



УДК 577.112.6:577.152.34:135

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ АРГИНИНА – ХРОМОФОРНЫХ СУБСТРАТОВ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И КАРБОКСИПЕПТИДАЗ

© 1995 г. М. П. Юсупова, Е. К. Котлова, Е. А. Тимохина, В. М. Степанов

ГосНИИгенетика, Москва

Поступила в редакцию 18.01.94 г. После доработки 25.02.94 г.

Субтилизин 72, сорбированный на поверхности макропористого стекла, в органических растворителях катализирует конденсацию эфиров N-ацилированных пептидов с производными аргинина. Сорбированный фермент может быть использован многократно и позволяет синтезировать хромофорные субстраты металлопротеиназ и карбоксипептидаз общей формулы Dnp-Ala-Ala-Xaa-Arg-NH₂ (Xaa = Leu, Phe, Val, Ile). Металлопротеиназы гидролизуют тетрапептиды по связи Ala-Xaa с отщеплением Dnp-Ala-Ala-OH, определяемого спектрофотометрически. Хромофорные субстраты карбоксипептидаз типа В (Dnp-Ala-Ala-Xaa-Arg-OH и Dnp-Ala-Ala-Arg-OH) получают гидролизом соответствующих амидов трипсином.

Ключевые слова: ферментативный синтез, субтилизин, хромофорный субстрат, металлопротеиназа.

Специфичность бактериальных металлопротеиназ (КФ 3.4.24) определяется структурой аминокислотного остатка, занимающего Р₁'-положение в молекуле субстрата [1]. С наибольшей скоростью расщепляются связи, образованные α-аминогруппой гидрофобных аминокислот фенилаланина и лейцина, в меньшей степени – валина и изолейцина [2]. Для определения активности этих ферментов была предложена серия субстратов общей формулы Dnp-Gly-Gly-Xaa-Arg-OH, синтезированных традиционными методами пептидной химии [3]. Металлопротеиназы расщепляют связь Gly-Xaa, высвобождая при этом дипептид Dnp-Gly-Gly-OH, который может быть количественно отделен от избытка субстрата и определен спектрофотометрически. Однако такие субстраты имеют на конце свободную карбоксильную группу, что делает их уязвимыми к действию карбоксипептидаз, которые могут сопутствовать металлопротеиназам.

Нами получена серия субстратов, лишенных этого недостатка, общей формулы Dnp-Ala-Ala-Xaa-Arg-NH₂ (I), где Xaa = Leu (а), Phe (б), Val (в), Ile (г). Амидирование С-концевого остатка аргинина предотвращает его отщепление карбоксипептидазами. Другая серия субстратов – Dnp-Ala-Ala-Xaa-Arg-OH (IIа - г), а также Dnp-Ala-Ala-Arg-OH (III)

могут быть использованы для определения активности карбоксипептидаз В, N, T и их аналогов. Для получения Dnp-пептидов разработан двухстадийный ферментативный синтез. На первой стадии Dnp-Ala-Ala-OH (IV) вводят в реакцию с метиловым эфиром лейцина (а), фенилаланина (б), валина (в) или изолейцина (г) в присутствии термוליзина как катализатора (молярное отношение E : S = 1 : 10⁴), следуя методу, описанному ранее для бензилоксикарбонилпептидов аналогичной структуры [4]. Например,

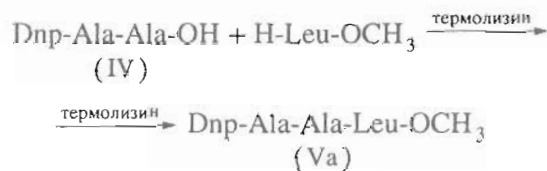


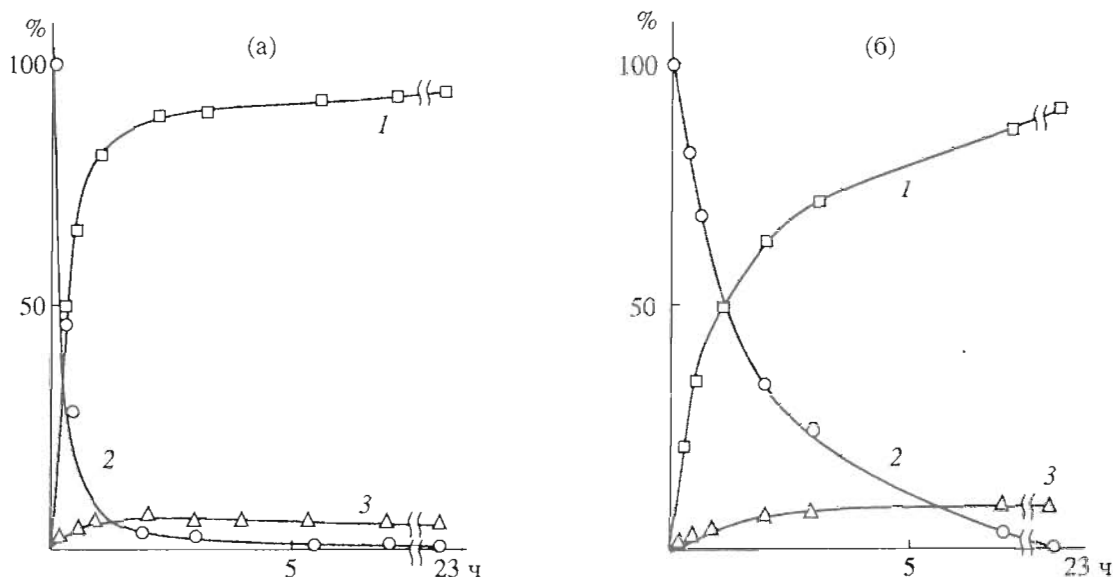
Схема 1.

Равновесие этой реакции сдвигается в сторону синтеза благодаря выпадению продукта в осадок. Выходы продуктов реакции Dnp-Ala-Ala-Xaa-OCH₃ (Va - г) составили 76% для соединений (Va) и (Vб), 73% для (Vв) и 50% для (Vг).

На следующей стадии эфиры (Va - г) в смеси DMSO и ацетонитрила, содержащей не более 0.1% воды, вводили в реакцию с амидом аргинина в присутствии субтилизина 72, сорбированного на макропористом стекле СРГ-10 [5], что обеспечивает

Сокращения: Dnp – 2,4-динитрофенил, DMSO – диметилсульфоксид. Все аминокислоты – L-ряда.

Адрес для переписки: 113545 Москва, 1-й Дорожный пр., д. 1, ГосНИИгенетика, В.М. Степанову.



ВЭЖХ-контроль синтеза пептидов Dnp-Ala-Ala-Leu-Arg-NH₂ (Ia) (а) и Dnp-Ala-Ala-Phe-Arg-NH₂ (Ib) (б). Приведены кривые накопления продуктов (Ia, б) (1), (VIa, б) (3) и расхода эфира (Va, б) (2). Условия синтеза см. в "Экспер. части" и табл. 1.

стабильность фермента в присутствии органических растворителей:

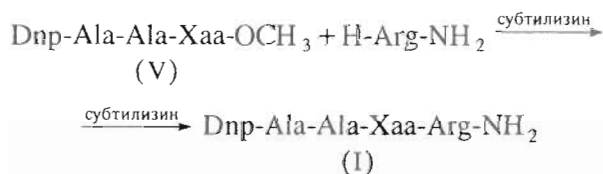


Схема 2.

Реакция между эфирами Dnp-пептидов и амидом аргинина протекает, очевидно, по схеме 3:

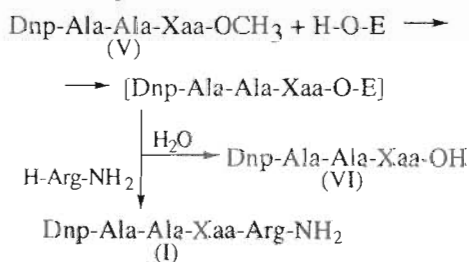


Схема 3.

Здесь H-O-E – фермент со свободной гидроксильной группой серина в активном центре.

Ускорение образования ацилфермента и направленность всего процесса в сторону образования пептидной связи обеспечивались использованием в качестве ацилирующих компонентов метиловых эфиров пептидов. Образующийся на промежуточной стадии процесса ацилфермент (схема 3) может реагировать как с аминокомпонентом, давая желаемый продукт, так и с водой, что приводит к снижению выхода основного вещества. Варьируя концентрации амида аргинина и воды в реакционной смеси, можно направить

реакцию в ту или иную сторону. Для получения высокого выхода Dnp-тетрапептида оптимален 1,5-кратный избыток аминокомпонента, поскольку не вступивший в реакцию амид аргинина легко отделяется от заметно более гидрофобного Dnp-пептида. Дальнейшее увеличение избытка аминокомпонента не вызывает заметного ускорения процесса. При эквимольном соотношении реагентов скорость накопления продуктов существенно снижается и их разделение усложняется.

Степень гидролиза ацилфермента можно понизить, уменьшая концентрацию воды в системе, т.е. используя "сухие" растворители (в нашем случае 35% DMSO и 65% ацетонитрил. Надо отметить, что в реакции помимо той воды, которая содержится в растворителях, может участвовать и вода, имеющаяся на поверхности фермента и макропористого стекла). В этих условиях амиды Dnp-тетрапептидов (Ia, б) были получены с выходом 90 - 94% (табл. 1). Гидролиз эфиров Dnp-пептидов в таких условиях незначителен, и даже после продолжительной инкубации выход Dnp-Ala-Ala-Leu-OH (VIa) составляет всего 6%, а Dnp-Ala-Ala-Phe-OH (VIб) – 9%. Вторичного гидролиза ферментом пептидного продукта не наблюдается, что также объясняется низким содержанием воды в реакционной среде. Как показано на рисунке, кривые расхода эфиров трипептидов (2) и накопления продуктов (1) практически симметричны, при этом основное количество соединения (Ia) накапливается в смеси в течение 1 - 2 ч и выход медленно приближается к 94% за сутки (рисунок, а). Кривая же накопления (Iб) (рисунок, б) отличается более пологим наклоном, и основное количество продукта образуется несколько мед-

леннее (за 3 - 4 ч). Надо отметить, что добавление в систему 1 - 2% воды резко увеличивает скорость синтеза тетрапептидов (I), по-видимому, за счет возрастания активности фермента, однако одновременно возрастает скорость гидролиза исходных эфиров (V).

По-видимому, присутствие органических растворителей не изменяет заметным образом субстратную специфичность субтилизина 72 - фермента, подобного субтилизину Carlsberg. Данные, представленные в табл. 1 и на рисунке, показывают, что в положении P_1 наиболее предпочтителен остаток лейцина, несколько хуже с участком S_1 фермента связывается остаток фенилаланина. Остатки валина и изолейцина, имеющие в боковой цепи β -разветвленные радикалы, наименее подходят для размещения в подцентре S_1 субтилизина [6 - 9]. Низким средством этих аминокислот к биокатализатору можно объяснить существенно меньшую скорость синтеза и низкие выходы соответствующих продуктов (Iв, г), которые удается повысить только путем увеличения содержания фермента в реакционной смеси. При этом, однако, процесс усложняется тем, что получающиеся производные (Iв, г) могут вступать в реакцию со второй молекулой амида аргинина, образуя необычные продукты - Dnp-Ala-Ala-Val(Ile)-Arg-Arg-NH₂. Эта реакция будет подробно рассмотрена в последующих публикациях.

В выбранных нами условиях (E : S = 1 : 500) практически не наблюдается образования амида трипептида (III) - Dnp-Ala-Ala-Arg-NH₂ (VII) из Dnp-Ala-Ala-OCH₃ (VIII) и амида аргинина (схема 4). В этом случае положение P_1 в субстрате занимает остаток аланина, который связывается с подцентром S_1 субтилизина существенно слабее объемных остатков лейцина и фенилаланина [9]. Кроме того, дипептиды имеют менее протяженный участок связывания, чем трипептиды. Однако отрицательное влияние слабого связывания исходного субстрата с ферментом на скорость реакции и в этом случае удается компенсировать увеличением содержания фермента в реакционной среде (табл. 1).

Поскольку в качестве катализатора используется фермент, сорбированный на твердом носителе, говорить о его объемной концентрации нельзя. Приводимые мольные отношения фермента и субстрата, на первый взгляд, указывают на необычно низкую эффективность катализатора, что может быть, в частности, обусловлено непродуктивной ориентацией фермента на поверхности носителя. При увеличении содержания фермента (до мольного соотношения E : S = 1 : 110) удается провести синтез трипептида (VII) в органических растворителях без добавления воды с выходом 25 - 30% за 24 ч. При этом гидролиз карбоксильного компонента составляет 4 - 5%. Добавление в

Таблица 1. Синтез Dnp-пептидов Dnp-Ala-Ala-Xaa-Arg-NH₂ (Ia - г), катализируемый субтилизинном 72 (см. схему 3)

(Мольное соотношение E : S = 1 : 500 в смеси DMSO-ацетонитрил 35 : 65, содержание воды < 0.1%)

Xaa в пептиде	Время реакции, ч	Содержание в смеси, %		
		(I)	(V)	(VI)
Leu (a)	23	94	0	6
Phe (б)	23	90	1	9
Val (в)	450	33	62	5
Val* (в)	48	50	31	8
Ile (г)	96	10	86.3	3.7
Ile*	66	26.6	57.6	3.3
- **	48	79.2	7.8	13

* Мольное соотношение E : S = 1 : 150.

** Мольное соотношение E : S = 1 : 110; содержание воды 2%.

реакционную смесь 2% воды приводит к 70% выходу соединения (VII) и образованию 10 - 12% Dnp-Ala-Ala-OH (IV):

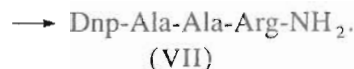
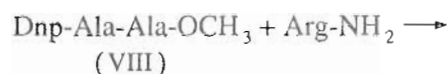


Схема 4.

Очевидно, введение небольшого количества воды в реакционную среду позволяет заметно повысить эффективность сорбированного на пористом носителе фермента, вследствие чего скорость накопления продуктов синтеза возрастает в 2 раза.

Сорбированный на макропористом стекле субтилизин достаточно стабилен, если органические растворители содержат 1 - 3% воды. В таких условиях с одним и тем же препаратом сорбированного субтилизина можно провести не менее девяти циклов синтеза без существенного снижения выхода (например, выход тетрапептида (Ia) в девятом цикле составлял 74% против 86% в первом). Однако если проводить синтез соединения (Ia) в безводных растворителях с повторным использованием одного и того же препарата сорбированного субтилизина, то уже в третьем цикле выход продукта в синтезе не превышает 40% и не возрастает при увеличении продолжительности реакции. Вероятно, при контакте фермента, сорбированного на макропористом стекле, со свежими порциями растворителей происходит связывание ими воды, гидратирующей поверхность носителя и фермента, что приводит к быстрой потере активности субтилизина. Присутствие 1 - 3% воды в реакционной среде увеличивает также скорость реакции, катализируемой ферментом, что позволяет

Таблица 2. Препаративный синтез* Dnp-Ala-Ala-Arg-NH₂ (VII) путем многократного использования субтилизина 72, сорбированного на CPG-10

№	Время синтеза, ч	Содержание в смеси, %		
		(VII)	(IV)	(VIII)
1	24	73.8	9.8	16.5
	42	83.5	12.4	4.1
2	47	81.4	15.8	3
3	72	82.8	15.3	0.8
4	48	74.3	17.7	7.8
5	48	74.7	15.5	10
6	96	81.6	12.9	5.6
7	72	78.2	10.6	11.2
8	72	67.7	10.3	22.0
9	96	73.6	11.3	15.0
	120	77.7	12.0	9.7

* Условия проведения реакции: [(VIII)] = 74.8 мМ, [Arg-NH₂] = 112 мМ, DMSO – ацетонитрил, 35 : 65, [вода] = 2%; мольное соотношение E : S = 1 : 110. Смесь анализировалась ВЭЖХ.

сократить количество используемого катализатора. Например, в препаративном синтезе соединения (Ia) использовалось в 4 раза меньше субтилизина, чем это следовало из аналитических опытов. Аналогично с многократным использованием одного и того же препарата фермента были синтезированы соединения (Iб) и (VII) (см. табл. 2).

Dnp-пептиды со свободной карбоксильной группой были получены гидролизом соответствующих амидов Dnp-пептидов (Ia - г) и (III) трипсином (при pH 7 - 8), который происходит количественно и без расщепления пептидных связей.

Синтезированные субстраты были использованы нами ранее для исследования субстратной специфичности нейтральной металлопротеиназы *Bacillus mesentericus* В-313. Было показано [10], что отношение k_{cat}/K_m для амидов Dnp-пептидов приблизительно в 2.5 - 3 раза выше, чем для соответствующих субстратов со свободной карбоксильной группой. Очевидно, амидная группа на С-конце пептидного субстрата способствует его лучшему связыванию в активном центре фермента. Изучение субстратной специфичности нейтральной металлопротеиназы *B. thermoproteolyticus* (термолизина) выявляет явное предпочтение фермента к Dnp-пептидам, содержащим остатки фенилаланина и лейцина в P₁-положении субстрата. Отношение k_{cat}/K_m для указанных пептидов в 15 - 12 раз превышает соответствующее отношение для валинсодержащего субстрата. Эти данные хорошо согласуются с результатами, полученными при синтезе эфиров Dnp-пептидов, катализируемом металлопротеиназами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы кристаллический термолизин, трипсин и макропористое стекло марки CPG-10 (Serva, ФРГ), диметилсульфоксид, содержащий не более 0.1% воды, и ацетонитрил, содержащий не более 0.05% воды (Merck, ФРГ). Субтилизин 72 выделен в нашей лаборатории [11]. Гомогенность полученных соединений подтверждали высокоэффективной жидкостной хроматографией на приборе Gilson 704, используя колонку Ultrasphere ODS (Beckman); растворы для хроматографии (приготовленные на обработанной ультрафиолетом бидистиллированной воде) содержали трифторуксусную кислоту и триэтиламин (по 0.05%), метанол (5% для раствора А и 90% для раствора Б); пептиды разделяли в линейном градиенте концентрации раствора Б 30 - 70%, добавляемого в раствор А (1 - 15 мин); для валинсодержащих пептидов градиент Б 15 - 60% (1 - 20 мин); трипептиды, содержащие аргинин, анализировали в линейном градиенте Б 15 - 50% (1 - 15 мин). Детектирование проводили при 360 нм. Молярный коэффициент поглощения практически не зависит от структуры пептида. ТСХ на пластинках Silufol вели в системе *n*-бутанол-вода-пиридин-уксусная кислота (10 : 15 : 12 : 3), проявление раствором нингидрина или Cl₂/KI. После кислотного гидролиза в стандартных условиях (5.7 н. HCl, 105°C, 24 - 72 ч) гидролизаты анализировали на автоматическом аминокислотном анализаторе BC-200 (ФРГ) или Biotronik LC 5001 (ФРГ).

Катализатор – субтилизин 72, сорбированный на CPG-10, – получали по методу [5].

Arg-NH₂ получали из Arg-OCH₃ по методу [12], Dnp-Ala-Ala-OH (IV) – по методу [13], Dnp-Ala-Ala-OCH₃ (VIII) – этерификацией Dnp-Ala-Ala-OH [14].

Dnp-Ala-Ala-Leu-OCH₃ (Va). К раствору 1.63 г (5 ммоль) соединения (IV) в 2.5 мл воды и 3 мл (6 ммоль) 2 М NaOH прибавляли 1.14 г (6.25 ммоль) Leu-OCH₃ · HCl и после полного растворения доводили pH до 7.0, добавляя 1 мл (2 ммоль) 2 М NaOH; затем вносили 17 мг термолизина и перемешивали при 20°C. Через 20 мин появлялся осадок, который постепенно заполнял весь объем смеси. Через 18 ч осадок переносили на фильтр, отжимали, растворяли в 40 мл уксусной кислоты и осаждали 280 мл воды, через 16 ч (4°C) образовавшийся кристаллический осадок переносили на фильтр, промывали водой (15 мл × 3) и сушили над KOH. Выход 76%. Аналогично получали (Vб); выход 76%.

Dnp-Ala-Ala-Val-OCH₃ (Vв) получили, как и соединение (Va), увеличив количество термолизина в 3 раза; выход 73%. Аналогично получили (Vг); выход 52%.

Dnp-Ala-Ala-Leu-Arg-NH₂ (Ia). В смеси 4 мл DMSO, 0.33 мл воды и 0.65 мл триэтиламина растворяли 292 мг (1.2 ммоль) Arg-NH₂ · 2HCl,

прибавляли 362 мг (0.8 ммоль) соединения (Va) и 7 мл ацетонитрила. После полного растворения пептида в смесь вносили 250 мг CPG-10, содержащего 12 мг субтилизина 72, встряхивали на качалке 24 ч при 20°C. Выход (Ia) составляет не менее 80%. После окончания реакции катализатор отделяли на фильтре, промывали смесью ацетонитрил–DMSO–вода, 63 : 34 : 3 (промытый катализатор использовали в повторных синтезах). Фильтраты подкисляли 6 М HCl (0.8 мл), упаривали ацетонитрил, остаток растворяли в 250 мл воды, экстрагировали этилацетатом (150 мл × 3), *n*-бутанолом, насыщенным водой (200 мл × 4). Бутанольный слой промывали водой (25 мл × 4) и упаривали досуха под вакуумом. Остаток растворяли в 6 мл метанола и осаждали 42 мл эфира. Кристаллы продукта переносили на фильтр, промывали эфиром и сушили над KOH. Выход (Ia) 72.4%; время удерживания 9.3 мин, R_f 0.65.

Аналогично получили Dnp-Ala-Ala-Phe-Arg-NH₂ (Ib) (при увеличении количества катализатора в 2 раза и содержании воды в реакционной смеси 2%); выход 71.5%; время удерживания 9.6 мин, R_f 0.66, и Dnp-Ala-Ala-Arg-NH₂ (VII) (катализатор – 1 г CPG-10/193 мг субтилизина, 2% воды, время реакции 48 ч); выход 67.5%; время удерживания 6.8 мин, R_f 0.66.

Dnp-Ala-Ala-Val-Arg-NH₂ (Iv). 147 мг (0.6 ммоль) Arg-NH₂ · 2HCl растворяли в 6.3 мл DMSO и 0.3 мл триэтиламина, прибавляли 175 мг (0.4 ммоль) соединения (Vv) и 11.7 мл ацетонитрила. После полного растворения пептида вносили 400 мг CPG-10, содержащего 76.8 мг субтилизина 72, и встряхивали смесь на качалке при 20°C 3 сут. Выход (Iv) составил 50%. После окончания реакции катализатор отделяли на фильтре, промывали смесью DMSO–ацетонитрил, 35 : 65. Фильтраты объединяли, подкисляли 0.8 мл 6 М HCl и упаривали в вакууме. К остатку прибавляли 100 мл воды и экстрагировали этилацетатом (50 мл × 3), затем насыщенным водой *n*-бутанолом (50 мл × 6). Бутанольный слой промывали водой (5 мл × 4) и упаривали досуха. Остаток растворяли в 10 мл метанола и осаждали продукт 70 мл эфира. Кристаллы отделяли на фильтре, промывали эфиром и сушили над KOH. Выход (Iv) 40%; время удерживания 12 мин, R_f 0.62.

Dnp-Ala-Ala-Leu-Arg-OH (IIa). 234 мг (0.5 ммоль) соединения (Ia) растворяли в 60 мл воды, доводили pH до 8 добавлением 0.5 М NaOH и вносили 11 мг трипсина, перемешивали 3 ч (30°C), подкисляли 6 М HCl до pH 3.0 и экстрагировали *n*-бутанолом (200 мл × 3). Бутанольный слой промывали водой (15 мл × 4) и упаривали под вакуумом. Сухой остаток растворяли в 6 мл метанола и осаждали 42 мл эфира. Кристаллы продукта переносили на фильтр, промывали эфиром и сушили

над KOH. Выход (IIa) 80%; время удерживания 9.9 мин, R_f 0.62.

Dnp-Ala-Ala-Phe-Arg-OH (IIb). Соединение (Ib) синтезировали как описано выше. Катализатор отделяли и промывали смесью DMSO–ацетонитрил–вода, 34 : 64 : 2. Фильтраты объединяли, подкисляли 1 мл 6 М HCl и отгоняли ацетонитрил. Остаток растворяли в 250 мл воды и экстрагировали этилацетатом (120 мл × 3). К водной фазе прибавляли 0.5 М NaOH до pH 7, вносили 3 мг трипсина и перемешивали 3 ч при 33°C. Гидролизат подкисляли 6 М HCl до pH 3 и экстрагировали *n*-бутанолом, насыщенным водой (150 мл × 4). Бутанольный слой промывали водой (20 мл × 4) и упаривали под вакуумом. Сухой остаток растворяли в 5 мл метанола и осаждали 50 мл эфира. Кристаллы отделяли на фильтре, промывали эфиром и сушили над KOH. Выход (IIb) 85%; время удерживания 10.4 мин, R_f 0.63.

Dnp-Ala-Ala-Val-Arg-OH (IIv). Соединение (Iv) синтезировали как описано выше. После отделения катализатора фильтраты объединяли, подкисляли 0.8 мл 6 М HCl и осаждали эфиром. Осадок растворяли в 100 мл воды, 0.5 М NaOH доводили pH до 7 и вносили 2 мг трипсина. Перемешивали 3 ч при 33°C, подкисляли 6 М HCl до pH 3 и экстрагировали 50 мл этилацетата и насыщенным водой *n*-бутанолом (100 мл × 4). Бутанольный слой промывали водой (5 мл × 4) и упаривали досуха. Остаток растворяли в 5 мл метанола и осаждали 35 - 40 мл эфира. Кристаллы продукта отделяли на фильтре, промывали эфиром и сушили над KOH. Выход (IIv) 57%; время удерживания 13.2 мин, R_f 0.59.

Dnp-Ala-Ala-Ile-Arg-OH (IIr). К раствору 394 мг (1.6 ммоль) Arg-NH₂ · 2HCl в смеси 7 мл DMSO и 0.7 мл триэтиламина прибавляли 322 мг (0.8 ммоль) соединения (Vg) в 12.3 мл ацетонитрила. После полного растворения пептида вносили 900 мг CPG-10, содержащего 173 мг субтилизина 72. Смесь встряхивали на качалке 7 сут при 20°C. При этом суммарный выход соединений (Iг) и Dnp-Ala-Ala-Ile-Arg-Arg-NH₂ составил 63%. После окончания реакции катализатор отделяли на фильтре и промывали смесью DMSO–ацетонитрил, 35 : 65. Фильтраты подкисляли 6 М HCl и отгоняли ацетонитрил. Остаток растворяли в 300 мл воды и экстрагировали этилацетатом (150 мл × 3). К водной фазе прибавляли 0.5 М NaOH до pH 7, вносили 5 мг трипсина и перемешивали 2 ч при 33°C, подкисляли 6 М HCl до pH 3 и экстрагировали насыщенным водой *n*-бутанолом (200 мл × 5). Бутанольный слой промывали водой (20 мл × 5) и упаривали досуха. Остаток растворяли в 5 мл метанола и осаждали продукт 35 мл эфира. Кристаллы отделяли на фильтре, промывали эфиром и сушили над KOH. Выход (IIr) 51.1%; время удерживания 8.7 мин, R_f 0.62.

Dnp-Ala-Ala-Arg-OH (III). Синтезировали соединение (VII), отделяли катализатор, подкисляли фильтрат, отгоняли ацетонитрил, как описано выше. Остаток растворяли в 150 мл воды и экстрагировали этилацетатом (50 мл × 4). Водный слой подщелачивали 0.5 М NaOH до pH 7.1, вносили 2 мг трипсина, перемешивали 2 ч при 32°C, подкисляли 6 М HCl до pH 3 и экстрагировали насыщенным водным *n*-бутанолом (150 мл × 4). Бутанольный слой промывали водой (5 мл × 4) и упаривали досуха. Остаток растворяли в 5 мл метанола и осаждали 40 - 45 мл эфира. Кристаллы отделяли на фильтре, промывали эфиром и сушили над КОН. Выход (III) 63.3%, время удерживания 7.6 мин, R_f 0.54.

Состав синтезированных соединений (Ia - в), (IIa - г), (III) и (VII) подтвержден аминокислотным анализом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Schechter I., Berger A.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1967. V. 27. № 1. P. 157.
2. *Morihara K., Tsuzuki H.* // Arch. Biochem. and Biophys. 1971. V. 146. № 1. P. 291 - 296.
3. *Люблинская Л.А., Ваганова Т.И., Остерман А.Л., Чикиндас С.Е., Степанов В.М.* // Биоорган. химия. 1986. Т. 13. № 10. С. 1331 - 1337.
4. *Люблинская Л.А., Бойцова С.Е., Степанов В.М.* // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 10. С. 1301 - 1305.
5. *Reslow M., Adlercreutz P., Mattiasen B.* // Eur. J. Biochem. 1988. V. 177. P. 313 - 318.
6. *Гололобов М.Ю., Морозова И.П., Воюшина Т.Л., Тимохина Е.А., Степанов В.М.* // Биохимия. 1991. Т. 56. № 2. С. 230 - 239.
7. *Takeuchi Y., Noguch S., Satou Y., Kojima S., Kumagai I., Miura K., Nakamura K.T., Mitsui Y.* // Protein Engng. 1991. V. 4. № 5. P. 501 - 508.
8. *Bech L.M., Sorensen S.B., Breddam K.* // Eur. J. Biochem. 1992. V. 209. P. 869 - 874.
9. *Gron H., Meldal M., Breddam K.* // Biochemistry. 1992. V. 31. № 26. P. 6011 - 6018.
10. *Морозова И.П., Юсупова М.П., Гололобов М.Ю., Королькова Н.К., Ходова О.М., Степанов В.М.* // Биохимия. 1993. Т. 58. № 9. С. 1420 - 1429.
11. *Гололобов М.Ю., Морозова И.П., Степанов В.М.* // Биохимия. 1991. Т. 56. № 1. С. 33 - 40.
12. *Гринштейн Дж., Виниц М.* Химия аминокислот и пептидов: Пер. с англ. М.: Мир, 1965. С. 624.
13. *Герикович А.А., Кибирев В.К.* Синтез пептидов. Реагенты и методы. Киев: Наук. думка, 1987. С. 171.
14. *Loudfoot J.H., Kruger J.E.* // Can. J. Chem. 1963. V. 41. № 10. P. 2462 - 2463.

Enzymatic Synthesis of Peptides of Arginine – Chromophore Substrates of Metalloproteinases and Carboxypeptidases

M. P. Yusupova, E. K. Kotlova, E. A. Timokhina, and V. M. Stepanov

GosMlgenetika, Moscow, Pervyi Dorozhnyi proezd, 1, 113545 Russia

Abstract – Subtilisin 72 sorbed on the surface of macroporous glass catalyzes a condensation of the esters of *N*-acylated peptides with arginine derivatives in organic solvents. The sorbed enzyme can be used repeatedly, which makes it possible to synthesize the chromophore substrates of metalloproteinases and carboxypeptidases of the general formula Dnp-Ala-Ala-Xaa-Arg-NH₂ (Xaa = Leu, Phe, Val, Ile). In tetrapeptides, metalloproteinases hydrolyze the Ala-Xaa bond with the removal of Dnp-Ala-Ala-OH, which can be determined spectrophotometrically. The chromophore substrates of carboxypeptidases of the B type (Dnp-Ala-Ala-Xaa-Arg-OH and Dnp-Ala-Ala-Arg-OH) are obtained by hydrolysis of the corresponding amides by trypsin.

Key words: enzymatic synthesis, subtilisin, chromophore substrate, metalloproteinase.