

Вн

на правах рукопису

ГОРБАТЮК ВІТАЛІЙ ЯКОВИЧ

УДК 577.322:591.145-546:543.422.2

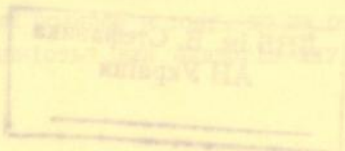
КОНФОРМАЦІОННА РУХОМІСТЬ ТРИПЕПТИДНИХ ГОРМОНІВ
ЗА ДАНИМИ ДВОМІРНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ ЯМР
ТА ЇЇ ЗВ'ЯЗОК З НЕЙРОТРОПНОЮ АКТИВНІСТЮ

02.00.10. - біоорганічна хімія, хімія природних
та фізіологічно активних речовин

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеню
кандидата хімічних наук

ОДЕСА - 1995



877.1



Робота виконана у

ім.О.В.Богатського НАН України

Науковий керівник: доктор хімічних наук,
професор Ю.Є.Шапиро

Офіційні опоненти: доктор хімічних наук,
професор О.Г.Юрченко
кандидат хімічних наук,
науковий співробітник
О.В.Севастьянов

Провідна організація: Інститут біоорганічної хімії
та нафтохімії НАН України

Захист відбудеться "26" грудня 1995 р. о 10 год. на
засіданні спеціалізованої ради Д05.14.02 при Фізико-хімічному
інституті ім.О.В.Богатського НАН України (270080, м.Одеса, Чорно-
морська дорога, 86)

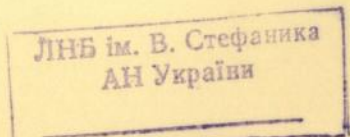
З дисертацією можна ознайомитися в науковій бібліотеці Фізико-
хімічного інституту ім.О.В.Богатського НАН України

Автореферат розісланий "18" листопада 1995 р.

Вчений секретар спеціалізованої

ради, кандидат хімічних наук

Л.О.Літвінова



Актуальність теми. Широке розповсюдження олігопептидів у природі, їх різноманітні фізіологічні функції, можливість проведення хімічних модифікацій робить цей клас біологічних молекул благодатним при вивченні зв'язку "структура-активність". Знання просторової будови молекул природних та синтетичних олігопептидів необхідне для дослідження молекулярних механізмів пізнавання, стимулювання, регуляції, тобто для визначення тих факторів, що зумовлюють взаємодію пептидних біорегуляторів з їх біологічною мішенню. Прямий підхід міг би полягати в безпосередньому вивченні гормон-рецепторних комплексів сучасними фізико-хімічними методами. Однак рецептори, навіть якщо їх вдається виділити в ізольованому стані, не завжди зберігають свої властивості. У той же час розуміння молекулярних механізмів передачі біологічної інформації може бути досягнуто вивченням структурних та динамічних властивостей цілеспрямовано синтезованих та відібраних аналогів гормонів. Застосування спектроскопії ЯМР до вирішення цих завдань відмічено значними успіхами, що зв'язано з розвитком за останнє десятиріччя багатомпульсних двовірних методик. В результаті обсяг і якість інформації про структуру молекул у розчині, отриманої методами двовірної спектроскопії ЯМР, порівняні з одержаною методом рентгеноструктурного аналізу.

Метою роботи було встановлення структурних особливостей аналогів меланостатину (MIF) та тироліберину (TRH), які зумовлюють їх антидепресивну або антиамнестичну активність.

Наукова новизна досліджень полягає в тому, що

- запропоновано комплексний метод пошуку "біологічно активної конформації" пептидів, оснований на методиках двовірної спектроскопії ЯМР;

- відібрано "біологічно активні конформації" у розчині для аналогів MIF та TRH;

- показано, що при фізичному моделюванні взаємодії аналогів MIF і біологічної мішені за допомогою обернених міцел АОТ "біологічно активна конформація" стабілізується на межі поділу фаз вода/ПАР;

- виконано попереднє картування активного центру біологічної мішені аналогів MIF;

- пояснено знайдений при малих дозах реверсивний ефект антидепресивної активності (АДА) аналогів MIF.

Практичне значення роботи полягає в тому, що на основі знайденого зв'язку "структура-активність" для аналогів MIF та TRH було

запропоновано синтезувати модельні циклічні дипептиди і пептидоміметики, у яких "біологічно активна конформація" реверсивного повороту закріплена ковалентним зв'язком. Дійсно, серед синтезованих циклічних пептидоміметиків при біологічних дослідженнях були знайдені сполуки, які мають більшу антидепресивну або антиамнестичну активність, ніж MIF, TRH та їх лінійні аналоги. Це дозволяє використовувати запропоновані підходи для позаекспериментального скринінгу нейрорептиків нових поколінь.

На захист виносяться:

1. Стратегія пошуку "біологічно активної конформації" пептидів методами двовірної спектроскопії ЯМР, фізичного та математичного моделювання.
2. "Біологічно активна конформація" реверсивного повороту аналогів MIF та TRH, яка реалізується як у розчині ДМСО, так і на межі поділу фаз вода/ПАР.
3. Топографія активного центру біологічної мішені аналогів MIF, які мають антидепресивну активність.

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідалися на 9th International Symposium on Surfactants in Solution (Varna-1992), 28th Colloquium Spectroscopicum Internationale (York-1993), 13th American Peptide Symposium (Edmonton-1993), 9th Russia-Germany Symposium on Chemistry of Peptides and Proteins (Pushchino-1994), Всесоюзному симпозіумі по хімії пептидів (Рига-1990), 8 Всесоюзному симпозіумі по міжмолекулярній взаємодії і конформаціям молекул (Новосибірськ-1990), 1 Всесоюзній конференції по теоретичній органічній хімії (Волгоград-1991), 6 З'їзді фармакологів України (Харків-1990), 9 Всесоюзній конференції "Химическая информатика" (Черноголовка-1992), Російській науковій конференції "Создание лекарственных средств" (Москва-1992), Науково-практичній конференції "Лекарственные средства Украины, синтез, научные исследования, производство, реализация" (Харків-1992), Всесоюзних, республіканських і регіональних конференціях молодих вчених та спеціалістів (Москва-1990, Київ-1990, Донецьк-1991, Одеса-1991, 1992). На конкурсі молодих вчених (1992 р.) робота була удостоєна премії ім.О.В.Богатського.

Публікації: По темі дисертації опубліковано 26 друкованих робіт.

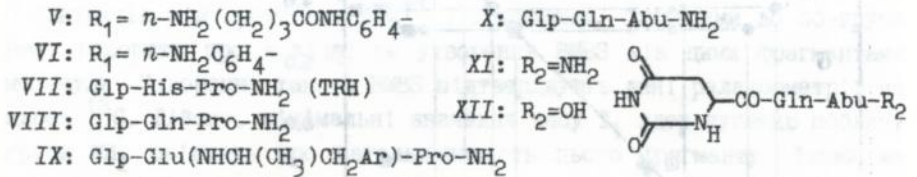
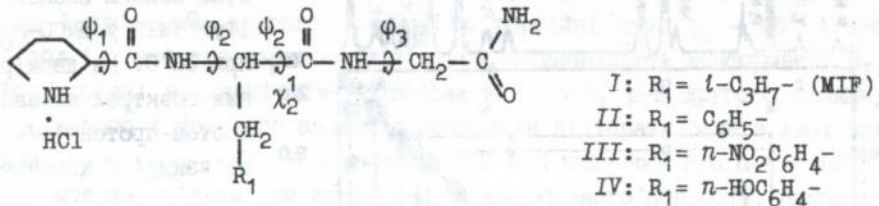
Структура і обсяг роботи. Дисертація викладена на 183 стор. машинопису, містить 23 мал. і 24 табл. Робота складається з вступу, чотирьох глав, висновків та списку літератури з 129 джерел.

Експериментальні результати отримані особисто автором або при його безпосередній участі. Теоретичні результати отримані разом з співавторами робіт. При цьому автор приймав участь у постановці задачі і обговоренні результатів. Більшість розрахунків у гл.3 виконано В.С.Кузьміним, Л.П.Тригуб і М.Ю.Горбачовим.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

1. Вивчення конформаційної рухомості молекул меланостатину, тироліберину та їх аналогів методами двовірної спектроскопії ЯМР.

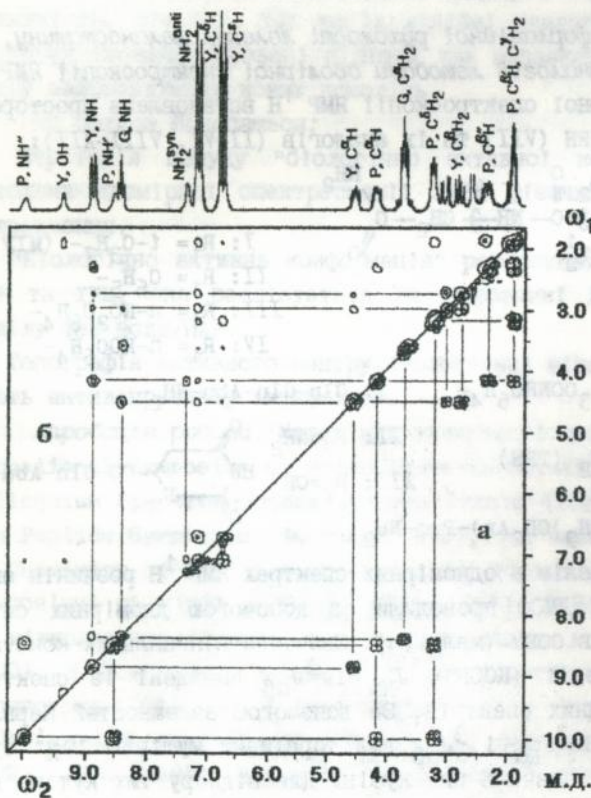
Методами двовірної спектроскопії ЯМР ¹H встановлена просторова структура MIF (I), TRH (VII) та їх аналогів (II-VI, VIII-XII):



Віднесення сигналів в одномірних спектрах ЯМР ¹H розчинів аналогів MIF та TRH у ДМСО проводили за допомогою двовірних спінокореляційних спектрів COSY (мал.1,а). Значення віціональних констант спін-спінової взаємодії (KCCB) ³J_{Nα} і ³J_{Nβ} знайдені із спектрів COSY і δ-J-кореляційних спектрів. За допомогою залежностей Карплуса-Бистрова для KCCB ³J_{Nα} і ³J_{Nβ} від торсійних кутів φ і χ¹ було розраховано декілька значень цих кутів. Для відбору тих кутів, які реалізуються у розчині, були застосовані міжпротонні відстані між зближеними фрагментами, які взаємодіють за диполь-дипольним механізмом. В двовірних крос-релаксаційних спектрах NOESY (мал.1,σ) ці взаємодії (δ-контакти) проявляються у вигляді крос-пиків ядерного ефекту Оверхаузера (ЯЕО). Значення ЯЕО, знайдені з інтенсивностей крос-пиків, обернено пропорційні шостому степеню міжпротонної відстані. Ці експерименти дозволили також виконати оцінку торсійних кутів φ і χ₂.

Відомо, що енергетично вигідними конформаціями MIF є конформа-

ції реверсивного повороту - β -завороти I і II роду, стабілізовані внутрішньомолекулярним водневим зв'язком (ВМВЗ) $\text{NH}_2 \dots \text{O}=\text{C}$ Pro. Конформації β_I і β_{II} відрізняються значеннями торсійних кутів φ_2 і φ_{Gly} . Для молекули MIF у кристалі характерна конформація β_{II} .



Мал.1. Спектр ЯМР ^1H (угорі) та двовірні COSY (а) і NOESY (б) спектри розчину 0,05 моль/л аналогу $[\text{Tyr}^2]\text{MIF}$ у $\text{DMSO}-d_6$ при 30°C . На двовірних спектрах вказані протон-протонні J -зв'язки і δ -контакти

На підставі залежностей Карплуса-Бистрова отримані значення торсійних кутів $\varphi_2 \approx -90, -145^\circ$ і $\varphi_{\text{Gly}} \approx \pm 25^\circ$ для аналогів MIF у розчині DMSO. У випадку канонічних конформацій β_I та β_{II} кут φ_2 приймає значення, близьке до -60° . Збільшення φ_2 за модулем викликає викривлення конформації β -завороту і збільшує імовірність розриву ВМВЗ. При цьому стає можливим вільне обертання навколо зв'язків $(\text{C}^\alpha-\text{CO})_2$ і $(\text{N}-\text{O}^\alpha)_{\text{Gly}}$. Проте α -протони Gly дають сигнали у вигляді вироджених мультиплетів, що може свідчити про загальмованість

обертання навколо зв'язків цього залишку. За програмою PANIC виконані розрахунки спінової системи протонів залишку Gly. На підставі залежностей гемінальної КССВ ${}^2J_{\alpha'\alpha''}$ від торсійного кута ϕ для залишку Gly були знайдені значення кутів $\phi_{\text{Gly}} = \pm 25^\circ$, які відповідають конформаціям β_I і β_{II} .

В спектрах ЯМР ${}^1\text{H}$ пептидів II-VI у ДМСО спостерігається магнітна нееквівалентність β -протонів другого амінокислотного залишку (мал.1). Аналіз молекулярних моделей показав, що причиною магнітної нееквівалентності може бути близькість карбонільної групи другого залишку, що можливо тільки у випадку конформації β_{II} .

Дійсно, δ -контакти в спектрі NOESY (мал.1, σ) між протоном NH Gly і протонами другого залишку та торсійні кути $\phi_2 = 55^\circ$ і 180° (табл.1), які при цьому реалізуються, відповідають конформації β_{II} . Розраховані відстані між протонами NH і α -H, β -H другого залишку, NH другого і третього залишків дозволили відібрати одне з двох значень кута $\phi_2 \approx -90^\circ$. В спектрі NOESY в δ -контакти Pro α -H - NH_2^{CIV} , які можливі тільки при конформації реверсивного повороту. Наявність δ -контактів між протонами NH_2^{CIV} і протонами, близькими до CO-групи Pro, говорить про можливість утворення ВМВЗ між цими фрагментами молекули. Утворення такого ВМВЗ підтверджують дані релаксометрії на ядрах ${}^{13}\text{C}$. Дійсно, мінімальні значення часу T_1 ядер вуглецю поблизу групи NH_2 свідчать про загальмованість цього фрагменту. Такий же висновок було зроблено на підставі магнітної нееквівалентності α -протонів Gly. Таким чином, аналоги MIF у ДМСО набувають переважно конформацію β_{II} , стабілізовану ВМВЗ $\text{NH}_2^{\text{CIV}} \dots \text{O}=\text{C}$ Pro.

Заміна Leu на Phe слабо впливає на значення торсійних кутів і не змінює конформації β_{II} молекули пептида. При введенні в n -положення фенільного кільця Phe різних замісників збільшується значення ${}^3J_{\text{NH}\alpha}$ для другого залишку, а, отже, зростає значення ϕ_2 , що призводить до викривлення конформації β_{II} . Методами множинної лінійної регресії отримані кореляційні рівняння, що зв'язують АДА аналогів MIF із значеннями КССВ другого і третього залишків. Знайдено, що найбільше значення АДА мають ті сполуки, у яких конформація β_{II} найменш викривлена. Із збільшенням цього викривлення активність падає. Так, аналог VI, у якого β -заворот II роду найбільш викривлений, був майже не активним по всьому інтервалі вивчених доз. Тому має сенс говорити про існування "біологічно активної конформації" β_{II} у MIF та його аналогів.

Таблиця 1

Міжпротонні відстані, отримані за даними NOESY, і відповідні їм значення торсійних кутів ϕ_i , ϕ_i та χ_i^j молекули HCl-Pro-Tyr-Gly-NH₂ (1 моль/л, 303 К)

\bar{d} - Контакт	Розчин пептиду у воді		Розчин пептиду у ДМСО		Водний розчин пептиду, інкапсульований оберненою міцеллю АОТ	
	\bar{d} , Å	Торсійний кут	\bar{d} , Å	Торсійний кут	\bar{d} , Å	Торсійний кут
Pro α -H - Tyr NH	2,3	$\phi_1 = 80^\circ$	2,4	$\phi_1 = 60^\circ$	*	$\phi_1 = 165^\circ$
Pro β -H - Tyr NH	**		2,5; 3,1	$\phi_1 = 180^\circ$	2,7; 3,4	
Tyr α -H - Tyr NH	2,9		2,9		3,0	
Tyr β -H - Tyr NH	2,4	$\phi_2 = -80^\circ$; -160°	2,5; 2,8	$\phi_2 = -94^\circ$	2,5	$\phi_2 = -94^\circ$
Gly NH - Tyr NH	**		3,1		3,8	
Gly NH - Tyr α -H	2,4		2,6		2,6	
Gly NH - Tyr NH	**	$\phi_2 = 180^\circ$	3,1	$\phi_2 = 55^\circ$; 180°	3,8	$\phi_2 = 70^\circ$; 180°
Gly NH - Tyr β -H	**		3,1; 2,9		3,1	
Tyr β -H - Tyr α -H	2,4		2,8; 2,6		2,5	
Tyr β -H - Tyr NH	2,4	$\chi_2^1 = \pm 29^\circ$; $\pm 134^\circ$	2,5; 2,8	$\chi_2^1 = -33^\circ$	2,5	$\chi_2^1 = \pm 35^\circ$; $\pm 130^\circ$
Gly NH - Tyr β -H	**		3,1; 2,9		3,1	
Tyr δ -H - Tyr β -H	2,3	$\chi_2^2 = 90^\circ$	2,5; 2,5	$\chi_2^2 = 90^\circ$	2,6	$\chi_2^2 = 90^\circ$
Gly α -H - Gly NH	2,4	$\phi_3 = \pm 25^\circ$	2,6	$\phi_3 = \pm 25^\circ$	2,6	$\phi_3 = \pm 25^\circ$

*) Кросс-пик схований сигналом води.

***) \bar{d} - контакти відсутні.

У аналогів MIF у воді спостерігається слабкопольний зсув сигналів карбонільних груп в спектрі ЯМР ^{13}C , який можна пояснити розривом BMB3 через гідратацію цих груп. Розрив BMB3 підтверджується селективним зростанням часу T_1 ядер вуглецю $\text{C}_{1\alpha}$. При цьому α -контакти в спектрі NOESY і міжпротонні відстані (табл.1) відповідають розгорнутій конформації молекули. Тому необхідно встановити причини можливої стабілізації конформації β_{II} у водному середовищі поблизу активного центру мішені, на реалізацію якої вказують біологічні дослідження. Для цього використано фізико-хімічне моделювання біологічної мішені пептидів оберненими міцелами Аерозоля OT (діоктилсульфосукцинат натрію, AOT), які інкапсулюють водний розчин трипептиду IV.

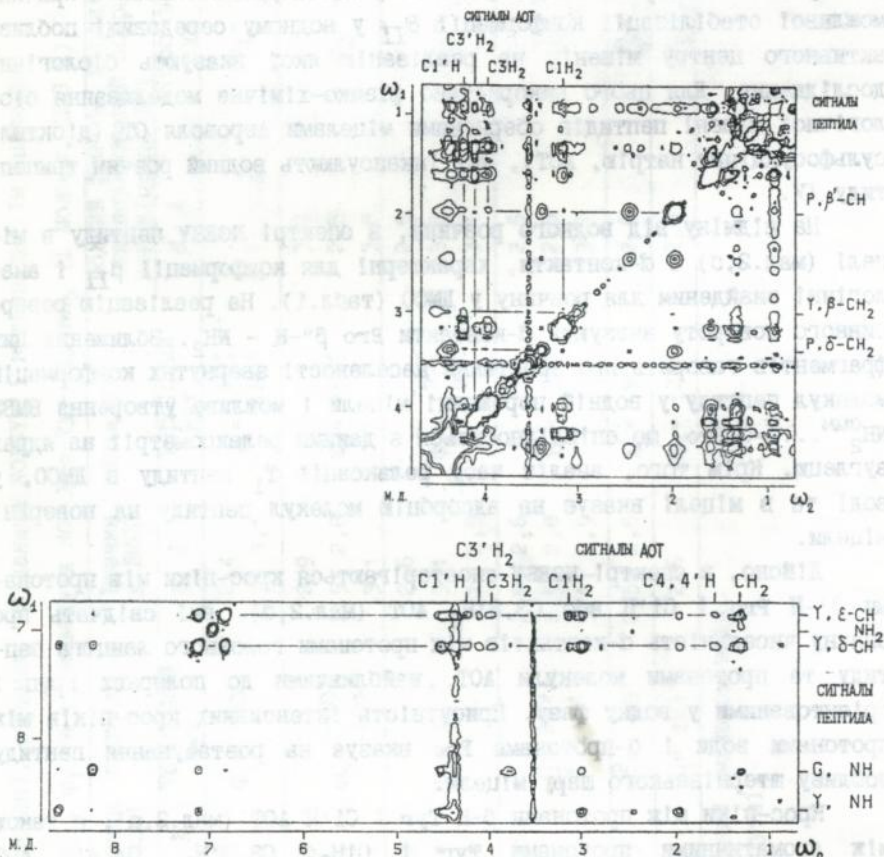
На відміну від водного розчину, в спектрі NOESY пептиду в міцелі (мал.2,б) є α -контакти, характерні для конформації β_{II} і аналогічні знайденим для розчину у ДМСО (табл.1). На реалізацію реверсивного повороту вказують α -контакти $\text{Pro} \beta\text{-H} - \text{NH}_2$. Зближення цих фрагментів говорить про зростання населеності звернутих конформацій молекул пептиду у водній порожнині міцели і можливе утворення BMB3 $\text{NH}_2^{\text{силь}} \dots \text{O}=\text{C} \text{Pro}$, що співвідноситься з даними релаксометрії на ядрах вуглецю. Крім того, аналіз часу релаксації T_1 пептиду в ДМСО, у воді та в міцелі вказує на адсорбцію молекул пептиду на поверхні міцели.

Дійсно, в спектрі NOESY спостерігаються крос-піки між протонами $\beta\text{-H} \text{Pro}$ і $\text{C}_{1\alpha}\text{H}$ або $\text{C}_{3,3'}\text{H}_2$ AOT (мал.2,а), які свідчать про значну чисельність α -контактів між протонами головного ланцюга пептиду та протонами молекули AOT, найближчими до полярних груп і орієнтованими у водну фазу. Присутність інтенсивних крос-пиків між протонами води і δ -протонами Pro вказує на розташування пептиду поблизу штернівського шару міцели.

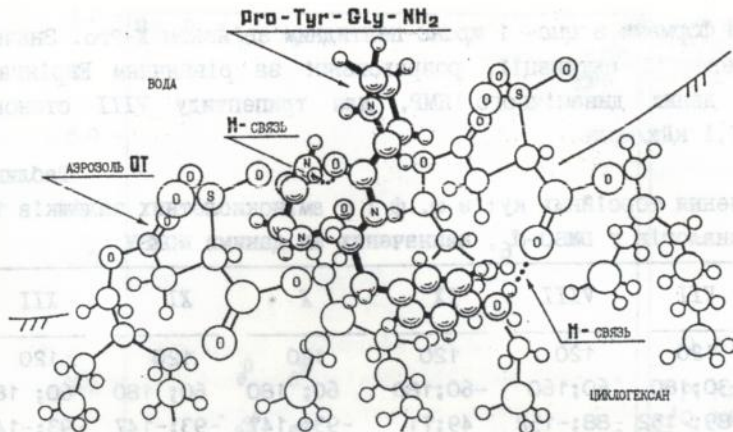
Крос-піки між протонами $\beta\text{-H} \text{Tyr}$ і $\text{C}_{1\alpha}\text{H}$ AOT (мал.2,а), а також між ароматичними протонами Tyr і $\text{C}_{1\alpha}\text{H}_2$, $\text{C}_{3,3'}\text{H}_2$, $\text{C}_{4,4'}\text{H}$ AOT (мал.2,б) говорять про те, що фенільне кільце діє як гідрофобний якір при адсорбції молекули пептиду на внутрішній поверхні міцели. На підставі значень ЯЕО розраховані міжпротонні відстані між зближеними фрагментами молекул пептиду і AOT. На мал.3 зображена модель адсорбції пептиду, яка побудована у відповідності до вищезгаданих α -контактів і відповідних їм відстаням.

Можна дати різні пояснення стабілізації "біологічно активної

конформації". Одне з них - енергетична стабільність цієї конформації в іммобілізованій на межі поділу фаз воді, специфічні властивості якої подібні властивостям ДМСО. З іншого боку, молекулярна адсорбція на межі поділу фаз мембрана/вода може сприяти стабілізації "біологічно активної конформації".



Мал.2. Фазочутливий спектр NOESY водного розчину пептиду [Тур²]MIF (1 моль/л), інкапсульованого оберненими міцелами АОТ ([H₂O]/[АОТ] = 18,5 моль/моль, [АОТ]/[пептид] = 3 моль/моль): а - область $\omega_1 = 0,7 \pm 4,7$ м.д., $\omega_2 = 0,7 \pm 4,7$ м.д.; б - область $\omega_1 = 6,7 \pm 8,7$ м.д., $\omega_2 = 0,7 \pm 8,7$ м.д. Амінокислотні залишки позначені їх однолітерними кодами.



Мал.3. Модель адсорбції пептиду на внутрішній поверхні оберненої міцели.

Тироліберин, подібно MIF, проявляє антидепресивну активність і має антиамнестичні властивості. З метою виявлення елементів подібності їх конформацій, які можуть зумовлювати однакові властивості, уявляється важливим вивчення конформаційних особливостей TRH та його аналогів.

Серед вивчених нами аналогів TRH виявлені пептиди, як мають високу антиамнестичну активність, порівняну з ефектом відомого ноотропного препарату пірацетаму, але в значно менших дозах. Для виявлення змін просторової структури TRH, які могли б призвести до зростання антиамнестичної активності, методами двомірної спектроскопії ЯМР ^1H визначені переважні конформації у розчині $\text{DMSO-}d_6$ тироліберину та його аналогів VIII-XII, подібно до того, як це було виконано для аналогів MIF. Значення торсійних кутів аналогів TRH наведені в табл.2.

В спектрах ЯМР ^1H сполук VIII і IX сигнали від протонів NH, $\alpha\text{-H}$ Gln, $\alpha\text{-H}$, $\delta\text{-H}$ і NH_2 Pro мають два компоненти із співвідношенням інтегральних інтенсивностей 0,8:0,2, які відповідають *транс*- та *цис*-ізомерам відносно пептидного зв'язку X-Pro. Подібна ізомерія пептидного зв'язку спостерігається у TRH. Дійсно, у фазочутливому спектрі NOESY (мал.4) є крос-піки між компонентами сигналів протонів NH, $\alpha\text{-H}$ залишку Gln. Причому знак цих крос-піків збігається із знаком діагональних піків, що вказує на їх обмінний характер. Отже, для молекул сполук VIII і IX у $\text{DMSO-}d_6$ спостерігається рівновага

між двома формами з *цис*- і *транс*-пептидним зв'язком X-Pro. Значення вільної енергії активації, розрахованої за рівнянням Ейрінга на підставі даних динамічного ЯМР, для трипептиду VIII становить $\Delta G_{296}^{\ddagger} = 57,1$ кДж/моль.

Таблиця 2

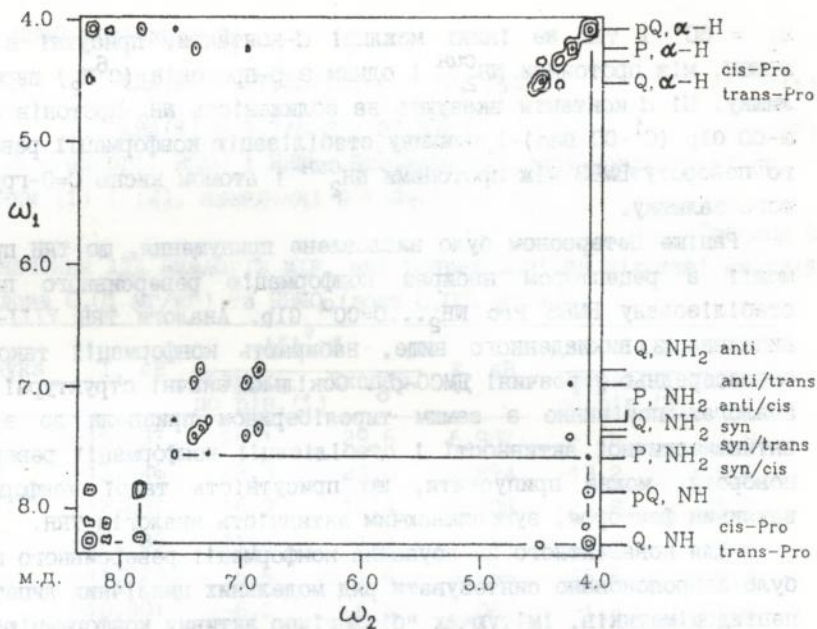
Значення торсієвих кутів φ , ψ і χ амінокислотних залишків TRH та його аналогів у DMSO- d_6 , визначених за даними NOESY

Торсі- оний кут	VII	VIII	IX	X	XI	XII
φ_1	120	120	120	120	120	120
ψ_1	-30;180	60;160	-60;180	60; 180	60; 180	60; 180
φ_2	-89;-152	-88;-152	49;71	-93;-147	-93;-147	-93;-147
ψ_2	0;170	120	20;130	80; 160	120	120
χ_2^1	± 125	± 126	20;90	$\pm 35;\pm 130$	$\pm 35;\pm 130$	$\pm 35;\pm 130$
χ_2^2	0;180	$\pm 60; 180$	*	*	± 60	± 60
φ_3	-	-	-	± 25	± 30	± 20
ψ_3	0	0	0	-	-	-
χ_3^1	-	-	-	30; ± 130	$\pm 60; 180$	$\pm 60; 180$
χ_3^2	-	-	-	$\pm 60; 180$	$\pm 60; 180$	$\pm 60; 180$
χ_3^3	-	-	-	-120	-120	-120

*) Торсієвий кут не визначено через накладення сигналів.

Із аналізу міжпротонних відстаней випливає, що у сполуки VIII торсієвий кут $\psi_3 = 0^\circ$ (табл.2). При *транс*-пептидному зв'язку Gln-Pro і $\psi_3 = 0^\circ$ спостерігається зближеність протонів $\text{NH}_2^{\text{сш}}$ Pro з атомом кисню $\alpha\text{-CO}$ Gln. В разі *цис*-пептидного зв'язку Gln-Pro при знайдених торсієвих кутах $\varphi_2 = -88^\circ$, $\psi_2 = 120^\circ$, $\psi_3 = 0^\circ$ можливо утворення ВМВЗ $\text{NH}_2^{\text{сш}} \dots \text{O}=\text{C}\alpha$ Gln, про що свідчать δ -контакти в спектрі NOESY (мал.4) між протонами $\text{NH}_2^{\text{сш}}$ *цис*-Pro і $\alpha\text{-H}$ Gln. При цьому конформація молекули пептиду VIII являє собою реверсивний поворот.

За рівнянням Арреніуса здійснена оцінка значень енергій цих ВМВЗ на підставі температурних залежностей часу релаксації T_1 рухливих протонів. Для протонів NH_2 Pro отримані найбільші значення енергій активації. Причому для молекул з *цис*-зв'язком X-Pro енергія активації протонів $\text{NH}_2^{\text{сш}}$ становить 24,3 кДж/моль, а з *транс*-пептидним зв'язком - 20,1 кДж/моль.



Мал.4. Фазочутливий спектр NOESY (область $\omega_1 = 3,9 \div 8,5$ м.д., $\omega_2 = 3,9 \div 8,5$ м.д.) розчину 0,05 моль/л аналогу $[Gln^2]TRN$ у ДМСО- d_6 при $30^\circ C$.

Отримані експериментальні дані про конформаційний стан молекули пептиду VIII добре узгоджуються з результатами теоретичного конформаційного аналізу, виконаного за алгоритмом Еллінджера MM2.

Як впливає в табл.2, торсійний кут φ_2 у сполуки IX приймає позитивні значення на відміну від цих кутів для інших сполук. Тому у молекул пептиду IX не реалізується конформація реверсивного повороту, як для пептиду VIII. Однак моделювання молекулярних структур показало, що для пептиду IX при торсійних кутах $\varphi_2 = 49^\circ$, $\varphi_2 = 130^\circ$, $\varphi_3 = 0^\circ$, $\varphi_3 = 180^\circ$ реалізується псевдоциклічна конформація з ВМВЗ між протоном NH_2 і атомом кисню $\alpha-CO$ Glp. На користь утворення цього ВМВЗ говорять δ -контакти в спектрі NOESY між протонами NH_2 -групи і протонами NH залишку Glu, NH, α -H, β "-H залишку Glp.

В спектрах NOESY сполук X, XI, XII є δ -контакти між протонами NH залишку Abu і протонами Glu α -H, Abu α -H, γ -H та NH_2 , які можливі при торсійних кутах $\varphi_2 = -93^\circ$, $\varphi_2 = 120^\circ$, $\varphi_3 = 30^\circ$, $\chi_3^1 = 60^\circ$, $\chi_3^2 = 60^\circ$, $\chi_3^3 = -120^\circ$ і конформації реверсивного повороту. При кутах

$\phi_1 = 60^\circ$ і тих же інших можливі d -контакти, присутні в спектрі NOESY, між протонами $\text{NH}_2^{\text{сшч}}$ і одним з β -протонів (C^6H_2) першого залишку. Ці d -контакти вказують на зближеність NH_2 -протонів з групою $\alpha\text{-CO Glp}$ ($\text{C}^1\text{-CO Dho}$) і можливу стабілізацію конформації реверсивного повороту BMB3 між протонами $\text{NH}_2^{\text{сшч}}$ і атомом кисню C=O -групи першого залишку.

Раніше Петерсоном було висловлене припущення, що TRH при взаємодії з рецептором набирає конформацію реверсивного повороту, стабілізовану BMB3 Pro $\text{NH}_2\cdots\text{O}=\text{C}^\alpha$ Glp. Аналоги TRH VIII-XII, як випливає з викладеного вище, набирають конформації такого типу безпосередньо у розчині $\text{DMSO-}d_6$. Оскільки значні структурні зміни в аналогах порівняно з самим тироліберином призвели до зростання антиамнестичної активності і стабілізації конформації реверсивного повороту, можна припустити, що присутність такої конформації є важливим фактором, зумовлюючим активність аналогів TRH.

Для ковалентного зв'язування конформації реверсивного повороту було запропоновано синтезувати ряд модельних циклічних дипептидів і пептидоміметиків, імітуючих "біологічно активну конформацію" аналогів MIF і TRH. Структура синтезованих циклодипептидів доведена методами спектроскопії ЯМР ^1H , ^{13}C і мас-спектрометрії.

Вивчення біологічної активності усіх сполук проводили за тестом Порсолта для виявлення антидепресивних властивостей і за тестом умовного рефлексу пасивного ухилення для виявлення антиамнестичної активності. Знайдена в ряді циклічних пептидоміметиків висока біологічна активність підтверджує припущення про важливу роль конформації реверсивного повороту у аналогів MIF та TRH при виявленні ними активності.

2. Можливості комп'ютерної імімі при вивченні зв'язку

'структура-активність' в ряду аналогів меланостатину

Структурні особливості молекул безпосередньо зв'язані з їх електронною будовою. Враховуючи той факт, що групові електронегативності замісників по Полінгу пропорційні їх орбітальним електронегативностям, визначеним за шкалою Маллікена, а останні пропорційні енергії ВЗМО відповідних R_1 , був виконан квантовохімічний розрахунок методом CNDO/2 електронної структури замісників R_1 в молекулах пептидів I-VI. Результати розрахунків свідчать про електронний вплив бічного замісника другого залишку на АДА аналогів MIF. Отримані кореляційні рівняння (1) і (2), які зв'язують АДА з енергіями

ВЗМО і НВМО замісника R₁:

$$\text{АДА}(\%) = 17,55 \cdot \ln(-I - 10,275) \quad (1)$$

$$\text{АДА}(\%) = 3,748 \cdot E - 27,832, \quad (2)$$

де I і E - енергії ВЗМО і НВМО. Значення АДА, які розраховані по рівнянням (1) і (2), наведенні в табл.3.

Таблиця 3

Значення АДА аналогів MIF, які розраховані на підставі енергій ВЗМО (доза 0,01 мг/кг) та НВМО (доза 0,001 мг/кг)

Сполука	I, eВ	АДА, %		E, eВ	АДА, %	
		Розрах. по рів.(1)	Експер.		Розрах. по рів.(2)	Експер.
I	-15,237	28,1	29,6	6,987	-1,6	-1,8
II	-13,846	22,3	23,0	3,894	-13,2	-10,6
III	-12,897	16,9	16,4	0,808	-24,8	-25,2
IV	-12,189	11,4	-1,2	9,664	8,4	8,2
V	-11,723	6,5	1,6	3,256	-15,6	-17,3
VI	-10,901	-8,2	-6,3	7,062	-1,4	-1,6

$$*) \text{АДА} = \frac{\sum \Delta t^{\text{контр}} - \sum \Delta t^{\text{досл}}}{\sum \Delta t^{\text{контр}}} \cdot 100\%, \text{ де } \Delta t - \text{періоди іммобілізації}$$

тварин (с) в контролі (контр.) та досліді (досл.).

При зменшенні дози пептидів I-VI від 0,01 мг/кг до 0,001 мг/кг спостерігався реверсивний ефект АДА, виникнення якого можна пояснити на основі розрахунків електронної структури замісників R₁. Дійсно, при низьких дозах можливий перерозподіл електронної густини по усій молекулі, включно і атоми замісника R₁ (в наближенні методу MO). Таким чином, в розрахованих модельних системах R₁-Н надлишкова електронна густина повинна надійти на раніше вільну НВМО атому вуглецю Cγ з енергією E, частково заселивши її. Тоді значення АДА при дозі 0,001 мг/кг повинно вже корелювати не з величиною I, як це було при дозі 0,01 мг/кг, а з величиною E.

Для з'ясування топографії активного центру біологічної мішені аналогів MIF, які виявляють АДА, методами чисельного гармонічного аналізу побудована система базисних конформацій (БК), яка дозволяє класифікувати конформаційну різноманітність молекул пептидів. За методом В.Е.Кузьміна кожна недекартова координата розглядається як параметр форми, а їх повний набір - як значення дискретної функції.

Розкладання цієї функції в ряд Фур'є дає набір БК, які відображають реальну конформацію.

Вклади різних БК в реальні конформації молекул аналогів МІГ використані як дескриптори в аналізі зв'язку "структура-антидепресивна активність". Детальний аналіз впливу запропонованих структурних параметрів на АДА дозволив побудувати рівняння лінійної регресії, в яких відображено зв'язок вкладів БК в реальну конформацію молекули з величиною активності. Отримані рівняння свідчать про те, що "біологічно активною конформацією" молекул аналогів МІГ дійсно є конформація β_{II} . Зростанню активності сприяє також присутність гідрофобного бічного замісника R_1 в другому амінокислотному залишку пептидного ланцюга.

Крім того, аналіз зв'язку активності із вкладами БК різних параметрів форми (випуклості, сферичності, апланарності) дозволив припустити зв'язування пептиду біологічною мішенню по трьох фрагментах: C^{10} , C^{30} та амідному NH_2 . Браслетоподібна молекула пептиду розміщується в щілині активного центру і фіксується гідрофобним бічним радикалом другого залишку.

ВИСНОВКИ

1. Методами двомірної спектроскопії ЯМР 1H показано, що для аналогів МІГ у розчині ДМСО переважною конформацією є конформація β -завороту II роду. Для аналогів ТРН у ДМСО також реалізується конформація реверсивного повороту. У водному розчині аналоги МІГ набирають розгорнуту рухому конформацію.
2. Методами двомірної спектроскопії ЯМР 1H і релаксометрії на ядрах ^{13}C показано, що при фізичному моделюванні біологічної мішені за допомогою обернених міцел АОТ конформація β_{II} аналогів МІГ стабілізується на межі поділу фаз вода/ПАР. При цьому ароматичне кільце другого амінокислотного залишку розміщується в міжмолекулярній порожнині, яка утворюється в гідрофобній області поблизу полярних груп при упаковці ізookтильних фрагментів АОТ, а головний ланцюг пептиду розташовується поблизу штернівського шару міцели.
3. Методами множинної лінійної регресії знайдено, що викривлення конформації β_{II} у аналогів МІГ призводить до зниження їх антидепресивної активності. У той же час наявність гідрофобного бічного замісника в пептидному ланцюгу сприяє зростанню активності.

4. На підставі аналізу зв'язку АДА аналогів MIF із вкладами базисних конформацій різних параметрів форми і з ліпофільністю молекул зроблено припущення щодо топографії активного центру біологічної мішені, який має гідрофобну порожнину і здатний зв'язувати пептид по трьом фрагментам: Pro¹ C=O, Gly³ C=O та амідному NH₂.
5. Природа виявленого при малих дозах реверсивного ефекту АДА аналогів MIF пояснена перерозподілом електронної густини на ту МО бічного замісника, в яку АО атом вуглецю C^γ другого амінокислотного залишку дає найбільший вклад (НВМО).
6. Отримані дані про те, що "біологічно активною конформацією" для аналогів MIF і TRN є конформація реверсивного повороту, підтверджені на підставі вивчення біологічної активності модельних циклічних дипептидів та пептидоміметиків, відтворюючих через ковалентне зв'язування активну конформацію.

Основний зміст дисертації викладено в таких роботах:

1. Modification of MSH release-inhibiting hormone / A.A.Mazurov, S.A.Andronati, V.M.Kabanov, N.I.Sokolenko, M.G.Rokachinskaya, Yu.E.Shapiro, V.Ya.Gorbatyuk // Collect. Czech. Chem. Commun. - 1990. - V.55, N10. - P.2555-2561.
2. Конформаційні особливості біологічно активних аналогів меланостатина / Ю.Е.Шапіро, В.Я.Горбатюк, В.М.Кабанов і др. // Биоорган. химия. - 1990. - Т.16, N12. - С.1607-1617.
3. Конформаційний аналіз біологічно активних аналогів тиролиберина методами двумірної спектроскопії ЯМР/В.Я.Горбатюк, Ю.Е.Шапіро, А.А.Мазуров і др.// Биоорган. химия. - 1992. - Т.18, N2. - С. 235-251.
4. Shapiro Yu.E., Gorbatyuk V.Ya. Conformation adjustment of peptides to the micellar surface// Abstracts of the 9th International Symposium on Surfactants in Solution. June 10-15, 1992, Varna, Bulgaria. P.77.
5. Новые геометрические дескрипторы пространственной формы молекул для анализа влияния структуры на биологическую активность трипептидов / Л.П.Тригуб, В.Е.Кузьмин, А.А.Мазуров, Ю.Е.Шапіро, В.Я.Горбатюк// Российская научная конференция "Создание лекарственных препаратов" Тезисы докл. 26-30 октября, 1992, Москва. С.44-45.

ЛНБ ім. В. Стефанива
АН України

6. Shapiro Yu.E., Gorbatyuk V.Ya. Choice of the bioactive conformation of short peptides with aid of 2D-NMR // Abstracts of the 28th Colloquium Spectroscopicum Internationale. June 29-July 4, 1993, York, UK. WL 3.4.
7. Стабилизация конформации Pro-Тур-Gly-NH₂ - аналога меланостатина - на поверхности мицеллы/Ю.Е.Шапиро, В.Я.Горбатик, А.А.Мазуров и др.//Теорет. и эксперим. химия.-1993.-Т. 29, №1.-С.74-80.
8. Влияние второго аминокислотного остатка на антидепрессивную активность аналогов меланостатина / Ю.Е.Шапиро, М.Ю.Горбачев, В.Я.Горбатик и др. // Теорет. и эксперим. химия. - 1993.- Т.29, №3. - С.255-259.
9. Фрагментарная подвижность молекул в обращенных мицеллах Аэрозоля OT в *n*-октане, инкапсулирующих α -химотрипсин или альбумин / Ю.Е.Шапиро, В.Я.Горбатик, А.В.Левашов, Н.Л.Клячко // Биологич. мембраны. - 1993. - Т.10, №3. - С.293-305.
10. Stabilization of the Peptide Conformation on the Micellar Surface/Yu.E.Shapiro, V.Ya.Gorbatyuk, A.A.Mazurov et al.//Analyst. - 1994. - V.119, N4. - P.647-652.
11. Formation of heterocyclic compounds in synthesis of thyroliberrine analogs/S.A.Andronati, A.A.Mazurov, T.I.Korotenko, A.I.Dyadenko, Shapiro Yu.E., V.Ya.Gorbatyuk, A.V.Mazepa// Abstracts of the 9th Russia-Germany Symposium on Chemistry of Peptides and Proteins. June 10-15, 1994, Pushchino, Russia. P.4.
12. Параметры формы молекул пептидов как дескрипторы при решении задач QSAR / В.Е.Кузьмин, Л.П.Тригуб, Ю.Е.Шапиро, А.А.Мазуров, В.В.Позигун, В.Я.Горбатик, С.А.Андронати // Ж. структ. химии. - 1995. - Т.36, №3. - С.509-517.

Горбатюк В.Я. Конформационная подвижность трипептидных гормонов по данным двумерной спектроскопии ЯМР и ее связь с нейротропной активностью.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10. - биорганическая химия, химия природных и физиологически активных веществ, Физико-химический институт им.А.В.Богатского НАН Украины, Одесса, 1995.

Защищаются 26 научных работ, которые содержат результаты изучения конформационных особенностей аналогов меланостатина и тиролиберина и связи "структура-активность". Методами двумерной спектроскопии ЯМР (COSY, NOESY, δ -J-спектроскопии), физического (с помощью обращенных мицелл АОТ) и математического моделирования рецепторного связывания показано, что "биологически активной конформацией" изученных трипептидов является конформация реверсивного поворота. Полученные результаты подтверждены биологическими испытаниями циклических пептидомиметиков, воспроизводящих конформацию реверсивного поворота посредством ковалентного связывания.

Gorbatyuk V.Ya. The conformational mobility of the tripeptide hormones according to the data of two-dimensional NMR-spectroscopy and its relationship with the neurotropic activity.

Thesis is presented for the candidate's degree of the chemical sciences by the speciality 02.00.10 - bioorganic chemistry, chemistry of natural and physiological active compounds, A.V.Bogatsky Physico-Chemical Institute of the National Academy of Sciences of Ukraine, Odessa, 1995.

26 scientific publications are defended, where the results of investigation of conformational features of the melanostatin and thyroliberin analogues and "structure-activity" relationships have been reported. Two-dimensional NMR (COSY, NOESY, δ -J-spectroscopy), physical (with the aid of reversed micelles AOT) and mathematical modeling of receptor binding have been used to establish that conformation of the reversible turn is the "biologically active conformation" of the studied tripeptides. The obtained results have been confirmed by biological tests of the cyclic peptide-mimetics reproducing conformation of the reversible turn by the use of covalent binding.

Ключові слова: меланостатин, тиролиберин, двовірна спектроскопія ЯМР, конформація реверсивного повороту, обернені мицели АОТ, "структура-активність"

AB 33.486

Подписано к печати 03.11.95г. Формат 60x84 1/16.
Объем 0,7 уч.изд.л. 1,0 п.л. Заказ № 48. Тираж 100 экз.
Полиграфическое предприятие ЧП (ул.Ришельевская 28,
ОЦНТИ, каб.90Б, тел.22-28-58)