

УДК 546.100.02.3:547.15/17

СИНТЕЗ МЕЧЕННОГО ДЕЙТЕРИЕМ САЛИЦИЛ-КАРНОЗИНА

© 2023 г. В. П. Шевченко^{1,*}, И. Ю. Нагаев¹, О. И. Куликова^{2,**}, академик РАН Н. Ф. Мясоедов¹

Поступило 28.01.2023 г.

После доработки 28.03.2023 г.

Принято к публикации 03.04.2023 г.

Изучено влияние температуры на эффективность введения дейтерия в новое биологически активное соединение салицил-карнозин (СК). В качестве источника дейтерия использовали газообразный дейтерий и тяжелую воду. Синтез меченого СК твердофазным методом при 190°C приводит к получению [D]СК с выходом 53% и содержанием дейтерия около 4.8 атомов на молекулу. При проведении изотопного обмена с дейтериевой водой показано, что после предварительной обработки катализатора при комнатной температуре газообразным дейтерием изотопный обмен между протонами СК и дейтериевой водой происходит более эффективно. [D]СК образуется с выходом 46% и содержит около 7.3 атомов дейтерия на молекулу. При проведении препаративного синтеза меченого СК по этой методике при 190°C выход [D]СК составил 60–70% при содержании дейтерия около 6.2 атомов на молекулу. Новая методика активизации включения дейтерия в пептиды открывает дополнительные возможности при получении высокомеченных препаратов.

Ключевые слова: салицил-карнозин, дейтерий, синтез, меченые соединения

DOI: 10.31857/S2686953523600058, **EDN:** ZBENEH

Салициловая кислота и ее производные широко применяются в медицине в качестве нестероидных противовоспалительных препаратов, а также обладают жаропонижающим, анальгетическим и антиагрегантным эффектами [1]. Природный дипептид карнозин также обладает широким спектром биологической активности, в том числе антиоксидантным и нейропротекторным действием [2]. Новое соединение — салицил-карнозин (салицил-β-аланил-L-гистидин, СК, рис. 1), — полученное путем реакции конденсации ацетилсалициловой кислоты и карнозина, сочетает в себе полезные свойства этих двух терапевтически активных молекул. СК обладает высокой антиагрегантной, супероксид-перехватывающей, антиоксидантной и цито- и нейропротекторной активностью и способен обеспечивать защиту слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта от побочных повреждающих эффектов, присущих

нестероидным противовоспалительным препаратам [3–5].

Все это обуславливает перспективность дальнейшего изучения СК и необходимость оценки его фармакологических характеристик при введении в организм экспериментальных животных. В связи с этим была поставлена задача синтезировать меченный дейтерием СК как внутреннего стандарта для повышения достоверности этих исследований.

Ранее было показано, что в другое производное карнозина — пирролилкарнозин (ПК) более перспективно вводить дейтерий изотопным обменом с дейтериевой водой на катализаторе, предварительно обработанном газообразным дейтерием [6]. По этой методике удалось ввести на два атома дейтерия больше, чем без использования активированного газообразным дейтерием гетерогенного катализатора. Но возник вопрос, будет ли наблюдаться та же тенденция, если изначально обмен между СК и дейтериевой водой не

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра “Курчатовский институт” (НИЦ “Курчатовский институт” — ИМГ), 123182 Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Научный центр неврологии” (ФГБНУ НЦН), 125367 Москва, Россия

*E-mail: nagaev@img.ras.ru

**E-mail: kulikova@neurology.ru

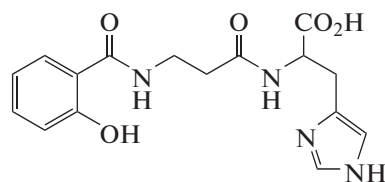


Рис. 1. Структурная формула салицил-карнозина (СК).

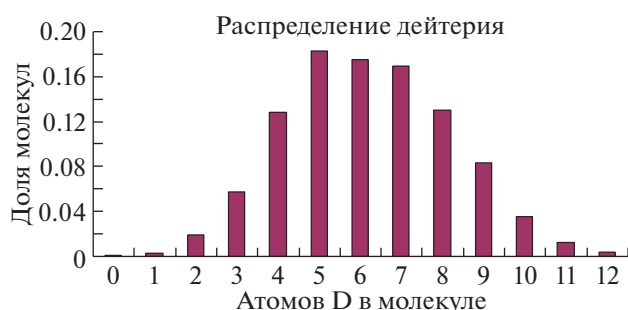


Рис. 2. Содержание изотопомеров при препаративном синтезе [D]СК.

столь эффективен, как в случае пирролилкарнозина.

При введении изотопов водорода в абсцизовую кислоту, даже при температуре 220°C в присутствии диизопропилэтиламина или триэтиламина, не удавалось ввести более трех атомов дейтерия [7]. Часто присутствие оснований в большей степени понижало выход меченого соединения, чем активировало изотопный обмен [8]. То есть условия проведения реакции необходимо каждый раз корректировать с учетом устойчивости тех или иных препаратов [9, 10]. С учетом возможных препятствий при использовании перечисленных выше методов необходимо в каждом случае при получении других соединений подтверждать эффективность предложенной модификации методики изотопного обмена.

Цель данной работы заключается в разработке методики и получении меченого СК, содержащего несколько атомов дейтерия.

При проведении реакции по методике, предложенной ранее для ПК [6], 5–6 мг смеси СК–5%Pd/Al₂O₃–Al₂O₃ (1 : 5 : 20) выдерживали 2 ч с газообразным дейтерием при комнатной температуре и давлении D₂ 400 гПа. Затем вносили 150 мкл дейтериевой воды, ампулу продували аргоном и запаивали. Реакцию вели в диапазоне температур 150–190°C в течение 10 мин. После охлаждения ампулу вскрывали, растворитель упаривали и остаток растворяли в 0.15 мл метанола. Катализатор отделяли центрифугированием. Далее полученный [D]СК анализировали на масс-спектрометре LCQ Advantage MAX (Термо-электрон, США) с ионизацией электрораспылением и прямым вводом раствора образца, а также методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Милихром А-02, колонка ProntoSIL 120-5-C18 AQ (2 × 75 мм, размер частиц 5 мкм, температура колонки 35°C), длина волны 210 нм, элюент А — 0.2 М LiClO₄ + 0.005 М HClO₄, элюент Б — метанол, линейный градиент от 0 до 80% Б за 16.5 мин, скорость пода-

чи элюента 150 мкл мин⁻¹, время удерживания СК 6.95 мин.

Эксперименты проводили при разных температурах и времени реакции. Как видно из приведенных результатов (табл. 1), изотопный обмен между СК и дейтериевой водой оказался значительно ниже, чем при работе с ПК [6]. Очевидно, это связано с тем, что эффективность взаимодействия протонов молекул салициловой кислоты в СК с дейтериевой водой ниже, чем с пирролильным фрагментом ПК. Действительно, при 150°C изотопным обменом с дейтериевой водой в ПК включалось 4.4 атома дейтерия на молекулу. В то время как даже при 190°C за счет обмена с D₂O в молекулы СК включилось всего 1.7 атома дейтерия, а в салициловый фрагмент СК — только 0.6 атома. Интересно также отметить, что при введении дейтерия в ПК с активированным катализатором при 150°C в течение первых 5 мин в пептид включается около 90% метки относительно его включения за час ведения реакции. В случае СК при 190°C подобный результат достигается только за 20 мин. Таким образом, достижение равновесия при включении дейтерия обменом с D₂O для СК занимает больше времени, чем в случае ПК.

Препаративный синтез [D]СК с использованием дейтериевой воды в отработанных условиях проводили при 190°C в течение 30 мин (рис. 2).

Выход в этих условиях был около 50%, а содержание в веществе — 6–7 атомов дейтерия. В гистидин при этих условиях включается около 2.94 атома дейтерия, в салициловый фрагмент — 2.79.

Исследовали распределение изотопа в молекуле [D]СК и при использовании твердофазного метода (табл. 2). Удовлетворительным считался выход не менее 50%, а содержание дейтерия — 4 атома и выше.

Как видно из данных табл. 2, СК с искомыми параметрами получен при проведении реакции при 190–200°C и давлении D₂ 400 гПа в течение 10 мин.

Согласно данным табл. 2, эффективный изотопный обмен между D₂ и СК начинается при температуре 180°C и выше, когда практически весь пептид попадает в зону обмена (содержание изотопомера без дейтерия близко к нулю). Это приводит к росту содержания дейтерия и способствует более быстрой деградации СК. Также при повышении температуры включение дейтерия в разные фрагменты СК становится более равномерным. Получение препаративных количеств [D]СК этим методом возможно при 190°C.

Выводы о влиянии температуры на распределение дейтерия в [D]СК при твердофазном и жидкофазном методах сделаны на основании

Таблица 1. Изотопный обмен между СК и дейтериевой водой при разных температурах и времени реакции

Изотопомеры	Температура, °C								
	150	175	190 ^a	190 ^b	190 ^c	190 ^e	190 ^d	190 ^e	190 ^{жс}
D ₀	7.60	4.58	4.61	3.56	0.19	0.20	0.10	0.11	0.09
D ₁	54.07	32.17	38.60	28.38	0.30	0.43	0.13	0.14	0.12
D ₂	21.49	22.61	40.03	34.92	1.01	0.93	0.28	0.29	0.24
D ₃	10.24	14.12	14.01	19.74	4.09	2.18	0.86	0.75	0.62
D ₄	4.67	13.04	2.49	9.07	11.11	6.51	3.32	2.80	2.64
D ₅	1.64	9.79	0.37	3.28	19.81	14.91	9.94	8.73	8.13
D ₆	0.38	2.72	—	0.93	22.73	20.73	18.66	17.58	16.97
D ₇	—	0.76	—	0.17	18.67	20.91	22.55	23.39	22.67
D ₈	—	0.28	—	—	11.82	16.16	19.96	20.83	21.52
D ₉	—	—	—	—	5.86	9.75	13.19	13.93	14.72
D ₁₀	—	—	—	—	3.28	5.39	6.72	7.61	7.78
D ₁₁	—	—	—	—	1.41	1.57	2.68	2.54	3.26
D ₁₂	—	—	—	—	—	0.44	1.03	1.03	1.07
D ₁₃	—	—	—	—	—	—	0.73	0.31	0.20
ΣD	1.57	2.45	1.72	2.17	6.21	6.74	7.33	7.39	7.48
D _{гистидин}	1.02	1.32	1.16	1.30	3.06	3.21	3.36	3.41	3.55
D _{салицил}	0.53	1.07	0.55	0.85	3.22	3.45	3.52	3.55	3.58
ВЫХОД	44	45	65	73	64	51	46	35	25

^a Изотопный обмен между СК и дейтериевой водой без добавок (10 мин). ^b Не активированная смесь СК–5%Pd/Al₂O₃–Al₂O₃ (10 мин). ^{c–жс} Реакция с активированной смесью СК–5%Pd/Al₂O₃–Al₂O₃ (^c 10 мин, ^e 20 мин, ^d 30 мин, ^e 45 мин, ^{жс} 60 мин).

Таблица 2. Эффективность изотопного обмена в атмосфере дейтерия и устойчивость СК при разных температурах

Изотопомеры	Температура, °C							
	125	140	155	170	180	190	200	210
D ₀	70.05	48.79	9.98	3.44	0.95	0.35	0.23	0.12
D ₁	27.88	45.70	66.29	44.78	9.92	0.81	0.16	0.64
D ₂	1.84	3.18	13.80	28.76	23.26	4.02	0.22	0.47
D ₃	0.32	2.17	4.74	11.02	24.90	14.64	0.84	0.36
D ₄	—	0.22	2.69	5.22	17.05	25.98	4.92	0.84
D ₅	—	—	2.03	3.91	11.41	25.28	15.89	3.14
D ₆	—	—	0.60	2.12	6.97	15.95	27.42	13.75
D ₇	—	—	—	0.80	3.20	7.53	30.79	35.47
D ₈	—	—	—	—	1.45	3.18	10.13	18.83
D ₉	—	—	—	—	0.76	1.48	5.67	15.32
D ₁₀	—	—	—	—	0.20	0.64	2.17	6.63
D ₁₁	—	—	—	—	—	0.21	1.01	3.12
D ₁₂	—	—	—	—	—	—	0.40	1.04
D ₁₃	—	—	—	—	—	—	0.16	0.33
ΣD	0.32	0.60	1.33	1.94	3.41	4.79	6.55	7.58
D _{гистидин}	0.21	0.43	0.92	1.25	1.79	2.74	3.48	3.99
D _{салицил}	0.10	0.15	0.40	0.67	1.57	1.91	2.63	3.05
ВЫХОД	73	72	66	65	62	53	43	29

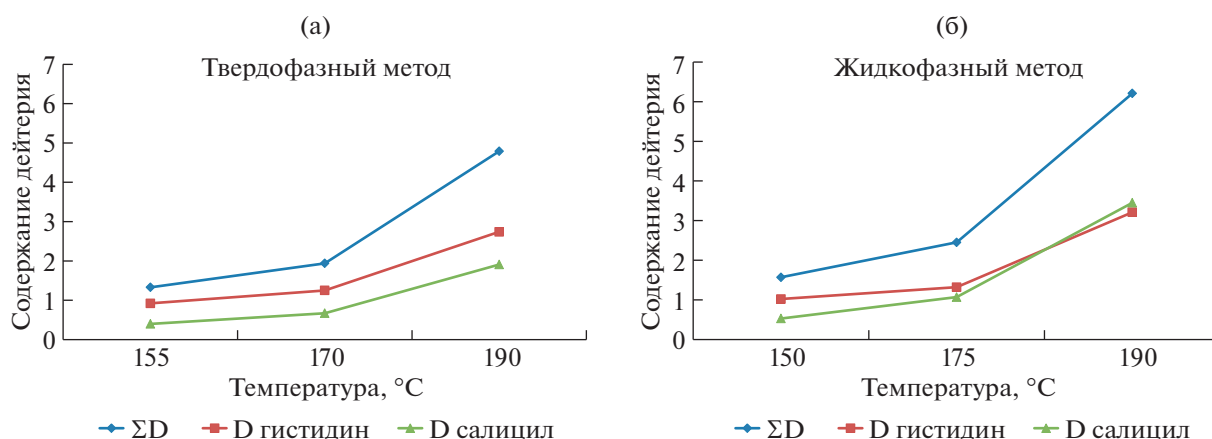


Рис. 3. Распределение дейтерия при использовании газообразного дейтерия (а) или дейтериевой воды (б).

данных табл. 1, 2 и рис. 3. При реализации обоих методов изотопный обмен активируется при температурах более 180 °C. При твердофазной реакции более эффективное включение дейтерия происходит в гистидин, по сравнению с салициловым фрагментом. При использовании дейтериевой воды выигрыш в содержании дейтерия в [D]СК определяется ростом эффективности включения дейтерия в салициловый фрагмент. При росте температуры (125–210 °C) при использовании твердофазного метода количество дейтерия, включенного в гистидиновую и салициловую части, увеличивалось примерно на одинаковую величину. При использовании дейтериевой воды с ростом температуры (150–190 °C) включение дейтерия в салициловый фрагмент происходило более эффективно, чем в гистидин (рис. 3). В результате через час содержание дейтерия в этих фрагментах практически совпадало (рис. 3б).

В рамках продолжения исследования новой методики, позволяющей вводить дополнительное количество изотопа водорода в препараты, показано, что на конечный результат влияет не только температура, но и время проведения реакции. Установлено, что при 150 и 175 °C при предварительном выдерживании (2 ч, 23 °C) смеси СК–5%Pd/Al₂O₃–Al₂O₃ в атмосфере D₂ включение дейтерия в СК было примерно таким же, как при твердофазном методе в том же интервале температур (табл. 1, 2).

И только при более высокой температуре (190 °C) наблюдали заметный эффект влияния предварительного выдерживания (2 ч, 23 °C) смеси СК–5%Pd/Al₂O₃–Al₂O₃ в атмосфере D₂. То есть использование дейтериевой воды в связке с твердофазным методом имеет в этом случае перспективу. При применении твердофазного метода в СК включается 4–5 атомов дейтерия с выходом 50–55% при 190 °C (табл. 2). При использовании дейтериевой воды и неактивированного катализа-

тора при 190 °C включается 2–2.3 атома дейтерия и выход составляет 70–75% (табл. 1). Когда же реакцию вели с дейтериевой водой при 190 °C с предварительным выдерживанием СК–5%Pd/Al₂O₃–Al₂O₃ в атмосфере D₂, эффективность изотопного обмена заметно росла, и в молекулу СК в среднем включалось 6–7 атомов дейтерия (табл. 1).

Установлено, что за период 10–30 мин включение дейтерия возрастает на 18%, а выход падает на 28% (табл. 1). А за период 30–60 мин включение дейтерия возрастает на 2%, а выход падает на 46% (табл. 1). Кинетика процесса при использовании разработанной методики указывает на то, что активированные частицы дейтерия, сольватированные на молекулах СК, заметно увеличивают включение дейтерия в СК. В кластерах, сольватированных на молекулах СК, присутствуют и атомарный дейтерий, и сольватированные электроны [11]. По-видимому, они способствуют деградации СК более продолжительное время, чем катионы дейтерия активируют изотопный обмен. Следовательно, процесс дополнительного включения дейтерия в этих условиях прекращается быстрее, чем деградация СК, которая происходит с нарастающей скоростью. Поэтому при 190 °C эту реакцию целесообразно проводить не более 30 мин.

Полученные результаты подтверждают концепцию о том, что при выдерживании СК, нанесенного на катализатор, в атмосфере D₂ активированные частицы дейтерия образуют кислотные центры не только на поверхности носителя, но и в молекулах СК. Наличие в молекулах СК кислотных центров способствует более эффективному изотопному обмену СК с D₂O. Негативное влияние активированных частиц дейтерия на выход [D]СК также не противоречит данной концепции.

Таким образом, полученные результаты являются еще одним примером применения нового метода, приводящего к повышению эффективности изотопного обмена с дейтериевой водой. Они соответствуют представлениям, согласно которым сольватированные молекулами СК активированные частицы, образовавшиеся из D₂, с одной стороны, должны повышать эффективность изотопного обмена, а с другой стороны, являться причиной более быстрой деградации вещества.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках темы № 1021052806528–6–1.6.4;3.1.1;3.1.9;3.1.8;3.2.25 “Фундаментальные аспекты нейропластичности в рамках модели трансляционной неврологии”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ekinci D., Şentürk M., Küfrevioğlu O.I.* // Expert Opin. Ther. Pat. 2011. V. 21. № 12. P. 1831–1841. <https://doi.org/10.1517/13543776.2011.636354>
2. *Berezhnov D.S., Stvolinsky S.L., Lopachev A.V., Devyatov A.A., Lopacheva O.M., Kulikova O.I., Abaimov D.A., Fedorova T.N.* // Amino Acids. 2019. V. 51. № 1. P. 139–150. <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2667-7>
3. *Танашиян М.М., Федорова Т.Н., Стволинский С.Л., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Мигулин В.А., Шабалина А.А., Трубицына И.Е., Лопачев А.В., Куликова О.И., Абаймов Д.А.* Патент РФ 2694061. 2019.
4. *Kulikova O.I., Stvolinsky S.L., Migulin V.A., Andreeva L.A., Nagaev I.Yu., Lopacheva O.M., Kulichenkova K.N., Lopachev A.V., Trubitsina I.E., Fedorova T.N.* // DARU J. Pharm. Sci. 2020. V. 28. P. 119–130. <https://doi.org/10.1007/s40199-019-00323-x>
5. *Стволинский С.Л., Федорова Т.Н., Хуторова А.В., Лопачев А.В., Тимошина Ю.А., Куликова О.И., Танашиян М.М.* Патент РФ 2780112. 2022.
6. *Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Федорова Т.Н., Мясоедов Н.Ф.* // Докл. Российской академии наук. Науки о жизни. 2023. Т. 508. С. 23–29. <https://doi.org/10.31857/S2686738922700020>
7. *Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Шапошников А.И., Шевченко К.В., Белимов А.А., Баташева С.Н., Гоголева Н.Е., Гоголев Ю.В., Мясоедов Н.Ф.* // ДАН. 2018. Т. 483. № 3. С. 274–278. <https://doi.org/10.31857/S086956520003247-4>
8. *Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Лопачев А.В., Мясоедов Н.Ф.* // Хим-фарм. журн. 2022. Т. 56. № 11. С. 48–52. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2022-56-11-48-52>
9. *Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф.* // Радиохимия. 2005. Т. 47. № 4. С. 368–373.
10. *Myasoedov N.F., Sidorov G.V., Kramerov V.N., Mishin V.I.* // J. Label. Compd. Radiopharm. 1999. V. 42. № 9. P. 859–866. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1344\(199909\)42:9<859::AID-JLCR248>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1344(199909)42:9<859::AID-JLCR248>3.0.CO;2-5)
11. *Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф.* Меченные тритием липофильные соединения. М.: Наука, 2003. 246 с.

SYNTHESIS OF DEUTERIUM-LABELED SALICYLCARNOSINE

V. P. Shevchenko^{a, #}, I. Yu. Nagaev^a, O. I. Kulikova^{b, ##}, and Academician of the RAS N. F. Myasoedov^a

^a*Institute of Molecular Genetics of National Research Centre “Kurchatov Institute” (NRC “Kurchatov Institute” – IMG), 123182 Moscow, Russian Federation*

^b*Research Center of Neurology (RCN), 125367 Moscow, Russian Federation*

[#]*E-mail: nagaev@img.ras.ru*

^{##}*E-mail: kulikova@neurology.ru*

The effect of temperature on the effectiveness of the introduction of deuterium into a new biologically active compound salicylcarnosine (SC) has been studied. Deuterium gas and heavy water were used as a source of deuterium. The synthesis of labeled SC by the solid-phase method at 190°C leads to the production of [D]SC with a yield of 53%, and a deuterium content of about 4.8 atoms per molecule. During isotope exchange with deuterated water, it was shown that after pretreatment of the catalyst at room temperature with deuterium gas, isotope exchange between SC protons and deuterated water occurs more efficiently. [D]SC is formed with a yield of 46% and contains about 7.3 deuterium atoms per molecule. During the preparative synthesis of labeled SC according to this technique at 190°C, the yield of [D]SC was 60–70%, with a deuterium content of about 6.2 atoms per molecule. A new technique for activating the inclusion of deuterium in peptides opens up additional opportunities for obtaining highly labelled drugs.

Keywords: salicylcarnosine, deuterium, synthesis, labeled compounds