Твърдофазен пептиден синтез и *in vitro* антитуморна активност на нови аналози на соматостатин

Светлана Стайкова, Емилия Найденова, Диана Веселинова, Любомир Везенков

Solid phase peptide synthesis and in vitro antitumor activity of new analogs of somatostatin: *Some cyclic analogs of somatostatin were synthesized by standard solid-phase peptide synthesis - Fmoc-strategy. The peptide purity was checked by electrospray ionization massspectrometry and the optical rotation was measured in water. The biological trials are in progress.*

Key words: *somatostatin analogs, anticancer activity, solid-phase peptide synthesys*

ВЪВЕДЕНИЕ

Хормонът соматостатин (SST-14 H_2N-Ala-Gly-c(Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys)-COOH) е природен тетрадекапептид, изпълняващ разнообразни функции в човешкия организъм - инхибира секрецията на растежен хормон, инсулин, глюкагон и др., подтиска чревната перисталтика, участва в невронната трансмисия [1]. Той притежава способността да подтиска растежа и размножаването на редица нормални и туморни клетки [2]. Характеризира се с ниска плазмена устойчивост, тъй като се разгражда бързо под действие на пептидазите [3]. Ето защо научно-приложните изследвания са насочени към създаването на нови скъсени соматостатинови аналози с по-висока биологична активност и по-дълъг плазмен полуживот.

Соматостатинът и синтетичните му аналози осъществяват своето действие посредством 5 повърхностно-клетъчни рецептори (sstr 1-5, somatostatin receptor 1-5). Те присъстват в клетки на ЦНС и периферните тъкани (стомашно-чревен тракт, кръвоносни съдове, кръвни клетки и др.). Соматостатиновите рецептори са открити и в различни туморни клетки и кръвоносни съдове, изхранващи туморната тъкан [4]. Това предопределя необходимостта от високоселективни аналози спрямо тези рецептори. Някои от създадените до момента синтетични аналози на соматостатин се използват в клиничната практика при терапията и диагностиката на ракови заболявания, а други са в процес на клинични изследвания. Аналозите Octreotide (Sandostatin, SMS-201-995, D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys)-Thr-ol) и Lanreotide (Somatuline, D-βNal-c(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys)-Thr-NH_2) намират приложение при лечение на болестта акромегалия, както и за облекчаване на състоянието при пациенти с невроендокринни тумори. Vapreotide (RC-160,Sanvar, D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys)-Trp-NH_2) се прилага за третиране на варици (разширени вени) на хранопровода при пациенти с чернодробни заболявания. Пептидите BIM-23052 (DC-23-99, D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH_2), RC-102 (D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys)-Thr-NH_2), RC-121 (D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys)-Thr-NH_2**)** са с доказана антихормонална активност [5].

Структурата на синтетичните соматостатинови аналози има ключово значение за взаимодействието със съответните рецептори. Така например биологичната активност се обуславя от фрагмент, образуващ β-извивка с последователност Phe/Tyr-Trp-Lys-Thr/Val, съответстваща на аминокиселините от 7 до 10 в структурата на SST-14. Противотуморна и антихормонална активност притежават Phe^3/Thr^6 и Tyr^3/Val^6 заместените октапептидни аналози. Включването на D-аминокиселини в пептидната верига удължава плазмения полуживот и увеличава биологичната активност, като най-подходяща D-аминокиселина е D-Trp вместо Trp. Цистеиновите остатъци, образуващи дисулфидния мост също са включени във взаимодействието с рецептора, а заместването на C-крайната карбоксилна група с амидна увеличава устойчивостта на ензимно разграждане и повишава биологичната активност [8, 9].

В предишни наши изследвания ние синтезирахме серия от аналози на Октреотид, RC-160 и RC-121, в които Thr^6 е заместен с Tle^6 (трет.-левцин), а Lys^5 с неговите структурни аналози Dap (диаминопропанова киселина), Dab (диаминобутанова киселина) и Orn (орнитин) с цел да оценим влиянието на дължината на страничната верига върху противотуморната активност на новосинтезираните пептиди.

При направените *in vitro* изследвания за противотуморна активност върху серия от човешки туморни клетки установихме, че заместването на Thr, разположен в позиция 6 с Tle не повлиява цитотоксичната активност. Освен това по-високо активни октапептидни аналози се получават при комбинирането на Tle^6 с Phe^3, тъй като аналозите на Октреотид показват по-висока цитотоксична активност в сравнение с тези на RC-160 и RC-121, в които има Tle^6 и Tyr^3. Установихме, че цитотоксичната активност се повлиява незначително от дължината на страничната веригата на аминокиселината, разположена в позиция 5. Новосинтезираните от нас аналози показват специфичност на действие, тъй като повлияват в различна степен туморните клетки и не показват цитотоксична активност в нормални диплоидни Lep-3 клетки, а това предполага по-малко нежелани странични реакции при евентуално терапевтично приложение [6,7].

Целта на настоящото изследване е твърдофазен синтез на нови модифицирани в 5 и 6 позиция скъсени аналози на Соматостатин, в частност аналози на Октреотид и установяване на връзката структура – биологична активност.

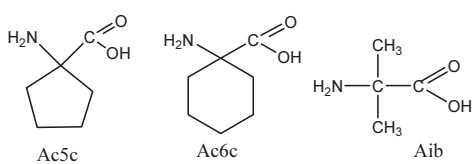
ИЗЛОЖЕНИЕ

Във връзка с поставената цел извършихме следите модификации в структурата на Октреотид:

D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Lys^5-Thr^6-Cys)-Thr-ol

- Заместихме Thr, разположен в 6-а позиция с пространствено запречените, Ac5c (аминоциклопентанова киселина), Ac6c (аминоциклохексанова киселина) и Aib (аминоизобутанова киселина) с цел да стабилизираме необходимата за активността конформация.
- В пептиди 4, 5 и 6 заместихме Lys, разположен в 5-а позиция с неговия структурен аналог Orn.
- Всички пептиди синтезирахме под формата на C-крайни амиди с цел да увеличим тяхната устойчивост на ензимно разграждане.

Синтезирахме и референтният SST-аналог RC-102 (D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys)-Thr-NH_2) (7rf), за да сравним неговата *in vitro* противотуморна активност с тази на останалите аналози.



Фиг. 1. Структура на Ac5c (1-аминоциклопентан карбоксилна киселина), Ac6c (1-аминоциклохексан карбоксилна киселина), Aib (α-аминоизобутанова киселина).

Данните за новосинтезираните соматостатинови аналози са обобщени в таблица 1:

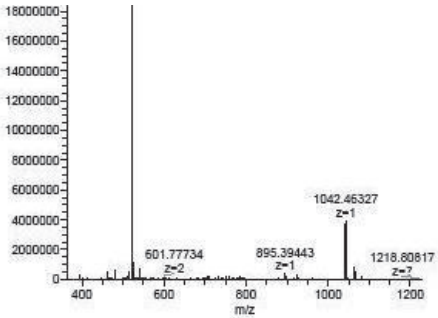
Таблица 1. Структура и характеристика на синтезираните аналози на Октреотид:

№	СТРУКТУРА	БРУТНА ФОРМУЛА	Изчислена MM_{exact}	Намерена $[MH]^+$	t_R (мин)	* α^{20}_{546}	ПД%
1	D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Lys-Aib-Cys)-Thr-NH_2	$C_{49}H_{65}N_{11}O_9S_2$	1015.4408	1016.4504	11.00	- 45.16	75.25
2	D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Lys-Ac5c-Cys)-Thr-NH_2	$C_{51}H_{67}N_{11}O_9S_2$	1041.4565	1042.4659	11.41	- 36.84	77.5
3	D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Lys-Ac6c-Cys)-Thr-NH_2	$C_{52}H_{69}N_{11}O_9S_2$	1055.4721	1056.4778	11.04	- 69.23	61.75
4	D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Orn-Aib-Cys)-Thr-NH_2	$C_{48}H_{63}N_{11}O_9S_2$	1001.4252	1002.4330	11.6	- 43.75	60.25
5	D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Orn-Ac5c-Cys)-Thr-NH_2	$C_{50}H_{65}N_{11}O_9S_2$	1027.4408	1028.4464	10.52	- 60.87	49.5
6	D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Orn-Ac6c-Cys)-Thr-NH_2	$C_{51}H_{67}N_{11}O_9S_2$	1041.4565	1042.4633	10.85	- 48.00	50
7_{rf}	D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys)-Thr-NH_2	$C_{49}H_{67}N_{11}O_{10}S_2$	1031.4357	1032.4401	8,7	-55.32	82

α^{20}_{546}: Ъгъл на оптично въртене, измерен при 20°C, разтворител: H_2O (c = 0.25); t_R- време на задържане на основния пик на $[MH]^+$; ПД: практичен добив в %

Синтезите извършихме чрез твърдофазен метод за пептиден синтез (SPPS–Solid Phase Peptide Synthesis) по Fmoc – стратегия. Методът се основава на последователното свързване на активирани аминокиселини с Fmoc - защитена α-аминогрупа, както и подходящо защитена странична функционална група към неразтворим полимерен носител. Като твърдофазен носител използвахме Rink Amide MBHA смола за получаването на C-крайни амиди. Като кондензиращи реагенти използвахме TBTU (2-(1-OH-бензотриазол-1-ил)1,1,3,3-тетраметил карбамид тетрафлуоро-борат) или DIC (N,N'-диизопропилкарбодиимид) и антирацемизираща добавка - HOBt (1-хидроксибензотриазол). Пълното протичане на реакциите на отстраняване на Fmoc-групата и на реакциите на образуване на пептидната връзка следяхме чрез стандартен Кайзер тест. Образуването на дисулфидния мост извършихме върху твърдофазния носител с помоща на $Tl(tfa)_3$. Цистеиновите остатъци бяха защитени със S-ацетамидометилна (Acm) група, която се деблокира едновременно със създаването на дисулфидния мост.

Пептидите доказахме и охарактеризирахме чрез електроспрей йонизационна мас-спектрометрия, комбинирана с високо ефективна течна хроматография и чрез определяне на специфичните ъгли на оптично въртене. Така например доказателство за получаването на пептид 6 (MM 1041.4565) е наличието на пик A (1042.4633).



Фиг. 2. MS хроматограма на пептид 6.

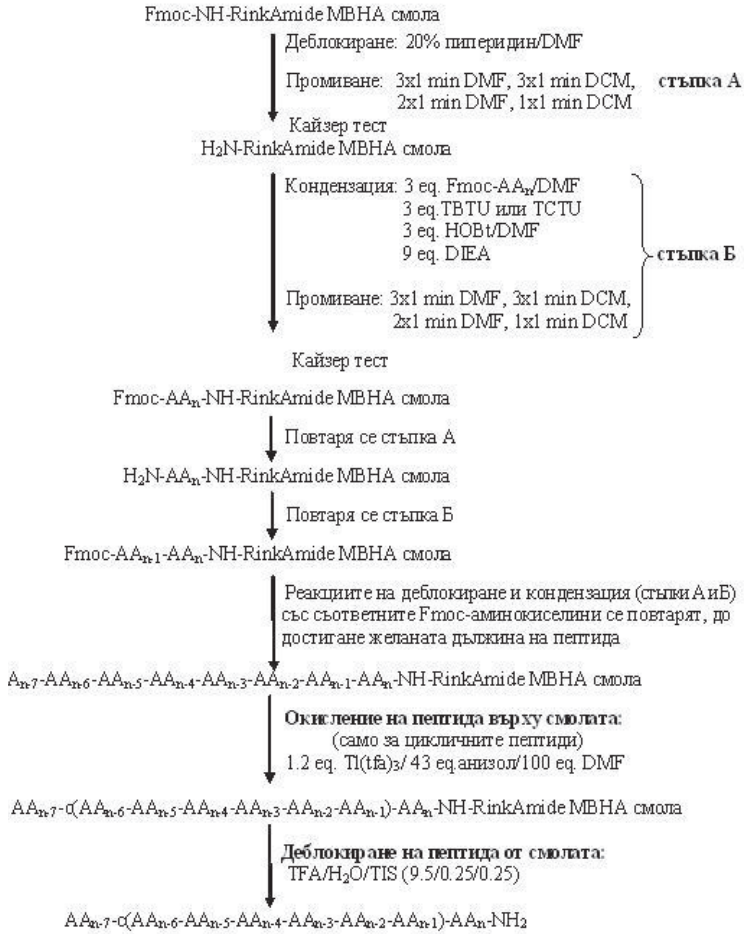


Схема 1. Обща схема на твърдофазен пептиден синтез по Fmoc-стратегия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предстоят да бъдат извършени *in vitro* биологични изследвания върху серия от туморни клетъчни линии (Hep G-2, MDA-MB-231, HT-29, HeLa) и Lep-3 нормална диплоидна клетъчна линия, които ще спомогнат за установяване на връзката структура – биологична активност.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Lamberts, S. W. J., Potential role of somatostatin analogues in the treatment of cancer, Endocr. Rev., 1988, 9, 417-436.

[2] Pollak, M. N., A. V. Schally, Mechanisms of antineoplastic action of somatostatin analogs, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1998, 217, 2, 143-152.

[3] Bauer, W., U. Briner, W. Doepfner, R. Haller, R. Huguenin, P. Marbach, T. J. Petcher, J. Pless, SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action, Life Sciences, 1982, 31, 11, 1133-1140.

[4] Patel, Y. C., C. B. Srikant, Somatostatin receptors, Trends Endocrinol.Metab., 1997, 8, 398-405.

[5] Moreau, J.P., S. Kim, J. Z. Dong, F. Ignatious, S. Jackson, S. C. Moreau, B. A. Morgan, F. Touraud, J. E. Taylor, B. Tissier, M. Pellet, W. Murphy, T. Davis, Improved analogs and novel delivery systems for somatostatin octapeptides, Metabolism, 1996, 45, 8, 24-26.

[6] Staykova, S., E. Naydenova, D. Wesselinova, A. Kalistratova, L. Vezenkov, Synthesis and *In Vitro* Study of the Anticancer Activity of of New Analogs of Octreotide, Protein and Peptide Letters, 2012, 19, 1257-1262

[7] Staykova, S., B. Mihaylova, I. Goshev, D. Wesselinova, L. Vezenkov, E. Naydenova, Antioxidant capacity of new analogs of Octreotide, Bulgarian Chemical Communications, 2012, 44, 3, 233-237,

[8] Cai, R.-Z, Szoke, B., Lu, R., et al. Synthesis and biological activity of highly potent octapeptide analogs of somatostatin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, *83*, 1896-1900.

[9] Horvath, A. Vadasz, Z. Szende, B. et al. Systematic structure-activity relationship studies of the antitumor peptide TT-232, Peptides, 1998, 494-495.

За контакти:

Проф. д-р Емилия Найденова, Катедра “Органична химия”, Департмент по химични науки, Химикотехнологичен и металургичен университет, тел.: 02-8163 425, e-mail: e_naydenova@abv.bg

Докладът е рецензиран.

РУСЕНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „АНГЕЛ КЪНЧЕВ"
UNIVERSITY OF RUSE „ANGEL KANCHEV"

ДИПЛОМА

Програмният комитет на
Научната конференция РУ&СУ'12
награждава с КРИСТАЛЕН ПРИЗ
"THE BEST PAPER"
СВЕТЛАНА СТАЙКОВА, ЕМИЛИЯ НАЙДЕНОВА,
ДИАНА ВЕСЕЛИНОВА, ЛЮБОМИР ВЕЗЕНКОВ
автори на доклада
"Твърдофазен пептиден синтез и in vitro антитуморна
активност на нови аналози на соматостатина"

DIPLOMA

The Programme Committee of
the Scientific Conference RU&SU'12
Awards the Crystal Prize "THE BEST PAPER"
to SVETLANA STAIKOVA, EMILIA NAIDENOVA,
DIANA WESELINOVA, LUBOMIR VEZENKOV
authors of the paper
"Solid Phase Peptide Synthesis and *in vitro* Antitumor
Activity of New Analogues of Somatostatin"

РЕКТОР
RECTOR

проф. д.т.н. Христо Белоев
Prof. DSc Hristo Beloev, DHC

12.11.2012