



УДК 541.124:546.11*1/*2:547.964.4:543.062

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ПЕПТИДА HLDF-6-АМИДА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ В ТКАНЯХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИХ МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ И ДЕЙТЕРИЕМ ПРОИЗВОДНЫХ¹

© 2015 г. Ю. А. Золотарев*^{#,}, А. К. Дадаян*, Н. В. Кост**, М. Э. Воеводина**, О. Ю. Соколов**, В. С. Козик*, С. И. Шрам*, В. Н. Азев***, Э. В. Бочаров****, А. П. Богачук****, В. М. Липкин****, Н. Ф. Мясоедов*

*ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН 123182, Москва, пл. Курчатова, 2

**ФГБНУ Научный центр психического здоровья

***ФГБУН Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

****ФГБУН Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Поступила в редакцию 31.03.2015 г. Принята к печати 10.06.2015 г.

На примере пептида HLDF-6-амид разработан новый метод фармакокинетики пептидных препаратов в тканях лабораторных животных, позволяющий практически полностью избежать их протеолитической деградации в ходе анализа. Гексапептид TGENHR – фрагмент 41–46 фактора дифференцировки лейкоцитов (HLDF), обладает широким спектром ноотропной и нейропротективной активности и на основе его амида TGENHR-NH₂ разрабатываются препараты для профилактики и лечения цереброваскулярных и нейродегенеративных заболеваний. Фармакокинетика и молекулярный механизм действия пептида TGENHR-NH₂ исследованы с использованием меченных тритием и дейтерием производных этого пептида. Меченые пептиды были получены с использованием реакции высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена (ВТКИО). Меченный тритием пептид [³H]TGENHR-NH₂ получен с молярной радиоактивностью 230 Ки/ммоль и меченный дейтерием пептид [²H]TGENHR-NH₂ – со средним включением дейтерия равным 10.5 атомов на молекулу пептида и равномерным ее распределением метки по молекуле пептида, доказанным методом ЯМР. Равномерность распределения метки в молекуле меченого пептида открывает возможность его использования для определения в тканях организма как его самого, так и всех его возможных фрагментов биодеградации. С использованием меченого тритием производного проведен количественный анализ основных метаболитов пептида TGENHR-NH₂, образующихся при его протеолитическом расщеплении в плазме крови, а также исследована фармакокинетика пептида TGENHR-NH₂ при внутривенном и интраназальном введениях мышам, крысам и кроликам. На основе полученных фармакокинетических профилей TGENHR-NH₂ в крови были рассчитаны значения основных фармакокинетических параметров, проверена гипотеза линейности и изучен метаболизм данного пептида. Показано, что пептид TGENHR-NH₂ обладает чрезвычайно высокой биодоступностью при интраназальном введении (34% для крыс). Пептид быстро выводится из крови, что связано с его активной протеолитической деградацией в тканях организма. Показано, что исследованный пептид TGENHR-NH₂ обладает высокой устойчивостью к протеолитическому гидролизу при инкубации с плазмой крови. Проведен количественный анализ образующихся при этом основных метаболитов.

Ключевые слова: HLDF-6 пептид, фармакокинетика, метаболизм, пептиды, меченные тритием и дейтерием, ¹H- ЯМР, масс-спектрометрия.

DOI: 10.7868/S0132342315060202

ВВЕДЕНИЕ

Создание новых эффективных ноотропных и

Статья публикуется по материалам сообщения, представленного на VII Российском симпозиуме “Белки и пептиды”; Новосибирск, 12–17 июля 2015 г.

Сокращения: СВ – спилlover-водород; ВТКИО – высокотемпературный твердофазный каталитический изотопный обмен; HLDF-фактор дифференцировки лейкоцитов; HLDF-6-амид – амидная форма пептида ₄₁TGENHR₄₆.

[#] Автор для связи (тел.: +7(499) 196-02-13; факс: +7(499) 196-02-21; эл. почта: zolya@img.ras.ru).

нейропротекторных препаратов для лечения церебро-васкулярных и нейродегенеративных заболеваний относится к числу важнейших медико-социальных проблем современности. Особенно перспективны для этих целей препараты пептидной природы, характеризующиеся высокой эффективностью и чрезвычайно низкой токсичностью. Пептиды после введения в организм в течение нескольких минут подвергаются биодеградации с образованием пептидных фрагментов, обладающих своим спектром физиологической активности. В силу это-

го, задача количественного анализа введенных пептидов и всех образующихся из них пептидных фрагментов представляет значительную экспериментальную сложность и остается во многом нерешенной. Одним из походов к ее решению является использование в анализе пептидов, содержащих изотопную метку во всех аминокислотных остатках [1, 2]. Такие равномерно меченные тритием пептиды были с успехом использованы для радиорецепторного анализа, а также для *in vivo*- и *in vitro*-исследований метаболизма пептидов. Для получения таких пептидов и белков использовалась реакция высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена (ВТКИО), происходящая без растворителей при повышенной температуре под действием спилловер-водорода (СВ) [3, 4]. Применение реакции ВТКИО позволяет достигнуть высокой степени замещения водорода на тритий. С помощью этой реакции был получен целый ряд меченных тритием физиологически активных соединений, со степенью замещения водорода на тритий составляющей 70–90%, что невозможно достичь никакими другими методами [5]. Теоретический и экспериментальный анализ кинетического изотопного эффекта реакции ВТКИО показал, что его величина составляет всего 1.1–1.3 [2]. Для сравнения можно отметить, что для реакций замещения водорода происходящих в растворах, кинетический изотопный эффект находится в интервале от 3 до 30. Исключительно малые значения кинетического изотопного эффекта приводят к тому, что тритий и дейтерий замещают водород органического соединения с близкими скоростями и то, что в результате реакций ВТКИО с дейтерием или тритием, проведенных в одинаковых условиях, распределение изотопной метки в пептидах, оказывается одинаковым [2].

Ранее из клеток HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека был выделен новый фактор дифференцировки лейкоцитов (HLDF), в составе которого был идентифицирован шестичленный фрагмент HLDF-6 (${}_{41}\text{TGENHR}_{46}$), полностью воспроизводящий дифференцирующую активность полноразмерного фактора [6, 7]. Получены прямые свидетельства нейропротекторного эффекта HLDF-6-пептида в экспериментах на первичной культуре нейрональных клеток гиппокампа, мозжечка, а также иммунокомпетентных клеток крови [8]. На экспериментальных моделях клинической патологии — болезни Альцгеймера, наркозависимости, ишемического инсульта — показано, что пептид в дозах 1–50 мкг/кг снимает выраженный когнитивный дефицит и способствует восстановлению нарушенной памяти [9]. Ранее было показано, что превращение С-концевой карбоксильной группы в амидную в пептиде HLDF-6 повышает его стабильность в плазме крови крысы [10]. Сравнение кислотной и амидной формы пептида HLDF-6 было выполнено также на моделях болезни Альцгеймера

и ишемического инсульта. Было показано, что пептид HLDF-6-амид обладает большей активностью и более перспективен для создания лечебного средства [11]. Поэтому, нами в рамках исследования по созданию нового фармацевтического препарата с высокой ноотропной и нейропротекторной активностью была выбрана именно амидная форма пептида HLDF-6 и проведено исследование его фармакокинетики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез изотопнозамещенных производных пептида — TGENHR-NH₂ для фармакокинетических исследований. Замещение водорода на изотопные атомы в реакции ВТКИО происходит на новых кислотных центрах, образующихся под действием спилловер-водорода в твердой фазе, по электрофильному одноцентровому синхронному механизму. В переходном состоянии этой реакции возникает пятикоординированный углеродный атом, при котором образуется трехцентровая связь между углеродом и обменивающимися водородными атомами [12]. Этот механизм реакции ВТКИО осуществляется с сохранением конфигурации асимметрического углеродного атома, позволяет избежать рацемизации при замещении водородных атомов на изотопные. В отличие от этой твердофазной реакции, изотопный обмен водорода в растворах сопровождается обращением конфигурации и рацемизацией.

Реакция ВТКИО позволяет получить равномерно меченные изотопами водорода пептиды [1]. Использование таких меченных физиологически активных пептидов открывает новые возможности для получения корректных результатов при анализе их фармакокинетики. Для решения задач, связанных с исследованием фармакокинетики пептида HLDF-6-амид и молекулярных механизмов его действия, с помощью реакции ВТКИО были получены его высоко меченные изотопами водорода производные: равномерно меченный дейтерием пептид [${}^2\text{H}$]TGENHR-NH₂, со средним включением дейтерия равным 10.5 атомов на молекулу пептида (рис. 1), и меченный тритием пептид [${}^3\text{H}$]TGENHR-NH₂ с молярной радиоактивностью 230 Ки/ммоль. Следует отметить, что данные по радиоактивности пептидных фрагментов, образующихся из этого равномерно меченного тритием пептида [${}^3\text{H}$]TGENHR-NH₂, не позволяют непосредственно рассчитать концентрации продуктов его ферментативных реакций, т.к. при равномерном распределении метки по всей молекуле молярная радиоактивность его фрагментов имеет разное значение.

Для расчета молярной радиоактивности фрагментов, образующихся из меченного тритием пептида [${}^3\text{H}$]TGENHR-NH₂ были использованы

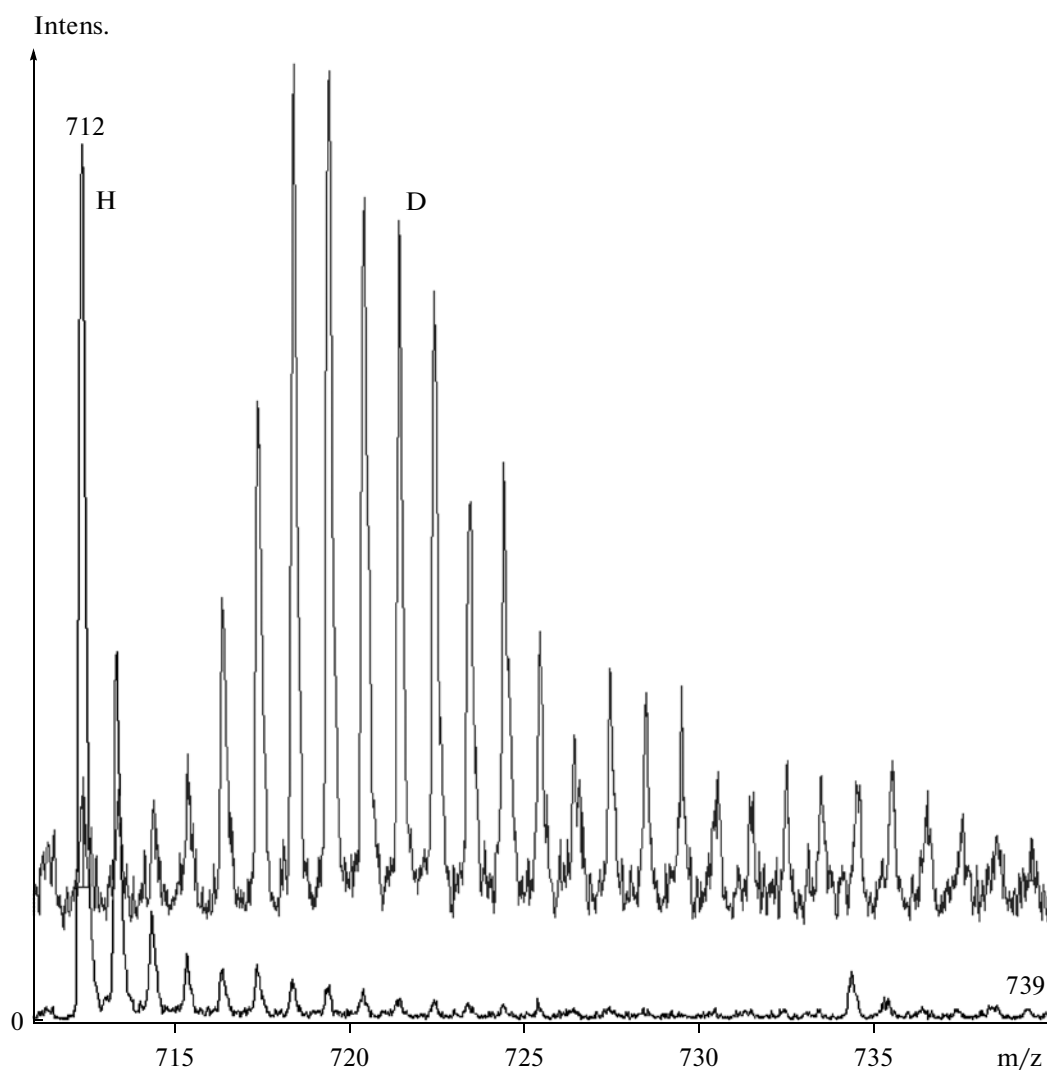


Рис. 1. Фрагменты MALDI-масс-спектров легкого пептида TGENHR-NH₂ (H) и меченного дейтерием пептида [²H]TGENHR-NH₂ (D).

данные о распределении изотопных атомов дейтерия по пептидной цепи пептида [²H]TGENHR-NH₂. Ранее было показано, что проведение реакции ВТКИО с дейтерием и тритием в одинаковых условиях приводит к одинаковому распределению изотопных атомов в органических соединениях. Это связано с тем, что в реакции ВТКИО дейтерий и тритий реагируют с органическими соединениями с близкими скоростями и одинаковой селективностью, а отношение скоростей этих реакций приближается к единице [2]. Анализ распределения дейтерия в меченном дейтерием пептиде [²H]TGENHR-NH₂ был выполнен с использованием спектроскопии ЯМР (рис. 2, табл. 1). Данные о распределении дейтерия в меченном дейтерием пептиде [²H]TGENHR-NH₂ были использованы для расчета молярной радиоактивности пептидных

фрагментов, образующихся при биотрансформации меченного тритием пептида [³H]TGENHR-NH₂.

Фармакокинетика пептида TGENHR-NH₂ и его фрагментов в плазме крови крысы

Анализ биотрансформации пептида [³H]TGENHR-NH₂ в гепариновой плазме крови был выполнен с помощью ВЭЖХ. Для этого использовали последовательно соединенные УФ-детектор и проточный детектор по радиоактивности. Для идентификации пептидных фрагментов, образующихся при биотрансформации пептида [³H]TGENHR-NH₂ в плазме крови крысы, в качестве маркеров были синтезированы 2–5-членные пептидные фрагменты. Образование таких пептидных фрагментов возможно при последовательно проходящем протеолитическом гидролизе с *N*- или

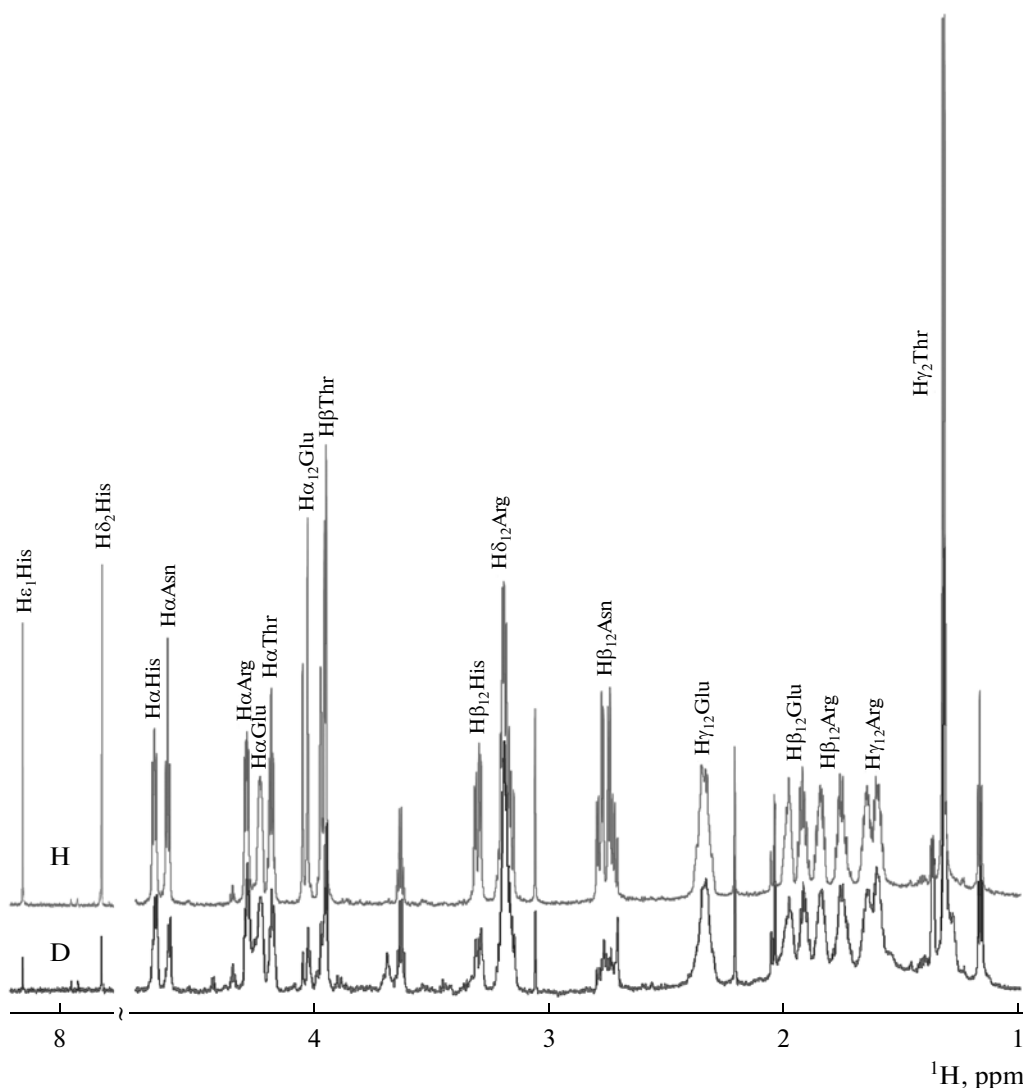


Рис. 2. Спектры ЯМР немеченного пептида TGENHR-NH₂ (H) меченного дейтерием пептида [²H]TGENHR-NH₂ (D).

С-конца пептидной цепи. С использованием меченного тритием пептида [³H]TGENHR-NH₂ был впервые проведен количественный *in vitro*-анализ не только пептида TGENHR-NH₂, но и образующихся из него при протеолитическом гидролизе фрагментов.

В проведенном ранее исследовании, посвященном сравнению пептидов TGENHR-NH₂ и TGENHR по их физиологической активности и стабильности при протеолитическом гидролизе, было показано, что пептид TGENHR-NH₂ обладает значительно большей ноотропной активностью и устойчивостью к гидролизу [10]. Там же, с использованием меченных тритием производных этих пептидов, был проведен количественный анализ этих пептидов при протеолитическом гидролизе в плазме крови крысы. Анализ же пептидных фрагментов, образовавшихся при протеоле-

тическом гидролизе этих пептидов, был выполнен лишь на качественном уровне, показавшим, что основным продуктом биodeградации пептида TGENHR-NH₂ является пептид ENHR-NH₂, который в дальнейшем превращается в дипептид HR-NH₂.

Задачей настоящего исследования явилось проведение количественного анализа пептидных фрагментов, образовавшихся при протеолитическом гидролизе пептида TGENHR-NH₂ методом радиохроматографии, используя данные о распределении изотопной метки в этом пептиде. Пример радиохроматографического ВЭЖХ-анализа продуктов биodeградации за 80 мин пептида TGENHR-NH₂ с исходной концентрацией 2.5 мкМ в плазме крови крысы приведен на рис. 3. Отнесение хроматографических пиков на радиохроматограмме было вы-

Таблица 1. Степень замещения водорода на дейтерий в пептиде $[^2\text{H}]\text{TGENHR-NH}_2$

Остаток	C–H-связь	D-замещение, %
Thr	C^αH	44
	C^βH	42
	$\text{C}^\gamma\text{H}_3$	34
Gly	$\text{C}^\alpha\text{H}_2$	72
Glu	C^αH	28
	C^βH_2	12
	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$	27
Asn	C^αH	62
	C^βH_2	66
His	C^αH	39
	C^βH_2	49
	C^δH	76
	$\text{C}^\epsilon\text{H}$	81
Arg	C^αH	22
	C^βH_2	14
	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$	16
	$\text{C}^\delta\text{H}_2$	21

полнено с использованием УФ-детектора и маркерных пептидов.

Для расчета молярной радиоактивности пептидных фрагментов, образующихся при биodeградации меченного тритием пептида $[^3\text{H}]\text{TGENHR-NH}_2$,

использовали ранее найденную зависимость о том, что дейтерий и тритий в реакции ВТКИО взаимодействуют с органическими соединениями с близкими скоростями и одинаковой селективностью [2]. С учетом данных по распределению дейтериевой изотопной метки в пептиде $[^2\text{H}]\text{TGENHR-NH}_2$ было рассчитано включение дейтерия в пептидные фрагменты ENHR-NH₂ и HR-NH₂. Среднее количество атомов дейтерия в пептидах $[^2\text{H}]\text{TGENHR-NH}_2$, $[^2\text{H}]\text{ENHR-NH}_2$ и $[^2\text{H}]\text{HR-NH}_2$ составило 10.5, 7.2 и 4.2 на молекулу, соответственно (табл. 1). После чего, принимая одинаковым распределение дейтерия и трития в этих пептидах и используя данные по молярной радиоактивности меченного тритием пептида $[^3\text{H}]\text{TGENHR-NH}_2$, были рассчитаны величины молярной радиоактивности образующихся пептидных фрагментов $[^3\text{H}]\text{ENHR-NH}_2$ и $[^3\text{H}]\text{HR-NH}_2$. Для фрагментов пептида $[^3\text{H}]\text{TGENHR-NH}_2$ с молярной радиоактивностью 230 Ки/ммоль, была рассчитана величина молярной радиоактивности фрагментов, которая для пептидов $[^3\text{H}]\text{ENHR-NH}_2$ и $[^3\text{H}]\text{HR-NH}_2$ составляла 158 и 92 Ки/ммоль, соответственно. Используя эти значения молярной радиоактивности и численные значения радиоактивности ВЭЖХ-фракций, содержащих эти пептиды, был проведен количественный анализ состава пептидов, образовавшихся при биodeградации $[^3\text{H}]\text{TGENHR-NH}_2$ в плазме крови.

В результате проведенного анализа было найдено, что исследуемый пептид обладает высокой устойчивостью к гидролизу в плазме крови (рис. 4).

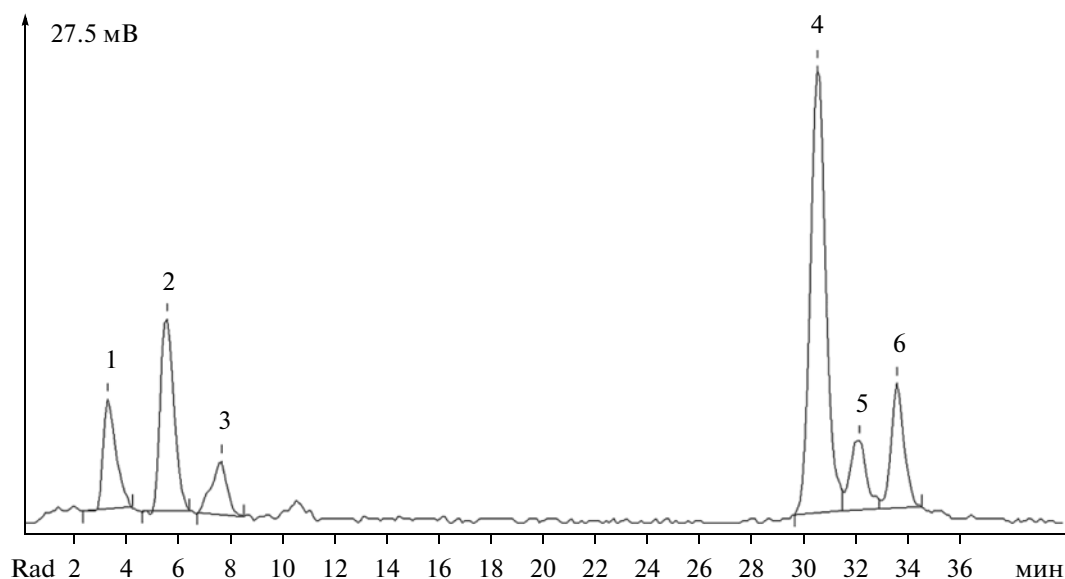


Рис. 3. Биodeградация пептида TGENHR-NH₂ в плазме крови крысы за 80 мин. Радиохроматография в градиенте метанола (0–30%) 0.08% TFA и 0.02% HFBA на колонке Kromasil C₁₈, 8 × 150 мм: Пик 4 – пептид HR-NH₂, 5 – ENHR-NH₂, 6 – TGENHR-NH₂.

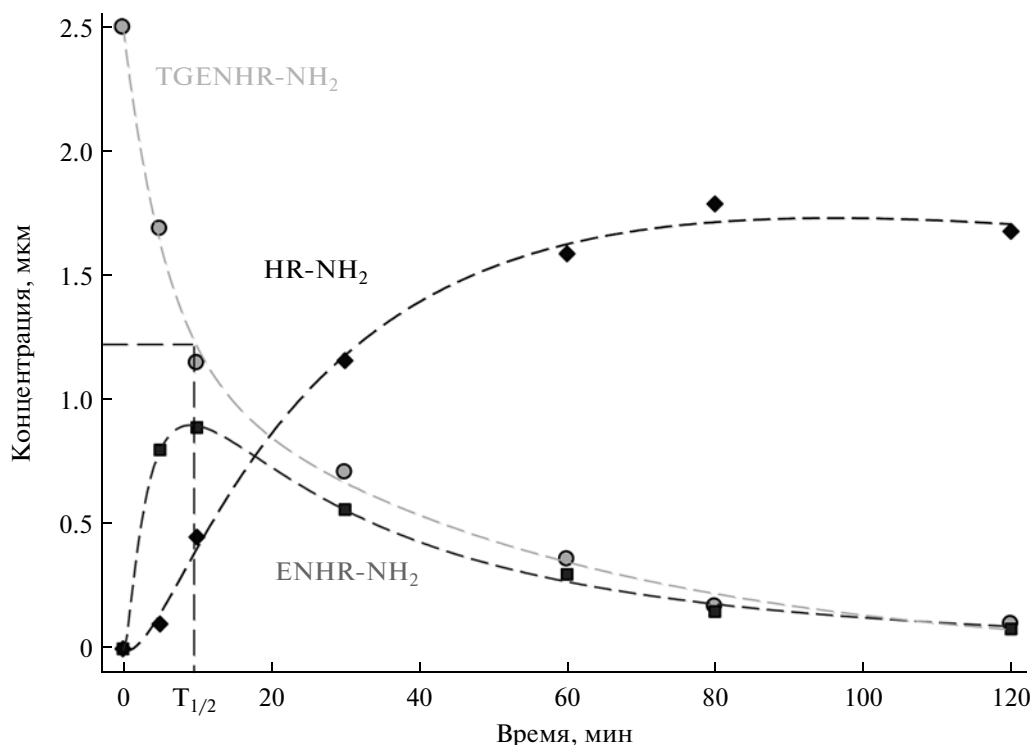


Рис. 4. Кинетика биодеградации пептида 2.5 мкМ TGENHR-NH₂ в плазме крови крысы.

Период его полудеградации равен 8 мин, что составляет значительную величину для пептидов, построенных только из природных аминокислот. Использование данных по молярной радиоактивности фрагментов позволило уточнить определенную ранее величину периода полудеградации пептида TGENHR-NH₂ в плазме крови, составившую 20 мин [10]. Можно отметить, что ранее определенный период полудеградации под действием пептидаз плазмы крови, как пептида TGENHR, не имеющего защиты на концах пептидной цепи, так и коротких пептидов Семакс (МЕНFPGP), Селанк (TKPRPGP), находится в пределах 2–3 мин [3, 10]. В результате проведенного исследования по превращению пептида TGENHR-NH₂ в плазме крови, впервые определены тетрапептид ENHR-NH₂ и дипептид HR-NH₂ как основные продукты его ферментативного гидролиза. Проведенный ранее анализ ноотропной активности этих пептидов показал, что пептид HR-NH₂ является активным метаболитом, обладающим высокой ноотропной активностью [10]. Полученные в настоящем исследовании данные по количественному содержанию пептида HR-NH₂ вносят свой вклад в понимание механизма ноотропной активности пептида TGENHR-NH₂.

Фармакокинетика пептида TGENHR-NH₂ и его фрагментов в организме экспериментальных животных

Наиболее сложным моментом при исследовании содержания пептидных фармакологических препаратов в тканях организма, является их быстрая биодеградация пептидазами. Период, в течение которого пептид наполовину деградирует под действием пептидаз, составляет, как правило, всего несколько минут. Традиционный подход в приготовлении образцов, заключающийся в измельчении тканей, проведении экстракции и разделении фаз центрифугированием, не позволяет избежать биодеградации исследуемых пептидов, в силу того что в течение всего этого длительного процесса в значительной мере сохраняется воздействие пептидазной активности тканей на исследуемый пептид. Следствием этого, является то, что результаты такого анализа не могут адекватно отражать количественное содержание пептидов в тканях.

Попытки решения проблемы пептидазной активности, затрудняющей определение количественного содержания пептидов в тканях организма, предпринимались разными авторами неоднократно. В качестве удачного примера решения этой проблемы можно привести метод, описанный в работе [13]. В этой работе для анализа пептидома головного мозга мыши была использована разработанная для этой цели СВЧ-установка. Помещенную в нее декапитированную голову мыши

Таблица 2. Значения основных фармакокинетических параметров, рассчитанные из данных по внутривенному болюсному введению пептида TGENHR-NH₂ на самцах кроликов породы Шиншилла

Ф/кинетический параметр	
C ₀ , нг/мл	82
K _{el} , 1/мин	0.211
T _{1/2} , мин	3.3
AUC _∞ , нг/мл мин	390
MRT, мин	7.3
V _{ss} , мл/кг	2250
Cl, мл/мин кг	308
R ²	0.98

Обозначения:

C₀ – кажущаяся концентрация вещества в крови в начальный момент времени (t = 0 мин);

K_{el} – константа скорости элиминации вещества;

T_{1/2} – время полувыведения вещества; период за который выводится половина всосавшейся дозы лекарственного вещества.

AUC_∞ – площадь под кривой зависимости концентрации/время;

MRT – среднее время пребывания лекарственного вещества в организме;

V_{ss} – стационарный объем распределения вещества;

Cl – общий клиренс – объем плазмы, который очищается от препарата в единицу времени;

R² – коэффициент детерминации.

нагревали с помощью этой СВЧ-установки в течение нескольких секунд до температуры близкой к кипению, что приводило к инактивации ферментов тканей. Использование этой методики позволило избежать действия пептидаз и получить достоверные результаты по содержанию пептидов в тканях головного мозга мыши. Несмотря на достигнутый несомненный успех предложенной методики, ее невозможно практически применить как универсальную.

В нашем исследовании, посвященном определению пептида TGENHR-NH₂ в тканях экспериментальных животных, нами предложена альтернативная методика, позволяющая избежать влияния протеолиза пептида в ходе анализа на его результаты. Можно отметить некоторые существенные моменты этой методики. После введения экспериментальным животным пептидного препарата [³H]TGENHR-NH₂, животных через требуемый интервал времени подвергали декапированию, необходимые органы изымали и быстро замораживали жидким азотом. Полученные образцы лиофильно высушивали при низкой температуре до постоянного веса, после чего прогревали при 65°C для удаления пептидазной активности ферментов тканей и подвергали измельчению с последующей экстракцией органически-

ми растворителями. В водно-ацетонитрильный раствор, использованный для экстракции, добавляли по 10 мкг пептидов TGENHR-NH₂, ENHR-NH₂ и HR-NH₂, предназначенных для идентификации фракций при хроматографии. Полученные в результате экстракции растворы упаривали досуха при пониженном давлении, подвергали повторной экстракции метанолом и упариванию. Полученные образцы исследовали с помощью ВЭЖХ. Радиоактивность фракций, соответствующих пептидам TGENHR-NH₂, ENHR-NH₂ и HR-NH₂, определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного счета.

Для количественной оценки достоверности результатов, полученных с помощью предложенной методики, в образец крови крысы в количестве 400 мкг ввели 25 мкг пептида [³H]TGENHR-NH₂. Образец обработали по описанному выше методу. В результате проведенного ВЭЖХ-анализа было найдено, что во фракции, соответствующей пептиду TGENHR-NH₂, содержалось 94% исходной радиоактивности, а во фракции пептида ENHR-NH₂ найдено 3% радиоактивности. Таким образом, было показано, что использованная методика в высокой степени обеспечивает извлечение исследуемого пептида из ткани и не приводит к его дополнительной биодеградации.

Исследование характеристики фармакокинетического профиля пептида HLDF-6-амид в крови при внутривенном введении было выполнено на самцах кроликов породы Шиншилла. Для анализа фармакокинетики этого пептида, самцам кролика ввели по 2000 мкг меченного тритием пептида [³H]TGENHR-NH₂ в дозе 400 мкг. ВЭЖХ-фракции, соответствующие пептиду TGENHR-NH₂, а также его фрагментам ENHR-NH₂ и HR-NH₂ собирали и анализировали с помощью жидкостного сцинтилляционного счета. По результатам этого анализа определяли радиоактивную концентрацию пептида TGENHR-NH₂ и его фрагментов, образующихся под действием пептидаз в крови животного, и рассчитывали объемную концентрацию пептида TGENHR-NH₂ в крови. Данные фармакокинетики пептида HLDF-6-амид приведены на рис. 5. Точками обозначены экспериментальные данные, сплошной линией – расчетные значения, полученные в результате наилучшего приближения к экспериментальным данным с помощью нелинейной регрессии. Исходя из полученных результатов, был проведен расчет фармакокинетических параметров (табл. 2). Найдено, что время полувыведения пептида TGENHR-NH₂ у кроликов при внутривенном введении составило 3.3 мин. Пептид характеризуется быстрым выведением из крови, которое обусловлено его быстрой деградацией в тканях организма.

Для определения биодоступности при интраназальном введении пептида HLDF-6-амид провели

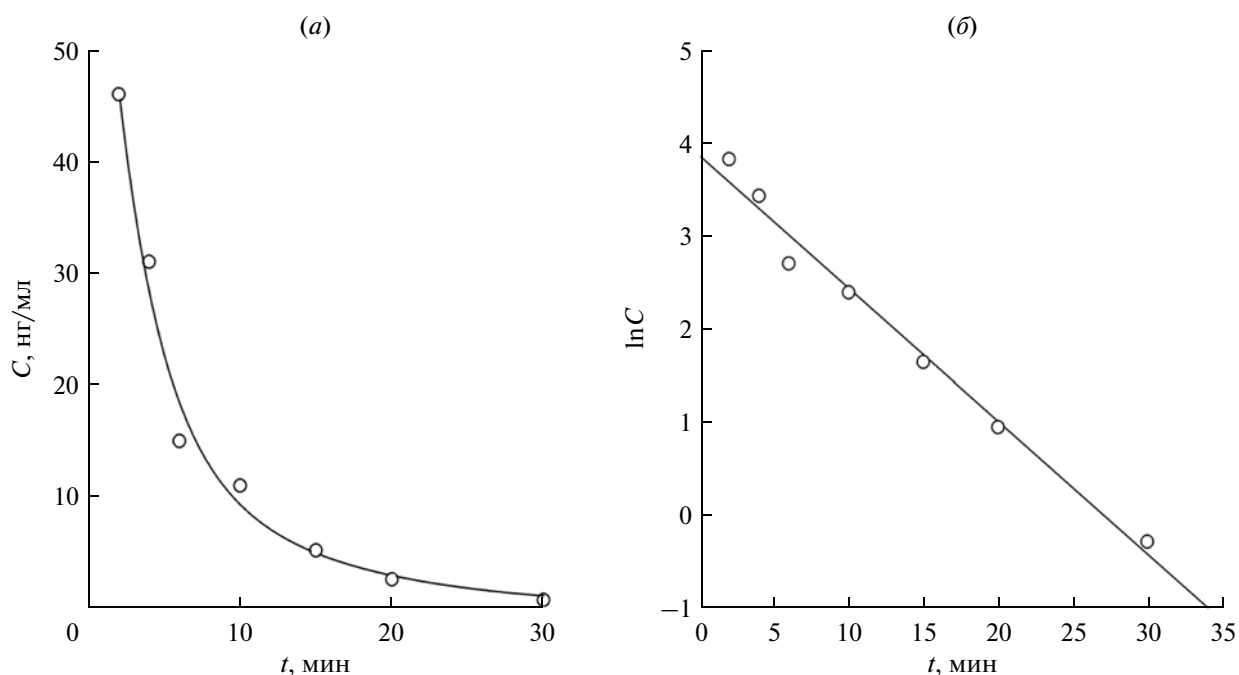


Рис. 5. Изменение концентрации TGENHR-NH₂ в крови кролика после его внутривенного болюсного введения в дозе 120 мкг/кг. Данные представлены в прямых (а) и полулогарифмических координатах (б).

исследование фармакокинетики пептида TGENHR-NH₂ на самцах крыс линии Вистар, которым интраназально или внутривенно вводили по 400 мкг и меченого пептида [³H]TGENHR-NH₂ в дозе 250 мкг/кг. Хроматографические фракции, соответствующие пептиду TGENHR-NH₂ и его фрагментам ENHR-NH₂ и HR-NH₂, собирали и анализировали с помощью жидкостного сцинтилляционного счета. По результатам этого анализа определяли радиоактивную концентрацию пептида TGENHR-NH₂ и его фрагментов в крови животного. Данные о концентрации пептидного препарата в крови крыс приведены на рис. 6 и 7. Исходя из данных по изменению концентрации пептида определили основные фармакокинетические параметры, рассчитанные из данных по интраназальному и внутривенному введению пептида HLDF-6-амид крысам (табл. 3).

Из величины AUC_∞, полученной для интраназального и внутривенного введений пептида TGENHR-NH₂ крысам линии Вистар, была рассчитана величина абсолютной биодоступности препарата [14], составляющая 34%. В этом эксперименте было показано, что исследуемый пептид обладает чрезвычайно высокой биодоступностью при интраназальном введении, что по-видимому, находит свое отражение в том, что при таком способе введения он проявляет наибольшую физиологическую активность как нейропротекторное средство. Найдено, что время полувыведения пептида TGENHR-NH₂ у крыс при внутривенном

введении составило 2.1 мин. На самцах крыс линии Вистар было показано, что при интраназальном способе введения пептид TGENHR-NH₂ характеризуется как быстрым попаданием в кровь, так и быстрым из нее выведением, которое обусловлено его быстрой деградацией в тканях организма.

В комплексном исследовании когнитивных патологий широко используются линейные мы-

Таблица 3. Значения основных фармакокинетических параметров, рассчитанные из данных по интраназальному и внутривенному введению пептида TGENHR-NH₂ крысам линии Вистар

Фармакокинетический параметр	Введение пептида	
	внутривенно	интраназально
Доза, мкг/кг	250	250
C ₀ , нг/мл	60.4	43.5
K _{el} , 1/мин	0.158	0.333
T _{1/2} , мин	4.4	2.1
AUC _∞ , нг/мл мин	383	131
MRT, мин	6.3	3.0
V _{ss} , мл/кг	4170	5700
Cl (мл/мин кг)	656	1890
R ²	0.98	0.99

Обозначения см. в примечании к табл. 2.

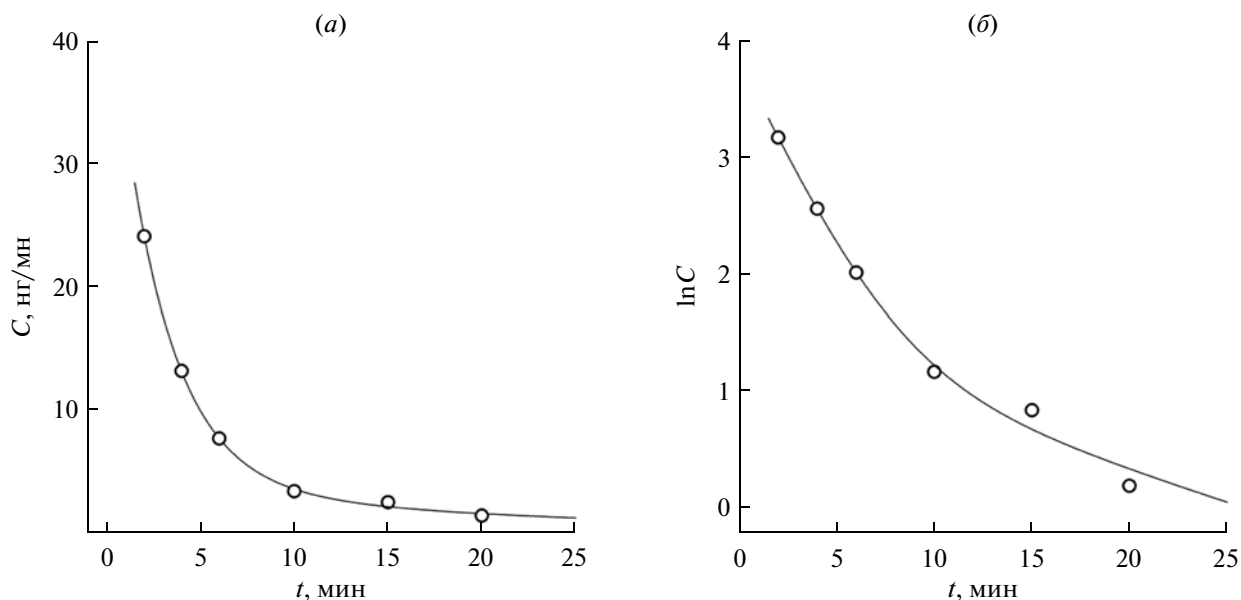


Рис. 6. Изменение концентрации пептида TGENHR-NH₂ в крови крыс после интраназального введения в дозе 250 мкг/кг. Данные представлены в прямых (а) и полулогарифмических координатах (б).

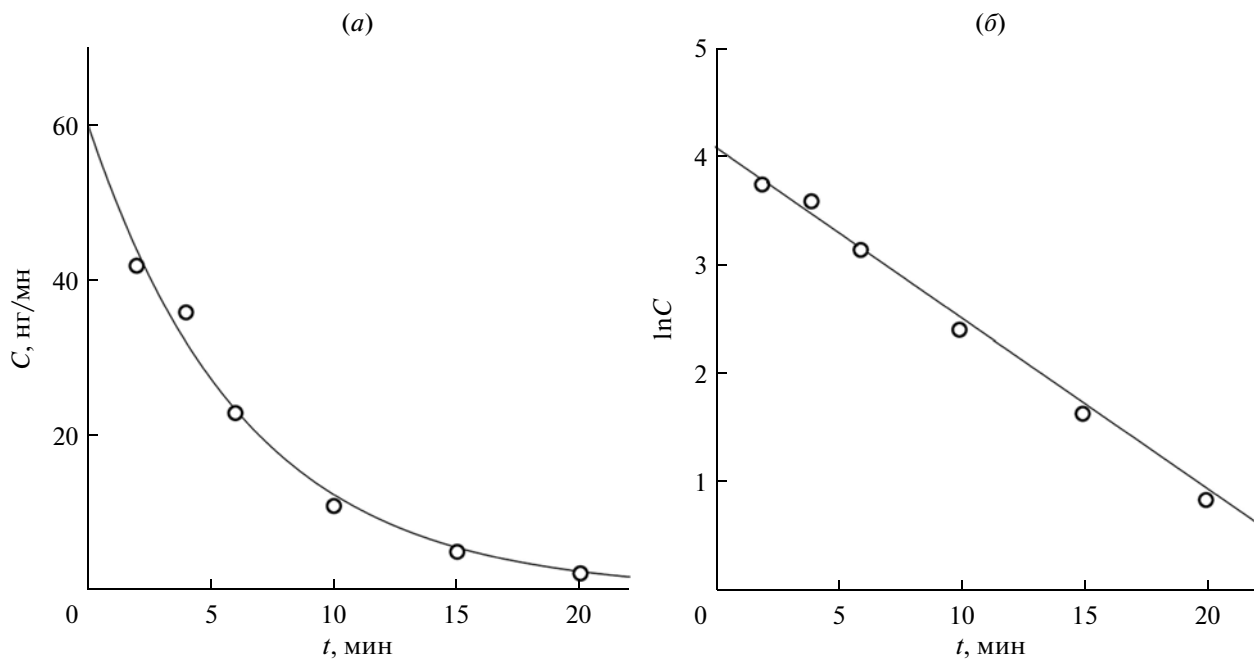


Рис. 7. Изменение концентрации пептида TGENHR-NH₂ в крови крыс после внутривенного введения в дозе 250 мкг/кг. Данные представлены в прямых (а) и полулогарифмических координатах (б).

ши Valb/c, обладающие когнитивным дефицитом. Для описания фармакокинетики пептида HLDF-6-амид при интраназальном способе введения провели исследование на мышах этой линии (табл. 4). Из приведенных данных по распределению пептида между кровью и периферическими тканями можно видеть, что наибольшая концентрация пептида наблюдается в тканях

сердца. Несколько меньшее сродство пептид имеет к тканям почек и сальникам. Можно отметить, что в тканях сальников через 15 мин после введения наблюдается самая высокая концентрация пептида, возможно, это связано меньшей скоростью протеолитической деградации пептида за счет меньшего содержания пептидаз в жировой ткани. Препарат пептида HLDF-6-амид после

Таблица 4. Концентрация пептида TGENHR-NH₂ в тканях (нг/мл) при интраназальном введении препарата мышам линии Balb/c в дозе 300 мкг/кг через 2–15 мин после введения

Органы	Время, мин				
	2	4	6	10	15
Кровь	13 ± 3.2	8.5 ± 1.4	5.1 ± 0.8	1.8 ± 0.3	1.3 ± 0.2
Мозг	2.1 ± 0.6	4.3 ± 1.4	3.3 ± 1.1	1.9 ± 0.6	0.9 ± 0.4
Почки	2.7 ± 0.7	4.5 ± 1.5	3.0 ± 1.1	1.3 ± 0.5	0.7 ± 0.3
Печень	1.3 ± 0.3	2.4 ± 0.6	1.5 ± 0.4	0.7 ± 0.3	0.4 ± 0.2
Сердце	11 ± 3.4	14 ± 4.5	17.2 ± 6.7	12.7 ± 4.4	7.4 ± 3.1
Сальник	3.2 ± 1.1	4.1 ± 2.3	6.4 ± 3.4	5.3 ± 3.2	4.2 ± 2.6

введения не аккумулируется в тканях в течение более продолжительного времени измерения, что является характерным свойством пептидных препаратов. Так уже через 1 ч после интраназального введения мышам по 25 мкг меченого пептида TGENHR-NH₂ в дозе 300 мкг/кг его не удается достоверно обнаружить в крови и исследуемых тканях. Было также показано, что многократное интраназальное введение препарата в дозах 300 и 1600 мкг/кг в течение 30 дней не приводит к изменению его закономерной кумуляции и не вызывает изменения фармакокинетики меченого тритием пептида TGENHR-NH₂ относительно однократного введения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспериментальные животные

Для исследований использовали 10 здоровых половозрелых крыс-самцов линии Вистар возрастом 180–200 дней, весом 280–300 г; 150 самцов мышей линии Balb/c возрастом 6–7 недель, весом 20 ± 1 г; и 5 самцов кроликов породы Шиншилла возрастом 12 недель, весом 3000 ± 300 г. Содержание животных соответствовало действующим санитарным правилам по обустройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник. Стандартная лабораторная диета соответствовала действующим нормам. Животные содержались по 4 в клетке в условиях свободного доступа к воде и корму при температуре 21 °С и постоянном световом дне 14 ч (включение света в 8 часов утра). Факторы внешней среды (температура, влажность, освещенность, состав подстилки) соответствовали требованиям по содержанию лабораторных животных. Исследование выполнялось согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации, а также рекомендациям, изложенным в "Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств" [14], и в соответствии с международными требованиями по правилам GLP FDA и GLP OECD на лабораторных животных (экспериментальных биомоде-

лях) SPF-статуса (свободные от патогенной флоры). Лабораторные животные SPF-статуса производились в Питомнике лабораторных животных ФИБХ РАН, который имеет международную аккредитацию AAALAC. Система управления качества производства лабораторных животных в Питомнике сертифицирована на соответствие международным требованиям ИСО 9001:2008. Все процедуры в исследовании выполнялись согласно утвержденным протоколам. Конкретные процедуры протокола с использованием животных до их начала рассматривались и утверждались Комиссией по гуманному обращению с животными.

Пептиды TGENHR-NH₂, ENHR-NH₂ и HR-NH₂ синтезировали твердофазным методом с использованием Boc/Bzl-методологии и схемы неполного блокирования боковых функций аминокислот. В синтезе пептида TGENHR-NH₂ использовали серную кислоту в диоксане для удаления *N*-Boc-защитной группы, производное треонина с незащищенной боковой цепью и сополимер стирола с 1%-дивинилбензола, модифицированный п-метилбензгидриламиной якорной группой (MBHA-resin) [15], к которому первоначально присоединяли производное аргинина Boc-Arg(Tos)-OH. После завершения синтеза, пептиды отщепляли от полимерной подложки безводным HF с добавкой 10% о объему *m*-крезола. Пептиды очищали с помощью препаративной ВЭЖХ на колонке Phenomenex Synergy Hydro-RP RP (50 x 250мм). Идентичность полученных препаратов оценивали масс-спектрометрически, а также с помощью аминокислотного анализа. (Статья с подробным синтезом готовится к публикации.)

Получение производных пептида HLDF-6-амид, меченных тритием и дейтерием

Меченные тритием и дейтерием пептиды [³H]TGENHR-NH₂ и [²H]TGENHR-NH₂ были получены реакцией ВТКИО с газообразными тритием или дейтерием в одинаковых условиях. Твердофазный изотопный обмен водорода в пеп-

тиде TGENHR-NH₂ на тритий или дейтерий проводили в твердой смеси, образованной нанесенным на окись алюминия пептидом и высокодисперсным гетерогенным катализатором Pd/BaSO₄, в присутствии газообразного изотопа водорода в одинаковых условиях. Для этого пептид TGENHR-NH₂ в количестве 1.0 мг предварительно растворяли в 0.5 мл воды и смешивали с 20 мг окиси алюминия. Смесь замораживали, воду удаляли лиофильной сушкой. Полученную твердую смесь смешивали с катализатором 10 мг 5% Pd/BaSO₄ (Fluka). В ампулу объемом 10 мл помещали полученную твердую смесь, вакуумировали, заполняли газообразным тритием или дейтерием до давления 30 кПа и выдерживали при 180°C в течение 10 мин. Ампулу охлаждали, вакуумировали, продували водородом. Пептид десорбировали 50% водным этанолом. Для удаления лабильного трития или дейтерия меченый пептид еще дважды растворяли в 50% водном этаноле и упаривали досуха. Очистку пептидов проводили с помощью ВЭЖХ на колонке Кромасил 8 × 150 в градиенте концентрации водного раствора ацетонитрила, в присутствии 0.1% гептафтормасляной кислоты (HFBA). Пептиды упаривали и растворяли в этаноле. Реакцией с газообразным тритием был получен меченый тритием пептид [³H]TGENHR-NH₂ с молярной радиоактивностью 230 Ки/ммоль. Для его получения была использована уникальная цельно паляная установка по обмену водорода на тритий ОВТ-1 (ИМГ РАН).

Реакцией ВТКИО между исходным пептидом и газообразным дейтерием был получен меченый дейтерием пептид [²H]TGENHR-NH₂, содержащий в среднем 10.5 атомов дейтерия на молекулу. Замещение водорода на тритий определяли по величине молярной радиоактивности пептида [³H]TGENHR-NH₂. Включение дейтерия в меченый пептид определяли с помощью масс-спектрологии. Данные по распределению дейтерия в пептиде [²H]TGENHR-NH₂ были получены с помощью спектроскопии ЯМР и использованы для расчета распределения трития в пептиде [³H]TGENHR-NH₂.

Спектроскопия ЯМР. Положение изотопной метки и степень замещения водорода С–Н связей на дейтерий в пептиде [²H]TGENHR-NH₂ были определены с помощью сравнения интенсивности пиков в одно- и двумерных ¹H-ЯМР-спектрах (¹H/¹H-TOCSY с временем задержки 60 мс). ¹H-ЯМР-спектры были получены с использованием ЯМР-спектрометра Varian NMR System 700 МГц.

MALDI-масс-спектры меченного дейтерием пептида [²H]TGENHR-NH₂ получали на приборе Ultraflex Tof/Tof (Bruker, Germany), укомплектованном азотным лазером (337 нм). В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзой-

ную кислоту. Образец смешивали с раствором матрицы (20 мг/мл в 30% растворе ацетонитрила в 0.1% TFA) в соотношении 1 : 1. Спектры снимали в диапазоне 400–6000 Да

Введение животным пептидов и отбор крови

В экспериментах на кроликах введение пептида и отбор крови осуществляли через большие ушные вены. Кроликов фиксировали в ящике с отверстием для головы. В правое ухо, через большую ушную вену, инсулиновым шприцом вводили 0.8 мл раствора гепарина (5000 МЕ/мл; ФГУП "Московский эндокринный завод") и через 5 мин в большую ушную вену левого уха устанавливали внутривенный катетер Flexicath G22, через который в дальнейшем осуществляли отбор крови. Пептид [³H]TGENHR-NH₂ (2 мКи, в дозе 120 мкг/кг) вводили инсулиновым шприцом в правую ушную вену и через фиксированные промежутки времени (2, 4, 6, 10, 15, 20 и 30 мин) через катетер отбирали примерно по 1 мл венозной крови. Кровь собирали во взвешенные пластиковые пробирки и замораживали жидким азотом.

В экспериментах на крысах введение пептида (внутривенный способ введения) и отбор крови осуществляли через яремные вены. Крыс анестезировали хлоралгидратом (300 мг/кг), и через 5–10 мин с вентральной стороны в области, прилегающей к грудным конечностям и шее, удаляли шерсть и делали два продольных разреза кожи (справа и слева) длиной ок. 3 см, и препарировали яремные вены. В левую яремную вену устанавливали внутривенный катетер Flexicath G24 и вводили через него 80 мкл гепарина. Затем в правую яремную вену устанавливали катетер Flexicath G22 для отбора крови. Раствор радиоактивно меченного пептида (400 мКи, 46 мкг) в объеме 200 мкл вводили в левую яремную вену в течение 10–15 с и по истечении определенного времени (2, 4, 6, 10, 15, 20 и 30 мин) из правой яремной вены отбирали примерно по 0.5 мл венозной крови. При интраназальном способе введения раствор радиоактивно меченного пептида вводили в объеме 40 мкл (по 20 мкл в каждую ноздрю) в течение 15 с. Забор крови осуществляли, как описано выше, с использованием внутривенного катетера. Кровь собирали во взвешенные пластиковые пробирки и замораживали жидким азотом.

В экспериментах на мышах введение меченого пептида [³H]TGENHR-NH₂ (25 мКи) осуществляли интраназально в дозе 300 мкг/кг. Животных декапитировали по окончании определенного протокола времени, кровь и исследуемые ткани собирали во взвешенные пластиковые пробирки и замораживали жидким азотом.

Подготовка проб тканей и анализ фармакокинетики пептида [³H]TGENHR-NH₂ с использованием

радиохроматографии. При приготовлении тканей для ВЭЖХ анализа, замороженные и взвешенные образцы проб тканей в пластиковых пробирках подвергались лиофильной сушке в течение 2 сут. Лиофильно высушенные образцы тканей прогревали при 65°C в течение 30 мин, после чего измельчали в этих же пластиковых пробирках горизонтальными ножами, вращающимися со скоростью 5000 об/мин. Первую экстракцию этих образцов проводили 90% водным ацетонитрилом, содержащим 1% TFA. В водно-ацетонитрильный раствор, использованный для экстракции, добавляли по 10 мкг пептидов TGENHR-NH₂, ENHR-NH₂ и HR-NH₂, предназначенных для идентификации фракций при хроматографии. После центрифугирования раствор, содержащий меченный тритием пептид и компоненты крови, подвергали сушке под уменьшенным давлением, реэкстракции метанолом и повторному центрифугированию. Полученный при этом раствор, содержащий меченный тритием пептид, подвергали упариванию под уменьшенным давлением, реэкстракции 0.1% водным раствором TFA и последующему центрифугированию. Количественный анализ пептидов проводили с помощью ВЭЖХ на колонке Kromasil C₁₈, 8 × 150 мм в градиенте метанола (0–30%), присутствии 0.08% TFA и 0.02% гептафтормасляной кислоты (HFBA). Фракции, содержащие пептиды TGENHR-NH₂, ENHR-NH₂ и HR-NH₂, собирали и в них проводили определение радиоактивности с помощью жидкостного сцинтилляционного счета. Фармакокинетический анализ провели для определения пиковой концентрации вещества в плазме (C_{max}), времени достижения C_{max} (T_{max}), времени полувыведения (T_{1/2}) и площади под кинетической кривой (AUC_∞) с использованием программы SigmaPlot 11.0 (Systat Software, USA). Все количественные данные были подвергнуты описательной статистике (среднее, стандартное отклонение).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан новый метод осуществления количественного анализа пептидов в тканях организма, позволяющий практически полностью избежать протеолиза исследуемых пептидов при проведении анализа. С целью создания высокоактивных и низкотоксичных пептидных препаратов с нейропротекторной и психотропной активностью с его помощью проводилось исследование инновационного фармакологического препарата для профилактики и лечения цереброваскулярных и нейродегенеративных заболеваний на основе амидной формы пептида ⁴¹TGENHR₄₆, являющегося фрагментом фактора дифференцировки лейкоцитов HLDF. Для решения задач связанных с исследованием его фармакокинетики и молекулярных механизмов действия были получены равномерно меченный трити-

ем пептид [³H]TGENHR-NH₂ с молярной радиоактивностью 230 Ки/ммоль и равномерно меченный дейтерием пептид [²H]TGENHR-NH₂, со средним включением дейтерия равным 10.5 атомов. С использованием этих меченых препаратов проведен количественный анализ пептида TGENHR-NH₂ на модельных животных, рассчитаны значения его основных фармакокинетических параметров и определена величина его абсолютной биодоступности. Показано, что пептид обладает чрезвычайно высокой биодоступностью при интраназальном введении (34% в случае крыс), что, по-видимому, находит свое отражение в том, что при таком способе введения он быстро попадает в кровь и проявляет наибольшую физиологическую активность. Пептид характеризуется быстрым выведением из крови, которое обусловлено его быстрой протеолитическим гидролизом в тканях организма. Так, время полувыведения пептида при внутривенном введении составляет 3.3 мин у кроликов и 2.1 мин у крыс при интраназальном введении. Отмечено, что наибольшая концентрация пептида наблюдается в тканях сердца, несколько меньшее сродство пептид имеет к тканям почек и сальникам.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации, государственный контракт № 14N08.11.0002 и программой Президиума РАН “Фундаментальные науки – медицина” за 2012–2014 гг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Bocharov E.V., Borisov Yu.A., Vaskovsky B.V., Dorokhova E.M., Myasoedov N.F. // *Amino Acids*. 2003. V. 24. P. 325–333.
2. Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Borisov Yu.A., Kozik V.S., Nazimov I.V., Ziganshin R.H., Bocharov E.V., Chizhov A.O., Myasoedov N.F. // *J. Phys. Chem. C*. 2013. V. 117. P. 16878–16884.
3. Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Долотов О.В., Козик В.С., Кост Н.В., Соколов О.Ю., Дорохова Е.М., Мешавкин В.К., Иноземцева Л.С., Габаева М.В., и др. // *Биоорг. химия*, 2006. Т. 32. С. 183–191. [Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Dolotov O.V., Kozik V.S., Kost N.V., Sokolov O.Yu., Dorokhova E.M., Meshavkin V.K., Inozemtseva L.S., Gabaeva M. et al. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2006. V. 32. P. 166–173.]
4. Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Козик В.С., Гасанов Е.В., Назимов И.В., Зиганшин Р.Х., Васильковский Б.В., Мурашов А.Н., Ксенофонтов А.Л., Харибин О.Н., Николаев Е.Н., Мясоедов Н.Ф. // *Биоорг. химия* 2014. Т. 40. С. 31–41. [Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Kozik V.S., Gasanov E.V., Nazimov I.V., Ziganshin R.Kh., Vaskovsky B.V., Murashov A.N., Xenofontov A.L., Kharybin O.N., Nikolaev E.N., Myasoedov N.F. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2014. V. 40. P. 26–35.]

5. Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Borisov Yu.A., Kozik V.S. // Chem. Rev. 2010. V. 110. P. 5425–5446.
6. Kostanyan I.A., Astapova M.V., Starovoytova E.V., Dranitsyna S.M., Lipkin V.M. // FEBS Letters, 1994, 356, (2–3), 327–329.
7. Костанян И.А., Астапова М.В., Наволоцкая Е.В., Лепихова Т.Н., Драницина С.М., Телегин Г.Б., Родионов И.Л., Байдакова Л.К., Золотарев Ю.А., Молотковская И.М., Липкин В.М. // Биооргани. химия, 2000, 26, (7), 505–511. [Kostanyan I.A., Astapova M.V., Navolotskaya E.V., Lepikhova T.N., Dranitsyna S.M., Telegin G.B., Rodionov I.L., Baidakova L.K., Zolotarev Yu.A., Molotkovskaya I.M., Lipkin V.M. // Russ. Bioorgan. Chem. 2000. V. 26. P. 505–511.]
8. Костанян И.А., Сторожева З.И., Семенова Н.А., Липкин В.М. // Доклады академии наук. 2009. 428(4). С. 1–5.
9. Sewell R.D., Gruden M.A., Pache D.M., Storozeva Z.I., Kostanyan I.A., Proshin A.T., Yurasov V.V., Sherstnev V.V. // J. Psychopharmacol. 2005. V. 19. P. 602–608.
10. Золотарев Ю.А., Ковалев Г.И., Дадаян А.К., Козик В.С., Кондрахин Е.А., Васильева Е.В., Липкин В.М. Статья в монографии: Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма / под ред. М.В. Угрюмова. М.: Научный мир, 2014. С. 763–777.
11. Bogachouk A.P., Storozeva Z.I., Solovjeva O.A., Sherstnev V.V., Zolotarev Yu.A., Azev V.N., Rodionov I.L., Surina E.A. and Lipkin V.M. // J. Psychopharmacol., 2015 (в печати)
12. Zolotarev Yu.A., Borisov Yu.A., Myasoedov N.F. // J. Phys. Chemistry A. 1999. V. 103. (N 25). 4861–4864.
13. Che F-Y., Lim J., Pan H., Biswas R., and Fricker L.D. // Mol. Cell Proteomics. 2005. V. 4(9). P. 1391–1405
14. Миронов А.Н., Бунятян Н.Д., Васильев А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012.
15. Matsueda G.R. and Stewart J.M. // Peptides 1981. V. 2. P. 45–50.

The Qualitative Analysis of the Amide Derivative of HLDF-6 Peptide and Its Metabolites with the Use of Tritium- and Deuterium-Labeled Derivatives

Yu. A. Zolotarev*[#], A. K. Dadayan*, N. V. Kost[#], M. E. Voevodina**[#], O. Y. Sokolov**[#], V. S. Kozik*, S. I. Shram*, V. N. Azev***[#], E. V. Bocharov****[#], A. P. Bogachouk****[#], V. M. Lipkin****[#] and N. F. Myasoedov***

[#]Phone: +7(499) 196-02-13; fax: +7(499) 196-02-21; e-mail: zolya@img.ras.ru

*Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, pl. Akademika Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

**Mental Health Research Center of RAMS, Moscow, Russia

***Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino Branch, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, Russia

****Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The goal of the study was to elaborate the pharmacokinetics methods of the amide derivative of peptide HLDF-6 (TGENHR-NH₂) and its range of nootropic and neuroprotective activity is wide. The hexapeptide ₄₁TGENHR₄₆ is a fragment of the HDLF differentiation factor. It forms the basis for the development of preventive and therapeutic preparations for treating cerebrovascular and neurodegenerative conditions. Pharmacokinetic and molecular mechanisms of the action of the HLDF-6 peptide were studied using tritium- and deuterium-labeled derivatives of this peptide, produced with the use of the high-temperature solid-state catalytic isotope exchange reaction (HSCIE). This reaction was employed to produce the tritium-labeled peptide [³H]TGENHR-NH₂ with a molar radioactivity of 230 Ci/mmol and the deuterium-labeled peptide [²H]TGENHR-NH₂ with an average deuterium incorporation equal to 10.5 atoms. It was shown by the NMR spectroscopy that the isotope label distribution over the labeled peptide's molecule was uniform, which allowed qualitative analysis of both the peptide itself and its fragments in the organism's tissues to be conducted. The newly developed pharmacokinetics method makes it possible to avoid almost completely losses of the peptides under study due to biodegradation during the analysis of tissues. These labeled peptides were used in mice, rats and rabbits to study the pharmacokinetics of the peptide and to calculate the values of its principal pharmacokinetic parameters. Characteristics of its pharmacokinetic profile in the blood were obtained, the hypothesis of pharmacokinetics linearity tested, its metabolism analyzed and its bioavailability value, 34%, calculated. It has been shown that the studied TGENHR-NH₂ peptide shows high resistance to hydrolysis in the blood plasma, with dipeptidyl aminopeptidases making the largest contribution to its hydrolysis.

Keywords: peptide HLDF-6, pharmacokinetics, metabolism, tritium and deuterium labeled peptides, ¹H NMR, mass spectroscopy