

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии  
им. академика Е.И. Чазова»  
Министерства Здравоохранения Российской Федерации

*на правах рукописи*



**АВДЕЕВ ДМИТРИЙ ВИКТОРОВИЧ**

**НОВЫЙ ПОДХОД К СИНТЕЗУ БИОЛОГИЧЕСКИ  
АКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ С ДИСУЛЬФИДНЫМИ СВЯЗЯМИ**

1.4.9 – Биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
**Руководитель лаборатории,  
к.х.н. Сидорова М.В.**

Москва – 2024

## О Г Л А В Л Е Н И Е

Список сокращений и условных обозначений .....	5
<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>7</b>
<b>1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1. ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2. ИСТОРИЧЕСКИЕ ВЕХИ В ИЗУЧЕНИИ ПЕПТИДНЫХ ГОРМОНОВ С S-S СВЯЗЬЮ .....</b>	<b>16</b>
<b>1.3. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ПЕПТИДЫ С S-S МОСТИКОМ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ .....</b>	<b>16</b>
1.3.1. Пептиды с S-S связями в организме человека .....	17
1.3.2. Пептиды с S-S связями в растениях .....	19
1.3.3. Пептиды с S-S связями в организме пауков .....	21
1.3.4. Пептиды с S-S связями в организме амфибий (земноводных).....	23
1.3.5. Пептид танатин с S-S связью в организме клопа-щитника rodusus maculiventris .....	24
1.3.6. Пептиды с S-S связями в организме сельскохозяйственных животных .....	25
1.3.7. Пептиды с S-S связями в организме водных обитателей .....	25
1.3.8. Пептиды с S-S связями в организме змей и скорпионов .....	27
1.3.9. Пептиды с S-S связями в организме крылатых насекомых .....	28
<b>1.4. ДИЗАЙН ПЕПТИДНЫХ ЛЕКАРСТВ СКВОЗЬ ПРИЗМУ S-S СВЯЗИ .....</b>	<b>46</b>
1.4.1. Дисульфидная связь – важный структурный элемент для выявления активных конформаций пептидов .....	46
<b>1.4.2. Роль дисульфидной связи в стабилизации пространственной структуры пептидов и повышении их селективности .....</b>	<b>48</b>
1.4.3. Влияние дисульфидной связи на биологическую активность пептидов .....	51
1.4.4. Связь дисульфидного мостика и снижения восприимчивости к деградации протеазами .....	52
<b>1.5. ОРФАННЫЕ ПРЕПАРАТЫ С ДИСУЛЬФИДНОЙ СВЯЗЬЮ .....</b>	<b>54</b>
<b>1.6. НОВАТОРСКИЕ ПЕПТИДЫ С S-S СВЯЗЬЮ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НЕУДОВЛЕТВОРЁННЫХ МЕДИЦИНСКИХ ПОТРЕБНОСТЕЙ .....</b>	<b>56</b>
1.6.1. Далазатид – высокоселективный ингибитор потенциал-зависимого калиевого канала kv1.3 .....	56
1.6.2. Пептид BLZ-100 – высокоселективный лиганд к хлоридным каналам и матриксной металлопротеиназе-2 (ММР2) .....	57
1.6.3. Пептиды RPMC и GE-137 – высокоселективные лиганды к рецепторам тирозин- протеинкиназы (С-MET) и интегрина A5B1 .....	58

1.6.4. Пептид PEN-221 – высокоселективный лиганд к рецептору соматостатина второго типа (SSTR 2) .....	59
1.6.5. Кагрилинтид – лиганд к рецепторам амилина и кальцитонина (AMYR и CTR) .....	61
1.6.6. Пептид AMY-101 – ингибитор активации центрального белка системы комплемента C3 .....	61
1.6.7. Пептид H1A – ингибитор кислоточувствительного ионного канала 1A (ASIC 1A) .....	62
<b>2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....</b>	<b>63</b>
<b>2.1. ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА ОБЪЕКТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	<b>63</b>
<b>2.2. МЕТОДЫ ЗАМЫКАНИЯ ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ .....</b>	<b>67</b>
<b>2.3. СИНТЕЗ НЕЙРОГИПОФИЗАРНЫХ ГОРМОНОВ И ИХ АНАЛОГОВ .....</b>	<b>70</b>
2.3.1. Замыкание S-S связи в атозибане (5) и терлипрессине (6) в растворе действием H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	71
2.3.2. Замыкание S-S связи в дезаминоаналогах нейрогипофизарных гормонов (2, 4, 5) на твёрдой фазе иодом .....	76
2.3.3. Замыкание S-S связи в окситоцине (1) на твёрдой фазе иодом .....	80
2.3.4. Изучение процесса замыкания S-S связи в нейрогипофизарных гормонах и их аналогах (1-6) in silico .....	82
2.3.5. Замыкание S-S связи в терлипрессине (6) на твёрдой фазе иодом .....	90
<b>2.4. ЗАМЫКАНИЕ S-S СВЯЗИ В АНАЛОГАХ ГОРМОНА СОМАТОСТАТИНА (7, 8) ИОДОМ НА ТВЁРДОЙ ФАЗЕ .....</b>	<b>97</b>
2.4.1. Изучение процесса замыкания S-S связи Tug <sup>3</sup> -окреотэйти (7) и DOTA-TATE (8) in silico .....	98
2.4.2. Замыкание S-S связи в Tug <sup>3</sup> -окреотэйте (7) и DOTA-TATE (8) на твёрдой фазе иодом .....	100
<b>3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....</b>	<b>107</b>
<b>3.1. ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ .....</b>	<b>107</b>
<b>3.2. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА .....</b>	<b>107</b>
3.2.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) .....	107
3.2.2. Теоретические вычисления .....	109

<b>3.3. ТВЁРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ .....</b>	<b>110</b>
3.3.1. Общая методика синтеза окситоцина (1), дезаминоокситоцина (2), D-Arg <sup>8</sup> -вазопрессина (3), десмопрессина (4), атозибана (5) и терлипрессина (6) .....	110
3.3.2. Общая методика синтеза Tyr <sup>3</sup> -окреотэйти (7) и DOTA-TATE (8) .....	111
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>115</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>116</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ac – ацетил

Acм – ацетамидометил

AcOH – уксусная кислота

ANF – предсердный натрийуретический фактор

Woc – *трет*-бутилоксикарбонил

Bu<sup>t</sup> – *трет*-бутил

C3 – центральный белок системы комплемента человека

ССК – циклический цистинный узел

Ctx – конотоксин

DBU – 1,8 –диазабиперидин [5.4.0]-ундец-7-ен

DDAVP – десмопрессин

DIC – N,N' – диизопропилкарбодиимид

DMF – N, N' – диметилформамид

DOT – дезаминокситоцин

DMSO – диметилсульфоксид

FDA – Food and Drug Administration – Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств

CGRP – пептид, связанный с геном кальцитонина

GPCR – Трансмембранные G-белок-связанные рецепторы

Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил

E<sub>pre-act</sub> – энергия преактивации

ESI – электрораспылительная химическая ионизация при атмосферном давлении

Et – этил

NOBt – 1-гидроксибензотриазол

ICK – ингибитор цистинного узла

IL-6 – интерлейкин 6

4-MePip – 4-метилпиперидин

Mpa – 3-меркаптопропионовая кислота

MSH – меланоцитстимулирующий гормон

Mob – 4-метоксибензил

NMP – N-метилпирролидон

Npys – 3-нитро-2-пиридсульфенил

Pbf – 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил

*i* -PrOH – *изо*-пропиловый спирт  
OT – окситоцин  
PRRT – пептидная рецепторная радионуклидная терапия  
SST – соматостатин  
SSTR – соматостатиновый рецептор  
TIS – триизопротилсилан  
Trt – тритил  
TFA – трифторуксусная кислота  
VP – вазопрессин  
Xan – ксантил  
а.о. – аминокислотный остаток  
АКТГ – адренокортикотропный гормон  
АМП – антимикробные пептиды  
в/в – внутривенно  
в/м – внутримышечно  
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография  
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт  
ИМ – инфаркт миокарда  
п/к – подкожно  
ПС – переходное состояние  
СГР – состояние готовности к реакции  
СН – сердечная недостаточность  
КРР – колоректальный рак  
МНН – международное непатентованное наименование  
МРЛ – мелкоклеточный рак лёгкого  
НМРЛ – немелкоклеточный рак лёгкого  
ОРДС – респираторный дистресс-синдром  
ПЭТ –позитронно-эмиссионная томография  
РСА – рентгеноструктурный анализ  
РФП – радиофармацевтический препарат  
ТФС – твердофазный синтез

## В В Е Д Е Н И Е

### Актуальность темы

Пептидная терапия играет заметную роль в медицинской практике с момента появления инсулинотерапии [1]. В настоящее время более 60 пептидных препаратов зарегистрированы FDA в США и на других крупных фармацевтических рынках [2–4]. Будучи эндогенными лигандами для ряда мишеней, пептиды являются естественной отправной точкой для создания лекарств и продолжают устойчивыми темпами входить в клиническую практику. Фармацевтический рынок пептидных лекарств довольно многообразен: за последние 20 лет он увеличился вдвое и ежегодно пополняется новыми молекулами [1–4].

Отдельную группу среди биологически-активных пептидов и пептидных лекарств представляют соединения, содержащие в своей структуре дисульфидный мостик [5]. Это гормоны и рилизинг-факторы (окситоцин, вазопрессин, инсулин, кальцитонин, соматостатин и др.), натрийуретические пептиды [6] и эндотелины [7] сердечно-сосудистой системы и др. Пептиды этой группы принимают участие в регуляции всех видов обмена веществ: водно-солевого баланса, роста и дифференциации тканей и органов, гемодинамики и сердечной деятельности, секреции и моторики ЖКТ, функций ЦНС и многих других физиологических процессов.

Хорошо известными примерами зарегистрированных препаратов с дисульфидными связями являются атозибан, терлипрессин и октреотид [4, 5]. Эти молекулы демонстрируют высокий потенциал благодаря повышенной химической и ферментативной стабильности, рецепторной избирательности и улучшенным фармакокинетическими и фармакодинамическим свойствам [4, 5]. В последние годы наблюдается рост числа молекул с дисульфидной связью – потенциальных кандидатов для терапии новых и редких заболеваний [8–11].

В настоящее время подавляющее большинство пептидных терапевтических препаратов получают химическим синтезом. Химический синтез пептидов с внутримолекулярными дисульфидными связями до сих пор является достаточно сложной задачей [12]. Это обусловлено тем, что на стадии замыкания внутримолекулярного дисульфидного мостика в пептиде, во избежание образования побочных димеров и олигомеров, приходится работать в условиях высокого разбавления. Рабочие концентрации пептидов при циклизации, как правило, составляют  $10^{-4}$  –  $10^{-5}$  М (т.е. 0.1 – 1 мг/мл) и выходы целевых продуктов колеблются от 10 до 30 % [12], что неэкономично при крупномасштабном синтезе циклических соединений такой структуры.

Несмотря на высокий интерес к теме пептидной фармацевтики в течение последних 70 лет и увеличивающееся с каждым годом количество пептидных препаратов с дисульфидной связью [1–4], до сих пор не существует универсальной, высокотехнологичной методики для крупномасштабного получения таких пептидов с высокими выходами. Поэтому разработка высокоэффективного способа получения циклических пептидов такой структуры является актуальной задачей фармацевтической химии.

### **Цели и задачи**

*Целью работы является* разработка нового высокоэффективного подхода к синтезу биологически активных пептидов с внутримолекулярными дисульфидными связями.

Для достижения поставленной цели были выполнены следующие **задачи**:

- Изучение и подбор оптимальных условий замыкания S-S связи в процессе твердофазного синтеза.
- Синтез окситоцина, вазопрессина, их аналогов и аналогов гормона соматостатина.
- Изучение влияния N-концевой аминогруппы на выход продукта циклизации при замыкании S-S мостика на твёрдой фазе иодом.
- Масштабирование технологического процесса получения циклических дисульфидов с целью и промышленного производства.

### **Научная новизна работы**

В ходе настоящего исследования разработан универсальный высокоэффективный полностью твёрдофазный подход к синтезу пептидов с одной внутримолекулярной дисульфидной связью, отличающийся простой обработкой, удобным методом выделения и очистки, применимый как в лабораторных, так и промышленных масштабах. Впервые экспериментально и с помощью молекулярного моделирования показано влияние свободной и Вос-защищённой N-концевой аминогруппы на выход продукта при I<sub>2</sub>-опосредованной циклизации за счёт прямой конверсии Trt-защищённого предшественника в циклический дисульфид.

### **Практическая значимость работы**

Разработанная методология, сочетающая преимущества твёрдофазного синтеза с замыканием дисульфидной связи прямой конверсией защищённых тиолов в цикл, может быть применима для синтеза циклических дисульфидов, в том числе включая пептиды, содержащие чувствительные к окислению тирозин и триптофан. Также метод пригоден для синтеза циклических пептидов, конъюгированных с соединениями непептидной природы: хелаторами, хромофорами и т.п., которые находят широкое применение в медико-биологических исследованиях. Разработанные методы могут быть использованы



в органической, биоорганической, медицинской химии и фармацевтической промышленности.

**Личный вклад автора** заключается в проведении всего объёма синтетической работы, физико-химических исследований и интерпретации полученных результатов. Автором проанализирован массив данных, полученных в ходе экспериментальной и теоретической работы, сформулированы цель, задачи и выводы работы, а также подготовка и написание научных статей.

#### **Структура диссертации**

Работа состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка литературы. Работа изложена на 143 страницах машинописного текста, включает 27 рисунков, 7 схем, 8 таблиц.

#### **Апробация работы**

Результаты, полученные в диссертационной работе, были представлены на следующих всероссийских и международных научных конференциях в виде устных докладов: Всероссийская конференция с международным участием: X Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Сочи, 2021 год); Международная Конференция: «Mendeleev 2021», The XII International Conference on Chemistry for Young Scientists (Санкт-Петербург, 2021 год); «MedChem-Russia 2021». 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021» 2021 год (Онлайн 2022); «МОБИ-ХимФарма 2023», VIII Междисциплинарная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (Санкт-Петербург, 2023); Всероссийской научно-практической конференция «Кардиология на марше 2023» (Москва, 2023 год).

#### **Публикации**

По материалам диссертационной работы опубликовано 3 статьи в научных журналах, включенных в перечень рецензируемых научных журналов ВАК и в международных базах цитирования Web of Science и Scopus, и 4 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

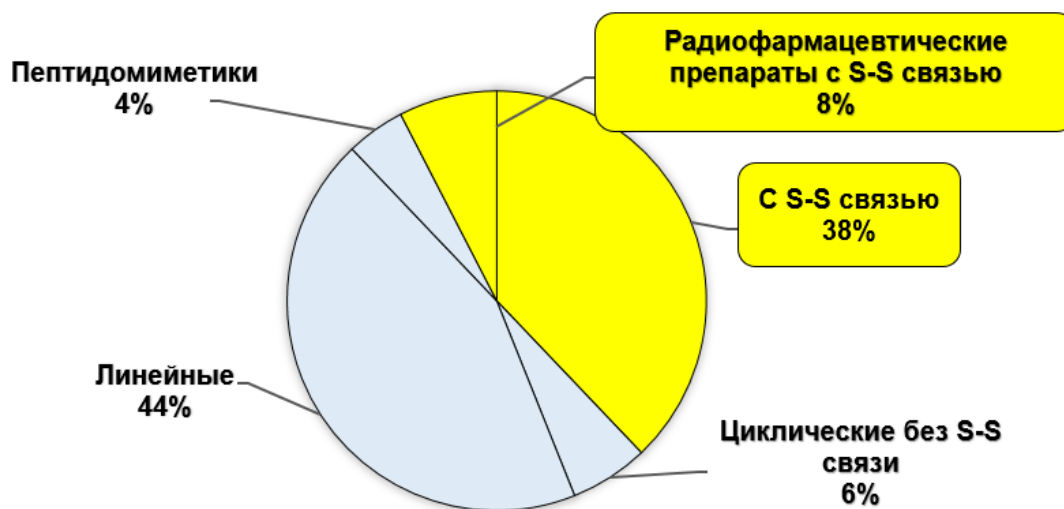
# 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

## 1.1. ВВЕДЕНИЕ

Природные пептиды обладают широким спектром биологической активности – это гормоны и рилизинг-факторы (АКТГ, окситоцин, гастрин, вазопрессин, MSH, секретин, инсулин, глюкагон, кальцитонин и др.); нейропептиды (эндорфины, энкефалины); регуляторы иммунитета (тафцин, тимозины др.); токсины – яды грибов, пчел, змей (аматоксин, меллитин, апамин и др.); антибиотики (циклоспорин А, валиномицин, грамицидины, полимиксины и др.). Поэтому пептиды широко используются как в научных (изучение взаимосвязи структуры и функции белков), так и в прикладных исследованиях в качестве синтетических моделей, имитирующих свойства природных белков; ингибиторов ферментов; антигенов и иммуногенов; лигандов в аффинной хроматографии, лекарственных препаратов, адресной части в составе радиофармацевтических препаратов (РФП).

С каждым годом наблюдается всё больший интерес к пептидным молекулам как возможным кандидатам в лекарственные препараты, о чем свидетельствует список пептидных препаратов, обычно используемых в медицинской практике [4]. Новые синтетические стратегии позволяют изменять фармакокинетические и биологические свойства препарата путем структурной модификации (включения в его состав неприродных аминокислот, модификации N- и C- концевых аминокислот, амидной связи, циклизации, конъюгации с соединениями непептидной природы [5–6], липидизации [7], инкапсулирования в биodeградируемые полимерные частицы [8], создания различных наносистем [9–10]). Эти модификации повышают стабильность, продлевают период полураспада молекулы, улучшают её растворимость, биодоступность и другие свойства, что позволяет целенаправленно заниматься дизайном структур с заданной биологической активностью [11–14]. Рецепторная специфичность диктует область применения потенциальных пептидных лекарств, большинство из которых являются лигандами трансмембранных G-белок-связанных (GPCR) рецепторов [15].

Среди разрешённых FDA к применению пептидных препаратов практически половина содержит в своей структуре дисульфидный мостик (Рисунок 1). Области применения лекарств с S-S связью многогранны и затрагивают сердечно-сосудистые, гинекологические, орфанные, болезни ЖКТ, онкологические и другие заболевания (Таблица 1).



**Рисунок 1.** Структурные особенности пептидных препаратов, разрешённых к применению FDA [1–5].

В настоящем обзоре рассмотрено современное состояние разработок перспективных молекул, выполненных на основе пептидов, в молекулах которых присутствуют дисульфидные связи. В обзоре затронуты история открытия пептидных гормонов с дисульфидным мостиком, описаны регуляторные функции, которые в живых организмах выполняют эти гормоны и другие пептиды с S-S связью, проанализирована роль дисульфидных связей в стабилизации структуры и реализации биологической активности пептидов. Отдельная глава посвящена новым перспективным молекулам с S-S мостиком, предназначенным для лечения «неудовлетворённых медицинских потребностей»<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> «Неудовлетворённая медицинская потребность» – Unmet medical need – «UMN» – серьёзное состояние, для которого не существует доступного к настоящему времени удовлетворительного метода диагностики, профилактики или терапии (<https://ncats.nih.gov/>).

**ПЕПТИДНЫЕ ПРЕПАРАТЫ С S-S СВЯЗЬЮ,  
РАЗРЕШЁННЫЕ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ FDA [1-5, 8, 9]**

№	Название пептида (МНН) (коммерческое название)	Структура*	Кол-во а.о.	Мишень для взаимодействия	Агонист/ Антагонист	Показания к применению	Доза**	Способ введения**
1	Окситоцин	$H-cyclo(C_1YIQNC_6)PLG-NH_2$	9	Окситоциновые рецепторы (OT рецепторы) – класс A GPCR рецепторов	Агонист	Стимуляция родовой деятельности; лактация	5-10 МЕ. мл	в/в (внутривенно)
2	Атозибан («Atosiban», «Трактоцил»)	$cyclo(Mpa_1y(OEt)ITNC_6)POmG-NH_2$	9		Антагонист	Преждевременные роды	7,5 мг/мл	в/в
3	Вазопрессин («Vasopressin»)	$H-cyclo(C_1YFQNC_6)PRG-NH_2$	9	Вазопрессиновые рецепторы (V <sub>1a</sub> , V <sub>1b</sub> , V <sub>2</sub> рецепторы) - класс A GPCR рецепторов	Агонист	Вазодилататорный шок; кровотечение пищевода; варикоз	0.01-0.07 МЕ/мин	п/к; в/м; в/в
4	Фелипрессин	$H-cyclo(C_1FFQNC_6)PKG-NH_2$				Стоматологическая анестезия		Инъекция
5	Орнипрессин	$H-cyclo(C_1YFQNC_6)POmG-NH_2$				Кровотечения пищевода; варикоз		Инъекция
6	Терлипрессин («Реместип»)	$H-GGG-cyclo(C_1YFQNC_6)PKG-NH_2$	12	Вазопрессиновые рецепторы второго типа - класс A GPCR рецепторов	Агонист	Несахарный диабет; первичный ночной энурез; ноктурия, болезнь Виллебранда <u>гемофилия А</u>	0,1 мг/мл	Инъекция
7	Десмопрессин («Пресайнекс»)	$cyclo(Mpa_1YFQNC_6)PrG-NH_2$	9				100 мкг/мл 89 мкг – табл.	Перорально, Интраназально; п/к; в/м; в/в
8	Соматостатин	$H-AGcyclo(C_3KNFFWKFTFTSC_{14})-OH$	14	Соматостатиновые рецепторы (sstr) - класс A GPCR рецепторов	Агонист	Кровотечения из верхних отделов ЖКТ; Кровотечение из	3,5 мкг/кг	Инъекция в/м; в/в
9	Вапреотид («Sanvar»)	$H-f-cyclo(C_2YwKC_6)W-NH_2$	8				Инъекция в/в	

						варикозно расширенных вен пищевода			
10	Октреотид («Сандостатин»; «Октреотид»)	$H-f-cyclo(C_2FwKTCT_8)-ol$	8			Акромегалия; Нейроэндокринные опухоли	100 мкг/мл;	п/к; в/в	
11	Ланреотид («Соматулин»)	$H-D-Naph-cyclo(C_2YwKVC_7)T-NH_2$	8				120 мг на 28 дней	п/к; в/м; в/в	
12	$^{177}Lu$ -DOTA-TATE («Lutathera»)	$DOTA-fcyclo(C_2FwKTCT_8)-OH$	8+ DOTA	Соматостатиновые рецепторы (sstr) - класс A GPCR рецепторов	Агонист	Терапия желудочно-панкреатических нейроэндокринных опухолей	По назначению врача	Инъекция	
13	$^{68}Ga$ -DOTA-TATE («Netspot») США	$DOTA-fcyclo(C_2FwKTCT_8)-OH$	8+ DOTA	Соматостатиновые рецепторы (sstr) - класс A GPCR рецепторов		Диагностика нейроэндокринных опухолей	По назначению врача	Инъекция	
14	$^{68}Ga$ -DOTA-TOC («SomaKitTOC») ЕС	$DOTA-fcyclo(C_2FwKTCT_8)-ol$	8+ DOTA			Диагностика нейроэндокринных опухолей Диагностика нейроэндокринных опухолей			
15	$^{111}In$ -DTPA-TOC («Octreoscan»)	$DTPA-fcyclo(C_2FwKTCT_8)-ol$	8+ DTPA			Диагностика нейроэндокринных опухолей			
16	$^{64}Cu$ -DOTA-TATE («Detecnet»)	$DOTA-fcyclo(C_2FwKTCT_8)-OH$	8+ DOTA			Агонист			Диагностика нейроэндокринных опухолей
17	Эптифибатид (Интегрилин, Коромакс)	$cyclo(Mpa_1-hR-GDWPC_7)-NH_2$	7		Гликопротеин IIb/IIIa-белокдимерный интегрин	Антагонист			Острый коронарный синдром

18	Карперитид («Carperitid»)	H-SLRRSS $cyclo(C_7FGGRMDRIGAQSGLGC_{23})NSFRY-$ OH	28	Натрийуретический пептидный рецептор А (NPR A) – класс А гуанилилциклазы	Агонист	Острая декомпенсиро- ванная сердечная недостаточность	0,025-0,05 мкг / кг /мин	Инъекция в/в
19	Несиритид («Natrecor»)	H- SPLMBQSG $cyclo(C_{10}FGRKMDRISSSSGLGC_{26})KVLRR$ H-OH	32	Натрийуретический пептидный рецептор А (NPR A) – класс А гуанилилциклазы		Острая декомпенсированная сердечная недостаточность	2 мкг/кг веса пациента	Инъекция в/в
20	Восоритид («Voxzogo»)	H- PGEQHPNARKYKGANKKGLSKG $cyclo(C_{23}FGLKLERIG$ SMSGLGC $_{39})$ -OH	39	Натрийуретический пептидный рецептор В (NPR B) – класс В гуанилилциклазы		Ахондроплазия	15 мкг/г	Инъекция п/к
21	Зиконотид («Prialt»)	H-C $_{1a}$ KGKGAKC $_{8b}$ SRLMYDC $_{15a}$ C $_{16c}$ TGSC $_{20b}$ RSGLC $_{25c}$ - NH $_2$	25	Кальциевые каналы N-типа- один из классов ионных каналов	Ингибитор	Хронические болевые синдромы	19,2 мкг/сут- макси- мальная доза	Инъекция
22	Линаклотид («Linzess»; «Konstella»)	H-C $_{1a}$ C $_{2b}$ QYC $_{5c}$ C $_{6a}$ NPAC $_{10b}$ TGC $_{13c}$ Y-OH	14	Рецептор гуанилилциклазы С (GC-C)	Агонист	Синдром раздраженного кишечника с запором; Хронический идиопатический запор	72-290 мкг в день	Перорально
23	Плеканатид («Trulance»)	H-NDQC $_{4a}$ QLC $_{7b}$ VNVAC $_{12a}$ TGC $_{15b}$ L-OH	16			Синдром раздраженного кишечника с запором; Хронический идиопатический запор	3 мг в день	Перорально
24	Кальцитонин	H- $cyclo(C_1GNLSTC_7)MLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP$ -NH $_2$	32	Рецептор кальцитонина - класс VGPCR рецепторов	Агонист	Гиперкальциемия новорождённых, болезнь Паджета, остеопороз		Интрана- зально; п/к; в/м; в/в

25	Прамлинтид («Symlin»)	H- K <sub>cyclo</sub> (C <sub>2</sub> NTATC <sub>7</sub> )ATQRLANFLVHSSNFGPILPPTNV GSNTY-NH <sub>2</sub>	37	Рецептор кальцитонина - класс BGPCR рецепторов	Агонист	Диабет первого и второго типа	15-120 мкг	п/к
26	Пегинесатид («Omontys»)	[AcGGLYAcyclo(C <sub>6</sub> HMGPIT(1-nal)VC <sub>14</sub> )QPLR(MeG)K- NH] <sub>2</sub> -PEG	20+20 (+PEG 40KDa)	Рецептор эритропоэтина (EpoR) – семейство цитоклиновых рецепторов	Ингибитор	Анемия, обусловленная хронической болезнью почек	0,04 мг/кг массы тела один раз в месяц	п/к или в/в
27	Пегцетакоплан («Empaveli») [249, 265]	[Ac-Icyclo(C <sub>2</sub> VW(Me)QDWGAHRC <sub>12</sub> )T-NH] <sub>2</sub> -PEG	13+13 (+ PEG 40KDa)	Белок системы комплемента C3		Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ)	1080 мг один-два раза в неделю	Инъекция п/к
28	Ромидепсин («Istodax»)	5(депсипептид)		Гистондеацетилаза (HDAC) – 3 класс ферментов гидролаз		Кожная (CTCL) и периферическая (PTCL) Т-клеточные лимфомы	14 мг/м <sup>2</sup> на 1,8,15,28 день цикла	Инфузия в/в
29	Эккалантид («Kalbitor»)	H- EAMHSFC <sub>7a</sub> AFKADDGPC <sub>16b</sub> RAAHPRWFFNIFTRQC <sub>32c</sub> E EFIYGGC <sub>40b</sub> EGNQNRFESEEC <sub>53c</sub> KKMC <sub>57a</sub> TRD-OH	60	Белок Калликреин		Наследственный ангионевротический отёк	30 мг дозами по 10 мг в течение 24 часов	Инъекция п/к
30	Дезирудин («Iprivask»)	H- VVYTDCTESGQNLCLCEGSNVCGQGKNCILGSDGEK NQCVTGEGTPKQSHNDGDFEEIPEEYLQ-OH	65	Тромбин		Тромбоз глубоких вен	15 мг	

\* – нижним индексом обозначены аминокислотные остатки серосодержащих аминокислот, между которыми образована S-S связь

\*\* – информация об используемой дозе и способе введения взята с официальной страницы FDA (URL: <https://www.fda.gov/>)

## **1.2. ИСТОРИЧЕСКИЕ ВЕХИ В ИЗУЧЕНИИ ПЕПТИДНЫХ ГОРМОНОВ С S-S СВЯЗЬЮ**

Эра пептидных гормонов началась с открытия инсулина в 1922 году Ф. Бантингом и Д. Маклеодом [24, 26]. Инсулин включает 51 аминокислотный остаток (а.о.), состоит из двух полипептидных цепей А (21 а.о.) и Б (30 а.о.) и имеет три дисульфидных связи: одну внутримолекулярную (в цепи А) и две межмолекулярных, соединяющих А и Б цепи [25]. Этот пептид практически целый век спасает и облегчает жизнь больным сахарным диабетом. За открытие инсулина в 1923 году Ф. Бантинг и Д. Маклеод были удостоены Нобелевской премии по физиологии [24, 26].

Первичная аминокислотная последовательность этого гормона была установлена гораздо позднее Фредериком Сенгером (Нобелевская премия по химии 1958 г. за установление структур белков, особенно инсулина), пространственная структура инсулина была установлена Дороти К. Ходжкин (Нобелевская премия по химии 1964 г. за определение с помощью рентгеновских лучей структур биологически активных веществ) [24].

В 1928 году из задней доли гипофиза были выделены гормоны окситоцин и вазопрессин, в 1953–1954 году Винсент Дю Виньо установил структуру этих нонапептидов с дисульфидным мостиком, а в 1955 г [27] В. Дю Виньо была вручена Нобелевская премия за выделение, структурную идентификацию и общий синтез циклического пептида, окситоцина [27]. Позднее в 1962 году был открыт гормон кальцитонин [28]. Этот 32-членный пептид является гормоном щитовидной железы и участвует в регуляции кальциевого гомеостаза. Кальцитонин применяется для лечения болезней костной системы [28]. Через 10 лет в 1972 году R. Guillemin открыл гормон соматостатин, а в 1973 году Brazeau выделил его из гипоталамуса овец и показал, что природный соматостатин встречается в двух изоформах, каждая из которых состоит из 14 (SST-14) или 28 (SST 28) аминокислотных остатков с одним S-S мостиком соответственно [29]. Прошло уже 50 лет с открытия этого гипоталамического гормона, а поиск его новых аналогов продолжается [30].

## **1.3. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ПЕПТИДЫ С S-S МОСТИКОМ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ**

В таблице 2 представлены аминокислотные последовательности и основные физиологические и биологические функции пептидов с одной или несколькими S-S связями в зависимости от места их образования и локализации. Рассмотрим более подробно каждую группу в отдельности.



### 1.3.1. ПЕПТИДЫ С S-S СВЯЗЯМИ В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА

Пептидные гормоны поджелудочной железы принимают важное участие в регуляции углеводного, жирового и белкового обмена. В  $\beta$ -клетках островков Лангерганса поджелудочной железы образуются **инсулин и амилин**, в  $\delta$ -клетках – **соматостатин**. Инсулин оказывает всестороннее действие на метаболизм организма в целом. Самым важным его свойством является саморегуляция содержания глюкозы в различных органах [24, 25, 31, 32]. В мышечных клетках инсулин способствует усвоению глюкозы и ускоряет синтез белка, подавляет выработку глюкозы в печени и ингибирует расщепление жиров [24, 25, 31, 32]. Амилин [33, 34] регулирует уровень сахара в крови, замедляя переваривание пищи, тем самым предотвращая скачки уровня глюкозы после еды [33, 34]. Соматостатин (SST) [35] ингибирует секрецию гормона роста (GH), глюкагона, инсулина, гастрина, секретина, а также множество физиологических функций в гипоталамусе, передней доле гипофиза, желудочно-кишечном тракте и поджелудочной железе [35, 36]. Помимо поджелудочной железы SST вырабатывается также в гипоталамусе. Этот гормон был обнаружен в различных отделах головного и спинного мозга, есть предположение, что он участвует в передаче нервного импульса [37]. Кроме соматостатина в гипоталамусе образуются два нейрогипофизарных гормона – **окситоцин (OT)** и **вазопрессин (VP)** [38].

Окситоцин отвечает за такие важные функции организма, как роды и лактация [39], влияет на социальное и сексуальное поведение [40], регулирует альгезию и принимает участие в процессах консолидации памяти [39]. Кроме того, в недавних исследованиях было показано, что OT уменьшает действие этанола и может помочь в лечении алкоголизма [41]. VP поддерживает водно-солевой баланс организма и артериальное давление, являясь антидиуретиком и вазоконстриктором [42]. Также вазопрессин участвует в процессах обучения и памяти [43].

Семейство **натрийуретических пептидов**, состоящих из 22–38 а.о. с одним S-S мостиком, в основном, включает в себя натрийуретический пептид типа А (ANP) или предсердный натрийуретический пептид, который обычно синтезируется и секретируется **миоцитами предсердий**, натрийуретический пептид типа В (BNP) или мозговой натрийуретический пептид и натрийуретический пептид типа С (CNP) (Рисунок 2). Изначально BNP был выделен из ткани головного мозга свиньи, но последующие исследования показали, что его синтез и секреция происходят, в основном, в **миоцитах желудочков сердца**. Было показано, что **эндотелиальные клетки сосудов** активно продуцируют CNP, который, предположительно, функционирует как локальный регулятор



Функциональная связь с натрийуретическими пептидами присутствует у группы **эндотелинов**. Эти соединения причастны к патофизиологическим процессам, протекающим при сердечной недостаточности [7]. В основном эти пептиды, имеющие в своей структуре 21–39 аминокислотных остатков с двумя дисульфидными связями, синтезируются в *эндотелиальных клетках сосудов* и проявляют сильное сосудосуживающее действие. Эти пептиды непосредственно связаны с регуляцией тонуса коронарных сосудов и дисфункцией сосудистого эндотелия при ишемической болезни сердца [7].

В *бокаловидных клетках кишечника* секретируются пептиды **гуанилин и урогуанилин**, которые вызывают диарею и регулируют транспорт воды и электролитов в кишечнике и почках [46]. Исследования показали, что при снижении экспрессии гуанилина могут развиваться опухоли кишечника различного генеза [47]. С-клетками щитовидной железы секретируется тиреоидный гормон кальцитонин, который играет важную роль в саморегуляции кальция в организме и является важным регулятором костного метаболизма [48].

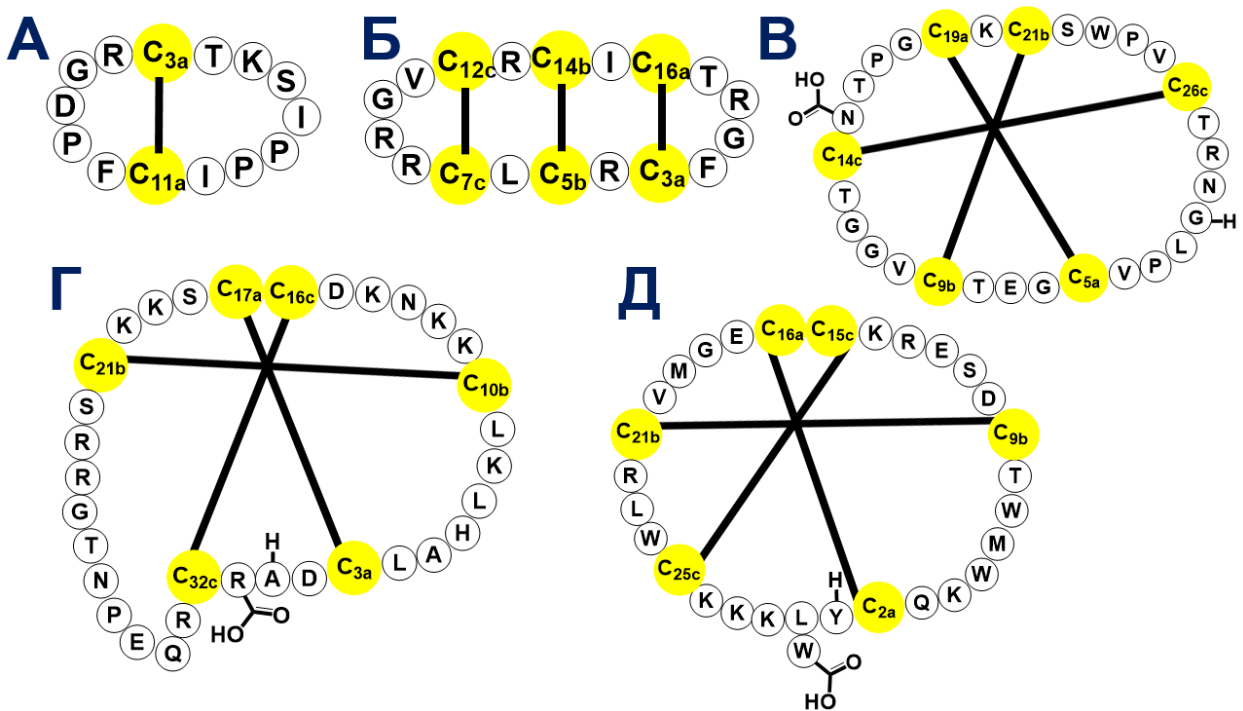
В *периферических нервных тканях и мозге* синтезируется нейропептид, названный **кальцитонин ген родственным пептидом (CGRP)**, поскольку он является продуктом экспрессии того же гена, что и кальцитонин, и образуется путем альтернативного сплайсинга этого гена. CGRP состоит из 37 аминокислот с одной S-S связью, является сильным вазодилататором и регулирует тонус кардиальных сосудов [49–50]. Современные исследования показали, что CGRP участвует в мобилизации стволовых клеток. У людей с такими заболеваниями, как сердечная недостаточность, мигрень, сепсис и гипертония, наблюдается повышенный уровень CGRP [51]. В недавних исследованиях показана связь между CGRP и возникновением неприятных воспоминаний и чувства страха [52].

### 1.3.2. ПЕПТИДЫ С S-S СВЯЗЯМИ В РАСТЕНИЯХ

В растениях различных видов синтезируется удивительное разнообразие биологически активных соединений, в том числе пептидов с одним или несколькими дисульфидными мостиками (Таблица 2). Так, **ингибитор трипсина подсолнечника-1 (SFTI-1)**, выделенный из *семян* этого растения, является одним из самых коротких и самых сильных ингибиторов сериновой протеазы трипсина второго типа. SFTI-1 – это кольцевой пептид, который состоит из 14 а.о. и представляет собой две антипараллельные  $\beta$ -цепи, соединённые S-S связью (Рисунок 3) [53, 54]. Дисульфидная связь делит молекулу пептида на две петли, одна из которых является функциональной, ингибирующей трипсин, вторая петля является нефункциональной (Рисунок 3).

Другим примером являются **тионины**, состоящие из 45–48 аминокислотных остатков с 3–4 S-S связями и подавляющим большинством основных аминокислот аргинина и лизина в составе молекулы [55]. Их подразделяют на пять различных классов в зависимости от места локализации дисульфидной связи (Таблица 2). Около 100 уникальных последовательностей тионина были выделены более чем из 15 видов растений [55].  $\alpha/\beta$  и  $\gamma$  тионины являются составляющей частью защитной системы организма растений и проявляют антибактериальные свойства против грамотрицательных и грамположительных бактерий [56], оказывают токсическое действие на патогены различной природы, что открывает возможности их применения при создании новых противомикробных и противораковых препаратов [57].

Другим большим семейством пептидов растительного происхождения являются **циклотиды** [58–61], идентифицированные в семействах *злаковых (Poaceae)*, *фиалковых (Violaceae)*, *мареновых (Rubiaceae)*, *бобовых (Fabaceae)*, *паслёновых (Solanaceae)* и *тыквенных (Cucurbitaceae)* растений.



**Рисунок 3.** Последовательности и структурные мотивы трёх семейств пептидов с дисульфидными связями.

Жёлтым цветом выделены остатки цистеина.

Нижний индекс указывает на остатки цистеина, связанные S-S мостиком.

А: Ингибитор трипсина подсолнечника – SFTI-1; Б:  $\theta$ -Дефенсин-1 (RTD-1);

В, Г, Д – ингибиторы цистинового узла (ICK)

(С – KalataB1; D – Imperacalcin A; E – Протоксин II).

Циклотиды состоят из 28–37 а.о. с тремя перекрёстными дисульфидными связями, которые образуют структурный мотив, получивший название циклического цистинового

узла (ССК). ССК отвечает за исключительную термическую, химическую и протеолитическую стабильность этих пептидов [58–61]. Естественной функцией циклотидов является их инсектицидная активность. На базе этих пептидов в настоящее время разработан коммерчески доступный биопестицидный спрей «Sero X» для хлопковых культур [58].

Другим 35-членным пептидом, который содержит три перекрестные дисульфидные связи и относится к группе пептидов – ингибиторов цистинового узла (ICK) (Рисунок 3), является **гурмарин**. Он был выделен из многолетней древесной лианы *Gymnema sylvestre* [62], представляющий семейство *Apocynaceae*. Гурмарин подавляет сладкий вкус на рецепторах грызунов, используется в аюрведической медицине. Было показано, что листья и корень *Gymnema sylvestre* использовались для лечения диабета и ожирения, и часть этого эффекта вызывается действием гурмарина вместе со смесью других соединений, содержащихся в этом растении [61]. В недавних работах 2022 года было показано, что гурмарин ингибирует образование биоплёнки возбудителем госпитальных инфекций – золотистым стафилококком *Staphylococcus aureus* [63], – что может помочь в преодолении антибиотикорезистентности.

Структура цистинового узла обнаружена в довольно большом количестве секретлируемых пептидов и белков. В пептидах с цистиновым узлом три дисульфидные связи расположены таким образом, что одна S-S-связь проходит через кольцо, образованное двумя другими S-S-мостиками и соединяющим пептидным остовом. В зависимости от топологии дисульфидных связей в белковых и пептидных молекулах различают два типа цистинового узла: циклический цистиновый узел (ССК), который присутствует в семействе циклотидов и ингибитор цистинового узла (ICK). Структурный мотив цистинового узла ICK (Рисунок 3) характерен не только для циклотидов и гурмарина, содержащихся в растениях, но и для многих других пептидов, выделенных из секретов пауков и скорпионов (кальцины), обладающих нейро- и кардиотоксичностью и оказывающих влияние на функционирование потенциалзависимых ионных каналов в клетках нервной и сердечно-сосудистой системы человека и животных.

### 1.3.3. ПЕПТИДЫ С S-S СВЯЗЯМИ В ОРГАНИЗМЕ ПАУКОВ

Большинство исследованных к настоящему времени пептидов с дисульфидными мостиками, выделенных из организма пауков, содержат структурный мотив ICK. Это одна из самых больших групп пептидных токсинов с топологией S-S связей, характерной для ингибитора цистинового узла [64–97]. Данные соединения состоят из 29–44 а.о. с тремя

дисульфидными связями (Таблица 2). Все они являются селективными лигандами различных подтипов ионных каналов. К примеру, **протоксин II** (ProTx-II) [73, 74] – выделенный из яда *перуанского зелёного тарантула* *Thrixopelma pruriens*, является мощным селективным ингибитором натриевых каналов Nav1.7, действующим в концентрациях, близких к 1 нМ [73, 74].

Два нейротоксина из яда *тринидадского тарантула* *Psalmopoeus cambridgei* – **ваниллотоксин** (VaTx 1–3) [96, 97] и **псалмотоксин** (PcTx1) [94, 95] также содержат в молекуле структурный мотив ИСК. Интересно, что эти пептиды действуют на разные фармакологические мишени. Все три типа ваниллотоксина являются агонистами неселективного катионного канала TRPV1, а типы VaTx1 и VaTx2 – антагонистами для калиевых K<sub>v</sub>2 каналов [96, 97]. В то время как PcTx1 же действует на различные виды кислотно-чувствительных ионных каналов, также псалмотоксин является селективным ингибитором ASIC1a/28 [94, 95]. Он может как ингибировать, так и потенцировать ASIC1a/2a [94, 95]. Данный кислотно-чувствительный ионный канал является перспективной мишенью при разработке новых препаратов для терапии сердечно-сосудистых заболеваний, о чём будет описано в подразделе 1.6.7.

В плане разработки современных антибиотиков интересна группа пептидов, обладающих **антимикробной активностью**. Эти пептиды, выделенные из различных многоклеточных организмов, являются ключевыми компонентами их врожденной иммунной системы и действуют как «первая линия защиты» хозяина от вторжения патогенов. В наши дни интенсивное использование антибиотиков сопровождается быстрым появлением и распространением устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий. Ежегодно в мире около 700 000 человек погибают от микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью, в частности, от возбудителей внутрибольничных инфекций.

Антимикробные пептиды (АМП) обладают мощным противомикробным действием широкого спектра, слабо стимулируют развитие лекарственной резистентности, благодаря чему дают надежду в плане профилактики и контроля бактериальных инфекций с множественной лекарственной устойчивостью. Как правило, АМП обладают сродством к компонентам клеточных стенок бактерий и грибов и результатом их действия является нарушение барьерной функции клеточной мембраны патогенов. Циклические пептиды с одним или несколькими дисульфидными мостиками, рассмотренные ниже, вероятно, образуют более устойчивую пространственную структуру, чем линейная форма, и обладают повышенной метаболической стабильностью.

Так, из гемоцитов *бразильского наука-птицеда* *Acanthoscurria gomesiana* [98–102] был выделен антимикробный пептид **ГОМЕЗИН** (Gm), который не относится к группе

паучьих токсинов ИСК (Рисунок 3). Он имеет в водном растворе, судя по данным спектроскопии ЯМР, пространственную структуру  $\beta$ -шпильки, которая близка к пространственной структуре Тахиплезинов и Полифемузинов, речь о которых пойдет ниже [99–101]. Спектр биологической активности Gm огромен. Его мишенью является липидный компонент клеточной мембраны бактериальной или опухолевой клетки. Он проявляет антимикробную активность против грамотрицательных и грамположительных бактерий, простейших паразитов рода *Plasmodium*, а также дрожжевых и нитчатых грибов [99–101]. Гомезин, действуя в синергизме с известным противогрибковым препаратом Флуконазолом, повышает его эффективность [100]. Пептид Gm также обладает противоопухолевой активностью в отношении метастатических клеток меланомы, нейробластомы, опухолей молочной железы и толстого кишечника [102].

#### 1.3.4. ПЕПТИДЫ С S-S СВЯЗЯМИ В ОРГАНИЗМЕ АМФИБИЙ (ЗЕМНОВОДНЫХ)

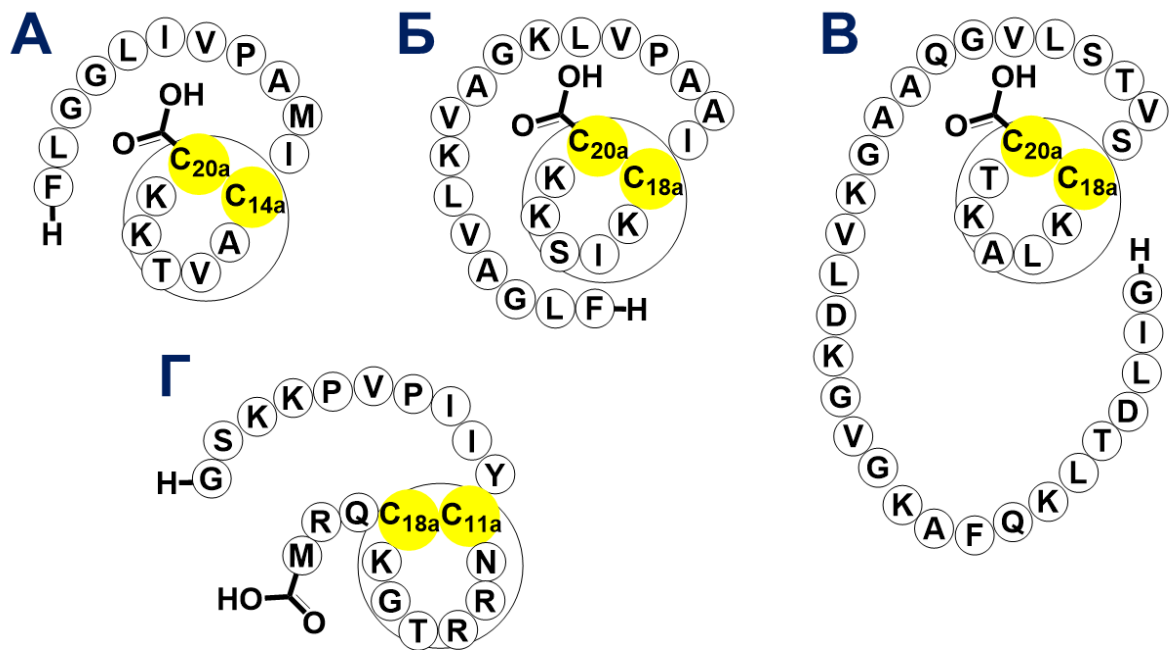
В разделе 1.3.1. мы рассматривали ингибитор трипсина подсолнечника **SFTI-1** (Рисунок 3). Гексапептидный мотив TKSIPP функциональной петли SFTI-1 консервативно повторяется в последовательностях пептидов семейства **ранациклинов (RaNc)**, полученных из кожных выделений 5 видов лягушек семейства *Ranidae* [103, 104]. Эти пептиды состоят из 17–20 аминокислот с длиной функциональной петли в 11 а.о. и являются бифункциональными соединениям, обладающими как трипсин-ингибирующей, так и антимикробной активностью. Ранациклины являются защитными молекулами в коже амфибий *Ranidae* и проявляют противомикробное действие против различных бактерий и грибов [103, 104]. Ранациклины относятся к семейству  $\beta$ -шпилечных АМП, стабилизированных одной дисульфидной связью [103, 104].

К этой же группе АМП относятся **тигеринины (TGN)**, выделенные из кожи пресноводной *тигровой индийской лягушки Rana tigerina* [106, 107], и тигеринин-подобные пептиды, выделенные из кожи *лягушек Fejervarya cancrivora* [108] и *Hoplobatrachus rugulosus* [109], обитающих в соленой воде. Тигеринины представляют собой 11–12 членные пептиды с одним дисульфидным мостиком, который замкнут с образованием 9-членного цикла [106–109]. Все пептиды этого семейства проявляют антимикробную активность. Помимо этого, TGN1 в микромолярных концентрациях проявляет цитотоксические свойства в отношении опухолевых клеток линий A549, MCF-7, HepG2 и PC3 [106, 107], а Tigerinin-1R обладает способностью стимулировать высвобождение инсулина как *in vitro*, так и *in vivo*. Tigerinin-1R вызывает деполяризацию



мембраны и увеличивает концентрацию внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы, что приводит к стимуляции выброса инсулина [109].

Хотелось бы выделить единственный антитромбоцитарный 15-членный пептид **ZDPI** с одним S-S мостиком, выделенный из амфибии (*лягушки Amolops loloensis*) [105]. По своей первичной структуре этот пептид можно отнести к семейству ранацелинов. Из кожных секретов лягушек семейства *Ranidae*, кроме ранацелинов, были выделены пептиды **раналексин** [110], **бревенин -1GHa** [111] и **гаегурин** [112], состоящие из 20, 24 и 37 аминокислотных остатков соответственно (Рисунок 4), обладающие антимикробной активностью против грамположительных и грамотрицательных бактерий [110–112].



**Рисунок 4.** Первичная структура пептидов:  
А – Раналексина, Б – Бревенина – 1GHa, В – Гаегурина, Г – Танатина.  
Жёлтым цветом выделены остатки цистеина,  
между которыми образован дисульфидный цикл.

Эти пептиды имеют в своей структуре одну дисульфидную связь, образуют семичленный цикл и близки по своей первичной и вторичной структуре пептиду **Танатину (ТНА)** (Рисунок 4), выделенному из гемолимфы *клопа-щитника Podisus maculiventris*.

### 1.3.5. ПЕПТИД ТАНАТИН С S-S СВЯЗЬЮ В ОРГАНИЗМЕ КЛОПА-ЩИТНИКА *PODISUS MACULIVENTRIS*

ТНА обладает активностью против грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также противогрибковой активностью при концентрациях  $<5$  мкМ [113]. Кроме того, Танатин активен в отношении ряда бактерий с множественной лекарственной



устойчивостью, в том числе антибиотикоустойчивых штаммов *Enterobacter aerogenes* и *Klebsiella pneumoniae* [113]. Способность ТНА эффективно подавлять рост различных фитопатогенных грибов широко используется для функционализации поверхности сельскохозяйственных культур с целью контроля их заболеваний [114, 115]. К примеру, обработка листьев сои конъюгатом eGFP-ТНА (зеленый флуоресцентный белок (eGFP)), предотвращает прорастание спор гриба *Phakopsora pachyrhizi* – возбудителя опасного заболевания ржавчины азиатской сои [114]. Кроме того, танатин может разрушать целостность мембраны и изменять морфологию гиф гриба *G. citri-aurantii* – возбудителя заболевания citrusовых, известного как «кислая гниль» [115].

### 1.3.6. ПЕПТИДЫ С S-S СВЯЗЯМИ В ОРГАНИЗМЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

12-членный антимикробный пептид **бактеницин**, выделенный *из нейтрофилов крупного рогатого скота* [116, 117], структурно близок к АМП тигерину, рассмотренному в разделе 1.3.3. Изоформа этого пептида – **OaVac** – была обнаружена у домашней *овцы Ovis aries* [118]. Эти пептиды не обладают регуляторной активностью, однако оказывают токсическое действие на разнообразные грамотрицательные и грамположительные бактерии [116–118]. Довольно большое разнообразие пептидов с S-S мостиком присутствует в тканях позвоночных и беспозвоночных животных.

Из *клеток костного мозга и лейкоцитов свиней* было выделено семейство антимикробных пептидов **протегринов (PG 1–5)**, состоящих из 16–18 а.о. с двумя S-S связями [119, 120]. Эти пептиды обладают антибактериальной активностью, ингибируют рост кишечной палочки *E. coli*, золотистого стафилококка (*S. aureus*) и грибковых микроорганизмов *C. albicans*, при повышенном содержании которых в организме может возникать молочница [119, 120]. Протегрины 1–5 похожи по структуре с АМП тахиплезинами (ТР) и полифемузинами (РМ), выделенными из различных видов крабов. Протегрины, тахиплезины и полифемузины могут подавлять репликацию ВИЧ [119].

### 1.3.7. ПЕПТИДЫ С S-S СВЯЗЯМИ В ОРГАНИЗМЕ ВОДНЫХ ОБИТАТЕЛЕЙ

17-членные пептиды **тахиплезины (ТР)** были выделены из *японского подковообразного краба Tachy pleus tridentatus* – [121], а из *американского подковообразного краба Limulus polyphemus* были выделены 18-членные пептиды – **полифемузины (РМ)** [122]. Эти катионные пептиды, также содержащие две дисульфидные связи в своей структуре, подавляют рост различных видов бактерий [121, 122]. Кроме того,

показана способность РМ и ТР ингибировать репликацию вирусов гриппа А и ВИЧ [123], а также проявлять противоопухолевые эффекты [124, 125].

Рассмотрим группу антимикробных пептидов **ареницинов (Aren)**, выделенных из целомоцитов *морского пескожила Arenicola marina* [126–132]. К настоящему времени идентифицировано три изоформы Aren 1–2, состоящих из 21 а.о. и обладающих уникальной петлевой структурой из 18 аминокислот, созданной одной S-S связью [126, 127]. Первичная структура Aren-1 и Aren-2 практически идентична, отличие лишь в одной аминокислоте внутри цикла (V заменён на I) [126, 127]. Ареницин-3 (NZ17000) также состоит из 21 аминокислоты, однако имеет две S-S связи и большое различие в аминокислотной последовательности [128, 129].

Секрета ареницинов играет важную роль в защитной системе пескожилов: эти пептиды проявляют мощную активность против грамотрицательных и грамположительных бактерий, патогенных дрожжей и грибов с мембраноактивным механизмом действия [130]. Интересно отметить, что ареницин-3 (NZ17000) был запатентован датской фармацевтической компанией Adenium Biotech, т.к. показал активность против широкого спектра штаммов бактерий с множественной лекарственной устойчивостью [131]. А другой аналог ареницина-3 (NZ17074) проходит доклинические исследования как возможный препарат, действующий на грамотрицательные бактерии, которые также обладают множественной лекарственной устойчивостью [132].

Кроме описанных выше ТР, РМ, Aren, являющихся АМП, морские организмы производят широкий спектр биологически активных пептидов и пептидных токсинов. Наиболее изученными представителями таких соединений являются **конотоксины (Conotoxins – CTxs)**, вырабатываемые *хищными морскими брюхоногими моллюсками из семейства Conus* [133–135]. В мире обитает около 700 видов таких улиток-конусов, и яд каждого вида обладает уникальным молекулярным составом, в котором присутствует более 1000 пептидов, а по различным оценкам учёных могут быть открыты более 500 000 конотоксинов [133]. Эти пептидные токсины состоят из 10–50 а.о. и содержат, как правило, 3 дисульфидные связи [134]. В зависимости от их активности и селективности их подразделяют на различные виды.

Благодаря своей высокой специфичности к различным важным физиологическим мишеням, таким как никотиновые рецепторы и различные типы ионных каналов, конотоксины проявляют широкий спектр биологической активности [133–136]. На основе остова конотоксинов создан пептидный препарат Зиконотид («Prialt»), который применяется у больных раком и СПИДом для ослабления хронических нейропатических болей, которые нельзя облегчить опиатами [23, 137].

При современных исследованиях *грибовидного коралла Heliofungia actiniformis*, а именно экстракта его щупалец, удалось охарактеризовать небольшой 12-членный пептид всего лишь с одной дисульфидной связью – **hact-1** [138]. Интересно то, что он оказывает ограниченное влияние на мононуклеарные клетки периферической крови человека [138]. Однако функция этого пептида в организме коралла остаётся вопросом для дальнейших исследований [138].

Из *тканей пиявки Macrobdella decora* был выделен 39-членный пептид **декорсин** с тремя дисульфидными связями, содержащий последовательность RGD. Он является мощным ингибитором агрегации тромбоцитов в наномолярных концентрациях [139, 140].

Из *морского анемона Stichodactyla helianthus* был выделен пептид, состоящий из 35 аминокислотных остатков, который получил название **stichodactyla (Shk)** [141, 142]. Он является одним из наиболее сильных блокаторов калиевых каналов Kv1.3 в пикомолярных концентрациях [141, 142]. На его основе разрабатываются инновационные аналоги, проходящие клинические испытания, которые будут рассмотрены в подразделе 1.6.1. **Shk** относится к подсемейству 3 типа калиотоксина ( $\alpha$ -КТХ-3).

### 1.3.8. ПЕПТИДЫ С S-S СВЯЗЯМИ В ОРГАНИЗМЕ ЗМЕЙ И СКОРПИОНОВ

В ядах скорпионов присутствует огромное количество пептидных токсинов различной структуры, которые насчитывают от 23 до 64 а.о. и имеют 3 – 4 S-S мостика в молекуле (Таблица 2) [143–165]. Одним из самых обширных семейств пептидных токсинов скорпионов является семейство **калиотоксинов (КТХ)** [143–154]. Соединения этого семейства являются высокоселективными ингибиторами различных подтипов калиевых  $K_v$  ионных каналов, действуют в нано- и пикомолярных концентрациях, и исследуются в качестве кандидатов для терапии аутоиммунных, сердечно-сосудистых и неврологических заболеваний [143–154].

В яде скорпионов также присутствуют пептиды семейства **кальцинов (Calcins)**, обладающие структурным мотивом ИСК [155–159], характерным для токсинов пауков, рассмотренных в разделе 1.3.3. и циклотидов, рассмотренных в разделе 1.3.2. (Рисунок 3). Кальцины являются высокоаффинными агонистами к риадиноновым рецепторам (RyRs) и рассматриваются как перспективные молекулы для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [155–159].

Одним из наиболее известных пептидов скорпионов является 36-членный **хлоротоксин (Chlorotoxin – CTX)** с четырьмя S-S мостиками, выделенный из яда *израильского скорпиона Leiurus quinquestratus*. Являясь высокоаффинным блокатором

хлоридных каналов и лигандом матриксной металлопротеиназы-2 (MMP2), он изучается в качестве потенциального лекарства против тех видов рака, для которых характерна сверхэкспрессия MMP2 [160–162].

В 2013 году из *яда бразильского скорпиона *Tityus serrulatus** был выделен первый натрийуретический пептид – **TsNP** [163], действующий на натрийуретические рецепторы типа В и С (NPR-B, NPR-C), который состоит из 21 а.о. с одним S-S мостиком (Рисунок 2) [163].

Одной из самых больших групп токсинов с дисульфидной связью являются натрийуретические пептиды змей [166–172], которые структурно схожи с натрийуретическими пептидами человека ANP, BNP и CNP [166–172], рассмотренными ранее в разделе 1.3.1. (Рисунок 2). Благодаря натрийуретическим токсинам рептилии охотятся и самообороняются. При попадании этих пептидов в организм жертвы или врага рептилии у них происходит быстрая гипотензия и потеря сознания [166–172]. **Натрийуретические пептиды змей (DNP, TNP, PNP и др.)** (Таблица 2) состоят из 33 – 40 а.о. (Рисунок 2) и являются лигандами натрийуретических рецепторов (NPR-A, NPR-B или NPR-C). Они проявляют сосудистые эффекты, кардиоразгружающее, натрийуретическое и мочегонное действие [166–172].

Из ядов змей выделены также пептиды с другим спектром биологической активности. К примеру, из *яда южноафриканской гремучей змеи *Crotalus durissus terrificus** выделены **кротамин** и **кротальфин**, проявляющие анальгетические свойства за счёт активации различных мишеней (Таблица 2) [173–178].

**В яде израильской кротовой гадюки *Atractaspis engaddensis*** найдены **сарафотоксины (SRTX)**, содержащие 21 а.о. и два S-S мостика [179, 180]. Эти пептиды имеют структурное и функциональное сходство с эндотелинами, рассмотренными в разделе 1.3.1. При попадании SRTX в кровь жертвы наблюдается серьёзный коронаророспазм [179, 180] (Таблица 2).

Из *яда *Naja cobra** выделен 62-членный  $\alpha$ -кобротоксин ( $\alpha$ -cobrotoxin) с 4 S-S связями, который разрабатывается в качестве потенциального лекарственного препарата против бокового амиотрофического склероза (болезнь Шарко), герпесно-вирусной и ВИЧ-инфекций [5, 181, 182].

### 1.3.9. ПЕПТИДЫ С S-S СВЯЗЯМИ В ОРГАНИЗМЕ КРЫЛАТЫХ НАСЕКОМЫХ

Отдельно хотелось бы рассмотреть ряд пептидных токсинов с дисульфидной связью, выделяемых крылатыми насекомыми.

Так, пептид **апамин**, выделенный из *яда пчелы Apismellifera*, состоит из 18 а.о., содержит две дисульфидных связи в молекуле, является одним из самых маленьких нейротоксинов природного происхождения, ингибитором  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$  каналов и обладает огромным спектром физиологической активности [183]. Показаны фармакологические свойства Апамина при таких заболеваниях, как фиброз печени, болезни Альцгеймера и Паркинсона, сердечная недостаточность, нейрофиброматоз, атопический дерматит [183–185], при подавлении сигнального пути NF- $\kappa$ B наблюдается ингибирование апоптоза макрофагов [184, 185].

Помимо апамина в ядах *пчелы Apismellifera* и *шмеля Megabombus pennsylvanicus* содержится **пептид, дегранулирующий тучные клетки (MCD peptide)**. В низких дозах этот пептид высвобождает гистамин и стимулирует дегрануляцию тучных клеток, в высоких дозах обладает противовоспалительным эффектом и может применяться при аллергии и ревматических заболеваниях [186, 187].

Из слюнной железы *песчаной мухи Lutzomyia longipalpis* был выделен 61-членный полипептид **максадилан (Мах)**, имеющий в своей структуре две дисульфидные связи, [188, 189]. Сам максадилан является природным противоядием во время развития гемостатических процессов, когда насекомое получает «blood meal» [189]. Также он является одним из иммуномодулирующих компонентов слюны этой мухи и способствует передаче и распространению лейшманиоза – заболевания, переносимого данными насекомыми, которое приводит к частой смертности [190]. В зависимости от среды обитания и различных популяций *Lutzomyia longipalpis* структура максадиланов варьируется, но имеет сходные структурные мотивы [189].

Стоит отметить, что Мах являются агонистами рецептора PAC1 [188, 191, 192] и вазодилаторами [188, 192], проявляют активность, индуцирующую IL-6 [189, 192]. Кроме того, на основе Максацилана и аналогов создаётся вакцина против лейшманиоза [189], высокоэффективные препараты для лечения мигрени [188, 191] и диагностические средства для ядерной медицины [193].

В отличие от вышеописанных пептидов, пептиды **дефенсины (Def)** экспрессируются в различных формах жизни: в *растениях, насекомых, птицах и млекопитающих, включая человека* [194–196]. Дефенсины являются одними из врождённых иммунных факторов в нейтрофилах и эпителиальных клетках, экспрессируясь в слизистых оболочках лёгких, кишечника и урогенитальных органов [197, 198]. Кроме того, исследования показали, что дефенсины млекопитающих регулируют не только врождённый, но и приобретённый иммунный ответ [194]. Def могут подавлять распространение вирусов, патогенных бактерий и грибов [194–199]. Увеличение

экспрессии дефенсинов коррелирует с ингибированием бактериальной РНК, ДНК, синтеза бактериальных белков и со снижением жизнеспособности бактерий [199]. Структура этих пептидов многообразна. Так, у млекопитающих Def обычно подразделяют на три структурные группы:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\theta$ - дефенсины, состоящие из 18–45 а.о. с тремя S-S связями [194].

Наиболее исследованными являются  $\alpha$ - и  $\beta$ -дефенсины. Между собой они отличаются локализацией дисульфидных связей и химической структурой [194]. Недавно обнаруженное семейство  $\theta$ -дефенсинов поражает спектром фармакологической активности [198, 199]. Они проявляют антимикробную, противовирусную, антиоксидантную и иммуномодулирующую активность, а также оказывают микробицидное действие [198, 199].

## ПЕПТИДЫ С ДИСУЛЬФИДНЫМИ СВЯЗЯМИ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ

Название пептида	Структура***	Кол-во а.о.	Локализация	Молекулярная мишень и класс лиганда	Функция	Ссылка
<b>Регуляторные пептиды в организме человека</b>						
<b>Инсулин</b>	<p style="text-align: center;">А цепь H-GIVEQ<sub>cyclo</sub>(C<sub>6</sub>C<sub>7a</sub>TSIC<sub>11</sub>)SLYQLENYC<sub>20b</sub> N-OH Б цепь H-FVNQHLC<sub>7a</sub>GSHLVEALYLVC<sub>19b</sub>GERGFFYTPLT-OH</p>	51	β-клетки островков Лангерганса поджелудочной железы	Природный лиганд инсулиновых рецепторов (IR) – рецепторов тирозинкиназы	Регуляция содержания глюкозы в различных органах	[24, 25, 31, 32]
<b>Амилин</b>	H-K <sub>cyclo</sub> (C <sub>2</sub> NTATC <sub>7</sub> )ATQRLANFLVHSSNFGPILPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub>	37	β-клетки островков Лангерганса поджелудочной железы	Природный лиганд рецепторов кальцитонина (CTR)	Контроль действия инсулина и глюкагона; Регуляция уровня сахара	[33, 34]
<b>Соматостатин</b>	H-SANSNPAMAPRERKAG <sub>cyclo</sub> (C <sub>17</sub> KNFFWKFTFTSC <sub>28</sub> )-OH	28	Головной и спинной мозг, гипоталамус, δ-клетки островков Лангерганса	Природный лиганд соматостатиновых рецепторов (sstr 1-5)	Ингибирование секреции гормона роста, (GH), глюкагона, инсулина, гастрин	[35-37]
<b>Окситоцин</b>	H-cyclo(C <sub>1</sub> YIQNC <sub>6</sub> )PLG-NH <sub>2</sub>	9	Гипоталамус	Природный лиганд окситоциновых рецепторов (OTR)	Роды и лактация	[38-42]
<b>Вазопрессин</b>	H-cyclo(C <sub>1</sub> YFQNC <sub>6</sub> )PR/KG-NH <sub>2</sub>	9		Агонист вазопрессиновых рецепторов (V <sub>1-2</sub> R)	Регуляция водно-солевого баланса и артериаль-	

					ного давления	
<b>Натрийуретические пептиды</b>	ANP: H-SLRRSS <sub>cyclo</sub> (C <sub>7</sub> FGGRMERIGAQSGGLGC <sub>23</sub> ) NSFRY-OH BNP: H-SPKMQGSG <sub>cyclo</sub> (C <sub>10</sub> FGRKMERISSSSGLGC <sub>26</sub> ) KVLRRH-OH CNP: H-GLSKG <sub>cyclo</sub> (C <sub>6</sub> FGLKLERIGSMSGLGC <sub>22</sub> )-OH	22-38	ANPBNP – Эндокринные клетки предсердий и желудочков; CNP – ЦНС, сосудистая система, кости	Природные лиганды натрийуретических рецепторов А, В и С	Поддержание натриевого и водного гомеостаза почек, вазодилаторный эффект	[6]
<b>Эндотелины</b>	Эндотелин 1: H-C <sub>1a</sub> SC <sub>3b</sub> SSLMDKEC <sub>11b</sub> VYFC <sub>15a</sub> HLDIIW-OH Эндотелин 2: H-C <sub>1a</sub> SC <sub>3b</sub> SSWLDKEC <sub>11b</sub> VYFC <sub>15a</sub> HLDIIW-OH Эндотелин 3: H-C <sub>1a</sub> TC <sub>3b</sub> FTYKDKEC <sub>11b</sub> VYYC <sub>15a</sub> HLDIIW-OH	21	Эндотелиальные клетки	Природные лиганды рецепторов эндотелина (E <sub>T</sub> A,B,C)	Сосудосуживающий эффект;	[7]
<b>Гуанилин</b>	H-SHTC <sub>4a</sub> EIC <sub>7b</sub> AFAAC <sub>12a</sub> AGC <sub>15b</sub> -OH	15	Слизистая оболочка кишечника	Природные лиганды рецептора агуанилилциклазы С (GC-C)	Регуляция секреции кишечной жидкости и электролитов	[46, 47]
<b>Урогуанилин</b>	H-QEDC <sub>4a</sub> ELC <sub>7b</sub> INVAC <sub>12a</sub> TGC <sub>15b</sub> -OH					
<b>Кальцитонин</b>	H-cyclo(C <sub>1</sub> GNLSTC <sub>7</sub> )MLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGGAP-NH <sub>2</sub>	32	С-клетки щитовидной железы	Природный лиганд рецептора кальцитонина (CTR)	Регуляция уровня кальция	[48]
<b>Ген-кальцитониновый пептид (CGRP)</b>	αCGRP: H-Acyclo(C <sub>2</sub> DTATC <sub>7</sub> )VTHRLAGLLSRSGGVVKNFVPTNVGSKAF-NH <sub>2</sub> βCGRP: H-Acyclo(C <sub>2</sub> DTATC <sub>7</sub> )VTHRLAGLLSRSGGMVKNFVPTNVGSKAF-NH <sub>2</sub>	37	Нервные ткани и клетки мозга	Природный лиганд рецептора родственному кальцитонину (CLR)	Сосудорасширяющий эффект	[49-52]
<b>Биологически активные пептиды в организме растений</b>						
<b>Тионины</b>	β-Пуруотионин: (PDB шифр 1BHP) H-KSC <sub>3a</sub> C <sub>4b</sub> KSTLGRNC <sub>12c</sub> YNLC <sub>17d</sub> RARGAQKLC <sub>26d</sub> ANVC <sub>31e</sub> RC <sub>34b</sub> KLTSGLSC <sub>42a</sub> PKDFPK γ 1-Н Тионин (PDB шифр 1GPT) H-RIC <sub>3a</sub> RRRSAGFKGPC <sub>14b</sub> VSNKNC <sub>20c</sub> AQVC <sub>25d</sub> MQEGWGGG-NC <sub>35b</sub> DGPLRRC <sub>42c</sub> KC <sub>44d</sub> MRRC <sub>48a</sub>	45-48	Семейство злаковых Роасае; капуста рода Abyssinian cabbage; различные виды кустарников	Ингибитор проницаемости клеточной мембраны, за счёт связывания с отрицательно заряженными фосфолипидами,	Компоненты защитной системы хозяина; антибактериальные свойства	[55-57]



			паразитов и полупаразитов	тем самым запуская лизис клеток		
<b>Циклотиды Ингибиторы цистинового узла (ICK)</b>	Kalata B1: H-GLPVC <sub>5a</sub> GETC <sub>9b</sub> VGGTC <sub>14c</sub> NTPGC <sub>19a</sub> T <sub>20</sub> C <sub>21b</sub> SWPVC <sub>26c</sub> TRN-OH	28- 37	Семейства злаковых (Poaceae), фиалковых (Violaceae), мареновых (Rubiaceae), бобовых (Fabaceae), паслёновых (Solanaceae) тыквенных (Cucurbitaceae)	Антагонист рецептора фактора роста эндотелия сосудов-A VEGF-R 2	Антианги- огенный эффект в терапии рака	[58-61]
<b><u>Kalata B1:</u></b>	H-GLPVC <sub>5a</sub> GETC <sub>9b</sub> VGGTC <sub>14c</sub> NTPGC <sub>19a</sub> KC <sub>21b</sub> SWPVC <sub>26c</sub> TRN-OH			Иммуномоду- лятор	Рассеянный склероз	
	H-LPSFGC <sub>5a</sub> GETC <sub>9b</sub> VGGTC <sub>14c</sub> NTPGC <sub>19a</sub> KC <sub>21b</sub> SWPVC <sub>26c</sub> PPRK-OH			Антагонист рецептора брадикинина B1	Лечение хроничес- кой боли	
<b><u>Cycloviolacin O2</u></b>	H-GIPC <sub>4a</sub> GESC <sub>8b</sub> VWITPC <sub>14c</sub> ISSAIGC <sub>21a</sub> SC <sub>23b</sub> KSKVC <sub>28c</sub> YRN-OH			Селективное разрушение мембран. Содержащих фосфатидилэ- танол амин (и для самой KalataB1)	Противо- грибковая активность	
<b><u>MCoTI-II</u></b>	H-GGVC <sub>4a</sub> PKILQRC <sub>11b</sub> RRSDC <sub>17c</sub> PGAC <sub>21a</sub> IC <sub>22b</sub> RGNGYC <sub>28c</sub> GSGSD-OH			Компо- ненты защитной системы хозяина; антибакте- риальные свойства		
<b>Гурмарин Ингибитор цистинового узла (ICK)</b>	H-PyrQC <sub>3a</sub> VKKDELC <sub>10b</sub> IPYYLDC <sub>17c</sub> C <sub>18a</sub> EPLC <sub>23b</sub> KKVNWWDHKC <sub>33c</sub> IG-OH	35	Многолетняя древесная лиана Gymnema sylvestre	Клеточная мишень неизвестна	Антибакте- риальный эффект	[62, 63]
<b>Ингибитор трипсина подсолнечника-1 (SFTI-1)</b>	<i>cyclo</i> [GRC <sub>3a</sub> TKSIPPIC <sub>11a</sub> FPD]	14	Семена подсолнечника	Ингибитор сериновой протеазы трипсина второго типа	Стимули- рование иммунной и восстанов- ление сердечно- сосудистой системы	[53-54]

Биологически активные пептиды в организме пауков						
<b>Грамотоксин (GrTx) (ICK)</b>	H-DC <sub>1a</sub> VRFWGKC <sub>9b</sub> SQTSDC <sub>15c</sub> C <sub>16a</sub> PHLAC <sub>21b</sub> KSKWPRNIC <sub>30c</sub> VWDGSV-OH	36		Ингибитор P/Q- и N потенциал-зависимых Ca <sup>2+</sup> каналов	Антиаритмический эффект	[64, 65]
<b>Ханатоксин (HaTx) (ICK)</b>	H-EC <sub>2a</sub> RYLFGGC <sub>9b</sub> KTTSDC <sub>15c</sub> C <sub>16a</sub> KHLGC <sub>21b</sub> KFRDKYC <sub>28c</sub> AWDFTFE-OH	35	Чилийский розовый тарангул <i>Grammostola rosea</i>	Ингибитор и opener Kv2.1. Изучено не до конца. Ингибитор Kv4.2.(500 нМ) [85]	Увеличение секреции инсулина, которая стимулирована глюкозой [90]	[79-82]
<b>GTx1-15 (ICK)</b>	H-DC <sub>2a</sub> LGFMRKC <sub>9b</sub> IPDNDKC <sub>16c</sub> C <sub>17a</sub> RPNLVC <sub>23b</sub> SRTHKWC <sub>30c</sub> KYVF-OH	34	Паук-птицеед <i>Phrixotrichus scrofa</i> ; и <i>Grammostola rosea</i>	Ингибитор Cav3.1, Nav1.3 (0.12 мМ) и Nav1.7 (0.007 мМ)	Патологические болевые состояния; эпилепсия	[66, 67]
<b>Хайнантоксин-III (HNTX-III) (ICK)</b>	H-GC <sub>2a</sub> KGFGDSC <sub>9b</sub> TPGKNEC <sub>16c</sub> C <sub>17a</sub> PNYAC <sub>22b</sub> SSKHKWC <sub>29c</sub> KVYL-OH	33	Китайские птичьи тарангулы <i>Haplopelma hainanum</i> и <i>Haplopelma schmidtii</i>	Ингибитор hNav1.7, 1.2, 1.3.	Облегчение Воспалительной и невропатической боли	[68, 69]
<b>Хувентоксин-IV (HWTX-IV) (ICK)</b>	H-EC <sub>2a</sub> LEIFKAC <sub>9b</sub> NPSNDQC <sub>16c</sub> C <sub>17a</sub> KSSKLVC <sub>24b</sub> SRKTRWC <sub>31c</sub> KYQI-OH	35		Ингибитор hNav1.7		[70, 71]
<b>δ-Палутотоксины (ICK)</b>	δ -PaluIT1: H-GC <sub>2</sub> LGEGEKC <sub>9</sub> ADWSGPSC <sub>17</sub> C <sub>18</sub> DGFYC <sub>23</sub> SC <sub>25</sub> RSMPYC <sub>31</sub> RC <sub>33</sub> RNNS-OH δ -PaluIT2: H-ACVGDQRCASWSGPYCCDGYCSCRSMPYCRNNS-OH	37	Паук <i>Paracoelotes luctuosus</i>	Лиганд потенциал-зависимого Na <sup>+</sup> канала	Инсектицидная активность	[72]
<b>Протоксин II (ProTx-II) (ICK)</b>	H-YC <sub>2a</sub> QKWMWTC <sub>9b</sub> DSERKC <sub>15c</sub> C <sub>16a</sub> EGMVC <sub>21b</sub> RLWC <sub>25c</sub> KKKLW-OH	30	Перуанский зелёный тарангул <i>Thrixopelma pruriens</i>	Высокоселективный ингибитор Nav1.7 (1 нМ)	Нейтрализация послеоперационной боли и гипералгезии; лечение ноцицептивной боли	[73, 74]

<b>Ковалитоксины I-III (CvtxI-III) (ICK)</b>	CvtX-II: H-AC <sub>2a</sub> SRAGENC <sub>9b</sub> YKSGRC <sub>15c</sub> C <sub>16a</sub> DGLYC <sub>21b</sub> KAYVVTC <sub>28c</sub> YKP-OH	31	Голубой сингапурский тарантул <i>Coremioscenus validus</i>	Изучается	Нейротоксический эффект	[75]
<b>Гуанситоксины (GxTX-1D, GxTX-1E и GxTX-2) (ICK)</b>	GxTX-1E: H-EGEC <sub>4a</sub> GGFWWKC <sub>11b</sub> GSGKPAC <sub>18c</sub> C <sub>19a</sub> PKYVC <sub>24b</sub> SPKWGLC <sub>31c</sub> NFPMP-OH	33-36	Китайский тарантул-птицеед <i>Plesiophrictus guangxiensis</i>	Высокоаффинный ингибитор Kv2.1 (IC <sub>50</sub> 1–3 нМ)	Действие на нейрональные механизмы мозга	[76-78]
<b>Гетероскодратоксины (κ-TRTX-Hm1a и κ-TRTX-Hm2a) (ICK)</b>	κ-TRTX-Hm1a: H-EC <sub>2a</sub> RYLFGGC <sub>9b</sub> SSTSDC <sub>15c</sub> C <sub>16a</sub> KHLSC <sub>21b</sub> RSDWKYC <sub>28c</sub> AWDGTFS-OH	35	Звёздообразный тарантул <i>Heteroscodra maculata</i>	Ингибитор Kv2 и Kv4.1	Изучение структуры и действия калиевых каналов	[83, 84]
	κ-TRTX-Hm2a: H-EC <sub>2a</sub> RYFWGEC <sub>9b</sub> NDEMVC <sub>15c</sub> C <sub>16a</sub> EHLVC <sub>21b</sub> KEKWPITYKIC <sub>32c</sub> VWDRTF-OH	38		Ингибитор Kv2		
<b>Тяньлунтоксины (TLTx1, 2, 3) (ICK)</b>	TLTx1: H-AAC <sub>3a</sub> LGMFESC <sub>10b</sub> DPNNDKC <sub>17c</sub> C <sub>18a</sub> PNREC <sub>23b</sub> NRKHKWC <sub>30c</sub> KYKLW-OH TLTx2: H-DDC <sub>3a</sub> LGMFSSC <sub>10b</sub> DPKNDKC <sub>17c</sub> C <sub>18a</sub> PNRVC <sub>23b</sub> RSRDQWC <sub>30c</sub> KYKLW-OH TLTx3: H-DDC <sub>3a</sub> LGMFSSC <sub>10b</sub> DPNNDKC <sub>17c</sub> C <sub>18a</sub> PNRVC <sub>23b</sub> RNRDQWC <sub>30c</sub> KYKLW-OH	35	Тарантул-птицеед <i>Theraphosa blondi</i>	Ингибиторы Kv4; TLTx1 более селективен к Kv4.2		
<b>Гетероподатоксины (HrTx 1-3) (ICK)</b>	HrTx2: H-DDC <sub>3a</sub> GKLFSGC <sub>10b</sub> DTNADC <sub>16c</sub> C <sub>17a</sub> EGYVC <sub>22b</sub> RLWC <sub>26c</sub> KLDW-OH	30	Крабовый паук <i>Heteropoda venatoria</i>	Селективный ингибитор Kv4.2	Неврологические и сердечные патологии	[86]
<b>Фриксотоксины (PaTx1, PaTx2, PaurTx3) (ICK)</b>	PaTx1: H-YC <sub>2a</sub> QKWMWTC <sub>9b</sub> DSARKC <sub>15c</sub> C <sub>16a</sub> EGLVC <sub>21b</sub> RLWC <sub>25c</sub> KKII-OH	29	Чилийский медный тарантул <i>Phrixotrichus auratus</i>	Ингибитор Kv4.2 и Kv2.1	Изучение структуры и действия калиевых каналов	[88, 89]
	PaTx2: H-YC <sub>2a</sub> QKWMWTC <sub>9b</sub> DEERKC <sub>15c</sub> C <sub>16a</sub> EGLVC <sub>21b</sub> RLWC <sub>25c</sub> KRIINM-OH	31		Блокирует потенциал зависимые Na <sup>+</sup> каналы		
	PaurTx3: H-DC <sub>2a</sub> LGFLWKC <sub>9b</sub> NPSNDKC <sub>16c</sub> C <sub>17a</sub> RPNLVC <sub>23b</sub> SRKDKWC <sub>30c</sub> KYQI-OH	34				
<b>Строматоксин (ScTx1) (ICK)</b>	H-DC <sub>2a</sub> TRMFGAC <sub>9b</sub> RRSDC <sub>15c</sub> C <sub>16a</sub> PHLGC <sub>21b</sub> KPTSKYC <sub>28c</sub> AWDGTI-OH	34	Африканский древесный паук-птицеед <i>Stromatopelma calceatum</i>	Ингибитор Kv2.1 (IC <sub>50</sub> 12,7 нМ), Kv2.2 (IC <sub>50</sub> = 21,4 нМ), Kv4.2 (IC <sub>50</sub> 1,2 нМ) и гетеромультимерного канала Kv2.1/9.3	Сократимость гладкой мускулатуры сосудов головного мозга; участие в	[90, 91]

					восприятии кислорода миоцитами легочной артерии	
<b>Астракотоксины (δ-АСТХ) (ІСК)</b>	Робустоксин (δ-АСТХ-Аг1): H-C <sub>1a</sub> AKKRNWC <sub>8b</sub> GKNEDC <sub>14c</sub> C <sub>15a</sub> C <sub>16d</sub> PMKC <sub>20b</sub> IYAWYNQQGSC <sub>31c</sub> QTTITGLFKKC <sub>42a</sub> -OH (δ-HXTX-Mg1b): H-C <sub>1a</sub> ARKRAWC <sub>8b</sub> EKTENC <sub>14c</sub> C <sub>15a</sub> C <sub>16d</sub> PMKC <sub>20b</sub> IYAWYNGQSSC <sub>31c</sub> DHTISTIWTS <sub>42a</sub> PK-OH	42-44	Австралийский воронкообразный паук <i>Atrax robustus</i>	Замедления инактивации потенциал-зависимых Na <sub>v</sub>	Нейротоксические симптомы; летальное действие	[92, 93]
<b>Псалмотоксин (PcTx1) (ІСК)</b>	H-EDC <sub>3a</sub> PKWKGC <sub>10b</sub> VNRHGDC <sub>17c</sub> C <sub>18a</sub> EGLEC <sub>23b</sub> WKRRRSFEVC <sub>33c</sub> VPKTPKT-OH	40	Тринидатский тарантул <i>Psalmopoeus cambridgei</i>	Селективный ингибитор ASIC1a; ингибитор гетеромерных каналов ASIC1a/2b и ASIC1a/2a; (IC <sub>50</sub> <10 нМ); потенцирует ASIC1a/2a	Усиление токов в нейронах головного мозга; исследование функции кислото-чувствительных ионных каналов (ASIC)[97]; защита сетчатки глаза от окислительного стресса [98]	[94, 95]
<b>Ваниллотоксины (VaTx 1-3) (ІСК)</b>	VaTx 1: H-SEC <sub>3a</sub> RWFMGGC <sub>10b</sub> DSTLDC <sub>16c</sub> C <sub>17a</sub> KHLSC <sub>22b</sub> KMGLYYC <sub>29c</sub> AWDGTf-OH VaTx 2: H-GAC <sub>3a</sub> RWFLGGC <sub>10b</sub> KSTSDC <sub>16c</sub> C <sub>17a</sub> EHLSC <sub>22b</sub> KMGLDYC <sub>29c</sub> AWDGTf-OH VaTx 3: H-EC <sub>2a</sub> RWYLGGC <sub>9b</sub> KEDSEC <sub>15c</sub> C <sub>16a</sub> EHLQC <sub>21b</sub> HSYWEWC <sub>28c</sub> LWDGSF-OH	34-35		Агонисты неселективного катионного канала TRPV1; VaTx1 и VaTx2 – антагонисты Kv2 каналов	Воспалительная боль, вызванная активацией ионного канала TRPV1	[96, 97]
<b>Гомезин (Gm)</b>	PyE-C <sub>2a</sub> RRLC <sub>6b</sub> YKQRC <sub>11b</sub> VTYC <sub>15a</sub> RGR-NH <sub>2</sub>	18	Бразильский паук-птицеед <i>Acanthoscurria gomesiana</i>	Разрушает и проникает через липидный компонент клеточной мембраны	Антимикробная и противоопухолевая активность	[98-102]

Биологически активные пептиды в организме амфибий (земноводные)						
<b>Ранациклины (RaNc)</b>	RaNc B1: H-AALKG <sub>cyclo</sub> [C <sub>6a</sub> WTKSIPPKPC <sub>16a</sub> ]FGKR-NH <sub>2</sub> RNF: H-GAPRG <sub>cyclo</sub> [C <sub>6a</sub> WTKSYPPQPC <sub>16a</sub> ]F-NH <sub>2</sub>	17-20	Семейство лягушек Ranidae	Ингибитор сериновой протеазы; клеточная мембрана	Антимикробная, гемолитическая и цитотоксическая активность	[103, 104]
	ZDPI: H-FRG <sub>cyclo</sub> [C <sub>4a</sub> WLKNYSRPGC <sub>14a</sub> ]L-NH <sub>2</sub>	15		Ингибитор агрегации тромбоцитов	Антиромбоцитарная активность	[105]
<b>Тигеринины (TGN)</b>	TGN 1: H-F <sub>cyclo</sub> [C <sub>2a</sub> TMIPIPRC <sub>10a</sub> ]Y-NH <sub>2</sub>	11	Тигровая индийская лягушка <i>Ranatigerina</i>	Ингибитор VEGF и VEGFR 2	Противоопухольный эффект	[107]
	TGN- RC1: H-RV <sub>cyclo</sub> [C <sub>3a</sub> SAIPLPIC <sub>11a</sub> ]H-OH TGN- RC2: H-RV <sub>cyclo</sub> [C <sub>3a</sub> MAIPLPLC <sub>11a</sub> ]H-OH	12	Крабоядная лягушка <i>Fejervarya cancrivora</i>	Проницаемость через клеточную мембрану	Анти-микробное действие	[108]
	Tigerinin-1R: H-RV <sub>cyclo</sub> [C <sub>3a</sub> SAIPLPIC <sub>11a</sub> ]H-NH <sub>2</sub>		Лягушка <i>Noplobatrachus rugulosus</i>	Деполаризация мембраны и увеличение внутриклеточной концентрации Ca <sup>2+</sup>	Увеличение высвобождения инсулина и улучшение толерантности к глюкозе	[109]
<b>Раналексин</b>	H-FLGGLIKIVPAMI <sub>cyclo</sub> [C <sub>14a</sub> AVTKKC <sub>20a</sub> ]-OH	20	Семейство лягушек Ranidae	Связывание с внешним слоем цитоплазматической мембраны	Анти-микробная активность	[110]
<b>Бревинин-1GHa</b>	H-FLGAVLKVAGKLVPAAI[C <sub>18a</sub> KISKKC <sub>24a</sub> ]-OH	24				[111]
<b>Гаегурин-4</b>	H-GILDTLKQFAKGVGKDLVKGAAQGVLSV <sub>cyclo</sub> [C <sub>31a</sub> KLAKTC <sub>37a</sub> ]-OH	37				[112]
Биологически активные пептиды в организме сельскохозяйственных животных						
<b>Бактеницин (Bac)</b>	H-RL <sub>cyclo</sub> [C <sub>3a</sub> RIVVIRVC <sub>11a</sub> ]R-OH	12	Нейтрофилы крупного рогатого скота	Цитоплазматическая мембрана.	Антибактериальная активность	[116, 117]

<b>Изоформа Бактеницина (OaVac)</b>	H-RL <i>cyclo</i> [C <sub>3a</sub> RIIFLRVC <sub>11a</sub> ]R-OH		Овца <i>Ovis aries</i>	Механизм действия до конца неизвестен		[118]
<b>Протегрины (PG)</b>	PG-1: H-RGGRLC <sub>6a</sub> YC <sub>8b</sub> RRRFC <sub>13b</sub> VC <sub>15a</sub> VGR-NH <sub>2</sub> PG-2: H-RGGRLC <sub>6a</sub> YC <sub>8b</sub> RRRFC <sub>13b</sub> IC <sub>15a</sub> V-NH <sub>2</sub> PG-4: H-RGGRLC <sub>6a</sub> YC <sub>8b</sub> RGWIC <sub>13b</sub> FC <sub>15a</sub> VGR-NH <sub>2</sub>	16-18	Костный мозг и лейкоциты свиней	Связывание с липидными компонентами клеточных мембран	Антибактериальная активность и подавление репликации ВИЧ	[119, 120]
<b>Биологически активные пептиды в организме клопа и пчелы</b>						
<b>Танатин (ТНА)</b>	H-GSKKPVPIIY <i>cyclo</i> [C <sub>11a</sub> NRRTGKC <sub>18a</sub> ]QRM-OH	21	Клоп-щитник <i>Podisus maculiventris</i>	Высокая аффинность связывания с липополисахаридным (LPS) слоем цитоплазматической мембраны [123]	Антибактериальная и противогрибковая активность	[113-115]
<b>Апамин</b>	H-C <sub>1a</sub> NC <sub>3b</sub> KAPETALC <sub>11a</sub> ARRC <sub>15b</sub> QQH-NH <sub>2</sub>	18	Пчела <i>Apis mellifera</i>	Высокоселективный ингибитор КCa2 (KCa2.2 87.7 pM; KCa2.1 4.1 nM;)	Фиброз печени, болезнь Альцгеймера и Паркинсона, сердечная недостаточность; атеросклероз	[183-185]
<b>Пептид, дегранулирующий тучные клетки (MCD пептид)</b>	H-IKC <sub>3a</sub> NC <sub>5b</sub> LRHVILPHIC <sub>15a</sub> RKIC <sub>19b</sub> GKN-NH <sub>2</sub>	22				
<b>Максидилан (MAX)</b>	H-C <sub>1a</sub> DATC <sub>5a</sub> QFRKAIDDC <sub>14b</sub> QKQAHHNSVNLQTSVQTATFTSMDTSQLPGNSVFKEC <sub>51b</sub> MKQKKKEFKAGK-OH	61-63	Песчаная муха <i>Lutzomyia longipalpis</i>	Высокоселективный агонист рецептора	Вазодилаторная активность,	[188-193]

				аденилатциклазы (PAC1) (IC50 0.06нМ)	вакцина против Лейш-маниоза. Лечение Мигрени	
<b>Биологически активные пептиды в организме водных обитателей</b>						
<b>Декорсин</b>	H-APRLPQ <sub>cycto</sub> [C <sub>7a</sub> QGDDQEKC <sub>15a</sub> ]LC <sub>17b</sub> NKDEC <sub>22c</sub> PPGQC <sub>27b</sub> RFPRGDAPYC <sub>38c</sub> E-OH	39	Пиявка Macrobdella decoza	Антагонист гликопротеина интегрина Пб/Ша	Ингибирование активности к агрегации тромбоцито в (IC50 500 нМ)	[139, 140]
<b>Конотоксины (CTxs)</b>	$\alpha$ -CTxsAnIB: H-GGC <sub>3a</sub> C <sub>4b</sub> SHPAC <sub>9a</sub> AANNQDYC <sub>17b</sub> -OH $\psi$ -CTxsPrIIIА: H-AARC <sub>4a</sub> C <sub>5b</sub> TYHGSC <sub>11c</sub> LKEKC <sub>16a</sub> RRKYC <sub>17b</sub> C <sub>18c</sub> -OH	10-50	Брюхоногие морские моллюски из семейства Copus	Антагонисты Никотиновых рецепторов ( $\alpha 9\alpha 10$ , $\alpha 9\alpha 10$ , $\alpha 9\alpha 10$ , $\alpha 6\beta 2\beta 3$ , $\alpha 7$ ) и различных видов потенциал зависимых ионных каналов	Широкий спектр биологической активности, включая облегчение боли, кардиососудистые и нейродегенеративные патологии, цитотоксические эффекты	[133-136]
<b><u>Stichodactyla</u> (Shk)</b>	H-RSC3aIDTIPKSRС <sub>12b</sub> TAFQC <sub>17c</sub> KHSMKYRLSFC <sub>28b</sub> RKTC <sub>32c</sub> GTC <sub>35a</sub> -OH	35	Морской анемон Stichodactyla helianthus	Высокоселективный ингибитор Kv1.3 (11.6 pM)	Аутоиммунные заболевания; воспалительные заболевания кишечника; нейровоспалительные состояния	[141, 142]

<b>Наст-1</b>	H-Gyclo[C <sub>2a</sub> HYTPFGLIC <sub>11a</sub> ]F-OH	12	Грибовидный коралл <i>Heliofungia actiniformis</i>	Мишень неизвестна	Антибактериальная активность против морских грамотрицательных и грамположительных бактерий	[138]
<b>Тахиплезины (TP)</b>	ТPI: H-KWC <sub>3a</sub> FRVC <sub>7b</sub> YRGIC <sub>12b</sub> YRRC <sub>16a</sub> R-NH <sub>2</sub> ТPIII: H-KWC <sub>3a</sub> FRVC <sub>7b</sub> YRGIC <sub>12b</sub> YRKC <sub>16a</sub> R-NH <sub>2</sub>	17	Японский подковообразный краб <i>Tachypleus tridentatus</i>	Взаимодействие с липополисахаридным (LPS) слоем цитоплазматической мембраны Интернализация полифенузина-I к цитоплазме <i>Escherichiacoli</i>	Антибактериальная, противоопухолевая активность. Ингибирование репликации вируса гриппа А и ВИЧ	[121, 122-125]
<b>Полифемузины (PM)</b>	PM I: H-RRWC <sub>4a</sub> FRVC <sub>8b</sub> YRGFC <sub>13b</sub> YRKC <sub>17a</sub> R-NH <sub>2</sub> PM III: H-RRGC <sub>4a</sub> FRVC <sub>8b</sub> YRGFC <sub>13b</sub> FQRC <sub>17a</sub> R-NH <sub>2</sub>	18	Американский подковообразный краб <i>Limulus polyphemus</i>			[122, 123, 125]
<b>Ареницины (Aren)</b>	Aren 1: H-RWcyclo[C <sub>3a</sub> VYAYVRVIRGVLVRYRRC <sub>20a</sub> ]W-OH Aren 2: H-RWcyclo[C <sub>3a</sub> VYAYVRIRGVLVRYRRC <sub>20a</sub> ]W-OH Aren 3(NZ 17000): H-GFC <sub>3a</sub> WYVC <sub>7b</sub> VYRNGVRC <sub>16b</sub> YRRC <sub>20a</sub> N-OH NZ 17074: H-GFC <sub>3a</sub> WNVC <sub>7b</sub> VYRNGVRC <sub>16b</sub> HRRC <sub>20a</sub> N-OH	21	Морской пескожил <i>Arenicola marina</i>	Взаимодействие с мембраной и ингибирование процессов биосинтеза белка в клетке. Изучается взаимодействие с системой комплемента [149]	Антибактериальное и противогрибковое действие. Цитотоксический эффект против опухолевых клеток. Иммуномодулирующее действие.	[126-132]
<b>Биологически активные пептиды в организме скорпионов</b>						
<b>Хлоротоксин (CTX)</b>	H-MC <sub>2a</sub> MPC <sub>5b</sub> FTTDHQMARRK <sub>16c</sub> DDC <sub>19a</sub> C <sub>20d</sub> GGKGRGKC <sub>28b</sub> YGPQC <sub>33c</sub> LC <sub>35d</sub> R-OH	36	Израильский скорпион <i>Leiurus quinquestratus</i>	Высокоселективный ингибитор хлоридных каналов (ClC-3)(EC50	Противоопухолевая активность для клеток, сверхэксп-	[160-162]



				of50 nM) и матричной металлопротеи- назы-2 (MMP2)	рессиру- ющих СiС-3 и MMP2	
<b>Андроктонин (AnDr)</b>	H-RSVC <sub>4a</sub> RQIKIC <sub>10b</sub> RRRGCC <sub>16b</sub> YYKC <sub>20a</sub> TNRPY-OH	25	Скорпион Androctonus australis	Разрушает целостность мембран за счёт связывания только с отрицательно заряженными липидными визигулами на поверхности мембраны [158]	Антибакте- риальная и противо- грибковая активность	[164, 165]
<b>Калиотоксины (КТХ)</b>						
<b>Подсемейство 3 типа калиотоксинов (<math>\alpha</math>-КТХ-3)</b>						
<b>BmКТХ</b>	H-VGINVKC <sub>7a</sub> KHSGQC <sub>13b</sub> LKPC <sub>17c</sub> KDAGMRFGKC <sub>27a</sub> INGKC <sub>32b</sub> DC <sub>34a</sub> TPK-NH <sub>2</sub>	37	Скорпион Buthus martensi	Селективный ингибитор Kv1.3 (IC50 0.2 нМ)	Лечение неврологи- ческих патологий, противо- воспали- тельное действие	[143-144]
<b>OSK-1</b>	H-GVIINVKC <sub>8a</sub> KISRQC <sub>14b</sub> LEPC <sub>18c</sub> KKAGMRFGKC <sub>28a</sub> MNGKC <sub>33b</sub> HC <sub>36c</sub> TPK-OH	38	Скорпион Orthochirus scrobiculosus	Высокоселектив- ный ингибитор Kv1.3 (IC50: 14рМ) и селективный ингибитор Kv1.1: 0.6 нМ Kv1.2: 5.4 нМ КСa3.1: 225 нМ	Аутоим- мунные заболева- ния (рассе- янный склероз, диабет 1 типа и ревматоид- ный артрит)	[143, 147, 148]
<b>Подсемейство 6 типа калиотоксинов (<math>\alpha</math>-КТХ-6)</b>						
<b>HsTx1</b>	H-ASC <sub>3a</sub> RTPKDC <sub>9b</sub> ADPC <sub>13c</sub> RKETGC <sub>19d</sub> PYGKC <sub>24a</sub> MNRKC <sub>29b</sub> KC <sub>31c</sub> NRC <sub>34d</sub> -NH <sub>2</sub>	34	Скорпион Anuroctonus phaiodactylus	Высокоселектив- ный ингибитор Kv1.3 (IC50: 12 рМ)	Ауто- иммунные заболе- вания,	[149, 150]

				Ингибитор Kv1.1: (11,330 pM)	различные виды рака, сердечная аритмия, астма	
<b>Ануротоксин (AnTx)</b>	H-QKEC <sub>4a</sub> TGPQHC <sub>10b</sub> TNFC <sub>14c</sub> RKNKC <sub>19d</sub> THGKC <sub>24a</sub> MNRKC <sub>29b</sub> KC <sub>31c</sub> FNC <sub>34d</sub> K-NH <sub>2</sub>	35	Скорпион Anuroctonus phaiodactylus	Высокоселективный ингибитор Kv1.3 (IC50: 0.7 nM)		[151]
<b>Мауротоксин (MTX)</b>	H-VSC <sub>3a</sub> TGSKDC <sub>9b</sub> YAPC <sub>13c</sub> RKQTGC <sub>19c</sub> PNAKC <sub>24a</sub> INKSC <sub>29b</sub> KC <sub>31d</sub> YGC <sub>34d</sub> -NH <sub>2</sub>	34	Израильский золотистый скорпион Scorpio maurus	Высокоселективный ингибитор Kv1.2 (IC50: 0.8 нМ); Ингибитор Kv1.1: (IC50: 37нМ)	Изучается	[153, 154]
<b>Хариботоксин (CTX)</b>	H-ZFTNVSC <sub>7a</sub> TTSKEC <sub>13b</sub> WSVC <sub>17c</sub> QLHNTSRGKC <sub>28a</sub> MNKKC <sub>33b</sub> RC <sub>35c</sub> YS-OH	37	Палестинский жёлтый скорпион Leiurus quinquestriatus hebraeus	Ингибиторы инактивирующие K <sup>+</sup> каналы А типа		
<b>Пандитоксины (PiTx)</b>	PiTx-K $\alpha$ : H-TISC <sub>4a</sub> TNPKQC <sub>10b</sub> YPHC <sub>14c</sub> KKETGYRNAKC <sub>25a</sub> MNRKC <sub>30b</sub> KC <sub>32c</sub> FGR-OH PiTx-K $\beta$ : H-TISC <sub>4a</sub> TNEKQC <sub>10b</sub> YPHC <sub>14c</sub> KKETGYRNAKC <sub>25a</sub> MNRKC <sub>30b</sub> KC <sub>32c</sub> FGR-OH PiTx-K $\gamma$ : H-LVKC <sub>4a</sub> RGTSDC <sub>10b</sub> GRPC <sub>14c</sub> QQQTGC <sub>25d</sub> PNSKC <sub>30a</sub> INRMC <sub>35b</sub> KC <sub>37c</sub> YGC <sub>40d</sub> -OH	35-37	Императорский скорпион Pandinus imperator			[154]
<b>Кальцины (ICK)</b>						
<b>Imperacalcin A</b>	H-ADC <sub>3a</sub> LAHLKLC <sub>10b</sub> KKNKDC <sub>16c</sub> C <sub>17a</sub> SKKC <sub>21b</sub> SRRGTNPEQRC <sub>32c</sub> R-OH	33	Императорский скорпион Pandinus imperator	Агонисты рианодиновых рецепторов (RyRs). Способствуют Ca <sup>2+</sup> -индуцированному высвобождению ионов Ca <sup>2+</sup>	Сердечная недостаточность, болезнь Альцгеймера, злокачественная гипертермия; уменьшение кардиовас-	[155-159]
<b>Opicalcins 1 и 2</b>	1: H-GDC <sub>3a</sub> LPHLKRC <sub>10b</sub> KENNDCC <sub>16c</sub> C <sub>17a</sub> SKKC <sub>21b</sub> KRRGT(A)NPEKRC <sub>32c</sub> R-OH					
<b>Maurocalcine</b>	H-GDC <sub>3a</sub> LPHLKLC <sub>10b</sub> KENKDC <sub>16c</sub> C <sub>17a</sub> SKKC <sub>21b</sub> LRRGTNIEKRC <sub>32c</sub> R-OH		Израильский золотой скорпион Scorpio maurus			
<b>Hemicalcin</b>	H-GDC <sub>3a</sub> LPHLKLC <sub>10b</sub> KADKDC <sub>16c</sub> C <sub>17a</sub> SKKC <sub>21b</sub> LRRGTNPEKRC <sub>32c</sub> R-OH		Иранский скорпион Hemiscorpius lepturus			

<b>Vejocalcin</b>	H-ADC <sub>3a</sub> LAHLKLC <sub>10b</sub> KKNND <sub>16c</sub> C <sub>17a</sub> SKKC <sub>21b</sub> SRRGTNPEQRC <sub>32c</sub> R-OH		Мексиканский скорпион Vaejovis mexicanus		кулярных рисков	
<b>Urocalcin</b>	H-KDC <sub>3a</sub> LKKLKLC <sub>10b</sub> KENKDC <sub>16c</sub> C <sub>17a</sub> SKSC <sub>21b</sub> KRRGTNIEKRC <sub>32c</sub> R-OH					
<b>Hadrucalcin</b>	H-SEKDC <sub>5a</sub> IKHLQRC <sub>12b</sub> RENKDC <sub>18c</sub> C <sub>19a</sub> SKKC <sub>23b</sub> SRRGTNPEKRC <sub>34c</sub> R-OH	35	Песчаный скорпион Hadrurus gertsch			
<b>TsNp</b>	H-KLSG <sub>cyclo</sub> [C <sub>5a</sub> FGFKLDRIGTMSGLGC <sub>21a</sub> ]-OH	21	Бразильский скорпион Tityus serrulatus	Беспорядочное действие на NPR-B, NPR-C и GC-C (Механизм неизвестен)	Почечное действие и эффективность Воздействия на экспрессию мРНК NPRs в почках	[163]
<b>Биологически активные пептиды в организме змей</b>						
<b>Группа натрийуретических пептидов</b>						
<b>Dendroaspis natriuretic peptide (DNP)</b>	H-EVKYDP <sub>cyclo</sub> [C <sub>7a</sub> FGHKIDRINHVSNLGC <sub>23a</sub> ]PSLRDPRPNAPSTSA-OH	38	Зелёная мамба Dendroaspis angusticeps	Агонист NPR-A и NPR-C. Агонист рецепторов рGC-A и рGC-B	Сосудорасширяющее, кардиоразрушающее, натрийуретическое и мочегонное действие	[166-168]
<b>TNP пептиды</b>	TNP-a: H-SDSKIGD <sub>cyclo</sub> [C <sub>9a</sub> FGLPLDHIGSVSGLGC <sub>25a</sub> ]NRPVQNRPKK-OH TNP-b: H-SDPKIGD <sub>cyclo</sub> [C <sub>9a</sub> FGLPLDHIGSVSGLGC <sub>25a</sub> ]NRPVQNRPKK-OH TNP-c: H-SDSKIGN <sub>cyclo</sub> [C <sub>9a</sub> FGFPLDRIGSVSGLGC <sub>25a</sub> ]NRIMQNPPKKFSGE-OH	35-39	Семейство аспидов Oxurganus	TNP-сагонист рецептора GC-A; Все связывание с NPR-C (Механизм неизвестен)	Сосудистое и натрийуретическое действие	[166, 169]
<b>PtNP-a, PaNP-c, TcNP-a пептиды</b>	PtNP-a: H-SGSKIGN <sub>cyclo</sub> [C <sub>9a</sub> FGLPLDRISNTSGMGC <sub>25a</sub> ]RNPIQNRPKSTPGGS-OH PaNP-c: H-SGSKTAEIGD <sub>cyclo</sub> [C <sub>12a</sub> FGVPIDHIGSTSGMGC <sub>28a</sub> ]GRPRPKPTPGGS-OH	39-40	Семейство Elapidae	Ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (ACE)	Вазоактивные эффекты	[166, 170]

	TcNP-a: H-SGSETAKIGDG <i>cyclo</i> [C <sub>12a</sub> FGLPIDRIGSASGMGC <sub>28a</sub> ]GSVPKPTPGGS-OH					
<b>PNP пептид</b>	H-GENEPPKKKAPDG <i>cyclo</i> [C <sub>14a</sub> FGHKIDRIGSHSGLGC <sub>30a</sub> ]NKFKPGH-OH	37	Иранская ложноногатая гадюка Pseudocerastes persicus	Агонист NPR-A	Вызывает гипотензию, натрийурез и диурез	[166, 171]
<b>NP2_Casca пептид</b>	H-VSTSRGSQGC <i>cyclo</i> [C <sub>10a</sub> FGLKLDRIGAASGLGC <sub>26a</sub> ]WRRIVDS-OH	33	Гадюка Crotalus durissus cascavella	Связывание с NPR-A, NPR-B и NPR-C (Механизм изучается)	Вызывает натрийурез, диурез и вазорелаксацию, связанную с увеличением уровня NO	[166, 172]
<b>α - Кобротоксин</b>	H-LEC <sub>3a</sub> HNQSSQTPTTTC <sub>17b</sub> SGGETNC <sub>24a</sub> YKKRWRDHRGYRTERGC <sub>41b</sub> GC <sub>43c</sub> PSVKNGIEINC <sub>54c</sub> C <sub>55d</sub> TTDRCC <sub>60d</sub> NN-OH	62	Naja cobra	Блокатор никотинового ацетилхолинового рецептора (nAChR)	Амиотрофический склероз, герпесно-вирусная и ВИЧ инфекции; Яд	[5, 181, 182]
<b>Кротальфин</b>	H-EFSPEN <i>cyclo</i> [C <sub>7a</sub> QGESQPC <sub>14a</sub> ]-OH	14	Южноафриканская гремучая змея Crotalus durissus terrificus	Агонист каннабиноидного рецептора 2 типа (CB2) и k- and d-опиоидных рецепторов	Предотвращает центральное и периферическое нейровоспаление – контроль рассеянного склероза. Длительный ангиоци-	[173-175]

					цепивный эффект	
<b>Кротамин</b>	H-YKQC <sub>4a</sub> HKKGGHC <sub>11b</sub> FPKEKIC <sub>18c</sub> LPPSSDFGKMDC <sub>30b</sub> RWRWKC <sub>36a</sub> C <sub>37c</sub> KKGSG-OH	42			Нарушение целостности мембраны (Механизм изучается)	Антимикробное действие; Противоопухолевый эффект
					Фактор некроза опухоли TNF- $\alpha$ ; действие на K <sup>+</sup> Ca <sup>2+</sup> каналы (Механизм изучается)	Антиоцицептивный и противовоспалительный эффект
<b>Сарафотоксины (SRTX)</b>	SRTX 6b: H-C <sub>1a</sub> SC <sub>3b</sub> KDMTDKEC <sub>11b</sub> LYFC <sub>15a</sub> HQDVIW-OH SRTX 6c: H-C <sub>1a</sub> TC <sub>3b</sub> NDMTDEEC <sub>11b</sub> LNFC <sub>15a</sub> HQDVIW-OH	21	Израильская кротовая гадюка <i>Atractaspis engaddensis</i>	Агонисты рецепторов эндотелина ET <sub>B,A,c</sub>	Вызывают коронарospазм; SRTX 6c обладает кардиопротекторным и антиаритмическим эффектом	[173, 176-178]
<b>Дефенсины (Def)</b>	$\alpha$ -Defensin (NP-1): H-VVC <sub>3a</sub> AC <sub>5b</sub> RRALC <sub>10c</sub> LPRERRAGFC <sub>20b</sub> RIRGRIHPLC <sub>30c</sub> C <sub>31a</sub> RR-OH $\beta$ -Defensin (HBD-1): H-DHYNC <sub>5a</sub> VSSGGQC <sub>12b</sub> LYSAC <sub>17c</sub> PIFTKIQTGTC <sub>27b</sub> YRGKAKC <sub>34a</sub> C <sub>35c</sub> K-OH $\theta$ -Defensin-1 (RTD-1): <i>cyclo</i> [GFC <sub>3a</sub> RC <sub>5b</sub> LC <sub>7c</sub> RRGVC <sub>12c</sub> RC <sub>14b</sub> IC <sub>16a</sub> TR]	18-45	Все формы жизни	Нарушение целостности мембраны. Взаимодействие с ионными каналами. (Мишени и механизмы изучаются)	Антимикробная, противовоспалительная, противоопухолевая, антиоксидантная и иммуномодулирующая активность	[194-199]

\*\*\* – нижним индексом обозначены аминокислотные остатки серосодержащих аминокислот, между которыми образована S-S связь

## **1.4. ДИЗАЙН ПЕПТИДНЫХ ЛЕКАРСТВ СКВОЗЬ ПРИЗМУ S-S СВЯЗИ**

S-S мостик, являясь мультифункциональным структурным элементом, играет одну из ключевых ролей в биологических эффектах, описанных выше пептидных дисульфидных молекул в организме. Биологическая активность пептидов, описанных в главах 1.1. – 1.3., обусловлена их взаимодействием с определенными молекулярными мишенями – теми или иными клеточными рецепторами или ионными каналами в клеточной мембране.

Так, пептиды, секретируемые в организме человека, являются агонистами трансмембранных рецепторов гуанилатциклазы, тирозинкиназы и рецепторов, связанных с G-белками (GPCR). Пептиды связываются с внеклеточной частью рецептора, вызывая его конформационное изменение и приводя к активации последовательных биохимических процессов, тем самым передавая сигнал внутрь клетки [23, 200]. До сих пор не до конца изучены молекулярные мишени и сигнальные пути для биологически активных пептидов, синтезируемых растениями, организмами позвоночных и беспозвоночных животных. Однако одним из основных аспектов, которому обе группы этих пептидов обязаны своими регуляторными и многогранными биологическими свойствами, является их циклическая природа. Именно наличие одной или нескольких дисульфидных связей в их молекулах позволяет поддерживать чётко определённую трёхмерную структуру за счёт ограничения конформационной гибкости [5, 200, 201]. Учитывая основополагающий вклад дисульфидных связей в реализацию и регуляцию пространственной структуры таких пептидов, именно сохранение циклического мотива стало основой дизайна ряда современных пептидных препаратов.

Таким образом, S-S связь поддерживает и фиксирует структуру пептида в биоактивной конформации, тем самым повышая активность и селективность действия лиганда; стабилизирует его пространственную структуру; повышает устойчивость к протеазам, тем самым увеличивая стабильность в организме; помогает выяснять активную конформацию. Ниже рассмотрим эти функциональные свойства S-S мостика, проводя анализ структуры и свойств различных пептидов.

### **1.4.1. ДИСУЛЬФИДНАЯ СВЯЗЬ – ВАЖНЫЙ СТРУКТУРНЫЙ ЭЛЕМЕНТ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АКТИВНЫХ КОНФОРМАЦИЙ ПЕПТИДОВ**

Фиксация фармакофорной конформации является современным подходом лекарственного дизайна.

Конформация играет решающую роль в связывании с молекулярными мишенями. Подход, заключающийся в создании конформационных ограничений пептидной молекулы,

широко применялся при поиске активных конформаций и фармакофорных последовательностей в нативных гормонах, что помогло изучить механизмы связывания лигандов в организме [200, 202].

Показательным являются новаторские работы конца 20-го века по поиску новых аналогов гормона соматостатина [203, 204]. Путём последовательного усечения углеродного скелета молекулы с N-конца более чем в половину и выявлением функционально важных аминокислот в структуре SST в 1979 году был создан первый циклический аналог – *cyclo*(Cys-Phe-Trp-Lys-Thr-Cys), который проявил более высокую активность при ингибировании секреции гормона роста, чем нативный соматостатин [203]. Результаты этих исследований показали, что в самом нативном гормоне фармакофорной является последовательность **-Phe-Trp-Lys-Thr-** [2, 4, 203, 204] и она же отвечает за  $\beta$ -поворот пептидной цепи, что в недавних исследованиях было показано нами с помощью PCA [205]. В дальнейшем именно на основе последовательности *cyclo*(Cys-Phe-Trp-Lys-Thr-Cys) были разработаны все клинически используемые к настоящему времени препараты-аналоги SST [2, 4].

Ещё одним примером введения дисульфидной связи в качестве ограничительного элемента является нахождение активных конформаций в структуре линейного 29-членного гормона Глюкагона [206]. Поскольку эта молекула является гибкой по своей природе, для понимания конформационных требований к функционально активной структуре гормона исследователями были синтезированы аналоги глюкагона, имеющие конформационные ограничения в N-концевой части пептида, включая аналоги, ограниченные дисульфидными мостиками между различными аминокислотными остатками [206].

Так, при введении S-S связи снижалась аффинность и активность аналогов по сравнению с нативным гормоном, что говорит о созданных в результате циклизации «неправильных» конформациях, за счёт чего нарушается правильное взаимодействие с рецептором. Это наблюдение помогло определить биологически активную конформацию глюкагона, которая состоит из двух спиральных сегментов между аминокислотными остатками 1–10 и 13–29, соединённых неспиральной областью между остатками 10–13 [206]. Эти исследования стали одним из важных факторов при создании гипогликемических пептидных лекарств, проявляющих своё действие за счёт связывания с рецептором глюкагоноподобного пептида-1 (GLP1R) – Lixisenatide, Liraglutide, Exenatide, Dulaglutide, Albiglutide.

Похожие исследования были проведены для нахождения активной конформации N-концевой части гормона секретина, связанного с GPCR рецептором семейства В [207]. Была синтезирована серия аналогов секретина, конформационно-ограниченных

в N-концевой части молекулы, включением S-S мостика между определёнными аминокислотными остатками. Один из аналогов проявил активность, подобную природному секретину, что подтверждает актуальность такого ограничения для выяснения активной конформации этого гормона [207].

Интересным примером является вставка внутримолекулярного дисульфидного мостика для стабилизации специфической третичной структуры в пептидах PP, YY, NPY, входящих в семейство полипептидов поджелудочной железы [208]. Эти 36-членные пептиды структурно похожи и характеризуются наличием в молекуле так называемой PP-складки (PP-fold) – двойной спирали U-образной формы, состоящей из полипролиновой спирали типа II на участке последовательности 2–8(Pro<sup>2,5,8</sup>) и  $\alpha$ -спирали между а.о. 15–32, соединенные  $\beta$ -витком. Сродство циклических аналогов к рецепторам Y4 и Y2 мыши и человека аналогично сродству нативных линейных пептидов, что может указывать на то, что складчатая структура является активной формой, и с большей вероятностью связывается и активирует соответствующий рецептор [208].

#### **1.4.2. РОЛЬ ДИСУЛЬФИДНОЙ СВЯЗИ В СТАБИЛИЗАЦИИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ПЕПТИДОВ И ПОВЫШЕНИИ ИХ СЕЛЕКТИВНОСТИ**

Пептиды могут обладать различной структурной организацией [209]. В большинстве случаев, это вторичная структура [209, 210].  $\alpha$ -Спираль и  $\beta$ -складчатые листы являются доминирующими структурными мотивами в белках, но и в молекулах линейных пептидов, содержащих менее 20 а.о., эти вторичные структуры, как правило, не очень стабильны. Альфа и бета-структурные мотивы могут быть стабилизированы, например, путем образования макроцикла, включающего боковые цепи аминокислотных остатков и/или остов пептида. В природных пептидах «стратегия структурного укрепления» реализуется, главным образом, путем образования дисульфида между боковыми цепями остатков цистеина.

Многие пептидные лекарства были разработаны на основе концепции имитации и стабилизации структурного мотива фармакофорной последовательности [211, 212]. Как правило, этот структурный элемент в молекулах пептидных лигандов отвечает за селективность взаимодействия в комплексах лиганд – мишень [213]. В молекулах многих терапевтических препаратов для стабилизации пространственной структуры фармакофоров используется циклизация пептида, в том числе и через дисульфидные мостики. Кроме того, включение дисульфидного мостика в последовательность различных линейных пептидов в ряде случаев на порядки увеличивало селективность их взаимодействия с мишенями.



Большое количество пространственных структур пептидов представляет собой  $\alpha$ -спирали, что является необходимым условием для проявления их биологических свойств [5]. В литературе присутствуют различные примеры, когда введение дисульфидного мостика в структуру линейных пептидов стабилизирует спиральную конформацию. Как было показано в исследованиях пептидных аналогов Апамина и S-пептида рибонуклеазы А [214, 215], введение дисульфидного мостика в линейные пептиды приводило к стабилизации  $\alpha$ -спиральной конформации и соответствующему упорядочиванию пространственной структуры циклических аналогов по сравнению с линейными молекулами. В случае S-пептида рибонуклеазы факт стабилизации структуры пептида подтверждался экспериментально найденными термодинамическими параметрами образования каталитически активного комплекса с S-белком [214, 215].

Другим примером стабилизации  $\alpha$ -спирали путем введения в молекулу дисульфидного мостика является разработка высокоселективных лигандов рецептора эстрогена (ER) [216]. Так, циклические нонапептиды с дисульфидным мостиком, в отличие от линейных, были способны принимать квазиспиральную конформацию, а селективность их связывания с рецептором ER была на порядок выше, чем для циклических амидных аналогов и линейных пептидов: НК*cyclo*(CILC)RLLQNH<sub>2</sub>  $Ki_{ER\alpha} = 0.025\mu\text{M}$ ; НК*cyclo*(EILRK)LLQNH<sub>2</sub>  $Ki_{ER\alpha} = 0.22\mu\text{M}$  НКKILHRLQNH<sub>2</sub>  $Ki_{ER\alpha} = 0.17\mu\text{M}$  [216]. Таким образом, лиганд с дисульфидным мостиком (PERM-1) проявил более высокое сродство к эстрогеновому рецептору  $\alpha$  (ER <sub>$\alpha$</sub> ) ( $Ki = 0.025\mu\text{M}$ ), чем  $\beta$  (ER <sub>$\beta$</sub> ) ( $Ki = 0.39\mu\text{M}$ ), показывая тем самым примерно в 15 раз выше селективность для ER <sub>$\alpha$</sub> , чем для ER <sub>$\beta$</sub>  [216].

В недавнем исследовании было доказано, что дисульфидная связь между остатками Cys840 и Cys851 в S-белке SARS-CoV-2 стабилизирует С-концевую  $\alpha$ -спираль пептида слияния (FP), который является одной из важнейших структурных единиц в S-белке для взаимодействия вируса с клеткой-хозяина [217]. Нарушение структуры белка SARS-CoV-2 влияет на контагиозные свойства самого вируса. Эти данные открывают новый вектор для борьбы с инфекцией COVID-19.

Другой тип пространственной организации пептидов – это  $\beta$ -структуры:  $\beta$ -складки,  $\beta$ -повороты,  $\beta$ -шпильки и  $\beta$ -листы. В пептидах  $\beta$ -структурные фрагменты также, как и  $\alpha$ -спирали, стабилизируются водородными связями. Наличие в этих пептидах S-S мостика вносит дополнительный вклад в их стабилизацию. Одним из наиболее важных примеров стабилизации  $\beta$ -поворота с помощью введения дисульфидной связи является разработка лекарств на базе фармакофорной последовательности гормона соматостатина, описанной выше (FwKT) [205, 218]. Введение S-S мостика в данную последовательность

стабилизирует  $\beta$ -поворот, что является важным условием высокой селективности действия данного пептида в организме [218, 219].

Необходимость присутствия дисульфидной связи была ещё раз доказана при изучении селективности различных аналогов *октреотида*, в котором S-S мостик был заменён на этиленовый фрагмент -CH=CH-, к пятому подтипу рецептора соматостатина (sstr5) [219]. Все новые синтезированные соединения показали более низкое по сравнению с октреотидом сродство к sstr5 ( $K_{i\text{sstr5}} = 5.1\text{нМ}$ ) [219, 220].

В исследовании Almeida A.M. [221] показано, что межцепочечные поперечные S-S связи не только стабилизируют  $\beta$ -складчатую вторичную структуру, но и определяют степень её параллельности. Довольно большое количество исследований посвящено введению дисульфидной связи в пептиды для стабилизации пространственной структуры  $\beta$ -шпильки. В работе [222] с помощью спектроскопии ЯМР и циркулярного дихроизма была изучена пространственная структура серии линейных и циклических 12-членных пептидов – аналогов последовательности (69–80) виммина – белкового фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), обнаруженного в змеином яде, и оценен вклад S-S мостика в стабилизацию  $\beta$ -шпильки. Авторами было показано, что дополнительное введение S-S мостика с концов линейного пептида RWNPRTQSWK увеличивает вклад нековалентного индол-индольного взаимодействия (что было продемонстрировано и в других работах [223]) и ещё сильнее стабилизирует  $\beta$ -шпильку [222].

В работе [224] продемонстрировано, что влияние дисульфидной связи на стабилизацию  $\beta$ -шпильки зависит от её локализации в пептидной последовательности. С помощью спектроскопии ЯМР найдено, что стабилизация наблюдается в местах с наименьшим количеством водородных связей. Авторам работы [225] удалось стабилизировать структуру  $\beta$ -складчатого листа в молекуле пептида AR-1-C – аналога ареницина -1 – путем введения в пептид второй (дополнительной) дисульфидной связи. Для этого остатки Val<sup>8,15</sup> были заменены на остатки Cys<sup>8,15</sup>(RWCYAYC<sup>8</sup>RVRGVL<sup>15</sup>RYRRCW). Увеличение структурной жесткости молекулы и снижение ее гидрофобности привели к двукратному повышению антибактериальной активности пептида [225], что позволило создать более селективный, чем ареницин-1 АМП.

В работах [226-227] была изучена роль S-S связи в стабилизации вторичной и третичной структуры противоопухолевого 43-членного пептида Луназина: (H-SKWQHQQDS<sub>cyclo</sub>[C<sub>10</sub>RKQLQGVNLT<sub>PC22</sub>] EKHIMEKIQGRGDDDDDDDDDD-ОН), проявляющего химиотерапевтическое и антимиотическое действие. В структуре этого пептида имеется несколько различных конформационных мотивов: 29 % его

последовательности представляют собой  $\alpha$ -спираль, 28 % –  $\beta$ -складку, 23 % –  $\beta$  поворот, а остальная часть не упорядочена. Именно дисульфидная связь стабилизирует конформацию и отвечает за плотность упаковки молекулы Луназина. [226].

В литературе есть отдельные примеры исследований, показывающих, что S-S мостики могут выступать в роли «скрепок», участвующих в организации и стабилизации  $\beta$ -листовой четвертичной структуры [227].

### 1.4.3. ВЛИЯНИЕ ДИСУЛЬФИДНОЙ СВЯЗИ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДОВ

В предыдущем разделе мы описали, что введение S-S мостика в пептидах фиксирует их пространственную структуру в одной или нескольких ограниченных конформациях и в большинстве случаев стабилизирует её. Поэтому неслучайно, основной пептидный остов и боковые цепи обычно структурно ограничены дисульфидными мостиками. Ведь именно организация пептидной геометрии в стабилизированной конформации увеличивает энергию связывания с молекулярной мишенью за счёт уменьшения энтропийного вклада и во многом отвечает за биологическую активность [228–230].

Одним из наиболее показательных примеров данного факта является разработка лекарств на базе гормона окситоцина (ОТ) *H-cyclo(Cys<sup>1</sup>-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys<sup>6</sup>)-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>*. Считается, что дисульфидный цикл, состоящий из 6 аминокислот, связывается со второй внеклеточной петлёй и экспонированными во внеклеточное пространство участками трансмембранных доменов 3,4 и 6 окситоциновых рецепторов (OTR), в то время как С-концевая амидная часть, состоящая из трёх аминокислот, связывается с первой внеклеточной петлёй и N-концевым доменом рецептора [231]. Авторы работы [232] показали, что циклическая часть ОТ необходима для реализации его биологической активности и связывания с OTR. В экспериментах на крысах [232, 233] было установлено отсутствие уретонической активности (увеличение тонуса и сократительной активности матки), характерной для ОТ, как у линейных аналогов гормона [Ala<sup>1,6</sup>] ОТ и [Ser<sup>1,6</sup>] ОТ, так и у циклических аналогов ОТ с заменой дисульфидного мостика амидным.

Рассмотрим также примеры, в которых введение дополнительной дисульфидной связи увеличивало биологическую активность пептида. Так, в недавних исследованиях было показано, что введение дополнительного S-S мостика в молекулу антимикробного 25-членного пептида Лактоферрина на порядок увеличивает его антимикробную активность в отношении грамположительных бактерий *Truoperella pyogenes* [234].

В другом исследовании при удалении одного дисульфидного мостика из молекулы антимикробного 25-членного пептида Андроктонина осталась лишь его активность

в отношении грамположительных бактерий [235]. Сам же Андроктонин, обладающий двумя S-S связями, проявляет активность в отношении большого количества патогенов – как грибов, так и бактерий [235].

Хотелось бы также обратить внимание на исследование структуры антимикробного 12-членного пептида Тигерина, в котором присутствие дисульфидной связи является необходимым условием для проявления высокой гипогликемической активности, в то время как для линейных аналогов данный вид активности проявляется в меньшей мере [236]. В недавно проведенных исследованиях связи структура-активность  $\mu$ -Конотоксина РША была показана главенствующая роль всех трёх дисульфидных мостиков, присутствующих в структуре этого пептида [237]. При удалении хотя бы одной связи значительно снижалась аффинность связывания с  $\text{Na}_v1.4$ , тем самым уменьшался и ингибирующий эффект [237].

#### **1.4.4. СВЯЗЬ ДИСУЛЬФИДНОГО МОСТИКА И СНИЖЕНИЯ ВОСПРИИМЧИВОСТИ К ДЕГРАДАЦИИ ПРОТЕАЗАМИ**

Одним из главных недостатков пептидных лекарств является их низкая протеолитическая устойчивость [5, 21, 238]. При конструировании аналогов природных пептидов данная проблема решается за счёт модификации молекулы, путем создания циклической структуры различной химической природы [5, 21, 238], модификацией N-и C-концевых а.о., включением в последовательность неприродных аминокислот и аминокислот D-ряда и др.

Включение *D*-Phe или *D*-Nal в последовательность аналогов соматостатина на порядок (по сравнению с нативным гормоном) продлевает время их полураспада: для октреотида  $T_{1/2} = 1.7\text{--}1.9$  ч, для ланреотида  $T_{1/2} = 23\text{--}30$  дней [13, 247, 239]. Для защиты от действия аминопептидаз часто ацетируют N-концевую аминокислоту, что было реализовано совсем недавно при создании нового пептидного препарата Пегцетакоплана («Empaveli»). Кроме того, была продемонстрирована превосходная протеолитическая стабильность этого циклического дисульфида по сравнению с его линейными и циклическими аналогами с тиоэфирным мостиком [8].

Ещё одной стратегией увеличения протеолитической устойчивости против действия эндопептидаз является увеличение длины C-конца до 15 аминокислот [240]. Этим подходом пользовались при создании препарата Сендеритида – аналога натрийуретического пептида с удлинённой C-концевой частью [149, 240] (Рисунок 2).

Широко используемая стратегия защиты от действия аминопептидаз – это дезаминирование N-концевого остатка цистеина путём его замены на меркаптопропионовую кислоту. Препараты атозибан ( $T_{1/2}=18-21$  мин), десмопрессин ( $T_{1/2}=2.8-3.1$  ч) и эптифибатид ( $T_{1/2}=1.5-2.5$  ч) являются циклическими дезаминопептидами, благодаря чему время их полужизни в плазме существенно выше, чем у их природных предшественников [241].

Работы ряда исследователей [242, 243] показали, что введение дисульфидной связи в некоторые линейные антимикробные пептиды увеличивает их протеолитическую стабильность на несколько порядков. Циклический дисульфидный аналог 13-членного антимикробного пептида Индолицидина ( $T_{1/2}=18$  мин), богатого триптофаном и аргинином, – был значительно устойчивее по отношению к трипсину, чем линейный пептид ( $T_{1/2}=4$  мин) [242]. Авторы работы [242] объясняют увеличение протеолитической устойчивости пептида с внутримолекулярной S-S связью более компактной упаковкой боковых радикалов лизина и триптофана в циклической молекуле [242].

Другим примером повышения протеолитической стабильности дисульфидных пептидов в сыворотке по сравнению с линейными является разработка коротких аналогов *лактоферрицина* с S-S мостиком. Все циклические пептиды показали более высокую устойчивость к протеазам [243]. Одним из интересных исследований была оценка устойчивости к ферментативной деградации аналогов части линейной последовательности H-LLE<sup>281</sup>DPVG<sup>284</sup>TVA-NH<sub>2</sub>-гликопротеина D вируса простого герпеса первого типа (HSVgD-1) [244]. Именно последовательность – <sup>281</sup>DPVG<sup>284</sup> – отвечает за иммунный ответ всего линейного эпитопа 268–287 HSVgD-1. После выдерживания в течение 96 ч в 10% в человеческой сыворотке циклического пептида – *cyclo*(CLLEDPVGTVAC)-NH<sub>2</sub> – оставалось в неизменном виде 53 %, в 50 %-ой сыворотке в тех же условиях – 29 % [244]. В то время как исходный линейный пептид полностью разлагался в обеих сыворотках уже через 24 часа [244].

В работах по изучению протеолитической устойчивости аналогов Глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) [245] и эндоморфина-1 [246] показано, что аналог GLP-1, представляющий из себя гомодимер с двумя дисульфидными мостиками, при сохранении биотерапевтического эффекта обладает увеличенной протеолитической стабильностью, в несколько раз превышающей устойчивость нативного пептида. Это открывает возможности применения данного пептида в качестве препарата для лечения сахарного диабета 2 типа [245]. Период полураспада аналога эндоморфина-1 с одним S-S мостиком в плазме крови человека практически в 30 раз больше ( $T_{1/2}=152.3$  мин), чем у эндогенного опиоидного пептида ( $T_{1/2}=5.6$  мин) [246].

В работах [247, 248] проведена сравнительная оценка протеолитической стабильности в сыворотке крови человека аналогов *конотоксинов*, содержащих различное количество дисульфидных связей. Показано, что наибольшей стабильностью обладал Ctx с 4-мя S-S мостиками, за 24 часа инкубации в плазме 80% пептида сохранились в неизменном виде. Линейный Ctx-1 деградировал быстро, в то время как два других пептида – Ctx-2 и Ctx-3 с 3-мя S-S связями – были менее стабильны, чем их аналог Ctx, что может объясняться повышенной конформационной гибкостью лигандов Ctx-2 и Ctx-3, которая увеличивается при потере дополнительного цикла [247].

Такая же тенденция наблюдается при разрыве любой из трёх дисульфидных связей в 25-членном пептиде Зиконотиде ( $\omega$ -конотоксин MVIIA), что делает молекулу неустойчивой к действию протеаз [248].

В другой работе, посвящённой аналогам Гомезина (Gm), показали, что в сыворотке крови человека после 6 часов инкубации обнаруживается до 90% нативного Gm. Аналоги без дисульфидных связей – [Ser<sup>2,6,11,15</sup>, Pro<sup>9</sup>]-Gm, [Ser<sup>2,6,11,15</sup>, Pro<sup>9</sup>]-Gm, [Ser<sup>2,6,11,15</sup>, D-Pro<sup>9</sup>]-Gm и [Thr<sup>2,6,11,15</sup>, D-Pro<sup>9</sup>]-Gm – гораздо более восприимчивы к протеазам, чем природный пептид, и не обнаруживаются в плазме уже через 1–2 часа [249]. Пептидные препараты Линаклотид и Плеканатид – аналоги урогуанилина [241, 249, 250] принимаются перорально благодаря наличию в их структуре трёх и двух дисульфидных связей, соответственно. Именно эти структурные элементы стабилизируют промежуточные петли, защищают эти пептиды от ферментов за счёт формирования конформации, недоступной для протеаз.

### **1.5. ОРФАННЫЕ ПРЕПАРАТЫ С ДИСУЛЬФИДНОЙ СВЯЗЬЮ**

В последние годы среди большого количества одобренных FDA пептидных лекарств отдельную нишу занимают пептидные препараты с S-S связью для лечения редких заболеваний. Описанные ранее лекарства на молекулярном уровне действуют за счёт связывания с внеклеточной частью плазматической мембраны, будь то рецепторы или ионные каналы, исключением является депсипептид Ромидепсин, который действует за счёт связывания с клеточным ядром и цитоплазмой благодаря двум своим структурным особенностям – дисульфидной и сложноэфирной связи [251–253]. Данный препарат был одобрен в 2011 году FDA для лечения различных видов периферических Т-клеточных лимфом, и ему был присуждён статус орфанного препарата. А совсем недавние исследования показали более значительный эффект Ромидепсина по сравнению с известным онкологическим препаратом Воринастатом *in vivo* [251–253].

Другим орфанным заболеванием является пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ) – приобретённое гематологическое заболевание, которое приводит к неконтролируемой активации системы комплемента и разрушению эритроцитов посредством внутрисосудистого и внесосудистого гемолиза [254]. Более столетия учёными исследуется эта болезнь и её разнообразные проявления и сложная, до сих пор неизученная, патофизиология [254].

ПНГ заболевают в основном молодые люди от 30 до 40 лет, а средняя выживаемость не превышает 15–20 лет в зависимости от протекания болезни [254]. Чем более глубокая апластическая анемия костного мозга, тем меньше шансов на благоприятный прогноз [254]. К настоящему моменту для лечения пароксизмальной ночной гемоглобинурии использовались два похожих препарата на основе моноклональных антител – Экулизумаб и Ултомирис [254, 255]. Однако для пациентов с более глубоким поражением костного мозга, сильным проявлением анемии и усталости эти лекарства бессильны [255].

Весной 2021 года FDA в ускоренном порядке зарегистрировало препарат Пегцетакоплан («Empaveli») – первый в своём классе таргетный ингибитор компонента C3 системы комплемента [8]. Этот пептид с двумя S-S мостиками по эффективности обошёл два вышеописанных антитела за счёт нормализации и повышения уровня гемоглобина, снижения потребности в переливании крови даже при глубокой апластической анемии костного мозга [8, 255]. Именно Пегцетакоплан может стать стандартом лечения ПНГ в скором времени, ведь FDA уже рекомендовало применять это лекарство пациентам, которым не помогают моноклональные антитела [255]. Пегцетакоплан является аналогом пептида Компстатина с одной S-S связью, на основе которого более 20 лет ведётся поиск новых молекул [8].

Другим орфанным препаратом, который ждёт одобрения FDA (завершились два исследования III фазы клинических испытаний), является пептид с одним S-S мостиком Сетмеланотид («Imcivree»). Это лекарство применяется у людей с дефицитом проопиомеланокортина (ПОМС) или рецептора лептина (LEPR), результатом чего является тяжёлое ожирение [256, 257]. Этим редким генетическим заболеванием страдают в основном молодые люди, наряду с ожирением, также испытывающие гиперфагию и другие сопутствующие заболевания, что сильно снижает качество жизни [256, 257].

Для лечения детей с неизлечимой болезнью – ахондроплазией (карликовостью, или дварфизмом) [9, 258] в 2021 году FDA был зарегистрирован препарат Восоритид («Voxzogo»), который применяется в ЕС, США, Бразилии, Японии и Австралии. Он представляет собой 39-членный аналог натрийуретического пептида человека C-типа (CNP) с одной S-S связью (Рисунок 2). За счёт модификации N-конца пептида

последовательностью –Pro-Gly–, время его жизни было увеличено практически в 10 раз по сравнению с нативным пептидом, что позволяет принимать «Voxzogo» один раз в день [258]. Связываясь с натрийуретическим пептидным рецептором типа В (NPR-B), препарат способствует росту костей, ингибируя сигнальный путь MAPK, опосредованный FGFR3. Являясь практически единственным в своём классе средством для терапии дварфизма, Восоритид помогает улучшать качество жизни огромному количеству людей [9, 258].

Современные тенденции развития пептидного фармацевтического рынка ориентированы на создание препаратов для лечения редких заболеваний и болезней, для которых до сих пор не существует необходимой терапии и диагностики. Ниже мы рассмотрим перспективные пептидные молекулы с S-S мостиком из этого сегмента рынка, некоторые из которых проходят последние стадии клинических испытаний.

## 1.6. НОВАТОРСКИЕ ПЕПТИДЫ С S-S СВЯЗЬЮ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НЕУДОВЛЕТВОРЁННЫХ МЕДИЦИНСКИХ ПОТРЕБНОСТЕЙ

В данной главе мы рассмотрим наиболее перспективные, по нашему мнению, соединения, отталкиваясь от их взаимодействия с определённой мишенью.

### 1.6.1. ДАЛАЗАТИД – ВЫСОКОСЕЛЕКТИВНЫЙ ИНГИБИТОР ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМОГО КАЛИЕВОГО КАНАЛА Kv1.3

Сейчас в мире известно более 100 аутоиммунных заболеваний. Их распространённость среди населения колеблется от 5% до 8%, с более высокой частотой у женщин [259]. Этот недуг может быть как врождённым, так и приобретённым, и представляет серьёзную проблему из-за сложности клинической картины и хронического характера [259]. Калиевые ионные каналы Kv1.3 в последние годы рассматриваются в качестве мишени для лечения аутоиммунных заболеваний [143, 260, 261].

Пептид Далазатид (ShK-186) (Рисунок 5) с тремя S-S мостиками является аналогом описанного выше токсина Stichodactyla (Shk) и так же, как и Shk, ингибирует каналы Kv1.3 в пикомолярных концентрациях [143, 262, 263, 264], при этом проявляет в 100–1000 раз большую селективность к ионным каналам Kv1.3, чем к близкородственным [262].

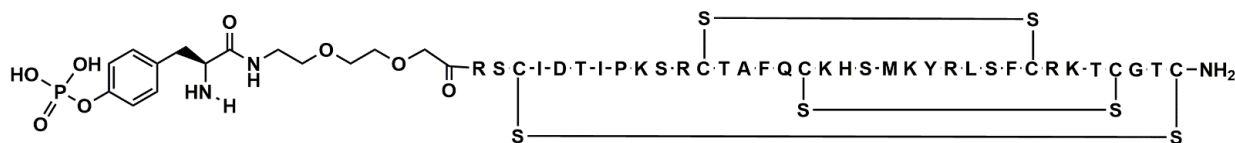


Рисунок 5. Структура Далазатида (ShK-186).

Следует отметить, что, хотя малые молекулы, являющиеся кандидатами в этой области, проявляют активность в наномолярных концентрациях, но ни одна из них до сих пор



пор не дошла до клинических испытаний [143]. Исследования Далазатида *in vivo* на модели реакции гиперчувствительности замедленного типа показали, что медикаментозное лечение этим пептидом подавляет хронически активированные аутореактивные Т-клетки, но не влияет на здоровые и центральные Т-клетки памяти [265].

ShK-186 показал эффективность в лечении аутоиммунных заболеваний человека таких, как рассеянный склероз, ревматоидный артрит, васкулит и красная волчанка [261], а также аллергической астмы [266], ожирения и других метаболических расстройств [267, 263]. Ни для одного из этих заболеваний до сих пор не существует эффективной терапии.

В 2016 году Далазатид успешно прошел первую фазу клинических испытаний для лечения хронического аутоиммунного заболевания – псориаза [264, 268]. Кроме того, после успешно проведенной первой фазы клинических испытаний была дана рекомендация для рассмотрения ShK-186 как превосходного кандидата не только в лечении псориаза, но и других Т-клеточных иммунопатологий, опосредованных Т-лимфоцитами [264].

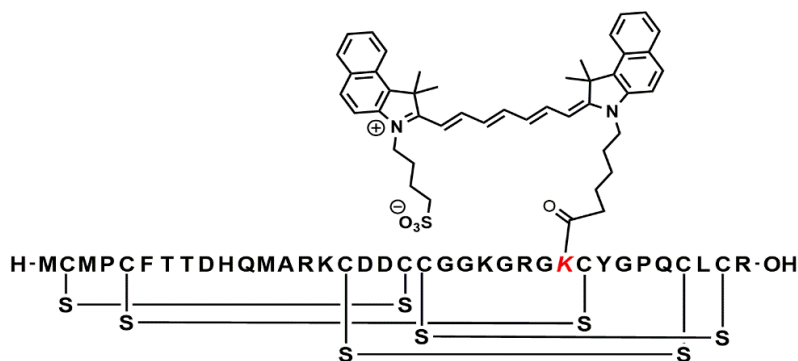
### 1.6.2. ПЕПТИД BLZ-100 – ВЫСОКОСЕЛЕКТИВНЫЙ ЛИГАНД К ХЛОРИДНЫМ КАНАЛАМ И МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЕ-2 (ММР2)

Глиомы представляют группу опухолей, возникающих из глиальных клеток центральной нервной системы, – глиобластомы, олигодендроглиому, эпендимому, олигоастроцитому и другие [269]. На долю глиом приходится более 70% первичных опухолей головного мозга. Злокачественные глиомы являются третьей ведущей причиной смертности от рака среди людей в возрасте от 15 до 34 лет [269]. Существующие лекарства не удовлетворяют потребностям пациентов ввиду низкой специфичности их действия и большого количества побочных эффектов [269, 270].

В данном виде опухолей наблюдается сверхэкспрессия двух видов мишеней, а именно: глиомспецифических хлоридных каналов (GCC) и цинк-зависимого фермента – металлопротеиназы-2 (ММР-2) [271, 272]. Но несмотря на такую высокую специфичность к глиомам, эти мишени практически отсутствуют в здоровых тканях [271–273]. Поэтому разработка высокоселективных молекул к GCC и ММР-2 является актуальной задачей.

Одним из таких соединений является описанный нами выше пептид Хлоротоксин (СТХ) [271–273]. Соединение на основе этого токсина – *Тозулеристид (BLZ-100)* (Рисунок б) – успешно прошло первую фазу клинических испытаний при интраоперационной визуализации рецидивирующих глиом [274–276]. В данном пептиде Хлоротоксин выполняет роль векторной молекулы, высокоаффинной к GCC и ММР-2, а в качестве контрастного агента выступает флуоресцентный краситель – индоцианин зеленый [275].

Совсем недавно начался набор пациентов с опухолями ЦНС, перенёвших операцию, для II и III фазы клинических испытаний по визуализации метастазов Тозулеристидом [274, 276]. Всё больший интерес проявляется к СТХ как векторной молекуле. Изучаются и другие диагностические молекулы как для оптической визуализации, так и для МРТ на основе этого токсина, содержащие аналоги либо индоцианина зелёного, либо FITC, либо меченные радионуклидами иода и  $^{99m}\text{Tc}$ , различными лантаноидами и другими красителями пептиды [271–273, 275].



**Рисунок 6.** Структура Тозулеристида (BLZ-100).

Красным цветом показан остаток лизина, к  $\epsilon$ -амино группе которого присоединён цианиновый флуорофор.

В последние годы растёт интерес к диагностическим препаратам, содержащим в своей структуре цианиновые флуорофоры – в большинстве своём аналоги индоцианина зелёного [275]. В ноябре 2021 года FDA экстренно зарегистрировало препарат Пафолацианин для интродермальной диагностики злокачественных поражений у больных раком яичников [277].

### 1.6.3. ПЕПТИДЫ RPMC И GE-137 – ВЫСОКОСЕЛЕКТИВНЫЕ ЛИГАНДЫ К РЕЦЕПТОРАМ ТИРОЗИН-ПРОТЕИНАЗИ (С-МЕТ) И ИНТЕГРИНА $\alpha 5\beta 1$

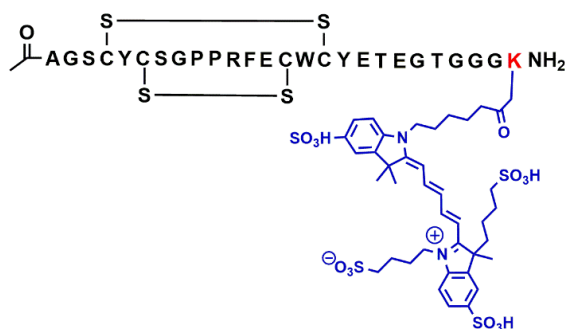
Колоректальный рак (КРР) является одним из самых частых злокачественных образований во всем мире, и с каждым годом возраст больных становится всё моложе [278–280]. Высокий уровень смертности от КРР вызван чаще всего метастазированием в печени, а также неокончательным удалением полипов в различных отделах кишечника, что снижает пятилетнюю выживаемость с 90% до 12% [278–280].

Одной из таких мишеней является рецептор семейства интегринов  $\alpha 5\beta 1$ , который сверхэкспрессируется на колоректальных раковых клетках, а также на метастатических опухолевых клетках КРР [278, 279]. Была синтезирована серия небольших химерных пептидов с одним S-S мостиком, содержащих в структуре либо цианиновый краситель, либо FITC, либо хелатор DOTA, помеченный радионуклидом  $^{111}\text{In}$  [278, 279]. Был найден

оптимальный пептид – *H-cyclo[CPIEDRPMC]GGSK-NH<sub>2</sub> (RPMC)*, у которого была высокая селективность к опухолевым клеткам и интернализация в опухоли [279]. Такие данные стали основой для недавнего исследования этого пептида в качестве векторной молекулы. Конъюгат RPMC с известным противораковым лекарством Доксорубицином показал отличную селективность как к обычным клеткам КРР, так и метастатическим клеткам HT29 в печени [278].

Ещё одной не менее интересной мишенью является тирозин-протеинкиназа (с-Met), чья сверхэкспрессия начинает наблюдаться уже на начальных этапах развития КРР, а в дальнейшем и аденокарциномы прямой кишки [280].

Пептид с двумя S-S связями *GE-137* (Рисунок 7) проявляет высокое сродство к с-Met человека (2 нМ) [280]. Этот конъюгат с цианиновым флуорофором (Рисунок 7) специфически накапливается предпочтительно в опухолевых и предопухолевых клетках КРР [280].



**Рисунок 7.** Структура GE-137.

Красным цветом показан остаток лизина, к ε-аминогруппе которого присоединён цианиновый флуорофор, выделенный синим цветом.

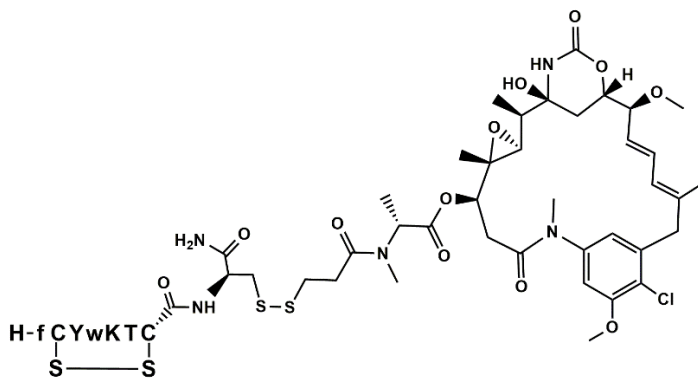
#### 1.6.4. ПЕПТИД PEN-221 – ВЫСОКОСЕЛЕКТИВНЫЙ ЛИГАНД К РЕЦЕПТОРУ СОМАТОСТАТИНА ВТОРОГО ТИПА (SSTR 2)

С каждым годом растёт резистентность к уже имеющимся противораковым препаратам. Мутации известных видов опухолей приводят к изменениям патогенеза заболевания [281].

Кроме колоректального рака, мы бы хотели остановиться на двух серьёзных неудовлетворённых медицинских потребностях – мелкоклеточном раке лёгкого (МРЛ) [282, 283] и раке носоглотки (РНГ) [284–286]. МРЛ, являясь нейроэндокринной агрессивной опухолью с высокой степенью злокачественности, составляет до 15% всех диагностированных видов раков легких [282]. Назофарингеальная карцинома (РНГ) является редкой злокачественной опухолью и до сих пор не имеет эффективной диагностики и терапевтической стратегии лечения [284–286].

Совсем недавно была найдена новая мишень для лечения этих двух видов рака – рецептор соматостатина второго типа (sstr2) [283, 287,288]. Было показано, что он сверхэкспрессируется в опухолевой ткани и ограничено экспрессируется в здоровых клетках, что демонстрирует ключевую роль данного рецептора в визуализации и терапии мелкоклеточного рака легких [287] и назофарингеальной карциномы [286]. Визуализация опухолей у пациентов с МРЛ уже проводится с использованием диагностического препарата  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-ТОС/TATE [283, 288] и высокоэффективна в выявлении очагов заболевания.

Выше мы уже говорили, что огромное количество работ посвящено поиску новых аналогов соматостатина, но немногие доходят до стадии клинических. Соединение **PEN-221** (Рисунок 8) проходит I/IIa фазу клинических испытаний в лечении нейроэндокринных опухолей и МРЛ, которое, по нашему мнению, является уникальным с точки зрения структуры и свойств среди пептидных лекарств [283, 287].



**Рисунок 8.** Структура PEN-221.

Как видно, PEN-221 является химерной молекулой, состоящей из векторной молекулы Tуг<sup>3</sup>-октреотида и цитотоксической молекулы Майтанзина (DM1), превосходящей в 100–1000 раз по активности известные цитостатики винкристин и винбластин [289]. В структуре данного соединения присутствует одна внутримолекулярная и одна межмолекулярная S-S связь [283, 287]. В недавно проведённых исследованиях было показано, что PEN-221 связывается с sstr2 с пикомолярным сродством [287].

Довольно частым осложнением химиотерапии рака является ожирение, которое также может быть связано и с другими причинами: сахарным диабетом 2 типа, сердечно-сосудистыми заболеваниями, болезнями костной системы, хроническими болями спины и астмой [290]. С 1975 года по 2016 год количество больных ожирением увеличилось в 3 раза [291].

### 1.6.5. КАГРИЛИНТИД – ЛИГАНД К РЕЦЕПТОРАМ АМИЛИНА И КАЛЬЦИТОНИНА (АМУР И СТР)

Кагрилинтид (AM833) – это синтетический аналог нативного пептида Амилина, состоящий также из 37 аминокислотных остатков с дисульфидной связью, локализованной так же, как и в природном пептиде, между Cys<sup>2</sup> и Cys<sup>7</sup> (Рисунок 9) [292, 293].

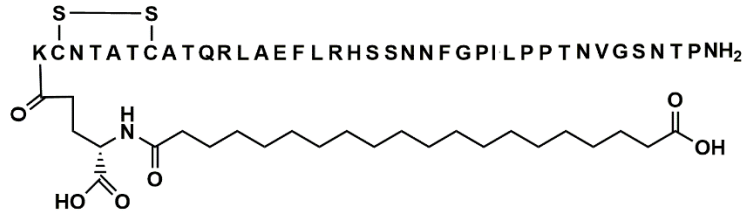


Рисунок 9. Структура Кагрилинтида (AM833).

AM833 имеет 6 замен и остаток гексадекановой кислоты (C20) с N-конца, что сделано для увеличения времени жизни *in vivo* (159–195 часов), что позволяет вводить его подкожно всего один раз в неделю [290–293]. Замена C-концевого тирозина в Амилине на пролин в Кагрилинтиде увеличивает аффинность связывания с кальцитониновыми рецепторами. Совсем недавно с многообещающими результатами завершилась вторая фаза клинических испытаний Кагрилинтида для лечения пациентов с ожирением [290, 292].

### 1.6.6. ПЕПТИД АМУ-101 – ИНГИБИТОР АКТИВАЦИИ ЦЕНТРАЛЬНОГО БЕЛКА СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА C3

Один из рецепторных белков системы комплемента – центральный белок C3 – перспективная мишень для разработки лекарств.

Современные исследования продемонстрировали связь между сверхактивацией компонента C3 и микробным дисбиозом полости рта, что приводит к хроническому пародонтиту. Поэтому C3-таргетная терапия может стать одним из новых подходов при воспалительных заболеваниях пародонта [8].

В связи с этим был разработан пептидный лиганд AMU-101 (H-γ-cyclo[CVW(Me)ODWSarAHRC]I(Me)-NH<sub>2</sub>) – аналог компстатина, который продемонстрировал постоянную терапевтическую эффективность за счёт ослабления ключевых маркеров воспаления пародонта, что, по-видимому, может быть связано с его наномолярной аффинностью (0.5 нМ) к компоненту C3 по сравнению с нативным пептидом (1600 нМ).

Ещё одну область терапевтических возможностей для использования ингибиторов C3 определяют гипертрофические синдромы, которые часто завершаются микрососудистым эндотелиальным повреждением, тромбозом и полиорганной

недостаточностью [8]. Недавно было показано, что активация компонента С3 при течении COVID-19 у пациентов с тяжелыми осложнениями острого респираторного синдрома, вызывает целый каскад нежелательных воспалительных и патогенных процессов. АМУ-101 также проходит II фазу клинических испытаний у пациентов с тяжёлой формой COVID-19 [8, 294].

### 1.6.7. ПЕПТИД Н1А – ИНГИБИТОР КИСЛОТОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ИОННОГО КАНАЛА 1А (ASIC 1А)

Выше мы рассмотрели пептиды с одной или несколькими дисульфидными связями, которые состоят не более чем из 40 аминокислотных остатков. Однако существуют современные разработки токсина *Hi1a*, выделенного из яда **австралийского воронкового паука *Hadronyche infensa***, состоящего из 76 аминокислотных остатков, который имеет в своей структуре 6 S-S связей (Рисунок 10), обладает сложной третичной структурой и относится к группе ИСК (Рисунок 2) [295–297]. Совсем недавно был разработан подход в получении этого полипептида полностью с использованием химического твёрдофазного синтеза [295]. Hi1a, на данный момент, является самым сильным ингибитором кислоточувствительного ионного канала 1а (ASIC1а) человека (IC<sub>50</sub> 530 пМ) [295] по сравнению с непептидными ингибиторами и антителами. К примеру, данный токсин в 170 раз эффективнее ингибирует ASIC1а, чем недавно обнаруженное антитело [298].

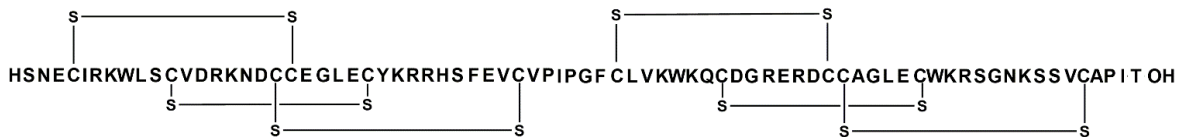


Рисунок 10. Структура Hi1a.

Полипептид Hi1a, являясь высокоселективным ингибитором ASIC1а, при однократном введении (2нг/кг) [297] уменьшал размер инфаркта миокарда [295–297]. Совсем недавно было показано, что данный богатый S-S связями пептид обладает кардиозащитными свойствами в доклинических моделях инфаркта миокарда и трансплантации сердца [295, 297, 299].

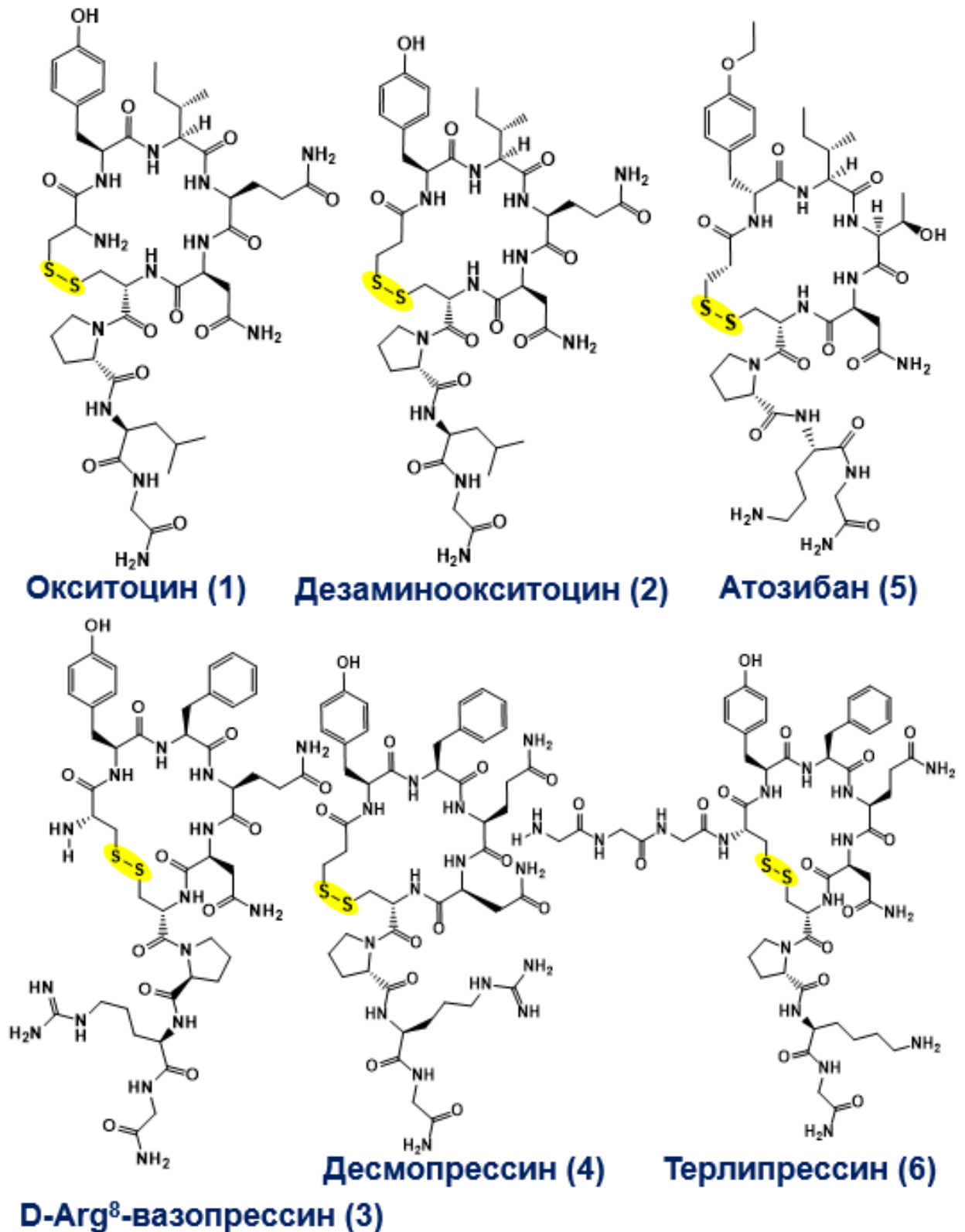
## 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 2.1. ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА ОБЪЕКТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обзор научной литературы показывает, что пептиды с S-S связями присутствуют в большом количестве живых организмов и проявляют биологическую активность, поддерживая самые различные процессы, отвечающие за нормальное функционирование организма. Поэтому постоянно растёт интерес к новым пептидным молекулам с S-S мостиком, которые рассматриваются в качестве прототипов лекарственных препаратов.

Кроме того, растущий спрос на синтетические пептиды на фармацевтическом рынке требует оптимизации методик получения этих соединений. Диссертация посвящена разработке универсального полностью твёрдофазного подхода к синтезу пептидных циклических дисульфидов, пригодного для их крупномасштабного получения. В нашей работе выбор пептидов был обусловлен современными запросами фармацевтического рынка. Выбранные нами пептиды применяются в нашей стране для терапии и диагностики широко распространенных патологий, что диктует необходимость их синтеза в препаративных количествах.

Выбранные пептиды являются аналогами природных гормонов окситоцина, вазопрессина и соматостатина, которые были описаны нами в разделе 1.3.1. Так, *атозибан* (**5**) (Рисунок 11) является единственным клиническим антагонистом окситоциновых рецепторов, который применяется для предотвращения преждевременных родов [300, 301]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) за последнее десятилетие более 152 миллиона детей родились недоношенными [302]. Преждевременные роды являются глобальной проблемой, так как могут привести к осложнениям и даже смерти новорожденных. Несмотря на то что ведётся поиск новых, более эффективных молекул для лечения данной патологии, ни одна из них до сих пор не применяется в медицинской практике. В настоящее время потребность в атозибране (**5**) увеличивается, особенно в странах Латинской Америки и Азии, из-за роста числа беременных женщин [303]. Только в США количество преждевременных родов составило 383 082 случая за 2022 год [304], что показывает потребность в атозибране (**5**) ~ 3 кг в год, отталкиваясь от дозы в 7.5 мг/мл (Таблица 2) [302–305].



**Рисунок 11.** Структурные формулы нейрогипофизарных гормонов и их аналогов (1–6). Жёлтым цветом выделена дисульфидная связь.

Двумя другими объектами исследования являются аналоги Arg<sup>8</sup>-вазопрессина и Lys<sup>8</sup>-вазопрессина – десмопрессин (4) и терлипрессин (6) (Рисунок 11), соответственно.

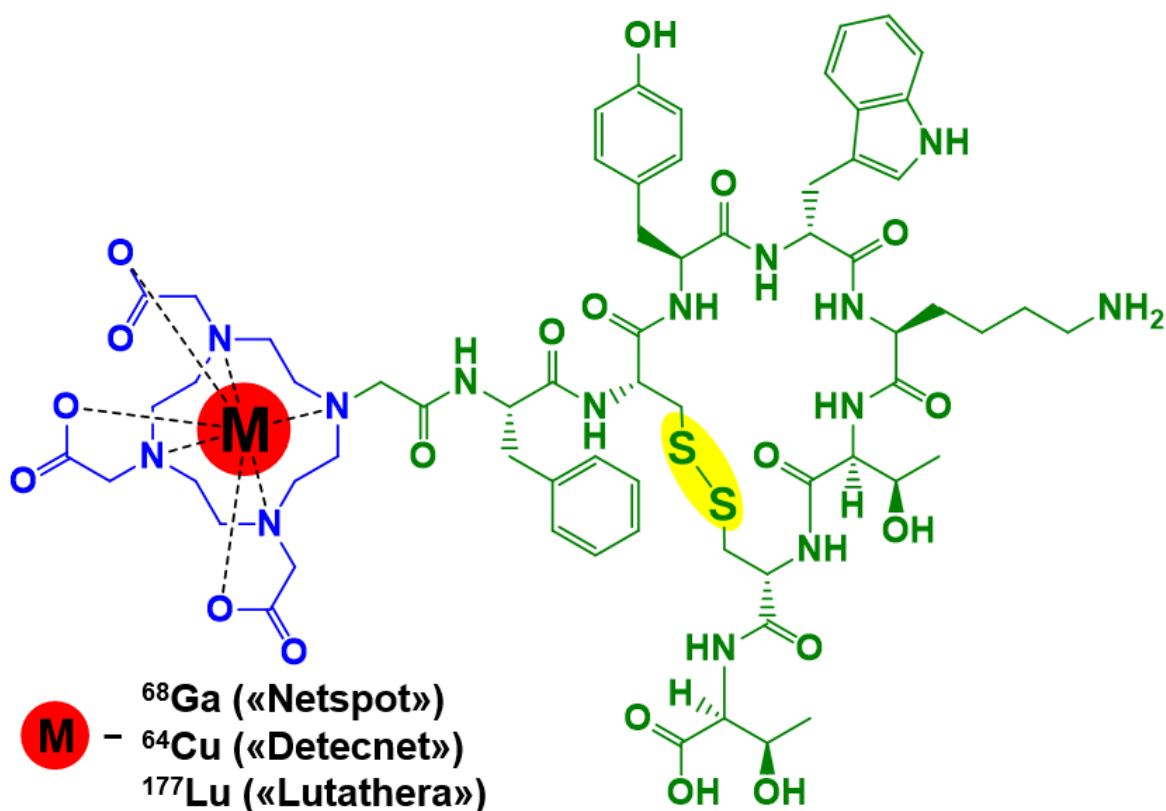


Терлипрессин (**6**) – агонист вазопрессиновых рецепторов – является стандартом лечения для пациентов с гепаторенальным синдромом (ГРС), осложнённым циррозом печени. И так как ГРС является серьёзным недугом (8.3 человека на 100 000 населения в США), при котором смертность составляла 23.7 % в 2019 году, необходимы эффективные методы лечения [306, 307]. По различным данным количество больных ГРС в США составляет от 9 000 до 18 000 больных в год [308], что показывает необходимость в терлипрессине (**6**) ~ 100 г в год, исходя из дозировки в 1 мг/мл (Таблица 2) и применении в течение 5 дней.

Десмопрессин (**4**) является агонистом второго типа вазопрессиновых рецепторов и применяется, в основном, для лечения несахарного диабета и ночного энуреза [241]. Количество больных несахарным диабетом в России достигло практически 3 000 человек с 2004 года [309]. А так как доза десмопрессина (**4**) для лечения ночного энуреза и несахарного диабета составляет 0.1–0.05 мг (Таблица 2) два раза в день перорально, потребность в этом препарате в России составляет ~ 50 г в год.

В качестве объекта исследования нами был также выбран аналог соматостатина Туг<sup>3</sup>-окреотэйт (**7**) и прекурсор РФП DOTA-TATE (**8**) (Таблица 2) [310], применяемый для пептид-рецепторной радионуклидной диагностики и терапии. Этот пептид в качестве адресной части входит в состав радиофармацевтических препаратов (РФП) – «Lutathera», «Netspot» и «Detecnet». Так, DOTA-TATE (**8**), образуя комплекс с такими радионуклидами, как <sup>68</sup>Ga («Netspot») и <sup>64</sup>Cu («Detecnet»), используется для диагностики различных опухолей с помощью ПЭТ-визуализации [310].

Зарегистрированный в 2021 году препарат «Lutathera», представляющий комплекс DOTA-TATE (**8**) с <sup>177</sup>Lu является первым в своём классе препаратом для пептид-рецепторной радионуклидной терапии (PRRT) [310]. Эти препараты проявляют высокую специфичность к соматостатиновым рецепторам, и поэтому особенно эффективны в тераностике нейроэндокринных опухолей. Применяемые в составе РФП дозы пептидов ничтожно малы: для «Netspot» одна доза введения DOTA-TATE (**8**) не должна превышать 50 мкг [311].



**Рисунок 12.** Структурная формула радиофармацевтических препаратов «Netspot», «Detecnet» и «Lutathera».

Зелёным цветом выделена векторная часть – Тир<sup>3</sup>-окреотэйт –, синим – хелатор DOTA, отвечающий за связывание с радионуклидом М, выделенный красным цветом. Жёлтым цветом выделена дисульфидная связь.

Обычно курс лечения при PRRT составляет не более 8 недель, что соответствует 4 дозам (не более 200 мкг).

В США каждый год диагностируют нейроэндокринные опухоли более чем у 12 000 человек, в Испании – более 9 000 [312]. В недавнем исследовании было показано, что в России зарегистрировано 21 668 больных с нейроэндокринными опухолями [313]. Для такого количества пациентов потребность в прекурсоре DOTA-TATE (**8**) в России составляет ~ 5 г в год.

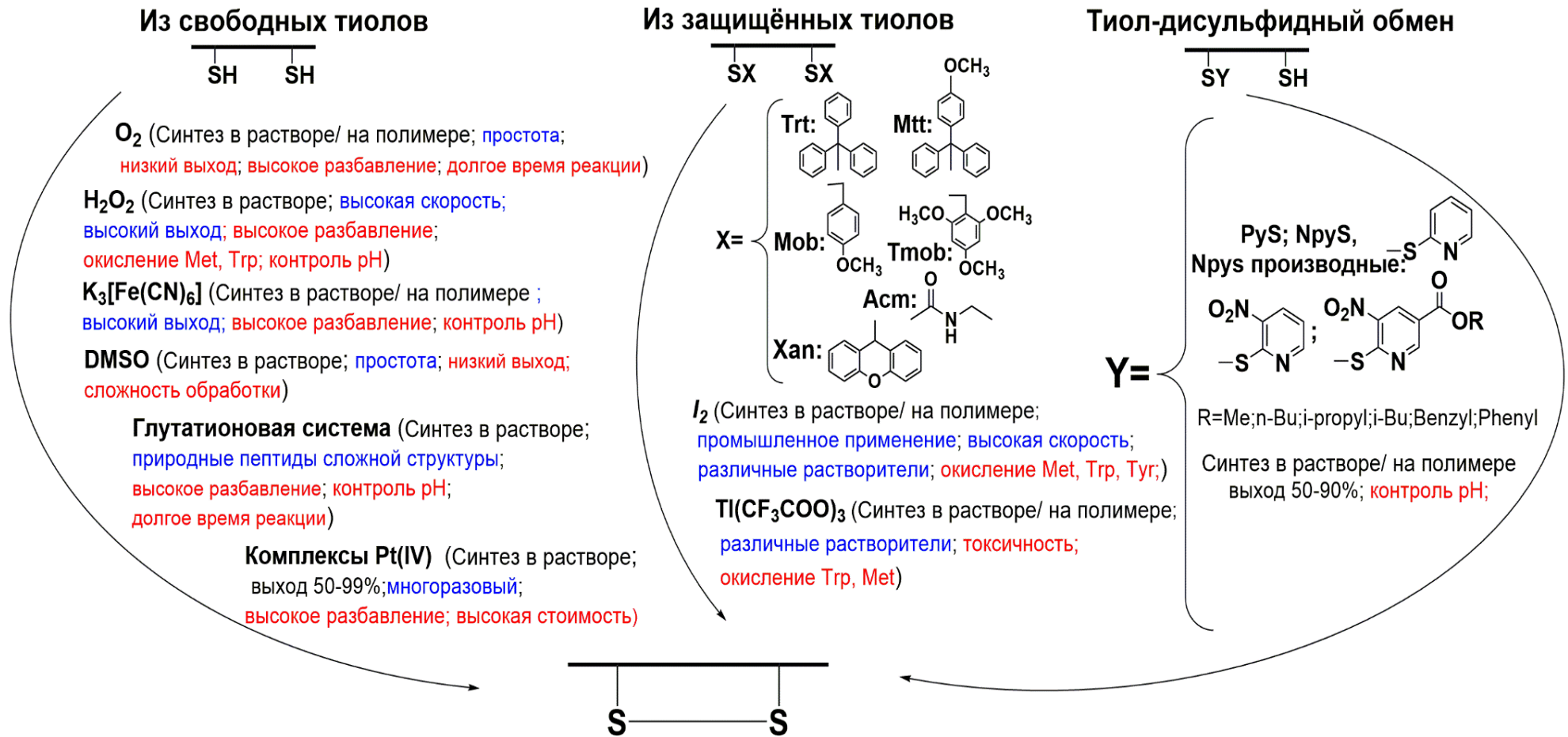
Существует ряд работ, в том числе клинических, где было показано присутствие на поверхности макрофагов рецепторов соматостатина второго типа (SSTR2) [314]. Было продемонстрировано селективное накопление  $^{68}\text{Ga}$  – DOTA-TATE в бляшках коронарных артерий, вследствие активного воспалительного процесса у пациентов с острым коронарным синдромом [315]. Синтез данного прекурсора имеет важный практический интерес в рамках общего проекта с отделом радионуклидной диагностики и позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) НМИЦ кардиологии им. Е. И. Чазова по разработке РФП

для диагностики атеросклероза. А так как атеросклероз считается основной причиной сердечно-сосудистых заболеваний, которые являются главной причиной смерти во всем мире, унося примерно 17.9 миллиона жизней ежегодно [316], своевременная диагностика и её доступность крайне необходимы, поэтому разработка крупномасштабного, высокотехнологического синтеза DOTA-TATE (8) чрезвычайно важна.

Все объекты данной работы, описанные выше, являются пептидами с одной S-S связью (Рисунок 11, 12). Получение пептидов с дисульфидными мостиками является непростой задачей, особенно в крупномасштабном синтезе таких соединений для фармацевтики. Критической стадией в синтезе таких соединений является именно замыкание S-S связи. Понимание тонкостей и особенностей этого процесса важно для препаративных целей, когда чистота и выход конечного продукта, а также простота и удобство проведения процесса является первостепенной задачей.

## **2.2. МЕТОДЫ ЗАМЫКАНИЯ ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ**

Для выбора наиболее подходящего окислителя для крупномасштабного синтеза нами была проведена сравнительная оценка различных окислителей для замыкания S-S связи. В зависимости от наличия свободной или защищённой сульфгидрильной группы линейного предшественника применяются различные окислители (Рисунок 13).



**Рисунок 13.** Методы создания внутримолекулярной дисульфидной связи.  
Синим цветом обозначены *плюсы* метода, а красным – *минусы*.

Обычно для образования внутримолекулярной дисульфидной связи пользуются тремя подходами. Первый подход предполагает замыкание S-S мостика окислением линейного предшественника, в котором все сульфгидрильные группы находятся в свободной форме. Этот подход можно подразделить на две группы в зависимости от выбора окислителя. Такие реагенты как  $O_2$ ,  $H_2O_2$ , DMSO,  $K_3[Fe(CN)_6]$ , система глутатиона применяются довольно давно и хорошо себя зарекомендовали при синтезе определённых пептидов с одним или несколькими дисульфидными мостиками [317].

Второй класс окислителей представляет собой различные реагенты, иммобилизованные на полимерных носителях и комплекс Pt(IV), нанесённый на наносферы [318]. Плюсом иммобилизованных окислителей является их простое удаление после циклизации и возможность многократного использования, однако их применение пока ограничивается лабораторными исследованиями из-за слишком высокой стоимости для комплексов Pt(IV), неудовлетворительными выходами и побочными реакциями. Создание S-S связи при втором подходе происходит путём прямой конверсии S-защищённого тиольного предшественника. Этот подход применяется для взаимодействия двух сульфгидрильных остатков, которые имеют одинаковые защитные группы. В зависимости от структуры определённой защитной группы скорость её отщепления при циклизации различна, что можно использовать при синтезе пептидов с несколькими дисульфидными связями. Наиболее распространёнными и применяющимися окислителями в этой методологии являются иод и трифторацетат таллия (III) [319, 320]. Однако трифторацетат таллия не только высокотоксичен, но и не всегда эффективен, поскольку выходы циклизации невелики из-за образования побочных продуктов. В этой связи данный реагент вряд ли выйдет за рамки лабораторных исследований.

В соответствии с третьим подходом дисульфидная связь замыкается в результате реакции тиол-дисульфидного обмена между активированной тиольной группой одного остатка цистеина и свободной тиольной группой другого. Наиболее исследуемыми и дающими наилучшие результаты в качестве активаторов  $-SH$  группы являются различные 2-пиридинсульфонаты [321]. Этот метод применялся при синтезе как пептидов с одной, так и несколькими дисульфидными связями, давая выходы от 20 до 90 %, но так и не вышел за пределы лабораторных исследований [321].

При использовании любого из перечисленных методических подходов на качество получаемого циклического дисульфида критически влияют такие факторы, как pH среды, природа окислителя, особенно когда исходят из тиольных предшественников, температура, время, растворитель и концентрация пептида.

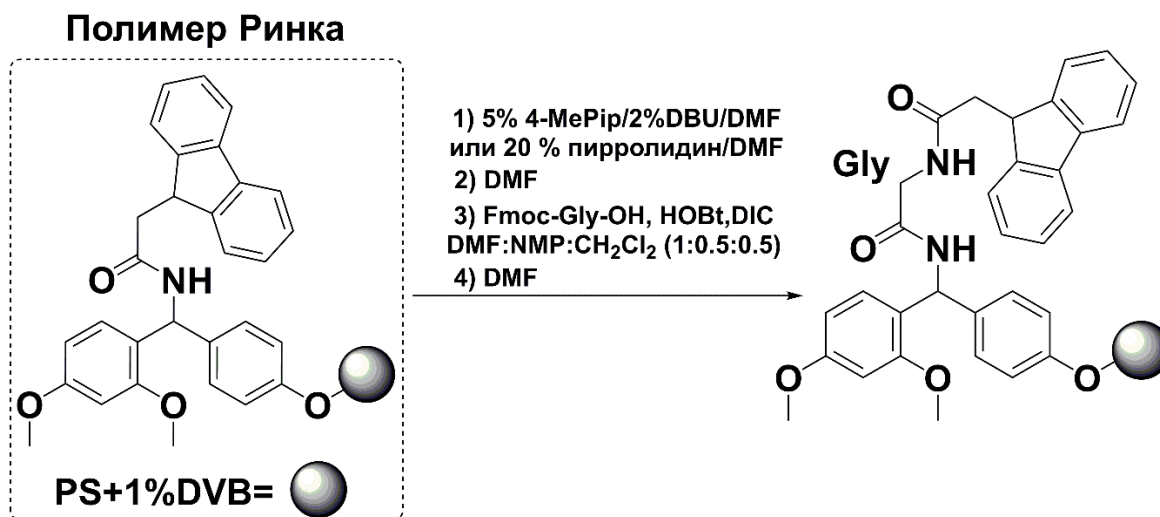
### 2.3. СИНТЕЗ НЕЙРОГИПОФИЗАРНЫХ ГОРМОНОВ И ИХ АНАЛОГОВ

К настоящему времени известны различные методы синтеза нейрогипофизарных гормонов – окситоцина (**1**) и вазопрессина – и их аналогов – дезаминоокситоцина (**2**), D-Arg<sup>8</sup>-вазопрессина (**3**), десмопрессина (**4**), атозибана (**5**) и терлипрессина (**6**), однако, согласно литературным данным, предпочтение, в основном, отдаётся синтезу в растворе [322–324].

В данной работе для синтеза линейных предшественников пептидов (**1–6**) был выбран твёрдофазный метод, который, по нашему мнению, более технологичен. Так как данные пептиды содержат С-концевую карбоксамидную группу, в качестве твёрдой фазы мы выбрали полимеры Ринка с различным начальным содержанием аминогрупп (0.47–1.1 ммоль/г) (Схема 1). В сочетании с N<sup>α</sup>-Fmoc-защитой для блокирования функциональных групп боковых цепей аминокислот использовали кислотолабильные защитные группы: Bu<sup>t</sup> – для треонина и тирозина, Voc – для орнитина и лизина, Trt – аспарагина и глутамина, Pbf – для D-Аргинина. При синтезе пептидов остаток цистеина и меркаптопропионовой кислоты защищали Trt-группой. Для отщепления Fmoc-защит использовали раствор 5% 4-MePip/2% DBU/DMF или 20 % пирролидин в DMF.

На примере синтеза атозибана (**5**) и терлипрессина (**6**) было показано, что пирролидин не уступает пиперидину по эффективности удаления Fmoc-группы и связывания образующегося дибензофульвена [325], но гораздо доступнее, что важно для крупномасштабных синтезов. Содержание и выход пептидов (**5**) и (**6**) при использовании пирролидина были сходны с содержанием и выходом, полученными при использовании пиперидина.

Для создания пептидной связи применяли DIC/НОВt-метод (Схема 1). Во всех пептидах **1–6** С-концевой аминокислотой является Gly, поэтому первый цикл синтеза идентичен (Схема 1).



**Схема 1.** Первый цикл твёрдофазного синтеза для пептидов (1–6).

Затем, в зависимости от метода создания дисульфидной связи, использовались различные линейные предшественники.

### 2.3.1. ЗАМЫКАНИЕ S-S СВЯЗИ В АТОЗИБАНА (5) И ТЕРЛИПРЕССИНЕ (6) В РАСТВОРЕ ДЕЙСТВИЕМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

В результате ТФС были получены линейные предшественники атозибана (5):

Mpa-D-Tyr(OEt)-Ile-Thr-Asn-Cys-Pro-Orn-Gly-NH<sub>2</sub> и терлипрессина (6):

H-(Gly)<sub>3</sub>-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-NH<sub>2</sub> с чистотой 76 % и 90 % по данным ВЭЖХ, соответственно.

Для циклизации атозибана и терлипрессина в растворе в качестве окислителя было решено использовать перекись водорода, т.к. ранее в лаборатории синтеза пептидов «НМИЦ Кардиологии им ак. Е.И. Чазова» МЗ РФ было проведено сравнительное изучение эффективности различных окислителей (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, O<sub>2</sub>, I<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) для замыкания дисульфидного мостика в тиольных предшественниках циклических дисульфидов в растворе и было показано, что лучшие результаты наблюдаются при использовании перекиси водорода в различных органических растворителях [326, 327]. Замыкание внутримолекулярного S-S мостика проводят в условиях высокого разбавления [326, 327], однако при проведении крупномасштабных синтезов это нетехнологично, т.к. объем реакционных смесей резко возрастает (так, при циклизации 10 г тиольного предшественника пептида объем реакционной смеси составит 10 л).

В литературе имеются отдельные упоминания о том, что введение органических растворителей в состав реакционных смесей на стадии циклизации способствует образованию внутримолекулярных дисульфидов [327]. Наши собственные данные по

синтезу октреотида [327] показывают, что в этом случае циклизация тиольного предшественника с концентрацией 10–20 мг/мл гладко проходит в метаноле. Мы провели серию экспериментов по получению атозибана и терлипрессина в водных или водно-органических растворах (H<sub>2</sub>O/изопропиловый спирт, H<sub>2</sub>O/диоксан, H<sub>2</sub>O/изопропиловый спирт/CH<sub>3</sub>CN) с использованием нарастающих концентраций линейного SH-пептида 1.0–20.0 мг/мл при pH 7.0–8.0 (Таблицы 3 и 4). Для контроля полноты протекания циклизации параллельно использовали ВЭЖХ и тест Элмана [328]. Использование органических растворителей в составе реакционной смеси при циклизации позволило нам увеличить концентрацию исходного SH-предшественника (Таблицы 3 и 4).

Таблица 3

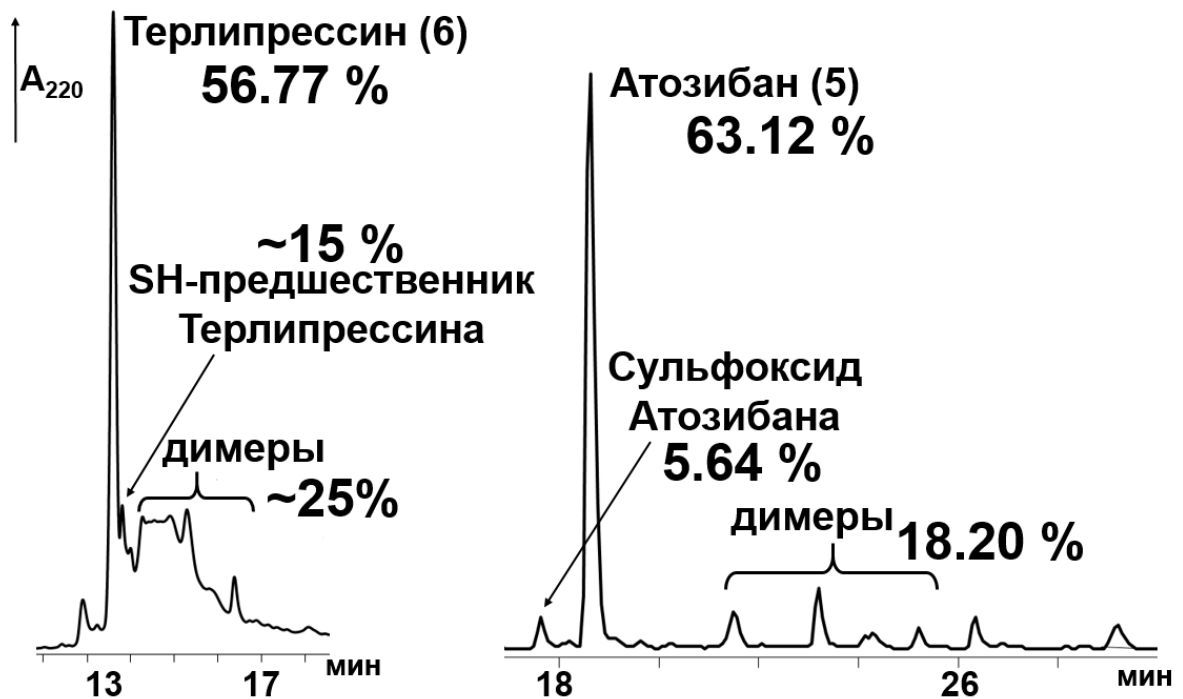
**ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ЗАМЫКАНИЯ ДИСУЛЬФИДНОЙ СВЯЗИ  
ДЕЙСТВИЕМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> НА СОДЕРЖАНИЕ ЦЕЛЕВОГО  
И ПОБОЧНЫХ ПРОДУКТОВ В РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ  
ПРИ ПОЛУЧЕНИИ АТОЗИБАНА (5) В РАСТВОРЕ**

Концентрация SH- предшественника мг/мл	pH	Растворитель	Состав реакционной смеси по ВЭЖХ, %		
			SH- предшественник	Атозибан	Димеры
1.0	7.0	H <sub>2</sub> O	0.15	74.1	10.2
5.0	7.0	H <sub>2</sub> O/ <i>i</i> -PrOH 1:1	0.24	71.0	9.28
	7.0	H <sub>2</sub> O/диоксан 1:1	0.17	62.2	14.2
10.0	7.5	H <sub>2</sub> O/ <i>i</i> -PrOH /CH <sub>3</sub> CN5:3:1	0.30	71.8	12.83
	7.5	H <sub>2</sub> O/ <i>i</i> -PrOH 1:1	0.23	73.7	10.1
20.0	7.5-8.0	H <sub>2</sub> O/ <i>i</i> -PrOH 1:1	0.26	63.12	18.2



**ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ЗАМЫКАНИЯ ДИСУЛЬФИДНОЙ СВЯЗИ  
ДЕЙСТВИЕМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> НА СОДЕРЖАНИЕ ЦЕЛЕВОГО  
И ПОБОЧНЫХ ПРОДУКТОВ В РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ  
ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ТЕРЛИПРЕССИНА (6) В РАСТВОРЕ**

Концентрация SH- предшественника мг/мл	рН	Растворитель	Состав реакционной смеси по ВЭЖХ, %		
			SH- предшественник	Терлипрессин	Димеры
1.0	7.0	H <sub>2</sub> O	4.00	88.7	2.41
5.0	7.0	H <sub>2</sub> O/ <i>i</i> -PrOH 1:1	13.91	70.38	5.22
10	7.5	H <sub>2</sub> O/ <i>i</i> -PrOH 1:1	16.01	63.91	4.90
20	7.5-8.0	H <sub>2</sub> O/ <i>i</i> -PrOH 1:1	~ 20	56.77	~ 20



**Рисунок 14.** Фрагменты профилей аналитических ВЭЖХ продуктов замыкания S-S мостика в терлипрессине (6) и атозибана (5) в растворе при концентрации SH-предшественника 20 мг/мл в течение 15 мин действием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в смеси H<sub>2</sub>O/*i*-PrOH(1:1).

Как видно из Таблиц 3, 4 и Рисунка 14 при циклизации в растворе нам не удалось избежать образования побочных продуктов с межмолекулярными дисульфидными связями – параллельных и антипараллельных димеров, – структура которых после выделения из реакционной смеси с помощью ВЭЖХ была подтверждена масс-спектрометрией. При оценке результатов циклизации нами учитывалось суммарное количество димеров. В случае обоих пептидов в спектрах ESI (+) фракций, идентифицированных как димерные, наблюдались: в случае атозибана (5) – единственный пик молекулярного иона 1988.6, а в случае терлипрессина (6) – пик молекулярного иона 2454.76. При этом в интервале концентраций исходного SH-предшественника атозибана от 1 до 10 мг/мл содержание побочных продуктов практически не менялось и составляло около 10% (см. табл. 1).

При повышении концентраций исходного SH-предшественника терлипрессина от 1 до 10 мг/мл, количество побочных продуктов увеличивалось. При повышении концентрации исходного SH-предшественника атозибана и терлипрессина до 20 мг/мл количество дисульфидных димеров возрастало до 18.20 или 25.00 %, соответственно (см. табл. 3, 4). Кроме того, при концентрации линейного предшественника 20 мг/мл для атозибана практически не наблюдается оставшегося линейного предшественника, а для терлипрессина его количество нарастает.

Как видно на рисунке 14, SH-предшественнику терлипрессина соответствует близлежащий с целевым продуктом пик, который довольно сложно отделим с помощью препаративной ВЭЖХ. И из-за сложности очистки и больших потерь выход терлипрессина на стартовую аминокислоту составлял менее 15 %. Кроме того, оказалось, что димеры атозибана имеют более низкую растворимость, чем атозибан (5), и существенно осложняют выделение целевого продукта.

Лучшие результаты при замыкании S-S мостика в растворе для пептидов (5) и (6) были получены при использовании перекиси водорода в водно-органической среде при концентрации 1 мг/мл. При увеличении концентрации пептида нарастает количество побочных продуктов. Окисление происходило в течение 15 минут. После завершения реакции pH реакционной смеси доводили до 4 с помощью уксусной кислоты, и целевой пептид выделяли с помощью препаративной ВЭЖХ. Стоит отметить, что в случае атозибана (5) на стадии подкисления реакционной смеси нельзя применять трифторуксусную кислоту, так как наличие остаточных количеств  $H_2O_2$  может привести к образованию соответствующего сульфоксида (Рисунок 14). Такие побочные продукты были нами выделены. В масс-спектре ESI (+) наблюдается пик молекулярного иона (1010), соответствующий сульфоксиду атозибана.

Работая в условиях высокого разбавления, довольно сложно синтезировать сотни граммов пептидов, и главная причина неудач лежит в необходимости концентрирования реакционных смесей после циклизации, которое зачастую сопровождается побочными реакциями. Так, для получения 10 граммов циклического пептида фармакопейного качества (чистотой более 98 %) придётся проводить циклизацию как минимум 30 г SH-предшественника в ~30 л растворителя.

Полученные результаты побудили нас продолжить поиски оптимальной методики. Мы предположили, что нужно поменять подход к проведению замыкания S-S связи. К настоящему времени замыкание дисульфидной связи, в основном, проводят в растворе, что часто сопровождается побочными реакциями, а выходы целевых дисульфидов составляют не более 5–30 % [322, 329, 12]. Простая идея проведения всех стадий пептидного синтеза на полимере может добавить гибкость химическому процессу и существенно его упростить.

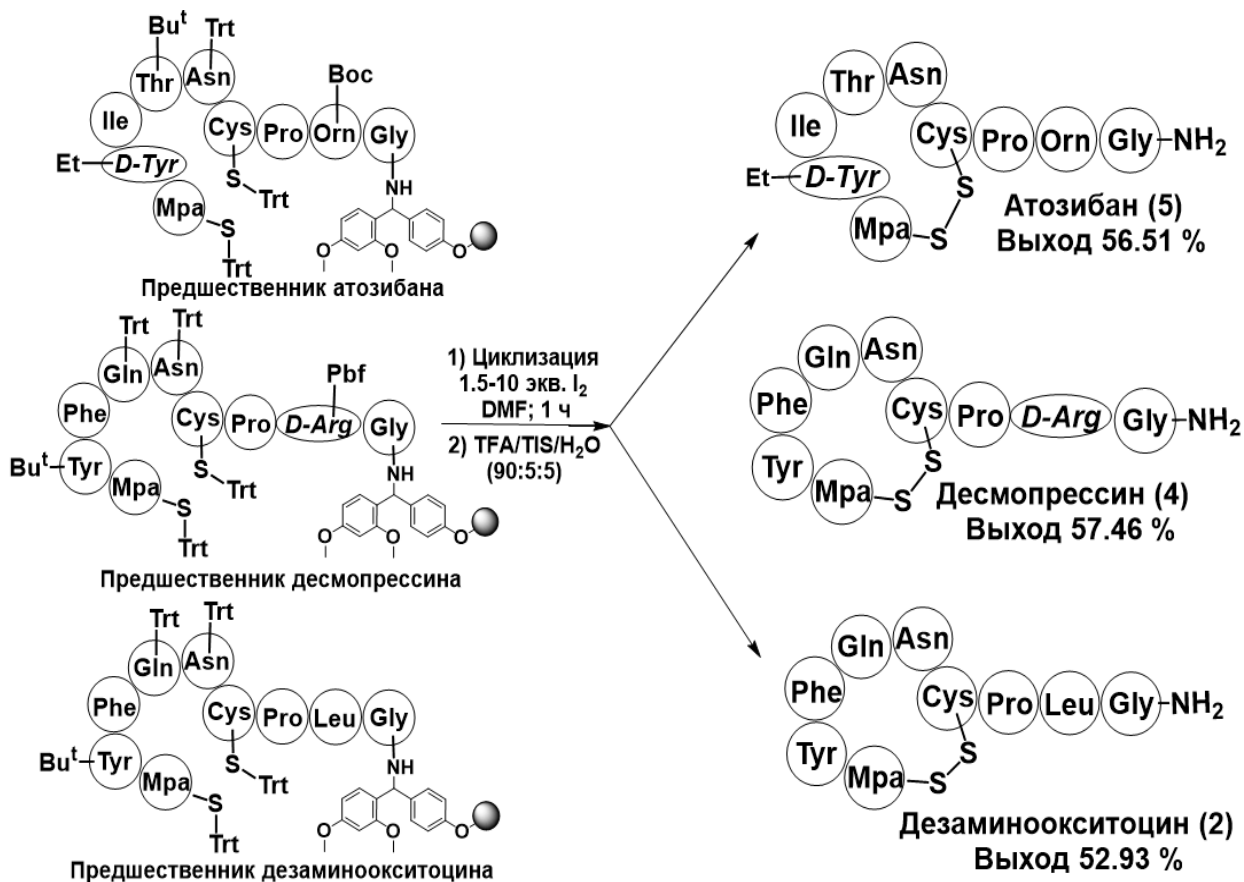
В недавнем времени стали появляться исследования по созданию S-S мостика на полимерном носителе, при которых выходы циклических продуктов достигают 50–75 % [12, 330, 331]. Главное отличие от циклизации в растворе – это возможность проведения циклизации в очень концентрированных растворах, практически в 100 раз (10 г ~ 0.1 л). При циклизации на твёрдой фазе молекулы полимерного носителя (полистирола, содержащего 1 % дивинилбензолных поперечных сшивок) образуют трехмерную динамическую матрицу, где циклизация происходит внутри отдельных ячеек, что приводит к значительному усилению эффекта клетки [332] и, как следствие, к эффекту псевдоразведения [333]. Кроме того, увеличение расстояния между молекулами за счёт уменьшения ёмкости полимера сводит межмолекулярные взаимодействия практически к нулю без изменения объёма растворителя.

Циклизация на твёрдой фазе позволяет обойти проблему растворимости SH-предшественника, с которой мы столкнулись при циклизации атозибана (**5**) в растворе. Также при окислении на полимере значительно облегчён процесс обработки реакционной массы, как правило, – это лишь промывки пептидполимера для удаления избытка окислителя.

Исходя из всех вышеперечисленных преимуществ циклизации на твёрдой фазе, мы решили синтезировать атозибан (**5**) и другие дезаминоаналоги нейрогипофизарных гормонов – десмопрессин (**4**) и дезаминоокситоцин (**2**) – полностью на твёрдой фазе, включая стадию замыкания S-S мостика.

### 2.3.2. ЗАМЫКАНИЕ S-S СВЯЗИ В ДЕЗАМИНОАНАЛОГАХ НЕЙРОГИПОФИЗАРНЫХ ГОРМОНОВ (2, 4, 5) НА ТВЁРДОЙ ФАЗЕ ИОДОМ

После 8 циклов твёрдофазного синтеза были получены пептидилполимерные предшественники атозибана (5), десмопрессина (4) и дезаминоокситоцина (2) (Схема 2).



**Схема 2.** Схема замыкания S-S связи в атозибане (5), десмопрессине (4) и дезаминоокситоцине (2) на твёрдой фазе с использованием в качестве окислителя I<sub>2</sub>.

Конечно, при проведении циклизации на твёрдой фазе выбор окислителей для создания S-S мостика ограничен. К примеру, различные полимерные окислители, иммобилизованные комплексы платины и перекись водорода невозможно применять в ТФС.

Наиболее же применяемыми окислителями для циклизации на твёрдой фазе являются иод и Tl(CF<sub>3</sub>COO)<sub>3</sub>. Последний используется, в основном, в лабораторной практике, а иод также находит применение и в крупномасштабном пептидном синтезе [12, 330, 331]. Иод хорошо растворим в органических растворителях, обеспечивающих хорошую сольватацию пептидилполимера, и при его использовании наблюдается прямая конверсия цистеин-защищённого пептида в циклический дисульфид. Были проведены

систематические исследования по изучению зависимости количества окислителя и времени проведения циклизации на состав образующихся примесей.

Таблица 5

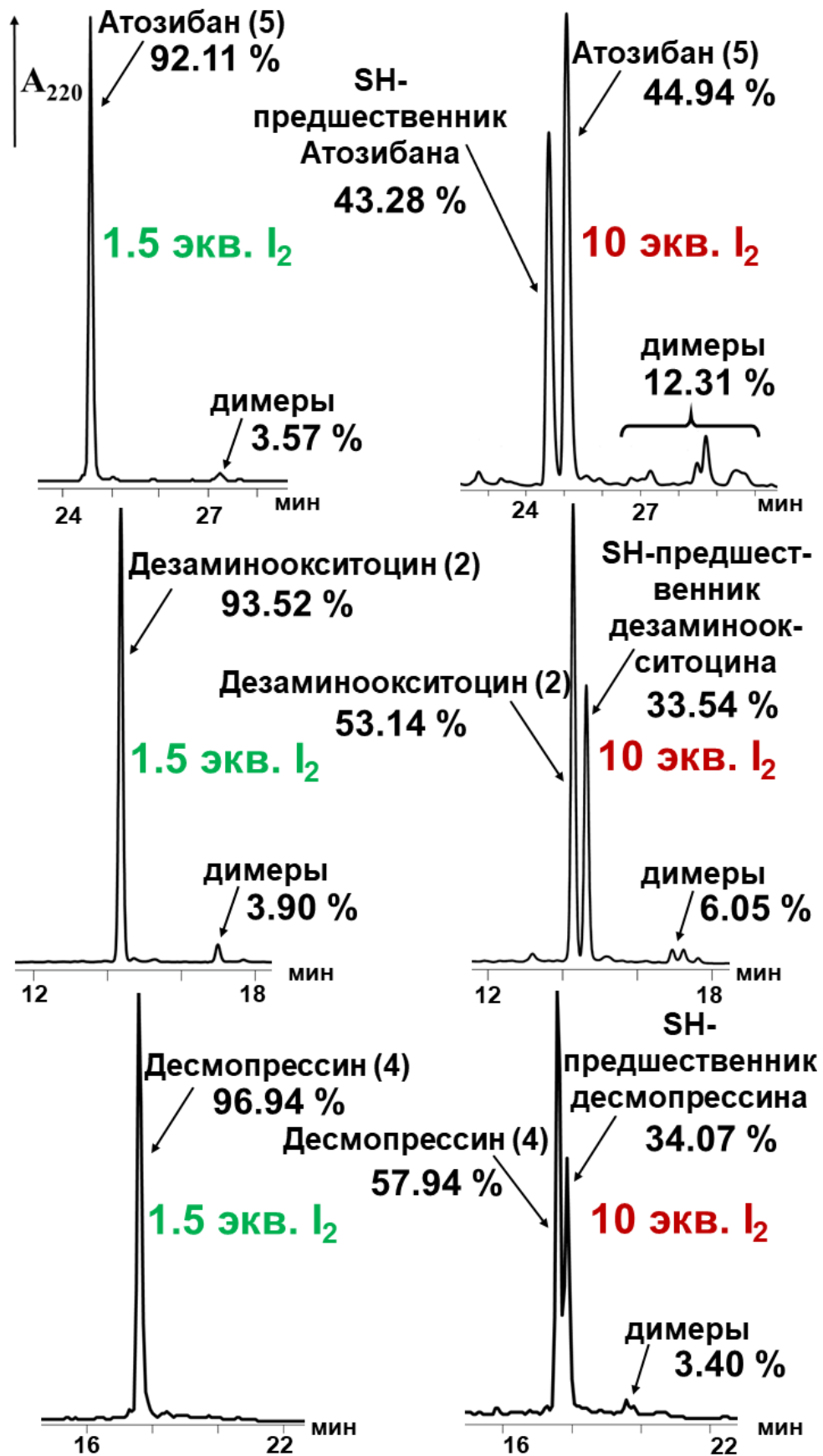
**СОСТАВ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ ЦИКЛИЗАЦИИ АТОЗИБАНА (5),  
ДЕСМОПРЕССИНА (4) И ДЕЗАМИНООКСИТОЦИНА (2) НА ТВЁРДОЙ ФАЗЕ  
ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ 1.5-10 ЭКВ. I<sub>2</sub> В DMF  
В ТЕЧЕНИЕ 1 Ч ПО ДАННЫМ ВЭЖХ**

Название пептида	Количество изб. I <sub>2</sub>	S-S-пептид, %	SH-предшественник, %	Димеры, %
Атозибан (5)	1.5	92.11	-	3.57
Десмопрессин (4)		96.94	-	-
Деаминоокситоцин (2)		93.52	-	3.90
Атозибан (5)	3	85.51	3.71	4.80
Десмопрессин (4)		88.73	2.14	3.26
Деаминоокситоцин (2)		87.41	2.84	4.96
Атозибан (5)	5	71.22	11.21	4.93
Десмопрессин (4)		81.86	9.31	3.11
Деаминоокситоцин (2)		78.65	10.08	5.82
Атозибан (5)	10	44.94	43.28	12.31
Десмопрессин (4)		57.94	34.07	3.40
Деаминоокситоцин (2)		53.14	33.54	6.05

Yang и соавторы [331] считают, что «сухость» пептидилполимерного линейного предшественника может влиять на качество целевого дисульфида [331]. Мы провели несколько экспериментов.

В первом эксперименте после присоединения меркаптопропионовой кислоты пептидилполимерный линейный предшественник промывали DMF и хлористым метилом, а затем высушивали в течение 24 часов, а во втором только промывали DMF и сразу добавляли раствор окислителя и проводили циклизацию, минуя стадию сушки. В обоих случаях наблюдались схожие содержания циклического дисульфида в техническом продукте и его конечный выход после очистки. Проведённое исследование показывает, что «сухость» смолы не влияет на качество сырого дисульфида.

Конверсия полностью защищённых производных пептидов (2), (4), (5) в циклические дисульфиды проводилась действием различных избытков иода (1.5–10 экв.) (Рисунок 15) в DMF в течение 1–3 часов (Таблица 5). Замыкание S-S мостика проводили в минимально необходимом объёме растворителя (12.6 ммоль пептидов (2), (4), (5) в 250 мл растворителя), тогда как для такого же масштаба циклизации в растворе потребовалось от 6 до 12 литров растворителя.



**Рисунок 15.** Фрагменты профилей аналитических ВЭЖХ продуктов при замыкании S-S мостика в атозибране (5), десмопрессине (4) и дезаминокситоцине (2) на твёрдой фазе в течение 60 мин действием I<sub>2</sub> в DMF с использованием различных избытков иода.

После проведения циклизации раствор пептидполимера отфильтровывали и промывали, минуя стадию концентрирования больших объёмов реакционной смеси перед очисткой ВЭЖХ, которая необходима при проведении реакции в растворе.

Во всех экспериментах при увеличении количества окислителя в реакционной смеси неожиданно нарастает содержание линейного SH-предшественника пептидов **(2)**, **(4)**, **(5)** и димеров. Увеличение времени проведения циклизации до 180 минут никак не влияло на качество продукта (Таблица 5). Для идентификации продуктов циклизации были специально получены и охарактеризованы SH-предшественники атозибана, десмопрессина и дезаминокситоцина. В масс-спектрах ESI (+) технических смесей циклизации (3–10 экв. I<sub>2</sub>) наблюдался пик молекулярного иона, соответствующий линейным SH-пептидам. В масс-спектрах ESI (+) технических смесей циклизации пептидов **(2)**, **(4)**, **(5)** при использовании 1.5 экв. I<sub>2</sub> не наблюдался пик молекулярного иона, соответствующий линейным SH-пептидам, что ещё раз говорит о полноте замыкания S-S мостика в данных условиях.

Также нами было изучено время, необходимое для замыкания дисульфидной связи при синтезе десмопрессина. Как оказалось, уже через 3 мин проведения циклизации наблюдается 86.33 % S-S-продукта, а оставшегося SH-предшественника – всего лишь 5 %. Через 45 мин – линейного предшественника остаётся 3 %, а через 1 ч происходит полная конверсия в циклический дисульфид. Именно этот эксперимент показывает важность проведения циклизации дезаминоаналогов в укрупнённом масштабе не менее 1 ч, так как именно полная конверсия в S-S-пептид позволяет избежать проблем с выделением и очисткой требуемого продукта.

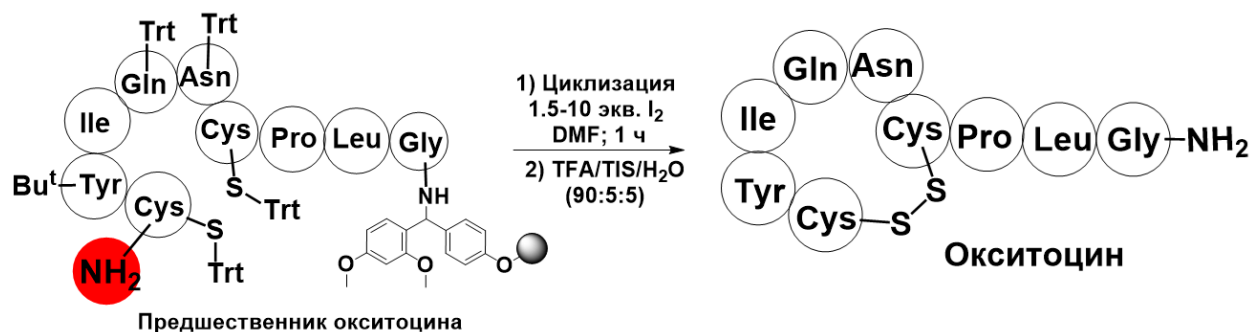
Был установлен допустимый диапазон количества избытков иода для замыкания S-S мостика в пептидах **(2)**, **(4)**, **(5)**. Оказалось, что он довольно мал, и уже при 3 экв. I<sub>2</sub> наблюдается появление SH-предшественника и понижение чистоты технического продукта почти на 10 % (Рисунок 15).

Следует отметить, что при замыкании дисульфидной связи в атозибанае **(5)**, десмопрессине **(4)** и дезаминокситоцине только при использовании низких количеств окислителя (1.5 экв. I<sub>2</sub>) в DMF в течение 1 часа, удалось достичь чистоты технических продуктов **(2)**, **(4)**, **(5)** выше 92 % и выхода более 52 % (для загрузки в 12.6 ммоль), по сравнению с выходом в ~ 15 % (для загрузки в 14 ммоль) при циклизации в растворе. Выход был рассчитан на стартовую аминокислоту, включая ТФС, циклизацию и очистку с помощью препаративной ВЭЖХ. Чистота пептидов **(2)**, **(4)**, **(5)** составила выше 99.3 %.

### 2.3.3. ЗАМЫКАНИЕ S-S СВЯЗИ В ОКСИТОЦИНЕ (1) НА ТВЁРДОЙ ФАЗЕ ИОДОМ

После синтеза дезаминоаналогов (2), (4), (5) в препаративных масштабах с высоким выходом мы попробовали использовать тот же подход в синтезе окситоцина. Известно, что замыкание S-S мостика в окситоцине довольно часто сопровождается образованием большого количества димерных и олигомерных продуктов [322, 334]. Именно поэтому его циклизацию проводят в растворе при больших разбавлениях [335]. Описанные в литературе опыты по циклизации окситоцина на твёрдой фазе не выходят за рамки лабораторных исследований [335].

В результате ТФС был получен пептидилполимерный защищённый S-Trt предшественник окситоцина с незащищённой N-концевой аминогруппой (Схема 3).

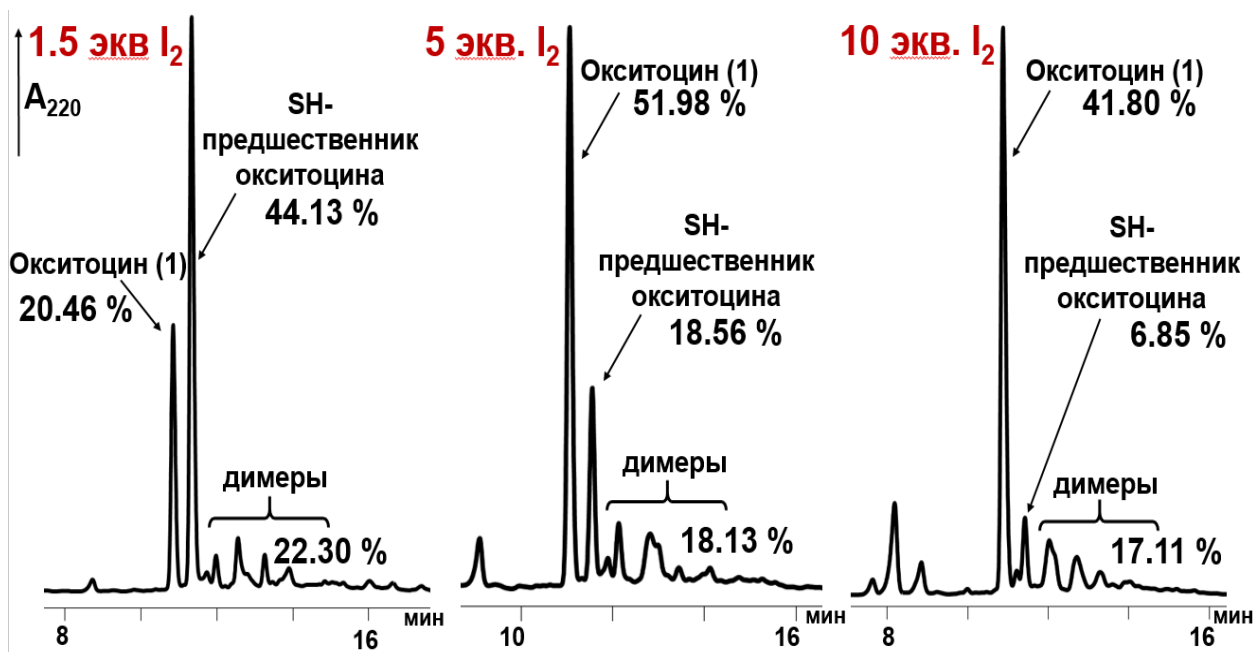


**Схема 3.** Схема замыкания S-S связи в Окситоцине (1) на твёрдой фазе с использованием I<sub>2</sub>, исходя из аминоксвободного пептидилполимерного предшественника окситоцина.

Циклизацию проводили в течение часа в DMF, используя в качестве окислителя I<sub>2</sub> в избытке от 1.5 до 10 экв. Во всех случаях содержание окситоцина в техническом продукте ТФС не превышало 51.98 %, кроме того, наблюдалось образование большого количества побочных продуктов (Рисунок 16).

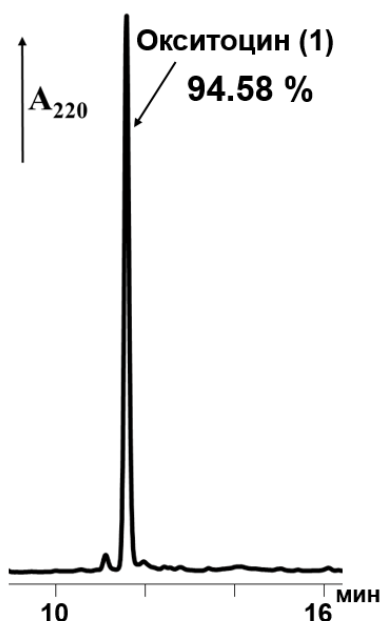
Сопоставляя полученные данные с результатами синтеза дезаминоаналогов окситоцина, описанных выше, мы предположили, что такой неудачный результат может быть связан с наличием незащищённой -NH<sub>2</sub> группы. Для проверки нашего предположения был проведён ТФС, в котором на завершающей стадии наращивания пептидной цепи вместо Fmoc-Cys(Trt)-OH присоединяли Boc-Cys(Trt)-OH. Замыкание S-S связи в N<sup>α</sup>-Boc-защищенном пептидилполимере проводилось с использованием 5-кратных избытков иода в тех же условиях, которые применяли для циклизации аминоксвободного предшественника (Рисунок 16).





**Рисунок 16.** Фрагменты профилей аналитических ВЭЖХ продуктов при замыкании S-S мостика в Окситоцине (1) на твёрдой фазе в течение 60 мин действием различных избытков  $I_2$  в DMF, исходя из аминоксвободного предшественника окситоцина.

Результат твёрдофазной циклизации Вос-защищённого предшественника окситоцина был поразителен – содержание целевого пептида в сыром продукте ТФС составило 94.58 % (Рисунок 17). При этом наблюдалось минимальное количество примесей, что облегчило дальнейшую очистку. Особенно стоит отметить, что такое высокое содержание в техническом продукте было получено при проведении его синтеза в укрупнённом масштабе. Суммарный выход окситоцина (1) фармакопейного качества также был высоким и составил 52.70 %.

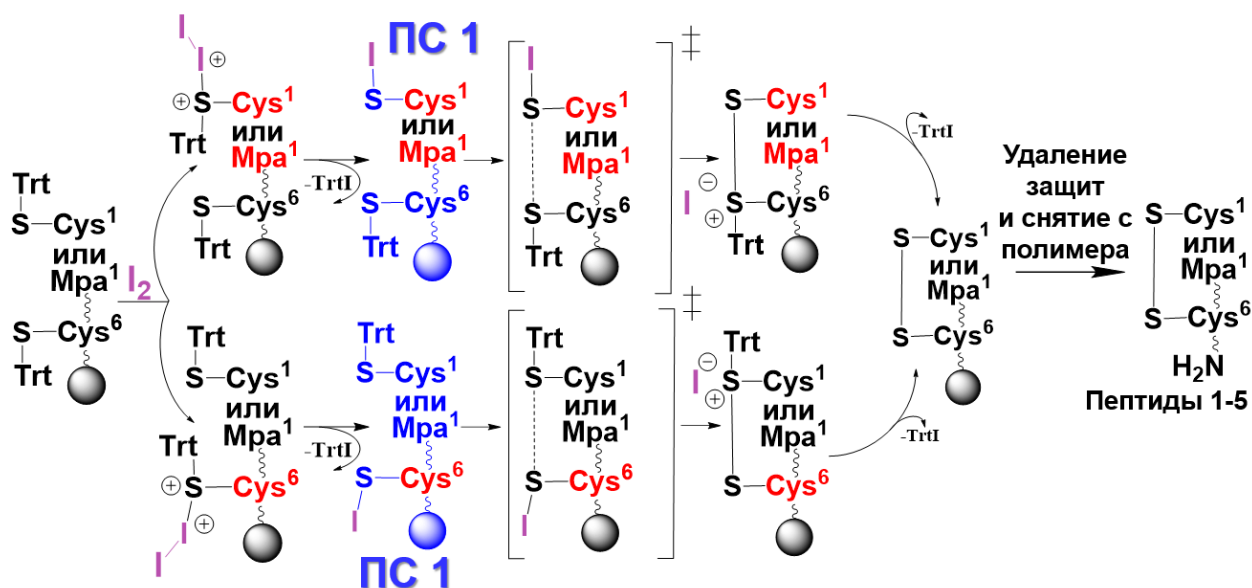


**Рисунок 17.** Фрагмент профиля аналитической ВЭЖХ продуктов замыкания S-S мостика в Вос-защищённом предшественнике Окситоцина (1) на твёрдой фазе действием 5-кратного избытка I<sub>2</sub> в DMF в течение 60 мин.

### **2.3.4. ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА ЗАМЫКАНИЯ S-S СВЯЗИ В НЕЙРОГИПОФИЗАРНЫХ ГОРМОНАХ И ИХ АНАЛОГАХ (1-6) *IN SILICO***

Полученные при синтезе окситоцина результаты побудили нас более детально изучить процесс замыкания внутримолекулярной дисульфидной связи во всех объектах работы **1–8** и оценить влияние статуса N-концевой аминогруппы (Вос-защищённой или свободной) на качество целевых циклических пептидов. Несмотря на то что создание S-S мостика изучается уже более 50 лет, до сих пор существуют различные мнения относительно механизма этой реакции [5, 12, 317, 331, 336].

Кроме того, в зависимости от используемого подхода (окислитель, растворитель, концентрация, использование различных защит на сульфгидрильных группах) механизм циклизации будет различен. Чтобы оценить влияние защиты N-концевой α-аминогруппы на легкость замыкания дисульфидной связи в выбранных пептидах, мы решили использовать молекулярное моделирование этого процесса в условиях прямой конверсии соответствующих S-Trt-защищенных пептидполимеров в циклические дисульфиды под действием иода в DMF. Следуя предполагаемому механизму данной реакции, исходя из защищённого Cys(Trt)-пептидполимерного предшественника, используя в качестве окислителя I<sub>2</sub> [12, 331, 336], мы предположили, что S-S связь в пептидах **1–8** образуется в промежуточном продукте ПС1, содержащем тритильную группу на одном атоме серы и иод – на другом. В зависимости от места нахождения серосодержащей кислоты в пептидном остове можно предположить три варианта протекания реакции, представленных соответствующими схемами для защищённых предшественников пептидов (**1–5**) – (Схема 4), для пептида (**6**) – (Схема 5) и для пептидов (**7**), (**8**) – (Схема 6).



**Схема 4.** Предполагаемый механизм замыкания S-S связи в окситоцине (1), D-Arg<sup>8</sup>-вазопрессине (2), дезаминокситоцине (3), десмопрессине (4) и атозибане (5), исходя из Cys(Trt)/Mpa(Trt) защищённого линейного предшественника. Красным цветом выделено возможное место присоединения иода.

Во всех случаях иод может присоединиться только к одному из атомов серы, поэтому реакция может протекать в двух направлениях, что мы и постарались доказать с помощью молекулярного моделирования в Maestro 10.6 (Schrodinger) [337], используя силовое поле OPLS3 [338] и модель неявного растворителя ( $\epsilon(\text{DMF}) = 36.71$ ).

Поскольку силовое поле OPLS3 не позволяет безопасно моделировать переходные состояния, а упрощение системы, позволяющее моделировать ее методами квантовой химии, может привести к потере важных взаимодействий, мы оценили энергии преактивации (т. е. энергии, соответствующие переходу в состояние готовности к реакции (СГР) (Рисунки 18, 19, 26), в котором атомы серы в PC1 сближаются на расстояние 4 ангстрема, следуя гипотезе о том, что изменения конформаций защищённых предшественников соединений **1–8**, необходимые для сближения атомов серы друг с другом, ответственны за разницу в энергиях активации образования S-S связи в этих пептидах.

Конформационный поиск в низкочастотном режиме был выполнен в макромоделе Шредингера для двух состояний (PC1 и PC1-СГР на Рисунках 18, 19, 26) обоих защищённых предшественников пептидов (**1–8**) с альтернативной локализацией Trt группы и I на атомах серы. Конформационный поиск PC1-СГР был выполнен из структуры с самой низкой энергией соответствующего PC1. После проведения молекулярного моделирования для каждого из объектов мы проверяли проделанные расчеты экспериментально.

Молекулярное моделирование показало, что энергия предварительной активации (преактивации ( $E_{\text{pre-act}}$ )) для сближения атомов серы на расстояние 4 Å в дезаминоаналогах нейрогипофизарных гормонов (**2**, **4**, **5**) зависит от места присоединения иода – к атому серы цистеина или меркаптопропионовой кислоты. Для дезаминоокситоцина (**2**) она минимальна и составляет всего 0.1 ккал/моль, когда иод находится на цистеине, но становится равной 6 ккал/моль, когда иод присоединяется к атому серы Мра.

Похожая тенденция наблюдается и для защищённого десмопрессина (**4**). Однако в этом случае энергия преактивации практически на порядок больше и составляет 12 ккал/моль, когда иод находится на Cys<sup>6</sup>, и 18 ккал/моль, когда находится на меркаптопропионовой кислоте.

Интересно, что для атозибана (**5**) ситуация противоположна:  $E_{\text{pre-act}}$  составляет всего 5 ккал/моль, при присоединении иода к атому серы Мра, но увеличивается практически в два раза – до 12 ккал/моль – если иод находится на Cys<sup>6</sup>. Можно предположить, что такая разница в направлении реакции и значениях преактивационной энергии зависит от структурных особенностей защищённых пептидов.



связано ли это различие с влиянием N-концевой свободной аминогруппы (Рисунок 18), мы рассчитали энергию пре-активации для защищённого окситоцина с Вос-защищённой аминогруппой. Поразительно, но защита аминогруппы резко снизила энергию предварительной активации Cys<sup>1</sup>/Cys<sup>6</sup>-иодированного ПС1, которая составила всего 7 и 8 ккал/моль, что близко к наиболее реакционноспособным промежуточным продуктам дезаминоаналогов нейрогипофизарных гормонов **2, 4, 5**.

Таким образом, наличие Вос-защиты изменяет геометрию молекулы так, что энергия преактивации, необходимая для сближения атомов серы, снижается на 4 ккал/моль (если иод находится на остатке Cys<sup>1</sup>) или 15 ккал/моль (если иод находится на остатке Cys<sup>6</sup>).

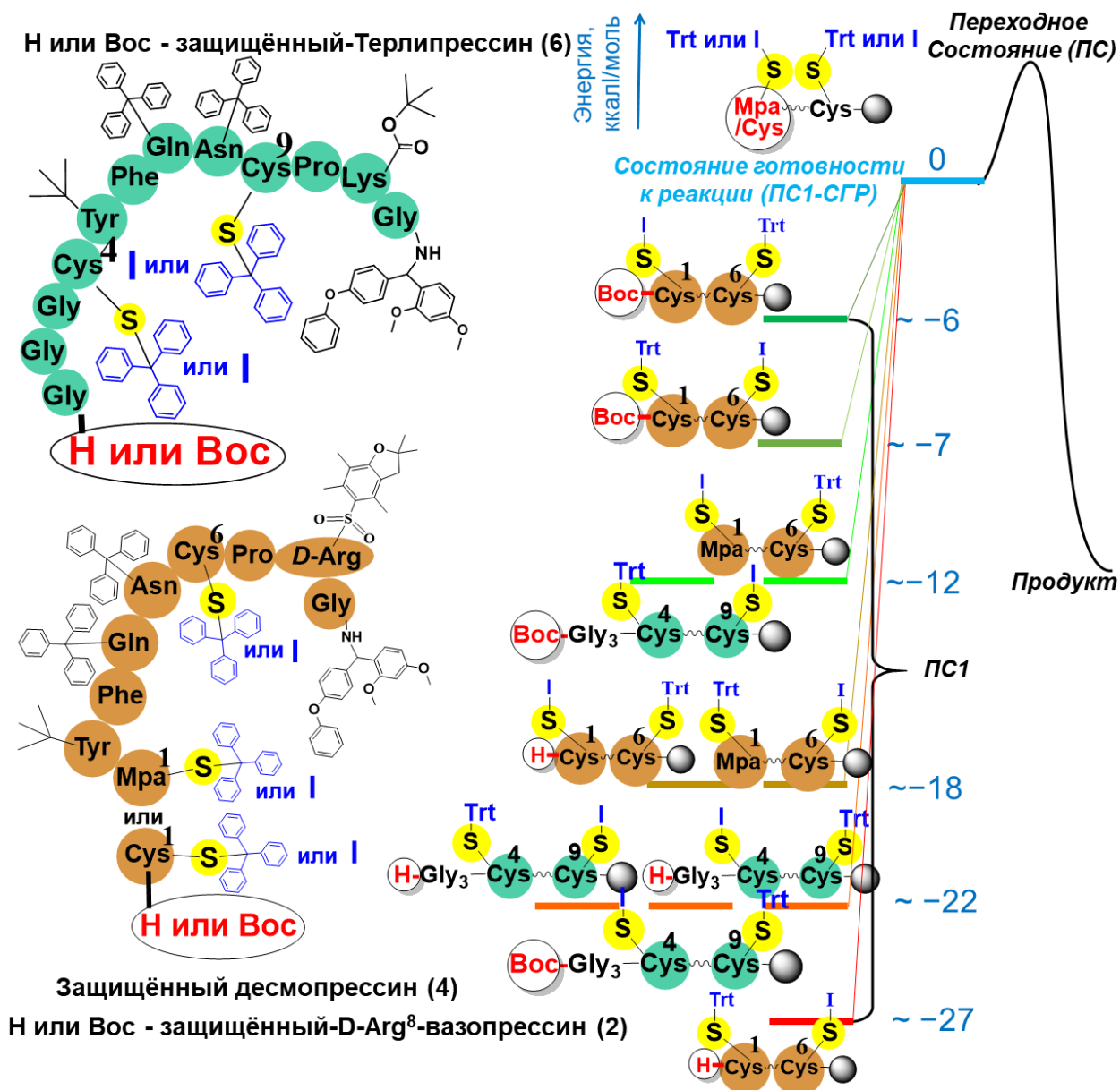
Так как экспериментальные результаты твёрдофазной циклизации соответствующих N<sup>α</sup>-Вос-защищённого и аминосвободного пептидилполимерных предшественников окситоцина, описанные в разделе 2.3.3., полностью коррелируют с данными молекулярного моделирования, мы решили провести аналогичные исследования для другого пептида и сравнить расчётные и экспериментальные данные замыкания S-S мостика на твёрдой фазе в синтезе аналогов вазопрессина с различной структурой N-концевой аминокислоты: дезаминоаналог D-Arg<sup>8</sup>-вазопрессина – десмопрессине с заменой N-концевого остатка цистеина меркаптопропионовой кислотой, а также N<sup>α</sup>- Вос-защищённом и аминосвободном пептидилполимерных предшественниках D-Arg<sup>8</sup>-вазопрессина.

Аналогично вышеприведенным данным, мы с помощью молекулярного моделирования оценивали энергии преактивации, необходимые в случае аналогов вазопрессина для сближения двух атомов серы на расстояние 4 Å. Молекулярное моделирование показало схожую тенденцию с защищёнными аминосвободными пептидилполимерными предшественниками окситоцина. Иод предпочтительнее присоединяется к Cys<sup>1</sup>, чем к Cys<sup>6</sup> (Рисунок 20). E<sub>pre-act</sub> для защищённых предшественников D-Arg<sup>8</sup>-вазопрессина со свободной аминогруппой составляет 18 ккал/ моль (если иод находится на остатке Cys<sup>1</sup>) или 27 (если иод находится на остатке Cys<sup>6</sup>) ккал /моль. Вос-защита аминогруппы значительно снизила энергию предварительной активации ПС1, соответствующего Cys<sup>1</sup>-иодированному производному, которая составила всего 6 ккал/моль, что в два раза меньше, чем для наиболее реакционноспособного промежуточного продукта десмопрессина (Рисунок 19).

Таким образом, наличие Вос-защиты изменяет геометрию молекулы так, что энергия предварительной активации (E<sub>pre-act</sub>), необходимая для сближения атомов серы, снижается на 20 ккал/моль, если I присоединяется к Cys<sup>1</sup>, и на 12 ккал/моль, если Cys<sup>6</sup>. Полученные расчётные данные для D-Arg<sup>8</sup>-вазопрессина мы проверили экспериментально. Содержание

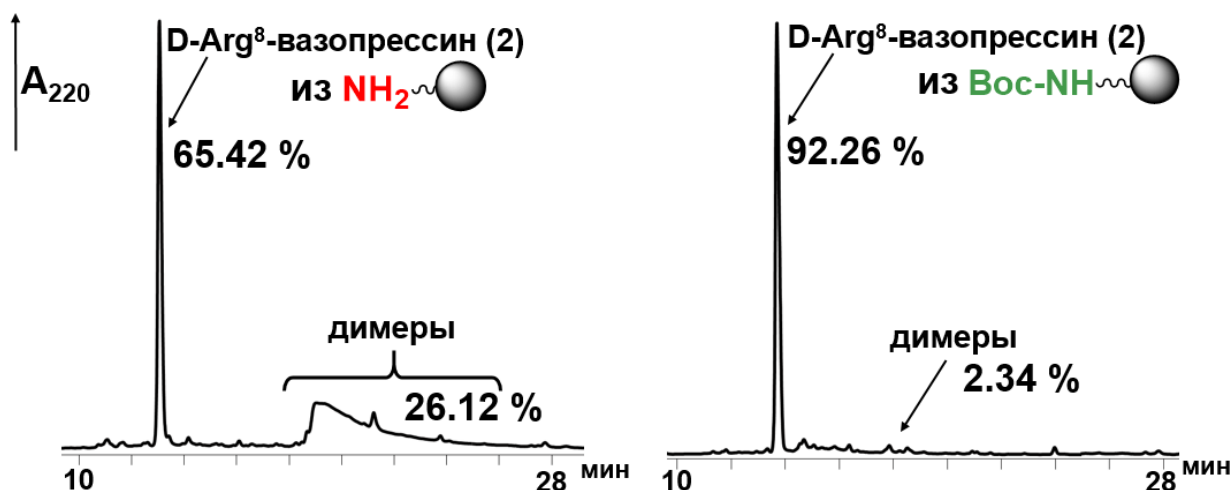
десмопрессина (**4**) в неочищенном продукте синтеза, включавшего замыкание S-S связи на полимере, было высоким – 96.94 %.

Используя тот же подход, что и при полностью твёрдофазном синтезе окситоцина, описанный в разделе 2.3.3., мы синтезировали D-Arg<sup>8</sup>-вазопрессин, исходя из свободного и Вос-защищённого предшественника. Мы использовали 5 экв. I<sub>2</sub>, так как именно при таком количестве иода наблюдалось наилучшее содержание технического окситоцина (Рисунок 16). Содержание D-Arg<sup>8</sup>-вазопрессина в техническом продукте синтеза, полученном, исходя из аминсвободного предшественника, составило всего лишь 65.42 % (Рисунок 20). Введение же Вос-защиты повысило чистоту до 92.26 %, что полностью коррелирует с данными молекулярного моделирования (Рисунок 19, 20). По-видимому, Вос-защита N-концевой аминогруппы в защищённых пептидилполимерных предшественниках пептидов 1 и 2 облегчает сближение двух атомов серы и увеличивает лёгкость замыкания S-S связи (Рисунок 18, 19).



**Рисунок 19.** Сравнение уровней энергии, соответствующих процессу сближения двух атомов серы в защищенных предшественниках D-Arg<sup>8</sup>-вазопрессина (2), десмопрессина (4) и терлипрессина (6) на полимере Ринка, в зависимости от наличия свободной, Вос-защищённой N-концевой аминогруппы или её отсутствия. Бирюзовым цветом выделена аминокислотная последовательность терлипрессина (6); коричневым цветом – D-Arg<sup>8</sup>-вазопрессина (2).

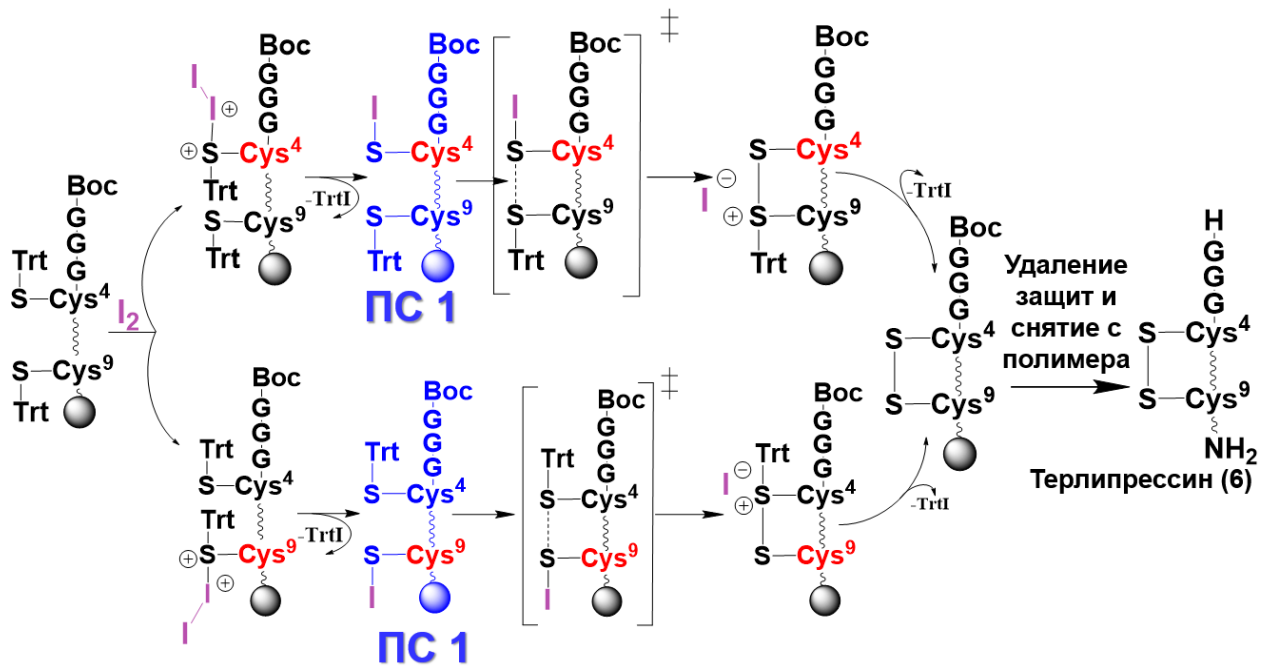




**Рисунок 20.** Фрагменты профилей аналитических ВЭЖХ продуктов замыкания S-S мостика в D-Arg<sup>8</sup>-вазопрессине (2) на твёрдой фазе действием 5 изб. I<sub>2</sub> в DMF в течение 60 мин, исходя из аминокислотного и Boc-защищённого предшественника D-Arg<sup>8</sup>-вазопрессина (2).

Выше мы рассмотрели объекты работы (1–5), чья структура построена на базе природных гормонов окситоцина или вазопрессина. У этих соединений дисульфидный цикл состоит из 6 аминокислотных остатков и локализован с первой по шестую аминокислоту. У терлипрессина S-S цикл находится в середине пептидного остова, что влияет не только на его конформационные особенности, но и на фармакокинетические свойства [339]. Увеличение длины пептидной цепи за счёт добавления триглицидина к Lys<sup>8</sup>-вазопрессину делают терлипрессин активным пролекарством с периодом полураспада около 6 ч, благодаря постепенному отщеплению остатков глицина до нативного гормона, что, в свою очередь, также определяет структуру его основных метаболитов [340].

Также, как и для пептидов 1–5, молекулярное моделирование показало, что энергия пре-активации, необходимая для сближения атомов серы на расстояние 4 Å и дальнейшего взаимодействия в пептиде (6), зависит от места присоединения атома иода к атому серы – Cys<sup>4</sup> или Cys<sup>9</sup> (Рисунок 18). Предшественник терлипрессина со свободной N-концевой аминогруппой показывает одинаковую E<sub>pre-act</sub> в 22 ккал/моль независимо от того, по какому из остатков Cys<sup>4</sup> или Cys<sup>9</sup> присоединяется иод, что заметно выше, чем для всех дезаминоаналогов 2, 4, 5 и для Boc-защищённых предшественников пептидов 1–5 (Рисунки 18, 19).



**Схема 5.** Предполагаемый механизм замыкания S-S связи в терлипрессине (6), исходя из Cys(Trt) защищённого линейного предшественника. Красным цветом выделено возможное место присоединения иода.

Вос-защита N-концевой аминогруппы в терлипрессине резко снизила энергию предварительной активации Cys<sup>9</sup> – иодированного ПС1, которая составила всего 12 ккал/моль, что очень близко к наиболее реакционноспособному промежуточному продукту десмопрессина.

Таким образом, введение Вос-защиты по N-концевой аминогруппе изменяет геометрию молекулы так, что  $E_{\text{pre-act}}$  снижается на 10 ккал/моль (Рисунок 19). Полученные результаты молекулярного моделирования для терлипрессина (6) мы применили при разработке высокотехнологической методики его получения. Имея неудачный опыт циклизации пептида (6) в растворе, описанный в разделе 2.3.1., мы решили детально изучить замыкание дисульфидной связи данного пептида на твёрдой фазе.

### 2.3.5. ЗАМЫКАНИЕ S-S СВЯЗИ В ТЕРЛИПРЕССИНЕ (6) НА ТВЁРДОЙ ФАЗЕ ИОДОМ

К настоящему времени синтез терлипрессина изучен довольно мало, и, согласно литературным данным, этот пептид получают путём твёрдофазного синтеза линейного предшественника с дальнейшей циклизацией в растворе [322, 341]. Мы решили использовать полностью твёрдофазный вариант, включая замыкание S-S мостика, и использовали собственный опыт синтеза вышеописанных пептидов (1–5). Для снятия Fmoc-защит мы применили и сравнили два деблокирующих агента: 5 % 4-метилпиперидин/2%DBU/DMF и 20 % пирролидин/DMF для полимеров Ринка

с 0.47, 0.84 и 1.1 ммоль/ г начальным содержанием аминогрупп. Во всех случаях были получены сходные результаты: технический продукт содержал более 92 % терлипрессина. Так как в главе 2.3.2. мы также показали возможность использования пирролидина в синтезе дезаминоаналогов нейрогипофизарных гормонов с высокими выходами, открывается возможность использования этого основания для крупномасштабных синтезов пептидов (1–6).

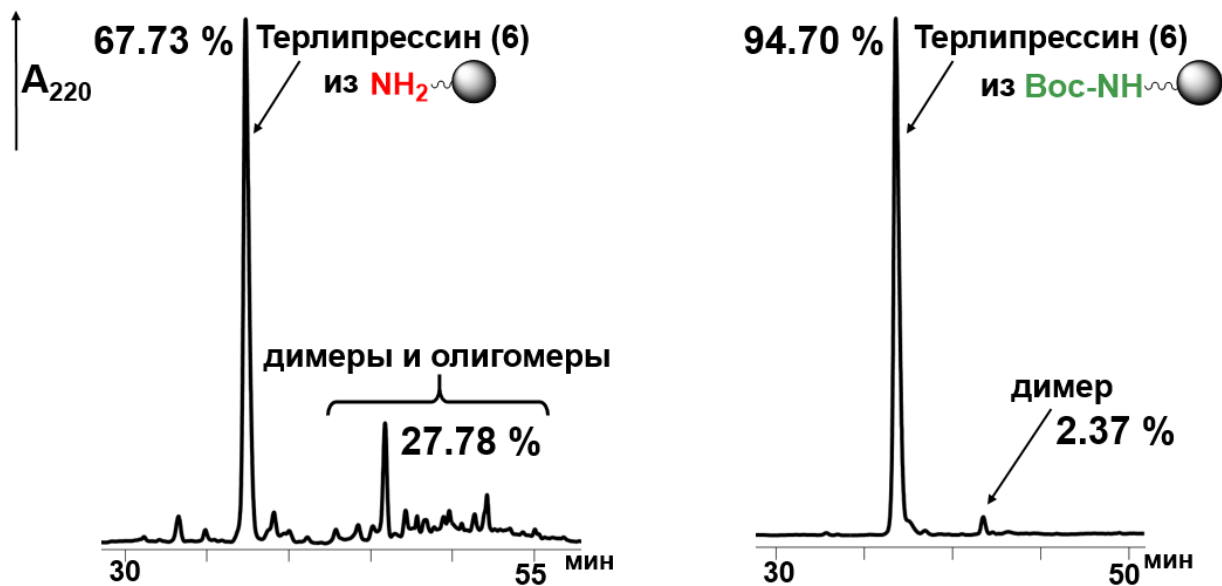
После 8 циклов твёрдофазного синтеза был получен защищённый пептидилполимерный предшественник терлипрессина. Замыкание дисульфидной связи осуществляли прямой конверсией Trt-защищённого предшественника терлипрессина в DMF, используя различные избытки  $I_2$  (Схема 6).



**Схема 6.** Схема замыкания S-S связи в Boc-защищённом пептидилполимерном предшественнике терлипрессина (6) действием  $I_2$ .

Судя по данным молекулярного моделирования, приведенным в разделе 2.3.4., замыкание S-S связи в  $N^{\alpha}$ -Boc-защищённом предшественнике терлипрессина должно протекать с большей легкостью, чем в аминоксвободном, т.к. наши расчеты показывают, что соответствующее промежуточное состояние более энергетически выгодно. Поэтому мы решили проверить, будет ли корреляция между расчетом и экспериментом.

Мы провели циклизацию аминоксвободного и Boc-защищённого предшественника терлипрессина в DMF в течение 1 часа, используя 5 экв.  $I_2$ . Этот эксперимент полностью подтвердил расчетные данные. Содержание целевого циклического пептида, полученного из Boc-защищённого предшественника, составило 94.70 %, а из предшественника со свободной N-концевой аминогруппой – 67.73 % (Рисунок 21). Выше мы отмечали, что принципиальное значение для создания внутримолекулярной S-S связи в растворе имеет концентрация пептида, в то время как на полимере это не так критично. В серии экспериментов мы оценили влияние содержания якорных аминогрупп на полимере на качество целевого продукта.



**Рисунок 21.** Фрагменты профилей аналитических ВЭЖХ «сырых» продуктов замыкания S-S мостика в терлипрессине (6) на твёрдой фазе действием 5 экв. I<sub>2</sub> в DMF в течение 60 мин, исходя из аминоксвободного и Вос-защищённого предшественника терлипрессина (6).

Синтез терлипрессина проводили на полимерах Ринка различных производителей с содержанием якорных аминогрупп 0.47, 0.84 и 1.1 ммоль/г. Независимо от используемого полимерного носителя, содержание целевого терлипрессина (6) в продукте ТФС было высоким (от 88 до 94%) (Таблица экспериментальных данных), во всех случаях в качестве основных примесей были идентифицированы дисульфидные димеры, содержание которых при циклизации на низко- и высокозамещенных амидных смолах было примерно одинаковым, и составляло менее 4%. Данные эксперименты ещё раз подтверждают, что при циклизации на твёрдой фазе концентрация не влияет на чистоту целевого продукта, вероятно, за счёт эффекта псевдоразбавления.

Для оптимизации способа получения терлипрессина была проведена серия опытов по подбору избытка иода, необходимого для замыкания дисульфидной связи. Мы попытались определить минимально необходимое и максимально допустимое количество иода. Циклизацию Вос-защищённого предшественника терлипрессина, полученного на полимере Ринка с содержанием аминогрупп 0.84 ммоль/г, проводили в DMF с использованием избытков I<sub>2</sub> в диапазоне от 1.5 до 30-кратных (Схема 6). После окончательного деблокирования и отщепления пептида от носителя, оценивали содержание целевого циклического пептида, SH-линейного предшественника и побочных димеров в «сыром» продукте ТФС. Для этих экспериментов был специально синтезирован и охарактеризован линейный SH-предшественник терлипрессина, а димеры приобретены

у Vachem (Швейцария). Анализ состава сырых продуктов, полученных в этих экспериментах, проводили методом ВЭЖХ в условиях, подобранных для хорошего разделения SH-, S-S-пептидов и димеров (см. Экспериментальная часть). Отметим, что данные условия для терлипрессина подбирались нами специально, так как в условиях ВЭЖХ для пептидов (1–5) линейный SH- и циклический S-S-пептиды в случае терлипрессина не разделялись.

Данные этих опытов представлены в Таблице 6, согласно которой видно, что полная конверсия защищённого предшественника в циклический дисульфид наблюдается при использовании иода в диапазоне от 5 до 10 эквивалентов.

Таблица 6

**СОСТАВ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ ЦИКЛИЗАЦИИ ТЕРЛИПРЕССИНА (6)  
НА ПОЛИМЕРЕ РИНКА С СОДЕРЖАНИЕМ  
ЯКОРНЫХ АМИНОГРУПП 0.84 ММОЛЬ/Г  
ДЕЙСТВИЕМ I<sub>2</sub> В DMF В ТЕЧЕНИЕ 1 Ч (ПО ДАННЫМ ВЭЖХ)**

Количество экв. I <sub>2</sub>	S–S-пептид, %	SH-предшественник, %	Димеры, %
1.5	43.12	46.59	1.27
3	73.96	15.67	2.48
5	94.70	-	2.27
7	94.50	-	2.32
10	94.34	-	2.37
20	83.08	10.12	3.21
30	77.88	13.67	2.76

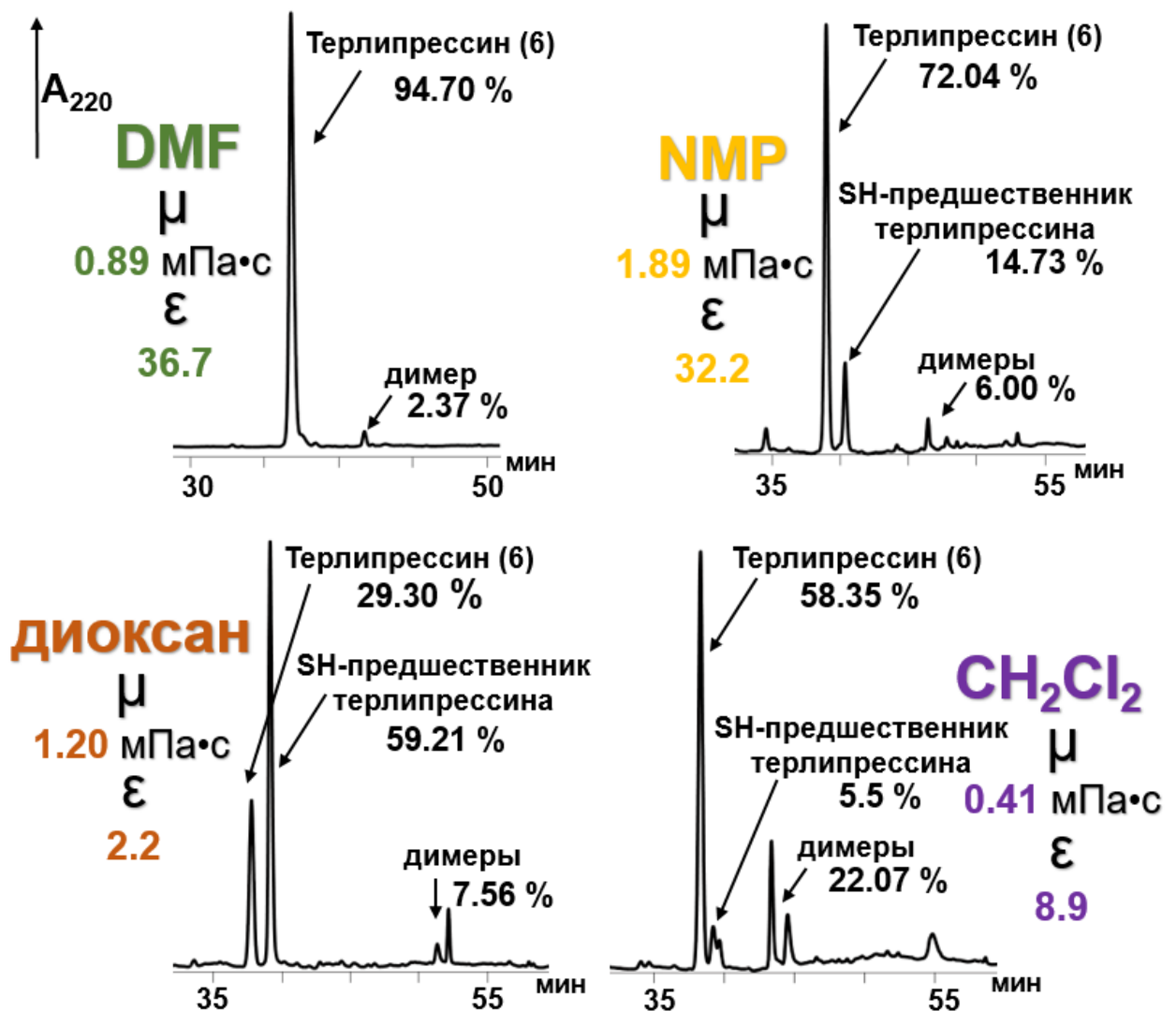
Следует отметить, что для циклизации дезаминоаналогов окситоцина и вазопрессина в тех же условиях достаточно 1.5 экв. иода, при повышении избытка до трёх эквивалентов – наблюдается появление небольшого количества SH-предшественника.

В случае терлипрессина при увеличении избытка окислителя выше 10 эквивалентов содержание S-S пептида снижается, а содержание линейного пептида растет. Так, при использовании 30 экв. иода в реакционной смеси содержание линейного предшественника увеличивается до 15.37 %. В наших опытах оказалось, что образование димерных продуктов не зависит от количества использованного иода. Во всех случаях их содержание было менее 4% (Таблица 6).

Во всех описанных до настоящего времени работах по замыканию S-S связи на твёрдой фазе в качестве растворителя использовался DMF [12, 330, 331]. На примере

терлипессина мы решили исследовать возможность применения других органических растворителей для твердофазной циклизации и сравнить их с DMF.

Для изучения были выбраны растворители, подходящие как для растворения иода, так и для набухания полимерного носителя, – N-метилпирролидон (NMP), хлористый метилен и диоксан. Циклизацию проводили в оптимальных условиях в течение 60 минут с использованием 5 экв. иода, так как именно в этих условиях наблюдались наилучшие результаты при проведении замыкания S-S мостика терлипессина в DMF. Однако во всех случаях наблюдалась низкая чистота технического терлипессина, не превышающая 72 % (Рисунок 22).



**Рисунок 22.** Фрагменты профилей аналитических ВЭЖХ продуктов при замыкании S-S мостика в терлипессине (6) на твёрдой фазе в течение 60 мин действием 5 экв. I<sub>2</sub>, исходя из Вос-защищённого предшественника в различных растворителях.

В наших экспериментах прослеживается следующая тенденция: при уменьшении значения диэлектрической постоянной растворителя, понижается и чистота технического

терлипрессина. По-видимому, только в DMF наблюдается достаточная стабилизация переходного состояния ПС1 (Схема 5), за счёт высокого значения диэлектрической постоянной ( $\epsilon = 36.7$ ) по сравнению с другими растворителями.

Как видно из экспериментов, набухание смолы не играет важной роли для полноценного замыкания S-S мостика. Большее значение, по-видимому, имеет вязкость растворителя и его способность не только стабилизировать переходное состояние ПС1, сольватировать полимерную матрицу, но и растворять защищённый пептид. Поэтому при использовании NMP, обладающего близкой к DMF диэлектрической проницаемостью, но существенно большей вязкостью, чистота технического терлипрессина понижается на 20 %. По всей вероятности, результат, полученный при циклизации в хлористом метиле, можно объяснить низкой растворимостью защищённого пептида в этом растворителе.

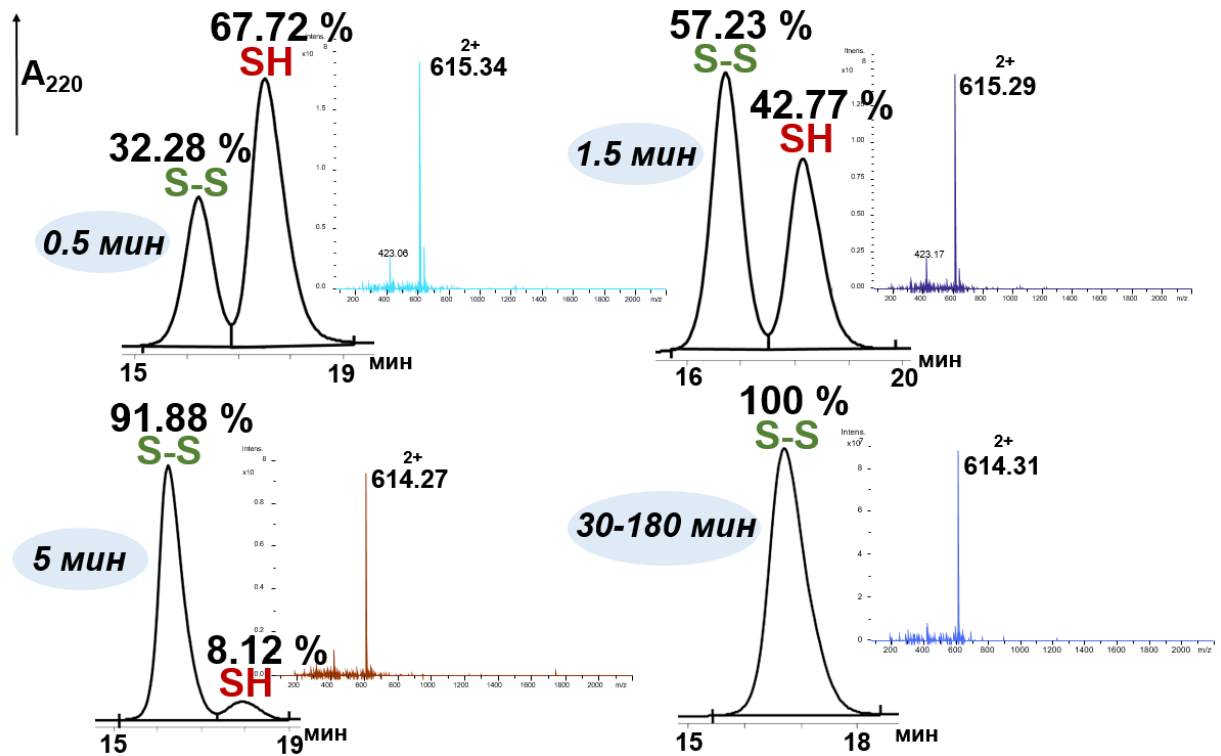
Также, как и для десмопрессина, для терлипрессина мы изучили процесс замыкания S-S связи во времени (Рисунок 23). Циклизация проводилась действием 5 экв. иода в DMF в течение 3 часов с отбором проб реакционной смеси через 0.5, 1.5, 5.0, 30, 45, 60 и 180 мин от начала реакции и последующим хроматографическим (ВЭЖХ) и масс-спектрометрическим анализом состава (SH-, S-S- и димерных пептидов) технического продукта реакции.

Разделение циклической и линейной формы одного и того же пептида с помощью ВЭЖХ часто вызывает значительные трудности. При анализе качества продуктов твердофазной циклизации терлипрессина мы столкнулись с необходимостью подбора специальных условий, в которых хорошо бы разрешались исходные SH- и целевые S-S пептиды (Рисунок 23). Эти условия ВЭЖХ, приведенные в экспериментальной части, были использованы при изучении кинетики циклизации терлипрессина. В этих условиях оценивали только соотношение SH- и S-S пептидов.

На рисунке 23 видно, что уже через 5 минут образуется более 90 % циклического продукта. Похожая тенденция наблюдалась и в случае десмопрессина (см. раздел 2.3.2.). Через 30 – 60 мин в реакционной смеси уже не наблюдается линейного предшественника.

Интересно, что в масс-спектрах ESI (+) технических продуктов циклизации при содержании SH-предшественника терлипрессина более 40 %, основной пик молекулярного иона соответствует именно линейному пептиду (Рисунок 23). Ещё раз отметим, что при крупномасштабном синтезе очень важно добиться высоких выходов при замыкании дисульфидного мостика именно за счет полной конверсии соответствующего линейного предшественника в циклический пептид, т.к. присутствие даже незначительных количеств примеси родственного предшественника в «сыром» продукте синтеза существенно затрудняет дальнейшую очистку целевого пептида.

Следует отметить, что после завершения циклизации (30 мин) состав реакционной смеси практически не менялся – появления линейного терлипрессина и побочных продуктов не наблюдалось.



**Рисунок 23.** Фрагменты профилей аналитических ВЭЖХ и масс-спектры ESI (+) при замыкании дисульфидной связи в терлипрессине (S-S) на твёрдой фазе в DMF действием 5 экв. I<sub>2</sub>, исходя из Вос-защищённого предшественника в зависимости от времени.

В главе 2.3. мы рассмотрели объекты работы (1–6), в которых дисульфидный цикл состоит из шести а.о. и показали корреляцию между расчётными и экспериментальными данными и полную воспроизводимость результатов.

Отметим, что в пептидах (1–6) присутствует чувствительный к окислению тирозин. Известно, что тирозин является одним из наиболее уязвимых аминокислотных остатков при обработке иодом с образованием моно- и ди-иод производных [336, 342]. В наших экспериментах на масс-спектрах ESI (+) технических продуктов замыкания дисульфидной связи в пептидах (1–6) не наблюдалось пиков [M+126] или [M+253], соответствующих побочным продуктам окисления тирозина, что является ещё одним фактом в пользу разработанного нами подхода замыкания S-S связи.



## 2.4. ЗАМЫКАНИЕ S-S СВЯЗИ В АНАЛОГАХ ГОРМОНА СОМАТОСТАТИНА (7, 8) ИОДОМ НА ТВЁРДОЙ ФАЗЕ

Выше уже говорилось о важности разработки эффективных схем синтеза аналогов соматостатина. Эти пептиды содержат аминокислотные остатки тирозина и триптофана, наличие которых в последовательности пептида существенно осложняет его химический синтез. Триптофан подвержен окислению и побочным реакциям [343–346]. Из-за высокой реакционной способности углерода второго положения индольного кольца при замыкании дисульфидной связи в пептидах, содержащих триптофан, и последующей обработкой кислотой, возможно образование различных побочных продуктов, что приводит к низким выходам целевых дисульфидов.

Триптофан склонен к димеризации как при действии иода, так и при обработке кислотой. В работе Sieber и соавторов [345] было показано, что при прямой конверсии Trt-защищённого предшественника в циклический дисульфид с использованием в качестве окислителя  $I_2$ , возможно образование побочного продукта – триптофан-2-тиоэфира [345].

Yang и соавторы [336] установили строение продуктов окисления триптофана иодом, модифицированных как в индольном кольце, так и в аминокислотном скелете. Также показана [343] возможность модификации второго положения индольного кольца триптофана линкером полимера Ванга.

Мы решили проверить универсальность нашего подхода в синтезе аналогов гормона соматостатина – Tug<sup>3</sup>-октреотэита (7) и DOTA-TATE (8), в которых кроме тирозина присутствует и триптофан. В отличие от октреотида пептиды (7) и (8) содержат на С-конце карбоксильную группу, поэтому их синтез проводился на полимере Ванга.

В настоящее время существует довольно большое количество работ по промышленному получению аналогов октреотида [347]. Однако в большинстве случаев замыкание дисульфидной связи проводится в растворе в условиях высокого разбавления с использованием в качестве окислителя  $O_2$ ,  $I_2$  или  $H_2O_2$  [347]. Обратим внимание, что возможно протекание побочных реакций по первому и второму положениям индольного кольца триптофана особенно при отсутствии защиты индольного азота [347]. Мы предположили, что Вос-защита на атоме азота, за счёт пространственных затруднений, позволит избежать образования продуктов модификации триптофана не только при окислении иодом, но и при обработке трифторуксусной кислотой.

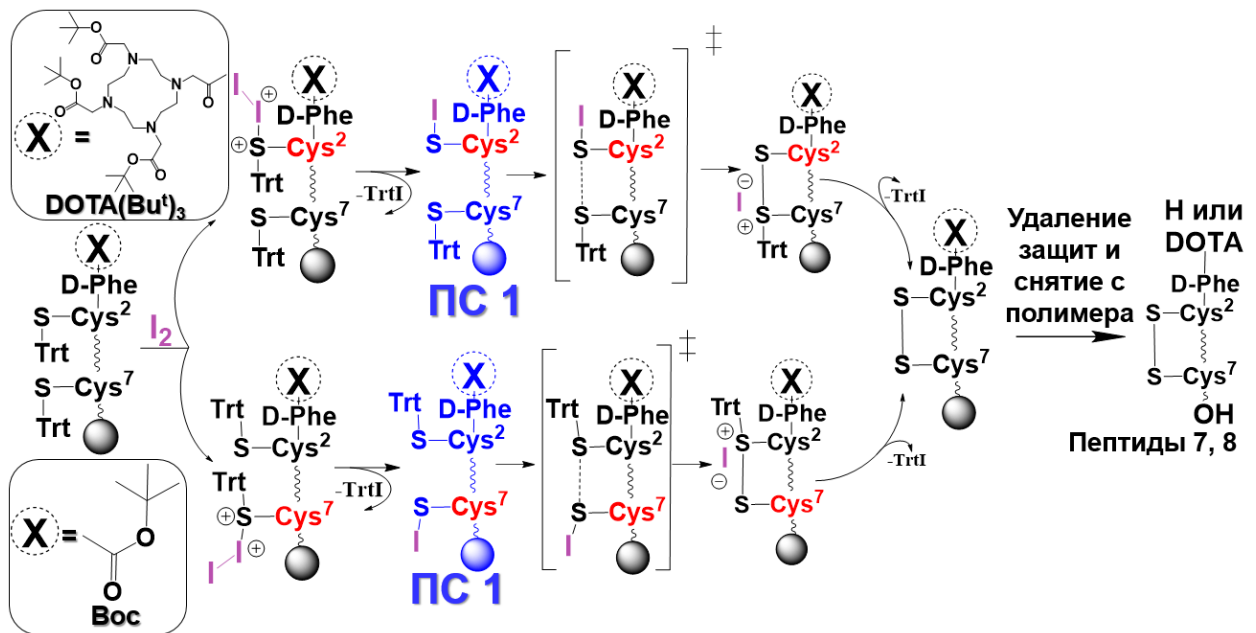
Было показано, что в сильных кислотах Вос-защита с индольной NH-группы отщепляется в две стадии: сначала отщепляется  $Bu^t$ , а затем происходит декарбоксилирование [348]. Кроме того, полное отщепление данной защиты с атома азота

ароматических систем протекает в слабокислых условиях, а иногда даже в нейтральных условиях, когда молекула воды выступает в роли двойного кислотно-основного катализатора [348].

Исходя из этих данных, в синтезе пептидов (7) и (8) мы использовали производное Fmoc-D-Trp(Вос)-ОН, вместо широко распространённого реактива Fmoc-D-Trp-ОН. Мы сначала решили теоретически с помощью молекулярного моделирования изучить процесс замыкания S-S связи, применив тот же подход, описанный в подразделе 2.3.4.

#### 2.4.1. ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА ЗАМЫКАНИЯ S-S СВЯЗИ TYR<sup>3</sup>-ОКРЕОТЭЙТА (7) И DOTA-TATE (8) *IN SILICO*

Моделирование проводилось в условиях максимально приближенных к реальным, и также, как и в случае пептидов (1–6), рассматривалось два возможных варианта присоединения I<sub>2</sub> – к атому серы Cys<sup>2</sup> или Cys<sup>7</sup> (Схема 6).

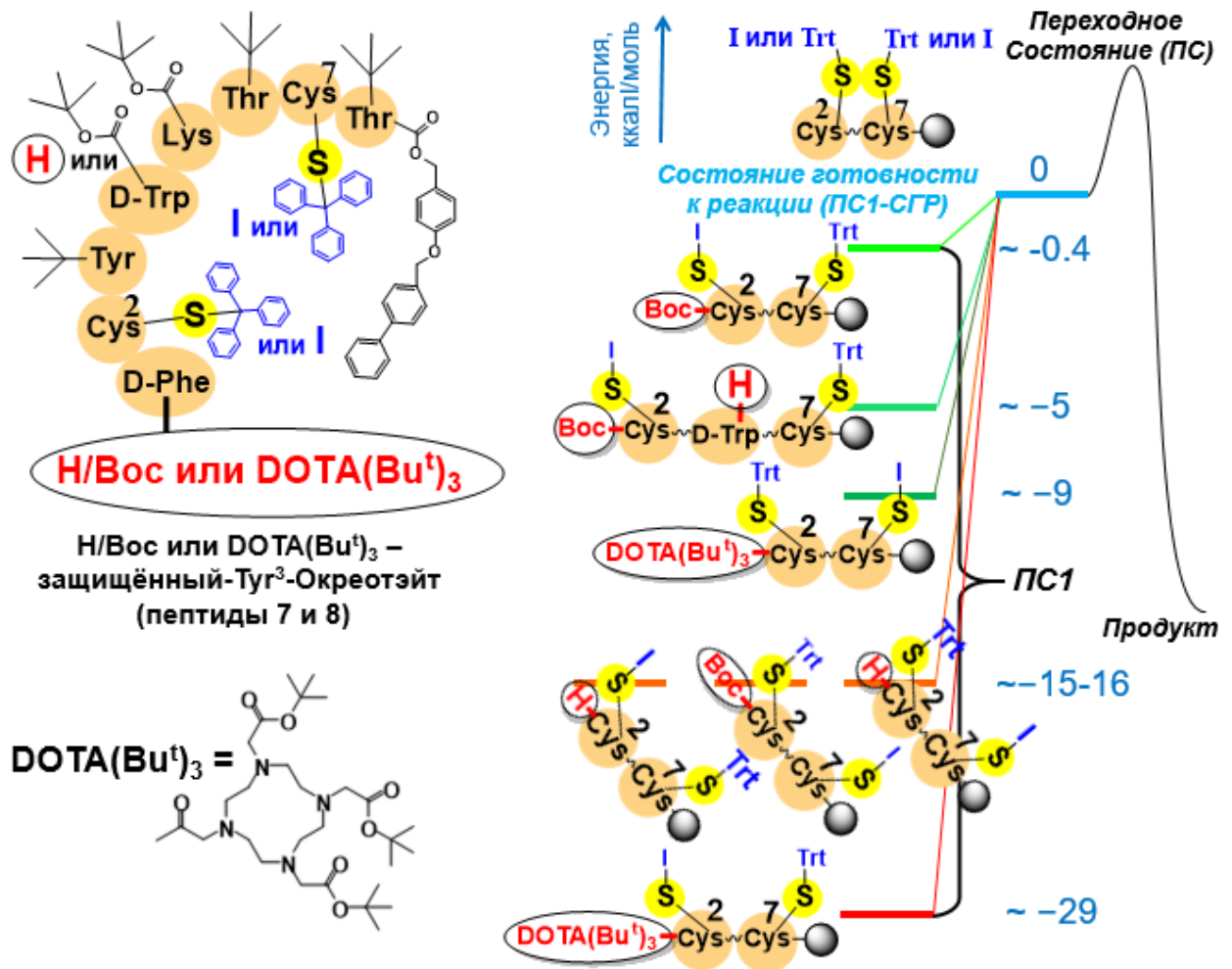


**Схема 6.** Предполагаемый механизм замыкания S-S связи в Tyr<sup>3</sup>-окреотэйте (7) и DOTA-TATE (8), исходя из Cys(Trt) защищённого линейного предшественника. Красным цветом выделено возможное место присоединения иода.

Выше мы отметили, что пептиды (7) и (8), являясь кислотами, синтезируются на полимере Ванга. Поэтому по сравнению с объектами работы (1–6) структура линкера полимера Ванга отличается от структуры линкера полимера Ринка (Рисунки 18, 19, 26). Молекулярное моделирование проводилось для полностью защищённых пептидов (7) и (8) с линкером полимера Ванга (Рисунок 24).

Молекулярное моделирование показало, что энергия преактивации, необходимая для сближения атомов серы на 4 Å и их последующего взаимодействия в Туг<sup>3</sup>-окреотэйте (7) и DOTA-TATE (8), зависит от места присоединения атома иода к атому серы – Cys<sup>2</sup> или Cys<sup>7</sup> (Рисунок 24), также, как и для нейрогипофизарных гормонов и их аналогов (1–6).

Защищённый Туг<sup>3</sup>-окреотэйт (7) со свободной аминогруппой показывает одинаковую  $E_{pre-act}$  в 15–16 ккал/моль независимо от того, какой из остатков Cys<sup>2</sup> или Cys<sup>7</sup> иодирован. Эта энергия заметно выше, чем для всех энергетически выгодных конформаций дезаминоаналогов (2), (4), (5) и Вос-защищённых предшественников пептидов (1), (3), (6) (Рисунки 18, 19).



**Рисунок 24.** Сравнение уровней энергии, соответствующих процессу сближения двух атомов серы в защищенных предшественниках Туг<sup>3</sup>-окреотэйте (7) и DOTA-TATE (8) на полимере Ванга, в зависимости от статуса N-концевой аминогруппы.

Светло-оранжевым цветом выделена аминокислотная последовательность Туг<sup>3</sup>-окреотэита (7) и DOTA-TATE (8).

Вос-защита N-концевой аминогруппы в Туг<sup>3</sup>-окреотэйте (7) резко снизила энергию пре-активации ПС1, соответствующего Cys<sup>2</sup> – иодированному производному, которая

составила всего 0.4 ккал/моль, что очень близко к наиболее реакционноспособному промежуточному продукту дезаминокситоцина (Рисунок 18).

Таким образом, введение Вос-защиты на N-концевую аминогруппу Tyr<sup>3</sup>-окреотэйти изменяет геометрию молекулы так, что  $E_{\text{pre-act}}$  снижается на 15 ккал/моль (Рисунок 26). Так как триптофан со свободной аминогруппой в первом положении индольного кольца склонен к побочным реакциям при окислении иодом, мы попробовали смоделировать взаимодействие атомов серы в структуре Cys<sup>2</sup>- иодированного ПС1 с одним лишь отличием – без Вос-защиты на атоме азота индольного кольца триптофана.

Поразительно, но отсутствие Вос-защиты в первом положении индола повышает  $E_{\text{pre-act}}$  на 5 ккал/моль. Можно предположить, что параллельно со сближением атомов серы на 4 Å, в данной структуре возможно образование побочных продуктов из-за нехватки энергии.

Интересно, что при моделировании замыкания S-S мостика в DOTA-TATE наблюдаются другие результаты. Так, для защищённого DOTA-TATE, иодированного по атому серы Cys<sup>2</sup> энергия пре-активации составляет 29 ккал/моль, что заметно выше, чем даже для аминокислотных предшественников пептидов (1), (3), (6), (7). Скорее всего, это связано с пространственными конформационными особенностями хелатора DOTA(Bu<sup>t</sup>)<sub>3</sub>, что затрудняет сближение S-I и S-Trt.

Для ПС1, соответствующего Cys<sup>7</sup>- иодированному производному, энергия предварительной активации меньше на 20 ккал/моль, что объясняется большим расстоянием между хелатором и молекулой иода и отсутствием серьёзных пространственных затруднений для сближения сульфгидрильных остатков цистеина.

Таким образом, с помощью молекулярного моделирования мы показали, что при твёрдофазной циклизации предшественников Tyr<sup>3</sup>-окреотэйти (7) и DOTA-TATE (8) наличие Вос-защиты на N-концевой аминогруппе и индольном азоте должно существенно повысить чистоту и выход соответствующих продуктов. Согласно расчётным данным в случае пептидов (7) и (8) эти характеристики должны быть на уровне объектов (1–6), рассмотренных в разделе 2.3.

#### 2.4.2. ЗАМЫКАНИЕ S-S СВЯЗИ В TYR<sup>3</sup>-ОКРЕОТЭЙТЕ (7) И DOTA-TATE (8) НА ТВЁРДОЙ ФАЗЕ ИОДОМ

Синтез Tyr<sup>3</sup>-окреотэйти (7) и DOTA-TATE (8) мы проводили на полимере Ванга, исходя из коммерческого Fmoc-Thr(Bu<sup>t</sup>)-полимера Ванга с содержанием якорных аминогрупп 0.68 ммоль/г. В сочетании с N<sup>α</sup>-Fmoc-защитой для блокирования функциональных групп боковых цепей аминокислот использовали кислотолabile

защитные группы:  $Bu^t$  – для треонина и тирозина,  $Boc$  – для лизина и D-триптофана. Остаток цистеина защищали  $Tgt$ -группой. Для отщепления  $-Fmoc$  защит использовали раствор 5% 4-MePip/2% DBU/DMF. Для создания пептидной связи применяли DIC/NOBt-метод.

Для подтверждения результатов молекулярного моделирования мы сравнили циклизацию аминсвободного и  $Boc$ -защищённого  $Tyr^3$ -окреотэпта (7) с использованием различных избытков иода в течение часа в DMF. Эти эксперименты подтвердили наши теоретические расчёты: содержание целевого пептида (7) в «сыром» продукте, полученном из полностью защищённого предшественника, было существенно выше (88.72 %), чем при циклизации  $N^{\alpha}$ -свободного пептидилполимера (50.52 %) для  $NH_2$ -свободного (Рисунок 25).

В дальнейшем при изучении замыкания дисульфидной связи в объектах работы (7) и (8) применялись  $Boc$ -защищённые предшественники  $Tyr^3$ -окреотэпта (7) и DOTA-TATE (8).

Конверсия полностью защищённых производных пептидов (7) и (8) в циклические дисульфиды проводилась действием различных избытков иода (1.5–30 экв.) (Схема 7, Рисунок 25) в DMF в течение 1–3 часов.

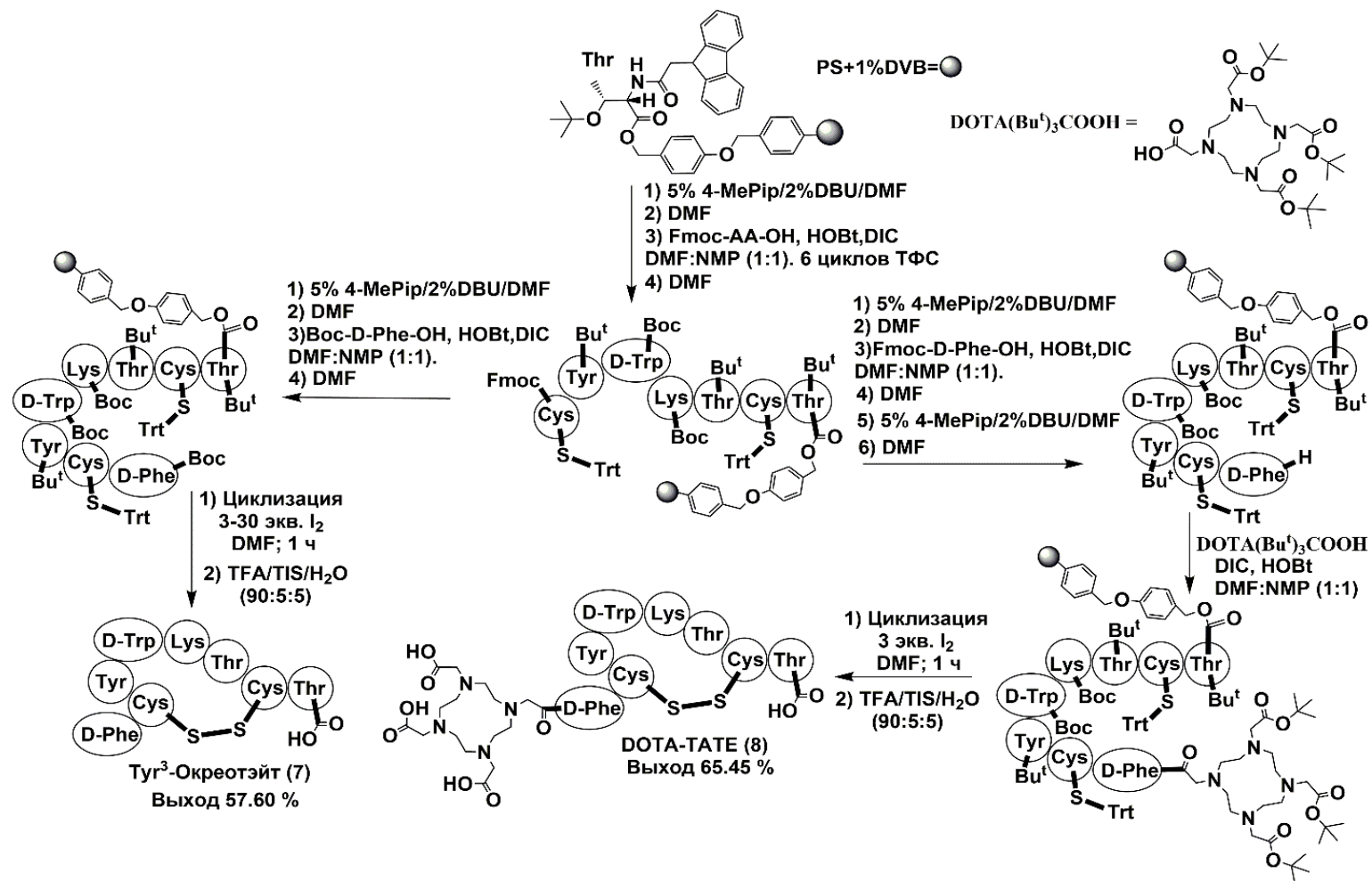


Схема 7. Схема синтеза Tyr<sup>3</sup>-окреотэйт (7) и DOTA-TATE (8).

Замыкание S-S мостика проводили в минимально необходимом объёме растворителя (~ на 2.72 ммоль пептидов (7) и (8) в 80 мл растворителя), тогда как для такого же масштаба циклизации в растворе потребовалось бы от 1.5 до 3 литров растворителя. После проведения циклизации раствор пептидилполимера отфильтровывали и промывали, минуя стадию концентрирования больших объёмов реакционной смеси перед очисткой ВЭЖХ, которая необходима при проведении реакции в растворе.

Интересно, что в диапазоне от 3 до 30-кратных избытков иода качество технических дисульфидов (7) было сходным (Рисунок 25), и не наблюдалось линейного SH-пептида, димерных продуктов. Увеличение времени проведения циклизации до 180 минут при использовании 3-кратного изб. I<sub>2</sub> никак не влияло на качество продукта.

При уменьшении же количества иода до 1.5 наблюдалось появление SH-предшественника Tug<sup>3</sup>-окреотэйти (7). Для идентификации продуктов циклизации были специально получены и охарактеризованы SH-предшественники Tug<sup>3</sup>-окреотэйти (7) и DOTA-TATE (8).

В масс-спектрах ESI (+) технических смесей циклизации пептида (7) (3–30-кратный изб. I<sub>2</sub>) не наблюдалось пика молекулярного иона, соответствующего линейным SH-пептидам, что ещё раз говорит о полноте замыкания S-S мостика в данных условиях.

В начале проведения исследований мы столкнулись с интересным наблюдением. После отщепления от полимера смесью TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (90:5:5), технический продукт (7) по данным ВЭЖХ, оказался смесью двух веществ (Рисунок 25). Мы предположили, что одной из причин такого профиля ВЭЖХ может быть неполное отщепление Вос-защиты с индольного атома азота триптофана, возможность которого отмечалась в литературе [348]. После же лиофилизации из 5 % АсОН на профиле ВЭЖХ полностью исчез пик вещества с большим временем удерживания, при этом содержание Tug<sup>3</sup>-окреотэйти достигло 88 %, что подтвердило наше предположение.

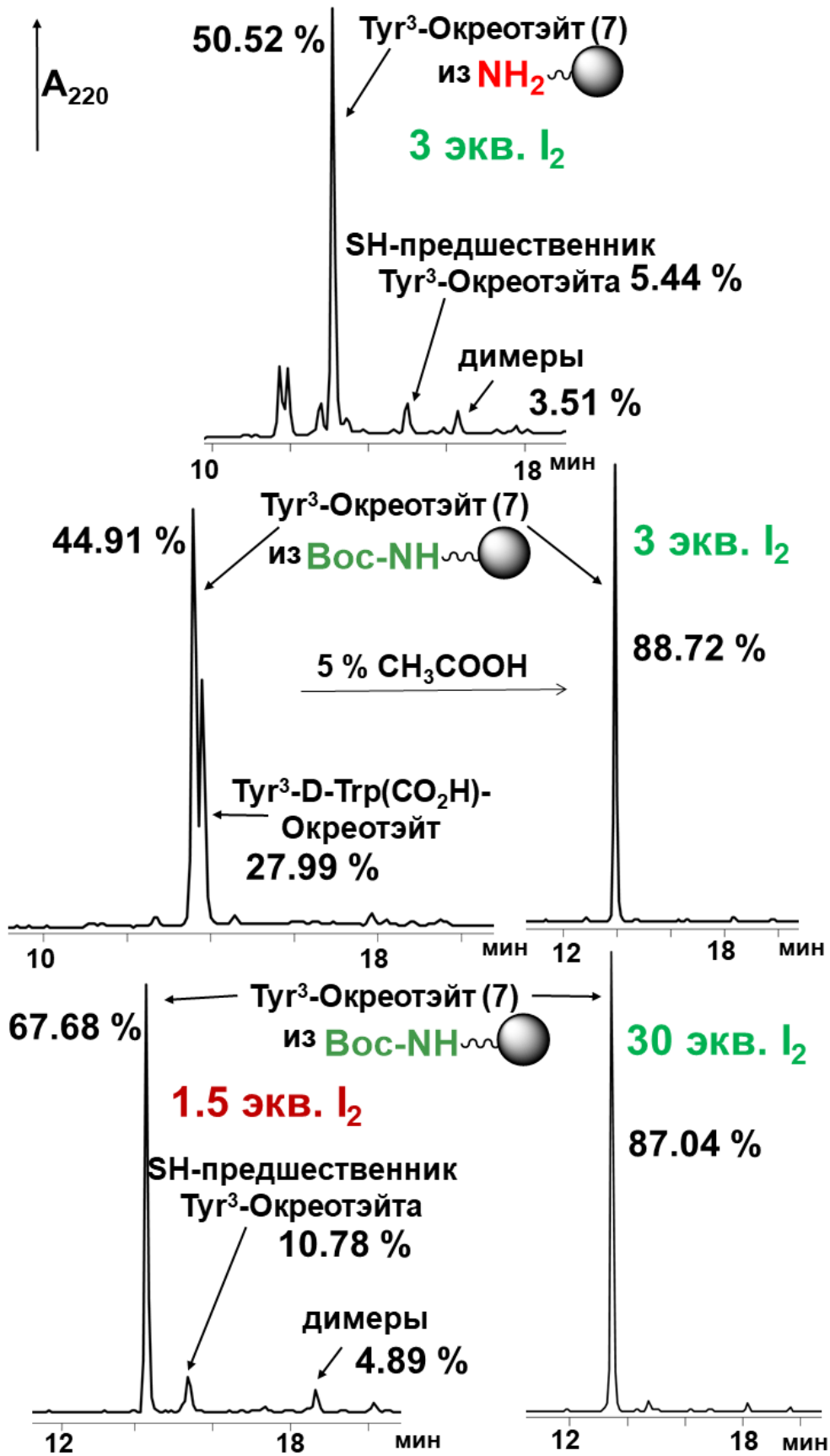
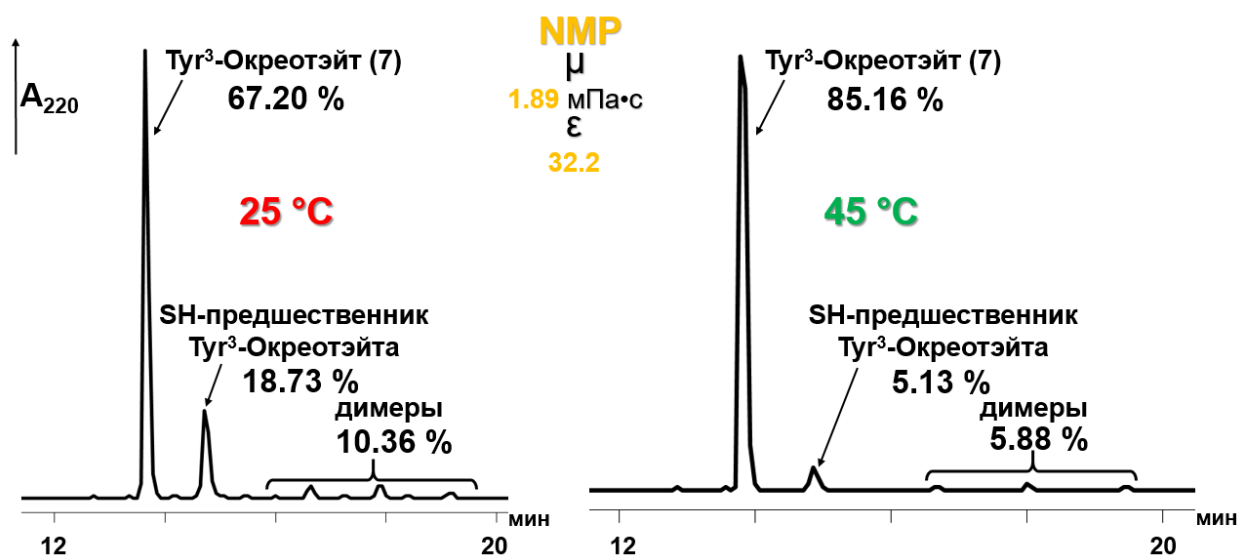


Рисунок 25. Фрагменты профилей аналитических ВЭЖХ продуктов замыкания S-S мостика в Trp<sup>3</sup>-окреотэйте (7) на твёрдой фазе с использованием различных избытков иода в DMF.



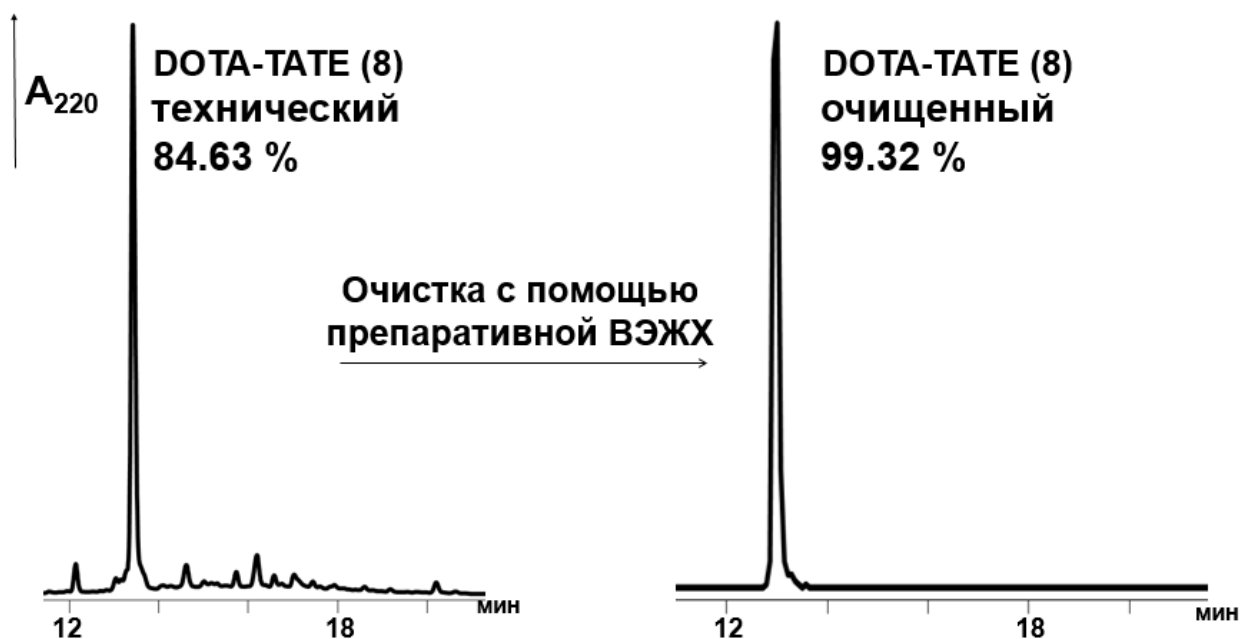
При синтезе Туг<sup>3</sup>-окреотэита (7) мы проверили возможность применения N-метилпирролидона для твёрдофазной циклизации. При комнатной температуре наблюдается похожий с терлипрессином результат – количество SH-предшественника в реакционной смеси составляет 18.73 %.

Мы предположили, что, уменьшив вязкость путём повышения температуры реакции циклизации до 45 градусов, получится добиться более полного замыкания дисульфидной связи. Наша гипотеза полностью подтвердилась экспериментально. Чистота технического Туг<sup>3</sup>-окреотэита увеличилась почти на 20 %, однако всё равно наблюдались остаточные количества линейного предшественника, что подтверждает влияние вязкости среды, температуры и значения диэлектрической постоянной растворителя на проведение замыкания S-S связи (Рисунок 26).



**Рисунок 26.** Фрагменты профилей аналитических ВЭЖХ продуктов замыкания S-S мостика в Туг<sup>3</sup>-окреотэите на твёрдой фазе действием 3 экв. I<sub>2</sub> в NMP, исходя из Вос-защищённого предшественника в зависимости от температуры.

Замыкание дисульфидной связи в DOTA-TATE (8) проводили с использованием трёхкратного избытка I<sub>2</sub> в DMF в течение 60 минут. Нам удалось получить технический продукт (8) с содержанием целевого вещества 84.63 %, что облегчило дальнейшую очистку до фармакопейного качества.



**Рисунок 27.** Фрагменты профилей аналитических ВЭЖХ технического и очищенного ДОТА-ТАТЕ (8).

Таким образом, мы ещё раз показали необходимость проведения замыкания дисульфидной связи именно в DMF при комнатной температуре в течение одного часа. Данные условия являются универсальными для замыкания дисульфидной связи во всех объектах работы (1–8).

### 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

#### 3.1. ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

В работе использовались коммерчески доступные производные L и D аминокислот: Boc-Gly-OH, Boc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Orn(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Thr(t-Bu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-D-Tyr(OEt)-OH, Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-D-Trp(Boc)-OH, а также тритил-3-меркаптопропионовая кислота (Trt-Mpa) фирм Novabiochem (Великобритания), Fluka и Vachem (Швейцария). Диизопропилкарбодиимид (DIC), N-гидроксibenзотриазол (HOBT), 1,8-дизабицикло [5.4.0.] ундец-7-ен (DBU) приобретались у Sigma-Aldrich (США). Три-трет-бутил-1,4,7,10-тетраазаациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота (DOTA-tris (tert-butyl ester)), Триизопропилсилан (TIS), иод, пирролидин и 4-метилпиперидин – у TokyoChemicalIndustryCo, Ltd (ТСI) (Япония).

Все растворители – N, N, -диметилформамид(DMF), 1,4-диоксан, N-метилпирролидон (NMP), хлористый метилен (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), диэтиловый эфир (Et<sub>2</sub>O), и кислоты – уксусная (AcOH) и трифторуксусная (TFA) приобретались у Sigma-Aldrich (США) и «Carl Roth GmbH» (Germany) и использовались без предварительной очистки.

Для ВЭЖХ применяли ацетонитрил (CH<sub>3</sub>CN) фирмы «Carl Roth GmbH» (Германия) и деионизированную воду компании Millipore Corporation (Бедфорд, США).

Полимеры Ринка были приобретены: Chem-ImpexInternational, Inc, США (содержание аминогрупп 0.47 ммоль/г); BLD Pharmatech Ltd., Китай (содержание аминогрупп 0.84 ммоль/г); Sigma-Aldrich, США (содержание аминогрупп 1.1 ммоль/г).

#### 3.2. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

##### 3.2.1. ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ (ВЭЖХ)

Аналитическую ВЭЖХ окситоцина (OT) (1), дезамиоокситоцина (DOT) (2), D-Arg<sup>8</sup>-вазопрессина (D-Arg<sup>8</sup>VP) (3) и DOTA-TATE (8) проводили на хроматографе Stayer (Россия). Для OT, DOT и DOTA-TATE использовали колонку (4.6 x 250 мм) Диасфер-110-C-18 («BioChemMack S&T», Россия), а для D-Arg<sup>8</sup>VP – колонку (4.6 x 250 мм) Luna 100 C-18(2) («Phenomenex» США). В обеих колонках размер частиц сорбента составляет 5 мкм.

В качестве элюентов использовали: буфер А – 0.1 % TFA и буфер Б – 80 % CH<sub>3</sub>CN в буфере А, элюцию проводили со скоростью 1 мл/мин в градиенте концентрации буфера Б в буфере А от 20 до 80 % за 30 мин. Детекция – при длине волны 220 нм.

Аналитическую ВЭЖХ десмопрессина (DDAVP) (4) проводили на хроматографах Stayer (Россия) и WellChrom, Knauer (Германия) на колонке (4.6 x 250 мм) Luna 100 C-18(2) («Phenomenex» США), размер частиц сорбента – 5 мкм. В качестве элюентов использовали: буфер А – 0.1 % TFA и буфер Б – 80 % CH<sub>3</sub>CN в буфере А, элюцию проводили со скоростью 1 мл/мин в градиенте концентрации буфера Б в буфере А от 10 до 70 % за 30 мин. Детекция – при длине волны 220 нм.

Аналитическую ВЭЖХ атозибана (5) и Тур<sup>3</sup>-окреотэйт (7) проводили на хроматографе WellChrom, Knauer (Германия) на колонках (4.6 x 250 мм) Диасфер-110-С-18 («BioChemMack S&T», Россия) и/или (4.6 x 250 мм) Kromasil 100-5 ODS (Швеция). В обеих колонках размер частиц сорбента составляет 5 мкм. В качестве элюентов использовали: буфер А – 0.05 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, рН 3.0 и буфер Б – 70 % ацетонитрил в буфере А, элюцию проводили со скоростью 0.75 мл/мин (Диасфер-110-С-18) и 1 мл/мин (Kromasil 100-5 ODS) в градиенте концентрации буфера Б в буфере А от 20 до 80 % за 30 мин.

Аналитическую ВЭЖХ терлипрессина (6) проводили на хроматографе Stayer (Россия) на колонке (4.6 x 250 мм) Диасфер-110-С-18 («BioChemMack S&T», Россия), размер частиц сорбента – 5 мкм. В качестве элюентов использовали: буфер А – 0.05 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, рН 3.0, содержащий 6 % CH<sub>3</sub>CN и буфер Б – CH<sub>3</sub>CN. Элюцию проводили со скоростью 0.75 мл/мин в градиенте буфера Б (см. таблицу).

Таблица 7

**ТАБЛИЦА АНАЛИТИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ ВЭЖХ  
ДЛЯ ТЕРЛИПРЕССИНА (6)**

Время, мин	Буфер А, %	Буфер Б, %
0	100	0
40	88	12
60	72.5	27.5
62	100	0

Аналитическую ВЭЖХ для специальной оценки терлипрессина и его SH-предшественника (раздел 2.3.5.), проводили на хроматографе Stayer (Россия) на колонке Диасфер-110-С-18 (4.0 x 250 мм) («BioChemMack S&T», Россия) при температуре 20°C. Элюцию проводили в изократическом режиме (буфер 0,5 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (рН 3,0, содержит

14 %  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) в течение 30 мин при скорости потока 0.75 мл/мин с детектированием при  $\lambda = 220$  нм.

Препаративную ВЭЖХ окситоцина (1), дезамокситоцина (2), D-Arg<sup>8</sup>-вазопрессина (3), десмопрессина (4), атозибана (5) и терлипрессина (6) осуществляли на приборе PuroFlash 4100 (Франция) на колонке Biotage Sfar C18 D (50 x 250 мм) с размером частиц сорбента – 30 мкм. В качестве элюентов использовали буфер А – 0.01 М водный раствор ацетата аммония с рН 4.5, буфер Б – 70 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  в буфере А. Элюцию проводили от 100 % буфера А в градиенте концентрации 0.5 %/ мин буфера Б со скоростью 20 мл/мин. Фракции, соответствующие целевому веществу (более 98.5 % целевого продукта), объединяли, концентрировали в вакууме и лиофилизовали.

Препаративную ВЭЖХ Туг<sup>3</sup>-окреотэйти (7) и DOTA-TATE (8) осуществляли на приборе Knauer (Германия) на колонке (30 x 250 мм) Kromasil 100-10 ODS (Швеция), размер частиц сорбента – 10 мкм. В качестве элюентов использовали буфер А – 0.01 М водный раствор ацетата аммония с рН 4.5 + 5 %  $\text{CH}_3\text{CN}$ , буфер Б – 70 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  в буфере А. Элюцию проводили от 100 % буфера А в градиенте концентрации 0.5 %/ мин буфера Б со скоростью 20 мл/мин. Фракции, соответствующие целевому веществу (более 98.5 % целевого продукта), объединяли, концентрировали в вакууме и лиофилизовали.

Масс-спектры регистрировали на приборе «Amazon Bruker» методом электрораспылительной ионизации (ESI) в режиме регистрации положительных ионов (напряжение на капилляре – 3500 В). Диапазон сканирования масс –  $m/z$ – 70 – 2200. Применяли шприцевой ввод образца, растворенного в смеси  $\text{CH}_3\text{CN}$  – вода. Газ-распылитель – азот, температура интерфейса – 100 °С.

Масс-спектры D-Arg<sup>8</sup>-вазопрессина (2), атозибана (5) регистрировали на MALDI-TOF/TOF «UltrafleXtreme Bruker Daltonics GmbH» приборе, оснащённом УФ-лазером (Nd) в режиме регистрации положительных ионов. Диапазон сканирования масс –  $m/z$ – 600 – 6000. На мишени смешивали 0.3 мкл раствора пептида, растворённого в  $\text{H}_2\text{O}$  (1 мг/1 мл), и раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты («Sigma-Aldrich», 40 мг/мл в 30 % водном ацетонитриле, 0.5 % TFA), полученную смесь высушивали на воздухе.

### 3.2.2. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ВЫЧИСЛЕНИЯ

Молекулярное моделирование проводилось в программном комплексе Maestro 10.6 с использованием силового поля OPLS3 и неявным учётом растворителя ( $\epsilon(\text{DMF})= 36.71$ ). Конформационный поиск был выполнен методом «low-frequency-mode», реализованный в Maestro 10.6. Визуализация расстояния между атомами серы была проведена в VMD 1.9.3.

### 3.3. ТВЁРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ

#### 3.3.1. ОБЩАЯ МЕТОДИКА СИНТЕЗА ОКСИТОЦИНА (1), ДЕЗАМИНООКСИТОЦИНА (2), *D*-ARG<sup>8</sup>-ВАЗОПРЕССИНА (3), ДЕСМОПРЕССИНА (4), АТОЗИБАНА (5) И ТЕРЛИПРЕССИНА (6)

Синтез пептидилполимерных предшественников пептидов 1–6:

**1a:** Boc-Cys(Trt)-Tyr(t-Bu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Trt)-Pro-Leu-Gly- P<sub>Rink</sub>amide

**2a:** Trt-Mpa-Tyr(t-Bu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Trt)-Pro-Leu-Gly- P<sub>Rink</sub> amide

**3a:** Boc-Cys(Trt)-Tyr(t-Bu)-Phe-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Trt)-Pro-D-Arg(Pbf)-Gly-P<sub>Rink</sub> amide

**4a:** Trt-Mpa-Tyr(t-Bu)-Phe-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Trt)-Pro-D-Arg(Pbf)-Gly- P<sub>Rink</sub> amide

**5a:** Trt-Mpa-D-Tyr(OEt)-Ile-Thr(t-Bu)-Asn(Trt)-Cys(Trt)-Pro-Orn(Boc)-Gly-P<sub>Rink</sub> amide

**6a:** Boc-(Gly)<sub>3</sub>-Cys(Trt)-Tyr(t-Bu)-Phe-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Trt)-Pro-Lys(Boc)-Gly-P<sub>Rink</sub> amide

Каждый из пептидилполимеров **1a–6a** синтезировали в ручном режиме, исходя из 15 г (~ 12.6 ммоль) полимера Ринка с содержанием аминогрупп 0.84 ммоль/г.

1. Снятие -Fmoc защиты с α-аминогруппы проводили 150 мл раствора 5% 4-метилпиперидина и 2% DBU, в DMF в течение 5 и 10 минут последовательно или 20 % раствором пирролидина в DMF в течение 10 и 20 минут, последовательно, увеличивая к последнему циклу объём деблокирующей смеси до 250 мл.

2. Промывка пептидилполимера после деблокирования DMF (5 x 150 мл), увеличивая объём DMF к последнему циклу до 250 мл.

3. 2 часа конденсация раствором предварительно активированного производного (37.8 ммоль Fmoc-аминокислоты + 37.8 ммоль HOBT + 37.8 ммоль DIC) в 150 мл смеси DMF: NMP:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:0.5:0.5), увеличивая объём до 200 мл к последнему циклу.

4. Промывка пептидилполимера после конденсации DMF (5 x 150 мл), увеличивая объём DMF к последнему циклу до 250 мл.

5. Нингидриновый тест на остаточные аминогруппы. После присоединения N-концевой аминокислоты пептидилполимер промывали DMF (5 x 250 мл) и добавляли раствор 4.8 г (18.9 ммоль) I<sub>2</sub> (1.5 экв.) для пептидов **2, 4, 5** или 16.0 г (63.0 ммоль) I<sub>2</sub> (5 экв.) для пептидов **1, 3, 6** в 250 мл DMF и перемешивали в течение 1 ч при 25 °С. Затем реакционный раствор отфильтровывали, пептидилполимер промывали DMF (3 x 250 мл), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 250 мл) и высушивали в течение 24 часов при 25 °С. 31.2 г соответствующего пептидилполимера обрабатывали 315 мл смеси для расщепления (90 % TFA, 5 % деионизованной воды и 5 % TIS) при 25 °С в течение 1.5 ч.

Полимер отфильтровывали, промывали деблокирующей смесью (2× 100 мл). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении (35°C, 15 мм.рт.ст.) до маслообразного состояния. К остатку добавляли 180 мл Et<sub>2</sub>O, выпавший осадок

отфильтровывали и промывали Et<sub>2</sub>O (2× 100 мл). Получали технические продукты **1–6** в виде белых порошков чистотой по ВЭЖХ 86.28–96.94 %.

После очистки с помощью препаративной ВЭЖХ получали лиофилизаты пептидов **1–6** чистотой >98%, которые были охарактеризованы с помощью масс-спектрометрии и сравнением с коммерческими образцами окситоцина (CAS №50-56-6), дезаминокситоцина (CAS № 113-78-0), десмопрессина (CAS № 16679-58-6), атозибана (CAS № 90779-69-4) и терлипрессина (CAS № 14636-12-5).

Процесс синтеза пептидов **1–6**, исходя из полимера Ринка с содержанием аминокроп 0.47 и 1.1 ммоль/г, аналогичен процессу синтеза с использованием полимера Ринка с начальным содержанием аминокроп 0.84 ммоль/г. См. Таблицу экспериментальных данных.

### 3.3.2. ОБЩАЯ МЕТОДИКА СИНТЕЗА TYR<sup>3</sup>-ОКРЕОТЭЙТА (7) И DOTA-TATE (8)

Синтез пептидилполимерных предшественников пептидов 7 и 8:

**7a:** Boc-D-Phe-Cys(Trt)-Tyr(t-Bu)-D-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Thr(t-Bu)-Cys(Trt)-Thr(t-Bu)-P<sub>wang</sub>

**8a:** DOTA-D-Phe-Cys(Trt)-Tyr(t-Bu)-D-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Thr(t-Bu)-Cys(Trt)-Thr(t-Bu)-P<sub>wang</sub>

Пептидилполимер **7a** синтезировали в ручном режиме, исходя из 4 г (~2.72 ммоль) Fmoc-Thr(t-Bu)-полимера Ванга фирмы Bachem (Швейцария) с содержанием стартовой аминокислоты – 0.68 ммоль/г.

Каждый цикл твёрдофазного синтеза включал следующие этапы:

1) снятие -Fmoc защиты с α-аминокропы проводили 40 мл раствора 5 % 4-метилпиперидина и 2 % DBU, в DMF в течение 5 и 10 минут последовательно, увеличивая к последнему циклу объём деблокирующей смеси до 70 мл;

2) промывка пептидилполимера после деблокирования DMF (5 x 40 мл), увеличивая объём DMF к последнему циклу до 80 мл;

3) 2 часа конденсация раствором предварительно активированного производного (8.2 ммоль Fmoc-аминокислоты + 8.2 ммоль HOBt + 8.2 ммоль DIC) в 30 мл смеси DMF: NMP (1:1), увеличивая объём до 60 мл к последнему циклу;

4) промывка пептидилполимера после конденсации DMF (5 x 40 мл), увеличивая объём DMF к последнему циклу до 80 мл;

5) нингидриновый тест на остаточные аминокропы. После присоединения N-концевой кислоты пептидилполимер промывали DMF (5 x 80мл) и добавляли раствор 2.07 г (8.16 ммоль) I<sub>2</sub> (3экв.) в 80 мл DMF и перемешивали в течение 1 ч при 25 °С. Затем

реакционный раствор отфильтровывали, пептидилполимер промывали DMF (3 x 80 мл), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 80 мл) и высушивали в течение 24 часов при 25 °С.

7.2 г соответствующего пептидилполимера обрабатывали 72 мл смеси для расщепления (90 % TFA, 5 % деионизованной воды и 5 % TIS) при 25 °С. в течение 3 ч. Полимер отфильтровывали, промывали для отщепления смесью (2x 40 мл). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении (35 °С, 15 мм.рт.ст.) до маслообразного состояния. К остатку добавляли 60 мл Et<sub>2</sub>O, выпавший осадок отфильтровывали, промывали Et<sub>2</sub>O (2x 40 мл) и лиофилизовали из 5 % AcOH в течение 24 часов.

Получали технический продукт **7** в виде лиофилизата чистотой по ВЭЖХ 88.72 %. После очистки с помощью препаративной ВЭЖХ получали лиофилизат пептида **7** чистотой > 98%, который был охарактеризован с помощью масс-спектрометрии и сравнением с коммерческими образцами Tug<sup>3</sup>-окреотэйти (CAS № 302794-43-0).

Пептид **8** (DOTA-TATE (CAS № 177943-88-3)) получали аналогично пептиду **7**. Характеристики полученных продуктов **7** и **8** приведены в *таблице 8 экспериментальных данных*.



Таблица 8

ТАБЛИЦА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

Название пептида	Содержание аминокрупп, ммоль/г	Масштаб синтеза, ммоль	Избыток I <sub>2</sub> , моль/моль	Чистота технического продукта по ВЭЖХ, %	Чистота целевого продукта по ВЭЖХ, %	Кол-во продукта, г (ммоль)	Выход на стартовую аминокислоту, %	Брутто-формула / Расчётная молекулярная масса, г/моль	Масс-спектр, m/z (I отн, %):
Окситоцин (1)	0.84	12.60	5	94.58	99.23	7.1 (6.65)	52.7 %	C <sub>43</sub> H <sub>66</sub> N <sub>12</sub> O <sub>12</sub> S <sub>2</sub> 1007.19	505.18 [M/2+2H] <sup>2+</sup> (100); 1007.57 [M] <sup>1+</sup> (14.99); 349.79 [M/3+2CH <sub>3</sub> CN+2H] <sup>3+</sup> (13.83)
D-Arg <sup>8</sup> -Вазопрессин (2)	0.84	12.60	5	92.26	99.40	7.8 (6.48)	51.42 %	C <sub>46</sub> H <sub>65</sub> N <sub>15</sub> O <sub>12</sub> S <sub>2</sub> 1084.24	1084.441 [M] <sup>1+</sup> (100); 1085.449 [M+H] <sup>1+</sup> (68.10); 2169.83 [2M] <sup>1+</sup> (8.22)
Дезаминокситоцин (3)	0.84	12.60	1.5	93.52	99.31	7.02 (6.67)	52.93 %	C <sub>43</sub> H <sub>65</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub> S <sub>2</sub> 992.18	497.70 [M/2+2H] <sup>2+</sup> (100); 516.69 [M/2+2CH <sub>3</sub> CN+2H] <sup>2+</sup> (56.31); 508.70 [M/2+2Na] <sup>2+</sup> (23.00); 992.58 [M] <sup>1+</sup> (19.38)
Десмопрессин (4)	0.84	12.60	1.5	96.94	99.52	8.17 (7.24)	57.46 %	C <sub>46</sub> H <sub>64</sub> N <sub>14</sub> O <sub>12</sub> S <sub>2</sub> 1069.22	535.28 [M/2] <sup>2+</sup> (100); 369.82 [M/3+2H+K] <sup>3+</sup> (69.07); 1069.55 [2M] <sup>1+</sup> (2.45)
Атозибан (5)	0.84	12.60	1.5	92.11	99.66	7.51 (7.12)	56.51 %	C <sub>43</sub> H <sub>67</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub> S <sub>2</sub> 994.19	994.461 [M] <sup>1+</sup> (100); 995.466 [M+H] <sup>1+</sup> (66.87); 1016.441, [M+Na] <sup>1+</sup> (12.54); 1032.428 [M+K] <sup>1+</sup> (7.68); 1989.993 [2M] <sup>1+</sup> (2.59)
Терлипрессин (6)	0.47	7.05	5	88.47	98.70	5.14 (3.79)	54.18 %	C <sub>52</sub> H <sub>74</sub> N <sub>16</sub> O <sub>15</sub> S <sub>2</sub> 1227.38	614.39[M/2+H] <sup>2+</sup> (100); 1227.59 [M] <sup>1+</sup> (13.42); 1249.53 [M+Na] <sup>1+</sup> (2.46)
	0.84	12.60		94.70	99.62	8.71 (6.47)	51.34 %		614.35[M/2+H] <sup>2+</sup> (100)
			7	94.50	99.44	8.92 (6.63)	52.61 %		614.36[M/2+H] <sup>2+</sup> (100)

			10	94.34	99.12	8.21 (6.10)	48.41 %		614.37[M/2+H] <sup>2+</sup> (100) 422.77 [M/3+3K] <sup>3+</sup> (9.92)
	1.1	16.50	5	92.46	98.87	11.42 (8.48)	51.39 %		614.39[M/2+H] <sup>2+</sup> (100); 1227.59 [M] <sup>1+</sup> (12.46); 1249.53 [M+Na] <sup>1+</sup> (3.54)
Тур <sup>3</sup> -окреотгэйт (Тур <sup>3</sup> -TATE)	0.68	2.72	3	88.72	98.84	1.74 (1.57)	57.60 %	C <sub>49</sub> H <sub>64</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S <sub>2</sub> 1049.23	525.19[M/2+H] <sup>2+</sup> (100); 1049.46 [M] <sup>1+</sup> (34.22); 351.01 [M/3+3H] <sup>3+</sup> (8.74)
DOTA-TATE		0.55		84.63	99.32	0.54 (0.36)	65.45 %	C <sub>65</sub> H <sub>90</sub> N <sub>14</sub> O <sub>19</sub> S <sub>2</sub> 1435.63	718.36 [M/2+H] <sup>2+</sup> (100); 729.34 [M/2+Na] <sup>2+</sup> (38.45); 775.40 [M/2+CF <sub>3</sub> COO] <sup>2+</sup> (16.36); 737.79 [M/2+K] <sup>2+</sup> (11.15); 346.97 [M-[Ac-Tyr <sup>3</sup> -TATE]] <sup>1+</sup> (9.76)

## В Ы В О Д Ы

1. Разработан новый подход к замыканию внутримолекулярной дисульфидной связи в регуляторных пептидах на полимерном носителе, который отличается простотой проведения эксперимента, воспроизводимостью результатов, и может быть применим для получения фармакопейных препаратов в промышленных масштабах.

2. Изучены и оптимизированы условия замыкания S-S мостика на полимере для аналогов соматостатина и нейрогипофизарных гормонов: окситоцина, D-Arg<sup>8</sup>-вазопрессина, дезаминоокситоцина, атозибана, десмопрессина, терлипрессина, Tug<sup>3</sup>-окреотэйтa и DOTA-TATE.

3. Показано, что высокая чистота технических продуктов твёрдофазной циклизации (более 90 % по данным ВЭЖХ) позволяет легко получить препараты фармакопейного качества.

4. С помощью молекулярного моделирования была подтверждена предлагаемая схема замыкания внутримолекулярной S-S связи, что найдет применение при изучении любых аналогов соматостатина и нейрогипофизарных гормонов.

5. Проведено масштабирование процесса циклизации с целью получения нейрогипофизарных гормонов, их аналогов и аналогов гормона соматостатина с высокими выходами.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lau J.L. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2018. – V. 26. – № 10. – P. 2700–2707.
2. Schteingart C.D. From Natural Peptides to Market // *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. – 2017. – V. 50. – P. 543–586.
3. Sachdeva S. Peptides as ‘Drugs’: The Journey so Far // *Int. J. Pept. Res. Ther.* – 2017. – V. 23. – P. 49–60.
4. Muttenthaler M., King G.F., Adams D.J. Trends in peptide drug discovery // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2021. – V. 20. – № 4. – P. 309–325.
5. Gongora-Benitez M., Albericio F. Multifaceted Roles of Disulfide Bonds. Peptides as Therapeutics // *Chemical Reviews*. – 2014. – V. 114. – № 2. – P. 901–926.
6. Mengjiao Xu., Xingzhu Li, Ping Li, Siyu Zhao Modified natriuretic peptides and their potential roles in cancer treatment // *Biomedical Journal*. – 2022. – V. 45. – № 1. – P. 118–131.
7. Tomoh M. Historical review: Endothelin // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2004. – V. 25. – № 4. – P. 219–224.
8. Lamers C., Mastellos D.C., Ricklin D., Lambris J.D. Compstatins: the dawn of clinical C3-targeted complement inhibition // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2022. – V. 43. – № 8. – P. 629 – 640.
9. Young-A Heo. Vosoritide in achondroplasia: a profile of its use // *Drugs and Therapy Perspectives*. – 2022. – V. 38. – № 10. – P. 417–422.
10. Xinwang Yang., Ying Wang, Chunyun Wu, Eng-Ang Ling Animal Venom Peptides as a Treasure Trove for New Therapeutics Against Neurodegenerative Disorders // *Current Medicinal Chemistry*. – 2019. – V. 26. – P. 4749–4774.
11. Finol-Urdaneta R.K., Belovanovic A., Kinsella G.K. Marine Toxins Targeting Kv1 Channels: Pharmacological Tools and Therapeutic Scaffolds // *Mar. Drugs*. – 2020. – V. 18. – P. 173.
- 12.. Avdeev D.V., Ovchinnikov M.V., Dudkina Y.S., Molokoedov A.S., Azmuko A.A., Palkeeva M.E., Sidorova M.V. Optimal Method for Disulfide Bond Closure in the Synthesis of Atosiban – Antagonist of Oxytocin Receptors // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2021. – V. 47. – P. 1241–1248.
13. Nestor Jr.J.J. The Medicinal Chemistry of Peptides // *Current Medicinal Chemistry*. – 2009. – V. 16. – № 33. – P. 4399–4418.
14. Buckton L.K., Rahimi M.N., McAlpine S.R. Cyclic Peptides as Drugs for Intracellular Targets: The Next Frontier in Peptide Therapeutic Development // *Chem. Eur. J.* – 2021. – V. 27. – P. 1487–1513.

15. Kurtzhals P., Oestergaard S., Kjeldsen T. Derivatization with fatty acids in peptide and protein drug discovery // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2022.
16. Jeon Hye-Yoon., Lee Ah-Jun, Kwon-Soo Ha Polymer-Based Delivery of Peptide Drugs to Treat Diabetes: Normalizing Hyperglycemia and Preventing Diabetic Complications // *BioChip*. – 2022. – V. 16. – P. 111–127.
17. Noura G. Eissa, Mahmoud Elsabahy, Ayat Allam Engineering of smart nanoconstructs for delivery of glucagon-like peptide-1 analogs // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2021. – V. 597. – P. 12037.
18. Sousa M.G.C., Rezende T.M.B., Franco O.L. Nanofibers as drug-delivery systems for antimicrobial peptides // *Drug Discovery Today*. – 2021. – V. 26. – № 8. – P.2064–2074.
19. Ruzza P. Peptides and Peptidomimetics in Medicinal Chemistry // *Medicinal Chemistry and Drug Design*. – 2012. – P. 297–314.
20. Craik D.J., Fairlie D.P., Liras S. The Future of Peptide-based Drugs // *Chem Biol Drug Des*. – 2013. – V. 81. – P. 136–147.
21. Vlieghe V., Lisowski J., Khrestchatisky M. Synthetic therapeutic peptides: science and market // *Drug Discovery Today*. – 2010. – V. 15. – P. 40–56.
22. Cooper B.M., Iegre J., O’ Donovan D.H., Halvarsson M.O. Peptides as a platform for targeted therapeutics for cancer: peptide-drug conjugates (PDCs) // *Chem. Soc. Rev.* –2021. – V. 50. – P. 1480–1494.
23. Davenport A.P., Scully C.G., Maguire J.J. Advances in therapeutic peptides targeting G protein-coupled receptors // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2020. – V. 19. – № 6. – P. 389–413.
24. Falcetta P., Aragona M., Bertolotto A., Bianchi C. Insulin discovery: A pivotal point in medical history // *Metabolism Clinical and Experimental*. – 2022. – V. 127. – P. 154941.
25. Hirsch B. Irl. Insulin Analogues // *The new england journal of medicine*. – 2005. – V. 352. – P.174–183.
26. Ryden L., Lindsten J. The history of the Nobel prize for the discovery of insulin // *Diabetes Research and Clinical Practice*. – 2021. – V. 175. – P. 108819.
27. Malte O., Imithri B., Banu M.A. Vincent du Vigneaud: following the sulfur trail to the discovery of the hormones of the posterior pituitary gland at Cornell Medical College // *Journal of neurosurgery*. – 2016. – V. 124. – № 5. – P. 1538–1542.
28. Wimalawansa Sunil J. Calcitonin: History, Physiology, Pathophysiology and Therapeutic Applications // *Osteoporosis in Men*. – 2010. – P. 653–666.
29. Trofimiuk-Müldner M., Hubalewska-Dydejczyk A. Somatostatin: The History of Discovery // *Somatostatin. Somatostatin Analogues*. – 2015. – P. 1–5.

30. Melpomeni F., Rosalba M., Guillaume P.N. Radiolabeled Somatostatin Analogs – A Continuously Evolving Class of Radiopharmaceuticals // *Cancers*. – 2022. – V. 14. – P. 1172.
31. Misler S., Zhou Z., Dickey A.S., Silva A.M. Electrical activity and exocytotic correlates of biphasic insulin secretion from  $\beta$ -cells of canine islets of Langerhans: Contribution of tuning two modes of  $\text{Ca}^{2+}$  entry-dependent exocytosis to two modes of glucose-induced electrical activity // *Channels*. – 2009. – V. 3. – № 3. – P. 181–193.
32. Jensen V.F.H., Nowak J., Fels J.J., Bøgh I.B. Prolonged insulin-induced hypoglycaemia reduces  $\beta$ -cell activity rather than number in pancreatic islets in non-diabetic rats // *Scientific Reports*. – 2022. – V. 12. – № 1. – P. 14113.
33. Dehestani B., Stratford N.R.S., W le Roux C. Amylin as a Future Obesity Treatment // *Journal of Obesity & Metabolic Syndrome*. – 2021. – V. 30. – № 4. – P. 320–325.
34. Kowalczyk R., Brimble M.A., Tomabechi Y., Fletcher M. Convergent chemoenzymatic synthesis of a library of glycosylated analogues of pramlintide: structure-activity relationships for amylin receptor agonism // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2014. – V. 12. – № 4. – P. 8102–8355.
35. Yunseok Heo, Eojin Yoon, Ye-Eun Jeon, Ji-Hye Yun, Naito Ishimoto, Hyeonuk Woo Cryo-EM structure of the human somatostatin receptor 2 complex with its agonist somatostatin delineates the ligand-binding specificity // *eLife*. – 2022. – V. 11. – P. e76823.
36. Bilal Haider Shamsi, Mahanand Chatoo, Xiao Kang Xu, Xun Xu, Xue Qun Chen Versatile Functions of Somatostatin and Somatostatin Receptors in the Gastrointestinal System // *Frontiers in endocrinology*. – 2021. – V. 12. – P. 652363.
37. Qiong Xiang, Jia-sheng Tao, Jing-Jing Li, Rong-Bo Tian, Xian-Hui Li Changes in dorsal root ganglion CGRP expression in mouse pinch nerve injury model: Modulation by Somatostatin type-2 receptor // *Journal of Chemical Neuroanatomy*. – 2022. – V. 121. – P. 102086.
38. Putraa S., Masanoria N., Yoichib U., Toshihiko Y. CNS control of metabolism: Suprachiasmatic vasopressin to paraventricular oxytocin neurocircuit in the hypothalamus relays light reception to inhibit feeding behavior // *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*. – 2018. – V. 315. – № 4. – P. 478–488.
39. Urtado J. Silva, Galhardoni R., Ciampi de Andrade D., Brito I. Effects of intranasal oxytocin on tactile perception // *Neuroscience Letters*. – 2019. – V. 698. – P. 64–68.
40. Shann M´enard, H´el`ene Gelez, Genaro A. Coria-Avila, James G. Pfaus Sexual experience increases oxytocin, but not vasopressin, receptor densities in the medial preoptic area, ventromedial hypothalamus, and central amygdala of male rats // *Psychoneuroendocrinology*. – 2022. – V. 146. – P. 105900.

41. Hansson A.C., Spanagel R. No changes in the oxytocin system in alcohol-dependent female rodents and humans: Towards a sex-specific psychopharmacology in alcoholism // *Addiction Biology*. – 2021. – V. 26. – № 2. – P. e12945.
42. Bous J., Orcel H., Floquet N., Leyrat C., Lai-Kee-Him J. Cryo-electron microscopy structure of the antidiuretic hormone arginine-vasopressin V2 receptor signaling complex // *Science Advances*. – 2021. – V. 21. – № 7. – P. eabg5628.
43. Tugba Mutu Pek, Esra Yazici, Derya Guzel, Elif Kose, Ahmet Bülent Yazıcı, Atila Erol The relationship between oxytocin, vasopressin and atrial natriuretic peptide levels and cognitive functions in patients with schizop hrenia // *Psychiatry and clinical psychopharmacology*. – 2019. – V. 29. – № 4. – P. 798–810.
44. Montgomery Lynnette R., Hubscher C.H. Altered vasopressin and natriuretic peptide levels in a rat model of spinal cord injury: Implications for the development of polyuria // *American Journal of Physiology – Renal Physiology*. – 2022. – V. 314. – № 1. – P. 58–66.
45. Kerr B., Brandon L. Atrial Fibrillation, thromboembolic risk, and the potential role of the natriuretic peptides, a focus on BNP and NT-proBNP – A narrative review // *IJC Heart & Vasculature*. – 2022. – V. 43. – P. 101132.
46. Forte L.R. Guanylin regulatory peptides: structures, biological activities mediated by cyclic GMP and pathobiology // *Regulatory Peptides*. – 1999. – V. 81. – P. 25–39.
47. Blomain E.S., Rappaport J.A., Pattison A.M., Bashir B., Caparosa E. APC- $\beta$ -catenin-TCF signaling silences the intestinal guanylin-GUCY2C tumor suppressor axis // *Cancer Biology & Therapy*. – 2020. – V. 21. – № 5. – P. 441–451.
48. Sekiguchi T., Akira S., Honoo S., Hiroki T., Kenjic K., Ajai K, Masatog Ikari, Takahiroa Hattori Calcitonin-typical suppression of osteoclastic activity by amphioxus calcitonin superfamily peptides and insights into the evolutionary conservation and diversity of their structures // *General and Comparative Endocrinology*. – 2017. – V. 246. – P. 294–300.
49. Yi-Lynn Liang, Khoshouei M., Deganutti G., Glukhova A., Koole C., Radjainia M. Cryo-EM structure of the active, Gsprotein complexed, human CGRP receptor // *Nature*. – 2018. – V. 561. – P. 492–499.
50. Hay D.L., Garelja M.L., Poyner D.R., Walker C.S. Update on the pharmacology of calcitonin/CGRP family of peptides: IUPHAR Review 25 // *British Journal of Pharmacology*. – 2018. – V. 175. – P. 3–17.
51. Min Su Kim, Bo Yeon Kim, Allen Saghetlians, Xiang Zhang, Takuya Okida, So Yeon Kim Anti-nociceptive effects of dual neuropeptide antagonist therapy in mouse model of neuropathic and inflammatory pain // *Korean J Pain*. – 2022. – V. 35. – № 2. – P. 173–182.

52. Sukjae J. Kang, Shijia Liu, Mao Ye, Dong-Il Kim, Gerald M. Pao, Bryan A. Copits, Benjamin Z. Roberts A central alarm system that gates multi-sensory innate threat cues to the amygdala // *Cell Reports*. – 2022. – V. 40. – № 7. – P. 111222.
53. Li C.Y., Yap K., Swedberg J.E. Binding Loop Substitutions in the Cyclic Peptide SFTI-1 Generate Potent and Selective Chymase Inhibitors // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2020. – V. 63. – № 2. – P. 816–826.
54. de Veer S.J., White A.M., Craik D.J. Sunflower Trypsin Inhibitor-1 (SFTI-1): Sowing Seeds in the Fields of Chemistry and Biology // *Angewandte Chemie – International Edition*. – 2021. – V. 60. – № 15. – P. 8050–8071.
55. Stec B. Plant thionins – the structural perspective // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2006. – V. 63. – P. 1370–1385.
56. Ho`ng K., Austerlitz T., Bohlmann H. The thionin family of antimicrobial peptides // *PLoS ONE*. – 2021. – V. 16. – № 7. – P. e0254549.
57. Xiumei Luo, WenxianWu, Li Feng, Haim Treves Maozhi Ren Short Peptides Make a Big Difference: The Role of Botany-Derived AMPs in Disease Control and Protection of Human Health // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22. – P. 11363.
58. de Veer S.J., Meng-Wei Kan, Craik D.J. Cyclotides: From Structure to Function // *Chemical Reviews*. – 2019. – V. 119. – P. 12375–12421.
59. Jayapriya Venkatesan, Durba Roy, Jayapriya Venkatesan Cyclic cystine knot and its strong implication on the structure and dynamics of cyclotides // *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. – 2022. – P. 1–12.
60. Weidmann J., Craik D.J. Discovery, structure, function, and applications of cyclotides: circular proteins from plants // *Journal of Experimental Botany*. – 2016. – V. 67. – № 16. – P. 4801–4812.
61. Jacob B., Vogelaar A., Cadenas E., Camarero J.A. Using the Cyclotide Scaffold for Targeting Biomolecular Interactions in Drug Development // *Molecules*. – 2022. – V. 27. – № 19. – P. 6430.
62. Eliasena R., Andresen T.L., Conde-Frieboes K.W. Handling a tricycle: Orthogonal versus random oxidation of the tricyclic inhibitor cystine knotted peptide gurmarin // *Peptides*. – 2012. – V. 37. – P. 144–149.
63. Chang A.W., Dowd S.E., Brackee G., Fralick J.A. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm formation by gurmarin, a plant-derived cyclic peptide // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2022. – V. 12. – P. 1017545.
64. Koh Takeuchi, Solution Eun Ju Park, Chul Won Lee, Jae Il Kim, Hideo Takahashi, Kenton J. Swartz, Ichio Shimada Structure of  $\nu$ -Grammotoxin SIA, A Gating Modifier of P/Q and N-type  $\text{Ca}^{2+}$  Channel // *J. Mol. Biol.* – 2002. – V. 321. – P. 517–526.



65. Seigo Ono, Tadashi Kimura, Tai Kubo Characterization of voltage-dependent calcium channel blocking peptides from the venom of the tarantula *Grammostola rosea* // *Toxicon*. – 2011. – V. 58. – P. 265–276.
66. Kimura T. Stability and Safety of Inhibitor Cystine Knot Peptide, GTx1-15, from the Tarantula Spider *Grammostola rosea* // *Toxins*. – 2021. – V. 13. – № 9. – P. 621.
67. Cherki R.S., Kolb E., Langut Y., Bajayo N. Two tarantula venom peptides as potent and differential NaV channels blockers // *Toxicon*. – 2014. – V. 77. – P. 58–67.
68. Yunxiao Zhang, Li Wang, Dezheng Peng, Qingfeng Zhang, Qiuchu Yang, Jiayan Li, Dan Li, Dongfang Tang Engineering of highly potent and selective HNTX-III mutant against hNav1.7 sodium channel for treatment of pain // *Journal of Biological Chemistry*. – 2021. – V. 296. – P. 100326.
69. Yu Liu, Zhisheng Liu, Qing Wang, Zhen Wang, Yuxia Zhang HNTX-III Alleviates Inflammatory and Neuropathic Pain in Animal Models // *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. – 2019. – V. 25. – P. 799–806.
70. Liping Jiang, Meichun Deng, Zhigui Duan, Xing Tang, Songping Liang Molecular cloning, bioinformatics analysis and functional characterization of HWTX-XI toxin superfamily from the spider *Ornithoctonus huwena* // *Peptides*. – 2014. – V. 54. – P. 9–18.
71. Agwa A.J., Lawrence N., Deplazes E., Henriques S.T. Spider peptide toxin HwTx-IV engineered to bind to lipid membranes has an increased inhibitory potency at human voltage-gated sodium channel hNav1.7 // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2017. – V. 1859. – № 5. – P. 835–844.
72. Ferrat G., Bosmans F., Darbon H., Corzo G. Solution Structure of Two Insect-Specific Spider Toxins and Their Pharmacological Interaction with the Insect Voltage-Gated Na<sup>+</sup> Channel // *Proteins*. – 2005. – V. 59. – №2. – P. 368–379.
73. Montnach J., Nicolas S., Marionneau C. Fluorescent- and tagged-prototoxin II peptides: potent markers of the Nav1.7 channel pain target // *British Journal of Pharmacology*. – 2021. – V. 178. – № 13. – P. 2632–2650.
74. Wright Z.V.F., McCarthy S., Dickman R., Sanchez-Martinez S. The Role of Disulfide Bond Replacements in Analogues of the Tarantula Toxin ProTx-II and Their Effects on Inhibition of the Voltage-Gated Sodium Ion Channel Nav1.7 // *J. Am. Chem. Soc.* – 2017. – V. 139. – №. 37. – P. 13063–13075.
75. Ashok Balaji R., Toru Sasaki, Gopalakrishnakone P. Purification, structure determination and synthesis of covalitoxin-II, a short insect-specific neurotoxic peptide from the venom of the *Coremiocnemis validus* (Singapore tarantula) // *FEBS Letters*. – 2000. – V. 474. – № 2–3. – P. 208 – 212.
76. Gupta K., Zamanian M., Milesco M. Tarantula toxins use common surfaces for interacting with Kv and ASIC ion channels // *eLife*. – 2015. – V. 4. – P. 1–20.

77. Lee-Ming Kow, Kandel H., Kilinc M. Potassium channels and the development of arousal-relevant action potential trains in primary hindbrain neurons // *Brain Research*. – 2021. – V. 1768. – P. 1–13.
78. Hönigsperger C., Nigro J., Storm J.F. Physiological roles of Kv2 channels in entorhinal cortex layer II stellate cells revealed by Guanyxitoxin-1E // *Journal of Physiology*. – 2017. – V. 595. – № 3. – P. 739–757.
79. Bosmans F., Swartz K.J. Targeting voltage sensors in sodium channels with spider toxins // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2010. – V. 31. – № 4. – P. 175–182.
80. Lou K.-L., Hsieh M.-H, Chen W.-J. Hanatoxin Inserts into Phospholipid Membranes without Pore Formation // *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. – 2017. – V. 1859. – № 5. – P. 917–923.
81. Milesu M., Lee Hwa C., Chan Hyung Bae, Jae Il Kim Opening the Shaker K<sup>+</sup> channel with hanatoxin // *Journal of General Physiology*. – 2013. – V. 141. – № 2. – P. 203–216.
82. Chen R., Robinson A., Shin-Ho Chung Binding of Hanatoxin to the Voltage Sensor of Kv2.1 // *Toxins*. – 2012. – V. 4. – № 12. – P. 1552–1564.
83. Escoubas P., Rash L. Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists // *Toxicon*. – 2004. – V. 43. – № 5. – P. 555–574.
84. Mouhat S., Andreotti N., Jouirou B. Animal Toxins Acting on Voltage-Gated Potassium Channels // *Current Pharmaceutical Design*. – 2008. – V. 14. – № 24. – P. 2503–2518.
85. Ebbinghaus J., Legros C., Nolting A., Ba'hring R. Modulation of Kv4.2 channels by a peptide isolated from the venom of the giant bird-eating tarantula *Theraphosa leblondi* // *Toxicon*. – 2004. – V. 43. – № 8. – P. 923–932.
86. Zarayskiy V.V., Balasubramanian G., Bondarenko V.E., Morales M.J. Heteropoda toxin 2 is a gating modifier toxin specific for voltage-gated KC channels of the Kv4 family // *Toxicon*. – 2005. – V. 45. – № 4. – P. 431–442.
87. Coulter-Parkhill A., McClean S., Irwin N. Therapeutic Potential of Peptides Derived from Animal Venoms: Current Views and Emerging Drugs for Diabetes // *Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes*. – 2021. – V. 14. – P. 1–13.
88. Chagot B., Escoubas P., Villegas E., Bernard C., Lazdunski M. Solution structure of Phrixotoxin 1, a specific peptide inhibitor of Kv4 potassium channels from the venom of the theraphosid spider *Phrixotrichus auratus* // *Protein Science*. – 2004. – V. 13. – № 5. – P. 1197–208.
89. Ono S., Kimura T., Kubo T. Characterization of voltage-dependent calcium channel blocking peptides from the venom of the tarantula *Grammostola rosea* // *Toxicon*. – 2011. – V. 58. – № 3. – P. 265–276.

90. Escoubas P., Diochot S., Célérier M.-L., Lazdunski M. Novel Tarantula Toxins for Subtypes of Voltage-Dependent Potassium Channels in the Kv2 and Kv4 Subfamilies // *Molecular pharmacology*. – 2002. – V. 62. – № 1. – P. 48–57.
91. Xi Zoë Zhong, Khaled S Abd-Elrahman, Chiu-Hsiang Liao, Ahmed F El-Yazbi, Emma J Walsh, Michael P Walsh, William C. Cole Stromatoxin-sensitive, heteromultimeric Kv2.1/Kv9.3 channels contribute to myogenic control of cerebral arterial diameter // *J Physiol*. – 2010. – V. 588. – № 22. – P. 4519–4537.
92. Nicholson G.M., Little M.J., Birinyi-Strachan L.C. Structure and function of  $\delta$ -atracotoxins: lethal neurotoxins targeting the voltage-gated sodium channel // *Toxicon*. – 2004. – T. 43. – № 5. – P. 587–599.
93. Borrego J., Clement H., Corrales-García L.-L. Key amino acid residues involved in mammalian and insecticidal activities of Magi4 and Hv1b, cysteine-rich spider peptides from the  $\delta$ -atracotoxin family // *Amino Acids*. – 2020. – V. 52. – № 3. – P. 465–475.
94. Liu Y., Hagan R., Schoellerman J. Dual actions of Psalmotoxin at ASIC1a and ASIC2a heteromeric channels (ASIC1a/2a) // *Scientific Reports*. – 2018. – V. 8. – № 1. – P. 1–11.
95. Dibas A., Millar C., Al-Farra A., Yorio T. Neuroprotective Effects of Psalmotoxin-1, an Acid-Sensing Ion Channel (ASIC) Inhibitor, in Ischemia Reperfusion in Mouse Eyes // *Current Eye Research*. – 2018. – V. 43. – № 7. – P. 921–933.
96. Cromera B.A., McIntyre P. Painful toxins acting at TRPV1 // *Toxicon*. – 2008. – V. 51. – № 2. – P. 163–173.
97. Gazerani P., Cairns B.E. Venom-based biotoxins as potential analgesics // *Expert Review of Neurotherapeutics*. – 2014. – V. 14. – № 11. – P. 1261–1274.
98. Tanner J.D., Deplazes E., Mancera R.L. The biological and biophysical properties of the spider peptide gomesin // *Molecules*. – 2018. – V. 23. – № 7. – P. 1–19.
99. Lorenzini D.M., da Silva Jr. P.I., Fogaca A.C. Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana* // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2003. – V. 27. – № 9. – P. 781–791.
100. Shan Zhang, Mingwei Wan, Junjie Song, Lianghui Gao, Weihai Fang Peripheral Antimicrobial Peptide Gomesin Induces Membrane Protrusion, Folding, and Laceration // *Langmuir*. – 2019. – V. 35. – № 40. – P. 13233–13242.
101. Benfield A.H., Defaus S., Lawrence N., Henriques S.T. Cyclic gomesin, a stable redesigned spider peptide able to enter cancer cells // *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. – 2021. – V. 1863. – № 1. – P. 1–42.

102. Ikonopoulou M.P., Fernandez-Rojo M.A., Pineda S.S. Gomeisin inhibits melanoma growth by manipulating key signaling cascades that control cell death and proliferation // *Scientific Reports*. – 2018. – T. 8. – № 1. – P. 1–32.
103. Xiuwen Yan, Xuening Yang, Qiaolin Che, Rui Liu, Hailong Yang, Xiuhong Liu Bi-functional peptides with both trypsin-inhibitory and antimicrobial activities are frequent defensive molecules in Ranidae amphibian skins // *Amino Acids*. – 2012. – V. 43. – № 1. – P. 309–316.
104. Tao Wang, Yangyang Jiang, Xiaoling Chen, Lei Wang, Chengbang Ma, Xiping Xi Ranacyclin-NF, a Novel Bowman–Birk Type Protease Inhibitor from the Skin Secretion of the East Asian Frog, *Pelophylax nigromaculatus* // *Biology*. – 2020. – V. 9. – № 7. – P. 1–15.
105. Xue Hao, Xiaopeng Tang, Lei Luo, Yuming Wang, Ren Lai, Qiumin Lu A novel ranacyclin-like peptide with anti-platelet activity identified from skin secretions of the frog *Amolops loloensis* // *Gene*. – 2016. – V. 576. – № 1. – P. 171–175.
106. Narasimhaiah S., Purna S.K., Ramakrishnan N. Structure-Function Relationship Studies on the Frog Skin Antimicrobial Peptide Tigerinin 1: Design of Analogs with Improved Activity and Their Action on Clinical Bacterial Isolates // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2002. – V. 46. – № 7. – P. 2279–2283.
107. Antony A., Olakkaran S., Shekh S. Antitumor activity of Tigerinin-1: Necroptosis mediates toxicity in A549 cells // *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*. – 2022. – V. 1866. – № 9. – P. 1–16.
108. Yuzhu Song, Yi Lub, Lijun Wang, Hailong Yang, Keyun Zhang, Ren Lai Purification, characterization and cloning of two novel tigerinin-like peptides from skin secretions of *Fejervarya cancrivora* // *Peptides*. – 2009. – V. 30. – № 7. – P. 1228–1232.
109. Ojo O.O., Abdel-Wahab Y.H.A., Flatt P.R. Tigerinin-1R: a potent, non-toxic insulin-releasing peptide isolated from the skin of the Asian frog, *Hoplobatrachus rugulosus* // *Diabetes, Obesity and Metabolism*. – 2011. – V. 13. – № 12. – P. 1114–1122.
110. Domhan C., Zimmermann P. Uhl., Kleist C. Replacement of l-Amino Acids by d-Amino Acids in the Antimicrobial Peptide Ranalexin and Its Consequences for Antimicrobial Activity and Biodistribution // *Molecules*. – 2019. – V. 24. – № 16. – P. 1–12.
111. Şeyda Kara, Cemil Kürekci, Muharrem Akcan Design and modification of frog skin peptide brevinin-1GHa with enhanced antimicrobial activity on Gram-positive bacterial strains // *Amino Acids*. – 2022. – V. 54. – № 9. – P. 1327–1336.
112. Heejeong Kim, Byeong Jae Lee, Mun Han Lee, Seong Geun Hong Mechanisms of selective antimicrobial activity of gaegurin 4 // *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2009. – V. 13. – № 1. – P. 39–47.

113. Dash R., Bhattacharjya S. Thanatin: An emerging host defense antimicrobial peptide with multiple modes of action // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – V. 22. – № 4. – P. 1–13.
114. Schwinges P., Jakob F. A bifunctional dermaseptin–thanatin dipeptide functionalizes the crop surface for sustainable pest management // *Green Chemistry*. – 2019. – V. 21. – № 9. – P. 2316–2325.
115. Hongyan Zhang, Sha Liu, Xindan Li, Wenjun Wang, Lili Deng Interaction of Antimicrobial Peptide Ponericin W1, Thanatin, and Mastatopara-S with *Geotrichum citri-aurantii* Genomic DNA // *Foods*. – 2021. – V. 10. – № 8. – P. 1–13.
116. Jacky C.H. Chu, Miu Ling Chin, Clarence T.T. One-Pot Synthesis of a Cyclic Antimicrobial Peptide-Conjugated Phthalocyanine for Synergistic Chemo-Photodynamic Killing of Multidrug-Resistant Bacteria // *Advanced Therapeutics*. – 2021. – V. 4. – № 3. – P. 1–10.
117. Ji-Yeong Sim, Shanghyeon Kim, Jaeho Lee, Hyunjung Lim A significantly enhanced antibacterial spectrum of D-enantiomeric lipopeptide bactenecin // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2019. – V. 514. – № 2. – P. 497–502.
118. Huttner K.M., Lambeth M.R. Localization and genomic organization of sheep antimicrobial peptide genes // *Gene*. – 1998. – V. 206. – № 1. – P. 85–91.
119. Bellm L., Ganz T. Protegrins: New antibiotics of mammalian origin // *Expert Opinion on Investigational Drugs*. – 2000. – V. 9. – № 8. – P. 1731–1742.
120. Shruti Sunil Ranade, Rajasekaran Ramalingam A Review on Bioactive Porcine Peptide, Protegrin-1 // *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. – 2020. – V. 26. – № 3. – P. 1493–1501.
121. Zhang Chuanliang, Gao Jiangming, Yang Xianmin, Song Shengnan Design, synthesis and antibacterial activity of a class of novel molecular engineering analogues of Tachyplesin I // *Phytochemistry Letters*. – 2022. – V. 52. – P. 54–58.
122. Pramod Shah, Chien-Sheng Chen Systematical Screening of Intracellular Protein Targets of Polyphemusin-I Using *Escherichia coli* Proteome Microarrays // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – V. 22. – № 17. – P. 1–19.
123. Tamamura H., Masuda M. A comparative study of the solution structures of tachyplesin I and a novel anti-HIV synthetic peptide, T22 ([Tyr<sup>5,12</sup>, Lys<sup>7</sup>]-polyphemusin II), determined by nuclear magnetic resonance // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*. – 1993. – V. 1163. – № 2. – P. 209–216.
124. Jun Wu, Xi Chen, Jiayi Zhang, Jianming Chen, Yajun Wang Tachyplesin induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells and enhances the chemosensitivity of A549/DDP cells to cisplatin by

activating Fas and necroptosis pathway // *Chemical Biology and Drug Design*. – 2021. – V. 97. – № 4. – P. 809–820.

125. Marggraf M.B., Pantelev P.V., Ovchinnikova T.V. Cytotoxic potential of the novel horseshoe crab peptide polyphemusin III // *Marine Drugs*. – 2018. – V. 16. – № 12. – P. 1–19.

126. Andrá J., Grötzinger J., Krasnosdembskaya A.D. Structure and mode of action of the antimicrobial peptide arenicin // *Biochemical Journal*. – 2008. – V. 410. – № 1. – P. 113–122.

127. Krenev I., Umnyakova E.S., Pantelev P.V. Antimicrobial Peptide Arenicin-1 Derivative Ar-1-(C/A) as Complement System Modulator // *Marine Drugs*. – 2020. – V. 18. – № 12. – P. 1–13.

128. Umerska A., Saulnier P. Synergistic Effect of Combinations Containing EDTA and the Antimicrobial Peptide AA230, an Arenicin-3 Derivative, on Gram-Negative Bacteria // *Biomolecules*. – 2018. – V. 8. – № 4. – P. 1–13.

129. Zhenlong Wang, Na Yang, Da Teng, Ya Hao Resistance response to Arenicin derivatives in *Escherichia coli* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2022. – V. 106. – № 1. – P. 211–226.

130. Maltseva A.L., Kotenko O.N. Expression pattern of arenicins – the antimicrobial peptides of polychaete *Arenicola marina* // *Frontiers in Physiology*. – 2014. – V. 5. – P. 1–12.

131. Fox J.L. Antimicrobial peptides stage a comeback // *Nature Biotechnology*. – 2013. – V. 31. – № 5. – P. 379–382.

132. Xiaojie Wang, Xiumin Wang, Da Teng, Yong Zhang, Ruoyu Mao Candidacidal mechanism of the arenicin-3-derived peptide NZ17074 from *Arenicola marina* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2014. – V. 98. – № 17. – P. 7387–7398.

133. Sulan Luo, Xiaopeng Zhu, Yong Wu, Dongting Zhangsun Conotoxins and Drug Discovery with Special Reference to Hainan Species // *Toxins and Drug Discovery, Toxinology*. – 2017. – P. 149–187.

134. Jimenez E.C., Cruz J. Conotoxins as Tools in Research on Nicotinic Receptors // *Toxins and Drug Discovery, Toxinology*. – 2017. – P. 189–204.

135. Ueberheide B.M., Fenyó D. Rapid sensitive analysis of cysteine rich peptide venom components // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – V. 106. – № 17. – P. 6910–6915.

136. Tosti E., Boni R. Pathophysiological Responses to Conotoxin Modulation of Voltage-Gated Ion Currents // *Marine Drugs*. – 2022. – V. 20. – № 5. – P. 1–15.

137. Löschner D., Reichart R. What became of Prialta<sup>®</sup>?: Observational study on the use of ziconotide in the treatment of chronic pain // *Schmerz*. – V. 35. – № 5. – P. 343–348.

138. Schmidt C.A., Peigneur S., Daly N.L. Identification and Characterization of a Peptide from the Stony Coral *Heliofungia actiniformis* // Journal of Natural Products. – 2020. – V. 83. – № 11. – P. 3454–3463.
139. Wu Lingzhi, Li Ying, Yang Yang, Qin Meng Deciphering structural and functional roles of disulfide bonds in decorsin // Science China Chemistry. – 2013. – V. 56. – № 10. – P. 1485–1492.
140. Xingzhen Lao, Jingxiao Bao, Tingting Yu, Qingqing Li Structural and functional aspects of decorsin and its analog as recognized by integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 // Journal of Molecular Modeling. – 2016. – V. 22. – № 11. – P. 1–10.
141. Tajtia G. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 as a therapeutic target for venom-derived peptides // Biochemical Pharmacology. – 2020. – V. 181. – P. 1–14.
142. Iadonato S.P., Munoz E.J., Chesko J., Tarcha E.J. Sustained release depot formulations of therapeutic proteins, and uses thereof // Patent WO 2015/100370 A1.
143. Gubič Š., Hendrickx L.A., Sterle M. Discovery of Kv1.3 ion channel inhibitors: Medicinal chemistry approaches and challenges // Medicinal Research Reviews. – 2020. – V. 41. – № 4. – P. 2423–2473.
144. Zongyun Chen, Youtian Hua, Jun Hua, Weishan Yang Unusual binding mode of scorpion toxin BmKTX onto potassium channels relies on its distribution of acidic residues // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2014. – V. 447. – № 1. – P. 70–76.
145. Jianhua Shao, Rong Zhang, Xin Ge, Bin Yang Analgesic Peptides in *Buthus martensii* Karsch: A Traditional Chinese Animal Medicine // Asian Journal of Traditional Medicines. – 2007. – V. 2. – № 2. – P. 45–50.
146. Fang Ye, Youtian Hu, Weiwei Yu The Scorpion Toxin Analogue BmKTX-D33H as a Potential Kv1.3 Channel-Selective Immunomodulator for Autoimmune Diseases // Toxins. – 2016. – V. 8. – № 4. – P. 1–12.
147. Rajabrata Bhuyan, Alpana Seal Molecular dynamics of Kv1.3 ion channel and structural basis of its inhibition by scorpion toxin-OSK1 derivatives // Biophysical Chemistry. – 2015. – V. 203–204. – P. 1–11.
148. Bingzheng Shen, Zhijian Cao, Wenxin Li, Jean-Marc Sabatier Treating autoimmune disorders with venom-derived peptides // Expert Opinion on Biological Therapy. – 2017. – V. 17. – № 9. – P. 1065–1075.
149. Rashid M.H., Tanner M.R. A potent and Kv1.3-selective analogue of the scorpion toxin HsTX1 as a potential therapeutic for autoimmune diseases // Scientific Reports. – 2014. – V. 4. – P. 1–9.

150. Bruno L., Akikazu Y. A four-disulphide-bridged toxin, with high affinity towards voltage-gated K<sup>+</sup> channels, isolated from *Heterometrus spinnifer* (Scorpionidae) venom // *Biochemical Journal*. – 1997. – V. 328. – № 1. – P. 321–327.

151. Bagdány M., Panyi G. Anurotoxin, a New Scorpion Toxin of the  $\alpha$ -KTx 6 Subfamily, Is Highly Selective for Kv1.3 over IKCa1 Ion Channels of Human T Lymphocytes // *Molecular pharmacology*. – 2005. – V. – 67. – №4. – P. 1034–44.

152. Borrego J., Naseem M.U. Recombinant Expression in *Pichia pastoris* System of Three Potent Kv1.3 Channel Blockers: Vm24, Anurotoxin, and Ts6 // *J. Fungi*. – 2022. – V. 8. – P. 1–15.

153. Fajloun Z., Andreotti N., Fathallah M. Analysis of the interacting surface of maurotoxin with the voltage-gated Shaker BK<sup>+</sup> channel // *Journal of Peptide Science*. – 2011. – V. 17. – № 3. – P. 200–210.

154. Rong Chen, Shin-Ho Chung Structural Basis of the Selective Block of Kv1.2 by Maurotoxin from Computer Simulations // *PLoS ONE*. – 2012. – V. 7. – № 10. – P. 1–8.

155. Ahmadi S., Bordon C.F., Laustsen A.H. Scorpion venom: Detriments and benefits // *Biomedicines*. – 2020. – V. 8. – № 51. – P. 1–31.

156. Vargas-Jaimes L., Valdivia H.H., Quintero-Hernández V., Xiao L. Recombinant expression of Intrepicalcin from the scorpion *Vaejovisintrepidus* and its effect on skeletal ryanodine receptors // *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*. – 2017. – V. 1861. – № 4. – P. 936–946.

157. Ramos-Franco J., Fill M. Approaching ryanodine receptor therapeutics from the calcin angle // *Journal of General Physiology*. – 2016. – V. 147. – № 5. – P. 369–373.

158. Xiao L., Gurrola G.B., Valdivia C., Zamudio Z. Structure-Function Relationship of Calcins, a Family of High-Affinity Peptide Ligands of Ryanodine Receptors // *Journal of General Physiology*. – 2016. – V. 147. – № 5. – P. 375–394.

159. Chen L., Este`ve E., Ronjat M., Waard M. De, Pessah I.N. Maurocalcine and Peptide A Stabilize Distinct Subconductance States of Ryanodine Receptor Type 1, Revealing a Proportional Gating Mechanism // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – V. 278. – № 18. – P. 16095–16106.

160. Cohen G., Burks S.R., Frank J.A. Chlorotoxin – A Multimodal Imaging Platform for Targeting Glioma Tumors // *Toxins*. – 2018. – V. 10. – № 12. – P. 1–12.

161. Enam Alhagh Charkhat Gorgich, Kasbiyan H., Ahmadvand D., Ajdary M. Smart chlorotoxin-functionalized liposomes for sunitinib targeted delivery into glioblastoma cells // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2022. – V. 77. – P. 1–14.

162. Ojeda P.G., Wang C.K., Craik D.J. Chlorotoxin: Structure, activity, and potential uses in cancer therapy // *Biopolymers*. – 2016. – V. 106. – № 1. – P. 25–36.



163. Alves R.S., Ximenes R.M., Isolation, Nascimento N.R.F., Martins D. Homology modeling and renal effects of a C-type natriuretic peptide from the venom of the Brazilian yellow scorpion (*Tityus serrulatus*) // *Toxicon*. – 2013. – V. 74. – P. 19–26.
164. Lipkin R.B., Lazaridis T. Implicit Membrane Investigation of the Stability of Antimicrobial Peptide b-Barrels and Arcs // *Journal of Membrane Biology*. – 2015. – V. 248. – № 3. – P. 469–486.
165. Hetru C., Letellier L., Hoffmann J. Androctonin, a hydrophilic disulphide-bridged non-haemolytic anti-microbial peptide: a plausible mode of action // *Biochemical Journal*. – 2000. – V. 345. – № 3. – P. 653–664.
166. Rebello Horta C.C., Kalapothakis E., Chávez-Olórtegui C., Felicori L.F. Cardiovascular-active venom toxins: An overview // *Current Medicinal Chemistry*. – 2016. – V. 23. – № 6. – P. 603–622.
167. Moghtadaei M., Rose R.A., Polina I. Electrophysiological effects of natriuretic peptides in the heart are mediated by multiple receptor subtypes // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. – 2016. – V. 120. – № 1–3. – P. 37–49.
168. Ichiki T., Dzhyoyashvili N., Burnett Jr J.C. Natriuretic peptide based therapeutics for heart failure: Cenderitide: A novel first-in-class designer natriuretic peptide // *International Journal of Cardiology*. – 2019. – V. 281. – P. 166–171.
169. Frya B.G., Wickramaratana J.C., Garbers D., Alewood P. Novel natriuretic peptides from the venom of the inland taipan (*OxyuranPmicrolepidotus*): isolation, chemical and biological characterization // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2005. – V. 327. – № 4. – P. 1011–1015.
170. St Pierre L., Hanchard K.J., Alewood P.F. Cloning and characterisation of natriuretic peptides from the venom glands of Australian elapids // *Biochimie*. – 2006. – V. 88. – № 12. – P. 1923–1931.
171. Elmia M.M. et. all Structural and Functional Characterization of a Mutant of *Pseudocerastes persicus* Natriuretic Peptide // *Protein and Peptide Letters*. – 2006. – V. 13. – № 3. – P. 295–300.
172. Aires R.S., Freitas C.N., Paixão A.D. NO mediates the effect of the synthetic natriuretic peptide NPCdc on kidney and aorta in nephrectomised rats // *European Journal of Pharmacology*. – 2020. – V. 866. – P. 1–12.
173. Hayashi A.F.M., Campeiro J.D., Yonamine J.M. Revisiting the potential of South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* toxins as therapeutic, theranostic and/or biotechnological agents // *Toxicon*. – 2022. – V. 206. – P. 1–13.
174. Giardini A.C., Evangelista B.G., Martins B.B., Lancellotti C.L.P. Crotalphine Attenuates Pain and Neuroinflammation Induced by Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice // *Toxins*. – 2021. – V. 13. – № 11. – P. 1–19.

175. Lopes F.S.R., Giardini A.C., Bufalo M.C., Picolo G. Crotaline Modulates Microglia M1/M2 Phenotypes and Induces Spinal Analgesia Mediated by Opioid-Cannabinoid Systems // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – V. 23. – № 19. – P. 1–16.
176. Jong Yeon Park, Bich Hang Do, Ju-Seung Lee, Hyun Cheol Yang, Anh Ngoc Nguyen Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Recombinant Crotamine in Mouse Models of Pain // *Toxins*. – 2021. – V. 13. – № 10. – P. 1–18.
177. Joshi R., Scheffler K., Engelmann J. Evaluation of crotamine based probes as intracellular targeted contrast agents for magnetic resonance imaging // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. – 2022. – V. 69. – P. 1–9.
178. Falcao C.B., Radis-Baptista G. Crotamine and crotalidin, membrane active peptides from *Crotalus durissus terrificus* rattlesnake venom, and their structurally-minimized fragments for applications in medicine and biotechnology // *Peptides*. – 2020. – V. 126. – P. 1–9.
179. Izume T., Shihoya W., Nureki O. Crystal structure of human endothelin ETB receptor in complex with sarafotoxin S6bT // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2020. – V. 528. – № 2. – P. 383–388.
180. Biswadeep Das, Chayna Sarkar, Ravi Shankar Pretreatment with sarafotoxin 6c prior to coronary occlusion protects against infarction and arrhythmias via cardiomyocyte mitochondrial  $K_{ATP}$  channel activation in the intact rabbit heart during ischemia/reperfusion // *Cardiovascular Drugs and Therapy*. – 2007. – V. 21. – № 4. – P. 243–251.
181. King G.F. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics // *Expert Opinion on Biological Therapy*. – 2011. – V. 11. – № 11. – P. 1469–1484.
182. Sepuru Krishna Mohan, Chin Yu Structure function relationships of cobrotoxin from *Naja naja atra* // *Toxin Reviews*. – 2007. – V. 26. – № 2. – P. 99–122.
183. Kuzmenkov A.I., Pinheiro-Junior E.L., Vassilevski A.A. Apamin structure and pharmacology revisited // *Frontiers in Pharmacology*. – 2022. – V. 13. – P. 1–13.
184. Soo-Jung Kim, Ji-Hyun Park, Kyung-Hyun Kim, Woo-Ram Lee Apamin inhibits THP-1-derived macrophage apoptosis via mitochondria-related apoptotic pathway // *Experimental and Molecular Pathology*. – 2012. – V. 93. – № 1. – P. 129–134.
185. Hyemin Gu, Sang Mi Han, Kwan-Kyu Park Therapeutic Effects of Apamin as a Bee Venom Component for Non-Neoplastic Disease // *Toxins*. – 2020. – V. 12. – № 3. – P. 1–17.
186. Buku A., Price J.A. Further studies on the structural requirements for mast cell degranulating (MCD) peptide-mediated histamine release // *Peptides*. – 2001. – V. 22. – № 12. – P. 1987–1991.
187. Buku A., Condie B.A. [Ala<sup>12</sup>] MCD peptide: a lead peptide to inhibitors of immunoglobulin E binding to mast cell receptors // *Journal of Peptide Research*. – 2005. – V. 66. – № 3. – P. 132–137.

188. Marynissen H., Vargas G., Van Hecken A. First-in-human development of a pharmacodynamics biomarker for PAC<sub>1</sub> receptor antagonists using intradermal injections of maxadilan // *Clinical and Translational Science*. – 2022. – V. 15. – № 8. – P. 1968–1977.
189. Lerner E.A. Maxadilan, Iuga A.O. a PAC1 receptor agonist from sand flies // *Peptides*. – 2007. – V. 28. – № 9. – P. 1651–1654.
190. Wheat W.H., Dow S.W. Immunization against full-length protein and peptides from the *Lutzomyia longipalpis* sand fly salivary component maxadilan protects against *Leishmania major* infection in a murine model // *Vaccine*. – 2017. – V. 35. – № 48. – P. 6611–6619.
191. Hu E., Lehto S.G., Miranda L.P et. all Discovery of Selective Pituitary Adenylate Cyclase 1 Receptor (PAC1R) Antagonist Peptides Potent in a Maxadilan/PACAP38- Induced Increase in Blood Flow Pharmacodynamic Model // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2021. – V. 64. – № 6. – P. 3427–3438.
192. Bourgault S., Vaudry D. Strategies to Convert PACAP from a Hypophysiotropic Neurohormone Into a Neuroprotective Drug // *Current Pharmaceutical Design*. – 2011. – V. 17. – № 10. – P. 1002–1024.
193. Joosten L., Boerman O.C., Gotthardt M. Preclinical evaluation of PAC1 targeting with radiolabeled Maxadilan // *Scientific Reports*. – 2017. – V. 7. – № 1. – P. 1–9.
194. Selsted M.E.  $\theta$ -Defensins: Cyclic Antimicrobial Peptides Produced by Binary Ligation of Truncated  $\alpha$ -Defensins // *Current Protein and Peptide Science*. – 2004. – V. 5. – № 5. – P. 365–371.
195. Xu C., Marin M., Ramasamy S. Human Defensins Inhibit SARS-CoV-2 Infection by Blocking Viral Entry // *Viruses*. – 2021. – V. 13. – № 7. – P. 1–15.
196. Hein M.J.A., Kvensakul M., Hulett M.D. Defensin–lipid interactions in membrane targeting: mechanisms of action and opportunities for the development of antimicrobial and anticancer therapeutics // *Biochemical Society Transactions*. – 2022. – V. 50. – № 1. – P. 423–437.
197. Abdeen S., Deshpande C., Cines D.B. Alpha-defensins: risk factor for thrombosis in COVID-19 infection // *British Journal of Haematology*. – 2021. – V. 194. – № 1. – P. 44–52.
198. Soohyung Lee, Inkyu Yoo, Yugyeong Cheon, Minsun Hong, Bo-Young Jeon Antimicrobial peptides  $\beta$ -defensin family: Expression and regulation in the endometrium during the estrous cycle and pregnancy in pigs // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2023. – V. 139. – P. 1–9.
199. Meng Yu, Jin Yan, Wangxiao He, Chenyu Li Synthetic  $\theta$ -Defensin Antibacterial Peptide as a Highly Efficient Nonviral Vector for Redox-Responsive miRNA Delivery // *Advanced Biosystems*. – 2017. – V. 1. – № 12. – P. 1–6.
200. Singh A., Haskell-Luevano C. Peptide design strategies for g-protein coupled receptors (GPCRs) // *Peptide Chemistry and Drug Design*. – 2015. – P. 75–112.

201. Hidaka Y., Shimamoto S. Folding of peptides and proteins: role of disulfide bonds, recent developments // *Biomolecular Concepts*. – 2013. – V. 4. – № 6. – P. 597–604.
202. Hruby V.J. Designing peptide receptor agonists and antagonists // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2002. – V. 1. – № 11. – P. 847–858.
203. Vale W., Brown M., Rivier C., Perrin M., Rivier J. Development and applications of analogs of LRF and somatostatin. In *Brain Peptides: A New Endocrinology*. Elsevier // North Holland Biomedical Press, Amsterdam. – 1979. – №3. – P. 71–88.
204. Ovadia O., Greenberg S., Kessler H. Improvement of drug-like properties of peptides: the somatostatin paradigm // *Expert Opinion on Drug Discovery*. – 2010. – V. 5. – № 7. – P. 655–671.
205. Diusenova S., Avdeev D.V., Zubavichus Ya. The Crystal Structure Elucidation of a Tetrapeptide Analog of Somatostatin DOTA-Phe-D-Trp-Lys-Thr-OMe // *Crystals*. – 2022. – V. 12. – № 1. – P. 1–12.
206. Ahn J.-M., Medeiros M., Hruby V.J. A New Approach to Search for the Bioactive Conformation of Glucagon: Positional Cyclization Scanning // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2001. – V. 44. – № 19. – P. 3109–3116.
207. Dong M., Bordner A.J., Miller L.J. Elucidation of the active conformation of the amino terminus of receptor-bound secretin using intramolecular disulfide bond constraints // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2010. – V. 20. – № 20. – P. 6040–6044.
208. Germain N., Bloom S. Analogs of pancreatic polypeptide and peptide YY with a locked PP-fold structure are biologically active // *Peptides*. – 2013. – V. 39. – № 1. – P. 6–10.
209. Swanson S., Keating A.E. Tertiary motifs as building blocks for the design of protein-binding peptides // *Protein Science*. – 2022. – V. 31. – № 6. – P. 1–18.
210. Pérez de Vega M.J., González-Muñiz R. A role for ring-closing metathesis in medicinal chemistry: Mimicking secondary architectures in bioactive peptides // *Medicinal Research Reviews*. – 2011. – V. 31. – № 5. – P. 677–715.
211. Craik D.J., Price D. The Future of Peptide-based Drugs // *Chemical Biology and Drug Design*. – 2013. – V. 81. – № 1. – P. 136–147.
212. Whitby L.R., Boger D.L. Comprehensive Peptidomimetic Libraries Targeting Protein-Protein Interactions // *Accounts of Chemical Research*. – 2012. – V. 45. – № 10. – P. 1698–1709.
213. Mainak Guharoy, Pinak Chakrabarti Secondary structure based analysis and classification of biological interfaces: identification of binding motifs in protein–protein interactions // *Bioinformatics*. – 2007. – V. 23. – № 15. – P. 1909–1918.
214. Pease J.H.B., Wemmer D.E. Folding and activity of hybrid sequence, disulfide stabilized peptides // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1990. – V. 87. – № 15. – P. 5643–5647.

215. Bastos M., Connelly P.R. Thermodynamics of the Helix-Coil Transition: Binding of S15 and a Hybrid Sequence, Disulfide Stabilized Peptide to the S-Protein // *Proteins: Structure, Function and Genetics*. – 2001. – V. 42. – № 4. – P. 523–530.

216. Leduc A.-M., Burris T.P., Spatola A.F. Helix-stabilized cyclic peptides as selective inhibitors of steroid receptor– coactivator interactions // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2003. – V. 100. – № 20. – P. 11273–11278.

217. Hujun Shen, Zhenhua Wu Effect of Disulfide Bridge on the Binding of SARS-CoV-2 Fusion Peptide to Cell Membrane: A Coarse-Grained Study // *ACS Omega*. – 2022. – V. 7. – № 41. – P. 36762–36775.

218. Vasco A.V., Wessjohann L.A. Multicomponent Functionalization of the Octreotide Peptide Macrocyclic Scaffold // *European Journal of Organic Chemistry*. – 2022. – V. 2022. – № 39. – P. 1–8.

219. D'Addona D., Ginanneschi M., Papini A.M. Novel sst<sub>5</sub>-Selective Somatostatin Dicarba-Analogues: Synthesis and Conformation-Affinity Relationships // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2008. – V. 51. – № 3. – P. 512–520.

220. Grace C.R.R., Erchegeyi J. Ring size in octreotide amide modulates differently agonist versus antagonist binding affinity and selectivity // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2008. – V. 51. – № 9. – P. 2676–2681.

221. Almeida A.M. Parallel  $\beta$ -Sheet Secondary Structure Is Stabilized and Terminated by Interstrand Disulfide Cross-Linking // *Journal of the American Chemical Society*. – 2012. – V. 134. – № 1. – P. 75–78.

222. Mirassou Yasmina, Santiveri Clara M. Disulfide Bonds versus Trp–Trp Pairs in Irregular  $\beta$ -Hairpins: NMR Structure of Vammin Loop 3-Derived Peptides as a Case Study // *ChemBioChem*. – 2009. – V. 10. – № 5. – P. 902–910.

223. Kier B.L. Stabilizing capping motif for  $\beta$ -hairpins and sheets // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – V. 107. – № 23. – P. 10466–10471.

224. Santiveri Clara M., Rico Manuel, Jiménez M. Angeles Context-dependence of the contribution of disulfide bonds to  $\beta$ -hairpin stability // *Chemistry – A European Journal*. – 2008. – V. 14. – № 2. – P. 488–499.

225. Lee Ju-Un., Kim Jinkyung, Song Yub Shin, Park Yoonkyung Cell selectivity of arenicin-1 and its derivative with two disulfide bonds // *Bulletin of the Korean Chemical Society*. – 2008. – V. 29. – № 6. – P. 1190–1194.

226. Stephanny Miranda Alves de Souza, Tácio Vinício Amorim Fernandes, Dário Eluan Kalume, Luís Maurício T R Lima Physicochemical and structural properties of lunasin revealed by spectroscopic, chromatographic and molecular dynamics approaches // *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*. – 2020. – V. 1868. – № 8. – P. 1–16.

227. Khakshoor O., Nowick J.S. Use of Disulfide “Staples” To Stabilize  $\beta$ -Sheet Quaternary Structure // *Organic Letters*. – 2009. – V. 11. – № 14. – P. 3000–3003.

228. Craik D.J. Seamless proteins tie up their loose ends // *Science*. – 2006. – V. 311. – № 5767. – P. 1563–1564.

229. Yang Zhang, Jie Wang, Wenchao Li, Ying Guo Rational design of stapled helical peptides as antidiabetic PPAR $\gamma$  antagonists to target coactivator site by decreasing unfavorable entropy penalty instead of increasing favorable enthalpy contribution // *European Biophysics Journal*. – 2022. – V. 51. – № 7–8. – P. 535–543.

230. Bo He, Tao Wu, Ping He, Fenglin Lv, Hongxiang Liu Structure-based derivation and optimization of YAP-like coactivator-derived peptides to selectively target TEAD family transcription factors by hydrocarbon stapling and cyclization // *Chemical Biology and Drug Design*. – 2021. – V. 97. – № 6. – P. 1129–1136.

231. Hawtin S.R., Wheatley M. Identification of an extracellular segment of the oxytocin receptor providing agonist-specific binding epitopes // *Biochemical Journal*. – 2021. – V. 354. – № 2. – P. 465–472.

232. Poláček I., Nesvadba H., Rudinger J. Action of [1,6-Di-alanine]-oxytocin and [1,6-Di-serine]-oxytocin on the rat uterus and mammary gland in vitro // *European Journal of Pharmacology*. – 1970. – V. 9. – № 2. – P. 239–245.

233. Wisniewski K. Design of Oxytocin Analogs // *Methods in Molecular Biology*. – 2019. – V. 2001. – P. 235–271.

234. Jie Pei, Lin Xiong, Min Chu, Xian Guo Effect of intramolecular disulfide bond of bovine lactoferricin on its molecular structure and antibacterial activity against *Trueperella pyogenes* separated from cow milk with mastitis // *BMC Veterinary Research*. – 2020. – V. 16. – № 1. – P. 1–10.

235. Bulet P., Menin L. Anti-microbial peptides: From invertebrates to vertebrates // *Immunological Reviews*. – 2004. – V. 198. – P. 169–184.

236. Xiaolong Chen, Cuihua Hu, Yibing Huang, Yuxin Chen Role of Disulfide Bonds in Activity and Stability of Tigerinin-1R // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – V. 19. – № 2. – P. 1–13.

237. Xiaoxiao Xu, Qingliang Xu, Fangling Chen, Juan Shi Role of the disulfide bond on the structure and activity of  $\mu$ -conotoxin PIIIA in the inhibition of Nav1.4 // *RSC Advances*. – 2019. – V. 9. – № 2. – P. 668–674.

238. Roveri M., Bernasconi M. Peptides for tumor-specific drug targeting: state of the art and beyond // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2017. – V. 5. – № 23. – P. 4348–4364.

239. Pandit A., Cherif-Cheikh R. Self-assembly of the octapeptide lanreotide and lanreotide-based derivatives: The role of the aromatic residues // *Journal of Peptide Science*. – 2008. – V. 14. – № 1. – P. 66–75.
240. Dickey D.M., Potter L.R. Dendroaspis natriuretic peptide and the designer natriuretic peptide, CD-NP, are resistant to proteolytic inactivation // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2011. – V. 51. – № 1. – P. 67–71.
241. Brian Chia C.S. A Review on the Metabolism of 25 Peptide Drugs // *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. – 2021. – V. 27. – № 2. – P. 1397–1418.
242. Rozek A., Hancock R.E.W. Structure-Based Design of an Indolicidin Peptide Analogue with Increased Protease Stability // *Biochemistry*. – 2003. – V. 42. – № 48. – P. 14130–14138.
243. Nguyen L.T., Vogel H.J. Serum stabilities of short tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptide analogs // *PLoS ONE*. – 2010. – V. 5. – № 9. – P. 1–8.
244. Tugyi R., Fellinger E. The effect of cyclization on the enzymatic degradation of herpes simplex virus glycoprotein D derived epitope peptide // *Journal of Peptide Science*. – 2005. – V. 11. – № 10. – P. 642–649.
245. Ying Li, Xuemin Zheng, Lida Tang, Weiren Xu Disulfide bond prolongs the half-life of therapeutic peptide-GLP-1 // *Peptides*. – 2011. – V. 32. – № 7. – P. 1400–1407.
246. Mansfeld F.M., Toth I. Synthesis and Plasma Stability of Disulfide-Bridged Cyclic Endomorphin-1 Derivatives // *International Journal of Organic Chemistry*. – 2012. – V. 2. – № 1. – P. 1–6.
247. Ojeda P.G., Wang C.K. The role of disulfide bonds in structure and activity of chlorotoxin // *Future Medicinal Chemistry*. – 2014. – V. 6. – № 15. – P. 1617–1628.
248. Gopalakrishnan Aridoss, Dong-MinKim, Jae Il Kim, Jae Eun Kang Ziconotide ( $\omega$ -conotoxin MVIIA)—Efficient solid-phase synthesis of a linear precursor peptide and its strategic native folding // *Peptide Science*. – 2021. – V. 113. – № 5. – P. 1–13.
249. Fretzen A. Peptide therapeutics for the treatment of gastrointestinal disorders // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. – 2018. – V. 26. – № 10. – P. 2863–2872.
250. Busby R.W., Kurtz C.B., Currie M.G. Pharmacologic Properties, Metabolism, and Disposition of Linaclotide, a Novel Therapeutic Peptide Approved for the Treatment of Irritable Bowel Syndrome with Constipation and Chronic Idiopathic Constipations // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2013. – V. 344. – № 1. – P. 196–206.
251. Yang Yang, Yu Yan, Zhen Chen, Jie Hu, Kai Wang Histone Deacetylase Inhibitors Romidepsin and Vorinostat Promote Hepatitis B Virus Replication by Inducing Cell Cycle Arrest // *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. – 2021. – V. 9. – № 2. – P. 160–168.

252. Pojani E., Barlocco D. Romidepsin (FK228), A Histone Deacetylase Inhibitor and its Analogues in Cancer Chemotherapy // *Current Medicinal Chemistry*. – 2021. – V. 28. – № 7. – P. 1290–1303.
253. Smolewski P., Robak T. The discovery and development of romidepsin for the treatment of T-cell lymphoma // *Expert Opinion on Drug Discovery*. – 2017. – V. 12. – № 8. – P. 859–873.
254. Hill A., Brodsky R.A. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria // *Nature Reviews Disease Primers*. – 2017. – V. 3. – P. 1–14.
255. Syeda Tayyaba Rehan, Mahnoor Rehan Hashmi, Muhammad Sohaib Asghar Pegcetacoplan – a novel C3 inhibitor for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria // *Health Science Reports*. – 2022. – V. 5. – № 3. – P. 1–3.
256. Clément K., Wabitsch M., Kühnen P. Efficacy and safety of setmelanotide, an MC4R agonist, in individuals with severe obesity due to LEPR or POMC deficiency: single-arm, open-label, multicentre, phase 3 trials // *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. – 2020. – V. 8. – № 12. – P. 960–970.
257. Kühnen P., Gnanasakthy A., Clément K. Quality of life outcomes in two phase 3 trials of setmelanotide in patients with obesity due to LEPR or POMC deficiency // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. – 2022. – V. 17. – № 1. – P. 1–11.
258. Shaer D., Albericio F. Al 2021 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest // *Pharmaceuticals*. – 2022. – V. 15. – № 2. – P. 1–17.
259. Cañas C.A., Castro-Herrera F. Pharmacological blockade of KV1.3 channel as a promising treatment in autoimmune diseases // *Journal of Translational Autoimmunity*. – 2022. – V. 5. – P. 1–5.
260. Tajti G., Norton R.S. The voltage-gated potassium channel KV1.3 as a therapeutic target for venom-derived peptides // *Biochemical Pharmacology*. – 2020. – V. 181. – P. 1–14.
261. Mozaffar T., Olsen C. Kv1.3 expression on effector memory T cells in sporadic inclusion body myositis: potential for targeted immunotherapy with dalazatide // *Neuromuscular Disorders*. – V. 27. – № 2. – P. S158.
262. Pennington M.W., Norton R.S., Beeton C. Development of Highly Selective Kv1.3-Blocking Peptides Based on the Sea Anemone Peptide ShK // *Marine Drugs*. – 2015. – V. 13. – № 1. – P. 529–542.
263. George Chandy K., Sanjeev Kumar Upadhayay, Ping H. Wang, Paolo Sassone-Corsi, Kristin Lynn Eckel-Mahan, Shawn Iadonato, Jogesh Mukherjee, M. Reza Mirbolooki // Treatment of obesity and obesity-related disorders by pharmalogical targeting of kv 1.3 potassium channels // Patent US 2015/0072940.



264. Tarcha E.J., Muñoz-ElôÂas E.J. Safety and pharmacodynamics of dalazatide, a Kv1.3 channel inhibitor, in the treatment of plaque psoriasis: A randomized phase 1b trial // PLoS ONE. – 2017. – V. 12. – № 7. – P. 1–19.
265. Tarcha E.J., Iadonato S.P., Pennington M.W. Durable pharmacological responses from the peptide ShK-186, a specific Kv1.3 channel inhibitor that suppresses T cell mediators of autoimmune disease // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2012. – V. 342. – № 3. – P. 642–653.
266. Koshy S., Tanner M.R. Blocking Kv1.3 Channels Inhibits Th2 Lymphocyte Function and Treats a Rat Model of Asthma // Journal of Biological Chemistry. – 2014. – V. 289. – № 18. – P. 12623–12632.
267. Crunkhorn S. Potassium channel blocker prevents obesity // Nature Reviews Drug Discovery. – 2013. – V. 12. – № 8. – P. 577.
268. Prentis P.J., Pavasovic A., Norton R.S. Sea Anemones: Quiet Achievers in the Field of Peptide Toxins // Toxins. – 2018. – V. 10. – № 1. – P. 1–15.
269. Delinois L.J., Villalobos-Santos J.C., Ramírez-Paz J. A cytochrome c-chlorotoxin hybrid protein as a possible antiglioma drug // ChemMedChem. – 2020. – V. 15. – № 22. – P. 2185–2192.
270. Sacli-Bilmez B.B. Identifying overall survival in 98 glioblastomas using VASARI features at 3T // Clinical Imaging. – 2023. – V. 93. – P. 86–92.
271. Agarwal S. Chlorotoxin modified morusin–PLGA nanoparticles for targeted glioblastoma therapy // Journal of Materials Chemistry B. – 2019. – V. 7. – № 39. – P. 5896–5919.
272. Lingzhou Zhao, Tiantian Wang, Changcun Liu, Ningning Song, Shan Wu A novel *Buthus martensii* Karsch chlorotoxin derivative for gliomaSPECT imaging // New Journal of Chemistry. – 2020. – V. 44. – № 35. – P. 1–6.
273. Cohen-Inbar Or, Menashe Zaaroor Glioblastoma multiforme targeted therapy: The Chlorotoxin story // Journal of Clinical Neuroscience. – 2020 – V. 33. – P. 52–58.
274. Yamada M. A first-in-human study of BLZ-100 (tozuleristide) demonstrates tolerability and safety in skin cancer patients // Contemporary Clinical Trials Communications. – 2021. – V. 23. – P. 1–6.
275. Yang Li, Yiming Zhou, Xiuli Yue, Zhifei Dai Cyanine Conjugate-Based Biomedical Imaging Probes // Advanced Healthcare Materials. – 2020. – V. 9. – № 22. – P. 1–24.
276. Patil C.G. Phase 1 Safety, Pharmacokinetics, and Fluorescence Imaging Study of Tozuleristide (BLZ-100) in Adults With Newly Diagnosed or Recurrent Gliomas // Clinical Neurosurgery. – 2019. – V. 85. – № 4. – P. 641–649.
277. Dindere M.E. Intraoperative Tumor Detection Using Pafolacianine // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – V. 23. – № 21. – P. 1–16.

279. Kelly K., Weissledere R. Detection of Invasive Colon Cancer Using a Novel, Targeted, Library-Derived Fluorescent Peptide // *Cancer Research*. – 2004. – V. 64. – № 17. – P. 6247–6251.
280. Burggraaf J., Ødegårdstuen L.-I., Hardwick J.C.H. Detection of colorectal polyps in humans using an intravenously administered fluorescent peptide targeted against c-Met // *Nature Medicine*. – 2015. – V. 21. – № 8. – P. 955–961.
281. Arakelyan J. Molecular Profile of Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms (PanNENs): Opportunities for Personalized Therapies // *Cancer*. – 2021. – V. 127. – № 3. – P. 345–353.
282. Xue-qin Wu, Jing-yi Li, Wen-jing Du Causes of death following small cell lung cancer diagnosis: a population-based analysis // *BMC Pulmonary Medicine*. – 2022. – V. 22. – № 1. – P. 1–7.
283. Whalen K.A. Targeting the Somatostatin Receptor 2 with the Miniaturized Drug Conjugate, PEN-221: A Potent and Novel Therapeutic for the Treatment of Small Cell Lung Cancer // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2019. – V. 18. – № 11. – P. 1926–1936.
284. Bader Alshamsan, Ahmed Mostafa Gad, Maaz Kamal Alata Capecitabine Monotherapy as Palliative Treatment for Patients with Recurrent/Metastatic Nasopharyngeal Cancer // *Journal of Oncology*. – 2022. – V. 2022. – P. 1–9.
285. Blanchard P., Maingon P. Radiotherapy for nasopharyngeal cancer // *Cancer/Radiotherapie*. – 2022. – V. 26. – № 1–2. – P. 168–173.
286. Lechner Matta Somatostatin receptor 2 expression in nasopharyngeal cancer is induced by Epstein Barr virus infection: impact on prognosis, imaging and therapy // *Nature Communications*. – 2021. – V. 12. – № 1. – P. 1–11.
287. White B.H., Sweryda-Krawiec B. Discovery of an SSTR2-Targeting Maytansinoid Conjugate (PEN-221) with Potent Activity in Vitro and in Vivo // *J. Med. Chem*. – 2019. – V. 62. – № 5. – P. 2708–2719.
288. Vitali E. The impact of SST2 trafficking and signaling in the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2021. – V. 527. – P. 1–14.
289. Portera J. A highly potent maytansinoid analogue and its use as a cytotoxic therapeutic agent in gold nanoparticles for the treatment of hepatocellular carcinoma // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2020. – V. 30. – № 24. – P. 1–6.
290. Enebo L.B. Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of concomitant administration of multiple doses of cagrilintide with semaglutide 2.4 mg for weight management: a randomised, controlled, phase 1b trial // *The Lancet*. – 2021. – V. 397. – № 10286. – P. 1736–1748.
291. Fletcher M.M. AM833 Is a Novel Agonist of Calcitonin Family G Protein-Coupled Receptors: Pharmacological Comparison with Six Selective and Nonselective Agonists // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2021. – V. 377. – № 3. – P. 417–440.

292. Becerril S. Cagrilintide plus semaglutide for obesity management // *The Lancet*. – 2021. – V. 397. – № 10286. – P. 1687–1689.
293. Kruse T. Development of Cagrilintide, a Long-Acting Amylin Analogue // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2021. – V. 64. – № 15. – P. 11183–11194.
294. Skendros P. Complement C3 inhibition in severe COVID-19 using compstatin AMY-101 // *Science Advances*. – 2022. – V. 8. – № 33. – P. 1–12.
295. Duggan N.M. Total Synthesis of the Spider-Venom Peptide Hi1a // *Organic Letters*. – 2021. – V. 23. – № 21. – P. 8375–8379.
296. Yandong Ren, Chengchong Li, Jinlong Chang, Rui Wang Hi1a as a Novel Neuroprotective Agent for Ischemic Stroke by Inhibition of Acid-Sensing Ion Channel 1a // *Translational Stroke Research*. – 2018. – V. 9. – № 2. – P. 96–98.
297. Redd M.A. Therapeutic Inhibition of Acid-Sensing IonChannel 1a Recovers Heart Function After Ischemia–Reperfusion Injury // *Circulation*. – 2021. – V. 144. – P. 947–960.
298. Qiang M., Bei Yang, Jia Xie, Tian-Le Xu, Zhihu Qu Selection of an ASIC1a-blocking combinatorial antibody that protects cells from ischemic death // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2018. – V. 115. – № 32. – P. 7469–7477.
299. Heusser S.A., Pless A. Acid-sensing ion channels as potential therapeutic targets // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2021. – V. 42. – № 12. – P. 1035–1050.
300. Fullerton G.M., Bhattacharya S. Atosiban in the Management of Preterm Labour // *Clin. Med. Insights Womens Health*. – 2011. – V. 4. – P. 9–16.
301. Craciunas L., Kollmann M. Oxytocin Antagonists for Assisted Reproduction // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2021. – V. 9. – P. 1–55.
302. Dataintelo Company Global Atosiban Market by Type (Injection, Concentrate), By Application (Hospital Pharmacies, Online Pharmacies, Retail Pharmacies), By End-User (Hospitals, Maternity Clinics, Home Care), By Distribution Channel (Direct Sales, Distributors), and By Region (North America, Latin America, Europe, Asia Pacific, Middle East & Africa), Forecast From 2023 to 2031. – 2022. – URL: <https://dataintelo.com/report/atosiban-market/>
303. MarketWatch Reviews and Pricing Atosiban Acetate Market Size, Share and Scope Analysis to 2030. – 2023. – URL: <https://www.marketwatch.com/press-release/atosiban-market-2023-2030-massive-growth-in-upcoming-year-2030-2023-06-02>
304. CNN Health US gets D+ grade for rising preterm birth rates, new report finds. – 2022. – URL: <https://edition.cnn.com/2022/11/15/health/preterm-birth-rate-march-of-dimes-who/index.html>
305. World Health Organization 152 million babies born preterm in the last decade. – 2023. – URL: [152 million babies born preterm in the last decade \(who.int\)](https://www.who.int/news/152-million-babies-born-preterm-in-the-last-decade)

- 306 Singal A.K. Healthcare Burden and Outcomes of Hepatorenal Syndrome among Cirrhosis-related Hospitalisations in the US // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2022. – V. 56. – № 10. – P. 1486–1496.
307. Habas E., Elgamal M.E. Update on Hepatorenal Syndrome: Definition, Pathogenesis, and Management // *Arab.Journal of Gastroenterology.* – 2022. – V. 23. – № 2. – P. 125–133.
308. Flamm S.L. The current management of hepatorenal syndrome–acute kidney injury in the United States and the potential of terlipressin // *Liver Transplantation.* – 2021. – V. 27. – №. 8. – P. 1191–1202.
309. Lutsenko A., Rozhinskaya L. ADH-deficiency (central diabetes insipidus) registry in Russia: current // *Endocrine Abstracts.* – Bioscientifica. – 2023. – V. 90. – P. EP687.
310. Zhu Y.-S., Tang K. Peptide–Drug Conjugate-Based Novel Molecular Drug Delivery System in Cancer // *Trends in Pharmacological Sciences.* – 2021. – V. 42. – № 10. – P. 857–869.
311. Virgolini I. Procedure guidelines for PET/CT tumour imaging with  $^{68}\text{Ga}$ -dota-conjugated peptides:  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC,  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NOC,  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE // *European journal of nuclear medicine and molecular imaging.* – 2010. – V. 37. – P. 2004–2010.
312. Cancer.Net Neuroendocrine Tumors: Statistics. – 2023. – URL: <https://www.cancer.net/cancer-types/neuroendocrine-tumors/statistics>
313. Yastrebova E.S. Epidemiology of Neuroendocrine Tumors (Nets) and SocioClinical Profile of Patients According to Data from the National Cancer Registry and the Federal Patient Registry of the MOLNEO Medical Society for Treatment of Neuroendocrine Tumors // *Open Access Journal of Endocrinology.* – 2022. – V. 6. – № 1. – P. 1–11.000168
314. World Health Organization Cardiovascular diseases. – 2022. – URL: [https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1)
315. Shi T., Miller E.J. Novel Radiotracers for Molecular Imaging of Myocardial Inflammation: an Update Focused on Clinical Translation of Non- $^{18}\text{F}$ -FDG Radiotracers // *Current Cardiovascular Imaging Reports.* – 2023. – V. 16. – №. 1. – P. 1–9.
316. World Health Organization Cardiovascular diseases (CVDs). – 2022. – URL: [https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1)
317. Kudryavtseva E.V., Sidorova M.V. Some peculiarities of synthesis of cysteine-containing peptides // *Russian Chemical Reviews.* – 1998. – V. 67. – №. 7. – P. 545–562.
318. Sun J. Construction of disulfide bonds in peptides via immobilized platinum (IV) complex oxidation // *Tetrahedron Letters.* – 2020. – V. 61. – №. 7. – P. 151496.
319. Andreu D., Albericio F. Formation of disulfide bonds in synthetic peptides and proteins // *Peptide synthesis protocols.* – 1995. – P. 91–169.

320. Fujii N., Otaka A., Yajima H. Studies on peptides. CLI. Syntheses of cystine-peptides by oxidation of S-protected cysteine-peptides with thallium (III) trifluoroacetate // *Chemical and pharmaceutical bulletin*. – 1987. – V. 35. – №. 6. – P. 2339–2347.

321. Kobayashi K. “On-Resin” Disulfide Peptide Synthesis with Methyl 3-Nitro-2-pyridinesulfenate // *Eur. J. Org. Chem.* – 2021. – V. 2021. – №.6. – P. 956–963.

322. Avi Tovi, Chaim Eidelman, Shimon Shushan, Shai Elster, Hagi Alon, Alexander Ivchenko, Gabriel-Marcus Butilca, Gil Zaovi. A counterion exchange process for peptides // *Patent WO 2006/041945 2006*

323. Andersson L. Large-scale synthesis of peptides // *Peptide Science*. – 2000. – V. 55. – №. 3. – P. 227–250.

324. Bray B.L. Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2003. – V. 2. – №. 7. – P. 587–593.

325. Egelund P.H.G., Pedersen D. Sejer Fmoc-Removal with Pyrrolidine Expands the Available Solvent Space in Green Solid-Phase Peptide Synthesis // *ACS Sustainable Chem. Eng.* – 2021. – V. 9. – №. 42. – P. 14202–14215.

326. Sidorova M.V. Primenenie perekisi vodoroda dlya zamy`kaniya disul`fidny`x mostikov v peptidax // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2004. – V. 30. – №. 2. – P. 115–125.

327. Kudryavtseva E.V., Sidorova M.V. Comparative evaluation of different methods for disulfide bond formation in synthesis of the HIV-2 antigenic determinant // *The Journal of peptide research*. – 1997. – V. 49. – №. 1. – P. 52–58.

328. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 1959. – V. 82. – №. 1. – P. 70–77.

329. Kisfaludy L. Rapid synthesis of oxytocin // *Acta chim. Acad. Sci. Hungar.* – 1975. – V. 84. – №. 2. – P. 227–228.

330. Avdeev D.V., Ovchinnikov M.V., Sidorova M.V. Preparative Solid-Phase Method of S–S Bond Closure in Desamino-Analogs of Neurohypophyseal Hormones // *Pharm. Chem. J.* – 2022. – V. 56. – №. 9. – P. 1285–1289.

331. Yang Y., Badalassi F. Investigation of On-Resin Disulfide Formation for Large-Scale Manufacturing of Cyclic Peptides: A Case Study // *Org. Process Res. Dev.* – 2020. – V. 24. – №. 7. – P. 1281–1293.

332. Chaliy V.A. CO-Preserving Photoinduced Transfer of Cymantrenyl Moiety: A Tandem Experimental and Computational Investigation // *Chemistry–A European Journal*. – 2023. – V. 29. – №. 29. – P. e202203949.

333. Albericio F., Barany G. Cyclization of Disulfide-Containing Peptides in Solid-Phase Synthesis // *International Journal of Peptide and Protein Research*. – 1991. – V. 37. – № 5. – P. 402–413.
334. Bodanszky M. Side reactions in peptide synthesis // *Synthesis*. – 1981. – V. 1981. – № 5. – P. 333–356.
335. Kremsmayr T. Fmoc solid phase peptide synthesis of oxytocin and analogues // *Oxytocin: Methods and protocols*. – 2022. – P. 175–199.
336. Yang Y., Badalassi F. DMF-Assisted Iodination Side Reaction during the Preparation of Disulfide Peptides, Its Substrate/Solvent/pH Dependence, and Implications on Disulfide-Peptide Production // *Org. Process Res. Dev.* – 2021. – V. 25. – № 9. – P. 2090–2099.
337. Schrödinger Release 2015–4: Maestro; Schrödinger, LLC: New York, 2015.
338. Harder E. OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins // *J. Chem. Theory Comput.* – 2016. – V. 12. – № 1. – P. 281–296.
339. Kam P.C.A. Vasopressin and Terlipressin: Pharmacology and Its Clinical Relevance // *Anaesthesia*. – 2004. – V. 59. – № 10. – P. 993–1001.
340. Wisniewski K., Schteingart C., Trojnar J. Synthesis and Biological Activity of Terlipressin and Its Putative Metabolites // *Synthesis and Biological Activity of Terlipressin and Its Putative Metabolites. Understanding Biology Using Peptides: Proceedings of the Nineteenth American Peptide Symposium*. – New York. – 2006. – P. 489–490.
341. Tovi A., Eidelman C., Shushan S., Elster S., Alon H. Process for production of cyclic peptides // Patent WO2004092202A1. 2004.
342. Patil A.M., Lokhande P.D. A Metal-Free Iodination of Aryl Ethers and Phenols Using I<sub>2</sub> // *ChemistrySelect*. – 2017. – V. 2. – P. 8418–8422.
343. Giraud M., Martinez J. A Side-reaction in the SPPS of Trp-containing Peptides // *Journal of Peptide Science*. – 1999. – V. 5. – P. 457–461.
344. Wiensch E. Side Reactions in Peptide Synthesis: tert-Butylation of Tryptophan // *Angewandte Chemie International Edition*. – 1977. – V. 16. – № 5. – P. 317–318.
345. Sieber P. Iodine Oxidation of S-Trityl- and S-Acetamidomethyl-cysteine-peptides Containing Tryptophan: Conditions Leading to the Formation of Tryptophan-2-thioethers' // *Helvetica Chimica Acta*. – 1980. – V. 63. – № 8. – P. 2358–2363.
346. Bodanszky M. Side reactions in peptide synthesis // *Synthesis*. – 1981. – V. 1981. – № 5. – P. 333–356.
347. Sabatino G. Production of peptides as generic drugs: a patent landscape of octreotide // *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. – 2016. – V. 26. – № 4. – P. 485–495.

348. Wang J., Qu J. Boiling water-catalyzed neutral and selective N-Boc deprotection // *Chemical communications*. – 2009. – №. 34. – P. 5144–5146.