



УДК 54.057+577.171.7+615.015.35+615.099.092

ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА И ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ТРИПТОФАНСОДЕРЖАЩЕГО АНАЛОГА АРГИНИН-ВАЗОПРЕССИНА

© 2025 г. К. В. Бородина*, #, Е. И. Квятковская*, В. П. Мартинович*, О. В. Грибовская*,
О. В. Панибрат*, Т. В. Чукарина*, С. Э. Огурцова*, Р. Д. Зильберман*, О. Н. Саванец*,
Л. М. Ольгомец*, А. О. Савин*, И. В. Жебракова*, Е. В. Кравченко*

* Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Беларусь, 220084 Минск, ул. Акад. Купревича, 5/2

Поступила в редакцию 18.02.2025 г.

После доработки 11.03.2025 г.

Принята к публикации 12.03.2025 г.

Среди ранее исследованных аналогов C-концевого фрагмента аргинин-вазопрессина (АВП) большой интерес в качестве потенциальной фармацевтической субстанции представляет тетрапептид Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂, продемонстрировавший в опытах с грызунами антидепрессантоподобную и анксиолитическую (противотревожную) активность. В данной работе рассмотрены особенности синтеза триптофансодержащего аналога АВП, предложена новая “блочная” схема получения пептида, позволяющая нарабатывать его с большими выходами, чем было показано ранее. Также проведены токсикологические исследования тетрапептида Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ *in vitro* и *in vivo*. Исследования *in vitro* продемонстрировали низкую цитотоксичность в отношении культуры клеток фибробластов кожи человека ($IC_{50} > 1000$ мкМ). Исследование острой токсичности в эксперименте на мышах ICR не выявило токсического действия тетрапептида Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂. Низкая токсичность тетрапептида, продемонстрированная в данном исследовании, делает перспективными дальнейшие исследования биологической активности, токсичности и механизмов действия триптофансодержащего аналога АВП с целью создания на его основе новых более безопасных и эффективных анксиолитиков и антидепрессантов.

Ключевые слова: аргинин-вазопрессин, пептидный синтез в растворе, острая токсичность, цитотоксичность, фибробlastы, мыши

DOI: 10.7868/S1998286025060042

ВВЕДЕНИЕ

Аргинин-вазопрессин (АВП), известный также как антидиуретический гормон, обладает широким спектром биологических функций в организме человека. В зависимости от типа рецепторов, с которыми он взаимодействует, и их расположения в организме АВП может играть роль как гормона, так и нейромедиатора [1]. Начиная с 80-х гг. XX века, активно изучается способность АВП, его фрагментов и аналогов влиять на поведение и память животных и человека [2]. Примером

таких соединений могут служить тетрапептидные аналоги C-концевого фрагмента молекулы антидиуретического гормона с общей формулой Ac-Xaa-Pro-Arg-Gly-NH₂ (где Xaa = Trp, Phe, Ser, D-Ser, D-Met, Tyr), которые при интраназальном введении в той или иной степени оказывают воздействие на поведение и память грызунов [3–6]. В частности, большой интерес представляет тетрапептид Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂, который в дозах 0.10–10 мкг/кг демонстрирует анксиолитическую (противотревожную) и антидепрессантоподобную активность, влияет на ультрадианные ритмы

Сокращения: АВП – аргинин-вазопрессин.

Автор для связи: (эл. почта: borodina@iboch.by).

активности (биологические циклы продолжительностью менее 24 ч – от нескольких минут до 20 ч) и память грызунов [3–6]. Перечисленные свойства триптофансодержащего аналога АВП делают его объектом исследования в качестве потенциальной фармацевтической субстанции антидепрессантов и ноотропных лекарственных средств. По этой причине необходимо установить токсические свойства тетрапептида Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂, что может быть сопряжено с некоторыми трудностями, которые включают, в первую очередь, наработку тетрапептида в достаточном количестве, позволяющем ввести его опытным животным в максимально возможной концентрации. Ранее опубликованная схема синтеза тетрапептида Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ отличается трудоемкостью этапов очистки и значительными потерями целевого продукта на этих стадиях, а также вероятностью возникновения стереоизомеров [3].

Цель данной работы – модификация схемы синтеза тетрапептида Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ (V) для увеличения выхода целевого продукта и исследование его токсических свойств.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее опубликованная схема синтеза тетрапептида Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ (V) представляет собой вариацию последовательного наращивания пептидной цепи (схема 1a) [3]. Указанный способ

получения тетрапептида имеет неоспоримые достоинства: простота, легкое разделение диастереомеров на стадии получения дипептида (Boc-Pro-Arg-OH), высокие постадийные выходы (60–95%) [3]. Однако стоит отметить, что реакция присоединения остатка Ac-Trp сопряжена с высокими рисками рацемизации. По этой причине схема 1a впоследствии была скорректирована, и в нее были добавлены еще две стадии синтеза с целью снижения вероятности оптической изомеризации (схема 1b). Дополнительно введенные этапы характеризуются высокими выходами реакции (68–89%), однако их добавление привело к снижению общего выхода с 33% (схема 1a) до 23% (схема 1b), а также к очередным потерям целевых пептидов при очистке на дополнительно введенных стадиях (до 50%). Неэффективность и трудоемкость выделения промежуточных соединений и конечного продукта по указанной методике, снижение общего выхода по схеме 1b вызвало необходимость поиска новых путей сборки тетрапептида (V).

При подборе новых условий синтеза учитывали ряд факторов. Во-первых, промежуточные и побочные продукты реакций должны легко отделяться от целевого соединения, а значит, их физические свойства должны отличаться. Во-вторых, схема синтеза должна состоять из как можно меньшего количества стадий, что влечет за собой использование минимального количества защитных групп, а также применение промежуточных

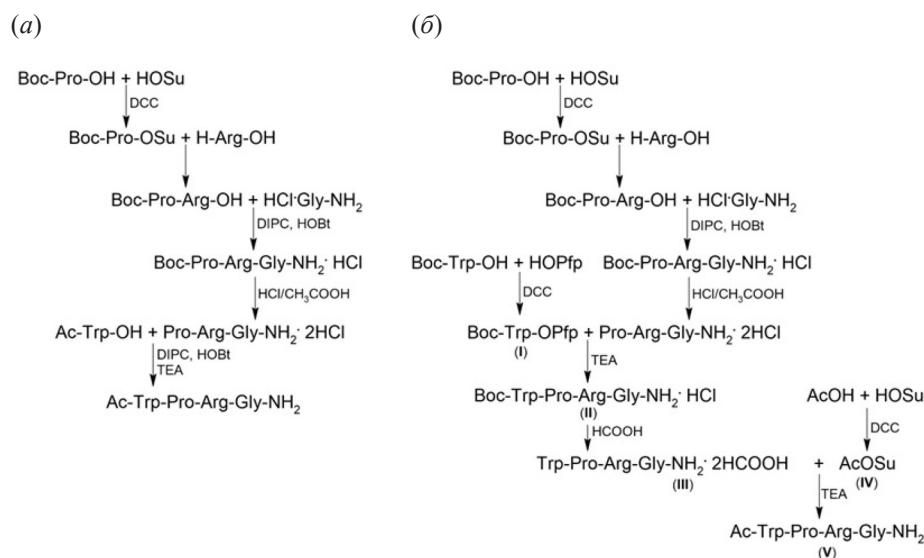


Схема 1. Методики синтеза тетрапептида (V) путем последовательного наращивания цепи.

пептидов или их активированных эфиров без выделения. На основании вышеизложенного было предложено кардинально изменить подход к сборке цепи (V) – осуществить сшивку тетрапептида из двух дипептидных “блоков”. Предположительно, сшиваемые фрагменты должны значительно отличаться по физическим свойствам от целевого тетрапептида и, следовательно, легче отделяться при очистке тетрапептида (V). Таким образом, была предложена новая “блочная” схема сборки для данного тетрапептида (схема 2).

Стратегию получения пептидов конденсацией блоков, иначе конвергентного синтеза, зачастую используют для сборки более крупных молекул (>5 а.о.), но в случае тетрапептида (V) идея ее применения оказалась весьма привлекательной, в частности из-за наличия остатка Pro, который рекомендуют применять в качестве C-концевых аминокислотных остатков сшиваемых “блоков” [7]. Такой способ сборки позволяет вводить защищенный протонированием остаток Arg в реакцию в присутствии основания только на последней стадии, в отличие от схемы 1б, что облегчает сохранение протона на гуанидиновой группе аминокислотного остатка.

Синтез блоков (IX) и (XI) осуществляли классическими методами пептидной химии в растворе с использованием карбодиимидного метода и метода активированных эфиров (схема 2). Полупродукты синтеза соединений (VI) и (IX) выделяли с применением экстракции и промывок с последующей перекристаллизацией. Ускорить процесс синтеза можно, проводя реакции кон-

денсации без выделения активированных эфиров (I) и (IX). В таком случае эфиры стоит применять с более чем 15%-ным избытком и обязательно тщательно очищать получившиеся в ходе реакции продукты.

Условия удаления Boc-защитной группы с дипептидов (VI) и (X) подбирали, исходя из свойств дипептидов и возможных побочных реакций. Для дипептида Boc-Trp-Pro-OH было испытано два метода снятия защиты: с использованием концентрированной муравьиной кислоты и 4 н. HCl/CH₃COOH в присутствии меркаптоэтанола, очистку проводили методом перекристаллизации. В обоих случаях снятие Boc-защиты с дипептида (VI) происходит полностью, по данным ВЖЭХ после выделения и перекристаллизации получены однофазные соединения (рис. 1). Исходя из результатов масс-спектрометрического анализа проб, в обоих образцах не наблюдается *трет*-бутилирования индольного кольца остатка Trp (рис. 1а, 1б). Однако при удалении защиты в растворе 4 н. HCl/CH₃COOH в качестве наиболее интенсивного молекулярного иона в положительном поле масс-спектра наблюдается незаряженная частица с *m/z* 316.2 (рис. 1б) вместо ожидаемого однозарядного иона с *m/z* 302.2, который встречается в масс-спектре, но со значительно меньшей интенсивностью.

Такие результаты анализа могут свидетельствовать о вероятном протекании процессов окисления индольного кольца остатка триптофана в таких условиях. При деблокировании пептида (VI) муравьиной кислотой подобный пик не детекти-

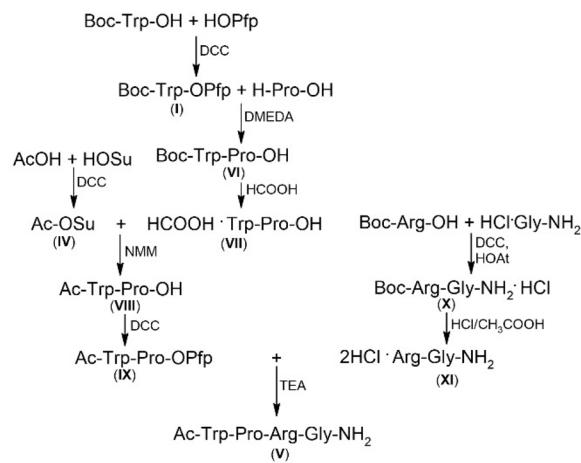


Схема 2. Блочная схема синтеза тетрапептида (V).

руется, а частица с m/z 302.2 – наиболее часто встречающийся ион (рис. 1). Таким образом, предпочтительный реагент для снятия Вос-защитной группы – 98–10%-ная HCOOH.

Деблокирование соединения (X) осуществляли раствором 4 М HCl/CH₃COOH (схема 2). В результате выход соли дипептида на данном этапе составил 85%, реакция протекала в течение 2.5 ч. Дополнительно была исследована возможность снятия Вос-группы с дипептида (X) с помощью 25%-ного раствора TFA/CH₂Cl₂. Реакция протекала ~5 ч, получили соль 2TFA·Arg-Gly-NH₂ с выходом 76%. Увеличение длительности процесса деблокирования и снижение выхода, вероятно, связаны с плохой растворимостью Boc-Arg-Gly-NH₂·HCl и продукта реакции в смеси TFA/CH₂Cl₂. В ходе реакции раствор в колбе расслаивался, и снятие защитной группы, вероятно, происходило на границе образовавшихся фаз. Однако данный способ также позволяет получить монофазный продукт по данным ВЭЖХ после процедуры перекристаллизации.

Первоначально для сшивки дипептидных блоков применяли карбодиимидный метод, в качестве конденсирующего агента использовали DCC в присутствии HOBr как противоракемической до-

бавки. Конденсировали эквимолярные количества Ac-Trp-Pro-OH и 2HCl·Arg-Gly-NH₂. Реакция протекала в течение 1 сут с выходом тетрапептида 62%. В дальнейшем было предложено использовать метод активированных эфиров для конденсации “блоков” (схема 2). Такой метод позволил ускорить процесс сшивки (15 ч), увеличить выход реакции до 89% и облегчить очистку тетрапептида (V) от примесей триптофана содержащего блока (IX), который легко удалялся в процессе перекристаллизации из смеси MeOH/EtOAc.

Выход по блочной схеме синтеза (схема 2) составляет 65%, что значительно превышает выходы по методикам, представленным на схеме 1. Финальная очистка представляла собой колоночную хроматографию, аналогичную описанной ранее [3]. Полученный таким образом тетрапептид имеет идентичные физико-химические характеристики с тетрапептидом (V), синтезированным по схеме 1б.

Таким образом, предложена новая схема синтеза тетрапептида (V), позволяющая получить его с более высоким выходом и сократить количество стадий очистки с помощью колоночной хроматографии.

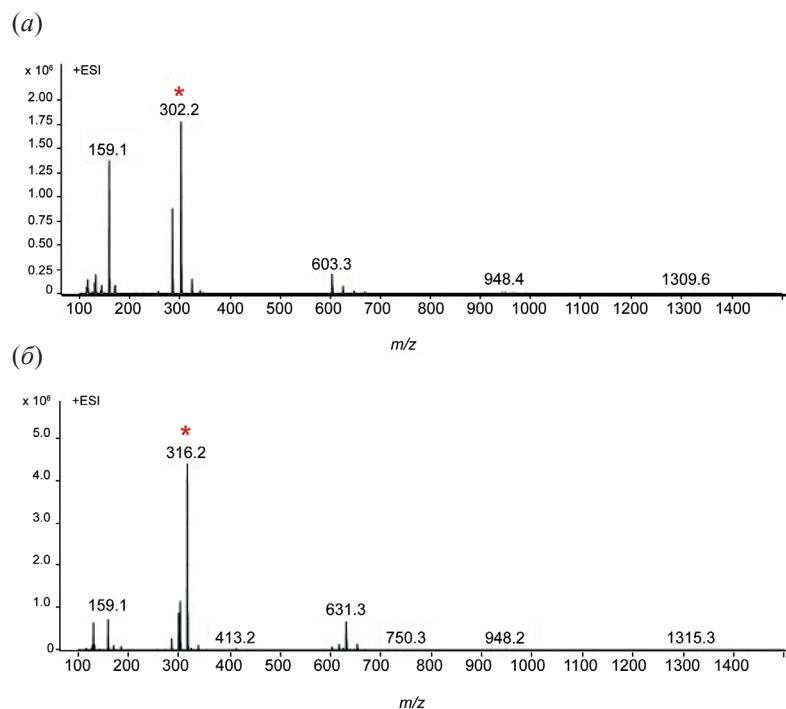


Рис. 1. Данные масс-спектрометрического анализа: (a) – HCOOH·Trp-Pro-OH (VII), (b) – HCl·Trp-Pro-OH.

Цитотоксическая активность тетрапептида Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ *in vitro*. МТТ-тест – один из самых широко применяемых способов оценки метаболической активности клеток, позволяющий оценить количество жизнеспособных клеток. Одна из важнейших проблем при создании препаратов с интраназальным способом введения – токсическое действие на эпителиальные клетки носовой полости, включающие мерцющий эпителий, фибробциты с вытянутыми ядрами, ацинусы, фибробlastы и др. [8]. По этой причине для оценки цитотоксичности тетрапептида (V) на данном этапе в качестве объекта исследования была выбрана клеточная культура фибробластов кожи человека.

В ходе эксперимента было установлено, что цитотоксический эффект тетрапептида (V) имеет выраженный дозозависимый характер (рис. 2).

Согласно полученным данным, введение тетрапептида в культуру клеток фибробластов кожи человека в концентрациях 0.00001–10 мкМ не привело к цитотоксическому эффекту, клетки сохранили жизнеспособность, способность к росту и пролиферации. Увеличение концентрации тетрапептида (V) до 100–1000 мкМ привело к снижению жизнеспособности клеток фибробластов на 12–18% (рис. 2). Таким образом, для исследуемого тетрапептида значение IC₅₀ значительно превышает 1000 мкМ.

Острая токсичность тетрапептида Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂. Следующим этапом исследования стало изучение острой токсичности тетрапептида *in vivo*, которое проводили на самцах и самках аутбредных мышей ICR. Тетрапептид вводили грызунам в максимально возможной для данного пути введения дозировке. На протяжении всего эксперимента в обеих группах животных летальных исходов не наблюдали, что делает невозможным расчет LD₅₀. Внешний вид особей обоих полов в ходе опыта не претерпевал изменений: мыши были ухоженными, с чистой, гладкой и блестящей шерстью, нормальными слизистыми оболочками. На протяжении всего эксперимента животные в каждой из групп были активны, подвижны, избегали захвата рукой, хорошо потребляли корм. Признаков нарушения экскреторной функции почек за время опытов выявлено не было, стул оставался в норме. Отмечен прирост массы тела у животных обеих групп, характерный для популяции интактных мышей ICR вивария Института биоорганической химии НАН Беларуси (рис. 3).

Один из важнейших параметров при изучении острой токсичности соединений в исследованиях на животных – изменение массы органов подопытных. Фиксация достоверных отклонений в массе тех или иных органов опытных групп животных от масс в контрольной группе может свидетельствовать о токсическом эффекте и быть инди-

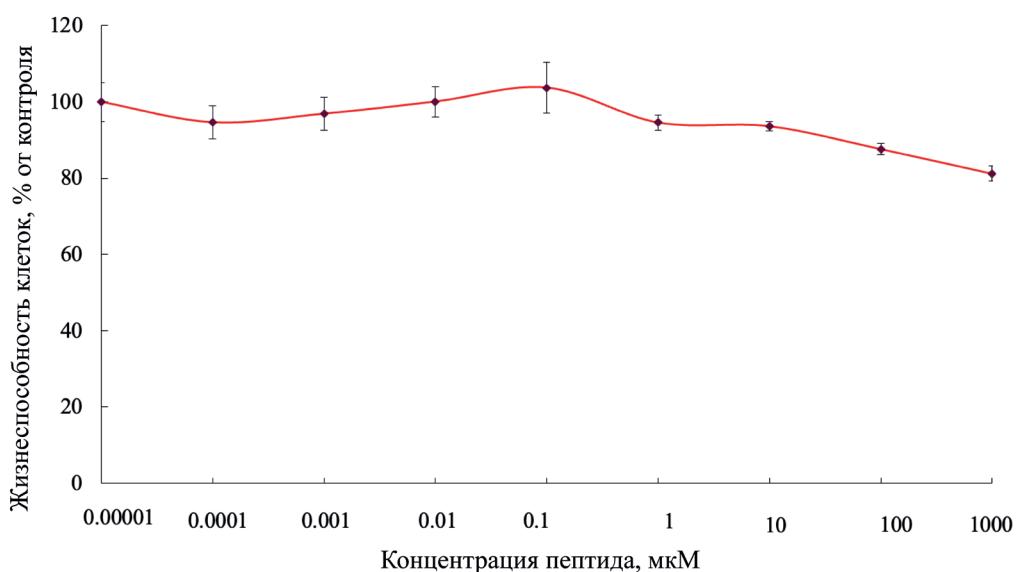


Рис. 2. Зависимость жизнеспособности клеток фибробластов кожи человека от концентрации тетрапептида (V).

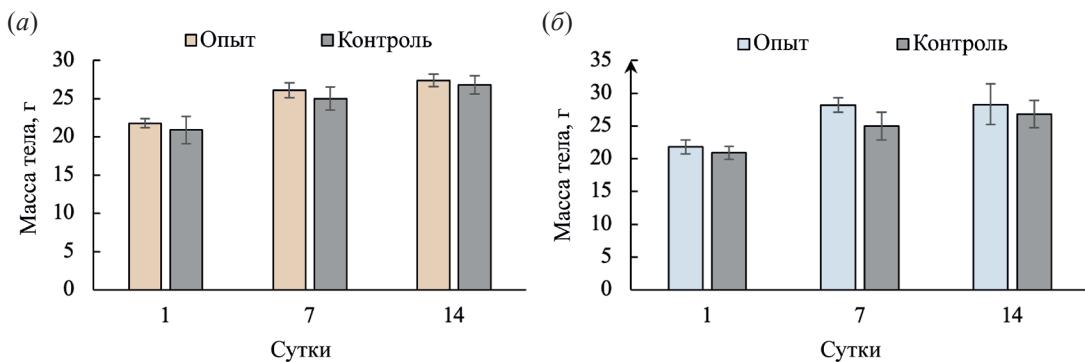


Рис. 3. Динамика изменения массы тела самок (a) и самцов (б) мышей ICR в эксперименте по определению острой токсичности тетрапептида (V).

катором чувствительности органа к исследуемому веществу [9]. По этой причине в ходе исследования острой токсичности тетрапептида Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ после завершения 14-дневного наблюдения за животными проводили эвтаназию выживших и экстирпацию внутренних органов.

По результатам проведенных опытов достоверных изменений массы органов мышей относительно интактных животных не зафиксировано (рис. 4).

В процессе аутопсии у самцов и самок мышей при макроскопическом исследовании не обнаружено патологических изменений внутренних органов: расположение органов правильное, признаков кровоизлияния, отечности и раздражения не выявлено. В плевральной и брюшной полости свободной жидкости не обнаружено. Полученные результаты позволяют констатировать отсутствие токсического действия тетрапептида (V) в условиях эксперимента.

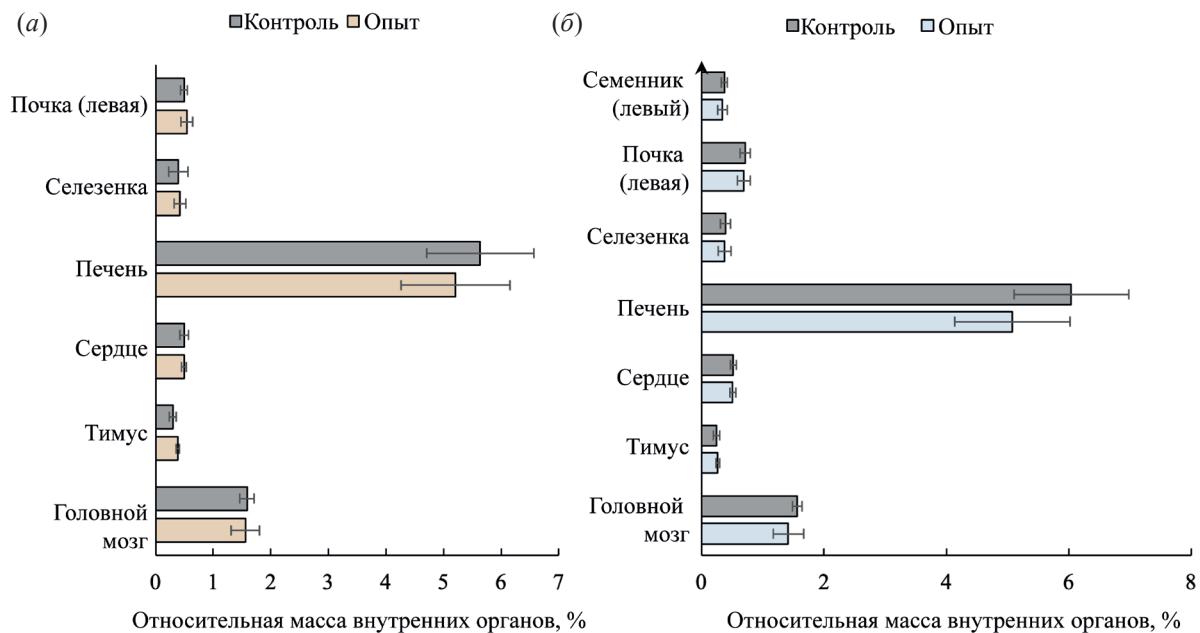


Рис. 4. Относительные массы внутренних органов самок (a) и самцов (б) мышей ICR в эксперименте по определению острой токсичности тетрапептида (V).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез пептида. В процессе синтеза использовали реагенты, аминокислоты и их производные фирм Sigma (США), Acros Organics (Бельгия) и TCI (Япония). Процессы синтеза и удаления защитных групп контролировали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах Merck (Германия) и Sorbfil (Россия) в различных системах растворителей: хлороформ–метанол 4 : 1 (А); этилацетат–пиридин–уксусная кислота–вода 5 : 3 : 1 : 2 (Б); хлороформ–метанол–25%-ный аммиак 6 : 4 : 1 (В). Соединения обнаруживали с помощью хлорбензидиновой пробы.

Удельное вращение пептидов измеряли на автоматическом поляриметре Hanon P850Pro (Китай).

Аналитическую ВЖЭХ и масс-спектрометрию (ионизация распылением в электрическом поле (ESI MS) в режиме сканирования положительных ионов) проводили на хроматографе Agilent 1200 с масс-селективным детектором типа тройной квадруполь Agilent 6140 (США). Колонка Agilent ZorbaxSBC18 RR (2.1 × 30 мм), размер частиц 3.5 мкм. Использовали градиент концентраций ацетонитрила 10–95% в 0.05%-ном растворе муравьиной кислоты в деионизированной воде.

Температуры плавления, измеренные в открытых капиллярах, приведены без исправления.

Вос-Trp-OPfp (I). Синтез активированного эфира проводили согласно стандартной методике [10]. Получили 1.29 г (93%) пентафторфенилового эфира *трем*-бутилоксикарбонилтриптофана; т. пл. 110–111°C; $[\alpha]_D^{25} -27.9 \pm 0.3$ (с 1, метанол); R_f 0.95 (А); ESI-MS, m/z : 493.1 [$M + Na$]⁺, 494.1 [$M + Na + H$]⁺, 495.1 [$M + Na + 2H$], 963.3 [$2M + Na$]⁺, 964.3 [$2M + Na + H$]⁺, 965.3 [$2M + Na + 2H$]⁺.

Вос-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂·HCl (II). Полученный по ранее опубликованной схеме 2HCl·Pro-Arg-Gly-NH₂ массой 0.24 г (0.60 ммоль) растворяли в 4.0 мл DMF, затем по каплям добавляли 83 мкл TEA (pH 7), перемешивали 10 мин [3]. Затем вносили 0.31 г (0.66 ммоль) Вос-Trp-OPfp. Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 16 ч. После окончания реакции выпавшие в осадок соли отфильтровывали, промывали на фильтре небольшим количеством DMF. К фильтрату добавляли 15 мл эфира, после уплотнения осадка декантировали раствор маточника. Осадок переосаждали из метанола эфиром, из метанола

етилацетатом. Сушили осадок в вакуум-эксикаторе с NaOH и P₂O₅ до постоянной массы. Получили 0.34 г (88%) тетрапептида. Очистку проводили методом колоночной хроматографии. В качестве неподвижной фазы использовали силикагель-60, в качестве элюента применяли смесь хлороформ–метанол–25%-ный аммиак в соотношении 24 : 16 : 3. Фракции, содержащие чистый пептид, объединяли, элюент упаривали. Сушили осадок в вакуум-эксикаторе с NaOH и P₂O₅ до постоянной массы. Получили 0.17 г (49%) Вос-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂; т. пл. 109–110°C; $[\alpha]_D^{25} -28.3 \pm 0.0$ (с 1, метанол); R_f 0.66 (Б), 0.67 (Б); ESI-MS, m/z : 614.5 [$M + H$], 615.4 [$M + H$]⁺, 616.4 [$M + H$]⁺, 636.4 [$M + Na$], 1227.8 [$2M + H$]⁺, 1228.8 [$2M + H$]⁺.

2HCOOH·Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ (III). К 0.17 г (0.28 ммоль) Вос-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ добавляли 1.3 мл концентрированной муравьиной кислоты. Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч при 20°C. После окончания реакции HCOOH и газообразные продукты реакции упаривали на ротационном испарителе. К остатку приливали 12 мл диэтилового эфира. После уплотнения осадка маточник декантировали, маслообразный продукт переосаждали из метанола диэтиловым эфиром, затем из метанола этилацетатом. Сушили осадок в вакуум-эксикаторе с NaOH и P₂O₅ до постоянной массы. Получили 0.14 г (85%) 2HCOOH·Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂; т. пл. 119–120°C; $[\alpha]_D^{20} -13.455 \pm 0.364$ (с 0.0022 г/мл, метанол); R_f 0.33 (Б); ESI-MS, m/z : 328.2 [$M - Trp + H$]⁺, 329.2 [$M - Trp + H$]⁺, 514.3 [$M + H$]⁺, 515.3 [$M + H$]⁺.

Ac-OSu (IV). Синтез активированного эфира уксусной кислоты проводили по стандартной методике получения активированных эфиров [10]. Получили 1.17 г (94%); т. пл. 109–110°C; R_f 0.94 (Б); ESI-MS, m/z : 116.0 [$M - Ac + H$]⁺, 117.0 [$M - Ac + H$]⁺, 213.0 [$2M - Ac + H$]⁺.

Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ (V). **Метод последовательного наращивания.** К раствору 0.14 г (0.23 ммоль) 2HCOOH·Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ в 2.5 мл DMF добавляли 32 мкл TEA (pH 7), перемешивали в течение 10 мин. Затем порциями в течение 30 мин вносили 0.50 г (0.30 ммоль) Ac-OSu, контролируя значение pH и при необходимости добавляя TEA. Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 16 ч. После окончания синтеза осадок солей отфильтровывали, промывали DMF. К фильтрату добавляли 10 мл эфира, смесь раствори-

рителей удаляли декантацией, маслообразный осадок переосаждали из метанола эфиром, затем из смеси метанол–хлороформ этилацетатом. Сушили осадок в вакуум-эксикаторе с NaOH и P_2O_5 до постоянной массы. Получили 0.10 г (80%) $\text{Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH}_2\text{-HCOOH}$. Очистку пептида осуществляли методом колоночной хроматографии по ранее описанной методике [3]. Получили 0.06 г (60%) тетрапептида $\text{Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH}_2$; т. пл. 145–146°C; $[\alpha]_D^{20} -27.1 \pm 0.4$ (*c* 1, метанол); R_f 0.59 (Б); ESI-MS, m/z ($I_{\text{отн.}}$, %): 328.2 [$M - \text{Arg-Gly-NH}_2 + \text{H}]^+$ (4.0), 556.5 [$M + \text{H}]^+$ (100), 557.3 [$M + \text{H}]^+$ (26.5), 558.3 [$M + \text{H}]^+$ (4.6), 578.3 [$M + \text{Na}]$ (1.9), 1111.4 [$2M + \text{H}]$ (1.6); УФ-спектр, λ_{max} , нм: 197, 222, 280.

Метод конденсации блоков. К раствору 0.14 г (0.47 ммоль) $2\text{HCl}\cdot\text{Arg-Gly-NH}_2$ (XI) в 5.5 мл DMF добавляли 65 мкл TEA (pH 7) и перемешивали при 20°C в течение 15 мин. Затем вносили 0.36 г (0.71 ммоль) Ac-Trp-Pro-OPfp . Конденсация протекала при 20°C в течение 15 ч. После завершения реакции выпавшие в осадок соли отфильтровывали, промывали 0.5 мл DMF. К получившемуся фильтрату добавляли 20 мл диэтилового эфира. После уплотнения осадка декантировали слой растворителей, осадок переосаждали из метанола эфиром, затем из смеси метанол/хлороформ этилацетатом. При необходимости операцию перекристаллизации повторяли несколько раз. Сушили осадок в вакуум-эксикаторе с NaOH и P_2O_5 до постоянной массы. Получили 0.23 г (89%) тетрапептида. Очистку пептида осуществляли методом колоночной хроматографии по ранее описанной методике [3]. Получили 0.14 г (63%) тетрапептида $\text{Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH}_2$; т. пл. 141–142°C; $[\alpha]_D^{20} -26.3 \pm 0.2$ (*c* 1, метанол); R_f 0.58 (Б); ESI-MS, m/z ($I_{\text{отн.}}$, %): 328.2 [$M - \text{Arg-Gly-NH}_2 + \text{H}]^+$ (5.0), 556.5 [$M + \text{H}]^+$ (100), 557.3 [$M + \text{H}]^+$ (26.2), 558.3 [$M + \text{H}]^+$ (1.9), 578.3 [$M + \text{Na}]$ (1.3), 1111.4 [$2M + \text{H}]$ (1.6); УФ-спектр, λ_{max} , нм: 198, 222, 279.

Вос-Trp-Pro-OH (VI). К суспензии пролина массой 0.20 г (1.7 ммоль) в 5.0 мл свежеперегнанного DMF, охлажденной на ледяной бане до 10°C, добавляли 0.98 г (2.1 ммоль) Вос-Trp-OPfp. Смесь перемешивали в течение 16 ч при 20°C, затем вносили 54.4 мкл *N,N*-диметилэтилендиамина (DMEDA) и перемешивали еще 1 ч. Затем выпавший осадок отфильтровывали, промывали 0.5 мл DMF. Фильтрат разбавляли дистиллированной

водой до 30 мл, переносили в делительную воронку и подкисляли сухой лимонной кислотой до pH ~4. Дипептид экстрагировали из смеси DMF/вода этилацетатом (3×10 мл). Фазы, содержащие Вос-Trp-Pro-OH, объединяли и промывали 10%-ным раствором лимонной кислоты (2×7 мл) и насыщенным раствором NaCl (2×5 мл), сушили безводным Na_2SO_4 . Этилацетат упаривали на ротационном испарителе, масло растворяли в небольшой порции сухого этилацетата и добавляли гексан до уплотнения осадка. Получившееся масло растворяли в диэтиловом эфире и кристаллизовали дипептид гексаном. Сушили в вакуум-эксикаторе с P_2O_5 и NaOH до постоянной массы. Получили 0.67 г дипептида в виде масла (96%); $[\alpha]_D^{20} -16.2 \pm 0.2$ (*c* 1, метанол); R_f 0.73 (А), 0.87 (Б), 0.76 (Б); ESI-MS, m/z : 302.1 [$M - \text{Boc} + \text{H}]$, 346.1 [$M - \text{Boc} + \text{Na}]^+$, 424.2 [$M + \text{Na}]^+$, 425.2 [$M + \text{Na}]^+$, 825.4 [$2M + \text{Na}]^+$, 826.4 [$2M + \text{Na}]^+$, 827.4 [$2M + \text{Na}]^+$, 841.4 [$2M + \text{K}]^+$.

HCOOH-Trp-Pro-OH (VII). Вос-Trp-Pro-OH в виде масла массой 0.67 г (~1.67 ммоль) растворяли в 7.6 мл муравьиной кислоты, перемешивали раствор при 20°C в течение 3 ч. После окончания реакции кислоту упаривали на ротационном испарителе, пептид кристаллизовали диэтиловым эфиром. Осадок дважды переосаждали из метанола диэтиловым эфиром. Сушили в вакуум-эксикаторе с P_2O_5 и NaOH до постоянной массы. Получили 0.49 г пептида (64%); т. пл. 129–130°C; $[\alpha]_D^{25} -9.5 \pm 0.2$ (*c* 1, метанол); R_f 0.06 (А), 0.49 (Б); ESI-MS, m/z : 116.0 [$M - \text{Trp} + 2\text{H}]$, 285.1 [$M - \text{COOH} + \text{Na}]^+$, 286.1 [$M - \text{COOH} + \text{Na}]^+$, 302.1 [$M + \text{H}]$, 303.1 [$M + \text{H}]^+$; 603.3 [$2M + \text{H}]^+$, 604.3 [$2M + \text{H}]^+$.

Ac-Trp-Pro-OH (VIII). К раствору 0.49 г (1.4 ммоль) $\text{HCOOH}\cdot\text{Trp-Pro-OH}$ в 4.0 мл DMF добавляли 155 мкл *N*-метилморфолина (NMM) (до pH 7), перемешивали 10 мин. Затем порциями в течение 1 ч вносили 0.45 г (2.9 ммоль) Ac-OSu , получившийся раствор перемешивали 16 ч при 20°C. Выпавшие в осадок соли отфильтровывали, к раствору DMF добавляли 15–20 мл диэтилового эфира до уплотнения осадка. Маточник декантировали, пептид переосаждали из смеси CH_2Cl_2 /гексан и метанол/диэтиловый эфир. Сушили в вакуум-эксикаторе с P_2O_5 и NaOH до постоянной массы. Получили 0.37 г дипептида (77%); $[\alpha]_D^{20} -16.2 \pm 0.12$ (*c* 1, метанол); R_f 0.22 (А); ESI-MS, m/z : 116.1 [$M - \text{Ac-Trp} + \text{H}]^+$, 229.1 [$M - \text{Pro}]$, 344.2

$[M + H]^+$, 345.2 $[M + H]^+$, 366.1 $[M + Na]^+$, 367.2 $[M + Na]^+$, 709.3 $[2M + Na]^+$, 710.3 $[2M + Na]^+$, 711.4 $[2M + Na]^+$.

Ac-Trp-Pro-OPfp (IX). К раствору 0.37 г (1.1 ммоль) Ac-Trp-Pro-OH в 4.0 мл этилацетата, охлажденному до 0°C, при постоянном перемешивании последовательно добавляли 0.22 г (1.2 ммоль) пентафторфенола и 0.25 г (1.2 ммоль) *N,N'*-дициклогексилкарбодиимида (DCC). Реакцию проводили в течение 1.5 ч при 0°C и 10 ч при 20°C, затем осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, промывали 1.0 мл этилацетата. Растворитель упаривали на ротационном испарителе, получившееся масло уплотняли петролейным эфиром. Затем раствор маточника декантировали, а эфир в виде масла растворяли в хлористом метилене и осаждали петролейным эфиром. Сушили в вакуум-эксикаторе с P_2O_5 и NaOH до постоянной массы. Получили 0.36 г порошкообразного активированного эфира (~65%); т. пл. 136–137°C; R_f 0.88 (A); ESI-MS, m/z : 510.2 $[M + H]^+$, 511.2 $[M + H]^+$, 532.2 $[M + Na]^+$, 533.2 $[M + Na + H]^+$, 1041.3 $[2M + Na]^+$, 1042.3 $[2M + Na + H]^+$, 1043.3 $[2M + Na + H]^+$.

Boc-Arg-Gly-NH₂·HCl (X). В раствор 0.55 г (2.0 ммоль) Boc-Arg-OH в 3.0 мл DMF вносили 0.22 г (2.0 ммоль) HCl-Gly-NH₂, перемешивали в течение 1 ч при 20°C. Смесь охлаждали на ледяной бане до 0°C, затем последовательно добавляли 0.23 г (1.7 ммоль) 1-гидрокси-7-азабензатриазола (HOAt) и 0.34 мл (2.2 ммоль) *N,N'*-диизопропилкарбодиимида (DIPC). Перемешивали на ледяной бане в течение 1 ч и при 20°C в течение 14 ч. Осадок *N,N'*-диизопропилмочевины отделяли фильтрованием, промывали DMF. К диметилформамидному раствору добавляли 15 мл диэтилового эфира, после уплотнения масла декантировали слой растворителей, осадок переносили из метанола эфиром, затем из смеси метанол/уксусная кислота этилацетатом. Сушили в вакуум-эксикаторе с P_2O_5 и NaOH до постоянной массы. Получили 0.64 г дипептида (87%); т. пл. 68–69°C; $[\alpha]_D^{25}$ –7.9 ± 0.0 (с 1, метанол); R_f 0.68 (B); ESI-MS, m/z : 231.2 $[M - Boc + 2H]^+$, 275.2 $[M - Gly-NH_2 + H]^+$, 276.2 $[M - Gly-NH_2 + H]^+$, 331.3 $[M + H]^+$, 332.3 $[M + H]^+$, 333.3 $[M + H]^+$, 66.5 $[2M + H]^+$, 662.5 $[2M + H]^+$, 775.5 $[2M + H]^+$.

2HCl·Arg-Gly-NH₂ (XI). Дипептид Boc-Arg-Gly-NH₂·HCl массой 0.64 г (1.7 ммоль) раствори-

ряли в 4.5 мл CH₃COOH и медленно при постоянном перемешивании добавляли 7.0 мл 4 M HCl/CH₃COOH. Перемешивали при 20°C в течение 2.5 ч. Затем избыток хлороводорода и часть уксусной кислоты удаляли на ротационном испарителе, дипептид в виде соли выкристаллизовали из CH₃COOH с помощью диэтилового эфира. Затем маточник декантировали, соль дипептида переосаждали из смеси MeOH/EtOAc. Сушили в вакуум-эксикаторе с P_2O_5 и NaOH до постоянной массы. Получили 0.54 г (85%) 2HCl·Arg-Gly-NH₂; т. пл. 78–80°C; $[\alpha]_D^{20}$ +39.2 ± 0.2 (с 1, метанол); R_f 0.06 (B); ESI-MS, m/z : 231.1 $[M + H]$, 232.1 $[M + H]^+$, 233.1 $[M + H]^+$.

Цитотоксическая активность тетрапептида Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂. Цитотоксическую активность исследовали *in vitro* в тест-системе клеточной линии фибробластов кожи человека, полученной из банка культур Государственного научного учреждения “Институт биофизики и клеточной инженерии” Национальной академии наук Беларусь. Для анализа использовали MTT-тест. Клетки фибробластов человека культивировали во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, при 37°C в питательной среде DMEM (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, антибиотиков (пенициллина – 100 ед./мл, стрептомицина – 100 мкг/мл) и антибиотика амфотерицина (25 мкг/кг). Клетки фибробластов высаживали в 96-луночный планшет в концентрации 7×10^3 клеток в лунке и инкубировали 24 ч. Затем добавляли раствор тетрапептида (V) в концентрациях 0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 10, 100 и 1000 мкМ, который получали последовательным разведением тетрапептида в инкубационной среде. В качестве контроля использовали 0.5%-ный раствор диметилсульфоксида (DMSO). Клетки с раствором тетрапептида (V) культивировали в описанных выше условиях в течение 72 ч, затем в каждую лунку планшета добавляли по 20 мкл 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий бромида (MTT) в концентрации 5 мг/мл. Восстановление желтого MTT до темно-фиолетовых гранул формазана протекало в течение 3 ч экспозиции при 37°C и 5% CO₂ в атмосфере. Гранулы формазана растворяли в 200 мкл DMSO, количество восстановленного продукта измеряли фотометрически при длине волны 570 нм на планшетном анализаторе АИФ-М/340 (Витязь, Беларусь).

Для каждой концентрации тестируемого препарата вычисляли среднее значение оптической плотности (D) из трех параллельных измерений и рассчитывали жизнеспособность клеток (X) в присутствии исследуемого пептида по формуле:

$$X = \frac{D_{\text{Опыт}}}{D_{\text{Контроль}}} \times 100,$$

где $D_{\text{Опыт}}$ – оптическая плотность образцов с тетрапептидом Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂; $D_{\text{Контроль}}$ – оптическая плотность контрольных образцов с 0.5%-ным раствором DMSO.

Концентрацию препарата, которая вызывает 50%-ное ингибирование жизнеспособности клеток (IC_{50}), рассчитывали по уравнению дозозависимой кривой.

Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение ANOVA. Различия между группами данных оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента, статистически значимыми считали отличия при $p < 0.05$.

Острая токсичность тетрапептида Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂. При подборе условий проведения эксперимента по исследованию острой токсичности тетрапептида (**V**) руководствовались ТКП 125-2008(02040) “Надлежащая лабораторная практика” [11] и “Руководство” [12]. Эксперимент проводили на здоровых половозрелых аутбредных мышах ICR (самках и самцах), полученных в виварии Государственного научного учреждения “Институт биоорганической химии” Национальной академии наук Беларуси. На мышах ICR ранее был продемонстрирован биологический эффект – воздействие на поведение грызунов [4], что обусловило выбор подопытных животных. Сформировали две группы животных: 1) самки ICR ($n = 8$), 2) самцы ICR ($n = 8$). Средняя масса тела мышей на момент начала эксперимента составила 21.8 ± 0.6 г (самки) и 21.8 ± 1.1 г (самцы), возраст – 2 месяца.

Животных содержали по восемь особей в клетке (длина \times ширина \times высота $32 \times 22 \times 9$ см) с подстилкой из стерилизованных опилок в помещении со следующими параметрами микроклимата: температура – 20 ± 2 °С, влажность – 50–65%, воздухообмен – 10–15 объемов комнаты в час, освещение – искусственное, 12-часовой световой день. На протяжении эксперимента мыши имели свободный доступ к пище (стерилизованный комбикорм) и воде.

Выбранный путь введения (интраназально) аналогичен предполагаемому пути для клинического применения. Выбранная доза пептида (231 мг/кг) – технически максимально возможная доза для интраназального введения. Рабочий раствор тетрапептида Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ с концентрацией 346.5 мг/мл готовили непосредственно перед введением, соблюдая правила асептики, путем полного растворения тетрапептида в воде для инъекций (ОАО “Несвижский завод медицинских препаратов”, Республика Беларусь). Раствор вводили однократно пропорционально массе тела из расчета 20 мкл раствора на 30 г массы тела, что соответствует дозе 231 мг/кг. Длительность наблюдения – 14 сут. Ежедневно регистрировали падеж животных и состояние выживших. Массу тела мышей измеряли на 1, 7 и 14-е сутки. Выживших грызунов подвергали эвтаназии в атмосфере CO₂ и осуществляли вскрытие. В ходе вскрытия проводили экстирпацию и взвешивание внутренних органов (головной мозг, тимус, сердце, печень, селезенка, почка (в случае патологий – обе); у самцов – семенник (левый, в случае патологий – оба)), составляли их макроскопическое описание. Расчет относительных масс органов и статистическую обработку результатов проводили в программе MS Excel 2010 с использованием следующих показателей описательной статистики: среднее значение (mean) и стандартное отклонение (SD). Для оценки различий между испытуемой группой и контрольными значениями применяли непараметрический U-критерий Манна–Уитни (Statistica 10).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований была разработана новая схема синтеза триптофансодержащего аналога АВП, основанная на конденсации дипептидных “блоков”. Такой подход к сборке пептидной цепи позволил повысить выход целевого продукта в 2–3 раза (до 65%) по сравнению с ранее представленными схемами последовательного наращивания (23–33%). В дальнейших исследованиях перспективной представляется модификация методов очистки и выделения промежуточных соединений и целевого пептида.

Эксперименты по изучению цитотоксических свойств Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ на культуре клеток фибробластов человека показали, что IC_{50} соединения превышает концентрацию 1000 мкМ.

В ходе исследования острой токсичности на аутбредных мышах линии ICR обоих полов токсическое действие тетрапептида Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ не выявлено.

Представляется перспективным дальнейшее изучение фармакокинетики и фармакодинамики тетрапептида Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ как потенциальной фармацевтической субстанции для новых антидепрессантов и анксиолитиков.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории физико-химических исследований Института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси за их значимый вклад в данное исследование, связанный с регистрацией ВЭЖХ-масс-спектрометрических данных и записью ЯМР-спектров.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование не имело финансовой поддержки.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания результатов исследований с участием людей в качестве объектов. Информированное согласие не требовалось.

При подготовке и проведении экспериментов *in vivo* руководствовались “Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях” (Страсбург, 1986). Исследование было одобрено на заседании комиссии по биоэтике Института биоорганической химии НАН Беларуси (протокол № 03-2022 от 23.09.2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Написание статьи, разработка схем синтеза, синтез пептидов – КВБ; синтез пептидов – ЕИК; разработка схем синтеза, написание статьи – ВПМ; администрирование проекта – ОВГ; проведение эксперимента на клеточных культурах – ТВЧ; разработка методики проведения и администрирование эксперимента на клеточных культурах – ОВП, СЭО; проведение эксперимента на животных (приготовление растворов тетрапептида и введение подопытным) – ОНС; проведение эксперимента на животных (регистрация параметров, получение результатов) – ЛМО; написание статьи, анализ и интерпретация данных – РДЗ; администрирование проекта – ЕВК.

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

- Угрюмов М.В. // Механизмы нейроэндокринной регуляции / Под ред. Турпаев Т.М. Москва: Наука, 1999. С. 55–57.
- Burbach J.P.H., Kovacs G.L., De Wied D., Van Nispen J.W., Greven H.M. // Science. 1983. V. 221. P. 1310–1312. <https://doi.org/10.1126/science.6351252>
- Borodina K.V., Savanets O.N., Pustyulga E.S., Martynovich V.P., Kravchenko E.V., Olgomets L.M., Golubovich V.P. // Bioorg. Khim. 2022. V. 48. P. 357–370. <https://doi.org/10.31857/S0132342322030058>
- Kravchenko E.V., Savanets O.N., Olgomets L.M., Borodina K.V., Golubovich V.P., Zilberman R.D., Bizunok N.A., Dubovik B.V. // Izv. Nats. Akad. Nauk Belarusi, Ser. Biolog. Nauk. 2024. V. 69. P. 120–133. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-2-120-133>
- Кравченко Е.В., Саванец О.Н., Ольгомец Л.М., Бородина К.В., Пустюльга Е.С., Голубович В.П., Зильберман Р.Д., Бизунок Н.А., Дубовик Б.В. // Известия НАН Беларуси. Сер. мед. наук. 2023. Т. 20, № 3. С. 256–264. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-256-264>
- Stakhanova A.A., Voskresenskaya O.G., Golubovich V.P., Kamensky A.A. // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2023. V. 78. P. 100–105. <https://doi.org/10.3103/S0096392523020098>
- Гросс Э., Майенхофер И., Джоунс Дж., Бодански М., Рич Д., Синех Ж., Кемп Д. // Пептиды. Основные методы образования пептидных связей / Под ред. Гросс Э., Майенхофер И. Москва: Мир, 1983. С. 362.
- Keller L.A., Merkel O., Popp A. // Drug Deliv. Transl. Res. 2022. V. 12. P. 735–757. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00891-5>
- Andersen H., Larsen S., Spliid H., Christensen N.D. // Toxicology. 1999. V. 136. P. 67–77. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(99\)00056-6](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(99)00056-6)
- Гершкович А.А., Киберев В.К. // Синтез пептидов. Реагенты и методы / Отв. ред. Серебрянский С.Б. Киев: Наук. думка. 1987. С. 60–62.
- Надлежащая лабораторная практика: ТКП 125-2008(02040). Введ. 01.05.2008. Минск: РУП “Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении”, 2008. 40 с.
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А.Н. Миронова и др. М.: Гриф и К, 2012. Ч. 1. С. 13–17.

Features of Synthesis and Study of Toxic Properties of Tryptophan-Containing Analogue of Arginine-Vasopressin

**K. V. Borodina^{*, #}, E. I. Kvyatkowskaya^{*}, V. P. Martinovich^{*}, O. V. Gribovskaya^{*},
O. V. Panibrat^{*}, T. V. Chukarina^{*}, S. E. Ogurtsova^{*}, R. D. Zilberman^{*}, O. N. Savanets^{*},
L. M. Olgometz^{*}, A. O. Savin^{*}, I. V. Zhebrokova^{*}, and E. V. Kravchenko^{*}**

[#]*E-mail: borodina@iboch.by*

** Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,
ul. Acad. Kuprevicha 5/2, Minsk, 220084 Belarus*

Among the previously studied analogues of the C-terminal fragment of arginine vasopressin (AVP), the tetrapeptide Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ is of great interest as a potential pharmaceutical substance. It demonstrated antidepressant-like and anxiolytic activity at doses of 0.10–10 µg/kg in experiments with rodents. In this paper, we consider the features of the synthesis of a tryptophan-containing analogue of AVP, and propose a new “block” scheme for obtaining the peptide, which allows it to be produced in higher yields than shown previously. Experiments were conducted to study the toxic properties of Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂. Under these conditions, the peptide did not exhibit any clearly expressed pathological effect on the internal organs of experimental mice, and also showed no cytotoxicity in the range of expected therapeutic doses (IC₅₀>1000 µM). The low toxic effects of tryptophan-containing AVP analogue demonstrated in this work makes the tetrapeptide a promising substance for further studies of biological activity, toxicity and mechanisms of action with the aim of creating new, safer and more effective anxiolytics and antidepressants based on it.

Keywords: arginine-vasopressin, peptide synthesis in solution, acute toxicity, cytotoxicity, fibroblasts, mice