

# Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2010

Н. В. Месонжник<sup>1, 2</sup>, С. С. Бойко<sup>1</sup>, С. А. Апполонова<sup>2</sup>, Г. М. Родченков<sup>2</sup>,  
В. П. Жердев<sup>1</sup>

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ДИПЕПТИДНОГО СОЕДИНЕНИЯ ДИЛЕПТ

<sup>1</sup> ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, Россия, sarpharm@mail.ru;

<sup>2</sup> ФГУП "Антидопинговый центр", Москва, Россия

В ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН разработано оригинальное соединение пептидной природы аналог нейротензина — дилепт (метиловый эфир N-капроил-L-пролил-L-тирозина). Методом высокоэффективной хроматографии — МС/МС-спектрометрии обнаружены и идентифицированы основные метаболиты дилепта. Структуры метаболитов подтверждены с использованием стандартов-свидетелей, полученных встречным синтезом. Изучена метаболическая стабильность дилепта в присутствии плазмы крови крыс и человека в условиях *in vitro* и после перорального введения его субстанции крысам. Установлено, что в присутствии плазмы крови крыс дилепт быстро метаболизируется с образованием N-капроил-L-пролил-L-тирозина (M1) и более стабилен в плазме крови человека. В экспериментах с пероральным введением дилепта, помимо метаболита M1, у крыс обнаруживается метаболит M2 — N-капроил-L-пролин, который является продуктом ферментативного гидролиза дилепта под действием пептидаз.

**Ключевые слова:** дилепт, дипептид, нейролептик, ВЭЖХ-МС, метаболизм.

В отделе химии ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН на основе сконструированного короткого пептида амида L-пролил-L-тирозина, аналога атипичного нейролептика сульпирида, получено фармакологически активное соединение — метиловый эфир N-капроил-L-пролил-L-тирозина (дилепт), обладающий выраженной антипсихотической активностью [1 – 5]. Существенным фактором, ограничивающим применение пептидомиметиков нейротензина в клинической практике является их низкая биологическая устойчивость при пероральном введении, связанная с энзиматической активностью пептидаз ЖКТ, а также их деградация в плазме крови и других органах и тканях экспериментальных животных [6]. Учитывая эти факты, представлялось необходимым изучить метаболическую стабильность дилепта в модельных экспериментах в присутствии плазмы крови крыс и человека, а также метаболизм дилепта после перорального введения крысам.

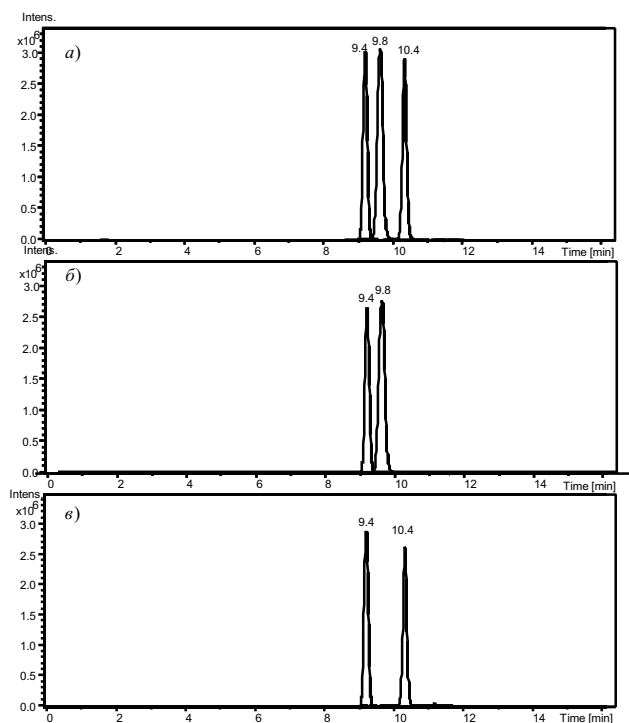
### Материалы и методы

Исследования проводили на белых беспородных крысах-самцах массой  $200 \pm 20$  г, полученных из питомника "Столбовая" РАМН. Животных содержали в стандартных условиях вивария ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН при 12 ч световом режиме и свободном доступе к корму и воде. Крыс декапировали через 15 мин после перорального введения суспензии дилепта с твином-80. Кровь отбирали в предварительно охлажденные гепаринизированные пробирки. Полученные образцы немедленно центри-

фугировали со скоростью 4000 об/мин в течение 10 мин, при  $T = -4$  °С. Контрольную плазму крови крыс получали после введения водной нагрузки в объеме 2 мл. Плазму крови человека получали от здоровых добровольцев.

Субстанции метилового эфира N-капроил-L-пролил-L-тирозина (т. пл.  $120 - 121$  °С,  $[\alpha]_D^{20} - 60^\circ$  (с 0,4;  $\text{CHCl}_3$ ); N-капроил-L-пролил-L-тирозина (т. пл.  $44 - 52$  °С,  $[\alpha]_D^{20} - 33^\circ$  (с 0,4;  $\text{CHCl}_3$ ) и N-капроил-L-пролина (масло,  $[\alpha]_D^{20} - 50^\circ$  (с 0,4; ДМФА) были предоставлены отделом химии ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН. Были использованы ацетонитрил фирмы Merck, маркировка LC-MS (Darmstadt, Germany), ацетат аммония фирмы Sigma (St. Louise, MO, USA). Деионизованная вода была получена с помощью системы Millipore Milli-Q (Millipore, Milford, MA, USA).

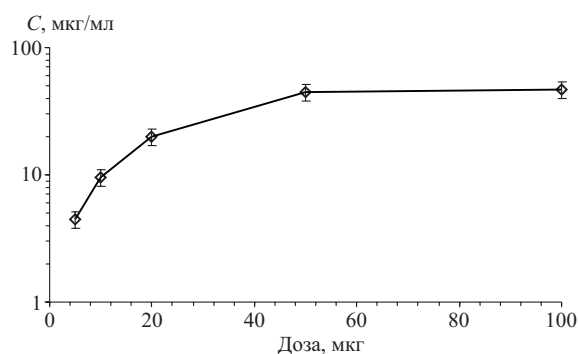
Дилепт и его активный метаболит были определены с использованием системы Agilent 1100 Series LC-MSD Trap "SL" (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Хроматографическое разделение было проведено на аналитической колонке Zorbax SB-C18 (2,1 мм × 150 мм I. D., 5 мкм) фирмы "Agilent Technologies" (Palo Alto, CA, USA). Мобильная фаза состояла из 0,2 мМ ацетата аммония/0,05 % муравьиной кислоты (А) и 100 % ацетонитрила (В). ВЭЖХ-анализ проводился в режиме градиентного элюирования: 0 мин — (В) 5 %, 7 мин — (В) 80 %, 7,5 мин — (В) 5 %, 15 мин — (В) 5 %. Скорость потока подвижной фазы составляла 0,25 мл/мин.



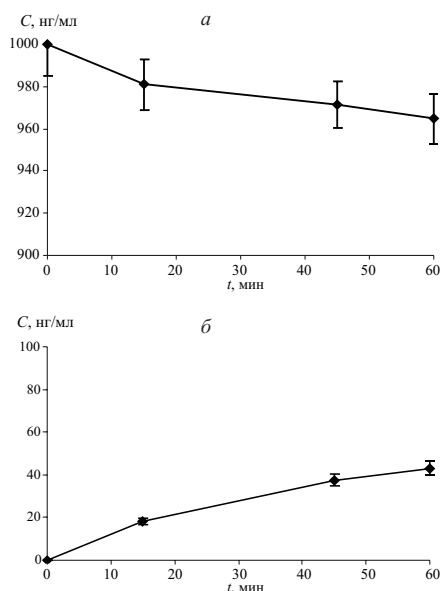
**Рис. 1.** Масс-хроматограммы диплепта ( $[M-H]^- = 389$ ,  $RT = 10,4$ ), метаболита М1 ( $[M-H]^- = 375$ ,  $RT = 9,8$ ) и ВС ( $[M-H]^- = 361$ ,  $RT = 9,4$ ) а) модельной смеси диплепта и М1 ( $C = 1$  мкг/мл); б) образца плазмы крови крысы с добавкой диплепта ( $C = 1$  мкг/мл); в) образца плазмы крови человека с добавкой диплепта ( $C = 1$  мкг/мл). По оси абсцисс — время удерживания, мин, по оси ординат — интенсивность аналитического сигнала масс-спектрометра, у. е.

Масс-спектры были получены с использованием ионизации электрораспылением при сканировании полного тока отрицательных ионов ((-)ИЭР). Напряжение на капилляре составляло 3500 В. В качестве осушающего и распыляющего газа использовали азот с объемной скоростью 9 л/мин давлением 2,07 бар, температура в источнике ионов составляла 350 °С.

Обработку полученной плазмы проводили по следующей схеме. Осаждение белков проводили добавлением 2 мл ацетонитрила и центрифугировали (4000 об/мин, 10 мин,  $T = -4$  °С). К 2,5 мл депротеи-



**Рис. 2.** Зависимость образования метаболита диплепта — N-капроил-L-пролил-L-тирозина — от дозы диплепта, добавленного *in vitro* к плазме крови крысы. На графике представлены средние значения 3 повторений. По оси абсцисс — доза, добавленного к плазме крови диплепта, мкг, по оси ординат — концентрация метаболита М1, мкг/мл.

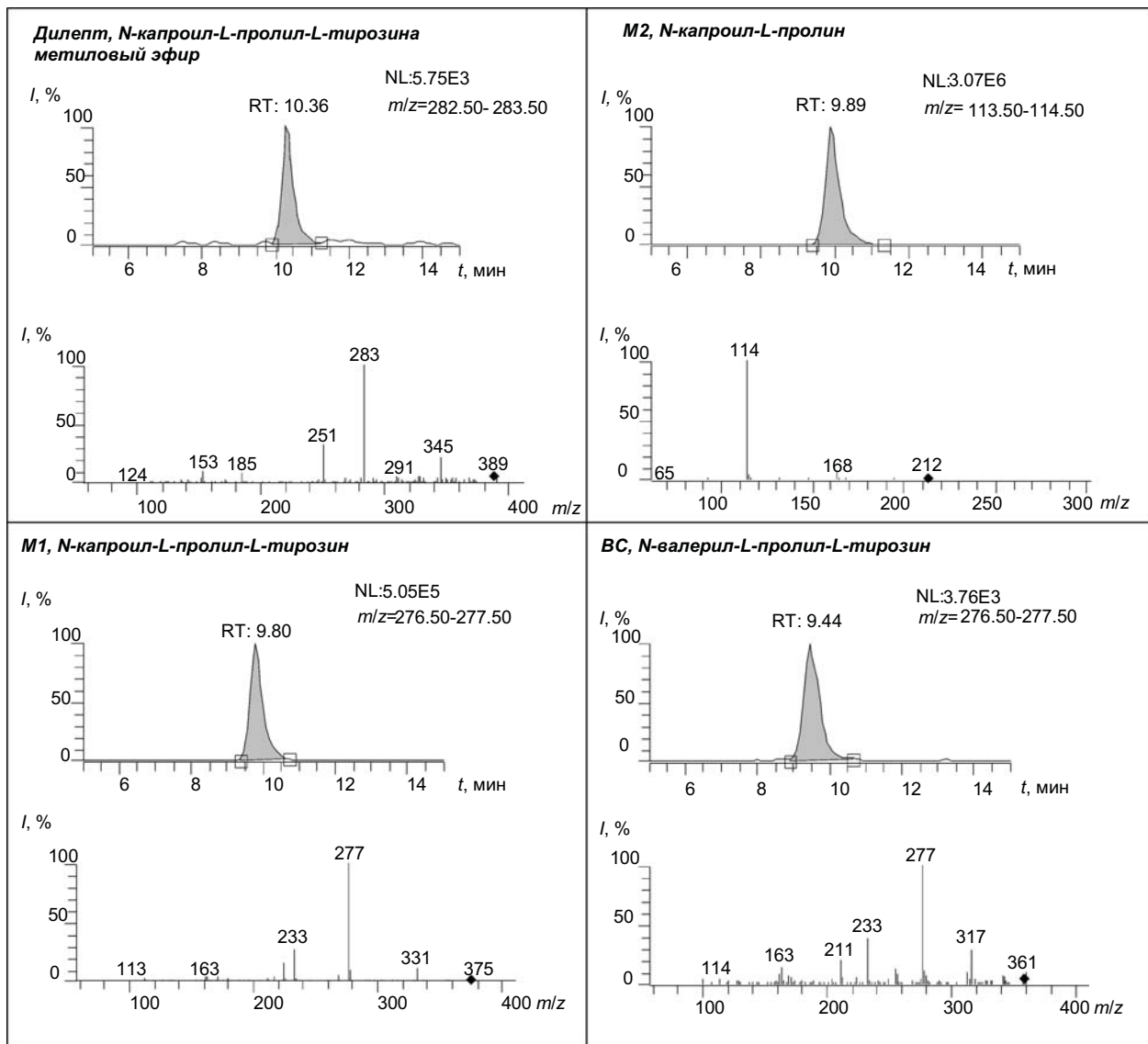


**Рис. 3.** Изменение скорости деградации диплепта и образования метаболита диплепта — N-капроил-L-пролил-L-тирозина — в плазме крови человека от времени инкубации ( $T = 37$  °С). Представлены средние значения  $n = 5 \pm SD$ . По оси абсцисс — время инкубации, мин, по оси ординат — концентрация диплепта (а) и метаболита М1 (б), нг/мл.

низированной плазмы добавляли 25 мкл N-валерил-L-пролил-L-тирозина (ВС, 1000 нг/мл). Экстракцию сопутствующих веществ проводили 2 мл гексана на вихревом встряхивателе в течение 2 мин. К 2,3 мл водного слоя добавляли 1 мл 0,7 % уксусной кислоты. Экстракцию диплепта и его основных метаболитов осуществляли 2 мл хлороформа при встряхивании в течение 2 мин. После центрифугирования (2500 об/мин, 5 мин, 20 °С) 2,8 мл органического слоя отбирали и высушивали в токе азота. Сухой остаток перерастворяли в 100 мкл метанола и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Для определения устойчивости диплепта к процессу деметилирования ферментами плазмы крови крысы и человека была приготовлена серия образцов: 1) модельная смесь определяемых соединений, экстракция которых не проводилась (1 мкг/мл); 2) добавка диплепта (1 мкг/мл) к плазме крови крысы; 3) добавка диплепта к плазме крови человека (1 мкг/мл). Для определения зависимости количества метаболита М1, регистрируемого после добавления различных доз диплепта к плазме крови крысы, была приготовлена серия образцов плазмы крови крысы с добавкой диплепта в концентрациях 5, 10, 20, 50, 100 мкг/мл. Обработку биологических образцов проводили *ex tempore*.

Для определения устойчивости диплепта к деградации ферментами плазмы крови человека в физиологических условиях была приготовлена серия образцов плазмы крови человека с добавкой диплепта в концентрации 1 мкг/мл. Образцы плазмы с добавкой диплепта инкубировали при  $T = 37$  °С в течение 15, 45 и 60 мин.



**Рис. 4.** Масс-хроматограмма по выделенным ионам диплепта ( $m/z$  389), M1 ( $m/z$  375) и M2 ( $m/z$  212) образца плазмы крови крысы, полученной после перорального введения диплепта в дозе 200 мг/кг. На хроматограммах: по оси абсцисс — время удерживания, мин, по оси ординат — интенсивность аналитического сигнала масс-спектрометра, % от интенсивности максимального хроматографического пика. На масс-спектрах: по оси абсцисс — отношение “масса/заряд”,  $m/z$ , по оси ординат — интенсивность аналитического сигнала масс-спектрометра, % от интенсивности максимального пика в масс-спектре.

### Результаты и их обсуждение

Метод ВЭЖХ(-)ИЭР-МС и ВЭЖХ(-)ИЭР-МС/МС, описанный в предыдущей работе [7], был применен для определения диплепта и его метаболитов в плазме крови крысы. Обнаружено, что диплепт при добавлении к плазме крови крысы образует деметилованный метаболит. На рис. 1 представлены масс-хроматограммы модельной смеси диплепта и его деметилованного метаболита M1 — N-капроил-L-пролил-L-тирозина (а), плазмы крови крысы с добавкой диплепта (б) и плазмы крови человека с добавкой диплепта (в). Видно, что на хроматограмме плазмы крови крысы с добавкой диплепта исходное соединение отсутствует, однако присутствует хроматографический пик с  $m/z$  375, принадлежащий деметилованному метаболиту — N-капроил-L-пролил-L-тирозину. Следовательно, после добавления диплепта к плазме крови крысы *ex tempore* он подвергается ферментативному гидролизу по эфирной связи.

Результаты изучения образования метаболита диплепта N-капроил-L-пролил-L-тирозина в зависимости от концентрации диплепта, добавленного *in vitro* к плазме крови крысы, представлены на рис. 2. При увеличении количества диплепта до 50 мкг детектируется и неизмененный диплепт, что может свидетельствовать о процессе насыщения ферментов, гидролизующих метильную группу диплепта.

Результаты по изучению устойчивости диплепта к ферментам плазмы крови человека представлены на рис. 3. Установлено, что при добавлении диплепта к плазме крови человека в физиологических условиях при инкубации ( $T = 37^\circ\text{C}$ ) образование деметилованного метаболита происходит гораздо менее интенсивно. Через 1 ч после инкубации доля метаболита относительно исходного соединения составляет менее 10 %.

Быстрая деградация дипептида объясняется высокой активностью ферментных систем плазмы крови крысы. Известно, что степень гидролиза алифатических

эфиров уменьшается в ряду крыса > кролик > собака > человек. Грызуны содержат некоторые алифатические эстеразы, которые не являются характерными для человека [8]. Исследования, проведенные на микросомах печени различных видов животных, показали, что образование деакилированного метаболита противовирусного препарата AG 7088 происходит намного интенсивнее, чем образование других метаболитов [9]. Причем этот процесс наиболее выражен у грызунов. В исследованиях неотама [10] также показано, что после перорального введения пептидного подсластителя крысам происходит образование его деметилированного продукта, который детектировался в низких концентрациях. Исходное соединение было найдено только в моче самок крыс после внутривенного введения (3,7 % от дозы препарата). Простые алкиловые эфиры, как правило, не являются субстратами для эстераз крови человека и подвергаются энзиматическому гидролизу в печени. Например, многие успешно применяемые в клинической практике ингибиторы АПФ гидролизуются в печени до активного продукта [11, 12].

Метод ВЭЖХ(-)ИЭР-МС/МС был применен для анализа экстрактов плазмы крови крыс, полученной через 15 мин после перорального введения субстанции дилепта в дозе 200 мг/кг. Результаты эксперимента представлены на хроматограммах, прописанных по характеристическим ионам дилепта и его метаболитов (рис. 4), полученных в режиме МС/МС. Установлено, что пики продуктов метаболизма имеют более ранние времена удерживания, чем сам дилепт, то есть в процессе метаболизма образуются продукты, по своей химической природе более полярные, чем исходное соединение.

Идентификация и подтверждение структур дилепта и его метаболитов проводились сопоставлением времен удерживания и характерных МС/МС-спектров со стандартами-свидетелями, синтезированными в отделе химии ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН. В результате фрагментации депротонированной молекулы метаболита М1 образуется серия ионов, которая отличается на 14 а.е.м. от соответствующих пиков в МС/МС-спектре дилепта ( $m/z$  283  $\rightarrow$   $m/z$  269,  $m/z$  291  $\rightarrow$   $m/z$  277,  $m/z$  185  $\rightarrow$   $m/z$  171). (-)ИЭР МС/МС-спектр метаболита М2, N-капроил-L-пролина, содержащегося в образце плазмы крови крыс, представлен только 1 фрагментным ионом с  $m/z$  114.

Полученные в нашей работе результаты о нестабильности метилового эфира N-капроил-L-пролил-L-тирозина в плазме крови крыс как в опытах на животных, так и в модельных опытах с плазмой крови крыс находятся в соответствии с литературными данными о высокой активности эстеразы у грызунов.

Таким образом, в плазме крови крыс после перорального введения дилепта обнаружены и идентифицированы его основные метаболиты — N-капроил-L-пролил-L-тирозин и N-капроил-L-пролин. При сопоставлении результатов метаболической устойчивости дилепта в опытах *in vitro* и *in vivo* установлено, что основным метаболитом дилепта в присутствии плазмы крови крыс является N-капроил-L-пролил-L-тирозин, который образуется в результате деметилирования дилепта эстеразами плазмы крови грызунов. Активность этого фермента у человека значительно ниже по сравнению с ферментативной активностью экспериментальных животных. В опытах с пероральным введением дилепта крысам показано образование второго продукта метаболизма — N-капроил-L-пролина, который образуется в результате гидролиза пептидной связи.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Гудашева, Н. И. Зайцева, Н. А. Бондаренко и др., *Хим. фарм. журн.*, **31**(11), 10 – 16, (1997).
2. Т. А. Gudasheva, T. A. Voronina, R. U. Ostrovskaya, et al., *J. Med. Chem.*, **41**, 284 – 290 (1998).
3. С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, Т. А. Гудашева и др., Патент РФ № 2091390 (1995).
4. М. В. Ретюнская, Л. С. Гузевых, Н. А. Бондаренко и др., *Бюл. эксперим. биол. мед.*, **136**(11), 527 – 543 (2003).
5. Р. У. Островская, М. В. Ретюнская, Л. С. Гузевых и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **68**(1), 3 – 6 (2005).
6. M. Boules, E. Richelson, and P. Fredrickson, *Peptides*, **27**, 2523 – 2533 (2006).
7. Н. В. Архипенко, С. А. Апполонова, Т. Г. Соболевский и др., *Хим.-фарм. журн.*, **43**(5), 53 – 56 (2009).
8. L. Hu, *Meeting Report Prodrugs*, 28 – 29 June, USA (2004).
9. K. Zhang, B. Hee, C. Lee, et al., *Drug Metabol. Disposition*, **29**(5), 729 – 734 (2001).
10. Neotame. Joint Expert Committee of Food Additives (JECFA), 52 (2004).
11. J. D. Cleary and J. W. Taylor, *Drug Intelligence Clin. Pharm.*, **20**(3) 177 – 186 (1986).
12. S. Meisel, A. Shamiss, and T. Rosenthal, *Clin. Pharmacokinet.*, **26**(1), 7 – 15 (1994).

Поступила 08.12.08

## EXPERIMENTAL INVESTIGATION OF THE BIOLOGICAL STABILITY OF DIPEPTIDE NEUROLEPTIC DILEPT

N. V. Mesonzhnik<sup>1,2</sup>, S. S. Boiko<sup>1</sup>, S. A. Appolonova<sup>2</sup>, G. M. Rodchenkov<sup>2</sup>, and V. P. Zherdev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia.

<sup>2</sup> Moscow Antidoping Center, Moscow, 107005 Russia.

Major metabolites of the new original compound of peptide nature (neurotensin analog) dilept (N-caproyl-L-prolyl-L-tyrosine methyl ester), which was designed at the Zakusov Institute of Pharmacology, were isolated and identified using the HPLC-MS method. The structures of metabolites were confirmed using reference compounds obtained by oncoming synthesis. The stability of dilept *in vitro* in human and rat plasma and *in vivo* upon peroral administration in rats was studied. It is established that dilept is rapidly hydrolyzed in rat plasma to N-caproyl-L-prolyl-L-tyrosin (metabolite M1), while being more stable in human plasma *in vitro*. In experiments with peroral administration of dilept in rats, metabolite M2 (N-caproyl-L-proline) was found besides M1 in the blood stream. It is suggested that M2 is a product of the enzymatic hydrolysis of dilept by peptidases.

**Key words:** Dilept, dipeptide, neuroleptic, HPLC-MS, metabolites