



УДК 547.964:543.422.25

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕГРАДАЦИИ ПЕПТИДОВ
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЕТОДОМ ^1H -ЯМР

*Исакова О. Л., Сепетов Н. Ф., Беспалова Ж. Д.,
Бушугев В. Н.,
Виноградов В. А., Рууге Э. К., Титов М. И.*

*Всесоюзный кардиологический научный центр
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Методом ^1H -ЯМР-спектроскопии исследована деградация гексапептида *Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg* в сыворотке крови человека. Показано, что конечные продукты распада (тетра- и пентапептид) устойчивы к действию сывороточных протеиназ в течение нескольких часов. Обосновано применение метода ЯМР для исследования фармакокинетики.

Открытие нейропептидов привело к появлению в последние годы большого числа работ, посвященных изучению их функций в организме, а также созданию химическим путем аналогов природных нейропептидов и их использованию в качестве лекарственных препаратов [1]. Пути катаболизма лекарственных препаратов пептидной природы в организме человека — один из самых важных и в то же время мало разработанных вопросов фармакологии. Решение этого вопроса представляет интерес как с точки зрения изучения механизма действия лекарственных препаратов, так и для получения новых препаратов. Например, определение пептидной связи, которая в первую очередь гидролизует, позволяет создавать новые препараты, обладающие большей стабильностью в биологических жидкостях и большей продолжительностью действия [2].

В настоящей работе для исследования распада лекарственных препаратов пептидной природы предложено использовать метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР). На примере изучения катаболизма в сыворотке крови *in vitro* лекарственного препарата даларгина [3], гексапептида *Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg*, рассмотрены возможности и преимущества применения для этих целей метода ЯМР.

Полное исследование распада препаратов пептидной природы в сыворотке крови предполагает получение информации о времени полураспада препарата и образующихся продуктах. Метод ЯМР позволяет регистрировать одновременно сигналы исходного пептида, а также продуктов его распада. Количество образующегося фрагмента по отношению к исходному пептиду можно оценить, сравнивая амплитуды сигналов соответственно фрагмента и исходного пептида.

В ряде случаев задача состоит в определении времени полураспада препарата без выяснения путей его катаболизма. При этом достаточно следить только за уменьшением амплитуды сигналов в спектре ЯМР исходного пептида.

Если целью исследования является изучение путей распада препарата, необходимо следить за новыми сигналами, появление которых в спектре свидетельствует об образовании фрагментов исследуемого препарата. Идентификация образующихся продуктов возможна благодаря индивидуальности спектров ЯМР пептидов [4]. При этом следует предельно выяснить, какие сигналы наиболее просто позволяют зарегистрировать появление фрагмента в растворе. С этой целью для исследования путей распада даларгина в сыворотке крови были синтезированы все возможные его фрагменты. Нами были получены спектры ЯМР фрагментов и всех аминокислот, входящих в состав даларгина, как

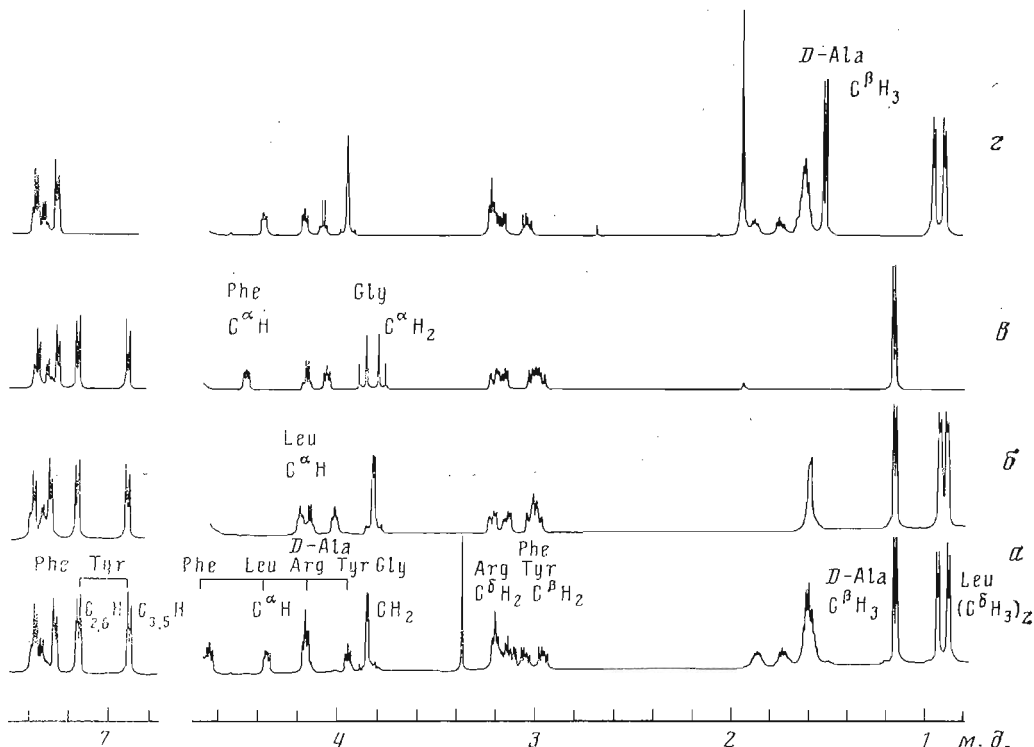


Рис. 1. Спектры ^1H -ЯМР (500 МГц) в D_2O (pH 7,4; 30°C) даларгина, Tyr-*D*-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg (а), Tyr-*D*-Ala-Gly-Phe-Leu (б), Tyr-*D*-Ala-Gly-Phe (в), *D*-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg (г)

в сыворотке крови, так и в D_2O . Следует отметить, что для ряда пептидов (особенно пентапептида Tyr-*D*-Ala-Gly-Phe-Leu) в сыворотке крови по сравнению с их растворами в D_2O в спектрах ЯМР наблюдается уширение сигналов протонов без заметного изменения положения характеристических химических сдвигов.

На рис. 1 представлены спектры ЯМР даларгина и некоторых пептидов его частичной последовательности, растворенных в D_2O (pH 7,4). На спектрах указано отнесение сигналов, наиболее отличающихся от сигналов соответствующих протонов даларгина.

Анализ спектров показывает, что о появлении в растворе фрагментов даларгина с отщепленным остатком Tyr, т. е. имеющих в качестве N-концевой аминокислоты *D*-Ala, можно судить по сигналу от C^βH_3 -*D*-Ala 1,47 м.д. У остальных фрагментов, содержащих *D*-Ala, сигнал этого протона находится в районе 1,1 м.д. В качестве примера на рис. 1г приведен спектр пептида *D*-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg. Образование фрагментов с C-концевым лейцином может быть зарегистрировано по сигналу от C^αH Leu, который сдвигается в сильное поле до 4,13 м.д. (рис. 1б). Характерным для спектров фрагментов с C-концевым фенилаланином будет сигнал от C^αH Phe при 4,43 м.д. (рис. 1в). Кроме того, каждый из фрагментов даларгина, содержащих Gly, будет иметь свой характерный сигнал от протонов CH_2 Gly (ср. рис. 1а-г).

Таким образом, применение перечисленных признаков, позволяет идентифицировать любой из образующихся фрагментов.

Сравнение спектров, полученных через различные промежутки времени после добавления даларгина в сыворотку крови, показывает (рис. 2), что амплитуда сигналов исходного гексапептида (например, сигналы протонов $\text{C}^\delta\text{H}_2$ и C^βH Arg) со временем уменьшается. При этом в спектре появляются новые сигналы, амплитуды которых увеличиваются (рис. 3). Некоторые из них (3,72; 0,95; 1,91; 3,23; 3,75 м.д.) были отнесены нами к сигналам свободных аминокислот Leu и Arg, что было доказано добавлением этих аминокислот в раствор. Сигналов других свободных

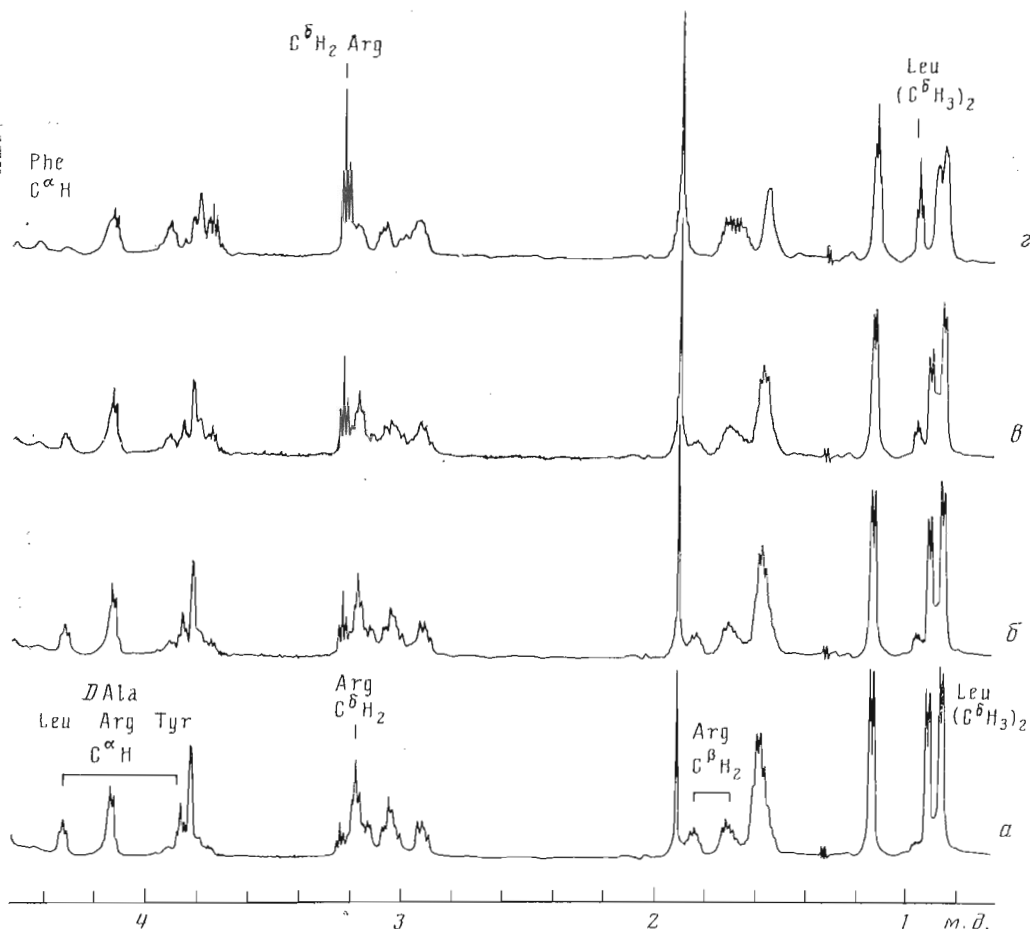


Рис. 2. Спектры $^1\text{H-NMR}$ даларгина (после вычитания спектра сыворотки), полученные через 6 (а), 9 (б), 15 (в) и 29 мин (г) после добавления пептида в сыворотку

аминокислот в спектре обнаружено не было. Это говорит о том, что остальные аминокислоты остаются включенными в состав образующихся фрагментов.

Отсутствие в спектре сигналов в районе 1,4 м.д., характерных для C^βH_3 -группы *D*-аланина, и сигналов свободного тирозина свидетельствует о том, что связь *Tyr-D-Ala* не гидролизует. Гидролиз связи *D-Ala-Gly* должен приводить к появлению сигналов *N*-концевого *Gly* в районе 3,65–3,7 м.д. Однако этого не наблюдается, и, следовательно, связь *D-Ala-Gly* также не разрушается. Фрагмент с *N*-концевым *Phe* характеризуется наличием сигнала C^αH *Phe* в районе 4,0 м.д. Среди новых сигналов, появившихся в спектре, такой сигнал обнаружен не был. Следовательно, связь *Gly-Phe* не гидролизует.

Таким образом, расщепление даларгина происходит с *C*-концевой части молекулы.

После завершения распада даларгина (>84 мин) в спектрах не наблюдается никаких изменений в течение нескольких часов, что говорит о неизменности в течение этого времени концентрации образовавшихся продуктов. Анализ этих спектров (рис. 2г) показывает, что весь *Arg* находится в свободном состоянии, а *Leu* — как в составе пептида (сигналы C^βH_2 , C^γH при 1,56 м.д.; $(\text{C}^\delta\text{H}_3)_2$ при 0,86 и 0,95 м.д.), так и в свободном состоянии. Следовательно, распад исходного пептида не может происходить путем последовательного отщепления сначала остатка *Arg*, а затем *Leu*, а среди образовавшихся продуктов есть пептид, в составе которого содержится *Leu*. Сигнал при 4,43 м.д., отнесенный методом

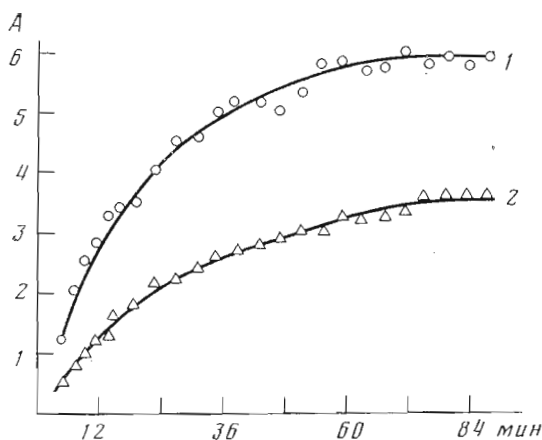
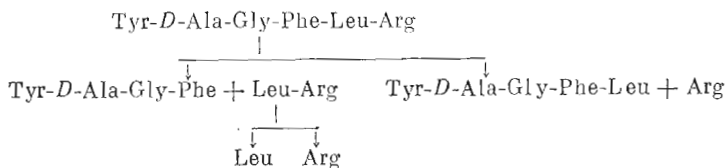


Рис. 3. Кинетика изменения амплитудной интенсивности (А) сигналов 3,23 м.д. ($C^{\delta}H_2$ Arg) (1) и 0,95 м.д. ($C^{\delta}H_3$ Leu) (2) свободных аминокислот, образующихся при распаде даларгина

двойного резонанса к протону $C^{\alpha}H$ Phe, свидетельствует о наличии в растворе пептида с С-концевым Phe. Поскольку, как уже было показано, связи Tyr-D-Ala, D-Ala-Gly, Gly-Phe не гидролизуются, пептид с С-концевым фенилаланином представляет собой фрагмент Tyr-D-Ala-Gly-Phe, а пептид, в составе которого есть Leu, — фрагмент Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu. Это подтверждается также сравнением со спектрами соответствующих тетра- и пентапептидов.

Кроме того, на начальных этапах деградации (рис. 2а) в спектрах были обнаружены сигналы дипептида Leu-Arg (например, сигнал при 1,845 м.д. $C^{\delta}H$ Arg в составе дипептида, а также сигналы в районе 0,95 м.д., которые представляют собой наложение сигналов ($C^{\delta}H_3$)-группы свободного Leu и сигналов тех же групп в составе дипептида Leu-Arg). Отсутствие сигналов дипептида в спектре, полученном после завершения распада даларгина (рис. 2г), свидетельствует о достаточно быстром распаде фрагмента Leu-Arg.

На основании наличия в сыворотке крови двух пептидов, концентрация которых не меняется после того, как в растворе не осталось исходного гексапептида, а также факта образования дипептида Leu-Arg и его достаточно быстрого исчезновения была предложена следующая модель распада даларгина:



У части молекул пептида отщепляется С-концевой аргинин и образуется стабильный пентапептид Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu, а у остальных молекул отщепляется дипептид Leu-Arg, который быстро распадается на свободные аминокислоты Leu и Arg, и образуется устойчивый фрагмент — тетрапептид Tyr-D-Ala-Gly-Phe.

Чтобы подтвердить сделанное предположение об устойчивости тетрапептида Tyr-D-Ala-Gly-Phe и пентапептида Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu в сыворотке крови, были проведены контрольные эксперименты, доказавшие, что в спектрах 1H -ЯМР пептидов не наблюдалось никаких изменений в течение нескольких часов после их добавления в сыворотку крови.

Кроме исследования путей распада, в настоящей работе было оценено время полураспада пептида. С точки зрения формальной кинетики время полураспада пептида в общем случае определяется, согласно теории Михаэлиса — Ментен, максимальными скоростями ферментатив-

ных реакций, начальной концентрацией субстрата и константами Михаэлиса ферментов. Однако в области концентраций субстрата, меньших константы Михаэлиса, время его полураспада можно считать слабо зависящим от начальной концентрации. Мы выяснили, что при начальной концентрации даларгина ниже 0,1 мг/мл время его полураспада практически не зависит от концентрации. На основании наших данных, время полураспада даларгина в сыворотке крови *in vitro* было оценено равным ~2 мин. Чувствительность современных спектрометров позволяет проводить исследования вплоть до концентраций пептида $\sim 10^{-6}$ М, что, безусловно, выше концентраций, обычно применяемых в клинической практике. Анализ возможности экстраполировать полученные методом ЯМР данные о времени полураспада к более низким, физиологическим, концентрациям — предмет дальнейших исследований.

Полученные результаты указывают на высокую информативность метода ЯМР в изучении деградации пептидов в сыворотке крови, так как при его использовании возможна постоянная («мониторная») оценка количества как самого пептида, так и образующихся фрагментов. Ранее для изучения фармакокинетики пептидов использовали главным образом радиоиммунологический анализ и жидкостную хроматографию высокого давления и их сочетание [5, 6]. С помощью первого метода можно обнаружить обычно лишь полную молекулу пептида и не представляется возможным выявить отщепляемые фрагменты; жидкостная хроматография высокого давления невозможна без достаточно трудоемких и маловоспроизводимых процедур экстракции сыворотки, и для ее проведения необходим полный набор возможных фрагментов пептидов для использования в качестве свидетелей. Обе процедуры не дают возможности «мониторного» контроля за деградацией и выполнимы лишь для ограниченного числа точек с достаточно большими временными интервалами между ними.

Второе положение, вытекающее из проведенной работы, — неожиданный характер расщепления даларгина на стабильные тетра- и пентапептид. Такое расщепление предполагает наличие в сыворотке двух основных деградирующих систем: карбоксипептидазы и дишпептидилкарбоксипептидазы (типа ангиотензинпревращающего фермента). Эти две системы конкурентно расщепляют гексапептид до тетра- и пентапептида, но затем деградация прекращается. По всей видимости, какие-то конформационные характеристики как пента-, так и тетрапептида препятствуют воздействию на них сывороточных ферментов. Отметим, что оба продукта деградации даларгина активно связываются с опиатными рецепторами [7], и их стабильность в сыворотке может объяснить некоторые отсроченные эффекты даларгина.

Экспериментальная часть

Спектры ^1H -ЯМР получены на спектрометре WM-500 фирмы Bruker (ФРГ) с рабочей частотой 500 МГц при 37° С. Химические сдвиги в спектрах ^1H -ЯМР измерены относительно внутреннего стандарта — натриевой соли 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфоната. Отнесение сигналов в спектрах сделано с помощью метода двойного резонанса. Для выделения сигналов, принадлежащих протонам пептида, применялась разностная спектроскопия: из каждого спектра, полученного после добавления пептида в сыворотку, вычитался спектр сыворотки.

Кровь брали у доноров из локтевой вены натощак, выдерживали в течение 1 ч при 37° С и затем центрифугировали (15 мин, 3000 g, 0° С) для отделения сыворотки. Сыворотка крови человека была лиофилизована и затем растворена в D_2O ; рН доводился до 7,4 добавлением малых количеств DCl . В полученный таким образом препарат сыворотки крови непосредственно перед началом измерений добавляли даларгин. Концентрация пептида в образце составляла 1 мг/мл.

Все исследованные нами пептиды были синтезированы классическими методами пептидной химии в растворе путем последовательного нара-

щивания аминокислотной цепи по одной аминокислоте с помощью *n*-нитрофениловых эфиров карбобензоксиаминокислот, исходя из аргинина в виде свободного основания для пептидов, содержащих С-концевой аргинин, или натриевых солей аминокислот для всех остальных пептидов. Защитные группы удаляли с помощью каталитического гидрогенолиза. Чистота полученных соединений подтверждена спектрами ¹H-ЯМР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бугаев В. М. Итоги науки и техники. Серия «Фармакология. Химиотерапевтические средства». М., 1982, т. 13, с. 101–184.
2. Marks N., Stern F., Venuck M. Nature, 1976, № 261, p. 511–512.
3. Смагин В. Г., Виноградов В. А., Булгаков С. А., Полонский В. М., Беспалова Ж. Д., Титов М. И. Терапевт. арх., 1984, № 11, с. 49–52.
4. Jardetzky O., Roberts G. C. K. In: NMR in Molecular Biology. Acad. Press, 1981, p. 143–196.
5. Matsas P., Kenny A. J., Turner A. J. Biochem. J., 1984, v. 223, № 2, p. 433–440.
6. Loeber J. G., Verholf J., Burbach J. P. H., Witter A. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 86, № 4, p. 1288–1295.
7. Kosterlitz H. W. Receptors Proc. 7th int. Congr. Pharmacol., Paris, 1978. Oxford, 1979, p. 15–23.

Поступила в редакцию
24.IV.1985
После доработки
21.VI.1985

PEPTIDES DEGRADATION IN HUMAN SERUM AS MONITORED BY ¹H-NMR SPECTROSCOPY

ISAKOVA O. L., SEPETOV N. F., BESPALOVA G. D., BUSHUEV V. N.,
VINOGRADOV V. A., RUUGE E. K., TITOV M. I.

*USSR Research Centre for Cardiology, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow*

Enzymatic degradation of hexapeptide Tyr-*D*-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg in human serum has been investigated by ¹H-NMR spectroscopy, and its pathways are suggested. Its final degradation products, tetra- and pentapeptide, are shown to be stable in human serum for several hours. The NMR spectroscopy application for pharmacokinetic studies is substantiated.