



УДК 577.151;577.112.6

## НОВЫЕ ДОНОРНО-АКЦЕПТОРНЫЕ ПАРЫ ДЛЯ ФЛУОРОГЕННЫХ СУБСТРАТОВ С ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫМ ПЕРЕНОСОМ ЭНЕРГИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ ТРОМБИНА И ТРИПСИНА\*

© 1998 г. В. В. Холодович, Д. И. Кара, А. А. Гершкович#,  
В. К. Кибирев, Л. В. Карабут, И. В. Клименко\*, А. И. Корнелюк\*

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, 253660, Киев-94, Мурманская, 1;

\*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

Поступила в редакцию 27.05.97 г. Принята к печати 08.10.97 г.

Описаны новые субстраты тромбина и трипсина: Abz-Pro-Arg-Gly-Nph (I), являющийся флуорогенным субстратом, действие которого основано на принципе внутримолекулярного переноса энергии флуоресценции (СВПЭФ), и H-D-Trp-Pro-Arg-pNA (II), который можно использовать и как хромогенный субстрат, и как СВПЭФ. В субстрате (I) впервые в качестве акцептора энергии возбуждения 2-аминобензоильной группы (Abz) использована 4-нитрофенилгидразидная группа (Nph); он плохо гидролизуется тромбином ( $k_{\text{кат}}/K_m = 1.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ) и эффективно – трипсином ( $k_{\text{кат}}/K_m = 3.15 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ). Гидролиз субстрата (II) можно контролировать как спектрофотометрически при 405 нм, так и по возрастанию флуоресценции при 340 нм. По эффективности гидролиза тромбином ( $k_{\text{кат}}/K_m = 3.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ) соединение (II) сравнимо с известными хромогенными субстратами этого фермента. Предложенные новые донорно-акцепторные пары перспективны для создания СВПЭФ для широкого круга протеолитических ферментов.

*Ключевые слова:* тромбин, трипсин, субстраты с внутримолекулярным переносом энергии флуоресценции, субстраты с внутримолекулярным тушением флуоресценции.

Для исследования протеолитических ферментов и определения их активности широкое применение нашли хромогенные и флуорогенные субстраты [2, 3]. В последние два десятилетия все большее распространение находят флуорогенные субстраты, действие которых основано на принципе внутримолекулярного переноса энергии флуоресценции (СВПЭФ). Их часто называют также субстратами с внутримолекулярным тушением флуоресценции (СВТФ) [4, 5]. В дальнейшем мы будем придерживаться первого наименования, так как считаем, что оно более точно отражает физический смысл процесса [6, 7]. В отличие от традиционных хромогенных и флуорогенных субстратов, в которых хромофорная

группа связана с С-концевой карбоксильной группой, в СВПЭФ донор и акцептор флуоресценции расположены на противоположных концах пептидной цепи. При расстоянии между ними до 5 нм происходит безызлучательный перенос энергии возбуждения от донора к акцептору, что приводит к значительному уменьшению интенсивности флуоресценции пептида. Однако после расщепления пептидной связи субстрата расстояние между донором и акцептором существенно увеличивается, что прерывает перенос электронной энергии и вызывает резкое возрастание флуоресценции продукта гидролиза, несущего флуорофор (донор) [4, 5].

Таким образом, СВПЭФ позволяют определять расщепление субстрата на любом участке его пептидной цепи, что дает возможность использовать их для исследования широкого круга эндо- и экзопептидаз [4, 5]. Кроме того, в субстратах этого типа можно варьировать аминокислотные остатки, расположенные по обе стороны расщепляемой связи. Это позволяет применять их для детального изучения участков связывания ферментов с субстратами, а также создавать субстраты с более высокой специфичностью к изучаемым протеиназам [4, 5].

\*Часть данной работы см. [1].

Сокращения: СВПЭФ – субстраты с внутримолекулярным переносом энергии флуоресценции; Abz – 2-аминобензоил; Nba – 4-нитробензиламино; Nph – 4-нитрофенилгидразид; ONb – 4-нитробензилокси; Dnp – 2,4-динитрофенил; Ded – 2,4-динитрофенилэтилендиамино; Dns – 5-диметиламинонафталин-1-сульфонил; pNA – 4-нитроанилино; Phe(NO<sub>2</sub>) – 4-нитрофенилаланин; Trp(NO<sub>2</sub>) – 3-нитротриптозин; Z(NO<sub>2</sub>) – 4-нитробензилкарбонил; EDANS – 5-[(2-аминоэтил)амино]нафталин-1-сульфонил; Pip – пиперидиновая кислота.

# Автор для переписки.

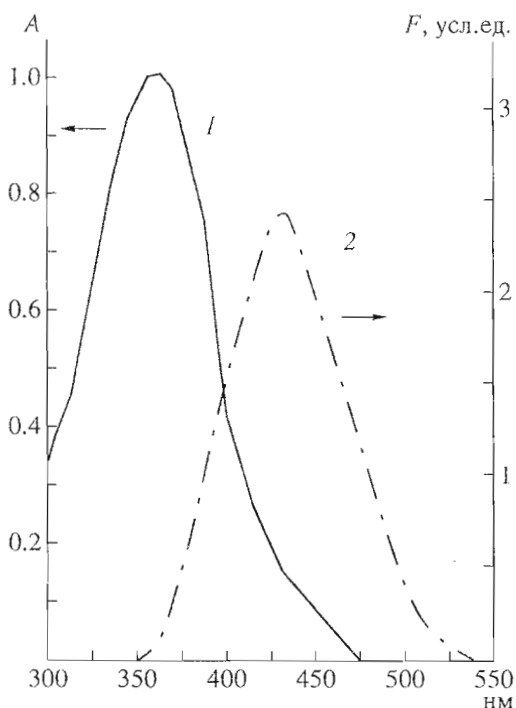


Рис. 1. Спектр поглощения  $\text{H-Gly-Nph} \cdot \text{HCl}$  (1) и спектр флуоресценции  $\text{Abz-Pro-Arg-OH} \cdot \text{HCl}$  (2) ( $\lambda_{\text{возб}} 340 \text{ нм}$ ) в 20 мМ трис- $\text{HCl}$ -буфере, рН 8.2.

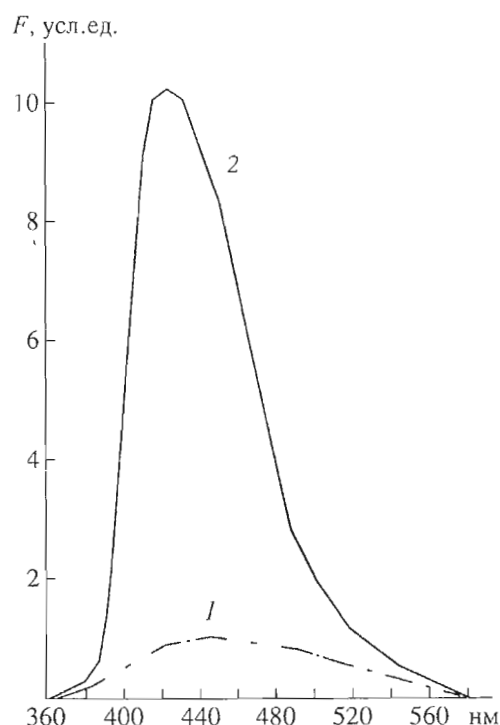


Рис. 2. Спектр флуоресценции субстрата  $\text{Abz-Pro-Arg-Gly-Nph}$  (1) ( $\lambda_{\text{возб}} 340 \text{ нм}$ ) до (1) и после (2) гидролиза трипсином. Условия см. в "Экспер. части".

К настоящему времени описано большое количество СВПЭФ для широкого круга протеиназ, в частности для ферментов системы свертывания крови [5]. Однако для ключевого фермента гемостаза – тромбина (КФ 3.4.21.5) такие субстраты до последнего времени описаны не были. С целью выяснения роли подцентров субстратов  $P'_2$  и  $P'_3$  во взаимодействии с тромбином недавно был получен ряд СВПЭФ, состоящих из 10 а.о. [8]. Некоторые из них эффективно гидролизировались тромбином ( $k_{\text{кат}}/K_m = 2.1\text{--}8.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ), однако эти субстраты, по-видимому, мало доступны по сравнению с традиционными хромогенными субстратами тромбина. Ввиду важности использования флуорогенных субстратов тромбина как в научных исследованиях, так и в медицинской диагностике целью нашего исследования было получение трипептидных СВПЭФ для этого фермента.

При конструировании субстратов учитывались как первичная (остаток аргинина в положении  $P_1$ ), так и вторичная (ароматическая аминокислота в положении  $P_3$ ) специфичности тромбина [9], а также данные о том, что в хромогенных субстратах тромбина хорошо зарекомендовал себя остаток пролина в подцентре  $P_2$  [9]. При получении субстрата  $\text{Abz-Pro-Arg-Gly-Nph}$  (I) в качестве донора флуоресценции мы использовали попу-

лярную в СВПЭФ Abz-группу. Она отличается высоким квантовым выходом флуоресценции, небольшими размерами, относительно низкой гидрофобностью и весьма доступна [4, 5]. В качестве акцептора энергии возбуждения этой группы широко использовались различные ароматические остатки, содержащие нитрогруппы:  $\text{ONb}$  [10],  $\text{Nba}$  [11–14],  $\text{Dnp}$  [8, 15],  $\text{Ded}$  [11, 16–20] и  $\text{pNa}$  [11, 21, 22]. Удобными для этой цели оказались модифицированные аминокислоты  $\text{Phe}(\text{NO}_2)$  [23–26] и  $\text{Tyr}(\text{NO}_2)$  [27–29], которые мало отличаются от природных аналогов и могут быть легко введены в любое положение пептидной цепи субстратов.

Среди указанных выше акцепторов наиболее эффективны те, у которых спектры поглощения перекрываются со спектрами флуоресценции Abz-группы, т.е. имеет место перенос электронной энергии от донора к акцептору по резонансному механизму [6, 7]. Однако группы, для которых перекрывание спектров не имеет места ( $\text{ONb}$ ,  $\text{Phe}(\text{NO}_2)$  и  $\text{Nba}$ ) и перенос энергии возбуждения которых осуществляется по обменному (или контактному) механизму (для чего необходим тесный контакт между донором и акцептором [3, 6, 7]), также успешно использовались совместно с Abz-группой.

В качестве нового акцептора для Abz-группы мы применили 4-нитрофенилгидразидную группу, спектр поглощения которой перекрывается

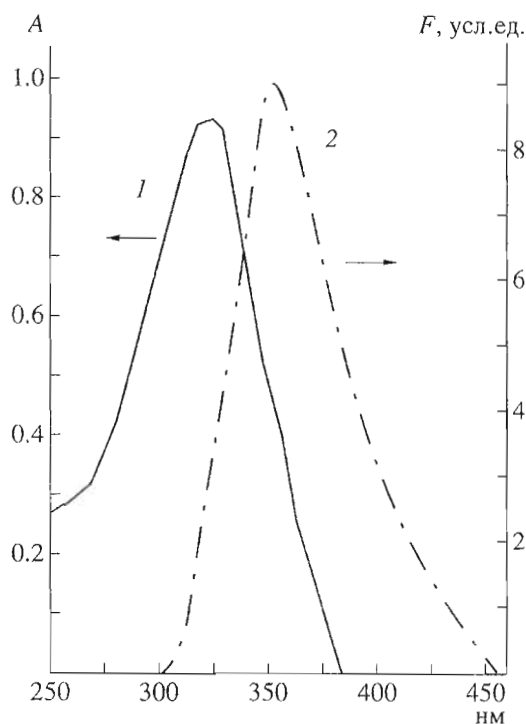


Рис. 3. Спектр поглощения  $\text{H-Arg-pNA} \cdot 2\text{HCl}$  (1) и спектр флуоресценции  $\text{H-D-Trp-Pro-Arg-OH} \cdot \text{HCl}$  (2) ( $\lambda_{\text{возб}} 290 \text{ нм}$ ) в 20 мМ трис- $\text{HCl}$ -буфере, pH 8.2.

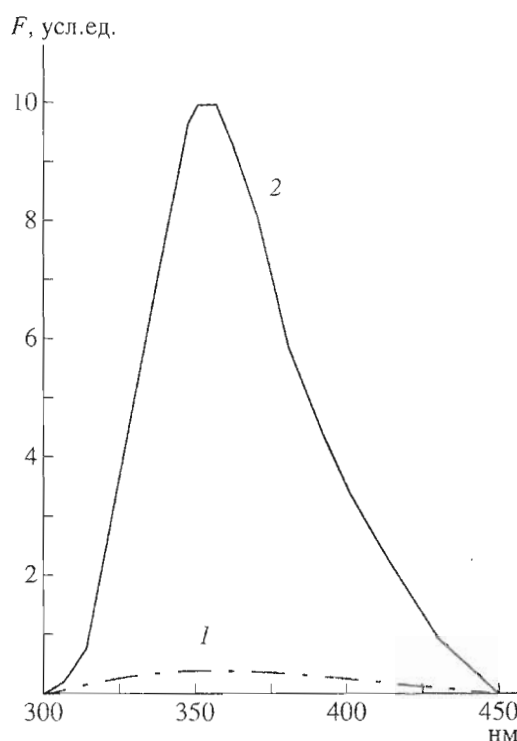


Рис. 4. Спектры флуоресценции  $\text{H-D-Trp-Pro-Arg-pNA}$  (II) ( $\lambda_{\text{возб}} 290 \text{ нм}$ ) до (1) и после (2) полного гидролиза трипсином.

со спектром флуоресценции Abz-остатка (рис. 1). Она более гидрофильна, чем Ded-группа, и легко доступна. При полном гидролизе соединения (I) трипсином (КФ 3.4.21.4) интенсивность флуоресценции раствора возрастала в 10 раз (рис. 2).

При конструировании субстрата  $\text{H-D-Trp-Pro-Arg-pNA}$  (II) в качестве флуорофора-донора мы использовали  $D$ -триптофан, учитывая, что в лучших хромогенных субстратах тромбина в подцентре  $P_3$  расположен остаток  $D$ -фенилаланина [9]. Природный флуорофор триптофан широко применяется в СВПЭФ с различными акцепторными группами: Dns [30–39], Dnp [34–37], EDANS [38, 39] и  $\text{Z}(\text{NO}_2)$  [40]. Мы в качестве акцептора энергии возбуждения использовали pNA-группу, так как ее спектр поглощения перекрывается со спектром флуоресценции триптофана (рис. 3). Использование pNA-группы преследовало двойную цель: она могла служить как акцептором для триптофана, так и традиционным хромофором. Таким образом, степень гидролиза пептида (II) можно детектировать двумя способами: по возрастанию оптического поглощения реакционной смеси при 405 нм или по увеличению интенсивности флуоресценции при 350 нм ( $\lambda_{\text{возб}} 290 \text{ нм}$ ), т.е. трипептид (II) может быть использован и как хромогенный, и как флуорогенный субстрат согласно принципу, впервые предложенному в работах

[21, 22]. В результате полного гидролиза соединения (II) трипсином интенсивность флуоресценции возрастала в 60 раз (рис. 4), что позволяет применять пару Trp – pNA-группа при конструировании новых СВПЭФ.

График зависимости интенсивности флуоресценции продуктов полного гидролиза субстрата (I) от его концентрации (рис. 5) сохраняет линейность в интервале концентраций пептида 1–80 мкМ, что определяет диапазон его использования для кинетических измерений. Отклонение от линейности при концентрации выше 80 мкМ можно объяснить проявлением эффекта “внутреннего фильтра”, т.е. поглощением части возбуждающего излучения ( $\lambda_{\text{возб}} 340 \text{ нм}$ ) присутствующим в растворе продуктом гидролиза  $\text{H-Gly-Nph}$ , максимум поглощения которого находится при 364 нм [11, 34].

Кинетические характеристики гидролиза субстратов (I) и (II) трипсином и тромбином (таблица) свидетельствуют о том, что соединение (I) эффективно расщепляется трипсином и величина  $k_{\text{кат}}/K_m$  этого процесса сравнима с величинами констант специфичности “хороших” субстратов трипсина (соединения (III) и (V) в таблице). Однако значение  $k_{\text{кат}}/K_m$  для гидролиза соединения (I) тромбином оказалось на три порядка ниже величин констант специфичности для известных хро-

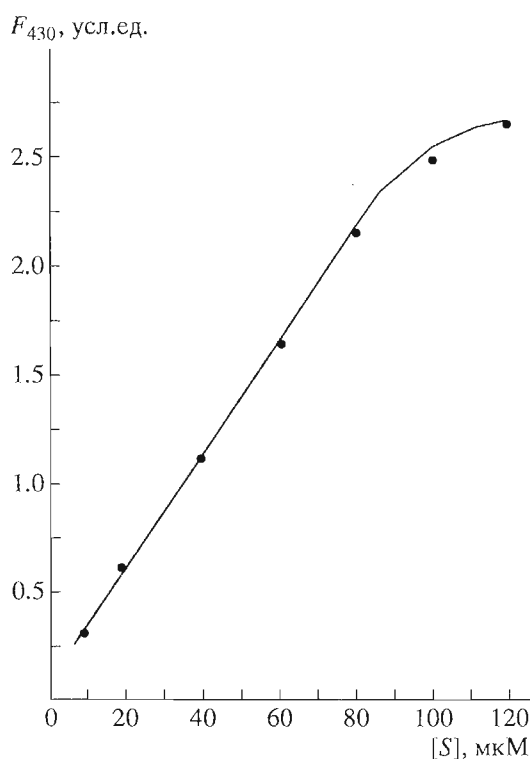


Рис. 5. Зависимость интенсивности флуоресценции субстрата Abz-Pro-Arg-Gly-Nph (I) от его концентрации при гидролизе трипсином в 20 мМ трис-НСl-буфере, рН 8.2.

могенных субстратов этого фермента (соединения (III) и (IV)).

Мы предполагаем, что причиной низкой эффективности расщепления субстрата (I) тромбином является присутствие в нем объемистой Nph-группы в подцентре  $P'_2$  субстрата, в то время как хромофорные группы в традиционных флуорогенных и хромогенных субстратах расположены в их подцентрах  $P'_1$ . Моделирование при помощи прецизионных атомно-молекулярных моделей (производимых в Тартуском университете, Эстония) фермент-субстратного взаимодействия субстрата (I) и тромбина (модель фермента построена [41] по данным рентгеноструктурного анализа [42]) позволило предположить, что Nph-группа в подцентре  $P'_2$  субстрата (I) может неблагоприятно влиять на его расположение в щели активного центра фермента. В частности, могут ухудшаться контакты ароматической Abz-группы с гидрофобным окружением в подцентре  $S_3$  тромбина [42, 43].

Субстрат (II) имеет величину  $k_{кат}/K_m$  для гидролиза тромбином, сравнимую со значениями констант специфичности для известных хромоген-

ных субстратов этого фермента (III) и (IV), и, по-видимому, перспективен для использования в работе с тромбином.

Мы полагаем, что предложенные в данной работе донорно-акцепторные пары (Abz – Nph и Trp – pNA), перенос энергии возбуждения между которыми происходит по резонансному механизму, могут быть использованы в СВПЭФ для широкого круга протеолитических ферментов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Температуры плавления даны без исправления. Индивидуальность всех полученных соединений контролировали с помощью ТСХ на пластинках Silufol в системах *n*-бутанол–уксусная кислота–вода, 4 : 1 : 1 (А), этилацетат–гексан, 1 : 2 (Б) и 2 : 1 (В). Спектры поглощения снимали на УФ-спектрофотометре UV VIS M-40 (Германия), флуоресцентные измерения производили на спектрофлуориметре Hitachi M-850 (Япония). Оптическое вращение определяли на спектрополяриметре Spectropol-1 (Sofica, Франция). В работе использовали трипсин (Serva) и тромбин человека с удельной активностью 700 НИЕ-единиц, полученный по методике работы [44].

**Вос-Gly-Nph.** Раствор 7 г (27.5 ммоль) Вос-Gly-ONSu и 4.2 г (27.5 ммоль) 4-нитрофенилгидразина в 100 мл диоксана перемешивали 24 ч при 20°C. Осадок отфильтровывали, промывали диоксаном, эфиром и сушили на воздухе. Выход 6.2 г (73°C), т. пл. 146°C,  $[\alpha]_D^{25} -15^\circ$  (*c* 1, DMF),  $R_f$  0.2 (В). Найдено, %: С 50.43; Н 5.91; N 17.78.  $C_{13}H_{18}N_4O_5$ . Вычислено, %: С 50.32; Н 5.85; N 18.06.

**Вос-Arg-Gly-Nph · HCl.** К раствору 5.9 г (18 ммоль) Вос-Arg-OH · HCl · H<sub>2</sub>O в 70 мл DMF добавляли Н-Gly-Nph (полученный деблокированием 5.9 г (19 ммоль) Вос-Gly-Nph при помощи 1 н. HCl в уксусной кислоте) и 2.67 г (20 ммоль) 1-гидроксibenзтриазола. Реакционную смесь охлаждали до 0°C, вносили 2 мл (18 ммоль) N-метилморфолина и 4.12 г (20 ммоль) DCC, перемешивали 2 ч при 0°C и оставляли на 18 ч при 20°C. Дициклогексилмочевину удаляли, DMF отгоняли в вакууме, а оставшееся масло растворяли в 150 мл изобутанола. Раствор промывали 2 раза 1 н. KHSO<sub>4</sub> и раствором NaCl до рН 7. После высушивания органической фазы над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> фильтровали, растворитель отгоняли и оставшееся светло-оранжевое масло растирали с эфиром. Образовавшийся желтый осадок промывали 2 раза смесью изопропанол–эфир (1 : 1), эфиром и затем сушили. Выход 5.62 г (57%), т. пл. 145°C,  $[\alpha]_D^{25} -10^\circ$  (*c* 1, DMF),  $R_f$  0.42 (А). Найдено, %: С 47.42; Н 6.91; N 20.42.  $C_{19}H_{31}N_8O_6Cl \cdot C_3H_7OH$ . Вычислено, %: С 46.93; Н 6.98; N 19.90.

Кинетические параметры гидролиза пептидных субстратов трипсином

Субстрат	Тип*	Трипсин			Тромбин			Ссылка
		$K_m$ , мкМ	$k_{кат}$ , с <sup>-1</sup>	$k_{кат}/K_m \times 10^{-6}$ , М <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>	$K_m$ , мкМ	$k_{кат}$ , с <sup>-1</sup>	$k_{кат}/K_m \times 10^{-6}$ , М <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>	
Abz-Pro-Arg-Gly-Nph (I)	Ф	66.7	210.0	3.15	91.0	0.125	0.0014	
H-D-Trp-Pro-Arg-pNA (II)**	Х, Ф	—	—	—	33.0	100.0	3.0	
Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (III) (Chromozym TH)	Х	17.0	69.0	4.1	4.0	100.0	25.0	[2, 3]
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (IV) (S-2238)	Х	—	—	—	1.6	95.0	59.0	[2, 3]
Abz-Gly-Phe-Arg-Leu-Ded (V)	Ф	8.3	23.0	2.7	—	—	—	[17]

\* Тип субстратов: Ф – флуорогенные, Х – хромогенные.

\*\* Кинетические константы определяли по возрастанию поглощения продуктов гидролиза при 405 нм.

**Вос-Abz-Pro-OH.** К раствору 4.9 г (15.3 ммоль) Вос-Abz-ONSu в 100 мл диоксана добавляли 1.93 г (16.8 ммоль) пролина, растворенного в 40 мл воды с 0.7 г (16.8 ммоль) NaOH. Раствор перемешивали 20 ч при 20° С, фильтровали и диоксан удаляли в вакууме. К остатку добавляли 50 мл воды, раствор подкисляли 1 н. KHSO<sub>4</sub> до pH 3 и выделившееся масло экстрагировали 100 мл этилацетата. Органическую фазу промывали водой до pH 7, сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и растворитель удаляли. После растирания оставшегося масла с петролейным эфиром получали бесцветный осадок. Выход 2.9 г (58%), т. пл. 121–123°С (этилацетат–гексан),  $[\alpha]_D^{25} -70^\circ$  (с 1, DMF),  $R_f$  0.94 (А), 0.18 (В). Найдено, %: С 61.02; Н 6.55; N 8.33. C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Вычислено, %: С 61.07; Н 6.63; N 8.38.

**Вос-Abz-Pro-Arg-Gly-Nph · HCl (Вос-I).** К охлажденному до 0°С раствору H-Arg-Gly-Nph · HCl (полученного деблокированием 2.36 г (4.2 ммоль) N<sup>α</sup>-Вос-замещенного пептида 1 н. HCl в уксусной кислоте) в 35 мл DMF добавляли 0.28 мл (4.1 ммоль) N-метилморфолина, 1.3 г (4.1 ммоль) Вос-Abz-Pro-OH, 0.5 г (4.1 ммоль) N-гидроксисукцинимиды и 0.9 г (4.2 ммоль) DCC. Смесь перемешивали 2 ч при 0°С и оставляли на 18 ч при 20°С. Дициклогексилмочевину удаляли, DMF отгоняли в вакууме, к остатку добавляли 100 мл изобутанола и 50 мл 1 н. KHSO<sub>4</sub>, органическую фазу промывали раствором NaCl до pH 7 и сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. После удаления растворителя оставшееся желтое масло растирали с эфиром и образовавшийся осадок кристаллизовали из смеси этанол–эфир. Выход 1.8 г (61%), т. пл. 157°С,  $[\alpha]_D^{25} -27.5^\circ$  (с 1, DMF),  $R_f$  0.28 (А). Найдено, %: С 51.86; Н 6.86; N 17.26. C<sub>31</sub>H<sub>43</sub>O<sub>8</sub>N<sub>10</sub>Cl · 2C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH. Вычислено, %: С 51.82; Н 6.83; N 17.34.

**Abz-Pro-Arg-Gly-Nph · 2HCl (I).** Раствор 1.5 г (2.1 ммоль) Вос-I в 30 мл 2 н. HCl в уксусной кис-

лоте выдерживали 1 ч при 20°С, защитив от влаги воздуха. К раствору добавляли 100 мл сухого эфира, растворитель декантировали с выпавшего осадка, который промыли эфиром. Осадок растворяли в небольшом количестве метанола и осаждали его эфиром, отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакууме над щелочью. Выход 0.95 г (70%), т. пл. 187–190°С,  $[\alpha]_D^{25} -42.5^\circ$  (с 1, DMF),  $R_f$  0.23 (А). Найдено, %: С 46.70; Н 6.16; N 19.46. C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub>N<sub>10</sub>C<sub>12</sub> · CH<sub>3</sub>OH. Вычислено, %: С 46.23; Н 6.16; N 19.59.

**Вос-D-Trp-Pro-OH.** К раствору 8.02 г (20 ммоль) Вос-D-Trp-ONSu в 100 мл THF прибавляли 2.9 г (25 ммоль) пролина, растворенного в 50 мл воды с 1 г (25 ммоль) NaOH, раствор перемешивали 4 ч и оставляли на 18 ч при 20°С. После удаления растворителя остаток разбавляли 40 мл воды, подкисляли 1 н. KHSO<sub>4</sub> до pH 7 и продукт экстрагировали этилацетатом. Органическую фазу промывали раствором NaCl до pH 7, сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и растворитель удаляли в вакууме. Перекристаллизацию производили из смеси этилацетат–этанол (10 : 1). Выход продукта 3.5 г (44%), т. пл. 196–197°С,  $[\alpha]_D^{25} -47.5^\circ$  (с 1, DMF),  $R_f$  0.36 (В). Найдено, %: С 63.18; Н 7.08; N 10.54. C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub>. Вычислено, %: С 62.82; Н 6.78; N 10.46.

**Вос-D-Trp-Pro-Arg-pNA · HCl (Вос-II).** К охлажденному до 0°С раствору 2 г (5 ммоль) Вос-D-Trp-Pro-OH в 50 мл DMF прибавляли 0.7 г (6 ммоль) N-гидроксисукцинимиды, 1.2 г (6 ммоль) DCC, 2 г (6 ммоль) H-Arg-pNA · HCl и 0.65 мл (6 ммоль) N-метилморфолина. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при 0°С и оставляли на 18 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляли в вакууме, остаток растворяли в изобутаноле, промывали 1 н. KHSO<sub>4</sub> и раствором NaCl и сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. После упаривания растворителя остаток кристаллизовали из смеси метанол–этил-

ацетат. Выход 1.15 г (40%), т. пл. 140°C,  $[\alpha]_D^{25}$   $-30^\circ$  (с 1, DMF),  $R_f$  0.7 (А). Найдено, %: С 54.57; Н 6.51; N 17.21.  $C_{33}H_{44}O_7N_9Cl \cdot CH_3OH$ . Вычислено, %: С 54.72; Н 6.48; N 17.21.

**H-D-Trp-Pro-Arg-pNA · HCl (II).** Раствор 1.15 г (1.61 ммоль) Вос-(II) в 50 мл 98% муравьиной кислоты выдерживали 4 ч при 20°C и затем разбавляли 250 мл эфира. Через 18 ч растворитель декантировали, осадок растворяли в 10 мл метанола, к смеси добавляли 0.4 мл 4 н. HCl в диоксане и продукт осаждали 100 мл эфира. Выход 0.96 г (92%), т. пл. 173–175°C,  $[\alpha]_D^{25}$   $-80^\circ$  (с 1, DMF),  $R_f$  0.25 (А). Найдено, %: С 49.54; Н 6.21; N 18.18.  $C_{28}H_{37}O_5N_9Cl_2 \cdot 0.5H_2O$ . Вычислено, %: С 49.63; Н 5.96; N 18.60.

**Ферментативный гидролиз субстратов.** При изучении хромогенных свойств субстрата (II) непрерывно контролировали поглощение раствора продуктов гидролиза при 405 нм. При исследовании субстрата (I) непрерывно измеряли флуоресценцию раствора продуктов гидролиза при 430 нм ( $\lambda_{возб}$  340 нм), а субстрата (II) – при 350 нм ( $\lambda_{возб}$  290 нм). Ферментативный гидролиз субстратов проводили при 25°C, используя их в концентрациях  $10^{-6}$  М (спектрофлуориметрический контроль) и  $10^{-4}$  М (спектрофотометрический контроль) в 20 мМ трис-HCl-буфере, рН 8.2. Для измерения флуоресценции продукта исчерпывающего гидролиза субстратов последние инкубировали с трипсином в течение 2 ч.

**Кинетические константы расщепления субстратов** тромбином и трипсином определяли по начальным скоростям гидролиза по методу Лайнуивера–Берка, а начальные скорости гидролиза субстрата  $v_0$  рассчитывали по изменению флуоресценции раствора по формуле [11, 34]

$$v_0 = \frac{F_t[S]_0}{(F - F_0)t},$$

где  $v_0$  – начальная скорость гидролиза (мкМ/с),  $[S]_0$  – начальная концентрация субстрата (мкМ),  $F$  – флуоресценция при полном гидролизе субстрата трипсином,  $F_0$  – начальная флуоресценция субстрата,  $F_t$  – флуоресценция раствора через время  $t$  после добавления фермента,  $t$  – время гидролиза (с).

Часть данной работы была поддержана грантом (К 16100) Правительства Украины и Международного научного фонда.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gershkovich A.A., Kholodovich V.V., Kara D.I., Kibirev V.K. // XVth Congr. Int. Soc. Thrombosis and Haemostasis. Jerusalem, Israel, June 11–16, 1995 (Thromb. and Haemostas. 1995. V. 73. P. 926).
- Lottenberg R., Christensen U., Jackson C.M., Coleman P.L. // Methods Enzymol. 1981. V. 80. P. 341–361.
- Гершкович А.А., Кибирев В.К. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. С. 1461–1488.
- Yaron A., Carmel A., Katchalski-Katzir E. // Anal. Biochem. 1979. V. 95. P. 228–235.
- Gershkovich A.A., Kholodovich V.V. // J. Biochem. Biophys. Methods. 1996. V. 33. P. 135–162.
- Stryer L., Haugland R.P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1967. V. 58. P. 719–726.
- Lakovic J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. N. Y.: Plenum Press, 1983. P. 305–337.
- Le Bonniec B.F., Myles T., Johnson T., Knight C.G., Tapparelli C., Stone S.R. // Biochemistry. 1996. V. 35. P. 7114–7122.
- Izquiero C., Burguillo F.J. // Int. J. Biochem. 1982. V. 21. P. 579–592.
- Carmel A., Kessler E., Yaron A. // Eur. J. Biochem. 1977. V. 73. P. 617–625.
- Филиппова И.Ю., Лысогорская Е.Н., Оксенойт Е.С., Комаров Ю.Е., Степанов В.М. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. С. 1172–1180.
- Castillo M.J., Kurachi K., Nishino N., Ohkubo I., Powers J.C. // Biochemistry. 1983. V. 22. P. 1021–1029.
- Vencill C.F., Rasnick D., Crumbley K.V., Nishino N., Powers J.C. // Biochemistry. 1985. V. 24. P. 3149–3157.
- Rush R.S., Mitas M., Powers J.C., Tanaka T., Hersh L.B. // Arch. Biochem. Biophys. 1984. V. 231. P. 390–393.
- Vanhoof G., De Meester I., Goossens F., Hendriks D., Scharpe S., Yaron A. // Biochem. Pharmacol. 1992. V. 44. P. 479–487.
- Chagas J.R., Juliano L., Prado E.S. // Anal. Biochem. 1991. V. 192. P. 419–425.
- Nichino N., Makinose Y., Fujimoto T. // Chem. Lett. 1992. V. 1. P. 77–80.
- Guathier F., Moreau T., Lalmanch G., Brillard-Bourdet M., Ferrer-Di Martino M., Juliano L. // Arch. Biochem. Biophys. 1993. V. 306. P. 304–308.
- Juliano L., Chagas J.R., Hirata I.Y., Carmona E., Sucupira M., Oliveira E.S., Oliveira E.B., Camargo A.C.M. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990. V. 173. P. 647–652.
- Oliveira M.C.F., Hirata I.Y., Chagas J.R., Boschov P., Gomes R.A.S., Figueiredo A.F.S., Juliano L. // Anal. Biochem. 1992. V. 203. P. 39–46.
- Bratanova E.K., Petkov D.D. // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 213–218.
- Stambolieva N.A., Ivanov I.P., Yomtova V.M. // Arch. Biochem. Biophys. 1992. V. 294. P. 703–706.
- Carmel A., Yaron A. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 87. P. 265–273.
- Fleminger G., Carmel A., Goldenberg D., Yaron A. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 125. P. 609–615.
- Toth M.V., Marshall G.R. // Int. J. Pept. Protein Res. 1990. V. 36. P. 544–550.
- Carmel A., Ehrlich-Rogozinsky S., Yaron A. // Clin. Chim. Acta. 1979. V. 93. P. 215–220.
- Meldal M., Breddam K. // Anal. Biochem. 1991. V. 195. P. 141–147.

28. *Breddam K., Meldal M.* // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 206. P. 103–107.
29. *Angliker H., Neumann U., Molloy S.S., Thomas J.* // *Anal. Biochem.* 1995. V. 224. P. 409–412.
30. *Latt S.A., Auld D.S., Valee B.L.* // *Anal. Biochem.* 1972. V. 50. P. 56–62.
31. *Geoghegan K.F., Spencer R.W., Danley D.E., Contillo L.G., Andrews G.C.* // *FEBS Lett.* 1990. V. 262. P. 119–122.
32. *Yonerawa H., Yamada K., Uchikola T., Kaneda M.* // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1993. V. 66. P. 2653–2658.
33. *Menard R., Carmona E., Plouffe C., Bromme D., Konishi Y., Lefebvre J., Storer A.C.* // *FEBS Lett.* 1993. P. 328. P. 107–110.
34. *Netcel-Arnett S., Mallya S.K., Nagase H., Birkedal-Hausen H., Van Wart H.E.* // *Anal. Biochem.* 1991. V. 195. P. 86–92.
35. *Stack M.S., Gray R.D.* // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 4277–4281.
36. *Niedzwiecky L., Teahan J., Harrison R.K., Stein R.L.* // *Biochemistry.* 1989. V. 31. P. 12 618–12 623.
37. *Biogegrain R.A., Fehrentz J.A., Castro B., Coletti-Previero M.A.* // *C. R. Acad. Sci., Ser. 3.* 1990. V. 310. P. 465–470.
38. *Von Geldren W.T., Holleman W.H., Opgenorth T.J.* // *Peptide Res.* 1991. V. 4. P. 32–35.
39. *Handa B.K., Keech E.* // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1992. V. 40. P. 66–71.
40. *Persson A., Wilson I.B.* // *Anal. Biochem.* 1977. V. 83. P. 296–309.
41. *Karabut L.V., Shchechkin I.E., Sereyskaya A.A., Chetyrkina S.N.* *Symp. on Molecular Modelling in Genetic and Protein Engineering.* Sopron. Hungary, 1994. P. 28.
42. *Bode W., Mayr I., Baumann U., Huber R., Stone S.R., Hofsteenge J.* // *EMBO J.* 1989. V. 8. P. 3467–3475.
43. *Stubbs M.S., Bode W.* // *Thromb. Res.* 1993. V. 69. P. 1–58.
44. *Fenton J.W., Fasco M.J., Stackrow A.B., Aronson D.L., Young A.M., Finlayson J.S.* // *J. Biol. Chem.* 1977. V. 252. P. 3587–3598.

## New Donor–Acceptor Pairs for Fluorogenic Substrates with Intramolecular Fluorescence Energy Transfer for Thrombin and Trypsin

V. V. Kholodovich\*, **D. I. Kara\***, A. A. Gershkovich\*, V. K. Kibirev\*, L. V. Karabut\*,  
I. V. Klimenko\*\*, and A. I. Kornelyuk\*\*

\**Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine,  
ul. Murmanskaya 1, Kiev 94, 253660 Ukraine*

\*\**Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine*

New substrates for thrombin and trypsin are described: a fluorogenic substrate Abz-Pro-Arg-Gly-Nph (I), whose action is based on intramolecular fluorescence energy transfer, and H-D-Trp-Pro-Arg-pNA (II), which can be used both as a chromogenic substrate and as a substrate with the intramolecular fluorescence energy transfer. In substrate (I), a 4-nitrophenylhydrazide group was first used as an acceptor of excitation energy of the 2-aminobenzoyl group. The substrate is poorly hydrolyzed by thrombin ( $k_{\text{cat}}/K_m = 1.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) and is efficiently cleaved by trypsin ( $k_{\text{cat}}/K_m = 3.15 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). The hydrolysis of (II) can be monitored both spectrophotometrically, by absorbance at 405 nm, and from the increase in fluorescence at 340 nm. In the efficiency of hydrolysis with thrombin ( $k_{\text{cat}}/K_m = 3.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), compound (II) is comparable with the known chromogenic substrates for this enzyme. The proposed donor–acceptor pairs are promising in designing substrates with the intramolecular fluorescence energy transfer for a variety of proteolytic enzymes.

*Key words: thrombin, trypsin, intramolecular fluorescence energy transfer substrates, intramolecularly quenched fluorogenic substrates*