

©Коллектив авторов

ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ПРОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ ДОФАМИНА И СЕРТОНИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VITRO*

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

Институт молекулярной генетики Российской академии наук,
123182, Москва, пл. Курчатова, 2; *эл. почта: ATCarma@mail.ru

Впервые синтезированы *Woc-Gly-Pro-DP*, *Z-Gly-Pro-DP*, *LA-Gly-Pro-DP*, *Woc-Gly-Pro-Srt*, *Z-Gly-Pro-Srt*. Исследование устойчивости синтезированных пептидов в присутствии лейцинаминопептидазы, карбоксипептидазы γ , карбоксипептидазы β и пролиновой эндопептидазы (PEP) показало, что данные соединения устойчивы в присутствии аминоксипептидаз и карбоксипептидаз. В присутствии PEP от синтезированных препаратов отщепляется дофамин (DP) и серотонин (Srt). Таким образом, впервые получены пролинсодержащие производные Srt и DP, из которых Srt и DP могут постепенно высвободиться. Это создает возможность пролонгированного действия данных биологически активных соединений на жизнедеятельность клеток и, следовательно, всего организма.

Ключевые слова: пролинсодержащие производные дофамина и серотонина; деградация пептидов; лейцинаминопептидаза; карбоксипептидаза; пролиновая эндопептидаза; ферменты плазмы крови

DOI: 10.18097/PBMC20196506498

ВВЕДЕНИЕ

Биологически активные соединения пептидной природы можно ввести в живой организм с использованием различных методов (внутривенно, интраназально и др.). Поэтому очень важно предварительно определить устойчивость используемого препарата в присутствии аминоксипептидаз и карбоксипептидаз. Кроме того, интересно выяснить, какие метаболиты могут образоваться в результате ферментативного превращения, так как они могут иметь собственную биологическую активность. Например, при разных способах введения *Pro-Gly-Pro-Leu* содержание образующегося дипептида *Gly-Pro* может различаться почти в 3 раза [1]. Это нельзя не учитывать в связи с тем, что *Gly-Pro* обладает выраженным фармакологическим действием, он предотвращает повышение тревожности и снижение уровня ориентировочно-исследовательской активности [2].

Известным способом стабилизации синтетических пептидов является их модификация пролиновыми остатками [3]. Такие пролинсодержащие соединения обладают высокой устойчивостью к протеолитическому действию самых распространённых протеаз [4-6]. Естественно, в живом организме присутствуют и пролидазы. Они присутствуют в мозге [дипептидил пептидаза II (КФ 3.4.14.2; DPP-II)] [7] и в крови [пролидаза (КФ 3.4.13.9; пептидаза D, иминопептидаза)] [8], принимают участие в расщеплении пролинсодержащих пептидов [дипептидил пептидаза IV, (КФ 3.4.14.5; DPP-IV)] [9], а также в других процессах [8, 10]. Под их воздействием

биологически активный фрагмент, связанный с пролином, будет постепенно отщепляться от пролекарства и вызывать соответствующий клеточный ответ. То есть, в результате связывания биологически активного соединения с пролинсодержащим пептидом получается препарат, который будет функционировать в живом организме более продолжительное время, что позволит снизить дозировку лекарства и, следовательно, при таком же самом положительном эффекте будет способствовать уменьшению его негативного действия.

В данной работе исследовалась устойчивость пролинсодержащих производных DP и Srt под действием лейцинаминопептидазы (КФ 3.4.11.2), карбоксипептидазы γ (КФ 3.4.16.1), карбоксипептидазы β (КФ 3.4.17.2) и пролиновой эндопептидазы (КФ 3.4.21.26).

Целью данной работы является синтез и исследование ферментативного гидролиза *Woc-Gly-Pro-DP*, *Z-Gly-Pro-DP*, *LA-Gly-Pro-DP*, *Woc-Gly-Pro-Srt*, *Z-Gly-Pro-Srt* в экспериментах *in vitro*. В качестве реперного соединения был использован семакс (*Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro*).

МЕТОДИКА

В работе были использованы лейцинаминопептидаза (Тип VI) микросомальная из почки свиньи (9,2 Ед./мг), карбоксипептидаза γ из хлебопекарных дрожжей (17 Ед./мг), карбоксипептидаза β из поджелудочной железы свиньи (70 Ед./мг) и пролиновая эндопептидаза из флавобактерий (55 Ед./мг), а также катализаторы

Принятые сокращения: АсОН – уксусная кислота; *Woc* – трет-бутоксикарбонильная группа; *Bzl* – бензильная группа; DMF – диметилформамид; DMSO – диметилсульфоксид; DP – дофамин; Et₃N – триэтиламин; HCl – соляная кислота; KCl – хлорид калия; LA – лауриновая кислота; MeOH – метанол; Na₃PO₄ – фосфат натрия; NaCl – хлорид натрия; NaOH – гидроксид натрия; Srt – серотонин; Su – N-оксисукцинимид; TFA – трифторуксусная кислота; Z – бензилоксикарбонильная группа; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ДЦГК – N,N-дициклогексилкарбодимид; PEP – пролиновая эндопептидаза.

и реактивы фирмы “Sigma-Aldrich” (США). Растворители, кислоты и др. получены от фирмы “Химмед” (Россия).

Woc-Gly-Pro синтезирован в Институте молекулярной генетики Российской академии наук конденсацией Woc-Gly и Pro-OBzl с последующим снятием бензильной группы гидрированием. Плазма крови (31 мг белка/мл) получена из самцов крыс Wistar (самцы, масса 200 г). Кровь (5 мл) собирали в пробирку, содержащую 20 мкл гепарина (5000 Ед./мл) и центрифугировали (1500 g, 10 мин). Концентрацию белка в образцах плазмы крови определяли по методу Хартри-Лоури. Работы *in vitro* проводили по ранее описанным методикам [11, 12].

При работе с фирменными ферментами реакционные смеси анализировали без предварительной очистки, поэтому разброс значений при параллельных измерениях не превышал 5%. При анализе проб, полученных при работе с плазмой крови, необходимо было проводить предварительную очистку твердофазной экстракцией. Поэтому число повторных измерений проводили не менее 5 раз. Разброс значений при этом не превышал 10-15%.

Анализ реакционных смесей

Анализ реакционных смесей проводили на хроматографе Милихром-А02 (Россия), длины волн (нм): 210, 220, 230, 240, 254 с использованием колонки ProntoSIL-120-5-C₁₈ AQ DB-2003 (“Bishcoff Chromatography”, Германия, 2×75 мм, размер частиц 5 мкм), в градиенте метанола и буфера (0,2 М LiClO₄ + 0,005 М HClO₄, pH 2,24) в течение 12 мин при температуре 35°C. Анализ Z-Gly-Pro-DP, Woc-Gly-Pro-DP, Z-Gly-Pro-Srt и Woc-Gly-Pro-Srt проводили, увеличивая концентрацию метанола с 5% до 100% (система 1). Анализ LA-Gly-Pro-DP проводили, увеличивая концентрацию метанола с 5% до 45% за 5 мин и с 85% до 100% за 6,0-12,0 мин (система 2). Скорость подачи элюента – 0,2 мл/мин. Времена удерживания исследуемых соединений приведены в таблице 1.

Анализ соединений с использованием масс-спектрометрических данных проводили на приборе LCQ Advantage MAX (“Thermo Electron Corp.”, США) с ионизацией электрораспылением

Таблица 1. Хромато-масс-спектрометрический анализ соединений

Соединение	τ, мин	[M+1] ⁺
Z-Gly-Pro-DP	8,13*	441
Woc-Gly-Pro-DP	7,80*	407
Z-Gly-Pro-Srt	8,30*	464
Woc-Gly-Pro-Srt	7,96*	430
LA-Gly-Pro-DP	8,80**	489
Z-Gly-Pro	7,62*	305
Woc-Gly-Pro	7,08*	271
Дофамин	2,25*	153
Серотонин	4,07*	176

Примечание: * – система 1; ** – система 2; τ – время удерживания на хроматографической колонке; [M+1]⁺ – молекулярный вес.

прямым вводом раствора образца с концентрацией 10 мкг/мл в 0,1% уксусной кислоте и дальнейшей фрагментацией молекулярного пика в анализаторе методом ионных соударений при 35 эВ (табл. 1).

Синтез Woc-Gly-Pro-DP

При перемешивании к раствору 15 мг (0,055 ммоль) Woc-Gly-Pro в 1 мл дихлорметана при комнатной температуре прибавляли 1,4 мг (0,01 ммоль) 1-оксибензотриазола и 20,8 мг (0,1 ммоль) ДЦГК. Через 10 мин прибавляли 20 мкл Et₃N и раствор 9,9 мг (0,064 ммоль) DP в 0,5 мл DMF. Перемешивание продолжали еще 4 ч, DMF удаляли лиофилизацией. Твердофазную экстракцию Woc-Gly-Pro-DP, нанесенного на Диапак С16, проводили пятью системами растворителей. Сначала пропускали 5 мл 5% метанола, потом 10 мл 20% метанола, 6 мл 30% метанола, 6 мл 95% метанола и 5 мл 100% метанола. Содержание искомого продукта во фракциях соотносилось как 0:1:5:20:0,01. Чистота препарата увеличилась в три раза. Preparative очистку Woc-Gly-Pro-DP проводили с использованием колонки Reprosil-Pur C18aq (“Maisch GmbH”, Германия, 20×150 мм, размер частиц 10 мкм) в системе MeOH-AcOH-TFA (45:0,1:0,01). Скорость подачи элюента – 20 мл/мин. Время удерживания – 3,95 мин. Выход Woc-Gly-Pro-DP составил 58% с химической чистотой 98%.

Синтез Woc-Gly-Pro-Srt

Раствор 24 мг (0,088 ммоль) Woc-Gly-Pro, 7 мг (0,05 ммоль) 1-оксибензотриазола и 29 мг (0,141 ммоль) ДЦГК в 1 мл DMF перемешивали 20 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 20 мкл (0,14 ммоль) Et₃N, перемешивали 10 мин, добавляли 15 мг (0,085 ммоль) Srt и перемешивали 4 ч; DMF удаляли лиофилизацией. Preparative очистку проводили, как описано выше. Время удерживания – 5,02 мин. Выход Woc-Gly-Pro-Srt – 64%.

Синтез Z-Gly-Pro-DP

При перемешивании к раствору 170 мг (0,56 ммоль) Z-Gly-Pro в 0,3 мл DMF при комнатной температуре прибавляли 10 мг (0,071 ммоль) 1-оксибензотриазола и 130 мг (0,63 ммоль) ДЦГК. Через 10 мин прибавляли 0,2 мл Et₃N и раствор 100 мг DP (0,65 ммоль) в 0,3 мл DMF. Перемешивание продолжали ещё 4 ч; DMF удаляли лиофилизацией. Preparative очистку проводили, как описано выше. Время удерживания – 5,53 мин. Выход Z-Gly-Pro-DP составил 66%.

Синтез Z-Gly-Pro-Srt

Раствор 28,5 мг (0,093 ммоль) Z-Gly-Pro, 7 мг (0,05 ммоль) 1-оксибензотриазола и 21 мг (0,102 ммоль) ДЦГК в 0,5 мл DMF перемешивали 20 мин при комнатной температуре. Затем к нему прибавляли 20 мг (0,113 ммоль) Srt в 0,5 мл DMF и 25 мкл (0,179 ммоль) Et₃N. После объединения растворов перемешивание продолжали 4 ч. Preparative очистку проводили, как описано выше. Время удерживания – 5,95 мин. Выход Z-Gly-Pro-Srt составил 65-70%.

УСТОЙЧИВОСТЬ ПРОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ ДОФАМИНА И СЕРОТОНИНА

Синтез производных DP и Srt при использовании Вос-Gly-Pro-Su и Z-Gly-Pro-Su.

К раствору 1 ммоль Вос- или Z-аминокислоты и 115 мг (1 ммоль) N-оксисукцинимид в 5 мл сухого диоксана добавляли 214 мг (1,039 ммоль) ДЦГК и перемешивали 2 ч при 15°C. Затем оставляли при перемешивании на ночь при комнатной температуре. Мочевину отфильтровывали, промывали 2 мл диоксана, растворитель упаривали. Осадок растворяли в 6 мл этанола. В 2 мл этанола с 0,15 мл триэтиламина растворяли 1 ммоль DP или Srt. Затем по 0,5 ммоль Вос-Pro-Su или Z-Gly-Pro-Su в 3 мл этанола смешивали с 0,5 ммоль раствора DP или Srt в 1 мл этанола. Растворы перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Препаративную очистку проводили, как описано выше. Выход Вос-Gly-Pro-DP составил 82%, Z-Gly-Pro-DP – 86%, Z-Gly-Pro-Srt – 81%, Вос-Gly-Pro-Srt – 79%.

Синтез Вос-Gly-Pro-OMe и Вос-Gly-Pro-OBzl

Раствор 875 мг (5,57 ммоль) Вос-Gly в 5 мл хлороформа обрабатывали 1444 мг (7 ммоль) ДЦГК в течение 20 мин при комнатной температуре. Добавляли 0,7 мл (5,04 ммоль) Et₃N и перемешивали 10 мин. Затем добавляли раствор 778 мг (5,37 ммоль) ProOCH₃ в 4 мл хлороформа и перемешивали 3 ч при комнатной температуре и 72 ч при 5°C. Осадок отфильтровывали, хлороформ упаривали. Вос-Gly-Pro-OMe растворяли в 10 мл этилацетата, промывали 5 мл 1 М HCl и 5 мл воды. Этилацетат упаривали, остаток лиофилизировали. Аналогично синтезировали Вос-Gly-Pro-OBzl. Анализ проводили на хроматографе Милихром А-02 в градиенте 0,1% CH₃COOH-метанол от 30% до 100% за 12,5 мин. Скорость подачи элюента – 0,2 мл/мин. Время удерживания Вос-Gly-Pro-OMe – 6,53 мин, Вос-Gly-Pro-OBzl – 7,11 мин.

Препаративную очистку Вос-Gly-Pro-OMe и Вос-Gly-Pro-OBzl проводили с использованием колонки Reprosil-Pur C18aq (20×150 мм, размер частиц 10 мкм) в системе MeOH-H₂O-AcOH (50:50:0,1). Время удерживания Вос-Gly-Pro-OMe и Вос-Gly-Pro-OBzl 6,53 мин и 7,11 мин соответственно. Выход Вос-Gly-Pro-OMe и Вос-Gly-Pro-OBzl – около 70%.

Синтез LA-Gly-Pro-OMe и LA-Gly-Pro-OBzl

а) Раствор 200 мг (1 ммоль) LA в 3 мл абсолютного бензола смешивали с 321 мг (2,70 ммоль) тионилхлорида. Раствор кипятили 2,5 ч. Бензол и избыток тионилхлорида упаривали и ещё дважды упаривали с 5 мл абсолютного бензола. Хлорангидрид LA использовали без дополнительной очистки.

Вос-защиту с Вос-Gly-Pro-OMe и Вос-Gly-Pro-OBzl снимали обработкой раствора 100 мг защищённого пептида смесью 1 мл хлороформа и 0,5 мл TFA в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем раствор упаривали и ещё дважды упаривали с 5 мл метанола. Остаток лиофилизировали и использовали без дополнительной очистки.

Раствор Gly-Pro-OMe в 1 мл хлороформа обрабатывали при перемешивании 0,4 мл Et₃N и 0,35 ммоль хлорангидрида LA. Через 2 ч реакционную смесь обрабатывали метанолом и лиофилизировали. Аналогично проводили реакцию с Gly-Pro-OBzl. Анализ проводили на хроматографе Милихром А-02 в градиенте 0,1% уксусная кислота-метанол от 10% до 100% за 10 мин, далее метанол в течение 2,5 мин. Скорость подачи элюента – 0,2 мл/мин. Время удерживания LA-Gly-Pro-OMe – 10,30 мин, LA-Gly-Pro-OBzl – 10,96 мин.

Препаративную очистку LA-Gly-Pro-OBzl и LA-Gly-Pro-OMe проводили с использованием колонки Reprosil-Pur C18aq (20×150 мм, размер частиц 10 мкм) в системе MeOH-H₂O-AcOH-TFA (90:10:0,1:0,01). Скорость подачи элюента 20 мл/мин. Времена удерживания соединений 2,94 мин и 2,71 мин соответственно. Выходы препаратов – 87% и 79% соответственно.

б) К раствору 216 мг (1,08 ммоль) LA и 124,2 мг (1,08 ммоль) N-оксисукцинимид в 5 мл сухого диоксана добавляли 245,3 мг (1,19 ммоль) ДЦГК и перемешивали 2 ч при 15°C. Мочевину отфильтровывали, промывали диоксаном (2 мл ×2), растворитель упаривали. Осадок растворяли в 1 мл диоксана и обрабатывали раствором 250,5 мг Gly-Pro-OBzl в 2 мл этанола с 0,2 мл Et₃N. Через 21 ч раствор упаривали, растворяли в 5 мл этилацетата, промывали два раза по 1 мл воды. Водные слои объединяли и экстрагировали 1 мл этилацетата. Этилацетат упаривали. Выход LA-Gly-Pro-OBzl составил 52%.

Синтез LA-Gly-Pro

К раствору 110 мг LA-Gly-ProOCH₃ в 4 мл метанола при перемешивании прибавляли 0,5 мл 2 н. NaOH (рис. 1). Через 7 ч раствор подкисляли 1 М HCl и упаривали. Остаток растворяли в 3 мл этилацетата

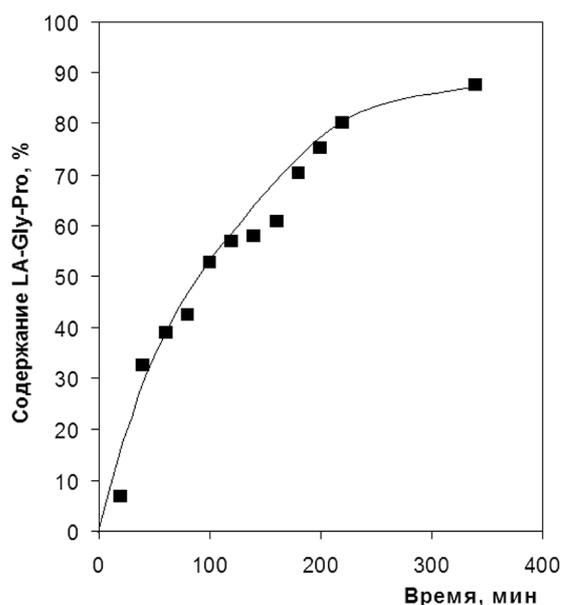


Рисунок 1. Кинетика щелочного гидролиза LA-Gly-ProOCH₃.

и промывали водой до нейтрального pH. Раствор упаривали, лиофилизировали и использовали в дальнейшем без дополнительной очистки. Выход LA-Gly-Pro составил 90%.

Бензильную защиту с LA-Gly-ProOBzl снимали в метаноле гидрированием в присутствии 5% PdO/BaSO₄ (30 мг) в течение 90 мин. Катализатор отфильтровывали. Раствор упаривали и остаток лиофилизировали. В дальнейшем препарат использовали без дополнительной очистки. Выход LA-Gly-Pro составил 98%.

Анализ проводили на хроматографе Милихром А-02 в градиенте 0,1% уксусная кислота-метанол от 10% до 100% за 10 мин, далее метанол в течение 2,5 мин. Скорость подачи элюента – 0,2 мл/мин. Время удерживания LA-Gly-Pro – 10,10 мин.

Синтез LA-Gly-Pro-DP

При перемешивании к раствору 90 мг (0,26 ммоль) LA-Gly-Pro в 0,15 мл DMF добавляли 60 мг (0,29 ммоль) ДЦГК. Через 10 мин прибавляли 150 мкл Et₃N, а затем раствор 50 мг DP (0,327 ммоль) в 0,3 мл DMF. Перемешивание продолжали ещё 4 ч. Затем добавляли 4 мл хлороформа и продолжали перемешивание в течение ночи. DMF удаляли лиофилизацией. Остаток растворяли в этилацетате (6 мл), добавляли 2 мл воды и 0,1 мл уксусной кислоты. После центрифугирования воду и мочевины отделяли. Водную фракцию вновь экстрагировали этилацетатом (4 мл) и центрифугировали. Препаративную очистку LA-Gly-Pro-DP проводили с использованием колонки Reprosil-Pur C18aq (20×150 мм, размер частиц 10 мкм) в системе MeOH-H₂O-AcOH-TFA (85:15:0,1:0,01). Время удерживания 2,86 мин. Выход LA-Gly-Pro-DP – 46%.

Проверка влияния присутствия этанола или DMSO в инкубационной среде на функционирование лейцинаминопептидазы и карбоксипептидазы Y

Проверку влияния присутствия в инкубационной среде этанола или DMSO на активность ферментов проводили по следующей методике. К раствору 0,068 ммоль семакса и 0,0039 Ед. лейцинаминопептидазы или 0,935 Ед. карбоксипептидазы Y в 100 мкл смеси фосфатно-солевого буфера (27,4 mM NaCl, 0,4 mM KCl, 2 mM Na₃PO₄ в 100 мл H₂O, pH 7,4) добавляли этанол или DMSO. Соотношение фосфатно-солевого буфера и этанола или DMSO варьировались от 100:0 до 50:50 (табл. 2). Инкубационную смесь

перемешивали и термостатировали при 30°C, отбирая аликвоты по 15 мкл через определённые промежутки времени. Остановка ферментативного гидролиза осуществлялась добавлением к отбираемым пробам равного объёма метанола.

Оценка устойчивости производных пептидов в присутствии лейцинаминопептидазы, карбоксипептидаз Y и B и PEP

При использовании лейцинаминопептидазы, карбоксипептидаз и PEP условия ферментативного гидролиза отработывали, исследуя деградацию изучаемых пептидов при разных соотношениях субстрата и фермента. Для дальнейшей работы для лейцинаминопептидазы использовали соотношение 1 мкмоль/Ед., для карбоксипептидазы Y – 0,092 мкмоль/Ед., для карбоксипептидазы B – 0,022 мкмоль/Ед., для PEP – 10, 1 и 0,10 мкмоль/Ед.

Ферментативный гидролиз пролинсодержащих производных DP и Srt проводили по следующей методике. К раствору 0,5 мкмоль пролинсодержащего производного в 260 мкл фосфатно-солевого буфера (27,4 mM NaCl, 0,4 mM KCl, 2 mM Na₃PO₄ в 100 мл H₂O, pH 7,4) добавляли 0,47 Ед. лейцинаминопептидазы или 5,45 Ед. карбоксипептидазы Y или 22,46 Ед. карбоксипептидазы B в этом же буфере. Для разных пролинсодержащих производных DP и Srt добавляли 0,05 Ед., 0,5 Ед., 5,0 Ед. PEP. 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 объёма метанола.

Оценка устойчивости производных пептидов в присутствии плазмы крови

К раствору 0,74 мкмоль производного пептида в 820 мкл фосфатно-солевого буфера (27,4 mM NaCl, 0,4 mM KCl, 2 mM Na₃PO₄ в 100 мл H₂O, pH 7,4) добавляли 380 мкл плазмы крови (31 мг белка/мл). Инкубационную смесь перемешивали и термостатировали при 30°C, отбирая аликвоты по 100 мкл через определённые промежутки времени. Полученные пробы очищали твердофазной экстракцией на обращённой фазе: пептидную фракцию наносили на патрон, упакованный обращенной фазой Lichroprep RP-18, с последующим элюированием пептидов метанолом с 0,1% TFA. Далее смесь упаривали и растворяли в 150 мкл смеси метанол:вода (5:95). Анализ смеси проводили методом ВЭЖХ.

Таблица 2. Влияние этанола и DMSO на ферментативный гидролиз семакса (реакцию проводили в течение 180 мин)

Фермент	Органический растворитель	Процентное содержание этанола и DMSO					
		0,0	1,0	1,5	5,0	20,0	50,0
Лейцинаминопептидаза	Этанол	1,2*	1,8	3,0	5,0	54,5	97,5
Карбоксипептидаза Y		14,6	19,2	21,3	27,5	88,0	97,7
Лейцинаминопептидаза	DMSO	1,2	2,1	9,2	17,1	76,9	98,1
Карбоксипептидаза Y		14,6	23,4	29,3	44,0	96,3	97,9

Примечание: * – остаточное содержание семакса в инкубационном растворе, %.

УСТОЙЧИВОСТЬ ПРОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ ДОФАМИНА И СЕРОТОНИНА

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее уязвимая часть пептидного фрагмента в соединениях Boc-Gly-Pro-DP, Z-Gly-Pro-DP, LA-Gly-Pro-DP, Boc-Gly-Pro-Srt, Z-Gly-Pro-Srt – N-концевая аминокислота. Поэтому в используемых соединениях её аминогруппа была защищена (Boc, Z, жирная кислота). Идея защиты аминогруппы жирной кислотой связана с результатами, полученными в работе [13].

При исследовании устойчивости Pro-Gly-Pro-Leu и его ацилированных аналогов к действию лейцинаминопептидазы показано, что деградация исходного пептида значительно выше, чем у его N-ацильных производных и, значит, физиологическое действие последних может оказаться более длительным [13]. Следовательно, использование N-защищённых пептидов, как правило, приводит к повышению их устойчивости к деградации в биологических средах [13, 14].

Синтез Boc-Gly-Pro-DP, Z-Gly-Pro-DP, LA-Gly-Pro-DP, Boc-Gly-Pro-Srt, Z-Gly-Pro-Srt проводили с использованием известного набора приёмов [15, 16]. В экспериментах использовали ДЦГК, тионилхлорид, различные защитные группы. Boc-группу снимали в кислых условиях, бензильную газообразным водородом в присутствии катализатора, метильную в щелочных условиях. Омыление метилового эфира происходило довольно медленно. Реакция на 90% прошла только через 6 ч (рис. 1).

Для получения перечисленных выше препаратов использовали две основные методики. Первая предусматривала использование ДЦГК для конденсации соединений, вторая – использование ДЦГК и N-оксисукцинимиды для получения соответствующих эфиров, реакциями с которыми получали нужный препарат. Первая стратегия более перспективна при получении соединений с LA. Реакции с DP и Srt лучше проводить по второй методике.

Все вещества были охарактеризованы хроматографическими методами (ВЭЖХ) и с использованием масс-спектропии.

Сложность работы в экспериментах *in vitro* с Boc-Gly-Pro-DP, Z-Gly-Pro-DP, LA-Gly-Pro-DP, Boc-Gly-Pro-Srt, Z-Gly-Pro-Srt заключалась в недостаточной растворимости их в воде. Поэтому сначала пришлось оценить влияние этанола или DMSO, которые добавлялись для повышения растворимости производных DP и Srt, на ферментативный гидролиз пептидов. В качестве реперного соединения использовался семакс.

В результате проведенной работы установлено, что при содержании этанола или DMSO менее 5% эффективность ферментативного гидролиза семакса заметно не падала (табл. 2).

Как видно из приведённых данных, использование этанола предпочтительно. Раствор производных DP и Srt готовили, растворяя Boc-Gly-Pro-DP, Z-Gly-Pro-DP, Boc-Gly-Pro-Srt, Z-Gly-Pro-Srt в 25% этаноле. При добавлении необходимой аликвоты в инкубационную среду концентрация этанола не превышала 1,5%. В случае LA-Gly-Pro-DP концентрацию этанола или DMSO в инкубационной среде приходилось увеличивать до 3%. Следовательно, в таких условиях влияние этанола на эффективность работы ферментов было минимальным.

При работе с производными DP и Srt в качестве коммерческих ферментов, помимо приведённых в таблице 2, использовали карбоксипептидазу В и РЕР (табл. 3, 4).

Как видно из приведённых данных, устойчивость производных Srt в присутствии лейцинаминопептидазы оказалась выше, чем у соответствующих производных DP. Та же тенденция наблюдается и в присутствии карбоксипептидаз В и Y. Соединения с Boc-защитой в присутствии лейцинаминопептидазы

Таблица 3. Устойчивость Boc-Gly-Pro-DP, Z-Gly-Pro-DP, LA-Gly-Pro-DP, Boc-Gly-Pro-Srt, Z-Gly-Pro-Srt в присутствии amino- и карбоксипептидаз

Субстрат	Фермент	Время, мин					
		2	30	60	180	1440	4320
Boc-Gly-Pro-DP	Лейцинаминопептидаза	100*	89,3	79,6	67,4	55,1	33,7
Z-Gly-Pro-DP		100	77,3	73,2	53,6	48,1	33,2
LA-Gly-Pro-DP		100	83,5	67,1	40,1	33,7	27,2
Boc-Gly-Pro-Srt		100	99,3	99,0	98,3	93,8	92,4
Z-Gly-Pro-Srt		100	94,7	94,7	89,5	79,0	73,7
Boc-Gly-Pro-DP	Карбоксипептидаза В	100	96,6	88,2	79,8	65,7	36,5
Z-Gly-Pro-DP		100	85,0	76,7	61,6	58,8	30,0
LA-Gly-Pro-DP		100	86,7	73,4	55,6	34,4	29,5
Boc-Gly-Pro-Srt		100	100	100	100	100	100
Z-Gly-Pro-Srt		100	100	100	94,4	88,9	83,3
Boc-Gly-Pro-DP	Карбоксипептидаза Y	100	92,5	89,7	88,7	80,3	54,0
Z-Gly-Pro-DP		100	98,4	93,3	91,7	83,2	62,6
LA-Gly-Pro-DP		100	92,5	85,0	73,3	73,0	40,5
Boc-Gly-Pro-Srt		100	100	99,6	98,4	97,2	96,8
Z-Gly-Pro-Srt		100	100	100	100	94,4	88,9

Примечание: * – содержание исходного соединения в инкубационном растворе, %.

Таблица 4. Оптимизация соотношения субстрат-РЕР (реакцию проводили в течение 60 мин)

Субстрат	Субстрат-ферментное соотношение, мкмоль/ед.				
	0,05	0,49	5,7	58	597
Z-Gly-Pro-DP	0,0*	0,0	28,0	94,1	100
Woc-Gly-Pro-DP	0,0	17,5	92,4	100	100

Примечание: * – содержание исходного соединения в инкубационном растворе, %.

и карбоксипептидазы В оказались более устойчивыми по сравнению с соединениями с Z-защитой и лауриновым остатком. В присутствии карбоксипептидазы У соединения с Z-защитой оказались более устойчивыми по сравнению с соединениями с Woc-защитой и лауриновым остатком. В целом можно констатировать, что все синтезированные соединения обладают высокой устойчивостью к действию как амино-, так и карбоксипептидаз. В отличие от семакса, исходные соединения сохраняются в инкубационной смеси в течение многих часов, что, по-видимому, объясняется и наличием пролинового остатка и наличием защитных групп на N-концевой аминокислоте.

Различная скорость уменьшения содержания производных DP и Srt в присутствии перечисленных выше пептидаз указывает на то, что этот процесс определяется не гидролизом пролинсодержащего фрагмента данных производных, а деградацией дофаминовой или серотониновой части молекул этих соединений. На это указывает и то, что при масс-спектрометрическом анализе реакционных смесей, молекулярных пиков, которые могли образоваться из пролинсодержащего фрагмента, обнаружено не было.

При работе с РЕР пришлось провести оптимизацию его концентрации при проведении экспериментов. Изначально использовали субстрат-ферментное соотношение, как и при работе с другими ферментами. При этом оказалось, что деградация производных DP и Srt в присутствии РЕР

происходит очень быстро. Для исследования кинетики ферментативного гидролиза синтезированных соединений концентрацию РЕР пришлось значительно уменьшить (табл. 4).

Как видно из приведённых данных, устойчивость соединения с Z-защитой для данного фермента ниже, чем у соединений с Woc-защитой. За 60 мин в инкубационной среде при субстрат-ферментном соотношении 5,7 мкмоль/Ед. Z-Gly-Pro-DP оставалось менее 30%, а Woc-Gly-Pro-DP – около 90%. При субстрат-ферментном соотношении 0,49 мкмоль/Ед. Z-Gly-Pro-DP деградировал полностью, а Woc-Gly-Pro-DP оставалось около 17%. Поэтому изучение зависимости устойчивости Woc-Gly-Pro-DP, Z-Gly-Pro-DP, LA-Gly-Pro-DP, Woc-Gly-Pro-Srt, Z-Gly-Pro-Srt в присутствии РЕР от времени проводили для соединений с Z- и Woc-защитой при разном субстрат-ферментном соотношении (рис. 2).

Как видно из приведённых данных, форма кинетических кривых для всех соединений идентична. Ферментативный гидролиз производных с Z-защитой происходил значительно быстрее, чем соединений с Woc-защитой (рис. 2а). Кинетику LA-Gly-Pro-DP удалось проследить, только увеличив концентрацию фермента ещё в десять раз (рис. 2в). Влияние остатка DP и Srt на устойчивость соединений при небольшом количестве фермента сказывается незначительно. При уменьшении субстрат-ферментного соотношения до 1 мкмоль/Ед. наблюдается большая устойчивость производных Srt (рис. 2б). При проведении эксперимента в течение нескольких суток оказалось, что при наименьшем субстрат-ферментном соотношении (0,1 мкмоль/Ед.) можно обнаружить только производные LA (LA-Gly-Pro-DP) (табл. 5). При соотношении 10 мкмоль/Ед. в значительных количествах присутствуют соединения с Woc-защитой, в то время как соединения с Z-защитой в инкубационной среде или присутствуют в количествах, измеряемых несколькими процентами, или практически отсутствуют (табл. 5). При соотношении 1 мкмоль/Ед. соединения с Z-защитой и с Woc-защитой через сутки гидролизуются полностью (табл. 5).

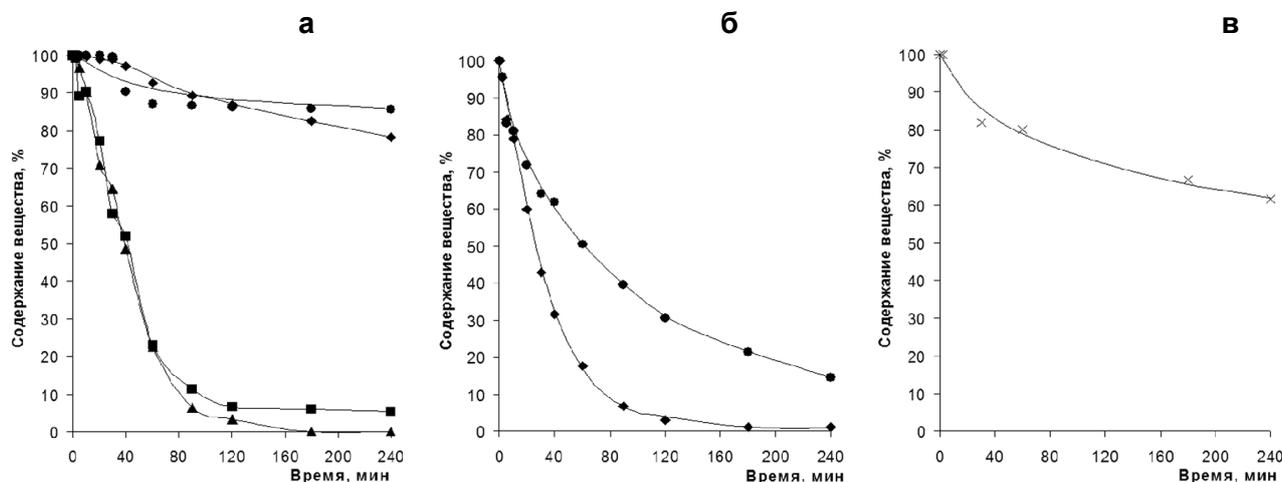


Рисунок 2. Устойчивость Z-Gly-Pro-DP (■), Z-Gly-Pro-Srt (▲), Woc-Gly-Pro-DP (◆), Woc-Gly-Pro-Srt (●), LA-Gly-Pro-DP (×) при разных соотношениях субстрата к РЕР: а – 10 мкмоль/Ед; б – 1 мкмоль/Ед.; в – 0,1 мкмоль/Ед.

УСТОЙЧИВОСТЬ ПРОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ ДОФАМИНА И СЕРТОНИНА

Таблица 5. Ферментативный гидролиз препаратов с PEP при проведении реакции более суток

Субстрат	С _{РЕР} , мкмоль/Ед.	Время, мин			С _{РЕР} , мкмоль/Ед.	Время, мин		
		24 ч	72 ч	120 ч		24 ч	72 ч	120 ч
Z-Gly-Pro-DP	10	0,0*	0,0	0,0	1	0,0	0,0	0,0
Вос-Gly-Pro-DP		72,46	34,30	23,70		0,0	0,0	0,0
Z-Gly-Pro-Srt		5,23	2,83	2,40		0,0	0,0	0,0
Вос-Gly-Pro-Srt		84,54	68,42	56,40		0,5	0,0	0,0
LA-Gly-Pro-DP		–	–	–		0,1	49,1	44,3

Примечание: * – содержание исходного соединения в инкубационном растворе, %.

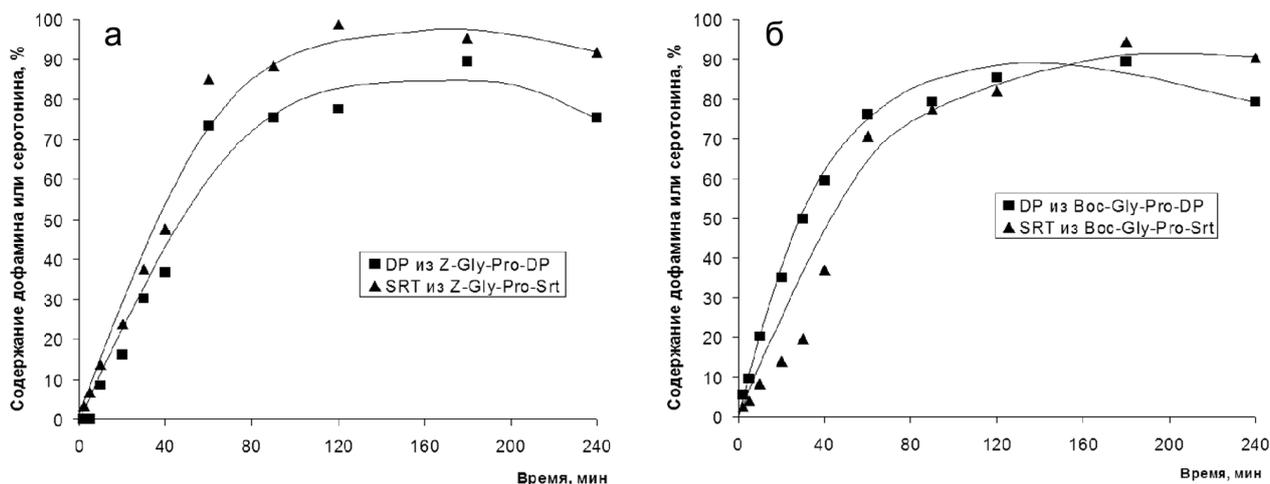


Рисунок 3. Образование DP и Srt из их производных при разных соотношениях субстрата и PEP: а – 10 мкмоль/Ед.; б – 1 мкмоль/Ед.

Таблица 6. Образование DP и Srt из их производных под действием PEP в течение пяти суток (субстрат-ферментное соотношение для Z-производных 10 мкмоль/Ед, для Вос-производных 1 мкмоль/Ед.)

Источник DP	Время, сутки			Источник Srt	Время, сутки		
	1	3	5		1	3	5
Z-Gly-Pro-DP	66,8*	16,2	12,9	Z-Gly-Pro-Srt	88,5	74,9	61,3
Вос-Gly-Pro-DP	75,7	54,9	19,8	Вос-Gly-Pro-Srt	56,7	50,1	26,3

Примечание: * – содержание продукта ферментативного гидролиза в инкубационном растворе, %.

Таблица 7. Устойчивость Вос-Gly-Pro-DP, Z-Gly-Pro-DP, LA-Gly-Pro-DP, Вос-Gly-Pro-Srt, Z-Gly-Pro-Srt в присутствии плазмы крови крыс

Соединение	Время, мин									
	10	30	60	120	180	300	420	1440	2880	4320
Z-Gly-Pro-DP	99,0±0,7*	87,1±4,9	79,1±4,8	48,8±6,9	30,8±4,3	20,0±2,6	10,3±1,5	0	0	0
Вос-Gly-Pro-DP	100	97,4±1,5	96,0±1,4	56,6±3,3	50,0±4,1	29,0±4,2	14,5±2,0	1,6±0,2	1,1±0,2	0
LA-Gly-Pro-DP	99,0±0,5	95,9±2,1	88,8±3,9	81,6±4,7	70,4±4,4	67,4±2,2	66,3±0,9	60,2±2,9	46,3±4,8	23,5±3,3
Z-Gly-Pro-Srt	100	100	80,0±8,5	60,0±9,2	40,0±6,6	24,9±3,5	13,4±1,9	0	0	0
Вос-Gly-Pro-Srt	100	100	98,7±0,7	82,9±8,6	65,8±5,8	65,8±4,2	64,5±4,6	63,2±4,7	61,8±5,1	59,2±4,5

Примечание: * – содержание исходного соединения в инкубационном растворе, %.

Исследование кинетики образования продуктов реакции под действием PEP проводили и для соединений с Z-защитой и для соединений с Вос-защитой. Показано, что ферментативный гидролиз происходит по связи между DP/Srt и пролином (рис. 3, табл. 6).

Таким образом, под действием фермента PEP происходит постепенное высвобождение DP и Srt. Максимальные значения (около 90%) достигаются

через несколько часов. Следовательно, можно ожидать более длительного воздействия DP и Srt, образующихся из этих соединений, на процессы, происходящие как в клетках, так и в организме в целом.

Сравнение данных, полученных при использовании фирменных ферментов и ферментной системы, содержащейся в плазме крови крыс, показало, что основные закономерности сохраняются (табл. 7).

Как видно из полученных данных (табл. 7), наиболее устойчивым среди производных DP оказалось соединение с LA, затем следуют соединения с Вос-защитой и, наконец, с Z-защитой. Естественно, устойчивость соединений с одинаковой защитной группой определяется, как это уже подчёркивалось выше, устойчивостью дофаминового или серотонинового фрагментов. Можно сделать вывод, что в присутствии ферментов крови крыс в экспериментах *in vitro* производные DP и Srt устойчивы. Следовательно, синтезированные производные DP и Srt могут быть в течение нескольких часов источниками DP и Srt. И они могут оказаться препаратами, которые можно будет использовать для продолжительного воздействия на патологические процессы с целью их локализации и лечения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работу проводили частично при поддержке программ фундаментальных исследований Президиума РАН “Инновационные разработки в биомедицине” и “Постгеномные технологии и перспективные решения в биомедицине”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с Международными рекомендациями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях” (The European Convention, 1986).

ЛИТЕРАТУРА

1. Шевченко К.В., Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф. (2014) Докл. Акад. Наук, **456**(5), 613-617. [Shevchenko K.V., Vyunova T.V., Andreeva L.A., Nagaev I.Y., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F. (2014) Doklady Biochemistry And Biophysics, **456**(1), 111-115.]
2. Копылова Г.Н., Умарова Б.А., Самонина Г.Е., Гусева А.А., Платонова Р.Д. (2005) Научные труды I съезда физиологов СНГ, Том 2, Сочи, Дагомыс, Медицина-Здоровье, М., С. 677. [Kopylova G.N., Umarova B.A., Samonina G.E., Guseva A.A., Platonova R.D. (2005) Nauchnye trudy I sezda fiziologov SNG, Vol. 2, Sochi, Dagomys, Medicina-Zdorov'e, M., P. 677.]
3. Walker J.R., Altman R.K., Warren J.W., Altman E. (2003) J. Pept. Res., **62**(5), 214-226.
4. Walter R., Simmons W.H., Yoshimoto T. (1980) Mol. Cell Biochem., **30**(2), 111-127.
5. McDonald J.K., Barrett A.J. (1986) Mammalian Proteases: A Glossary and Bibliography Vol. 2. Exopeptidases, Academic Press, London.
6. Mentlein R. (1988) FEBS Letters, **234**(2), 251-256.
7. Mentlein R., Struckhoff G. (1989) J. Neurochem., **52**(4), 1284-1293.
8. Yaron A., Naider F. (1993) Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., **28**(1), 31-81.
9. Heins J., Welker P., Schonlein C., Born J., Hartrodt B., Neubert K., Tsuru D., Barth A. (1988) Biochim. Biophys. Acta, **954**(2), 161-169.
10. Hooper N.M., Htyszko J., Turner A.J. (1990) Biochem. J., **267**(2), 509-515.
11. Шевченко К.В., Вьюнова Т.В., Нагаев И.Ю., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. (2013) Биоорг. химия, **39**(3), 320-325. [Shevchenko K.V., Vyunova T.V., Nagaev I.Yu., Andreeva L.A., Myasoedov N.F. (2013) Russ. J. Bioorgan. Chem., **39**(3), 283-287.]
12. Шевченко К.В., Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф. (2015) Хим.-фарм. журнал, **49**(2), 12-17. [Shevchenko K.V., Vyunova T.V., Andreeva L.A., Nagaev I.Yu., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F. (2015) Pharmaceutical Chemistry Journal, **49**(2), 82-87.]
13. Шевченко К.В., Безуглов В.В., Акимов М.Г., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф. (2017) Докл. Акад. Наук, **476**(5), 596-599. [Shevchenko K.V., Bezuglov V.V., Akimov M.G., Nagaev I.Yu., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F. (2017) Doklady Biochemistry and Biophysics, **476**(1), 333-336.]
14. Безуглов В.В., Грецкая Н.М., Блаженнова Л.В., Андрианова Е.Л., Акимов М.Г., Бобров М.Ю., Назимов И.В., Кисель М.А., Шарко О.Л., Новиков А.В., Краснов Н.В., Шевченко В.П., Шевченко К.В., Вьюнова Т.В., Мясоедов Н.Ф. (2006) Биоорг. химия, **32**(3), 258-267. [Bezuglov V.V., Gretskaya N.M., Blazhenova A.V., Andrianova E.L., Akimov M.G., Bobrov M.Yu., Nazimov I.V., Kisel' M.A., Sharko O.L., Novikov A.V., Krasnov N.V., Shevchenko V.P., Shevchenko K.V., Vyunova T.V., Myasoedov N.F. (2006) Russ. J. Bioorgan. Chem., **32**(3), 231-239.]
15. Гринштейн Дж., Виниц М. (1965) Химия аминокислот и пептидов, Мир, М. [Greenstein J.P., Winitz M. (1961) Chemistry Of The Amino Acids, John Wiley & Sons, New York London]
16. Гершкович А.А., Кибирев В.К. (1992) Химический синтез пептидов, Наукова думка, Киев. [Gershkovich A.A., Kibirev V.K. (1992) Himicheskij sintez peptidov, Naukova dumka, Kiev.]

Поступила в редакцию: 18. 06. 2019.
После доработки: 08. 07. 2019.
Принята к печати: 10. 07. 2019.

STUDY OF STABILITY OF PROLINE-CONTAINING DERIVATIVES OF DOPAMINE AND SEROTONIN
IN THE BIOLOGICAL MEDIA IN VITRO EXPERIMENTS

K.V. Shevchenko, L.A. Andreeva, I.Yu. Nagaev, V.P. Shevchenko, N.F. Myasoedov*

Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences,
2 Kurchatov sq., Moscow, 123182 Russia; *e-mail: ATCarma@mail.ru

Boc-Gly-Pro-DP, Z-Gly-Pro-DP, LA-Gly-Pro-DP, Boc-Gly-Pro-Srt, Z-Gly-Pro-Srt were synthesized for the first time. The stability of these compounds in the presence of leucine aminopeptidase, carboxypeptidase Y, carboxypeptidase B and proline endopeptidase (PEP) was determined. It turned out that the compounds are stable in the presence of aminopeptidases and carboxypeptidases. In the presence of PEP, dopamine (DP) and serotonin (Srt) are cleaved from the synthesized preparations. Thus, new proline-containing Srt and DP derivatives were obtained, Srt and DP could be gradually released from them. This suggests the possibility of a prolonged action of these biologically active compounds on the vital activity of cells and, consequently, of the whole organism.

Key words: proline-containing dopamine and serotonin derivatives; peptide degradation; leucine aminopeptidase; carboxypeptidase; proline endopeptidase (PEP); blood plasma enzymes

Funding. The work was partially supported by the Fundamental Research Programs of the Presidium of the Russian Academy of Sciences “Innovative Developments in Biomedicine” and “Postgenomic Technologies and Promising Solutions in Biomedicine”.

Received: 18.06.2019, revised: 08.07.2019, accepted: 10.07.2019.