



УДК 577.152.342 : 547.587.51

© 1991 г.

*В. Ф. Позднев, С. Э. Рабинович, Т. С. Пасхина***НОВЫЕ ДИПЕПТИДНЫЕ ФЛУОРОГЕННЫЕ СУБСТРАТЫ
ТКАНЕВОГО КАЛЛИКРЕИНА ЧЕЛОВЕКА***Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва*

Исходя из 4-метилкумарил-7-амида аргинина и ряда *N*-алкилоксикарбонильных производных фенилаланина синтезировано 11 4-метилкумарил-7-амидов дипептидов типа ROCO-Phe-Arg-Amc (R — алкильный радикал), а также *n*-C₃H₇OCO-Leu-Arg-Amc и *n*-C₃H₇OCO-*D*-Phe-Arg-Amc и изучен их ферментативный гидролиз под действием тканевого и плазменного калликреинов человека. Показано, что Amc-производные с R = *n*-Pr и *n*-Bu, а также *n*-C₃H₇OCO-Leu-Arg-Amc гидролизуются тканевым калликреином значительно эффективнее, чем известные субстраты Z-Phe-Arg-Amc и H-Pro-Phe-Arg-Amc, *n*-C₃H₇OCO-*D*-Phe-Arg-Amc является слабым ингибитором этого фермента ($k_i = 1,5 \cdot 10^{-4}$ М). Плазменный калликреин человека гидролизует новые субстраты с меньшей скоростью, чем Z-Phe-Arg-Amc.

Плазменный (КФ 3.4.21.34) и тканевый (КФ 3.4.21.35) калликреины (кининогеназы) являются ключевыми компонентами регуляторных систем человека, играющих важную роль в обеспечении жизнедеятельности [1, 2]. Оба фермента — сериновые протеиназы. Объединяет их кинингенерирующая активность и некоторое сходство в субстратной специфичности, выражающееся в том, что они гидролизуют связь у карбоксила аргинина. В остальном это разные белки, различающиеся иммунологическими свойствами и отношением к ингибиторам [3, 4].

Определение уровня активности этих ферментов в биологических жидкостях представляет интерес для медицины и используется в клинической диагностике некоторых заболеваний почек, репродуктивной системы, при оценке генезиса гипертонических состояний [2, 5—8]. При этом наиболее надежные результаты дает радиоиммунологический метод, который, однако, довольно сложен в выполнении [9, 10]. Более простой подход основан на определении активности ферментов с использованием синтетических пептидных субстратов, содержащих детекторную группу, удаляемую при протеолизе, в результате чего изменяются спектральные характеристики реакционной среды [11]. Для определения активности плазменного калликреина был предложен Vz-Pro-Phe-Arg-pNA [12], аминокислотная последовательность которого соответствует последовательности Pro-Phe-Arg-Ser в природном субстрате калликреинов (кининогене). Позже оказалось [13], что замена в этом соединении бензоилпролинового фрагмента на *D*-пролин приводит к улучшению субстратных свойств пептида. В это же время Т. Морита и сотр. [14] синтезировали 20 флуорогенных пептидов, содержащих C-концевой 4-метилкумарил-7-амид аргинина (Arg-Amc), и исследовали их в качестве субстратов некоторых протеиназ, в том числе плазменного калликреина из крови быка и тканевого калликреина из мочи человека. Было показано, что H-Pro-Phe-Arg-Amc быстрее других субстратов гидролизуются тканевым калликреином, а для калликреина из плазмы наиболее специфическим субстратом является Z-Phe-Arg-Amc. Эти данные нашли подтверждение в работе [15].

Сокращения: Amc — 7-амино-4-метилкумарин, pNA — *n*-нитроанлилд. Все аминокислоты, кроме особо указанных, *L*-ряда.

**Физико-химические характеристики синтезированных субстратов
ROCO-Aaa-Arg-Amc**

Соединение	R	Aaa	Выход, %	Т. пл., °C	$[\alpha]_D^{20}$, град (с. 0,5, CH ₃ OH)	R_f^*	ВЭЖХ, мин ^{2*}	Брутто-формула ^{3*}
(I)	CH ₃ -	Phe	94	151—152	-23,0	0,45	5,18	C ₃₀ H ₃₂ N ₆ O ₆ ·HBr
(II)	C ₂ H ₅ -	Phe	86	142—144	-24,1	0,53	5,60	C ₃₁ H ₃₄ N ₆ O ₆ ·HBr
(III)	<i>n</i> -C ₃ H ₇ -	Phe	63	139—140	-24,4	0,55	6,30	C ₃₂ H ₃₆ N ₆ O ₆ ·HBr
(IV)	<i>i</i> -C ₃ H ₇ -	Phe	63	149—152	-23,6	0,55	6,16	C ₃₂ H ₃₆ N ₆ O ₆ ·HBr
(V)	<i>n</i> -C ₄ H ₉ -	Phe	45	148—150	-24,2	0,55	7,50	C ₃₃ H ₃₈ N ₆ O ₆ ·HBr
(VI)	<i>s</i> -C ₄ H ₉ -	Phe	53	150—151	-24,8	0,55	7,11	C ₃₃ H ₃₈ N ₆ O ₆ ·HBr
(VII)	<i>t</i> -C ₄ H ₉ -	Phe	50	160—162	-24,0	0,55	7,04	C ₃₃ H ₃₈ N ₆ O ₆ ·HBr
(VIII)	<i>i</i> -C ₄ H ₉ -	Phe	50	148—150	-23,4	0,55	7,15	C ₃₃ H ₃₈ N ₆ O ₆ ·HBr
(IX)	<i>cyclo</i> -C ₆ H ₁₁ -	Phe	72	162—164	-25,4	0,67	9,07	C ₃₅ H ₄₀ N ₆ O ₆ ·HBr
(X)	<i>cyclo</i> -C ₆ H ₉ CH(CH ₃) ^{4*}	Phe	65	150—153	-29,2	0,68	11,07 ^{4*}	C ₃₆ H ₄₂ N ₆ O ₆ ·HBr
(XI)	C ₆ H ₅ CH ₂ (CH ₃) ₂ C-	Phe	73	~130	-35,6	0,68	11,75	C ₃₉ H ₄₂ N ₆ O ₆ ·HBr
(XII)	C ₆ H ₅ CH ₂ -	Phe	80	~150	-27,8	0,67	10,05	C ₃₃ H ₃₆ N ₆ O ₆ ·HBr
(XIII)	<i>n</i> -C ₃ H ₇ -	Leu	51	142—145	-55,4	0,50	6,96	C ₃₀ H ₄₀ N ₆ O ₆ ·HBr
(XIV)	<i>n</i> -C ₃ H ₇ -	<i>D</i> -Phe	66	155—157	-107,8	0,55	6,56	C ₃₂ H ₃₆ N ₆ O ₆ ·HBr

* Условия определения см. в «Экспер. части».

^{2*} Время выхода основного вещества.^{3*} Результаты элементного анализа на C, H, N соответствуют вычисленным значениям.^{4*} (±)-изомер. Второй пик пептида с временем выхода 12,2 мин.

Таблица 2

**Кинетические параметры ферментативного гидролиза соединений
ROCO-Aaa-Arg-Amc и H-Pro-Phe-Arg-Amc (XV)
калликреинами человека**

Соединение	Тканевый калликреин			Плазменный калликреин		
	$K_m \cdot 10^3$, М	V_{max} , мкмоль/ (мин·мг)	$V_{max}/K_m \cdot 10^{-3}$, мл/(мин·мг)	$K_m \cdot 10^3$, М	V_{max} , мкмоль/ (мин·мг)	$V_{max}/K_m \cdot 10^3$, мл/(мин·мг)
(I)	6,2	9,1	146	1,2	10,2	7,2
(II)	5,0	10,2	204	1,5	10,7	8,5
(III)	2,7	9,4	348	1,1	11,2	10,2
(IV)	3,3	10,1	330	1,2	10,6	8,8
(V)	2,3	9,3	382	1,0	11,0	11,0
(VI)	2,3	8,1	352	1,7	8,1	4,9
(VII)	2,1	2,3	112	1,2	3,0	2,4
(VIII)	2,8	10,8	375	1,5	9,5	6,4
(IX)	5,0	6,2	125	0,4	12,4	29,8
(X)	2,5	4,4	176	0,4	11,8	26,8
(XI)	4,5	1,7	38	0,2	3,2	12,0
(XII)	25	3,3	13,4	0,3	12,1	36,3
(XII) [17]	28	1,1	3,96	0,2	11,3	42,7
(XIII)	2,6	5,1	194	—	—	—
(XV)	3,3	5,3	159	0,7	12,9	17,4
(XV) [16]	4,0	—	—	—	—	—

Таким образом, из имеющихся в литературе данных следует, что для определения активности плазменного калликреина пригоден сравнительно доступный в синтетическом отношении Z-Phe-Arg-Amc, а для определения тканевого калликреина предпочтителен Pro-Phe-Arg-Amc, синтез которого заметно сложнее. Поскольку в биологических объектах, доступных для клинического исследования (слезная жидкость, моча, слюна и др.), присутствует преимущественно тканевый калликреин, поиск более простых субстратов этого фермента представляет практический интерес. В связи с этим мы обратили внимание на тот факт, что из дипептидных субстратов для определения калликреинов широко применяется только Z-Phe-Arg-Amc, а другие дипептиды типа ROCO-Phe-Arg-Amc в качестве субстратов этих ферментов не изучались.

С целью поиска более доступных в синтетическом отношении и более избирательных субстратов тканевого калликреина в настоящей работе синтезирована серия Амс-производных дипептидов типа ROCO-Aaa-Arg-Ams (R — алкильный или аралкильный радикал, Aaa — Phe, *D*-Phe или Leu) (табл. 1) и изучен их ферментативный гидролиз под действием калликреинов человека.

Кинетические характеристики ферментативного гидролиза новых соединений и известных субстратов представлены в табл. 2. Видно, что соединения (I)—(XI) гидролизуются тканевым калликреином с более высокой эффективностью, чем трипептидный субстрат (XV) [16], и существенно лучше (примерно на порядок), чем известный дипептидный субстрат Z-Phe-Arg-Ams (XII) [17] (полученные нами кинетические характеристики гидролиза субстрата (XII) достаточно хорошо соответствуют литературным).

Из табл. 2 также следует, что сродство к ферменту у всех новых соединений на порядок выше, чем у дипептида (XII). Максимальная скорость гидролиза изменяется в пределах нескольких единиц в зависимости от строения радикала R блокирующей группировки и снижается при появлении в радикале циклических фрагментов (соединение (IX)), а также при сильном разветвлении (соединение (VII)). При замене фенилаланина на лейцин (соединение (XIII)) V_{\max} уменьшается примерно в 1,5 раза, а пептид с *D*-фенилаланином (XIV) не гидролизуются и является слабым конкурентным ингибитором тканевого калликреина (K_i $1,5 \cdot 10^{-4}$ М) (определено методом Диксона, субстрат — *n*-C₃H₇OCO-Phe-Arg-Ams).

При гидролизе новых соединений плазменным калликреином результаты существенно различаются. Соединения (I)—(VIII), у которых R — простой алкильный радикал, имеют сродство к плазменному калликреину на порядок ниже, чем Z-Phe-Arg-Ams, и оно улучшается при появлении в радикале R ароматических или циклических фрагментов. При этом V_{\max} при гидролизе большинства соединений остается примерно на одном уровне и уменьшается только при разветвлении радикала R . Отмеченная тенденция приводит к тому, что соединения (I)—(VIII), эффективно гидролизующиеся тканевым калликреином, хуже других соединений гидролизуются калликреином плазмы. Это свойство новых соединений может оказаться полезным при использовании их в качестве субстратов тканевого калликреина в клинической диагностике.

Таким образом, среди изученного ряда дипептидов типа ROCO-Phe-Arg-Ams обнаружены соединения с высоким сродством к тканевому калликреину человека, которые гидролизуются им с высокой скоростью и поэтому могут представлять интерес как высокоэффективные флуорогенные субстраты этого фермента.

Экспериментальная часть

В работе использован высокоочищенный препарат тканевого калликреина из мочи человека [4] (уд. акт. 10 мкмоль/мин·мг белка, субстрат — *D*-Val-Leu-Arg-pNa). Плазменный калликреин человека выделяли по методике [18] (уд. акт. 30 мкмоль/мин·мг белка, субстрат — этиловый эфир бензоиларгинина). Содержание белка определяли по методу Лоури [19]. Количество образующегося в результате ферментативной реакции Амс определяли на флуориметре фирмы Opton.

В синтезе соединений (I)—(XI) использовали 4-метилкумарил-7-амид аргинина [20] и *N*-алкилоксикарбонильные производные *L*-фенилаланина [21], которые конденсировали в DMF с помощью дициклогексикарбодиимида в присутствии 1-гидроксибензотриазола. Соединение (XIII) получали аналогично из *n*-пропилоксикарбонил-*L*-лейцина. Очистку целевых продуктов производили хроматографией на силикагеле (элюент — хлороформ, затем хлороформ с 10% метанола) с последующей кристаллизацией из хлороформа с добавлением эфира. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Kieselgel 60 F-254 (Merck, ФРГ) в системе хлороформ — метанол — уксусная кислота, 40 : 10 : 3. Детектиро-

вание производили бензидиновым реактивом после хлорирования и реактивом Сакагучи. Обратенно-фазовую ВЭЖХ осуществляли на колонке (4 × 250 мм) LiChrosorb RP-18, 5 мкм в изократическом режиме. Элюент — метанол — 0,01% трифторуксусная кислота (7 : 3), скорость элюции 1 мл/мин при 18—20° С, детектирование по оптическому поглощению при 226 нм (хроматограф фирмы ЛКВ, Швеция). Оптическую активность измеряли на поляриметре Perkin — Elmer 241 (Англия). Температуры плавления определяли в открытых капиллярах и не исправляли. Н-Pro-Phe-Arg-Амс — фирмы Serva (ФРГ).

Определение характеристик ферментативного гидролиза соединений (I)—(XII). Растворы субстратов, а также Амс (Serva) готовили в минимальном объеме DMF с последующим разведением 0,1 М трис-НСI-буфером, рН 8,0, содержащим 0,15 М NaCl (рабочий буфер), до концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М (концентрация DMF ~ 5%). Последующим разведением рабочим буфером готовили растворы субстратов в интервале концентраций от $1 \cdot 10^{-3}$ до $7,5 \cdot 10^{-6}$ М. Ферментативную реакцию начинали добавлением к раствору субстрата раствора фермента в рабочем буфере (50 мкл раствора тканевого калликреина с содержанием белка 17 мкг/мл или 100 мкл плазменного калликреина, содержащего 0,55 мкг белка). Общий объем реакционной смеси 1 мл, время инкубации 10 мин при 37° С. Реакцию останавливали добавлением 1,5 мл 17% уксусной кислоты и измеряли флуоресценцию Амс при 470 нм (возбуждение при 365 нм). Концентрацию образовавшегося Амс рассчитывали по калибровочному графику (0—12,5 нмоль), кинетические параметры (K_m и V_{max}) — по начальным стационарным скоростям реакции в двойных обратных координатах Лайнуивера—Берка. За единицу удельной ферментативной активности принимали такое количество фермента, которое образует 1 мкмоль Амс в 1 мин на 1 мг белка.

Выражаем благодарность В. Ф. Нартиковой за предоставление препарата плазменного калликреина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пасхина Т. С. // Вестн. АМН СССР. 1982. № 9. С. 50—56.
2. Schachter M. // Pharmacol. Rev. 1980. V. 30. № 1. P. 1—17.
3. Geiger R., Stuckstedte U., Fritz H. // Hoppe — Seyler's Z. physiol. Chem. 1980. B. 361. № 7. S. 1003—1016.
4. Рабинович С. Э., Лобарева Л. С., Пасхина Т. С. // Биохимия. 1990. Т. 55. № 9. С. 1675—1688.
5. Fink E., Shill W. B., Fiedler F., Krassing F., Geiger R., Shimamoto K. // Biol. Chem. Hoppe — Seyler. 1985. V. 366. № 9. P. 917—924.
6. Mitas J. A., Levy S. B., Holle R., Frigon R. P., Stone R. A. // New Engl. J. Med. 1978. V. 299. № 4. P. 162—165.
7. Witt I., Koeppen H., Haster K. // Fresenius Z. Anal. Chem. 1978. B. 290. № 1. S. 104—105.
8. Киселев В. И., Куликов В. П. // Лабор. дело. 1988. № 7. С. 27—32.
9. Fink E., Seifert J., Guttel C. // Fresenius Z. Anal. Chem. 1978. B. 290. № 2. S. 183.
10. Fink E., Guttel Ch. // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1978. V. 16. № 2. P. 381—385.
11. Claesson C., Aurell L. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1981. V. 370. P. 798—811.
12. Amundsen E., Svendsen L., Vennerød M., Laake K. // Chemistry and Biology of the Kallikrein-Kinin System in Health and Disease/Eds J. J. Pisano, K. F. Austen. Washington D. C. P.: Fogarty International Center Proceedings. US Government Printing Office, 1976. № 27. P. 215—220.
13. Claesson F., Aurell L., Friberger P., Gustavsson S., Karlsson G. // Haemostasis. 1978. V. 7. № 1. P. 62—68.
14. Morita T., Kato H., Ivanaga S., Takada K., Kimura T., Sakakibara S. // J. Biochem. 1977. V. 82. № 5. P. 1495—1498.
15. Nagase H., Barrett A. J. // Biochem. J. 1981. V. 193. № 1. P. 187—192.
16. Morichi S., Sako E., Hasegawa E., Suyama T., Moriya H. // Chem. Pharm. Bull. 1984. V. 32. № 3. P. 1152—1162.
17. Ivanaga S., Morita T., Kato H., Harada T., Adochi N., Sugo T., Maruyama I., Takada K., Kimura T., Sakakibara S. // Adv. exp. med. biol. 1979. V. 120A. P. 147—163.
18. Нартикова В. Ф., Егорова Т. П., Реу Е. В., Пасхина Т. С. // Биохимия. 1986. Т. 51. № 3. С. 463—471.
19. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265—275.

20. Позднев В. Ф., Рабинович С. Э., Пасхина Т. С. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 5. С. 590—594.
21. Позднев В. Ф., Елисеева Ю. Е., Павлихина Л. В., Орехович В. Н. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 2. С. 232—236.

Поступила в редакцию
6.III.1991

V. F. POZDNEV, S. E. RABINOVICH, T. S. PASHINA
NEW DIPEPTIDE FLUORIGENIC SUBSTRATES OF HUMAN
TISSUE KALLIKREIN

*Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR,
Moscow*

Based on 4-methylcoumarinyl-7-amide (Amc) arginine and a series N-alkyloxycarbonyl derivatives of phenylalanine, eleven Amc-derivatives of the type ROCO-Phe-Arg-Amc (R = alkyl) were synthesized; also were *n*-C₃H₇OCO-Leu-Arg-Amc and *n*-C₃H₇OCO-*D*-Phe-Arg-Amc synthesized. The enzymatic hydrolysis of these compounds under the action of tissue and plasma human kallikreins were studied. Tissue kallikrein from human urine hydrolyzed the compounds with R = *n*-propyl and *n*-butyl and *n*-C₃H₇OCO-Leu-Arg-Amc more readily than the known substrates Z-Phe-Arg-Amc and H-Pro-Phe-Arg-Amc. *n*-C₃H₇OCO-*D*-Phe-Arg-Amc is a weak inhibitor of this enzyme ($K_1 = 1,5 \cdot 10^{-4}$ M). Human plasma kallikrein hydrolyzed these novel substrates at a lower rate than Z-Phe-Arg-Amc.