



УДК 547.466.2;577.152.342

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ФОСФИНОВЫХ ПСЕВДО-Pro-Gly-ПРОИЗВОДНЫХ ДОФАМИНА И СЕРОТОНИНА

© 2026 г. В. П. Шевченко*, М. Э. Дмитриев**, К. В. Шевченко*, #, А. В. Бородачев**, И. Ю. Нагаев*, Д. Е. Иванов**, Л. А. Андреева*, В. В. Рагулин**, Н. Ф. Мясоедов*

* Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”,
Россия, 123182 Москва, пл. Курчатова, 2

** Институт физиологически активных веществ

ФГБУН Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии РАН,
Россия, 142432 Черноголовка, Северный просп., 1

Поступила в редакцию 23.09.2025 г.

После доработки 10.10.2025 г.

Принята к публикации 13.10.2025 г.

Осуществлена конденсация фосфинового кислого структурного изомера Pro-(POOH)-Gly и биогенных аминов дофамина и серотонина в одной молекуле путем образования классической пептидной связи. Синтезированы фосфиновые трипептидные Pro-(POOH)-Gly-DA и Pro-(POOH)-Gly-5-HT в свободной водорастворимой форме. Модификация ранее опубликованной процедуры позволила получить *N,P*-дизащищенный строительный блок Z-Pro-(POOAd)-Gly-OH, который затем был превращен в Z-Pro-(POOAd)-Gly-Su с активированным карбоксильным фрагментом. Последний конденсировали с дофамином и серотонином. Свободные соединения Pro-(POOH)-Gly-DA и Pro-(POOH)-Gly-5-HT получали удалением *N*-Cbz-группы каталитическим гидрированием и удалением адамантиловой эфирной группы трифторуксусной кислотой. Установлено, что свободные соединения Pro-(POOH)-Gly-DA и Pro-(POOH)-Gly-5-HT ферментативно устойчивы в присутствии пролиновой эндопептидазы, лейцинаминопептидазы, карбоксипептидаз Y и B, следовательно, они могут рассматриваться как гибридные соединения, которые показывают потенциал для повышения устойчивости биогенных аминов. Кроме того, при гидролизе соединений Pro-(POOH)-Gly-DA и Pro-(POOH)-Gly-5-HT в организме образовавшийся фосфиновый кислый аналог Pro-Gly может оказаться полезным при лечении ряда патологий.

Ключевые слова: псевдопептидный строительный блок Z-Pro-(POOAd)-Gly-OH, синтез псевдо-трипептидных производных дофамина и серотонина, ферментативная устойчивость фосфиновых трипептидов Pro-Gly-DA и Pro-Gly-5-HT

DOI: 10.7868/S1998286026020128

ВВЕДЕНИЕ

Дефицит передачи сигналов биогенными аминами приводит к известным патологиям – болезни Паркинсона [1] и депрессии [2]. Использование свободных дофамина и серотонина может вызывать различные побочные эффекты. Кроме того, серотонин и дофамин нестабильны в кровотоке. Повы-

сить устойчивость биогенных аминов можно ацилированием свободной аминогруппы [3–6]. Установлено, что *N*-докозагексаеноилдофамин проявляет антиоксидантные свойства, на моделях окислительного стресса, индуцированного H₂O₂, оказывает дозозависимое защитное действие на культивируемые клетки-зерна мозжечка крысы. Показано ингибирующее влияние *N*-докозагексаеноил-

Сокращения: Ad – адамантиловая защитная группа; Boc – *tert*-бутилоксикарбонильная защитная группа; DA – дофамин; DCC – *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид; Dox – доксорубин; 5-HT – серотонин; (POOH) = $\psi\{P(O)(OH)CH_2\}$; (POOAd) = $\psi\{P(O)(OAd)CH_2\}$; Su – сукцинимид; TFA – трифторуксусная кислота; Z (Cbz) – бензилоксикарбонильная защитная группа.

Автор для связи: (тел.: +7 (499) 196-02-16; эл. почта: ATCarma@mail.ru).

дофамина на развитие симптомов болезни Паркинсона, вызванных у мышей введением нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина [4].

Одна из возможных причин большего влияния биологически активного соединения (БАС) на функционирование живых организмов – защита свободной аминогруппы БАС аминокислотой или пептидом. Один из примеров реализации такого подхода – конденсация доксорубина (Dox) с пролином или с пролинсодержащими пептидами [7, 8] (схема 1). Кроме того, в данном случае уменьшаются системные побочные эффекты, связанные с высокой токсичностью Dox [9]. Действительно, при оценке цитотоксичности доксорубина и его производных при использовании тест-системы с инфузориями *Tetrahymena pyriformis* установлено, что наибольшей цитотоксичностью обладал нативный доксорубин ($EC_{50} < 10$ мкМ), наименьшей – Z-Gly-Pro-Dox ($50 < EC_{50} < 100$ мкМ), Boc-Gly-Pro-Dox занимал промежуточное положение ($25 < EC_{50} < 50$ мкМ) [10]. Тест основан на оценке общего количества подвижных клеток в пробах при действии различных концентраций исследуемых веществ. Метод дает возможность одновременно оценивать пролиферацию, остановку деления и гибель клеток. Таким образом, нормальные клетки пептидный фрагмент ограж-

дает от гибели, а в чужеродных клетках содержатся ферменты, которые гидролизуют Z-Gly-Pro-Dox по связи Pro-Dox. В результате высвобождается Dox, который уничтожает раковую клетку.

В рамках реализации данной концепции были синтезированы пептидные производные дофамина (DA) и серотонина (5-гидрокситриптамин, 5-HT): Z-Gly-Pro-DA, Z-Gly-Pro-5-HT, Boc-Gly-Pro-DA, Boc-Gly-Pro-5-HT, Boc-Pro-DA, Boc-Pro-5-HT и их аналоги, содержащие дейтерий и тритий [11–13] (схема 2).

Конъюгаты оказались намного стабильнее в плазме крови [14] и высвобождали биогенный амин после обработки пролиновой эндопептидазой [15].

Помимо исследований, связанных с увеличением жизни биогенных аминов в живых организмах за счет их конденсации с пептидами, продолжают работы с целью повышения ферментативной гидролитической устойчивости самого пептидного фрагмента [16–18]. Для реализации этой концепции были синтезированы фосфиновые кислые аналоги различных пептидов, например, Pro-Gly-Pro (PGP), путем замены природной пептидной NH-C(O)-связи метиленфосфорильным кислым $CH_2P(O)OH$ -фрагментом [17–20] (схема 3).

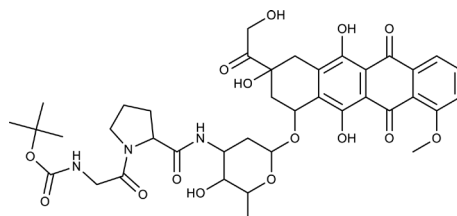


Схема 1. Структурная формула Boc-Gly-Pro-Dox.

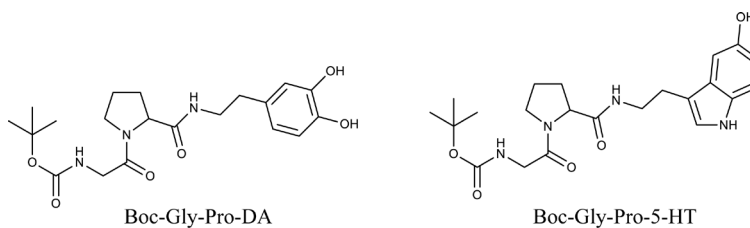


Схема 2. Структурные формулы Boc-Gly-Pro-DA и Boc-Gly-Pro-5-HT.

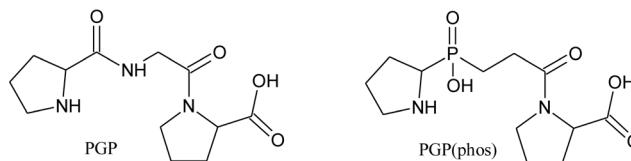


Схема 3. Структурные формулы Pro-Gly-Pro и фосфинового аналога PGP(phos).

Результаты исследований показали, что кроме увеличения гидролитической стабильности, фосфиновый кислый аналог Pro-(POOH)-Gly-Pro {PGP(phos)} обладает антиагрегационными свойствами и может влиять на образование отложений в клеточной системе протеинопатии (протеинопатия – нарушение структуры определенного белка, ведущее к его ненормальной аккумуляции и токсическому воздействию на организм). Многие распространенные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и диабет 2-го типа, ассоциированы с протеинопатиями [21]. Таким образом, потенциальные антиагрегационные свойства делают фосфиновый кислый аналог Pro-Gly-Pro интересным в плане лечения когнитивных патологий.

Комбинация фосфинового псевдодипептидного фрагмента и биоактивного амина в одной молекуле может повысить ферментативную устойчивость

биогенных аминов (DA, 5-HT), а также придать им полезные биологические свойства.

Цель данной работы – оптимизация условий синтеза Pro-(POOH)-Gly-DA (**I**) и Pro-(POOH)-Gly-5-HT (**II**) и оценка устойчивости этих соединений в присутствии пролиновой эндопептидазы, лейцин-аминопептидазы, карбоксипептидаз Y и B.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез соединений (**I**) и (**II**) осуществляли путем ряда последовательных превращений, исходя из фосфонистой кислоты (**III**), содержащей структурный изостер глициновой компоненты, с небольшой модификацией ранее используемой процедуры (схема 4) [19, 20].

В этом случае проводили синтез *N*-Cbz-защитного псевдодипептидного пролилглицинового блока (**IV**) с использованием ацетата (**V**). В отработанных относительно жестких условиях син-

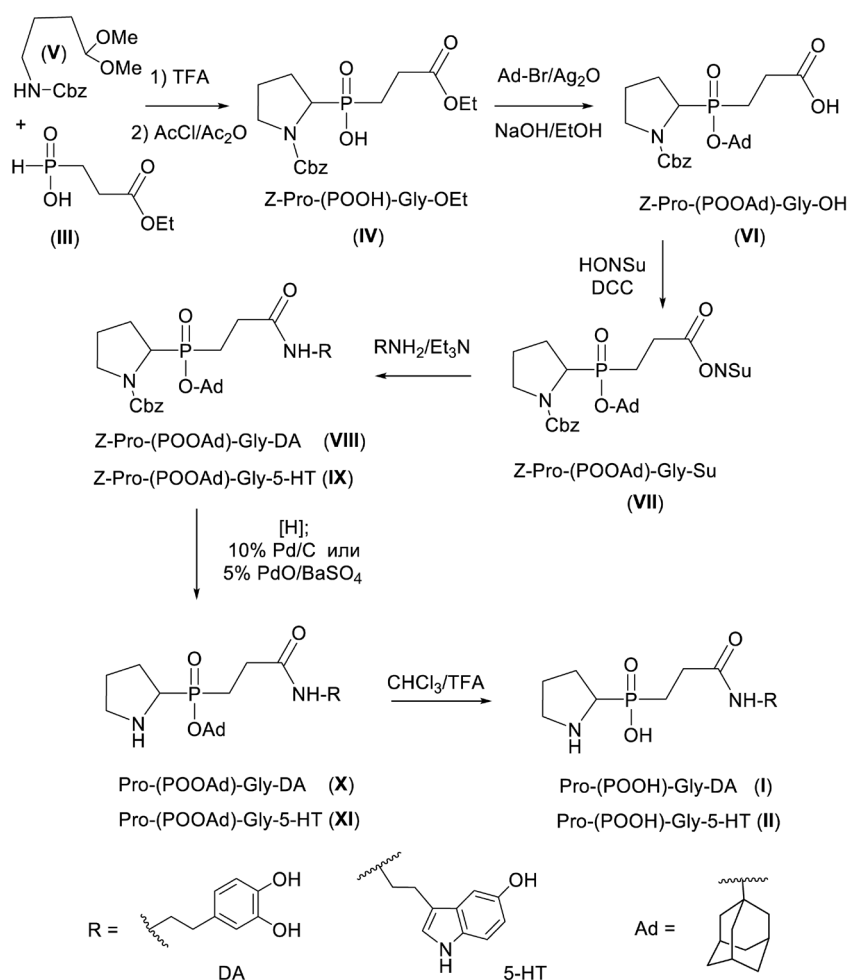


Схема 4. Общая схема синтеза фосфиновых псевдо-Pro-Gly-производных DA и 5-HT (соединений (**I**) и (**II**)).

теза становится возможным совместить удаление ацетальной защиты в молекуле (V) и генерирование *in situ* соответствующего альдегида с сохранением в реакционной среде сложноэфирной функции в продукте (IV) (схема 4). Последняя необходима для селективной установки защитной эфирной адамантиловой группы при атоме фосфора с последующим удалением сложноэфирной функции и получением *N*-Cbz-защитенного псевдопептидного пролилглицинового блока (VI) с защищенной (POOAd) фосфиновой и свободной карбоновой функциями [18–20].

Используя *N*-оксисукцинимид (HONSu) и *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (DCC), синтезировали соединение (VII) (выход ~60–70%) (схема 4). Затем проводили реакцию соединения (VII) с DA или 5-НТ. После завершения реакции растворы упаривали, лиофилизировали и проводили твердофазную экстракцию для отделения продуктов реакции от более полярных исходных веществ.

Твердофазную экстракцию на патроне, упакованном Sep-Pack C₁₈, проводили для соединения Z-Pro-(POOAd)-Gly-DA (VIII) или Z-Pro-(POOAd)-Gly-5-НТ (IX), суспендировав их в 3 мл 30%-ного водного раствора метанола и нанося на патрон. Затем патрон промывали 2 мл 50%-ного водного метанола и 4 мл метанола.

После удаления бензилоксикарбонильной группы каталитическим гидрогенолизом образовывались более полярные соединения. Поэтому реакционную смесь наносили на патрон Sep-Pack C₁₈ и промывали 20%-ным водным метанолом. Вещество смывали 50%-ным водным метанолом.

При определении степени очистки производных DA и 5-НТ установлено, что наибольший эффект при использовании твердофазной экстракции наблюдается после каталитического гидрогенолиза. Это связано с тем, что Pro-(POOAd)-Gly-5-НТ и Pro-(POOAd)-Gly-DA легче растворялись в водном метаноле, а также с тем, что аналоги биогенных аминов имели достаточное время удерживания для отделения их и от побочных продуктов (как более, так и менее полярных).

Для удаления *N*-бензилоксикарбонильной группы каталитическим гидрогенолизом использовали 10% Pd/C или 5% PdO/BaSO₄. В обоих случаях выход искомого продукта практически не отличался, но при использовании 5% PdO/BaSO₄ удаление *N*-бензилоксикарбонильной группы в

производных DA и 5-НТ не всегда проходило до конца. По-видимому, даже после твердофазной экстракции реакционные смеси могли содержать примеси, которые постепенно дезактивировали катализатор. При использовании 10% Pd/C вредные примеси адсорбировались на угле и не мешали гидрогенолизу, что повышало стабильность образования искоемых продуктов.

Эфирную Ad-защиту при атоме фосфора удаляли трифторуксусной кислотой и вновь подвергали реакционную смесь твердофазной экстракции. После гидролиза Ad-защиты реакционную смесь, содержащую соединения (I) или (II), наносили на патрон Sep-Pack C₁₈ и промывали 5%-ным водным метанолом. Вещество смывали 50%-ным водным метанолом. При анализе методом ВЭЖХ фракций, содержащих фосфиновые производные DA и 5-НТ, установлено, что может наблюдаться заметный “проскок” производных DA или 5-НТ. В этом случае дополнительное количество искоемых продуктов получали повторным нанесением первых фракций на патрон и экстракцией их водным метанолом. В результате удавалось выделить ~90–95% гибридных соединений.

Окончательную очистку соединений (I) и (II) проводили на колонке Reprosil pur C18aq (20 × 150 мм, размер частиц 10 мкм), подвижная фаза: метанол–вода–трифторуксусная кислота (20 : 80 : 0.1), скорость потока 20 мл/мин. Время удерживания составляло 4.28 и 4.76 мин соответственно.

Для определения ферментативной устойчивости соединений (I) и (II) использовали пролиновую эндопептидазу, лейцинаминопептидазу, карбоксипептидазы Y и B (рис. 1). Работу проводили *in vitro* по методикам [22, 23].

Установлено, что при использовании перечисленных выше протеаз стабильность пептидов оказалась очень высокой. В течение 1–2 ч содержание соединений (I) и (II) снижалось не более, чем на 20%. Через 4 сут оставалось 20–40% соединения (I), а соединения (II) – 75–85%. Судя по устойчивости гибридных соединений, содержащих DA и 5-НТ, их деградация, по-видимому, связана в основном с деградацией биогенных аминов. На это указывает более быстрое падение содержания соединения (I) относительно соединения (II), т.к. известно, что растворы DA при хранении даже при пониженной температуре быстро разлагаются. Растворы 5-НТ в этих условиях устойчивы.

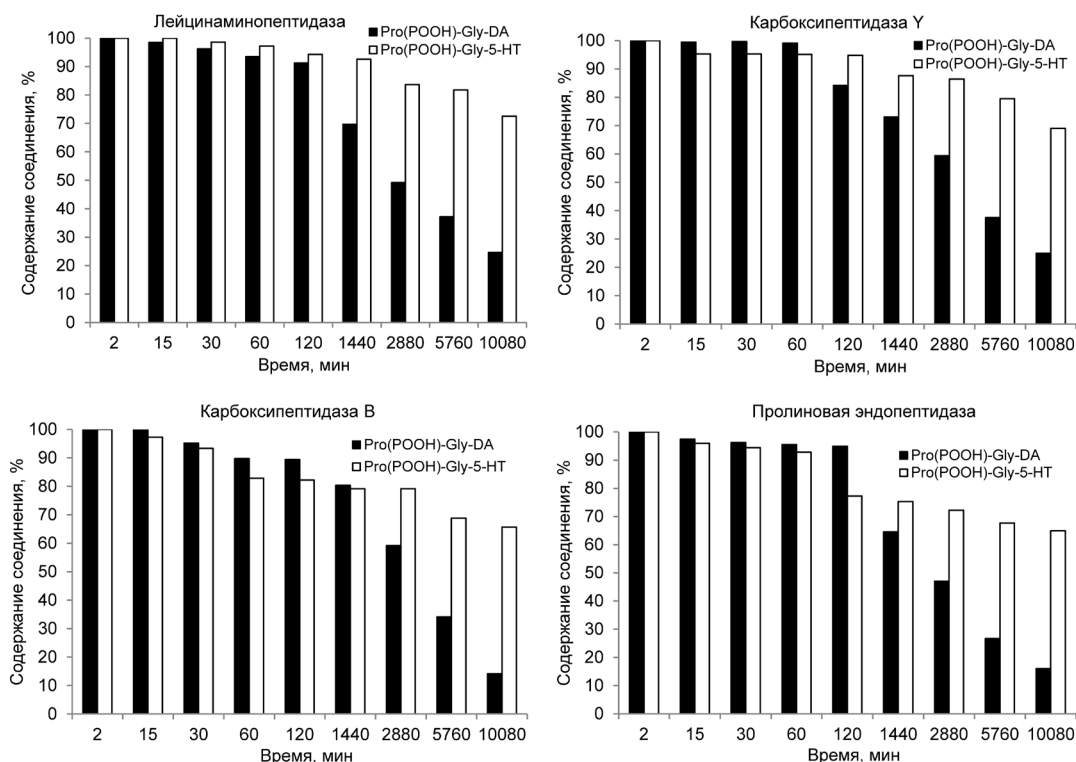


Рис. 1. Деградация Pro-(POOH)-Gly-DA (I) и Pro-(POOH)-Gly-5-HT (II) в присутствии протеаз.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектральные данные ЯМР ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ и DEPT ^{13}C , включая данные двумерного ЯМР ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMBC и ^1H - ^{13}C HSQC, регистрировали на приборе DPX-200 (Bruker, Германия) и ЯМР-спектрометре Quantum-I Plus 400 (Q.One, Китай).

Для анализа реакционных смесей использовали методы ВЭЖХ и масс-спектрометрии. Анализ реакционных смесей проводили на хроматографе Милихром-А02 (Эконова, Россия) с использованием колонки ProntoSIL-120-5- C_{18} AQ (2×75 мм, размер частиц 5 мкм). Подвижная фаза: система А – 200 мМ LiClO_4 + 5 мМ HClO_4 , система В – метанол. Элюирование проводили с применением линейного градиента за 12.5 мин при скорости потока 0.15 мл/мин.

Для Z-Pro-(POOAd)-Gly-DA и Z-Pro-(POOAd)-Gly-5-HT (время удерживания 8.20 и 8.64 мин соответственно) и для Pro-(POOAd)-Gly-DA и Pro-(POOAd)-Gly-5-HT (время удерживания 4.35 и 4.48 мин соответственно) использовали градиент 50–100% В; для соединений (I) и (II) – градиент 0–50% В (время удерживания 6.07 и 7.21 мин соответственно).

Масс-спектры получали на приборе LCQ Advantage MAX (Термоэлектрон, США), с ионизацией электрораспылением, прямым вводом раствора образца с концентрацией 10 мкг/мл в метаноле и дальнейшей фрагментацией молекулярного пика в анализаторе методом ионных соударений при 35 эВ (табл. 1).

Синтез Z-Pro(POOAd)-Gly-OH (VI). К перемешиваемому охлажденному до 5°C раствору 1.7 г (10 ммоль) 2-этоксикарбонил-этилфосфоновой кислоты (III) в 20 мл ацетилхлорида в токе аргона добавляли по каплям 2.9 г (11 ммоль) диметилацетата 4-(N-бензилоксикарбонил)-аминобутиральдегида (V) в 4 мл смеси уксусной и трифторуксусной кислот ($\text{AcOH} : \text{TFA} \sim 1 : 3$). Образовавшуюся смесь перемешивали при постепенном самонагревании до комнатной температуры. За ходом реакционного процесса наблюдали с помощью ^{31}P -ЯМР-спектроскопии. По завершении реакции смесь разбавляли 20 мл хлористого метилена и упаривали в вакууме. Маслообразный остаток распределяли между этилацетатом и водой (25/10 мл), органический слой дополнительно промывали водой (2×10 мл) и упаривали в вакууме. Данные масс-спектров приведены в табл. 1. Согласно данным ^1H - и ^{31}P -ЯМР-спектроскопии, остаток представлял

Таблица 1. Молекулярные пики производных дофамина и серотонина и их фрагментация

Соединение	MW*	$[M + H]^+$	Фрагментация $[M + H]^+$	$[M - H]^-$	Фрагментация $[M - H]^-$
Z-Pro-(POOAd)-Gly (VI)	475.2	476.2	363.0 (100) 203.7 (21) 323.7 (18)	474.1	322.1 (100) 214.2 (20) 172.3 (5)
Z-Pro-(POOAd)-Gly-DA (VIII)	610.3	611.3	–	609.3	–
Z-Pro-(POOAd)-Gly-5-HT (IX)	633.3	634.2	503.2 (100) 616.2 (41) 572.3 (28)	632.2	367.1 (100) 372.2 (94) 480.1 (85)
Pro-(POOAd)-Gly-DA (X)	476.2	477.2	408.1 (100)	475.2	254.2 (100) 406.2 (88) 236.3 (8)
Pro-(POOAd)-Gly-5-HT (XI)	499.3	500.3	431.2 (100) 413.1 (8)	498.3	498.3 (100) 429.3 (46) 188.3 (11)
Pro-(POOH)-Gly-DA (I)	342.1	343.0	274.0 (100)	341.3	272.3 (100) 205.3 (18) 152.3 (12)
Pro-(POOH)-Gly-5-HT (II)	365.1	366.1	297.1 (100)	364.1	264.3 (100) 295.3 (62) 188.3 (30)

Примечание: в скобках приведены относительные интенсивности.

* Моноизотопный молекулярный вес.

собой 1-*N*-(бензилоксикарбонил)пирролидин-2-ил-2'-этоксикарбонил-этилфосфиную кислоту (Z-Pro(POOH)-Gly-OEt) (IV), которая была использована в дальнейших превращениях без дополнительной очистки. Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 1.22 т (3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}}$ 7.0), 1.80–2.40 м (6H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}_{\text{цикл.}}$ + PCH_2), 2.45–2.75 м (2H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$), 3.35–3.63 м (3H, CH_2N , CHN), 4.11 к (2H, CH_2O , $^3J_{\text{HH}}$ 7.0), 5.11 уш. с. (2H, PhCH_2O), 7.33 уш.с (5H, Ph), 8.87 уш.с. (1H, POOH). Спектр ^{31}P -ЯМР (CDCl_3): 55.6*, 55.7*, 56.1, 56.5*. Сигналы, отмеченные звездочкой, относятся к минорным диастереомерным и конформерным формам. Дальнейшие превращения соединения (IV) и синтез фосфинового *N,P*-дизащищенного блока (VI) проводили в соответствии с ранее опубликованными процедурами (схема 4) [18–20].

Синтез Z-Pro-(POOAd)-Gly-Su (VII). Раствор соединения (VI) (135 мг, 0.28 ммоль) в 4 мл диоксана

обрабатывали HONSu (33 мг, 0.29 ммоль) и DCC (64 мг, 0.31 ммоль). Перемешивание раствора продолжали в течение 20 ч. Выпавшую мочевину отделяли центрифугированием. Осадок дважды промывали 1 мл диоксана и центрифугировали. Диоксан удаляли упариванием при пониженном давлении, остаток лиофилизировали.

Синтез Z-Pro-(POOAd)-Gly-DA (VIII). Соединение (VII) (0.21 ммоль) растворяли в 1.5 мл диметилформаида. К раствору добавляли DA (0.2 ммоль) в 1.5 мл воды с 50 мкл триэтиламина. Раствор перемешивали в течение 20 ч. Растворитель упаривали, остаток растворяли в 4 мл метанола. Первоначальную очистку проводили, как описано выше. Данные масс-спектров приведены в табл. 1. Выход соединения (VIII) составил 40–60%.

Синтез Z-Pro-(POOAd)-Gly-5-HT (IX). Соединение (VII) (71 мкмоль) растворяли в 1.5 мл метанола и при перемешивании добавляли 5-HT (80 мкмоль) в 1.5 мл метанола с 30 мкл триэтиламина. Раствор перемешивали 20 ч. Растворитель упаривали, остаток растворяли в 4 мл метанола. Первоначальную очистку проводили, как описано выше. Данные масс-спектров приведены в табл. 1. Выход соединения (IX) составил 60–70%.

Синтез Pro-(POOAd)-Gly-DA (X). Раствор 25 мг (VIII) в 6 мл этанола с 50 мкл CH_3COOH перемешивали с 18 мг 5% PdO/BaSO_4 в атмосфере водорода в течение 3 ч. Катализатор удаляли центрифугированием. Осадок дважды промывали 1 мл этанола. Экстракты объединяли и упаривали. Первоначальную очистку проводили, как описано выше. Данные масс-спектров приведены в табл. 1. Гидрогенолиз также проводили, обрабатывая раствор 25 мг соединения (VIII) в 8 мл метанола в атмосфере водорода в течение 3 ч в присутствии 16 мг 10% Pd/C . Выход соединения (X) составил 75–80%.

Синтез Pro-(POOAd)-Gly-5-HT (XI). Раствор 13 мг соединения (IX) в 4 мл этанола с 50 мкл CH_3COOH перемешивали с 17 мг 5% PdO/BaSO_4 в атмосфере водорода в течение 3 ч. Катализатор удаляли центрифугированием. Осадок дважды промывали 1 мл этанола. Экстракты объединяли и упаривали. Первоначальную очистку проводили, как описано выше. Данные масс-спектров приведены в табл. 1. Гидрогенолиз также проводили, обрабатывая раствор 12 мг Z-Pro-(POOAd)-Gly-5-HT (IX) в 4 мл метанола в атмосфере водорода в течение 3 ч в присутствии 16 мг 10% Pd/C . Выход соединения (XI) составил 80–85%.

Синтез Pro-(POOH)-Gly-DA (I). Соединение (X) (10 мг) растворяли в 0.2 мл хлороформа и обрабатывали 0.2 мл CF_3COOH в течение 30 мин. Реакционную массу упаривали в вакууме. Данные масс-спектров приведены в табл. 1. Выход соединения (I) составил 88%. ^1H -ЯМР (399.9 МГц, D_2O): 6.77 (д, 1H, 5-CH DA, $^3J_{\text{HH}}$ 8.1), 6.70 (д, 1H, 2-CH DA, $^4J_{\text{HH}}$ 1.3), 6.62 (дд, 1H 6-CH DA, $^3J_{\text{HH}}$ 8.1, $^4J_{\text{HH}}$ 1.4), 3.41 (дт, 1H, CHP Pro, $^2J_{\text{HP}}$ 3.6, $^3J_{\text{HH}}$ 8.7), 3.32 (т, 2H, CH_2N DA, $^3J_{\text{HH}}$ 6.6), 3.29 (т, 2H, CH_2N Pro, $^3J_{\text{HH}}$ 7), 2.61 (т, 2H, CH_2 DA, $^3J_{\text{HH}}$ 6.6), 2.31 (дт, 2H, CH_2 Gly, $^3J_{\text{HP}}$ 8.7, $^3J_{\text{HH}}$ 8.1), 2.13–2.20 (м, 1H, CH_2 Pro), 2.00–2.07 (м, 1H, CH_2 Pro), 1.90–2.00 (м, 1H, CH_2 Pro), 1.85–2.00 (м, 1H, CH_2 Pro), 1.73 (ддд, 2H, CH_2P Gly, $^2J_{\text{HP}}$ 15, $^3J_{\text{HH}}$ 9, $^3J_{\text{HH}}$ 6). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -ЯМР (100.55 МГц, D_2O): 175.32 (д, $^3J_{\text{PC}}$ 14.7, CON Gly), 144.20 (3-C DA), 142.71 (4-C DA), 132.43 (1-C DA), 121.63 (6-CH DA), 117.11 (2-CH DA), 116.58 (5-CH DA), 56.97 (д, CHP Pro,

$^1J_{\text{PC}}$ 93.0), 47.59 (д, CH_2N Pro, $^{3/4}J_{\text{PC}}$ 4.8), 41.04 (CH_2N DA), 34.18 (CH_2 DA), 28.64 (д, CH_2CO Gly, $^2J_{\text{PC}}$ 3.2), 25.77 (CH_2 Pro), 25.45 (д, CH_2P Gly, $^1J_{\text{PC}}$ 96.6), 24.33 (д, CH_2 Pro, $^2J_{\text{PC}}$ 7.2). ^{31}P -ЯМР (161.87 МГц, D_2O): 34.01.

Синтез Pro-(POOH)-Gly-5-HT (II). Соединение (XI) (10 мг) растворяли в 0.2 мл хлороформа и обрабатывали 0.2 мл CF_3COOH в течение 30 мин. Реакционную массу упаривали в вакууме. Данные масс-спектров приведены в табл. 1. Выход соединения (II) составил 88%. ^1H -ЯМР (399.9 МГц, D_2O): 7.32 (д, 1H, 7-CH 5-HT, $^3J_{\text{HH}}$ 8.7), 7.15 (1H, 2-CH 5-HT), 7.02 (д, 1H, 2-CH 5-HT, $^4J_{\text{HH}}$ 1.7), 6.76 (дд, 1H, 6-CH 5-HT, $^3J_{\text{HH}}$ 8.7, $^4J_{\text{HH}}$ 2.0), 3.43 (т, 2H, CH_2N 5-HT, $^3J_{\text{HH}}$ 6.6), 3.30 (дт, 1H, CHP Pro, $^2J_{\text{HP}}$ 3.7, $^3J_{\text{HH}}$ 8.6), 3.26 (т, 2H, CH_2N Pro, $^3J_{\text{HH}}$ 7), 2.86 (т, 2H, CH_2 5-HT, $^3J_{\text{HH}}$ 6.6), 2.28 (дт, 2H, CH_2 Gly, $^3J_{\text{HP}}$ 8.7, $^3J_{\text{HH}}$ 8.1), 2.05–2.15 (м, 1H, CH_2 Pro), 1.98–2.06 (м, 1H, CH_2 Pro), 1.88–1.96 (м, 1H, CH_2 Pro), 1.83–1.96 (м, 1H, CH_2 Pro), 1.64 (ддд, 2H, CH_2P Gly, $^2J_{\text{HP}}$ 14, $^3J_{\text{HH}}$ 8, $^3J_{\text{HH}}$ 6). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -ЯМР (100.55 МГц, D_2O): 175.41 (д, $^3J_{\text{PC}}$ 14.7, CON Gly), 148.96 (CON 5-HT), 131.86 (7a-C 5-HT), 128.21 (3a-C 5-HT), 125.14 (2-CH 5-HT), 113.07 (7-CH 5-HT), 111.93 (6-CH 5-HT), 111.85 (3-C 5-HT), 103.21 (4-CH 5-HT), 57.01 (д, CHP Pro, $^1J_{\text{PC}}$ 92.6), 47.52 (д, CH_2N Pro, $^{3/4}J_{\text{PC}}$ 4.8), 40.61 (CH_2N 5-HT), 28.77 (д, CH_2CO Gly, $^2J_{\text{PC}}$ 3.6), 25.74 (CH_2 Pro), 25.39 (д, CH_2P Gly, $^1J_{\text{PC}}$ 96.6), 24.49 (CH_2 5-HT), 24.31 (д, CH_2 Pro, $^2J_{\text{PC}}$ 7.2). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -ЯМР (161.87 МГц, D_2O): 33.16.

Устойчивость соединений (I) и (II). Изучение ферментативного гидролиза фосфиновых кислот псевдопептидов (I) и (II) проведено с использованием коммерческих препаратов ряда аминокислот- и эндопептидаз: лейцинаминопептидазы (К.Ф. 3.4.11.2, тип VI, микросомальная из почки свиньи, 78 ед. акт./мг, Sigma-Aldrich, США), карбоксипептидазы Y (К.Ф. 3.4.16.1, из хлебопекарных дрожжей, 92 ед. акт./мг, Sigma-Aldrich, США), карбоксипептидазы B (К.Ф. 3.4.17.2, из поджелудочной железы свиньи, 77 ед. акт./мг, Sigma-Aldrich, США) и пролиновой эндопептидазы (К.Ф. 3.4.21.26, из флавобактерий, 55 ед. акт./мг, Sigma-Aldrich, США).

Ферментативный гидролиз фосфор-содержащих пептидных производных дофамина (I) и серотонина (II) проводили по следующей методике. К раствору 1 мкмоль субстрата в 270 мкл фосфатно-солевого буфера (27.4 mM NaCl, 0.4 mM KCl, 2 mM Na_3PO_4 , pH 7.4) добавляли фермент – или 1.90 ед. акт. лейцинаминопептидазы, или 11.04 ед. акт. карбоксипептидазы Y, или 9.24 ед. акт. карбоксипептидазы B, или 3.96 ед. акт. пролино-

вой эндопептидазы – в этом же буфере. Инкубационную смесь перемешивали и термостатировали при 30°C, отбирая аликвоты по 25 мкл через определенные промежутки времени. Остановку ферментативного гидролиза осуществляли добавлением к отбираемым пробам равного объема метанола. Пробы, отобранные через заданные промежутки времени, анализировали методом ВЭЖХ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые осуществлена конденсация фосфинового псевдо-Pro-(POOH)-Gly-дипептида и DA или 5-НТ в одной молекуле путем образования классической пептидной связи. Синтезированы соединения Pro-(POOH)-Gly-DA (**I**) и Pro-(POOH)-Gly-5-НТ (**II**) в свободной водорастворимой форме.

Установлено, что свободные соединения (**I**) и (**II**) ферментативно устойчивы в присутствии пролиновой эндопептидазы, лейцинаминопептидазы, карбоксипептидаз Y и B, следовательно, они могут рассматриваться как гибридные соединения, повышающие устойчивость биогенных аминов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа по получению фосфинового производного дофамина и серотонина, определению их масс-спектрометрических параметров и исследованию их устойчивости к действию протеолитических ферментов частично проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”, а работа по синтезу фосфинового предшественника и получению данных ЯМР частично проведена в рамках плановой темы ИФАВ РАН № FFSG-2024-0019.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов. Информированное согласие не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

ВПШ – проведение экспериментов по конденсации биогенных аминов (DA и 5-НТ) с фосфиновым дипептидом, участие в написании текста; МЭД, АВБ, ДЕИ – проведение экспериментов по синтезу фосфинового дипептида Z-Pro(POOAd)-Gly; КВШ – проведение экспериментов по исследованию ферментативной устойчивости соединений (**I**) и (**II**); ИЮН – обеспечение работы по очистке (ВЭЖХ) и анализу (масс-спектрометрия); ЛАА – оформление сопроводительной документации

и консультации по получению гибридных соединений; ВВР и НФМ – концепция статьи и обсуждение результатов, руководство работами.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Simon D.K., Tanner C.M., Brundin P. // Clin. Geriatr. Med. 2020. V. 36. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.08.002>
2. Blier P., El Mansari M. // Philos. Trans. R Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2013. V. 368. P. 20120536.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0536>
3. Shevchenko K.V., Nagaev I.Yu., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F., Bezuglov V.V., Akimov M.G. // Dokl. Biochem. Biophys. 2017. V. 476. P. 333–336.
<https://doi.org/10.1134/S1607672917050118>
4. Akimov M.G., Gretskeya N.M., Shevchenko K.V., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F., Bobrov M.Yu., Bezuglov V.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2007. V. 33. P. 602–606.
<https://doi.org/10.1134/S1068162007060118>
5. Bobrov M.Yu., Lyzhin A.A., Andrianova E.L., Gretskeya N.M., Zinchenko G.N., Frumkina L.E., Khaspekoy L.G., Bezuglov V.V. // Bull. Exp. Biol. Med. 2006. V. 142. P. 425–427.
<https://doi.org/10.1007/s10517-006-0383-x>
6. Bobrov M.Yu., Lzhin A.A., Andrianova E.L., Gretskeya N.M., Frumkina L.E., Khaspekoy L.G., Bezuglov V.V. // Neurosci. Lett. 2008. V. 431. P. 6–11.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.11.010>
7. Kratz F. // Patent US 7803903 B2, 2010.
8. Zhang Y., Zhang X., Lui H., Cai S., Wu B., Wang H. // Int. J. Nanomed. 2015. V. 10. P. 1625–1636.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S75954>
9. Chen Y., Hu L. // Med. Res. Rev. 2009. V. 29. P. 29–64.
<https://doi.org/10.1002/med.20137>
10. Pozdnyakova A.N., Cheremnykh E.G., Sokolov O.Yu., Kost N.V., Shevchenko K.V., Shevchenko V.P., Nagaev I.Yu., Andreeva L.A., Myasoedov N.F. // Dokl. Biochem. Biophys. 2021. V. 497. P. 104–107.
<https://doi.org/10.1134/S1607672921020125>
11. Shevchenko V.P., Andreeva L.A., Nagaev I.Yu., Myasoedov N.F. // Dokl. Chem. 2019. V. 485. P. 87–90.
<https://doi.org/10.1134/S0012500819030030>
12. Shevchenko V.P., Andreeva L.A., Nagaev I.Yu., Shevchenko K.V., Myasoedov N.F. // Radiochemistry. 2020. V. 62. P. 400–405.
<https://doi.org/10.1134/S1066362220030133>
13. Shevchenko V.P., Andreeva L.A., Shevchenko K.V., Nagaev I.Yu., Myasoedov N.F. // Radiochemistry. 2020. V. 62. P. 539–542.
<https://doi.org/10.1134/S1066362220040116>

14. Shevchenko K.V., Nagaev I.Yu., Andreeva L.A., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F. // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B.* 2019. V. 13. P. 179–201. <https://doi.org/10.1134/S1990750819030089>
15. Shevchenko K.V., Andreeva L.A., Nagaev I.Yu., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F. // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B.* 2020. V. 14. P. 150–158. <https://doi.org/10.1134/S1990750820020110>
16. Vinyukov A.V., Dmitriev M.E., Andreeva L.A., Ustyugov A.A., Shevchenko V.P., Sidoruk K.N., Lednev B.V., Freyman V.M., Dobrovolskiy Y.A., Ragulin V.V., Myasoedov N.F. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2021. V. 539. P. 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.12.087>
17. Collinsova M., Jiracek J. // *Curr. Med. Chem.* 2000. V. 7. P. 629–647. <https://doi.org/10.2174/0929867003374831>
18. Dmitriev M.E., Ragulin V.V. // *Tetrahedron Lett.* 2012. V. 53. P. 1634–1636. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.01.094>
19. Dmitriev M.E., Golovash S.R., Borodachev A.V., Ragulin V.V. // *J. Org. Chem.* 2021. V. 86. P. 593–600. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c02259>
20. Vinyukov A.V., Dmitriev M.E., Afanasiev A.V., Ragulin V.V., Andreeva L.A., Myasoedov N.F. // *Russ. J. Gen. Chem.* 2017. V. 17. P. 266–271. <https://doi.org/10.1134/S1070363217020189>
21. Shelkovernikova T.A., Kulikova A.A., Tsvetkov Ph.O., Peters O., Bachurin S.O., Buchman V.L., Ninkina N.N. // *Mol. Biol.* 2012. V. 46. P. 362–374. <https://doi.org/10.1134/S0026893312020161>
22. Shevchenko K.V., V'yunova T.V., Nagaev I.Yu., Andreeva L.A., Myasoedov N.F. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2013. V. 39. P. 283–287. <https://doi.org/10.1134/S1068162013030151>
23. Shevchenko K.V., V'yunova T.V., Andreeva L.A., Nagaev I.Yu., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F. // *Pharm. Chem. J.* 2015. V. 49. P. 82–87. <https://doi.org/10.1007/s11094-015-1226-8>

Synthesis And Study of Enzymatic Stability of Phosphinic Pseudo-Pro-Gly-Tripeptide Derivatives of Dopamine and Serotonin

V. P. Shevchenko*, M. E. Dmitriev**, K. V. Shevchenko*, #, A. V. Borodachev**,
I. Yu. Nagaev*, D. E. Ivanov**, L. A. Andreeva*, V. V. Ragulin**, and N. F. Myasoedov*

Phone: +7 (499) 196-02-16; e-mail: ATCarma@mail.ru

* National Research Centre “Kurchatov Institute”, pl. Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

** Institute of Physiologically Active Compounds, Federal Research Center of Problems of Chemical Physics
and Medicinal Chemistry of the Russian Academy of Sciences,
Severnoy prosp 1, Chernogolovka, 142432 Russia

A combination of the phosphinic structural isostere Pro-(POOH)-Gly and bioactive amines dopamine and serotonin in one molecule was achieved by forming a classical peptide bond. Phosphinic tripeptides Pro-(POOH)-Gly-DA and Pro-(POOH)-Gly-5-HT were synthesized in free water-soluble form. A modification of the previously published procedure made it possible to obtain the *N,P*-diprotected building block Z-Pro-(POOAd)-Gly-OH, which was converted to Z-Pro-(POOAd)-Gly-Su with an activated carboxyl moiety. The latter was condensed with dopamine and serotonin. The free compounds Pro-(POOH)-Gly-DA and Pro-(POOH)-Gly-5-HT were obtained by removing *N*-Cbz group by catalytic hydrogenation and the adamantyl ether group with trifluoroacetic acid. It was found that free compounds Pro-(POOH)-Gly-DA and Pro-(POOH)-Gly-5-HT are enzymatically stable in the presence of proline oligopeptidase, leucine aminopeptidase, and carboxypeptidases Y and B, therefore, they can be considered as hybrid compounds that show the potential to increase the stability of biogenic amines. In addition, during the hydrolysis of Pro-(POOH)-Gly-DA and Pro-(POOH)-Gly-5-HT compounds *in vivo*, the formed phosphinic acid analogue of Pro-Gly may be useful in the treatment of a number of pathologies.

Keywords: pseudo-peptide building block Z-Pro-(POOAd)-Gly-OH, synthesis of pseudo-tripeptide derivatives of dopamine and serotonin, enzymatic stability of phosphine tripeptides Pro-Gly-DA and Pro-Gly-5-HT