37.

CF_3COOH \cdot H-Abz-Ala-Ala-Phe-OMe (IV \cdot CF_3COOH). 0,4 г (0,74 ммоль) пептида (III) выдерживали 1 ч при 20°С в 4 мл TFA, упаривали в вакууме. После многократной обработки остатка абс. эфиром с последующей отгонкой его в вакууме получили 0,35 г кристаллического вещества. Выход 85%, т. пл. 125–127°С, R_f 0,76 (А), 0,64 (Б), 0,52 (Г), $[\alpha]_D^{20} - 20^\circ$ (с 1; DMF). Аминокислотный анализ: Ala 1,9, Phe 1,0.

Nbz-Ala-Ala-Phe-OMe (V). К 1,13 г (2,8 ммоль) бромгидрата пептида (II) в 8 мл абс. хлористого метилена прибавляли 0,78 мл (5,6 ммоль) триэтиламина, охлаждали до 0°С и при перемешивании прикапывали охлажденный раствор 0,53 г (2,8 ммоль) *Nbz-Cl* в 2 мл хлористого метилена. Реакционную смесь оставляли при 20°С на 16 ч, затем растворитель отгоняли в вакууме, образовавшееся кристаллическое вещество промывали водой, 0,5 н. NaHCO_3 , водой, 0,2 н. HCl, водой. Сушили в вакууме над щелочью. Выход 1,11 г (81%), R_f 0,72 (А), 0,65 (Б), т. пл. 152–154°С, аминокислотный анализ: Ala 2,0, Phe 1,0.

H-Abz-Ala-Ala-Phe-OMe (IV). 0,93 г (1,9 ммоль) соединения (V) в 20 мл метанола, содержащего 0,5 мл ледяной уксусной кислоты, гидролиро-

вали 4 ч над Pd-чернью, катализатор отфильтровывали, растворитель упаривали в вакууме. Образовавшееся маслообразное вещество закристаллизовывалось под эфиром. Выход 0,65 г (77%), т. пл. 127–129°С, R_f 0,76(А), 0,65(Б), $[\alpha]_D^{20} - 12^\circ$ (с 0,5; DMF). Найдено, %: С 57,80; Н 7,02; N 11,62. $C_{23}H_{28}N_2O_5 \cdot 2H_2O$. Вычислено, %: С 57,98; Н 6,72; N 11,76. Аминокислотный анализ: Ala 2,02, Phe 1,0.

H-Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-pNA (Ia). К смеси 55,4 мг (0,1 ммоль) трифторацетата пептида (IV) и 28 мг (0,1 ммоль) Phe-pNa прибавляли при перемешивании 0,1 мл 1 М раствора N-метилморфолина в DMF, 0,3 мл DMF, 0,4 мл 0,2 М карбонатного буфера (pH 9,9) и 1 мг химотрипсина. Реакционную смесь оставляли при 20°С на 1 ч, добавляли 2 мл воды. Через 12 ч (4°С) осадок отфильтровывали, промывали 0,1 н. HCl, водой, 0,5 н. NaHCO₃, водой, сушили в вакууме над щелочью. Выход 56 мг (80%), т. пл. 230–232°С, R_f 0,9(А), 0,82(Б), $[\alpha]_D^{20} - 22^\circ$ (с 0,5; DMF). Аминокислотный анализ: Ala 1,0, Phe 1,04.

Z-Phe-Ded. К раствору 0,9 г (3 ммоль) Z-Phe в 15 мл абс. хлористого метилена прибавляли 0,68 г (3 ммоль) Ded, охлаждали до 0°С и при перемешивании прибавляли 1,5 г (3,5 ммоль) СМЕС. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0°С, выдерживали 3 сут при 20°С, упаривали в вакууме досуха, к остатку приливали 3 мл воды, отфильтровывали нерастворившуюся часть и промывали на фильтре 0,2 н. HCl, водой, 5% NaHCO₃, водой. Сушили в вакууме над щелочью. Выход 1,1 г (72%), т. пл. 183–186°С, R_f 0,8(А), 0,8(Б), 0,39(В).

HBr·H-Phe-Ded. К 1,1 г (2,2 ммоль) Z-Phe-Ded прибавляли 5 мл 33% раствора HBr в ледяной уксусной кислоте. Смесь перемешивали 1,5 ч (20°С), затем приливали 30 мл абс. эфира. Образовавшийся осадок многократно обрабатывали абс. эфиром с последующей декантацией, фильтровали, сушили в вакуум-эксикаторе над щелочью. Выход 0,9 г (91%), т. пл. 153–155°С с разл., R_f 0,7(А), 0,23(Б), $[\alpha]_D^{20} + 27^\circ$ (с 1; DMF). Найдено, %: С 43,30; Н 4,88; C₁₇H₂₀N₅O₅Br·1,5 H₂O. Вычислено, %: С 43,31; Н 4,88.

H-Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-Ded (I6). К смеси 55,4 мг (0,1 ммоль) трифторацетата пептида (IV) и 45,4 мг (0,1 ммоль) HBr·H-Phe-Ded прибавляли при перемешивании 0,2 мл 1 М раствора N-метилморфолина в DMF, 0,2 мл DMF, 0,4 мл 0,2 М карбонат-бикарбонатного буфера (pH 9,9) и 1 мг химотрипсина. Реакционную смесь оставляли при 20°С на 3 ч, добавляли 2 мл воды, отделяли осадок центрифугированием, промывали 5% NaHCO₃, водой, 10% лимонной кислотой, водой, сушили в вакууме над щелочью. Выход 66 мг (84%), т. пл. 241–242°С, R_f 0,84(А), 0,76(Б), $[\alpha]_D^{20} - 39^\circ$ (с 1,0; DMF). Аминокислотный анализ: Ala 1,0, Phe 1,1.

Z-Phe-Nba. К раствору 626 мг (2 ммоль) Z-Phe-OMe и 376 мг (2 ммоль) HCl·Nba [18] в 4,6 мл DMF прибавляли 2 мл 1 М раствора триэтиламина в DMF, 5,5 мл 0,2 М карбонат-бикарбонатного буфера (pH 9,9) и 7 мг химотрипсина. Через 15 мин образовывался обильный осадок. Реакционную смесь оставляли на 20 ч при 0°С, фильтровали, осадок промывали 5 мл 50% водного метанола, 1 н. HCl, водой, 3% NaHCO₃, водой, сушили над щелочью. Выход 480 мг (72%), т. пл. 209–210°С, R_f 0,8(А), 0,71(Б), $[\alpha]_D^{20} + 24^\circ$ (с 1,0; DMF).

HBr·H-Phe-Nba. К 198 мг (0,46 ммоль) Z-Phe-Nba прибавляли 1 мл 33% бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте, перемешивали 1 ч и разбавляли абс. эфиром. Образовавшийся кристаллический осадок отфильтровывали, промывали абс. эфиром, сушили в вакууме над щелочью. Выход 173 мг (99%), т. пл. 200–201°С, R_f 0,65(А), $[\alpha]_D^{20} - 18^\circ$ (с 0,5; AcOH – DMF, 1:2).

H-Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-Nba (I6). К смеси, содержащей 22 мг (0,05 ммоль) метилового эфира (IV) и 21 мг (0,05 ммоль) HBr·H-Phe-Nba в 0,3 мл DMF и 0,4 мл 0,2 М карбонат-бикарбонатного буфера (pH 9,9), прибавляли 0,05 мл 1 М раствора триэтиламина в DMF и 2 мг химотрипсина. Реакционную смесь оставляли на 1 ч при 20°С и на 16 ч при 4°С. Осадок отфильтровывали и промывали 0,2 н. HCl, водой, 5% NaHCO₃, водой. Сушили в вакууме над щелочью. Выход 28 мг (74%),

т. пл. 238–239° С, R_f 0,65(А), 0,60(Б), $[\alpha]_D^{20} -37^\circ$ (с 0,37; АсОН — DMF, 1:3). Аминокислотный анализ: Ala 1,0, Phe 1,04.

Определение начальных скоростей гидролиза субстратов. 3 мл раствора субстрата в 0,1 М ацетатном буфере, содержащем 2% DMF, помещали в термостатированную (22° С) кювету и измеряли начальную флуоресценцию. Затем включали самописец, добавляли 50 мкл раствора фермента, быстро переключали и регистрировали изменение флуоресценции от времени. Для измерения флуоресценции раствора субстрата при полном гидролизе его ферментом 3 мл раствора субстрата инкубировали 3 ч с избытком фермента. Начальную скорость гидролиза вычисляли по формуле

$$v = \frac{I_t [S]}{(I - I_0)t}$$

v — начальная скорость гидролиза (мкмоль/мин), $[S]$ — концентрация субстрата (мкмоль), I — флуоресценция при полном гидролизе субстрата ферментом, I_0 — начальная флуоресценция субстрата, I_t — флуоресценция раствора субстрата спустя время t после добавления фермента, t — время гидролиза (мин).

Авторы выражают признательность В. С. Гаспарову за полезные дискуссии и помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yaron A., Carmel A., Katchalski-Katzir E. Anal. Biochem., 1979, v. 95, № 2, p. 228–235.
2. Fleminger G., Carmel A., Goldenberg D., Yaron A. Eur. J. Biochem., 1977, v. 73, № 3, p. 617–625.
3. Carmel A., Kessler E., Yaron A. Eur. J. Biochem., 1982, v. 125, № 3, p. 609–615.
4. Carmel A., Yaron A. Eur. J. Biochem., 1978, v. 87, № 2, p. 265–273.
5. Kam C. M., Nishino N., Powers J. C. Biochemistry, 1979, v. 18, № 14, p. 3032–3038.
6. Nishino N., Powers J. C. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 8, p. 3482–3486.
7. Rush R. S., Milas M., Powers J. C., Tanaka T., Persh I. B. Arch. Biochem. Biophys., 1984, v. 231, № 2, p. 390–399.
8. Florentin D., Sassi A., Roques B. P. Anal. Biochem., 1984, v. 141, № 1, p. 62–69.
9. Deurup C., Dunn B. M. Anal. Biochem., 1983, v. 129, № 2, p. 502–512.
10. Udenfriend S. Fluorescence assay in biology and medicine. N. Y.: Acad. Press, 1964.
11. Азарян А. В., Акопян Т. Н., Арутюнян Л. А. Лаб. дело, 1981, № 6, с. 337–339.
12. Irvine G. B., Blumson N. L., Elmore D. T. Biochem. J., 1983, v. 211, № 1, p. 237–242.
13. Филиппова И. Ю., Лысогогорская Е. Н., Оксенойт Е. С., Люблинская Л. А., Степанов В. М. Биорган. химия, 1984, т. 10, № 3, с. 390–393.
14. Agarwal N., Rich D. H. Anal. Biochem., 1983, v. 130, № 2, p. 158–165.
15. Sachdev E., Fruton J. S. Biochemistry, 1970, v. 9, № 23, p. 4465–4471.
16. Ковалева Г. Г., Юсупова М. И., Балаудина Г. Н., Лысогогорская Е. Н., Степанов В. М. Биохимия, 1977, т. 42, № 3, с. 534–539.
17. Hofmann T., Hodges R. S. Biochem. J., 1982, v. 203, № 3, p. 603–610.
18. Губец И. Методы органической химии. Т. I, вып. 1. М.: Госхимиздат, 1949, с. 478.

Поступила в редакцию
7.1.1986

INTRAMOLECULARLY QUENCHED FLUORESCENT SUBSTRATES FOR ASPARTIC PROTEINASES

FILIPPOVA I. Yu., LYSOGORSKAYA E. N., OKSENOIT E. S.,
KOMAROV Yu. E., STEPANOV V. M.

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

o-Aminobenzoyltetrapeptides of the common structure Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-B (where B = pNA, Ded or Nba, i. e. *p*-nitroaniline, 2,4-dinitrophenylethylenediamine or *p*-nitrobenzylamine residue, respectively) were prepared by combination of chemical and enzymatic methods. The structure of these peptides relies on the principle of intramolecular fluorescence quenching. Pepsin and aspergillopepsin A were shown to hydrolyze Phe-Phe bond of the substrates with simultaneous increase in fluorescence for Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-Ded in 8,5 times, for Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-pNa in 4,5 times, and for Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-Nba in 2,5 times. Kinetic parameters for enzymatic hydrolysis of the substrates were determined. The proteolytic coefficients for the synthesized substrates are comparable with the k_{cat}/K_m values for the best substrates of aspartic proteases so far described.