

ФИО соискателя Тарасюк Алексей Валерьевич

Название диссертации *Дизайн, синтез и изучение связи структуры и фармакологической активности дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора*

Шифр специальности –1.4.9. – биоорганическая химия

Химические науки

Шифр диссертационного совета 24.1.092.01

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук

119991, Москва, Ленинский проспект, 47

Тел.:(499) 137-13-79

E-mail: sci-secr@ioc.ac.ru

Дата размещения полного текста диссертации на сайте Института

<http://zioc.ru/>

16 сентября 2022 года

Дата приема к защите

21 сентября 2022 года

Дата размещения автореферата на сайте ВАК <https://vak.minobrnauki.gov.ru>

28 сентября 2022 года

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФАРМАКОЛОГИИ ИМЕНИ В.В. ЗАКУСОВА»**

на правах рукописи

ТАРАСЮК АЛЕКСЕЙ ВАЛЕРЬЕВИЧ

**ДИЗАЙН, СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗИ СТРУКТУРЫ И
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ДИПЕПТИДНЫХ
МИМЕТИКОВ МОЗГОВОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА**

1.4.9 — Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва - 2022

Работа выполнена в отделе химии лекарственных средств Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова».

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор,
член-корреспондент РАН

Гудашева Татьяна Александровна

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор,
ведущий научный сотрудник лаборатории
молекулярной фармакологии пептидов
Федерального государственного
бюджетного учреждения Институт молекулярной генетики
Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт»

Золотарев Юрий Александрович

кандидат химических наук, ведущий научный
сотрудник, заведующий лабораторией медицинской
химии кафедры медицинской химии и тонкого
органического синтеза химического факультета
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Московский государственный университет
имени М.В.Ломоносова»

Палюлин Владимир Александрович

Ведущая организация: Институт физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук.

Защита диссертации состоится «30» ноября 2022 г. в 11:00 часов на заседании Диссертационного совета Д 24.1.092.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН по адресу: 119991 Москва, Ленинский проспект, 47.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН и на официальном сайте Института <http://zioc.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ваш отзыв в двух экземплярах, заверенный гербовой печатью, просим направлять по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, д. 47, ученому секретарю Диссертационного совета ИОХ РАН.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

Д 24.1.092.01 ИОХ РАН

доктор химических наук

Г.А. Газиева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Мозговой нейротрофический фактор (BDNF) относится к семейству нейротрофинов, которое кроме него включает фактор роста нервов (NGF), нейротрофин-3 и нейротрофин-4. Подобно другим нейротрофинам, BDNF образуется из неактивного предшественника и представляет собой негликозилированный белок гомодимерной структуры, состоящий из 119 аминокислотных остатков (а.к.о.) (*Robinson R.C. et al. // Biochemistry. 1995. Vol. 34. P. 4139-4146*).

BDNF осуществляет свои основные эффекты через специфический тирозинкиназный рецептор TrkB, связывание с которым приводит к гомодимеризации рецептора, его самофосфорилированию и запуску сигнальных путей MAPK/ERK, PI3K/AKT и PLC- γ 1. Путь, опосредованный MAPK, отвечает за нейропротекцию, дифференцировку и пролиферацию клеток (*Mohammadi M., Zinkle A. // F1000Research. 2018. Vol. 7*). Путь AKT в основном связан с нейропротекцией за счет стимуляции экспрессии антиапоптотических белков и ингибирования проапоптотических белков (*Skaper S.D. // CNS Neurol. Disord. Drug Targets. 2008. Vol. 7. № 1. P. 46–62*). Каскад PLC- γ 1 модулирует синаптическую пластичность и критически важен для индукции долговременной потенциации и особенно её ранней фазы (*Matsumoto T. // J. Neurochem. 2001. Vol. 79. № 3. P. 522–530*).

Благодаря своей способности увеличивать выживаемость нейронов нейротрофины рассматриваются как перспективные нейропротекторные средства. BDNF особенно привлекателен в этом отношении, так как он улучшает выживание и предупреждает дегенерацию нейронов, вовлеченную в такие заболевания, как боковой амиотрофический склероз (мотонейроны), сенсорные neuropatii (сенсорные нейроны), болезнь Альцгеймера (базальные холинергические нейроны переднего мозга), болезнь Паркинсона (дофаминергические нейроны черной субстанции). Кроме того показано, что BDNF играет важную роль в депрессии (*Zuccato Ch., Cattaneo E. // Nature reviews/Neurology. 2009. Vol. 5. P. 311-322; Schmidt H.D., Duman R.S. // Neuropsychopharm. 2010. Vol. 35. P. 2378-2391*).

В связи с вышесказанным BDNF является перспективной терапевтической мишенью. Однако использование полноразмерного BDNF ограничивается его нестабильностью в биологических жидкостях, низкой способностью проникать через ГЭБ, а также плейтропностью. Эти проблемы могут быть решены с помощью низкомолекулярных миметиков BDNF. Таким образом, создание дипептидных миметиков BDNF, которые воспроизводили бы его полезные терапевтические эффекты при системном введении и были бы свободны от его недостатков, является актуальным.

Степень разработанности проблемы. Проблема создания терапевтически пригодных миметиков BDNF решается исследовательскими группами с двух направлений, одно из которых опирается на структуру BDNF, а другое использует принципы скрининга химических библиотек. Используются и комбинации этих подходов. Так, Хьюз и Флетчер (*Fletcher J.M., Hughes R.A. // J. Pept. Sci. 2006. Vol. 12, №. 8. P. 515–524*), исходя из представлений о важности поворотной конформации петель BDNF и его димерной

структуры для агонистической активности, сконструировали димерные бициклические и трициклические пептиды на основе 2-й петли с агонистической активностью.

Группой американских исследователей (*Massa S.M., Longo F.M. et al. // J. Clin. Investigation. 2010. Vol. 120. № 5. P. 1774-1785*) путем имплантации фрагментов BDNF в структуру NGF был выявлен участок 2-й петли, -Ser⁴⁵-Lys⁴⁶-Gly⁴⁷-Gln⁴⁸-Leu⁴⁹-, вовлеченный в специфичное взаимодействие BDNF с TrkB. Эта структура была использована в качестве фармакофора, с использованием которого методом виртуального скрининга был просеян 1 миллион описанных соединений. Из них 1855 соответствовали энергетическому критерию и из этого числа лишь 14 отвечали структурным критериям, в частности, правилам Липинского. Из прошедших этот фильтр 7 были коммерчески доступными. После их тестирования *in vitro* на клеточных моделях было отобрано одно соединение, триэтаноламид 1,3,5-бензолтрикарбоновой кислоты (LM22A-4). Для последнего при интраназальном введении была показана способность восстанавливать пространственную память у крыс, нарушенную травмой мозга. Информация о развитии LM22A-4 в качестве лекарственного препарата отсутствует.

Группа ученых из Нью-Йоркского государственного института фундаментальных исследований нарушений развития (*Cardenas-Aguayo M.C. et al. // PLoS ONE. 2013. Vol. 8. № 1. P. 1-18*) получила 5 терапевтически перспективных амидов *N*-ацетилтетрапептидов: B1 (Ac-RRGF-NH₂), B2 (Ac-IDKR-NH₂), B3 (Ac-SKKR-NH₂), B4 (Ac-DKRH-NH₂) и B5 (H-IKRG-NH₂), соответствующих последовательностям 6-9, 71-74, 94-97, 72-75, 115-118 BDNF человека. Пептидные последовательности были выявлены как эпитопы моноклональных антител к активным сайтам BDNF. Все пептиды вызывали умеренную активацию TrkB. Наиболее активными были пептиды B3 и B5, которые работали как частичные агонисты/антагонисты BDNF. Авторы делают вывод, что эти пептиды более перспективны как лекарственные препараты, чем димерные циклические пептиды Хьюза (*Hughes*), поскольку имеют меньший молекулярный вес и могут легче проникать через биологические барьеры, и более перспективны, чем описанные ниже непептидные миметики Лонго (*Longo*), так как метаболизируются до природных аминокислот.

Группа американских ученых из медицинской школы университета Эмори (*Jang S-W., Liu X. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. Vol. 107. № 6. P. 2687-2692*) провела *in vitro* скрининг 2000 соединений из базы Spectrum Collection Library по критерию способности поддерживать опосредованную TrkB выживаемость клеток, в результате которого был отобран 7,8-дигидроксифлавон (7,8-DHF). Методом поверхностного плазмонного резонанса было показано, что 7,8-DHF является агонистом TrkB с K_d ~ 15.4 нМ (*Liu X. et al. // J. Biol. Chem. 2014. Vol. 289. P. 27571-27584*). В экспериментах *in vivo* 7,8-DHF продемонстрировал положительные эффекты на моделях болезней Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона (*Zhang Z., Liu X. et al. // Neuropsychopharmacol. 2014. Vol. 39. № 3. P. 638-650; Barriga G-D. et al. // Hum. Mol. Genet. May 2017. doi:10.1093/hmg/ddx198*), бокового амиотрофического склероза, инсульта, синдром Ретта и депрессии (*Jang S-W., Liu X. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. Vol. 107. № 6. P. 2687-2692*). 7,8-DHF как системно-активный миметик BDNF в

настоящее время находится на стадии расширенных фармакологических исследований в качестве потенциального лекарственного средства с нейропротекторным и антидепрессивным эффектами.

Новый импульс низкомолекулярным миметикам нейротрофинов - агонистам Trk-рецепторов был дан в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, где были впервые созданы **дипептидные** миметики NGF (*Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б. // Докл. АН. 2010. Т. 434. №4. С. 549-552*). Они были сконструированы на основе оригинальной гипотезы о том, что фармакофорными участками нейротрофинов являются центральные фрагменты бета-изгибов петлеобразных структур полипептидной цепи как наиболее экспонированные наружу и поэтому предположительно более доступные для взаимодействия с рецептором. В их числе димерный дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2 гексаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-глутамил-*L*-лизина), который развивается в качестве потенциального нейропротекторного препарата для лечения постинсультного состояния (*Т.А. Gudasheva et al. // J. Biomed. Sci. 2015. Vol. 22. № 5. P. 106-116*). Этот же принцип в настоящей работе был положен в основу создания дипептидных димерных миметиков BDNF. Дипептидные миметики имеют наименьший молекулярный вес среди всех возможных миметиков BDNF пептидной природы.

Целью работы являлось создание фармакологически пригодных низкомолекулярных миметиков BDNF методом рационального конструирования на основе структуры его отдельных петель.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Дизайн мономерных и димерных дипептидных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF.
2. Синтез сконструированных дипептидных миметиков.
3. Выявление и анализ нейропротекторной и антидепрессивной активностей синтезированных миметиков BDNF, выбор наиболее перспективного.
4. Синтез аналогов наиболее перспективного для дальнейшего развития дипептидного миметика.
5. Изучение зависимости активности аналогов миметика-лидера от конфигурации и природы а.к.о. и отбор кандидата в лекарственный препарат.
6. Выбор оптимальной схемы синтеза отобранного миметика для разработки лабораторного регламента.
7. Разработка фармакопейной статьи предприятия (ФСП) на субстанцию миметика BDNF - потенциального антидепрессанта.

Научная новизна. Впервые получены мономерные и димерные дипептидные миметики 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF. Впервые в мире показано, что BDNF - подобную активность можно проимитировать димерным *N*-ацилзамещенным дипептидом. Установлено, что для проявления агонистической активности дипептидного миметика BDNF необходима его димерная структура, тогда как мономерные дипептидные миметики отдельных петель либо неактивны, либо проявляют антагонистическую активность.

Теоретическая и практическая значимость работы. Показано, что функции полноразмерного BDNF могут быть воспроизведены с помощью димерного замещенного дипептида, имитирующего структуру центрального участка бета-изгиба одной из его петель. Показано, что за антидепрессивную активность BDNF ответственен центральный дипептидный фрагмент бета-изгиба его наиболее экспонированной 4-й петли. Показана возможность дивергенции функций нейротрофина BDNF с помощью дипептидных миметиков его отдельных петель.

Получены новые фармакологически активные низкомолекулярные миметики BDNF – димерные *N*-ацилдипептиды с высокой нейропротекторной активностью, которые могут стать основой для создания оригинальных нейропсихотропных лекарственных препаратов для лечения нейродегенеративных и психиатрических заболеваний, таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона, инсульта мозга, шизофрения и депрессия. Получен новый системно-активный миметик BDNF, димерный дипептид ГСБ-106 с антидепрессивной и нейропротекторной активностями, для которого в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова завершен полный цикл доклинических исследований в качестве лекарственного средства – антидепрессанта, первого в новом классе антидепрессантов с BDNF-подобным механизмом действия.

Связь темы диссертации с научными планами института. Диссертация выполнена в рамках НИР ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» «Изучение механизмов эндо- и экзогенной регуляции функций центральной нервной системы. Разработка новых оригинальных нейропсихотропных средств» Рег. № 01201169192, Гос. задания на 2019-2021 гг. по теме №0521-2019-0003 «Изыскание фармакологических способов избирательной активации путей трансдукции сигнала тирозинкиназных нейротрофиновых рецепторов как основы для создания лекарственных средств, свободных от побочных эффектов нативных нейротрофинов», проекта РФФИ № 12-04-01225 «Изучение фармакофоров, ответственных за нейропротективную и антидепрессивную активности нейротрофина BDNF, как фундамент для создания новых антидепрессантов», проекта РНФ № 14-15-00596 «Дивергенция основных функций нейротрофинов с помощью их низкомолекулярных миметиков», Государственного контракта от «29» августа 2016 г. №14.N08.12.0086 в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» «Доклинические исследования лекарственного средства – антидепрессанта на основе дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора».

Положения, выносимые на защиту:

1. Сконструированы и синтезированы фармакологически активные дипептидные миметики 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF.
2. Для проявления нейропротекторной активности дипептидными миметиками 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF необходима гомодимерная структура.
3. Антидепрессивную активность полноразмерного белка BDNF можно воспроизвести с помощью гомодимерного дипептидного миметика его 4-й петли.

4. Нейропротекторная активность димерного миметика 4-й петли является стереоспецифичной.
5. Минимальный участок BDNF, ответственный за проявление антидепрессивной активности, соответствует структуре центрального фрагмента бета-изгиба его 4-й петли.
6. Получен новый системно активный низкомолекулярный миметик BDNF, димерный дипептид ГСБ-106, обладающий антидепрессивной и нейропротекторной активностями.
7. Выбрана оптимальная схема синтеза лидерного соединения ГСБ-106, вошедшая в лабораторный регламент его получения.
8. Разработан проект фармакопейной статьи предприятия на фармацевтическую субстанцию ГСБ-106.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на 5-й и 6-й Международных конференциях «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» (Московская область, 2010, 2015), на 11-м Региональном Конгрессе Европейской коллегии по психофармакологии (Санкт-Петербург, 2011), на 4-м съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» (Казань, 2012), на 1-й Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств» (Москва, 2013), на 6-м и 7-м Российских симпозиумах «Белки и пептиды» (Уфа, 2013; Новосибирск, 2015), на 2-й, 3-й, 4-й и 5-й Международных «научных конференциях молодых ученых, посвященных 91-94-летию Национального лидера Азербайджана Гейдара Алиева» (Баку, 2014-2017), на 24-м Международном симпозиуме по медицинской химии Европейской федерации медицинской химии (Манчестер, 2016), на 5-м Съезде фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств» (Ярославль, 2018), 2-й Научной конференции молодых ученых с международным участием "Актуальные исследования в фармакологии" (Москва, 2021).

Личный вклад. Автор работы является основным исполнителем проведенного исследования на всех этапах: анализе данных литературы по теме диссертационной работы, проведении экспериментальной части исследования и анализе полученных результатов, проведении статистической обработки, формулировании выводов. При активном участии автора подготовлены публикации по результатам работы.

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 25 печатных работ, из них 12 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, 2 статьи в журналах, рецензируемых в РИНЦ, 2 патента РФ (рег. номера 2559880 и 2693479) и 9 тезисов в материалах российских и международных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы. Библиографический список включает 11 отечественных и 230 иностранных источников. Работа изложена на 181 странице, содержит 54 рисунка и 25 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали коммерчески доступные энантиомерно чистые *L*- и *D*-аминокислоты и их производные фирм Sigma, Fluka и реагенты для пептидного синтеза: ди-трет-бутилпиروкарбонат (Sigma); трифторуксусная кислота (TFA) (Merck); бензилоксикарбонилсукцинимид (Z-OSu), катализатор 10% Pd/C, *N*-гидроксисукцинимид, пентафторфенол и дициклогексилкарбодиимид (DCC) фирмы AlfaAesar.

Хроматографическую гомогенность подтверждали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ). ТСХ выполняли на алюминиевых пластинах DC Kieselgel 60 G/F₂₅₄ (Merck, Германия). Для проведения ОФ ВЭЖХ использовали хроматографическую систему Wellchrom 2001 (KNAUER, Германия). Анализ проводили при комнатной температуре на стальной колонке 250×4 мм Диасфер-110-С16, 5 мкм (BioChemMack), объем петли – 20 мкл, детектирование при длине волны 220 нм. Очистку целевых продуктов проводили ОФ ВЭЖХ на колонке 250×15 мм Диасфер-110-С16, 5 мкм, объем петли 2 мл.

Температуру плавления определяли на приборе Optimelt MPA100 (Stanford Research Systems, США) в открытых капиллярах без корректировки. Удельное оптическое вращение регистрировали на автоматическом поляриметре ADP 440 Polarimeter (Bellingham+Stanley Ltd., Великобритания).

Для подтверждения структуры и диастереомерной чистоты пептидов использовали ЯМР-спектроскопию. Спектры ¹H- и ¹³C-ЯМР регистрировали по шкале δ, м. д. на спектрометре Bruker FOURIER 300 HD (300 и 75 МГц, соответственно) в растворах DMSO-d₆ и D₂O:H₂O=1:9, внутренний стандарт тетраметилсилан (0 м.д.). Отнесение сигналов сделано на основании анализа одномерных и двумерных гомоядерных спектров ¹H -¹H COSY и гетероядерных спектров ¹H -¹³C COSY (HSQC и HMBC). Масс-спектрометрия: спектры высокого разрешения зарегистрированы на приборе Bruker microTOF II методом электрораспылительной ионизации (ESI-MS).

Синтез пептидов

Синтез пептидов проводили классическими методами пептидного синтеза в растворе с использованием Вос/*Z*- и *Z*/Вос-стратегий защиты функциональных групп а.к.о. Очистку целевых пептидов проводили кристаллизацией или хроматографическими методами (ОФ ВЭЖХ и ионообменная хроматография).

Введение и удаление защитных групп

Введение трет-бутилоксикарбонильной (Вос) и бензилоксикарбонильной (*Z*) защитных групп осуществляли по стандартным методикам, используя ди-трет-бутилпирокарбонат (В.Ф. Позднев // *Химия природных соединений*. 1974. № 6. С. 764-767) и бензилоксикарбонилсукцинимид (А. Raquet // *Can. J. Chem.* 1982. Vol. 80. P. 976-980). Удаление защитных групп проводили в условиях ацидолиза (для Вос-групп) и каталитического гидрогенолиза в присутствии Pd/C (для *Z*-, *Z*(Cl)- и *Bzl*-групп).

Методы образования пептидной связи

Активированные *N*-оксисукцинимидные и пентафторфениловые эфиры защищенных аминокислот получали классическим способом (Anderson G.W. et al. // *J. Am. Chem. Soc.* 1964. Vol. 86. № 9. P. 1839-1842; Kisfaludy L. et al. // *J. Org. Chem.* 1970. Vol. 35. №. 10. P. 3563-3565) в ТГФ или EtOAc, используя DCC. Конденсацию соответствующих активированных эфиров и аминок компонента проводили в среде DMF.

Конденсацию аминокислотных компонентов азидным методом проводили по методике Хонзла и Рудингера (Honzl J., Rudinger J. // *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1961. Vol. 26. №. 10. P. 2333-2344), исходя из метилового эфира защищенной аминокислоты, переводом его в гидразид, затем *in situ* в азид, используя *n*-бутилнитрит.

Фармакологические тесты

Для выявления *нейропротекторной активности* синтезированных миметиков была использована модель окислительного стресса с перекисью водорода на культуре иммортализованных клеток гиппокампа мыши линии HT22 (Jackson G.R. et al. // *Brain Res.* 1992. Vol. 592. №1. P. 239-248). Пептиды вносили за 24 ч до повреждающего агента в интервале концентраций 10^{-5} - 10^{-10} М. Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста (Kerr S.J. et al. // *J. Neurovirol.* 1995. Vol. 1, № 5-6. P. 375-380). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре "Multiscan EX" (Thermo, Германия) при 600 нм.

Антидепрессивная активность дипептидов была изучена на модели вынужденного плавания на мышах линии Balb/c по Порсолту (Porsolt R.D. et al. // *Eur. J. Pharmacol.* 1978. Vol. 47. P. 379-391).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Дизайн и синтез дипептидных миметиков BDNF

1.1. Дизайн мономерных и димерных *N*-ацилдипептидных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF

При конструировании миметиков BDNF мы основывались на кристаллической структуре гетеродимера BDNF/NT-3 (PDB ID: 1bnd) (рисунок 1). Подобно другим членам нейротрофинового семейства, BDNF представляет собой симметричный гомодимер, мономерные единицы которого содержат 7 бета-тяжей, образующих три антипараллельных листа. β -Тяжи связаны четырьмя экспонированными наружу нерегулярными участками, называемыми петлями, три из которых, петли 1 (остатки 28—36), 2 (43—49) и 4 (92—98), являются бета-поворотными, а 3-я петля (остатки 59—75) представляет собой серию из трех последовательных изгибов (Robinson R.C, et al // *Protein Sci.* 1999. Vol. 8. P. 2589-2597). Путем визуального анализа этой структуры нами было обнаружено, что наиболее экспонированными в растворитель являются бета-изгибы 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF -Asp³⁰-Met³¹-Ser³²-Gly³³-, -Val⁴⁴-Ser⁴⁵-Lys⁴⁶-Gly⁴⁷- и -Asp⁹³-Ser⁹⁴-Lys⁹⁵-Lys⁹⁶-. В свою очередь, наиболее экспонированное и, следовательно, предположительно геометрически наиболее выгодное для взаимодействия с рецептором положение занимают центральные дипептидные фрагменты этих бета-изгибов: -Met³¹-Ser³²-, -Ser⁴⁵-Lys⁴⁶-, -Ser⁹⁴-Lys⁹⁵-. Поэтому в качестве

основы для конструирования миметиков были выбраны последовательности β -изгибов, при этом их центральные фрагменты были полностью сохранены.

Предшествующий центральному фрагменту а.к.о. заменяли его биоизоостером. Так, остатки Asp³⁰ и Asp⁹³ заменяли остатком янтарной кислоты HOOCCH₂CH₂CO- (HO-Suc-), остаток Val⁴⁴ - остатком гексановой (Hex) кислоты. Последующий за дипептидным фрагментом остаток заменяли амидной группой. Цели эти двух замен — стабилизация конформации β -изгиба, увеличение устойчивости соединения к действию пептидаз.

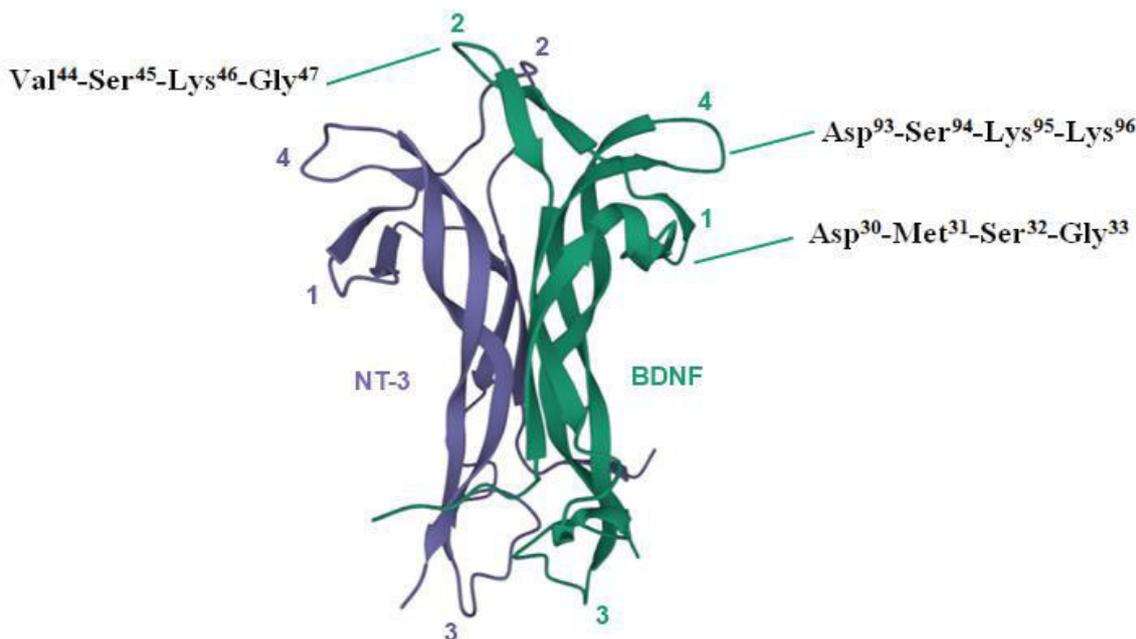


Рисунок 1 - Структура гетеродимера BDNF/NT-3 (PDB ID: 1bnd). Указано положение бета-изгибов петель 1, 2, 4 мономера BDNF (Robinson R.C, 1999).

Таким образом, были сконструированы мономерные дипептидные миметики β -изгибов 1-й и 4-й петель BDNF:

Миметик	Химическое название	Структура	Шифр
β -изгиба 1-й петли	Амид <i>N</i> -моносукцинил- <i>L</i> -метионил- <i>L</i> -серина	HO-Suc-Met-Ser-NH₂	ГСБ-207
β -изгиба 4-й петли	Амид <i>N</i> -моносукцинил- <i>L</i> -серил- <i>L</i> -лизина	HO-Suc-Ser-Lys-NH₂	ГСБ-104

Основываясь на данных о димерной структуре нейротрофина BDNF, два миметика β -изгиба соответствующей петли были димеризованы хвост-к-хвосту гекса- или гептаметилендиаминовым спейсером. Длина спейсера была выбрана на основе предыдущих исследований по димерным дипептидным миметикам NGF (А.В. Тарасюк и др. // *Хим.-фарм. журнал.* 2019, Т. 53, № 6, С. 3-10). Таким образом, были сконструированы следующие димерные дипептидные миметики BDNF:

Димерный дипептидный миметик β -изгиба	Химическое название	Структура	Шифр
1-х петля	Гептаметилендиамид бис-(<i>N</i> -моносукцинил- <i>L</i> -	(HO-Suc-Met-Ser-NH-)₂(CH₂)₇	ГСБ-214

наращивали с помощью Z-Ser-OPfp. Далее Z-защиту удаляли каталитическим гидрогенолизом и полученный деблокированный бис-дипептид конденсировали с Hex-OSu. Вос-защитные группы удаляли TFA в CH₂Cl₂, затем трифторацетат продукта переводили в ацетатную форму. Общий выход составил 50% (рисунок 4).

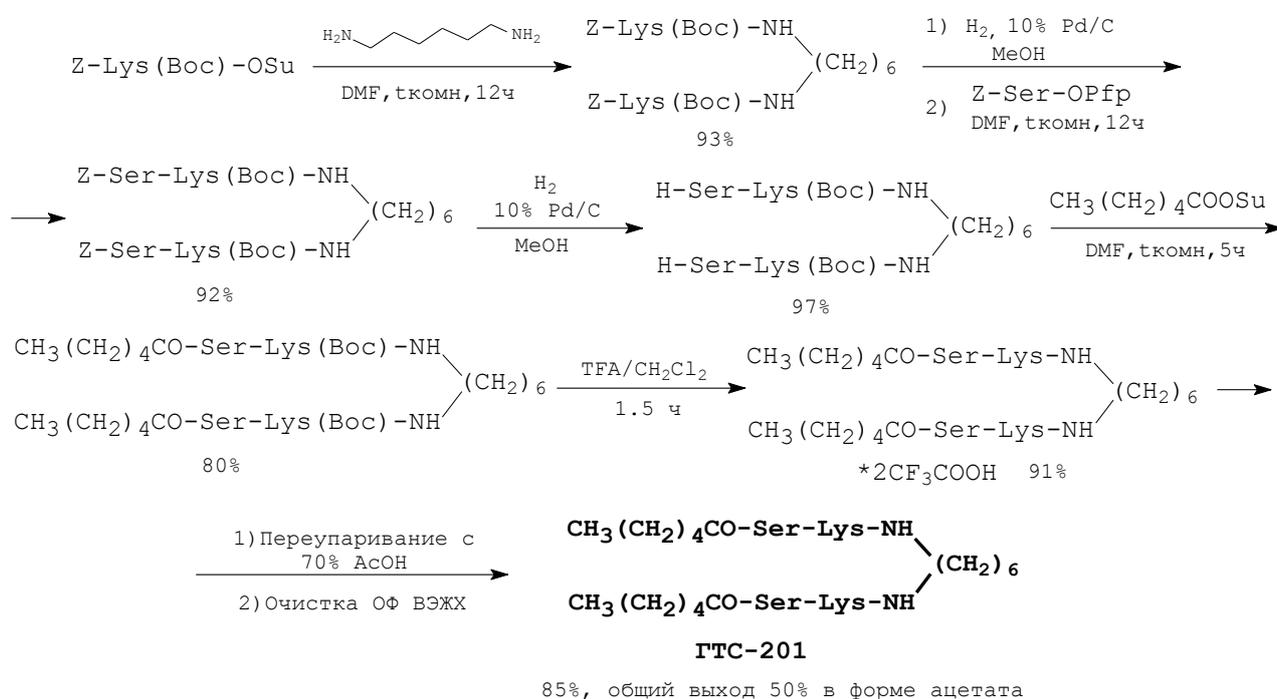


Рисунок 4 – Схема синтеза димерного дипептидного миметика 2-й петли BDNF ГТС-201

1.2.3 Синтез дипептидных миметиков 4-й петли BDNF

Мономерный дипептидный миметик бета-изгиба 4-й петли ГСБ-104 был получен путем конденсации Boc-Ser(Bzl)-OSu с H-Lys(Z(Cl))-NH₂ с последующим удалением Boc-группы, далее ацилированием продукта янтарным ангидридом и Z(Bzl)-деблокированием каталитическим гидрогенолизом (рисунок 5).

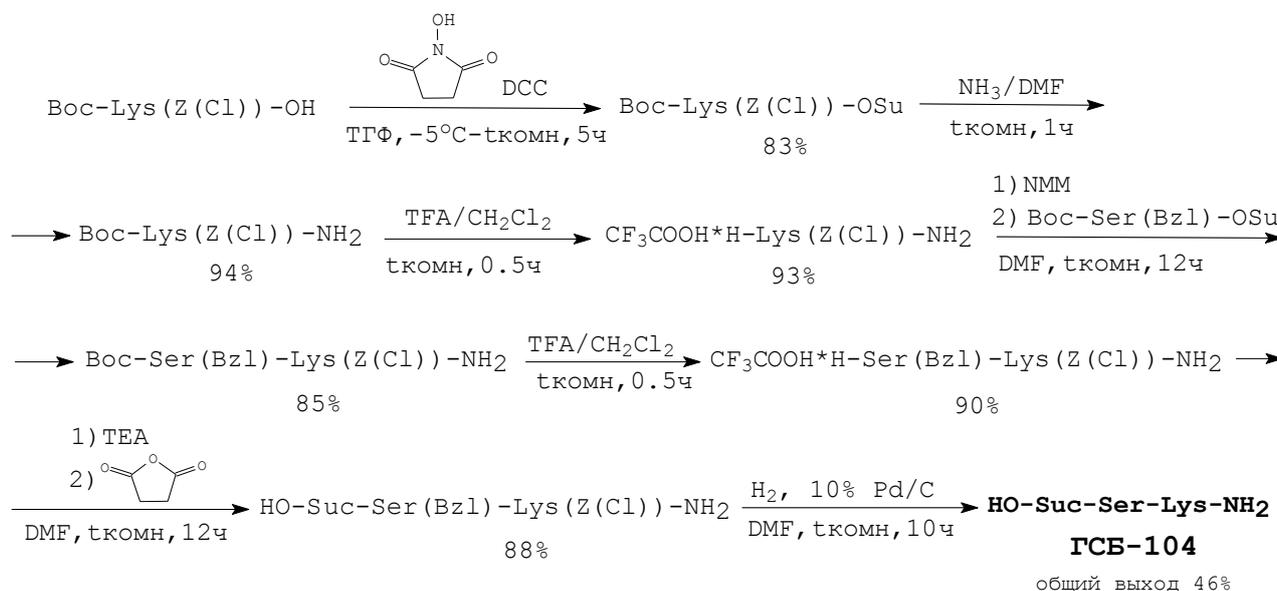


Рисунок 5 – Схема синтеза мономерного дипептидного миметика 4-й петли BDNF ГСБ-104

Димерный дипептидный миметик 4-й петли ГСБ-106 был получен путем присоединения Boc-Lys(Z(Cl))-OSu к гексаметилендиамину с последующим наращиванием пептидной цепи остатком защищенного серина методом *N*-оксисукцинимидных эфиров. *N*-Boc-защитные группы с бис-дипептида удаляли TFA и полученный продукт ацилировали янтарным ангидридом. Удаление боковых защитных групп каталитическим гидрогенолизом позволили получить ГСБ-106 с общим выходом 29% (рисунок 6).

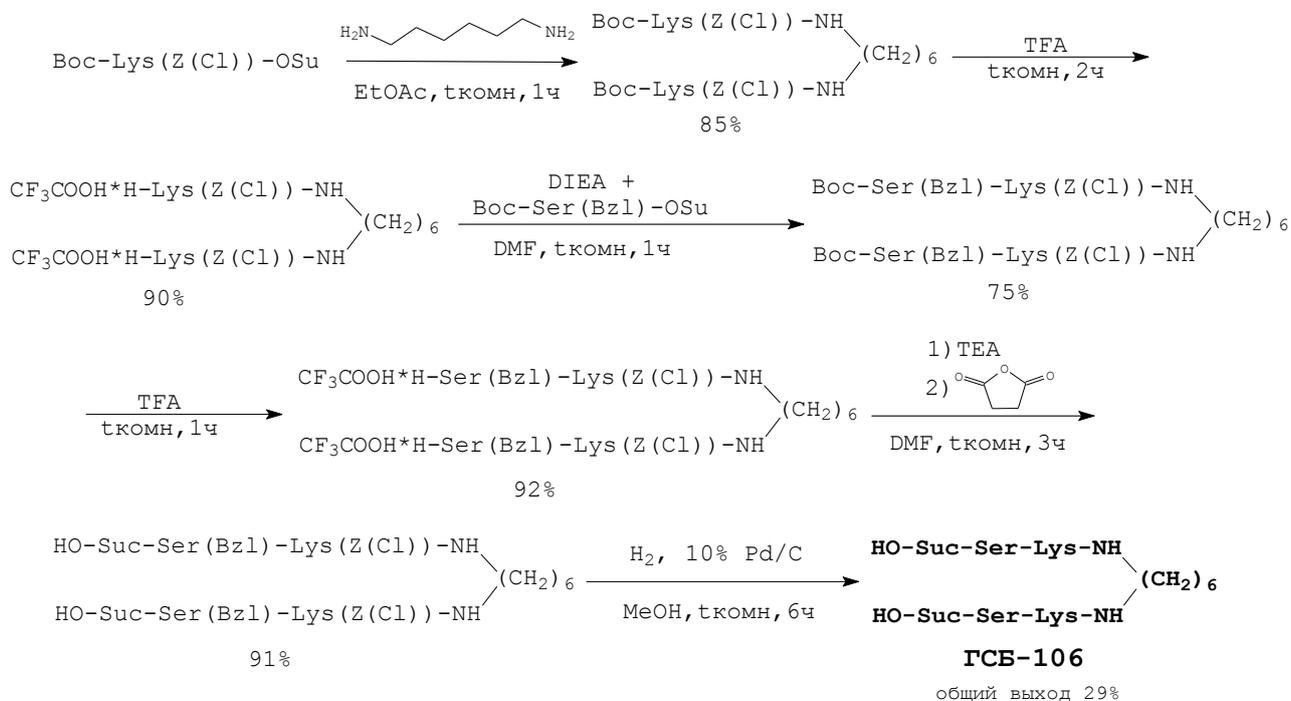


Рисунок 6 – Схема синтеза димерного дипептидного миметика 4-й петли BDNF ГСБ-106

В таблице 3 представлены физико-химические характеристики синтезированных миметиков BDNF.

Таблица 3 - Физико-химические характеристики миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF

Миметик	т. пл., °С	$[\alpha]_D^t$, град	ТСХ, R_f	ОФ ВЭЖХ	$[M + H]^+$
				Время удерживания, мин	
ГСБ-207	101-105 (из MeOH-Et ₂ O)	$[\alpha]_D^{20} -14.25$ (с 0.4; MeOH)	0.45 (А), 0.12 (Б)	7.9	336.1218
ГСБ-214	162-163 (из MeOH-Et ₂ O)	$[\alpha]_D^{25} +9.0$ (с 0.4; DMF)	0.57 (А)	8.7	767.3304
ГТС-201	110-125 с разлож.	$[\alpha]_D^{25} -14.9$ (с 0.6; MeOH)	0.59 (А)	12.0	743.5390
ГСБ-104	136-138 (из MeOH)	$[\alpha]_D^{20} -15.75$ (с 0.4; DMF)	0.35 (А), 0.11 (Б)	5.4	333.1771
ГСБ-106	143-145 (из MeOH-Et ₂ O)	$[\alpha]_D^{25} -44.5$ (с 1; вода)	0.42 (А), 0.10 (Б)	6.2	747.4226

Примечания: системы ТСХ: (А) - хлороформ-метанол-вода-уксусная кислота, 15:10:2:3;

(Б) - пиридин-вода-уксусная кислота-этилацетат, 20:11:6:120; (В) - н-бутанол-уксусная кислота-вода, 4:1:1.

Параметры ОФ ВЭЖХ: подвижная фаза А (вода : ацетонитрил : TFA = 950:50:0.5 об.), подвижная фаза Б (0.05 % раствор TFA в ацетонитриле). Режим элюирования градиентный. Скорость потока – 0.9 мл/мин.

1.3 Выявление нейропротекторной активности¹ *in vitro* дипептидных миметиков BDNF

Все димерные миметики (ГСБ-214, ГСБ-106, ГТС-201), как и полноразмерный BDNF, увеличивали жизнеспособность нейронов, т.е. обладали нейропротекторной активностью, (таблица 4). Мономерный миметик 4-й петли ГСБ-104 в концентрации 10^{-7} М в два раза уменьшал жизнеспособность нейронов, то есть демонстрировал нейродегенеративную активность. Это может быть связано с его антагонизмом в отношении эндогенного BDNF. Мономерный миметик 1-й петли был неактивен. Полученные данные согласуются с тем, что BDNF проявляет активность, взаимодействуя в димерной форме с рецептором.

Таблица 4 - Влияние дипептидных миметиков BDNF на жизнеспособность нейронов HT22 в условиях окислительного стресса

Соединение	Концентрация, М	Оптическое поглощение		Активность ^a , %
		с H ₂ O ₂	без H ₂ O ₂	
ГСБ-207	10 ⁻⁵	0.081±0.010		-7
	10 ⁻⁶	0.087±0.010		13
	10 ⁻⁷	0.082±0.005		-3
	10 ⁻⁸	0.084±0.010		3
	0 (контроль)	0.083±0.005 [#]	0.113±0.007	
ГСБ-214	10 ⁻⁵	0.096±0.008*		34
	10 ⁻⁶	0.098±0.011*		40
	10 ⁻⁷	0.095±0.006*		31
	10 ⁻⁸	0.088±0.004*		11
	0 (контроль)	0.084±0.004 [#]	0.119±0.006	
ГТС-201	10 ⁻⁵	0.102±0.004*		34
	10 ⁻⁶	0.102±0.005*		34
	10 ⁻⁷	0.104 ±0.004*		38
	10 ⁻⁸	0.102 ±0.005*		34
	0 (контроль)	0.86±0.003 [#]	0.133±0.007	
ГСБ-104	10 ⁻⁵	0.114±0.036		26
	10 ⁻⁶	0.100±0.020		-19
	10 ⁻⁷	0.089 ±0.010*		-55
	10 ⁻⁸	0.107 ±0.025		3
	0 (контроль)	0.106±0.023 [#]	0.137±0.026	
ГСБ-106	10 ⁻⁵	0.097±0.010*		31
	10 ⁻⁶	0.095±0.008*		27
	10 ⁻⁷	0.095±0.010*		26
	10 ⁻⁸	0.101±0.007*		41
	0 (контроль)	0.085±0.006 [#]	0.124±0.010	
	10 ⁻⁹	0.088±0.010*		36
	10 ⁻¹⁰	0.082±0.009		17
BDNF	50 нг/мл (~10 ⁻⁹)	0.090±0.003*		78
	0 (контроль)	0.076±0.003 [#]	0.094±0.004	

Примечания: опыты выполнены на клетках HT22. Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста; * $p < 0.05$ по критерию Краскела-Уоллеса относительно активного контроля (с H₂O₂); [#] $p < 0.05$ по критерию Краскела-Уоллеса относительно пассивного контроля (без H₂O₂); ^a активность рассчитывалась по формуле $A(\%) = (D_{\text{экс}} - D_{\text{H}_2\text{O}_2}) / (D_{\text{контр}} - D_{\text{H}_2\text{O}_2}) \times 100\%$, где $D_{\text{экс}}$ – оптическое поглощение раствора в опыте, $D_{\text{H}_2\text{O}_2}$ – в активном контроле (с H₂O₂), $D_{\text{контр}}$ – в пассивном контроле (без H₂O₂).

¹ проводилось совместно с зав. лаб., к.б.н. Т.А. Антиповой и н.с. И.О. Логвиновым лаборатории фармакологии нейропротекции отдела фармакогенетики (рук. отдела академик РАН С.Б. Середенин).

1.4 Выявление антидепрессивной активности¹ димерных дипептидных миметиков BDNF

Поскольку BDNF вовлечен в патогенез депрессии и обладает антидепрессивной активностью (*Schmidt H.D., Duman R.S. // Neuropsychopharm. 2010. Vol. 35. P. 2378-2391*), мы изучили антидепрессивные свойства синтезированных димерных дипептидных миметиков BDNF (таблица 5).

Таблица 5 - Антидепрессивная активность дипептидных миметиков BDNF в тесте Порсолта в сравнении с классическим антидепрессантом амитриптилином

Вещества	Группа, доза мг/кг, внутрибрюшинно	Время иммобильности животных, с			Активность, %
		Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	
ГСБ-106	0 (контроль)	208	189	233	0
	0.05	190	121	216	9.5
	0.1	165*	176	159	20.7
	1.0	167*	178	161	19.7
	10	194	167	211	6.7
ГСБ-214	0 (контроль)	208	189	233	0
	0.1	198	186	205	4.8
	1.0	193	185	215	7.2
ГТС-201	0 (контроль)	230.6	195.5	257.4	0
	0.1	245.9	216.8	261.8	-6.6
	1.0	205.2	191	212.4	11.0
	5.0	227.2	217.4	254.1	1.5
Амитриптилин	0 (контроль)	205	193	229	0
	10	129*	115	147	37.1

Примечание: Данные представлены в виде медиан и квартилей. *- $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$ по сравнению с контролем (U-тест Манна-Уитни). Активность в опытах рассчитывалась по формуле:

$A(\%) = (T_{\text{контр}} - T_{\text{экс}}) / T_{\text{контр}} \times 100\%$, где $T_{\text{контр}}$ – время иммобильности животных в контроле (медиана), $T_{\text{экс}}$ – время иммобильности животных в эксперименте (медиана).

Активностью обладал только миметик 4-й петли ГСБ-106. Он проявлял статистически достоверный антидепрессивный эффект в дозах 0.1 и 1.0 мг/кг и был неактивен в дозах 0.5 и 10 мг/кг при внутрибрюшинном введении (таблица 5). По выраженности этот эффект составлял около 56% от эффекта классического антидепрессанта амитриптилина.

На основании вышесказанного следует, что за антидепрессивную активность BDNF отвечает его 4-я петля. Отметим, что в случае дипептидных миметиков NGF также была обнаружена селективность, связанная с петлеобразными структурами – за нейропротекторную активность этого нейротрофина отвечала 4-я петля, а за дифференцировочную активность - его 1-я петля (*Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б. // Докл. АН. 2010. Т. 434. №4. С. 549-552*).

2. Синтез диастереомеров и глициновых аналогов ГСБ-106 и изучение связи структура-активность в их ряду

Изучение активности миметиков BDNF показало, что и нейропротекторной, и антидепрессивной активностью обладал только димерный дипептидный миметик 4-й петли

¹ проводилось совместно с к.б.н., с.н.с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств П.Ю. Поварниной.

ГСБ-106, который и был выбран в качестве наиболее перспективного соединения (соединения-лидера). Для изучения влияния на фармакологическую активность природы бокового радикала и конфигурации а.к.о. в структуре соединения-лидера были синтезированы и изучены его стереоизомеры и глициновые аналоги (рисунки 7 и 8):

ГТ-106DL	(HO-Suc- <i>D</i> -Ser- <i>L</i> -Lys-NH-) ₂ (CH ₂) ₆	<i>L</i> -Ser→ <i>D</i> -Ser,
ГТ-106LD	(HO-Suc- <i>L</i> -Ser- <i>D</i> -Lys-NH-) ₂ (CH ₂) ₆	<i>L</i> -Lys→ <i>D</i> -Lys,
ГТ-106Ac	(CH ₃ CO- <i>L</i> -Ser- <i>L</i> -Lys-NH-) ₂ (CH ₂) ₆	Suc→Ac,
ГТ-105	(HO-Suc- <i>L</i> -Ser-Gly-NH-) ₂ (CH ₂) ₆	<i>L</i> -Lys→Gly,
ГТ-107	(HO-Suc-Gly- <i>L</i> -Lys-NH-) ₂ (CH ₂) ₆	<i>L</i> -Ser→Gly,
ГТ-107D	(HO-Suc-Gly- <i>D</i> -Lys-NH-) ₂ (CH ₂) ₆	<i>L</i> -Ser→Gly и <i>L</i> -Lys→ <i>D</i> -Lys

2.1 Синтез диастереомеров и глициновых аналогов ГСБ-106

Синтез аналогов ГСБ-106 был осуществлен наращиванием пептидной цепи с C-конца методом активированных эфиров с использованием Boc/Z- или Z/Boc-стратегий защитных групп (рисунки 7 и 8).

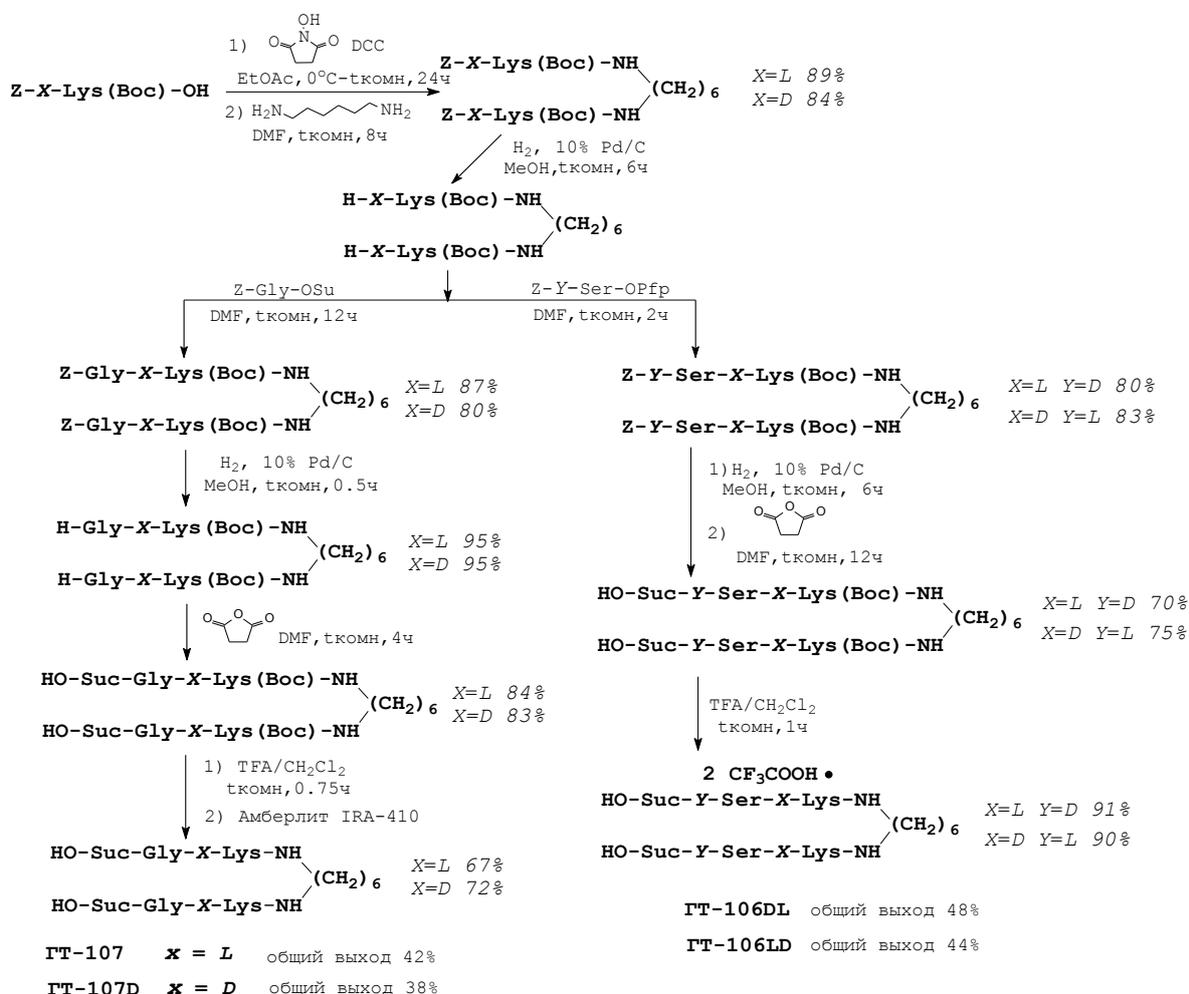


Рисунок 7 – Схема синтеза дипептидов ГТ-106DL, ГТ-106LD, ГТ-107 и ГТ-107D

Соединения ГТ-107, ГТ-107D, ГТ-106DL и ГТ-106LD синтезировали (рисунок 7), исходя из Z/Boc защищенного *L*- или *D*- лизина (*Z*-(*L/D*)-Lys(Boc)-OH). Защищенный бис-лизин (*Z*-(*L/D*)-Lys(Boc)-NH-)₂(CH₂)₆ подвергали каталитическому гидрогенолизу, затем свободный по аминогруппам продукт конденсировали в DMF с *Z*-Gly-OSu в случае ГТ-107 и

ГТ-107D, а в синтезе ГТ-106LD и ГТ-106DL с *Z-L-Ser-OPfp* и *Z-D-Ser-OPfp* соответственно. Полученные с выходами около 80% *Z*-защищенные димерные дипептиды подвергали каталитическому гидрогенолизу и ацилировали янтарным ангидридом в DMF. Боковые Вос-защитные группы удаляли обработкой TFA в CH₂Cl₂. Соединения ГТ-107 и ГТ-107D были получены в бессолевой форме путем обработки ионообменной смолой. Общий выход пептидов составил от 38 до 48% (рисунок 7).

Соединения ГТ-106Ac и ГТ-105 получали методом активированных *N*-оксисукцинимидных эфиров с использованием Вос/*Z*-стратегии защитных групп (рисунок 8). Для получения пептида ГТ-106Ac синтезированный ранее бис-лизин (Вос-Lys(*Z*(Cl))-NH)₂(CH₂)₆ Вос-деблокировали с помощью 4М HCl в диоксане, затем проводили наращивание пептидной цепи взаимодействием с Вос-Ser(Bzl)-OSu в DMF. Вос- группы вновь удаляли 4 М HCl в диоксане и бис-дипептид ацилировали AcOSu. После удаления боковых защитных групп каталитическим гидрогенолизом получали димерный дипептид ГТ-106Ac с общим выходом 44% (рисунок 8).

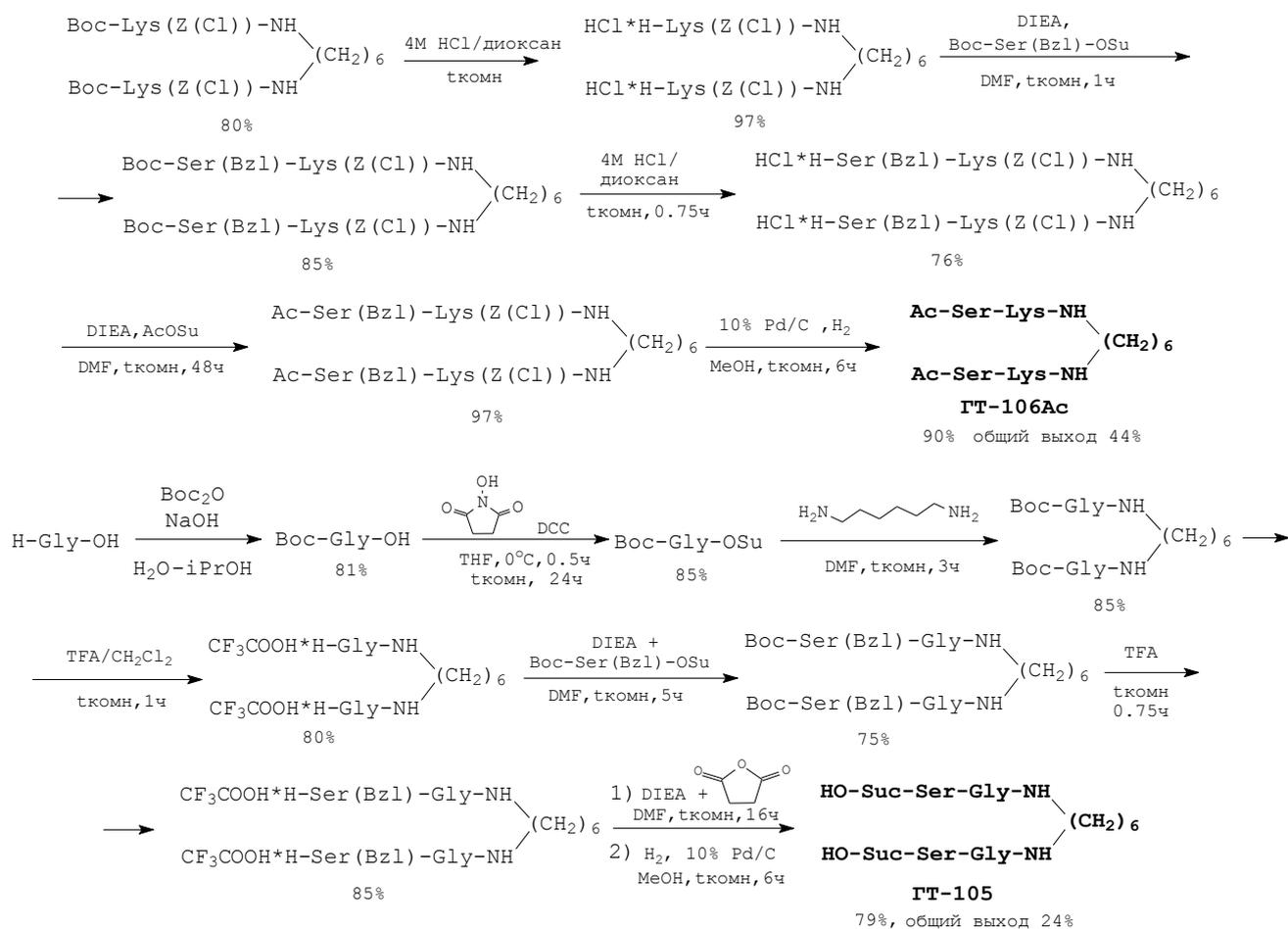


Рисунок 8 – Схема синтеза соединений ГТ-106Ac и ГТ-105

На первой стадии синтеза ГТ-105 проводили конденсацию Вос-Gly-OSu с гексаметилендиамином в DMF, затем удаляли Вос-группу TFA в CH₂Cl₂ и осуществляли конденсацию с Вос-Ser(Bzl)-OSu. Выход на этой ключевой стадии составил 75%. Полученный бис-дипептид Вос-деблокировали ацидолизом TFA и ацилировали янтарным ангидридом, затем бис-(*N*-моносукцинил-дипептид) подвергали каталитическому гидрогенолизу. Целевой пептид ГТ-105 получали с общим выходом 24% (рисунок 8).

2.2 Изучение связи структуры и нейропротекторной активности аналогов ГСБ-106

Как видно из таблицы 6, нейропротекторная активность¹ сохраняется при замене остатка серина в ГСБ-106 на глицин (ГТ-107) и при замене сукцинильного радикала на ацетильный (ГТ-106Ac). Эти аналоги проявляли активность, сравнимую с активностью ГСБ-106 в концентрациях до 10^{-8} М. В то же время замена остатка *L*-лизина на глицин (ГТ-105) или *D*-лизин (ГТ-106LD), а также замена *L*-серина на *D*-серин (ГТ-106DL) приводит к исчезновению активности.

Таблица 6 - Влияние дипептидных миметиков BDNF на жизнеспособность нейронов в условиях окислительного стресса

Соединение	Концентрация, М	Оптическое поглощение		Активность, %
		с H ₂ O ₂	без H ₂ O ₂	
ГСБ-106 (HO-Suc- <i>L</i> -Ser- <i>L</i> -Lys-NH-) ₂ (CH ₂) ₆	10 ⁻⁵	0.097±0.010*		31
	10 ⁻⁶	0.095±0.008*		27
	10 ⁻⁷	0.095±0.010*		26
	10 ⁻⁸	0.101±0.007*		41
	0 (контроль)	0.085±0.006 [#]	0.124±0.010	
	10 ⁻⁹	0.088±0.010*		36
	10 ⁻¹⁰	0.082±0.009		17
	0 (контроль)	0.077±0.003 [#]	0.107±0.008	
ГТ-106DL <i>L</i> -Ser→ <i>D</i> -Ser	10 ⁻⁵	0.103±0.006		-21
	10 ⁻⁶	0.111±0.009		0
	10 ⁻⁷	0.107±0.010		-11
	10 ⁻⁸	0.106±0.007		-14
	0 (контроль)	0.111±0.009 [#]	0.148±0.013	
ГТ-106LD <i>L</i> -Lys→ <i>D</i> -Lys	10 ⁻⁵	0.098±0.013		-14
	10 ⁻⁶	0.097±0.010		-28
	10 ⁻⁷	0.098±0.014		-14
	10 ⁻⁸	0.100±0.007		7
	0 (контроль)	0.099±0.008 [#]	0.106±0.005	
ГТ-106Ac Suc→Ac	10 ⁻⁵	0.119±0.014*		55
	10 ⁻⁶	0.122±0.017*		64
	10 ⁻⁷	0.117±0.018*		48
	10 ⁻⁸	0.118±0.009*		52
	0 (контроль)	0.101±0.006 [#]	0.134±0.005	
ГТ-105 <i>L</i> -Lys→Gly	10 ⁻⁵	0.156±0.008		-8
	10 ⁻⁶	0.170±0.020		20
	10 ⁻⁷	0.166±0.017		12
	10 ⁻⁸	0.166±0.014		12
	0 (контроль)	0.160±0.013 [#]	0.211±0.012	
ГТ-107 <i>L</i> -Ser→Gly	10 ⁻⁵	0.096±0.008		3
	10 ⁻⁶	0.121±0.010*		74
	10 ⁻⁷	0.113±0.011		53
	10 ⁻⁸	0.126±0.009*		89
	0 (контроль)	0.095±0.009 [#]	0.130±0.013	
ГТ-107D <i>L</i> -Ser→Gly	10 ⁻⁵	0.142±0.013		-9
	10 ⁻⁶	0.149±0.012		3
	10 ⁻⁷	0.147±0.015		0
	10 ⁻⁸	0.145±0.018		-3

¹ Изучение нейропротекторной активности аналогов ГСБ-106 проводилось совместно с зав. лаб., к.б.н. Т.А. Антиповой и н.с. И.О. Логвиновым лаборатории фармакологии нейропротекции отдела фармакогенетики (рук. отдела академик РАН С.Б. Середенин).

<i>L</i> -Lys→ <i>D</i> -Lys	0 (контроль)	0.147±0.012 [#]	0.205±0.015	
BDNF	50 нг/мл (10 ⁻⁹)	0.090±0.003*		78
	0 (контроль)	0.076±0.003 [#]	0.094±0.004	

Примечания: опыты выполнены на гиппокампальных нейронах мыши линии НТ22. Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста. Жирным шрифтом выделены статистически достоверные значения активности по критерию Краскела-Уоллеса: * $p < 0.05$ относительно активного контроля (с H₂O₂); [#] $p < 0.05$ относительно пассивного контроля (без H₂O₂).

Полученные результаты свидетельствуют о ключевой роли бокового радикала лизина у ГСБ-106 в проявлении его нейропротективной активности. *L*-Конфигурация необходима как для остатка лизина, так и для остатка серина. В отсутствие бокового радикала серина конфигурация лизина остается критичной, так как миметик ГТ-107D был неактивен. Результаты исследований указывают на малое влияние сукцинильного радикала (биоизоостера остатка аспарагиновой кислоты) в структуре ГСБ-106 на его нейропротективную активность (таблица 6).

2.3 Изучение связи структуры и антидепрессивной активности аналогов ГСБ-106

Антидепрессивные свойства изучались¹ только для тех аналогов ГСБ-106, для которых была выявлена нейропротекторная активность (миметики ГТ-107 и ГТ-106Ac) (рисунок 9). Это связано с тем, что антидепрессивные свойства BDNF тесно связаны с его нейропротекторной активностью (*Neto F.L. et al. // Curr Neuropharmacol. 2011. V. 9. P. 530–552*).

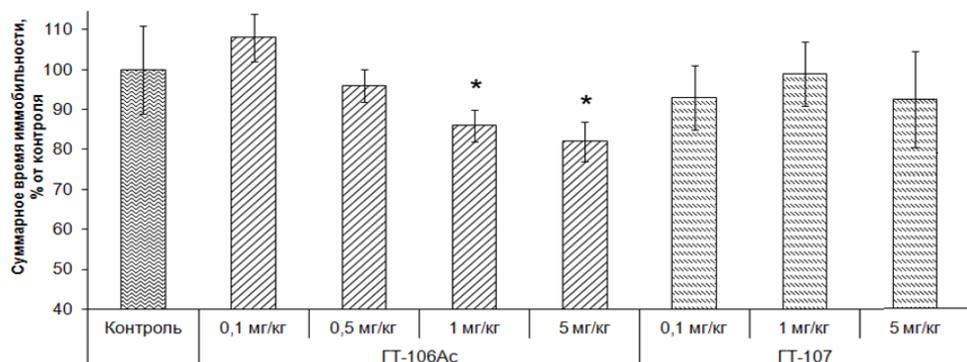


Рисунок 9 - Антидепрессивная активность димерных дипептидов ГТ-106Ac и ГТ-107 в тесте «вынужденное плавание» по Порсолту

Примечание: * $p < 0.05$ относительно контроля по точному критерию Фишера.

Как видно из рисунка 9, антидепрессивной активностью обладал только ГТ-106Ac (замена Suc→Ac), проявляя в тесте вынужденного плавания статистически достоверный антидепрессивный эффект в дозах 1 и 5 мг/кг внутривнутрибрюшинно. Уменьшение времени иммобильности мышей составляло 14% и 17% от времени иммобильности мышей из контрольной группы соответственно. Однако ГТ-106Ac был на порядок менее активен, чем ГСБ-106 (таблица 5). Глицинсодержащий аналог ГТ-107, обладающий нейропротекторной активностью, антидепрессивной активности не проявлял (рисунок 9).

¹ проводилось совместно с к.б.н., с.н.с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств П.Ю. Поварниной.

Таким образом, для антидепрессивной активности димерных миметиков BDNF необходима дипептидная последовательность, совпадающая с центральным фрагментом бета-изгиба 4-й петли (рисунок 10). Для проявления более выраженной активности необходима и боковая цепь а.к.о., предшествующего центральному фрагменту бета-изгиба, и дипептид ГСБ-106 сохраняет за собой положение лидерного соединения.

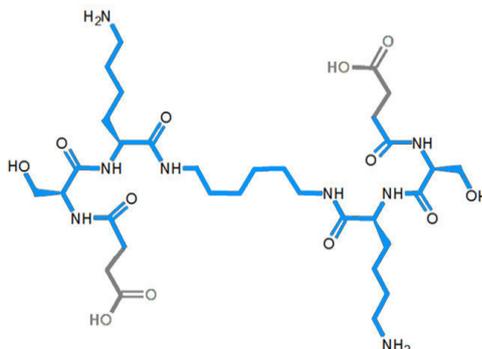


Рисунок 10 – Минимальный фрагмент, необходимый для антидепрессивной активности миметика BDNF (выделен синим цветом). Асимметрические атомы углерода остатков лизина и серина имеют (*S*) – конфигурацию

3. Выбор схемы синтеза и разработка фармакопейной статьи на субстанцию ГСБ-106 - потенциального антидепрессанта

3.1 Выбор схемы синтеза ГСБ-106

Важным этапом развития фармакологически активного соединения в качестве потенциального лекарственного средства является разработка лабораторного регламента его получения. Для этого необходимо было выбрать оптимальный метод синтеза ГСБ-106. Синтез ГСБ-106 был проведен 4-мя способами (рисунки 11 и 12, таблица 7):

Таблица 7 – Методы синтеза ГСБ-106

СПОСОБ/МЕТОД	СТРАТЕГИЯ ЗАЩИТНЫХ ГРУПП	МЕТОД КОНДЕНСАЦИИ ОСТАТКОВ LYS / SER
I	Boc/Z(Bzl)-	-OSu / -OSu
II		-OPFP / -OPFP
III	Z/Boc-, OH-ГРУППА SER	-OSu / -N ₃
IV	СВОБОДНА	-OSu / -OPFP

Синтез методами I и II (рисунок 11) включает 8 стадий: 1) и 2) получение активированных эфиров защищенных лизина и серина; 3) конденсация активированного эфира лизина с гексаметилендиамином; 4) удаление Boc-защитной группы; 5) конденсация полученного деблокированного продукта с активированным эфиром серина; 6) второй ацидолиз (Boc-деблокирование); 7) ацилирование янтарным ангидридом; 8) удаление защитных групп с боковых функциональных групп серина и лизина каталитическим гидрогенолизом.

Синтез методом III (рисунок 12) включает 10 стадий: 1) получение гидразида Z-серина; 2) получение азиды Z-серина; 3) получение Z-Lys(Boc)-OSu; 4) его конденсация с гексаметилендиамином; 5) удаление Z-группы с остатка лизина каталитическим гидрогенолизом; 6) конденсация бис-лизина с азидом Z-серина; 7) второй гидрогенолиз,

удаление Z- группы с остатка серина; 8) ацилирование янтарным ангидридом; 9) удаление Boc-групп с N^ε-групп лизина; 10) перевод соединения в бессолеую форму.

Синтез методом IV (рисунок 12) также как и метод III включает 10 стадий, однако есть отличия на стадиях 1, 2 и 6: 1) получение Z-защищенного серина; 2) получение пентафторфенилового эфира Z-защищенного серина; 6) его конденсация с бис-лизинном с образованием димерного дипептида.

Метод I

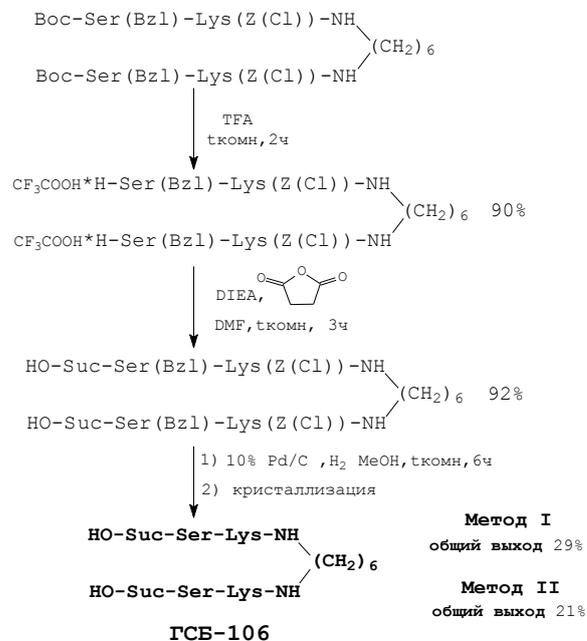
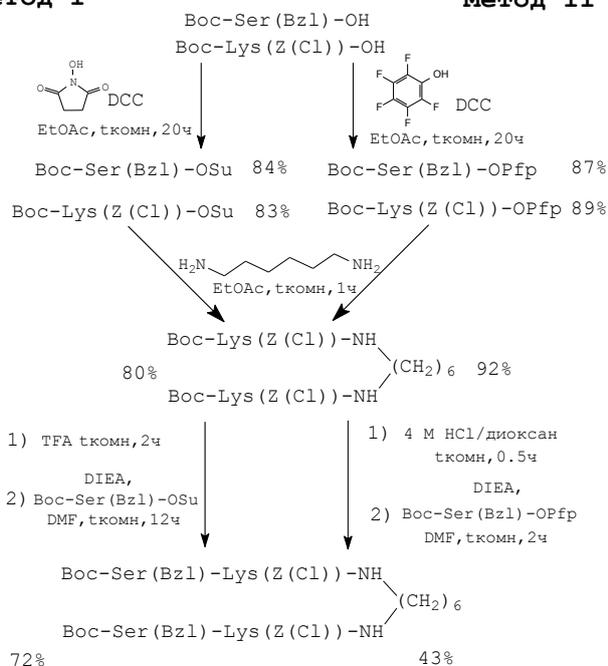


Рисунок 11 – Схема синтеза ГСБ-106 по Boc/Z-стратегии методом N-оксисукцинимидных эфиров (метод I) и пентафторфениловых эфиров (метод II)

Общий выход по методу I составил 21%, по методу II – 29% в расчете на защищенный лизин после очистки ГСБ-106 кристаллизацией. К преимуществам синтеза способами I и II относится использование гидрогенолиза на финальной стадии, что позволяет получать ГСБ-106 сразу в виде основания без использования ионообменных смол.

Синтез азидным методом (способ III) (рисунок 12), позволяет использовать серин, не защищенный по боковой OH-группе. Это важно, т.к. введение защиты в боковую группу серина является трудоемкой операцией, что приводит к значительному росту стоимости синтеза ГСБ-106. На завершающей стадии синтеза методом III трифторацетат ГСБ-106 переводили в свободное основание с помощью анионообменной смолой Amberlite IRA-410 в OH-форме, затем очищали на катионообменной смоле в градиенте пиридин-ацетатного буфера с последующей лиофилизацией. Общий выход синтеза этим методом составил 44%.

В синтезе способом IV трудномасштабируемый азидный метод заменен на метод активированных пентафторфениловых эфиров. Известно, что для свободного по гидроксильной группе Z-Ser-OH проблемным является получение его N-оксисукцинимидного эфира, выход реакции составляет ~20%, в то время как Z-Ser-OPfp удается получить с выходом ~90%. Поэтому для введения в структуру остатка серина был

выбран метод пентафторфениловых эфиров. Общий выход ГСБ-106 по методу IV составляет 62%.

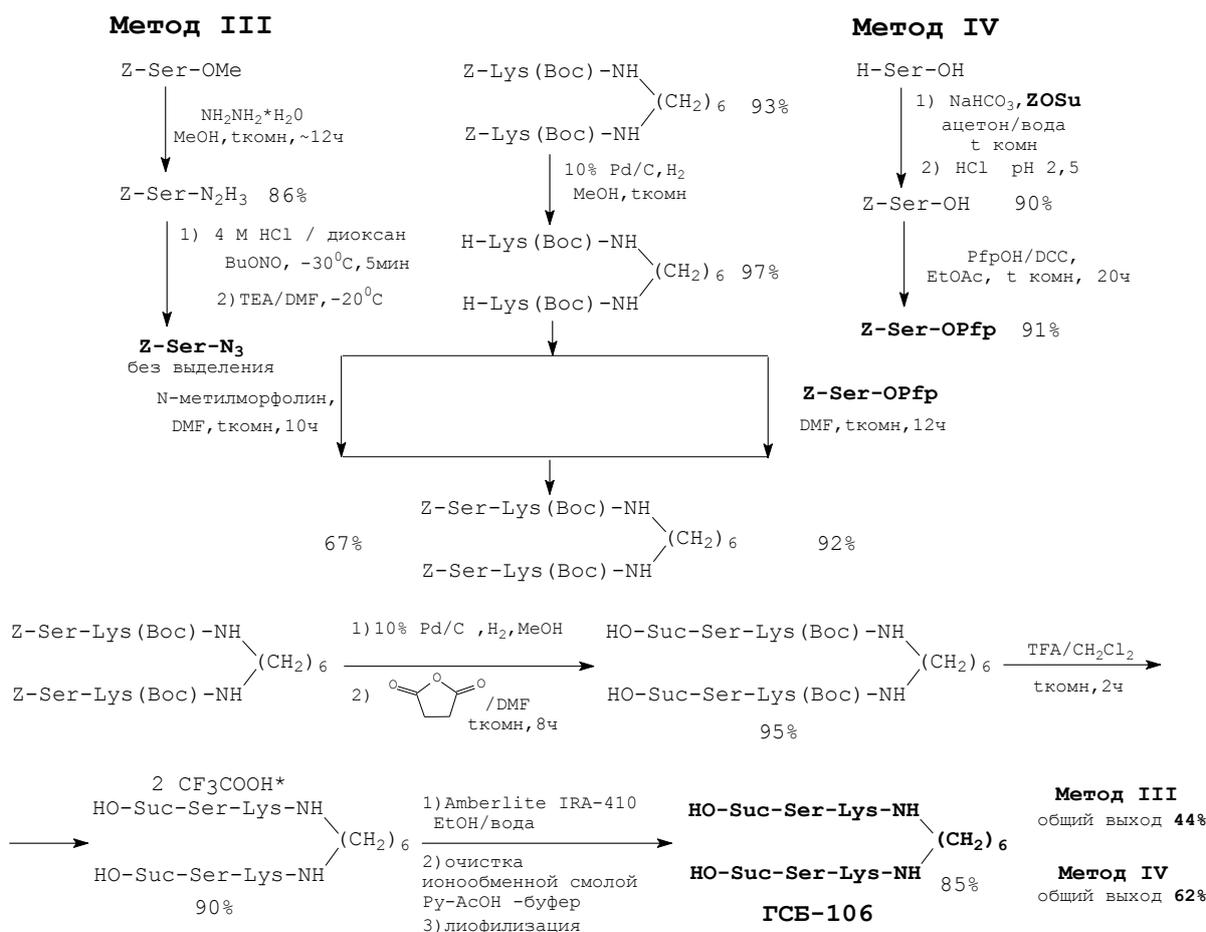


Рисунок 12 – Схема синтеза ГСБ-106 по Z/Boc-стратегии методами III и IV

Расчёт стоимости синтеза ГСБ-106 с учётом актуальной стоимости реагентов и растворителей показал, что метод IV является оптимальным из рассмотренных (дешевле метода I в два раза), таким образом, для синтеза ГСБ-106 был выбран этот способ, на основе которого затем был разработан лабораторный регламент получения ФС ГСБ-106.

3.2 Разработка фармакопейной статьи на субстанцию ГСБ-106

При разработке ФСП на трех опытных образцах субстанции пептида ГСБ-106 изучены физико-химические свойства: растворимость, температура плавления, удельный угол оптического вращения, показатель pH раствора субстанции. Определены основные фармакопейные показатели качества в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ XIII издания. Получены и охарактеризованы ИК- и ЯМР- спектры образцов субстанции. Разработана методика определения посторонних примесей в субстанции методами ТСХ и ВЭЖХ. Разработана методика количественного определения содержания ГСБ-106 в субстанции, включающая ВЭЖХ, метод Къельдаля (определение общего азота), метод Фишера (определение содержания воды) и газо-жидкостную хроматографию (определение остаточных растворителей).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сконструированы мономерные (ГСБ-207, ГСБ-104) и гомодимерные (ГСБ-214, ГТС-201, ГСБ-106) *N*-ацилдипептидные миметики 1, 2 и 4-й петель мозгового нейротрофического фактора, состоящие из центрального дипептидного фрагмента бета-изгиба соответствующей петли, биоизостера предшествующего а.к.о. и *C*-концевой амидной группы или *C*-концевого метилендиаминового спейсера. Соединения были синтезированы методами классического пептидного синтеза в растворе и очищены хроматографическими методами. Изучение фармакологической активности *in vitro* показало, что все димерные миметики обладают агонистической нейропротекторной, а мономерные были неактивны (ГСБ-207) или обладали антагонистической нейродегенеративной активностью (ГСБ-104). Миметик 4-й петли, гексаметилендиамид *бис*-(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина) (ГСБ-106), кроме того, проявлял антидепрессивную активность. Для выяснения влияния на фармакологическую активность природы боковых радикалов и конфигурации а.к.о. ГСБ-106 были синтезированы и изучены его глициновые аналоги (ГТ-105, ГТ-107, ГТ-106Ас) и диастереомеры (ГТ-106DL и ГТ-106 LD). Показано, что нейропротекторная активность стереоспецифична по обоим а.к.о. и не зависит от природы боковой группы остатков серина и биоизостера Asp (моносукцинила). В то же время, для антидепрессивной активности необходимы боковые группы обоих а.к.о. (*L*-лизин и *L*-серин), а *N*-сукцинильный заместитель может быть заменен на *N*-ацетил, но с уменьшением активности. ГСБ-106 был выбран в качестве соединения-лидера для дальнейшего развития в качестве перспективного антидепрессанта. Для ГСБ-106 была разработана методика синтеза и фармакопейная статья предприятия. К настоящему времени ГСБ-106 успешно прошел полный цикл доклинических исследований.

ВЫВОДЫ

1. Сконструирован и синтезирован классическими методами пептидного синтеза в растворе ряд мономерных и гомодимерных *N*-ацилдипептидных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF.
2. Показано, что димерные миметики, подобно полноразмерному белку BDNF, обладают нейропротекторной активностью *in vitro* в условиях окислительного стресса в концентрациях 10^{-5} - 10^{-9} М. Мономерные миметики в этих условиях неактивны или обладают обратным, нейродегенеративным эффектом.
3. Найдено, что в ряду синтезированных дипептидных миметиков BDNF с нейропротекторной активностью только димерный миметик 4-й петли гексаметилендиамид *бис*-(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина) (ГСБ-106) обладает свойственной BDNF антидепрессивной активностью.
4. Синтезированы *L,D*- и *D,L*-диастереомеры и три глициновых аналога ГСБ-106. При изучении связи структуры и нейропротекторной активности показано, что нейропротекторная активность дипептида ГСБ-106 стереоспецифична: активностью обладает только *L,L*-диастереомер; *L,D*- и *D,L*-диастереомеры неактивны.

5. Показано, что минимальным фармакофором 4-й петли BDNF по нейропротекции является фрагмент Ac-Gly-L-Lys-, а минимальным фармакофором по антидепрессивной активности - фрагмент Ac-L-Ser-L-Lys-, оба в димерных структурах.
6. Дипептид ГСБ-106 отобран для дальнейшего развития в качестве перспективного лекарственного препарата с антидепрессивной и нейропротекторной активностью.
7. Разработаны технология синтеза и методы контроля качества субстанции ГСБ-106.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Рекомендуется расширенное изучение фармакологических эффектов гомодимерных дипептидных миметиков отдельных петель BDNF соединений ГСБ-214, ГТС-201 и ГСБ-106 как потенциальных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и амиотрофический латеральный склероз.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК

1. Гудашева, Т.А. Дизайн и синтез дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора [Текст] / Т.А. Гудашева, **А.В. Тарасюк**, С.В. Помогайбо, И.О. Логвинов, П.Ю. Поварнина, Т.А. Антипова // Биоорганическая химия. – 2012. – Т. 38, №3. – С. 280-290.
2. Логвинов, И.О. Нейропротективные свойства дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 в экспериментах *in vitro* [Текст] / И.О. Логвинов, Т.А. Антипова, Т.А. Гудашева, **А.В. Тарасюк**, П.И. Антипов, С.Б. Середенин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 155, №3. – С. 319-322.
3. **Тарасюк, А.В.** Синтез димерного дипептидного миметика BDNF ГСБ-106, потенциального нейропротективного препарата [Текст] / **А.В. Тарасюк**, С.В. Помогайбо, Д.В. Курилов, Т.А. Гудашева // Химико-фармацевтический журнал. – 2013. – Т. 47, № 1. – С. 21-28.
4. **Тарасюк, А.В.** Анализ зависимости структура-активность в ряду аналогов ГСБ-106-дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора [Текст] / **А.В. Тарасюк**, Т.А. Гудашева, Н.М. Сазонова, П.И. Антипов, Д.В. Курилов, П.Ю. Поварнина, И.О. Логвинов, Т.А. Антипова // Биоорганическая химия. – 2014. – Т. 40, №2. – С. 142-156.
5. Гудашева, Т.А. Новый дипептидный миметик мозгового нейротрофического фактора селективно активирует сигнальный путь MAPK-Erk [Текст] / Т.А. Гудашева, **А.В. Тарасюк**, Н.М. Сазонова, П.Ю. Поварнина, Т.А. Антипова, С.Б. Середенин // Доклады Академии наук. – 2017. – Т. 476, № 1. – С. 108-112.
6. Сазонова, Н.М. Синтез и биологические свойства нового дипептидного миметика 2-й петли мозгового нейротрофического фактора [Текст] / Н.М. Сазонова, **А.В. Тарасюк**, А.Н. Шумский, П.Ю. Поварнина, С.В. Круглов, Т.А. Антипова, Т.А. Гудашева, С.Б. Середенин // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52, № 9. – С. 14-21.
7. Gudasheva, T.A. The Low Molecular Weight Brain-derived Neurotrophic Factor Mimetics with Antidepressant-like Activity [Text] / T.A. Gudasheva, P. Povarnina, **A.V. Tarasiuk**, S.B. Seredenin. // Current Pharmaceutical Design. – 2019. – V. 25. – P. 729-737.

8. **Тарасюк, А.В.** Физико-химические свойства и разработка методик анализа субстанции оригинального антидепрессанта ГСБ-106 [Текст] / **А.В. Тарасюк**, Н.М. Сазонова, А.Н. Шумский, А.Л. Некрашевич, П.И. Антипов, Л.М. Гаевая, Л.Н. Грушевская, С.В. Минаев // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. – Т. 53, № 1. – С. 41-47.
9. Гудашева, Т.А. Дипептидный миметик 4-й петли мозгового нейротрофического фактора обладает анальгетической активностью [Текст] / Т.А. Гудашева, М.А. Константинопольский, **А.В. Тарасюк**, Л.Г. Колик, С.Б. Середенин. // Доклады академии наук. Биохимия, биофизика, молекулярная биология. – 2019. – Т. 485, № 3. – С. 366-369.
10. Gudasheva, T.A. Low-molecular mimetics of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor: Design and pharmacological properties [Text] / T.A. Gudasheva, P.Y. Povarnina, **A.V. Tarasiuk**, S.B. Seredenin // Medicinal Research Reviews. – 2021. – V. 41(5). – P. 2746-2774. DOI: 10.1002/med.21721. (IF=12.94, Q1 WoS, Q1 Scopus).
11. **Тарасюк, А.В.** Дипептидные миметики NGF и BDNF: дизайн и фармакологические свойства [Текст] / **А.В. Тарасюк**, Т.А. Антипова, П.Ю. Поварнина, Т.А. Гудашева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2021. – Т. 84, № 2. – С. 59-67.
12. Mezhlumyan, A.G. Antidepressant-like Effects of BDNF and NGF Individual Loop Dipeptide Mimetics Depend on the Signal Transmission Patterns Associated with Trk [Text] / A.G. Mezhlumyan, A.V. Talleroва, P.Y. Povarnina, **A.V. Tarasiuk**, N.M. Sazonova, T.A. Gudasheva, S.B. Seredenin // Pharmaceuticals. – 2022. – V. 15(3). – P. 284. DOI: 10.3390/ph15030284. (IF=5.86, Q1 WoS, Q1 Scopus).

Статьи в журналах

1. Гудашева, Т.А. Мозговой нейротрофический фактор и его низкомолекулярные миметики [Текст] / Т.А. Гудашева, **А.В. Тарасюк**, П.Ю. Поварнина, С.Б. Середенин // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2017. – № 3. – С. 3-13.
2. Логвинов, И.О. Сравнение нейропротекторных свойств дипептидных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель мозгового нейротрофического фактора на модели окислительного стресса in vitro [Текст] / И.О. Логвинов, **А.В. Тарасюк**, Н.М. Сазонова, П.И. Антипов, Т.А. Антипова, Т.А. Гудашева // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2018. – № 3. – С. 37-41.

Патенты

1. Пат. 2559880 Российская Федерация, МПК C07K 5/062, A61K 38/05, A61P 25/28. Замещенный бисдипептид с нейропротективным и антидепрессивным эффектом [Текст] / С.Б. Середенин, Т.А. Гудашева, **А.В. Тарасюк**, Н.М. Сазонова, Т.А. Антипова, И.О. Логвинов, П.Ю. Поварнина, Т.А. Воронина; заявитель и патентообладатель ФГБНУ "Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова". – № 2014124855, заявл. 18.06.2014; опубликов. 20.08.2015, Бюл. № 23.
2. Пат. 2693479 Российская Федерация, МПК A61K 38/05, A61P 3/10. Средство, обладающее антидиабетической активностью [Текст] / С.Б. Середенин, Р.У. Островская, Т.А. Гудашева, С.С. Ягубова, **А.В. Тарасюк**; заявитель и патентообладатель ФГБНУ "Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова". – № 2017140147, заявл. 20.11.2017; опубликов. 20.05.2019, Бюл. № 14.

Тезисы докладов на конференциях

1. **Тарасюк, А.В.** Дизайн и синтез дипептидных миметиков 4-й петли нейротрофина BDNF [Текст] / **А.В. Тарасюк**, И.О. Логвинов, Т.А. Антипова, Т.А. Гудашева // *Материалы 5-ой Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам»*. Москва. 2010. – С. 85.
2. **Tarasiuk, A.V.** A novel active small mimetic of brain-derived neurotrophic factor: bis-(N-monosuccinyl-seryl-lysine) hexamethylenediamide [Text] / **A.V. Tarasiuk**, I.O. Logvinov, P.Y. Povarnina, T.A. Antipova, T.A. Gudasheva // *«The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology»*. – 2011. – V. 21, Supp. 2. – P. 174.
3. **Тарасюк, А.В.** Синтезирован димерный дипептидный миметик 1-й петли нейротрофина BDNF, обладающий нейропротективной и лишенный антидепрессивной активности [Текст] / **А.В. Тарасюк**, П.Ю. Поварнина, И.О. Логвинов // *Материалы IV Съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии»*. Казань. 2012. – С. 178.
4. **Тарасюк, А.В.** Структурно-функциональные отношения в ряду аналогов дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 [Текст] / **А.В. Тарасюк**, И.О. Логвинов, Т.А. Антипова, Т.А. Гудашева // *VI Российский симпозиум «Белки и пептиды»: Материалы симпозиума*. Уфа: ИСЭИ УНЦ РАН. 2013. – С. 159.
5. **Тарасюк, А.В.** Дизайн димерного дипептидного миметика 4-й петли нейротрофина BDNF и изучение связи структура-активность в ряду его аналогов. [Текст] / **А.В. Тарасюк**, Т.А. Гудашева, Т.А. Антипова, С.Б. Середенин // *Материалы 2-й Международной научной конференции молодых ученых, посвященной 91-летию Национального лидера Азербайджана Гейдара Алиева*. Баку, Азербайджан. 2014. – С.7.
6. **Тарасюк, А.В.** Дизайн и исследование нейропротективной и антидепрессивной активности димерных дипептидных миметиков 1-й и 4-й петель мозгового нейротрофического фактора [Текст] / **А.В. Тарасюк**, Н.М. Сазонова, И.О. Логвинов, П.Ю. Поварнина, Т.А. Антипова, Т.А. Гудашева, С.Б. Середенин // *Материалы VII Российского симпозиума «Белки и пептиды»*. Новосибирск. 2015. – С. 315.
7. **Тарасюк, А.В.** Новый миметик 4-й петли BDNF: синтез и фармакологическая активность [Текст] / **А.В. Тарасюк**, Н.М. Сазонова, А.Г. Ребеко, И.О. Логвинов, П.Ю. Поварнина, П.И. Антипов, Т.А. Антипова, Т.А. Гудашева, С.Б. Середенин // *Материалы 6-ой Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам»*. Моск. Обл. 2015. – С. 58.
8. **Tarasiuk, A.** Structure-activity study in a series of analogues of dipeptide of brain derived neurotrophic factor [Text] / **A. Tarasiuk**, T. Gudasheva, I. Logvinov, P.Povarnina, T. Antipova, S. Seredenin // *Book of abstracts of “EFMC International Symposium on Medicinal chemistry”*. 2016. – P. 122.
9. **Тарасюк, А.В.** Синтез дипептидного миметика 2-й петли мозгового нейротрофического фактора и изучение его антидепрессивной активности [Текст] / **А.В. Тарасюк**, Н.М. Сазонова, П.Ю. Поварнина, Т.А. Гудашева // *Материалы V съезда фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств»*. Ярославль. 2018. – С. 241.