

МЕЧЕННЫЕ ТРИТИЕМ ПРОИЗВОДНЫЕ ДОФАМИНА, СЕРОТОНИНА И ДОКСОРУБИЦИНА, СОДЕРЖАЩИЕ НЕУСТОЙЧИВЫЕ В УСЛОВИЯХ ГИДРИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТЫ

© 2020 г. В. П. Шевченко*, Л. А. Андреева, К. В. Шевченко, И. Ю. Нагаев, Н. Ф. Мясоедов

Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Курчатова, д. 2

**e-mail: ATRegister@mail.ru*

Получена 30.04.2019, после доработки 15.07.2019, принята к публикации 17.07.2019

Впервые синтезированы необходимые предшественники для получения меченных тритием Z-Gly-Pro-DOPA, Z-Gly-Pro-Srt, Z-Gly-Pro-Dox, Ol-Gly-Pro-DOPA, Ol-Gly-Pro-Srt (Gly – глицин, Pro – пролин, Ol – олеиновая кислота, DOPA – дофамин, Dox – доксорубин, Srt – серотонин, Z – бензилоксикарбонильная защита). С использованием меченных тритием пролина и глицина синтезированы пептидные производные DOPA, Dox и Srt с разным распределением трития.

Ключевые слова: синтез, производные дофамина, серотонина, доксорубина, тритий, пептиды

DOI: 10.31857/S0033831120040085

Для синтеза меченных тритием пептидных производных биологически активных соединений (БАС), содержащих неустойчивые в условиях гидрирования фрагменты, необходимо введение трития в соответствующий предшественник с последующим включением его в искомое соединение. Синтез и использование предшественников для получения меченных соединений могут осуществляться разными методами. Например, меченные тритием бензойные кислоты использовались для получения меченных нейротоксинов (7,8-дигидробатрахотоксин, аконитин), которые необходимы для изучения быстрых натриевых каналов электровозбудимых мембран [1]. Этим же методом получены меченные аналоги нуклеотидов и ряда других БАС [2–4]. При получении меченных производных дофамина, серотонина и доксорубина, в состав которых входили ненасыщенные жирные кислоты или бензилоксикарбонильная защита (Z), необходимо было прибегнуть к подобному подходу. При использовании $[^3\text{H}]\text{Pro}$ и $[^3\text{H}]\text{Gly}$ получены меченные соединения с разным распределением трития.

Целью данной работы являлся синтез Z-Gly- $[^3\text{H}]\text{Pro-DOPA}$, Z-Gly- $[^3\text{H}]\text{Pro-Srt}$, Z-Gly- $[^3\text{H}]\text{Pro-}$

Dox, Ol-Gly- $[^3\text{H}]\text{Pro-DOPA}$, Ol-Gly- $[^3\text{H}]\text{Pro-Srt}$, Ol- $[^3\text{H}]\text{Gly-Pro-DOPA}$, Ol- $[^3\text{H}]\text{Gly-Pro-Srt}$.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Катализаторы, реагенты и растворители – коммерческие препараты. Нерadioактивные стандарты синтезировали по методикам [5–8]. Тритий в глицин (27–31 Ки/ммоль) вводили по методу [9]. Исходные и конечные продукты характеризовали с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Препараты очищали методом ВЭЖХ. Анализ проводили на хроматографе Милихром А-02 с использованием колонки ProntoSIL-120-5-C18 AQ DB-2003 (2×75 мм, размер частиц 5 мкм), в градиенте метанола в 0.1%-ной уксусной кислоте (см. таблицу). Скорость подачи элюента – 0.2 мл/мин. длины волны 210 нм.

Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике LKB1215 с эффективностью регистрации трития около 30% в диоксановом сцинтилляторе. Для сбора и обработки хроматографических данных использовали систему МультиХром 1.5 (ЗАО «Амперсэнд», Россия).

Времена удерживания Z- и Ol-содержащих производных дофамина, серотонина и доксорубина

Соединение	Времена удерживания, мин (градиент, %)
Z-Gly-Pro-DOPA	4.97 (30–100)
Z-Gly-Pro-Srt	5.25 (30–100)
Z-Gly-Pro-Dox	9.18 (30–100)
Ol-Gly-Pro-DOPA	7.80 (70–100)
Ol-Gly-Pro-Srt	7.76 (70–100)

Синтез $[^3\text{H}]\text{Pro}$. Раствор 5 мг дегидропролина (ΔPro) в 0.15 мл воды в присутствии 10 мг 5% PdO/BaSO_4 помещали в реакционную ампулу, замораживали жидким азотом и вакуумировали до 0.1 Па. Напускали 70–80%-ный газообразный тритий (давление 400 гПа), и при комнатной температуре перемешивали раствор 1.5 ч. Раствор вновь замораживали жидким азотом и удаляли избыточный тритий адсорбцией последнего на уране с последующим вакуумированием. Катализатор отфильтровывали и промывали метанолом (3×1 мл). Лабильный тритий удаляли упариванием реакционной смеси с 80%-ным водным метанолом (3×3 мл). Выход меченого пролина 95% (молярная активность 35–40 Ки/ммоль).

Синтез Z-Gly- $[^3\text{H}]\text{Pro}$. К раствору 7.5 мг (30 мкмоль) Z-Gly в 0.5 мл диоксана прибавляли 6.2 мг (54 мкмоль) N-оксисукцинимид (Su) и 7.6 мг (37 мкмоль) N,N-дициклогексилкарбодиимида (ДЦГК). Через 7 ч 0.25 мл раствора отбирали и упаривали. Остаток растворяли в 400 мкл этанола и добавляли 15 мкл Et_3N . Реакцию с 15 мкмоль Z-Gly-Su начинали прибавлением 260 мКи (7 мкмоль) $[^3\text{H}]\text{Pro}$ в 250 мкл смеси воды и этанола (1 : 2) и вели при перемешивании 15 ч. Раствор упаривали, остаток растворяли в 4 мл этилацетата и промывали 1 мл 1 н. HCl и дважды водой. Анализ проводили на хроматографе Милихром А-02, как описано выше. Выделение меченого соединения проводили методом ВЭЖХ на колонке Kromasil 100C18 (8×150 мм, размер частиц 7 мкм). Элюент А – метанол–вода– AcOH –трифторуксусная кислота (TFA) (20 : 80 : 0.1 : 0.01); элюент В – метанол; линейный градиент от 0 до 100% В за 30 мин. Скорость подачи элюента 2 мл/мин, детектор по радиоактивности. Время удерживания 16.5 мин. Выход меченого Z-Gly- $[^3\text{H}]\text{Pro}$ 69%.

Синтез $\text{Woc-}[^3\text{H}]\text{Gly}$ и $[^3\text{H}]\text{Gly-ProOMe}$. К раствору 88 мКи глицина в 1 мл воды добавляли

20 мкл Et_3N и 10 мкл ди-*трет*-бутилпиокарбоната (Woc_2O) в 0.4 мл изопропанола и перемешивали реакционную смесь 17 ч. Растворитель и летучие вещества удаляли упариванием. Остаток лиофилизировали, промывали петролейным эфиром (2×0.2 мл) и растворяли в 4 мл метанола. Выход $\text{Woc-}[^3\text{H}]\text{Gly}$ 90%.

77 мКи (3 мкмоль) $\text{Woc-}[^3\text{H}]\text{Gly}$ растворяли в 0.5 мл сухого диоксана. Затем прибавляли 1.5 мг (7.3 мкмоль) ДЦГК и 1.1 мг (10 мкмоль) N-оксисукцинимид. Через 7 ч раствор упаривали, растворяли осадок в 0.5 мл этанола и добавляли 20 мкл Et_3N и 1.0 мг (6 мкмоль) $\text{HCl} \cdot \text{ProOMe}$. Раствор перемешивали 15 ч при комнатной температуре. Раствор упаривали, остаток растворяли в 4 мл этилацетата и промывали 1 мл 1 н. HCl и дважды водой. Анализ проводили на хроматографе Милихром А-02, как описано выше. Выделение меченого соединения проводили ВЭЖХ, как описано выше. $\text{Woc-}[^3\text{H}]\text{Gly-ProOMe}$ растворяли в 0.3 мл смеси хлороформа с трифторуксусной кислотой и упаривали через 40 мин. Выход меченого $[^3\text{H}]\text{Gly-ProOMe}$ 69%.

Синтез Ol- $[^3\text{H}]\text{Gly-Pro}$ и Ol-Gly- $[^3\text{H}]\text{Pro}$. 43 мг (0.14 мкмоль) олеата натрия обрабатывали раствором 0.1 мл хлористого тионила в 0.4 мл хлороформа. Через 2 ч упаривали и растворяли в 2 мл хлороформа.

а. Раствором 50 мкмоль хлорангидрида олеиновой кислоты (OlCl) обрабатывали 9 мг (0.1 мкмоль) солянокислого метилового эфира глицина в 2 мл хлороформа с 0.1 мл триэтиламина и перемешивали 2 ч. Упаривали, растворяли в 3 мл этилацетата и промывали 2 мл 1 н. HCl , затем три раза по 0.4 мл воды. Органическую фазу упаривали, лиофилизировали. Для удаления олеиновой кислоты раствор реакционной смеси в 2 мл эфира промывали 1 мл 0.2 н. NaOH . Эфирный раствор упаривали, остаток растворяли в 4 мл метанола и добавляли 1 мл 0.2 н. NaOH . Через 1 ч образовался Ol-Gly. Выход препарата 70%.

б. К раствору 18.9 мг (56 мкмоль) Ol-Gly в 1 мл диоксана прибавляли 7 мг (61 мкмоль) N-оксисукцинимид и 12.0 мг (58 мкмоль) ДЦГК, перемешивали смесь 7 ч и упаривали.

25% полученного Ol-GlySu (14 мкмоль) растворяли в 400 мкл этанола и добавляли 15 мкл Et_3N . Реакцию с Ol-GlySu начинали прибавлением

260 мКи (7 мкмоль) $[^3\text{H}]\text{Pro}$ в 0.2 мл смеси воды и этанола (1 : 3) и вели при перемешивании 15 ч. Раствор упаривали, остаток растворяли в 4 мл этилацетата и промывали 1 мл 1 н. HCl и дважды водой. Анализ и очистку проводили, как описано выше. Выход $\text{Ol-Gly-}[^3\text{H}]\text{Pro}$ 55%.

75% сукцинимидного производного Ol-Gly (42 мкмоль) растворяли в 400 мкл этанола и добавляли 50 мкл Et_3N . Реакцию с Ol-GlySu начинали прибавлением 10 мг (66 мкмоль) $\text{Pro}\cdot\text{HCl}$ в 0.2 мл смеси воды и этанола (1 : 3) и вели при перемешивании 15 ч. Продукт выделяли, как описано выше. Строение Ol-Gly-Pro подтверждено масс-спектрометрическими данными, полученными на приборе LCQ Advantage MAX (ThermoElectron, США) с ионизацией электрораспылением, прямым вводом раствора образца с концентрацией 10 мкг/мл в 0.1%-ной уксусной кислоте и дальнейшей фрагментацией молекулярного иона в анализаторе методом ионных соударений при 35 эВ.

в. К раствору OlCl (5 мкмоль) в 0.1 мл хлороформа прибавляли 52 мКи (2 мкмоль) $[^3\text{H}]\text{Gly-ProO-Me}$. Через 2 ч реакционную смесь обрабатывали метанолом и лиофилизировали. К раствору $\text{Ol-}[^3\text{H}]\text{Gly-ProOCH}_3$ в 0.5 мл метанола при перемешивании прибавляли 0.5 мл 2 н. NaOH . Через 7 ч раствор подкисляли 1 н. HCl и упаривали. Остаток растворяли в 3 мл этилацетата и промывали водой до нейтрального pH. Выход $\text{Ol-}[^3\text{H}]\text{Gly-Pro}$ 90%.

Синтез $\text{Ol-}[^3\text{H}]\text{Gly-Pro-Srt}$, $\text{Ol-}[^3\text{H}]\text{Gly-Pro-DOPA}$. а. При перемешивании к раствору 13 мкмоль $\text{Ol-}[^3\text{H}]\text{Gly-Pro}$ в 0.5 мл диоксана при комнатной температуре прибавляли 2.3 мг (20 мкмоль) *N*-оксисукцинимид и 4 мг (19 мкмоль) ДЦГК. Через 7 ч растворитель упаривали, остаток растворяли в 1 мл этанола.

К этанольному раствору (0.5 мл) прибавляли 30 мкл Et_3N и 2.5 мг (13 мкмоль) *DOPA*. Перемешивание продолжали 16 ч. Этанол упаривали. Хроматографическое выделение проводили на колонке Kromasil 100C18 (8×150 мм, размер частиц 7 мкм). Элюент А – метанол–вода– AcOH – TFA (50 : 50 : 0.1 : 0.01); элюент В – метанол; линейный градиент от 0 до 100% В за 30 мин, затем 100% В в течение 5 мин. Скорость подачи элюента 2 мл/мин, детектор по радиоактивности. Выход $\text{Ol-}[^3\text{H}]\text{Gly-Pro-DOPA}$ 45%, время удерживания 30.5 мин.

б. В аналогичных условиях проводили получение и очистку $\text{Ol-}[^3\text{H}]\text{Gly-Pro-Srt}$. Выход $\text{Ol-}[^3\text{H}]\text{Gly-Pro-Srt}$ 50%, время удерживания 30.9 мин.

Синтез $\text{Ol-Gly-}[^3\text{H}]\text{Pro-Srt}$, $\text{Ol-Gly-}[^3\text{H}]\text{Pro-DOPA}$. К раствору 175 мКи (5 мкмоль) $\text{Ol-Gly-}[^3\text{H}]\text{Pro}$ и 1.2 мг (10 мкмоль) *N*-оксисукцинимид в 0.5 мл сухого диоксана добавляли 2.3 мг (11 мкмоль) ДЦГК и перемешивали 5 ч при 23°C. Затем растворитель упаривали. Осадок растворяли в 1 мл этанола.

К 0.5 мл этанольного раствора прибавляли 15 мкл триэтиламина и 10 ммоль дофамина или серотонина. Растворы перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Соединения очищали, как описано выше. Выход $\text{Ol-Gly-}[^3\text{H}]\text{Pro-DOPA}$ 42%, $\text{Ol-Gly-}[^3\text{H}]\text{Pro-Srt}$ 41%.

Синтез $\text{Z-Gly-}[^3\text{H}]\text{Pro-Dox}$, $\text{Z-Gly-}[^3\text{H}]\text{Pro-Srt}$, $\text{Z-Gly-}[^3\text{H}]\text{Pro-DOPA}$. К раствору 2.5 мг (8.2 мкмоль) $\text{Z-Gly-}[^3\text{H}]\text{Pro}$ и 1.2 мг (10 мкмоль) *N*-оксисукцинимид в 0.5 мл сухого диоксана добавляли 2.3 мг (11 мкмоль) ДЦГК и перемешивали 7 ч при 23°C. Затем растворитель упаривали. Осадок растворяли в 1.5 мл этанола.

К 0.5 мл этанольного раствора прибавляли 15 мкл триэтиламина и 10 ммоль дофамина, доксорубина или серотонина. Растворы перемешивали при комнатной температуре 15 ч. Соединения очищали, как описано выше. Выход $\text{Z-Gly-}[^3\text{H}]\text{Pro-DOPA}$ 55%, $\text{Z-Gly-}[^3\text{H}]\text{Pro-Srt}$ 65%, $\text{Z-Gly-}[^3\text{H}]\text{Pro-Dox}$ 46%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для введения трития в пептидные производные дофамина, серотонина и доксорубина, которые содержат фрагменты, нестабильные в условиях гидрирования, метку необходимо заблаговременно вводить в аминокислоту с последующим встраиванием ее в соединение. В пролин изотоп водорода можно ввести гидрированием ΔPro [7], а в Gly – изотопным обменом [9].

При использовании $[^3\text{H}]\text{Pro}$, полученного из ΔPro , его конденсировали с Z-GlyOSu или с Ol-GlyOSu . Z-GlyOSu синтезировали обработкой Z-Gly *N*-оксисукцинимидом и ДЦГК. Для синтеза Ol-GlyOSu сначала ненасыщенную жирную кислоту превращали в хлорангидрид, который обрабатывали GlyOMe . Метиловый эфир удаляли омылением Ol-GlyOMe . Образовавшийся

Ol-Gly превращали в Ol-GlyOSu, который затем обрабатывали [^3H]Pro. По той же методике Z-Gly-[^3H]Pro и Ol-Gly-[^3H]Pro превращали в Z-Gly-[^3H]ProOSu и Ol-Gly-[^3H]ProOSu. При использовании этих реагентов искомые соединения получали конденсацией с DOPA, доксорубицином и Srt. Недостатком такой методики является необходимость проведения большого количества стадий с мечеными предшественниками.

В результате проведенной работы получены Z-Gly-Pro-DOPA, Z-Gly-Pro-Srt, Z-Gly-Pro-Dox, Ol-Gly-Pro-DOPA, Ol-Gly-Pro-Srt, содержащие тритий в пролине. Молярная радиоактивность таких препаратов 35–40 Ки/ммоль.

Получение соединений, меченных по глицину, является более сложной задачей. С использованием [^3H]Gly нельзя получить перечисленные выше вещества с Z-защитой. Возможно лишь получение соединений с ненасыщенными жирными кислотами. Для этого необходимо предварительно изготовить OIOSu. Затем провести реакцию с [^3H]Gly.

К сожалению, данная реакция проходит с низким выходом. Более высокий выход удалось получить, конденсируя OICl с [^3H]Gly-ProOMe. Но для реализации этого подхода необходимо сначала синтезировать Вос-[^3H]Gly, затем сконденсировать его с ProOMe и снять Вос-защиту. Удалить метильную группу с пролина оказалось намного труднее, чем с глицина. Следующие стадии проводили аналогично синтезам пептидных производных дофамина и серотонина. Молярная радиоактивность препаратов 26 Ки/ммоль.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа проведена при частичной поддержке Программ фундаментальных исследований Пре-

зидиума РАН «Инновационные разработки в биомедицине» и «Постгеномные технологии и перспективные решения в биомедицине».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф. // Радиохимия. 1999. Т. 41, № 4. С. 289.
2. Coombs M.E., Kingston L.P., Lockley W.J.S., Mather A.N., Wilkinson D.J. // Seventh Int. Symp. «The Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds»: Abstracts., Dresden, Germany, 2000, P. 147.
3. Gibbs A.R., Morimoto H., VanBrocklin H.F., Williams Ph.G., Biegon A. // J. Label. Compd. Radiopharm. 2002. Vol. 45, N 5. P. 395.
4. Shevchenko V.P., Nagaev I.Yu., Myasoedov N.F., Susan A.B., Switek K.-H., Braunger H. // J. Label. Compd. Radiopharm. 2006. Vol. 49, N 5. P. 421.
5. Шевченко К.В., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф. // Биомед. хим. 2019. Т. 65, № 6. С. 498
6. Шевченко В.П., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. // Докл. АН. 2019. Т. 485, № 2. С. 182.
7. Шевченко В.П., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. // Докл. АН. 2019. Т. 487, № 1. С. 41.
8. Гершкович А.А., Кибирев В.К. Химический синтез пептидов. Киев: Наук. думка, 1992. 360 с.
9. Шевченко В.П., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. // Докл. АН. 2018. Т. 483, № 2. С. 159.