



УДК 547.654.2+577.151.35

© 1992 г. *З. А. Талайките, С. Ю. Бутенас, А. И. Палайма*

ЗАМЕЩЕННЫЕ 6-АМИНОНАФТАЛИН-1-СУЛЬФАМИДЫ В КАЧЕСТВЕ ФЛУОРОГЕННЫХ ИНДИКАТОРНЫХ ГРУПП СИНТЕТИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ ПРОТЕИНАЗ

Институт биохимии Литовской академии наук, Вильнюс

Синтезированы *N*-алкиламидами 6-аминонафталин-1-сульфонокислоты (ANSA), их 6-*N*-ацилпроизводные (Z-Arg-ANSA и Z-Gly-Gly-Arg-ANSA) и исследованы их спектральные свойства. Установлено, что ANSA имеют полосу флуоресценции при 470–480 нм, интенсивность которой сопоставима с интенсивностью соединений, применяемых в качестве флуорогенных индикаторных групп, или превышает ее. Z-Arg-ANSA и Z-Gly-Gly-Arg-ANSA в этой области не флуоресцируют.

Исследована реакция расщепления Z-Arg-ANSA и Z-Gly-Gly-Arg-ANSA при взаимодействии с трипсином. Установлено, что кинетические параметры реакции (k_{cat} и K_m) Z-Arg-ANSA зависят от природы сульфамидной группы. В случае Z-Gly-Gly-Arg-ANSA эта зависимость выражена очень слабо, но параметр k_{cat}/K_m более чем на порядок выше этого параметра для Z-Arg-ANSA.

Предложено использовать ANSA в качестве флуорогенных индикаторных групп синтетических субстратов протеиназ.

Синтетические флуорогенные субстраты находят широкое применение для определения ферментативной активности различных биологических препаратов. Наиболее распространены субстраты, содержащие 7-амино-4-метилкумаринную группу [1], которые, однако, достаточно дороги и труднодоступны. Субстратам, содержащим другие флуорогенные группы, такие, как 2-аминонафталин или 4-метокси-2-аминонафталин, свойственны полосы флуоресценции, перекрывающиеся с полосами индикаторных групп, что уменьшает чувствительность анализа. Среди известных нам флуорогенных субстратов лишь хинолил-6-амиды α -аминокислот не обладают этим недостатком [2].

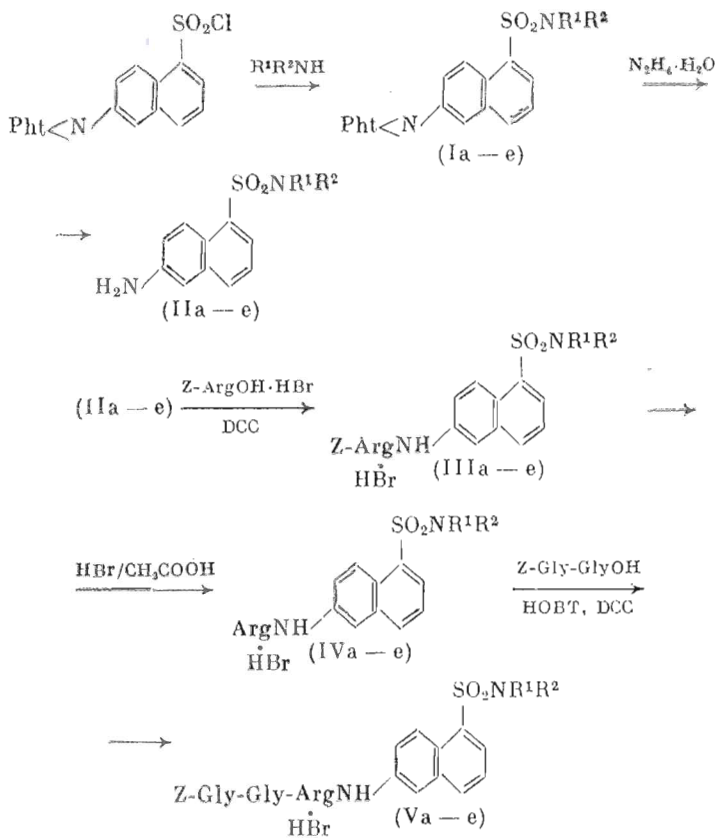
Для расширения ассортимента флуорогенных субстратов представляет интерес поиск новых более доступных соединений, обладающих необходимыми спектральными характеристиками, что актуально при анализе смесей ферментов [3].

В настоящей работе из 6-фталимидонафталин-1-сульфонокислоты синтезированы алкилзамещенные 6-аминонафталин-1-сульфамиды (ANSA), их ацилированные производные — гидробромиды 6-*N*-(*N*^α-бензилоксикарбонил-*L*-аргинил)аминонафталин-1-сульфамидов (Z-Arg-ANSA) и гидробромиды 6-*N*-(*N*-бензилоксикарбонилглицилглицил-*L*-аргинил)аминонафталин-1-сульфамидов (Z-Gly-Gly-Arg-ANSA) — и исследованы их спектральные характеристики. Спектры флуоресценции ANSA сопоставлены со спектрами наиболее распространенных флуорогенных соединений. Исследована реакция Z-Arg-ANSA и Z-Gly-Gly-Arg-ANSA с трипсином.

Замещенные ANSA (IIa–e) получены взаимодействием алкиламинов с хлорангидридом 6-фталимидонафталин-1-сульфонокислоты и последующим гидразинолизом продукта реакции (схема).

Конденсация ANSA (IIa–e) с гидробромидом *N*^α-бензилоксикарбо-

Сокращения: ANSA — 6-аминонафталин-1-(*N*-алкил)сульфамид, Pht< — фталиил, НОВТ — 1-гидроксибензотриазол, DMSO — диметилсульфоксид.



$\text{R}^1, \text{R}^2 = \text{CH}_3, \text{H} \text{ (a), } n\text{-C}_4\text{H}_9, \text{H} \text{ (б),}$
 $m\text{рет-C}_4\text{H}_9, \text{H} \text{ (в), } \text{CH}_3, \text{CH}_3 \text{ (г), } n\text{-C}_4\text{H}_9,$
 $n\text{-C}_4\text{H}_9 \text{ (д); } \text{R}^1 \neq \text{R}^2 = \text{-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-CH}_2\text{- (e).}$

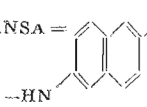
ниларгина карбодимидным методом привела к Z-Arg-ANSА (IIIa-e). N-Бензилоксикарбонильную защитную группу в соединениях (IIIa-e) удаляли с помощью реакции с HBr в уксусной кислоте, а полученные моногидробромиды 6-N-аргиниламинонафталин-1-сульфамидов (IVa-e) с помощью реакции с бензилоксикарбонилглицином в комбинации с N-гидроксибензотриазолом превращали в ацилированные производные Z-Gly-Gly-Arg-ANSА (Va-e).

Спектральные характеристики полученных соединений приведены в табл. 1. В УФ-спектрах ANSA содержатся три полосы, параметры которых, как и следовало ожидать, не зависят от заместителей в сульфамидной группе (рис. 1). В спектрах ацилированных производных — Z-Arg-ANSА (IIIa-e) и Z-Gly-Gly-Arg-ANSА (Va-e) длинноволновая полоса (при λ 350 нм) отсутствует. Однако ее невысокая интенсивность не позволяет применить поглощение производных ANSA в этой области спектра для соответствующих хромогенных субстратов.

Наоборот, ANSA обладают высокой интенсивностью флуоресценции в области 470–480 нм ($\lambda_{\text{возб}}$ 350 нм). Полоса флуоресценции их ацилированных производных (IIIa-e) и (Va-e) ($\lambda_{\text{возб}}$ 286 нм) приблизительно на 100 нм сдвинута в коротковолновую сторону и практически не перекрывается с полосой ANSA (рис. 2). Фоновая эмиссия соединений (IIIa-e) и (Va-e) при $\lambda_{\text{возб}}$ 350 нм в области 470–480 нм не превышает 1%.

Параметры полос поглощения и флуоресценции ANSA (IIa-e), Z-Arg-ANSA (IIIa-e) и Z-Gly-Gly-Arg-ANSA* (Va-e)

Соединение	УФ-спектры			Спектры флуоресценции	
	λ_{max} , нм ($\epsilon_{\text{max}} \cdot 10^{-3}$, $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)			λ , нм	$I_{\text{отн}}$
(IIa)	248 (44,8);	290 (4,97);	347 (2,71)	473	30
(IIб)	248 (42,1);	289 (5,38);	345 (2,46)	471	30
(IIв)	248 (40,9);	291 (5,13);	347 (2,79)	473	32
(IIг)	248 (41,7);	291 (4,55);	349 (2,57)	481	22
(IIд)	248 (40,4);	290 (4,30);	349 (2,60)	475	29
(IIе)	249 (39,0);	291 (4,80);	348 (2,54)	477	24
(IIIa)	253 (38,6);	287 (6,61)		382	31
(IIIб)	253 (39,0);	286 (7,89)		380	37
(IIIв)	252 (39,5);	286 (6,00)		383	37
(IIIг)	252 (38,0);	286 (6,76)		385	20
(IIIд)	253 (37,4);	286 (7,31)		380	15
(IIIе)	252 (38,1);	286 (6,54)		384	16
(Va)	253 (28,5);	286 (4,96)		383	21
(Vб)	254 (29,5);	286 (4,77)		387	15
(Vв)	253 (32,8);	286 (5,83)		382	25
(Vг)	253 (30,0);	286 (5,97)		385	14
(Vд)	254 (29,8);	286 (5,50)		384	26
(Ve)	254 (31,0);	286 (6,12)		385	16

* ANSA = ; для производных (I), (III), (V)

R ¹	R ²	R ¹	R ²
CH ₃	H (а)	CH ₃	CH ₃ (г)
n-C ₄ H ₉	» (б)	n-C ₄ H ₉	n-C ₄ H ₉ (д)
трет-С ₄ H ₉	» (в)	-CH ₂ -(CH ₂) ₃ -CH ₂ -	(е)

Таблица 2

Параметры полос флуоресценции флуорофоров, используемых для синтеза пептидамидов - субстратов протеиназ

Флуорофор	$\lambda_{\text{возб}}$	$\lambda_{\text{фл}}$	$I_{\text{отн}}$
6-Аминонафталин-1-сульфамиды	350	470-480	22-32
5-Аминонафталин-1-сульфамиды	350	550-568	0,18-0,53
2-Аминонафталин	330	407	60
4-Метокси-2-аминонафталин [4]	342	426	55
7-Амино-4-метилкумарин [5]	345	440	>60
6-Аминохинолин [2]	355	550	34
Диметилловый эфир 5-аминоизофталевой кислоты	330	435	12
2-Аминоакридон [6]	450	550	33

Примечание. Интенсивность флуоресценции указанных в литературе соединений пересчитана в принятую нами шкалу. Их спектры сняты в 0,01 M трис-HCl-буфере, pH 8,3.

Сопоставление спектров флуоресценции ANSA со спектрами других флуорогенных индикаторных групп (табл. 2) показывает, что интенсивность флуоресценции ANSA близка к интенсивности 6-аминохинолина, но уступает интенсивности 2-амино- и 4-метокси-2-аминонафталинов и 7-амино-4-метилкумарина. Однако 4-метокси-2-аминонафталин нестабилен при облучении [4], а полосы флуоресценции 2-аминонафталина

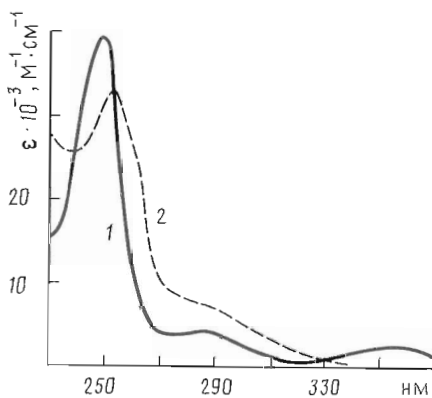


Рис. 1

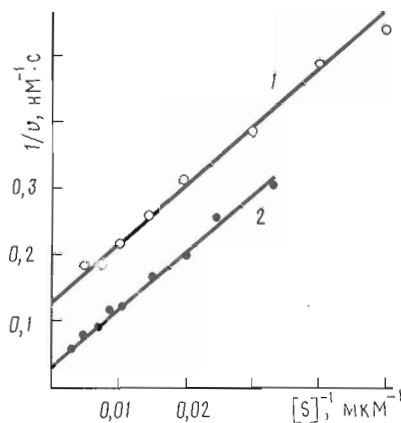


Рис. 3

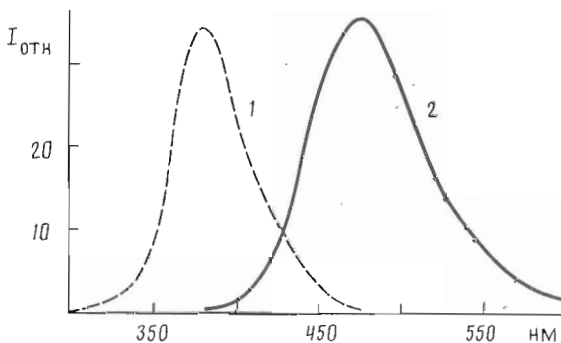


Рис. 2

Рис. 1. Спектры поглощения ANSA (Iв) (1) и Z-Gly-Gly-Arg-ANSA (Vв) (2) в 0,067 М фосфатном буфере, pH 7,2

Рис. 2. Спектры флуоресценции Z-Arg-ANSA (IIIa) (1) и ANSA (IIa) (2) в 0,067 М фосфатном буфере, pH 7,2

Рис. 3. Зависимость скорости гидролиза Z-Gly-Gly-Arg-ANSA (Vб) (1) и Z-Arg-ANSA (IIIб) (2) трипсином от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера – Берка в 0,05 М трис-НСl-буфере, pH 8,3, при 20° С (концентрация трипсина: $1,05 \cdot 10^{-8}$ (1), $5,24 \cdot 10^{-10}$ М (2))

его N-ацимпроизводных перекрываются (например, полоса флуоресценции 2-N-(Вос-Leu-)аминонафталина находится при 340 нм, полоса 2-аминонафталина — при 407 нм). Поэтому для детекции образовавшегося в реакции гидролиза 2-аминонафталина используют более длинные волны, при которых интенсивность флуоресценции значительно меньше.

Следует особо отметить, что интенсивность флуоресценции изучаемых 6-аминонафталин-1-сульфамидов приблизительно в 80 раз превышает интенсивность флуоресценции изомерных им 5-аминопроизводных, входящих в состав субстратов, предложенных для анализа смесей протеиназ методом ВЭЖХ [3]. Поэтому применение ANSA для указанных целей может повысить точность детектирования продуктов реакции как по флуоресценции, так и по поглощению при λ 250 нм (молярный коэффициент поглощения в этой области 6,1-ANSA почти в 2 раза выше, чем 5,1-ANSA).

Кинетические константы гидролиза Z-Arg-ANSA (IIIa-e) и Z-Gly-Gly-Arg-ANSA (Va-e) трипсином

Соединение	K_m , мкМ	k_{cat} , с ⁻¹	$\frac{k_{cat}}{K_m} \cdot 10^{-4}$, М ⁻¹ с ⁻¹	Соединение	K_m , мкМ	k_{cat} , с ⁻¹	$\frac{k_{cat}}{K_m} \cdot 10^{-4}$, М ⁻¹ с ⁻¹
(IIIa)	500	0,9	0,2	(Va)	57	14	24,6
(IIIб)	250	2,9	1,1	(Vб)	67	15	22,4
(IIIв)	560	5,5	1,0	(Vв)	69	16	23,2
(IIIг)	450	3,5	0,8	(Vг)	50	17	34,0
(IIIд)	220	5,3	2,4	(Vд)	50	17	34,0
(IIIе)	450	5,5	1,2	(Ve)	52	18	34,6

Таким образом, ANSA, обладающие требуемыми спектральными характеристиками, могут быть применены как флуорогенные индикаторные группы в синтетических субстратах протеиназ. Метод синтеза этих соединений позволяет вводить различные алкильные заместители в сульфамидную группу, не изменяя их спектральных свойств. Это удобно при хроматографическом определении ANSA, так как чувствительность определения ANSA с различными алкильными заместителями и по УФ-поглощению, и по флуоресценции практически одинакова.

Представляет интерес исследовать влияние алкильных заместителей на кинетические параметры ферментативного расщепления связи пептид-детектируемая группа. Для этой цели определены скорости гидролиза Z-Arg-ANSA (IIIa-e) и Z-Gly-Gly-Arg-ANSA (Va-e) трипсином в трис-HCl-буфере. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата, выраженная по Лайнуверу — Берку, показана на рис. 3. Прямолинейная зависимость обратных величин свидетельствует, что эти реакции описываются уравнением Михаэлиса — Ментена.

Как видно из полученных данных (табл. 3), кинетические параметры реакции — K_m и k_{cat} — зависят от заместителей в сульфамидной группе Z-Arg-ANSA. Например, константы скорости соединений, содержащих метильные группы (IIIa, IIIг), меньше, чем *n*-бутильные (IIIб, IIIд). Влияние *tert*-бутильного радикала (IIIв) выражено еще сильнее. Константы скорости соединений, содержащих дизамещенную сульфамидную группу (IIIг, IIIд), выше, чем соответствующих монозамещенных (IIIa, IIIб). Отметим, что K_m соединений, содержащих *n*-бутильные группы (IIIб, IIIд), меньше, чем остальных соединений. Судя по параметру k_{cat}/K_m , наилучшим субстратом в ряду Z-Arg-ANSA оказалось соединение, содержащее две *n*-бутильные группы (IIIд). Таким образом, удлинение радикалов или увеличение их числа в сульфамидной группе Z-Arg-ANSA способствует более высокой реакционной способности этого субстрата.

В реакции гидролиза Z-Gly-Gly-Arg-ANSA (Va-e) трипсином влияние заместителей в сульфамидной части на кинетические параметры практически не выходит за пределы погрешности эксперимента. Наблюдается лишь незначительное увеличение параметра k_{cat}/K_m в случае дизамещенных производных (Vг-e). Интересно, что в случае субстратов, содержащих 5-аминонафталин-1-сульфамидные группы (Tos-Gly-Pro-Arg-5,1-ANSA) найдены существенные различия в параметре k_{cat}/K_m в зависимости от заместителей в сульфамидной группе [3].

Сопоставление кинетических параметров реакции гидролиза Z-Arg-ANSA и Z-Gly-Gly-Arg-ANSA показывает, что они существенно зависят от длины пептидной части молекулы. Так, k_{cat} гидролиза Z-Gly-Gly-Arg-ANSA заметно выше, а K_m меньше, чем соответствующие константы

гидролиза Z-Arg-ANSA. Это приводит к увеличению параметра k_{cat}/K_m для первой реакции более чем на порядок по сравнению со второй. Отметим, что субстраты типа Z-Gly-Gly-Arg-ANSA, в соответствии с параметром k_{cat}/K_m , более эффективны, чем близкий по строению флуорогенный субстрат, применяемый для определения трипсина, содержащий 7-амино-4-метилкумаринную группу — Z-Gly-Gly-Arg-AMC ($k_{\text{cat}}=60 \text{ с}^{-1}$, $K_m=330 \text{ мкМ}$, $k_{\text{cat}}/K_m=18,2 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}\text{М}^{-1}$) [7].

Из полученных данных следует, что субстраты, содержащие ANSA, могут быть перспективными субстратами протеиназ. При определении активности отдельной протеиназы практически безразлично, какие алкильные заместители входят в сульфамидную группу. (Влияние алкильных заместителей наблюдается лишь в реакции гидролиза Z-Arg-ANSA, которые, судя по кинетическим параметрам, еще не являются эффективными субстратами.) В анализе смесей протеиназ методом ВЭЖХ применение ANSA с различными хроматографическими и практически одинаковыми спектральными характеристиками дает возможность создать наборы субстратов, в которых различные алкильные заместители в сульфамидной группе могут служить своеобразной меткой субстрата, предназначенного для анализа определенной протеиназы.

Экспериментальная часть

УФ-спектры растворов в 0,067 М фосфатном буфере, pH 7,2, сняты на спектрофотометре Specord UV VIS (Германия). Спектры флуоресценции растворов в том же буфере сняты на спектрофлуориметре Hitachi MPF-4 (Япония) в относительном режиме. Ширина щели возбуждения 10 нм, эмиссии — 4 нм. Концентрация измеряемых растворов составляла 20—40 мкМ, поглощение при длине волны возбуждения — 0,06—0,10. За единицу интенсивности флуоресценции принята высота полосы эмиссии при 440 нм 0,01 мкМ раствора сульфата хинина в 0,1 н. H_2SO_4 ($\lambda_{\text{возб}} 345 \text{ нм}$), измеренная в тех же условиях.

ПМР-спектры растворов в DMSO сняты на спектрометре Hitachi R-22 (Япония).

ТСХ проводили на пластинках DC Alufolen Kieselgel 60 F₂₅₄ в системе *n*-бутиловый спирт — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 2). Вещества детектировали в УФ-свете.

Трипсин кристаллический (M_r 23 800), производства Госагропрома РСФСР (Ленинградский завод медицинских препаратов) использовали без дополнительной очистки. Содержание активного фермента в препарате не определяли.

Общая методика синтеза 6-фталимидонафталин-1-сульфамидов (Ia—e). К раствору 0,11 моль амина и 14 мл (0,1 моль) триэтиламина в 500 мл ацетона прибавляли 37,1 г (0,1 моль) 6-фталимидонафталин-1-сульфонилхлорида, смесь перемешивали 4 ч при 20° С и упаривали в вакууме. К остатку прибавляли 1 л воды, выпавший продукт отфильтровывали, промывали водой и высушивали. После перекристаллизации из метанола получали аналитически чистые соединения (Ia—e) (табл. 4).

Общая методика синтеза 6-аминонафталин-1-сульфамидов (IIa—e). К суспензии 0,01 моль 6-фталимидонафталин-1-сульфамида (Ia—e) в 50 мл метанола прибавляли гидразингидрат и кипятили 4,5 ч. Метанол отгоняли, остаток экстрагировали кипящим хлороформом (2×20 мл), экстракт упаривали. После перекристаллизации из метанола получили хроматографически и аналитически чистый продукт (табл. 5).

Общая методика синтеза Z-Arg-ANSA (IIIa—e). К раствору 3,89 г (0,01 моль) гидробромида N^{α} -бензилоксикарбонил-L-аргинина и 0,01 моль ANSA (IIa—e) в 15 мл сухого пиридина прибавляли 30 мл сухого то-

Выходы и температуры плавления алкиламещенных 6-фталимидонафталин-1-сульфамидов (Ia--e) *

Соединение	Выход, %	Т. пл., °С
(Ia)	83	186-189
(Iб)	69	202-205
(Iв)	81	213-216
(Iг)	90	151-155
(Iд)	89	193-195
(Iе)	94	165-169

* Данные элементного анализа удовлетворительно совпадают с вычисленными.

Таблица 5

Характеристики алкиламидов 6-аминонафталин-1-сульфокислоты (IIa--e)

Соединение	Выход, %	Т. пл., °С	Брутто-формула *	ИМР-спектр, δ, м.д.	R _f **
(IIa)	50	145-148	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₂ S	2,40 (CH ₃)	0,38
(IIб)	72	76-79	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂ S	0,77 (CH ₃), 1,14 (CH ₂), 2,72 (CH ₂)	0,48
(IIв)	67	198-200	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₂ S	0,98 (CH ₃)	0,53
(IIг)	81	92-94	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	2,63 (CH ₃)	0,63
(IIд)	73	105-109	C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₂ S	0,66 (CH ₃), 1,22 (CH ₂), 3,17 (CH ₂)	0,82
(IIе)	77	139-146	C ₁₅ H ₁₈ N ₂ O ₂ S	1,30 (CH ₂), 2,96 (CH ₂)	0,78

* Данные элементного анализа удовлетворительно совпадают с вычисленными.

** Хлороформ -- этилацетат (1 : 1).

дуола. Толуол отгоняли в вакууме, а к охлажденной до -20°C реакционной смеси прибавляли 2,68 г (0,013 моль) DCC в 6 мл сухого пиридина. Смесь выдерживали 30 мин при -20°C , 1 ч при 4°C и 20 ч при 20°C . Выпавшую дициклогексимочевину отфильтровывали, пиридин упаривали в вакууме, а оставшееся масло растворяли в 40 мл смеси *n*-пропилового спирта и хлороформа (1 : 3). Этот раствор промывали 15 мл воды, 15 мл насыщенного раствора NaCl, содержащего 1 мл конц. HCl, 15 мл 2% водного раствора аммиака и 15 мл воды. Органический слой высушивали над безводным Na₂SO₄. Растворитель упаривали в вакууме, а оставшееся масло растирали с сухим толуолом. Образовавшийся порошок отфильтровывали, промывали толуолом, этиловым эфиром и перекристаллизовывали из *n*-пропилового спирта. Получили аналитически чистые соединения (IIIa--e) (табл. 6).

Общая методика синтеза моногидробромидов 6-N-аргиниламинонафталин-1-сульфамидов (IVa--e). 0,01 моль Z-Arg-ANSA (IIIa--e) растворяли в 10 мл 3 М HBr в ледяной уксусной кислоте, выдерживали 2 ч при комнатной температуре и выливали в 100 мл сухого эфира. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, высушивали и растворяли в 10 мл воды. К этому раствору прибавляли 50 мл *n*-бутилового спирта, а затем смесь нейтрализовали 5% NaHCO₃ до pH 7,5. Органический слой отделяли, промывали 15 мл воды и упаривали. Остаток растирали с эфиром, образовавшийся продукт отфильтровывали и высушивали. Получили аналитически чистые соединения (IVa--e) (табл. 7).

Общая методика синтеза Z-Gly-Gly-Arg-ANSA (Va--e). Раствор, содержащий 0,63 г (2,5 ммоль) Z-Gly-Gly-OH и 0,35 г (2,5 ммоль) HOBT

Характеристики Z-Arg(-HBr)-ANSA (IIIa-e)

Соединение	Выход, %	Т. пл., °С	Брутто-формула *	ПМР-спектр, δ, м.д.	R _f
(IIIa)	81	126-132	C ₂₅ H ₃₁ N ₆ O ₅ SBr	2,40 (CH ₃)	0,68
(IIIб)	94	122-127	C ₂₈ H ₃₇ N ₆ O ₅ SBr	0,75 (CH ₃), 1,12 (CH ₂), 2,95 (CH ₂)	0,67
(IIIв)	43	141-148	C ₂₈ H ₃₇ N ₆ O ₅ SBr	0,98 (CH ₃)	0,55
(IIIг)	78	116-121	C ₂₆ H ₃₃ N ₆ O ₅ SBr	2,62 (CH ₃)	0,69
(IIIд)	82	99-102	C ₃₂ H ₄₃ N ₆ O ₅ SBr	0,70 (CH ₃), 1,25 (CH ₂), 3,00 (CH ₂)	0,73
(IIIе)	93	119-123	C ₂₉ H ₃₇ N ₆ O ₅ SBr	1,30 (CH ₂), 2,99 (CH ₂)	0,74

* Данные элементного анализа удовлетворительно совпадают с вычисленными.

Таблица 7

Характеристики Arg(-HBr)-ANSA (IVa-e)

Соединение	Выход, %	Т. пл., °С	Брутто-формула *	ПМР-спектр, δ, м.д.	R _f
(IVa)	85	96-104	C ₁₇ H ₂₅ N ₆ O ₃ SBr	2,45 (CH ₃)	0,40
(IVб)	90	126-133	C ₂₀ H ₃₁ N ₆ O ₃ SBr	0,77 (CH ₃), 1,20 (CH ₂), 2,80 (CH ₂)	0,47
(IVв)	90	161-168	C ₂₀ H ₃₁ N ₆ O ₃ SBr	0,95 (CH ₃)	0,33
(IVг)	83	95-102	C ₁₈ H ₂₇ N ₆ O ₃ SBr	2,65 (CH ₃)	0,41
(IVд)	81	119-123	C ₂₄ H ₃₉ N ₆ O ₃ SBr	0,80 (CH ₃), 1,20 (CH ₂), 2,70 (CH ₂)	0,43
(IVе)	93	121-130	C ₂₁ H ₃₁ N ₆ O ₃ SBr	1,30 (CH ₂), 3,00 (CH ₂)	0,48

* Данные элементного анализа удовлетворительно совпадают с вычисленными.

Таблица 8

Характеристики Z-Gly-Gly-Arg(-HBr)-ANSA (Va-e)

Соединение	Выход, %	Т. пл., °С	Брутто-формула *	ПМР-спектр, δ, м.д.	R _f
(Va)	80	100-114	C ₂₉ H ₃₇ N ₈ O ₇ SBr	2,50 (CH ₃)	0,61
(Vб)	96	101-116	C ₃₂ H ₄₃ N ₈ O ₇ SBr	0,80 (CH ₃), 1,20 (CH ₂), 2,80 (CH ₂)	0,64
(Vв)	53	115-128	C ₃₂ H ₄₃ N ₈ O ₇ SBr	1,10 (CH ₃)	0,66
(Vг)	82	98-100	C ₂₉ H ₃₉ N ₈ O ₇ SBr	2,44 (CH ₃)	0,67
(Vд)	95	100-109	C ₄₃ H ₄₇ N ₈ O ₇ SBr	0,77 (CH ₃), 1,20 (CH ₂), 3,05 (CH ₂)	0,66
(Ve)	88	118-122	C ₃₃ H ₄₃ N ₈ O ₇ SBr	1,30 (CH ₂), 3,10 (CH ₂)	0,66

* Данные элементного анализа удовлетворительно совпадают с вычисленными.

в 18 мл сухого DMF, охлаждали до -20° С, прибавляли 0,62 г (3 ммоль) DCC, выдерживали 0,5 ч при этой температуре и 1 ч при 4° С. После этого прибавляли раствор, содержащий 2,5 ммоль моногидробромида 6-N-аргинилнафталин-1-сульфамида (IVa-e) в DMF, смесь перемешивали 19 ч при 20° С, образовавшуюся дидцклогексилмочевину отфильтровывали, а к фильтрату добавляли 150 мл воды. Полученную суспензию экстрагировали смесью этилацетат - *n*-бутиловый спирт, 1:1 (3×25 мл) и объединенные органические фракции промывали 5% NaHCO₃, 10% KHSO₄ и водой (3×12 мл). Раствор упаривали приблизительно до 3 мл и продукт осаждали сухим эфиром. Получили соединения (Va-e) (табл. 8).

Определение кинетических параметров. Раствор 20–400 мкМ субстрата (2 мл) в трис-HCl-буфере (рН 8,3, 0,05 М) термостатировали в кювете электрофлуориметра в течение 5 мин, прибавляли раствор трипсина (50 мкл), концентрация которого составляла 10,5 нМ в случае Z-Arg-ANSA (IIIa–e) и 0,524 нМ в случае Z-Gly-Gly-Arg-ANSA (Va–e), в 1 мМ HCl и регистрировали рост флуоресценции при 475 нм в течение 4 мин ($\lambda_{\text{возб}}$ 350 нм). Из наклона полученных кинетических кривых рассчитывали скорость реакции. Максимальную скорость и K_m определяли методом Лайнуивера – Берка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hemker H. C. // Handbook of Synthetic Substrates for Coagulation and Fibrinolytic System. / Boston. The Hague. Dordrecht. Lancaster: Martinus Nijhoff Publishers, 1983. P. 31.
2. Brynes P. J., Bevilacqua P., Green A. // Analyt. Biochem. 1981. V. 116. № 2. P. 408–413.
3. Недоспасов А. А., Потапов В. Н., Родина Е. В. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 4. С. 444–452.
4. Bigbee W. L., Weintraub H. D., Jensen R. H. // Analyt. Biochem. 1978. V. 88. № 1. P. 114–122.
5. Zimmerman H., Quigley J. P., Ashe B., Doru C., Goldfarb R., Troll W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 2. P. 750–753.
6. Baustert J. H., Wolfbeis O. S., Moser R., Koller E. // Analyt. Biochem. 1988. V. 171. № 2. P. 393–397.
7. Pierzchala P. A., Dorn C. P., Zimmerman M. // Biochem. J. 1979. V. 183. P. 555–559.

Поступила в редакцию
8.VII.1991
После доработки
29.XI.1991

Z. TALAIKYTĖ, S. BUTĖNAS, A. PALAIMA

SUBSTITUTED 6-AMINONAPHTHALENE-1-SULPHAMIDES AS FLUOROGENIC LEAVING GROUPS OF SYNTHETIC PROTEASE SUBSTRATES

Institute of Biochemistry, Lithuanian Academy of Sciences, Vilnius

Alkyl substituted 6-aminonaphthalene-1-sulphamides (ANSA), hydrobromides of substituted 6-(N^{α} -benzyloxycarbonyl-L-arginyl)aminonaphthalene-1-sulphamides (Z-Arg-ANSA) and hydrobromides of 6-(benzyloxycarbonylglycylglycyl-L-arginyl)aminonaphthalene-1-sulphamides (Z-Gly-Gly-Arg-ANSA) are synthesized and their absorption and emission spectra measured. ANSA have an emission band at 470–480 nm, comparable or exceeding in intensity that of compounds used as fluorogenic leaving groups in peptide cleavage reactions. The bands of Z-Arg-ANSA and Z-Gly-Gly-Arg-ANSA are shifted to the short-wave side and do not overlap with ANSA's emission band.

Reactions of Z-Arg-ANSA and Z-Gly-Gly-Arg-ANSA with trypsin were studied. The kinetic parameters (k_{cat} and K_m) of the reaction of Z-Arg-ANSA were found to depend on the nature and the number of substituents in the sulphamide. In the case of Z-Gly-Gly-Arg-ANSA, this dependence is negligible and k_{cat}/K_m exceeds by over ten times this parameter of Z-Arg-ANSA.

ANSA can apparently be used in the synthesis of fluorogenic substrates of proteases.