



УДК 546.100.02.3:547.15/17

УСТОЙЧИВОСТЬ HIS-PHE-ARG-TRP-PRO-GLY-PRO К ДЕЙСТВИЮ ЛЕЙЦИНАМИНОПЕПТИДАЗЫ, КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Y И ФЕРМЕНТНЫМ СИСТЕМАМ НАЗАЛЬНОЙ СЛИЗИ, КРОВИ И ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫС

© 2016 г. К. В. Шевченко*, #, С. А. Дулов**, Л. А. Андреева*, И. Ю. Нагаев*,
В. П. Шевченко*, А. С. Радилов**, Н. Ф. Мясоедов*

*ФГБУН Институт молекулярной генетики Российской академии наук (ИМГ РАН),
123182 Москва, пл. Курчатова, 2, факс: (499) 196-02-21

**ФГУП “НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека” Федерального медико-биологического агентства,
188663 Ленинградская область, Всеволожский район, п/о Кузьмовский,
ст. Капитолово, корп. № 93, факс: (812) 449-61-77

Поступила в редакцию 20.04.2015 г. Принята к печати 16.09.2015 г.

Синтезирован His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro (АСТН-(6-9)-PGR). Проведено сравнение гидролиза пептидов АСТН-(6-9)-PGR и семакса (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) лейцинаминопептидазой и карбоксипептидазой Y. Оказалось, что если гидролиз АСТН-(6-9)-PGR определяется действием лейцинаминопептидазы, то главным продуктом является Trp-Pro-Gly-Pro. Идентификация основных продуктов гидролиза АСТН-(6-9)-PGR указанными ферментами *in vitro* и исследование кинетики их образования сделало возможным оценить направления расщепления АСТН-(6-9)-PGR и наработать необходимые количества промежуточных пептидов для дальнейшего использования их в качестве стандартов. Исследована кинетика деградации АСТН-(6-9)-PGR в присутствии ферментов назальной слизи, крови и плазмы крови. Установлено, что в крови и плазме крови гидролиз АСТН-(6-9)-PGR происходит преимущественно под действием ферментов, действие которых аналогично действию лейцинаминопептидазы.

Ключевые слова: семакс, АСТН-(6-9)-PGR, лейцинаминопептидаза, карбоксипептидаза Y, деградация пептидов, ферменты назальной слизи, крови и плазмы крови.

DOI: 10.7868/S0132342316020123

ВВЕДЕНИЕ

В качестве пептидов, которые по своей ноотропной и нейропротективной активности не уступали бы семаксу, испытывали различные фрагменты АСТН: АСТН-(7-10)-PGR – Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹-Gly¹⁰-Pro-Gly-Pro, АСТН-(4-10)-PGR – Met⁴-Glu⁵-His⁶-Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹-Gly¹⁰-Pro-Gly-Pro, АСТН-(6-9)-PGR – His⁶-Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹-Pro-Gly-Pro и АСТН-(5-7)-PGR – Glu⁵-His⁶-Phe⁷-Pro-Gly-Pro [1]. Эксперименты на животных показали, что особенно успешным с точки зрения биологических свойств оказался АСТН-(6-9)-PGR. Этот пептид не только проявлял ноотропную и ангиолитическую активности, но также увеличивал жизнеспособность культивируемых клеток глии,

полученных из коры больших полушарий мозга крыс с ишемическим повреждением мозга. При исследовании влияния АСТН-(6-9)-PGR на размер некротического очага у крыс оказалось, что данный пептид, как и семакс, уменьшает размер некроза при развитии ишемического инсульта у крыс приблизительно на 50%.

Препараты, которые планируется использовать в качестве лекарственных средств, должны проходить многоплановое исследование. Одной из стадий этого исследования является проверка их устойчивости к действию протеолитических ферментов [2, 3]. В этой связи необходимо определить устойчивость АСТН-(6-9)-PGR к действию протеолитических ферментов, основные пути его ферментативного гидролиза и наработать промежуточные продукты расщепления этого пептида для использования в качестве стандартов.

Это связано с тем, что при разных способах введения из исходных пептидов образуется раз-

Сокращения: АСТН – адренкортикотропный гормон, PGR – Pro-Gly-Pro.

Автор для связи (тел.: (499) 196-02-16; факс: (499) 196-02-16; эл. почта: ATRegister@mail.ru).

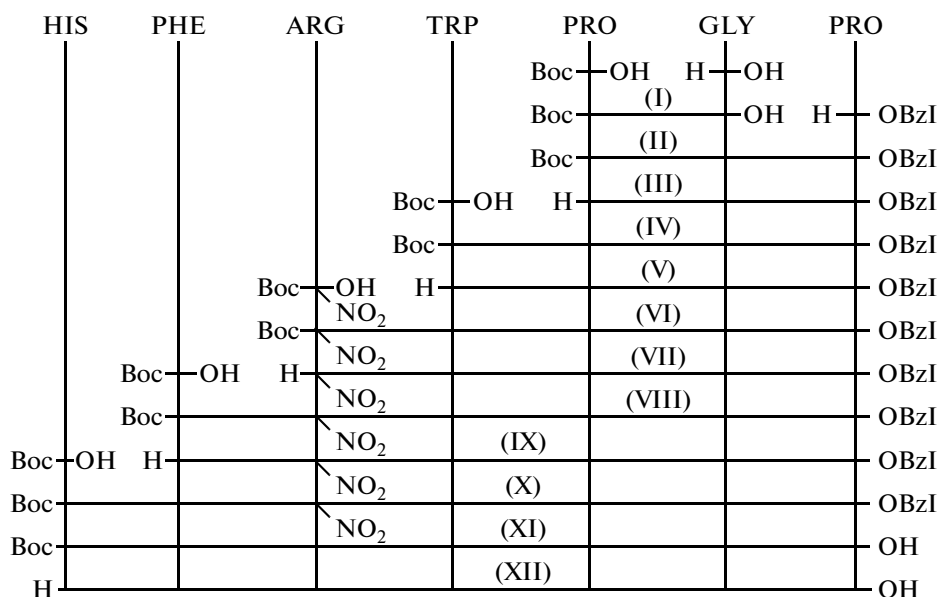


Схема 1. Схема синтеза гептапептида АСТН-(6-9)-PGP.

ный набор продуктов гидролиза, а известно, что образующиеся более короткие пептиды часто имеют собственную биологическую активность. Следовательно, это обстоятельство тоже нужно учитывать при выборе того или иного метода введения препарата. В качестве примера можно привести данные о метаболизме Pro-Gly-Pro-Leu, при разных способах введения которого содержание Gly-Pro может различаться почти в 3 раза [4]. А Gly-Pro обладает выраженным протекторным действием, предотвращает повышение тревожности и снижение уровня ориентировочно-исследовательской активности [5]. Так как АСТН-(6-9)-PGP планируется вводить в живой организм внутривенно и интраназально, кинетику его деградации определяли, используя ферменты назальной слизи, крови и плазмы крови.

Преимуществами интраназального введения являются неинвазивность, безболезненность, простота и удобство применения. Но при таком способе введения необходимо учитывать ферментативный барьер, предназначение которого предотвращать проникновение посторонних веществ в организм через носовую полость [6–8]. В то же время при низкой устойчивости препарата в крови интраназальное введение может обеспечить высокую биодоступность лекарственного вещества.

Целью данной работы является синтез и исследование гидролиза АСТН-(6-9)-PGP лейцинаминопептидазой (К.Ф. 3.4.11.2) и карбокси-пептидазой Y (К.Ф. 3.4.16.1). Исследование кинетики расщепления АСТН-(6-9)-PGP ферментами назальной слизи, крови, плазмы крови и определение набора образующихся пептидных фрагментов позволит выявить направление деградации АСТН-(6-9)-PGP в организме. Для сравнения ис-

пользовали семакс, так как его деградация под действием указанных выше ферментов хорошо была нами изучена ранее [9, 10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гидролиз АСТН-(6-9)-PGP с использованием коммерческих ферментов проводили для того, чтобы составить представление о том, какие ферменты определяют эффективность деградации АСТН-(6-9)-PGP и какой набор промежуточных пептидов образуется в реакционной смеси. На первый вопрос могут ответить форма кинетических кривых, получаемых в присутствии лейцинаминопептидазы и карбокси-пептидазы Y. На второй вопрос можно ответить, анализируя состав реакционных смесей, которые образовались под действием ферментов.

Для проведения вышеозначенных исследований сначала нами был синтезирован исходный пептид АСТН-(6-9)-PGP. Синтез этого пептида осуществляли методами классической пептидной химии в растворе с использованием как защищенных, так и свободных L-аминокислот по схеме 1. При синтезе пептидов, обозначенных на схеме, применяли метод смешанных ангидридов, карбодиимидный метод с добавлением 1-гидроксибензотриазола и метод активированных эфиров. Защитные группы с синтезированных пептидов удаляли гидролизом в токе сухого водорода с добавлением палладиевой черни (OBzI – бензиловый эфир) или гидролизом трифторуксусной кислотой (Boc – *tert*-бутилоксикарбонильная защита). NO₂-производное Arg превращали в Arg в условиях, аналогичных условиям удаления OBzI-группы. Полученный АСТН-(6-9)-PGP и другие объекты оха-

рактированы с использованием хромато-масс-спектрометрического метода (рис. 1).

Кинетические данные по гидролизу АСТН-(6-9)-PGP и семакса лейцинаминопептидазой и карбоксипептидазой Y приведены на рис. 2.

Как и можно было ожидать, устойчивость АСТН-(6-9)-PGP и семакса к воздействию лейцинаминопептидазы различаются (их терминальные аминокислотные остатки гистидин и метионин разные, рис. 2а), а при использовании карбоксипептидазы Y их деградация происходит с одинаковой скоростью (С-концевой, глипролиновый фрагмент этих пептидов одинаков, рис. 2б). То обстоятельство, что скорость деградации семакса карбоксипептидазой Y после 60 минуты становится меньше, чем скорость деградации АСТН-(6-9)-PGP, дает основания предположить, что в присутствии продуктов расщепления указанных выше пептидов происходит модификация фермента, что приводит к большему замедлению гидролиза семакса, чем АСТН-(6-9)-PGP.

Хроматомасс-спектрометрический анализ реакционных смесей при инкубации АСТН-(6-9)-PGP с лейцинаминопептидазой и карбоксипептидазой Y во времени позволил изучить кинетику изменения содержания промежуточных продуктов расщепления под действием этих коммерческих экзопептидаз и определить основные пути деградации АСТН-(6-9)-PGP (рис. 3).

После анализа реакционных смесей можно сделать следующие выводы. Достижение максимальных концентраций промежуточных продуктов разнесено во времени. Так, при гидролизе АСТН-(6-9)-PGP лейцинаминопептидазой максимум содержания Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro наблюдается на 90 минуте, а Trp-Pro-Gly-Pro и Arg-Trp-Pro-Gly-Pro – на 180 минуте. Последнее обстоятельство показывает, что Arg-Trp-Pro-Gly-Pro и Trp-Pro-Gly-Pro образуются из Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro, причем отщепление фенилаланина происходит менее эффективно, чем последующее отщепление Arg (схема 2).

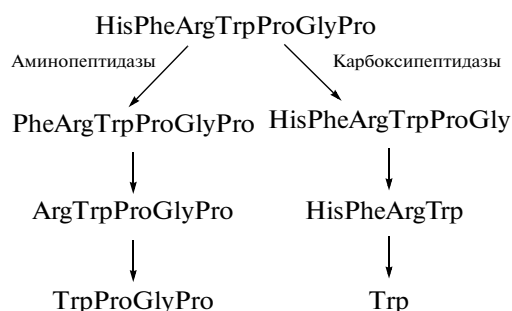


Схема 2. Образование продуктов гидролиза АСТН-(6-9)-PGP под действием протеаз.

Из приведенных данных видно, что наиболее устойчивым в присутствии лейцинаминопепти-

дазы оказывается Trp-Pro-Gly-Pro, далее следуют Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro и Arg-Trp-Pro-Gly-Pro. При этом необходимо отметить, что прочность связи His-Phe, Phe-Arg и Trp-Pro в этих условиях выше, чем связи Arg-Trp – это связано с субстратной специфичностью лейцинаминопептидазы. Arg-Trp-Pro-Gly-Pro – наиболее приемлемый (и конформационно и по заряду) для этого фермента субстрат, поэтому его гидролиз происходит очень быстро, а расщепление связей His-Phe и Phe-Arg связей в исходном и производном пептидах является лимитирующими стадиями для последующего гидролиза (рис. 2а и 3а). Поэтому максимальное количество Arg-Trp-Pro-Gly-Pro в инкубационной среде не достигает и 9%, в то время как для Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro и Trp-Pro-Gly-Pro эти значения составляют 30 и 40% соответственно.

При исследовании гидролиза пептидных связей с С-конца в АСТН-(6-9)-PGP карбоксипептидазой Y мы установили отщепление только одного С-концевого Pro (рис. 3б). Наибольшая устойчивость в присутствии карбоксипептидазы Y оказалась у His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly.

Следовательно, можно ожидать, что, если гидролиз АСТН-(6-9)-PGP определяется действием лейцинаминопептидазы, то основным продуктом расщепления будет пептид Trp-Pro-Gly-Pro. Аналогично, гидролиз АСТН-(6-9)-PGP карбоксипептидазой Y будет приводить, в основном, к появлению пептида His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly (схема 2). Для моделирования реальной деградации АСТН-(6-9)-PGP в природных объектах было проведено дополнительное исследование, смысл которого заключался в том, чтобы иметь все возможные продукты ферментативного гидролиза АСТН-(6-9)-PGP. Для этого (первое направление эксперимента) сначала АСТН-(6-9)-PGP подвергали гидролизу лейцинаминопептидазой, затем фермент дезактивировали, полученную смесь пептидов очищали твердофазной экстракцией, ресольбилизировали в буферном растворе и обрабатывали карбоксипептидазой Y. При реализации второго направления эксперимента АСТН-(6-9)-PGP сначала подвергали гидролизу карбоксипептидазой Y, и после аналогичной процедуры остановки реакции и очистки реакционной смеси обрабатывали полученную смесь пептидов лейцинаминопептидазой.

Устойчивость пептидов, образовавшихся при гидролизе АСТН-(6-9)-PGP по двум вышеописанным направлениям, показана на рис. 4.

Результаты по первому направлению можно оценить следующим образом. Процентное содержание образовавшихся под действием лейцинаминопептидазы пептидов (Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro и Trp-Pro-Gly-Pro) падает, при этом наблюдается увеличение в реакционной смеси триптофана, Trp-Pro-Gly и Phe-Arg-Trp-Pro-Gly (рис. 4а). Нужно от-

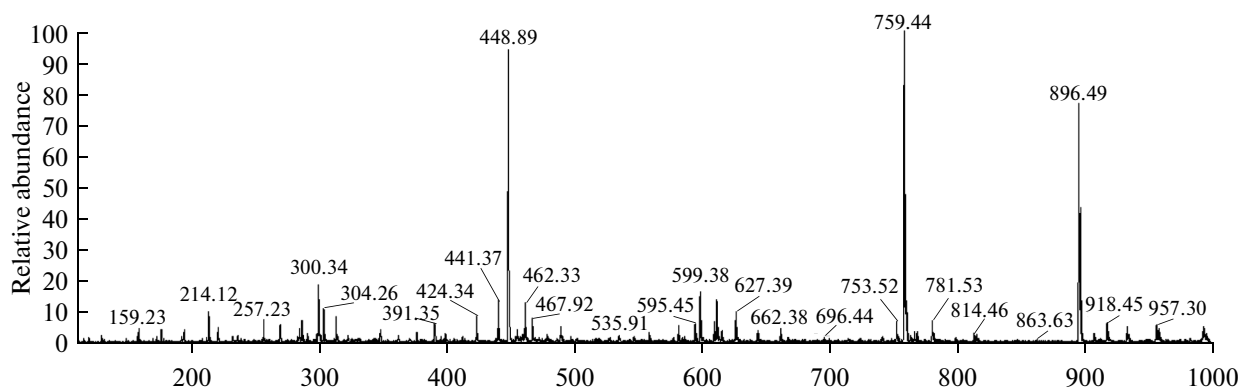


Рис. 1. Хромато-масс-спектрограмма стандарта АСТН-(6-9)-РРР ($448.9 = [M + 2H]^{2+}$, $759.4 = [M + H - \text{His}]^+$, $896.4 = [M + H]^+$). По горизонтальной оси отложено отношение массы иона к его заряду. По вертикальной отложен относительный отклик.

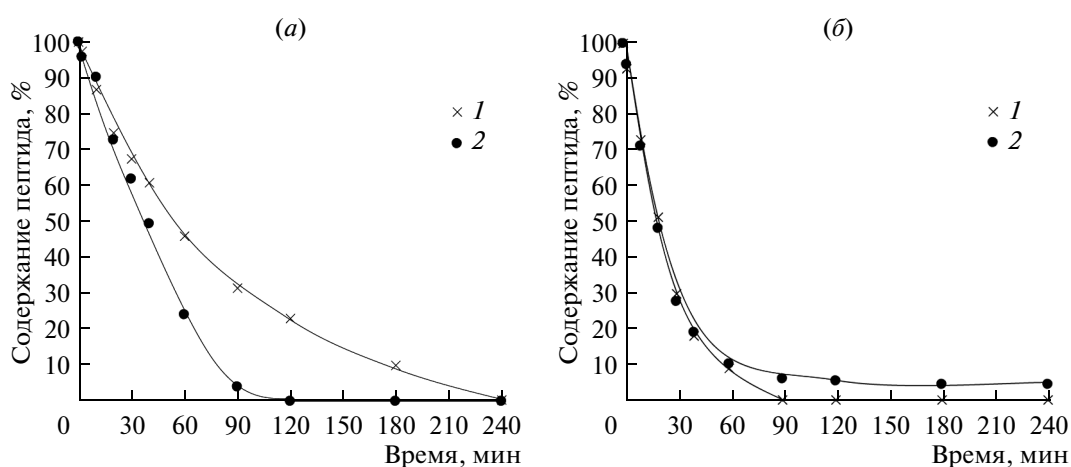


Рис. 2. Гидролиз АСТН-(6-9)-РРР (1) и семакса (2): а — лейцинаминопептидазой, б — карбоксипептидазой Y (в процентах от исходного количества соответствующего пептида).

метить, что, если Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro к 90 минуте исчезает полностью, то содержание Trp-Pro-Gly-Pro падает только в два раза. Устойчивость Trp-Pro-Gly и Phe-Arg-Trp-Pro-Gly высокая, кинетические кривые их образования выходят на плато. Пептиды Pro-Gly-Pro, Pro-Gly и Gly-Pro по данным, полученным при анализе масс-спектров, не образуются. По второму направлению основной продукт гидролиза АСТН-(6-9)-РРР карбоксипептидазой Y — His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly в течение 40 мин полностью расщепляется лейцинаминопептидазой с образованием Phe-Arg-Trp-Pro-Gly и Trp-Pro-Gly. Концентрация Phe-Arg-Trp-Pro-Gly достигает максимума через 40 мин и через 90 мин этот пептид полностью гидролизует. Пептид Trp-Pro-Gly в этих условиях устойчив (рис. 4б).

Таким образом, продукты гидролиза АСТН-(6-9)-РРР лейцинаминопептидазой и последующем воздействии карбоксипептидазы Y теряют только С-терминальный пролин, а при обратной схеме

экспериментов происходит последовательное отщепление N-концевых аминокислот до пептида Trp-Pro-Gly от продукта гидролиза АСТН-(6-9)-РРР карбоксипептидазой Y. В результате проведенной работы удалось зафиксировать пять промежуточных продуктов последовательного расщепления АСТН-(6-9)-РРР лейцинаминопептидазой и карбоксипептидазой Y.

Образование этих продуктов в реакционных смесях позволило оценить направления ферментативного гидролиза АСТН-(6-9)-РРР. Кроме того, удалось наработать необходимые количества данных продуктов, которые сделают возможным анализ реакционных смесей, образующихся под действием более сложных ферментных систем *in vitro*, и идентификацию этих пептидов в биологических пробах, полученных при работе с живыми объектами *in vivo*.

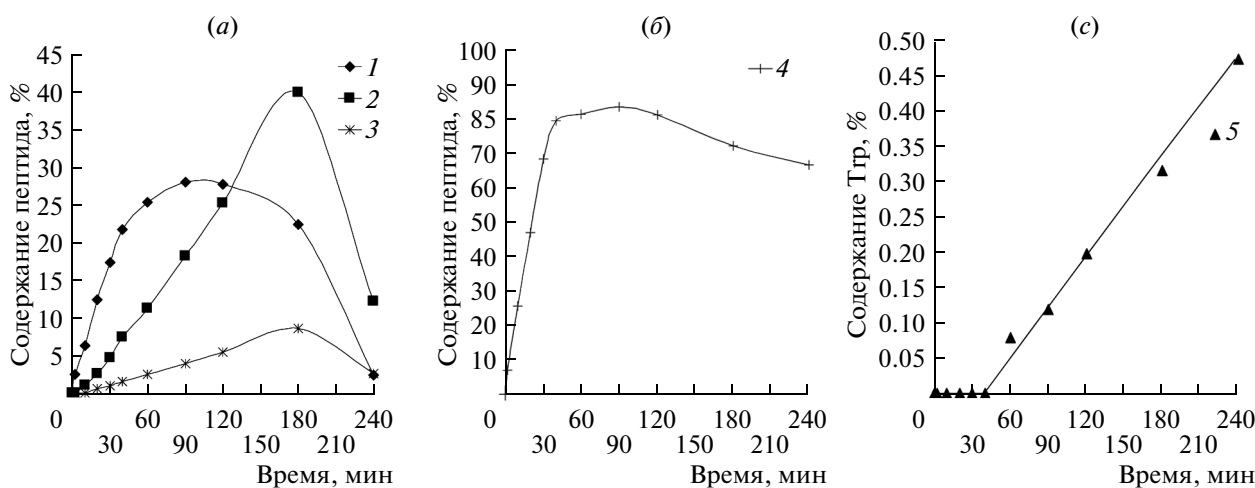


Рис. 3. Изменение содержания продуктов гидролиза АСТН-(6-9)-PGP лейцинаминопептидазой (а) и карбоксипептидазой Y (б, в): 1 – Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro, 2 – Trp-Pro-Gly-Pro, 3 – Arg-Trp-Pro-Gly-Pro, 4 – His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly, 5 – Trp– (в процентах от исходного количества АСТН-(6-9)-PGP).

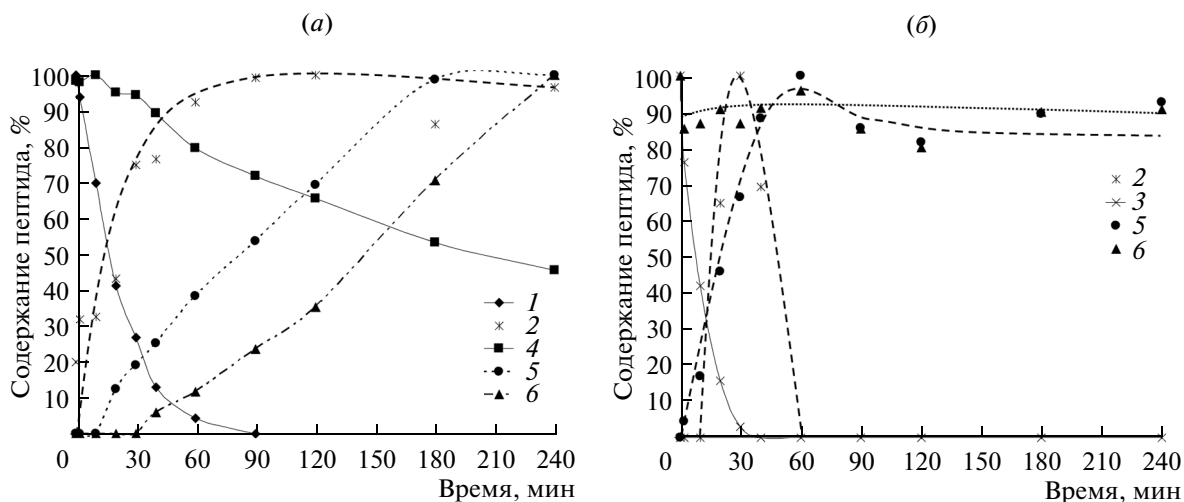


Рис. 4. Изменение содержания продуктов гидролиза АСТН-(6-9)-PGP (в процентах от максимального количества каждого из приведенных пептидов, образовавшихся при проведении эксперимента) при разной последовательности обработки экзопептидазами: первичное расщепление лейцинаминопептидазой, гидролиз полученных продуктов карбоксипептидазой Y (а) и первичное расщепление карбоксипептидазой Y, гидролиз полученных продуктов лейцинаминопептидазой (б): 1 – Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro, 2 – Phe-Arg-Trp-Pro-Gly, 3 – His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly, 4 – Trp-Pro-Gly-Pro, 5 – Trp-Pro-Gly, 6 – Trp.

Данные по устойчивости АСТН-(6-9)-PGP в присутствии назальной слизи и крови крыс приведены в табл. 1 и 2.

В начальной стадии процесса остаточные концентрации АСТН-(6-9)-PGP и семакса в назальной слизи крыс примерно равны (табл. 1). Затем гидролиз семакса происходит эффективнее гидролиза АСТН-(6-9)-PGP. Таким образом, устойчивость АСТН-(6-9)-PGP в присутствии назальной слизи несколько выше, чем у семакса.

При сравнении устойчивости АСТН-(6-9)-PGP и семакса в крови крыс оказалось, что эффек-

тивность гидролиза обоих пептидов близка (табл. 2). Если примерно до 20 минуты содержание семакса в присутствии крови крыс немного выше, чем АСТН-(6-9)-PGP, то, начиная с 20 минуты остаточное количество АСТН-(6-9)-PGP в инкубационной среде превышает содержание семакса.

При сравнении устойчивости АСТН-(6-9)-PGP в присутствии ферментных систем, находящихся в назальной слизи и крови крыс, оказалось, что устойчивость АСТН-(6-9)-PGP в назальной слизи выше (табл. 1, 2).

Таблица 1. Динамика гидролиза АСТН-(6-9)-PGR и семакса в назальной слизи крыс (в процентах от исходного количества пептида, концентрация белка 1.62 мг/мл)

Пептид	Время инкубации, мин						
	5	10	30	40	60	90	120
Семакс	92	70	29	12	4	0.5	0
АСТН-(6-9)-PGR	81	64	52	45	31	14	0

Таблица 2. Динамика гидролиза АСТН-(6-9)-PGR и семакса в крови крыс (в процентах от исходного количества пептида, концентрация белка 9.35 мг/мл)

Пептид	Время инкубации, мин								
	2	5	10	20	30	40	60	90	120
Семакс	90	74	68	48	39	30	9	3	0
АСТН-(6-9)-PGR	75	50	47	43	40	36	12	5	0

Данные, полученные при использовании плазмы крови, приведены в табл. 3.

Как видно из приведенных данных, в плазме крови крыс устойчивость АСТН-(6-9)-PGR выше, чем устойчивость семакса. Эта тенденция сохраняется при увеличении количества добавляемой плазмы крови крыс в инкубационную среду. Необходимо отметить, что разница в устойчивости семакса и АСТН-(6-9)-PGR минимальна, когда в инкубационную среду добавляют количество плазмы крови, которая содержит в два раза больше белка по сравнению с количеством белка в крови в аналогичных экспериментах.

При сравнении устойчивости АСТН-(6-9)-PGR в крови и плазме крови оказалось, что деградация АСТН-(6-9)-PGR при одинаковом количестве белка в плазме крови и в крови крыс сильно отличается. За время инкубации 30, 60 и 120 мин в присутствии ферментов крови оставалось 40, 12 и 0% пептида, в то время как при работе с плазмой крови 91, 78 и 56% соответственно.

При использовании ферментной системы, присутствующей в крови, из АСТН(6-9)-PGR образовывались Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro и Trp-Pro-Gly-Pro (табл. 4). Максимум содержания Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro наблюдается через 20 мин, для Trp-Pro-Gly-Pro это время составляет 40 мин. Данные факты свидетельствуют о том, что определяющим фактором гидролиза АСТН-(6-9)-PGR в крови является действие ферментов, подобных лейцинаминопептидазе.

Как было показано выше, с увеличением содержания плазмы крови в инкубационной системе возрастает скорость деградации АСТН-(6-9)-PGR (табл. 3). Можно предположить, что при изменении соотношения АСТН-(6-9)-PGR/плазма

крови может измениться как процентное содержание продуктов гидролиза исходного пептида, так и время достижения их максимального содержания в реакционной смеси. Действительно, при увеличении количества плазмы крови скорость гидролиза АСТН-(6-9)-PGR и продуктов его расщепления возрастает (табл. 5). При этом время достижения максимальных концентраций промежуточных продуктов гидролиза Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro и Trp-Pro-Gly-Pro уменьшается, а содержание триптофана неуклонно растет.

Полученные данные позволили оценить устойчивость АСТН-(6-9)-PGR в присутствии индивидуальных ферментов и ферментных систем назальной слизи, крови и плазмы крови, а также определить набор основных продуктов гидролиза АСТН-(6-9)-PGR. Полученные данные позволят достоверно оценить содержание АСТН-(6-9)-PGR и его метаболитов при анализе биологических проб, полученных после введения исходного пептида в организм подопытных животных. Таким образом, в результате проведенной работы отработаны подходы для проведения исследований с АСТН-(6-9)-PGR *in vivo* при использовании внутривенного и интраназального методов введения пептида.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Лейцинаминопептидаза (К.Ф. 3.4.11.2, Sigma (США), Тип VI, микросомальная из почки свиньи, 9.2 ед. акт./мг), карбоксипептидаза Y (К.Ф. 3.4.16.1, Sigma (США), из хлебопекарных дрожжей, 17 ед. акт./мг), а также необходимые реактивы – коммерческие препараты. Назальная слизь (5.2 мг белка/мл), кровь (31 мг белка/мл) и плазма крови (63 мг белка/мл) получены из крыс Wistar (самцы, масса 200 г).

Синтез АСТН-(6-9)-PGR

Синтез исходного пептида осуществляли методами классической пептидной химии в растворе с использованием как защищенных, так и свободных L-аминокислот по схеме 1. На первом этапе получали Pro-Gly-Pro-OBzl, который затем наращивали с N-конца необходимыми аминокислотами.

I. Вос-Pro-Gly

К раствору 10.8 г (50 ммоль) Вос-Pro в 150 мл ацетонитрила, охлажденному до -5°C , при перемешивании прибавляли 7.7 мл (50 ммоль) триэтиламина (ТЕА) и охлаждали до -20°C . К охлажденному раствору при перемешивании прибавляли 6.8 мл (55 ммоль) пивалоилхлорида (PivCl) в течение 20 мин при -10°C , охлаждали до -30°C и прибавляли предварительно охлажденный рас-

Таблица 3. Динамика гидролиза АСТН-(6-9)-PGR и семакса в плазме крови крыс (в процентах от исходного количества пептида)

Пептид	Концентрация белка по методу Лоури, мг/мл	Время инкубации, мин				
		20	30	60	90	120
Семакс	9.60	88	77	50	32	14
	19.0	78	56	31	10	0
	38.0	36	28	14	0	0
АСТН-(6-9)-PGR	9.60	96	91	78	67	56
	19.0	81	63	35	14	5
	38.0	68	42	16	0.8	0.2

Таблица 4. Динамика изменения содержания Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro и Trp-Pro-Gly-Pro при гидролизе АСТН-(6-9)-PGR в крови крыс (в процентах от исходного количества АСТН-(6-9)-PGR, концентрация белка 9.35 мг/мл)

Пептид	Время инкубации, мин								
	2	5	10	20	30	40	60	90	120
Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro	23	46	48	51	47	42	18	3	0
Trp-Pro-Gly-Pro	2	4	5	6	12	13	10	9	0

твор Gly, приготовленный следующим образом: Gly 4.5 г (60 ммоль, избыток 1.2) растворяли в 35 мл воды и 60 мл ацетонитрила, прибавляли 8.4 мл (60 ммоль) ТЕА и охлаждали до -10°C в течение 20 мин. Реакционную смесь при перемешивании выдерживали 1 ч при -10°C и 2 ч при $18-20^{\circ}\text{C}$, упаривали, к остатку добавляли ~ 50 мл воды. Водный раствор подкисляли 3-кратным избытком NaHSO_4 (24.84 г) до pH 3, экстрагировали этилацетатом (ЕА) (5×100 мл). Объединенный ЕА-раствор промывали H_2O (50 мл), 10% раствором KHSO_4 (50 мл), H_2O (50 мл), насыщенным раствором NaCl (50 мл). ЕА-раствор сушили над MgSO_4 , отфильтровывали, упаривали до 50 мл и добавляли сухой эфир. При добавлении эфира выпадал осадок, который отфильтровывали и промывали на фильтре сухим эфиром. Полученное вещество высушивали под вакуумом в эксикаторе над KOH , P_2O_5 и парафином. Выход пептида 43%, т. пл. 70°C .

Woc-Pro-Gly-Pro-OBzl

К раствору 6.0 г (21.7 ммоль) *Woc-Pro-Gly* в 100 мл ацетонитрила, охлажденному до -5°C при перемешивании прибавляли 3.35 мл (23.9 ммоль, избыток 1.1) ТЕА и охлаждали до -20°C . К охлажденному раствору при перемешивании прибавляли 2.34 мл (23.9 ммоль, избыток 1.1) PivCl в течение 20 мин при -10°C , охлаждали до -30°C и прибавляли предварительно охлажденный раствор $\text{HCl} \cdot \text{Pro-OBzl}$, приготовленный следующим образом: $\text{HCl} \cdot \text{Pro-OBzl}$ 6.3 г (26.1 ммоль, избыток 1.2) растворяли в 50 мл ацетонитрила, прибавляли 4.0 мл (28.7 ммоль, избыток 1.1) ТЕА и охла-

ждали до -10°C в течение 20 мин. Реакционную смесь при перемешивании выдерживали 1 ч при -10°C и 2 ч при $18-20^{\circ}\text{C}$. Реакционную смесь упаривали, к остатку прибавляли 300 мл ЕА. ЕА-раствор промывали H_2O (3×25 мл), 10% раствором KHSO_4 (3×25 мл), H_2O (3×25 мл), 5% раствором NaHCO_3 (3×25 мл), H_2O (3×25 мл), насыщенным раствором NaCl (25 мл). ЕА-раствор сушили над MgSO_4 , отфильтровывали, упаривали до образования маслообразного остатка и добавляли ~ 100 мл сухого эфира. Выпавший продукт отфильтровывали и промывали на фильтре сухим эфиром. Полученное вещество высушивали в вакуумном эксикаторе над KOH , P_2O_5 и парафином. Выход пептида 80%, т. пл. $125-126^{\circ}\text{C}$.

II. Pro-Gly-Pro-OBzl

К раствору 5.4 г (11.7 ммоль) *Woc-Pro-Gly-Pro-OBzl* в 29 мл хлористого метилена, добавляли 29 мл трифторуксусной кислоты (TFA), выдерживали 45 мин при комнатной температуре и последовательно по два раза упаривали с абс. этанолом, бензолом и эфиром, растворяли в бензоле и высаживали гексаном. Гексан сливали, а полученное масло сушили в эксикаторе над $\text{P}_2\text{O}_5/\text{KOH}$ и парафином. Выход $\text{TFA}^* \text{Pro-Gly-Pro-OBzl} - 96\%$.

Trp-Pro-Gly-Pro-OBzl

К раствору 4.9 г (16 ммоль, избыток 1.1) *Woc-Trp* в 45 мл диметилформамида (DMF) при перемешивании прибавляли 3.0 г (18 ммоль) карбонилдидиимидозола. После прекращения выделения

Таблица 5. Динамика изменения содержания продуктов гидролиза АСТН-(6-9)-PGP в плазме крови крыс (в процентах от исходного количества АСТН-(6-9)-PGP)

Концентрация белка по методу Лоури, мг/мл	Продукт гидролиза	Время инкубации, мин					
		2	20	30	60	90	120
9.60	Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro	0.0	10.0	13.4	23.7	26.8	28.7
	Trp-Pro-Gly-Pro	0.0	0.9	2.2	7.2	12.5	15.3
	Trp	0.3	0.3	0.3	0.3	0.6	0.6
19.0	Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro	0.0	15.3	20.3	30.2	18.2	2.8
	Trp-Pro-Gly-Pro	0.0	4.0	5.9	17.9	20.0	13.9
	Trp	0.2	0.5	0.5	0.7	0.9	1.4
38.0	Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro	0.0	23.7	27.8	24.7	2.7	0.2
	Trp-Pro-Gly-Pro	0.0	7.6	10.8	22.1	18.2	6.5
	Trp	0.4	0.6	0.6	1.0	1.8	2.5

CO₂ прибавляли раствор 5.5 г (14.6 ммоль) Pro-Gly-Pro-OBzl в 30 мл DMF и выдерживали сутки при 0°C. Реакционную смесь лиофилизировали. К остатку прибавляли 300 мл EA, раствор отфильтровывали и упаривали. Остаток растворяли в 30 мл абс. EA и продукт высаживали гексаном. Гексан декантировали, полученный продукт высушивали. Выход пептида после удаления Вос-защиты – 70%.

Arg(NO₂)-Trp-Pro-Gly-Pro-OBzl

К раствору 3.1 г Вос-Arg(NO₂) (9.7 ммоль) в 50 мл тетрагидрофурана (THF) и 10 мл DMF добавляли 2.07 г (10.7 ммоль) *N,N*-дициклогексилкарбодиимида (DCC), охлаждали до 0°C, перемешивали в течение 40 мин и добавляли раствор 6.9 г TFA · Trp-Pro-Gly-Pro-OBzl (10.7 ммоль) в 50 мл THF и 5.1 мл (11 ммоль) TEA. Перемешивали реакционную смесь в течение 3 сут. Отфильтровывали осадок дициклогексилмочевины, упаривали раствор в вакууме, остаток обрабатывали 200 мл гексана, при этом отделялся целевой продукт в виде масла, которое растворяли в 500 мл EA и промывали 0.1 н. HCl (3 × 25 мл), H₂O (3 × 25 мл), насыщ. NaCl (25 мл). Органический слой высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и упаривали. Остаток растворяли в EA и высаживали сухим эфиром. Выпавший осадок отфильтровывали и высушивали. Выход пептида после удаления Вос-защиты – 80%.

Phe-Arg(NO₂)-Trp-Pro-Gly-Pro-OBzl

К охлажденному до –5°C раствору 2.12 г (8 ммоль) Вос-Phe в 50 мл ацетонитрила при перемешивании прибавляли 1.2 мл (8.8 ммоль) TEA

и охлаждали до –20°C. К охлажденному раствору при перемешивании прибавляли 1.2 мл (8.8 ммоль) PivCl в течение 20 мин при –10°C и охлаждали до –30°C. Затем прибавляли охлажденный в течение 20 мин при –10°C раствор 6.1 г (7.3 ммоль) TFA · Arg(NO₂)-Trp-Pro-Gly-Pro-OBzl в 27 мл смеси ацетонитрила с TEA (25 : 2). Реакционную смесь при перемешивании выдерживали 1 ч при –10°C и 2 ч при 18–20°C и упаривали. К остатку прибавляли 300 мл EA. EA-раствор промывали H₂O (2 × 25 мл), 10% раствором KHSO₄ (2 × 25 мл), H₂O (2 × 25 мл), 5% раствором NaHCO₃ (2 × 25 мл), H₂O (2 × 25 мл), насыщенным раствором NaCl (12 мл). EA-раствор сушили над MgSO₄, отфильтровывали и упаривали. Остаток растворяли 30 мл абс. EA и высаживали гексаном. Гексан декантировали, полученный продукт высушивали. Выход пептида после удаления Вос-защиты – 85%.

WocHis-Phe-Arg(NO₂)-Trp-Pro-Gly-Pro-OBzl

К охлажденному до –5°C раствору 1.3 г (5.1 ммоль) Вос-His в 25 мл ацетонитрила при перемешивании прибавляли 0.7 мл (5 ммоль) TEA и охлаждали до –20°C. Далее при перемешивании прибавляли 0.7 мл (5 ммоль) PivCl в течение 20 мин при –10°C и охлаждали до –30°C. Затем прибавляли в течение 20 мин охлажденный до –10°C раствор 4.0 г (4.1 ммоль) TFA · Phe-Arg(NO₂)-Trp-Pro-Gly-Pro-OBzl в 27 мл смеси ацетонитрила с TEA (25 : 2). Реакционную смесь при перемешивании выдерживали 1 ч при –10°C и 2 ч при 18–20°C. Реакционную смесь упаривали. К остатку прибавляли 300 мл EA. EA-раствор промывали последовательно по 2 раза 25 мл 10% раствором KHSO₄, H₂O, 5% раствором NaHCO₃, H₂O, насыщенным

раствором NaCl (12 мл), сушили над MgSO₄, отфильтровывали и упаривали. Остаток растворяли 30 мл абс. этилацетата и высаживали гексаном. Гексан декантировали, полученный продукт высушивали. Выход пептида 75%.

His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro

К раствору 1.1 г (1.0 ммоль) BocHis-Phe-Arg(NO₂)-Trp-Pro-Gly-Pro-OBzl в 50 мл метанола добавляли 0.5 мл 1 М HCl и 0.85 г катализатора — 10% Pd/Al₂O₃ и гидрировали в токе водорода при комнатной температуре и давлении 1 атм. в течение 6 ч. Затем катализатор отфильтровывали, промывали на фильтре метанолом. Объединенный фильтрат упаривали досуха. Остаток высаживали из абс. метанола эфиром и сушили в вакууме. Затем остаток суспензировали в 10 мл 2 М HCl в диоксане и выдерживали при комнатной температуре в течение 45 мин. Реакционную смесь высаживали гексаном. Выпавший осадок отфильтровывали, многократно промывая на фильтре гексаном от избытка HCl. Промытый осадок сушили в вакууме. Пересаждали из абс. метанола сухим эфиром, выпавший осадок отфильтровывали, сушили в вакууме, анализ проводили методом ВЭЖХ. Выход АСТН-(6-9)-PGP — 65%. Затем незащищенный пептид переводили в форму ацетата (CH₃COO⁻) с помощью катионнообменника Амберлист А-21.

Индивидуальность полученных соединений и промежуточных продуктов проверяли с помощью ТСХ на пластинках с силикагелем фирмы Silufol (Чехия), методами ВЭЖХ и масс-спектрокопии. Вещества при использовании ТСХ обнаруживали в УФ-свете, с помощью нингидрина, реагентов Бартона, Паули и Рейнделя-Хоппе, о-толидина в среде хлора.

Реакционные смеси при синтезе анализировали методом ТСХ. в системах растворителей: бутанол—уксусная кислота—вода (4 : 1 : 1); этилацетат—ацетон—50% уксусная кислота (2 : 1 : 1); бензол—этанол (8 : 2); хлороформ—метанол—аммиак (7 : 2.5 : 0.5); хлороформ—метанол—аммиак (6 : 4 : 1); хлороформ—метанол—уксусная кислота (42 : 7 : 1); ацетон—бензол—уксусная кислота (50 : 100 : 1); хлороформ—метанол (9 : 1); гексан—ацетон (3 : 2); метанол; бутанол—уксусная кислота—пиридин—вода (30 : 6 : 20 : 24); хлороформ—метанол (14 : 1); изопропанол—муравьиная кислота—вода (20 : 5 : 1); этанол—аммиак (7 : 3). Величина *R_f* в этих системах колеблется от 0.25—0.8.

Хроматомасс-спектрометрический анализ пептидов

Хроматографию проводили на хроматографе Surveyor с масс-спектрометрическим детектором LCQ Advantage MAX (Термоэлектрон, США). Ко-

лонка Reprosil pur C18aq, 5.0 мкм, 2.0 × 100 мм (Dr. Maisch, Германия), скорость потока 0.2 мл/мин, линейный градиент Б в А от 0 до 80% за 20 мин, элюент А — вода—AcOH—TFA (100 : 0.1 : 0.01), элюент Б — метанол. Молекулярный ион Arg-Trp-Pro-Gly-Pro (4.18 мин) — 612.2, Trp-Pro-Gly-Pro (6.89 мин) — 456.3, АСТН-(6-9)-PGP (10.97 мин) — 896.4, Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro (13.4 мин) — 759.4, His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly (16.1 мин) — 799.4, Trp-Pro-Gly (13.2 мин) — 359.1.

Выделение пептидов методом ВЭЖХ

Условия выделения пептидов методом ВЭЖХ: колонка Reprosil pur C18aq, 5 мкм, 4 × 150 мм (Dr. Maisch, Германия), элюент А — метанол—25 мМ дигидрофосфат аммония, pH 2.8 (30 : 70), элюент В — метанол, скорость потока — 1 мл/мин, в градиенте концентрации элюента В: время — 0, 15, 17, 30 мин, концентрация элюента В, об. % — 0, 50, 100, 0, соответственно. Измерение поглощения производилось на длине волны 280 нм. В этих условиях ВЭЖХ-стандарты имели следующие времена удерживания (мин): Trp (3.42), Arg-Trp-Pro-Gly-Pro (4.96), Trp-Pro-Gly-Pro (6.58), АСТН-(6-9)-PGP (9.75), Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro (11.84).

Гидролиз АСТН-(6-9)-PGP и семакса лейцинаминопептидазой и карбоксипептидазой Y

Гидролиз АСТН-(6-9)-PGP и семакса проводили при соотношениях пептид-фермент 10.53 мкмоль/ед. акт. для лейцинаминопептидазы и 0.043 мкмоль/ед. акт. для карбоксипептидазы Y. В этих условиях деградация семакса в течение 90 мин происходила более чем на 90%.

К раствору 0.19 мкмоль пептида в 260 мкл фосфатно-солевого буфера (27.4 мМ NaCl, 0.4 мМ KCl, 2 мМ Na₃PO₄ в 100 мл H₂O, pH 7.4) добавляли 0.01804 ед. акт. лейцинаминопептидазы или 4.44 ед. акт. карбоксипептидазы Y в этом же буфере. Инкубационную смесь перемешивали и термостатировали при 30°C, отбирая аликвоты по 40 мкл через определенные промежутки времени. Реакцию останавливали добавлением к отбираемым пробам равного объема метанола.

В случае гидролиза карбоксипептидазой Y набора пептидов, полученных после расщепления АСТН-(6-9)-PGP лейцинаминопептидазой и наоборот набор пептидов от обработки первым ферментом получали в течение 120 мин. Затем первый фермент дезактивировали добавлением TFA (1.5%), смесь пептидов очищали твердофазной экстракцией на обращенной фазе Lichroprep RP-18 (100 мг). Фосфатно-солевой буфер и дезактивированный фермент удаляли промыванием обращенной фазы 1.5% раствором TFA в воде, осажденные пептиды элюировали смесью метанол—вода (9 : 1) с добавлением 0.1% TFA. Далее смесь

пептидов упаривали, растворяли в 170 мкл фосфатно-солевого буфера и обрабатывали вторым ферментом. Полученные пробы анализировали методом ВЭЖХ.

Препаративная наработка продуктов гидролиза АСТН-(6-9)-PGR лейцинаминопептидазой и карбоксипептидазой

К раствору 26.23 мкмоль АСТН-(6-9)-PGR в 3 мл фосфатно-солевого буфера (27.4 mM NaCl, 0.4 mM KCl, 2 mM Na₃PO₄ в 100 мл H₂O, pH 7.4) добавляли 2.76 ед. акт. (300 мкг) лейцинаминопептидазы или 20.4 ед. акт. (1200 мкл) карбоксипептидазы Y в этом же буфере. Инкубационную смесь перемешивали и термостатировали при 30°C, отбирая аликвоты по 30 мкл для контроля процесса гидролиза пептида. Реакционные смеси обрабатывали 45 мкл TFA, когда все продукты деградации присутствовали в инкубационной среде примерно в сопоставимых количествах. Полученные смеси пептидов очищали твердофазной экстракцией на обращенной фазе Lichroprep RP-18 как описано выше. Экстракты упаривали и растворяли в 2 мл этанола. Полученные пробы анализировали и выделяли образовавшиеся пептиды методом ВЭЖХ.

Получение биологических жидкостей, содержащих ферментные комплексы назальной слизи, крови и плазмы крови крыс

Назальную слизь смывали фосфатно-солевым буфером с косточек перегородки носа крысы. Кровь собирали из туловища крысы в пробирку, содержащую 20 мкл гепарина (5000 Е/мл) и аккуратно перемешивали. Часть крови центрифугировали при комнатной температуре 15 мин при 2000 об/мин. Плазму крови (верхний слой) аккуратно отбирали, перемешивали и разливали в охлаждаемые льдом микропробирки. Концентрацию белка в образцах назальной слизи, крови и плазмы крови определяли по методу Хартри-Лоури. Концентрация белка составила 5.2, 31 и 63 мг на 1 мл полученного экстракта назальной слизи, крови и плазмы крови; соответственно.

Гидролиз АСТН(6-9)-PGR в назальной слизи, крови и плазме крови крыс.

К раствору 0.19 мкмоль пептида добавляли 98 мкл экстракта назальной слизи (5.2 мг белка/мл), или 95 мкл крови (31 мг белка/мл), или 48 (95; 190) мкл (63 мг белка/мл) плазмы крови (суммарный объем инкубационной смеси 315 мкл).

Инкубационную смесь перемешивали и термостатировали при 30°C, отбирая аликвоты по 40–50 мкл через определенные промежутки времени. Полученные пробы очищали твердофазной

экстракцией на обращенной фазе, суть которой заключалась в нанесении пептидной фракции на паптон, упакованный обращенной фазой Lichroprep RP-18, с последующим элюированием пептидов смесью метанол–вода (4 : 1) с 0.1% TFA. Далее смесь упаривали и растворяли в 200 мкл смеси метанол–вода (10 : 90). Дальнейший анализ смеси проводили, как описано выше.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа проводилась при частичной поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” № госрегистрации 01201353020, гранта Научные школы № 14.120.14.4222-НСШ под руководством академика Н.Ф. Мясоедова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глазова Н.Ю., Левицкая Н.Г., Андреева Л.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. // Докл. АН. 1999. Т. 367. С. 137–140.
2. Вьюнова Т.В., Шевченко К.В., Шевченко В.П., Безуглов В.В., Мясоедов Н.Ф. // Радиохимия. 2009. Т. 51. № 2. С. 161–166.
3. Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Шевченко К.В., Шевченко В.П., Бобров М.Ю., Безуглов В.В., Мясоедов Н.Ф. // Докл. АН. 2008. Т. 419. № 1. С. 136–137.
4. Шевченко К.В., Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф. // Докл. АН. 2014. Т. 456. № 5. С. 613–617.
5. Копылова Г.Н., Умарова Б.А., Самонина Г.Е., Гусева А.А., Платонова Р.Д. // Тезисы научных трудов I съезда физиологов СНГ. Т. 2. Сочи. Дагомыс. 19–21 сентября 2005. М.: Медицина-Здоровье, 2005. С. 677.
6. Pires A., Fortuna A., Alves G., Falcao A. // J. Pharm. & Pharmaceutical Sci. 2009. V. 12. P. 288–311.
7. Furubayashi T., Kamaguchi A., Kawaharada K., Masaoka Y., Kataoka M., Yamashita S., Higashi Y., Sakane T. // Biol. Pharm. Bull. 2007. V. 30. P. 1007–1010.
8. Hashizume R., Ozawa T., Gryaznov S.M., Bollen A.W., Lamborn K.R., Frey II W.H., Deen D.F. // Neuro-Oncology. 2008. V. 10. P. 112–120.
9. Шевченко К.В., Вьюнова Т.В., Нагаев И.Ю., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Мясоедов Н.Ф. // Биоогран. химия. 2011. Т. 37. № 4. С. 475–482. [Shevchenko K.V., Vyunova T.V., Nagaev I.Yu., Andreeva L.A., Alfeeva L.Yu., Myasoedov N.F. // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2011. V. 37. № 4. P. 421–427.]
10. Шевченко К.В., Нагаев И.Ю., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Мясоедов Н.Ф. // Докл. АН. 2013. Т. 450. С. 245–247.

Stability of His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro to Leucine Aminopeptidase, Carboxypeptidase Y, Nasal Slime, Blood and Plasma of Rats

K. V. Shevchenko*, S. A. Dulov**, L. A. Andreeva*, I. Yu. Nagaev*, V. P. Shevchenko*,
A. S. Radilov**, N. F. Myasoedov*

Phone: (499) 196-02-16; fax: (499) 196-02-16; e-mail: ATRegister@mail.ru

* Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences, pl. Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia
Fax: (499) 196-0216, e-mail: ATRegister@mail.ru

** Federal State Unitary Enterprise "Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology" of the Federal Medical-Biological Agency, st. Kapitolovo, korp. 93, p/o Kuzmolovsky, Vsevolozhsky r-n, Leningradskaya obl., 188663 Russia
Fax: (812)449-61-77

His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro [ACTH-(6-9)-PGP] is synthesized. Proteolysis of ACTH-(6-9)-PGP and Semax (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) in the presence of leucine aminopeptidase and carboxypeptidase Y is studied. If the proteolysis of ACTH-(6-9)-PGP is mainly defined by aminopeptidases, the basic metabolite is Trp-Pro-Gly-Pro. Identification of major metabolites of ACTH(6-9)PGP when incubated with the enzymes *in vitro* made it possible to evaluate proteolysis pathways of the peptide and to prepare necessary amounts of its metabolites for using them as standards. Kinetics of ACTH-(6-9)-PGP degradation in the presence of enzyme systems of nasal mucus, blood and plasma were also explored. It was found that proteolysis of ACTH-(6-9)-PGP in rat blood and plasma occurs mainly under the action of enzymes working similar to leucinaminopeptidase.

Keywords: semax, ACTH(6-9)PGP, leucine aminopeptidase, carboxypeptidase Y, degradation of peptides, enzymes of nasal slime, blood and plasma