

19. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 2, с. 263—271, 1983.
20. Саакян С. А., Срапионян Р. М., Спакян Д. М., Попова Т. В., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 3, с. 12—20, 1984.
21. Галоян А. А. Вopr. биохимии мозга, т. 13, с. 9—38, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1978.
22. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Абелян Ж. Г., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 1, с. 36—42, 1982.
23. Галоян А. А., Абелян Ж. Г., Александян С. С., Бархударян Н. А. Докл. АН АрмССР, т. 60, с. 117—120, 1975.
24. Seidah N. G., Chretien M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 78, p. 4236—4240, 1981.
25. Seidah N. G., Rochemont J., Hamlin J., Lis M., Chretien M. J. Biol. Chem., v. 256, p. 7977—7984, 1981.
26. Шерстнев В. В., Полстакс А. Б., Долнов О. Н. Успехи физиол. наук, т. 3, с. 66—86, 1979.

Поступила 10. IX 1985

УДК 612.82+577.152.344

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВЕЩЕСТВА Р И АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА

СИМС В. Э., ХЕДЕР Г., ЭМЕ Н.

Институт по исследованию лекарственных препаратов АН ГДР, Берлин

В течение последних лет появилось много данных о взаимодействиях вещества Р и ангиотензинпревращающего фермента (АТФФ) (КФ 3.4.15.1): ингибирование АТФФ с помощью вещества Р, деградация вещества Р посредством АТФФ и некоторые дополнительные результаты экспериментов *in vivo*. АТФФ—относительно неспецифическая дипептидилпептидгидролаза, отщепляющая от пептидной цепи С-концевой дипептид. Наиболее важными субстратами для нее являются вазоактивные пептиды—ангиотензин I и брадикинин.

Реакции между веществом Р и АТФФ несколько противоречат существующим концепциям о строении каталитического центра АТФФ. Согласно Cushman, Ondetti и Petrillo [1—3], ингибиторы АТФФ должны соответствовать следующим структурным критериям: содержать Zn^{2+} -связывающую группу; два гидрофобных участка, реагирующих с соответствующими гидрофобными карманами фермента (S_1 и S_2); водородную связь между двумя гидрофобными участками; С-концевую отрицательно заряженную группу (COO^-), взаимодействующую с катионным остатком аргинина фермента; расстояние между Zn^{2+} -связывающей группой и $COOH$ -группой должно соответствовать длине дипептидной цепочки.

Субстраты АТФФ (как минимум трипептиды) в их С-концевой части должны обладать такими же структурными особенностями. Кроме того, предпоследняя пептидная связь не должна быть замещена. Скорость гидролиза субстрата более всего зависит от боковых цепей пептида, особенно в его С-концевом отрезке [4].

Поскольку вещество Р является амидом, оно не должно было бы служить хорошим субстратом или ингибитором АТФФ. Более того, С-концевая аминокислотная последовательность вещества Р (Gly-Leu-MeI) не является благоприятной для взаимодействия с АТФФ. Несмотря на эти неблагоприятные условия, такие реакции между ними, как катаболизм вещества Р и торможение АТФФ в последние 6 лет были неоднократно описаны.

Взаимодействия между веществом Р и АТФФ могут вызывать интерес и в медицинском отношении, так как оба эти вещества участвуют во многих физиологических функциях, в том числе в регуляции кровяного давления [5—7], что дополнительно подчеркивает сложность систем регуляции последнего. Эти неожиданные реакции между веществом Р и АТФФ привлекли наше внимание главным образом в структурно-молекулярном отношении с целью новых ингибиторов АТФФ.

Материалы и методы

Вещество Р и его фрагменты, а также трипептид Нур-His-Leu были синтезированы в Отделе синтеза лекарственных препаратов (ГДР).

Активность АТФФ определяли флуориметрически микромодификацией метода Friedland, Silverstein [8,9]; субстратом служил Нур-His-Leu. Реакцию проводили в хлорид-фосфатном буфере, pH 8,3. Образующий дипептид His-Leu определяли флуориметрически с помощью реакции с офтальмидальдегидом при 355 nm (использовали препарат His-Leu для стандартизации фирмы „Serva“, ФРГ).

АТФФ выделяли из легких свиней по методу, близкому к методам Oshima и соавт. [10], Das, Soffer [11] и Lanzillo, Garburg [12]. Гомогенизированную ткань солюбилизировали ДОХ-На и наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, затем элюировали 0,02 М Na-фосфатным буфером (pH 8,3) и градиентом KCl (0—0,2 М). Полученные фракции разделяли на колонке с гидроксипатитом с элюцией фосфатным градиентом (0,01—0,05 М, pH 8,3) с последующей гель-фильтрацией на сефадексе G-200. Очищенный препарат имел величину У. А. 80000 нмоль His-Leu/мин/мл и давал одну полосу при гель-электрофорезе в ПААГ в присутствии ДДС-Na. В случае частично очищенного препарата исключалась стадия очистки на гидроксипатите. Такой препарат, помимо АТФФ, содержал примесь некоторых других ферментов, в частности с активностями, близкими к активности дипептид-аминопептидазы IV.

Идентификация гидролитических продуктов вещества Р с помощью ВЭЖХ. Инкубацию АТФФ с веществом Р проводили при 37° в течение 3,7 и 27 ч в 2 мл хлорид-фосфатного буфера, pH 8,3, содержавшем 0,5 мМ вещества Р и 1 мл раствора очищенного фермента. Реакцию останавливали нагреванием аликвот 5 мин при 95°. Продукты гидролиза идентифицировали с помощью ВЭЖХ в обратной фазе на колонке Lichrosorb RP-8 (250×4,6 мм, 10 мкм). После нанесения 100 мкМ пробы пептиды 40 мин элюировали градиентной элюцией следующими растворителями: А—10%-ным ацетонитрилом, 90%-ным 0,01 М NaH_2PO_4 и 0,15 М NaClO_4 (pH 2,2); В—70%-ным ацетонитрилом, 30%-ным 0,01 М NaH_2PO_4 и 0,5 М NaClO_4 (pH 2,2). Поглощение при 215 nm регистрировали с помощью УФ-детектора при комнатной температуре.

Радиоиммунный анализ. Определение вещества Р с помощью радиоиммунного анализа проводили по методу Rathsack и соавт. [13]: 0,5—50 мкМ вещества Р инкубировали 1 или 3 ч с очищенным препаратом АТПФ (190 нг/100 мкл) в хлорид-фосфатном буфере, рН 8,3. Реакцию останавливали нагреванием аликвот 5 мин при 55°.

Результаты и обсуждение

По нашему мнению, результаты экспериментов с торможением АТПФ необходимо разделить на полученные с использованием чистых и лишь частично очищенных препаратов АТПФ в связи с возможной примесью в последних других веществ Р-расщепляющих ферментов. Эти ферменты могут приводить к образованию фрагментов вещества Р с АТПФ-ингибирующими свойствами и тем самым усиливать тормозящий эффект вещества Р на АТПФ.

В наших исследованиях было установлено повышение величины IC_{50} для вещества Р, то есть снижение его тормозящего эффекта с увеличением степени очистки АТПФ (табл. 1). В сопоставимых условиях было обнаружено ингибирующее действие также и фрагментов вещества Р. С-концевой фрагмент вещества P_{5-11} не тормозил АТПФ, тогда как N-концевые фрагменты вещества P_{1-1} и вещества P_{3-4} тормозили АТПФ в той же мере, что и вещества P_{1-11} . Это свидетельствует о существенном вкладе этих N-концевых фрагментов вещества Р в его ингибирующее действие на нативный АТПФ; фрагменты вещества P_{1-4} и вещества P_{3-4} могут с легкостью образовываться при действии неочищенных препаратов фермента. На рис. 1 представлены некоторые возможные пути ферментативного образования N-концевых фрагментов вещества Р.

Литературные данные по ингибирующему действию вещества Р на активность АТПФ очень расходятся [14—20]. В большинстве случаев сообщали о высоких значениях IC_{50} и K_i для амидированного вещества Р и, как этого ожидали, данные величины оказались значительно ниже для неамидированного вещества Р. Значения же IC_{50} , приведенные в ра-

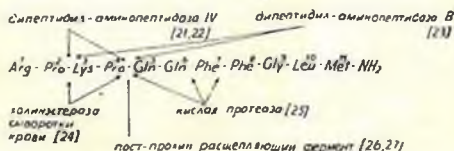


Рис. 1. Возможные пути ферментативного гидролиза N-концевого участка вещества Р.

боте Верма и соавт. [15, 16], совершенно неожиданны и до сих пор не получили подтверждения.

Главный вопрос в настоящее время состоит в следующем: можно ли данные по ингибированию АТПФ с помощью вещества Р, полученные

Таблица 1

Подавление ангиотензинпревращающего фермента (АПФ)
веществом Р и его фрагментами

Вещество Р	1 Arg — Pro —	2 Lys —	3 Pro —	4 Gln —	5 Gln —	6 Phe —	7 Phe —	8 Gly —	9 Leu —	10 Met — NH ₂	11
	нативная АПФ (сыво- ротка крови человека)		частично очи- щенная АСЕ (легкие свиньи)		очищенная АПФ (легкие свиньи)		источник АПФ				
Вещество Р ₁₋₁₁ (амид)	31		95		150						
	50		9,1		1,25		мозг крысы [14], легкие собаки [15,16]				
					40		мозг крысы [17]				
					260		легкие кролика [18]				
					290 (метидовый эфир)						
					32 (свободная кислота)		почки человека [19]				
					25						
Фрагменты вещества Р					2 (свободная кислота)		почки свиньи [20]				
					74						
	1-4 29		—		33						
	5-11 ≥100		≥100		≥100						
	1-2 (Arg-Pro) 100		—		≥100						
	2-4 (Lys-Pro) 20		—		15						

in vitro, экстраполировать на условия *in vivo*, то есть имеет ли значение этот феномен для регуляции кровяного давления. Ведет ли ингибирование АТПФ к значительному подавлению распада ангиотензина I и брадикинина в организме? В 1983 г. Ryan широко обсуждал аналогичный вопрос значимости установленных *in vitro* величин торможения протеаз для условий *in vivo*. На основе простых кинетических соображений он подтвердил, что для существенного ингибирования какого-либо фермента *in vivo* концентрация его ингибитора должна значительно превышать величину K_i . Это означает, что в случае вещества Р и продуктов его распада их концентрации в организме должны быть значительно больше, чем 20—200 мкМ. Концентрация же вещества Р в периферических органах существенно ниже, а максимальная концентрация вещества Р в мозгу, в черной субстанции составляет всего 15 мкМ/кг [7]. Мало вероятно, чтобы в такой концентрации в ткани мозга вещество Р могло влиять на активность АТПФ и соответственно на кровяное давление. Как было уже сказано, субстраты АТПФ по своей структуре должны быть близкими к ингибиторам этого фермента. Поскольку же С-конец вещества Р амидирован, оно должно быть весьма неподходящим субстратом для АТПФ, тем более, что С-концевая аминокислотная последовательность также не особенно подходит для реакции с АТПФ. Тем не менее, результаты ряда исследований свидетельствуют, что вещество Р гидролизуетсЯ при инкубации с АТПФ (табл. 2).

Наши исследования подтверждают эти данные. Деградация вещества Р вначале была количественно установлена с помощью радиоиммунного анализа и была вычислена величина K_m , составлявшая 33 мкМ; это совпадает с данными Skidgel и соавт. [19], согласно которым $K_m = 25$ мкМ. Затем продукты деградации вещества Р были идентифицированы с помощью ВЭЖХ (рис. 2). Было подтверждено, что главным начальным этапом деградации вещества Р являлся гидролиз связи Phe-Gly с образованием трипептида Gly-Leu-Met-NH₂. Кроме того, в результате гидролиза связи Gly-Leu в очень малом количестве образуется и дипептид Leu-Met-NH₂. Затем, вслед за отщеплением С-концевого трипептида, последовательно отделяются два дипептида — Phe-Phe и Gln-Gln. Но даже после длительной инкубации с АТПФ можно было обнаружить оставшийся неразложенным тетрапептид Arg-Pro-Lys-Pro (вещество P₁₋₄). Каптоприл в концентрации 1 мкМ полностью подавлял гидролиз вещества Р с помощью АТПФ.

Другой путь образования С-концевых трипептидов под действием АТПФ был описан Inokuchi, Nagamatsu [31] и Neels и соавт. [32] в случае субстратов с модифицированными пептидными связями между аминокислотными остатками в положении 2 и 3. Это свидетельствует о том, что в случае определенных субстратов АТПФ может проявлять эндопептидную активность. С другой стороны, образование С-концевого тетрапептида под влиянием АТПФ, как предложили Yokosawa и соавт. [29], не нашло подтверждения. По данным Skidgel и соавт. [19] и Erdős, Skidgel [33], вещество Р со свободной COOH-группой гидро-

Таблица 2

Катаболизм вещества Р (вР) при действии ангиотензинпревращающего фермента (АПФ)

Источник АСЕ	Метод определения Р	Основные продукты распада	Ингибиторы реакции	Концентрация АСЕ в иг/100мл	Концентрация вР в мкМ
Чистый фермент (мозг крысы) [29]	а) флуориметрически	$\text{вР}_{1-6} + \text{Gly-Leu-Met-NH}_2$			
	б) ВЭЖХ	$\text{вР}_{1-7} + \text{Phe-Gly-Leu-Met-NH}_2$	каптоприл	33	50
Чистый фермент (легкие кролика) [18]	а) биотест по секреции слюны	$\text{вР}_{1-8} + \text{Gly-Leu-Met-NH}_2$	каптоприл МК 422	4400*	800
	б) ВЭЖХ	$\text{вР}_{1-9} + \text{Leu-Met-NH}_2$	ЭДТА		
Чистый фермент (почки человека) [19]	а) биотест по реакции кишки морской свинки	$\text{вР}_{1-8} + \text{Gly-Leu-Met-NH}_2$	каптоприл	54	100
	б) ВЭЖХ				
Чистый фермент (легкие крысы) [30]	а) флуориметрически	$\text{вР}_{1-8} + \text{Gly-Leu-Met-NH}_2$	каптоприл МК 421	10-20	50
	б) ВЭЖХ		ЭДТА		

Примечание. * — вычисленная величина.

лизуетсЯ АТФФ в 7 раз быстрее, чем вещество Р-амид. Эти авторы постулировали слабое взаимодействие способного поляризоваться карбонилла первой пептидной связи с катионной группой остатка аргинина в каталитическом центре АТФФ. Несомненно, что реактивность COO^- -иона в неамидированном веществе Р намного сильнее, в связи с чем K_m и K_1/IC_{50} намного ниже, чем для вещества Р-амида или сложных эфиров (рис. 3).

Биологическая значимость неожиданвшегося гидролиза вещества Р при действии АТФФ до сих пор еще не ясна. Некоторые авторы сделали

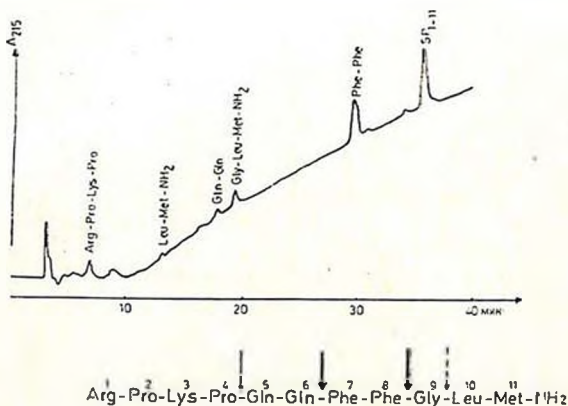


Рис. 2. Применение при исследовании вещества Р под влиянием ангиотензинпревращающего фермента ВЭЖХ; время инкубации 20 ч при 37°

недавно попытку пролить свет на этот вопрос. Так, Bunnell и соавт. [34] количественно охарактеризовали расщепление вещества Р при действии различных мембраносвязанных пептидаз неочищенного экстракта желудка свиньи. Вклад отдельных ферментов устанавливали применением их специфических ингибиторов. Было показано, что АТФФ не играет существенной роли в катаболизме вещества Р (ингибирование катоприлом и аналаприлом в кислотной форме составляло 5 и 13% соответственно). С другой стороны, фосфорамидон, ингибитор нейтральной эндопептидазы (КФ 3.4.24.11), называемой также энкефалиназой, ингибировал катаболизм вещества Р на 85%. Важность расщепления вещества Р энкефалиназой была признана Matsas и соавт. [35, 36] на основе результатов аналогичных опытов с препаратами мозга человека, а также опытов *in vitro*. Так, величины k_{cat} для обоих ферментов—АТФФ и энкефалиназы сопоставимы (33 и 31,9 мкМ соответственно), но определяющие скорость реакции величины k_{cat} для энкефалиназы значительно выше (5062 мин^{-1}), чем в случае АТФФ (225 мин^{-1}) [18, 33, 35]. Однако Lee и соавт. [37], Endo и соавт. [38] и Lauffer и соавт. [39] считают, что в условиях *in vivo* распад вещества Р, главным образом, обусловлен

действием неидентифицированной пока металлсодержащей протеазой, отличной от АТФФ и энкефалиназы. С другой стороны, есть некоторые указания и на участие АТФФ в катаболизме вещества Р в условиях *in vivo*. Так, Hanson и Lovenberg [40] сообщили об увеличении содержания вещества Р у животных после торможения АТФФ путем внутрижелудочкового введения каптоприла. Мы также обнаружили значительное увеличение содержания вещества Р в сыворотке крови у 5 из 7 больных со стойкой гипертонией в результате успешной пероральной терапии каптоприлом. В ряде других экспериментов было обнаружено повышение

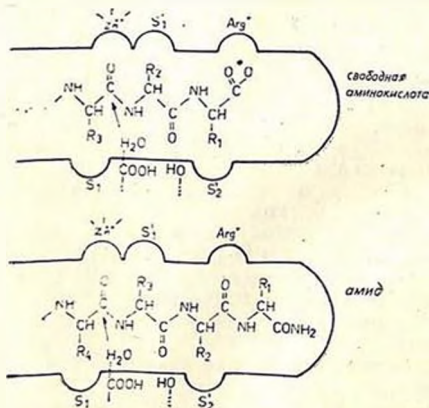


Рис. 3. Предполагаемое связывание пептидов со свободным и амидированным С-концом с активным центром ангиотензинпревращающего фермента. Модель активного центра по Skidgel и соавт. [19]

содержания вещества Р в сыворотке и в других тканях при лечении каптоприлом [41], но все эти результаты могут быть следствием и неспецифических эффектов каптоприла, который может ингибировать кроме АТФФ и некоторые другие протеазы.

Прийти к окончательному заключению по поводу деградации вещества Р, вызываемой АТФФ, до сих пор затруднительно. По-видимому, АТФФ не является ни единственным, ни главным ферментом, ответственным за катаболизм вещества Р, но это мнение требует дальнейшего подтверждения. Полное выяснение путей катаболизма вещества Р и других родственных пептидов поможет уяснить некоторые нежелательные побочные эффекты ингибиторов АТФФ при лечении гипертонии и определенных нарушений сердечной деятельности.

Мы благодарим д-ра Ragna Rathsack и Uve Kartscher, за проведение радиоиммунного анализа и ВЭЖХ, а также полезное обсуждение результатов.

1. Petrillo E. W., Ondetti M. A. *Med. Res. Rev.*, v. 2, №1, 1982.
2. Wyvratt M. J., Patchett A. A. *Med. Res. Rev.*, v. 5, p. 483, 1985.
3. Ondetti M. A., Cushman D. W. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 51, p. 283, 1982.
4. Cheung H. S., Wang F.-L., Ondetti M. A., Sabo E. F., Cushman D. W. *J. Biol. Chem.*, v. 255, 401, 1980.
5. Siems W. — E., Halle W. *Pharmazie*, v. 37, 539, 1982.
6. Studdy P. R., Lapworth R., Bird R. J. *Clin. Pathol.*, v. 36, 938, 1983.
7. Oehme P., Bienert M., Hecht K., Bergmann J. — In: Substanz P. P. Oehme H.-L. W. Gores (Eds.), Berlin-Friedrichsfelde, 1981.
8. Friedland H., Silverstein E. *Amer. J. Clin. Pathol.*, v. 66, 416, 1976.
9. Siems W. — E., Heder G., Komissarowa N. W. *Z. med. Labor. — Diagn.*, v. 26, 232, 1985.
10. Oshima G., Geese A., Erdös E. C. *Biochim. et biophys. acta*, v. 350, 26, 1974.
11. Das M., Soffer R. L. *J. Biol. Chem.*, v. 250, 6762, 1975.
12. Lanzillo J. L., Fanburg B. L. *Biochemistry*, v. 16, 5491, 1977.
13. Rathsack R., Wein A. N., Hecht K., Oehme P. *Dtsch. Gesundh.-Wesen*, v. 37, 563, 1982.
14. McGeer E. G., Singh E. A. *Neurosci Lett.*, v. 14, 105, 1979.
15. Verma P. S., Sander G., Miller R. L., Taylor R. E., O'Doonuc T. O., Adams R. C. *Federat. Proc.*, v. 41, 1531, 1987.
16. Verma P. S., Adams R. G., Miller R. L. *Europ. J. Pharmacol.*, v. 86, 275, 1982.
17. Yokosawa H., Ogura Y., Ishii S. *J. Neurochem.*, v. 41, 403, 1983.
18. Cascieri M. A., Bull H. G., Mumford R. A., Patchett A. A., Thornberry N. A., Liang T. *Med. Pharmacol.*, v. 25, 287, 1984.
19. Skidgel R. A., Engelbrecht S., Johnson A. R., Erdös E. G. *Peptides*, v. 5, 769, 1984.
20. Ody C. E., Wilgis F. P., Vavrek R. J., Stewart J. M. *Biochem. Pharmacol.*, v. 32, 3839, 1983.
21. Kato T., Nagatsu T., Fukasawa K., Harada M., Nagatsu I., Sakakibara S. *Biochim. et biophys. acta*, v. 525, 417, 1978.
22. Heymann E., Mentlen R. *FEBS Lett.*, v. 91, 360, 1978.
23. Kato T., Hama T., Nagatsu T. *J. Neurochem.*, v. 34, 602, 1980.
24. Lockridge O. J. *Neurochem.*, v. 39, 106, 1982.
25. Akopyan T. N., Arutunyan A. A., Lajtha A., Galoyan A. A. *Neurochem. Res.*, v. 3, 83, 1978.
26. Blumberg S., Teichberg V. I. *Biochim. and Biophys. Res. Commun.*, v. 90, 347, 1979.
27. Blumberg S., Teichberg V. I., Charl J. L., Hersh L., Mekelvy J. *Brain Res.*, v. 192, 477, 1980.
28. Ryan J. W. *Biochem. Pharmacol.*, v. 32, 2127, 1983.
29. Yokosawa H., Endo S., Ogura Y., Ishii S. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 116, 735, 1983.
30. Yokosawa H., Endo S., Ohgaki Y., Mueyama H., Ishii S. *J. Biochem.*, v. 98, 1293, 1985.
31. Inokuchi J. I., Nagamatsu A. *Biochim. et biophys. acta [Amsterdam]*, v. 662, 300, 1981.
32. Neels H., Inokuchi J. I., Nagamatsu A., van Sande M., Scharpe S. *J. Clin. Pathol.*, v. 35, 835, 1983.
33. Erdös E. G., Skidgel R. A. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 13, 42, 1985.
34. Bunnnett N. W., Konayashi R., Orloff M. S., Reeve J. R., Turner A. J. *Walsh J. H. Peptides*, v. 6, 277, 1985.
35. Matsuz R., Kenny A. J., Turner A. J. *Biochem. J.*, v. 223, 433, 1984.
36. Matsuz R., Ratray M., Kenny A. J., Turner A. J. *Biochem. J.*, v. 228, 487, 1985.

37. Lee C. — M., Sandberg B. E. B., Hanley M. R., Iversen L. L. *Europ. J. Biochem.*, v. 114, 315, 1981.
38. Endo S., Yokosawa H., Ishii S. I. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 129, 694, 1985.
39. Laufer R., Ewenson A., Gilon Ch., Chorev M., Selinger Z. *Europ. J. Biochem.*, v. 150, 135, 1985.
40. Hanson G. R., Lovenberg W. J. *Neurochem.*, v. 35, 1370, 1980.
41. Cauture R., Regoli D. *Can. J. Physiol Pharmacol.*, v. 59, 621, 1981.

Поступила 9. IX 1986

УДК 612.82.015.13:577.2

ИЗУЧЕНИЕ ЭКЗОПЕПТИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КАТЕПСИНА В И СПЕЦИФИЧНОСТИ КАТЕПСИНА D И ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ АСПАРТИЛЬНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА С ПОМОЩЬЮ ХРОМОФОРНЫХ И ВАЗОАКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ

АЗАРЯН А. В., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Изучено действие катепсина В (КФ 3.4.22.1), катепсина D (КФ 3.4.23.5) и высокомолекулярной аспартильной протеиназы (КФ 3.4.23.—) головного мозга человека и быка на вазоактивные пептиды (ангиотензины I и II, вещество P, ренин субстрат тетрадекапептид) и хромофорные пептиды, содержащие остаток п-нитро-L-фенилаланила: Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO₂)-Ala-Leu-OH (I), Gly-Gly-His-Phe(NO₂)-Phe-Ala-Leu-NH₂ (II), Pro-Glu-Ala-Phe(NO₂)-Gly (III). Обе аспартильные протеиназы расщепляли пептидную связь Phe₇-Phe₈ в веществе P, Leu₁₀-Leu₁₁ — в ренин субстрате тетрадекапептиде, Phe-Phe(NO₂) — в субстрате I и Phe(NO₂)-Phe — в субстрате II; катепсин D гидролизует связь Phe-Phe(NO₂) в субстрате I с K_m 0,4 мМ и k_{cat} 18,3 с⁻¹, а субстрат II — по связи Phe(NO₂)-Phe с K_m 0,88 мМ и k_{cat} 0,08 с⁻¹. Сопоставление кинетических констант гидролиза исследованных хромофорных пептидов катепсином D с таковыми для высокомолекулярной аспартильной протеиназы подтверждает наше предположение, что высокомолекулярная аспартильная протеиназа является комплексом катепсина D с эндогенным ингибитором. Изучение расщепления хромофорных пептидов катепсином В и определение кинетических констант ферментативного гидролиза субстратов I, III и Z-Arg-Arg-NNaOMe выявило факторы, способствующие проявлению дипептидилкарбоксипептидазной активности этой цистеиновой протеиназы.

Становится очевидным, что протеолитическая деградация нейропептидов и пептидных гормонов является принципиально важным механизмом, регулирующим активную концентрацию этих соединений и длительность их физиологических эффектов. Осознание роли протеиназ в процессе и инактивации нейропептидов и пептидных гормонов и в генерации олигопептидных фрагментов, обладающих более мощным или специфическим центральным действием, вызвало большой интерес к изучению протеиназ ткани головного мозга.

Ранее были описаны очистка, физико-химические свойства и субстратная специфичность аспартильных и цистеиновых протеиназ головного