



УДК 577.112.6:577.152.342*31

СИНТЕЗ НОВЫХ ХРОМОГЕННЫХ СУБСТРАТОВ ДЛЯ АСПАРТИЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ

© 1998 г. О. В. Литвинова, Г. Н. Баландина[#], В. М. СтепановМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
119899, Москва, В-234

Поступила в редакцию 11.07.97 г. Принята к печати 25.08.97 г.

Разработан метод синтеза новых хромогенных субстратов аспартильных протеиназ общей формулы Dnp-Ala-Xaa-Phe-Phe-Ala-Arg-NH₂, где Xaa = Ala или Ser. Схема синтеза включает в себя химические и ферментативные методы, в том числе конденсацию трипептидов в органической среде с использованием пепсина, сорбированного на целите. Изучены зависимости эффективности синтеза в присутствии пепсина от типа органического растворителя, времени реакции, содержания и ионной силы буфера, добавляемого в реакционную смесь и используемого при нанесении пепсина на целит.

Ключевые слова: аспартильная протеиназа, пептид, ферментативный синтез, хромогенный субстрат.

Цель нашей работы – развитие ферментативного пептидного синтеза с участием пепсина в органических растворителях с малым содержанием воды, а также изучение некоторых закономерностей конденсации, протекающей в присутствии этого фермента, на примере синтеза хромогенных субстратов аспартильных протеиназ Dnp-Ala-Xaa-Phe-Phe-Ala-Arg-NH₂, где Xaa = Ala (пептид (I)) или Ser (пептид (II)). Аспартильные протеиназы расщепляют в этих субстратах связь Phe-Phe, высвобождая трипептид Dnp-Ala-Xaa-Phe-OH, который может быть отделен от нерасщепленного субстрата и C-концевого трипептида при помощи ионообменной хроматографии и определен спектрофотометрически.

Исследование субстратной специфичности пепсина и химозина на пептидах показало, что фермент-субстратное взаимодействие зависит как от длины пептидной цепи субстрата, так и от характера остатков аминокислот, окружающих разрываемую связь [1, 2]. Поскольку активный центр аспартильных протеиназ имеет протяженный характер, субстрат должен содержать как минимум шесть аминокислотных остатков, по три с каждой стороны от разрываемой связи. Специфичность аспартильных протеиназ определяется главным образом структурой аминокислотных остатков, занимающих P₁- и P'₁-положения в молекуле субстрата [3]. Как в реакциях гидролиза, так и в реакциях синтеза наиболее предпочти-

тельны для этих ферментов в положениях P₁ и P'₁ гидрофобные, особенно ароматические, аминокислоты [2, 4]. Специфичности S₂- и S'₂-подцентров связывания аспартильных протеиназ соответствуют аминокислотные остатки с полярными или небольшими алифатическими боковыми цепями [5]. Меньше влияет на связывание природа аминокислотных остатков, занимающих положения S₃ и S'₃ активного центра ферментов, хотя известно, что для аспартильных протеиназ в положении P₃ благоприятны остатки таких аминокислот, как Ala, Val [6–8]. Таким образом, предлагаемые нами гексапептиды по своему строению соответствуют протяженности участка связывания и специфичности активного центра аспартильных протеиназ.

Стратегия синтеза субстратов основывалась на комбинации химических и ферментативных методов синтеза (схема). Так, производные аминокислот, дипептиды и Dnp-Ala-Ser-Phe-OMe были синтезированы традиционными методами пептидной химии. Для сочетания Dnp-Ala-Ala-OH и H-Phe-OMe был использован термолизин. Dnp-пептиды со свободной карбоксильной группой получали гидролизом их метиловых эфиров, катализируемым α-химотрипсином (при pH 8.2), который проходит количественно и не затрагивает пептидных связей. Амид трипептида Z-Phe-Ala-Arg-NH₂ был синтезирован в органической среде в присутствии сериновой протеиназы *Bacillus subtilis*, шт. 72 (субтилизин 72), сорбированной на макропористом стекле (см. схему).

Поскольку цель нашей работы – изучение закономерностей, характеризующих процесс обра-

Сокращения: Dnp – 2,4-динитрофенил, TFA – трифторуксусная кислота. Все аминокислоты – L-ряда.

[#]Автор для переписки (тел.: (095) 939-55-41, факс: (095) 939-31-81).

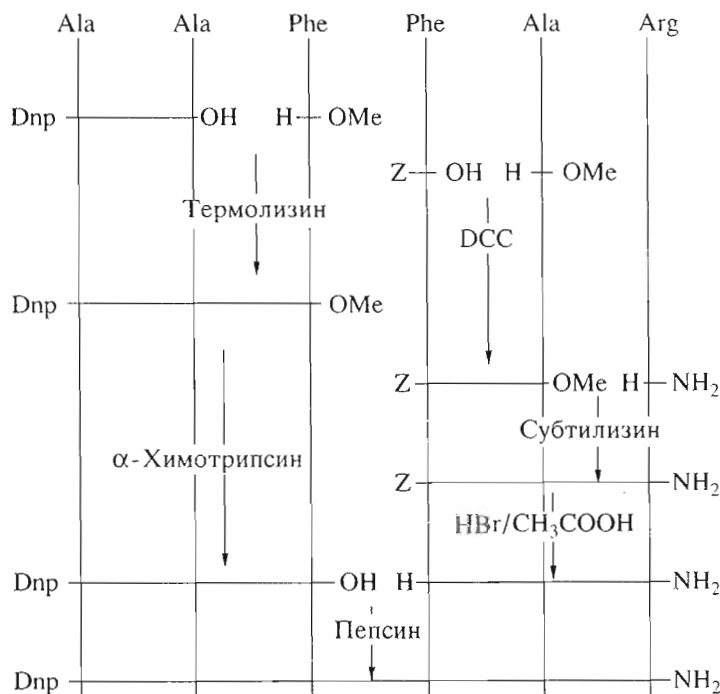


Схема синтеза пептида (I).

зования пептидной связи в присутствии пепсина, особое внимание было уделено последней стадии синтеза – ферментативному сочетанию двух трипептидов (см. схему).

Проведение реакции ферментативного синтеза в органической среде имеет ряд преимуществ по сравнению с синтезом в водных растворах: возможность более глубокого сдвига равновесия за счет малого содержания воды в системе; увеличение растворимости гидрофобных субстратов; легкость отделения фермента от продуктов синтеза. В нашем случае попытки синтезировать гексапептиды в водно-органической среде (содержание воды более 50%) не дали положительных результатов вследствие образования исходными трипептидами гидрофобной соли и их выведения таким образом из сферы реакции. Можно было предполагать, что ограничение в растворимости будет преодолено при проведении синтеза в органических растворителях в присутствии пепсина, осажденного на поверхности носителя.

Ферментативный катализатор готовили по методике [9] наслаиванием на целит раствора пепсина в цитратном буфере, pH 4.5, с последующим высушиванием. Как было показано [9], сорбированный таким образом пепсин сохраняет свою протеолитическую активность. Фермент, смытый с носителя при суспендировании катализатора в 25 мМ цитратном буфере, pH 4.5, показывал ту же активность, что и до сорбции на целите. В выбранных условиях реакции пепсин удержи-

вался носителем, будучи нерастворимым в органической фазе.

Изучалась зависимость выхода гексапептидов от времени синтеза в системах разных органических растворителей (рис. 1). Синтез гексапептидов проводили в смесях DMF–ацетонитрил, ацетонитрил–*n*-бутанол, DMF–этилацетат с различным соотношением компонентов. Образование продукта происходило во всех случаях, но лучший результат (выход пептида (I) 43%, пептида (II) 50%) был получен в смеси DMF – 25 мМ цитратный буфер (pH 4.5) – ацетонитрил, 17 : 8 : 75. При проведении синтеза в тех же растворителях, но с соотношением 8 : 4 : 88 равновесный выход был невысоким (пептид (I) – 20%, пептид (II) – 28%), но достигался за 1 ч. В остальных случаях накопление продукта происходило значительно медленнее, кривая синтеза выходила на плато через 24 ч. Активность фермента, смытого с носителя через 24 ч проведения синтеза, составляла 94% активности нанесенного фермента.

На ход реакции влияло количество солей буфера, сорбированных на поверхности носителя. Мы варьировали содержание солей в катализаторе, нанося на целит одинаковое количество пепсина в одинаковых объемах цитратного буфера, pH 4.5, с различной концентрацией, и таким образом подобрали оптимальную концентрацию буфера для приготовления катализатора – 0.5 М (рис. 2). Если в качестве катализатора использовался фермент, нанесенный на целит в 0.5 или 1 М буфере, при молярном соотношении субстратов и

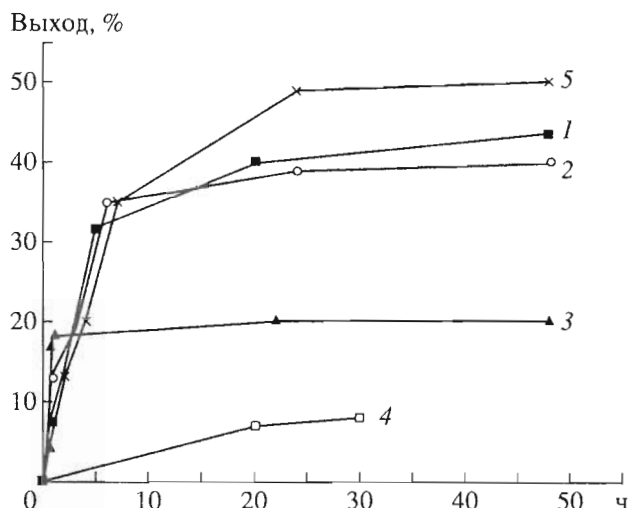


Рис. 1. Влияние состава реакционной смеси на выход гексапептидов. Приведены кривые накопления пептида (I) в системах DMF (17%) – буфер (8%) – CH₃CN (1), BuOH (80%) – буфер (4%) – CH₃CN (2), DMF (8%) – буфер (4%) – CH₃CN (3), DMF (8%) – буфер (4%) – этилацетат (4) и пептида (II) в системе DMF (17%) – буфер (8%) – CH₃CN (5). [S] : [E] 10000 : 1. Остальные условия см. в “Экспер. части”.

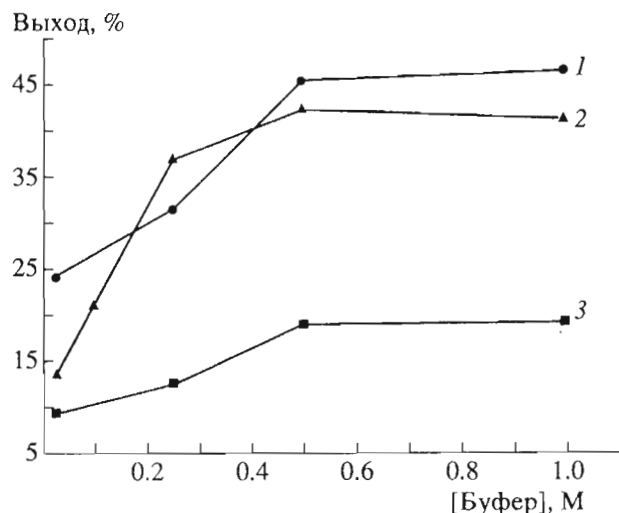


Рис. 2. Зависимость выхода пептида (I) от концентрации буфера, в котором сорбировался пепсин. Приведены выходы синтеза продукта в CH₃CN, содержащем 17% DMF, 8% буфера (1), 80% BuOH, 4% буфера (2), 8% DMF, 4% буфера (3). [S] : [E] 10000 : 1, время реакции 24 ч. Остальные условия см. в “Экспер. части”.

фермента 10000 : 1, кривая накопления продукта выходила на плато через 24 ч. Если же пепсин наносился на целит в буферах с меньшей ионной силой, равновесный выход продукта в течение суток не достигался.

Ионная сила буфера, добавляемого в реакционную смесь, также влияет на протекание синтеза. Концентрацию буфера варьировали от 0 до 0.5 М. Наилучший результат был получен при введении в реакционную смесь 25 мМ цитратного буфера, рН 4.5 (далее – просто буфер).

Ранее было показано, что введение небольшого количества воды (2%) в органическую среду позволяет заметно повысить эффективность сорбированного на носителе фермента [10]. Мы исследовали зависимость выхода гексапептидов от содержания (об. %) буфера в реакционной смеси (рис. 3). Оптимальной системой для синтеза гексапептидов оказалась смесь, содержащая 17% DMF, 8% буфера и 75% ацетонитрила.

Была показана принципиальная возможность использования синтезированных гексапептидов в качестве субстратов пепсина и химозина. Под действием этих протеиназ происходит расщепление единственной пептидной связи – связи между остатками фенилаланина. Для определения активности аспартильных протеиназ применили методику, аналогичную используемой для определения активности металлопротеиназ [11]. Степень гидролиза субстратов определяли после разделения гидролизатов на SP-сефадексе по величине оптического поглощения несорбирующе-

гося Dnp-содержащего трипептида в элюате при длине волны 360 нм. При рН 4.4 гидролиз гексапептидов в течение 10 мин происходит на 30% при молярном соотношении субстратов и фермента 1.1×10^4 : 1 для пепсина и 2×10^3 : 1 для химозина. В случае проведения гидролиза при рН 3.6 эти соотношения составляют 2.4×10^4 : 1 и 4×10^3 : 1 соответственно.

В дальнейшем предполагается детальная разработка методики определения активности аспартильных протеиназ по расщеплению синтезированных Dnp-Ala-Ala-Phe-Phe-Ala-Arg-NH₂ и Dnp-Ala-Ser-Phe-Phe-Ala-Arg-NH₂, а также определение кинетических характеристик этих субстратов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы кристаллический термолизин (КФ 3.4.24.4), α-химотрипсин (КФ 3.4.21.1), макропористое стекло марки СРG-10, целит 535 (Serva, Германия), DMSO, ацетонитрил (Merck, Германия). Субтилизин 72 (КФ 3.4.21.14) выделен нами по методике [12], препарат пепсина свиный (КФ 3.4.23.1) очищен по методике [13]. Использовались диметилформамид и уксусная кислота ос. ч. (Lecbiopharm, Россия), остальные реактивы марки х. ч. (“Реахим”, Россия). ТСХ проводили на пластинках Silufol в системах: *n*-бутанол–пиридин–вода–уксусная кислота (15 : 20 : 3 : 10) (1), метанол–хлороформ (1 : 9) (2), *n*-бутанол–уксусная кислота–вода (4 : 1 : 5) (3) и бензол–ацетон–уксусная кислота (100 : 50 : 2) (4); проявляли рас-

твором нингидрина или Cl_2/KI . Реакционные смеси при синтезе гексапептидов анализировали после разделения электрофорезом на хроматографической бумаге в системе муравьиная кислота – уксусная кислота – вода – спирт (1 : 1 : 1 : 1) по поглощению элюатов при 360 нм.

Аминокислотный анализ выполняли на автоматическом анализаторе Hitachi-835 (Япония) после кислотного гидролиза 5.7 М HCl при 105° С в течение 24 ч.

Обращенно-фазовую ВЭЖХ осуществляли на приборе Gilson 704 (Франция) на колонке (4.6 × 250 мм) Ultrasphere ODS (Beckman, США). Для хроматографирования использовали линейные градиенты концентрации ацетонитрила в 0.1% CF_3COOH : от 30 до 60% за 15 мин (1) и от 0 до 80% за 36 мин (2). Скорость элюции 1 мл/мин. Детекция при 215 и 280 нм.

Метилловые эфиры аминокислот получали по методу [14], H-Arg-NH₂ был синтезирован из H-Arg-OMe по методу [15].

Dnp-Ala-Ala-OH. К нагретому до 40° С раствору 2 г (12.5 ммоль) H-Ala-Ala-OH в 44 мл 15% $NaHCO_3$ при постоянном перемешивании прибавили по каплям раствор 2 г (12.5 ммоль) 2,4-динитрофторбензола в 10 мл этанола. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 40° С и оставили на сутки при комнатной температуре. Суспензию подкислили 6 М HCl до pH 5.0 и оставили на ночь в холодильнике. Осадок отфильтровали, растворили в 20 мл уксусной кислоты и осадили 200 мл воды. Через 18 ч (5° С) образовавшийся кристаллический осадок перенесли на фильтр, промыли холодной водой (3 × 10 мл), высушили в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 . Выход 3.36 г (84%), т. пл. 105° С, R_{f1} 0.64, R_{f2} 0.58, R_{f3} 0.8, время удерживания 3 (1) и 19.4 мин (2).

Dnp-Ala-OH. Синтез проводили по описанной выше методике. В реакцию вводили 2 г (22.5 ммоль) H-Ala-OH и 4.16 г (22.5 ммоль) 2,4-динитрофторбензола. Выход 4.4 г (76%), R_{f3} 0.91, R_{f4} 0.69, время удерживания 18.9 мин (2).

Z-Phe-Ala-OMe. К раствору 2.85 г (9.5 ммоль) Z-Phe-OH в 10 мл абсолютного этилацетата прибавили 1.5 г (10.7 ммоль) HCl · Ala-OMe и 1.5 мл (10.7 ммоль) абсолютного триэтиламина. Суспензию охладили до 0° С и прибавили раствор 2.67 г (13 ммоль) DCC в 5 мл абсолютного этилацетата. Реакцию вели при перемешивании 24 ч. Отфильтровали дициклогексилмочевину, фильтрат промыли 0.5 М HCl (3 × 4 мл), 3% $NaHCO_3$ (3 × 3 мл) и водой (3 × 4 мл), сушили 10 мин над $MgSO_4$. Отфильтровали осушитель и упарили этилацетат в вакууме. Масло кристаллизовали под абсолютным эфиром. Белый кристаллический осадок отфильтровали, промыли абсолютным эфиром, высушили на воздухе. Выход 1.9 г (52%), т. пл. 158° С, R_{f1} 0.83, R_{f3} 0.76. Аминокислотный анализ:

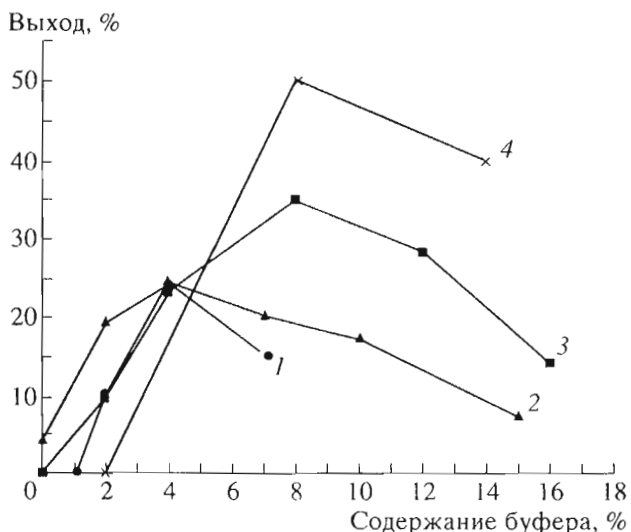


Рис. 3. Зависимость выхода гексапептидов от содержания 25 мМ цитратного буфера в реакционной смеси. Приведены выходы синтеза пептида (1) в CH_3CN , содержащем 8% DMF (1), 80% BuOH (2), 17% DMF (3), и пептида (II) в системе DMF (17%) – CH_3CN (4). [S] : [E] 10000 : 1. Остальные условия см. в “Экспер. части”.

Phe 0.97, Ala 1.07. Время удерживания 10 (1) и 24.6 мин (2).

Woc-Ser-Phe-OMe синтезировали по описанной выше методике. В реакцию вводили 0.6 г (2.8 ммоль) HCl · Phe-OMe, 0.4 мл (2.9 ммоль) абсолютного триэтиламина, 0.5 г (2.4 ммоль) Woc-Ser-OH и 0.7 г (3.4 ммоль) DCC. Кристаллизовали под абсолютным эфиром. Выход 0.48 г (54%), R_{f4} 0.47. Аминокислотный анализ: Ser 1.02, Phe 0.98.

HCl · H-Ser-Phe-OMe. К 1 г (2.7 ммоль) Woc-Ser-Phe-OMe прибавили 3 мл 3 М раствора HCl в диоксане. Перемешивали при комнатной температуре 1 ч. Упарили реакционную смесь до масла. Кристаллизовали под абсолютным эфиром. Осадок отфильтровали и высушили в вакуум-эксикаторе над NaOH. Выход 0.8 г (97%), R_{f4} 0.

Dnp-Ala-Ser-Phe-OMe синтезировали карбодимидным методом, аналогично Z-Phe-Ala-OMe. В реакцию вводили 0.84 г (2.7 ммоль) HCl · H-Ser-Phe-OMe, 0.4 мл (2.8 ммоль) абсолютного триэтиламина, 0.7 г (2.7 ммоль) Dnp-Ala-OH и 0.72 г (0.35 ммоль) DCC. Кристаллизовали под абсолютным этилацетатом при –5° С. Выход 0.45 г (32%), R_{f4} 0.5. Аминокислотный анализ: Ser 1.01, Phe 0.99. Время удерживания 24.1 мин (2).

Dnp-Ala-Ala-Phe-OMe. Растворили 1.63 г (5 ммоль) Dnp-Ala-Ala-OH в 10 мл воды и 2.5 мл 2 М NaOH, добавили 1.186 г (5.5 ммоль) HCl · H-Phe-OMe. После полного растворения довели pH раствора до 7 добавлением 2 М NaOH и внесли 2.5 мг термолизина. Перемешивали реакционную смесь до загустения и оставили на ночь при ком-

натной температуре. Добавили 20 мл воды, отфильтровали осадок, растворили его в 40 мл уксусной кислоты и осадили 280 мл воды. Образовавшийся кристаллический осадок перенесли на фильтр, промыли водой (3 × 15 мл), высушили над NaOH. Выход 1.6 г (65%), т. пл. 200° С, R_f 0.85. Аминокислотный анализ: Ala 1.03, Phe 0.96. Время удерживания 12 мин (1).

Dnp-Ala-Ala-Phe-OH. Растворили 0.5 г (1.02 ммоль) Dnp-Ala-Ala-Phe-OMe в 30 мл ацетонитрила. При перемешивании прибавили 20 мл 0.1 М NH_4HCO_3 (рН 7.8) до появления хлопьевидного осадка. Внесли 10 мг α -химотрипсина. Через сутки прибавили 10 мл 0.1 М NH_4HCO_3 и 10 мг α -химотрипсина, перемешивали 2 ч. Упарили реакционную смесь до 1/2 первоначального объема. Добавлением 6 М HCl довели рН раствора до 5.5. Отфильтровали осадок, промыли водой (3 × 4 мл), высушили в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 . Выход 0.46 г (95%), т. пл. 195°С, R_f 0.64, время удерживания 10 мин (1).

Dnp-Ala-Ser-Phe-OH получали как описано выше. В реакцию вводили 0.35 г (0.7 ммоль) Dnp-Ala-Ser-Phe-OMe. Выход 0.32 мг (86%), R_{f4} 0.36, время удерживания 22.1 мин (2).

Приготовление субтилизина, сорбированного на SPG-10. Раствор 50 мг субтилизина в 3 мл 0.1 М фосфатного буфера (рН 7.6) по каплям нанесли на 1 г сорбента, рассыпанного тонким слоем. Сушили в вакуум-эксикаторе над NaOH при 5°С до постоянной массы.

Z-Phe-Ala-Arg-NH₂. В раствор 1.0 г (3.8 ммоль) $2\text{HCl} \cdot \text{H-Arg-NH}_2$ и 0.98 г (2.5 ммоль) Z-Phe-Ala-OMe в смеси 10 мл абсолютного DMSO, 1.4 мл (10 ммоль) абсолютного триэтиламина и 20 мл абсолютного ацетонитрила внесли 100 мг субтилизина, сорбированного на макропористом стекле, как описано выше. Синтез проводили при постоянном встряхивании. Через 5 сут отфильтровали сорбированный фермент, фильтрат подкислили 6 М HCl до рН 2, упарили ацетонитрил. Экстрагировали этилацетатом (4 × 40 мл), *n*-бутанолом, насыщенным водой (5 × 100 мл). Бутанольный экстракт упарили до 1/2 первоначального объема и промыли водой (3 × 5 мл). Упарили бутанол, пептид кристаллизовали из абсолютно-го этилацетата. Выход 1.0 г (76%), т. пл. 220°С, R_f 0.66. Аминокислотный анализ: Ala 1.05, Phe 0.99, Arg 0.97. Время удерживания 7 мин (1).

2HBr · H-Phe-Ala-Arg-NH₂. К 1.05 г (2.0 ммоль) кристаллического Z-Phe-Ala-Arg-NH₂ добавили 5 мл 40% раствора HBr в ледяной уксусной кислоте. Через 2 ч прилили 30 мл абсолютного эфира. Отфильтровали осадок, высушили в вакуум-эксикаторе над NaOH. Выход 1.06 г (96%), т. пл. 235°С, R_f 0.47.

Приготовление пепсина, сорбированного на целите. Раствор 20 мг пепсина в 2 мл 0.5 М цитрат-

ного буфера (рН 4.5) наслоили на 1 г сорбента, рассыпанного тонким слоем. Сушили в вакуум-эксикаторе над NaOH при 5° С до постоянного веса.

Выбор оптимальных условий синтеза Dnp-Ala-Ala-Phe-Phe-Ala-Arg-NH₂. В реакцию ввели 1.4 мг (2.5 мкмоль) $2\text{HBr} \cdot \text{H-Phe-Ala-Arg-NH}_2$ и 2.4 мг (5 мкмоль) Dnp-Ala-Ala-Phe-OH, добавили 500 мкл смеси растворителей и внесли 50 мг катализатора, полученного как описано выше. Синтез вели 24 ч при постоянном встряхивании.

Для выбора оптимального количества солей буфера на поверхности носителя в реакционную смесь добавляли по 50 мг целита, содержащего 1 мг пепсина, нанесенного в 0.025, 0.1, 0.25, 0.5 или 1 М цитратном буфере, рН 4.5.

Dnp-Ala-Ala-Phe-Phe-Ala-Arg-NH₂. 50 мг (0.09 ммоль) $2\text{HBr} \cdot \text{H-Phe-Ala-Arg-NH}_2$ и 86 мг (0.18 ммоль) Dnp-Ala-Ala-Phe-OH растворили в смеси 3 мл DMF, 1.43 мл 25 мМ цитратного буфера (рН 4.8) и 13.4 мл ацетонитрила. Внесли 1.8 г целита, содержащего 36 мг пепсина, встряхивали на качалке сутки. Отфильтровали катализатор, промыли на фильтре смесью 17% DMF-ацетонитрил. Фильтрат упарили досуха, остаток растворили в 0.8 мл уксусной кислоты при нагревании до 50° С и добавили 20 мл воды. Осадок отфильтровали, промыли на фильтре этилацетатом, растворили в 0.2 мл TFA и осадили 20 мл этилацетата. Выход 25 мг (28%), R_{f2} 0, R_{f4} 0. Аминокислотный анализ: Ala 1.998, Phe 2.016, Arg 0.986. Время удерживания 7 (1) и 23.6 мин (2).

Dnp-Ala-Ser-Phe-Phe-Ala-Arg-NH₂. Синтез проводили описанным выше способом. В реакцию ввели 86 мг (0.18 ммоль) Dnp-Ala-Ser-Phe-OH, 50 мг (0.09 ммоль) $2\text{HBr} \cdot \text{H-Phe-Ala-Arg-NH}_2$. Отфильтровали катализатор, промыли на фильтре смесью 17% DMF-ацетонитрил. Фильтрат упарили досуха, остаток растворили в 60 мл *n*-бутанола, насыщенного водой, промыли 3% NaHCO_3 (6 × 40 мл), 0.05 М NaCl (2 × 20 мл) и водой (2 × 20 мл). Упарили *n*-бутанол, прибавили к остатку 50 мл этилацетата и через 15 мин декантировали, осадок растворили в 1 мл TFA, переосадили добавлением 20 мл этилацетата. Выход 55 мг (60%), R_{f2} 0, R_{f4} 0. Аминокислотный анализ: Ala 1.07, Ser 0.97, Phe 2.05, Arg 0.91. Время удерживания 22.4 мин (2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Visser S., Van Rooijen P.J., Schattenkerk C., Kerling K.E. // Biochim. Biophys. Acta. 1977. V. 481. P. 171–176.
2. Isowa Y., Nagasawa T., Kuroiwa K., Narita K. // Pat Swiss 597 158 (Cl.: C 07 C 103/52, 31 March 1978).
3. Powers J.C., Harley A.D., Myers D.V. // Acid Proteases. Structure, Function and Biology / Ed. J. Tang. N. Y.; L.: Plenum Press, 1977. P. 141–157.
4. Baker L.E. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 809–819.

5. Sachdev G.P., Fruton J.S. // *Biochemistry*. 1970. V. 9. P. 4465–4470.
6. Inouye K., Fruton J.S. // *Biochemistry*. 1966. V. 5. P. 1765–1777.
7. Dunn B.M., Valler M.J., Rolph C.E., Foundling S.I., Jimenez M., Kay J. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1987. V. 913. P. 122–130.
8. Dunn B.M., Jimenez M., Parten B., Valler M.J., Rolph C.E., Kay J. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1986. V. 237. P. 899–906.
9. Анисимова В.В., Лысогорская У.Н., Филиппова И.Ю., Оксенойт Е.С., Степанов В.М. // *Биоорганическая химия*. 1994. Т. 20. С. 316–322.
10. Юсупова М.П., Котлова Е.К., Тимохина Е.А., Степанов В.М. // *Биоорганическая химия*. 1995. Т. 21. С. 33–38.
11. Остерман А.Л., Степанов В.М., Руденская Г.Н. // *Биохимия*. 1984. Т. 49. С. 292–301.
12. Гололобов М.Ю., Морозова И.П., Степанов В.М. // *Биохимия*. 1991. Т. 56. С. 33–40.
13. Соловьева Т.А., Беляев С.В., Степанов В.М. // *Химия природных соединений*. 1977. № 3. С. 398–403.
14. Гершкович А.А., Кибирев В.К. *Синтез пептидов. Реагенты и методы*. Киев: Наукова думка, 1987. С. 172.
15. Гринштейн Дж., Виниц М. *Химия аминокислот и пептидов*: Пер. с англ. М.: Мир, 1965. С. 624.

Synthesis of New Chromogenic Substrates for Aspartyl Proteases

O. V. Litvinova, G. N. Balandina, and V. M. Stepanov

Department of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia

Abstract—A general method was developed for the synthesis of new chromogenic substrates of aspartyl proteases: Dnp-Ala-Xaa-Phe-Phe-Ala-Arg-NH₂, where Xaa was Ala or Ser. The synthetic scheme involved both chemical and enzymic stages, the condensation of tripeptides in an organic medium by means of pepsin immobilized on Celite being among the latter. The influence of organic solvents, reaction time, and the composition and ionic strength of the buffers used in the reaction mixture and at the pepsin immobilization step on the efficacy of the pepsin-catalyzed synthesis was studied.

Key words: aspartyl protease, peptide, enzymic synthesis, chromogenic substrate.