

УДК 547.466+547.717

**СИНТЕЗ НОВЫХ ФОТОАКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ, РОДСТВЕННЫХ ЭНКЕФАЛИНУ**

Н. В. Сумбатян, А. Н. Топин, М. В. Тараненко, Г. А. Коршунова

(кафедра химии природных соединений)

**Осуществлен синтез двух новых аналогов энкефалина, содержащих фотоактивируемые остатки *n*-азидо-L-фенилаланина и *n*-(3-(трифторметил)-3Н-диазирин-3-ил)-L-фенилаланина. Изучены фотохимические свойства аналогов и их способность связываться с опиоидными рецепторами.**

Метод фотокросслинкинга широко используется в структурных исследованиях биологических рецепторов [1]. Большое число фотоактивных реагентов, главным образом основанных на нитрен-генерирующих азидоарильных производных, было применено для идентификации опиоидных рецепторов [2, 3]. Фотоактивируемые реагенты, содержащие карбен-генерирующую арил(трифторметил)диазириную группу, имеющую определенные преимущества над другими фотоактивными группировками, до настоящего времени не были использованы для изучения опиоидных рецепторов [4]. Единственный фотоактивный аналог лейцин-энкефалина, несущий трифторметилдиазириную (TFMD) группу в *para*-положении фенилаланина, был получен Нассалем [5].

В этой статье мы сообщаем о синтезе двух новых фотоактивных [D-Ala, D-Leu]-энкефалиновых аналогов I и II, в которых фенилаланиновый остаток в положении 4 замещен *n*-[3-(трифторметил)-3Н-диазирин-3-ил]-L-фенилаланином (Phe(TFMD)) или *n*-азидо-L-фенилаланином (Phe(N<sub>3</sub>)). Эти пептиды могут быть полезными инструментами для сайт-специфического фотокросслинкинга с опиоидными рецепторами.

H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe(TFMD)-D-Leu-OH (I),

H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe(N<sub>3</sub>)-D-Leu-OH (II).**Материалы и методы**

Все реагенты и растворители были очищены или перерегнаны перед использованием. Точки плавления были определены на приборе РНМК (*VEB Wagetechnik Rapido*). Величины оптического вращения были измерены на поляриметре *Perkin Elmer 341*. Аминокислотный анализ был выполнен на анализаторе *Hitachi KLA*, модель 835. Пептиды гидролизовали 6 н. HCl в вакууме при 105° в течение 24 ч. В работе использовали метод восходящей хроматографии на пластинках силикагеля F<sub>254</sub> (*Merck*), вещества на хроматограммах обнаруживали по УФ-поглощению. Соединения со свободной аминогруппой идентифицировали нингидриновым реактивом. Хроматографию выполняли в следующих системах растворителей: А – бензол:ацетон:уксусная кислота = 100:50:2; Б – бутанол:вода:уксусная кислота = 4:1:1; В – дихлорметан:петролейный эфир = 3:1. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L 40/100 Chemapol Sephadex G-10 (*Pharmacia*). Высокоэффективную жидкостную хромато-

графию (ВЭЖХ) проводили на колонке (250×4 мм) Диасорба 130 C<sub>16</sub> (*БиоХимМак*, Россия): стартовые буферы: А – 0,1% трифторуксусная кислота, Б – ацетонитрил с 0,1% трифторуксусной кислоты, линейный градиент от 20 до 60% Б за 30 мин при скорости потока 1 мл в мин. FАВ-масс-спектрометрия была сделана в лаборатории масс-спектрометрии Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, УФ-спектры были записаны на спектрофотометре *Hitachi*, модель 150–20, ИК-спектры снимались на приборе UR-10 в таблетках KBr.

**Синтез производных аминокислот**

Phe(TFMD) был синтезирован исходя из *n*-бромтолуола [5, 6, 7, 8]. Вос-Phe(TFMD)-OH был получен обработкой Phe(TFMD)ди-*mpet*-бутилпирокарбонатом в смеси пропанола и водного раствора NaOH-NaHCO<sub>3</sub>. Выход 80%, *T*<sub>пл</sub> 101–102°; ТСХ: *R*<sub>f</sub> (Б) 0,85; УФ (CHCl<sub>3</sub>): λ<sub>max</sub> 265, 272 (плечо), 360 нм [5]. Вос *n*-азидофенилаланин был приготовлен из Вос-*n*-амино фенилаланина, как описано [9], *T*<sub>пл</sub> 193–196°; ТСХ: *R*<sub>f</sub> (А) 0,57; УФ (CHCl<sub>3</sub>): λ<sub>max</sub> 252 нм.

**Синтез H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe(TFMD)-D-Leu-OH (I) и H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe(N<sub>3</sub>)-D-Leu-OH (II)**

Вос-Tyr-D-Ala-Gly-OH (III) был получен, как описано ранее [10].

Вос-Phe(TFMD)-D-Leu-OMe (IV) в 0,6 мл ДМФА растворили 0,108 г (0,278 ммоль) Вос-Phe(TFMD)-OH и 52,5 мг (0,389 ммоль) 1-гидроксibenзотриазола (HOBt). Раствор охладил до –10°, добавили 80,1 мг (0,389 ммоль) дициклогексилкарбодиимида (DCC) и перемешивали 1 ч при 0°. Затем внесли 70,57 мг (0,389 ммоль) H-D-Leu-OMe в виде гидрохлорида и 67 мкл (0,391 ммоль) диизопропилэтиламина (DIEA). Реакционную смесь перемешивали 14 ч при комнатной температуре, отфильтровали дициклогексилмочевину, фильтрат упарили на масляном насосе, остаток растворили в 15 мл этилацетата и промыли последовательно нас. раствором бикарбоната натрия (2×5 мл), 0,1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2×5 мл) и 5 мл нас. раствора NaCl. Сушили MgSO<sub>4</sub>, растворитель упарили на ротормном испарителе. В результате получили 123,4 мг (0,239 ммоль, 86% от теоретического) хроматографически чистого IV в виде бесцветных кристаллов. *T*<sub>пл</sub> 101–105°; *R*<sub>f</sub> (Б) 0,85.

*Вос-Tyr-D-Ala-Gly-Phe(TFMD)-D-Leu-OMe (V)*. Соединение IV (123,4 мг, 0,239 ммоль) растворили в 50% трифторуксусной кислоте (TFA) в дихлорметане, перемешивали раствор 30 мин при комнатной температуре, затем смесь упарили в вакууме, добавили 1 мл абсолютного этанола и вновь упарили досуха для удаления остатков трифторуксусной кислоты. Полученный трифторацетат сочетали с 97,8 мг (0,239 ммоль) *Вос-Tyr-D-Ala-Gly-OH* в присутствии 38,7 мг (0,287 ммоль) *HOBT* и 59,1 мг (0,287 ммоль) *DCC* и 41 мкл (0,239 ммоль) *DIEA*. Перекристаллизация продукта из этилацетата-петролейного эфира дала пентапептид с выходом 57%.

*Вос-Tyr-D-Ala-Gly-Phe(TFMD)-D-Leu-OH (VI)*. В 0,8 мл метанола растворили 110 мг V (0,136 ммоль) и при перемешивании добавили 150 мкл 2 н. раствора едкого натра. Раствор перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре, затем смесь разбавили водой до 30 мл и метанол отогнали в вакууме. Раствор экстрагировали этилацетатом (15 мл), водный раствор охладил до 0°, добавили 1 н. серную кислоту до pH 3 и вновь экстрагировали этилацетатом (2×30 мл). Объединенные органические вытяжки промыли 20 мл воды, 20 мл нас. раствора NaCl, сушили сульфатом магния и растворитель удалили на роторном испарителе. В результате получили 82,1 мг (0,103 ммоль, 76%, ) VI в виде светло-желтого масла.  $R_f(A)$  0,02;  $R_f(B)$  0,94.

*TFA-H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe(TFMD)-D-Leu-OH (I)*. Вос-группу с VI снимали, как описано для IV. Полученное желтое масло чистили гель-проникающей хроматографией, а затем ВЭЖХ в препаративном варианте с метанолом в качестве элюента. После лиофилизации получили 32 мг (0,046 ммоль, 44,7% от теоретического) пептида. Аминокислотный анализ: Tyr 0,68; Ala 1,00; Gly 1,19; Leu 1,04,  $T_{пл}$  163–164°;  $R_f(B)$  0,86, УФ-спектр:  $\lambda_{макс}$  274 нм, плечо до 400 нм, уменьшающееся при облучении УФ-светом.  $[\alpha]_D^{20} +26,2$  (с 0,06, H<sub>2</sub>O), МС 678 (M+).

*Вос-Phe(N<sub>3</sub>)-D-Leu-OMe (VII)*. Синтез VII был выполнен, как описано для IV, исходя из *Вос-Phe(N<sub>3</sub>)-OH* (128,8 мг, 0,4 ммоль) и *HCl-D-Leu-OMe* (100,6 мг, 0,554 ммоль). Выход 77%, масло,  $R_f(B)$  0,85.

*H-Phe(N<sub>3</sub>)-D-Leu-OMe (VIII)*. После удаления Вос группы из соединения VII по стандартной процедуре трифторуксусной кислотой в дихлорметане трифторацетат дипептида был получен в виде желтоватого масла. Осаждение из этилацетата петролейным эфиром привело к VIII. Выход 45 %,  $T_{пл}$  178–180°,  $R_f(A)$  0,73.

*Вос-Tyr-D-Ala-Gly-Phe(N<sub>3</sub>)-D-Leu-OMe (IX)*. Пептид VIII (81,1 мг, 0,181 ммоль) сочетали с III, используя *HOBT* (23,4 мг, 0,181 ммоль), *DCC* (37,1 мг, 0,181 ммоль) и *DIEA* (31 мкл, 0,181 ммоль). Все процедуры были подобны таковым для синтеза V. Выход пептида IX 93,4 мг (86%),  $T_{пл}$  106–108°,  $R_f(A)$  0,14.

*H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe(N<sub>3</sub>)-D-Leu-OH (II)*. Защитные группы с пептида IX (93,4 мг, 0,121 ммоль) были удалены, как описано для пептида V. Свободный пентапептид очищали гелефильтрацией на Сефадексе G-10 в 0,1 М уксусной кислоте. Пептид получен с выходом 87%. Чистота вещества была проверена с помощью ВЭЖХ ( $\tau = 11,6$  мин),

$T_{пл}$  169–170°,  $[\alpha]_D^{20} +51,5$  (с 0,1; H<sub>2</sub>O),  $R_f(B)$  0,79 (с 0,1; H<sub>2</sub>O). Аминокислотный анализ: Tyr 0,81, Ala 1,00, Gly 1,13, Leu 1,08; ИК (пленка)  $\nu = 2112$  см<sup>-1</sup>, МС: m/z 611 (M<sup>+</sup>).

#### Исследование свойств пептидов

*Получение препарата мембран головного мозга крыс* [11]. Крыс-самцов линии Вистар весом 150–200 г декапировали, на холоду быстро извлекали головной мозг, отсекали мозжечок, который практически не содержит опиоидных рецепторов, и оставшуюся часть промывали и гомогенизировали в среде выделения (80 мл раствора на один мозг). В работе использовали стеклянный гомогенизатор с тефлоновым ротором (зазор 250 мкм). Полученный гомогенат центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин при 4° на центрифуге «*Вескман-Y-2-21*» (США). Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в среде инкубации (50 мл буфера на один мозг) и выдерживали суспензию 30 мин при 37° при перемешивании для полного гидролиза эндогенных лигандов. Затем суспензию вновь центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин при 4°. Супернатант отбрасывали, осадок ресуспендировали в среде инкубации (50 мл на один мозг) и хранили в темноте при 0–4°. Среда выделения: 50 мМ раствор Трис-HCl, pH 7,4 при 4°. Среда инкубации: 20 мМ раствор *Нерес*, pH 7,4 при 37°.

#### Исследование вытеснения $\mu$ - и $\delta$ -селективных лигандов опиоидных рецепторов

В качестве селективных лигандов использовали:  $\mu$ -селективный – DAGO;  $\delta$ -селективный – DTLET, меченные тритием. В качестве стандарта брали растворы налоксона и DTLET. Кривую вытеснения снимали следующим способом. В пробирку вносили 50 мкл раствора меченого селективного лиганда с концентрацией 1 нМ в конечном объеме и 50 мкл раствора исследуемого лиганда или среды инкубации. Использовали концентрации немеченого лиганда, равные 0,1; 0,4; 1; 5; 20; 100; 1000 нМ в конечном объеме. Добавляли в пробирку 500 мкл суспензии препарата мембран и раствор инкубировали 20 мин при 37° на механической мешалке, затем фильтровали через стекловолоконный фильтр и три раза промывали средой промывки (5 мМ раствор Трис-HCl pH 7,4 при 4°). Фильтр аккуратно переносили в полиэтиленовый флакон для счета, добавляли 10 мл сцинтиллятора ЖС-8 и выдерживали 12 ч при комнатной температуре. Счет проводили на приборе «*Mark-III*» при ограничениях 10 мин или

#### Результаты экспериментов по специфическому связыванию пептидов с опиоидными рецепторами мозга крыс

Исследуемый пептид	IC <sub>50</sub> (нМ) DTLET ( $\delta$ )	IC <sub>50</sub> (нМ) DAGO ( $\mu$ )	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ )/IC <sub>50</sub> ( $\delta$ )
[D-Ala <sup>2</sup> -D-Leu <sup>5</sup> ]-enk	12,4 ± 3,4	53 ± 10	4,3
[D-Ala <sup>2</sup> -Phe(TFMD) <sup>4</sup> -D-Leu <sup>5</sup> ]-enk (I)	36 ± 18	32,4 ± 8,6	0,9
[D-Ala <sup>2</sup> -Phe(N <sub>3</sub> ) <sup>4</sup> -D-Leu <sup>5</sup> ]-enk (II)	8,8 ± 1,1	31 ± 13	3,5

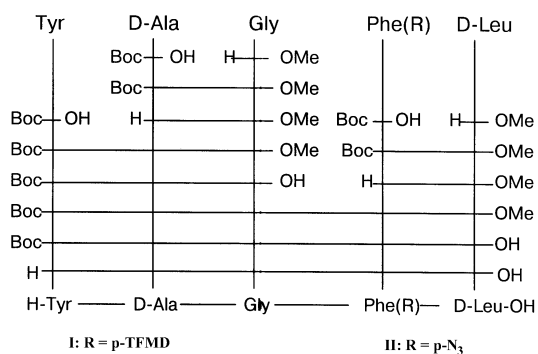


Рис. 1. Схема синтеза [D-Ala<sup>2</sup>-Phe(TFMD)<sup>4</sup>-D-Leu<sup>5</sup>]-энкефалина и [D-Ala<sup>2</sup>-Phe(N<sub>3</sub>)<sup>4</sup>-D-Leu<sup>5</sup>]-энкефалина

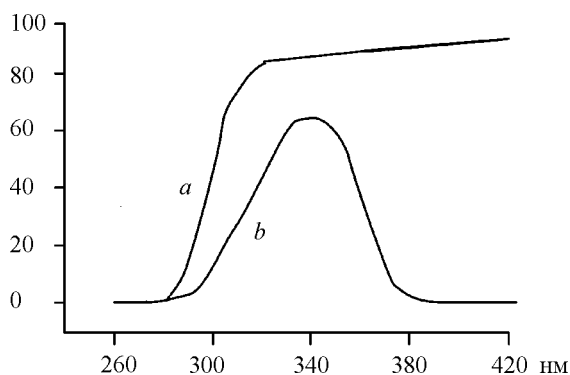


Рис. 2. Спектры пропускания светофильтров УФ-1 (а) и УФС-8 (б)

10000 СРМ. Обсчет результатов проводили с помощью программы InPlot.

**Фотолиз** выполняли с использованием ртутной лампы высокого давления (120 ватт, ДРК-120, Россия), снабженной стеклянным фильтром УФ-1 или УФС-8. Луч света пропускали через кварцевую линзу. Облучение проводили при 0° в пробирке, расположенной в фокусе на расстоянии 10 см от источника света. Образцы растворяли в воде (1 мг в мл).

**Инактивация рецепторов.** Водную суспензию препарата мембран мозга крыс помещали в кварцевую кювету и подвергали УФ-облучению. Связывание [H<sup>3</sup>]DADLE с препаратами мозга определяли количественно, как описано выше.

**Обсуждение результатов**

Для синтеза фотоактивного аналога фенилаланина Phe(TFMD) была выбрана оптимизированная методика, основанная на комбинации описанных методов, исходя из 4-бромтолуола [5–8]. Бок-защищенные производные были получены, как описано выше (см. «Материалы и методы»). Все константы этих соединений были идентичны описанным в литературе [5, 9]. Фотоактивные аналоги лейцин-энкефалина были синтезированы классическим методом в растворе с использованием фрагментной конденсации 3+2, как показано на рис. 1.

После хроматографической очистки целевые пептиды были охарактеризованы данными аминокислотного анализа и масс-спектрологии. Присутствие ТФМД-группы было подтверждено УФ-спектром, азидо-группы – ИК-спектром. Опыты по связыванию с опиоидными рецепторами были выполнены, как описано выше. Результаты представлены в таблице. Связывающая способность сравнивалась с таковой [D-Ala<sup>2</sup>-D-Leu<sup>5</sup>]-энкефалина. Изменение в рецепторной селективности в случае I может быть обусловлено большим объемом заместителя у фенилаланина в положении 4. Этот факт согласуется с данными [12], показывающими, что включение объемных аминокислотных остатков в положение 4 энкефалина приводит к μ-селективным лигандам. В общем, следует заключить, что присутствие азидо- или ТФМД-группы в пара положении фенилаланина не сильно влияет на связывание пептидов с опиоидными рецепторами, т.е. оба пептида являются подходящими лигандами для специфического фотокросслинкинга.

Фотохимические свойства нитрен-генерирующих азидов были интенсивно изучены в последние годы [1, 13]. Было показано, что их фотолиз происходит в области 250–300 нм и рецепторы очень чувствительны к такому облучению [14]. Максимум поглощения арилдиазириннов находится в области 350 нм. [15]. Так как влияние длинноволнового УФ-света на белки опиоидных рецепторов не описано, мы предприняли серию экспериментов, направленных на выяснение оптимальных условий иррадиации. Мы использовали для этой цели ртутную лампу высокого давления и два стеклянных фильтра с различным спектром пропускания, как показано на рис. 2 (кривые а и б).

В первом случае (фильтр УФ-1) условия облучения подобны стандартным, описанным для диазиринов (15). Чтобы оптимизировать условия облучения лиганд-рецепторного комплекса, мы определили инактивацию рецептора, как функцию от времени облучения. Инактивацию оценивали по связыванию [H<sup>3</sup>]DADLE с препаратами мозга крыс. Было обнаружено, что около 50% инактивации происходит уже после 60 с облучения (рис. 3, кривая а).

В другом эксперименте мы использовали фильтр УФС-8 с максимумом в районе 350 нм (рис. 2, кривая

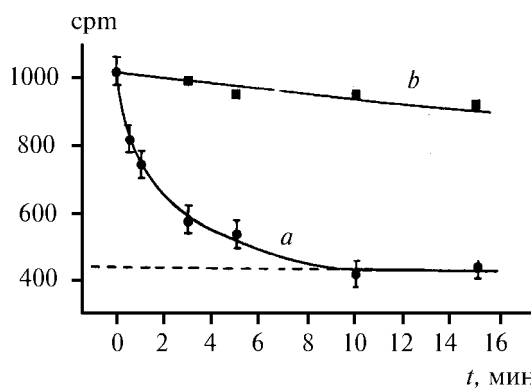


Рис. 3. Зависимость активности опиоидных рецепторов от времени фотооблучения (а – фильтр УФ-1, б – фильтр УФС-8)

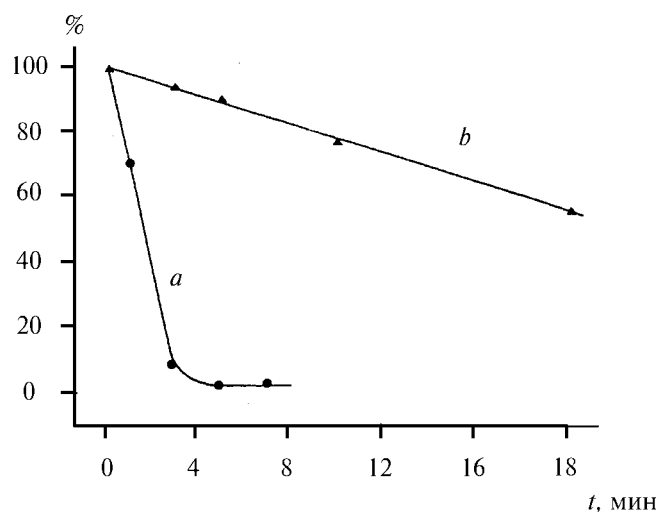


Рис. 4. Зависимость степени фотолиза (%) пептидов I (a) и II (b) от времени облучения при 350 нм (фильтр УФС-8)

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты № 00-04-48312 и 00-04-22003).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bayley H. Photogenerated Reagents in Biochemistry and Molecular Biology. Amsterdam, N.Y., 1983.
2. Schiller P.W. // Progress in Medical Chemistry. 1991. **28**. P. 301.
3. Loh H.H., Smith A.P. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1990. **30**. P. 123.
4. Brunner J., Senn H., Richards F.M. // J.Biol. Chem. 1980. **255**. P. 3313.
5. Nassal M. // J. Am. Chem. Soc. 1984. **106**. P. 7540.
6. Shih L.B., Bailey H. // Anal. Biochem. 1985. **144**. P. 132.
7. Baldini G., Martoglio B., Schachenmann A., Zugliani C., Brunner J. // Biochemistry. 1988. **27**. P. 7951.
8. Топин А.Н., Кориунова Г.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1995. **36**. С. 583.
9. Schwyzer R., Caviezel M. // Helv. Chem. Acta. 1971. **54**. P. 1395.
10. Кориунова Г.А., Добкина И.М., Рябцева О.Н., Швачкин Ю.П. // ЖОХ. 1987. **57**. С. 1647.
11. Зайцев С.В., Курочкин И.Н., Сергеева М.Г., Варфоломеев С.Д. // Биохимия. 1984. **49**. С. 1127.
12. Schiller P. W., Nguyen T.M.-D., Lemieux C. // in Peptides 1988. P. 613 (eds. Jung G., Bayer E. W. de Gruyter, Berlin, 1989)
13. Brunner J. // Annu. Rev. Biochem. 1993. **62**. P. 483.
14. Glassel J.A., Venn R.F. // Life Sci. 1981. **29**. P. 221.
15. Nassal M. // Liebigs Ann. Chem. 1983. P. 1510.

Поступила в редакцию 12.12.00