

Союз Советских
Социалистических
Республик



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

ГОСУДАРСТВЕННАЯ
ПАТЕНТНО-ТЕХНИЧЕСКАЯ
БИБЛИОТЕКА УБД

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ

(11) 736889

(61) Дополнительный к патенту -

(22) Заявлено 30.11.77 (21) 2548501/28-13

(23) Приоритет - (32) 01.12.76

(31) 7613463-4 (33) Швеция

(51) М. Кл.²

G01 N 33/16

Опубликовано 25.05.80. Бюллетень № 19

(53) УДК 616-078
(088.8)

Дата опубликования описания 26.05.80

Иностранцы

(72) Авторы
изобретения

Карл Геран Клаесон, Лейф Эрик Аурелл
и Лейф Роджер Симонссон
(Швеция)

Иностранная фирма

(71) Заявитель

"Активеболагет Каби"
(Швеция)

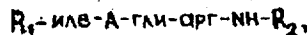
(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПРОТЕАЗ СЕРИНА

Изобретение относится к биохимии.
Известен способ определения активности протеаз серина путем воздействия ферментосодержащего материала на энзимный субстрат [1].

Однако известный способ не обеспечивает высокой точности определения активности протеаз серина.

Целью изобретения является повышение точности способа.

Это достигается тем, что в качестве субстрата используют вещество общей формулы



где R_1 - ацил, преимущественно ацетил или бензоил;

иле - изолейцин;

А - аспарагиновая или глутаминовая кислота, замещенная в карбоксильной группе образованием сложного эфира с коротким алкилом, оксиалкилом, замещенным аминоалкилом или циклоалкилом, или амидированием моно- или дизамещенным коротким алкилом, оксиалкилом, замещенным аминоалкилом или гетероцикли-

ческой группой, у которой азот амидной группы образует участок пиперидинового морфолинового или пиперазинового кольца;

гли - глицин;

арг - аргинин;

R_2 -н - нитрофенил.

Субстраты получают из хромогенных или флюорогенных субстратов, содержащих аминокислоты в последовательности соответственно ил-глю-гли-арг-и-ил-асп-гли-арг посредством образования сложной эфирной группы или амидирования свободной γ -или β -карбоксильной группы известным способом.

При тонкослойном хроматографическом анализе экстракта из адсорбента и продуктов в качестве абсорбционной среды берут стеклянные пластинки с силикагелем F-254. Используют систему растворителей: хлороформ - метанол - уксусная кислота - вода в соотношении 34:4:9:2. После тонкослойной хроматографии пластинки исследуют сначала в ультрафиолетовых лучах (254 нм), а затем с помощью хлортолуидиновой реакции. Все использованные аминокислоты при отсутствии

других указаний имеют L-конфигурацию.

Приняты следующие сокращения:

Арг - аргинин, асп - аспарагиновая кислота, глю - глутаминовая кислота, гли - глицин, иле - изолейцин, лей - лейцин; Ас - ацетил, АсОН - уксусная кислота, В - бензил, DCCl - дициклогексилкарбодимид, DMF - диметилформамид, Et₃N - триэтиламин, НОВТ - оксибензотриазол, НОСу - N-оксиимид янтарной кислоты, MeOH - метанол, OEt - этилокси, OMe - метилокси, OrNp - p-нитрофенокси, Oisoprop - изопропилокси, pNA - p-нитроанилид, GAE - четвертичная аминоэтилсефароза, SOCl₂ - хлористый тионил.

Пример 1. Субстрат Бензоил-ил-глю-арг-p-нитроанилид (S-2222) В2-ил-глю-(OMe)-гли-арг-pNA · HCl (мол.в. 748,2).

В безводных условиях при 0°C 30 мл дистиллированного SOCl₂ добавляют к 0,5 мл абсолютного метанола. После первоначальной реакции раствор оставляют стоять примерно на 15 мин при комнатной температуре, затем добавляют 75 мг В2-ил-глю-гли-арг-pNA · HCl (S-2222). Раствор перемешивают в течение 5 ч, затем упаривают. Полученный маслообразный продукт растворяют в небольшом количестве метанола и очищают по способу хроматографирования на геле на колонке, содержащей "Сефадекс 2Н-20" в среде метанола. Для отмывки с адсорбента также применяют метанол. Чистый сложный метиловый эфир, полученный после выпаривания метанола, растворяют в воде и высушивают в замороженном состоянии. Выход 30 мг (40%). Продукт однороден по данным тонкослойной хроматографии, $R_f = 0,33/\alpha/\beta$ минус 40,3° (с = 0,5, 50% HOAc/H₂O).

Пример 2. В2-ил-глю(OEt)-гли-арг-NA · HCl (мол.в. = 762,2).

В безводных условиях при температуре минус 10°C 60 мл дистиллированного SO₂Cl₂ добавляют к 1,0 мл абсолютного этанола. Через 30 мин при комнатной температуре добавляют 150 мг субстрата S-2222. Примерно через 15 ч по окончании реакции (по данным тонкослойной хроматографии) раствор выпаривают. Полученное масло растворяют в небольшом количестве 30%-ной HOAc в воде и очищают посредством хроматографирования на колонке, содержащей "Сефадекс С 15" в среде 10%-ного водного раствора. HOAc. Чистый сложный этиловый эфир, извлеченный из адсорбента, высушивают в замороженном состоянии. Выход 70 мг (46%). Продукт однороден по данным тонкослойной хроматографии, $R_f = 0,40/\alpha/\beta$ минус 37,7° (с = 0,5, 50% HOAc/H₂O).

Пример 3. В2-ил-глю(Oisoprop)-гли-арг-p NA · HCl (мол.в. 776,3).

Осуществляют синтез по примеру 2, однако вместо этанола берут абсолютный изопропанол. Реакция заканчивается через 16 ч. Хроматографирование и высушивание в замороженном состоянии проводят по методике, приведенной в примере 2. Выход 90 мг (58%). Продукт однороден по данным тонкослойной хроматографии, $R_f = 0,44/\alpha/\beta$ минус 36,4° (с = 0,5, 50% HOAc/H₂O).

Пример 4. В2-ил-глю-(0-циклогексил)-гли-арг-pNA · HCl (мол.в. 833,3).

60 мл SO₂Cl₂ добавляют к 1,0 мл сухого циклогексанола и через 1 ч при комнатной температуре добавляют 200 мг S-2222. По окончании реакции, примерно через 12 ч, раствор упаривают и хроматографируют как указано в примерах 2 и 3. Затем продукт высушивают в замороженном состоянии. Выход 170 мг (75%). Продукт однороден по данным тонкослойной хроматографии, $R_f = 0,50/\alpha/\beta$ минус 38,6° (с = 0,5, 50% HOAc/H₂O).

Пример 5. В2-ил-глю-(0-CH₂CH₂N(CH₃)₂)-гли-арг-pNA · HCl (мол.в. 859,8).

75 г (0,10 ммоль) субстрата S-2222 и 100 мг диметил-аминоэтанол-гидрохлорида растворяют в 1,0 мл сухого дистиллированного DMF, затем добавляют 10 мл пиридина, 10 мг НОВТ и в заключение добавляют 25 мг DCCl. Образовавшийся дициклогексилкарбамид отфильтровывают примерно через 24 ч и диметилформамидный раствор упаривают при пониженном давлении. Оставшееся масло растворяют в небольшом количестве 35% MeOH-5% H₂O и очищают на колонке, содержащей ионообменник "ОАЕ-25" в его хлоридной форме. Ту же самую смесь растворителей используют для отмывки с адсорбента. Согласно этой методике получают хлористоводородную соль сложного диметиламиноэтилового эфира, свободную от примеси других пептидов, однако продукт содержит незначительное количество некоторых загрязняющих примесей, например хлористоводородной соли диметиламиноэтанола. Фракцию, содержащую сложный диметиламиноэтиловый эфир, упаривают и очищают хроматографированием на колонке, содержащей "Сефадекс 15" в 10% HOAc/H₂O. Раствор чистого сложного эфира высушивают в замороженном виде. Выход 60 мг (58%). Продукт однороден по данным тонкослойной хроматографии, $R_f = 0,50/\alpha/\beta$ минус 35,0° (с = 0,5, 50% HOAc/H₂O).

CONH-CH(CH₃)₂

Пример 6. В2-ил-глю-гли-арг-pNA (мол.в. 775,3).

240 мг субстрата S-2222 HOSu растворяют в 1 мл сухого дистиллированного DMF. Раствор охлаждают до минус 5°C и добавляют 120 мг DCCl₂. Температуру дают подняться до комнатной и спустя 4 ч раствор вновь охлаждают до 0°C, выделившийся в виде осадка дициклогексилкарбамид отфильтровывают и промывают. DMF-раствор (около 2 мл) охлаждают до 0°C и добавляют 0,1 мл чистого изопропиламина. Через 70 ч выдерживания при комнатной температуре раствор выпаривают при пониженном давлении, смешивают с 5 мл воды и вновь выпаривают. Продукт растворяют примерно в 4 мл 50% HOAc/H₂O и очищают хроматографированием на колонке, содержащей "Сефадекс С-15" в среде 33% HOAc/H₂O. Эту же смесь растворителей используют для отмывки с адсорбента. Фракцию, содержащую чистый изопропиламид, упаривают и подвергают ионному обмену в колонке, содержащей четвертичную аминоэтилсефарозу "АЕ 25" в ее хлоридной форме, растворенной в 95% MeOH-5% H₂O. Экстракт из адсорбента выпаривают, растворяют в воде и высушивают в замороженном состоянии. Выход 120 мг (47%). Продукт однороден по данным тонкослойной хроматографии, $R_f = 30,39 / \alpha / \frac{25}{D}$ минус 30,6° (с = 0,5, MeOH).

Пример 7. Bz-ил-глю-гли-
-арг-pNA (мол. в. 802,3)

Синтез осуществляют по примеру 6, однако используют пиперидин взамен изопропиламина. Выход 105 мг (40%). Продукт однороден по данным тонкослойной хроматографии, $R_f = 0,50 / \alpha / \frac{25}{D}$ минус 34° (с = 0,5, MeOH).

Пример 8. Bz-ил-глю-гли-
-арг-pNA (мол. в. 822,3)

Синтез проводят по примеру 6, но применяют диэтаноламин вместо изопропиламина. Выход 120 мг (45%). Продукт однороден по данным тонкослойной хроматографии, $R_f = 0,25 / \alpha / \frac{25}{D}$ минус 31° (с = 0,5 MeOH).

Пример 9. Bz-ил-асп-
(o-i-Pr)-гли-арг-pNA HCl / мол. в. 762,3).

30 мл дистиллированного SOCl₂ добавляют к 0,5 мл сухого изопропанола и после 30 мин стояния при комнатной температуре добавляют 73 мг (0,10 ммоль) Bz-ил-асп-гли-арг-pNA HCl (мол. в. 720,2). По окончании реакции, примерно через 18 ч, раствор упаривают, хроматографируют и высушивают в замороженном состоянии, как указано в примерах 2, 3 и 4.

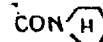
Выход 32 мг (42%). Продукт однороден по данным тонкослойной хроматографии, $R_f = 0,46 / \alpha / \frac{25}{D}$ минус 22,7° (с = 0,5, 50% HOAc/H₂O).

Пример 10. Bz-ил-асп-
5 (OEt)-гли-арг-pNA HCl (мол. в. 748,2).
Синтез проводят по примеру 9, но вместо изопропанола применяют этанол. Выход 28 мг (37%). Продукт однороден по данным тонкослойной хроматографии, $R_f = 0,40 / \alpha / \frac{25}{D}$ минус 23,5° (с = 0,5, 50% HOAc/H₂O).

Пример 11. Bz-ил-асп-гли-
-арг-pNA HCl (мол. в. 761,3).

Синтез проводят по примеру 6, но применяют Bz-ил-асп-гли-арг-pNA HCl в качестве исходного материала вместо S-2222. Выход 100 мг (40%). Продукт однороден по данным тонкослойной хроматографии, $R_f = 0,40 / \alpha / \frac{25}{D}$ минус 20,1° (с = 0,5, MeOH).

Пример 12. Bz-ил-асп-гли-



25 -арг-pNA (мол. в. 818,3).

Синтез проводят по примеру 11, но применяют морфолин взамен изопропиламина. Выход 95 мг (35%). Продукт однороден по данным тонкослойной хроматографии, $R_f = 0,46 / \alpha / \frac{25}{D}$ минус 24,2° (с = 0,5 MeOH).

Определения K_m и $V_{\max}$ (K_m - константа Михаэлиса, $V_{\max}$ - максимальная скорость), получают, применяя уравнение Лайнвевера-Бурка:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max} S_0} + \frac{1}{V_{\max}}$$

40 Затем смешивают с субстратом в буферном растворе и определяют спектрофотометрически скорость гидролиза. Концентрацию субстрата (S_0) измеряют, а концентрацию энзима сохраняют постоянной. Затем значения величин, обратных скорости $\frac{1}{V}$, откладывают на графике относительно значений обратной концентрации $\frac{1}{S}$. По полученному графику Лайнвевера-Бурка определяют K_m и $V_{\max}$ (см. таблицу).

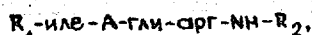
50 Субстрат растворяют в воде до 2 ммоль/л, буфер, энзим и субстрат, смешивают и отсчитывают изменение абсорбируемости ($\Delta OD/\text{мин}$) при 405 нм при 37°C.

Предлагаемый способ с помощью хромогенных субстратов обеспечивает высокую чувствительность и точность определения в течение короткого времени, что позволяет проводить анализ большого количества образцов.

Субстрат	$K_m \cdot 10^4$, моль/л	$V_{max} \cdot 10^8$ моль/мин V	Относительная актив- ность
S-2222	8,3	8,6	100
Пример 1	2,6	8,1	230
Пример 2	2,9	7,5	200
Пример 3	2,1	7,1	220
Пример 6	5,6	20,0	340
Пример 7	1,7	8,6	300

Формула изобретения

Способ определения активности протеаз серина путем воздействия ферментосодержащего материала на энзимный субстрат, отличающийся тем, что, с целью повышения точности способа, в качестве субстрата используют вещество общей формулы



где R_1 - ацил, преимущественно ацетил или бензоил;
иле - изолейцин;
А - аспарагиновая и. глутаминовая кислота, замещенная в карбоксильной группе, образованием сложного эфира с коротким ал-

килом, оксиалкилом, замещенным аминокислотой или циклоалкилом, или амидированием моно- или дивалентным коротким алкилом, оксиалкилом, замещенным аминокислотой или гетероциклической группой, у которой азот амидной группы образует участок пиперидинового морфолинового или пиперазинового кольца;

гли - глицин;
арг - аргинин;

$R_2 = n$ - нитрофенил

Источники информации, принятые во внимание при экспертизе
1. Тейен А.П., Лии М., Абильтгаард У. Исследования в области тромбоза. 1976, 8, 413.

Составитель С. Малютина
Редактор Т. Смирнова Техред И. Асталов

Корректор Г. Решетник

Заказ 2474/50

Тираж 1019

Подписное

ЦНИИПИ Государственного комитета СССР
по делам изобретений и открытий
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4