

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СУБСТРАТОВ ТРОМБИНА – *n*-НИТРОАНИЛИДОВ ПЕПТИДОВ

А.А. Чистов^{1,2}, А.В. Таланова¹, М.В. Мельникова¹, С.С. Кузнецова¹, Е.Ф. Колесанова^{1*}

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121, Россия, Москва, ул. Погодинская 10; *эл. почта: EKolesanova@yandex.ru

²Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая 16/10

Низкомолекулярные хромогенные субстраты тромбина, *n*-нитроанилиды защищённых по N-концевой аминогруппе коротких пептидов, получали путём твердофазного пептидного синтеза на полистирол-дивинилбензольном полимере с тритильными группами с предварительно присоединенным к ним остатком *n*-фенилендиамин. После отщепления от смолы *n*-аминоанилиды пептидов мягко окисляли до *n*-нитроанилидов смесью сульфата и персульфата калия. Адсорбция на полимерном носителе Bio-Beads SM-2 с элюцией ацетонитрилом позволила легко отделить полученные *n*-нитроанилиды пептидов от окислителя и получить препараты хромогенных субстратов тромбина с содержанием целевого вещества не ниже 95% и с выходами 30-40%. Тромбин эффективно катализировал гидролиз полученных субстратов со значением K_M в диапазоне 29-134 мкМ и V_{max} 0.03-1.16 мкМ/с.

Ключевые слова: хромогенные субстраты; *n*-нитроанилиды; твердофазный пептидный синтез; Bio-Beads SM-2; адсорбция; тромбин

DOI: 10.18097/BMCRM00057

ВВЕДЕНИЕ

Хромогенные субстраты ферментов часто используются для определения активностей последних с помощью фотометрических методов [1, 2]. Так как данные методы широко применяются в научных исследованиях, клинической диагностике, при проведении анализов в биотехнологической промышленности, экологии и иных областях для выявления ферментов и оценки их активности, потребности в специфичных хромогенных субстратах весьма высоки, и многие из этих субстратов есть в каталогах зарубежных компаний – производителей и поставщиков реактивов.

Тромбин, он же фактор свёртывания II, играет одну из ключевых ролей в процессе свёртывания крови. Нарушения процесса свёртывания, вызывающие усиленную активацию тромбина, приводят к тромбозам и являются одними из основных причин развития сердечно-сосудистых заболеваний, нарушения кровообращения и кровоснабжения органов и тканей [3-5]. Связь серьезных патологий с нарушением регуляции активности тромбина требует контроля активности этого фермента. Медикаментозная регуляция повышенной свёртываемости крови также должна сопровождаться контролем активности тромбина, поскольку длительное и излишнее снижение её может привести к опасным для жизни кровотечениям [5]. Помимо этого, разработка новых лекарственных средств, регулирующих активность тромбина, сопровождается исследованием их воздействия на кинетические параметры катализируемых тромбином реакций. Потребность в субстратах тромбина, позволяющих просто, надежно и в условиях прямой регистрации во времени определять активность этого фермента, привела к разработке ряда коротких пептидов, модифицированных по C-концевой карбоксильной группе остатками хромофора (*n*-нитроанилина) или флуорофора (7-амино-4-метилкумарина) [6, 7]. *n*-Нитроанилидные субстраты ранее получали путём присоединения хромофора непосредственно к готовому пептиду либо к C-концевой аминокислоте в растворе [2, 8-10], однако разработаны и более удобные так называемые *one-pot* способы синтеза *n*-нитроанилидов пептидов на твёрдой фазе. В ряде способов аминокислотный остаток присоединяется к смоле за функциональную группу в боковой цепи [9-11]. Это требует обязательного наличия таких остатков

вблизи C-конца пептида и использования особым образом функционализированных смол, обычно не применяемых в пептидном синтезе [11, 12], что весьма неудобно и непрактично. Использование связанного со смолой *n*-фенилендиамин позволило проводить наращивание на нём пептидной цепи с помощью стандартных методик твердофазного пептидного синтеза с последующим окислением остатка *n*-аминоанилида (pAA) до *n*-нитроанилида (pNA) в отщепленных пептидах, однако применяемые смолы подвергались дополнительным модификациям для обеспечения возможности присоединения *n*-фенилендиамин [13, 14]. Наиболее удобным оказался способ с модификацией остатком *n*-фенилендиамин смолы с легко замещаемым атомом хлора (третилхлоридной или 2-хлортритилхлоридной, обычно используемых для синтеза защищенных пептидов) с последующим наращиванием на нём пептидной цепи с помощью Fmoc-аминокислот и мягким окислением остатка *n*-аминоанилида до *n*-нитроанилида смесью персульфата и сульфата калия (Oxone®) после отщепления пептида от смолы [15]. Способ предполагал использование ВЭЖХ для одновременной очистки *n*-нитроанилида пептида и отделения от него окислителя. Однако нагрузка колонки для ВЭЖХ с обращённой фазой солью неорганической кислоты, к тому же являющейся окислителем, приводит к сокращению срока службы такой колонки. Кроме того, *n*-нитроанилиды пептидов более гидрофобны, чем *n*-аминоанилиды, элюируются с ВЭЖХ-колонки при достаточно высокой концентрации органической фазы и частично необратимо сорбируются, что снижает их выход и удорожает процесс получения *n*-нитроанилидов пептидов. Учитывая, что большинство хромогенных субстратов тромбина содержат фенильные группы (в составе остатков фенилаланина и бензойной (Bz) кислоты), нами для замены ВЭЖХ на стадии отделения пептида от окислителя была предложена адсорбционная хроматография на носителе Bio-Beads SM-2, связывающем гидрофобные соединения и проявляющем высокую селективность в отношении соединений с фенильной группой [16]. При необходимости ВЭЖХ использовали для очистки *n*-аминоанилидов пептидов. Усовершенствованная методика получения *n*-нитроанилидов была опробована и отработана на примере синтеза субстратов тромбина Bz-Phe-Val-Arg-pNA, Bz-Val-Pro-Arg-pNA, Bz-Gly-Pro-Arg-pNA, Bz-Leu-Thr-Pro-Arg-pNA.



МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы следующие реактивы: 1,4-диаминобензол (*n*-фенилендиамин, “Реахим”, Россия); хлортритильная смола (полистирол, сшитый дивинилбензолом и содержащий хлортрифенилметильные (хлортритильные) группы – TCP-Cl resin, 1.4 ммоль активных групп/г смолы, (“IRIS Biotech”, Германия); N,N-диметилформамид “ос.ч.” (DMFA, “ЭКОС-1”, Россия); N-диизопропилэтиламин (DIPEA, “Acros”, Бельгия); метанол (“Acros”); дихлорметан “ос.ч.” (“Компонент-реактив”, Россия); N-Фмос-L-аминокислоты: N^ε-2,2,4,6,7-пентаметил-дигидробензофуран-5-сульфонил-аргинин, пролин, O-трет-бутил-треонин, глицин, валин, лейцин, фенилаланин (все – “Applied Biosystems”, США); 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуруон гексафторфосфат (HBTU, “ChemPer”, США); 1-гидроксibenзотриазол (HOBT, “Fluka”, Швейцария), 2,4,6-триметилпиридин (*симм*-коллиндин, “Sigma-Aldrich”, США); 4-метилпиперидин (“Acros”); бензоилхлорид (“Fluka”); трифторуксусная кислота (TFAA, “Acros”); триизопропилсилан (TIS, “Acros”); диэтиловый эфир (“Реаторг”, Россия); диметилсульфоксид (DMSO, “Acros”); ацетонитрил для ВЭЖХ (“BioSolve”, США); Oxone® (“Acros”); тромбин лиофилизированный из набора Tissucol® Kit, 500 ME (“Baxter AG”, Австрия), полистирольный носитель для адсорбционной хроматографии Bio-Beads SM-2 (“Bio-Rad Laboratories”, США).

n-Аминоанилид-модифицированную смолу получали по методике [14]: к раствору свежечищенного сублимацией в вакууме *n*-фенилендиамина (1.82 г, 16.8 ммоль) в сухом DMFA (15 мл) при 0°C добавили тритилхлоридную смолу (1.50 г, 2.1 ммоль), затем DIPEA (2.93 мл, 16.8 ммоль) и оставили на 6 ч при комнатной температуре. По окончании реакции смолу отфильтровали, промыли на фильтре метанолом (5×20 мл), дихлорметаном (5×20 мл) и высушили под вакуумом.

n-Аминоанилиды *N*-замещённых пептидов получали автоматическим твердофазным пептидным синтезом на синтезаторе 433A (“Applied Biosystems”) по программе FastMoc в масштабе 0.25 ммоль с использованием 4-кратного избытка (по отношению к количеству остатков *n*-фенилендиамина на смоле) соответствующих аминокислот и HBTU/HOBT/*симм*-коллиндина как активаторов (1/1/2 экв. по отношению к Фмос-аминокислотам) в DMFA, с однократным присоединением каждого аминокислотного остатка. Защитные Фмос-группы с *N*-конца растущей пептидной цепи удаляли обработкой 20%-ным 4-метилпиперидином в DMFA. Присоединение остатка бензойной кислоты проводили, используя смесь бензоилхлорида (4 экв.) с DIPEA (4 экв.). Синтезированные пептиды снимали со смолы с одновременным деблокированием боковых функциональных групп аминокислот смесью 95% TFAA, 2.5% TIS и 2.5% воды (15 мл смеси на 1 г смолы) в течение 2 ч. Растворы пептидов упаривали в вакууме до минимального объёма и осаждали пептиды холодным диэтиловым эфиром. Осадок пептидов растворяли в минимальном объёме DMSO и очищали с помощью ВЭЖХ на обращенной фазе (колошка Zorbax 300SB-C8 5 μm 21.2×250 mm, рабочая станция Agilent 1100, США) с элюцией градиентом концентрации ацетонитрила в воде в присутствии 0,1% TFAA, скорость элюции 15 мл/мин. Полученные фракции очищенных *n*-аминоанилидов пептидов объединяли, упаривали под вакуумом до полного удаления ацетонитрила. При выпадении пептидов в осадок добавляли деионизованную воду до полного растворения пептида, после чего добавляли ещё воды в объёме, равном 50% общего объёма раствора (для предотвращения выпадения в осадок образующихся при окислении *n*-нитроанилидов).

Общая методика окисления и последующей очистки субстратов. К водным растворам полученных *n*-аминоанилидов пептидов добавляли не менее 6 экв. Oxone® (смесь сульфата и персульфата калия, 1:1 по массе). Полученную смесь перемешивали 6 ч при комнатной температуре, после чего к ней добавляли 1 г Bio-Beads SM-2 и перемешивание продолжали ещё 6-10 ч. Сорбент отфильтровывали на фильтре Шотта и промывали водой (5×10 мл воды) до отрицательной реакции с насыщенным раствором BaCl₂. Элюцию пептида с сорбента проводили ацетонитрилом (“BioSolve”, 3×10 мл), элюат упаривали под вакуумом. Полученные *n*-нитроанилиды пептидов анализировали высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ, колонка 2.1×50 мм YMC Triart C18, 1.9 мкм (“YMC”, Швейцария), градиент ацетонитрила 2-98% в воде с 0.1% муравьиной кислоты и 0.01% TFAA, объём нанесения 1 мкл, скорость элюции 0.3 мл/мин) с УФ- (210 нм) и масс-спектрометрической (ионизация электрораспылением, детектор – ионная ловушка) детекцией, растворяли в деионизованной воде и лиофилизировали.

Гидролиз полученных субстратов под действием тромбина регистрировали по изменению во времени оптической плотности раствора при 405 нм на планшетном спектрофотометре MultiScan Spectrum (“Thermo Fisher Scientific”, США), коэффициент молярной экстинкции *n*-нитроанилина $\epsilon_{405}=9800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [8]. Реакции проводили при 37°C при перемешивании в лунках полистирольных планшетов с низкой сорбционной активностью Cliniscan (“Labsystems”, Финляндия) в буферном растворе, содержащем 20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 0.1% ПЭГ 6000, pH 8.0, при концентрациях субстратов 4-200 мкМ, объём реакционной пробы 200 мкл, длина оптического пути 5 мм. Реакцию запускали после стабилизации скорости спонтанного гидролиза субстрата добавлением 10 мкл раствора тромбина (конечная концентрация в лунке 0.5 ME/мл). Начальную скорость гидролиза субстрата под действием тромбина определяли по отрезку кинетической кривой, соответствующему степени гидролиза не более 10% субстрата.

Кинетические параметры каталитических реакций рассчитывали из зависимостей скоростей реакций от концентраций субстратов в координатах Лайнуивера-Берка с помощью программы Origin 9.1 (“OriginLab Corporation”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Как известно, методика твердофазного синтеза пептидов позволяет значительно упростить и автоматизировать основные стадии синтетического цикла. В то же время довольно затруднительно получить производные пептидов, замещённые по C-концу, поскольку он необходим для присоединения к полимерному носителю.

Ранее на примере *n*-нитроанилидов пептидов была предложена концепция присоединения к твердофазному носителю предшественника хромофора в начале синтеза с последующим наращиванием полипептидной цепи [13-15]. *n*-Нитроанилин является одним из наиболее востребованных хромофоров и легко получается из *n*-аминоанилина (*n*-фенилендиамина) мягким окислением перборатом [13] или смесью персульфата и сульфата калия (Oxone®) [15]. *n*-Фенилендиамин является гомобифункциональным реагентом, то есть может быть легко встроено в качестве линкера между смолой и пептидом. Для дальнейшего наращивания пептидной цепи используются обычные методы твердофазного пептидного синтеза, а после снятия пептида со смолы остаток *n*-аминоанилина окисляется до *n*-нитроанилида. Присоединение *n*-фенилендиамина к тритилхлоридной смоле (обычно используемой для синтеза

защищённых по боковым функциональным группам пептидов) путём алкилирования взятого в избытке амина тритильной группой проходит с высокой эффективностью: по данным элементного анализа полученного нами препарата модифицированной смолы на содержание азота степень модификации смолы составила не менее 90%. Для автоматического твердофазного синтеза *n*-аминоанилидов пептидов была применена стандартная методика с использованием в качестве активаторов урониевых солей в присутствии 1-гидроксibenзотриазола. Полученные твердофазным синтезом *n*-аминоанилиды пептидов Vz-FVR, Vz-VPR, Vz-LTPR были очищены препаративной ВЭЖХ на октил-силикагеле и после упаривания ацетонитрила подвергнуты в водном растворе окислению Oxone® до *n*-нитроанилидов. *n*-Аминоанилид Vz-GPR после синтеза имел степень чистоты по данным аналитической ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией не ниже 90%, и его с помощью ВЭЖХ не очищали (см. ниже). В работе [15] *n*-аминоанилиды пептидов не подвергали очистке на ВЭЖХ, хотя описанные в ней препараты, как и полученные нами (см. рис. Д1-Д4 в Дополнительных материалах), содержали некоторое количество примесей, а очищали ВЭЖХ полученные окислением *n*-нитроанилиды одновременно с обессоливанием. Однако *n*-нитроанилиды элюируются с колонки с октил-силикагелем при более высокой концентрации ацетонитрила, чем *n*-аминоанилиды, что означает повышенный расход дорогого органического растворителя, а примеси в виде целевых соединений с неснятыми защитными группами в случае *n*-нитроанилидов могут связываться практически необратимо и загрязнять колонку. Кроме того, после окисления в препаратах *n*-нитроанилидных субстратов присутствуют довольно большие количества Oxone®, который при постоянном хроматографировании содержащих его растворов мог нанести непоправимый ущерб материалам хроматографической системы (коррозия, выпадение осадков, модификация носителя). Результаты анализа *n*-нитроанилидов пептидов (рис. Д5-Д8 в Дополнительных материалах) показывают, что окисление *n*-аминоанилидов до *n*-нитроанилидов происходит количественно: в препаратах *n*-нитроанилидов примесей *n*-аминоанилидов не обнаружено. Очистка конечных препаратов целевых пептидов представляет собой обессоливание. Так как синтезированные пептиды имеют небольшие молекулярные массы, использование гель-фильтрации для этой цели невозможно. Наилучшим вариантом является адсорбция на носителе, селективно и прочно сорбирующем полученные нами весьма гидрофобные *n*-нитроанилидные субстраты и легко десорбирующем их после отмывки от окислителя. В качестве носителя для адсорбции полученных *n*-нитроанилидов

пептидов был выбран полистирольный носитель Bio-Beads SM-2, проявляющий высокую селективность в отношении адсорбции гидрофобных соединений, и особенно соединений с фенильными группами [16]. Поскольку все синтезированные нами субстраты тромбина содержали фенильные группы в составе остатков бензойной кислоты, можно было полагать, что Bio-Beads SM-2 будет пригоден для очистки указанных субстратов, причём по инструкции производителя его можно использовать в режиме сорбции из объёма. Действительно, после окисления 20.0 мг Vz-LTPR-pAA с последующей очисткой на Bio-Beads SM-2 сорбцией из объёма и элюцией ацетонитрилом получено 18.4 мг Vz-LTPR-pNA, что соответствует выходу 88% от теоретического на данной стадии, а после окисления 20.0 мг Vz-FVR-pAA с последующей очисткой на Bio-Beads SM-2 – 14.2 мг Vz-FVR-pNA (выход 71% от теоретического на стадии обессоливания). Эти результаты означают, что полученные *n*-нитроанилиды пептидов эффективно сорбируются из водного раствора на Bio-Beads SM-2 и достаточно полно элюируются полярным растворителем. Меньший выход субстрата Vz-FVR-pNA может быть связан с его более низкой растворимостью в воде: часть субстрата могла осесть после окисления на стенках колбы и не сорбироваться на носитель. Выходы остальных пептидов на стадии окисления и последующей очистки на Bio-Beads SM-2 не проверяли, поскольку это требовало дополнительной длительной сушки *n*-аминоанилидов пептидов в вакууме, усложняющей методику. Однако, судя по величинам выходов *n*-нитроанилидов пептидов (в % от теоретических, табл. 1), рассчитанных для процесса в целом для каждого субстрата, выходы субстратов на стадии окисления и последующей очистки на Bio-Beads SM-2 составляют не менее 70% от теоретических.

В целом выходы полученных нами очищенных *n*-нитроанилидных субстратов тромбина такие же или немного выше выходов *n*-нитроанилидов пептидов, описанных в работе [15]. Субстрат тромбина Vz-GPR-pNA, содержащий в качестве минорных примесей не бензоилированный пептид-*n*-нитроанилид и побочные продукты реакции снятия пептида со смолы и удаления защитных групп, был получен в виде высокоочищенного препарата без очистки ВЭЖХ в виде *n*-аминоанилида; указанные примеси были удалены при одновременном обессоливании пептида адсорбцией на Bio-Beads SM-2.

Полученные нами *n*-нитроанилидные субстраты тромбина были испытаны на способность гидролизаться при катализе тромбином, определены кинетические параметры ферментативного гидролиза (табл. 2 и рис. Д9).

Таблица 1. Характеристики синтезированных *n*-нитроанилидных пептидных субстратов тромбина

Субстрат	Кол-во, мг	Выход, % от теоретического ^a	Чистота, %	[M+H] ⁺ , m/e расчет.	[M+H] ⁺ , m/e эксперим.
Vz-FVR-pNA	64	40	>95	645.3	645.4
Vz-VPR-pNA	58	41	>95	595.3	595.4
Vz-GPR-pNA	54	39	>95	553.3	553.3
Vz-LTPR-pNA	53	30	>95	710.4	710.4

Примечание: а - расчёт выполнен исходя из количества остатков *n*-фенилендиамин на смоле.

Таблица 2. Кинетические параметры гидролиза синтезированных субстратов под действием тромбина

Субстрат	K _M , мкМ	V _{max} , мкМ/с	V _{max} /K _M , с ⁻¹
Vz-FVR-pNA	34.5	0.100	2.9×10 ⁻³
Vz-VPR-pNA	35.5	0.034	9.6×10 ⁻⁴
Vz-GPR-pNA	29.0	0.0136	4.7×10 ⁻⁴
Vz-LTPR-pNA	134.0	1.16	8.7×10 ⁻³

Величины V_{\max}/K_M бензоилированных *n*-нитроанилидных субстратов тромбина прямо пропорциональны величинам k_{cat}/K_M субстратов с такими же аминокислотными последовательностями, но тозиллированных по N-концу, а значения K_M синтезированных нами субстратов близки к известным из литературы значениям K_M ферментативного гидролиза *n*-нитроанилидных субстратов тромбина, полученных синтезом в растворе [8]. Это косвенно свидетельствует об идентичности структур *n*-нитроанилидных субстратов, полученных ранее синтезом в растворе и твердофазным синтезом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Замена очистки конечных продуктов, *n*-нитроанилидов пептидов, методом ВЭЖХ на очистку полупродуктов – *n*-аминоанилидов – и последующее обессоливание *n*-нитроанилидов адсорбцией на Bio-Beads SM-2 позволило исключить повреждающее воздействие на оборудование и расходные материалы для ВЭЖХ при получении *n*-нитроанилидных субстратов тромбина, снизить расход ацетонитрила и повысить выход конечных продуктов. Следует отметить, что в случае получения после твердофазного синтеза достаточно чистого препарата пептид-*n*-аминоанилида его очистка методом ВЭЖХ необязательна, если присутствующие примеси после окисления Охоне® могут быть удалены при параллельном обессоливании адсорбцией на Bio-Beads SM-2.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Н.А. Казьминой и А.В. Колесниченко за отличную техническую помощь. Элементный анализ *n*-фенилендиамин-модифицированной смолы был выполнен в ИОХ РАН. Синтез пептидов проводили с использованием оборудования ЦКП “Протеом человека” ИБМХ, поддержанного Минобрнауки России в рамках выполнения соглашения №14.621.21.0017 (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0017). Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

К данной статье приложены дополнительные материалы, свободно доступные в электронной версии (<http://dx.doi.org/10.18097/BMCRM00057>) на сайте журнала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Semashko T.A., Vorotnikova E.A., Sharikova V.F., Vinokurov K.S., Smirnova Y.A., Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A., Oppert B., Elpidina E.N., Filippova I.Y. (2014) Selective chromogenic and fluorogenic peptide substrates for the assay of cysteine peptidases in complex mixtures, *Anal. Biochem.*, 449, 179-187. DOI: 10.1016/j.ab.2013.12.032

2. Rijkers D.T.S., Adams H.P.H.M., Hemker H.C., Tesser G.I. (1995) A convenient synthesis of amino acid *p*-nitroanilides; synthons in the synthesis of protease substrates, *Tetrahedron*, 51(41), 11235-11250. DOI: 10.1016/0040-4020(95)00671-T
3. Loeffen R., Winckers K., Ford I., Jukema J.W., Robertson M., Stott D.J., Lowe G.D. (2014) Associations Between Thrombin Generation and the Risk of Cardiovascular Disease in Elderly Patients: Results From the PROSPER Study, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 1758-535X (Electronic), 982-988. DOI: 10.1093/gerona/glu228
4. Sheehan J.J., Tsirka S.E. (2005) Fibrin-modifying serine proteases thrombin, tPA, and plasmin in ischemic stroke: A review, *Glia*, 50(4), 340-350. DOI: 10.1002/glia.20150
5. Walker C.P.R., Royston D. (2002) Thrombin generation and its inhibition: a review of the scientific basis and mechanism of action of anticoagulant therapies, *Br. J. Anaesth.*, 88(6), 848-863. DOI: 10.1093/bja/88.6.848
6. Backes B.J., Harris J.L., Leonetti F., Craik C.S., Ellman J.A. (2000) Synthesis of positional-scanning libraries of fluorogenic peptide substrates to define the extended substrate specificity of plasmin and thrombin, *Nat. Biotechnol.*, 18(2), 187-193. DOI: 10.1038/72642
7. Rijkers D.T., Wielders S.J., Tesser G.I., Hemker H.C. (1995) Design and synthesis of thrombin substrates with modified kinetic parameters, *Thromb. Res.*, 79(5-6), 491-499. DOI: 10.1016/0049-3848(95)00139-I
8. Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W. (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin, *Arch. Biochem. Biophys.*, 95, 271-278. DOI: 10.1016/0003-9861(61)90145-X
9. Kaspari A., Schierhorn A., Schutkowski M. (1996) Solid-phase synthesis of peptide-4-nitroanilides, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 48(5), 486-494. DOI: 10.1111/j.1399-3011.1996.tb00867.x
10. Bernhardt A., Drewello M., Schutkowski M. (1997) The solid-phase synthesis of side-chain-phosphorylated peptide-4-nitroanilides, *J. Pept. Res.*, 50(2), 143-152. DOI: 10.1111/j.1399-3011.1997.tb01179.x
11. Alsina J., Yokum T.S., Albericio F., Barany G. (1999) Backbone Amide Linker (BAL) Strategy for N(alpha)-9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) Solid-Phase Synthesis of Unprotected Peptide *p*-Nitroanilides and Thioesters, *J. Org. Chem.*, 64(24), 8761-8769. DOI: 10.1021/jo990629o
12. Kwon Y., Welsh K., Mitchel, A.R., Camarero J.A. (2004) Preparation of peptide *p*-nitroanilides using an aryl hydrazine resin, *Org. Lett.*, 6(21), 3801-3804. DOI: 10.1021/ol048417n
13. Burdick P.J., Struble M.E., Burnier J. (1993) Solid Phase Synthesis of Peptide *para*-Nitroanilides, *Tetrahedron Lett.*, 34, 2589-2592. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)77632-5
14. Mergler M., Dick F., Gosteli J., Nyfeler R. (2000) Protected peptide *p*-nitroanilides by solid-phase synthesis, *Lett. Pept. Sci.*, 7, 1. DOI: 10.1007/BF02443555
15. Abbenante G., Leung D., Bond T., Fairlie D.P. (2001) An efficient Fmoc strategy for the rapid synthesis of peptide *para*-nitroanilides, *Lett. Pept. Sci.*, 7, 347-351. DOI: 10.1023/A:1013016323676
16. Bio-Beads® SM Hydrophobic and Polar Interaction Adsorbents Instruction Manual. Bio-Rad Laboratories.

Поступила: 26. 07. 2018.
Принята к публикации: 07. 11. 2018.

AN IMPROVED PROCEDURE FOR THE PREPARATION OF THROMBIN LOW MOLECULAR WEIGHT SUBSTRATES – PEPTIDE *p*-NITROANILIDES

A.A. Chistov^{1,2}, *A.V. Talanova*¹, *M.V. Melnikova*¹, *S.S. Kuznetsova*¹, *E.F. Kolesanova*^{1*}

¹Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: EKolesanova@yandex.ru
²Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,
16/10 Miklukho-Maklaya str., GSP-7, Moscow, 117997 Russia

Low molecular weight chromogenic thrombin peptide substrates, *p*-nitroanilides of short peptides protected at their N-terminal amino group, were prepared by solid-phase peptide synthesis on polystyrene-divinylbenzene polymer with trityl groups with preliminary attached *p*-phenylene diamine moiety. After the cleavage from the resin peptide *p*-aminoanilides were mildly oxidized to *p*-nitroanilides with the mixture of potassium sulfate and persulfate. Adsorption onto polymer support Bio-Beads SM-2 with further elution by acetonitrile allowed easy separating peptide *p*-nitroanilides from the oxidizer and obtaining the thrombin chromogenic substrate preparations with the target substance contents of not less than 95% and yields of 30-40%. Thrombin effectively catalyzed hydrolysis of the prepared substrates with K_M and V_{max} values of 29-134 μM and 0.03-1/16 $\mu\text{M/s}$, respectively.

Key words: chromogenic substrates; *p*-nitroanilides; solid-phase peptide synthesis; Bio-Beads SM-2; adsorption; thrombin

ACKNOWLEDGMENTS

Authors are grateful to Ms. Natalia A. Kazmina and Ms. Alena V. Kolesnichenko for excellent technical assistance. Element analysis of the *p*-phenylenediamine-modified resin was made at the Institute of Organic Chemistry RAS. Peptide synthesis was performed on the equipment of the IBMC Core Facility “Human proteome”, which was supported by the Russian Ministry of Education and Science in the frame of the Agreement No. 14.621.21.0017 (project unique identifier RFMEF162117X0017). The work was made in the frame of the Program of Basic Scientific Research for State Academies of Sciences for 2013-2020.

SUPPLEMENTARY

Supplementary materials are available at <http://dx.doi.org/10.18097/BMCRM00057>