

Синтез цикло-L-пролилглицина и изучение его антипаркинсонической активности

Колясникова К. Н., Голубятникова А. К., Ребеко А. Г., Вуколова М. Н.,
Поварнина П. Ю., Кузнецова Е. А.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Резюме. Цель работы состояла в разработке оптимальной схемы синтеза субстанции нейропептида цикло-L-пролилглицина (ЦПГ), потенциального препарата, полезного для комплексного лечения психиатрических патологий, включающих тревожные, депрессивные расстройства и нарушения когнитивных функций. Были рассмотрены две 4-стадийные схемы синтеза ЦПГ. Обе схемы привели к получению продукта с одинаковой оптической чистотой, сопоставимым общим выходом и временными затратами, однако первая схема в 2,5 раза выгоднее по стоимости основных реактивов на 100 г продукта. Первая схема нами отобрана в качестве основы для разработки лабораторного регламента. Также выявлена впервые антипаркинсоническая активность ЦПГ (0,05 и 0,5 мг/кг внутрибрюшинно) на модели галоперидоловой катаlepsии.

Ключевые слова: цикло-L-пролилглицин; нейропептид; пептидный синтез; антипаркинсоническая активность; галоперидоловая катаlepsия

Для цитирования:

Колясникова К.Н., Голубятникова А.К., Ребеко А.Г., Вуколова М.Н., Поварнина П.Ю., Кузнецова Е.А. Синтез цикло-L-пролилглицина и изучение его антипаркинсонической активности // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 3. – С. 19–26. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10051

Synthesis of cyclo-L-prolylglycine and study of its anti-parkinsonian activity

Koliasnikova KN, Golubyatnikova AK, Rebeko AG, Vukolova MN, Povarnina PYu, Kuznetsova EA
FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. The aim of the work was to develop an optimal scheme for the synthesis of substance of cyclo-L-prolylglycine neuropeptide (CPG), a potential drug useful for the integrated treatment of psychiatric pathologies, including anxiety, depressive disorders and cognitive impairment. Two 4-stage CPG synthesis schemes were considered. Both schemes led to a product with the same optical purity, comparable to the overall yield and time-consuming, however, the first scheme is 2.5 times more profitable in terms of the cost of basic reagents per 100 g of product. The first scheme was selected as the basis for the development of laboratory regulations. Also for the first time the anti-parkinsonian activity of CPG (0.05 and 0.5 mg/kg intraperitoneally) on a model of haloperidol catalepsia was detected.

Keywords: cyclo-L-prolylglycine; neuropeptide; peptide synthesis; antiparkinsonian activity; haloperidol catalepsia

For citations:

Koliasnikova KN, Golubyatnikova AK, Rebeko AG, Vukolova MN, Povarnina PYu, Kuznetsova EA. Synthesis of cyclo-L-prolylglycine and study of its anti-parkinsonian activity. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;3:19–26. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10051

Введение

В 1996 г. в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова был открыт новый нейропептид цикло-L-пролилглицин (ЦПГ) [1], структура которого ранее была предложена в качестве дипептидного топологического аналога классического ноотропа пирацетама [2]. Позже зарубежными исследователями было показано, что предшественником ЦПГ является инсулиноподобный фактор роста [3]. Изучение спектра фармакологической активности выявило наличие у ЦПГ ноотропных, анксиолитических, антигипоксических и нейропротекторных свойств [4–7]. Недавно были выявлены антидепрессивная [8] и анальгетическая [9] активности этого нейропептида. ЦПГ способен оказывать положительное модулирующее действие на глутаматные AMPA-рецепторы [10] и, как и другие положительные модуляторы AMPA-рецепторов, приводить к усилению синтеза мозгового нейротрофического фактора (BDNF) [11].

Таким образом, ЦПГ можно рассматривать как потенциальный препарат, полезный для комплексного

лечения психиатрических патологий, включающих тревожные, депрессивные расстройства и нарушения когнитивных функций. Необходимым этапом создания любого лекарственного препарата является разработка оптимального метода синтеза субстанции, что явилось целью настоящей работы. Кроме того, нами была изучена антипаркинсоническая активность ЦПГ на модели галоперидоловой катаlepsии на мышах.

Материалы и методы

Экспериментальная химическая часть

Температуру плавления определяли в открытых капиллярах с использованием прибора OptiMelt MPA 100 (США) и не корректировали. ¹H-ЯМР спектры регистрировали на спектрометре Bruker AC-250 (Германия) в растворах CDCl₃ и DMSO-d₆, используя в качестве внутреннего стандарта ТМС. Удельное оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin-Elmer-241. ТСХ проводили на пластинах Kieselgel 60 F 254 (Merck). Соединения с амидными группами

обнаруживали в парах йода, соединения с открытой карбоксильной группой – бромкрезоловым зелёным, содержащие ароматические группы – в УФ-лучах. Используемые растворители очищали и сушили стандартными методами. Элементный анализ проводили на приборе для определения углерода и водорода с четырьмя электрическими печами (600–900 °С, тип МА-Г/6Р, завод ЛЭТО, Россия) в токе кислорода и на аппарате для определения азота с тремя такими же электрическими печами в токе углекислого газа. Данные элементного анализа соединений относительно процентного содержания С, Н и N отклоняются от теоретических не более чем на 0,4 %.

Схема 1

а) *N*-(Трет-бутилоксикарбонил)-глицин (Вос-Gly-OH). К раствору 7,5 г (0,1 моль) глицина в 100 мл 1 н раствора NaOH прибавляли раствор 5 г NaHCO₃ в 50 мл воды, 100 мл диоксана и 26,6 г (0,11 моль) ди-трет-бутилпиокарбоната. Смесь перемешивали 2 ч при комнатной температуре, затем добавляли 200 мл воды. Избыток ди-трет-бутилпиокарбоната экстрагировали петролейным эфиром (2 × 150 мл). К водному раствору добавляли 150 мл этилацетата, подкисляли лимонной кислотой до pH 4–5 (по универсальному индикатору), экстрагировали этилацетатом (2 × 150 мл). Экстракт промывали насыщенным раствором NaCl (2 × 150 мл) и высушивали над Na₂SO₄. Растворитель удаляли в вакууме. Остаток в виде жёлтого масляобразного вещества кристаллизовали под смесью диэтилового эфира и гексана, кристаллы отфильтровывали, сушили в вакууме. Выход 15,3 г (89 %); R_f 0,4 (хлороформ – метанол 10:1). Т.пл. – 96–98 °С. Лит. [12] – Т.пл. 94–95 °С.

б) Хлоридрат метилового эфира *L*-пролина (H-L-Pro-OMe·HCl). К 60 мл метилового спирта, охлаждённого до –20 °С, прибавляли по каплям 2,54 мл (34,64 ммоль) тионилхлорида и порциями вносили 2 г (17,32 ммоль) *L*-Pro-OH. Суспензию перемешивали 2 ч при –5 °С, и 2 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляли в вакууме; эту операцию повторяли дважды, каждый раз добавляя 30 мл метанола. Остаток в виде жёлтого масла кристаллизовали под диэтиловым эфиром, отфильтровывали, высушивали в вакууме. Выход – 2,7 г (94 %); Т.пл. – 68–70 °С; R_f 0,75 (изопропиловый спирт – водный аммиак 7:3). $[\alpha]_D^{20}$ – 33° (с 1, метанол). Лит. [13] – Т.пл. 71 °С. $[\alpha]_D^{20}$ – 32,6° (с 2, метанол).

в) Метилловый эфир *N*-трет-бутилоксикарбонил-глицил-*L*-пролина (Вос-Gly-*L*-Pro-OMe). К раствору 1,06 г (6,04 ммоль) *N*-трет-бутилоксикарбонил-глицина и 0,68 мл (6,04 ммоль) *N*-этилморфолина в 12 мл этилацетата, охлаждённого до –12 °С, прибавляли 0,79 мл (6,04 ммоль) изобутилхлорформиата (ИБХФ) при интенсивном перемешивании. Через 2–3 мин в реакционную смесь прибавляли по каплям раствор 1,00 г (6,04 моль) хлоридрата метилового эфира *L*-пролина

и 0,68 мл (6,04 ммоль) *N*-этилморфолина в смеси 4 мл ДМФА и 4 мл этилацетата. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при –12 °С и 1 ч при комнатной температуре. Осадок отфильтровывали. Растворители удаляли в вакууме. Остаток растворяли в хлороформе. Промывали 5 % водным раствором NaHCO₃ (2 × 40 мл), водой (2 × 40 мл), 1 н лимонной кислотой (2 × 40 мл), водой до pH 5±6 по универсальному индикатору, высушивали над MgSO₄. Осушитель отфильтровывали, растворитель удаляли в вакууме. Вещество получено в виде масла. Выход 1,52 г (88 %). $[\alpha]_D^{20}$ –25° (с 1, метанол); R_f 0,85 (хлороформ – этанол, 9:1) (Лит [13] R_f 0,85 (хлороформ – этанол, 9:1); $[\alpha]_D^{22}$ –27° (с 1, метанол)). ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃), δ, м.д.: 1,19 (с, 9H, (CH₃)₃), 1,64–1,98 (м, 4H, C^γH₂ Pro, C^βH₂ Pro), 3,17–3,42 (м, 2H, C^δH₂ Pro), 3,48 (с, 3H, O-CH₃), 3,70 (м, 2H, C^αH₂ Gly), 4,25 (д, 2H, C^αH₂ Pro), 5,17 (уш. с, 1H, NH).

д) Цикло-*L*-пролилглицин (cyclo-*L*-Pro-Gly). Раствор 2,30 г (8,00 ммоль) Вос-Gly-*L*-Pro-OMe в 50 мл муравьиной кислоты (96 %) выдерживали 2 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляли в вакууме (при 40 °С). К остатку прибавляли 60 мл толуола и 120 мл изобутанола и кипятили 2,5 ч с насадкой Дина–Старка. Растворители удаляли в вакууме. Остаток кристаллизовали из этанола. Полученные кристаллы отфильтровывали, промывали диэтиловым эфиром, высушивали на воздухе. Выход – 1,54 г (83 %). Т.пл. – 207–209 °С (с разложением); $[\alpha]_D^{20}$ –206° (с 1, вода) (Лит [14] Т.пл. – 213–214 °С; $[\alpha]_D^{20}$ –214° (с 4, вода)); R_f 0,45 (бутанол – уксусная кислота – вода, 4:1:1), R_f 0,27 (хлороформ – этанол, 12:1). ¹H-ЯМР-спектр (DMCO-*d*₆ + CF₃COOD), δ, м.д.: 1,7–2,2 (м, 4H, C^γH₂ Pro, C^βH₂ Pro), 3,39 (м, 2H, C^δH₂ Pro), 3,53 и 4,0 (2 д, 2H, J 16,65 Hz, C^αH₂ Gly), 4,13 (д.д., 1H, C^αH Pro), 8,11 (уш с, 1H, NH). Элементный анализ: вычислено, %: С 54,54; Н 6,54; N 18,17; найдено, %: С 54,61; Н 6,51; N 18,22; C₇H₁₀N₂O₂.

Схема 2

а) *N*-Карбобензоксиглицин (Z-Gly-OH). К раствору 7,5 г (0,1 моль) глицина в 25 мл 4 н раствора NaOH (0,1 моль), охлажденному до –5 °С, при перемешивании и охлаждении прибавляли порциями в течение 20–30 мин 30 мл 4 н NaOH (0,12 моль) и 13,8 мл (0,11 моль) карбобензоксиглорда. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, избыток карбобензоксиглорда экстрагировали 20 мл диэтилового эфира. Водную фазу при охлаждении льдом подкисляли 5 н HCl до слабощелочной реакции, выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали на воздухе. Перекристаллизовывали из хлороформа. Выход – 15,3 г (76 %); Т.пл. – 117–118 °С. Лит. [15] Т.пл. – 120 оС.

б) Хлоридрат этилового эфира *L*-пролина (H-L-Pro-OC₂H₅·HCl). К 100 мл абсолютного этанола, охлаждённого до –20 °С, прибавляли по каплям 14,6 мл (0,2 моль) тионилхлорида и порциями вносили 11,5 г

(0,1 моль) *L*-пролина. Далее реакционную смесь перемешивали 2 ч при -5°C и 2 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляли в вакууме; эту операцию повторяли дважды, каждый раз добавляя 50 мл абсолютного этанола. Получали 16,9 г (95 % хлоргидрата этилового эфира *L*-пролина в виде желтого масла. $[\alpha]_D^{23} -43^{\circ}$ (с 3, этанол); R_f 0,75 (изопропиловый спирт – водный аммиак 7:3). ^1H -ЯМР-спектр (ДМСО- d_6) δ , м.д.: 1,19 (м, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 1,8-2,1 (м, 4H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}_2$ Pro, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Pro), 3,2 (м, 2H, $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ Pro), 4,2 (м, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 4,5 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Pro), 9,9 (уш.с., 1H, NH). Лит. данные [16]: масло; $[\alpha]_D^{23} -44,8^{\circ}$ (с 3,03, этанол).

в) Этиловый эфир *N*-карбоксиглицил-*L*-пролина (*Z*-Gly-*L*-Pro-OEt). К раствору 4,17 г (20 ммоль) карбоксиглицина в 100 мл этилацетата, охлажденному до -15°C , при интенсивном перемешивании прибавляли 2,25 мл (20 ммоль) *N*-метилморфолина и 2,68 мл (20 ммоль) ИБХФ. Через 2-3 мин в реакционную смесь прибавляли по каплям раствор 3,30 г (20 ммоль) хлоргидрата этилового эфира *L*-пролина и 2,25 мл (20 ммоль) *N*-метилморфолина в 35 мл ДМФА. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при -12°C и 1 ч при комнатной температуре. Растворители удаляли в вакууме. Остаток растворяли в хлороформе. Промывали 5 % водным раствором NaHCO_3 (2×40 мл), водой (2×40 мл), 1 н соляной кислотой (2×40 мл), водой, высушивали над Na_2SO_4 . Осушитель отфильтровывали, растворитель удаляли в вакууме. Вещество получено в виде масла. Выход – 5,35 г (80 %). R_f 0,83 (хлороформ – метанол, 9:1) (Лит [14] R_f 0,83 (хлороформ – метанол, 9:1).

г) Цикло-*L*-пролилглицин (*cyclo-L*-Pro-Gly). К раствору 0,57 г (1,7 ммоль) *Z*-Gly-Pro-OEt в 100 мл ДМФА прибавляли 0,45 г 10 % Pd/C и через раствор при перемешивании пропускали водород в течение 2 ч. Раствор упаривали, остаток растворяли в спирте, катализатор отфильтровывали, растворитель удаляли в вакууме. Остаток кристаллизовали из этанола. Выход – 0,239 г (92 %). Т.пл. – $205-207^{\circ}\text{C}$ (с разложением); $[\alpha]_D^{20} -202^{\circ}$ (с 1, вода). R_f 0,45 (бутанол – уксусная кислота – вода, 4:1:1), R_f 0,27 (хлороформ – этанол, 12:1). ^1H -ЯМР-спектр (ДМСО- d_6 + CF_3COOD), δ , м.д.: 1,7-2,2 (м, 4H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}_2$ Pro, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Pro), 3,40 (м, 2H, $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ Pro), 3,54 и 4,0 (2 д, 2H, J 16,6 Hz, $\text{C}^{\alpha}\text{H}_2$ Gly), 4,12 (д.д., 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Pro), 8,10 (уш с, 1H, NH). Элементный анализ: вычислено, %: C 54,54; H 6,54; N 18,17; найдено, %: C 54,41; H 6,54; N 18,20; $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$.

Экспериментальная фармакологическая часть

Животные. В экспериментах были использованы мыши-самцы линии BALB/C весом 21-24 г, полученные из Центрального питомника лабораторных животных Филиал «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», Московская область. Содержание животных соответствовало прави-

лам лабораторной практики (GLP) и нормативным документам «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев», утвержденным Главным Государственным санитарным врачом 06.04.1973 г. №1045-73 и Приказом МЗ РФ № 199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Эксперименты проводили с 10 до 16 ч. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Галоперидоловую катаlepsию вызывали внутрибрюшинным введением галоперидола в дозе 1 мг/кг. Пирацетам, ЦПГ или физиологический раствор вводили внутрибрюшинно (в/б) в день эксперимента за 15 мин до введения галоперидола (1 мг/кг, в/б). Первой группе ($n = 7-10$ для каждой группы) вводили физраствор, второй группе – пирацетам или ЦПГ в разных дозах. Через 60 мин после введения галоперидола регистрировалась катаlepsия: животное помещалось на параллельные перекладки на высоте 4 см таким образом, чтобы спина животного была прямой. Фиксировалось время пребывания мышей в неподвижном состоянии в течение 2 мин [17].

Статистические методы. Для выявления различий между экспериментальными группами были применены статические методы: One-Way-ANOVA и *t*-Test.

Результаты и обсуждение

Для циклического дипептида не имеет значения, в каком порядке аминокислоты шли в исходном линейном пептиде, однако от этого зависят выход и оптическая чистота продукта. Например, выбор глицина в нашем случае в качестве карбоксильной компоненты при получении защищенного Gly-Pro снижает риск рацемизации из-за отсутствия в молекуле этой аминокислоты хирального центра. Известно [18, 19], что наличие имидной связи при пролине в дипептидной последовательности Gly-Pro, отсутствующей в Pro-Gly, увеличивает долю цисоидной конформации пептидной связи, что, в свою очередь, способствует внутримолекулярной циклизации [20, 21]. Таким образом, для получения ЦПГ рационально использовать дипептиды с последовательностью Gly-Pro.

Известно, что использование трет-бутилокси-карбонильной (Boc) защитной группы для аминокислоты и сложноэфирной для карбоксильной позволяет в мягких условиях (кислотный катализ) удалять защиту с аминокислоты и получать требуемый эфир в виде соответствующей соли. Удаление бензилоксикарбонильной (*Z*) защитной группы также проводится в мягких условиях каталитического гидрогенолиза. Метилловые эфиры аминокислот обычно легче подвергаются циклизации, чем этиловые за счёт меньших пространственных затруднений, поэтому в качестве защиты для карбоксильной группы целесообразно выбрать метилловые эфиры.

Среди методов образования пептидной связи наиболее широко используются методы смешанных ангидридов и активированных эфиров. Для получения защищённого Gly-Pro нами был выбран первый метод. К преимуществам данного метода можно отнести низкую стоимость реагентов, высокую скорость конденсации при низкой температуре, достаточно высокий выход продукта. Проведение реакции в условиях Андерсона [22] позволяет избежать рацемизации.

Важным является выбор условий циклизации. Циклизацию можно проводить путём кипячения водного раствора метилового эфира Вос-защищённого дипептида в автоклаве согласно [23], однако в этом случае существует риск рацемизации. Менее склонный к потере оптической чистоты метод состоит в снятии Вос-защиты муравьиной кислотой и последующей циклизацией в смеси 2-бутанол–толуол с азеотропной отгонкой [24]. Мы провели сравнение схемы синтеза ЦПГ на основе последнего метода циклизации (схема 1, рис. 1) с синтезом ЦПГ с использованием Z-защищённого дипептида и реакции каталитического гидрогенолиза по схеме 2 (рис. 2) [14].

По схеме 1 ЦПГ был получен циклизацией при нагревании в смеси 2-бутанол–толуол (2:1) метилового эфира глицил-L-пролина, который, в свою очередь, получали без выделения из Вос-Gly-L-Pro-OMe деблокированием муравьиной кислотой. Защищённый дипептид получали методом смешанных ангидридов с использованием изобутилхлорформиата в условиях Андерсона [22]. В качестве карбоксильной компоненты использовали Вос-Gly-OH, а в качестве аминокомпоненты – метиловый эфир пролина, который получали в метаноле в присутствии хлористого тионила по методу Бреннера [25]. Общий выход составил 60 % в расчёте на исходный пролин.

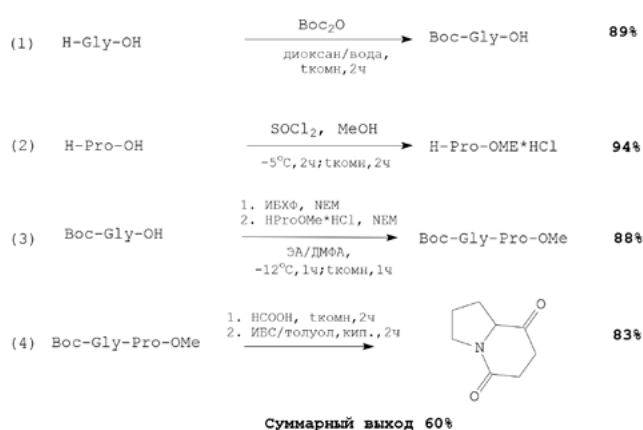


Рис. 1. Схема 1 получения ЦПГ

Второй способ получения ЦПГ основан на защищённом дипептиде Z-Gly-L-Pro-OEt [14] (схема 2, рис. 2), который получали методом смешанных ангидридов в условиях Андерсона [22]. В качестве карбоксильной компоненты использовали Z-Gly-OH, а в качестве

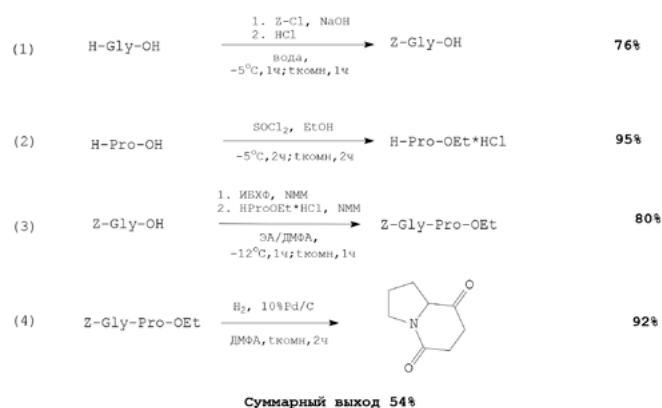


Рис. 2. Схема 2 получения ЦПГ

аминокомпоненты – этиловый эфир пролина, который получали этерификацией абсолютным этанолом в присутствии хлористого тионила по методу Бреннера [25]. Каталитический гидрогенолиз Z-Gly-L-Pro-OEt в ДМФА над 10 % Pd/C сопровождался самопроизвольной циклизацией в дикетопиперазин, при этом циклизация проходила с высоким выходом (92 %) и без рацемизации. Суммарный выход составил 54 % в расчёте на исходный пролин.

Для перекристаллизации ЦПГ в обоих случаях использовали этиловый спирт-ректификат, поскольку он менее токсичен, чем предлагаемый в литературе для этой цели ацетон [26]. Структура ЦПГ была подтверждена ¹H ЯМР, химическая чистота – данными элементного анализа.

При сравнении способов получения ЦПГ в качестве критерия оптимальности принималась оптическая чистота конечного продукта, а при равной оптической чистоте – экономические показатели синтеза. По количеству стадий синтеза по схемам 1 и 2 не различаются и оба состоят из 4 стадий.

В таблице 1 представлено сравнение двух способов синтеза ЦПГ. Показано, что они сопоставимы по суммарному выходу, временным затратам и оптической

Таблица 1

Способы синтеза цикло-L-пролилглицина

Способ	Суммарный выход, %	Временные затраты, ч	Физико-химические характеристики	
			Т.пл., °С (из спирта)	[α] ²⁰ , ° (с 1, вода)
1	60	15	207–209	–206
2	54	13	205–207	–202

чистоте конечного продукта, поэтому рационально сравнивать экономические показатели синтеза. Сравнение себестоимости ЦПГ представлено в таблице 2.

Как видно, стоимость синтеза по первой схеме в 2,5 раза ниже, чем по второй, поскольку последняя требует использования дорогостоящего катализатора на стадии циклизации. Таким образом, первая схема

Таблица 2

Сопоставление стоимости реагентов для синтеза ЦПГ по 2 способам

Схема 1				Схема 2			
Реактив	Количество, г/100 г продукта	Цена за 1 кг (л), руб.	Стоимость, руб.	Реактив	Количество, г/100 г продукта	Цена за 1 кг (л), руб.	Стоимость, руб.
Пролин	72	53 250	3 834	Пролин	100	53 250	5 325
Глицин	50,9	4 950	252	Глицин	91	4 950	450
Хлористый тионил	91,4	700	64	Хлористый тионил	127	700	89
Ди-трет-бутилпирикарбонат	180,6	18 000	3 251	Карбобензоксихлорид	167,5	15 400	2 580
Муравьиная кислота	3 246	300	974	10% Pd/C	25*	28 000#	28 000
Бутанол-2	7 792	210	1 636	N-Метилморфолин	200,4	6 120	1 226
N-Метилморфолин	147	6 120	900	Изобутилхлорформиат	119,3	21 600	2 577
Изобутилхлорформиат	79	21 600	1 706	Абсолютный этанол	1 740	500	870
Диэтиловый эфир	2 037	470	957	Диэтиловый эфир	243	470	114
Этилацетат	3 605	200	721	Этилацетат	4 453	200	891
ДМФА	392	320	125	ДМФА	1 559	320	499
Метанол	4 320	450	1 944				
Диоксан	680	300	204				
Толуол	3 900	190	741				
ИТОГО			17 310	ИТОГО			42 621

* – катализатор 10 % от массы дипептида; # – цена за упаковку.
 Примечание: цены на реактивы и растворители на март 2019 г. по каталогам Alfa Aesar и ООО «Компонент-реактив».

получения ЦПГ является более рациональной и может стать основой для создания лабораторного регламента.

Как говорилось выше, ранее были изучены различные нейрорепродуктивные эффекты ЦПГ (табл. 3), но антипаркинсонические эффекты этого нейропептида были неизвестны. Для изучения антипаркинсонических свойств ЦПГ нами была использована модель каталепсии, вызываемой галоперидолом. Этот тест широко используется для выявления дофамин-положительного действия и при исследовании антипаркинсонического действия препаратов [17].

Влияние ЦПГ на каталепсию было изучено в диапазоне доз 0,01–1,0 мг/кг в/б. Эти дозы были выбраны на основании наличия нейрорепродуктивных эффектов в других тестах (см. табл. 3). В качестве препарата сравнения был использован пирацетам в дозах 100 и 200 мг/кг [27]. Было показано, что ЦПГ в дозах 0,05 и 0,5 мг/кг в/б способен ослаблять каталепсию, вызванную галоперидолом (рис. 3, а). В дозах 0,01 и 1,0 мг/кг в/б ЦПГ был неактивен. Пирацетам в этих же условиях был активен в дозах 100 и 200 мг/кг в/б (рис. 3, б), что соответствует данным литературы [27].

Таблица 3

Нейрорепродуктивные эффекты цикло-L-пролилглицина

Фармакологическая активность <i>in vivo</i>	Тест, животные	Активные дозы, мг/кг в/б
Ноотропная активность	Условный рефлекс пассивного избегания с амнезией, вызванной максимальным электрошоком, крысы	0,1 – 1,0
Анксиолитическая активность	Приподнятый крестообразный лабиринт, крысы	0,05 – 0,1
Антигипоксическая активность	Нормобарическая гипоксия с гиперкапнией, мыши	0,5 – 1,0
Нейропротекторная активность	Неполная глобальная ишемия головного мозга у крыс, вызванная необратимой двусторонней окклюзией общих сонных артерий, крысы	1,0 субхронически
Антидепрессивная активность	Неизбегаемое плавание по Порсолту, мыши BALB/c	1,0; 2,0 хронически

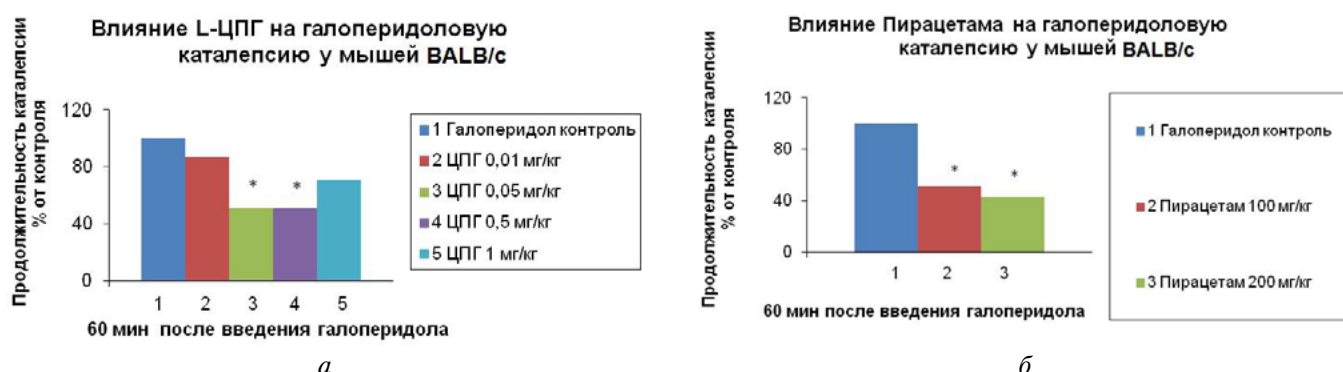


Рис. 3. Влияние пирацетама (а) и L-ЦПГ (б) на галоперидоловую каталепсию у мышей
Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем (one-way ANOVA).

Полученные данные свидетельствуют в пользу наличия у ЦПГ антипаркинсонической активности аналогично пирацетаму.

Выводы

Таким образом, нами предложена схема получения ЦПГ, которая может стать основой для создания лабо-

раторного регламента, а также показана антипаркинсоническая активность этого нейропептида в дозах 0,05 и 0,5 мг/кг в/б на модели галоперидоловой каталепсии.

Работа выполнена в рамках гос. задания (тема №0521-2019-0002 «Разработка новых средств и методов фармакотерапии тревожных расстройств и депрессивных состояний»).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Колясникова Ксения Николаевна
Автор, ответственный за переписку
e-mail: kszolotova@mail.ru
ORCID ID: 0000-0001-6797-692X
SPIN-код: 5682-2035
к. б. н., н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Голубятникова Анна Константиновна
Студент, РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва

Ребеко Алексей Геннадьевич
SPIN-код: 1049-3528
н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Вуколова Марина Николаевна
SPIN-код: 2049-8491
к. б. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Koliasnikova Ksenia
Corresponding author
e-mail: kszolotova@mail.ru
ORCID ID: 0000-0001-6797-692X
SPIN-code: 5682-2035
PhD, Research scientist of laboratory of peptide bioregulators of the Department of drug chemistry, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Golubyatnikova Anna
Student of Dmitry Mendeleev University, Moscow

Rebeko Alexey
SPIN-code: 1049-3528
Research scientist of laboratory of peptide bioregulators of the Department of drug chemistry, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Vukolova Marina
SPIN-code: 2049-8491
PhD, Senior research scientist of laboratory of peptide bioregulators of the Department of drug chemistry, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Поварнина Полина Юрьевна
ORCID ID: 0000-0002-0463-2190
SPIN-код: 5498-6724

к. б. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Кузнецова Елена Александровна
ORCID ID: 0000-0001-9228-0596
SPIN-код: 2798-7692

к. х. н., с. н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Povarnina Polina
ORCID ID: 00000-0002-0463-2190
SPIN0code: 5498-6724

PhD, Senior research scientist of laboratory of peptide bioregulators of the Department of drug chemistry, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Kuznetsova Elena
ORCID ID: 0000-0001-9228-0596
SPIN-code: 2798-7692

PhD, Senior research scientist of laboratory of fine organic synthesis of the Department of drug chemistry, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

- Gudasheva TA, Boyko SS, Akparov VKh, et al. Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-prolylglycine in rat brain. *FEBS Lett.* 1996;391:149–152.
- Гудашева Т.А., Островская Р.У., Максимова Ф.В. и др. Топологические аналоги пирacetам на основе пролина и их ноотропная активность // *Химико-фармацевтический журнал.* — 1989. — Т. 23. — № 3. — С. 276–281. [Gudasheva TA, Ostrovskaya RU, Maksimova FB, et al. Proline-based topologic pyracetam analogs and their nootropic activity. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal.* 1989;23(3):276–281. (In Russ).]
- Guan J, Gluckman P, Yang P, et al. Cyclic glycine-proline regulates IGF-1 homeostasis by altering the binding of IGFBP-3 to IGF-1. *Sci rep.* 2014;4:4388. DOI: 10.1038/srep04388
- Гудашева Т.А., Островская Р.У., Трофимов С.С., и др. Новый эндогенный дипептид циклопролилглицин подобен пирacetаму по селективности мнемоторного эффекта // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* — 1999. — Т. 128. — № 10. — С. 411–413. [Gudasheva TA, Ostrovskaya RU, Trofimov SS, et al. New Endogenous Dipeptide Cycloprolyl-Glycine Is Similar To Piracetam By Its Mnemotropic Selectivity. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 1999;128(4) 411–413. (In Russ).]
- Гудашева Т.А., Константинопольский М.А., Островская Р.У., Середенин С.Б. Анксиолитическая активность эндогенного ноотропного пептида циклопролилглицина в тесте приподнятого крестообразного лабиринта // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* — 2001. — Т. 131. — № 5. — С. 547–550. [Gudasheva TA, Konstantinopol'skii MA, Ostrovskaya RU, Seredenin SB. Anxiolytic Activity Of Endogenous Nootropic Dipeptide Cycloprolylglycine In Elevated Plus-Maze Test. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2001;131(5):547–550. (In Russ).]
- Колясникова К.Н., Гудашева Т.А., Назарова Г.А., и др. Сходство цикло-пролилглицина с пирacetамом по антигипоксическому и нейропротекторному эффектам // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* — 2012. — Т. 75. — № 9. — С. 3–6. [Kolyasnikova KN, Gudasheva TA, Nazarova GA, et al. Similarity of Cycloprolylglycine to Piracetam in Antihypoxic and Neuroprotective Effects. *Ekspierimental'naia i klinicheskaia farmakologija.* 2012;75(9):3–6. (In Russ).] DOI: 10.30906/0869-2092-2012-75-9-3-6
- Поварнина П.Ю., Колясникова К.Н., Николаев С.В., и др. Нейропептид циклопролилглицин проявляет нейропротекторную активность при системном введении на модели неполной глобальной ишемии у крыс и в условиях глутаматной нейротоксичности *in vitro* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* — 2015. — Т. 160. — № 11. — С. 600–603. [Povarnina PY, Kolyasnikova KN, Nikolaev SV, et al. Neuropeptide Cycloprolylglycine Exhibits neuroprotective activity after systemic administration to rats with modeled incomplete global ischemia and *in vitro* modeled glutamate neurotoxicity. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2015;160(11):600–603. (In Russ).]
- Ковалев Г.И., Абдуллина А.А., Васильева Е.В., и др. Антидепрессантоподобные свойства циклопролилглицина // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* — 2018. — Т. 81. — № 11. — С. 3–6. [Kovalev GI, Abdullina AA, Vasil'eva EV, et al. Antidepressant-like properties of

cycloprolylglycine. *Ekspierimental'naia i klinicheskaia farmakologija.* 2018;81(11):3–6. (In Russ).] DOI:10.30906/0869-2092-2018-81-11-3-6

9. Ferro JN, de Aquino FL, de Brito RG, et al. Cyclo-Gly-Pro, a cyclic dipeptide, attenuates nociceptive behavior and inflammatory response in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2015;42(12):1287–1295. DOI: 10.1111/1440-1681.12480

10. Гудашева Т.А., Григорьев В.В., Колясникова К.Н., и др. Нейропептид циклопролилглицин является эндогенным положительным модулятором AMPA-рецепторов // *Доклады академии наук.* — 2016. — Т. 471. — № 1. — С. 106–108. [Gudasheva TA, Kolyasnikova KN, Seredenin SB, et al. Neuropeptide cycloprolylglycine is an endogenous positive modulator of AMPA receptors. *Doklady Akademii nauk.* 2016;471(1):387–389 (In Russ).] DOI: 10.7868/S0869565216210273

11. Гудашева Т.А., Колясникова К.Н., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Нейропептид циклопролилглицин увеличивает содержание мозгового нейротрофического фактора в нейрональных клетках // *Доклады Академии наук.* — 2016. — Т. 469. — № 4. — С. 492–495. [Gudasheva TA, Kolyasnikova KN, Antipova TA, Seredenin SB. Neuropeptide cycloprolylglycine increases the levels of brain-derived neurotrophic factor in neuronal cells. *Doklady Akademii nauk.* 2016;469(4):273–276. (In Russ).] DOI: 10.7868/S0869565216220254

12. Schnabel E. Verbesserte Synthese von tert.-Butyloxycarbonyl-aminosäuren durch pH-Stat-Reaktion. *Ann Chem.* 1967;702:188–196.

13. Bonora GM, Toniolo C, Sequential oligopeptides. Synthesis and characterization of the oligopeptides and a polypeptide with the repeating sequence L-norvalyl-glycyl-L-proline. *Biopolymers.* 1974;13:1055–1066. DOI: 10.1002/bip.1974.360130518

14. Гудашева Т.А., Василевич Н.И., Островская Р.У., и др. Синтез и ноотропная активность пирролидино[1,2-а]дизазациклоалканов // *Химико-фармацевтический журнал.* — 1996. — Т. 30. — № 9. — С. 12–17. [Gudasheva TA, Vasilevich NI, Ostrovskaya RU, et al. Synthesis and nootropic activity of pyrrolidino[1,2-a]diazacycloalkanes. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal.* 1996;30(9):12–17. (In Russ).]

15. Bergmann M, Zervas L. Über ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese. *Berichte.* 1932;65:1192–1201.

16. Назарова Л.С., Розонов Ю.Б., Лихошерстов А.М., и др. Азациклоалканы. XXVII. Синтез и антиангинальная активность стереоизомеров нонахлорина // *Химико-фармацевтический журнал.* — 1984. — Т. 18. — № 12. — С. 1445–1448. [Nazarova LS, Rozonov YuB, Likhosherstov AM, et al. Azacycloalkanes. XXVII. Synthesis and antianginal activity of nonachlorine stereoisomers. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal.* 1984;18(12):1445–1448. (In Russ).]

17. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств.* Часть первая. / Под ред. Миронова А.Н. — М.: Гриф и К.; 2012. [*Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv.* CHast' pervaya. Ed by Mironov A.N. Moscow: Grif I K.; 2012. (In Russ).]

18. Ovchinnikov YuA, Ivanov VT. Conformational states and biological activity of cyclic peptides. *Tetrahedron.* 1975;31:2177–2209.

19. Baldoni HA, Zamarbide GN, Enriz RD, et al. Peptide models XXIX. cis–trans Isomerism of peptide bonds: ab initio study on small peptide model compound; the 3D-Ramachandran map of formylglycinamide. *J Molec Struct (Theochem).* 2000;500:97–111.

20. Rydon HN, Smith PWG. Polypeptides. Part IV. The self-condensation of the esters of some peptides of glycine and proline. *J Chem Soc.* 1956;1956:3642–3650. DOI: 10.1039/JR9560003642
21. Manabe S, Machida H, Aihara Y, et al. Development of a diketopiperazine-forming dipeptidyl Gly-Pro spacer for preparation of an antibody–drug conjugate. *MedChemComm.* 2013;4(5):792–796. DOI: 10.1039/C3MD00075C
22. Anderson GW, Zimmerman JE, Callahan FM. Reinvestigation of the mixed carbonic anhydride method of peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 1967;89:5012–5017.
23. Thajudeen H, Park K, Moon S-S, Hong IS. An efficient green synthesis of proline-based cyclic dipeptides under water-mediated catalyst-free conditions. *Tetrahedron Lett.* 2010;51(9):1303–1305. DOI: 10.1016/j.tetlet.2009.12.134
24. Nitecki DE, Halpern B, Westley JW. Simple route to sterically pure diketopiperazines. *J Org Chem.* 1968;33:864–866. DOI:10.1021/jo01266a091
25. Brenner M, Huber W. Herstellung von α -Aminosäureestern durch Alkoholyse der Methylester. *Helv. Chim. Acta.* 1953;36:1109–1115. DOI: 10.1002/hlca.19530360522
26. Smith EL, Bergmann M. The peptidases of intestinal mucosa. *J Biol Chem.* 1944;153:627–651.
27. Salam OA, Nada S. Piracetam reverses the haloperidol induced catalepsy in mice. *Turk J Med Sci.* 2011;41(4):693–699. DOI:10.3906/sag-1006-870