



УДК 546.11.3

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ ЭНКЕФАЛИНОВ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГАЗООБРАЗНОГО ТРИТИЯ

Петренко Б. В., Золотарев Ю. А., Мясоедов Н. Ф.

Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва

Беспалова Ж. Д., Молокоедов А. С., Ярыгин К. Н.

Институт экспериментальной кардиологии Академии медицинских наук СССР, Москва

Описано получение меченных тритием аналогов Leu-энкефалина —  $[3,5\text{-}^3\text{H-Tyr}^1, D\text{-Ala}^2, D\text{-Leu}^3]$  энкефалина и  $[3,5\text{-}^3\text{H-Tyr}^1, D\text{-Ala}^2]$  энкефалин — Arg с молярной активностью 814 и 888 ТБк/моль соответственно. Аналоги получали каталитическим дегалондированием соответствующих подированных производных в атмосфере трития в присутствии Pd- и Rh-катализаторов. Исследовано влияние природы катализатора и давления газа на скорость реакции, выход и молярную активность меченых пептидов. Показано, что каталитическое дегалондирование не приводит к рацемизации аминокислотных остатков и потере биологической активности.

Меченные тритием пептиды с высокой молярной активностью могут быть приготовлены с помощью широко применяемого метода, основанного на каталитическом дегалондировании тритием различных галондпроизводных пептида.

В настоящее время известно много работ по приготовлению меченных тритием пептидных гормонов; метка вводилась преимущественно в ароматическое кольцо тирозина [1—4] и фенилаланина [4—6]. Исходными соединениями в этих случаях являлись иод- и хлорпроизводные соединения. Для дегалондирования использовали гетерогенные катализаторы на основе металлов платиновой группы, обычно палладия. Применение смеси 5% палладия на угле и 5% родия на карбонате кальция позволило получить  $[^3\text{H-Tyr}]$ - $\beta$ -кортикотропин с молярной активностью 630—1700 ТБк/моль и  $[^3\text{H-Tyr}]$ -ангиотензин II с молярной активностью 407—1040 ТБк/моль. В работе [5] сообщалось, что с помощью каталитического дегалондирования удалось получить  $[^3\text{H-Tyr}]$ -ангиотензин II с молярной активностью 2070 ТБк/моль, однако его выход оказался очень низким (меньше 10%).

В данной работе описывается получение меченных тритием аналогов Leu-энкефалина: Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu (I) и Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg (II). В качестве исходных соединений использовали их иодированные производные Tyr(I<sub>2</sub>)-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu (III) и Tyr(I<sub>2</sub>)-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg (IV), которые синтезировали по описанной ниже методике.

Для выбора условий каталитического дегалондирования галондпроизводного (III) тритием были проведены предварительные исследования, в которых изучалось влияние давления газовой смеси на скорость реакции дегалондирования и молярную активность меченого пептида. Оказалось, что скорость реакции в значительной степени зависит от давления газовой смеси (рис. 1). Так, при давлении 400 гПа реакция дегалондирования в основном завершалась за 60 мин, в то время как при давлении 100 гПа для завершения реакции требовалось более 120 мин (в обоих случаях в качестве катализатора использовался Pd/BaSO<sub>4</sub>). Молярная активность пептида при давлении 400 гПа также оказалась выше. Именно это давление и было выбрано для исследования влияния природы катализатора на

Принятые сокращения: Et<sub>3</sub>N — триэтиламин, DMF — диметилформамид.

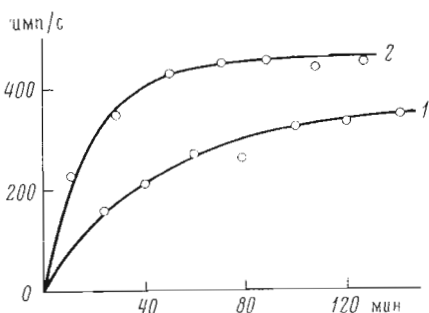


Рис. 1. Кинетика дегалондирования пептида (III) на гетерогенном палладиевом катализаторе в зависимости от давления газообразного трития: 1 — 100 гПа, 2 — 400 гПа

скорость, выход и молярную активность пептидов в реакции дегалондирования. Полученные результаты суммированы в табл. 1.

Как видно из таблицы, наибольшей молярной активности удалось достичь при использовании смеси 5% Pd/BaSO<sub>4</sub> и 5% Rh/CaCO<sub>3</sub>. Несколько худшие результаты получены при использовании Pd/BaSO<sub>4</sub>. Описанный в работе [1] смешанный катализатор 5% Pd/C и 5% Rh/CaCO<sub>3</sub> в диметилформамиде в случае пептида (III) оказался неэффективным с точки зрения как молярной активности, так и выхода. По-видимому, низкий выход в этом случае связан с большой адсорбцией пептида на угле. Кроме того, скорость реакции дегалондирования на этом катализаторе наиболее низкая. Так, за 1 ч реакция проходит только на 60%, в то время как для других исследованных катализаторов эта величина превышает 85–90%. В водном триэтиламинe наибольший выход получен при использовании Rh/CaCO<sub>3</sub>, однако молярная активность в этом случае на порядок ниже, чем при использовании палладиевых катализаторов. Причина такого различия требует дальнейшего выяснения. Родиевый катализатор при проведении реакции в диметилформамиде позволяет получать преимущественно моноодпронизводное пептида (I). Реакция дегалондирования в этих условиях протекает в две стадии, причем на первой стадии скорость существенно выше, чем на второй. Смешанный катализатор, содержащий равные количества Pd/BaSO<sub>4</sub> и Rh/CaCO<sub>3</sub>, позволяет достигать несколько большей молярной активности, чем катализатор, содержащий только палладий. Такая закономерность наблюдалась при проведении реакции как в диметилформамиде, так и в водном триэтиламинe.

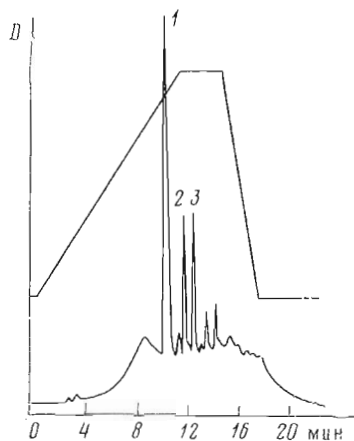
Найденные условия были использованы для приготовления меченных тритием пептидов в атмосфере 70%-ного трития. При этом наблюдалась

Таблица 1

Каталитическое дегалондирование пептида (III) с использованием 0,5% газообразного трития

Растворитель	Катализатор	Выход, %	Молярная активность, ТБК/моль	Соотношение продуктов, %		
				[ <sup>3</sup> H]пептид (I)	[ <sup>3</sup> H]пептид (II)	(III)
0,03 M Et <sub>3</sub> N	5% Pd/BaSO <sub>4</sub>	22	13,7	84	1	15
	5% Rh/CaCO <sub>3</sub>	36	8,9	93	3	4
	5% Pd/BaSO <sub>4</sub>	41	1,3	85	3	12
	5% Rh/CaCO <sub>3</sub>	38	6,7	88	9	3
	7% Pd/BaSO <sub>4</sub>	—	—	—	—	—
DMF	10% Pd/C	—	—	—	—	—
	5% Pd/C	10	3,7	58	2	40
	5% Rh/CaCO <sub>3</sub>	14	13,0	87	4	9
	5% Pd/BaSO <sub>4</sub>	20	8,5	88	7	5
	5% Rh/CaCO <sub>3</sub>	26	1,4	40	51	9
	5% Pd/BaSO <sub>4</sub>	46	6,0	93	4	3
	7% Pd/BaSO <sub>4</sub>	—	—	—	—	—

Рис. 2. Хроматография продуктов реакции каталитического дегалондирования пептида (III) на колонке Ultra-spher-Acyl 5  $\mu m$  (4,6 $\times$ 150 мм) в градиенте метанола в 0,01 н. ацетате аммония, pH 3,5. Скорость элюции 1 мл/мин. 1 — [ $^3H$ -Тур]-пептид (I); 2 — [ $^3H$ -Тур (I)]-пептид (I); 3 — (III)



удовлетворительная корреляция с данными, полученными при использовании  $\sim 0,5\%$  трития. Следует, однако, отметить, что скорость реакции дегалондирования с использованием высокопроцентного трития ниже, чем с противем. Реакционная смесь содержит значительное количество исходного дигалондпроизводного, а также моногалондпроизводного пептида, поэтому для выделения меченного тритием пептида необходимо использовать высокоэффективную жидкостную колоночную хроматографию.

При анализе кислых гидролизатов соединений (I) и (II) с использованием лигандообменной хроматографии [7] обнаружено, что аминокислоты сохранили свою оптическую чистоту и в условиях проведения реакции дегалондирования не подвергались рацемизации.

Изучение связывания меченных тритием пептидов с мембранами гомогената мозга крысы показало, что полученные препараты сохранили и свою биологическую активность. [ $^3H$ -Тур] пептид (I) и [ $^3H$ -Тур] пептид (II) связывались с ограниченным количеством специфических центров с константами диссоциации  $(0,3-0,6) \cdot 10^{-9}$  и  $(0,5-1,5) \cdot 10^{-9}$  соответственно.

### Экспериментальная часть

Синтез соединений (III) и (IV) описан в работе [8].

Реакцию дегалондирования пептида с разбавленным ( $0,5\%$ ) тритием проводили на установке, описанной в работе [9]. Использовали специальную гребенку с семью ампулами. В ампулу помещали раствор  $0,2$  мг ( $0,24$  мкмоль) энкефалина (III) в  $0,1$  мл растворителя и вносили  $20$  мг катализатора. Затем ампулы замораживали в жидком азоте, вакуумировали до остаточного давления  $1 \cdot 10^{-3}$  гПа, заполняли газообразным тритием под давлением  $400$  гПа и нагревали до  $20^\circ C$ . Реакцию вели при перемешивании на магнитной мешалке в течение  $60$  мин. Катализатор отфильтровывали и промывали метанолом ( $3 \times 5$  мл). Фильтрат упаривали досуха, затем остаток растворяли в метаноле и снова упаривали. Этот процесс повторяли трижды для удаления лабильного трития. Количество меченого препарата (I) определяли с помощью жидкостной хроматографии высокого давления (рис. 2). Результаты исследований приведены в табл. 1.

Полученные пептиды высокой молярной активности с  $70\%$  тритиевым газом проводили по методу [10] (табл. 2). В ампулу помещали  $2$  мг пептида в  $0,25$  мл растворителя, вносили  $200$  мг катализатора, ампулу замораживали жидким азотом и далее поступали аналогично описанному выше. Продукт очищали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Радиоактивность препаратов измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике РЖС-20 с эффективностью регистрации трития  $\sim 30\%$  в

## Каталитическое дегалондирование пептидов (III) и (IV) с использованием 70% газообразного трития

Исходное вещество	Растворитель	Катализатор	Выход, %	Молярная активность, ТБк/моль	Соотношение продуктов, %		
					[ <sup>3</sup> H]пептид (I)	[ <sup>3</sup> H]пептид (II)	(III)
(III)	0,03 M Et <sub>3</sub> N DMF	5% Pd/BaSO <sub>4</sub>	18	740	10	22	68
		7% Pd/BaSO <sub>4</sub>	23	496	75	11	14
(IV)	DMF	5% Pd/BaSO <sub>4</sub>	29	814	92	3	5
		5% Rh/CaCO <sub>3</sub>	35	888	11*	30*	59*

\* Соотношение для пептида (II) и его галоидпроизводных.

диоксановом сквинтилляторе [11]. Аналитическая высокоэффективная жидкостная хроматография проводилась при помощи хроматографа Altex модель 332 на колонке Ultraspher — Actyl 5  $\mu$ m (4,6×150 мм). Для градиентной элюции использовали раствор метанола (30–90%) в 0,01 M ацетате аммония, pH 3,5. Катализаторы и растворители готовили и очищали обычными методами.

Радиохимическую чистоту конечного продукта определяли с помощью ТСХ на пластинках Silufol UV-254 (ЧССР) в системах бутанол — уксусная кислота — вода (3 : 1 : 1) и этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода (45 : 20 : 6 : 11). Проявленную хроматограмму детектировали на сканирующем детекторе радиоактивности. Более 98% радиоактивности содержалось в зоне, соответствующей по хроматографической подвижности продукту реакции.

Биологическую активность меченных тритием пептидов оценивали по их специфическому связыванию с мембранами гомогената мозга крысы по методу [12] с незначительными модификациями.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Brundish D. E., Martin J. R., Wade R. J. Chem. Soc. Perkin I, 1976, v. 20, p. 2182–2185.
2. Brundish D. E., Wade R. J. Chem. Soc. Perkin I, 1976, v. 20, p. 2186–2189.
3. Brundish D. E., Wade R. J. Chem. Soc. Perkin I, 1973, v. 23, p. 2875–2879.
4. Mezo I., Seprodi J. A., Teplan I., Morgat J. L., Fromageot P., Toth G., Sirokman F. J. Label. Comp. Radiopharm., 1978, v. XIV, № 4, p. 557–567.
5. Morgat J. L., Hung L. T., Fromageot P. Biochim. et biophys. acta, 1970, v. 207, № 2, p. 374–376.
6. Bicornert M., Klauschenz E., Ehrlich A., Katzwinkel S., Niedrich H., Toth G., Teplan I. J. Label. Comp. Radiopharm., 1979, v. XVI, № 5, p. 673–679.
7. Zolotarev Yu. A., Mjasoedov N. F., Penkina V. I., Dostovalov I. N., Petrenik O. V., Davankov V. A. J. Chromatography, 1981, v. 207, № 2, p. 231–236.
8. Farrington G. A., Hezeall P. G., Kenner G. W., Turner V. M. Y. Chem. Soc., 1957, p. 1407.
9. Шевченко В. П., Мясоедов Н. Ф., Бергельсон Л. Д. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 5, с. 730–734.
10. Михайлов К. С., Лавров О. В., Мясоедов Н. Ф. В кн.: Органические соединения, меченные радиоактивными изотопами. Прага, 1977, с. 253–258.
11. Вяземский В. О., Ломоносов И. И., Писаревский А. Н., Прогопов Х. В., Рузин В. А., Терерин Е. Д. Сквинтилляционный метод в радиометрии. М.: Наука, 1961, с. 69–70.
12. Pasternak G. W., Wilson H. A., Snyder S. H. Molec. Pharmacol., 1980, v. 11, № 3, p. 340–351.

Поступила в редакцию  
31.V.1982

## PREPARATION OF TRITIUM-LABELED ENKEPHALINS USING GASEOUS TRITIUM

PETRENİK B. V., ZOLOTAREV Yu. A., MYASOEDOV N. F.,  
BESPALOVA J. D., MOLOKOEDOV A. S., YARYGIN K. N.

*Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences, of the USSR, Moscow;*  
*Institute of Experimental Cardiology, Academy of Medical Sciences*  
*of the USSR, Moscow*

Preparation of tritium-labeled Leu-enkephalin analogs is reported, namely [3,5-<sup>3</sup>H-Tyr<sup>1</sup>, D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>3</sup>]enkephalin and [3,5-<sup>3</sup>H-Tyr<sup>1</sup>, D-Ala<sup>2</sup>]enkephalin-Arg having molar activity of 814 and 888 TBg/mole, respectively. The procedure involved catalytic dehalogenation of the appropriate iodinated derivatives with gaseous tritium in the presence of Pd and Rh catalysts. The influence of the catalyst nature and tritium pressure on the reaction rate and yield, as well as on the molar activity of labeled peptides was examined. Catalytic dehalogenation brought about neither racemization nor a loss of biological activity.