

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 перереганы перед использованием. Точки плавления были определены на приборе РНМК (*VEB Wagetechnic 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 С<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*-бутилпирикарбонатом 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

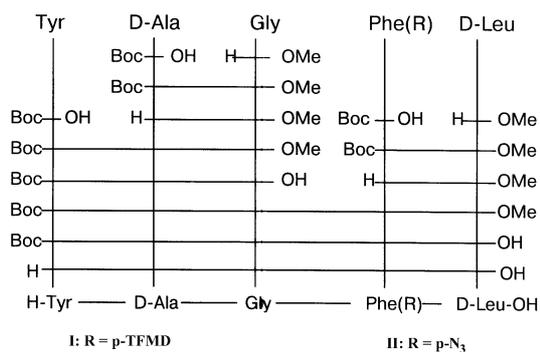


Рис. 1. Схема синтеза [D-Ala<sup>2</sup>-Phe(TFMD)<sup>4</sup>-D-Leu<sup>5</sup>]-энкефалина и [D-Ala<sup>2</sup>-Phe(N<sub>3</sub>)<sup>4</sup>-D-Leu<sup>5</sup>]-энкефалина

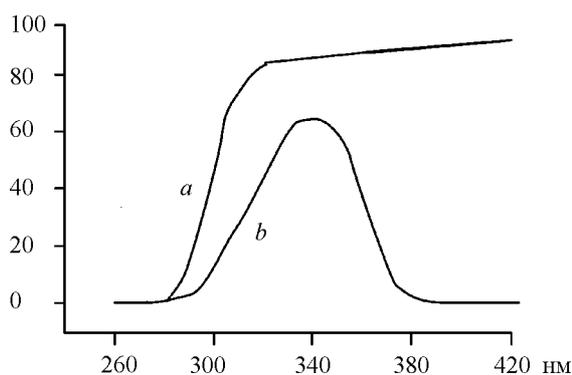


Рис. 2. Спектры пропускания светофильтров УФ-1 (а) и УФС-8 (б)

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

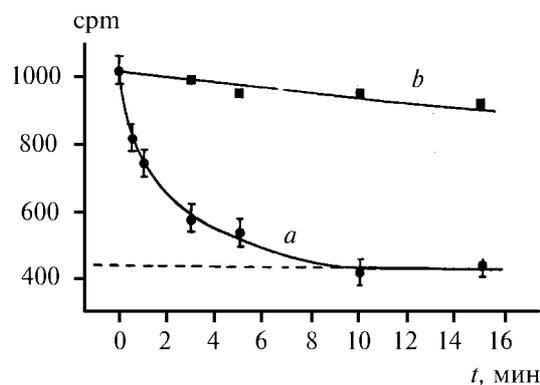


Рис. 3. Зависимость активности опиоидных рецепторов от времени фотооблучения (а – фильтр УФ-1, б – фильтр УФС-8)

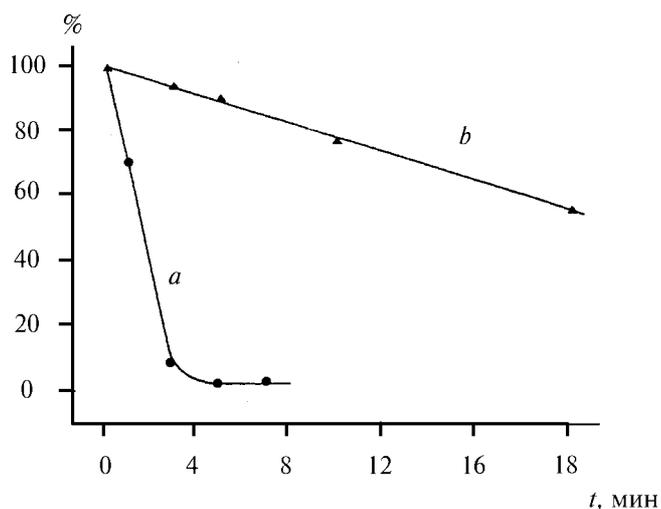


Рис. 4. Зависимость степени фотолиза (%) пептидов I (a) и II (b) от времени облучения при 350 нм (фильтр УФС-8)

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

б). Как показывает кривая б на рис. 3 рецепторы относительно стабильны в этих условиях, и только слабая потеря активности обнаружена через 15 мин. Пептид I был облучен в тех же условиях. За фоторазложением I следили хроматографически. Зависимость разложения I от времени показана на рис. 4 (кривая a): через 5 мин происходит полное разложение. Оптимальное время фотолиза для лиганд-рецепторного комплекса составляет 2–3 мин. Для сравнения на рис. 4 (кривая б) показано фоторазложение пептида II в тех же условиях.

Таким образом, можно сделать вывод, что новые синтезированные пептиды могут быть использованы как фотоактивируемые лиганды для изучения опиоидных рецепторов. Хотя синтез азидов легче, чем синтез ТФМД, последние, как оказалось, являются более предпочтительными для изучения опиоидных рецепторов, так как они могут подвергаться фотолизу в условиях, при которых устойчивы белки опиоидных рецепторов.