

УДК 546.100.02.3:547.15/17

## СИНТЕЗ ИЗОТОПНО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДОФАМИНА, СЕРОТОНИНА И ДОКСОРУБИЦИНА С Вос-Pro И Вос-[<sup>2</sup>H]Pro

В. П. Шевченко\*, Л. А. Андреева, И. Ю. Нагаев,  
академик РАН Н. Ф. Мясоедов

Поступило 04.10.2018 г.

Впервые синтезировали Вос-Pro-Dox, Вос-Pro-DOPA, Вос-Pro-Srt и Pro-Dox, Pro-DOPA, Pro-Srt, а также Вос-[<sup>2</sup>H]Pro-Dox, Вос-[<sup>2</sup>H]Pro-DOPA, Вос-[<sup>2</sup>H]Pro-Srt и [<sup>2</sup>H]Pro-Dox, [<sup>2</sup>H]Pro-DOPA, [<sup>2</sup>H]Pro-Srt. Для получения дейтерированных соединений наиболее перспективно использовать Вос-[<sup>2</sup>H]Pro. Гидрирование Вос-ΔPro в этилацетате на палладиевом катализаторе позволяет ввести в 1,6–1,65 раза больше дейтерия, чем при гидрировании ненасыщенного пролина, связанного с серотонином, и в 3 раза больше, чем при гидрировании ненасыщенного пролина, связанного с дофамином. Из-за неустойчивости доксорубицина в условиях восстановления ненасыщенного пролина его конденсация с Вос-[<sup>2</sup>H]Pro является единственной возможностью для получения Вос-[<sup>2</sup>H]Pro-Dox. Масс-спектрометрическими методами определили содержание изотопомеров в дейтерированных продуктах.

*Ключевые слова:* синтез, пролинпроизводные дофамина, серотонина, доксорубицина, дейтерий.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524852182-185>

Проблема разработки дизайна получения меченых изотопами водорода биологически активных соединений всегда является важной для их синтеза [1–3]. Как правило, для этих целей используются ненасыщенные предшественники и оптимизируются условия гидрирования. В случае использования изотопов водорода при гидрировании двойных связей важно, чтобы вещество растворялось в апротонном растворителе (меньшее разбавление подвижными протонами дейтерия или трития), а также желательно, чтобы введение дейтерия или трития происходило на стадии как можно ближе к конечной. С этой точки зрения интересно изучить введение дейтерия или трития в соединения, которые нерастворимы или малорастворимы в апротонных растворителях. Такая ситуация возникает при работе с производными дофамина (DOPA), серотонина (Srt) и доксорубицина (Dox). Известно, что использование DOPA, Srt и Dox в экспериментах *in vivo* имеет ряд негативных последствий, связанных с их деградацией и токсичностью. Улучшить эту ситуацию можно, получая производные этих соединений [4]. В результате образуются соединения, более устойчивые к действию ферментов, которые, обладая большей липофильностью, могут преодолевать гематоэнцефалический барьер и проникать в головной мозг живых организмов при интраназальном введении. В работе [4] в качестве защитной

группы с этой целью использовали Z-защиту. Естественно, в качестве защитной группы можно использовать и другие группы, например Вос-защиту. Исследование этой возможности составило предмет настоящего сообщения.

Для определения, какая из этих двух защитных групп более важна для экспериментов *in vivo*, мы воспользовались программой, разработанной в работах [5, 6]. Использование этой программы позволило оценить, какие из соединений будут иметь большую вероятность проникать из кровотока в головной мозг. Другими словами, эта программа позволила рассчитать отношение  $AUC_{\text{мозг}}/AUC_{\text{кровь}}$  (табл. 1).

Как видно из данных таблицы, соединения с Вос-защитой имеют преимущество перед соединениями с Z-защитой для преодоления гематоэнцефалического барьера. Таким образом, можно ожидать, что однотипные соединения с Вос-защитой более перспективны.

**Таблица 1.** Расчётные данные по распределению производных Dox, DOPA и серотонина между кровью и тканями мозга

Соединение	$AUC_{\text{мозг}}/AUC_{\text{кровь}}$
Вос-Pro-DOPA	0,129
Вос-Pro-Dox	0,025
Вос-Pro-Srt	0,120
Z-Pro-DOPA	0,089
Z-Pro-Dox	0,018
Z-Pro-Srt	0,081

Институт молекулярной генетики  
Российской Академии наук, Москва

\*E-mail: [nagaev@img.ras.ru](mailto:nagaev@img.ras.ru)

Цель настоящей работы — получение производных дофамина, серотонина и доксорубина, содержащих Вос-Pro и Вос-[<sup>2</sup>H]Pro.

Используемые в работе катализаторы, реагенты и растворители — коммерческие препараты. Исходные соединения и продукты реакций охарактеризованы с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и масс-спектрометрии. Масс-спектрометрические данные получали на приборе LCQ Advantage MAX (“Thermo Electron Corp.”, США) с ионизацией электрораспылением, прямым вводом раствора образца с концентрацией 10 мкг/мл в 0,1%-й уксусной кислоте и дальнейшей фрагментацией молекулярного пика в анализаторе методом ионных соударений при 35 эВ. Синтез проводили по методикам [7, 8].

Исследование эффективности разных подходов для получения производных дофамина, серотонина и доксорубина с пролином и [<sup>2</sup>H]пролином проводили с использованием серотонина. Для получения производного серотонина с пролином (Pro-Srt) в качестве пролинового компонента выбрали Вос-Pro. Конденсацию проводили традиционным методом с использованием дициклогексилкарбодиимида (ДЦГК). В раствор 33,3 мг (0,15 ммоль) Вос-Pro, 21,5 мг (0,16 ммоль) 1-оксibenзтриазола, 35 мг (0,17 ммоль) ДЦГК в 2 мл диметилформамида (DMF) и 150 мкл триэтиламина (Et<sub>3</sub>N) вносили 30 мг (0,14 ммоль) HCl · Srt. Реакцию проводили в течение 12–17 ч, DMF удаляли лиофилизацией. Анализ реакционной смеси проводили на колонке ProntoSIL-120-5-C18 AQ DB-2003 (“Bishcoff Chromatography”, Германия, размер 2,0 × 75 мм, диаметр частиц 5 мкм), в системе А (0,1% CH<sub>3</sub>COOH), в системе В (метанол), градиент В — от 30 до 100% за 12,5 мин, скорость подачи элюента — 0,2 мл/мин. Время удерживания Вос-Pro-Srt — 5,06 мин.

Вос-Pro-Srt выделяли твёрдофазной экстракцией на патроне Диапак С16 (“Гранат”, Россия). Вещество экстрагировали с носителя водным метанолом с 0,05% уксусной кислоты, постепенно увеличивая содержание метанола от 20 до 100% (на 1 г фазы рекомендуется наносить не более 5 мг реакционной смеси). Препаративную хроматографию проводили на колонке Reprosil pur C18aq (“Dr. Maisch GmbH”, Германия, размер 20 × 150 мм, диаметр частиц 10 мкм), в системе 50% метанол + 0,05% уксусной кислоты, скорость подачи элюента — 20 мл/мин, длина волны 280 нм. Выход Вос-Pro-Srt был в пределах 75–80%.

Для введения дейтерия использовали Вос-ΔPro, который хорошо растворим в этилацетате. Гидри-

рование Вос-ΔPro проводили в этом апротонном растворителе. Включение дейтерия в Вос-ΔPro (50 мг) при использовании этилацетата (0,4 мл) и 5% PdO/BaSO<sub>4</sub> (20 мг) достигало 1,94 среднего содержания атомов дейтерия на молекулу пролина. Реакцию вели 1,5–2 ч с газообразным дейтерием под давлением 400 гПа. Содержание изотопомеров, образовавшихся в пролине, представлено в табл. 2.

Конденсацию Вос-ΔPro и Вос-[<sup>2</sup>H]Pro с серотином проводили по методике, приведённой выше, с той разницей, что реагентов брали в 4 раза меньше при том же соотношении и порядке смешивания. Выходы Вос-ΔPro-Srt и Вос-[<sup>2</sup>H]Pro-Srt не отличались от выхода Вос-Pro-Srt.

Для получения Вос-[<sup>2</sup>H]Pro-Srt раствор Вос-ΔPro-Srt (1 мг) в 0,4 мл метанола или DMF обрабатывали газообразным дейтерием в присутствии 5 мг 5% PdO/BaSO<sub>4</sub> в течение 2 ч. Среднее содержание атомов дейтерия в молекуле Вос-[<sup>2</sup>H]Pro-Srt при использовании метанола было около 1,18; DMF — 1,00.

Защитную группу с Вос-Pro-Srt и Вос-[<sup>2</sup>H]Pro-Srt снимали в течение 30 мин после растворения соединений в смеси хлороформа с трифторуксусной кислотой (ТФУ) (1:1). ВЭЖХ проводили на колонке ProntoSIL-120-5-C18 AQ DB-2003 (размер 2,0 × 75 мм, диаметр частиц 5 мкм), в системе А — 0,1% CH<sub>3</sub>COOH, В — метанол, градиент В от 0 до 50% за 12,5 мин, скорость подачи элюента — 0,2 мл/мин. Время удерживания Pro-Srt 5,93 мин.

С помощью масс-спектрометрического анализа мы обнаружили, что не только количество дейтерия, но и соотношение изотопомеров изменилось при

**Таблица 2.** Содержание изотопомеров в пролине при разной последовательности введения дейтерия и обработки дейтерированных соединений

Атомов <sup>2</sup> H	Содержание изотопомера в гидрированном пролине, %				
	EtOAc*	[ <sup>2</sup> H]Pro**	ТФУ***	CH <sub>3</sub> OH****	DMF*****
0	7,2	7,2	11,0	20,7	32,4
1	21,3	22,8	23,7	43,6	40,7
2	46,0	46,4	42,5	31,0	22,3
3	22,5	21,5	20,4	3,7	3,8
4	3,2	1,9	2,2	0,4	0,8
5	0,2	0,4	0,2	—	—

Примечание. \* содержание изотопомеров в пролине при гидрировании Вос-ΔPro в этилацетате; \*\* после реакции Вос-[<sup>2</sup>H]Pro с серотином; \*\*\* после удаления защиты [<sup>2</sup>H]Pro-Srt; \*\*\*\* содержание изотопомеров в пролине при гидрировании Вос-ΔPro-Srt в метаноле; \*\*\*\*\* содержание изотопомеров в пролине при гидрировании Вос-ΔPro-Srt в DMF.

гидрировании  $\Delta$ Pro в составе Вос- $\Delta$ Pro и Вос- $\Delta$ Pro-Srt (табл. 2).

Как видно из данных табл. 2, содержание дейтерия в Вос- $^{[2]H}$ Pro-Srt и  $^{[2]H}$ Pro-Srt при использовании Вос- $^{[2]H}$ Pro по сравнению с исходным его содержанием в Вос- $^{[2]H}$ Pro изменилось незначительно, примерно на 0,1 атома дейтерия. При этом основными изотопомерами были изотопомер с двумя атомами дейтерия и примерно равное количество изотопомеров с одним и тремя атомами дейтерия. При введении дейтерия гидрированием Вос- $\Delta$ Pro-Srt жидкофазным методом основным изотопомером стал изотопомер с одним атомом дейтерия. Содержание этого изотопомера в 11–12 раз превосходило содержание изотопомера с тремя атомами дейтерия.

Таким образом, если включение метки является критическим для проведения биологических тестов, то нужно использовать Вос- $^{[2]H}$ Pro, а если достаточно включения менее одного атома изотопа водорода, то лучше провести полный синтез искомого соединения с использованием  $\Delta$ Pro и ввести изотоп водорода на последней стадии.

Конденсацию DOPA и Dox с Вос-Pro, Вос- $^{[2]H}$ Pro и Вос- $\Delta$ Pro проводили аналогично получению соответствующих производных с Srt. Анализ этих соединений, полученных в условиях, при которых синтезированы соответствующие соединения с Srt, показал, что время удерживания Вос- $^{[2]H}$ Pro-DOPA и Вос- $^{[2]H}$ Pro-Dox составляло 4,69 и 9,38 мин соответственно. После снятия Вос-защиты и ВЭЖХ получили  $^{[2]H}$ Pro-Dox и  $^{[2]H}$ Pro-DOPA (табл. 3).

**Таблица 3.** Синтез Вос- $^{[2]H}$ Pro-Dox, Вос- $^{[2]H}$ Pro-DOPA, Вос- $^{[2]H}$ Pro-Srt и  $^{[2]H}$ Pro-Dox,  $^{[2]H}$ Pro-DOPA,  $^{[2]H}$ Pro-Srt

Условия реакции	Анализ и идентификация продуктов
0,22 ммоль Вос- $^{[2]H}$ Pro, 0,22 ммоль 1-оксибензтриазола, 0,25 ммоль ДЦГК, 150 мкл Et <sub>3</sub> N в 0,72 мл DMF. Аликвоты 262, 360 мкл и 98 мкл смешивали с Dox (0,08 ммоль), DOPA (0,11 ммоль), серотонином (0,03 ммоль). Реакцию вели 12 ч, DMF удаляли лиофилизацией. Реакционные смеси очищали твёрдофазной экстракцией на Диапак С16. Защиту снимали ТФУ. Вещества выделяли с помощью ВЭЖХ. Выходы препаратов были в пределах 65–80%	Колонка ProntoSIL-120-5-C18 AQ DB-2003, 2,0 × 75 мм; 5,0 мкм, система А — 0,1% CH <sub>3</sub> COOH, В — метанол, градиент — от 30 до 100% В или от 0 до 50% В в течение 12,5 мин

Каталитическое дейтерирование Вос- $\Delta$ Pro-DOPA и Вос- $\Delta$ Pro-Dox проводили аналогично дейтерированию Вос- $\Delta$ Pro-Srt (растворитель метанол, катализатор 5% PdO/BaSO<sub>4</sub>).

При этом оказалось, что дофамин эту процедуру выдерживал, в то время как выход соединения, содержащего Dox, стал неудовлетворительным. Среднее содержание атомов дейтерия на молекуле пролина в Вос- $^{[2]H}$ Pro-DOPA и Вос- $^{[2]H}$ Pro-Dox при использовании метанола и 5% PdO/BaSO<sub>4</sub> (время реакции 1 ч) — 0,62 и 1,89 соответственно. Соотношение изотопомеров при гидрировании Вос- $\Delta$ Pro-DOPA и Вос- $\Delta$ Pro-Dox оказалось разным (табл. 4).

Таким образом, можно сделать вывод, что включение дейтерия в Вос- $\Delta$ Pro-Srt, Вос- $\Delta$ Pro-DOPA и Вос- $\Delta$ Pro-Dox происходило с разной скоростью. Чем быстрее включалась метка, тем меньше сказывалось влияние растворителя, содержащего подвижные протоны. Быстрее всего дейтерий включался при гидрировании Вос- $\Delta$ Pro-Dox, и если бы исходное вещество сохранялось в этих условиях, то можно было ввести метку в конечный продукт гидрированием соответствующего ненасыщенного предшественника. Медленнее всего включение дейтерия происходило при гидрировании Вос- $\Delta$ Pro-DOPA. Это, по-видимому, явилось причиной того, что содержание атомов дейтерия в этом соединении примерно в 3 раза меньше, чем при гидрировании Вос- $\Delta$ Pro-Dox. Как видно из данных табл. 2 и 4, изотопомеров с большим содержанием дейтерия в Вос- $^{[2]H}$ Pro-Dox было больше, чем в Вос- $^{[2]H}$ Pro-Srt и в Вос- $^{[2]H}$ Pro-DOPA.

После снятия Вос-защиты с Вос- $^{[2]H}$ Pro-DOPA, как и в случае аналогичной реакции с Вос- $^{[2]H}$ Pro-Srt, соотношение изотопомеров изменилось незначительно.

**Таблица 4.** Содержание изотопомеров в пролине при гидрировании  $\Delta$ Pro в Вос- $\Delta$ Pro-DOPA и Вос- $\Delta$ Pro-Dox и после снятия защиты.

Атомов <sup>2</sup> H	Содержание изотопомера в гидрированном пролине, %		
	DOPA*	Dox**	DOPA***
0	52,5	12,4	53,0
1	35,0	25,0	32,9
2	11,1	38,9	12,5
3	1,3	18,2	0,8
4	0,3	8,0	0,3

Примечание. \* образование изотопомеров при гидрировании Вос- $\Delta$ Pro-DOPA; \*\* образование изотопомеров при гидрировании Вос- $\Delta$ Pro-Dox; \*\*\* состав изотопомеров после снятия защитной группы с Вос- $^{[2]H}$ Pro-DOPA.

Таким образом, использование  $\Delta$ Pro для введения изотопа водорода не всегда возможно на конечной стадии синтеза.

Наше исследование показало, что лучше вводить изотопы водорода в Boc- $\Delta$ Pro и только затем проводить конденсацию с биологически активными аминами. Эта схема также удобна при получении меченых соединений, которые кроме пролина должны содержать другие аминокислотные остатки. В этом случае после снятия защитной группы с пролина можно связать атом азота в пролине с необходимым фрагментом.

**Источники финансирования.** Работу проводили при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий” и гранта РФФИ КОМФИ 17–00–00104 “Пептид-липидная регуляция рецепторного взаимодействия и активности генов, влияющих на метаболические пути”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. Меченные тритием липофильные соединения. М.: Наука, 2003. 246 с.
2. Voges R., Heys J.R., Moenius Th. Preparation of Compounds Labeled with Tritium and Carbon-14. Chichester: Wiley, 2009. P. 664.
3. Shevchenko V.P., Nagaev I.Yu., Myasoedov N.F. // J. Label. Comp. Radiopharm. 2010. V. 53. № 11/12. P. 693–703.
4. Huang S., Fang R., Xu J., Qiu Sh., Zhang H., Du J., Cai Sh. // J. Drug Targeting. 2011. V. 19. № 7. P. 487–496.
5. Радченко Е.В., Карпов П.В., Соснин С.Б., Дябина А.С., Соснина Е.А., Палюлин В.А., Зефиров Н.С. // XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. 26–30 сентября 2016 г. Екатеринбург, 2016. С. 432.
6. Дябина А.С., Радченко Е.В., Палюлин В.А., Зефиров Н.С. // ДАН. 2016. Т. 470. № 6. С. 720–723.
7. Гринштейн Дж., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов. М.: Мир, 1965. 826 с.
8. Гершкович А.А., Кибирев В.К. Химический синтез пептидов. Киев: Наук. думка, 1992. 360 с.

**SYNTHESIS OF ISOTOPICALLY MODIFIED DERIVATIVES  
OF DOPAMINE, SEROTONIN AND DOXORUBICINE  
WITH Boc-Pro AND Boc-[<sup>2</sup>H]Pro**

**V. P. Shevchenko, L. A. Andreeva, I. Yu. Nagaev, Academician of the RAS N. F. Myasoedov**

Received October 4, 2018

The synthesis of Boc-Pro-Dox, Boc-Pro-DOPA, Boc-Pro-Srt, Pro-Dox, Pro-DOPA, and Pro-Srt, as well as Boc-[<sup>2</sup>H]Pro-Dox, Boc-[<sup>2</sup>H]Pro-DOPA, Boc-[<sup>2</sup>H]Pro-Srt and [<sup>2</sup>H]Pro-Dox, [<sup>2</sup>H]Pro-DOPA, and [<sup>2</sup>H]Pro-Srt were performed for the first time. It was established that Boc-[<sup>2</sup>H]Pro is the most promising for obtaining deuterated compounds. It was shown that hydrogenation of Boc- $\Delta$ Pro in ethyl acetate on a palladium catalyst allows 1.6–1.65 times more deuterium to be introduced than for hydrogenation of an unsaturated proline bound to serotonin and three times more than hydrogenating an unsaturated proline bound to dopamine. Due to the instability of doxorubicin under the conditions of the reduction of unsaturated proline, its condensation with Boc-[<sup>2</sup>H]Pro is the only possibility for obtaining Boc-[<sup>2</sup>H]Pro-Dox. Mass spectrometric methods determined the content of isotopomers in deuterated products.

*Keywords:* synthesis, proline derivatives of dopamine, serotonin, doxorubicin, deuterium.