



УДК 577.152.34'135

НОВЫЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЕ СУБСТРАТЫ  
МЕТАЛЛОЭНДОПЕПТИДАЗ С ВНУТРЕННИМ ТУШЕНИЕМ  
ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИФилиппова И. Ю., Лысогогорская Е. Н., Оксенойт Е. С.,  
Троценкова Е. П., Степанов В. М.Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
химический факультет

Сочетанием химических и ферментативных методов синтеза получены *n*-нитроанилиды антрацилоилтрипептидов общей формулы  $\text{Abz-Ala-Ala-P}'_1\text{-pNa}$  ( $\text{P}'_1 = \text{Phe, Leu, Ile, Val}$ ). В структуре соединений использован принцип внутреннего тушения флуоресценции: Abz – флуорогенная группировка, pNA – группа-тушитель флуоресценции. Показано, что гидролиз соединений под действием термолитина и металлопротеиназ из *Legionella pneumophila* и *Thermoactinomyces species* проходит по связи  $\text{Ala-P}'_1$  и сопровождается возрастанием флуоресценции в 4–7 раз. Определены кинетические характеристики гидролиза субстратов термолитином. Установлено, что с помощью  $\text{Abz-Ala-Ala-Ile-pNA}$  и  $\text{Abz-Ala-Ala-Val-pNA}$  возможно определение металлоэндопептидаз в присутствии сериновых протеиназ типа субтилизина.

Металлоэндопептидазы (металлопротеиназы) представляют собой обширную группу протеолитических ферментов, продуцируемых различными микроорганизмами. К ферментам этого класса относятся также некоторые металлопротеиназы животного происхождения и интенсивно изучаемые в последнее время энкефалиназы [1, 2].

Металлопротеиназы проявляют строго эндопептидазную активность. Наиболее изученные представители этого класса ферментов – термолитин и подобные ему бациллярные протеиназы – преимущественно гидролизуют в молекулах пептидов и белков связи, образованные аминокислотами гидрофобных аминокислот, и не расщепляют связи, аналогичные пептидной (амидную, *n*-нитроанилидную,  $\beta$ -нафтиламидную и т. д. [1, 3]). В связи с этим для определения активности металлоэндопептидаз до недавнего времени либо использовали косвенные методы, позволяющие анализировать продукты ферментативного гидролиза после дополнительной обработки [4–6], либо применяли хромофоры с низкими значениями молярного коэффициента поглощения, что сказывалось на чувствительности прямых аналитических измерений [7–9].

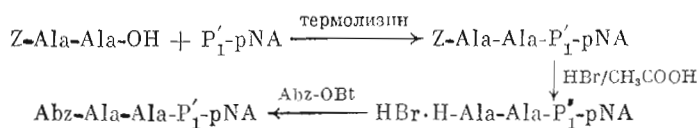
Возможность непосредственного контроля за ходом ферментативного гидролиза металлопротеиназами и повышения скорости и чувствительности методов определения их активности открывает использование субстратов с внутримолекулярным тушением флуоресценции [10–14]. Такие субстраты представляют собой тетра- или пентапептиды, содержащие в качестве группы-флуорофора данцильный или антрацилоильный остатки, а в качестве групп-тушителей флуоресценции – остатки *n*-нитробензиламина или *n*-нитрофенилаланина [12, 13]. Нами было показано, что достаточно эффективным оказывается использование в соединениях с внутренним тушением флуоресценции флуорогенной антрацилоильной группиров-

Сокращения:  $\text{P}'_1$  – аминокислотный остаток, аминокислота которого участвует в образовании пептидной связи, подвергающейся расщеплению ферментом; Abz – 2-аминобензоил (антрацилоил); pNA – *n*-нитроанилид; Nba – *n*-нитробензиламид; Z – бензилоксикарбонильная группа; BtO – бензотриазол-1-ил; DMF – диметилформамид. Все аминокислоты *L*-ряда.

ки и остатков других нитроароматических соединений — *n*-нитроанилина и 2,4-динитрофенилэтилендиамина, выполняющих роль тушителей флуоресценции [15]. Остаток *n*-нитроанилина в качестве тушителя был также успешно применен и в субстратах для хмотрепсина и трипсина [16]. В связи с этим нам представлялось целесообразным при конструировании флуорогенных субстратов с внутренним тушением флуоресценции для металлоэндопептидаз также использовать указанные выше структурные элементы.

В данной работе описано получение соединений (I) — (IV) общей формулы  $\text{Abz-Ala-Ala-P}'_1\text{-pNA}$  ( $\text{P}'_1 = \text{Phe}$  (I),  $\text{Leu}$  (II),  $\text{Ile}$  (III),  $\text{Val}$  (IV)) и исследована их применимость в качестве субстратов металлоэндопептидаз. Трипептидная структура синтезированных соединений определялась тем, что, согласно литературным данным, только для субстратов, содержащих не менее трех аминокислотных остатков, наблюдаются удовлетворительные кинетические характеристики [17, 18]. Аминокислотная последовательность соединений (I) — (IV) была выбрана нами в соответствии со специфичностью термолизина и сходных с ним металлоэндопептидаз. Следует отметить, что соединения (I) и (II), содержащие остатки фенилаланина и лейцина, могут также подвергаться расщеплению по *n*-нитроанилидной связи и сериновыми протеиназами. Использование же в положении  $\text{P}'_1$  остатков валина и изолейцина способствует большей устойчивости субстратов к действию сериновых протеиназ.

Синтез соединений (I) — (IV) проводили сочетанием химических и ферментативных методов образования пептидной связи (схема).



В соответствии с данной схемой легко получались *n*-нитроанилиды трипептидов с различными аминокислотными остатками в положении  $\text{P}'_1$ . Эффективным оказалось применение ферментативной конденсации *n*-нитроанилидов аминокислот с бензилоксикарбонилаланином по методу, предложенному ранее Л. А. Люблинской с сотр. [19]. Данные по ферментативному синтезу *n*-нитроанилидов трипептидов суммированы в табл. 1. Антранилоильный остаток вводили, используя бензотриазоловый эфир антраниловой кислоты [20], что позволило упростить синтез и повысить выход конечных соединений.

Полученные *n*-нитроанилиды антранилоилтрипептидов представляют собой устойчивые кристаллические соединения. Все вещества охарактеризованы данными аминокислотного анализа, температурами плавления, величинами удельного оптического вращения и хроматографической подвижностью в нескольких системах.

Полученные соединения гидролизовали термолизином и металлоэндопептидазами из *Legionella pneumophila* и *Thermoactinomyces species*, вы-

Таблица 1

**Ферментативный синтез *n*-нитроанилидов бензилоксикарбонилтрипептидов, исходя из Z-Ala-Ala-OH \***

| Аминокислотный компонент | Кол-во исходных компонентов, ммоль | Количество термолизина, мг | DMF, мл | 50 mM CaCl <sub>2</sub> , мл | Время реакции, ч | Выход, % |
|--------------------------|------------------------------------|----------------------------|---------|------------------------------|------------------|----------|
| H-Leu-pNA                | 5,0                                | 2,5                        | 6       | 16                           | 0,5              | 93       |
| H-Phe-pNA                | 2,0                                | 1,0                        | 0,9     | 1,8                          | 0,33             | 97       |
| HBr·Val-pNA              | 0,91                               | 2,0                        | 1,0     | 4,5                          | 17               | 73       |
| HBr·Ile-pNA              | 1,0                                | 2,0                        | 0,7     | 2,2                          | 12               | 76       |

\* Эквивалентное соотношение amino- и карбоксильного компонентов, температура реакции 4° С.

Кинетические константы гидролиза термוליзином *n*-нитроанилидов антранилоилтрипептидов  
 [S]=1–10 мкМ; [E]=2,4 нМ; 0,05 М трис-НСl-буфер, содержащий 1% DMF и 0,01 М CaCl<sub>2</sub>, рН 7,1

| Субстрат                  | $k_{cat}, c^{-1}$ | $K_m, мкМ$ | $k_{cat}/K_m, мкМ^{-1} \cdot c$ |
|---------------------------|-------------------|------------|---------------------------------|
| Abz-Ala-Ala-Phe-pNA       | 63,1±0,6          | 32,8±2,6   | 1,92±0,17                       |
| Abz-Ala-Ala-Leu-pNA       | 14,8±0,9          | 26,4±7,6   | 0,5±0,20                        |
| Abz-Ala-Ala-Ile-pNA       | 25,1±0,2          | 18,9±1,6   | 1,33±0,12                       |
| Abz-Ala-Ala-Val-pNA       | 16,7±0,7          | 33,9±9,2   | 0,49±0,15                       |
| Abz-Ala-Gly-Leu-Ala-Nba * | 283               | 140        | 2,1                             |

\* Данные из работы [11].

деленными в нашей лаборатории [21, 22] \*. Методом ТСХ было подтверждено, что продуктами расщепления являются Abz-Ala-Ala-OH и P<sub>1</sub>-pNA. Гидролиз сопровождался возрастанием флуоресценции в 4–7 раз. На примере *n*-нитроанилида антранилоил-аланил-аланил-фенилаланина было установлено, что максимальная скорость гидролиза субстратов термוליзином наблюдается при рН 7,0–7,1. В интервале концентраций 15–170 нг/мл сохранялась линейная зависимость начальной скорости гидролиза синтезированных субстратов от концентрации термוליзина. В этих условиях были определены кинетические константы, характеризующие синтезированные субстраты. Кинетические параметры гидролиза субстратов рассчитывали методом наименьших квадратов на ЭВМ по данным, полученным в координатах Лайнуивера — Берка (табл. 2).

Видно, что с наибольшей скоростью термוליзином гидролизвался Abz-Ala-Ala-Phe-pNA. Этот субстрат, а также Abz-Ala-Ala-Ile-pNA не уступают по кинетическим характеристикам одному из лучших известных в настоящее время субстратов — тетрапептиду Abz-Ala-Gly-Leu-Ala-Nba [11].

Важным достоинством флуорогенных субстратов по сравнению с хромогенными является возможность существенно понизить предел обнаружения ферментов. Флуорогенные субстраты с внутренним тушением флуоресценции, синтезированные нами, позволяют определять концентрацию термוליзина, равную  $0,8 \cdot 10^{-9}$  М, т. е. в 1000 раз меньшую, чем при использовании в качестве субстратов фурилакрилоильных производных. Кроме того, было показано, что использование Abz-Ala-Ala-Ile-pNA позволяет определять термוליзин в присутствии субтилизина: удельная активность по этому субстрату для термוליзина составляет 29 мкМ/(мин · OE<sub>280</sub>), а для субтилизина — 0,6 мкМ/(мин · OE<sub>280</sub>).

### Экспериментальная часть

Все температуры плавления даны без исправления. Гомогенность полученных соединений контролировали с помощью ТСХ на пластинках Silufol в системах *n*-бутанол — вода — пиридин — уксусная кислота, 15 : 12 : 10 : 3 (А); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 3 : 1 : 1 (Б); хлороформ — метанол, 9 : 1 (В). Оптическое вращение определяли на поляриметре Roussel Joan (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). Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре Hitachi MPF-4 (Япония), спектрофотометрию проводили на спектрофотометре Specord UV VIS (ГДР).

В работе использовали термוליзин (КФ 3.4.24.4; Serva, ФРГ), субтилизин Карлсберг (КФ 3.4.4.16; Novo, Дания), металлопротеиназы из *Legionella pneumophila* и *Thermoactinomyces species* [21, 22]. Для синтеза пептидов были использованы *n*-нитроанилид фенилаланина и *n*-нитроанилид лейцина (Олайне).

Z-Ala-Ala-Ile-pNA. К раствору 0,29 г (1 ммоль) Z-Ala-Ala-OH и 0,33 г (1 ммоль) HBr·H-Ile-pNA в 0,7 мл DMF добавляли 1 мл 1 М триэтиламина в DMF, 2,2 мл 0,05 М CaCl<sub>2</sub> (рН 8,1) до легкого помутнения раствора и 2 мг термוליзина. Через 10 мин

\* Авторы выражают признательность О. В. Мосоловой и С. В. Гулькину за предоставленные препараты ферментов.

наблюдали выделение осадка. Реакционную смесь оставляли на 12 ч при 4° С. Кристаллический осадок отфильтровывали, промывали водой, 0,1 н. HCl, водой, 3% NaHCO<sub>3</sub>, снова водой и высушивали в вакууме над щелочью. Выход 0,405 г (76%), т. пл. 237–238° С,  $[\alpha]_D^{20} -11^\circ$  (с 1, DMF),  $R_f$  0,82 (А), 0,65 (В). Аминокислотный анализ: Ala 1,85; Ile 1,0.

Аналогично из соответствующих производных были получены:

Z-Ala-Ala-Leu-pNA, выход 93%, т. пл. 211–212° С,  $[\alpha]_D^{20} -9^\circ$  (с 1; DMF),  $R_f$  0,85 (А), 0,24 (В), аминокислотный анализ: Ala 1,95; Leu 1,0.

Z-Ala-Ala-Phe-pNA, выход 97%, т. пл. 250–252° С,  $[\alpha]_D^{20} +18^\circ$  (с 1; DMF),  $R_f$  0,86 (А), 0,63 (В), аминокислотный анализ: Ala 1,89; Phe 1,0.

Z-Ala-Ala-Val-pNA, выход 73%, т. пл. 250–252° С,  $[\alpha]_D^{20} -10^\circ$  (с 1; DMF),  $R_f$  0,85 (А), 0,93 (В), аминокислотный анализ: Ala 1,85; Val 1,0.

HBr-H-Ala-Ala-Phe-pNA. К 0,28 г (0,52 ммоль) Z-Ala-Ala-Ile-pNA прибавляли 2 мл 40% бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте, перемешивали 1,5 ч и разбавляли абс. эфиром. Образовавшийся кристаллический осадок отфильтровывали, промывали абс. эфиром, сушили в вакууме над щелочью. Выход 0,25 г (99%), вещество гигроскопично,  $R_f$  0,78 (А), 0,84 (В).

Аналогично были получены:

HBr-H-Ala-Ala-Leu-pNA, выход 92%,  $R_f$  0,63 (А), 0,65 (В);

HBr-H-Ala-Ala-Phe-pNA, выход 97%,  $R_f$  0,71 (А), 0,66 (В);

HBr-H-Ala-Ala-Val-pNA, выход 97%,  $R_f$  0,68 (А), 0,71 (В).

Все полученные соединения гигроскопичны.

H-Abz-Ala-Ala-Ile-pNA. К раствору 0,5 г (1,1 ммоль) HBr-H-Ala-Ala-Ile-pNA в 5 мл DMF прибавляли 0,12 мл (1,1 ммоль) N-метилморфолина и 0,53 г (2,1 ммоль) Abz-OBt. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20° С, затем разбавляли 10 мл 0,5 М NaHCO<sub>3</sub>. Через 30 мин образовавшийся кристаллический осадок отфильтровывали, промывали 0,5 М NaHCO<sub>3</sub>, водой и сушили в вакууме над щелочью. Выход 0,48 г (89%), т. пл. 96–97° С,  $[\alpha]_D^{20} -30^\circ$  (с 1; DMF),  $R_f$  0,81 (А), 0,92 (Б), 0,90 (В). Аминокислотный анализ: Ala 2,0; Ile 1,0.

Аналогично были получены:

H-Abz-Ala-Ala-Leu-pNA, выход 60%, т. пл. 74–76° С,  $[\alpha]_D^{20} +44^\circ$  (с 1; DMF),  $R_f$  0,88 (А), 0,81 (Б), 0,90 (В). Аминокислотный анализ: Ala 1,82; Leu 1,0.

H-Abz-Ala-Ala-Phe-pNA, выход 81%, т. пл. 97–98° С,  $[\alpha]_D^{20} +22^\circ$  (с 1; DMF),  $R_f$  0,80 (А), 0,91 (Б), 0,92 (В). Аминокислотный анализ: Ala 2,19; Phe 1,0.

H-Abz-Ala-Ala-Val-pNA, выход 79%, т. пл. 122–123° С,  $[\alpha]_D^{20} +16^\circ$  (с 1; DMF),  $R_f$  0,79 (А), 0,95 (Б), 0,85 (В). Аминокислотный анализ: Ala 2,25; Val 1,0.

Измерение начальных скоростей гидролиза субстрата. 3 мл раствора субстрата в 0,05 М трис-HCl-буфере (рН 7,1), содержащем 0,01 М CaCl<sub>2</sub> и 1% DMF, помещали в термостатированную кювету (25° С) и измеряли начальную флуоресценцию. Затем включали самописец, добавляли 50 мкл раствора термолитина с концентрацией 5 мкг/мл, быстро перемешивали и регистрировали изменение флуоресценции во времени. Измерения проводили при восьми различных концентрациях субстрата в диапазоне 1–10 мкМ.

Начальные скорости гидролиза рассчитывали по формуле

$$v_0 = \frac{I_{\text{фл}}^t [\text{S}]}{I_{\text{фл}}^{100} - I_{\text{фл}}^0},$$

где  $v_0$  – начальная скорость гидролиза, мкМ/мин;  $I_{\text{фл}}^0$  – флуоресценция реакционной смеси в отсутствие фермента;  $I_{\text{фл}}^t$  – флуоресценция, наблюдаемая после гидролиза субстрата в течение времени  $t$ ;  $I_{\text{фл}}^{100}$  – флуоресценция при 100% гидролизе (измерена в отдельном опыте при инкубации 3 мл раствора субстрата с избытком фермента); [S] – концентрация субстрата, мкМ;  $t$  – время, мин.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В. К. Химия протексолиза. М.: Наука, 1983.
2. Паберит Н., Панк М., Лийдерс М., Ванаталу К. // Биохимия. 1984. Т. 49. Вып. 2. С. 275–284.
3. Holmquist B., Vallee B. // Biochemistry. 1976. V. 15. № 1. P. 401–407.
4. Ваганова Т. И., Ласовецкая Л. В., Стронгин А. Я., Люблинская Л. А., Стенанов В. М. // Биохимия. 1976. Т. 41. Вып. 12. С. 2229–2236.
5. Altmeyer J., Orłowski M. // Biochemistry. 1983. V. 23. № 3. P. 590–599.
6. Люблинская Л. А., Ласовецкая Л. В., Шехватова Г. В., Ваганова Т. И., Стенанов В. М. // Химия природ. соедин. 1976. № 1. С. 75–80.
7. Feder J. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1968. V. 32. № 2. P. 326–332.
8. Morgan G., Fruton J. // Biochemistry. 1978. V. 17. P. 3562–3568.
9. Steinbrink R. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 5. P. 2271–2276.
10. Kam C., Nichino N., Powers J. // Biochemistry. 1979. V. 18. № 14. P. 3032–3038.

11. *Nichino N., Powers J.* // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 8. P. 3482–3486.
12. *Rush R., Mitas M., Powers J., Tanaka T.* // Arch. Biochem. and Biophys. 1984. V. 231. № 2. P. 390–399.
13. *Florentin D., Sassi A., Roques B.* // Anal. Biochem. 1984. V. 141. № 1. P. 62–69.
14. *Vencill C.* // Biochemistry. 1985. V. 24. № 13. P. 3149–3157.
15. *Филиппова И. Ю., Лысогорская Е. Н., Оксенойт Е. С., Комаров Ю. Е., Степанов В. М.* // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 9. С. 1172–1180.
16. *Bratovanova E., Peikov D.* // Anal. Biochem. 1987. V. 162. № 1. P. 374–381.
17. *Morihara K.* // Eur. J. Biochem. 1970. V. 15. № 2. P. 374–380.
18. *Morihara K., Oka T.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1968. V. 30. № 2. P. 625–631.
19. *Люблинская Л. А., Воюшина Т. Л., Степанов В. М.* // Биооргани. химия. 1982. Т. 8. № 12. С. 1620–1624.
20. *Stewart T.* // Austr. J. Chem. 1983. V. 36. № 8. P. 1629–1638.
21. *Гульник С. В., Лавренова Г. И., Степанов В. М.* // Биохимия. 1987. Т. 52. № 8. С. 1387–1396.
22. *Мосолова О. В., Руденская Г. Н., Степанов В. М., Цаплина И. А., Тарасова Н. И.* // Биохимия. 1987. Т. 52. № 10. С. 1709–1715.

Поступила в редакцию  
24.IX.1987

## NEW INTRAMOLECULARLY QUENCHED FLUORESCENT SUBSTRATES FOR THE METALLOENDOPEPTIDASES

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

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

*p*-Nitroanilides of antranyloyltri-peptides of the general structure Abz-Ala-Ala-P<sub>1</sub>'-pNA (P<sub>1</sub>'=Phe, Leu, Ile, Val) containing intramolecularly quenched fluorescent groups (Abz is a fluorogenic group and pNA is a quencher of fluorescence) were prepared by combination of chemical and enzymatic methods. Thermolysin and metalloproteinases from *Legionella pneumophila* and *Thermoactinomyces species* were shown to hydrolyse Ala-P<sub>1</sub>' bond of the peptides with simultaneous 4–7 fold increase in fluorescence. Kinetic parameters for enzymatic hydrolysis of the substrates were determined. Metalloendo-peptidases can be assayed in the presence of serine proteinases (of the subtilisin type) using Abz-Ala-Ala-Ile-pNA or Abz-Ala-Ala-Val-pNA.