

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.07.052>

УДК 547.96

**Ю.В. Баканович, О.В. Стрижак,
І.В. Комаров, В.П. Хиля**

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка
E-mail: alex.strizhak@gmail.com

Діарилетеновмісні “степлені” пептиди – інгібітори р53/MDM2 взаємодії

Представлено членом-кореспондентом НАН України В.П. Хилю

Проведено дизайн, синтез та дослідження як інгібіторів р53/MDM2 взаємодії шести нових “степлених” фотоконтрольованих пептидоміметиків – аналогів відомого інгібітора рD1. Фотоконтролю активності пептидоміметиків досягнуто завдяки введенню в їх молекули фрагмента діарилетену, здатного до фотоізомеризації. Встановлено, що з’єднання амінокислотних залишків у лінійному прекурсорі в положеннях i,i+7 діарилетеновмісним лінкером є оптимальним для отримання активних фотоконтрольованих інгібіторів. Константи інгібування протеїну MDM2 деяких отриманих пептидоміметиків сягали значень кількох наномолів, що ставить їх в один ряд з найбільш активними відомими на цей час інгібіторами р53/MDM2 взаємодії. Перспективним є подальше дослідження отриманих сполук як засобів терапії захворювань на рак.

Ключові слова: *фотофармакологія, діарилетени, протеїн-протеїнові взаємодії, р53/MDM2 взаємодія, захворювання на рак.*

Протеїн-протеїнові взаємодії на даний час є перспективними, проте проблемними мішенями для сучасної фармакотерапії. Вони відіграють важливу роль у розвитку багатьох типів захворювань і тому нині досліджуються надзвичайно інтенсивно [1]. Дуже важливою є протеїн-протеїнова взаємодія між “охоронцем геному”, протеїном р53 і Е3-лігазою MDM2, яка регулює його рівень шляхом приєднання убіквітину з подальшою протеолітичною деградацією в протеасомі. У нормально функціонуючих клітинах рівень р53 підтримується на належному, досить низькому рівні за рахунок помірної концентрації MDM2. Проте у випадку пошкодження ДНК рівень р53 підвищується, що призводить до запуску низки вторинних процесів і, як наслідок, апоптозу клітин з пошкодженою ДНК. Майже 50 % різних видів раку пов’язані з порушенням балансу між протеїнами р53 та MDM2 [2], насамперед за рахунок надмірної експресії MDM2, що призводить до повної деградації р53 та втрати ним функції “охоронця геному”. Це дає змогу клітинам з мутаціями ДНК безконтрольно ділитися, в результаті чого розвивається онкозахворювання.

Цитування: Баканович Ю.В., Стрижак О.В., Комаров І.В., Хиля В.П. Діарилетеновмісні “степлені” пептиди – інгібітори р53/MDM2 взаємодії. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2020. № 7. С. 52–61. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.07.052>

Найбільш поширені мішені фармакотерапії — ензими та іонні канали — мають досить малий за об’ємом активний сайт, який успішно блокується малими молекулами, що є основою сучасної медичної хімії.

Проте інтерфейс взаємодії між двома протеїнами має набагато більшу поверхню, ніж інтерфейс протеїн—мала молекула, крім того, взаємодія протеїн—протеїн зазвичай відбувається переважно завдяки великій кількості відносно слабких гідрофобних і катіон- π взаємодій бічних ланцюгів амінокислот. Це все призводить до того, що малі молекули є мало-придатними для інгібування протеїн-протеїнових взаємодій. Для подібних мішеней була запропонована низка альтернативних підходів. Одним з методів, який інтенсивно розвивається зараз, є використання пептидів і пептидоміметиків. Для цього спочатку з’ясовують, які елементи вторинної структури протеїнів взаємодіють один з одним, а потім отримують пептидоміметики, молекули яких мають ці елементи та найважливіші для взаємодії функціональні групи. Найпоширенішим елементом інтерфейсів взаємодій протеїн-протеїн є альфа-спіраль. У випадку взаємодії p53/MDM2 N-кінцевий альфа-спіральний домен p53 (амінокислотні залишки 17–29) специфічно розпізнається N-кінцевим доменом MDM2 (залишки 17–125) [3]. Тому природно було б використати пептидоміметик, який має амінокислотну послідовність, аналогічну N-(17–29)-домену p53, як антагоніст MDM2. Проте такі пептидоміметики, відокремлені від решти протеїну p53, як правило, не зберігають структуру альфа-спіралі. Крім того, лінійні невеликі амінокислотні послідовності є нестійкими до ензиматичного гідролізу і не проникають крізь мембрану всередину клітини. Для подолання цих проблем часто використовують циклічні, так звані “степлені” пептиди — пептидоміметики, у яких бічні ланцюги неприродних амінокислот з’єднані один з одним з утворенням макроциклу [4] (рис. 1).

Альфа-спіраль, а точніше, 3.6_{13} -спіраль — елемент вторинної структури пептидів і протеїнів, який містить у середньому 3,6 амінокислотних залишки в одному оберті спіралі. Тому бічні ланцюги залишків на відстані трьох або чотирьох, семи та одинадцяти амінокислотних залишків знаходяться з одного боку спіралі на відстані одного, двох або трьох обертів спіралі відповідно. При замиканні циклу шляхом з’єднання бічних ланцюгів цих амінокислотних залишків отримують $i, i+3$ або $i, i+4$; $i, i+7$ та $i, i+11$ “степлені” пептиди відповідно. Такі пептидоміметики, по-перше, характеризуються підвищеною стабільністю альфа-спіралі і, відповідно, підвищеною афінністю до мішеней, а по-друге — є більш стійкими до ензиматичного гідролізу [4].

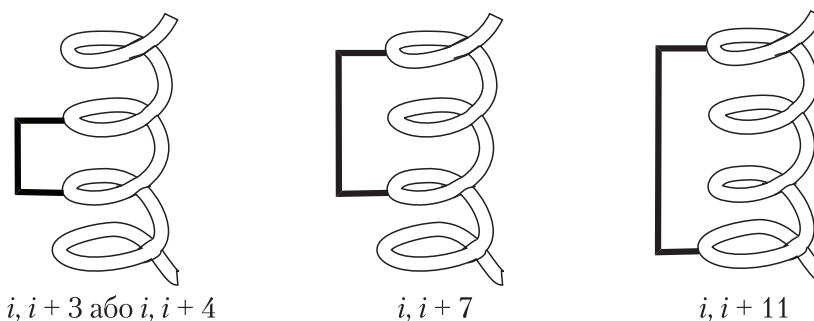


Рис. 1

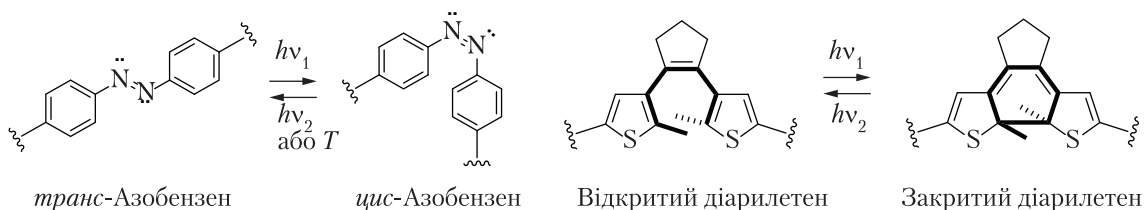


Рис. 2

Введення фрагментів, які вступають у зворотні фотохімічні перетворення, тобто фотоперемикачів, дає змогу контролювати конформаційні та біологічні властивості одержаних пептидоміметиків за допомогою світла, що нині є актуальним завданням нового напрямку медичної хімії – фотофармакології [5]. На фотофармакологію покладають надії у створенні безпечніших лікарських засобів, оскільки в організм пацієнтів можуть вводитися нетоксичні, малоактивні фотофармакологічні агенти, а дією світла вони можуть бути активованими лише в місцях уражень. Як фотоперемикачі найчастіше використовують азобензени [6]. Проте термічна релаксація та метаболічна нестійкість азобензенів стає на заваді їх практичному використанню у фотофармакології. Тому нашу увагу привернув інший фотоперемикач – діарилетен [7], який є термічно та метаболічно стійким. У результаті опромінення УФ світлом (280 нм) відкрита форма діарилетену перетворюється на закриту форму шляхом електроциклічної реакції, при цьому конформація фотоперемикача змінюється незначним чином, але його конформаційна рухливість істотно зменшується. Зворотна реакція відбувається у разі опромінення видимим світлом (450–550 нм) протягом 10–20 хв з кількісним виходом (рис. 2).

Крім того, обидві форми є термічно стійкими, тобто за відсутності опромінення можуть зберігатися протягом тривалого часу, що дуже важливо для практичного використання. У наших попередніх роботах ми довели, що цей фотоперемикач може істотним чином змінювати біологічну активність циклічних пептидоміметиків – аналогів граміцидину [8, 9]. Метою даного дослідження було створення фоторегульованих альфа-спіральних “ступених” пептидів – інгібіторів p53/MDM2 взаємодії, з використанням діарилетену як фотоперемикача.

Як лінійний пептид-прототип (темплат) ми вибрали відому послідовність pDI-E (Ac-LTFHEYWAQLTS-NH₂), яка була використана для синтезу *i,i+7* “ступених” (не фотоконтрольованих) MDM2 інгібіторів [10]. Автори цієї роботи розробили метод подвійної “клік”-реакції за участю лінкеру з двома потрійними зв’язками та лінійного пептиду – аналога pDI, який містить два залишки азидоорнітину в *i,i+7* позиціях. Ми для *i,i+7* з’єднання використали такий самий пептид, що і автори роботи [10], а саме – Ac-LTF-OrnN₃-EYWAQL-OrnN₃-S-NH₂ (**1**). Згідно з даними літератури, чотири амінокислотних залишки цієї послідовності є критичними для взаємодії з протеїном MDM2: F3, Y6, W7 та L10. Виходячи з цього, ми синтезували ще два лінійних пептиди: Ac-LTF-OrnN₃-EYW-OrnN₃-QLTS-NH₂ (**2**) для *i,i+4* та Ac-OrnN₃-LTFHEYWAQL-OrnN₃-S-NH₂ (**3**) для *i,i+11* з’єднання.

Як фотоперемикачі ми використали описані раніше аміді 4,4’-(циклопент-1-ен-1,2-дііл)-*bis*-(5-метилтіофен-2-карбонової кислоти) з пропаргіламіном (**A**) та N-метилпропаргіламіном (**B**), а також 1,2-*bis*-(5-етиніл-2-метилтіофен-3-іл)циклопент-1-ен (**C**) [7] (рис. 3).

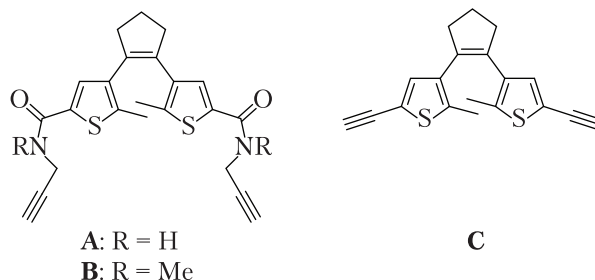


Рис. 3

Маючи три лінійних пептиди **1–3** з різною відстанню між бічними ланцюгами для приєднання фотоперемикача і три фотоперемикачі **A–C**, ми дослідили їх взаємну поведінку в “клік”-реакції з метою знайти оптимальне сполучення між фотоперемикачем та лінійним пептидом. “Клік”-реакція між лінійними азидозаміщеними пептидами **1–3** і фотоперемикачами **A–C**, що містять потрійний зв’язок, була проведена в умовах, аналогічних до описаних у роботі [11]. Результати наведені в табл. 1.

Ми встановили, що у випадку $i,i+7$ та $i,i+4$ з’єднань всі три фотоперемикачі утворюють “степлені” пептиди з усіма лінійними прекурсорами, а у випадку прекурсора **3** “клік”-реакція не відбувалася з жодним із перемикачів. Структури одержаних $i,i+4$ та $i,i+7$ “степлених” пептидів наведені на рис. 4.

Будова одержаних пептидоміметиків була доведена за допомогою мас-спектрометрії. Їх циклічна будова підтверджена відсутністю поглинання вільних N_3 -груп у ІЧ спектрах (2103 cm^{-1}), що свідчить про приєднання фотоперемикачів одночасно до двох бічних ланцюгів. У випадку $i,i+11$ з’єднання і перемикачів **A, B** утворення бажаного продукту не відбувалося, натомість отримано низку продуктів з масами, які відповідають адуктам пептид : перемикач 1 : 2. Це можна пояснити надто великою відстанню між місцями приєднання у вихідному пептиді, що значно перевищує відповідну відстань між потрійними зв’язками у перемикачах **A, B**. У випадку перемикача **C** ми виділили продукт з бажаною молекулярною масою з дуже низьким виходом, проте в його ІЧ спектрі ми спостерігали смугу поглинання при 2112 cm^{-1} , що свідчить про лінійну структуру, у якій фотоперемикач приєднався до пептиду лише за участю одного потрійного зв’язку.

Інгібіторну активність одержаних лінійних **1–3** і “степлених” пептидів **1A–C** та **2A–C** щодо p53-зв’язувального домену протеїну MDM2 досліджено за допомогою конкурентного флуоресцентно-поляризаційного методу аналізу. Як трейсер використано флуоресцентно-мічений пептид TAMRA-P17 [9]. Результати (значення констант інгібування, K_i) наведено

Таблиця 1

Лінійний пептид	Утворення “степлених” пептидів		
	A	B	C
1 ; $i,i+7$: Ac-LTF-OrnN ₃ -EYWAQL-OrnN ₃ -S-NH ₂	Так	Так	Так
2 ; $i,i+4$: Ac-LTF-OrnN ₃ -EYW-OrnN ₃ -QLTS-NH ₂	Так	Так	Так
3 ; $i,i+11$: Ac-OrnN ₃ -LTFHEYWAQL-OrnN ₃ -S-NH ₂	Ні	Ні	Ні

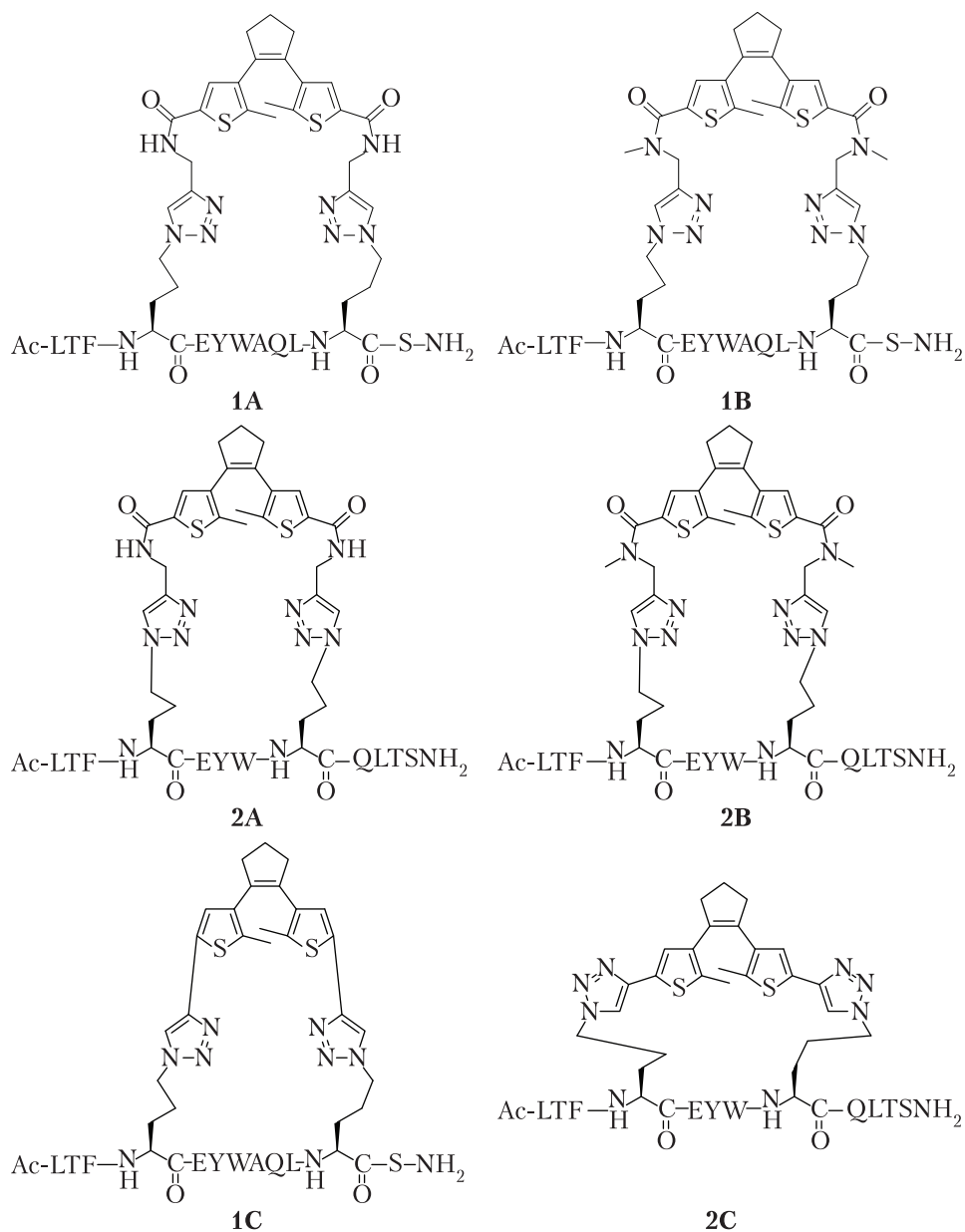


Рис. 4

в табл. 2. На підставі одержаних даних можна зробити висновок, що фотоперемикач **С** не є оптимальним: зв'язування з протеїном MDM2 відповідних “степлених” пептидів **1C** та **2C** виявилося менш ефективним порівняно з лінійними **1** або **2**. Також, для всіх $i,i+4$ пептидів встановлено погіршення зв'язування з MDM2 порівняно з лінійним **2**, а отже, $i,i+4$ з'єднання не є оптимальним для жодного з перемикачів. Проте $i,i+7$ пептиди **1A** і **1B** продемонстрували покращення зв'язування з MDM2 порівняно з лінійним пептидом. Особливо слід відмітити найактивніший пептид **1B**, для якого $K_i = 1,6$ нМ, що робить його одним із найсильніших антагоністів онкогенного протеїну MDM2 серед відомих на теперішній час сполук.

Відомо, що інгібування протеїн-протеїнової взаємодії p53/MDM2 *in vivo* спричиняє уповільнення росту ракових клітин [2]. Наразі декілька “степлених” пептидів, які є інгібіторами p53/MDM2 взаємодії, проходять клінічні випробування як протиракові лікарські засоби [12]. Зважаючи на це, одержані результати є перспективними і з практичної точки зору.

У даний час досліджується можливість перемикавання пептидів **1A** та **1B** у закрити форму і навпаки, а також активність одержаних сполук *in vitro* на клітинах лінії T22.

Експериментальна частина. Синтез вихідних сполук А–С та Fmoc-азидоорнітину. Фотоперемикачі **A** та **B** одержані із відповідної дикарбонової кислоти шляхом її конденсації з амінами під дією HATU [7], фотоперемикач **C** синтезований із відповідного дихлориду реакцією Соногашири [7]. Fmoc-азидоорнітин синтезований у дві стадії з комерційно доступного 3'-N-Вос-1-N-Fmoc-орнітину шляхом зняття 3'-N-Вос захисту дією HCl у діоксані з подальшим діазоперенесенням [7].

Рідинна хроматографія–мас-спектрометрія (РХМС). Аналітичні хроматограми отримані на колонці Supelcosil ABZ+PLUS (алкіламід) (4,6 × 33 мм, 3 мкм) за допомогою приладу Agilent 1200 series LC, об'єднаного з мас-спектрометричною системою Waters, джерелом іонізації ESCi та Micromass ZQ одноквадрупольним детектором. Дані обробляли за допомогою програмного пакета Waters MassLynx 4.1. Дані РХМС додатково аналізували за УФ поглинанням, використовуючи детектор на основі діодної матриці з діапазоном вимірювання 190–600 нм. Для кількісного аналізу одержаних сполук використовували довжину хвилі 215 нм. Усі одержані пептидоміметики мали чистоту понад 90 %.

Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ). ВЕРХ хроматограми одержані на інструментах Agilent 1260 Infinity або Agilent 1100 з колонкою ABZ+PLUS (алкіламід) (4,6 × 150 мм, 3 мкм), елюент – лінійний градієнт 0–100 % ацетонітрил у 0,1 % водній трифтороцтовій кислоті, швидкість потоку – 1 мл/хв. Пептиди очищали методом напівпрепаративної ВЕРХ, використовуючи колонку Vydac 218TP (C18) (22 × 250 мм, 10 мкм), градієнт ацетонітрилу в 0,1 % водній трифтороцтовій кислоті, швидкість потоку – 20 мл/хв. Моніторинг зроблений за допомогою УФ поглинання детектором на основі діодної матриці з діапазоном 200–650 нм. Фракції збирали, використовуючи поглинання при 215 нм.

Загальна методика синтезу лінійних пептидів 1–3. Лінійні пептиди **1–3** були одержані твердофазним методом за допомогою стратегії Fmoc на автоматичному мікрохвильовому синтезаторі “СЕМ Liberty Automated Microwave Peptide Synthesizer”. Як носій використана смола Merck Rink Amide MBHA resin LL (0,29–0,39 ммоль/г). Реакції конденсації проведені з Fmoc-захищеними амінокислотами (5 екв.) у ДМФА з HATU (5 екв.) як конденсуючим агентом та *N,N*-діізопропілетиламіном (10 екв.) як основи. Для усіх амінокислот застосовано одноразову конденсацію з мікрохвильовим опроміненням 25 Вт при 75 °С протягом 15 хв. Зняття захисту Fmoc проведено з використанням 20 % розчину піперидину в ДМФА за умов мікрохвильового опромінення потужністю 45 W при 75 °С протягом 3 хв.

N-термінальний кепінг був проведений обробкою пептиду, прив'язаного до полімерного носія оцтовим ангідридом (10 екв.) та *N,N*-діізопропілетиламіном (10 екв.) у дихлорметані

Таблиця 2

Пептид	K_p , нМ	Пептид	K_p , нМ
1	6,5	2	16,2
1A	4,0	2A	22,2
1B	1,6	2B	>100
1C	>100	2C	>100

протягом 45 хв. Зняття пептиду з полімерного носія здійснено протягом 1 год за допомогою суміші 95 % трифтороцтової кислоти, 2,5 % води та 2,5 % триізопропілсилану. Леткі компоненти з одержаних розчинів випарені у потоці сухого нітрогену, залишок оброблений діетиловим етером, після чого отримані пептидоміметики були відфільтровані та очищені напівпрепаративною ВЕРХ.

Загальна методика одержання степених пептидів. Лінійний пептид (**1–3**, 0,01 ммоль) розчиняли в 100 мл суміші 50 % *t*-BuOH/H₂O, після чого додавали розчин фотоперемикача (**A–C**, 0,011 ммоль) в ацетонітрилі або ДМФА (0,5 мл), розчин ліганду ТНРТА (=трис-(3-гідроксипропілтріазолілметил)аміну, 0,01 ммоль) в ацетонітрилі (0,1 мл) і розчин CuSO₄ · 5H₂O у воді (0,01 ммоль у 0,1 мл). Реакційну суміш дегазували шляхом пропускання через неї інтенсивного току аргону протягом 10 хв, після чого додавали розчин аскорбату натрію у воді (0,03 ммоль у 0,1 мл H₂O). Суміш перемішували в атмосфері аргону протягом 1–3 діб при кімнатній температурі. Хід реакції контролювали за допомогою РХМС і ВЕРХ. Після завершення реакційну суміш ліофілізували, кінцеві сполуки очищали за допомогою напівпрепаративної ВЕРХ. ІЧ спектроскопія була використана для доведення циклічної (нелінійної) будови одержаних продуктів: поглинання при ~2100 см⁻¹, які відповідають N₃-групі, спостерігались у лінійних пептидах **1–3** і не спостерігались у жодному з одержаних пептидоміметиків **1A–C** та **2A–C**, що свідчить про відсутність азидогруп.

Пептид 1, Ac-LTF-OrnN₃-EYWAQL-OrnN₃-S-NH₂. Для очищення використали градієнт 40–70 % MeCN (0,1 % ТФО кислоти). Мол. маса: розраховано 1577,6. Знайдено *m/z*: 1578,6 [M+H]⁺, 790,1 [M+2H]²⁺. РХМС: градієнт 0–100 % MeCN у H₂O, 5 хв, час утримання 2,44 хв.

Пептид 2, Ac-LTF-OrnN₃-EYW-OrnN₃-QLTS-NH₂. Для очищення використали градієнт 40–70 % MeCN (0,1 % ТФО кислоти). Мол. маса: розраховано 1607,6. Знайдено *m/z*: 1609,2 [M+H]⁺, 805,6 [M+2H]²⁺, 1607,3 [M-H]⁻, 803,6 [M-2H]²⁻. РХМС: градієнт 0–100 % MeCN у H₂O, 5 хв, час утримання 2,33 хв.

Пептид 3, Ac-OrnN₃-LTFHEYWAQL-OrnN₃-S-NH₂. Для очищення використали градієнт 30–60 % MeCN (0,1 % ТФО кислоти). Мол. маса: розраховано 1714,7. Знайдено *m/z*: 1717,1 [M+H]⁺, 859,1 [M+2H]²⁺, 1715,3 [M-H]⁻, 857,2 [M-2H]²⁻. РХМС: градієнт 0–100 % MeCN у H₂O, 5 хв, час утримання 1,93 хв.

Пептидоміметик 1A. Для очищення використали градієнт 50–70 % MeCN (0,1 % ТФО кислоти). Мол. маса: розраховано 2000,2. Знайдено *m/z*: 2001,9 [M+H]⁺, 1001,4 [M+2H]²⁺, 1999,3 [M-H]⁻, 999,5 [M-2H]²⁻. РХМС: градієнт 0–100 % MeCN у H₂O, 5 хв, час утримання 2,40 хв.

Пептидоміметик 1B. Для очищення використали градієнт 50–70 % MeCN (0,1 % ТФО кислоти). Мол. маса: розраховано 2028,2. Знайдено *m/z*: 2052,4 [M+Na]⁺, 1016,0 [M+2H]²⁺, 2028,7 [M-H]⁻, 1014,2 [M-2H]²⁻. РХМС: градієнт 0–100 % MeCN у H₂O, 5 хв, час утримання 2,47 хв.

Пептидоміметик 1C. Для очищення використали градієнт 50–80 % MeCN (0,1 % ТФО кислоти). Мол. маса: розраховано 1885,6. Знайдено *m/z*: 1888,7 [M+H]⁺, 944,8 [M+2H]²⁺, 1886,6 [M-H]⁻, 942,9 [M-2H]²⁻. РХМС: градієнт 0–100 % MeCN у H₂O, 5 хв, час утримання 2,75 хв.

Пептидоміметик 2А. Для очищення використали градієнт 50–80 % MeCN (0,1 % ТФО кислоти). Мол. маса: розраховано 2030,2. Знайдено m/z : 1016,9 $[M+2H]^{2+}$. РХМС: градієнт 0–100 % MeCN у H_2O , 5 хв, час утримання 2,40 хв.

Пептидоміметик 2В. Для очищення використали градієнт 40–80 % MeCN (0,1 % ТФО кислоти). Мол. маса: розраховано 2058,2. Знайдено m/z : 1030,8 $[M+2H]^{2+}$. РХМС: градієнт 0–100 % MeCN у H_2O , 5 хв, час утримання 2,43 хв.

Пептидоміметик 2С. Для очищення використали градієнт 40–80 % MeCN (0,1 % ТФО кислоти). Мол. маса: розраховано 1915,6. Знайдено m/z : 959,5 $[M+2H]^{2+}$, 957,6 $[M-2H]^{2-}$. РХМС: градієнт 0–100 % MeCN у H_2O , 5 хв, час утримання 2,75 хв.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

- Mullard A. Protein–protein interaction inhibitors get into the groove. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2012. **11**. P. 173–175. <https://doi.org/10.1038/nrd3680>
- Wang S., Zhao Y., Aguilar A., Bernard D., Yang C.-Y. Targeting the MDM2–p53 protein–protein interaction for new cancer therapy: progress and challenges. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2017. **7**, № 5. a026245. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026245>
- Kussie P., Gorina S., Marechal V., Elenbaas B., Moreau J., Levine A., Pavletich N. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science.* 1996. **274**. P. 948–953.
- Lau Y.H., de Andrade P., Quah S.T., Rossmann M., Laraia L., Sköld N., Sum T.J., Rowling P.J.E., Joseph T.L., Verma C., Hyvönen M., Itzhaki L.S., Venkitaraman A.R., Brown C.J., Lane D.P., Spring D.R. Functionalised staple linkages for modulating the cellular activity of stapled peptides. *Chem. Sci.* 2014. **5**. P. 1804–1809. <https://doi.org/10.1039/C4SC00045E>
- Hüll K., Morstein J., Trauner D. *In vivo* photopharmacology. *Chem. Rev.* 2018. **118**, № 21. P. 10710–10747. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00037>
- Beharry A.A., Woolley G.A. Azobenzene photoswitches for biomolecules. *Chem. Soc. Rev.* 2011. **40**. P. 4422–4437. <https://doi.org/10.1039/C1CS15023E>
- Irie M., Fukaminato T., Matsuda K., Kobatake S. Photochromism of diarylethene molecules and crystals: memories, switches, and actuators. *Chem. Rev.* 2014. **114**. P. 12174–12277. <https://doi.org/10.1021/cr500249p>
- Babii O., Afonin S., Berditsch M., Reißer S., Mykhailiuk P.K., Kubyshkin V.S., Steinbrecher T., Ulrich A.S., Komarov I.V. Controlling biological activity with light: diarylethene-containing cyclic peptidomimetics. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014. **53**. P. 3392–3395. <https://doi.org/10.1002/anie.201310019>
- Babii O., Afonin S., Garmanchuk L.V., Nikulina V.V., Nikolaienko T.V., Storozhuk O.V., Shelest D.V., Dasyukevich O.I., Ostapchenko L.I., Iurchenko V., Zozulya S., Ulrich A.S., Komarov I.V. Direct photocontrol of peptidomimetics: an alternative to oxygen-dependent photodynamic cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016. **55**. P. 5493–5496. <https://doi.org/10.1002/ange.201600506>
- Lau Y.H., Wu Y., Rossmann M., Tan B.X., de Andrade P., Tan Y.S., Verma C., McKenzie G.J., Venkitaraman A.R., Hyvönen M., Spring D.R. Double strain-promoted macrocyclization for the rapid selection of cell-active stapled peptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015. **54**. P. 15410–15413. <https://doi.org/10.1002/anie.201508416>
- Lau Y.H., Wu Y., de Andrade P., Galloway W.R.J.D., Spring D.R. A two-component ‘double-click’ approach to peptide stapling. *Nat. Protoc.* 2015. **10**. P. 585–594. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.033>
- Tisato V., Voltan R., Gonelli A., Secchiero P., Zauli G. MDM2/X inhibitors under clinical evaluation: perspectives for the management of hematological malignancies and pediatric cancer. *J. Hematol. Oncol.* 2017. **10**. Art. 133. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0500-5>

Надійшло до редакції 24.03.2020

REFERENCES

1. Mullard, A. (2012). Protein–protein interaction inhibitors get into the groove. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 11, pp. 173-175. <https://doi.org/10.1038/nrd3680>
2. Wang, S., Zhao, Y., Aguilar, A., Bernard, D. & Yang, C.-Y. (2017). Targeting the MDM2–p53 protein–protein interaction for new cancer therapy: progress and challenges. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 7, No. 5, a026245. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026245>
3. Kussie, P., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A. & Pavletich, N. (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*, 274, pp. 948-953.
4. Lau, Y. H., de Andrade, P., Quah, S. T., Rossmann, M., Laraia, L., Sköld, N., Sum, T. J., Rowling, P. J.E., Joseph, T. L., Verma, C., Hyvönen, M., Itzhaki, L. S., Venkitaraman, A. R., Brown, C. J., Lane, D. P. & Spring, D. R. (2014). Functionalised staple linkages for modulating the cellular activity of stapled peptides. *Chem. Sci.*, 5, pp. 1804-1809. <https://doi.org/10.1039/C4SC00045E>
5. Hüll, K., Morstein, J. & Trauner, D. (2018). *In vivo* photopharmacology. *Chem. Rev.*, 118, No. 21, pp. 10710-10747. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00037>
6. Beharry, A. A. & Woolley, G. A. (2011). Azobenzene photoswitches for biomolecules. *Chem. Soc. Rev.*, 40, pp. 4422-437. <https://doi.org/10.1039/C1CS15023E>
7. Irie, M., Fukaminato, T., Matsuda, K. & Kobatake, S. (2014). Photochromism of diarylethene molecules and crystals: memories, switches, and actuators. *Chem. Rev.*, 114, pp. 12174-12277. <https://doi.org/10.1021/cr500249p>
8. Babii, O., Afonin, S., Berditsch, M., Reißer, S., Mykhailiuk, P. K., Kubyshkin, V. S., Steinbrecher, T., Ulrich, A. S. & Komarov, I. V. (2014). Controlling biological activity with light: diarylethene-containing cyclic peptidomimetics. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, pp. 3392-3395. <https://doi.org/10.1002/anie.201310019>
9. Babii, O., Afonin, S., Garmanchuk, L. V., Nikulina, V. V., Nikolaienko, T. V., Storozhuk, O. V., Shelest, D. V., Dasyukevich, O. I., Ostapchenko, L. I., Iurchenko, V., Zozulya, S., Ulrich, A. S. & Komarov, I. V. (2016). Direct photocontrol of peptidomimetics: an alternative to oxygen-dependent photodynamic cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 55, pp. 5493-5496. <https://doi.org/10.1002/ange.201600506>
10. Lau, Y. H., Wu, Y., Rossmann, M., Tan, B. X., de Andrade, P., Tan, Y. S., Verma, C., McKenzie, G. J., Venkitaraman, A. R., Hyvönen, M. & Spring, D. R. (2015). Double strain-promoted macrocyclization for the rapid selection of cell-active stapled peptides. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54, pp. 15410-15413. <https://doi.org/10.1002/anie.201508416>
11. Lau, Y. H., Wu, Y., de Andrade, P., Galloway, W. R.J.D. & Spring, D. R. (2015). A two-component ‘double-click’ approach to peptide stapling. *Nat. Protoc.*, 10, pp. 585-594. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.033>
12. Tisato, V., Voltan, R., Gonelli, A., Secchiero, P. & Zauli, G. (2017). MDM2/X inhibitors under clinical evaluation: perspectives for the management of hematological malignancies and pediatric cancer. *J. Hematol. Oncol.*, 10, Art. 133. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0500-5>

Received 24.03.2020

*I.V. Bakanovych, O.V. Strizhak,
I.V. Komarov, V.P. Khilya*

Taras Shevchenko National University of Kyiv
E-mail: alex.strizhak@gmail.com

DIARYLETHENE-CONTAINING “STAPLED” PEPTIDES
AS INHIBITORS OF P53/MDM2 INTERACTION

Interaction between p53 and the E3 ubiquitin ligase murine double minute 2 homolog (MDM2) is regarded as an important target for anticancer therapeutics. The p53/MDM2 protein-protein interaction is one of the best-studied and most targeted intracellular processes related to cancer progression. Toxicity associated with p53 activation has been reported as a critical issue; therefore, the search for novel selective modulators of this protein-protein interaction is of great interest. In this work, the design, synthesis, and study, as the p53/MDM2 interaction inhibitors, of six new “stapled” photocontrolled peptidomimetics – analogues of the known inhibitor pDI – are reported. Photocontrol of peptidomimetic activity was achieved by introducing a photoisomerizable

diarylethene fragment into their molecules. Six peptidomimetics bearing the diarylethene group cross-linking amino acid side chains in different positions of the polypeptide strand: ($i,i+4$), ($i,i+7$), ($i,i+11$) were prepared. The stapling was achieved using the Cu-catalyzed “click”-reaction between the diarylethene-based *bis*-alkynes and two azidoornithine residues placed in appropriate positions of the linear peptide precursors. All the compounds were obtained with the diarylethene moiety in the so-called “open” conformation which can be generated by visible light. They were purified by high performance liquid chromatography. It has been found that the stapling of amino acid residues at positions ($i,i+7$) in the linear precursor with the diarylethene linker is optimal for obtaining active photocontrolled inhibitors, in terms of the yields of the stapling reaction. Attempts at ($i,i+4$) and ($i,i+11$) stapling gave either no product or the compounds, where the diarylethene building block reacted with the peptide precursor through only one alkyne group. The values of the inhibition constants for some of the obtained peptidomimetics measured with the use of a fluorescence polarization assay reached several nanomoles, which puts the obtained peptidomimetics in line with the most active inhibitors of the p53/MDM2 interaction known at the time. Further studies of the obtained compounds as possible candidates for the cancer photopharmacology are warranted.

Keywords: *photopharmacology, diarylethene, protein-protein interactions, p53/MDM2 interaction, cancer.*