

СИНТЕЗ ФОТОАФФИННОГО АРИЛАЗИДНОГО ПРОИЗВОДНОГО СЕМАКСА

*К.В. Мартынова, Ю.Г. Кириллова, *И.Ю. Нагаев, *В.П. Шевченко,
С.И. Шрам, В.И. Швеиц

** Институт молекулярной генетики РАН*

Осуществлен синтез фотоаффинного арилазидного производного пептида семакса исходя из *p*-аминобензойной кислоты и свободного семакса.

ВВЕДЕНИЕ

Пептид семакс (МЕНFPGP) является синтетическим аналогом адренокортико-тропного гормона (АКТГ₄₋₁₀). Он обладает ярко выраженным ноотропным и нейропротективным действием [1, 2]. Созданный на его основе препарат применяется для лечения последствий гипоксии и ишемии головного мозга, инсультов и черепно-мозговых травм [2-4]. Однако механизм его действия на клеточном уровне не выяснен, в частности, не идентифицированы рецепторы семакса на нейрональных клетках.

Одним из подходов для поиска биологических мишеней пептидов является метод фотоаффинного мечения [5]. Для этого используются различные фотоактивируемые радиоактивно меченные зонды. Целью настоящей работы являлась разработка оптимальной схемы синтеза арилазидных зондов пептида семакса на основе азидо-производных бензойной кислоты.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор арилазидных соединений был связан с относительной простотой их получения, а также с их спектральными и фотолитическими свойствами, позволяющими проводить облучение без существенного повреждения биологического образца [6]. Арилазиды представляют один из наиболее широко используемых в биологии классов фотоактивируемых реагентов [5]. Для отработки синтеза арилазидных зондов были использованы азидобензойные кислоты и их предшественники. Данный выбор был обусловлен тем, что эти соединения имеют малый размер, поэтому их производные с семаксом будут иметь

характеристики рецепторного связывания, близкие к аналогичным характеристикам семакса.

Первый этап работы заключался в отработке методики модификации пептида производными бензойной кислоты. В качестве модельного соединения использовали *o*-бромбензойную кислоту (1). Синтез осуществляли двумя способами, схема 1.

В первом случае синтез проводили без предварительной активации кислоты с использованием в качестве конденсирующего агента урониевого реагента для пептидного синтеза – *O*-бензотриазол-*N,N,N',N'*-тетраметил-уроний-гексафтор-фосфата (НВТУ) [7], а в качестве основания – диизопропилэтиламина (DIPEA) (схема 1). Выход *o*-бромбензойного производного семакса (2) в этом случае составил около 10%. Кроме того, анализ продуктов реакции методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) показал наличие ряда побочных продуктов, в связи с чем в дальнейшем от этого метода мы отказались.

Во втором случае синтез (2) осуществлялся в две стадии с получением в качестве промежуточного продукта, согласно методике [8], активированного *N*-сукцинимидного эфира *o*-бромбензойной кислоты (3), выход которого составил 65% (схема 1). Модификацию пептида *N*-сукцинимидным эфиром *o*-бромбензойной кислоты (3) проводили по методике [9] с использованием триэтиламина (ТЕА) в качестве основания. В этом случае выход (2) по данным ВЭЖХ составил 30%. Других продуктов присоединения *N*-сукцинимидного эфира *o*-бромбензойной кислоты к пептиду обнаружено не было.

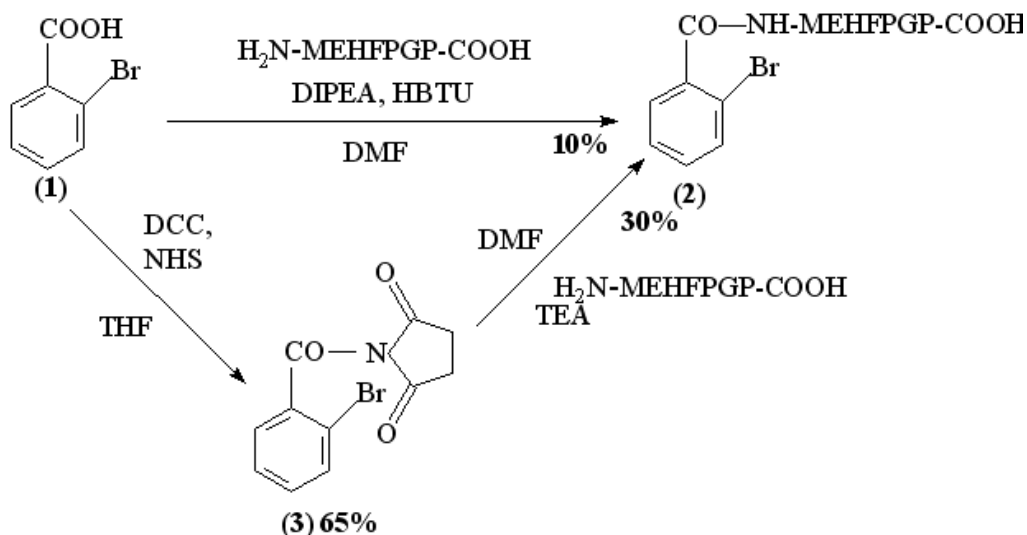


Схема 1. Получение *o*-бромбензойного производного семакса с использованием HBTU или через *N*-сукцинимидный эфир *o*-бромбензойной кислоты.

Таким образом, при использовании второго способа получения модифицированного пептида выход целевого продукта оказался в 2 раза выше (считая на две стадии).

Первоначально для получения азидобензойного производного семакса в качестве исходного соединения был использован модифицированный пептид (2). Однако, анализ продуктов реакции с помощью ВЭЖХ показал, что в условиях реакции замещения галогена на азид [8] происходит разрушение пептида.

Наиболее удачным оказалось использование в качестве исходного соединения *p*-аминобензойной кислоты (4). Ее подвергали нитрозилированию на холоду с последующей обработкой азидом натрия по методу [10]. Выход продукта (5) составил 67% (схема 2). Его конденсация с *N*-оксисукцинимидом давала с хорошим выходом активированный эфир (6). Конденсация последнего со свободным пептидом семакс приводила к целевому продукту (7).

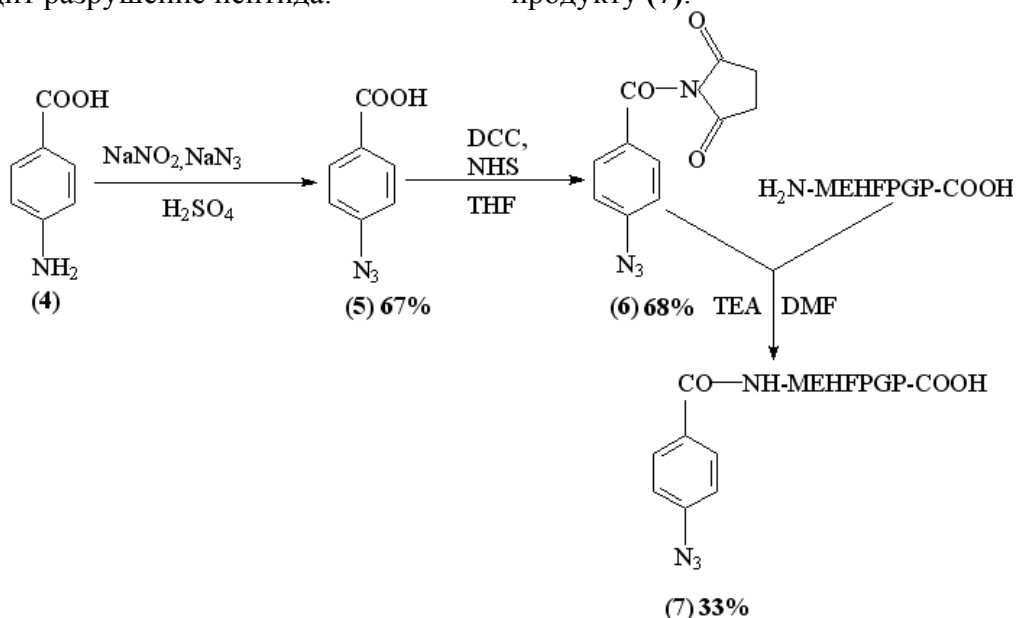


Схема 2. Получение *p*-азидобензойного производного семакса.

Согласно данным ВЭЖХ (рис. 1), в результате последней реакции образуются 4 фотоактивируемых продукта. Из приведенного рисунка видно, что после УФ-облучения

все 4 пика (I–IV), детектировавшиеся при 260 нм, исчезли. Это свидетельствует о присутствии азидобензойной группы во всех анализируемых соединениях (I–IV).

Этот вывод основывается на том, что, во-первых, максимум поглощения арилазидов находится в области 254–270 нм [6], и, во-вторых, при УФ-облучении арилазиды легко подвергаются фотолизу, при этом наблюдается снижение интенсивности пика поглощения [9].

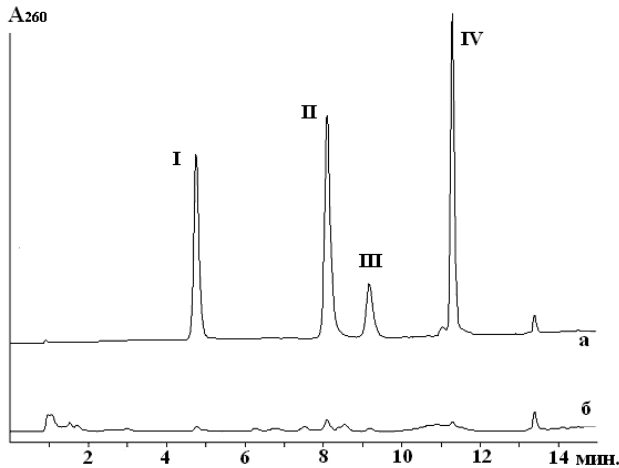


Рис. 1. ВЭЖХ реакционной смеси при получении *n*-азидобензойного производного семакса до (а) и после (б) УФ-облучения в течение 5 мин.

Продукты были очищены при помощи препаративной ВЭЖХ и проанализированы с использованием масс-спектрометрии и УФ-спектрофотометрии. Анализ полученных данных показал, что вещество со временем удерживания 11,3 мин (пик IV) содержит модифицированный пептид. Вещества со временем удерживания 4,8 и 9,2 мин (пики I и III, соответственно) имели гораздо меньшую молекулярную массу, чем пептид. Пик III соответствует *n*-азидобензойной кислоте, а пик I – предположительно, *N*-сукцинимидному эфиру *n*-азидобензойной кислоты. Вещество пика II имело большую молекулярную массу, чем пептид. В связи с тем, что время удерживания пика II было меньше, чем у целевого продукта (7), мы предполагаем, что это окисленный по сере продукт (7). Выход целевого продукта составил 33% относительно исходного количества семакса.

На рис. 2 приведен спектр поглощения азидобензойного производного семакса до и после облучения УФ-светом. Максимум поглощения модифицированного пептида лежит в области 270 нм. Как видно из

приведенного рисунка, при облучении УФ-светом спектр поглощения азидобензойного производного семакса претерпевает существенные изменения, которые связаны с расщеплением азидной группы под действием УФ-света с образованием активного нитрена и взаимодействием последнего с молекулами растворителя [6, 8]. Полученные результаты фотолиза согласуются с данными, полученными в работе [9].

В результате проведенного исследования было получено фотоактивное *n*-азидобензойное производное семакса. Показано преимущество использования активированных эфиров кислот по сравнению с прямой конденсацией для получения модифицированного пептида (7). Посредством фотолиза продемонстрирована принципиальная пригодность соединения (7) для использования в качестве фотоактивного зонда в исследованиях белок (рецептор)–пептидных взаимодействий. Представленный в работе трехстадийный синтез (схема 2) может применяться для получения арилазидных производных коротких пептидов в препаративных количествах.

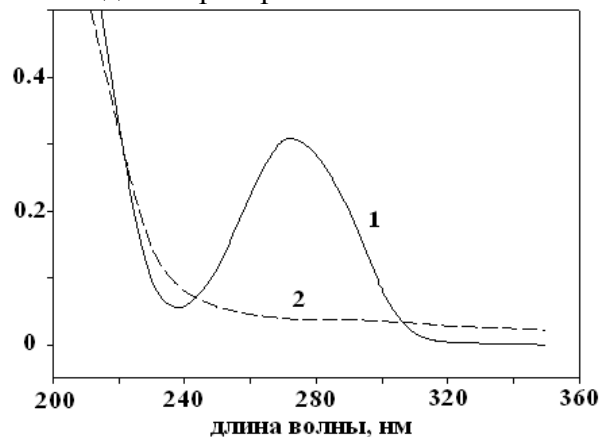


Рис. 2. Спектр поглощения *n*-азидобензойного производного семакса до (1) и после (2) облучения УФ-лампой в течение 5 мин. Концентрация образца – 5 мкг/мл.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: азид натрия производства Serva (Германия), НВТУ, дициклогексилкарбодиимид (DCC), *N*-гидроксисукцинимид (NHS) фирмы Fluka (Швейцария), а также *o*-бром-

бензойную кислоту, *n*-аминобензойную кислоту, сульфат магния (безв.), нитрит натрия и растворители отечественного производства марки чда. Растворители перед использованием перегоняли. Пептид семакс был любезно предоставлен Л.А. Андреевой из Отдела химии физиологически активных веществ Института молекулярной генетики РАН.

Для проведения ТСХ применяли силикагелевые пластины Sorbfil-UF (ПБК ПЛАСТМАШ ИВС). ТСХ проводили в системе бензол–этилацетат–уксусная кислота, 2 : 1 : 0.03. Детекцию осуществляли с помощью УФ-лампы ЭЗАН λ 254 нм.

Спектры ^1H -ЯМР регистрировали на приборе DRX500 (Bruker, Германия) Химические сдвиги приведены в миллионных долях.

Масс-спектры были получены на квадрупольном масс-спектрометре Finnigan MATINCOS 50 (США) с прямым вводом (ионизация электронным ударом) и масс-спектрометре Finnigan MAT LCQ (ионизация - электроспрей).

Анализ методом ВЭЖХ проводили на приборе МИЛИХРОМ А02 (Россия). Колонка Prontosil 12C_{18aq} (2×75 мм, 5 мкм), элюент А – 0.2 М LiClO₄, 0.05 М HClO₄, элюент Б – метанол, градиент Б в А: 30–100% за 30 мин), скорость потока 0.2 мл/мин. Детекцию проводили одновременно на 5-ти каналах с длинами волн в диапазоне от 210 до 260 нм.

***N*-Сукцинимидный эфир *o*-бромбензойной кислоты (3).**

Получение *N*-сукцинимидного эфира *o*-бромбензойной кислоты (3) проводили по модифицированной методике [8]. К раствору 88.2 мг (0.439 ммоль) *o*-бромбензойной кислоты (1) в 4 мл ТГФ добавляли 91.7 мг (0.445 ммоль) DCC и 51.2 мг (0.445 ммоль) NHS и выдерживали реакционную смесь в течение 12 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Затем смесь отфильтровывали, промывали на фильтре ТГФ и полученный осадок перекристаллизовывали из изопропилового спирта. Выход (3): 85 мг (65%). ^1H -ЯМР-спектр (CDCl₃, δ , м.д.): 3.0 (4H, s, 4'-H);

7.45 (2H, m, 4-CH, 5-CH); 7.77 (1H, m, 3-CH); 8.10 (1H, m, 6-CH).

***o*-Бромбензойное производное семакса (2).**

а) К раствору *o*-бромбензойной кислоты (1) (22.9 мкмоль) в 2 мл ДМФА добавляли НВТУ (22.9 мкмоль) и 9.94 мкл DIPEA (34.4 мкмоль). Смесь перемешивали в течение 5 мин, а затем добавляли 10 мг (11.4 мкмоль) семакса. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч, затем лиофильно удаляли растворитель. ВЭЖХ-анализ: время удерживания (2) – 10.5 мин, содержание целевого вещества – 10%.

б) К раствору 2.4 мг (12 мкмоль) соединения (3) в 200 мкл ДМФА последовательно добавляли ТЕА (6 мкл) и 3.5 мг (4 мкмоль) семакса и перемешивали в течение 10 ч при 0 °С (модифицированная методика [9]). Продукты реакции лиофилизировали и анализировали с помощью ВЭЖХ, время удерживания (2) – 10.5 мин. Препаративную очистку проводили на колонке Kromasil 100 C₁₈ (5 мкм, 8×150 мм). Элюент А – метанол–вода–муравьиная кислота–трифторуксусная кислота, 70 : 30 : 0.1 : 0.01, элюент Б – метанол, градиент Б в А: 0–100% за 30 мин, скорость потока 2 мл/мин. Время удерживания (2) – 2.9 мин. Выход (2): 1.2 мг (30%). Масс-спектр, m/z : 996.2 (M^+); 952.2 ($M^+ - \text{CO}_2$).

***n*-Азидобензойная кислота (5).**

Получение *n*-азидобензойной кислоты проводили по методике [10]. Выход (5): 1.57 г (67%). ВЭЖХ-анализ: время удерживания – 9.2 мин. Масс-спектр, m/z : 160 (M^+); 118 ($M^+ - \text{N}_2 - \text{OH}$).

***N*-Сукцинимидный эфир *n*-азидобензойной кислоты (6).**

Получение *N*-сукцинимидного эфира *n*-бромбензойной кислоты (6) проводили по модифицированной методике [8]. К раствору 71.6 мг (0.439 ммоль) *n*-азидобензойной кислоты (5) в 4 мл ТГФ последовательно добавляли 91.7 мг (0.445 ммоль) DCC и 51.2 мг (0.445 ммоль) NHS при комнатной температуре и перемешивании. Выдерживали реакционную смесь в течение 12 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании.

вании. Затем смесь отфильтровывали, промывали на фильтре ТГФ, полученный осадок перекристаллизовывали из изопропилового спирта. Выход (6): 77.6 мг (68%). Т. пл. 176–178°C. Масс-спектр, m/z : 260 (M^+); 232 ($M^+ - N_2$).

***n*-Азидобензойное производное семакса (7).**

Получение *n*-азидобензойного производного семакса (7) проводили по модифицированной методике [9]. К раствору 2.4 мг (12 мкмоль) *N*-сукцинимидного эфира *n*-азидобензойной кислоты (6) (12 мкмоль) в 200 мкл ДМФА последовательно добавляли ТЕА (6 мкл) и 3.5 мг (4 мкмоль) семакса и перемешивали в течение 10 ч при 0°C, после чего продукты реакции лиофилизировали и анализировали с помощью ВЭЖХ. Препаративную очистку проводили на колонке Kromasil 100C₁₈, (7 мкм, 8×150 мм). Элюент А: метанол–вода–муравьиная кислота, 50 : 50 : 0,1, элюент Б – метанол, градиент Б в А: 0–100% за 30 мин, скорость потока 2 мл/мин. Время удерживания – 11.3 мин. Масс-спектр, m/z :

959.2 (M^+). MS/MS: 843.4 (*p*-N₃-C₇H₄O-МЕНFPG); 690.0 (*p*-N₃-C₇H₄O-МЕНF); 542.9 (*p*-N₃-C₇H₄O-МЕН); 406 (*p*-N₃-C₇H₄O-МЕ).

Фотолиз *n*-азидобензойного производного семакса.

Облучение (7) проводили с использованием УФ-лампы PHILIPS Hg TUV 15W/G15T8 (Нидерланды). Источник излучения располагался на расстоянии 15 см от образца, находящегося в кварцевой кювете толщиной 1 см. Время облучения составило 5 мин. Растворитель метанол–вода, 1 : 1. УФ-спектры до и после облучения измеряли на спектрофотометре U-2800 в диапазоне длин волн от 240 до 450 нм с шагом 10 нм, скоростью сканирования 100 нм/мин в кварцевой кювете 1×1 см.

Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и гранта «Научные школы» № НШ-2150.2003.4 под руководством акад. Н.Ф. Мясоедова.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ноотропные эффекты нового аналога фрагмента АКТГ(5–10)-гексапептида АКТГ(5–7) PGP / Н. Ю. Глазова [и др.] // Доклады Академии Наук. – 1999. – Т. 367, № 1. – С. 137-140.
2. Исследование механизмов нейропротективного действия семакса в период острого ишемического удара / Н. Ф. Мясоедов [и др.] // Журн. неврологии и психиатрии. – 1999. – № 5. – С. 15-19.
3. Synthetic ACTH analogue Semax displays nootropic-like activity in humans / A. Ya. Caplan [et al.] // Neuroscience Res. Comm. – 1996. – Vol. 19, № 2. – P. 115-123.
4. Влияние гептапептида семакса на энцефалограмму человека / М. В. Королева [и др.] // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 1996. – Т. 122, № 11. – С. 527-529.
5. Hatanaka, Y. Photoaffinity labeling in drug discovery and developments: chemical gateway for entering proteomic frontier / Y. Hatanaka, Y. Sadakane // Curr. Topics in Med. Chem. – 2002. – Vol. 2. – P. 271-288.
6. Bayley, H. Photoaffinity labeling / H. Bayley, J.R. Knowles // Methods in Enzymology. – 1977. – Vol. 46. – P. 69-115.
7. Han, S.-Y. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis / S.-Y. Han, Y.-A. Kim // Tetrahedron. – 2004. – Vol. 60. – P. 2447-2467.
8. Toward the development of radiolabeled fluorophenyl azide-based photolabeling reagents: synthesis and photolysis of iodinated 4-azidoperfluorobenzoates and 4-azido-3,5,6-trifluorobenzoates / S. X. Cai [et al.] // J. Org. Chem. – 1992. – Vol. 57. – P. 1299-1304.
9. Photoaffinity labeling of insulin receptor proteins of liver plasma membrane preparations / C. C. Yip [et al.] // Biochemistry. – 1980. – Vol. 19, № 1. – P. 72-76.
10. Photoaffinity labeling of acyl-coenzyme A:glycine N-acyltransferase with *p*-azidobenzoyl-coenzyme A / E. P. Lau [et al.] // Biochemistry. – 1977. – Vol. 16, № 12. – P. 2581-2585.