



УДК 577.152.342'135:547.964.4.07

ВЛИЯНИЕ СТРОЕНИЯ АЛКИЛЬНОГО РАДИКАЛА УРЕТАНОВОЙ БЛОКИРУЮЩЕЙ ГРУППИРОВКИ ТРИ- И ТЕТРАПЕПТИДНЫХ СУБСТРАТОВ НА ИХ РАСЩЕПЛЕНИЕ КАРБОКСИКАТЕПСИНОМ

Позднев В. Ф., Елисеева Ю. Е., Павлихина Л. В.,
Орехович В. П.

*Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Изучено влияние строения алкильного радикала уретановой группировки и трипептидов ROCO-Phe-His-Leu-OH и тетрапептидах типа Вос-X-Phe-His-Leu-OH (где X — остаток Pro или Phe) на расщепление их дипептидилкарбоксипептидазой, выделенной из почек быка. Обнаружено, что увеличение разветвленности алкильного радикала защитной группировки замедляет расщепление трипептидных субстратов ферментом. Относительная скорость гидролиза Z- и Вос-производных трипептидов α -химотрипсином не зависит от строения алкильного радикала защитной группировки. В N^α-защищенных тетрапептидах замедляющее влияние Вос-группы обнаруживается у субстрата с N-концевым пролином.

Дипептидилкарбоксипептидаза (карбоксикатепсин КФ 3.4.15.1) — фермент, участвующий в регуляции кровяного давления путем превращения ангиотензина I в ангиотензин II и инактивации брадикинина [1, 2]. Важная физиологическая роль карбоксикатепсина обуславливает интенсивное изучение его субстратной специфичности. Известно, что этот фермент отщепляет дипептидные фрагменты с C-конца пептидных субстратов со свободной α -карбоксильной группой [4]. Строение аминокислотных остатков в отщепляемом дипептиде оказывает существенное влияние на процесс фермент-субстратного взаимодействия, причем дипептиды с C-концевыми дикарбоновыми кислотами или с пролином в предпоследнем положении не отщепляются карбоксикатепсином [4]. Выяснению влияния строения C-концевого дипептида субстрата на процесс взаимодействия с ферментом посвящено большое число работ [1, 3–8].

Другой особенностью карбоксикатепсина является его способность гидролизовать только пептиды, содержащие не менее трех аминокислотных остатков, причем α -аминогруппа N-концевого остатка трипептида должна быть ацилирована [9]. Ацилирующий фрагмент может быть пептидом [1, 2, 10], аминокислотой [3, 9], карбоновой кислотой [3, 11] или уретановой группировкой [12]. Однако влияние природы и строения N-концевой части субстрата на взаимодействие с ферментом изучено менее подробно, чем влияние C-концевого дипептида. В этом плане безусловный интерес представляет работа [10], авторы которой, изучив гидролиз $[Phe(NO_2)]^7$ -ангиотензина I и ряда пептидов, соответствующих его C-концевым фрагментам, карбоксикатепсином из легких кролика, нашли, что замена остатка Pro⁶ в изученных аналогах гормона на бензилоксикарбонильную группу заметно влияет на расщепляемость пептидной связи карбоксикатепсином. Для всех изученных пептидов они обнаружили прямую зависимость между величиной K_m и скоростью гидролиза, но защищенный трипептид Z-Phe(NO₂)-His-Leu-OH не подчиняется этой зависимости, что авторы объясняют специфическим влиянием бензилоксикарбонильной группировки. Влияние строения концевой N^α-блокирующей группировки трипептидов на их расщепляемость карбоксикатепсином систематически никем не изучалось. Между тем этот вопрос представляет не только теоретический, но и определенный практический интерес, так как различные N^α-защищенные трипептиды широко применяются в качестве субстратов при опре-

делении активности карбоксикатапсина в научной и медицинской практике [6, 11, 13–15]. Это побудило нас подробнее изучить влияние строения алкильного радикала уретановой группировки в трипептидах ROCO-Phe-His-Leu-OH (см. табл. 1) на расщепление их карбоксикатапсином, выделенным из почек быка. Необходимые трипептиды были синтезированы исходя из N-оксисукцинимидных эфиров соответствующих алкил-оксикарбонильных производных фенилаланина (I)–(VII) и метиловых эфиров гистидиллейцина (см. «Экспериментальную часть»).

Работа была построена таким образом, что, проводя реакцию ферментативного гидролиза субстратов в пределах 2–10%, скорость расщепления исследуемого субстрата (при $[S] > K_m$) в каждом опыте сравнивали со

Таблица 1

Характеристики и данные ферментативного гидролиза синтезированных субстратов ROCO-X-Phe-His-Leu-OH

Соединение	R	X	Метод синтеза *	Выход, %	Т. пл., °C	$[\alpha]_D^{20}$ (с 1, DMF)	Относительная скорость ферментативного гидролиза
(VIII)	$C_3H_7-CH_2-$	—	A	90	211–212	–15,2	1,0
(IX)	<i>t</i> - C_4H_9-	—	B	61	200–201	–15,9	0,05
(X)	$C_6H_5-CH_2C(CH_3)_2-$	—	B	63	145–150	–20,0	0,16
(XI)	<i>s</i> - C_4H_9-	—	A	89	218–220	–15,0	0,36
(XII)	<i>i</i> - C_3H_7-	—	A	36	212–213	–17,5	0,42
(XIII)	<i>t</i> - C_4H_9-	—	B	53	184–185	–15,5	0,53
(XIV)	<i>cyclo</i> - $C_6H_{11}-$	—	A	90	213–217	–15,4	0,70
(XV)	CH_3-	—	B	55	240–241	–15,0	0,36
(XVI)	C_2H_5-	—	B	52	215–217	–16,7	0,65
(XVII)	<i>n</i> - C_3H_7-	—	B	75	221–222	–16,7	0,84
(XVIII)	<i>n</i> - C_4H_9-	—	A	65	210–212	–16,6	0,83
(XIX) [26]	$C_6H_5-CH_2-$	Pro	B	64	193–196	–44,2	0,40
(XX)	<i>t</i> - C_4H_9-	Pro	B	68	169–170	–38,4	0,10
(XXI)	<i>t</i> - C_4H_9-	Phe	B	79	190–193	–17,2	1,0

* См. «Экспериментальную часть».

скоростью гидролиза Z-Phe-His-Leu-OH (VIII), которую принимали за 1,0.

Полученные результаты убедительно свидетельствуют (табл. 1), что строение алкильного радикала уретановой группировки существенно влияет на субстратные свойства ацилированных трипептидов. Прежде всего обращает на себя внимание тот факт, что замена бензильного остатка в уретановой группировке на алкильную группу нормального строения (соединения (XVI)–(XVIII)) несколько снижает расщепляемость субстрата. Для соединения с метильной группой (XV) относительная скорость расщепления составляет только 0,36. Эти данные, по-видимому, свидетельствуют о влиянии гидрофобности уретановой группировки на расщепление трипептидов. Затем следует отметить, что разветвление алкильной группы также замедляет расщепление субстрата. Трипептиды с изопропил- и изобутилоксикарбонильными группировками (соединения (XII), (XIII)) расщепляются карбоксикатапсином примерно вдвое, а трипептид с *втор*-бутилоксикарбонильной группой (XI) — в 3 раза медленнее, чем пептид сравнения (VIII). Расщепляемость соединения с циклогексанокарбонильной группировкой (XIV) повышается до 0,7, что отражает как большую компактность, так и большую гидрофобность циклогексильного радикала. Дальнейшее увеличение разветвленности алкильного остатка, т. е. переход к субстратам с *трет*-алкильными группами, резко снижает их подверженность гидролизу под действием карбоксикатапсина. Так, трипептид (IX) расщепляется только на 5% по сравнению со стандартом. Введение фенильного радикала в *трет*-бутильную группу (соединение (X)) увеличивает относительную скорость гидролиза пептида до 16%, и эта величина показывает, что расщепляемость субстрата опреде-

ляется главным образом разветвленностью радикала уретановой группировки, а гидрофобность ее в данном случае играет второстепенную роль.

В этой связи интересно сравнить полученные нами результаты с данными работы [16], в которой в качестве субстрата карбоксикатепсина наряду с другими пептидами использован $\text{Boc-Phe(NO}_2\text{)-Phe-Gly-OH}$. Приведенное для этого субстрата значение скорости гидролиза можно сопоставить со способностью к расщеплению Z-Phe-His-Leu-OH (VIII) через данные работы [5], позволяющие учесть различие аминокислотного состава сравниваемых пептидов и неидентичность использованных ферментных препаратов. В результате такого сопоставления получается, что $\text{Boc-Phe(NO}_2\text{)-Phe-Gly-OH}$ расщепляется примерно в 10 раз медленнее, чем пептид (VIII), и таким образом можно считать, что данные работы [16] косвенно подтверждают наблюдаемое нами ослабление расщепления трипептидных субстратов с N-*Boc*-защитной группировкой.

По-видимому, обнаруженное явление отражает специфику строения активного центра карбоксикатепсина. Подтверждением этому служат полученные нами данные об одинаковой скорости гидролиза пептида (VIII) и его N-*Boc*-аналога α -химотрипсином.

Удаление *tert*-бутильной группы от расщепляемой связи в тетрапептиде с $\text{Boc-Phe-Phe-His-Leu-OH}$ (соединения (XXI) в табл. 1) полностью снимает ее влияние на взаимодействие субстрата с ферментом, и он гидролизует с такой же скоростью, что и трипептид (VIII).

Однако тетрапептид с *tert*-бутилоксикарбонилпролином (соединение (XX), табл. 1) гидролизует карбоксикатепсином также очень слабо, примерно в 10 раз медленнее по сравнению с (VIII). Аналогичный тетрапептид с Z-группой (соединение (XIX)) гидролизует лучше, но все же вдвое медленнее, чем (VIII). По-видимому, специфическое строение пролина обуславливает такое расположение уретановой группировки в тетрапептидах (XIX) и (XX), при котором она экранирует расщепляемую связь, причем у пептида с *Boc*-группировкой это экранирование значительно больше. Такое замедление скорости гидролиза карбоксикатепсином субстратов с разветвленными алкильными группами вблизи расщепляемой связи безусловно существенно для более глубокого понимания механизма действия этого фермента.

Полученные нами результаты представляют интерес для лабораторной и медицинской практики. С их помощью исследователи получают возможность лучше ориентироваться в выборе аминоклокирующей группировки при синтезе субстратов для изучения карбоксикатепсина. В частности, хотя *Boc*-группа находит все более широкое применение при синтезе пептидов, использование *Boc*-защищенных трипептидов в качестве субстратов данного фермента, по-видимому, нецелесообразно. С другой стороны, тетрапептиды с *Boc*-защитой могут оказаться более подходящими субстратами, чем N $^{\alpha}$ -защищенные трипептиды, так как в некоторых случаях они при равных других условиях обладают лучшей растворимостью в буферных растворах.

Экспериментальная часть

Карбоксикатепсин выделяли из коры почек быка по методу, описанному ранее [4]. Гидролиз пептидов карбоксикатепсином и α -химотрипсином контролировали по освобождению гистидиллейцина, количество которого оценивали флуориметрическим методом [4]. Пептиды ($2 \cdot 10^{-4}$ М) инкубировали с карбоксикатепсином при 37° С в 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 7,4, содержащем 0,2 М NaCl, в присутствии 5% метанола. Скорость расщепления исследуемых субстратов в каждом опыте сравнивали со скоростью расщепления Z-Phe-His-Leu-OH , принимая ее за 1,0.

Гидролиз пептидов α -химотрипсином (фирмы Koch-Light, Англия, дважды кристаллизованный) осуществляли в 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 7,4, содержащем 0,2 М NaCl. Концентрация химотрипсина в пробе $5 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-6}$ и $5 \cdot 10^{-6}$ М. Концентрация субстрата $5 \cdot 10^{-5}$ М. Время инкубации 20 мин.

Характеристики синтезированных алкилоксикарбонильных производных фенилаланина (ROCO-Phe-OH)

Соединение	R	Выход, %	Т. пл., °C	$[\alpha]_D^{20}$ (с 1, DMF)
(I)	C ₂ H ₅	80	78–79	-26,8
(II)	<i>n</i> -C ₃ H ₇	85	53–54	-24,0
(III)	<i>i</i> -C ₃ H ₇	81	75–77	-24,4
(IV)	<i>n</i> -C ₄ H ₉	81	57–59	-25,5
(V)	<i>s</i> -C ₄ H ₉	81	82–83	-23,9
(VI)	<i>i</i> -C ₄ H ₉	70	84–85	-25,0
(VII)	<i>cyclo</i> -C ₆ H ₁₁	63	63–64	-22,5

Субстраты. В синтезе субстратов использовали *L*-аминокислоты производства фирмы Reanal (Венгрия). Все синтезированные соединения гомогенны при хроматографировании в тонком слое силикагеля (Silufol) и охарактеризованы элементным анализом на C, H, N, результаты которого соответствовали вычисленным значениям. Углы оптического вращения определены на поляриметре Perkin-Elmer 241 (США), температуры плавления измерены в открытых капиллярах и не исправлены.

Алкилоксикарбонильные производные фенилаланина (табл. 2) получали ацилированием фенилаланина алкилоксикарбонилхлоридами [17, 18] (соединения (II), (IV), (VI)) или диалкилпирокарбонатами [19–21] (соединения (I), (III), (V), (VII)) в водном диоксане в присутствии карбоната калия и перекристаллизовывали из смеси эфира с гексаном. Метиллоксикарбонилфенилаланин получен в виде некристаллизующегося масла [22]. 1-Бензил-1-метил-этилоксикарбонильное производное фенилаланина, используемое в синтезе трипептида (X), описано ранее [21]. Бензилоксикарбонильные производные пролина и фенилаланина, а также *трет*-бутилоксикарбонилпролин — коммерческие препараты фирмы Reanal. *N*-Оксисукцинимидные эфиры *N*^α-защищенных фенилаланина и пролина получены по методу [23]. Синтез *N*^α-ацилированных три- и тетрапептидов (табл. 1) осуществлен конденсацией *N*-оксисукцинимидных эфиров защищенных аминокислот с метиловыми эфирами гистидиллейцина или фенилаланил-гистидил-лейцина с последующим омылением эфиров раствором NaOH в водном метаноле (метод А) или со свободными гистидиллейцином и фенилаланил-гистидил-лейцином в водном диметилформамиде в присутствии K₂CO₃ (метод Б). Методы получения гистидиллейцина, хлоргидрата его метилового эфира и бензилоксикарбонилфенилаланил-гистидил-лейцина опубликованы ранее [24]. Свободный фенилаланил-гистидил-лейцин [25] получали обработкой его *N*-бензилоксикарбонильного производного (VIII) раствором бромистого водорода в уксусной кислоте с последующим выделением свободного пептида из дибромгидрата водным раствором аммиака. После промывок водным изопропиловым спиртом, сухим спиртом, эфиром и высушивания в вакууме получали продукт с т.пл. 215–217° С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Елисева Ю. Е., Орехович В. Н., Павлихина Л. В., Алексеенко Л. П. *Вопр. мед. химии*, 1970, т. 16, № 6, с. 646–649.
2. Soffer R. L. *Ann. Rev. Biochem.*, 1976, v. 45, p. 73–94.
3. Das M., Soffer R. L. *J. Biol. Chem.*, 1975, v. 250, № 17, p. 6762–6768.
4. Елисева Ю. Е., Орехович В. Н., Павлихина Л. В. *Вопр. мед. химии*, 1976, т. 22, № 1, с. 81–89.
5. Stevens R. L., Micalizzi E. R., Fessler D. C., Pals D. T. *Biochemistry*, 1972, v. 11, № 16, p. 2999–3007.
6. Bünning P., Holmquist B., Riordan J. F. In: *Biological Function of Proteinases* / Eds Holzer H., Tchesche H. Berlin – Heidelberg – New York: Springer Verlag, 1979, p. 269–275.
7. Елисева Ю. Е., Павлихина Л. В., Позднев В. Ф., Орехович В. Н. *Докл. АН СССР*, 1980, т. 254, № 6, с. 1476–1478.
8. Cheung H.-S., Wang F.-S., Ondetti M. A., Sabo E. F., Cushman D. W. *J. Biol. Chem.*, 1980, № 2, p. 401–407.

9. *Angus C. W., Lee H.-J., Wilson I. B.* Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 309, p. 169-174.
10. *Massey T. H., Fessler D. C.* Biochemistry, 1976, v. 15, № 22, p. 4906-4912.
11. *Ryan J. W., Chung A., Ryan U. S.* Environm. Health Perspectives, 1980, v. 35, p. 165-170.
12. *Piquilloud Y., Reinharz A., Roth M.* Biochim. et biophys. acta, 1970, v. 206, № 1, p. 136-142.
13. *Patel R., Ansari A.* Clin. chim. acta, 1979, v. 92, № 3, p. 491-495.
14. *Oparyl S., Koerner T. J., Lindheimer M. D.* J. Clin. Endocrinol. and Metabol., 1978, v. 46, № 3, p. 434-439.
15. *Орехович В. Н., Малая Л. Т., Павлихина Л. В., Елисеева Ю. Е., Лазорева С. А., Калимбуренко Л. Г.* В кн.: Инфаркт миокарда. Харьков: Мед. ин-т, 1977, с. 27-34.
16. *Oshima G., Gecse A., Erdös E. G.* Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 350, № 1, p. 26-37.
17. *Boissonas R. A., Pretner G.* Helv. chim. acta, 1953, v. 36, № 4, p. 875-886.
18. *McKay F. C., Albertson N. F.* J. Amer. Chem. Soc., 1957, v. 79, № 17, p. 4686-4694.
19. *Rosnati L.* Bull. Soc. chim. France, 1964, № 7, p. 1542.
20. *Позднеев В. Ф.* Химия природн. соедин., 1974, № 6, с. 764-767.
21. *Позднеев В. Ф., Смирнова Е. А.* Химия природн. соедин., 1978, № 3, с. 421-423.
22. *Guillot-Edelheit G., Laloi-Diard M., Guibe-Jampel E., Wakselman M.* J. Chem. Soc. Perkin Trans., 2, 1979, N 8, p. 1923-1928.
23. *Anderson G. W., Zimmerman J. E., Callahan F. M.* J. Amer. Chem. Soc. 1964, v. 86, N 9, p. 1839-1842.
24. *Позднеев В. Ф., Долинская С. И., Уварова Н. Н., Чаман Е. С.* Химия природн. соедин., 1975, № 5, с. 637-642.
25. *Ide A., Shigezane K., Shigezane T., Mizoguchi T., Sato S.* J. Pharm. Soc. Jap., 1970, v. 90, № 7, p. 850-858.
26. *Reinharz A., Roth M.* Eur. J. Biochem., 1969, v. 7, № 3, p. 334-339.

Поступила в редакцию
15.VII.1982

**EFFECT OF THE ALKYL RADICAL STRUCTURE IN THE URETHANE
BLOCKING GROUP ON SPLITTING OF TRI- AND TETRAPEPTIDE
SUBSTRATES BY CARBOXYCATHEPSIN (DIPEPTIDYL CARBOXYPEPTIDASE)**

POZDNEV V. F., ELISEEVA Yu. E., PAVLIKHINA L. V.,
OREKHOVICH V. N.

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

The effect of structure of alkyl radical of the urethane blocking group in the tripeptides ROCO-Phe-His-Leu-OH and in the tetrapeptides of the type Boc-X-Phe-His-Leu-OH (where X is either proline or phenylalanine residue) on the splitting of these peptides by bovine kidney dipeptidyl carboxypeptidase (DCP) was studied. The increase in branching of the alkyl radical was found to lower the splitting rate of the tripeptide substrates. The relative rate of splitting of tripeptides benzyloxycarbonyl and *tert*-butyloxycarbonyl derivatives by α -chymotrypsin did not depend on the structure of the blocking group alkyl radical. In N^z-protected tetrapeptides, the rate-decreasing effect of the Boc-group was only observed for the substrate with the N-terminal proline.