ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. ХИМИЯ, НАУКИ О МАТЕРИАЛАХ, 2025, том 522, с. 19–28

ХИМИЯ

УДК 546.100.02.3:547.15/17

СИНТЕЗ И ОЦЕНКА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ BOC-TRP-PRO-PRO-TRP И TRP-PRO-PRO-TRP, ПЕПТИДНЫХ АНАЛОГОВ ПАМ-43, АЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО МОДУЛЯТОРА AMPA-РЕЦЕПТОРОВ

© 2025 г. В. П. Шевченко[1], Т. В. Вьюнова[1,2], К. В. Шевченко[1], Л. А. Андреева[1], И. Ю. Нагаев[1,*], академик РАН Н. Ф. Мясоедов[1]

Поступило 24.02.2025 г.
После доработки 16.04.2025 г.
Принято к публикации 24.04.2025 г.

Синтезированы пептиды Boc-Trp-Pro-Pro-Trp и Trp-Pro-Pro-Trp, конструктивно подобные ПАМ-43, который является позитивным аллостерическим модулятором (ПАМ) AMPA-рецепторов, нарушение функционирования которых рассматривается как симптом многих патологий. Использование пептидов, синтезированных из аминокислот природного строения, в отличие от чужеродных для организма химических соединений, как правило, имеющих низкую цитотоксичность, позволяет применять их в необходимых дозах. Показано, что наиболее удачным при получении Boc-Trp-Pro-Pro-Trp и Trp-Pro-Pro-Trp оказалось начать синтез с получения Pro-Pro, который конденсировали с Boc-Trp и Trp. Определена устойчивость синтезированных пептидов к действию пептидаз. Установлено, что основным путем деградации пептидов является разрыв C-концевой связи Pro-Trp с образованием соответствующих метаболитов, которые также деградируют вследствие расщепления пептидных связей с C-конца молекулы. Дальнейшие исследования этих пептидов сделают возможным рассмотрение их как возможных кандидатов нового направления в поиске эффективных пептидных аналогов ПАМ с целью создания в будущем лекарственных средств на их основе.

Ключевые слова: синтез, пептидный аналог ПАМ-43

DOI: 10.31857/S2686953525030031

ВВЕДЕНИЕ

Глутаматная рецепторная система принадлежит к одной из древнейших нейрональных систем возбуждения, а синапсы в центральной нервной системе (**ЦНС**) большинства млекопитающих используют L-глутамат в качестве основного возбуждающего нейромедиатора [1]. Разнообразие типов глутаматных рецепторов очень велико, классификация определяет два основных типа – ионотропные и метаботропные. Ионотропные глутаматные рецепторы также можно подразделить на три подкласса (на основе их молекулярных и фармакологических различий) – α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота (**AMPA**), *N*-метил-*D*-аспарагиновая кислота (**NMDA**) и каинатные рецепторы [2]. В последнее время исследователи и клиницисты проявляют большой интерес к поиску и применению позитивных аллостерических модуляторов (**ПАМ**) AMPA-рецепторов, поскольку последние обеспечивают бóльшую часть возбуждающей нейротрансмиссии в ЦНС млекопитающих, а также участвуют в формировании синаптической пластичности и архитектуры нейронных сетей головного мозга [3, 4]. AMPA-рецепторы рассматривают сегодня как перспективную мишень при разработке терапевтических методов лечения очень большого числа неврологических расстройств, включая когнитивный дефицит, депрессию, болезнь Паркинсона, аутизм и другие [5–8]. Позитивная аллостерическая модуляция AMPA-рецепторов – одна из перспективных стратегий для избирательного усиления сниженной глутаматергической синаптической передачи, повышения уровня экспрессии нейротрофического (нейротропного) фактора мозга (**BDNF**) (как кальцийзависимыми, так и независимыми путями) и последующего достижения желаемого терапевтического эффекта. Известно

[1]*Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт" (НИЦ "Курчатовский институт"), 123182 Москва, Россия*
[2]*Центр Life Improvement by Future Technologies "LIFT", 121205 Москва, Россия*
**E-mail: nagaev.img@yandex.ru*

о нескольких классах позитивных аллостерических модуляторов AMPA-рецепторов, например, пирролидоны (пирацетам, анирацетам), бензотиазиды (циклотиазид), бензилпиперидины и биарилпропилсульфонамиды [9].

Другим направлением при создании новых классов лекарственных средств для лечения или существенной коррекции целого ряда серьезных нейродегенеративных и психоневрологических заболеваний является использование пептидов. Оказалось, молекулы пептидов способны сильно влиять на функциональную активность рецепторов, при этом они характеризуются большей биосовместимостью и меньшим числом побочных эффектов. Так, например, было показано, что пептиды из семейства тахикининов (нейрокинины A и B, вещество P), которые в норме широко распространены в головном мозге и периферической нервной системе млекопитающих, влияют на токи AMPA-рецепторов нейронов мозжечка [10]. В свежеизолированных нейронах спинного мозга молодых крыс было продемонстрировано депрессивное действие динорфина на внутренние токи, индуцируемые AMPA и каиновой кислотой. Причем токи, индуцированные AMPA, модулировались динорфином не только во время совместного введения, но и после удаления пептида [11].

Еще одним примером таких пептидов является циклопролилглицин, который увеличивает содержание мозгового нейротрофического фактора в культуре нейрональных клеток и является эндогенным положительным модулятором AMPA-рецепторов [12–15]. Предполагается, что накопление BDNF после активации AMPA-рецепторов циклопролилглицином вызывает положительную динамику при лечении эпилепсии, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, рассеянного склероза, возрастных нарушений когнитивных функций и памяти, аутизма, депрессии, наркозависимости и др. Синтезированные пептиды перспективны для разработки средств лечения острых нарушений мозгового кровообращения, нейродегенеративных болезней, депрессий, сахарного диабета, онкологических заболеваний [16–19].

Недавно было синтезировано новое соединение 3,7-бис(2,3-дигидро-1-бензофуран-5-илкарбонил)-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]-нонан-9-он (**ПАМ-43**) [20]. Проведенные тесты свидетельствуют, что ПАМ-43 является классическим позитивным модулятором AMPA-рецепторов. Причем он является одним из наиболее активных из описанных в литературе на сегодняшний день соединений и по своему действию на токи AMPA-рецепторов, и по своему когнитивно-стимулирующему эффекту в поведенческих экспериментах [21, 22].

Неудивительно, что и в этом случае это чисто химическое соединение в перспективе было бы рационально заменить пептидом. Пептид, который состоит из природных аминокислот, как правило, менее токсичен, менее токсичны и продукты его деградации, что предполагает более широкое его использование.

Несмотря на большой потенциал пептидов в качестве основы для лекарственных препаратов, существуют мощные ограничительные факторы их применения. Прежде всего, это низкая устойчивость пептидных молекул к действию эндогенных протеолитических ферментов. Есть способы увеличить стабильность пептида за счет введения в структуру молекулы аминокислотных последовательностей, обогащенных пролином, например, серинoподобную короткую, богатую пролином последовательность коллагена [23]. Подобная стабилизация увеличивает время жизни модифицированной молекулы, что позволяет добиться реализации ее терапевтического эффекта [10, 11, 24].

Пептид – аналог ПАМ-43, таким образом, должен соответствовать двум критериям. Отбор должен осуществляться по одному из основных параметров, который ответственен за биологическую активность ПАМ-43, и обладать необходимой протеолитической устойчивостью.

Предварительные исследования показали, что из ряда возможных вариантов наиболее коррелирующими со строением ПАМ-43 оказались пептидные структуры Trp-Pro-Pro-Trp и Boc-Trp-Pro-Pro-Trp (где Boc – *трет*-бутилоксикарбонильная группа, Trp – триптофан, Pro – пролин) (рис. 1) [25]. Преимущество этих пептидов основывалось и на предварительных оценках способности этих пептидов специфически связываться с мембранами мозга крыс [26]. Выбранные объекты были охарактеризованы как соединения, которые могут конкурировать с меченными тритием ПАМ-43 и Glu при специфическом связывании.

Целью работы является синтез Trp-Pro-Pro-Trp и Boc-Trp-Pro-Pro-Trp и оценка их устойчивости к действию различных протеолитических ферментов и ферментативных систем (плазмы крови и назальной слизи крысы).

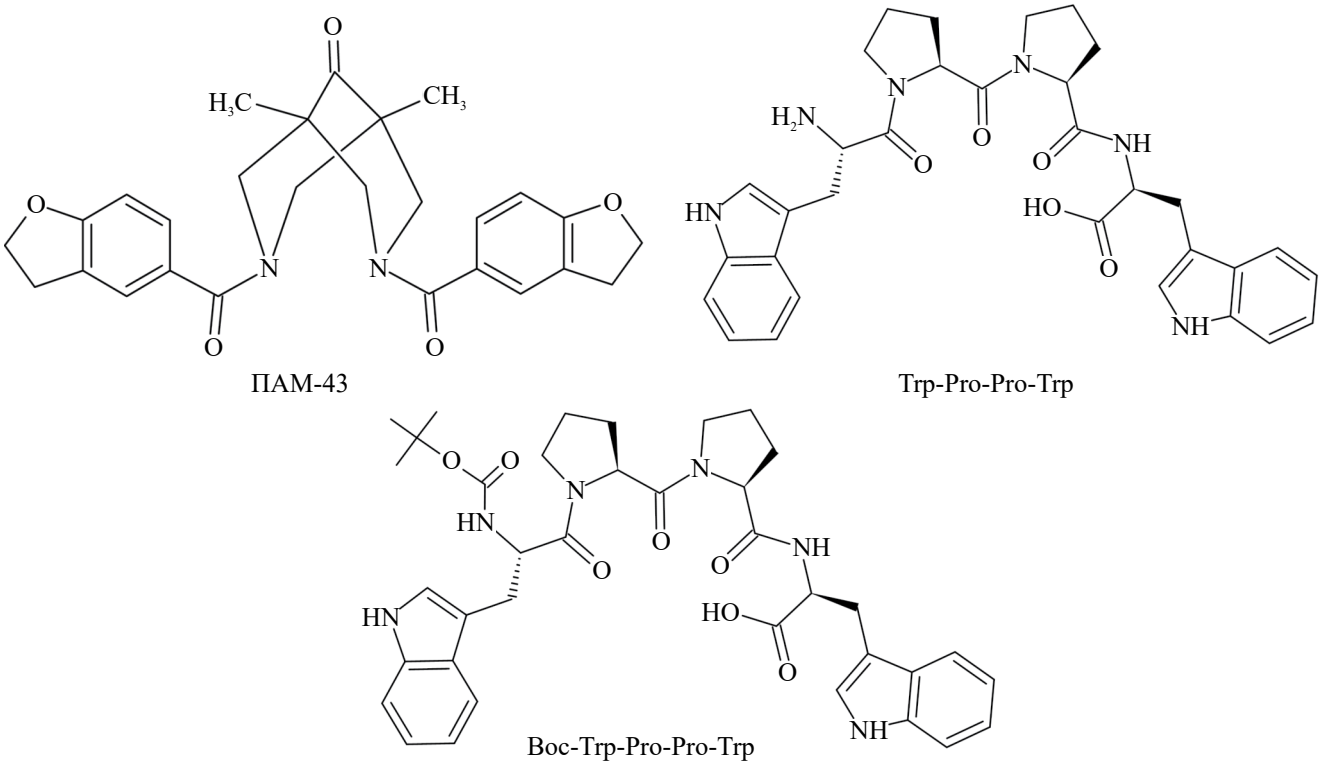

Рис. 1. Структуры ПАМ-43, Trp-Pro-Pro-Trp и Boc-Trp-Pro-Pro-Trp.

ЭКСПЕРИМЕНТ

Катализаторы, реагенты и растворители – коммерческие препараты. Образцы назальной слизи и плазмы крови крыс предоставлены сотрудниками биологического факультета МГУ. Исходные соединения и продукты протеолиза охарактеризованы с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Анализ проводили на хроматографе Милихром А-02, колонка ProntoSIL-120-5-C18aq (Bischoff Chromatography, Германия; 2 × 75 мм, размер частиц 5 мкм): температура колонки 35°C; длина волны 210 нм; элюент А – 0.1%-я уксусная кислота, Б – метанол; скорость подачи элюента 200 мкл мин$^{-1}$.

Масс-спектрометрические данные регистрировали на приборе LCQ Advantage MAX (Термоэлектрон, США), с ионизацией электрораспылением, прямым вводом раствора образца с концентрацией 10 мкг мл$^{-1}$ в 0.1%-й уксусной кислоте и дальнейшей фрагментацией молекулярного пика в анализаторе методом ионных соударений при 35 эВ.

Синтез Pro-Pro. Раствор 215 мг Boc-Pro (1 ммоль) в 5 мл диоксана смешивали с 127 мг *N*-оксисукцинимида (**Su**) (1.1 ммоль), инициировали реакцию 230 мг *N*,*N'*-дициклогексилкарбодиимидом (**ДЦГК**) (1.1 ммоль) и оставляли при перемешивании на ночь при комнатной температуре. Мочевину отфильтровывали, промывали 2 мл диоксана, растворитель упаривали. Осадок растворяли в 8 мл метанола и прибавляли 182 мг HCl·Pro (1.2 ммоль), растворенного в 1.6 мл воды, и 0.4 мл триэтиламина. Реакцию вели при комнатной температуре в течение ночи. Полярные вещества отделяли от Boc-Pro-Pro твердофазной экстракцией. Для этого раствор упаривали и избыток пролина удаляли на патроне Sep-Pack C18, который после нанесения реакционной смеси промывали 30%-м водным метанолом. Затем фракцию, содержащую искомое соединение, смывали метанолом. Очистку проводили на колонке Reprosil pur C18aq (Dr. Maisch, Германия; 20 × 150 мм, размер частиц 10 мкм): температура колонки 25°C; длина волны 226 нм; элюент А – метанол–вода–уксусная кислота (50 : 50 : 0.1), элюент Б – метанол, градиент Б от 0 до 100% за 15 мин; скорость подачи элюента 20 мл мин$^{-1}$. После очистки Boc-Pro-Pro выделен с чистотой 95–97%. Boc-защиту снимали обработкой Boc-Pro-Pro 2.4 мл смеси хлороформ–трифторуксусная кислота (5 : 1) в течение 90 мин. Выход Pro-Pro составил 79–82%. Для дальнейшего синтеза Pro-Pro использовали без дополнительной очистки.

Синтез Boc-Trp-Pro-Pro. К раствору 152 мг Boc-Trp (0.5 ммоль) и 57.5 мг Su (0.5 ммоль) в смеси 2 мл сухого хлороформа с 0.2 мл диметилформамида добавляли 125 мг ДЦГК (0.6 ммоль) и перемешивали при 15°C в течение 2 ч. Затем оставляли при перемешивании на ночь при комнатной температуре. Мочевину отфильтровывали, промывали 2 мл хлороформа, растворитель упаривали. Осадок растворяли в 2 мл этанола. В смеси 4 мл этанола и 0.25 мл триэтиламина (**Et_3N**) растворяли 0.7 ммоль Pro-Pro. Затем раствор Boc-Trp-Su смешивали с раствором Pro-Pro. Реакцию вели при комнатной температуре в течение ночи. Соединения очищали от Pro-Pro, как описано выше. Выход Boc-Trp-Pro-Pro – 81–86%.

Синтез Boc-Trp-Pro-Pro-Trp. К раствору 250 мг Boc-Trp-Pro-Pro (0.5 ммоль) и 60 мг Su (0.53 ммоль) в 4 мл сухого хлороформа добавляли 115 мг ДЦГК (0.56 ммоль) и перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Мочевину отфильтровывали, промывали 2 мл хлороформа, растворитель упаривали. Осадок (Boc-Trp-Pro-Pro-Su) растворяли в 5 мл этанола. В 9 мл смеси этанол–вода (5 : 1) и 0.2 мл Et_3N растворяли 144 мг Trp (0.71 ммоль). Затем растворы смешивали. Реакцию вели при комнатной температуре в течение ночи. Соединения очищали от Trp, как описано выше. Препаративную очистку проводили на колонке Reprosil pur C18aq (Dr. Maisch, Германия, 20 × 150 мм, размер частиц 10 мкм): температура колонки 25°C; длина волны 226 нм; элюент А – метанол–вода–уксусная кислота (50 : 50 : 0.1), элюент Б – метанол, градиент Б от 0 до 100% за 15 мин; скорость подачи элюента 20 мл мин$^{-1}$. Время удерживания Boc-Trp-Pro-Pro-Trp – 3.81 мин. Выход Boc-Trp-Pro-Pro-Trp – 60%, чистота 96–97%.

Синтез Trp-Pro-Pro-Trp. Для снятия Boc-защиты 15 мг Boc-Trp-Pro-Pro-Trp обрабатывали смесью 0.1 мл дихлорметана и 0.1 мл трифторуксусной кислоты в присутствии 0.01 мл анизола в течение 40 мин. После удаления растворителей остаток смешивали с 0.5 мл воды, замораживали жидким азотом и лиофилизировали в течение 15 ч. Выход Trp-Pro-Pro-Trp составил 94%.

*Оценка устойчивости тетрапептидов в присутствии лейцинаминопептидазы, карбоксипептидаз Y и B и пролиновой эндопептидазы (**PEP**).* При использовании лейцинаминопептидазы (К.Ф. 3.4.11.2, Sigma-Aldrich, США, Тип VI, микросомальная из почки свиньи, 9.2 ед.акт. мг$^{-1}$), карбоксипептидазы B (К.Ф. 3.4.17.2, Sigma-Aldrich, из поджелудочной железы свиньи, 70 ед.акт. мг$^{-1}$), карбоксипептидазы Y (К.Ф. 3.4.16.1, Sigma-Aldrich, из хлебопекарных дрожжей, 17 ед.акт. мг$^{-1}$) и пролиновой эндопептидазы (К.Ф. 3.4.21.26, Sigma-Aldrich, из флавобактерий, 55 ед.акт. мг$^{-1}$) условия ферментативного гидролиза отрабатывали, исследуя деградацию пептидов при разных соотношениях субстрата и фермента. Для дальнейшей работы для лейцинаминопептидазы использовали соотношение 1 мкмоль ед.акт.$^{-1}$, для карбоксипептидазы Y – 0.091 мкмоль ед.акт.$^{-1}$, для карбоксипептидазы B – 0.022 мкмоль ед.акт. $^{-1}$, для пролиновой эндопептидазы – 0.1 мкмоль ед.акт. $^{-1}$

Ферментативный гидролиз пролин-триптофановых пептидов проводили по следующей методике. К раствору 0.5 мкмоль пептида в 260 мкл фосфатно-солевого буфера (27.4 мМ NaCl, 0.4 мМ KCl, 2 мМ Na_3PO_4, pH 7.4) добавляли 0.5 ед. акт. лейцинаминопептидазы, или 5.44 ед. акт. карбоксипептидазы Y, или 22.4 ед. акт. карбоксипептидазы B, или 4.95 ед. акт. пролиновой эндопептидазы в этом же буфере. Инкубационную смесь перемешивали и термостатировали при 30°C, отбирая аликвоты по 20 мкл через определенные промежутки времени. Остановка ферментативного гидролиза осуществлялась добавлением к отбираемым пробам равного объема метанола.

Анализ реакционных смесей проводили на хроматографе Милихром-А02 с использованием колонки ProntoSIL-120-5-C18aq (Bischoff Chromatography, Германия, 2 × 75 мм, размер частиц 5 мкм), в градиенте метанола в буфере (0.2 M $LiClO_4$ + 0.005 M $HClO_4$, pH 2.24): температура колонки 35°C; длина волны 210 нм; скорость подачи элюента – 0.2 мл мин$^{-1}$. Анализ Boc-Trp-Pro-Pro-Trp проводили, увеличивая концентрацию метанола с 40 до 100% в течение 12 мин. Анализ Trp-Pro-Pro-Trp проводили, увеличивая концентрацию метанола с 20 до 100% в течение 12 мин. Время удерживания Boc-Trp-Pro-Pro-Trp составило 8.42 мин, а Trp-Pro-Pro-Trp – 7.85 мин.

Оценка устойчивости тетрапептидов в присутствии назальной слизи и плазмы крови. Концентрацию белка в образцах назальной слизи и плазмы крови определяли по методу Лоури [27].

Гидролиз производных пептидов. К раствору 0.5 мкмоль пептида в 200 мкл фосфатно-солевого буфера (27.4 мМ NaCl, 0.4 мМ KCl, 2 мМ Na_3PO_4, pH 7.4) добавляли 404 мкл назальной слизи (5 мг белка/мл) или 256 мкл плазмы крови (31 мг белка/мл). Инкубационную смесь перемешивали и термостатировали при 30°C, отбирая аликвоты по 35 мкл через определенные

промежутки времени. Остановка ферментативного гидролиза осуществлялась добавлением к отбираемым пробам равного объема метанола. Полученные пробы наносили на патрон, упакованный обращенной фазой Lichroprep RP-18, уравновешенной в смеси метанол–вода (1 : 1), с последующим элюированием метанолом, содержащим 0.1% трифторуксусной кислоты. Собранные метанольные растворы упаривали и растворяли в 150 мкл смеси метанол–вода (1 : 4). Анализ смеси проводили, как описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Порядок сборки Boc-Trp-Pro с Pro-Trp, Boc-Trp с Pro-Pro-Trp из аминокислот оказался существенен для синтеза этих соединений. Лучшие результаты получены при первоначальном синтезе Pro-Pro, который конденсировали с Boc-Trp, затем с Trp (табл. 1). По-видимому, образование на первом этапе синтеза дипептида пролил–пролин определяет конечный успех в получении Boc-Trp-Pro-Pro-Trp. Если же связь Pro–Pro пытались образовать после конденсации монопролиновых предшественников, это негативно сказывалось на конечном выходе пептида. Trp-Pro-Pro-Trp получали из Boc-Trp-Pro-Pro-Trp удалением Boc-защиты.

Устойчивость синтезированных пептидов к действию различных индивидуальных протеолитических ферментов определяли в присутствии лейцинаминопептидазы, PEP и карбоксипептидаз Y и B. Доверительный интервал посчитан для серии из $n = 3$ повторов, исходя из доверительной вероятности 0.95.

В присутствии лейцинаминопептидазы в реакционной смеси присутствуют Boc-Trp-Pro-Pro-Trp, Boc-Trp-Pro-Pro, Trp и Boc-Trp. Интересно отметить, что устойчивость N-концевой аминокислоты с Boc-защитой накладывает определенное своеобразие на процесс деградации Boc-Trp-Pro-Pro-Trp (табл. 2).

Как видно из приведенных в табл. 2 данных, связь Boc-Trp–Pro меньше подвержена протеолизу, чем связь Pro–Trp. Поэтому Boc-Trp присутствует в продуктах реакции в минимальных количествах, в то время как Boc-Trp-Pro-Pro и триптофан образуются синхронно и являются основными продуктами деградации исходного пептида.

При использовании карбоксипептидаз B и Y процесс деградации идет с C-концевой аминокислоты. В результате протеолиза образуются Boc-Trp-Pro-Pro и триптофан (табл. 3 и 4).

Таблица 1. Масс-спектрометрические характеристики полученных соединений

Соединение	$[M + H]^+$	$[M + H + Na]^+$	$[M + H + 2Na]^+$	$[2M + Na]^+$	$[M - H]^-$	$[2M - H]^-$
Boc-Pro-Pro	312.9	335.1	–	–	311.3	–
Pro-Pro	213.1	–	–	–	211.3	–
Boc-Trp-Pro-Pro	499.0	521.1	–	1019.2	497.4	995.3
Boc-Trp-Pro-Pro-Trp	–	707.2	729.2	1391.2	683.4	1367.4
Trp-Pro-Pro-Trp	585.3	607.3	–	–	583.5	–

Таблица 2. Устойчивость Boc-Trp-Pro-Pro-Trp в присутствии лейцинаминопептидазы

Время, мин	Пептид (содержание в %, $x \pm \Delta x$, количество повторов 3)			
	Boc-Trp-Pro-Pro-Trp	Trp	Boc-Trp-Pro-Pro	Boc-Trp
2	97.8 ± 1.5	2.1 ± 0.03	1.3 ± 0.04	0.0
10	91.9 ± 1.7	7.2 ± 0.1	6.3 ± 0.1	0.0
30	86.2 ± 1.8	13.5 ± 0.3	11.6 ± 0.2	0.0
60	80.6 ± 2.3	18.7 ± 0.5	17.6 ± 0.5	0.7 ± 0.02
120	68.4 ± 2.3	30.2 ± 1.0	27.5 ± 0.9	0.7 ± 0.02
180	60.0 ± 2.5	38.6 ± 1.6	36.9 ± 1.6	1.4 ± 0.06
240	55.6 ± 2.5	43.0 ± 1.9	41.6 ± 1.9	1.4 ± 0.06
4320	1.2 ± 0.02	96.7 ± 1.8	90.3 ± 2.0	4.9 ± 0.1

Таблица 3. Устойчивость Boc-Trp-Pro-Pro-Trp в присутствии карбоксипептидазы B

Время, мин	Пептид (содержание в %, $x \pm \Delta x$, количество повторов 3)			
	Boc-Trp-Pro-Pro-Trp	Trp	Boc-Trp-Pro-Pro	Boc-Trp
2	97.8 ± 1.2	2.1 ± 0.06	0.8 ± 0.05	0.0
10	93.8 ± 1.2	5.2 ± 0.1	4.2 ± 0.2	0.7 ± 0.03
30	79.6 ± 1.5	17.4 ± 0.3	15.4 ± 0.6	0.7 ± 0.03
60	70.7 ± 1.1	28.8 ± 1.0	26.5 ± 1.4	0.7 ± 0.02
120	55.2 ± 1.3	44.0 ± 1.7	42.1 ± 1.5	1.4 ± 0.04
180	38.6 ± 1.3	61.1 ± 2.1	58.8 ± 1.7	1.4 ± 0.06
240	33.3 ± 1.0	63.6 ± 1.7	60.0 ± 1.9	2.1 ± 0.08
4320	0.3 ± 0.02	99.0 ± 0.9	92.5 ± 1.1	6.2 ± 0.2

Таблица 4. Устойчивость Boc-Trp-Pro-Pro-Trp в присутствии карбоксипептидазы Y

Время, мин	Пептид (содержание в %, $x \pm \Delta x$, количество повторов 3)			
	Boc-Trp-Pro-Pro-Trp	Trp	Boc-Trp-Pro-Pro	Boc-Trp
2	80.4 ± 2.8	19.5 ± 0.8	10.7 ± 0.4	8.7 ± 0.3
10	71.8 ± 1.8	28.1 ± 0.7	15.3 ± 0.5	12.5 ± 0.5
30	36.4 ± 1.4	63.6 ± 2.2	36.7 ± 1.2	26.6 ± 0.9
60	11.5 ± 0.5	88.6 ± 1.6	57.6 ± 1.9	29.8 ± 1.0
120	1.02 ± 0.05	99.0 ± 0.8	66.3 ± 0.9	30.9 ± 1.1
180	0.76 ± 0.04	98.8 ± 1.0	67.5 ± 1.3	31.0 ± 1.6
240	0.74 ± 0.02	98.4 ± 1.1	63.5 ± 1.5	33.8 ± 1.5
4320	0.25 ± 0.02	98.8 ± 1.0	57.5 ± 1.3	41.2 ± 1.2

При этом установлено, что устойчивость Boc-Trp-Pro-Pro-Trp к действию карбоксипептидазы Y ниже, чем к карбоксипептидазе B. Протеолиз C-концевого триптофана оказался эффективным. В результате триптофан образуется при гидролизе C-концевого триптофана, но, в отличие от других протеаз, происходит протеолиз и Boc-Trp-Pro-Pro. В результате образуется заметное количество Boc-Trp (табл. 4).

В продуктах ферментативного гидролиза Boc-Trp-Pro-Pro-Trp не обнаружены Boc-Trp-Pro, Pro-Pro-Trp, Pro-Trp и Pro-Pro. Это может свидетельствовать о том, что связь пролина с пролином в этом пептиде очень прочная. В первую очередь отщепляется C-концевой триптофан. Образующийся трипептид является плохим субстратом для используемых ферментов. Поэтому отщепление Boc-Trp менее вероятно и происходит менее эффективно и за более длительный период времени.

Устойчивость связи Pro—Pro в Boc-Trp-Pro-Pro-Trp можно оценить при использовании PEP, которая эффективна при гидролизе пролиновых связей (табл. 5). Уже через несколько минут исходный пептид деградирует на 70–80%.

Интересно отметить, что расщепление по связи Boc-Trp–Pro не происходит, т.е. Boc-защита и в этом случае надежно прикрывает связь триптофан–пролин. Связь пролина с C-концевым триптофаном подвергается более эффективной атаке. Протеолиз Boc-Trp-Pro-Pro-Trp завершается примерно за час. За это время происходит отделение практически всего C-концевого Trp от исходного пептида. Но даже для PEP связь Pro–Pro не доступна: продукты гидролиза не обнаружены.

Кроме перечисленных индивидуальных ферментов оценили устойчивость синтезированных пептидов к действию протеолитических ферментов, присутствующих в назальной слизи и плазме крови крысы (рис. 2 и 3). Доверительный интервал посчитан для серии из 5 повторов, исходя из доверительной вероятности 0.95.

Таблица 5. Устойчивость пептида Boc-Trp-Pro-Pro-Trp в присутствии PEP

Время, мин	Пептид (содержание в %, $x \pm \Delta x$, количество повторов 3)			
	Boc-Trp-Pro-Pro-Trp	Trp	Boc-Trp-Pro-Pro	Boc-Trp
2	33.9 ± 0.7	61.3 ± 1.7	61.6 ± 1.6	0.0
10	14.5 ± 0.4	82.0 ± 2.9	81.4 ± 3.1	0.0
30	2.5 ± 0.1	93.8 ± 2.0	93.0 ± 1.7	0.0
60	0.8 ± 0.04	96.6 ± 2.3	95.8 ± 1.9	0.0
120	0.8 ± 0.1	96.6 ± 2.3	96.1 ± 2.0	0.0
180	0.6 ± 0.06	96.6 ± 2.2	96.4 ± 2.3	0.0
240	0.3 ± 0.02	97.9 ± 1.6	97.5 ± 1.3	0.0
4320	0.0	98.7 ± 1.2	97.6 ± 1.1	0.0

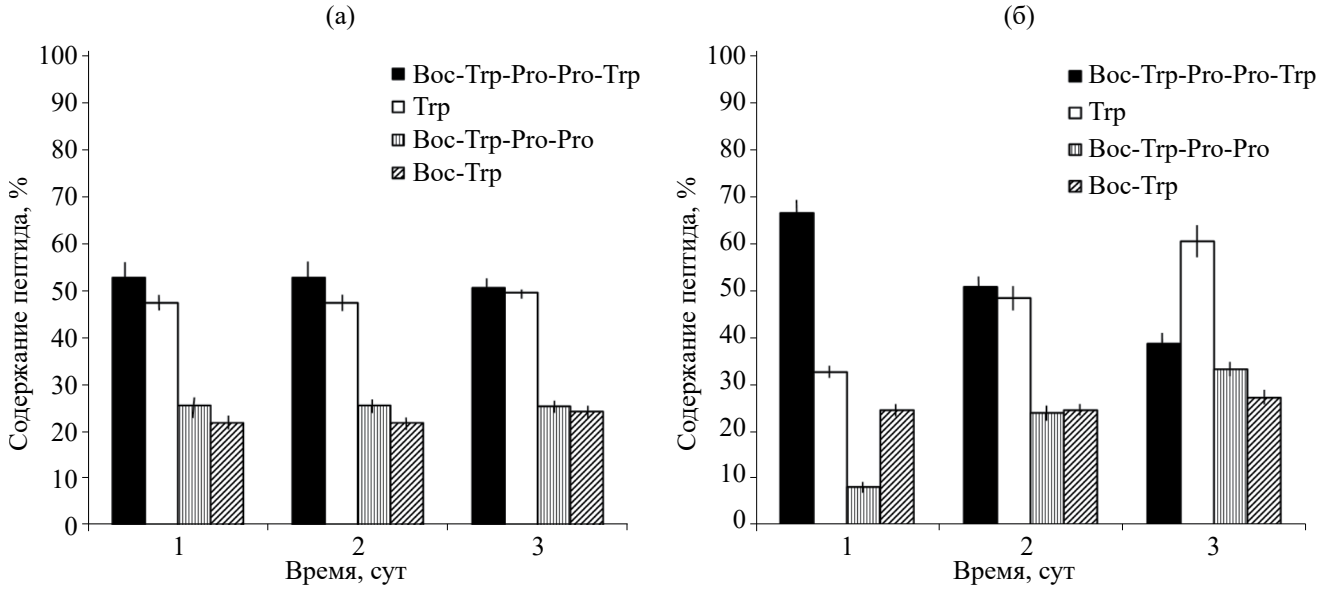

Рис. 2. Устойчивость пептида Boc-Trp-Pro-Pro-Trp в присутствии плазмы крови крыс (а) и назальной слизи (б) ($x \pm \Delta x$, $n = 5$).

Кинетика деградации Boc-Trp-Pro-Pro-Trp в присутствии назальной слизи и плазмы крови крыс приведена на рис. 2. При использовании плазмы крови крыс для протеолиза Boc-Trp-Pro-Pro-Trp при суточном отборе проб оказалось, что количественный состав Boc-Trp-Pro-Pro-Trp и его метаболитов через сутки мало меняется (рис. 2а). В случае назальной слизи ферментативная система сохраняет активность более длительное время. Через трое суток, по сравнению с суточными показателями, количество Boc-Trp-Pro-Pro-Trp снизилось примерно на 25–30%, а количество Trp выросло с 30 до 60%, возросло и количество Boc-Trp (рис. 2б).

Для оценки возможности проведения экспериментов по специфическому связыванию, как и для Boc-Trp-Pro-Pro-Trp, проверена устойчивость Trp-Pro-Pro-Trp в присутствии назальной слизи и плазмы крови крыс (рис. 3). В присутствии назальной слизи и плазмы крови крыс устойчивость Trp-Pro-Pro-Trp значительно выше, чем у многих пептидов, используемых как лекарственные средства (например, семакс). При более длительном инкубировании происходит быстрое разложение Trp-Pro-Pro-Trp, но для проведения специфического связывания это не существенно (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Разработанная схема синтеза и, как итог, высокий выход конечного продукта являются

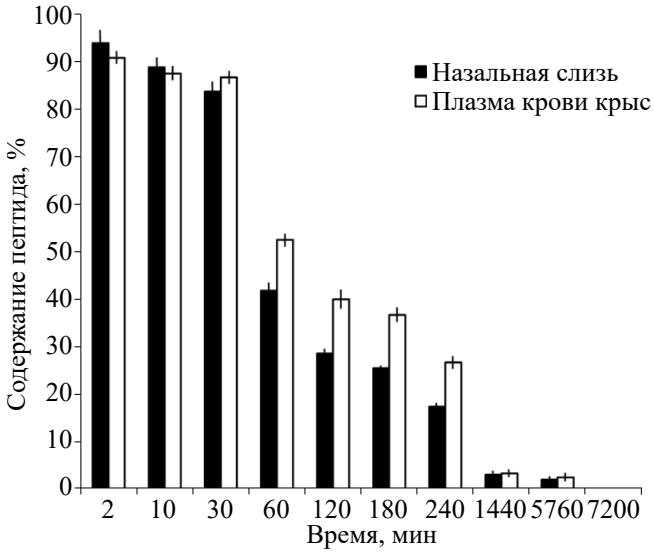

Рис. 3. Устойчивость пептида Trp-Pro-Pro-Trp в присутствии назальной слизи и плазмы крови крыс ($x \pm \Delta x$, $n = 5$).

немаловажным фактором, влияющим на применимость будущего препарата. Протестированы различные варианты синтеза пептидов. В первом варианте Trp-Pro-Pro-Trp получен конденсацией Boc-Trp-Pro с Pro-Trp с последующим удалением Boc-защиты. Во втором варианте Trp-Pro-Pro-Trp получен конденсацией Boc-Trp с Pro-Pro-Trp, который был синтезирован из Boc-Pro и Boc-Trp с последующим удалением Boc-защиты. Максимальный выход получен при первоначальном синтезе Pro-Pro, который конденсировали с Boc-Trp, а затем с Trp. Оказалось, что именно формирование на первой стадии синтеза дипептида Pro-Pro определяет конечный успех в получении тетрапептида Trp-Pro-Pro-Trp. Если же связь Pro-Pro пытались сформировать после конденсации монопролиновых предшественников, конечный выход пептида ощутимо снижался.

Как отмечалось выше, одной из основных проблем, препятствующих успешной разработке лекарственных средств на основе пептидов, является высокий уровень деградации этих молекул. Оценка устойчивости нового соединения при инкубации в различных биологических жидкостях – это необходимый этап исследований, определяющий возможность проведения последующих биологических экспериментов, определения путей введения (интраназальное или внутривенное) будущего препарата, и оценки, при каком способе введения продолжительность времени жизни пептида в организме выше. Кроме того, можно оценить скорость образования метаболитов и их состав (в различных средах организма), получить стандарты для последующей работы *in vivo*. Необходимо установить пути деградации как самого пептида, так и его метаболитов. Первым шагом в исследовании стала оценка биодеградации синтезированных пептидов под воздействием ферментов, содержащихся в назальной слизи и плазме крови.

Анализ процессов деградации пептида Boc-Trp-Pro-Pro-Trp в различных средах показал различия в динамике этого процесса (рис. 2). Так, в присутствии назальной слизи протеолиз Boc-Trp-Pro-Pro-Trp происходит более продолжительное время. Суточный рост содержания триптофана определяется десятками процентов, соответственно увеличивалось количество Boc-Trp-Pro-Pro и падало содержание исходного пептида. Концентрация Boc-Trp-Pro-Pro в плазме крови уже через сутки оставалась относительно постоянной. Таким образом, основным путем деградации пептида Boc-Trp-Pro-Pro-Trp в изученных ферментативных системах является разрыв C-концевой связи в Pro-Trp с образованием Boc-Trp-Pro-Pro с последующим гидролизом Boc-Trp-Pro-Pro и получением Boc-Trp. Кинетика деградации Boc-Trp-Pro-Pro-Trp в физиологических жидкостях показывает, что соотношение метаболитов различно, но общий набор метаболитов остается неизменным. Пептид без Boc-защиты (Trp-Pro-Pro-Trp) при тех же условиях оказался гораздо менее устойчивым к действию ферментных систем (рис. 3).

Детальный анализ стабильности различных связей в структуре пептидов был проведен с использованием различных индивидуальных ферментов. Пептид Boc-Trp-Pro-Pro-Trp инкубировали в присутствии лейцинаминопептидазы, карбоксипептидаз Y и B, а также пролинэндопептидазы. Здесь нужно отметить, что наличие Boc-защиты не только повысило устойчивость пептида, но и сделало возможным определить, C-конечный Trp или Trp с N-конца пептида образуются в инкубационной смеси.

В результате установлено, что связь Boc-Trp-Pro менее подвержена протеолизу, чем связь Pro-Trp. Инкубация Boc-Trp-Pro-Pro-Trp в присутствии лейцинаминопептидазы показала, что Boc-Trp-Pro-Pro и Trp являются основными продуктами (табл. 2). Та же закономерность наблюдается при использовании карбоксипептидазы B (табл. 3). Устойчивость Boc-Trp-Pro-Pro-Trp к действию карбоксипептидазы Y была ниже, но также происходил и протеолиз Boc-Trp-Pro-Pro. В результате образуется заметное количество Boc-Trp (табл. 4). Стабильность связи Pro–Pro в Boc-Trp-Pro-Pro-Trp можно оценить с помощью PEP, которая эффективна при гидролизе связей пролина (табл. 5).

Через несколько минут исходный пептид разрушался на 70–80%. Однако, несмотря на специфическую природу используемого фермента (PEP), гидролиз связи Boc-Trp–Pro не происходил. Другими словами, объемная *трет*-бутилоксикарбонильная группа надежно прикрывает связь триптофан-пролин. Между тем, протеолиз протеиновых связей происходит по меньшей мере на 60% быстрее, чем при использовании других ферментов, и завершается в течение часа.

Таким образом, было показано, что действие ферментов лейцинаминопептидазы и карбоксипептидаз (Y и B) наиболее эффективно в отношении C-концевой области молекулы. Метаболиты со структурами Boc-Trp-Pro, Pro-Pro-Trp, Pro-Trp и Pro-Pro не были обнаружены в продуктах ферментативного гидролиза пептида Boc-Trp-Pro-Pro-Trp. Это может свидетельствовать о том, что связь между пролинами в этом пептиде довольно прочная. C-концевой остаток триптофана отщепляется, оставляя трипептид, который не является хорошим субстратом для используемых ферментов. В результате вероятность расщепления Boc-Trp-Pro-Pro снижается и проходит менее эффективно (занимает более длительный период времени). Boc-защита надежно предотвращает разрыв связи триптофан–пролин.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе были синтезированы пептидные потенциальные аллостерические модуляторы AMPA-рецепторов глутамата – пептид с аминокислотной последовательностью Trp-Pro-Pro-Trp, а также его Boc-защищенный аналог Boc-Trp-Pro-Pro-Trp. Среди возможных вариантов синтеза наилучшим путем стало первоначальное получение Pro-Pro с последующей конденсацией его с Boc-Trp, а затем с Trp. Исследования ферментативной устойчивости пептидов позволило выявить, что основным путем их деградации в биологических средах является разрыв C-концевой связи Pro–Trp с образованием соответствующих метаболитов, которые также деградируют вследствие расщепления пептидных связей с C-конца молекулы. Более детальный анализ стабильности различных пептидных связей в структуре молекул, проведенный с использованием индивидуальных ферментов, показал, что лейцинаминопептидаза и карбоксипептидазы Y и B наиболее эффективны в отношении C-концевой области молекулы, а Boc-защита надежно предотвращает разрыв связи триптофан–пролин. Таким образом, оба пептида и по структуре, и по степени устойчивости к действию протеолитических ферментов оказались перспективны в качестве потенциально биологически активных молекул, интересных для создания на их основе терапевтических лекарственных препаратов, модулирующих функциональную активность AMPA-рецепторов глутамата.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе исследования на человеке или животных не проводились.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность сотрудникам кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ за предоставленные образцы назальной слизи и плазмы крови крыс.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Micheva K.D., Busse B., Weiler N.C., O’Rourke N., Smith S.J.* // Neuron. 2010. V. 68. № 4. P. 639–653. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.024
2. *Lodge D., Danysz W., Parsons C.G.* Ionotropic glutamate receptors as therapeutic targets. Tennesse: F.P Graham Publishing Co., 2002. 657 p.
3. *Diering G.H., Huganir R.L.* // Neuron. 2018. V. 100. № 2. P. 314–329. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.018
4. *Brown J.C., Higgins E.S., George M.S.* // Neuromodulation. 2022. V. 25. № 8. P. 1289–1298. https://doi.org/10.1016/j.neurom.2021.09.003
5. *Alt A., Nisenbaum E.S., Bleakman D., Witkin J.M.* // Biochem. Pharmacol. 2006. V. 71. № 9. P. 1273–1288. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.12.022
6. *Jensen K.L., Jensen S.B., Madsen K.L.* // Front. Pharmacol. 2022. V. 13. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.854176
7. *Stachowicz K., Sowa-Kućma M.* // Front. Pharmacol. 2022. V. 13. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.988648
8. *Danysz W.* // Curr. Opin. Investig. Drugs. 2002. V. 3. № 7. P. 1062–1066.
9. *O’Neill M.J., Bleakman D., Zimmerman D.M., Nisenbaum E.S.* // Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord. 2004. V. 3. № 3. P. 181–194. https://doi.org/10.2174/1568007043337508
10. *Pieri M., Severini C., Amadoro G., Carunchio I., Barbato C., Ciotti M.T., Zona C.* // J. Neurophysiol. 2005. V. 94. № 4. P. 2484–2490. https://doi.org/10.1152/jn.00436.2005
11. *Kolaj M., Cerne R., Randic M.* // Brain Res. 1995. V. 671. № 2. P. 227–244. https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)01333-d

12. *Гудашева Т.А., Колясникова К.Н., Антипова Т.А., Середенин С.Б.* // Докл. АН. 2016. Т. 469. № 4. С. 492–495. https://doi.org/10.7868/S0869565216220254
13. *Колясникова К.Н., Вичужанин М.В., Константинопольский М.А., Трофимов С.С., Гудашева Т.А.* // Химико-фармацевтический журнал. 2012. Т. 46. № 2. С. 31–37. https://doi.org/10.30906/0023-1134-2012-46-2-31-37
14. *Колясникова К.Н., Гудашева Т.А., Назарова Г.А., Антипов П.И., Николаев С.В., Антипова Т.А., Воронина Т.А., Середенин С.Б.* // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2012. Т. 75. № 9. С. 3–6. https://doi.org/10.30906/0869-2092-2012-75-9-3-6
15. *Поварнина П.Ю., Колясникова К.Н., Николаев С.В., Антипова Т.А., Гудашева Т.А.* // Бюлл. эксп. биол. мед. 2015. Т. 160. № 11. С. 600–603.
16. *Гудашева Т.А.* // Изв. АН. Сер. хим. 2015. № 9. С. 2012–2021.
17. *Кузнецова Е.А., Сазонова Н.М., Никитин С.В., Жмуренко Л.А., Гудашева Т.А.* // Хим.-фарм. журнал. 2013. Т. 47. № 5. С. 11–14. https://doi.org/10.30906/0023-1134-2013-47-5-11-14
18. *Островская Р.У., Озерова И.В., Гудашева Т.А., Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А., Середенин С.Б.* // Бюлл. эксп. биол. мед. 2013. Т. 156. № 9. С. 317–322.
19. *Вахитова Ю.В., Садовников С.В., Борисевич С.С., Островская Р.У., Гудашева Т.А., Середенин С.Б.* // Acta Naturae (Русскоязычная версия). 2016. Т. 8. № 1. С. 90–98.
20. *Мясоедов Н.Ф., Нагаев И.Ю., Шевченко К.В., Шевченко В.П., Григорьев В.В., Лавров М.И., Бондаренко Е.В., Калашникова Е.Е.* Меченный тритием 3,7-бис(2,3-дигидро-1-бензофуран-5-илкарбонил)-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-он. Патент РФ № 2668982. 2018.
21. *Vyunova T.V., Andreeva L.A., Shevchenko K.V., Grigoriev V.V., Palyulin V.A., Lavrov M.I., Bondarenko E.V., Kalashnikova E.E., Myasoedov N.F.* // Curr. Mol. Pharmacol. 2020. V. 13. № 3. P. 216–223. https://doi.org/10.2174/1874467213666200303140834
22. *Бачурин С.О., Григорьев В.В., Палюлин В.А, Лавров М.И., Зефиров Н.С., Гарибова Т.Л., Воронина Т.А., Розиев А.А.* *N,N'*-замещенные 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонаны, фармацевтические композиции на их основе и их применение. Патент РФ № 2613071. 2017.
23. *Kolomin T., Shadrina M., Slominsky P., Limborska S., Myasoedov N.* // Neurosci. Med. 2013. V. 4. № 4. P. 223–252. https://doi.org/10.4236/nm.2013.44035
24. *Ashmarin I.P., Samonina G.E., Lyapina L.A., Kamenskii A.A., Levitskaya N.G., Grivennikov I.A., Dolotov O.V., Andreeva L.A., Myasoedov N.F.* // Pathophysiology. 2005. V. 11. № 4. P. 179–185. https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2004.10.001
25. *Шевченко В.П., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф.* Синтез Boc-Trp-Pro-Pro-Trp и Trp-Pro-Pro-Trp и их дейтерированных аналогов. Материалы 6-й Российской конференции по медицинской химии “Медхим 2024” (1–4 июля 2024 г., Нижний Новгород, Россия).
26. *Вьюнова Т.В., Шевченко К.В., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф.* Оценка специфического связывания Boc-Trp-Pro-Pro-Trp и Trp-Pro-Pro-Trp с плазматическими мембранными клетками мозга крыс. Материалы 6-й Российской конференции по медицинской химии “Медхим 2024” (1–4 июля 2024 г., Нижний Новгород, Россия). 2024. С. 327.
27. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.

SYNTHESIS AND EVALUATION OF THE PROTEOLYTIC STABILITY OF BOC-TRP-PRO-PRO-TRP AND TRP-PRO-PRO-TRP OF PEPTIDE ANALOGUES OF PAM-43 OF ALLOSTERIC MODULATOR OF AMPA RECEPTORS

V. P. Shevchenko[a], T. V. Vyunova[a,b], K. V. Shevchenko[a], L. A. Andreeva[a], I. Yu. Nagaev[a,#], Academician of the RAS N. F. Myasoedov[a]

[a]*National Research Centre “Kurchatov Institute” (NRC “Kurchatov Institute”), 123182 Moscow, Russian Federation*
[b]*Lift Center Life Improvement by Future Technologies, 121205 Moscow, Russian Federation*
[#]*E-mail: nagaev.img@yandex.ru*

Peptides Boc-Trp-Pro-Pro-Trp and Trp-Pro-Pro-Trp were synthesized, structurally similar to PAM-43, which is a positive allosteric modulator (PAM) of AMPA receptors, the malfunction of which is considered as a symptom of many pathologies. The use of peptides synthesized from amino acids of a natural structure, unlike chemical compounds foreign to the body, as a rule, have low cytotoxicity, which allows their use in the necessary doses. It was shown that the most successful way to obtain Boc-Trp-Pro-Pro-Trp and Trp-Pro-Pro-Trp was to start synthesis by obtaining Pro-Pro, which was condensed with Boc-Trp and Trp. Their resistance to the action of peptidases has been determined. It turned out that the main way of degradation of peptides is the cleavage of the C-terminal bond of Pro-Trp with the formation of corresponding metabolites, which also degrade due to the cleavage of peptide bonds from the C-terminus of the molecule. Further studies of these peptides will make it possible to consider them as possible candidates for a new direction in the search for effective peptide analogues of PAM, with the aim of creating medicines based on them in the future.

Keywords: synthesis, peptide analog of PAM-43