

УДК 546.100.02.3:547.15/17

ПЕПТИДНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

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

Поступило 05.12.2018 г.

Проведён синтез *Woc-Gly-Pro-Dox*, *Woc-Gly-Pro-DOPA*, *Woc-Gly-Pro-Srt* и их дейтерированных аналогов. Показано, что эти конденсации проходят с побочными реакциями, которые удалось нивелировать, оптимизируя условия проведения синтеза. Наиболее универсальным синтезом *Woc-Gly-Pro-Dox*, *Woc-Gly-Pro-DOPA*, *Woc-Gly-Pro-Srt* и их дейтерированных аналогов является конденсация *Woc-Gly-Pro* или *Woc-Gly-[²H]Pro* с аминогруппами дофамина, серотонина и доксорубина. Установлено, что для введения изотопов водорода в Δ Pro целесообразно проводить гидрирование его водного раствора с последующей конденсацией восстановленного пролина с *Woc-GlyOSu*. Масс-спектрометрическими методами определено содержание изотопомеров в дейтерированных продуктах.

Ключевые слова: синтез, производные дофамина, серотонина, доксорубина, дейтерий, пептиды.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-5652487141-44>

Существует проблема направленной доставки биологически активного вещества (лекарства) в орган-мишень, т.е. непосредственно в те ткани организма, которые нуждаются в лечении. В работе синтезированы пептидные производные доксорубина (*Woc-Gly-Pro-Dox*), дофамина (*Woc-Gly-Pro-DOPA*) и серотонина (*Woc-Gly-Pro-Srt*), которые играют важную роль в функционировании различных систем организма.

Актуальность синтеза подобных соединений можно рассмотреть на примере подходов при разработке методик, в результате использования которых можно получить производные доксорубина *Dox*. Известно, что главным ограничивающим фактором применения *Dox* в противоопухолевой терапии является его кардиотоксичность [1–3]. При использовании *Dox* отмечены случаи, когда у больных проявлялись симптомы тяжёлой сердечной недостаточности, что могло привести даже к смерти пациента [1]. Поэтому до сих пор продолжается поиск производных *Dox*, которые проявят свои токсические свойства только в опухолях при минимальном ущербе для здоровых тканей организма человека.

В этом плане интересна работа [4], где в качестве пролекарства предлагается *Dox-Pro-Gly-Z*. Смысл этой работы заключался в том, что в опухолевых клетках присутствует фермент, который гидролизует *Dox-Pro-Gly-Z* по связи *Dox-Pro*. В результате этого высвобождается *Dox*, который уничтожает эту клетку. Такая методика позволила повысить тера-

певтическую эффективность цитостатических агентов в лечении рака за счёт уменьшения системных побочных эффектов, связанных с высокой токсичностью *Dox*.

Целью данной работы является синтез *Woc-Gly-Pro-Dox*, *Woc-Gly-Pro-DOPA* и *Woc-Gly-Pro-Srt* и их дейтерированных аналогов.

Катализаторы, реагенты и растворители — коммерческие препараты. *Woc-Gly-Pro* синтезирован в ИМГ РАН конденсацией *Woc-Gly* и *Pro-OBzl* с последующим снятием бензильной группы гидрированием. 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 следующей схеме 1 (табл. 1) [5, 6]. При оптимизации в условиях проведения синтезов установлено, что при избытке дициклогексилкарбодиимида (ДЦГК) обработка уксусной кислотой реакционной смеси, содержащей *Woc-Gly-Pro-Dox*, приводит к образованию *Woc-Gly-Pro-14-Ac-Dox*. Использование двукратного избытка ДЦГК в этих условиях может привести к образованию *Woc-Gly-Pro-14-Ac-Dox* с выходом до 40%.

При работе с серотином при избытке *Woc-Gly-Pro* пептид реагирует также с индольным фрагмен-

*Институт молекулярной генетики
Российской Академии наук, Москва
E-mail: nagaev@img.ras.ru

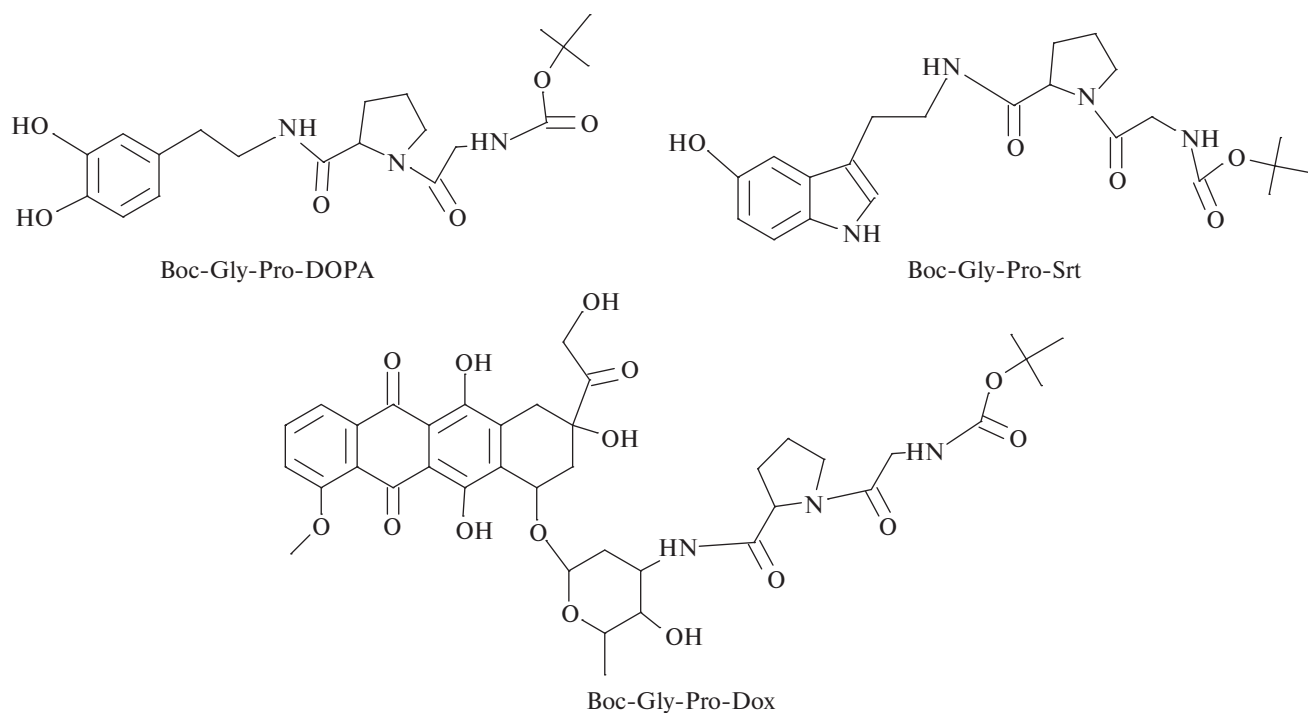


Схема 1

Таблица 1. Условия синтеза Boc-Gly-Pro-Dox, Boc-Gly-Pro-DOPA и Boc-Gly-Pro-Srt

Условия реакции	Анализ и идентификация продуктов
В реакцию брали 10 мкмоль Dox или 52 мкмоль DOPA, или 70 мкмоль серотонина. Сначала раствор пептида в DMF обрабатывали ДЦГК и Et ₃ N в присутствии 1-оксибензтриазола, через 10 мин вносили аминсодержащую компоненту. Соотношение реагентов: аминсодержащая компонента — 1-оксибензтриазола — Boc-Gly-Pro-ДЦГК — Et ₃ N 5,0 : 1,0 : 1,1 : 1,5 : 2,0. Реакцию вели 4–17 ч, DMF удаляли лиофилизацией. Реакционные смеси предварительно очищали твердофазной экстракцией на Диапак С16, вещество экстрагировали с носителя водным метанолом с 0,05%-й уксусной кислотой, постепенно увеличивая процент метанола от 50 до 100%. Вещество выделяли ВЭЖХ. Выходы препаратов были в пределах 60–70%	На колонке ProntoSIL-120-5-C18 AQ DB-2003 (размер 2,0 × 75 мм, диаметр частиц 5 мкм), система А: 0,1% CH ₃ COOH, В — ацетонитрил, градиент В от 0 до 100% В за 12,5 мин; скорость подачи элюента 0,2 мл/мин; время удерживания Boc-Gly-Pro-Dox 8,32 мин, Boc-Gly-Pro-DOPA 6,26 мин. Система А: буфер (0,2 М LiClO ₄ + 0,005 М HClO ₄ , pH 2,24), В — метанол, время удерживания Boc-Gly-Pro-Srt — 8,37 мин.
	На колонке Reprosil pur C18aq (размер 150 × 20 мм, диаметр частиц 10 мкм), в системе А 75% метанол с 0,05%-й уксусной кислотой, В — метанол (детекция при 280 нм); скорость подачи элюента 20 мл/мин; время удерживания Boc-Gly-Pro-Dox 3,58 мин

том серотонина. При соотношении серотонин с Boc-Gly-Pro 1 : 1,3 содержание (Boc-Gly-Pro)₂-Srt относительно Boc-Gly-Pro-Srt может достигать 30%. Образование Boc-Gly-Pro-14-Ac-Dox и (Boc-Gly-Pro)₂-Srt подтверждено масс-спектрометрическим анализом. При хроматографическом анализе на аналитической колонке время удерживания Boc-Gly-Pro-14-Ac-Dox составило 9,05 мин, (Boc-Gly-Pro)₂-Srt 10,47 мин, т.е. время удерживания этих продуктов отличается от времени удерживания Boc-Gly-Pro-Dox и Boc-Gly-Pro-Srt почти на полминуты и две минуты соответственно.

При проведении реакций в оптимальном режиме (табл. 1) выходы Boc-Gly-Pro-Dox, Boc-Gly-Pro-DOPA и Boc-Gly-Pro-Srt достигали 60–70%. Это

позволило получить достаточное количество препаратов для проведения их биотестирования как потенциальных источников доксорубина, дофамина и серотонина.

Для получения дейтерированных аналогов перечисленных выше соединений необходимо синтезировать предшественники, в которых пролин заменён на дегидропролин (ΔPro). Гидрирование последних позволило ввести дейтерий в Boc-Gly-Pro-Dox, Boc-Gly-Pro-DOPA и Boc-Gly-Pro-Srt.

Синтез соответствующих производных с ΔPro возможен с использованием следующей схемы. Растворы ΔPro в воде, в дейтериевой воде и диметилформамиде (DMF) гидрировали газообразным дейтерием. Гидрирование ΔPro проводили и без раство-

рителя при 140 °С. В результате в первом случае пролин содержал 1,73; во втором 1,85; в третьем 1,73; в четвёртом 1,76 атома дейтерия (табл. 2).

Как видно из полученных данных (табл. 2), лучшие результаты получены при использовании воды и дейтериевой воды. Гидрирование в DMF нельзя использовать для получения препаративных количеств меченого пролина, так как растворимость его в этом растворителе неудовлетворительна. Образование значительных количеств изотопомеров, содержащих более двух атомов дейтерия, при гидрировании ΔPro без растворителя при нагревании, по-видимому, связано с включением дейтерия и за счёт изотопного обмена в этих условиях. На это указывает и тот факт, что образуется много Pro, содержащего изотопомеры с меньшим, чем два атома дейтерия на молекулу аминокислоты. Очевидно, часть двойных связей восстанавливается за счёт активированных в результате изотопного обмена протонов. По перечисленным выше причинам в случае необходимости получения препаративных количеств меченого изотопом водорода пролина лучше использовать его водный раствор, так как при этом, как было показано выше, изотопное разбавление минимально, а метод введения метки намного проще и не зависит от многих факторов, которые необходимо учитывать при проведении твердофазного гидрирования.

Для синтеза Вос-Gly-[²H]Pro сначала при перемешивании эквимолекулярных количеств Вос-Gly, N-оксисукцинимиды и ДЦГК (раствор в хлороформе) в течение ночи получали Вос-GlyOSu. Рас-

творитель упаривали. Осадок экстрагировали этилацетатом и центрифугировали. Конденсацию Вос-GlyOSu (без дополнительной очистки) с [²H]Pro проводили по методике [4]. Для этого 40 мг (0,26 ммоль) солянокислого [²H]Pro в 0,2 мл воды в присутствии Et₃N (0,1 мл) обрабатывали 1 мл спиртового раствора Вос-GlyOSu (мольное соотношение 1 : 2). Реакцию вели при перемешивании 12–17 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь обрабатывали по методу [6]. Дипептид Вос-Gly-[²H]Pro конденсировали с Dox, DOPA, серотонином, как описано в табл. 1. Выходы достигали значений около 30–40%. По-видимому, это связано с необходимостью предварительного получения N-оксисукцинимидного эфира глицина и проведения конденсации в присутствии воды.

По аналогичной методике проводили синтез Вос-Gly-ΔPro. Гидрирование Вос-Gly-ΔPro проводили в этилацетате с использованием 5% PdO/BaSO₄ в атмосфере дейтерия (давление 400 гПа). Возможность проводить гидрирование в апротонном растворителе позволило ввести в пептид в среднем 1,91 атома дейтерия. Содержание изотопомеров приведено в табл. 2. Кроме того, введение изотопной метки на более поздней стадии экономит её суммарные потери при получении изотопно-модифицированных соединений. ВЭЖХ Вос-Gly-[²H]Pro и Вос-Gly-ΔPro проводили на колонке ProntoSIL-120-5-C18 AQ DB-2003 (размер 2,0 × 75 мм, диаметр частиц 5 мкм), в системе А 0,1% CH₃COOH, В — ацетонитрил, градиент В от 0 до 100% за 12,5 мин, скорость подачи элюента 0,2 мл/мин. Время удерживания 5,76 мин.

Таким образом, получены и идентифицированы Вос-Gly-Pro-Dox, Вос-Gly-Pro-DOPA и Вос-Gly-Pro-Srt и их дейтерированные аналоги.

При наличии большого количества соединений определённой проблемой является их всестороннее биотестирование. Эта работа занимает много времени и сложна в исполнении, например, когда необходимо получить данные об эффективности преодоления этими соединениями гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Время требуется для подготовки крыс, введения препарата, выделения биологического материала, анализа полученных проб и т.д. Работу можно упростить, используя подходы, разработанные недавно [7, 8]. Эти подходы позволяют получить предварительное представление о содержании тестируемого соединения в мозгу (AUC_{мозг}), если известно содержание этого соединения в крови (AUC_{кровь}) (табл. 3).

Как видно из приведённых данных, на данный показатель оказывают влияние не только фраг-

Таблица 2. Распределение изотопомеров в пролине при разных условиях введения дейтерия (давление газообразного дейтерия 400 гПа)

Число атомов ² H	Содержание изотопомеров в гидрированном ΔPro, %				
	H ₂ O*	² H ₂ O*	DMF**	140 °С***	EtAc****
0	13,2	7,9	5,4	29,8	3,5
1	17,2	14,9	24,5	18,9	20,9
2	69,6	64,2	63,6	23,4	60,2
3	4,0	10,6	4,8	12,4	13,5
4	1,1	2,5	1,7	8,1	2,2
5	—	—	—	4,4	—
6	—	—	—	2,2	—
7	—	—	—	0,8	—

* 80 мг ΔPro; 0,4 мл H₂O или ²H₂O, 20 мг 5% PdO/BaSO₄ 2 ч; ** 2 мг ΔPro; 0,4 мл DMF, 4 мг 5% PdO/BaSO₄ 2 ч; *** раствором 11,7 мг ΔPro в 40 мкл воды пропитали 117 мг 5% PdO/BaSO₄ и лиофилизировали, реакцию вели 15 мин при 140 °С; **** 5 мг Вос-Gly-ΔPro; 0,4 мл этилацетата; 11 мг 5% PdO/BaSO₄ 2 ч.

Таблица 3. Расчётные данные по распределению производных Dox, DOPA, серотонина между кровью и тканями мозга

Соединение	AUC _{мозг} /AUC _{кровь}
Вос-Gly-Pro-DOPA	0,085
Вос-Gly-Pro-Dox	0,019
Вос-Gly-Pro-Srt	0,079
Z-Gly-Pro-DOPA	0,059
Z-Gly-Pro-Dox	0,013
Z-Gly-Pro-Srt	0,054

менты, определяющие биологическую активность соединения, но и группы, которые связаны со свободным амином аминокислоты. Вос-защита, например, имеет некоторое преимущество перед Z-защитой для одного и того же соединения по способности преодолевать ГЭБ. Среди фрагментов, определяющих биологическую активность соединения, лучший результат показывает DOPA, затем идёт Srt, а вещества с Dox уступают в этом показателе в 4–5 раз.

Источник финансирования. Работу проводили при частичной поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Инновационные разработки в биомедицине”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семенова А.И. // *Практ. онкология*. 2009. Т. 10. № 3. С. 168–176.
2. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. // *Pharmacol. Rev.* 2004. V. 56. № 2. P. 185–229.
3. Octavia Y., Tocchetti C.G., Gabrielson K.L., Janssens S., Crijns H.J., Moens A.L. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2012. V. 52. № 6. P. 1213–1225.
4. Huang S., Fang R., Xu J., Qiu S., Zhang H., Du J., Cai S. // *J. Drug Targeting*. 2011. V. 19. № 7. P. 487–496.
5. Гринштейн Дж., Виниц М. *Химия аминокислот и пептидов*. М.: Мир. 1965. 826 с.
6. Гершкович А.А., Кибирев В.К. *Химический синтез пептидов*. Киев: Наук. думка, 1992. 360 с.
7. Радченко Е.В., Карпов П.В., Соснин С.Б., Дябина А.С., Соснина Е.А., Палюлин В.А., Зефирова Н.С. XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Екатеринбург, 26–30 сентября 2016 г. С. 432.
8. Дябина А.С., Радченко Е.В., Палюлин В.А., Зефирова Н.С. // *ДАН*. 2016. Т. 470. № 6. С. 720–723.

PEPTIDE DERIVATIVES OF SOME PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

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

*Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation*

Received December 5, 2018

The synthesis of Boc-Gly-Pro-Dox, Boc-Gly-Pro-DOPA, Boc-Gly-Pro-Srt and their deuterated analogs was carried out. It was shown that these condensations proceed with side reactions, which could be minimized by optimizing the conditions for the synthesis. The most universal approach to the synthesis of Boc-Gly-Pro-Dox, Boc-Gly-Pro-DOPA, Boc-Gly-Pro-Srt and their deuterated analogs is condensation of Boc-Gly-Pro or Boc-Gly-[²H]Pro with amino groups of dopamine, serotonin and doxorubicin. It was found that for the introduction of hydrogen isotopes in ΔPro, it is advisable to hydrogenate its aqueous solution, followed by condensation of the reduced proline with Boc-GlyOSu. Mass spectrometry was used to determine the content of isotopomers in deuterated products.

Keywords: synthesis, dopamine, serotonin, doxorubicin derivatives, deuterium, peptides.