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

на правах рукописи

Spinens

### ТАРАСЮК АЛЕКСЕЙ ВАЛЕРЬЕВИЧ

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

1.4.9 — Биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

> Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН Гудашева Татьяна Александровна

Москва – 2022

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
1. ВВЕДЕНИЕ	7
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
2.1 Мозговой нейротрофический фактор и его физиологические функции	13
2.2 Роль BDNF в патогенезе неврологических заболеваний	14
2.3 Вовлеченность BDNF в патогенез психических заболеваний	16
2.3.1 BDNF в патофизиологии депрессии	16
2.3.2 BDNF в патогенезе других психических заболеваний	18
2.4 Структура BDNF	18
2.5 Рецепторы BDNF и их сигнальные пути	20
2.5.1 Нейротрофиновые тирозинкиназные рецепторы	20
2.5.2 Взаимодействие BDNF с TrkB рецептором	25
2.5.3 Рецепторы р75	30
2.6 Нейротрофин BDNF в клинических исследованиях	36
2.7 Низкомолекулярные миметики BDNF	36
2.7.1 Циклические пептидные миметики 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF	37
2.7.2 Непептидные аналоги 2-й петли BDNF	43
2.7.3 Линейные тетрапептидные миметики BDNF	46
2.7.4 Пептидные миметики, содержащие последовательности 3-й и 4-й петель BDNF	47
2.7.5 Пептидные агонисты и антагонисты TrkB на основе <i>N</i> -концевых участков	
BDNF и NT-4	49
2.7.6 Ди- и тригидроксифлавоны - агонисты TrkB рецептора	51
2.7.7 Дезоксигедунин - агонист TrkB рецептора	54
2.8 Заключение	59
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	60
3.1 Дизайн и синтез дипептидных миметиков нейротрофина BDNF	60
3.1.1 Дизайн	60
3.1.2 Синтез	66
3.1.2.1 Синтез дипептидных миметиков 1-й петли BDNF	66
3.1.2.2 Синтез димерного дипептидного миметика 2-й петли BDNF	68
3.1.2.3 Синтез дипептидных миметиков 4-й петли BDNF	70
3.2 Выявление нейропротекторной активности <i>in vitro</i> дипептидных миметиков	
BDNF	76
3.3 Выявление антидепрессивной активности димерных дипептидных миметиков	

BDNF	78
3.4 Синтез диастереомеров и глициновых аналогов ГСБ-106 и изучение связи	
«структура-активность» в их ряду	80
3.4.1 Синтез диастереомеров и глициновых аналогов ГСБ-106	80
3.4.2 Изучение нейропротекторной активности и структуры аналогов ГСБ-106	91
3.4.3 Изучение связи структуры и антидепрессивной активности в ряду аналогов	
ГСБ-106	92
3.5 Выбор оптимальной схемы синтеза ГСБ-106	95
3.6 Разработка фармакопейной статьи предприятия на ФС ГСБ-106	104
3.6.1 Определение посторонних примесей в ФС ГСБ-106 методом ТСХ	107
3.6.2 Определение посторонних примесей в ФС ГСБ-106 методом ОФ ВЭЖХ	111
3.6.3 Определение остаточных органических растворителей в ФС ГСБ-106	112
3.6.4 Количественное определение содержания ГСБ-106 в ФС	113
4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	115
4.1 Материалы и методы	115
4.1.1 Исходные вещества и вспомогательные реагенты	115
4.1.2 Аналитические методы	115
4.2 Синтез	118
4.2.1 Синтез миметиков 1-й петли BDNF	118
4.2.1.1 Синтез амида <i>N</i> -моносукцинил- <i>L</i> -метионил- <i>L</i> -серина, ГСБ-207	118
4.2.1.2 Синтез гептаметилендиамида бис-( <i>N</i> -моносукцинил- <i>L</i> -метионил- <i>L</i> -серина),	
ГСБ-214	119
4.2.2 Синтез миметика 2-й петли BDNF гексаметилендиамида бис-( <i>N</i> -гексаноил- <i>L</i> -	
серил-L-лизина), ГТС-201	121
4.2.3 Синтез миметиков 4-й петли BDNF	127
4.2.3.1 Синтез амида <i>N</i> -моносукцинил- <i>L</i> -серил- <i>L</i> -лизина ГСБ-104	127
4.2.3.2 Синтез гексаметилендиамида бис-( <i>N</i> -моносукцинил- <i>L</i> -серил- <i>L</i> -лизина),	
ГСБ-106	129
4.2.4 Синтез аналогов дипептида ГСБ-106	132
4.2.4.1 Синтез гексаметилендиамида бис-( <i>N</i> -моносукцинил- <i>L</i> -серил- <i>D</i> -лизина),	
ГТ-106LD	132
4.2.4.2 Синтез гексаметилендиамида бис-(N-моносукцинил-D-серил-L-лизина),	
ГТ-106DL	134
4.2.4.3 Синтез гексаметилендиамида бис-( <i>N</i> -ацетил- <i>L</i> -серил- <i>L</i> -лизина), ГТ-106Ас	135
4.2.4.4 Синтез гексаметилендиамида бис-( <i>N</i> -моносукцинил- <i>L</i> -серил-глицина),	

<b>ΓΤ-105</b>	139
4.2.4.5 Синтез гексаметилендиамида бис-( <i>N</i> -моносукцинил-глицил- <i>L</i> -лизина) (ГТ	-107)
и его энантиомера ГТ-107Д	141
4.2.5 Разработка метода синтеза ГСБ-106	145
4.2.5.1 Синтез ГСБ-106 с использованием Вос/Z-стратегии	145
4.2.5.2 Синтез ГСБ-106 с использованием Z/Вос–стратегии	146
4.3 Разработка фармакопейной статьи предприятия на ФС ГСБ-106	149
4.3.1 Определение посторонних примесей в ФС ГСБ-106 методом ТСХ	149
4.3.2 Определение посторонних примесей в ФС ГСБ-106 методом ОФ ВЭЖХ	149
4.3.3 Определение остаточных органических растворителей в ФС ГСБ-106	150
4.3.4 Количественное определение содержания ГСБ-106 в ФС	151
4.4 Изучение фармакологической активности миметиков BDNF	151
4.4.1 Изучение нейропротекторной активности <i>in vitro</i>	151
4.4.2 Изучение антидепрессивной активности <i>in vivo</i>	
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	153
5.1 Заключение	153
5.2 Практические рекомендации	153
6. ВЫВОДЫ	154
7. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	155
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	159
9. БЛАГОДАРНОСТИ	

# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В/б	<ul> <li>внутрибрюшинный способ введения препаратов</li> </ul>
BO3	- всемирная организация здравоохранения (WHO)
ВЭЖХ/МС	- высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-
	спектрометрией
ГЭБ	- гемато-энцефалический барьер
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ИК	- инфракрасный спектр
КССВ	- константа спин-спинового взаимодействия
мРНК	- матричная рибонуклеиновая кислота
ОФ ВЭЖХ	- обращённо-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
ΤΓΦ	- тетрагидрофуран
TCX	- тонкослойная хроматография
УΦ	- ультрафиолетовый
ΦC	<ul> <li>фармацевтическая субстанция</li> </ul>
ΦСΠ	- фармакопейная статья предприятия
ЯМР	- ядерный магнитный резонанс
AKT	- (threonine-protein kinase) серин-треониновая протеинкиназа
BDNF	- (brain derived neurotrophic factor) мозговой нейротрофический фактор
Boc	- <i>трет</i> -бутилоксикарбонил
Bzl	- бензил
COSY	- двухмерная корреляционная ядерная магнитно-резонансная спектроскопия
CRD	- цистеин-обогащенный домен
DAG	- диацилглицерин
DCC	- <i>N</i> , <i>N</i> '-дициклогексилкарбодиимид
DCHA	- <i>N</i> , <i>N</i> -дициклогексиламин
DCU	- <i>N</i> , <i>N</i> '-дициклогексилмочевина
DD	- домен смерти рецептора Р75
DHF	- дигидроксифлавон
DMAPA	- <i>N</i> , <i>N</i> -диметиламинопропилендиамин
DMF	- <i>N</i> , <i>N</i> '-диметилформамид
DMSO-d <sub>6</sub>	- дейтерированный диметилсульфоксид
DIEA	- <i>N</i> , <i>N</i> - диизопропилэтиламин
DRG	- (dorsal root ganglia) спинальные ганглии
ECD	- (extracellular domain) внеклеточный домен

ERK	- (extracellular signal-regulated kinase) экстраклеточная сигнал-
	регулируемая киназа
ESI–MS	- метод электро-спрей ионизации в масс-спектрометрии
HMBC	- СН-корреляция по дальним константам в спектроскопии ЯМР
HSQC	- гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия ЯМР
Ig	- иммуноглобулин
IP3	- инозитол-1,4,5-трифосфат
JNK	- (c-Jun N-terminal kinase) N-терминальная киназа c-Jun
LTP	- (long-term potentiation) долговременная потенциация
NMDA	- ионотропный рецептор глутамата, связывающий <i>N</i> -метил- <i>D</i> -аспартат
МАРК	- (mitogen-activated protein kinase) митоген-активируемая протеинкиназа
MTT	- бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5 дифенилтетразолия
m/z	- отношение массы к заряду в масс-спектрометрии
NF-kB	- (nuclear factor-kappa b) ядерный фактор каппа b
NGF	- (nerve growth factor) фактор роста нервов
NMM	- <i>N</i> -метилморфолин
NT-3	- (neurotrophin-3) нейротрофин-3
NT-4	- (neurotrophin-4) нейротрофин-4
ONp	- <i>n</i> -нитрофениловый эфир
OSu	- <i>N</i> -оксисукцинимидный эфир
OPfp	- пентафторфениловый эфир
PDB	- (protein data bank) банк данных трёхмерных структур белков и нуклеиновых
	кислот
Pd/C	- палладий, нанесенный на поверхность активированного угля
PI3K	- (phosphatidylinositol-3-kinase) фосфатидилинозитол 3 киназа
PLCγ	- (phospholipase C- ү) фосфолипаза С гамма
TEA	- триэтиламин
TFA	- трифторуксусная кислота
THF	- тригидроксифлавон
TMD	- трансмембранный домен
TrkA	- (tropomyosin-related kinase A) тирозинкиназные рецепторы типа A
TrkB	- (tropomyosin-related kinase B) тирозинкиназные рецепторы типа B
TrkC	- (tropomyosin-related kinase C) тирозинкиназные рецепторы типа C
Z	- бензилоксикарбонил
Z(Cl)	- 2-хлорбензилоксикарбонил

### 1. ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность**. Мозговой нейротрофический фактор (BDNF) относится к семейству нейротрофинов, которое кроме него включает фактор роста нервов (NGF), нейротрофин-3 и нейротрофин-4/5. Подобно другим нейротрофинам, BDNF образуется из неактивного предшественника и представляет собой негликозилированный белок гомодимерной структуры, состоящий из 119 аминокислотных остатков (а.к.о.) [183].

BDNF осуществляет свои основные эффекты через специфический тирозинкиназный рецептор TrkB, связывание с которым приводит к гомодимеризации рецептора, его самофосфорилированию и запуску нисходящих сигнальных путей MAPK/ERK, PI3K/AKT и PLCγ1. Путь, опосредованный MAPK, отвечает за нейропротекцию, дифференцировку и пролиферацию клеток [237]. Путь AKT в основном связан с нейропротекцией за счет стимуляции экспрессии антиапоптотических и ингибирования проапоптотических белков [195]. Каскад PLCγ1 модулирует синаптическую пластичность и критически важен для индукции долговременной потенциации и особенно её ранней фазы [137].

Благодаря своей способности увеличивать выживаемость нейронов, нейротрофины рассматриваются перспективные нейропротекторные средства. BDNF особенно как привлекателен в этом отношении, так как он улучшает выживание и предупреждает дегенерацию разных типов нейронов, вовлеченную в такие заболевания, как боковой амиотрофический склероз (мотонейроны), сенсорные нейропатии (сенсорные нейроны), болезнь Альцгеймера (базальные холинергичекие нейроны переднего мозга), болезнь Паркинсона (дофаминергические нейроны черной субстанции). Кроме того, показано, что BDNF играет важную роль в депрессии [190, 240]. Эти заболевания являются серьезной медицинской и социально-экономической проблемой. Так, по оценкам ВОЗ, депрессией страдают около 280 миллионов людей по всему миру (Depression - WHO | World Health online: Organization. Available https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression). Неутешительные эпидемиологические данные вместе с отсутствием фармакологических современным требованиям эффективности и безопасности, препаратов, отвечающих определяют актуальность поиска новых патогенетически обоснованных терапевтических средств.

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 [61], 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 [136] путем имплантации фрагментов BDNF в структуру NGF был выявлен участок 2-й петли, -Ser<sup>45</sup>-Lys<sup>46</sup>-Gly<sup>47</sup>-Gln<sup>48</sup>- Leu<sup>49</sup>-, вовлеченный в специфичное взаимодействие BDNF с TrkB. Эта структура была использована в качестве фармакофора, с помощью 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 соединений 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 [40] получила 5 терапевтически перспективных амидов *N*ацетилтетрапептидов: B1 (Ac-RRGF-CONH<sub>2</sub>), B2 (Ac-IDKR-CONH<sub>2</sub>), B3 (Ac-SKKR-CONH<sub>2</sub>), B4 (Ac-DKRH-CONH<sub>2</sub>) и B5 (IKRG-CONH<sub>2</sub>), соответствующих последовательностям 6-9, 71-74, 94-97, 72-75, 115-118 BDNF человека. Пептидные последовательности были выявлены как эпитопы моноклональных антител к 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, поскольку имеют меньший молекулярный вес, могут легче проникать через биологические барьеры и более перспективны, чем описанные ниже непептидные миметики Лонго, так как метаболизируются до природных аминокислот.

Группа американских ученых из медицинской школы университета Эмори [100] 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<sub>d</sub> ~ 15.4 нМ [129]. В экспериментах *in vivo* 7,8-DHF продемонстрировал положительные эффекты на моделях болезней Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона [68, 234], бокового амиотрофического склероза, инсульта, синдром Ретта и депрессии [100]. 7,8-DHF как системно-активный миметик BDNF в настоящее время находится стадии расширенных фармакологических исследований в на качестве лекарственного средства с нейропротекторным и антидепрессивным потенциального эффектами.

Новый импульс низкомолекулярным миметикам нейротрофинов - агонистам Trkрецепторов был дан в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, где были впервые созданы дипептидные миметики NGF [3]. 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 [80]. 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.
- Выбор оптимальной схемы синтеза отобранного миметика для разработки лабораторного регламента.

7. Разработка фармакопейной статьи предприятия (ΦСП) 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, инсульты 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

10

нейротрофинов с помощью их низкомолекулярных миметиков», Государственного контракта от «29» августа 2016 г. №14.№8.12.0086 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:

- 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.
- 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.
- 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. Основные результаты диссертационной работы были представлены на 5-й и 6-й Международных конференциях «Биологические основы индивидуальной чувствительности и 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-, 92-, 93- и 94летию 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, индексируемых в РИНЦ, 2 патента РФ (рег. номера 2559880 и 2693479) и 9 тезисов в материалах российских и международных конференций.

### 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1 Мозговой нейротрофический фактор и его физиологические функции

Мозговой нейротрофический фактор (Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF) является членом семейства нейротрофинов, структурно гомологичных более чем на 50% полипептидных ростовых факторов, включающего в себя также фактор роста нервов (Nerve Growth Factor, NGF), нейротрофин-3 (Neurotrophin-3, NT-3) и нейротрофин-4 (Neurotrophin-4, NT-4). Первым был открыт и описан фактор роста нервов – NGF [123, 124]. BDNF был впервые описан в 1982 году [24] после выделения из экстракта головного мозга свиньи фактора, поддерживающего жизнеспособность нейронов, не чувствительных к действию NGF.

BDNF – белок с молекулярной массой 13.5 кДа, он состоит из 119 негликозилированных аминокислотных остатков и кодируется геном, который носит название *bdnf* B организме человека этот ген находится на 11-й хромосоме [27, 57]. BDNF играет важную роль в развитии нервной системы и поддержании ее нормального функционирования во взрослом организме.

*BDNF в развитии нервной системы*. Мэзонпьер с коллегами [132] охарактеризовали экспрессию гена *bdnf* в головном мозге в период пренатального развития у крыс и обнаружили, что она резко увеличивалась на 11-12 день эмбриогенеза, что совпадает с началом фазы активного нейрогенеза в периферической и центральной нервной системе [17, 29].

BDNF имеет решающее значение в постнатальной выживаемости, т.к. большинство гомозиготных мышей с дефектным геном *bdnf* умирают в течение 2 дней после рождения [59, 105]. У таких мышей выявляются нарушения развития сенсорных нейронов, а также мозжечка [105, 192]. Нокаутные по гену *bdnf* мыши имеют меньшие размеры, демонстрируют периоды гиперактивности и отсутствия активности, у них наблюдаются прогрессирующие со временем двигательные нарушения, характерные для дисфункции мозжечка, такие как вращение, атаксия, трудности с выпрямлением, сгорбленная поза, широкая постановка лап, хотя они способны выполнять такие сложные действия, как жевание и груминг [105, 192].

**BDNF и нейрогенез.** BDNF регулирует нейрогенез во взрослом мозге. Этот нейротрофин стимулирует пролиферацию нейрональных стволовых клеток в субгранулярной И субвентрикулярной нейрогенных зонах, дифференцировку и миграцию нейробластов, а также способствует их выживаемости [28, 47, 153]. Наиболее хорошо изучена роль BDNF в регуляции гиппокампального нейрогенеза, который лежит в основе поддержания как когнитивных функций, так и психоэмоционального статуса [142]. Введение BDNF в гиппокамп увеличивает число гранулярных нейронов в зубчатой извилине [188]. Показано, что BDNF стимулирует нейрогенез не только в основных нейрогенных зонах, но и в других областях мозга. Так, внутрижелудочковое введение BDNF приводило к образованию новых нейронов в полосатом теле, перегородке, таламусе, гипоталамусе [165].

**BDNF и синаптическая пластичность**. Надежно установлена значимость BDNF для долговременной потенциации (long-term potentiation, LTP), которая является важным компонентом синаптической пластичности [69, 75, 174]. LTP в гиппокампе нарушена у трансгенных мышей, лишенных гена *bdnf* [116], и восстанавливается при трансфекции в клетки гиппокампа этого гена [117]. Нарушение LTP наблюдается у крыс с дефицитом специфических рецепторов BDNF TrkB [222]. Введение BDNF в гиппокамп крысам с удаленными яичниками, у которых нарушение LTP обусловлено недостатком эстрогена, восстанавливает LTP [119]. Вовлеченность BDNF в LTP по крайней мере частично обусловлена стимуляцией экспрессии NMDA рецепторов. Известно, что NMDA рецепторы играют важную роль в LTP, стимулируя приток в клетку кальция, который связывается с кальций-зависимыми протеинкиназами и активирует ряд внутриклеточных механизмов, формирующих LTP. В исследовании на культурах клеток гиппокампа, Калдейра и коллеги [38] показали, что инкубация с BDNF приводила к увеличению содержания NR1, NR2A и NR2B субъединиц NMDA рецепторов, и это увеличение не наблюдалось в присутствии ингибиторов транскрипции и трансляции. В свою очередь, активация NMDA рецепторов стимулирует экспрессию BDNF [82].

*BDNF и когнитивные функции*. Участие BDNF в нейрогенезе и синаптической пластичности предполагает важность нейротрофина для таких когнитивных функций, как обучение и память. Показано, что содержание BDNF выше в дорсальном гиппокампе, который участвует в процессах памяти, чем в вентральном, вовлеченном в эмоциональное поведение [236]. У крыс в процессе обучения увеличивается содержание мPHK BDNF в гиппокампе, что сопряжено с увеличением активности NMDA рецепторов [109]. Введение BDNF в гиппокамп крысам ведет к улучшению пространственной памяти при тестировании в водном лабиринте Морриса [49]. С использованием трансгенных мышей было показано, что участие BDNF в процессах памяти опосредовано TrkB рецепторами и их сигнальными путями [16, 115].

**BDNF и психоэмоциональный статус**. Вовлеченность BDNF в пластичность мозга определяет его роль в поддержании психоэмоционального статуса [22]. В экспериментах и в клинике выявлена взаимосвязь между дефицитом BDNF и рядом психиатрических заболеваний. Так, с дефицитом BDNF ассоциированы тревожные расстройства, депрессия, биполярное расстройство, нарушения пищевого поведения и др. [76, 85, 134].

### 2.2 Роль BDNF в патогенезе неврологических заболеваний

Хорошо документирована связь нарушения BDNF сигналинга с развитием неврологических заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, боковой амиотрофический склероз и др. [143]. Посмертные исследования показали снижение содержания BDNF в коре и гиппокампе **при болезни Альцгеймера** [88], которое коррелирует с ухудшением когнитивных функций [166]. Показано, что BDNF защищает нейроны в условиях β-амилоидной токсичности как *in vitro*, так и *in vivo* [19]. Положительные эффекты BDNF были выявлены на животных моделях болезни Альцгеймера. Так, на экспериментальной модели болезни Альцгеймера (APP трансгенные мыши) генная BDNF-терапия улучшала когнитивные функции и предотвращала гибель клеток энторинальной коры, которая участвует в процессах памяти и подвергается нейродегенерации на ранних стадиях болезни Альцгеймера [148].

Болезнь Паркинсона ассоциирована со значительным снижением содержания BDNF и его мРНК в черной субстанции [91, 161]. Известно, что дофаминергические нейроны стриатума и черной субстанции, подвергающиеся гибели при болезни Паркинсона, зависят от трофической поддержки BDNF [93]. На различных *in vivo* моделях болезни Паркинсона было показано, что BDNF при центральном введении защищает от гибели дофаминергические нейроны, способствует росту их аксонов, увеличивает содержание дофамина в стриатуме и корректирует моторные нарушения [159].

ВDNF играет ключевую роль в патогенезе **болезни Хантингтона**. Полагают, что при данном заболевании мутации в гене белка гентингтина способствуют ухудшению поступления BDNF в стриатум из коры, где он синтезируется, что приводит к лежащей в основе заболевания дегенерации шипиковых нейронов стриатума, зависящих от поддержки BDNF [143, 241]. Снижение содержания BDNF в стриатуме выявлено при посмертных исследованиях людей с болезнью Хантингтона и на мышиных моделях данного заболевания [239]. В экспериментах на трансгенных мышах с экспериментальной болезнью Хантингтона генная BDNF терапия оказывала нейропротекторные эффекты и снижала выраженность моторных нарушений [20, 70].

Дефицит BDNF ассоциирован и с рассеянным склерозом [147]. На мышиной модели рассеянного склероза при внутривенном введении были установлены нейропротекторные и ремиелинезирующие эффекты BDNF [114].

ВDNF за счет нейропротекторных и нейрорегенеративных свойств способствует функциональному восстановлению после нарушений мозгового кровообращения. Содержание BDNF в плазме крови в острый период инсульта коррелирует со степенью восстановления неврологических функций впоследствии [200]. На моделях острых нарушений мозгового кровообращения у грызунов BDNF при центральном введении снижал объем ишемического повреждения с эффектом до 70% и снижал неврологический дефицит [84, 230, 233]. Кроме того, BDNF в условиях экспериментального инсульта стимулировал пролиферацию нейрональных стволовых клеток в субвентрикулярной зоне и зубчатой извилине гиппокампа, способствовал их выживаемости и усиливал миграцию нейробластов из субвентрикулярной зоны в зону ишемического повреждения [79, 189].

### 2.3 Вовлеченность BDNF в патогенез психических заболеваний 2.3.1 BDNF в патофизиологии депрессии

К настоящему времени накоплен большой объем данных, свидетельствующих о центральной роли дефицита BDNF в патогенезе депрессии, в том числе о связи выраженности депрессии и сниженного уровня BDNF, который восстанавливается до нормального при терапии антидепрессантами [51, 55, 178, 226].

экспериментальных моделях депрессии было **BDNF** Ha показано, что при внутримозговом введении оказывает выраженный антидепрессивный эффект [90, 92, 194]. Так, 2-х кратное введение 300 нг BDNF в желудочки мозга мышам линии ASC (antidepressant sensitive catalepsy) с наследственной предрасположенностью к депрессивноподобному поведению снижает время иммобильности в тесте подвешивания за хвост, а также восстанавливает нарушенное сексуальное поведение [202]. На этой же линии мышей BDNF при внутримозговом введении (300 нг) статистически значимо увеличивал экспрессию генов серотониновых рецепторов 2-HT<sub>1</sub>A, 5-HT<sub>1</sub>A и 5-HT<sub>2</sub>A, а также функциональную активность рецептора 5-HT<sub>2</sub>A [149]. Однократное введение BDNF в гиппокамп крысам оказывало выраженное антидепрессант-подобное действие в тестах выученной беспомощности и вынужденного плавания, причем эффект однократного введения BDNF был сравним с эффектами субхронического (7 дней) введения имипрамина или флуоксетина [194]. Показано, что антидепрессивный эффект BDNF при однократном введении крысам в желудочки мозга в тесте вынужденного плавания сохранялся по крайней мере в течение 6 дней [90].

Содержание BDNF в плазме крови снижается у людей, страдающих депрессией, и возвращается к норме после лечения антидепрессантами [171]. Аналогичные результаты получены и на экспериментальных моделях депрессии [22]. При посмертном анализе у жертв суицида выявляется сниженное содержание BDNF в префронтальной коре и гиппокампе [108].

Известно, что в гене *bdnf* присутствует полиморфный сайт, обусловленный заменой гуанина на аденин (G196A). Замена имеет функциональный характер, то есть вызывает замещение аминокислот в про-BDNF: валин замещается метионином в положении 66 (Val66Met). Полиморфизм Val66Met *bdnf* не изменяет экспрессию proBDNF и структуру зрелого нейротрофина BDNF [57]. Мутация Val66Met приводит к уменьшению ткани гиппокампа, ухудшению когнитивных способностей [53]. Генетические исследования показали связь между полиморфизмом Val66Met BDNF и предрасположенностью к депрессии [102].

Взаимосвязь дефицита BDNF и депрессии хорошо объясняется с точки зрения нейропластической теории депрессии [43, 56, 210, 226], которая в последние годы находит все больше подтверждений. Согласно этой теории, депрессивные расстройства обусловлены нарушением нейропластичности гиппокампа, приводящим к снижению адаптивных способностей мозга. Действительно, посмертные исследования показали, что у людей, страдавших депрессией, снижен объем гиппокампа, а также угнетен гиппокампальный нейрогенез [36, 50, 140]. При этом снижение объема гиппокампа у людей, страдавших депрессией, коррелирует со снижением содержания BDNF и его рецепторов TrkB в данном отделе мозга [42, 160]. Снижение объема гиппокампа и угнетение гиппокампального нейрогенеза было показано и на *in vivo* моделях депрессии [168]. Следует отметить, что практически все применяющиеся в клинике антидепрессанты стимулируют нейрогенез в гиппокампе на экспериментальных моделях депрессии, что подтверждает важную роль нарушения нейропластичности гиппокампа в патофизиологии депрессии [135]. Хорошо известно, что ключевую роль в регуляции нейрогенеза, синаптогенеза и синаптической пластичности в гиппокампе играет BDNF [56, 102]. Угнетение BDNF-сигналинга или нейрогенеза снижает эффект антидепрессантов. Так, у трансгенных мышей с дефицитом BDNF TrkB эффект антидепрессантов отсутствует или рецепторов [186]. Нарушение гиппокампального нейрогенеза с помощью воздействия низких доз радиации также блокирует эффект антидепрессантов на экспериментальных моделях [187].

Подтверждением взаимосвязи дефицита BDNF с депрессией является хорошо установленный факт, что хронический стресс, являющийся одним из основных факторов риска развития депрессии, сопровождается снижением содержания гиппокампального BDNF и нарушением нейропластичности гиппокампа [56, 135].

Функцию физиологической адаптации организма к стрессирующим факторам выполняет гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система. Активация этой системы регулируется с помощью петли отрицательной обратной связи, в которой важную роль играет гиппокамп. Вовлеченность гиппокампа в данную обратную связь обусловлена содержанием в нем большого количества рецепторов глюкокортикоидов и минералокортикоидов – гормонов, выделяемых надпочечниками при активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Активация этих рецепторов приводит к угнетению базальной активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и к завершению ее ответа на стресс [169]. В экспериментах показано, что хронический стресс приводит к снижению содержания BDNF в гиппокампе, уменьшению объема гиппокампа, угнетению гиппокампального нейрогенеза и ослаблению отрицательной обратной связи между гиппокампом и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы между гиппокампом и гипоталамо-гипофизарно-надпоченниковой системо связи между гиппокампом и гипоталамо-гипофизарно-надпоченниковой системо связи между гиппокампом и гипоталамо-гипофизарно-надпоченниковой срязи между гиппокампом и гипоталамо-гипофизарно-надпоченниковой системо связи между гиппокампом и гипоталамо-гипофизарно-надпоченниковой системо связи между гиппокампом и гипоталамо-гипофизарно-надпоченниковой системо связи между гиппокампом и гипоталамо-гипофизарно-надпоченниковой системо (121].

17

Таким образом, хорошо установлена роль дефицита BDNF в патофизиологии депрессии.

### 2.3.2 BDNF в патогенезе других психических заболеваний

Помимо депрессии, BDNF играет существенную роль в патофизиологии целого ряда психических заболеваний. Установлена связь между полиморфизмом Val66Met *bdnf* и повышенным риском развития и/или тяжестью протекания биполярного аффективного расстройства [22], тревожных расстройств [197], шизофрении [154, 238], синдрома Ретта [22], расстройств пищевого поведения [54, 181] и др.

Посмертные исследования показали снижение содержания BDNF в гиппокампе лиц, страдавших биполярным аффективным расстройством [113] и в некоторых регионах мозга у людей, страдавших шизофренией [214]. Содержание BDNF в плазме крови значительно снижено у лиц с обсессивно-компульсивным расстройством и расстройствами пищевого поведения по сравнению со здоровыми людьми [85, 201].

Исследования на трансгенных мышах показали, что дефицит BDNF ассоциирован с нарушениями пищевого поведения [127], повышенной тревожностью [127, 180], с такими позитивными симптомами шизофрении, как психоз, и гиперактивность [22], а также с когнитивными нарушениями [144].

В экспериментах была показана эффективность BDNF на моделях синдрома Ретта и нарушений пищевого поведения. Так, кратковременная инкубация срезов ствола головного мозга трансгенных мышей с мутантным геном *mecp2* (модель синдрома Ретта) с BDNF снижает синаптическую гипервозбудимость в нейронах ядра солитарного тракта (входящих в состав дыхательного центра) [112]. Внутримозговое введение BDNF корректирует нарушения пищевого поведения у трансгенных мышей с дефицитом BDNF [85].

Таким образом, BDNF играет ключевую роль в регуляции нейрогенеза, синаптической пластичности, синаптогенеза и нейропластичности в целом. Эти функции BDNF обуславливают его вовлеченность в целый спектр психических и психоневрологических заболеваний.

#### 2.4 Структура BDNF

Нейротрофины представляют собой как гомо-, так и гетеродимеры нековалентно связанных мономеров из примерно 120 аминокислотных остатков каждый. Рентгеноструктурный анализ NGF [138], NT-3 [37], NT-4 [184], BDNF/NT-4 [184], BDNF/NT-3 [176, 183] выявил присущий им общий способ сворачивания. Каждый мономер содержит 7 бета-тяжей, которые входят в состав трех продольных закрученных бета-листов. Эти бета-листы заканчиваются тремя экспонированными в растворитель шпилькообразными петлями 1, 2 и 4 и удлиненной петлей 3, содержащей три обратных бета-изгиба. Петли преимущественно

соответствуют вариабельным районам аминокислотной последовательности. Каждый мономер стабилизирован шестью полностью консервативными цистеиновыми остатками, которые образуют 3 дисульфидных мостика, организованные в так называемый цистеиновый узел, характерный для всех ростовых факторов. Мономеры нейротрофинов связаны параллельно, вследствие чего шесть петель (1-я, 2-я и 4-я) располагаются на одной стороне димерной молекулы. Отметим, что для BDNF гомодимерная структура до сих пор не установлена рентгеноструктурными методами и в литературе приводятся только гетеродимеры (рисунок 1).



Рисунок 1 - Структура гетеродимеров BDNF/NT-4 (PDB ID: 1b8m) и BDNF/NT-3 (PDB ID: 1bnd)

Рентгеноструктурные данные [183, 184]. Петли - 1, 2, 3, 4. Зеленым цветом выделен мономер BDNF, фиолетовым – мономер NT-3, оранжевым - мономер NT-4.

Радзеевски и коллеги [176] провели исследование молекулярной структуры нейротрофинов BDNF и NT-3 физическими методами, включающими гель-фильтрацию, определение седиментационного равновесия и скорости седиментация, электрофорез в геле с мочевиной, флуоресцентную спектроскопию и круговой дихроизм в ближней УФ-области (190-240 нм). Результаты этих исследований показали, что при физиологически значимых концентрациях оба рекомбинантных белка существуют в виде тесно связанных димеров. Димеры стабильны даже в 8 М растворе мочевины, а в растворах денатуранта гидрохлорида

гуанидина (3-5 М) BDNF и NT-3 медленно разворачиваются. Спектроскопия кругового дихроизма выявила содержание таких фрагментов вторичной структуры белка как бета-тяжи (около 70%) и бета-петли (около 20%) в нативной структуре обоих нейротрофинов.

Исследователями Робинсоном и Радзеевски [177] было установлено, что все четыре нейротрофина легко образуют гетеродимеры. Гомодимеры нейротрофинов в растворе могут обмениваться протомерами, процесс обмена ускоряется при внесении в раствор денатурирующих веществ (мочевина, гуанидин гидрохлорид, ацетонитрил), а также при низком рН. Гетеродимер BDNF/NT-3, полученный из рекомбинантных человеческих нейротрофинов BDNF и NT-3, выделили и закристаллизовали [177]. Авторы предположили, что эта гетеродимерная струтура может быть использована для построения моделей гомодимеров BDNF и NT-3, которые будут отличаться незначительно. Позднее гетеродимер BDNF был получен и с NT-4 [184]. Таким образом, в 1995 году была получена кристаллическая структура мономера BDNF в форме гетеродимера с NT-3 (разрешение 2,3 Å) [183], а в 1999 году и с NT-4 (разрешение 2,75 Å) [184].

### 2.5 Рецепторы BDNF и их сигнальные пути

BDNF проявляет свои эффекты, связываясь с двумя различными рецепторами, нейротрофиновым тирозинкиназным рецептором TrkB и нейротрофиновым p75 – представителем семейства рецепторов фактора некроза опухолей (рецепторов смерти).

### 2.5.1 Нейротрофиновые тирозинкиназные рецепторы

Тирозинкиназные рецепторы, открытые в конце прошлого века, являются регуляторами критических клеточных процессов - пролиферации и дифференцировки, метаболизма, выживаемости и контроля клеточного цикла. 58 тирозинкиназных рецепторов человека делятся на 20 подсемейств, из которых нейротрофиновое включает TrkA, TrkB и TrkC [122] Их лигандами являются нейротрофины NGF, BDNF, NT-3 и NT-4. NGF специфически взаимодействует с TrkA, BDNF и NT-4 с TrkB, NT-3 с TrkC. Trk активируются в результате вызванной лигандом димеризации и последующего аутофосфорилирования тирозиновых остатков цитоплазматического домена. В результате на Trk формируются сайты связывания адапторных и сигнальных белков, образуются комплексы этих белков с Trk, которые активируют сигнальные каскады PI3K/AKT, MAPK/ERK и PLCγ. Эти каскады в разной степени вовлечены в нейропротекцию, дифференцировку, синаптическую пластичность и нейрогенез.

Методом резонансной передачи энергии Ферстера (FRET) с использованием двухфотонной микроскопии и OptiMiS True Line Spectral Imaging системы Ахмед и Христова [13] на клетках HEK293T показали, что Trk-рецепторы нейротрофинов находятся в димеризованном состоянии даже в отсутствии лигандов, причем в этой димеризации участвуют трансмембранный и внутриклеточный домены, тогда как вклад внеклеточного лигандсвязывающего домена близок к нулю. В случае TrkC незначителен вклад в димеризацию апорецепторов и внутриклеточного домена. Связывание лигандов вызывает конформационые изменения, которые распространяются на трансмембранный и внутриклеточный домены, вызывая стабилизацию димеризованных Trk-рецепторов. При этом стабилизация TrkA и TrkB примерно одинакова (-2.63  $\pm$  0.14 ккал/моль и -2.65  $\pm$  0.10 ккал/моль), стабилизация же TrkC составляет -1.49  $\pm$  0.17 ккал/моль. Рентгеноструктурный анализ изолированного комплекса NGF-TrkA показывает, что взаимодействие внеклеточных доменов TrkA-рецепторов при димеризации осуществляется исключительно через молекулу лиганда (NGF), а прямое взаимодействие через контакты внеклеточных доменов TrkA отсутствует [213].

Структура тирозинкиназных рецепторов Trk подтипов A, B и C сходна. Trk представляют собой трансмембранные рецепторы. Внеклеточная (экстраклеточная) часть рецептора состоит из пяти доменов (рисунок 3). Домены 1 и 3 относятся к цистеинобогащенным доменам, домен 2 относится к группе лейцин-обогащенных доменов, а домены 4 и 5 являются иммуноглобулин-подобными доменами (Ig-like). Между доменом 5 и трансмембранной областью в структуре рецептора присутствует линкер длиной около 30 а.к.о. [191]. Установлено, что домен 5 отвечает за специфичность связывания лигандов с Trk рецептором [89, 167, 208]. Трансмембранный домен Trk проходит через клеточную мембрану и соединяет внеклеточную и внутриклеточную части рецептора.

В ранних исследованиях середины 90-х годов по связыванию нейротрофинов с рецепторами [218, 219] указывалось, что местом связывание нейротрофинов является лейцинобагащенный домен 2 Trk рецептора. Однако, авторы [213] предположили, что именно домен 5 специфическим является сайтом связывания нейротрофинов. Это предположение подтверждается в работах с химерными Trk [167, 208], в которых показано, что структурный обмен доменом d5 между Trk изменял их специфичность связывания с конкретными нейротрофинами. В исследованиях по мутагенезу Trk рецепторов [156, 209] установлено, что опосредованная рецепторами передача сигналов в усеченных Trk возможна только при наличии в структуре рецептора домена d5. Исследования с рекомбинантными доменами TrkA указывают, что только структура TrkA-d5 имеет близкий уровень сродства к NGF, характерный для полноразмерного рецептора, не проявляя при этом значимого связывания с BDNF [89, 182]. Таким образом, домен 5 отвечает как за аффинность, так и за специфичность связывания нейротрофинов с рецепторами Trk.

21

Исследователями Висманом, Ольтшем и др. [216] был получен комплекс нейтрофиносвязывающего домена 5 (Ig-C2) TrkA с NGF (PDB ID: 1www). Этой же группой были опубликованы результаты рентгеноструктурного анализа доменов Ig-C2 рецепторов TrkA (PDB ID: 1wwa), TrkB (PDB ID: 1wwb) и TrkC (PDB ID: 1wwc) (рисунок 2) [206].



Рисунок 2 - Нейротрофинсвязывающие домены рецепторов TrkA, TrkB и TrkC

Рентгеноструктурные данные (PDB ID: 1wwa, 1wwb и 1wwc). Белки экспрессированы в прокариотах (*Escherichia coli*). Бета-тяжи показаны зеленым цветом, петли – желтым и красным. Шариками показаны атомы серы, участвующие в образовании дисульфидных мостиков между бета-тяжами В и Е [206].

В 2001 году были представлены рентгеноструктурные данные комплекса NT-4 с TrkB-d5 [23]. Позднее, в 2007 году опубликованы данные рентгеноструктурного анализа полного экстраклеточного домена Trk (Trk-ECD) в комплексе с NGF [213] (рисунок 3).

Трансмембранный домен (TMD) TrkA содержит последовательность а.к.о. – М<sup>409</sup>ККDETPFGVSVAVGLAVFACLFLSTLLLVLNKAGRRNK<sup>447</sup> и представляет собой альфаспираль (выделено жирным), ограниченную неупорядоченными участками. Структура димера TrkA-TMD установлена Франко, Надеждиным и соавт. [67] в 2015 году с помощью ЯМРспектроскопии в липидных мицеллах (рисунок 4).



Рисунок 3 – Структура комплекса NGF и экстраклеточного домена TrkA (PDB ID: 2igf) Рентгеноструктурные данные. TrkA экспрессирован в эукариотах (*Spodoptera frugiperda*). Представлены иммуноглобулин-подобные домены (Ig-C1 и Ig-C2) и лейцинобогащенные домены (LRR) [213].



Рисунок 4 – Структура димеризованного TMD TrkA рецептора человека и схематическое изображение под разными углами по данным ЯМР (PDB ID: 2n90), а также последовательность

а.к.о. TMD у различных животных [67]

Представлены а.к.о. TMD TrkA животных: h – *Homo sapiens*; r - *Rattus norvegicus*; m - *Mus musculus*; c - *Gallus gallus*; x - *Xenopus laevis*; z - *Danio rerio*). Красным выделены а.к.о., участвующие в димеризации TMD TrkA.

Авторы [67] определили стандартную свободную энергию димеризации ( $\Delta G_0$ ) TrkA-TMD в мицеллах. Полученное значение  $\Delta G_0 = -1.9 \pm 0.2$  ккал/моль свидетельствовало о том, что димер TrkA-TMD не уступает по стабильности димерам TMD других рецепторных тирозинкиназ.

ЯМР-спектр <sup>15</sup>N-HSQC <sup>15</sup>N-меченого TrkA–TMD содержал ожидаемое количество кросспиков, а хорошее качество спектров позволило решить структуру димера в мицеллах додецилфосфохолина. Альфа-спиральная область димера TrkA-TMD начинается  $Gly^{417}$  и заканчивается  $Asn^{440}$ , имеет длину ~38Å. Угол пересечения спиралей TrkA–TMD составляет 40°, а минимальное расстояние между двумя мономерами — 8.8Å. Интерфейс димеризации лежит вдоль мотива последовательности  $L^{424}XXFAXXF^{431}$  (рисунок 4, выделен красным), который сохраняется в TrkA-TMD нескольких видов, а также в TrkC, но не в TrkB. Хотя последовательность TrkA-TMD содержит предполагаемый мотив димеризации вида SXXXG (рисунок 4, выделен синим), этот мотив находится на противоположной стороне спирали. Интерфейс взаимодействия LXXFAXXF был подтвержден с помощью сайт-направленного мутагенеза (а.к.о. в TMD последовательно заменяли на цистеин) вместе с функциональными исследованиями и изучением дифференцировки клеток PC12. По мнению авторов полученные результаты показывают, что трансмембранные и околомембранные области TrkA играют ключевую роль в димеризации и активации рецептора с помощью NGF [67].

В 2012 году Лью с коллегами была опубликована структура киназного домена TrkA рецептора (рисунок 5) [31].



Рисунок 5 – Структура киназного домена apo-TrkA (PDB ID: 4f0i) [31] Рентгеноструктурные данные. Белок экспрессирован в прокариотах (*Escherichia coli*). Лиганды-ингибиторы киназного домена в настоящее время рассматриваются как перспективные лекарственные средства для борьбы с онкологическими заболеваниями [32]. В литературе описаны ингибиторы киназного домена TrkA: GNF-10 и GNF-14 [48], MK-1 - MK-4 [198], AZ-23 [212]; TrkB: Cpd5n, EX429 и GW2580 [31]; TrkC: GNF-20 [14] и GNF-1 [48] (рисунок 6). Для всех этих соединений получены рентгеноструктурные данные в комплексе с киназным доменом соответствующего Trk рецептора.



Рисунок 6 – Структуры ингибиторов киназных доменов TrkA, TrkB и TrkC рецепторов [14, 31, 32, 48, 198, 212]. Синим цветом отмечены коды структур в базе PDB.

### 2.5.2 Взаимодействие BDNF с TrkB рецептором

TrkB рецепторы экспрессируются на телах нейронов, на аксонах и дендритах во многих структурах мозга, включая кору, гиппокамп, стриатум, ядра перегородки, черную субстанцию,

клетки Пуркинье мозжечка, ствол мозга, спинальные мотонейроны и чувствительные ядра ствола. Кроме того, TrkB обнаружен на субпопуляции клеток эпендимы, выстилающей желудочки мозга [163].

В настоящее время в литературе не описаны рентгеноструктурные данные комплекса BDNF с TrkB, однако в 2001 году была опубликована структура комплекса нейротрофина NT-4 с TrkB-d5, экспрессированного в прокариотах (*Escherichia coli BL21*) (рисунок 7).



Рисунок 7 - Структура комплекса TrkB-d5 с NT-4 (PDB ID: 1hcf) [23]

Рентгеноструктурные данные. TrkB-d5 экспрессирован в прокариотах (*Escherichia coli*). Показаны ортогональные виды общей структуры комплекса TrkB-d5 с NT-4. Гомодимер NT-4 окрашен в красный (один мономер) и синий (второй мономер) цвета с помеченными элементами вторичной структуры. Мономеры TrkB-d5 окрашены в бирюзовый цвет. Модель комплекса TrkB-d5:NT-4 включает остатки от Gly<sup>1</sup> до Thr<sup>127</sup> для одного мономера NT-4 и от Thr<sup>5</sup> до Gly<sup>128</sup> для второго. Остатки TrkB-d5 от Ala<sup>286</sup> до Gly<sup>383</sup> включительно наблюдаются в обеих копиях рецепторного домена [23].

Ранее Робертсон и соавт. [182] показали, что TrkA-d5 связывается с NGF с таким же сродством, как и с интактным рецептором TrkA, демонстрируя, что основной вклад в связывание NGF вносит домен d5. Используя технологию поверхностного плазмонного резонанса, было показано, что рекомбинантный TrkB-d5 связывает NT-4 с  $K_d \sim 260$  пM и BDNF с  $K_d \sim 790$  пM, тогда как связывание NGF не наблюдается вплоть до концентраций 100 нM. Константа  $K_d$  комплекса BDNF с TrkB-d5 сравнима с  $K_d$  для интактного рецептора на поверхности клетки (990 пM [52]), подтверждая предположение, что только d5 может объяснить связывание нейротрофина с рецептором. Хотя аффинность интактного рецептора TrkB к NT-4 на клеточной поверхности непосредственно не измерялась, авторы предполагают, что она примерно равна таковой BDNF.

Кристаллические структуры TrkB-d5 [206] и NT-4 человека [184] были ранее определены в свободных безлигандных формах. Для молекулы NT-4 наблюдаются существенные, но локальные изменения между структурами в свободной и лигандной формах. Хотя общая укладка сохраняется (среднеквадратическое отклонение координат для 180 атомов углерода составляет 0.83 Å), заметны значительные конформационные изменения в остатках, расположенных на *N*-конце, 2-й петле, а.к.о. 63-70 в 3-й петле, 4-й петле и *C*-конце. Большинство этих изменений, по-видимому, являются результатом разной степени подвижности этих областей петель в двух разных кристаллических решетках и вряд ли могут быть непосредственно связаны с образованием комплексов. Однако исключением является *N*конец. Исследования мутантных рецепторов показали, что эта область является важной детерминантой сродства и специфичности Trk в комплексе с нейротрофином [139, 207], но этот сегмент всегда неупорядочен в структурах нейротрофинов в нелигандных формах. В кристаллической структуре комплекса TrkB-d5:NT-4 все остатки на *N*-конце от Gly<sup>1</sup> видны у одного мономера NT-4 и от Thr<sup>5</sup> у второго. В обоих случаях остатки Ala<sup>7</sup>–Arg<sup>11</sup> образуют короткую альфа-спираль, которая находится в тесном контакте с TrkB-d5.

Авторы не делают выводов по аппроксимации результатов на связывание BDNF с TrkBd5, но проводят сравнение структуры полученного комплекса со структурой TrkA-d5:NGF. Архитектура комплекса TrkB-d5:NT-4 аналогична описанной ранее TrkA-d5:NGF и устанавливает, таким образом, общий механизм связывания нейротрофинов с их рецепторами. При наложении этих двух комплексов можно заметить переориентацию рецепторных доменов, в то время как гомодимер нейротрофина действует как жесткая структурная единица, для каждого из доменов TrkB наблюдается небольшое вращение относительно эквивалентных положений TrkA. Контакты между TrkB-d5 и NT-4 в двух отдельных участках – консервативном и специфичном, представлены на рисунке 8. Консервативный сайт связывания (рисунок 8, а) образован остатками петель AB, CD и EF и C-концом TrkB-d5, которые взаимодействуют с а.к.о. бета-тяжей A, C и D мономера NT-4 и его 1-й петлей. Специфичный сайт связывания (рисунок 8, б) образован между одной цепью гомодимера NT-4, *N*-концевым участком нейротрофина и внешней стороной листа ABED TrkB-d5.



Рисунок 8 – Места связывания NT-4 с TrkB-d5 [23] Представлены консервативный (а) и специфичный (б) сайты связывания.

В консервативном сайте связывания большинство контактов опосредуется через петлю EF TrkB-d5. Важность этой области была продемонстрирована ранее в экспериментах с мутантными TrkA и TrkC [209]. Остатки NT-4 Gln<sup>94</sup>, Tyr<sup>96</sup> и Arg<sup>114</sup> образуют сеть водородных связей с остатками Asp<sup>349</sup> и Asn<sup>350</sup> TrkB-d5. Интересно отметить, что остаток Arg<sup>114</sup> консервативен во всех нейротрофинах и, как было показано, является наиболее важной детерминантой связывания NT-3 с TrkC [209]. Гуанидиновая группа Arg<sup>114</sup> упаковывается вместе с Tyr<sup>329</sup> CD петли. Контакты, осуществляемые через петлю AB и C-конец d5 имеют ванн-дер-ваальсову природу.

Отсутствие консервативности в последовательности а.к.о. как в рецепторах Trk, так и в нейротрофинах во второй области связывания (рисунок 8, б), привело авторов [216] к предположению, что именно эта область и является главной детерминантой специфичности. Это предположение подкрепляется ранними экспериментальными данными [207], так, замена *N*-концевой области NT-3 соответствующим участком NGF, приводила к белку, взаимодействующему с высокой афинностью как с TrkA, так и с TrkC. В специфическом сайте связывания остатки NT-4 Arg<sup>10</sup> и Arg<sup>11</sup> взаимодействуют с остатками TrkB-d5 Asp<sup>298</sup>, His<sup>299</sup> и His<sup>343</sup>. Остатки Arg<sup>10</sup> и His<sup>343</sup> связаны стекингом, Arg<sup>11</sup> образует солевой мостик с Asp<sup>298</sup>, присутствует водородная связь между Glu<sup>13</sup> и His<sup>299</sup>, в пределах ванн-дер-ваальсова взаимодействия лежат остатки NT-4 Gly<sup>1</sup>, Ser<sup>3</sup>, Glu<sup>4</sup>, Ala<sup>6</sup>, Ser<sup>9</sup> и Leu<sup>14</sup>.

Взаимодействие нейротрофина с рецептором (в частности BDNF с TrkB) приводит к димеризации рецептора и изменению его конформации, вследствие чего происходит аутофосфорилирование тирозиновых остатков его цитоплазматического домена. В результате происходит формирование сайтов связывания с сигнальными и адапторными белками, которые активируют PI3K/AKT-киназный, MAPK/ERK-киназный сигнальные каскады и фосфолипазу С (PLC<sub>γ</sub>) [163] (рисунок 9).



Рисунок 9 - Сингальные пути Trk рецептора [145]

АКТ (РКВ) – протеинкиназа В; DAG – диацилглицерин; ERK – киназы, активируемые внеклеточными сигналами (extracellular signal-regulated kinases); Gab1 – адаптерный белок, связанный с Grb2; Grb2 – адаптерный белок (Growth Receptor Binding protein – белок, связывающий ростовые рецепторы); IP3 – инозитол-1,4,5-трифосфат; MAPK – митогенактивирующая протеинкиназа (Mitogen-activated protein kinase); MEK – киназа MAPK и ERK; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа; PKCδ – протеинкиназа С-δ; PLCγ – фосфолипаза С-γ; Ras – семейство генов и белков, кодирующих G-белки; SOS – нуклеотидный рилизинг фактор (гуанин-нуклеотид заменяющий фактор); Shc – адаптерный белок ((Src homology 2 domain containing) transforming protein – двухдоменный трансформирующий белок, гомологичный Src).

Пострецепторные пути трансдукции сигнала ответственны за проявление нейротрофином биологических свойств:

- путь, опосредованный PI3K-киназой и протеин-киназой В (также известной как Akt - threonine-protein kinase) – PI3K/AKT, в основном отвечает за нейропротекцию за счет стимуляции экспрессии анти-апоптотических белков и ингибирования про-апоптотических белков [35], а также с активацией в целом белкового синтеза [71].

- МАРК/ERК-киназный каскад вовлечен в нейропротекцию, дифференцировку и пролиферацию клеток [39]. Регуляция болевой чувствительности в большинстве случаев также опосредована МАРК-сигнальным путем [87].

- фосфолипаза С (PLCγ) способствует поддержанию синаптической пластичности [196], регулирует дифференцировку клеток и рост аксонов [34, 163], участвует в интернализации комплекса лиганд/рецептор в сигнальную эндосому [25].

### 2.5.3 Рецепторы р75

Белок p75 (p75(NTR)) – один из членов семейства рецепторов фактора некроза опухолей [41]. P75 рецепторы взаимодействуют со всеми белками семейства нейротрофинов. Взаимодействие нейротрофинов с p75 рецептором изучено к настоящему времени не так хорошо, как с Trk. Они могут служить корецепторами для TrkB рецепторов, усиливая опосредуемые ими функции или стимулировать апоптоз [107]. Предполагается, что, находясь в комплексе с Trk рецептором, p75 усиливает позитивные эффекты нейротрофина, однако в отсутствие Trk взаимодействие p75, например, с NGF приводит к апоптозу клеток [26]. Trk и p75 рецепторы часто находятся в непосредственной близости на клеточной мембране [33].

Функциональная гетерогенность рецептора p75 обусловлена его способностью взаимодействовать с разными лигандами и формировать комплексы с другими рецепторами [118].

Основные внутриклеточные каскады, активируемые р75 рецепторами, показаны на рисунке 10 [118]:

- 1. каскад, опосредованный NF-kB (Nuclear Factor kappa B), который стимулирует рост дендритов и увеличивает выживаемость аксонов;
- 2. каскад, опосредованный JNK (c-Jun-N-terminal kinase), который ведет к гибели клеток путем апоптоза;
- 3. каскад, опосредованный церамидом, который может способствовать как поддержанию жизнеспособности клеток, так и их апоптозу.



Рисунок 10 – Сигнальные пути, опосредованные p75NTR, которые регулируют

выживаемость клеток и апоптоз [118]

Взаимодействуя с нейротрофинами p75 способствует активации JNK, через NRAGE, TRAF6 и NRIF, а также через индукцию сфингомиелиназ, что приводит к апоптозу. Апоптозу способствует снижение содержания калия K<sup>+</sup> и другие цитозольные взаимодействия, включая NADE и MAGE-G1. В ответ на про-нейротрофины, p75 ингибирует Trk-опосредованную передачу сигналов выживания посредством индукции PTEN и результирующего ингибирования передачи сигналов выживания PI3K/AKT. Взаимодействие p75 с рецепторами Trk способствует увеличению выживаемости клеток, опосредованной Trk и PI3K/AKT, а также другим путем – через активацию NF-кВ [118].

Белок p75 представляет собой классический мембранный рецептор. Его внеклеточный участок (ECD) содержит четыре цистеин-обогащенных домена (CRD1 - CRD4), трансмембранный домен и внутриклеточный С-концевой участок рецептора p75, содержащий домен смерти (DD) [175] (рисунок 11).



Рисунок 11 – Структура рецептора р75 [73, 126, 146]

(a) - экстраклеточный домен p75ECD (PDB ID: 3buk) [73], структура взята из кристаллического комплекса NT-3 (рекомбинантный человеческий) с p75 (крысиный).

(б) - трансмембранный домен p75TM, данные ЯМР (PDB ID: 2mic), белок экспрессирован в прокариотах (*Escherichia coli*) [146].

(в) - домен смерти p75DD, данные ЯМР (PDB ID: 1ngr), белок экспрессирован в прокариотах (*Escherichia coli*) [126].

Экспериментальные данные нескольких лабораторий продемонстрировали, что p75 взаимодействует с нейротрофинами через четыре цистеин-обогащенных домена в его ECD [225], и делает это путем образования гомодимеров [77], однако молекулярные детали распознавания p75-ECD нейротрофином не были раскрыты до 2004 года. В 2004 году Хи и Гарсия установили структуру комплекса p75-ECD с NGF (рисунок 12) [86].

Эта структура содержит только один протомер p75 для каждого димера NGF, формируя стехиометрию 2:1 [86]. Однако, позже, эксперименты по взаимодействию изолированного p75-ECD и NGF в растворе [21], описанная кристаллическая структура p75-ECD:NT-3 (PDB ID: 3buk) [73] и кристаллическая структура p75-ECD:pro-NGF (PDB ID: 3ij2) [60] подтвердили стехиометрию 2:2 для p75-ECD: NT. Эти исследования показали, что комплекс 2:1 возник из-за отсутствия гликозилирования в белке, используемом при кристаллизации с NGF. Тем не менее, роль гликозилирования p75-ECD все еще остается нерешенной проблемой. В настоящее время считается, что соотношение 2:1 в комплексе может представлять собой конформацию, захваченную в процессе кристаллизации p75-ECD:NGF, и он является промежуточным звеном в образовании комплекса 2:2 [60].

32



Рисунок 12 – Комплекс NGF с рецептором p75 (PDB ID: 1sg1) [86]

Рецептор p75 отображен фиолетовым цветом, протомеры нейротрофина NGF зеленым и оранжевым. Комплекс представлен в виде вторичной структуры (а) и молекулярной поверхности (б) (программное обеспечение сайта https://www.rcsb.org).

Гонг и соавт. [73] для выяснения механизма взаимодействия p75 с нейротрофинами, закристаллизовали ECD гликозилированного p75 с NT-3. Кристаллические комплексы получали из рекомбинантного человеческого NT-3 и ECD крысиного гликозилированного p75 (очищен с помощью эксклюзионной хроматографии). Кристаллическая структура была определена с разрешением 2.6Å (PDB ID: 3buk). В структуре комплекса два протомера p75 имеют параллельные конформации с четырьмя перекрученными CRD доменами (CRD1 – CRD4) в тандеме. NT-3 взаимодействует с CRD2, CRD3 и CRD4 (рисунок 13).

Три сайта связывания стабилизированы гидрофобными взаимодействиями, солевыми мостиками и водородными связями. Первый сайт связывания находится в области между CRD1 и CRD2, с преобладанием последнего. Связывание в сайте 1 обеспечивается пятью водородными связями и одним солевым мостиком (рисунок 13, А). В связывании с p75 участвуют остатки  $Trp^{20}$  и Lys<sup>49</sup> одного протомера NT-3 и Arg<sup>31</sup> и Arg<sup>87</sup> другого. Сайт связывания 2 образован областью CRD3 и CRD4 с равным вкладом и содержит два солевых мостика и две водородные связи (рисунок 13, Б). В связывании с p75 участвуют остатки Tyr<sup>11</sup> и Arg<sup>68</sup> одного протомера NT-3 и Arg<sup>114</sup> другого. Сайт 3 включает только один солевой мостик между Lys<sup>73</sup> нейротрофина и Glu<sup>143</sup> C-концевого участка p75 (рисунок 13, В).



Рисунок 13 - Взаимодействие между p75NTR и NT-3 [73]

Мономеры NT-3 показаны красным и желтым цветом, а мономеры р75-рецептора синим и зеленым цветом. Водородные связи и солевые мостики показаны пунктирными линиями.

Авторы [73], рассмотрев кристаллические структуры p75 рецептора, в свободном и связанном с NT-3 состоянии установили, что изменение конформации рецептора происходит за счет остатков 5–12 *N*-концевого участка и остатков расположеных на границе взаимодействия нейротрофин-рецептор: петлеобразные участки 40–48 и 70–76,  $\operatorname{Arg}^{31}$ ,  $\operatorname{Glu}^{59}$ ,  $\operatorname{Asn}^{65}$ ,  $\operatorname{Leu}^{96}$  и  $\operatorname{Arg}^{114}$ .

Структура трансмембранного домена р75 была установлена Надеждиним и соавт. [146], а также изучена димеризация рецептора. С помощью ЯМР-спектроскопии установлены трехмерные структура трансмембранного домена димера p75-TM-WT и функционально неактивного p75-TM-C257A. После восстановления в липидных мицеллах p75-TM-WT спонтанно образует димеры с дисульфидными связями по остаткам Cys<sup>257</sup>. В восстанавливающих условиях p75-TM-WT находится в равновесии мономер-димер. Напротив, p75-TM-C257A образует димеры через мотив AXXXG на противоположной стороне альфа-

34

спирали. Биохимические эксперименты и эксперименты по сшиванию показывают, что мотив AXXXG не входит в димерный интерфейс p75-TM-WT, что позволяет предположить, что конформация p75-TM-C257A может быть функционально нерелевантной. Таким образом, получены структурные данные, дающие представление о ключевой роли Cys<sup>257</sup> в стабилизации трансмембранного домена p75 в димерной конформации, необходимой для передачи сигналов нейротрофинов через p75 [146].

На рисунке 14 представлены аминокислотные последовательности трансмембранного домена у ряда животных и димеризованная структура ТМ-домена р75.





Рисунок 14 – Структура димеризованного трансмембранного домена р75 и его аминокислотные

последовательности у разных животных [146]

Rn (*Rattus norvegicus*) - rhscf; Mm (*Mus musculus*) - мышь; Hs (*Homo sapiens*) - человек; Gg (*Gallus gallus*) - банкивский петух; Xt (*Xenopus tropicalis*) - западная когтистая лягушка. Димер p75-TM-WT представлен фронтально и при повороте на 90° вдоль вертикальной оси. Дисульфидная связь Cys<sup>257</sup>-Cys<sup>257</sup> показана желтым цветом (PDB ID: 2mic). Жирным шрифтом выделены а.к.о. участвующие в димеризации TM-DD p75.

*Структура домена смерти* p75DD была определена в ЯМР-исследованиях [126] (рисунок 11).

### 2.6 Нейротрофин BDNF в клинических исследованиях

Важная роль BDNF в поддержании жизнеспособности и фенотипической стабильности нейронов и глиальных клеток, регуляции нейрогенеза, синаптической пластичности и в целом нейропластичности определяет терапевтический его потенциал для лечения нейродегенеративных заболеваний. Установлена взаимосвязь дефицита BDNF с патогенезом болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, бокового амиотрофического склероза и др. [74, 130, 231]. Несмотря на большое количество доклинических исследований, показавших высокую эффективность BDNF при центральном введении на экспериментальных моделях нейродегенеративных заболеваний, применение нейротрофина в клинике оказалось безуспешным из-за фармакокинетических ограничений, таких как плохая проницаемость через ГЭБ [170], малое время жизни в кровотоке, так период полураспада рекомбинантного BDNF в крови менее 1 мин [170] и побочных эффектов за счет плейотропности. Так, клинические исследования BDNF для лечения бокового амиотрофического склероза не показали эффективности нейротрофина как при интратекальном (25, 60, 150, 400 или 1000 мкг/сут, 11 недель) [155], так и подкожном (25 и 100 мкг/кг, 9 месяцев) [12] введении, при этом при интратекальном введении высокие дозы BDNF (>150 мкг/кг в сутки) вызывали побочные эффекты, такие как парестезии, нарушения сна, сухость во рту, возбуждение. Эти исследования были прекращены на III фазе. Клинические исследования BDNF (подкожно, 25 и 100 мкг/кг, 3 месяца) для лечения диабетической нейропатии также не показали значимых положительных результатов [215].

Поэтому представляется актуальным создание лекарственных препаратов на основе низкомолекулярных соединений, обладающих заданным набором полезных свойств из спектра фармакологических свойств нейротрофина BDNF и при этом активных при системном введении.

### 2.7 Низкомолекулярные миметики BDNF

В 90-х годах серия исследований по сайт-направленному мутагенезу позволила Ибаньесу и сотрудникам [94-96] предположить, что петли 1, 2 и 4 являются носителями аминокислотных остатков, непосредственно участвующих в связывании нейротрофинов с рецепторами

Для BDNF было установлено, что важную роль в связывании с TrkB и/или проявлении активности играют следующие последовательности:  $-Lys^{26}$ -Thr<sup>27</sup>-Ala<sup>28</sup>-Val<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Met<sup>31</sup>-Ser<sup>32</sup>-Gly<sup>33</sup>-Gly<sup>34</sup>-Thr<sup>35</sup>- (1 петля) [94]; -Ser<sup>45</sup>-Lys<sup>46</sup>-Gly<sup>47</sup>-Gln<sup>48</sup>-Leu<sup>49</sup>- (2 петля) [94]; а также остатки 4 петли Lys<sup>95</sup>, Lys<sup>96</sup> и Arg<sup>97</sup> [95] и участок бета-тяжа -Gln<sup>79</sup>-Cys<sup>80</sup>-Arg<sup>81</sup>-Thr<sup>82</sup>-Thr<sup>83</sup>-Gln<sup>84</sup>-Ser<sup>85</sup>-Tyr<sup>86</sup>-Val<sup>87</sup>-Arg<sup>88</sup>- [95] (рисунок 15). С конца 90-х годов на основе этих данных различными
исследовательскими группами разрабатывались соединения - низкомолекулярные миметики BDNF.



Рисунок 15 - Аминокислотные остатки в структуре BDNF, участвующие в связывании и/или активации TrkB рецептора [94-96]

Схематическое представление мономера BDNF, взятого из кристаллической структуры гетеродимера BDNF/NT-3 (PDB ID: 1bnd). 1, 2, 3, 4 - петли нейротрофина. Синими кружками выделены остатки, выявленные с помощью гомологичного скана (имплементация фрагментов BDNF в структуру NGF), оранжевыми – остатки, выявленные аланиновым сканом.

## 2.7.1 Циклические пептидные миметики 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF

Первые низкомолекулярные миметики BDNF были получены исследовательской группой из Университета Мельбурна (Австралия) под руководством Ричарда Хьюза [157]. К началу работы трехмерная структура BDNF была неизвестна. Информацию о ней группа Хьюза получила с помощью гомологичного моделирования на основе трехмерной структуры NGF, описанной Макдональдом и др. в 1991 г. [138]. Полученная таким образом трехмерная структура BDNF была позже подтверждена рентгеноструктурными исследованиями Робинсона и соавторов [183]. К этому времени было известно, что химерный NGF с имплантированной 2-й петлей BDNF приобретал способность связываться с TrkB-рецепторами [95]. В связи с этим внимание исследователей было обращено на петлю 2, определенную ими как Glu<sup>40</sup>-Lys<sup>41</sup>-Val<sup>42</sup>-

Pro<sup>43</sup>-Val<sup>44</sup>-Ser<sup>45</sup>-Lys<sup>46</sup>-Gly<sup>47</sup>-Gln<sup>48</sup>-Leu<sup>49</sup>-Lys<sup>50</sup>-Gln<sup>51</sup>. Путем моделирования с помощью программы Нурегснет были сконструированы циклические пептиды, конформационно ограниченные дисульфидными мостиками остатков цистеина. Из этих циклопептидов с помощью алгоритма Полака-Рибьера (Polack-Ribere) и силового поля MM+ были отобраны четыре соединения, теоретически конформационно близких петле 2 и содержащих от 12 до 6 аминокислотных остатков BDNF (L2-12, L2-10, L2-8, L2-6, рисунок 16).



Рисунок 16 - Миметики 2-й петли BDNF с агонистической активностью [157] Шифр пептида содержит номер петли и количество а.к.о. Циклизация показана линиями.

Сконструированные пептиды были получены твердофазным синтезом с последующим окислением цистеиновых остатков диметилсульфоксидом при pH 8.0.

Изучение влияния синтезированных пептидов на выживаемость сенсорных нейронов куриных зародышей выявило концентрационно-зависимое ингибирование выживаемости, опосредованной BDNF. Максимальный эффект у всех пептидов наблюдался в микромолярной концентрации. Выраженность эффекта у пептидов L2-12 и L2-10 составляла 40%, у пептида L2-8 50%, у пептида L2-6 27%. Соответствующие линейные пептиды были неактивны. Все циклопептиды не ингибировали действие NGF. Так впервые были получены специфичные конкурентные антагонисты TrkB.

В следующей работе [158] авторы на основе наиболее активного циклопептида L2-8 с использованием программы Sybyl сконструировали димерные ди- и трициклические пептидные миметики второй петли с агонистической активностью. В их числе бициклические димерные пептиды, димеризованные дисульфидной связью и амидной связью, и трициклические димерные пептиды, димеризованные и амидной, и дисульфидной связями (рисунок 17). Димеризацию дисульфидной связью осуществляли, вводя остатки цистеина вовнутрь последовательности L2-8. Димеризацию с помощью амидной связи осуществляли, вводя в качестве С-концевых остатки лизина и глутаминовой кислоты, которые далее объединяли амидной связью боковых функциональных групп.



Рисунок 17 – Структуры би- и трициклических миметиков 2-й петли BDNF с агонистической и антагонистической активностями [158] со свободными (2-4) и блокированными (5, 6) концевыми группами. Циклизация и димеризация показаны линиями

Место введения димеризующей связи определялось, исходя из расстояний между соответствующими а.к.о. во второй петле.

Сконструированные соединения были синтезированы твердофазным методом в сочетании с методом образования амидной связи (γ-Glu-ε-Lys) частично защищенных продуктов и образования дисульфидной связи путем окисления остатков цистеина.

Эффекты бициклических димеров были изучены на первичных культурах сенсорных нейронов зародышей цыплят. Соединения 2, 4, 5 и 6 проявляли концентрационно-зависимое увеличение выживаемости нейронов. Среди бициклов наиболее активным было соединение 5 с EC<sub>50</sub>=10<sup>-10</sup> М с выраженностью эффекта 30% от BDNF. Среди всех соединений самым активным было трициклическое (35%) соединение 6 от BDNF: EC<sub>50</sub>=10<sup>-11</sup> М). Все соединения концентрационно-зависимо ингибировали эффекты BDNF на выживаемость, являясь, таким образом, его частичными агонистами-антагонистами. Соединение 3 обладало только антагонистическими свойствами.

Для воспроизведения пространственной структуры BDNF, содержащей 3 пары участвующих в связывании рецептора петель, группа Хьюза получила, наряду с мономерными аналогами, димерные миметики петель BDNF [61] (рисунок 18).

Пептид	Структура	Петля
	Мономеры	
L1	Ac-CVDMSGGTCTC(Acm)-OH	1
L2a	H-C(Acm)ECVPVSKGQLC-OH	2
L2b	H-C(Acm)LECVPVSKGQLC-OH	2
L4a	H-C(Acm)CTMDSKKRIGC-OH	4
L4b	H-C(Acm)RACTMDSKKRIGC-OH	4
L1-2a	Димеры Ac-CVDMSGGTCTC-OH H-CECVPVSKGQLC-OH	1+2
L2b-L4a	H-CLECVPVSKGQLC-OH H-CCTMDSKKRIGC-OH	2+4
L4b-L4b	H-CRACTMDSKKRIGC-OH H-CRACTMDSKKRIGC-OH	4+4

Рисунок 18 - Мономерные и димерные пептидные миметики 1, 2 и 4-й петель BDNF [61] Шифр пептида содержит номер петли. Циклизация показана линиями. Аст – ацетамидометильная защитная группа.

Были сконструированы как интрацепочечные (относящиеся к одной и той же полипептидной цепи), так и интерцепочечные (относящиеся к разным полипептидным цепям) димеры. В первых (гетеродимерных) были объединены петли 1 и 2, 2 и 4. Во втором случае речь шла о гомодимерах, объединявших 2 и 2' петли, 4 и 4' петли разных полипептидных цепей BDNF. Положение цистеиновых мостиков определялось как визуально, так и с использованием программы Sybyl 6.4. таким образом, чтобы внесенные в структуру возмущения были минимальны.

Мономерные пептиды концентрационно-зависимо ингибировали эффекты BDNF на выживаемость сенсорных нейронов эмбрионов цыплят. L1 проявлял наименьшую активность (10<sup>-5</sup> M, 30% ингибирования). Другие мономерные пептиды были активны уже в концентрации 10<sup>-7</sup> M. Пептид L2a обладал наибольшей ингибирующей активностью. Он был активен в интервале концентраций 10<sup>-9</sup> – 10<sup>-5</sup> M с максимальным эффектом 45% в концентрации 10<sup>-5</sup> M.

Миметики 4-й петли L4a и L4b значимо ингибировали эффекты BDNF в концентрации 10<sup>-7</sup> M с наибольшим эффектом (49 и 41% соответственно) при 10<sup>-5</sup> М.

Почти все димерные миметики также обладали ингибирующей активностью. И только гомодимерный бициклический пептид L4b-L4b обладал агонистической активностью, будучи способным в концентрации 10<sup>-5</sup> М увеличивать выживаемость сенсорных нейронов.

В целом, австралийскими учеными было показано, что мономерные моноциклические пептиды, как и гетеродимерные бициклические пептиды, основанные на петлях 1, 2 и 4, являются ингибиторами BDNF, в то время как гомодимерные бициклические пептиды являются агонистами BDNF.

Таким образом, были получены низкомолекулярные миметики BDNF с агонистической активностью как на основе 2-й [158], так и на основе 4-й петель нейротрофина [61].

Эти соединения, будучи низкомолекулярными аналогами BDNF, всё еще обладали большим молекулярным весом и были слишком сложны по структуре для дальнейшего развития в качестве лекарственных средств. В связи с этим группа Хьюза создала циклический протеолитически стабильный миметик BDNF, представляющий собой циклический пентапептид цикло(-*D*-Pro-Ala-Lys-Lys-Arg-), однако являющийся лигандом не TrkB, а p75 нейротрофинового рецептора [62]. Основой для конструирования этого циклопептида явились данные сайт-направленного мутагенеза о ключевой роли трипептидной последовательности - Lys-Lys-Arg- 4-й петли BDNF во взаимодействии с рецептором p75 [185].

Конструирование циклопептида проводилось с помощью программ Sybyl 6.4 и Нурегсhem 4.0. Трипептидная последовательность Lys<sup>94</sup>-Lys<sup>95</sup>-Arg<sup>96</sup> 4-й петли BDNF была взята из трехмерной структуры BDNF, полученной путем гомологичного моделирования [62]. Далее был рассмотрен широкий набор конформационных ограничителей, из которого были выбраны аминокислотные остатки, которые помещались между *N*- и *C*-концами трипептидной последовательности. В качестве таковых рассматривались пары Gly, Ala и Pro (включая *D*формы), а также β-аминокислоты и другие  $\omega$ -алкиламинокислоты различной длины. Каждая структура оптимизировалась до локального минимума конформационной энергии в силовом поле AMBER, имплементированного в Hyperchem. Перспективные циклопептиды подвергались дальнейшим конформационным исследованиям с использованием команды Conformation search в Hyperchem, в которых торсионные углы основной цепи менялись случайным образом и полученные структуры вновь минимизировались по энергии. Уникальные низкоэнергетические конформации, в которых среднеквадратичное отклонение  $\alpha$ - и β-углеродных атомов от соответствующих атомов природного трипептида было меньше 0.4Å использовались для дальнейшей работы. Визуальное моделирование дало 57 циклопептидов. Минимизация энергии уменьшила их число до 9, конформационный анализ и сравнение с природным трипептидом оставили 2 пептида, 6-аминогексаноилсодержащий тетрапептид (цикло-(Ahx-Lys-Lys-Arg)) и D-Pro – содержащий пентапептид (цикло-(*D*-Pro-Ala-Lys-Lys-Arg)) (рисунок 19). Оба были синтезированы твердофазным пептидным синтезом с последующей циклизацией в растворе.



цикло-(D-Pro-Lys(C14H29CO)-Lys-Lys-Arg)

Рисунок 19 – Циклические тетра- и пентапептидные миметики BDNF [62, 63]

Наиболее активным соединением по выживаемости сенсорных нейронов В экспериментах на культуре 8-дневных куриных эмбрионов был циклопентапептид, который давал 38% от активности BDNF при  $10^{-6}$  M и 68% при  $10^{-4}$  M. Он увеличивал эффект BDNF и не проявлял активности на NGF-зависимой культуре нейронов. Этот пептид не влиял на TrkB и его низлежащий путь сигналинга (МАРК), что было показано методом Вестерн-блот-анализа. Его взаимодействие с р75 рецептором подтверждается тем, что он способствует миелинизации периферических нервных волокон in vitro и in vivo [221]. Известно, что в этом процессе участвует р75 рецептор, тогда как активация TrkB ингибирует миелинизацию. Эксперименты in vitro проводились на культуре NGF-зависимых нейронов дорсального корневого ганглия (DRG) новорожденных крыс Спрег-Доули (P2S/D). Миелинизацию определяли Вестерн-блот-анализом с помощью моноклональных антител к гликопротеину, ассоциированному с миелином (MAG) и к основному белку миелина (МВР) и гистохимически. Пептид был активен в концентрациях 10-<sup>8</sup> - 10<sup>-7</sup> М. В то же время ни циклопентапептид, ни BDNF не были активны на DRG нейронах

трансгенных мышей ир75NTR -/-. Это показывает, что экспрессия p75 абсолютно необходима для промиелинизирующего действия как BDNF, так и цикло-*D*PAKKR. Эксперименты *in vivo* проводились на крысах Спрег-Доули путем подкожной инъекции 3.2 мкг цикло-*D*PAKKR с последующим извлечением седалищного нерва и определением экспрессии основного регулятора миелинизации NRG1-type III, а также MAG и MBP методом Вестерн-блот-анализа. Было показано, что циклопентапептид увеличивал экспрессию NRG1-type III и миелинизацию, в то время как BDNF был неактивен. Цикло-*D*PAKKR или подобные ему соединения, которые усиливают миелинизацию селективно через p75 рецептор, могут быть использованы для лечения периферических демиелинизнирующих заболеваний.

Для улучшения фармакокинетических свойств цикло-(*D*-Pro-Ala-Lys-Lys-Arg) был гидрофобизован путем замены Ala на Lys и введения н-алкилацильной группы по  $\omega$ -аминогруппе этого лизина [63] (рисунок 19). Эффективная концентрация пентадеканоильного производного цикло-*D*PKKKR *in vitro* уменьшилась на 2 порядка (pEC<sub>20BDNF</sub> = 9.1), увеличилась его стабильность в плазме крыс и способность проникать через модельные биологические мембраны.

В отличие от пентапептида, трициклический димерный пептид 6 (получивший в дальнейшем шифр TDP-6) (рисунок 17), селективно активирующий TrkB рецептор, усиливает миелинизацию центральных нейронов (0.1 - 100 нМ in vitro) [220]. С использованием мутантных олигодедроцитов с дефицитом TrkB рецепторов в экспериментах in vitro было подтверждено, что действие TDP6 опосредовано этими рецепторами. Пептид TDP6 стимулировал миелинизацию нейронов головного мозга и в экспериментах *in vivo* [64]. Так, на модели купризон-индуцированной демиелинизации у мышей (модель рассеянного склероза) TDP6 при внутримозговом введении усиливал ремиелинизацию, способствовал дифференцировке олигодендроцитов, увеличивал число миелинизированных аксонов и увеличивал толщину миелиновых оболочек. При этом BDNF в тех же условиях только увеличивал толщину миелиновых оболочек. TrkB-зависимый механизм действия соединения ТDР6 был подтвержден с использованием трансгенных мышей с дефицитом TrkB. Свойства, продемонстриованные TDP6 могут быть полезны при лечении такого заболевания, как рассеянный склероз.

## 2.7.2 Непептидные аналоги 2-й петли BDNF

Группа Лонго [136] разработала непептидные аналоги 2-й петли BDNF, исходя из данных [94, 95] о важности участка -Ser<sup>45</sup>-Lys<sup>46</sup>-Gly<sup>47</sup>-Gln<sup>48</sup>-Leu<sup>49</sup>- для проявления активности нейротрофина, полученных с помощью химерных белков NGF/BDNF. На основе пространственной структуры этого участка Лонго постулировал фармакофорную гипотезу, которая была использована для виртуального скрининга. Постулированный фармакофор имел

35 конформеров, для каждого из них был осуществлен скрининг *in silico* более миллиона доступных соединений из библиотек Asinex, AMRI, Interbioscreen, Sigma-Aldrich, Timtec, Chemstar. Виртуальный скрининг дал 1855 кандидатов, которые совмещались с конформером фармакофора со свободной энергией менее 10 ккал/моль. Это количество было уменьшено до 14 на основе таких критериев, как отсутствие объема, который мог бы мешать взаимодействию с рецептором, наличия гибкости молекулы, молекулярного веса между 500 и 650 Да, и критериев Липинского. Соединения, находящиеся на границе этих критериев и с трудом налагающиеся на фармакофор, были исключены. 7 из этих соединений были коммерчески доступны и для них был проведен анализ *in vitro* на гиппокампальных нейронах мыши E16. Нейротрофической активностью обладали четыре из них, получившие шифры LM22A-1, LM22A-2, LM22A-3 и LM22A-4 (рисунок 20). Они показывали эффект в 80-89% от активности BDNF, EC<sub>50</sub> от 200 до 500 пМ.



Рисунок 20 – Непептидные миметики 2-й петли BDNF с агонистической активностью [136]

Все соединения проявили себя как селективные частичные агонисты TrkB рецепторов, что было показано ингибиторным анализом с K252a и Вестерн-блот анализом TrkB<sup>Y490</sup>p на клетках, экспрессирующих только TrkB или TrkA или TrkC. Отобранное благодаря простоте структуры и возможности модернизации, соединение 4-(три(оксиэтиламид)-1,3,5бензолтрикарбоновой кислоты) было активно на клеточных моделях болезней Альцгеймера, Хантингтона и Паркинсона в концентрации 0.5 мкМ. Соединение LM22A-4 в дозе 3.4 мкг при двухнедельном интраназальном введении способствовало восстановлению моторных функций после экспериментальной травмы мозга у крыс.

На модели коркового посттравматического эпилептогенеза у крыс LM22A-4 (50 мг/кг, в/б, 2 недели) значительно усиливал ингибирующую ГАМК-ергическую трансмиссию и снижал выраженность судорог, индуцированных пентилентетразолом [78]. LM22A-4 был эффективен и на мышиной модели детской черепно-мозговой травмы [65]. При интраназальном 2-недельном введении после экспериментальной травмы соединение корректировало дефицит миелина в примыкающих к повреждению тканях, потерю объема ткани и степень реактивного глиоза, а также снижало тревожность мышей.

LM22A-4 при внутримозговом введении мышам (0.5·10<sup>-4</sup> M, 1 неделя) на модели рассеянного склероза, индуцированного хелатором меди купризоном, способствовал ремиелинизации, увеличивая толщину миелиновой оболочки и плотность олигодендроцитов в мозолистом теле [151]. LM22A-4 (0.5 мг/мл, интраназально) проявлял терапевтические эффекты при начале хронического введения через 3 дня после моделирования гипоксически-ишемического повреждения головного мозга у мышей [83], улучшая восстановление двигательных функций и усиливая нейрогенез.

На модели постишемических неонатальных судорог у мышей, не восприимчивых к терапии фенобарбиталом, LM22A-4 при внутрибрюшинном введении (0.25 мг/кг) как до, так и после моделирования ишемии, значительно снижал частоту и продолжительность судорожных припадков [110]. Эти эффекты сопровождались снижением фосфорилирования TrkB по сайту Y<sup>816</sup>, который опосредует постишемическую гипофункцию ионного транспортера КСС2 через активацию PLCγ.

Для LM22A-4 в экспериментах *ex vivo* с использование изолированных брыжеечных артерий крыс был показан вазодилатирующий эффект [203]. С помощью ингибиторного анализа было установлено, что этот эффект опосредован TrkB и PI3K/AKT, но не MAPK/ERK. Агонист TrkB LM22A-4 проявлял положительные эффекты на моделях передней ишемической нейропатии зрительного нерва, значительно увеличивая выживаемость ганглиозных клеток сетчатки в экспериментах *in vitro* [15].

Кроме того, японские исследователи из Хиросимского университета (Япония) показали [106], что LM22A-4, аналогично BDNF, регулирует дифференцировку цементобластов, которая осуществляется через TrkB-ERK/AKT сигнальный каскад. Это может дать новый лекарственный способ регенерации периодонтальной ткани и лечения пародонтоза.

Было показано, что соединение LM22A-4 эффективно на моделях синдрома Ретта в экспериментах *in vitro* (0.5 мкМ) и *in vivo* (150 мг/кг, однократно в/б, мыши) [120, 136]. В исследовании [125] было показано, что LM22A-4 при хроническом введении (50 мг/кг, в/б)

мышам с генетической моделью синдрома Ретта корректировал гиппокампальную дисфункцию, оказывая когнитотропные эффекты и восстанавливая нарушенную долговременную потенциацию (LTP).

Другой низкомолекулярный частичный агонист TrkB PTX-BD4-3, являющийся метилированным аналогом LM22A-4 (рисунок 21), на генетической модели синдрома Ретта у мышей при хроническом в/б введении (5 мг/кг) корректировал дыхательные и двигательные нарушения.

Группой Лонго с помощью сочетания *in silico* и *in vitro* скринингов было найдено соединение LM22B-10 (рисунок 21), которое проявило свойства низкомолекулярного агониста не только TrkB, но и TrkC рецептора. В микро-наномолярных концентрациях LM22B-10 проявляет нейропротекторные и дифференцирующие свойства в экспериментах *in vitro* [225]. На модели естественного старения у мышей LM22B-10 при интраназальном введении активировал TrkB и TrkC в гиппокампе и стриатуме, а также увеличивал плотность дендритных шипиков гиппокампа.



Рисунок 21 – Соединения РТХ-ВD4-3 (метилированное производное LM22A-4) и LM22B-10 - агонисты TrkB рецептора [225]

## 2.7.3 Линейные тетрапептидные миметики BDNF

Нью-Йоркского Группа исследователей государственного ИЗ института нарушений фундаментальных исследований развития получила 5 терапевтически перспективных тетрапептидов В1-В5 (рисунок 22), соответствующих последовательностям а.к.о. 6-9, 71-74, 94-97, 72-75, 115-118 BDNF человека [40]. Пептидные последовательности были выявлены как эпитопы моноклональных антител к активным сайтам BDNF. Для того, чтобы блокировать заряды концевых аминокислот, пептиды были ацилированы по *N*-концу и амидированы по C-концу: B1 (Ac-RRGF-NH<sub>2</sub>), B2 (Ac-IDKR-NH<sub>2</sub>), B3 (Ac-SKKR-NH<sub>2</sub>), B4 (Ac-И B5(H-IKRG-NH<sub>2</sub>). Bce пептиды  $DKRH-NH_2$ ) вызывали умеренную активацию (фосфорилирование по Y<sup>706</sup>) TrkB рецептора, которая блокировалась K252a, ингибитором семейства Trk.



Рисунок 22 - Линейные тетрапептидные миметики BDNF с агонистической активностью [40]

Наиболее активными были пептиды ВЗ и В5, которые работали как частичные агонисты/антагонисты BDNF. Они увеличивали выживаемость мышиных первичных нейронов E18 гиппокампа (0.1-1 мкМ) и стимулировал экспрессию нейрональных маркеров MAP2, β-III тубулина, NTM и NeuN аналогично BDNF в концентрации 0.8 нМ. В отличие от В5, ВЗ потенцирует нейропротекторные эффекты BDNF на модели окислительного стресса. Авторы предполагают, что ВЗ может иметь дополнительный сигналинг, отличный от такового BDNF, активируя и другие рецепторы, нежели TrkB. Авторы делают вывод, что эти пептиды более перспективны как лекарственные препараты, чем димерные циклические пептиды Хьюза, поскольку имеют меньший молекулярный вес и могут легче проникать через биологические барьеры и более перспективны, чем непептидные миметики Лонго, так как метаболизируются до природных аминокислот.

# 2.7.4 Пептидные миметики, содержащие последовательности 3-й и 4-й петель BDNF

Группой ученых из Копенгагенского университета (Дания) [66, 223] на основе последовательности а.к.о. BDNF, сконструированы и синтезированы два пептидных лиганда рецепторов TrkB и p75 – ундекапептид бетрофин 3 (Betrofin 3, RGIDKRHWNSQ, остатки 69-79), содержащий фрагмент 3-й петли нейротрофина (R<sup>69</sup>GIDKRHW<sup>76</sup>) и гептадекапептид бетрофин 4 (Betrofin 4, SYVRALTMDSKKRIGWR, остатки 85-101), содержащий последовательность 4-й петли (M<sup>92</sup>DSKKRI<sup>98</sup>) (рисунок 23). По мнению авторов 3-я и 4-я петли являются наиболее экспонированными в растворе и важны для связывания нейротрофина с рецептором. Для контроля в экспериментах использовали бетрофины с рандомизированной структурой, в которой а.к.о. были переставлены – Бетрофин 3R (SIRRDWQGHNK), так и Бетрофин 4R (KDWSRGRYKATVSCRMI).





(а) - приведены вторичная и первичная последовательности а.к.о. BDNF. Зеленым выделена последовательность бетрофина 3, красным – бетрофина 4. Представлены петли (L3 и L4) и бета-тяжи (ß3 и ß4, выделены жирными стрелками).

(б) – приведена третичная структура протомера BDNF, обозначены петли (1-4-я).

Методом поверхностного плазмонного резонанса было установлено, что оба бетрофина связываются и с TrkB, и с p75 рецепторами с аффиностью примерно в 1000 раз ниже BDNF. Бетрофин 3 имеет следующие константы связывания –  $K_d$  (TrkB) =  $1.8 \cdot 10^{-6}$  M,  $K_d$  (p75) =  $4 \cdot 10^{-7}$  M), Бетрофин 4 -  $K_d$  (TrkB) =  $1.3 \cdot 10^{-6}$  M,  $K_d$  (p75) =  $2.1 \cdot 10^{-6}$  M. В этом же эксперименте BDNF -  $K_d$  (TrkB) =  $5.4 \cdot 10^{-10}$  M,  $K_d$  (p75) =  $8.7 \cdot 10^{-10}$  M, полученные значения  $K_d$  согласуются с ранее опубликованными [44, 213].

В *in vitro* экспериментах на первичной культуре гранулярных нейронов мозжечка (CGN) бетрофин 3 и бетрофин 4 в концентрациях 3-9 мкМ стимулировали рост нейритов и способствовали выживаемости клеток, вероятно, за счет активации сигнальных путей АКТ и МАРК. Нейритогенный эффект пептидов частично подавлялся BDNF, который сам не индуцирует рост нейритов в условиях эксперимента (в диапазоне концентраций 1–100 нг/мл).

Для изучения связи структура - нейритогенное действие были получены пептиды на основе бетрофинов с укороченной пептидной цепью как с *N*-конца (п-усечения), так и *C*-конца (с-усечения) (рисунок 24).





Время дифференцировки 24 ч, концентрация пептидов 9 мкМ. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 по сравнению с клетками, обработанными бетрофинами 3 или 4 (one-way, ANOVA, тест Бонферрони) [66].

Результаты исследования укороченных пептидов на основе бетрофина 3 показали, что отсутствие первых двух аминокислот (R и G, усечения n1 и n2) не влияло на вызываемый пептидом рост нейритов, но значительное снижение нейритогенного ответа по сравнению с полноразмерным бетрофином наблюдалось для усечений n3-n5 (DKRHWNSQ, KRHWNSQ и RHWNSQ). Для укороченных по C-концу пептидов эффект пропадал для c2- и c4-усеченных пептидов (RGIDKRHWN и RGIDKRH). Интересно отметить, что c3-усеченный пептид (RGIDKRHW) сохранял нейритогенную активность. C5-усеченный пептид был нерастворим и поэтому не изучался. Пептиды n1-n3 на основе бетрофина 4 проявляли нейритогенный эффект как и полноразмерный бетрофин 4, эффект пропадал у пептида n-4 (DSKKRIGWR). Усеченные пептиды c1 и c2 были активны, в случае еще более короткого c3 (SYVRALTMDSKALTMD) эффект пропадал, вновь проявляясь у пептида c4 (SYVRALTMD) (рисунок 24).

Биохимическое изучение бетрофина 3 и бетрофина 4 показало, что оба пептида вызывают фосфорилирование киназ АКТ и ERK. Наиболее эффективная концентрация, при которой активируются оба сигнальных пути TrkB, для бетрофина 3 составляла 27 мкг/мл, для бетрофина 4 - 27 мкг/мл (для AKT) и 9 мкг/мл (для ERK). Бетрофины с рандомизированной структурой не оказывали влияния на рост нейритов, не активировали TrkB, АКТ и ERK. Таким образом, продемонстрированные эффекты бетрофинов делают их привлекательными в качестве фармакологического инструмента для изучения роли BDNF в нормальном и патологическом состояниях.

# 2.7.5 Пептидные агонисты и антагонисты TrkB на основе *N*-концевых участков BDNF и NT-4

Группой Вильямса [217] из центра Вольфсона по возрастным заболеваниям при Королевском колледже (Лондон, Великобритания) на основе данных о кристаллической

структуре комплекса NT-4:TrkB [23] были сконструированы пептидные агонисты и антагонисты BDNF. В структуре NT-4 авторы определили пептидную последовательность - SRRGELA-, которая участвует в связывании с функциональным сайтом рецептора TrkB. К этой пептидной последовательности были присоединены с обоих концов остатки цистеина, которые образовывали циклическую структуру пептида за счет дисульфидного мостика, N-конец полученного циклопептида был проацилирован остатком уксусной кислоты, а C-конец амидирован, таким образом получали соединение Ac-<u>CSRRGELAC</u>-NH<sub>2</sub> (рисунок 25). Конформационно ограниченный циклический пептидный миметик связывался с TrkB и действовал как антагонист, препятствую нейротрофинам BDNF и NT-4 активировать рецептор [217].



Рисунок 25 – Конформационно ограниченные циклопептиды: а - мономерный, б - димерный (шифр BAG) [217]

Используя тот же структурный мотив, был сконструирован агонист TrkB. Пептидная последовательность -SRRGELA- была удвоена, при этом во втором фрагменте остаток Ala был перенесен в начало цепочки, по обоим концам вновь остатки цистеина, воспроизводящие циклическую структуру, *N*-конец ацетилирован, а С-конец амидировован \_ Ac-CSRRGELAASRRGELC-NH2 (шифр BAG) (рисунок 25). Предварительная гипотеза авторов заключалась в том, что пептид может взаимодействовать с рецептором и стабилизировать его активную димерную форму [217]. В культуре нейронов мозжечка 3Т3, растущих с низкой плотностью в монослое в течение 16-17 ч, BAG дозозависимо стимулировал рост нейритов с максимальным эффектом в концентрации 10 мкг/мл (~ 6.10<sup>-6</sup> М), по выраженности сравнимым с действием самих нейротрофинов BDNF и NT-4. Эффекты BAG как и BDNF полностью подавлялись ингибитором Trk-рецепторов K252a и ингибитором PI3K LY294002. Эти данные подтверждали точку зрения, что BDNF и BAG стимулируют рост нейритов путем активации общего TrkB-зависимого сигнального каскада в нейронах мозжечка.

Внимание другой группы исследователей под руководством Травальи [204] из Университета Катании (Италия) привлек *N*-концевой участок нейротрофина BDNF. Выбор участка цепи нейротрофина  $H^1$ SDPARRGELSV<sup>12</sup> (пептид HSDPARRGELSV-NH<sub>2</sub> под шифром BDNF(1-12)) основывался на данных о важной роли этого участка в связывании с доменом d5 рецептора Trk, который, как считается, имеет критическое значение в специфичном связывании нейротрофинов [97, 164]. Представлены также ацетилированный по *N*-концу амид пептида Aс-

HSDPARRGELSV-NH<sub>2</sub> (шифр Ac-BDNF(1-12)) и пептид, в структуре которого остаток  $Asp^3$  заменен аспарагином (шифр BDNF(1-12)D3N) (рисунок 26). Компьютерное моделирование связывания пептидов с доменом 5 рецептора TrkB показало, что их расположение аналогично расположению *N*-концевого фрагмента NT-4 (PDB ID: 1hcf).



R = H, R' = OH	HSDPARRGELSV-NH2	BDNF(1-12)
R = Ac, R' = OH	Ac-HSDPARRGELSV-NH2	Ac-BDNF(1-12)
$R = H_1 R' = NH_2$	HSNPARRGELSV-NH <sub>2</sub>	BDNF(1-12)D31

Рисунок 26 – Линейные додекапептиды на основе *N*-концевого фрагмента BDNF [204]

Пептиды были изучены на пролиферативную активность на культуре клеток нейробластомы SHSY5Y. Установлено, что все пептиды в концентрации 10<sup>-7</sup> М проявляют пролиферативную активность, также как и нейротрофин BDNF. Авторы отмечают, что как ацетилированная форма BDNF(1-12), так и однозамещенный BDNF(1-12)D3N проявляют более выраженный эффект в сравнении с BDNF(1-12), структура которого максимально имитирует концевой фрагмент нейротрофина. По-видимому, это связано с различной гидрофобностью и распределением заряда в молекуле пептида и, по мнению авторов, эти факторы настраивают различные внутримолекулярные и/или межмолекулярные взаимодействия с рецептором TrkB, что приводит к разному биохимическому сигналингу.

### 2.7.6 Ди- и тригидроксифлавоны - агонисты TrkB рецептора

Соединение 7,8-дигидроксифлавон (7,8-DHF) (рисунок 27) - низкомолекулярный (254 Da) агонист TrkB, который в настоящее время разрабатывается в качестве потенциального антидепрессанта исследовательской группой из Университета Эмори (Атланта, США) [128, 232]. 7,8-DHF был отобран из 2000 биологически активных соединений из Spectrum Collection Library. Первоначально, 66 соединений, мишенью которых могли быть TrkB рецепторы или их пострецепторные пути, были отобраны на основе *in vitro* скрининга нейропротекторной активности с использованием клеток, экспрессирующих TrkB [100]. Пять из них были производными флавона (рисунок 27).



Рисунок 27 – Структуры производных флавона, отобранные *in vitro* скринингом [100]

Наибольшей активностью обладал 7,8-DHF (в диапазоне концентраций 10 - 250 нМ). Это соединение продемонстрировало в экспериментах *in vitro* на трансфецированных мышиных клетках TrkB T48 в условиях кислородно-глюкозной депривации даже более выраженные защитные эффекты, чем BDNF. 7,8-DHF также продемонстрировал нейропротекторную активность на первичной культуре человеческих нейронов в условиях окислительного стресса [100]. Методом поверхностного плазмонного резонанса было показано, что 7,8-DHF является агонистом TrkB с K<sub>d</sub> ~ 15.4 нМ [129]. С использованием иммунофлуоресцентного анализа и Вестерн-блота было показано, что 7,8-DHF, в отличие от других производных флавона, вызывает фосфорилирование TrkB в гиппокампальных нейронах. 7,8-DHF также активировал AKT и ERK1/2. Эти результаты были подтверждены ингибиторным анализом. Фосфорилирование TrkB под действием 7,8-DHF блокировалось ингибитором Trk рецепторов K252a. Нейропротекторная активность 7,8-DHF in vitro в значительной степени блокировалась ингибиторами МЕК или PI3К.

7,8-DHF проявил активность в ряду *in vivo* моделей неврологических и психических заболеваний, таких как болезнь Паркинсона [131], Хантингтона [68] и Альцгеймера [45, 234] рассеянный склероз [133], синдром Дауна [199], синдром Ретта [104], шизофрения [227], ишемический инсульт [211] и травма мозга [235].

Исследователи из Университета Эмори синтезировали аналог 7,8-DHF - 4'диметиламино-7,8-дигидроксифлавон (4'-DMA-7,8-DHF), превосходящий природный 7,8-DHF в способности активировать TrkB [128] (рисунок 28).



Рисунок 28 – Структура 4'-диметиламино-7,8-дигидроксифлавона (4'-DMA-7,8-DHF) [128]

В работе [103] было показано, что 7,8-DHF и его синтетическое производное 4'-DMA-7,8-DHF оказывали значительные нейропротекторные эффекты на генетической модели болезни Хантингтона у мышей линии N171-82Q. Хроническое пероральное введение через желудочный зонд 7,8-DHF (5 мг/кг) или 4'-DMA-7,8-DHF (1 мг/кг) корректировало двигательные нарушения, уменьшало выраженность атрофии головного мозга и увеличивало выживаемость мышей линии N171-82Q.

У соединения 7,8-DHF были выявлены антидепрессивные свойства. На модели хронического умеренного стресса у мышей 7,8-DHF (10-20 мг/кг, в/б, 28 дней) ослаблял агедонию в тесте предпочтения раствора сахара, восстанавливал сниженный уровень фосфорилирования TrkB и активировал экспрессию синаптических маркеров PSD95 и синаптофизина [232]. При хроническом введении 7,8-DHF (5 мг/кг, перорально, 21 день) значительно увеличивал пролиферативную активность нейрональных стволовых клеток в зубчатой извилине гиппокампа у взрослых мышей [128].

В поисках аналога 7,8-DHF, способного еще сильнее активировать TrkB рецептор и обладающего лучшими фармакокинетическими характеристиками *in vivo*, группа под руководством Йе (Ye) провела исследование взаимосвязи структура – активность, которое показало, что 7,8,3'-тригидроксифлавон (THF) (рисунок 29) увеличивает содержание фосфорилированной формы TrkB (pTrkB) в 2-3 раза, по сравнению с 7,8-DHF [228].



Рисунок 29 – Структура 7,8,3'-тригидроксифлавона [228]

Флавон ТНГ проявлял терапевтические эффекты на моделях нейросенсорной тугоухости [228]. Так, в экспериментах *in vitro* ТНГ защищал нейроны спирального ганглия от гибели, вызванной повреждением волосковых клеток, индуцированным гентамицином, с эффектом, сравнимым с эффектом BDNF. С помощью ингибиторного анализа было установлено, что этот

эффект ТНF опосредован TrkB. В другой работе было показано, что нейропротекторные эффекты THF на данной модели сопряжены с увеличением фосфорилирования TrkB и ERK1/2 [229]. На *in vitro* модели токсичности, вызванной анестетиком бупивакаином, THF в концентрациях 50-1000 нМ дозозависимо увеличивал выживаемость нейронов ганглиев задних корешков спинного мозга и предупреждал дегенерацию их нейритов, эти эффекты положительно коррелировали с увеличением фосфорилирования TrkB [193].

## 2.7.7 Дезоксигедунин - агонист TrkB рецептора

Исследовательской группой из Университета Эмори [99] с помощью *in vitro* скрининга, на ряду с 7,8-DHF было найдено 4 агониста TrkB, которые оказались производными гедунина, природного тетранортритерпеноида, который был выделен из индийского дерева *Azadirachta indica* [99]. Наиболее активным соединением из этой группы оказался Дезоксигедунин (рисунок 30).



Рисунок 30 – Структура дезоксигедунина [99]

Дезоксигедунин эффективен при системном введении, включая пероральное. Установлено, что дезоксигедунин предотвращает дегенерацию вестибулярного ганглия у детенышей трансгенных BDNF -/- мышей. Для дезоксигедунина продемонстрированы антидепрессант-подобные и когнитотропные эффекты. TrkB-зависимый механизм действия дезоксигедунина был подтвержден *in vitro* и *in vivo* с использованием нейрональных культур, лишенных TrkB и трансгенных мышей с дефицитом этого рецептора.

Для дезогсигедунина были показаны терапевтические эффекты на моделях болезни Паркинсона у грызунов [152]. Соединение (5 мг/кг, в/б, 2 недели) оказывало нейропротекторные эффекты в отношении дофаминергических нейронов и значительно улучшало двигательные функции у крыс с гемипаркинсонизмом, индуцированным введением 6 -гидроксидофамина в стриатум, и у мышей с паркинсоническим синдромом, индуцированным внутрибрюшинным введением 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МРТР).

На модели болезни Альцгеймера у крыс, вызванной введением *D*-галактозы и AlCl<sub>3</sub>, дезоксигедунин противодействовал нарушению пространственной памяти в водном лабиринте Морриса, препятствовал накоплению *B*-амилоида и гиперфосфорилированного белка тау в головном мозге, способствовал снижению окислительного стресса [46]. При этом было установлено, что дезоксигедунин полностью восстанавливал сниженное фосфорилирование TrkB, AKT и ERK1/2 в гиппокампе крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера, что свидетельствует о TrkB-опосредованном действии соединения. Показано [58], что дезоксигедунин при хроническом в/б введении способствует регенерации аксонов и реиннервации мышц в условиях повреждения периферических нервов у мышей.

Таким образом, для конструирования миметиков BDNF использовались данные по сайтнаправленному мутагенезу и химеризации NGF/BDNF, поиск среди эпитопов моноклональных антител к активным участкам BDNF, рандомизированный скрининг среди химических библиотек на основе фармакофора, предложенного в результате анализа данных сайтнаправленного мутагенеза, скрининг по библиотеке биологически активных природных соединений, рентгеноструктурные данные по *N*-концевому участку цепи BDNF. Подходы, используемые для создания низкомолекулярных миметиков BDNF представлены в таблице 1.

В таблице 2 представлены данные о фармакологических свойствах наиболее активных низкомолекулярных миметиках нейротрофина BDNF.

Таблица 1- Подходы к конструированию миметиков BDNF

Соединение		Полхол к конструированию	Механизм лействия	
Шифр	Структура			
TDP6	Ac-CVPVCKGQLCE-NH2 Ac-CVPVCKGQLCK-NH2	Получение димерных гомо- и гетероциклических пептидов на основе последовательности а.к.о. 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF с помощью дисульфидных мостиков [158].	Агонист TrkB	
Betrofine 3, Betrofine 4	H-SIRRDWQGHNK-OH H-KDWSRGRYKATVSCRMI-OH	Получение линейных мономерных пептидов на основе а.к.о. 3-й и 4-й петель BDNF как наиболее экспонированных фрагментов структуры нейротрофина. [66].	Агонисты TrkB, лиганды p75	
Цикло- <i>D</i> PAKKR	H <sub>2</sub> N H <sub>3</sub> C H <sub>3</sub> C H <sub>1</sub> C H <sub>1</sub> H <sub>1</sub> H <sub>1</sub> H <sub>1</sub> H <sub>1</sub> H <sub>1</sub> H <sub>1</sub> H <sub>1</sub>	Конструирование циклопептидов на основе данных сайт-направленного мутагенеза о ключевой роли трипептидной последовательности -Lys-Lys-Arg- 4-й петли BDNF во взаимодействии с рецептором p75 [62].	Лиганд р75	
B1 - B5	Ac-RRGF-NH <sub>2</sub> Ac-IDKR-NH <sub>2</sub> Ac-SKKR-NH <sub>2</sub> Ac-DKRH-NH <sub>2</sub> H-IKRG-NH <sub>2</sub>	Использование эпитопов моноклональных антител к активным сайтам BDNF [40].	Частичные агонисты/антагонисты BDNF	

LM22A-4	HO NH HN OH	Рандомизированный скрининг среди химических библиотек на основе фармакофора, предложенного в результате анализа данных сайт-направленного мутагенеза (2-я петля BDNF) [136].	Агонист TrkB
7,8-DHF	HOLO	Скрининг по библиотеке биологически активных природных соединений [232].	Агонист TrkB
Дезоксигедунин		Скрининг по библиотеке биологически активных природных соединений [99].	Агонист TrkB
BAG, Ac-BDNF(1-12)	Ac-CSRRGELAASRRGELC-NH2 Ac-HSDPARRGELSV-NH2	Конструирование на основе пептидной последовательности <i>N</i> -концевого участка BDNF. Конструирование на основе рентгеноструктурных данных о структурной близости <i>N</i> -концевых участков BDNF и NT-4 к домену связывания нейротрофина TrkB-d5 [204].	Агонисты TrkB

Фармакологические свойства		
In vivo		
ферической миелинизации		
21].		
дели синдрома Ретта (150		
20, 136].		
делях посттравматического		
ыс (50 мг/кг, в/б, 2 недели)		
роза у мышей (0.5·10 <sup>-4</sup> М,		
еделя) [78, 151].		
иях болезней Паркинсона		
[13] и Альцгеймера [12, 45]		
эза [133], синдрома Дауна		
та [104], шизофрении [227],		
льта [211].		
активность на мышах (5		
рорально) [128].		

Таблица 2- Фармакологические свойства наиболее перспективных низкомолекулярных миметиков BDNF

#### 2.8 Заключение

Как было показано, BDNF является перспективной терапевтической мишенью. Однако применение нативного нейротрофина в клинике ограничено его неудовлетворительными фармакокинетическими свойствами: нестабильностью в биологических жидкостях, низкой способностью проникать через ГЭБ, а также плейтропностью. Эти проблемы могут быть решены с помощью низкомолекулярных миметиков BDNF.

На сегодняшний день в мире созданы как непептидные, так и олигопептидные миметики. Преимуществом коротких пептидов, в основном ди-трипептидов, по сравнению с олигопептидами является их способность проникать через биологические барьеры как за счет пассивного, так и активного транспорта. Коротким пептидам, особенно дипептидам, присуща повышенная энзиматическая стабильность, дающая возможность перорального использования. Это позволяет в ряде случаев создавать на их основе перорально активные лекарственные препараты. В связи с важностью коротких физиологически активных пептидов как основы для создания нового поколения лекарственных веществ развитие новых подходов к их поиску представляется актуальным.

В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова на основе оригинальной гипотезы о том, что фармакофорными участками нейротрофинов являются центральные дипептидные фрагменты бета-изгибов петлеобразных структур полипептидной цепи, была разработана новая технология создания низкомолекулярных миметиков нейротрофинов – дипептидных агонистов Trkрецепторов. С ее помощью были созданы дипептидные миметики NGF [3, 9, 80]. Данная работа посвящена развитию этого оригинального подхода и созданию фармакологически активных дипептидных миметиков нейротрофина BDNF.

# 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

# 3.1 Дизайн и синтез дипептидных миметиков нейротрофина BDNF

# 3.1.1 Дизайн

Считается, что, подобно другим членам нейротрофинового семейства, BDNF представляет собой симметричный гомодимер, мономерные единицы которого содержат 7 бетатяжей, 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, включающих обратный бетаповорот (остатки 72—75) [184].



Рисунок 31 - Структура гетеродимера BDNF/NT-3 (PDB ID: 1bnd) [184]

Указано положение бета-изгибов петель 1, 2, 4 мономера BDNF.

В связи с отсутствием кристаллической структуры гомодимера, при конструировании миметиков BDNF мы основывались на кристаллической структуре гетеродимера BDNF/NT-3 (PDB ID: 1bnd [184]) (рисунок 31). 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 -Asp<sup>30</sup>-Met<sup>31</sup>-Ser<sup>32</sup>-Gly<sup>33</sup>-, -Val<sup>44</sup>-Ser<sup>45</sup>-Lys<sup>46</sup>-Gly<sup>47</sup>- и -Asp<sup>93</sup>-Ser<sup>94</sup>-Lys<sup>95</sup>-Lys<sup>96</sup>-. В свою очередь, наиболее экспонированное и, следовательно, предположительно геометрически наиболее выгодное для взаимодействия с рецептором положение занимают центральные дипептидные фрагменты бета-изгибов этих петель: -Met<sup>31</sup>-Ser<sup>32</sup>-, -Ser<sup>45</sup>-Lys<sup>46</sup>-, - Ser<sup>94</sup>-Lys<sup>95</sup>-. Поэтому в качестве основы для моделирования были выбраны последовательности

этих бета-изгибов, и их центральные фрагменты были нами полностью сохранены.

Для воспроизводства активной конформации миметики петель нейротрофинов обычно получают путем ковалентной циклизации их фрагментов. Мы использовали оригинальный подход, апробированный в нашей лаборатории ранее при получении дипептидных миметиков фактора роста нервов [3] и состоящий в получении амидов *N*-ацилдипептидов, которые в растворе часто воспроизводят конформацию бета-изгиба, стабилизированную внутримолекулярной водородной связью [2].

Таким образом, в структуре миметиков сохраняли центральный дипептидный фрагмент бета-изгиба, предшествующий аминокислотный остаток заменяли его биоизостером. Так, остатки Asp<sup>30</sup> и Asp<sup>93</sup> заменяли остатком янтарной кислоты (HO-Suc-), остаток Val<sup>44</sup> на остаток гексановой (капроновой) кислоты. Последующий за дипептидным фрагментом остаток заменяли амидной группой. Цели эти двух замен — стабилизация конформации β-изгиба, увеличение устойчивости соединения к действию пептидаз, а также удешевление синтеза. В результате были сконструированы мономерные дипептидные миметики β-изгибов петель BDNF, представленные в таблице 3.

Миметик	Химическое название	Структура	№ соединения	Шифр
β-изгиба	Амид <i>N</i> -моносукцинил-	HO-Suc-Met-Ser-NH <sub>2</sub>	3	ГСБ-207
1-й петли	<i>L</i> -метионил- <i>L</i> -серина			
β-изгиба	Амид <i>N</i> -моносукцинил-	HO-Suc-Ser-Lys-NH <sub>2</sub>	25	ГСБ-104
4-й петли	<i>L</i> -серил- <i>L</i> -лизина			

Таблица 3 - Мономерные дипептидные миметики BDNF

Основываясь на данных о взаимодействии нейротрофина BDNF с TrkB-рецептором в гомодимерной форме, два миметика β-изгиба соответствующей петли были димеризованы хвост-к-хвосту гекса- или гептаметилендиаминовым спейсером (рисунки 32-34).



Рисунок 32 - Конструирование дипептидного миметика 1-ой петли BDNF ГСБ-214 – гептаметилендиамида *бис-(N*-моносукцинил-*L*-метионил-*L*-серина)



Рисунок 33 - Конструирование дипептидного миметика 2-ой петли BDNF ГТС-201 – гексаметилендиамида *бис-(N*-гексаноил-*L*-серил-*L*-лизина)



Рисунок 34 - Конструирование дипептидного миметика 4-ой петли BDNF ГСБ-106 – гексаметилендиамида *бис-(N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина)

Таким образом, были сконструированы три димерных дипептидных миметика BDNF, представленные в таблице 4.

Димерный дипептидный миметик бета-изгиба	Химическое название	Структура	№ соедине- ния	Шифр
1-х петель	Гептаметилендиамид бис-( <i>N</i> -моносукцинил- <i>L</i> -метионил- <i>L</i> -серина)	(HO-Suc-Met-Ser-NH-) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub>	6	ГСБ-214
2-х петель	Гексаметилендиамид бис-( <i>N</i> -гексаноил- <i>L</i> -серил- <i>L</i> -лизина)	(Hex-Ser-Lys-NH-)2(CH2)6	17	ГТС <b>-2</b> 01
4-х петель	Гексаметилендиамид бис-( <i>N</i> -моносукцинил- <i>L</i> -серил- <i>L</i> -лизина)	(HO-Suc-Ser-Lys-NH-) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	31	ГСБ-106

Таблица 4 - Димерные дипептидные миметики BDNF

Длина спейсера, димеризующего миметики бета-изгибов, была выбрана на основе предыдущих исследований по димерным дипептидным миметикам NGF [10]. В работе [10] был сконструирован и синтезирован ряд димерных дипептидных миметиков 4-й петли NGF: гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина) (ГК-2), тетраметилендиамид *бис-(N-*моносукцинил-*L*-глутамил-*L*-лизина) (ГК-2в), пентаметилендиамид бис-(Nмоносукцинил-*L*-глутамил-*L*-лизина) (ГК-2б), триметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*глутамил-L-лизил-6-аминогексановой кислоты) (ГК-2а), содержащих соответственно 11, 9, 10 и сигма-связи между С<sup>α</sup>-атомами лизина дипептидных фрагментов. Исследование 22 нейропротекторной активности in vitro на нейрональной культуре HT-22 в условиях окислительного стресса, вызванного перекисью водорода, позволило установить, что при увеличении расстояния между дипептидными фрагментами от 11 до 22 сигма-связей происходит снижение нейропротекторного действия в 10000 раз по минимальной действующей концентрации. При уменьшении этого расстояния от 11 до 10 сигма-связей (ГК-2б) выраженность нейропротекторного действия незначительно снижается, а при 9 сигма связях (ГК-2в) активность исчезает. Таким образом, было установлено, что оптимальным является гексаметиленовый спейсер, несмотря на то, что расстояние по данным рентгеноструктурного анализа между соответствующими аминокислотными остатками в природном NGF существенно больше и соответствует 33 сигма-связям. Это противоречие может быть связано с тем, что во взаимодействии с TrkA рецептором участвуют две молекулы миметика, связанные солеобразованием. Другое возможное объяснение состоит в том, что молекулы TrkA способны сближаться в присутствии бис-дипептида ГК-2 теснее, чем при участии NGF.

## 3.1.2 Синтез

Миметики получали классическими методами пептидного синтеза в растворе с использованием Вос/Z- или Z/Вос-стратегий защитных групп. Конденсацию аминокислотных остатков осуществляли преимущественно методом активированных эфиров (использовались *n*нитрофениловые, *N*-оксисукцинимидные и пентафторфениловые), а также использовали в некоторых случаях азидный метод. Широко используемые в синтезе активированные эфиры изза невысокой степени активации избирательнее реагируют с аминокомпонентом, по сравнению с методом смешанных ангидридов и карбодиимидным методом, которые могут приводить к неправильному *N*-ацильному производному аминокомпонента образованию **O**или ацилизомочевины соответственно. Степень рацемизации при использовании активированных эфиров минимальна или рацемизация вовсе отсутствует. Стоит также отметить, что легко получаемые с выходами 80-95% кристаллические активированные эфиры удобны при хранении и дозировании в практике пептидного синтеза.

Все полученные дипептидные миметики очищались либо кристаллизацией, либо с помощью хроматографических методов. Строение и диастереомерная чистота синтезированных пептидов были подтверждены методами одномерной <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C и двумерной (COSY – гомоядерная корреляция, HSQC - гетероядерная одноквантовая корреляция, HMBC - гетероядерная многосвязная корреляция) ЯМР-спектроскопии. Строение также подтверждали с помощью масс-спектрометрии. Хроматографическая гомогенность подтверждалась методами TCX и ОФ ВЭЖХ.

## 3.1.2.1 Синтез дипептидных миметиков 1-й петли BDNF

Мономерный дипептид ГСБ-207 синтезировали, исходя из активированного *п*нитрофенилового эфира Вос-метионина, который конденсировали с коммерчески доступным метиловым эфиром серина в среде диметилформамида (DMF), получая защищенный дипептид (1) с выходом 81% (рисунок 35).



Рисунок 35 – Схема синтеза мономерного дипептидного миметика 1-й петли BDNF ГСБ-207

На следующей стадии (1) подвергали аммонолизу, используя насыщенный аммиаком МеОН. Продукт реакции – амид дипептида (2) Вос-деблокировали с помощью трифторуксусной кислоты (TFA), полученный трифторацетат дипептида переводили в свободное основание обработкой его водно-этанольного (1:1 по объему) раствора анионообменной смолой Amberlite IRA-900 и далее без очистки ацилировали янтарным ангидридом в среде DMF. Целевой пептид (**3**) ГСБ-207 получали с общим выходом 21% в расчете на исходный Вос-Met-ONp.

В спектре <sup>1</sup>Н-ЯМР ГСБ-207 наблюдались два мультиплета С<sup>°</sup>Н-протонов Меt и Ser при 4.31 и 4.16 м.д. соответственно, 4 сигнала CH<sub>2</sub>-групп (C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>2</sub>, C<sup> $\gamma$ </sup>H<sub>2</sub> - Met, C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>2</sub> - Ser и 2 CH<sub>2</sub>- группы *N*-моносукцинила), одна метильная группа (-SCH<sub>3</sub> Met) в виде синглета при 2.03 м.д. с интегральной интенсивностью соответствующей 3 протонам. Присутствуют сигналы амидных NH-групп Met и Ser в виде дублетов при 8.16 и 7.75 м.д. соответственно, сигналы протонов NH<sub>2</sub>-группы проявляются в виде двух синглетов в слабом поле 7.08 и 7.17 м.д., сигнал протона OH-группы Ser - уширенный синглет при 4.90 м.д.

Димерный дипептид ГСБ-214 был синтезирован азидным методом (рисунок 36). Использование азидного метода в этом случае удобно т.к. ранее в синтезе ГСБ-207 уже получен дипептидный фрагмент - метиловый эфир Вос-метионилсерина (1), кроме того, известно, что азидный метод не дает рацемизации и пригоден для конденсации пептидных фрагментов, а не только защищенных аминокислот.



Рисунок 36 - Схема синтеза димерного дипептидного миметика 1-й петли BDNF ГСБ-214

Пептид (1) превращали в гидразид (4) обработкой последнего спиртовым раствором гидразина, затем в азид с последующей конденсацией азида с гептаметилендиамином. Полученный бис-дипептид (5) подвергали ацидолизу ТFA и полученный трифторацетат гептаметилендиамида *бис*-(метионил-серина) растворяли в водно-этанольном (1:1 по объему) растворе и обрабатывали анионообменной смолой Amberlite IRA-900, которую затем отфильтровывали, фильтрат упаривали, а остаток – бис-дипептид в виде свободного основания

растворяли в DMF и ацилировали янтарным ангидридом. Целевой пептид (6) ГСБ-214 получали с общим выходом 39% в расчете на исходный Вос-Met-ONp.

В спектре <sup>1</sup>Н-ЯМР ГСБ-214 наблюдались два мультиплета С<sup>*α*</sup>Н-протонов Met и Ser при 4.30 и 4.17 м.д. соответственно, 7 сигналов CH<sub>2</sub>-групп (С<sup>*β*</sup>H<sub>2</sub>, С<sup>*γ*</sup>H<sub>2</sub> - Met, С<sup>*β*</sup>H<sub>2</sub> - Ser и CH<sub>2</sub>-групп *N*-моносукцинила, C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>3</sup>H<sub>2</sub> - спейсера), сигнал метильной группы (-SCH<sub>3</sub> Met) в виде синглета с интегральной интенсивностью соответствующей 6 протонам (т.к. соединение димерное). Присутствуют сигналы амидных NH-групп Met и Ser в виде дублетов при 8.16 и 7.76 м.д. соответственно, сигнал амидной NH-группы спейсера в виде триплета на 7.61 м.д.

## 3.1.2.2 Синтез димерного дипептидного миметика 2-й петли BDNF

Пептид ГТС-201 получали с использованием Z/Boc-стратегии защитных групп, без защиты гидроксильной группы серина. Наращивание пептидной цепи вели с С-конца, конденсацию аминокислотных остатков проводили методом активированных *N*-оксисукцинимидных и пентафторфениловых эфиров. Целевое соединение получали в виде диацетата (рисунок 37).

Активированные *N*-оксисукцинимидные эфиры гексановой кислоты (7) и Z/Bocзащищенного лизина (10)получали с использованием *N*-гидроксисукцинимида И дициклогексилкарбодиимида (DCC) в качестве конденсирующего агента. Реакции проводили при температуре от +5 °C до +10 °C, *N*-оксисукцинимидные эфиры получали с выходом около 90%. Z-защищённый серин (8) получали взаимодействием N-бензилоксикарбонилсукцинимида (Z-OSu) с H-L-Ser-OH в смеси ацетон-вода в соотношении 1:1 в присутствии бикарбоната натрия при температуре 20-22°С как описано в [162]. Пентафторфенловый эфир Z-серина (9) получали взаимодействием Z-Ser-OH (8) с пентафторфенолом в присутствии DCC в EtOAc при температуре -2°...0°С с выходом 91% как описано в [111]. Далее конденсацией Z-Lys(Boc)-OSu (10)DMF с гексаметилендиамином В при комнатной температуре получали гексаметилендиамид (11) с выходом 93%, который затем Z-деблокировали в условиях каталитического гидрогенолиза в MeOH в присутствии 10% Pd/C, получая гексаметилендиамид *бис-(N<sup>E</sup>-трет-*бутилоксикарбониллизина) 97% (12)с выходом. Взаимодействие пентафторфенилового эфира (9) и Z-деблокированного соединения (12) в DMF приводило с выходом 95% к продукту конденсации - (Z-Ser-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (13). Бис-дипептид (13) Zдеблокировали каталитическим гидрогенолизом аналогично стадии получения (12) (ОФ ВЭЖХ контроль) и получали гексаметилендиамид *бис-*(серил-*N<sup>e</sup>-mpem*-бутилоксикарбонил-лизина) (14) с выходом 97%.



Рисунок 37 - Схема синтеза димерного дипептидного миметика 2-й петли BDNF ГТС-201

В <sup>1</sup>Н-ЯМР спектре (14) характерной особенностью явилось в сравнении со спектром (13) отсутствие сигналов протонов Z-защитной группы, а именно, сигнала протонов -OCH<sub>2</sub>- группы в виде синглета в области 5.03 м.д. и сигналов ароматических протонов, в виде мультиплета в области 7.25-7.35 м.д., а также появления сигналов протонов свободной NH<sub>2</sub>-группы серина в

69

виде уширенного синглета в области 2.01 м.д. с интегральной интенсивностью, отвечающей двум протонам. В спектре также наблюдался сигнал протона ОН-группы серина в области 4.87 м.д. в виде уширенного синглета с интегральной интенсивностью, отвечающей одному протону.

Свободный по альфа-аминогруппе бис-дипептид (14) конденсировали в DMF с *N*оксисукцинимидным эфиром гексановой кислоты - CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>COOSu (7), получая соответстующее *N*-гексаноильное производное (15), которое Вос-деблокировали с помощью TFA в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (в соотношении 1:3) в течение 1.5 ч. Пептид ГТС-201 в виде дитрифторацетата (16) далее переводили в диацетат (17) путем 4-х кратного переупаривания с 70% AcOH с последующей очисткой с помощью ОФ ВЭЖХ (чистота продукта составляла 98%, по данным ОФ ВЭЖХ, время удерживания  $\tau = 12.00$  мин). Общий выход (17) ГТС-201 составил 50% в расчете на исходный защищенный лизин.

В спектре <sup>1</sup>Н-ЯМР наблюдались два сигнала С<sup>а</sup>Н-протонов Lys и Ser, 12 сигналов CH<sub>2</sub>групп (С<sup>β</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>r</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> - Lys, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> - Ser, C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>3</sup>H<sub>2</sub> - спейсера и C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>4</sup>H<sub>2</sub> - гексаноила) и одной метильной группы гексаноила, три сигнала амидных NH-групп (NH - Lys, NH – Ser и NH – спейсера). Сигналы протонов OH-группы Ser и сигналы протонов N<sup>+</sup>H<sub>3</sub> группы, принадлежащей боковой цепи Lys, не наблюдались. В спектре <sup>13</sup>С-ЯМР наблюдались сигналы атомов углерода - три сигнала карбонильных групп, один сигнал CH<sub>3</sub> группы, два сигнала С<sup>а</sup>Н-групп и 12 сигналов CH<sub>2</sub> групп (С<sup>β</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>7</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> - Lys, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> - Ser, C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>3</sup>H<sub>2</sub> - спейсера и C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>4</sup>H<sub>2</sub> - гексаноила). Также в спектре <sup>13</sup>С ЯМР наблюдались сигналы AcOH (22.7 и 180.4 м.д.) в то время, как характерные сигналы CF<sub>3</sub> и CO групп TFA отсутствовали.

## 3.1.2.3 Синтез дипептидных миметиков 4-й петли BDNF

Мономерный и димерный дипептидные миметики бета-изгиба 4-й петли ГСБ-104 и ГСБ-106 получали с использованием Boc/Z - стратегии защитных групп. Боковая гидроксигруппа серина была защищена бензильной группой. Наращивание пептидной цепи вели с С-конца, конденсацию аминокислотных остатков проводили методом активированных *N*оксисукцинимидных эфиров (рисунки 38 и 39).



Рисунок 38 - Схема синтеза мономерного дипептидного миметика 4-й петли BDNF ГСБ-104

Активированные *N*-оксисукцинимидные эфиры защищенного лизина (19) и Boc/Bzlзащищенного серина (18) получали из коммерчески доступных оптически чистых защищенных аминокислот с использованием *N*-гидроксисукцинимида и DCC в качестве конденсирующего агента. Реакции проводили в ТГФ при охлаждении до -5°С. *N*-оксисукцинимидные эфиры 83-84%. получали выходами Далее активированный эфир (19) обрабатывали с свежеприготовленным раствором аммиака в DMF и получали амид (20) с выходом 94%. Амид защищенного лизина (20) Вос-деблокировали с помощью TFA в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, к полученному трифторацетату (21) в среде DMF добавляли *N*-метилморфолин (NMM) для перевода альфааминогруппы в свободное основание и конденсировали с активированным эфиром серина (18), получая амид дипептида (22) с выходом 85%. Ацидолиз дипептида (22) приводил к трифторацетату амида дипептида (23), который переводили в свободное основание с помощью триэтиламина (ТЕА) и ацилировали янтарным ангидридом. Выделенное *N*-моносукцинильное производное дипептида (24) Z(Bzl)-деблокировали с помощью каталитического гидрогенолиза в DMF в присутствии 10% Pd/C, получая целевой дипептид (25) ГСБ-104 с общим выходом 46% в расчете на исходный защищенный лизин.

В спектре <sup>1</sup>Н-ЯМР ГСБ-104 наблюдались два мультиплета С<sup>*α*</sup>Н-протонов Ser и Lys при 4.55 и 4.40 м.д. соответственно, 6 мультиплетных сигналов CH<sub>2</sub>-групп (С<sup>*β*</sup>H<sub>2</sub> (1.53 м.д.), С<sup>*γ*</sup>H<sub>2</sub> (1.29 м.д.), С<sup>*δ*</sup>H<sub>2</sub> (1.79 м.д.), С<sup>*ε*</sup>H<sub>2</sub> (2.75 м.д.), - Lys, С<sup>*β*</sup>H<sub>2</sub> (два мультиплета 3.91 и 4.16 м.д.), - Ser и 2 CH<sub>2</sub>-группы (2.41 м.д.) *N*-моносукцинила), сигналы амидных NH-групп Ser и Lys в виде

71

дублетов при 8.31 и 8.00 м.д. соответственно, протоны NH<sub>2</sub>-группы проявляются в виде двух синглетов при 7.10 и 7.21 м.д. Сигналы протонов OH-группы Ser и боковой NH<sub>2</sub>-группы Lys не наблюдались.

Схема синтеза димерного дипептидного миметика 4-й петли BDNF ГСБ-106 представлена на рисунке 39.



Рисунок 39 - Схема синтеза димерного дипептидного миметика 4-й петли BDNF ГСБ-106

На первом этапе синтеза ГСБ-106 активированный эфир лизина (19) конденсировали с гексаметилендиамином в среде DMF при комнатной температуре. Выделенный, с выходом 85%, гексаметилендиамид бис-лизина (26) Вос-деблокировали с помощью TFA в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, получая трифторацетат Z(Cl)-защищенного бис-лизина (27) с выходом 90%. Раствор трифторацетата (27) в DMF обрабатывали DIEA для перевода в свободное основание и затем конденсировали с активированным эфиром серина (18), получая бис-дипептид (28) с выходом 75%. Удаление  $N^{\alpha}$ -Вос-защитной группы бис-дипептида (28) с помощью TFA приводило к трифторацетату бис-дипептида (29) с выходом 92%, который затем обрабатывали TEA в среде DMF и ацилировали янтарным ангидридом. Полученное *N*-моносукцинильное производное бис-дипептида (30) Z(Bzl)-деблокировали с помощью каталитического гидрогенолиза в MeOH в присутствии 10% Pd/C, получая целевой дипептид (31) ГСБ-106 с общим выходом 36% в расчете на исходный Boc-Lys(Z(Cl))-OH.

В спектре <sup>1</sup>Н-ЯМР ГСБ-106 наблюдались два мультиплета С<sup> $\alpha$ </sup>Н-протонов Ser и Lys при 4.27 и 4.13 м.д. соответственно, 9 мультиплетных сигналов CH<sub>2</sub>-групп: С<sup> $\beta$ </sup>Н<sub>2</sub> (два мультиплета 1.50 и 1.72 м.д.), С<sup> $\gamma$ </sup>Н<sub>2</sub> (1.32 м.д.), С<sup> $\delta$ </sup>Н<sub>2</sub> (1.50 м.д.), С<sup> $\epsilon$ </sup>Н<sub>2</sub> (2.74 м.д.) - Lys; С<sup> $\beta$ </sup>Н<sub>2</sub> (два мультиплета
3.52 и 3.63 м.д.) – Ser, CH<sub>2</sub>-группы (2.42 м.д.) *N*-моносукцинила и метиленовые группы спейсера - C<sup>1</sup>H<sub>2</sub> (3.02 м.д.), C<sup>2</sup>H<sub>2</sub> (1.39 м.д.), C<sup>3</sup>H<sub>2</sub> (1.24 м.д.). Сигналы амидных NH-групп Ser и Lys в виде дублетов при 8.12 и 7.98 м.д. соответственно, амидные протоны NH-гексаметиленового спейсера проявляются в виде триплета при 7.69 м.д. Сигналы протонов OH-группы Ser и боковой NH<sub>2</sub>-группы Lys не наблюдались. В спектре <sup>13</sup>C-ЯМР присутствуют сигналы всех углеродных ядер. Три сигнала карбонильного углерода - CO- Ser (171.0 м.д.), CO-Lys (172.1 м.д.) и CO- Suc (175.6 м.д.), сигнал карбоксильного углерода *N*-моносукцинила при 177.4 м.д. Наблюдаются сигналы С<sup> $\alpha$ </sup>-углеродов Lys и Ser при 54.4 и 57.6 м.д. соответственно, а также 9 сигналов от метиленовых углеродов: Lys (C<sup> $\beta$ </sup> – 29.8 м.д., C<sup> $\gamma$ </sup> – 22.2 м.д., C<sup> $\delta$ </sup> – 26.5 м.д., C<sup> $\epsilon$ </sup> – 37.6 м.д.), Ser (C<sup> $\beta$ </sup> -61.2 м.д.), спейсера (C<sup>1</sup> – 39.1 м.д., C<sup>2</sup> – 29.1 м.д., C<sup>3</sup> – 26.4 м.д.) и сигналы метиленовых углеродных ядер HOOC<u>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C</u>O- при 32.6 и 23.6 м.д. соответственно.

Таким образом, сконструировано и синтезировано пять миметиков бета-изгибов отдельных петель BDNF. Физико-химические характеристики синтезированных миметиков представлены в таблице 5. Данные <sup>1</sup>Н-ЯМР-спектроскопии приведены в таблице 6.

				ОФ ВЭЖХ	
Миметик	т пл °C		TCY R	Время	$[M + H]^+$
миметик	1. IIJI., C	[ [С] D, Град	$1CA, M_{f}$	удерживания,	
				МИН	
<b>ECE 207</b>	101-105	$[\alpha]^{20}_{D} - 14.25$	0.45 (A),	7.0	336 1218
I CD-207	(из MeOH-Et <sub>2</sub> O)	(c 0.4; MeOH)	0.12 (Б)	1.9	550.1218
ECE 214	162-163	$[\alpha]^{25}_{D} + 9.0$	0.57 (A)	07	767 2204
I CD-214	(из MeOH-Et <sub>2</sub> O)	(c 0.4; DMF)		0.7	707.3304
ETC 201	110-125	$[\alpha]^{25}_{D} - 14.9$	0.59 (A)	12.0	742 5200
110-201	с разлож.	(c 0.6; MeOH)		12.0	743.3390
ECE 104	136-138	$[\alpha]^{20}_{D} - 15.75$	0.35 (A),	5 4	222 1771
I CD-104	(из МеОН)	(c 0.4; DMF)	0.11 (B)	5.4	333.1771
ECE 106	143-145	$[\alpha]^{25}$ <sub>D</sub> - 44.5	0.42 (A),	6.2	747 4006
1СБ-100	(из MeOH-Et <sub>2</sub> O)	(с 1; вода)	0.10 (B)	0.2	/4/.4220

Таблица 5 - Физико-химические характеристики миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF

Примечания: системы TCX: (A) – CHCl<sub>3</sub>-MeOH-вода-AcOH, 15:10:2:3; (Б) - пиридин-вода-AcOH-EtOAc, 20:11:6:120; (В) - ВиOH-AcOH-вода, 4:1:1. Параметры ОФ ВЭЖХ: подвижная фаза A (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.

Масс-спектры высокого разрешения зарегистрированы на приборе Bruker microTOF II методом ионизации электроспреем (ESI-MS). Измерения выполнены на положительных (напряжение на капилляре 4500 V) или отрицательных (напряжение на капилляре 3200 V) ионах. Диапазон сканирования масс (m/z) 50-3000 Да, калибровка – внешняя или внутренняя (Electrospray Solution, Fluka). Использован шприцевой ввод вещества. Скорость потока 3 мкл/мин. Газраспылитель – азот (4 л/мин); температура интерфейса  $180^{\circ}$ С.

Таблица 6 - Спектры <sup>1</sup>Н-ЯМР синтезированных соединений (DMSO-d<sub>6</sub>; δ, хим. сдвиг м.д.; мультиплетность; КССВ *J*, Гц)

	Suc			Met				Ser			Амид	
-	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	NH	C <sup>α</sup> H	$C^{\beta}H_2$	$C^{\gamma}H_2$	SCH <sub>3</sub>	NH	C <sup>α</sup> H	$C^\beta H_2$	ОН	NH <sub>2</sub>	
Пептид	м, 4Н	д, 1H J 9.1	м, 1Н	два м, 2Н	м, 2Н	с, 3Н	д, 1H J 8.2	м, 1Н	м, 2Н	уш. с, 1Н	два с, 2Н	
ГСБ-207 (3)	2.41	8.16	4.31	1.75 и 1.90	2.44	2.03	7.75	4.16	3.58	4.90	7.08 и 7.17	
	Suc			Met		-		Ser			Спейсер	
	$(CH_2)_2$	NH	C <sup>α</sup> H	$C^{\beta}H_2$	$C^{\gamma}H_2$	SCH <sub>3</sub>	NH	C <sup>α</sup> H	$C^{\beta}H_2$	NH	$C^1H_2$	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>
Пептид	м, 8Н	д, 2H J 9.2	м, 2Н	два м, 4Н	м, 4Н	с, 6Н	д, 2H J 8,1	м, 2Н	м, 4Н	т, 2Н J 5.4	м, 4Н	м, 10Н
ГСБ-214 (6)	2.40	8.16	4.30	1.76 и 1.89	2.42	2.02	7.76	4.17	3.55	7.61	3.01	1.20- 1.40
	Hex		1	Ser			I	_ys			Спейсер	
Пептид	$\begin{array}{c} C^{1}H_{2} \\ C^{2,3,4}H_{2} \\ CH_{3} \end{array}$	NH	C <sup>α</sup> H	$C^{\beta}H_2$	ОН	NH	C <sup>α</sup> H	$\begin{array}{c} C^{\beta}H_{2}C^{\gamma}H_{2}\\ C^{\delta}H_{2}\end{array}$	C <sup>ɛ</sup> H <sub>2</sub>	NH	$C^{1}H_{2}$	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>
	т, 4H, <i>J</i> 7.5 м, 12H т, 6H, <i>J</i> 7.0	д, 2H J 7.0	м, 2Н	два м, 4Н	уш. с, 2Н	д, 2H J 8.0	м, 2Н	м, 4Н м, 8Н	м, 4Н	т, 2Н J 5.4	м, 4Н	м, 8Н
ГСБ-201 (17)	2.13 1.16-1.58 0.85	7.94	4.27	3.45 и 3.63	-	8.01	4.15	1.50-1.70 1.16-1.58	2.74	7.78	3.00	1.16- 1.58

	Suc			Ser	_	Lys					Амид		
Поптил	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	NH	C <sup>α</sup> H	$C^{\beta}H_{2}$	ОН	NH	C <sup>α</sup> H	$\begin{bmatrix} C^{\beta}H_2 C^{\gamma}H_2 \\ C^{\delta}H_2 \end{bmatrix}$	$C^{\epsilon}H_2$	NH <sub>2</sub>			
пентид	м, 4Н	д, 1H J 8.1	м, 1Н	два м, 2Н	уш. с, 1Н	д, 1H J 7.6	м, 1Н	три м, 6Н	м, 2Н	два с, 2Н			
ГСБ-104 (25)	2.41	8.31	4.55	3.91 и 4.16	-	8.00	4.40	1.53 и 1.79 1.29 1.53	2.75	7.10 и 7.21			
	Suc		Sei	r			Lys			Спей	сер		
Поятия	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	NH	C <sup>α</sup> H	$C^{\beta}H_{2}$	NH	C <sup>α</sup> H	$ \begin{array}{c} C^{\beta}H_{2} \\ C^{\gamma}H_{2} C^{\delta}H_{2} \end{array} $	$C^{\epsilon}H_{2}$	NH	$C^1H_2$	$C^{2}H_{2}$	$C^{3}H_{2}$	
пентид	м, 8Н	д, 2H J 8.1	м, 2Н	два м, 4Н	д, 2H J 7.8	м, 2Н	два м, 4Н м, 4Н м, 4Н	м, 4Н	т, 2H J 4.9	м, 4Н	м, 4Н	м, 4Н	
ГСБ-106 (31)	2.42	8.12	4.27	3.52 и 3.63	7.98	4.13	1.50 и 1.72 1.32 1.50	2.74	7.69	3.02	1.39	1.24	

# 3.2 Выявление нейропротекторной активности<sup>1</sup> in vitro дипептидных миметиков BDNF

Для выявления нейропротекторной активности дипептидов была использована модель окислительного стресса с перекисью водорода на культуре иммортализованных клеток гиппокампа мыши линии HT-22 [98]. При этом активность рассчитывалась в процентах от возможного эффекта, максимально что позволяло количественно выразить как нейропротекторную, так и нейродегенеративную (отрицательную нейропротекторную) активности. Пептиды изучали в интервале концентраций 10<sup>-5</sup>-10<sup>-10</sup> М, вносили за 24 ч до повреждающего агента. Все димерные миметики увеличивали жизнеспособность нейронов (таблица 7). Максимальный нейропротекторный эффект достигался для ГСБ-214 в концентрации 10<sup>-6</sup> М (40%), для ГТС-201 в концентрации 10<sup>-7</sup> М (38%), а для ГСБ-106 - 10<sup>-8</sup> М (41%). При этом выраженность нейропротекторного эффекта ГСБ-106 составляла 53% от эффекта самого нейротрофина BDNF. Мономерный миметик 4-й петли ГСБ-104 в концентрации 10<sup>-7</sup> М в два раза уменьшал жизнеспособность нейронов, то есть демонстрировал отрицательную нейропротекторную 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 с TrkB рецептором в димерной форме.

	Концентрация,	Оптическое п	оглощение	Активность <sup>а</sup> ,
Соединение	Μ	c H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	без H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	%
ГСБ-207	10 <sup>-5</sup>	0.081±0.010		-7
	10 <sup>-6</sup>	0.087±0.010		13
	10 <sup>-7</sup>	0.082±0.005		-3
	10 <sup>-8</sup>	0.084±0.010		3
	0 (контроль)	$0.083 \pm 0.005^{\#}$	0.113±0.007	
ГСБ-214	10 <sup>-5</sup>	0.096±0.008*		34
	10 <sup>-6</sup>	0.098±0.011*		40
	10 <sup>-7</sup>	0.095±0.006*		31
	10 <sup>-8</sup>	0.088±0.004*		11
	0 (контроль)	$0.084{\pm}0.004^{\#}$	0.119±0.006	
ГТС <b>-</b> 201	10 <sup>-5</sup>	0.102±0.004*		34
	10 <sup>-6</sup>	0.102±0.005*		34
	10 <sup>-7</sup>	0.104±0.004*		38

Таблица 7 - Влияние дипептидных миметиков BDNF на жизнеспособность нейронов HT-22 в условиях окислительного стресса

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> 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).

	10 <sup>-8</sup>	0.102±0.005*		34
	0 (контроль)	$0.86{\pm}0.003^{\#}$	0.133±0.007	
ГСБ-104	10 <sup>-5</sup>	0.114±0.036		26
	10 <sup>-6</sup>	0.100±0.020		-19
	10 <sup>-7</sup>	$0.089 \pm 0.010*$		-55
	10 <sup>-8</sup>	$0.107 \pm 0.025$		3
	0 (контроль)	$0.106 \pm 0.023^{\#}$	0.137±0.026	
ГСБ-106	10 <sup>-5</sup>	0.097±0.010*		31
	10 <sup>-6</sup>	0.095±0.008*		27
	10 <sup>-7</sup>	0.095±0.010*		26
	10 <sup>-8</sup>	0.101±0.007*		41
	0 (контроль)	$0.085{\pm}0.006^{\#}$	0.124±0.010	
	10 <sup>-9</sup>	0.088±0.010*		36
	10 <sup>-10</sup>	0.082±0.009		17
	0 (контроль)	$0.077{\pm}0.003^{\#}$	0.107±0.008	
BDNF	50 нг/мл(~10 <sup>-9</sup> )	0.090±0.003*		78
	0 (контроль)	$0.076 \pm 0.003^{\#}$	0.094±0.004	

Примечания: опыты выполнены на гиппокампальных нейронах мыши линии HT-22. Жизнеспособность клеток определяли с использованием 0,5% водного раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия (МТТ-тест), измеряя оптическую плотность при 600 нм. Статистическую обработку данных проводили с помощью критерия Краскела-Уоллеса с последующим тестом по Данну (ANOVA) или U-критерия Манна-Уитни. Данные представлены в виде m ± s.d.

\*p < 0.05 относительно активного контроля (с  $H_2O_2$ );

<sup>#</sup> p < 0.05 относительно пассивного контроля (без  $H_2O_2$ );

<sup>а</sup> активность в опытах по противодействию окислительному стрессу рассчитывалась по формуле

 $A(\%) = (D_{_{3KC\Pi}} - D_{_{H2o2}}) / (D_{_{KOHTp}} - D_{_{H2o2}}) \times 100\%$ , где  $D_{_{3KC\Pi}}$  – оптическое поглощение раствора в опыте,  $D_{_{H2o2}}$  - оптическое поглощение раствора активного контроля (с  $H_2O_2$ ),  $D_{_{KOHTp}}$  - оптическое поглощение; пассивного контроля (без  $H_2O_2$ ).

Известно, что нейропротекторные функции мозгового нейротрофического фактора реализуются через связывание со специфическим нейротрофиновым рецептором TrkB [72]. В работах [5, 6] было показано что димерные миметики активируют TrkB и его основные сигнальные пути PI3K/AKT, MAPK/ERK и PLC<sub>γ</sub> (таблица 8).

Все исследованные миметики нейротрофина BDNF активируют PLC<sub>γ</sub>. В то же время картина активации PI3K/AKT и MAPK/ERK каскадов миметиками разных петель различается: миметик 4-й петли ГСБ-106 активирует оба сигнальных каскада; миметик 1-й петли ГСБ-214 активирует PI3K/AKT и миметик 2-й петли ГТС-201 активирует MAPK/ERK. Интересно отметить, что нейропротекторное действие ГСБ-106 более выражено в сравнении с ГСБ-214 и ГТС-201. По-видимому, для проявления максимального эффекта нейропротекции необходима активация обоих путей.

Таблица 8 - Активация димерными дипептидными миметиками BDNF рецептора TrkB и его основных пострецепторных сигнальных путей [5, 6]

				Активация					
	Петля	Миметик	Нейропротек-		(Метод Весто	ерн-блоттинга)			
Н	ейротрофина	соответств.	торная						
	BDNF	Петли	активность	TrkB	PI3K/AKT	MAPK/ERK	PLCγ		
	1	ГСБ-214	+	+	+	0	+		
	2	ГТС-201	+	+	0	+	+		
	4	ГСБ-106	+	+	+	+	+		

Примечание: 0-нет эффекта (активации), + - есть эффект (активация).

### 3.3 Выявление антидепрессивной активности<sup>2</sup> димерных дипептидных миметиков BDNF

Поскольку BDNF вовлечен в патогенез депрессии и обладает антидепрессивной активностью [19], мы изучили антидепрессивные свойства димерных миметиков BDNF на классической модели «вынужденное плавание» у мышей в оригинальном варианте Порсолта [173] в сравнении с классическим антидепрессантом амитриптилином (10 мг/кг, внутрибрюшинно) [81] (таблица 9). Тест вынужденного плавания является наиболее распространенным для выявления соединений с антидепрессантной активностью. В основе метода лежит наблюдение, что мышь, помещенная в ситуацию неизбегаемого плавания, в конце концов перестает совершать попытки выбраться и принимает характерную позу иммобильности (отказ от активно-оборонительного и исследовательского поведения), что интерпретируют как отчаяние [173]. Тест чувствителен к действию антидепрессантов с разным механизмом действия.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> проводилось совместно с к.б.н., с.н.с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств П.Ю. Поварниной.

	Групна дора	Врем	я иммобиль	ности	
Рашаатра	труппа, доза		животных, (	2	Активность,
Бещества	ΜΙ/ΚΙ,	Мопиана	Нижний	Верхний	%
	внутриорюшинно	тедиана	квартиль	квартиль	
	0 (контроль)	208	189	233	0
	0.05	190	121	216	9.5
ГСБ-106	0.1	165*	176	159	20.7
	1.0	167*	178	161	19.7
	10	194	167	211	6.7
	0 (контроль)	208	189	233	0
ГСБ-214	0.1	198	186	205	4.8
	1.0	193	185	215	7.2
	0 (контроль)	230.6	195.5	257.4	0
	0.1	245.9	216.8	261.8	-6.6
110-201	1.0	205.2	191	212.4	11.0
	5.0	227.2	217.4	254.1	1.5
	0 (контроль)	205	193	229	0
Амитриптилин	10	129*	115	147	37.1

Таблица 9 - Антидепрессивная активность дипептидных миметиков BDNF в тесте Порсолта в сравнении с классическим антидепрессантом амитриптилином

Примечания: Данные представлены в виде медиан и квартилей. \*- р < 0.05, \*\*- р < 0.01 по сравнению с контролем (U-тест Манна-Уитни).

Активность в опытах рассчитывалась по формуле:

 $A(\%) = (T_{\text{контр}} - T_{\text{эксп}}) / T_{\text{контр}} \times 100\%$ , где  $T_{\text{контр}}$  – время иммобильности животных в контроле (медиана),  $T_{\text{эксп}}$  - 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 9). 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. Интересно отметить, что антидепрессивной активностью обладает только миметик, активирующий PI3K/AKT, MAPK/ERK и PLCγ сигнальные пути (таблица 8). По-видимому для проявления миметиком BDNF антидепрессивной активности необходима активация всех трех основных сигнальных путей. 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 [80].

Изучение активности миметиков BDNF показало, что и нейропротекторной, и антидепрессивной активностью обладал только димерный дипептидный миметик 4-й петли ГСБ-106, который и был выбран в качестве наиболее перспективного соединения (соединениялидера). 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 (таблица 10).

Номер	Шифр	Структурная формула	Изменения в структуре
соединения			ГСБ-106
31	ГСБ-106	(HO-Suc-L-Ser-L-Lys-NH-) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	-
38	ГТ-106LD	$(HO-Suc-L-Ser-D-Lys-NH-)_2(CH_2)_6$	обращение конфигурации лизина
41	ГТ-106DL	(HO-Suc- <b>D-Ser</b> -L-Lys-NH-) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	обращение конфигурации серина
46	ГТ-106Ac	(CH <sub>3</sub> CO-L-Ser-L-Lys-NH-) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	замена сукцинила на ацетил
57	ГТ-105	(HO-Suc-L-Ser-Gly-NH-) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	замена лизина на глицин
64	ГТ-107	(HO-Suc-Gly-L-Lys-NH-) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	замена серина на глицин
67	ГТ-107D	(HO-Suc-Gly-D-Lys-NH-) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	замена серина на глицин с обращением конфигурации лизина

Таблица 10 - Глициновые аналоги и диастереомеры ГСБ-106

### 3.4.1 Синтез диастереомеров и глициновых аналогов ГСБ-106

Синтез аналогов ГСБ-106 был осуществлен наращиванием пептидной цепи с *С*-конца методом активированных эфиров с использованием Boc/Z- или Z/Boc-стратегий защитных групп. Все полученные пептиды очищались либо кристаллизацией, либо с помощью хроматографических методов. Строение и диастереомерная чистота синтезированных соединений были подтверждены методами одномерной <sup>1</sup>H ,<sup>13</sup>C и двумерной (COSY, HSQC и HMBC) ЯМР-спектроскопии. Хроматографическая гомогенность подтверждалась методами TCX и ОФ ВЭЖХ.

В синтезе диастереомеров ГСБ-106 на первом этапе получали активированные *N*-оксисукцинимидные эфиры из энантиомерно чистых Z-*L*-Lys(Boc)-OH и Z-*D*-Lys(Boc)-OH с использованием *N*-гидроксисукцинимида и DCC (рисунок 40).



Рисунок 40 - Схема синтеза дипептидов ГТ-106DL и ГТ-106LD – диастереомеров ГСБ-106

Реакции проводили при температуре около 0°С. *N*-оксисукцинимидные эфиры (10) и (32) получали с выходом 96% и 93% соответственно. Активированный эфир Z-D-Ser-OPfp (35) получали аналогично L-изомеру (9), для этого сначала синтезировали Z-D-Ser-OH (34), используя Z-OSu в условиях [162], затем получали активированный эфир (35) реакцией с DCC и пентафторфенолом. Далее конденсацией активированных эфиров (10) и (32) с гексаметилендиамином в DMF при комнатной температуре получали гексаметилендиамиды  $\delta uc$ -( $N^{\alpha}$ -бензилоксикарбонил-*трет*-бутилоксикарбонил-лизина) (11) и (33) с выходом 93%. Бислизины (11) и (33) затем Z-деблокировали с помощью каталитического гидрогенолиза в MeOH в присутствии 10% Pd/C и конденсировали с соответствующим активированным эфиром серина (9) или (35) в среде DMF. Получали соответствующие бис-дипептиды (Z-L-Ser-D-Lys(Boc)-NH-)2(CH2)6 (36) и (Z-D-Ser-L-Lys(Boc)-NH-)2(CH2)6 (39) с выходами около 80%. Бис-дипептиды (36) и (39) Z-деблокировали каталитическим гидрогенолизом, затем ацилировали янтарным ангидридом в DMF, получая соответствующие *N*-моносукцинильные производные (HO-Suc-*L*-Ser-D-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (37) и (HO-Suc-D-Ser-L-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (40) с выходами 70% и 75%. Ацидолиз пептидов (37) и (40) ТГА в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> и последующая очистка ОФ ВЭЖХ приводили к целевым ГТ-106LD (38) и ГТ-106DL (41) с общими выходами 44% и 48% соответственно.

В спектре <sup>1</sup>Н-ЯМР энантиомеров ГТ-106LD и ГТ-106DL наблюдались два мультиплета С<sup> $\alpha$ </sup>Н-протонов Ser и Lys при 4.25-4.27 м.д. и 4.13-4.15 м.д. соответственно, 9 мультиплетных сигналов CH<sub>2</sub>-групп: С<sup> $\beta$ </sup>H<sub>2</sub>, С<sup> $\gamma$ </sup>H<sub>2</sub> и C<sup> $\delta$ </sup>H<sub>2</sub> (в области 1.00-1.80 м.д.), С<sup> $\epsilon$ </sup>H<sub>2</sub> (2.74-2.76 м.д.) - Lys; С<sup> $\beta$ </sup>H<sub>2</sub> (3.50-3.52 м.д.) – Ser, CH<sub>2</sub>-группы *N*-моносукцинила и метиленовые группы спейсера - C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>2</sup>H<sub>2</sub> и C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>. Сигналы амидных NH-групп Ser и Lys в виде дублетов при 8.07 м.д. и 7.94-8.01 м.д. соответственно, амидные протоны NH- гексаметиленового спейсера проявляются в виде триплета на 7.75 м.д. Сигналы боковой N<sup>+</sup>H<sub>3</sub>-группы Lys наблюдались в виде уширенного синглета в слабом поле с интегральной интенсивностью, отвечающей 6 протонам. Сигналы протонов OH-группы Ser не наблюдались.

Синтез аналога ГСБ-106 ГТ-106Ас, содержащего вместо *N*-моносукцинильного *N*ацетильный радикал, методом активированных *N*-оксисукцинимидных эфиров с использованием Boc/Z-стратегии защитных групп (рисунок 41). Активированные эфиры уксусной кислоты (42), защищенных серина (18) и лизина (19) получали по стандартным методикам [18].



Рисунок 41 - Схема синтеза ацетилсодержащего аналога ГСБ-106 ГТ-106Ас

Синтезированный ранее бис-лизин (26) Вос-деблокировали с помощью 4 М HCl в диоксане, получая гидрохлорид Z(Cl)-защищенного бис-лизина (43) с выходом 97%. Биспродукт (43) обрабатывали DIEA в среде DMF для перевода в свободное основание, затем проводили наращивание пептидной цепи конденсацией с Boc-Ser(Bzl)-OSu (18), получая бисдипептид (28) с выходом 85%. Вос-деблокирование бис-дипептида (28) 4 М HCl в диоксане позволяло получить гидрохлорид бис-дипептида (44), который далее обрабатывали DIEA и ацилировали Ac-OSu (42) в среде DMF. Полученное *N*-ацетильное производное бис-дипептида (45) Z(Bzl)-деблокировали с помощью каталитического гидрогенолиза в MeOH в присутствии 10% Pd/C, получая целевой дипептид (46) ГТ-106Ac с общим выходом 44% в расчете на исходный Вос-Lys(Z(Cl))-OH. Пептид ГТ-106Ac также был получен в виде ацетата (49) исходя из ранее синтезированного бис-дипептида (H-*L*-Ser-*L*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (14), который

83

ацилировали Ac-OSu (**42**), затем удаляли Вос-группы ацидолизом TFA и переупаривали с 10% AcOH. Конечный пептид (**49**) получали с общим выходом 57% в расчете на Z-*L*-Lys(Boc)-OH.

В спектре <sup>1</sup>Н-ЯМР ацетата ГТ-106Ас (**49**) наблюдались два мультиплета С<sup>*a*</sup>Н-протонов Ser и Lys при 4.28 и 4.14 м.д. соответственно, 8 мультиплетных сигналов CH<sub>2</sub>-групп: С<sup>*b*</sup>H<sub>2</sub> (два мультиплета 1.46 и 1.75 м.д.), С<sup>*γ*</sup>H<sub>2</sub> (1.33 м.д.), С<sup>*b*</sup>H<sub>2</sub> (1.46 м.д.), С<sup>*b*</sup>H<sub>2</sub> (2.75 м.д.) - Lys; С<sup>*β*</sup>H<sub>2</sub> (два мультиплета 3.46 и 3.57 м.д.) – Ser и метиленовые группы спейсера - C<sup>1</sup>H<sub>2</sub> (2.99 м.д.), С<sup>2</sup>H<sub>2</sub> (1.19 м.д.), и С<sup>3</sup>H<sub>2</sub> (1.33 м.д.), протоны метильных групп ацетила и АсОН проявлялись в виде синглета при 1.86 и 1.88 м.д. соответственно. Сигналы амидных NH-групп Ser и Lys наблюдались в виде дублетов при 8.02 и 8.08 м.д. соответственно, амидные протоны NH-гексаметиленового спейсера проявляются в виде триплета на 7.77 м.д. Протоны OH-группы Ser давали сигнал в виде уширенного синглета при 5.27 м.д., сигналы протонов боковой N<sup>+</sup>H<sub>3</sub>-группы Lys наблюдались в виде уширенного синглета в слабом поле с интегральной интенсивностью, отвечающей 6 протонам.

В спектре <sup>13</sup>С-ЯМР (**49**) присутствуют сигналы всех углеродных ядер. Три сигнала карбонильного углерода - CO- Ser (172.3 м.д.), CO- Lys (173.4 м.д.) и CO- Ac (174.6 м.д.), сигнал карбоксильного углерода AcOH при 180.9 м.д. Наблюдаются сигналы С<sup>*a*</sup>-углеродов Lys и Ser при 53.8 и 55.8 м.д. соответственно, а также 9 сигналов от метиленовых углеродов: Lys (C<sup>*β*</sup> – 30.3 м.д., C<sup>*γ*</sup> – 28.1 м.д., C<sup>*δ*</sup> – 26.3 м.д., C<sup>*ξ*</sup> – 39.3 м.д.), Ser (C<sup>*β*</sup> - 61.1 м.д.), спейсера (C<sup>1</sup> – 39.3 м.д., C<sup>*2*</sup> – 28.1 м.д., C<sup>3</sup> – 25.5 м.д.) и сигналы углеродных ядер <u>C</u>H<sub>3</sub>COOH и <u>C</u>H<sub>3</sub>CO- при 21.8 и 23.1 м.д. соответственно.

Синтез глицинового аналога ГСБ-106 ГТ-105, содержащего в структуре глицин на месте лизинового остатка, был осуществлен методом активированных *N*-оксисукцинимидных эфиров с использованием Boc/Z-стратегии защитных групп (рисунок 42).



88%, общий выход 24%

### Рисунок 42 - Схема синтеза пептида ГТ-105

Первоначально получали Вос-защищенный глицин (50) согласно методике [8] с выходом 81%, используя натриевую соль глицина и ди-трет-бутилпирокарбонат в среде *i*-PrOH : вода (1:1 по объему). Активированные эфиры Boc-Gly-OSu (51) и защищенного серина (18) получали по стандартным методикам [18]. Далее конденсацией (51) с гексаметилендиамином в среде DMF температуре получали гексаметилендиамид бис-(N-третпри комнатной бутилоксикарбонил-глицина) (52) с выходом 85%. Бис-глицин (52) Вос-деблокировали с помощью TFA, получая трифторацетат (53) с выходом 80%. Соединение (53) обрабатывали DIEA в DMF для перевода в свободное основание и конденсировали с активированным эфиром серина (18), получая бис-дипептид (54) с выходом 75%. Удаление  $N^{\alpha}$ -Вос-защитной группы бис-дипептида (54) с помощью TFA приводило с выходом 85% к трифторацетату гексаметилендиамида бис-(О-бензил-серил-глицина) (55), который затем обрабатывали DIEA в DMF и ацилировали янтарным ангидридом. Полученное *N*-моносукцинильное производное бис-дипептида (56) Bzl-деблокировали с помощью каталитического гидрогенолиза в MeOH в присутствии 10% Pd/C, получая целевой дипептид (57) ГТ-105 с общим выходом 24% в расчете на исходный глицин.

В спектре <sup>1</sup>Н-ЯМР ГТ-105 наблюдался мультиплет С<sup>α</sup>Н-протонов Ser при 4.13 м.д. и мультиплет CH<sub>2</sub>-группы Gly при 3.63 м.д., а также 5 мультиплетных сигналов CH<sub>2</sub>-групп: С<sup>β</sup>Н<sub>2</sub>

85

(два мультиплета 3.46 и 3.57 м.д.) – Ser, CH<sub>2</sub>-группы *N*-моносукцинила и метиленовые группы спейсера - C<sup>1</sup>H<sub>2</sub> (3.02 м.д.), C<sup>2</sup>H<sub>2</sub> и C<sup>3</sup>H<sub>2</sub> (в области 1.15-1.44 м.д.). Протоны амидной NH-группы Ser наблюдались в виде дублета при 8.13 м.д., сигналы амидных NH-групп Gly и спейсера в виде триплетов при 8.15 и 7.57 м.д. соответственно.

Синтез глицинсодержащих аналогов ГСБ-106 пептидов ГТ-107 и ГТ-107D проводили по схеме представленной ниже (рисунок 43).

H-Gly-OH Z-X-Lys (Boc) -NH X = L (11) (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> 1) NaHCO<sub>3</sub>, **ZOSu** Z-X-Lys (Boc) -NH X = D (33) ацетон/вода t комн  $1)H_2$ , 10% Pd/C 2) HCl pH 2.5 МеОН, tкомн, бч Z-Gly-OH (58) 92% 2) Z-Gly-OSu (59) DMF, tromh, 12ч OH Z-Gly-X-Lys (Boc) -NH X = L (60) 87% /DCC, (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> EtOAc, 0°C, 1ч X = D (65) 80% t комн, 20ч Z-Gly-X-Lys (Boc) -NH  $H_2$ , 10% Pd/C Z-Gly-OSu (59) 96% MeOH, tromh H-Gly-X-Lys (Boc) -NH X = L (61) 95% (CH<sub>2</sub>) 6 H-Gly-X-Lys (Boc) -NH DMF, tkomh, 44 HO-Suc-Gly-X-Lys (Boc) -NH X = L (62) 84% (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> X = D (66) 83% HO-Suc-Gly-X-Lys (Boc) -NH TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> tкомн,1ч HO-Suc-Gly-X-Lys-NH (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> X = L (63) 90% 2 CF3COOH\* HO-Suc-Gly-X-Lys-NH 1)Амберлит IRA-410/ вода 2)перекристаллизация HO-Suc-Gly-X-Lys-NH X = L (64) 75% (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> HO-Suc-Gly-X-Lys-NH X = D (67) 80% (**64**) **ГТ-107**  $\mathbf{x} = L$ общий выход 42%  $\mathbf{x} = D$ (67) **FT-107D** общий выход 38%

Рисунок 43 - Схема синтеза дипептидов ГТ-107 и ГТ-107D

На первом этапе синтеза ГТ-107 и ГТ-107D получали Z-защищённый глицин (58) взаимодействием *N*-бензилоксикарбонилсукцинимида (Z-OSu) с H-Gly-OH в смеси ацетон-вода в соотношении 1:1 в присутствии бикарбоната натрия при температуре 20-22°C как описано в [162] с выходом 92%. *N*-оксисукцинимидный эфир Z-глицина (59) получали взаимодействием Z-Gly-OH (58) с *N*-гидроксисукцинимидом в присутствии DCC в EtOAc при комнатной температуре с выходом 96%. Полученные ранее бис-лизины (11) и (33) Z-деблокировали с помощью каталитического гидрогенолиза в MeOH в присутствии 10% Pd/C и конденсировали с Z-Gly-OSu в среде DMF. Получали соответствующие бис-дипептиды (Z-Gly-*L*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (60) и (Z-Gly-*D*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (65) с выходами более 80%. Бис-дипептиды (60) и (65) Z-деблокировали каталитическим гидрогенолизом, затем ацилировали янтарным ангидридом в DMF, получая соответствующие *N*-моносукцинильные производные (HO-Suc-*L*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (62) и (HO-Suc-*D*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (65). Ацидолиз пептидов (62) и (66) TFA в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> и последующая обработка анионообменной смолой Амберлит IRA-410 приводили к целевым пептидам ГТ-107 (64) и ГТ-107D (67) с общими выходами 42% и 38% соответственно. Пептиды дополнительно очищали ОФ ВЭЖХ.

В спектре <sup>1</sup>Н-ЯМР энантиомеров ГТ-107 и ГТ-107D наблюдался мультиплет С<sup>а</sup>Нпротонов Lys при 4.10 и 4.12 м.д. и мультиплет CH<sub>2</sub>-группы Gly при 3.68 и 3.69 м.д., а также 8 мультиплетных сигналов CH<sub>2</sub>-групп: С<sup>β</sup>H<sub>2</sub>, С<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> и С<sup>δ</sup>H<sub>2</sub> (в области 1.06 – 1.85 м.д.), С<sup>E</sup>H<sub>2</sub> (2.84 и 2.75 м.д.) – Lys, CH<sub>2</sub>-группы (2.42 м.д.) *N*-моносукцинила и метиленовые группы спейсера -C<sup>1</sup>H<sub>2</sub> (3.05 и 3.00 м.д.), С<sup>2</sup>H<sub>2</sub> и С<sup>3</sup>H<sub>2</sub> (в области 1.06 - 1.85 м.д.). Протоны амидной NH-группы Lys наблюдались в виде дублета при 8.30 и 8.34 м.д., сигналы амидных NH-групп Gly и спейсера в виде триплетов при 7.60 и 8.64 м.д. соответственно. Сигналы протонов боковой NH<sub>2</sub>группы Lys не наблюдались.

Физико-химические характеристики синтезированных аналогов ГСБ-106 представлены в таблице 11. Данные <sup>1</sup>Н-ЯМР-спектроскопии приведены в таблице 12.

		r at	TCX, $R_f$	ОФ ВЭЖХ Время	
Пептид	т. пл., °С	[α] <sup>г</sup> <sub>D</sub> , град	(Система)	удержива-	[M+H]
				ния, мин	
ΓT-106LD	124-127	$[\alpha]^{25}_{D}$ +12.0 (с 1; вода)			
			0.15(A)	6.1	747 4226
ГТ-106DL	125-127	[α] <sup>25</sup> <sub>D</sub> -16.0 (с 1.2; вода)	0.15 (11)	0.1	747.4220
ГТ-106Ac	182-186	$[\alpha]^{20}$ <sub>D</sub> -42.9 (c 1; DMF)	0.40 (A)	11.8*	
		20	0.10 (Б)		631 4141
ΓT-106Ac	-	$[\alpha]^{30}$ <sub>D</sub> -25.6 (c 1; MeOH)	0.16 (A)	5.2	0.5 1. 11 11
ацетат					
ГТ-105	149-151	[α] <sup>20</sup> <sub>D</sub> -21.1 (с 1; вода)	0.35 (A)	13.5**	
		<u> </u>			
ГТ-107	137-139	[α] <sup>25</sup> <sub>D</sub> -15.7 (с 1; вода)			
			0.14 (A)	6.15	687 4032
ΓT-107D	137-139	$\left[\alpha\right]^{25}$ <sub>D</sub> +18.0 (с 1; вода)	0.38 (B)	0.15	007.4032

Таблица 11 - Физико-химические характеристики аналогов ГСБ-106

Примечания: системы TCX: (A) - CHCl<sub>3</sub>-MeOH-вода-AcOH, 15:10:2:3; (Б) - BuOH-AcOH-вода, 4:1:1; (В)- BuOH-пиридин-AcOH-вода, 15:10:3:6. Параметры ОФ ВЭЖХ: подвижная фаза A (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. \*- и \*\* - условия хроматографирования описаны в экспериментальной части (глава 4)

Таблица 12 - Спектры <sup>1</sup>Н-ЯМР аналогов ГСБ-106 (DMSO-d<sub>6</sub>; δ, хим. сдвиг м.д.; мультиплетность; КССВ *J*, Гц)

	Suc		Ser					D-Lys				Спейсер		
Поттил	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	NH	C <sup>α</sup> H	C <sup>β</sup> I	H <sub>2</sub>	NH	C <sup>α</sup> H	$C^{\beta}H_{2}$ $C^{\gamma}H_{2}$ $C^{\delta}H_{2}$	$C^{\epsilon}H_2$	$N^{\epsilon_+}H_3$	NH	$\mathrm{C}^{1}\mathrm{H}_{2}$	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	
пентид	м, 8Н	д, 2Н J 8.1	м, 2Н	м 4Н	, H	д, 2H J 7.8	м, 2Н	м, 12Н	м, 4Н	уш, с, 6Н	т, 2Н J 4.7	м, 4Н	м, 8Н	
ГТ-106LD (38)	2.43	8.07	4.27	3.5	52	8.01	4.15	1.00-1.80	2.76	7.70	7.75	3.00	1.00-1.80	
	Suc		D-Se	r				Lys				Спейсе	)	
Π	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	NH	C <sup>α</sup> H	C <sup>β</sup> I	$H_2$	NH	C <sup>α</sup> H	$\begin{array}{c} \mathrm{C}^{\beta}\mathrm{H}_{2} \\ \mathrm{C}^{\gamma}\mathrm{H}_{2} \ \mathrm{C}^{\delta}\mathrm{H}_{2} \end{array}$	$C^{\epsilon}\!H_2$	$N^{\epsilon ^+} H_3$	NH	$C^{1}H_{2}$	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	
пептид	м, 8Н	д, 2Н J 8.1	м, 2Н	м 4H	, H	д, 2H J 7.8	м, 2Н	м, 12Н	м, 4Н	уш, с, 6Н	т, 2Н J 4.7	м, 4Н	м, 8Н	
ГТ-106DL (41)	2.42	8.07	4.25	3.5	0	7.94	4.13	1.00-1.80	2.74	7.70	7.75	3.00	1.00- 1.80	
	Ac		Se	r			1	Lys	1	1		Спейсе	)	
Поттит	CH <sub>3</sub> CO-	NH	C <sup>α</sup> H	$C^{\beta}H_2$	ОН	NH	$C^{\alpha}H$	$ \begin{array}{c} C^{\beta}H_{2} \\ C^{\gamma}H_{2} C^{\delta}H_{2} \end{array} $	C <sup>E</sup> H <sub>2</sub>	$N^{\epsilon+}H_3$	NH	$\mathrm{C}^{1}\mathrm{H}_{2}$	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	
пешид	с, 6Н	д, 2H J 7.9	м, 2Н	два м, 4Н	уш. c, 2H	д, 2H J 7.8	м, 2Н	три м, 12Н	м, 4Н	уш, с, 6Н	т, 2Н J 4.7	м, 4Н	два м, 8Н	
ГТ-106Ac (45)	1.90	8.15	4.55	3.70	-	8.01	4.21	1.00-1.75	2.75	-	7.52	2.95	1.00-1.75	
ацетат ГТ-106Ас (49)	1.86, 1,88 (AcOH)	8.02	4.28	3.46 и 3.57	5.27	8.08	4.14	1.46 и 1.75 1.33, 1.46	2.75	7.69	7.77	2.99	1.19 и 1.33	

	Suc		Se	er		Gly		C	пейсер	
Пептид	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	NH	$C^{\alpha}H$	$C^{\beta}H_2$	ОН	NH	$CH_2$	NH	$\mathrm{C}^{1}\mathrm{H}_{2}$	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>
	м, 8Н	д, 2Н, <i>J</i> 8.1	м, 2Н	два м, 4Н	уш. с, 2Н	т, 2Н, Ј 6.6	м, 4Н	т, 2H, <i>J</i> 4.7	м, 4Н	м, 8Н
ГТ-105 (57)	2.42	8.13	4.16	3.46 и 3.57	-	8.15	3.63	7.57	3.02	1.15-1.44
	Suc	Gly				Lys	-	C	пейсер	-
Пептид	$(CH_2)_2$	NH	$CH_2$	NH	C <sup>α</sup> H	$C^\beta H_2  C^\gamma H_2  C^\delta H_2$	C <sup>e</sup> H <sub>2</sub>	NH	$C^1H_2$	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>
	м, 8Н	т, 2H, <i>J</i> 6.6	м. 4Н	д, 2H, <i>J</i> 7.8	м, 2Н	три м, 12Н	м, 4Н	т, 2H, <i>J</i> 4.7	м, 4Н	м, 8Н
ГТ-107 (64)	2.46	8.64	3.69	8.34	4.10	1.06-1.85	2.84	7.60	3.05	1.06-1.85
	Suc	Gly				D-Lys	-	C	пейсер	-
Пептид	$(CH_2)_2$	NH	$CH_2$	NH	C <sup>α</sup> H	$C^\beta H_2  C^\gamma H_2  C^\delta H_2$	$C^{\epsilon}H_2$	NH	$C^1H_2$	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>
	м, 8Н	т, 2H, <i>J</i> 6.6	м, 4Н	д, 2H, <i>J</i> 7.8	м, 2Н	три м, 12Н	м, 4Н	т, 2H, <i>J</i> 4.7	м, 4Н	м, 8Н
ΓT-107D (67)	2.42	8.57	3.68	8.30	4.12	1.10-1.75	2.75	7.65	3.00	1.10-1.75

# 3.4.2 Изучение связи нейропротекторной активности и структуры аналогов

# ГСБ-106

Для выявления нейропротекторной активности синтезированных дипептидных аналогов ГСБ-106 была также использована модель окислительного стресса с перекисью водорода на культуре иммортализованных клеток гиппокампа мыши линии HT-22 [98]. Активность аналогов ГСБ-106 изучали в интервале концентраций 10<sup>-5</sup>-10<sup>-8</sup> М.

Как видно из таблицы 13, нейропротекторная активность<sup>3</sup> сохраняется при замене остатка серина в ГСБ-106 на глицин (ГТ-107) и при замене сукцинильного радикала на ацетильный (ГТ-106Ас). 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 13).

Таблица 13 - Влияние дипептидных миметиков BDNF на жизнеспособность нейронов в условиях окислительного стресса

Соединение	Концентра-	Оптическое	поглощение	Активность,
	ция, М	c H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	без H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	%
ГСБ-106	10 <sup>-5</sup>	0.097±0.010*		31
	10 <sup>-6</sup>	0.095±0.008*		27
(HO-Suc-L-Ser-L-Lys-NH-	10 <sup>-7</sup>	0.095±0.010*		26
$)_2(CH_2)_6$	10 <sup>-8</sup>	0.101±0.007*		41
	0 (контроль)	$0.085 \pm 0.006^{\#}$	0.124±0.010	
	10 <sup>-9</sup>	0.088±0.010*		36
	10 <sup>-10</sup>	0.082±0.009		17
	0 (контроль)	$0.077 \pm 0.003^{\#}$	0.107±0.008	
ГТ-106DL	10 <sup>-5</sup>	0.103±0.006		-21
	10 <sup>-6</sup>	0.111±0.009		0
$L$ -Ser $\rightarrow D$ -Ser	10 <sup>-7</sup>	0.107±0.010		-11
	10 <sup>-8</sup>	0.106±0.007		-14
	0 (контроль)	$0.111\pm0.009^{\#}$	0.148±0.013	
ГТ-106LD	10 <sup>-5</sup>	0.098±0.013		-14
	10 <sup>-6</sup>	0.097±0.010		-28
$L-Lys \rightarrow D-Lys$	10 <sup>-7</sup>	0.098±0.014		-14
	10 <sup>-8</sup>	0.100±0.007		7
	0 (контроль)	$0.099 \pm 0.008^{\#}$	0.106±0.005	
ГТ-106Ac	10 <sup>-5</sup>	0.119±0.014*		55
	10 <sup>-6</sup>	0.122±0.017*		64
Suc→Ac	10 <sup>-7</sup>	0.117±0.018*		48
	10 <sup>-8</sup>	0.118±0.009*		52
	0 (контроль)	$0.101 \pm 0.006^{\#}$	0.134±0.005	

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> 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).

ГТ-105	10 <sup>-5</sup>	0.156±0.008		-8
	10 <sup>-6</sup>	0.170±0.020		20
L-Lvs→Glv	10 <sup>-7</sup>	0.166±0.017		12
	10 <sup>-8</sup>	0.166±0.014		12
	0 (контроль)	$0.160 \pm 0.013^{\#}$	0.211±0.012	
ГТ-107	10 <sup>-5</sup>	0.096±0.008		3
	10 <sup>-6</sup>	0.121±0.010*		74
<i>L</i> -Ser→Glv	10 <sup>-7</sup>	0.113±0.011		53
	10 <sup>-8</sup>	0.126±0.009*		89
	0 (контроль)	$0.095{\pm}0.009^{\#}$	0.130±0.013	
ГТ-107D	10 <sup>-5</sup>	0.142±0.013		-9
	10 <sup>-6</sup>	0.149±0.012		3
<i>L</i> -Ser→Glv	10 <sup>-7</sup>	0.147±0.015		0
$L_{\rm Lyc} \rightarrow D_{\rm Lyc}$	10 <sup>-8</sup>	0.145±0.018		-3
L-Lys - D-Lys	0 (контроль)	$0.147 \pm 0.012^{\#}$	0.205±0.015	
BDNF	50 нг/мл (10 <sup>-9</sup> )	0.090±0.003*		78
	0 (контроль)	$0.076 \pm 0.003^{\#}$	0.094±0.004	

Примечания: опыты выполнены на гиппокампальных нейронах мыши линии НТ-22. Жизнеспособность клеток определяли с использованием 0.5% водного раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия (МТТ-тест), измеряя оптическую плотность при 600 нм. Статистическую обработку данных проводили по критерию Краскела-Уоллеса. Данные представлены в виде m ± s.d.

p < 0.05 относительно активного контроля (с  $H_2O_2$ );

<sup>#</sup> p < 0.05 относительно пассивного контроля (без  $H_2O_2$ );

<sup>а</sup> активность в опытах по противодействию окислительному стрессу рассчитывалась по формуле  $A(%) = (D_{_{3Ken}} - D_{_{H2o2}}) / (D_{_{KoHTp}} - D_{_{H2o2}}) \times 100\%$ , где  $D_{_{3Ken}}$  – оптическое поглощение раствора в опыте,  $D_{_{H2o2}}$  - оптическое поглощение раствора активного контроля (с  $H_2O_2$ ),  $D_{_{KoHTp}}$  – оптическое поглощение; пассивного контроля (без  $H_2O_2$ ).

Полученные результаты свидетельствуют о ключевой роли бокового радикала лизина у ГСБ-106 в проявлении его нейропротекторной активности. *L*-Конфигурация необходима как для остатка лизина, так и для остатка серина. В отсутствии бокового радикала серина конфигурация лизина остается критичной, так как миметик ГТ-107D был неактивен. Результаты исследований указывают на малое влияние сукцинильного радикала (биоизостера остатка аспарагиновой кислоты) в структуре ГСБ-106 на его нейропротекторную активность (таблица 13).

# 3.4.3 Изучение связи структуры и антидепрессивной активности в ряду аналогов ГСБ-106

Антидепрессивные свойства изучались<sup>4</sup> только для тех аналогов ГСБ-106, для которых была выявлена нейропротекторная активность (миметики ГТ-107 и ГТ-106Ас) (рисунок 44). Это связано с тем, что антидепрессивные свойства BDNF тесно связаны с его нейропротекторной активностью [150]. Кроме того, нами ранее [4] было показано, что в ряду димерных

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> проводилось совместно с к.б.н., с.н.с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств П.Ю. Поварниной

дипептидных миметиков BDNF все соединения, обладавшие антидепрессивной активностью, обладали и нейропротекторной активностью, но не все соединения с нейропротекторной активностью. Так например пептиды ГСБ-106 и ГСБ-214 обладают нейропротекторной активностью, но антидепрессивный эффект проявляет только ГСБ-106.

Антидепрессивную активность выявляли на классической модели «выученная беспомощность» у мышей в оригинальном варианте Порсолта [173].



Рисунок 44 - Антидепрессивная активность димерных дипептидов ГТ-106Ас и ГТ-107 в тесте «вынужденное плавание» по Порсолту

Примечания: \**p*<0.05 относительно контроля по точному критерию Фишера.

Как видно из рисунка 44, антидепрессивной активностью обладал только ГТ-106Ас (замена Suc на Ac), проявляя в тесте вынужденного плавания статистически достоверный антидепрессивный эффект в дозах 1 и 5 мг/кг внутрибрюшинно. Уменьшение времени иммобильности мышей составляло 14% и 17% от времени иммобильности мышей из контрольной группы соответственно. Однако ГТ-106Ас был на порядок менее активен, чем ГСБ-106 (таблица 13). Глицинсодержащий аналог ГТ-107, обладающий нейропротекторной активностью, антидепрессивной активности не проявлял (рисунок 44).

В таблице 14 представлены результаты изучения связи структуры и фармакологической активности в ряду аналогов ГСБ-106.

Таблица 14 - Структурно-функциональные отношения в ряду аналогов ГСБ-106 ((Suc-Ser-Lys-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>) - димерного дипептидного миметика BDNF

Соединение					
	Замены			Активность	
Suc	Ser	Lys	Шифр	нейропротек- торная	антидепрес- сивная
0	0	0	ГСБ-106	+	+
Ac	0	0	ГТ-106Ас	+	+
0	Gly	0	ГТ-107	+	0
0	0	Gly	ГТ-105	0	не изучали
0	D-Ser	0	ГТ-106DL	0	не изучали
0	0	D-Lys	ГТ-106LD	0	не изучали
0	Gly	D-Lys	ΓT-107D	0	не изучали

Примечания: 0 – отсутствует замена, 0 – отсутствует эффект, + - соединение обладает активностью.

Отсутствие антидепрессивного эффекта у ГТ-107 подтверждает обнаруженный нами ранее факт, что не все димерные миметики BDNF с нейропротективной активностью обладают и антидепрессивной активностью. Не исключено, что это может быть связано с вовлечением разных путей передачи сигнала от TrkB при реализации этих двух эффектов. О такой возможности говорит то, что ГК-2, миметик NGF, сконструированный на основе его 4-й петли, обладает нейропротекторной активностью и при этом активирует только PI3K/AKT сигнальный путь [80]. С другой стороны, для миметика BDNF ГСБ-106, активирующего как PI3K/AKT, так и MAPK/ERK пути, характерны оба вида активности [5]. Это означает, что структурные требования для проявления антидепрессивной активности миметиками 4-й петли BDNF являются более строгими, чем для нейропротекторной.

Таким образом, для антидепрессивной активности димерных миметиков BDNF необходима дипептидная последовательность, совпадающая с центральным фрагментом бетаизгиба 4-й петли (рисунок 45). 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 45 – Минимальный фрагмент, необходимый для антидепрессивной активности миметика BDNF (выделен синим цветом). Асимметрические атомы углерода остатков лизина и серина имеют (*S*) – конфигурацию

### 3.5 Выбор оптимальной 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 (таблица 15).

Способ/	Стратегия защитных групп	Метод конденсации	
Метод		остатков Lys / Ser	
Ι	Poc/Z(Pzl)	-OSu / -OSu	
II	BOC/Z(BZI)-	- OPfp / -OPfp	
III	7/Pag OH EPUERS Ser aposerus	-OSu / -N <sub>3</sub>	
IV		-OSu / -OPfp	

Таблица 15 – Рассмотренные методы синтеза ГСБ-106

Синтез методами I и II (рисунок 46) включает 8 стадий: 1) и 2) получение активированных эфиров защищенных лизина и серина; 3) конденсация активированного эфира лизина с гексаметилендиамином; 4) удаление Вос-защитной группы; 5) конденсация полученного деблокированного продукта с активированным эфиром серина; 6) второй ацидолиз (Вос-деблокирование); 7) ацилирование янтарным ангидридом; 8) удаление защитных групп с боковых функциональных групп серина и лизина каталитическим гидрогенолизом.

Синтез методом III (рисунок 47) включает 10 стадий: 1) получение гидразида Z-серина; 2) получение азида защищенного серина; 3) получение активированного эфира Z-Lys(Boc)-OSu;

95

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 остатка серина; 8) ацилирование янтарным ангидридом; 9) удаление Вос-групп с N<sup>6</sup>H-группы лизина; 10) перевод соединения в бессолевую форму.

Синтез методом IV (рисунок 47) так же, 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-лизином с образованием димерного дипептида.

При наличии одинаковой хроматографической гомогенности в качестве критерия оптимальности метода синтеза ГСБ-106 принималась оптическая чистота конечного продукта, а при равной оптической чистоте - общий выход и трудоемкость синтеза.

Метод I представляет собой синтетическую цепочку, по которой впервые был получен ГСБ-106 (рисунок 38). Метод II предполагает использование пентафторфениловых эфиров защищенных серина и лизина. Этот метод, так же как и метод I, основан на Boc/Z-стратегии защитных групп. Первоначально получали активированные пентафторфениловые эфиры Boc-Lys(Z(Cl))-OPfp (68) и Boc-Ser(Bzl)-OPfp (69) в классических условиях [111], используя пентафторфенол и DCC, с выходами 87-89%. Далее активированный эфир лизина (68) конденсировали в EtOAc с гексаметилендиамином, получая бис-лизин (26) с выходом 92%. *N*-альфа-Boc-группы соединения (26) удаляли с помощью 4 М HCl в диоксане, получая гидрохлорид бис-лизина (43) с выходом 95%. Далее (43) конденсировали с активированным эфиром серина (69) в среде DMF и получали бис-дипептид (28) с выходом 45%. Начиная с бис-дипептида (28) синтетические схемы методов I и II полностью совпадают.

Общий выход по методу I составил 26%, по методу II – 36% в расчете на защищенный лизин. Основное влияние на общий выход оказывала стадия образования пептидной связи: метод *N*-оксисукцинимидных эфиров давал больший выход по сравнению с методом пентафторфениловых эфиров. Оптическая чистота конечных продуктов синтеза в обоих случаях была одинаковой. Таким образом, метод *N*-оксисукцинимидных эфиров при использовании Boc/Z - стратегии оказался предпочтительнее. К преимуществам синтеза способами I и II относится то, что на финальной стадии проводится гидрогенолиз, который позволяет получить продукт ГСБ-106 в виде свободного основания без использования ионообменных смол.



Рисунок 46 - Схема синтеза ГСБ-106 по Вос/Z-стратегии методами N-оксисукцинимидных (I) и

пентафторфениловых (II) эфиров

97

### **Метод III**



Рисунок 47 - Схема синтеза ГСБ-106 по Z/Boc -стратегии методами III и IV

Синтез с использованием азидного метода (способ III) (рисунок 47) позволяет использовать серин, не защищенный по боковой ОН-группе. Это очень важно, т.к. введение защиты в боковую группу серина является трудоемкой операцией, что приводит к удорожанию соединения.

На первой стадии синтеза по методу III из метилового эфира защищенного серина получали соответствующий гидразид Z-Ser-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub> (70). Цепочку превращения с остатком лизина вели аналогично синтезу ГТС-201, получая активированный эфир лизина (10), затем бис-лизин (11) и свободный по аминогруппе бис-лизин (12). Гидразид (70) переводили в азид с помощью *н*-бутилнитрита в среде DMF при - 30°С и без выделения вводили во взаимодействие с (12), получали бис-дипептид лизина (Z-L-Ser-L-Lys(Boc)-NH-)2(CH2)6 (13) с выходом 67%. Пептид (13) подвергали каталитическому гидрогенолизу, далее выделенный продукт ацилировали янтарным ангидридом. Полученный *N*-моносукцинильный бис-дипептид (71) Bocдеблокировали TFA в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> и получали трифторацетат (72) с выходом 90%. На завершающей стадии синтеза трифторацетат ГСБ-106 (72) обрабатывали анионообменной смолой Amberlite IRA-410 в ОН-форме и получали целевой пептид (31). ГСБ-106 очищали с помощью ионообменной хроматографии на смоле SPS-Био в градиенте Ру-АсОН буфера. Общий выход синтеза этим методом составил 44%.

В синтезе способом IV (рисунок 47) трудномасштабируемый азидный метод заменен на метод активированных эфиров. Известно, что для свободного по гидроксильной группе Z-Ser-ОН 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. Взаимодействие бис-лизина (H-*L*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (12) с Z-Ser-OPfp (9) приводило к бисдипептиду (13) из которого далее, также как и в методе III, получали *N*-моносукцинильное производное (71), затем трифторацетат (72) и целевой продукт (31) ГСБ-106. Общий выход ГСБ-106 по методу IV составляет 62%, оптическая чистота на уровне азидного метода (таблица 16).

Способ/ Метод синтеза ГСБ-106	Удельный угол оптического вращения [α] <sup>3</sup> D	Температура плавления, °С	Выход, %
I	$[\alpha]^{25}$ 44.5° (a.1; pour)	143-145	36
II	$[\alpha]_{D} = 44.3 (C 1, BODA).$	(из MeOH-Et <sub>2</sub> O)	26
III	$[\alpha]_{r}^{22}$ 46 1° (c 1; pour)	161-163 (EtOH)	44
IV	$[\alpha]_{\beta} = 40.1 (C 1, BOZa).$	101-105 (EtOII)	62

Таблица 16 – Характеристики и выходы ГСБ-106, полученного разными методами

Расчёт стоимости синтеза 100 г ГСБ-106 (таблицы 17-20) с учётом актуальной (на начало 2017 г) цены реагентов и растворителей показал, что метод IV является оптимальным из рассмотренных (дешевле метода I в два раза), по трудозатратам все методы сопоставимы, таким образом, для синтеза ГСБ-106 был выбран метод IV.

Необходимые для синтеза	Количество, г	Цена за 1 кг,	Стоимость, руб
реагенты и растворители	на 100 г продукта	руб	
Boc-Lys(Z(Cl))-OH, KHP	350	100000	35000
Boc-Ser(Bzl)-OH, KHP	358	150000	53700
Гексаметилендиамин, A14212*	34	6000	204
Янтарный ангидрид, A12245*	94	10000	940
N-гидроксисукцинимид, AC15727-0010	241	55000	13255
Дициклогексилкарбодиимид, AC11390-0010	418	12000	5016
Катализатор 10% Pd/C, A12012	16	288000	4608
	Количество, мл	Цена за 1 л,	
	на 100 г продукта	руб	
DMAPA	80	8000	640
DIEA	72	7000	504
Диметилформамид	2500	250	625
Дихлорметан	1380	350	483
Диэтиловый эфир	12000	700	8400
Метанол	5480	250	1370
Трифторуксусная кислота	2860	7000	20020
ΤΓΦ	7560	600	4536
Этилацетат	8150	220	1793
		ИТОГО	174449

Таблица 17 – Стоимость реагентов для синтеза ГСБ-106 по методу I

Таблица 18 – Стоимость р	еагентов для синтеза ГСБ-106 по методу	Π
--------------------------	--	---

Необходимые для синтеза	Количество, г	Цена за 1 кг,	Стоимость, руб
реагенты и растворители	на 100 г продукта	руб	
Boc-Lys(Z(Cl))-OH,	480	100000	48000
Boc-Ser(Bzl)-OH,	482	150000	72300
1 ексаметилендиамин, A14212*	52	6000	312
Янтарный ангидрид, A12245*	94	10000	940
Пентафторфенол, А15574	527	33500	17655
Дициклогексилкарбодиимид, AC11390-0010	554	12000	6648
Катализатор 10% Pd/C, A12012	16	288000	4608
	Количество, мл	Цена за 1 л,	
	на 100 г продукта	руб	
Гексан	3700	450	1665
Диоксан	2000	300	600
4 M HCl в диоксане	2000	8000	16000
DMAPA	134	8000	1072
DIEA	123	7000	861
Диметилформамид	4200	250	1050
Дихлорметан	1800	350	630
Диэтиловый эфир	6000	700	4200
Метанол	6200	250	1550
Трифторуксусная кислота	600	7000	4200
Этилацетат	16000	220	3520
		ИТОГО	202571

Необходимые для синтеза	Количество, г на 100 г пролукта	Цена за 1 кг, руб	Стоимость,
реагенты и растворители	на тоот продукта		руб
Z-L-Lys-(Boc)-OH*DCHA, KHP	324	100000	32400
Z-Ser-OMe, KHP	221	100000	22100
Гексаметилендиамин, A14212	31	6000	186
Янтарный ангидрид, А12245	40	10000	400
N-гидроксисукцинимид, AC15727-0010	79	55000	4345
Дициклогексилкарбодиимид, AC11390-0010	143	12000	1716
Катализатор 10% Pd/C, A12012	35,3	288000	10166
	Количество, мл на 100 г продукта	Цена за 1 л, руб	
Гидразингидрат, А14005	105	7300	767
Бутилнитрит, Н56050	86	132000	11352
Триэтиламин	345	300	104
Бензол	534	180	96
Гексан	400	450	180
Диметилформамид	4950	250	1238
Дихлорметан	2750	350	963
Диэтиловый эфир	2055	700	1439
Метанол	5280	200	1056
Петролейный эфир 40/60	710	250	178
Пиридин	730	1500	1095
Смола ан Amberlit IRA- 400(Cl), 017246	250	22000	5500
Смола кат СПС-Віо-SP	500	18000	9000
Трифторуксусная кислота	490	7000	3430
Уксусная кислота, ледяная	550	250	138
Этанол-ректификат	600	250	150
Этилацетат	14000	220	3080
		ИТОГО	111076

Таблица 19 – Стоимость реагентов для синтеза ГСБ-106 по методу III

Необходимые для синтеза	Количество, г	Цена за 1 кг, руб	Стоимость,
реагенты и растворители	на 100 г продукта		руб
Z-L-Lys-(Boc)-OH* DCHA, KHP	238	100000	23800
Серин	62	10000	620
Гексаметилендиамин, А14212	24	6000	144
Янтарный ангидрид, А12245	42	10000	420
N-гидроксисукцинимид, AC15727-0010	115	55000	6325
Пентафторфенол, А15574	114	33500	3819
N-бензилоксикарбонил-	170	00000	15010
сукцинимид АС12153	169	90000	15210
Дициклогексилкарбодиимид, AC11390-0010	215	12000	2580
Катализатор 10% Pd/C, A12012	28	288000	8064
	Количество, мл на 100 г продукта	Цена за 1 л, руб	
Бензол	556	180	100
Гексан	2260	450	1017
Диметилформамид	2812	250	703
Дихлорметан	6100	350	2135
Диэтиловый эфир	3340	700	2338
Метанол	9460	200	1892
Петролейный эфир 40/60	355	250	89
Пиридин	730	1500	1095
Смола ан Amberlit IRA- 400(Cl), 017246	250	22000	5500
Смола кат СПС-Віо-SP	500	18000	9000
Трифторуксусная кислота	1010	7000	7070
Уксусная кислота, ледяная	550	250	137
Этанол-ректификат	690	250	173
Этилацетат	5520	220	1214
		ИТОГО	93445

Таблица 20 – Стоимость реагентов для синтеза ГСБ-106 по методу IV

По отобранному методу синтеза (метод IV) в рамках выполнения Государственного контракта от «29» августа 2016 г. №14.№8.12.0086 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» был разработан **лабораторный регламент получения ФС ГСБ-106.** 

### 3.6 Разработка фармакопейной статьи предприятия на ФС ГСБ-106

Для разработки ФСП были синтезированы согласно лабораторному регламенту получения ФС ГСБ-106 три опытные партии субстанции ГСБ-106, на которых изучены физикохимические свойства: растворимость, температура плавления, удельный угол оптического вращения, показатель рН раствора субстанции. Получены и охарактеризованы ИК- и ЯМРспектры образцов субстанции (рисунки 48-50). Установлены основные фармакопейные показатели качества в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ XIII издания. Результаты определения представлены в таблице 21.

Показатели	Методы	Нормы
Описание	Визуальный	Порошок белого или почти белого цвета
Растворимость	ГФ XII, ч. 1, с. 92	Легко растворимо в воде, мало растворимо
		в DMSO, очень мало растворимо в
		абсолютном EtOH и MeOH, практически не
		растворимо в 96% EtOH, CHCl <sub>3</sub> , ацетоне,
		EtOAc, диэтиловом эфире, гексане
Подлинность	ИК-спектроскопия	ИК-спектр субстанции в области от 4000 до
		400 см <sup>-1</sup> по положению полос поглощения и
		их интенсивности должен соответствовать
		рисунку спектра ГСБ-106
	Качественная реакция	Окрашивание раствора в фиолетовый цвет
	ЯМР-спектроскопия	Соответствие <sup>1</sup> Н и <sup>13</sup> С-спектров эталонным
Прозрачность	ГФ XIII, том. 1, с. 542	2% раствор субстанции в воде должен быть
		прозрачным или выдерживать сравнение с
		эталоном I
Цветность	ГФ XIII, том. 1, с. 535	2% раствор субстанции в воде должен быть
		бесцветным
pH	ГФ XIII, том. 1, с. 547	От 4.3 до 5.0 (2% раствор в воде)
Удельное	ГФ XIII, том. 1, с. 605	От -44.0 до -47.0° (1% раствор в воде)
вращение		

Таблица 21 – Физикохимические свойство субстанции ГСБ-106

По химической структуре соединение ГСБ-106 представляет собой гексаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина). По внешнему виду субстанция ГСБ-106 - белый

кристаллический порошок, легко растворимый в воде, практически нерастворимый в EtOH, CHCl<sub>3</sub>, диэтиловом эфире, мало растворимый в DMSO.

Субстанция ГСБ-106 плавится в интервале температур от 159 до 163°C с разложением. 2% растворы ГСБ-106 в воде прозрачны или по мутности не превышают эталон I (ГФ XIII), растворы бесцветные, pH от 4.63 до 4.73. Потеря в массе при высушивании субстанции, определяемая при температуре  $60\pm1$ °C и остаточном давлении не превышающем 15 мм.рт.ст. в течение 3 ч над CaCl<sub>2</sub>, составляла не более 5.0%. Указанные условия были выбраны в связи с возможным разложением субстанции на воздухе.

ИК-спектры получены на ИК-спектрофотометре Vertex 70 («Вгикег», Германия) в таблетках КВг (1 мг ГСБ-106 на 200 мг КВг). В ИК-спектре ГСБ-106, снятом в таблетках калия бромида (рисунок 48), присутствуют характеристические полосы поглощения (см<sup>-1</sup>): 3400 – валентные колебания О-Н гидроксильной группы серина; 3282 и 3090 - валентные колебания NH амидных групп и  $\omega$ -NH<sub>2</sub>-группы лизина; 2930 и 2850 - валентные колебания C-H (CH<sub>2</sub>-групп); валентные колебания C=O карбоксильной группы накладываются на полосу 1650 – валентные колебаний C=O «амид I»; 1558 деформационные колебания N-H «амида II», 1402 - валентные колебания C=O карбоксильной группы; 1260 - деформационные колебания O-H карбоксильной группы; 1170 - валентные колебания C-O гидроксильной группы серина (рисунок 48).



Рисунок 48 - ИК-спектр ГСБ-106 (КВг)

В <sup>1</sup>Н-ЯМР-спектре (DMSO-d<sub>6</sub>, 20°C) присутствуют сигналы всех функциональных групп молекулы (рисунок 49). Характерными являются следующие сигналы: 1.10 (м, 4H, 2  $C^{\gamma}H_2$  Lys), 1.34 (м, 4H, 2  $C^{\delta}H_2$  Lys), 1.70 (м, 4H, 2  $C^{\beta}H_2$  Lys), 1.00-1.75 (м, 8H, -NHCH<sub>2</sub>(C<u>H</u><sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 2.42 (м, 8H, 2 HOOCC<u>H</u><sub>2</sub>C<u>H</u><sub>2</sub>), 2.74 (м, 4H, 2  $C^{\epsilon}H_2$  Lys), 3.00 (м, 4H, -NHC<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C<u>H</u><sub>2</sub>NH-), 3.63 (м, 4H, 2  $C^{\beta}H_2$  Ser), 4.14 (м, 2H, 2  $C^{\alpha}H$  Lys), 4.27 (м, 2H, 2  $C^{\alpha}H$  Ser), 7.68 (т, *J* 4.9 Гц, 2H, - N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 7.72 (уш,с, 4H, 2 N<sup>ε</sup>H<sub>2</sub>Lys), 7.95 (д, *J* 7.8 Гц, 2H, 2 NH Lys), 8.10 (д, *J* 8.1 Гц, 2H, 2 NH Ser).



В спектре <sup>13</sup>С-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>, 20°C) присутствуют сигналы всех углеродных ядер ( $\delta$ , м.д.): 22.2 (C<sup> $\gamma$ </sup> Lys), 26.4 (C<sup>3</sup>, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH-), 26.5 (C<sup> $\delta$ </sup> Lys), 29.1 (C<sup>2</sup>, -NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 29.8 (C<sup> $\beta$ </sup> Lys), 32.6 и 23.6 (HOOC<u>C</u>H<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-), 37.6 (C<sup> $\epsilon$ </sup> Lys), 39.1 (C<sup>1</sup>, -NHC<u>H<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 54.4 (C<sup> $\alpha$ </sup> Lys), 57.6 (C<sup> $\alpha$ </sup> Ser), 61.2 (C<sup> $\beta$ </sup> Ser), 171.0 (CO- Ser), 172.1 (CO- Lys), 175.6 (HOOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-), 177.4 (HOO<u>C</u>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-) (рисунок 50).</u>



Рисунок 50 – <sup>13</sup>С-ЯМР-спектр ГСБ-106 (DMSO-d<sub>6</sub>)

ИК-, <sup>1</sup>Н и <sup>13</sup>С ЯМР-спектры всех образцов субстанции были практически идентичны. Полученные спектры подтверждают химическую структуру соединения ГСБ-106 и могут быть применены для его идентификации в субстанции Для подтверждения присутствия в структуре молекулы ГСБ-106 пептидных связей была также проведена биуретовая реакция. Для проведения этой реакции к 1 мл 2% раствора субстанции ГСБ-106 в воде очищенной прибавляли 1 мл 10% раствора натрия гидроксида и затем осторожно по каплям прибавляли 1% раствор меди (II) сульфата. Раствор окрашивался в фиолетовый цвет.

### 3.6.1 Определение посторонних примесей в ФС ГСБ-106 методом ТСХ

Чистота субстанции ГСБ-106 была изучена с помощью тонкослойной хроматографии. При разработке методик были использованы образцы промежуточных продуктов синтеза: дициклогексилмочевины (1), Z-L-SerOH (4), Z-L-SerOPfp (5), (Z-L-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (8), (H-L-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (9), (Z-L-Ser-L-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (10), (H-L-Ser-L-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (11), (HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-L-Ser-L-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (12). Образцы *N*гидроксисукцинимида (2), *N*,*N*-диметил-1,3-пропандиамина (3), пентафторфенола (6) (Alfa Aesar, Великобритания), а также образец гексаметилендиамина (7) (Sigma-Aldrich, США).

На первом этапе соединения 1-12 были хроматографированы индивидуально в различных системах растворителей (таблица 22). Обнаружение зон адсорбции соединений на пластинке проводили в УФ-свете с длиной волны 254 нм, при обработке пластинки спиртовым раствором нингидрина и хлор-толидиновым реактивом. Анализ полученных данных, показал, что в одномерной TCX разделение не будет успешным вследствие близких показателей Rf (в основном для защищенных бис-пептидов 8, 10, 12). Удовлетворительного разделения удалось достичь только с помощью двумерной TCX. Были подобраны следующие условия: элюент 1 – система бензол – MeOH (1:4), элюент 2 – гексан – EtOAc (1:5). ГСБ-106 в этих условиях имеет Rf - 0.

Хроматограмма модельной смеси представлена на рисунке 51, показатели хроматографической подвижности в таблице 22.



Рисунок 51 - Хроматограмма модельной смеси ГСБ-106 и технологических примесей 1-12

Элюент 1 – система бензол – MeOH (1:4), элюент 2 – система гексан – EtOAc (1:5). На хроматографическую пластину наносили раствор ГСБ-106 в воде и растворы примесей 1-12 в MeOH. Обнаружение зон адсорбции соединений на пластинке проводили в УФ-свете с длиной волны 254 нм, при обработке пластинки спиртовым раствором нингидрина и хлортолидиновым реактивом.

Пределы обнаружения ГСБ-106 и технологических примесей составляли от 0.05 до 10 мкг (таблица 23). Следует отметить, что пределы обнаружения примесей при обработке хлортолидиновым реактивом значительно ниже в сравнении с другими индикаторами и составляют 0.05-0.50 мкг, поэтому этот способ обнаружения был выбран основным для дальнейших исследований.

При нанесении на хроматографическую пластинку 100-250 мкг серийных образцов субстанции ГСБ-106 ни в одном из них примесей 1-12 обнаружено не было. В тоже время в серийных образцах был обнаружен ряд неидентифицированных примесей I-V. Оптимальное разделение этих примесей наблюдалось в системе Л (MeOH – H<sub>2</sub>O, 2:1) значения R*f* для примесей I-V составили соответственно 0.05, 0.62, 0.70, 0.74 и 0.81 в системе В (CHCl<sub>3</sub> – MeOH – лед. AcOH – H<sub>2</sub>O, 15:10:2:3) (рисунок 52).

108
Элюирующая система		Значение Rf примесей												
		ГСБ-106	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
EtOAc	Этилацетат	0	0.68	0	0	0	0.82	0.83	0	0.51	0	0	0	0
В	СНСl <sub>3</sub> – MeOH – лед. AcOH – H <sub>2</sub> O (15:10:2:3)	0.22	0.99	0.73	0.37	0.75	0.95	0.98	0.34	1	0.89	0.99	0.74	0.95
B2	CHCl <sub>3</sub> – MeOH – лед. AcOH – H <sub>2</sub> O (8:10:2:3)	0.52	1	0.85	0.49	0.91	1	1	0.47	1	0.98	1	0.97	1
Г	СНСl <sub>3</sub> – МеОН – лед. АсОН (80:10:1)	0	0.91	0.16	0.05	0.03	0.76	0.69	0	0.75	0	0.41	0	0
Ж	ВиОН – лед. АсОН – H <sub>2</sub> O (3:1:1)	0.17	0.89	0.62	0.34	0.78	0.90	0.92	0.31	0.97	0.69	0.65	0.77	0.80
И	Бензол – МеОН (1:4)	0	0.91	0.78	0.10	0.86	0.89	0.88	0.03	0.93	0.29	0.90	0.16	0.79
К	Диоксан – H <sub>2</sub> O (9:1)	0.02	0.89	0.85	0.03	0.72	1	0.89	0	0.92	0.22	0.92	0.05	0.57
Л	$MeOH - H_2O$ (2:1)	0.51	хвост	0.81	0.05	0.91	0.93	0.94	0.03	0.96	0.12	1	0.35	1
Н	Гексан – EtOAc (1:1)	0	0.35	0	0	0	0.32	0.52	0	0.02	0	0	0	0
H3	Гексан – EtOAc (1:5)	0	0.64	0.04	0.04	0.03	0.77	0.88	0	0.33	0	0.14	0	0
Π	МеОН – лед. АсОН – H <sub>2</sub> O (4:2:1)	0.69	0.95	0.86	0.66	0.94	0.96	0.98	0.72	0.99	0.91	0.99	0.97	0.98

Таблица 22 - Результаты хроматографирования ГСБ-106 и примесей 1-12



Рисунок 52 - Хроматограмма образца субстанции ГСБ-106 в системе CHCl<sub>3</sub> – MeOH – лед. AcOH – H<sub>2</sub>O (15:10:2:3), объем нанесения – 200 мкг, проявление хлор-толидиновым реактивом

Таблица 23 - Значение Rf и предел обнаружения ГСБ-106 и его технологических примесей методом TCX

	R	ſ	Предел обнаружения, мкг					
Соединение	Система И Бензол – MeOH (1:4)	Система H3 Гексан – EtOAc (1:5)	УФ, 254 нм	Нингидрин	Хлор-толидиновый реактив			
ГСБ-106	0	0	-	0.5	0.5			
1	0.91	0.64	-	-	0.05			
2	0.78	0.04	0.5	-	0.5			
3	0.10	0.04	-	0.5	0.5			
4	0.86	0.03	10	-	0.5			
5	0.89	0.77	10	-	0.5			
6	0.88	0.88	10	-	0.5			
7	0.03	0	-	0.5	0.5			
8	0.93	0.33	10	-	0.5			
9	0.29	0	-	10	0.5			
10	0.90	0.14	10	-	0.5			
11	0.16	0	-	10	0.5			
12	0.79	0	-	-	0.5			

#### 3.6.2 Определение посторонних примесей в ФС ГСБ-106 методом ОФ ВЭЖХ

Для дополнительного подтверждения отсутствия примесей 8-12 и наличия неидентифицированных примесей в субстанции ГСБ-106 была разработана методика с использованием ВЭЖХ.

В результате исследований по выбору условий хроматографирования были подобраны следующие условия разделения: подвижная фаза A – смесь дистиллированной воды, ацетонитрила (для ВЭЖХ) и TFA («осч») (0.05% раствор TFA в 50 мл воды и 950 мл ацетонитрила), подвижная фаза Б – 0.05% раствор TFA в ацетонитриле. Режим элюирования градиентный (0-30%, от A к Б, 20 мин). Скорость потока 0.9 мл/мин, детектирование при длине волны 220 нм. Длина волны была выбрана на основании совпадения областей поглощения всех исследуемых соединений на УФ-спектрах в растворах в подвижной фазе Б.

В указанных условиях времена удерживания исследуемых соединений составляли ГСБ-106 – 6.3 мин, (9) – 12.9 мин, (12) – 14.5 мин, (11) – 18.5 мин, (10) – 21.6 мин, (8) – 24.7 мин. Относительное время удерживание (9) равно  $2.05 \pm 0.02$  мин, (12) –  $2.30 \pm 0.02$  мин, (11) – 2.94  $\pm 0.03$  мин, (10) –  $3.43 \pm 0.03$  мин, (8) –  $3.92 \pm 0.04$  мин. Предел обнаружения ГСБ-106 составлял  $4 \cdot 10^{-5}$  мг, примесей – около  $5 \cdot 10^{-6}$  мг.

Хроматограмма модельной смеси ГСБ-106 (концентрация 1 мг/мл) и промежуточных продуктов синтеза 8-12 (концентрация 0.01 мг/мл каждой примеси) представлена на рисунке 53.



Рисунок 53 - Хроматограмма модельной смеси ГСБ-106 (1 мг/мл) и примесей 8-12 (по 0.01 мг/мл)

Линейная зависимость площади пика от концентрации растворов ГСБ-106 наблюдалась в пределах интервала от 0.002 до 0.5 мг/мл, примесей - от 0.05 до 0.5 мг/мл.

Для определения посторонних примесей в образцах субстанции ГСБ-106 готовили растворы в подвижной фазе A с концентрацией 1 мг/мл. Содержание посторонних примесей

определяли методом внешнего стандарта (концентрация раствора рабочего стандартного образца (PCO) – 0.005 мг/мл). Содержание индивидуальной примеси в процентах оценивали по методу внешнего стандарта относительно площади пика PCO.

Пригодность хроматографической системы проверялась путем определения фактора ассиметрии пика ГСБ-106, эффективности хроматографической колонки и разрешению пиков ГСБ-106 и примеси 9. Фактор асимметрии пика ГСБ-106 не превышал 1.20 и фактически составлял от 1.05 до 1.20. Эффективность хроматографической колонки оценивали по числу теоретических тарелок для пика ГСБ-106, которое находилось в интервале значений 6155-6734, было предложено считать систему пригодной, если число теоретических тарелок составляет не менее 6000. Разрешение пиков ГСБ-106 и примеси 9 составляло от 18.0 до 20.7.

С помощью метода ВЭЖХ по разработанной методике в образцах субстанции был обнаружен ряд примесей, до 7 индивидуальных примесей в каждом отдельном образце (таблица 24). Подтверждено отсутствие в образцах технологических примесей 8-12, остальные обнаруженные примеси неидентифицированы, однако, данные об их содержании коррелируют с данными, полученными методом TCX.

Таблица 24 - Результаты определения посторонних примесей в образцах субстанции ГСБ-106 методом ВЭЖХ

N⁰	Относит	Суммарное								
опыта	пыта							содержание		
	0.57	0.91	1.10	1.14	1.21	1.36	1.44	примесей, %		
1	0.27	0.15	0.50	0.32	0.23	0.41	0.32	2.20		
2	0.27	0.50	0.50	0.40	0.44	0.42	0.47	3.00		
3	0.33	-	0.47	0.28	0.50	0.48	0.29	2.35		

Примечание: \*- относительно времени удерживания ГСБ-106.

Содержание единичной примеси во всех образцах субстанции ГСБ-106 не превышало 0.5 %, суммарное содержание примесей составляло не более 4 %.

Разработанные методики TCX и ВЭЖХ выбраны нами для определения чистоты субстанции ГСБ-106.

### 3.6.3 Определение остаточных органических растворителей в ФС ГСБ-106

Нами было проведено определение содержания воды в образцах субстанции ГСБ-106 методом К. Фишера, которое составило от 4.43% до 4.90% (таблица 25).

Содержание остаточных органических растворителей в субстанции было определено методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ). Исходя из технологии синтеза ГСБ-106

(очистка на катионно-обменной смоле в пиридин-ацетатном буфере) в образцах субстанции в качестве остаточных растворителей могут содержаться AcOH и пиридин. В условиях эксперимента времена удерживания пиридина и AcOH составили 4.24 и 6.20 мин соответственно (рисунок 54).

Вычисление содержания пиридина и AcOH в образцах проводили из соотношения площади соответствующего пика в испытуемом растворе к площади пика в рабочих стандартных растворах.

Содержание АсОН в образцах составило от 5.68% до 5.84% (таблица 25), содержание пиридина во всех образцах составляло менее 0.01%.



Рисунок 54 - Хроматограммы остаточных растворителей – пиридина и АсОН

### 3.6.4 Количественное определение содержания ГСБ-106 в ФС

Количественное определение субстанции ГСБ-106 проведено методом определения общего азота по Къельдалю.

В результате исследований по выбору условий минерализации образцов ГСБ-106 были выбраны следующие условия проведения анализа: около 0.3 г (точная навеска) препарата помещали в пробирку вместимостью 250 мл, прибавляли 1.0 г растертой смеси калия сульфата и меди сульфата (10:1), 0.05 г селена и 7.0 мл концентрированной серной кислоты. Содержимое пробирки нагревали около 60 мин при температуре 400°C до получения светло-зеленого раствора (конец минерализации). После охлаждения в пробирку осторожно приливали при перемешивании 20.0 мл воды, снова охлаждали и присоединяли пробирку к прибору для перегонки с водяным паром.

В приемник перед началом отгонки наливали 20.0 мл 4% раствора борной кислоты и прибавляли 5 капель смешанного индикатора.

Генерация пара, нагрев пробирки и прибавление в пробирку 40.0 мл 30% раствора натрия гидроксида проводились на приборе автоматически.

В сборник принимали около 200.0 мл отгона, дополнительно проводили промыв системы водой дистиллированной. Отгон титровали 0.1 М HCl до перехода окраски смешанного индикатора из зеленой в красно-фиолетовую. Параллельно проводили контрольный опыт. Объем 1 мл раствора 0.1 М HCl соответствует 0.001401 г азота.

При расчете количественного содержания ГСБ-106 в образцах субстанции учитывали содержание воды и остаточных растворителей (AcOH). Результаты количественного определения ГСБ-106 - от 96.01 до 96.34% (таблица 25).

Номер серии	1	2	3
Результат количественного определения ГСБ-106 без учета содержания воды и остаточных растворителей, %	85.70	86.60	86.10
Содержание воды, %	4.90	4.62	4.43
Содержание АсОН, %	5.84	5.68	5.84
Содержание ГСБ-106	96.01	96.34	96.15

Таблица 25 - Содержание ГСБ-106 в образцах субстанции

Таким образом, изучены физико-химические характеристики, хроматографическая подвижность, определены основные фармакопейные показатели качества, разработаны экспериментально обоснованные методики определения подлинности и чистоты, а также количественного определения субстанции оригинального антидепрессанта ГСБ-106. Разработанные методики могут быть использованы для контроля качества ФС ГСБ-106.

# 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

## 4.1 Материалы и методы

#### 4.1.1 Исходные вещества и вспомогательные реагенты

- аминокислоты: *L*-серин и *D*-серин (AlfaAesar, США), глицин (Reanal, Венгрия).

- производные *L*-аминокислот: Boc-*L*-Lys(Z(Cl))-OH, Boc-*L*-Ser(OBzl)-OH, Z-*L*-Lys(Boc)-OH•DCHA, HCl•H-Ser-OMe (Sigma, CША), Z-*D*-Lys(Boc)-OH•DCHA (GL Biochem, KHP), Z-Ser-OMe, Boc-Met-ONp (Bachem, Швейцария).

- компоненты и реагенты: гексаметилендиамин, гептаметилендиамин, гидразингидрат и трифторуксусная кислота (TFA) (Merck, Германия); триэтиламин (TEA), *N*-метилморфолин (NMM), 4M HCl в диоксане (Aldrich, Германия); янтарный ангидрид и ди-третбутилпирокарбонат (Sigma, CША); бензилоксикарбонилсукцинимид (Z-OSu), катализатор 10% Pd/C, *N*-гидроксисукцинимид, диизопропилэтиламин (DIEA), *N*,*N*-диметил-1,3-диаминопропан (DMAPA), пентафторфенол и дициклогексилкарбодиимид (DCC) фирмы AlfaAesar, США. Растворители производства РФ (поставщик ООО «Химмед»).

### 4.1.2 Аналитические методы

Высокоэффективная жидкостная хроматография. ВЭЖХ дипептидов проводили с использованием хроматографической системы Wellchrom 2001 (KNAUER, Германия) на аналитической колонке Диасфер 110-С16 (4×150 мм, 5 мкм) (BioChemMack) и препаративной Диасорб 130-С16Т (15×250 мм, 9 мкм) (BioChemMack). Объем петли – 20 мкл (аналитическая колонка) и 2 мл (препаративная колонка). Детектирование при длине волны 220 нм. Анализ проводили при комнатной температуре.

Условия хроматографирования (УХ):

- Подвижная фаза A (вода : ацетонитрил : TFA = 950:50:0.5 об.), подвижная фаза Б (0.05% раствор TFA в ацетонитриле). Режим элюирования градиентный 0-30 мин 0-100% фаза Б. Скорость потока 0.9 мл/мин для аналитической и 9 мл/мин для препаративной колонки,
- Те же подвижные фазы. Режим элюирования градиентный 0-30 мин 0-100% фаза Б. Скорость потока 0.6 мл/мин и 6 мл/мин для аналитической препаративной колонки соответственно.
- Те же подвижные фазы. Режим элюирования градиентный 0-15 мин 0-15% фаза Б. Скорость потока 1 мл/мин.
- Подвижная фаза A (0.05% раствор TFA в воде), подвижная фаза Б (0.05% раствор TFA в i-PrOH). Режим элюирования градиентный 0-20 мин 0-30% фаза Б. Скорость потока 1 мл/мин.

## Хроматография в тонком слое силикагеля.

Тонкослойную хроматографию (TCX) выполняли на алюминиевых и стеклянных пластинах DC Kieselgel 60 G/F<sub>254</sub> (Merck, Германия) в системах растворителей: EtOAc;

- CHCl<sub>3</sub> MeOH, 9:1 (A);
- СНСl<sub>3</sub> MeOH, 6:1 (Б);

СНСl<sub>3</sub> - MeOH - вода - AcOH, 15:10:2:3 (В);

СНСl<sub>3</sub> - MeOH - вода - AcOH, 8:10:2:3 (В2);

CHCl<sub>3</sub> - MeOH - AcOH, 80:10:1 (Γ);

СНСl<sub>3</sub> - MeOH -25% NH<sub>3</sub>, 20:15:5 (Д);

BuOH - AcOH - вода, 4:1:1 (Е);

BuOH - AcOH - вода, 3:1:1 (Ж);

бензол - МеОН, 2:1 (3);

бензол - МеОН, 1:4 (И);

- диоксан вода, 9:1 (К);
- МеОН вода, 2:1 (Л);

пиридин - вода - AcOH - EtOAc, 20:11:6:120 (М);

гексан - EtOAc, 4:1 (Н);

гексан - EtOAc, 1:1 (П);

МеОН - АсОН - вода, 4:2:1 (Р);

BuOH - пиридин - AcOH - вода, 15:10:3:6 (С).

Значения  $R_f$  соответственно обозначены:  $R_f(X)$  - значение  $R_f$  в системе X;

X = A, Б, В и т. д.

Качественное обнаружение соединений на TCX проводили одним из следующих способов:

1) Полоску хроматограммы выдерживали в парах йода, при этом пятна, соответствующие соединениям с первичной и блокированной аминогруппами, окрашивались в желтый цвет;

2) Хроматограмму опрыскивали раствором состава: 0.4 г нингидрина в смеси 200 мл ацетона, 5 мл воды и 5 мл AcOH и прогревали. Соединения с первичной и блокированной аминогруппами проявлялись в виде розовых пятен;

3) Приготовление раствора толидина: в емкость темного стекла объемом 1 л помещали навеску 160 мг *о*-толидина, 1 г KI, приливали 30 мл лед. АсОН и 500 мл дистиллированной воды, перемешивали. Проявление хроматограммы: пластинку помещали в атмосферу хлора (свежеприготовленного из 1.5% раствора KMnO<sub>4</sub> и 10% раствора HCl) на 2-3 мин. Затем

пластинку оставляли на 3-5 мин под током воздуха для удаления избытка хлора, далее опускали в раствор толидина на 5 с, промывали пластину водой.

4) Хроматограмму опрыскивали 0.1% спиртовым раствором бромкрезолового зеленого. Соединения с открытой карбоксильной группой проявлялись в виде желтых пятен.

5) Соединения, поглощающие в УФ-свете, обнаруживали с помощью УФ-лампы.

**ЯМР-спектроскопия**. Строение и диастереомерную чистоту целевых пептидов и промежуточных соединений устанавливали методами одномерной <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- и двумерной (COSY – гомоядерная корреляция, HSQC - гетероядерная одноквантовая корреляция, HMBC - гетероядерная многосвязная корреляция) ЯМР-спектроскопии. Спектры <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР регистрировали по шкале  $\delta$ , м.д. на спектрометре Bruker FOURIER 300 HD (300 и 75 МГц, соответственно) в растворах DMSO-d<sub>6</sub> и D<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>O=1:9, внутренний стандарт тетраметилсилан (0 м.д.).

Масс-спектрометрия. Спектры высокого разрешения зарегистрированы на приборе Bruker microTOF II методом ионизации электроспреем (ESI-MS). Измерения выполнены на положительных (напряжение на капилляре 4500 V) или отрицательных (напряжение на капилляре 3200 V) ионах. Диапазон сканирования масс (m/z) 50–3000 Да, калибровка – внешняя или внутренняя (Electrospray Solution, Fluka). Использован шприцевой ввод вещества. Скорость потока 3 мкл/мин. Газ-распылитель – азот (4 л/мин); температура интерфейса 180°С.

**Температуру плавления** определяли на приборе Optimelt MPA100 (Stanford Research Systems, США) в открытых капиллярах без корректировки.

**Поляриметрия**. Удельное оптическое вращение регистрировали на автоматическом поляриметре ADP 440 Polarimeter (Bellingham+Stanley Ltd., Великобритания). при длине волны линии D спектра натрия (589.3 нм) и длине кюветы 0.5 дм.

Величины удельных оптических вращений рассчитывали по формуле:

$$[\alpha]_{D} = (\alpha \times V)/(l \times a)$$
, где

α – наблюдаемое оптическое вращение в градусах; V – объем раствора в мл; 1 – толщина слоя в
 дм; а – навеска вещества в г.

## Очистка растворителей:

Используемые растворители и реагенты очищали стандартными методами [1, 11]. DMF очищали путем перегонки в вакууме над нингидрином, хранили в склянках темного стекла над молекулярными ситами 4 Å.

EtOAc промывали на делительной воронке равным объемом 5% NaHCO<sub>3</sub>, выдерживали над CaCl<sub>2</sub> в течение ночи, фильтровали и перегоняли при атмосферном давлении. Диэтиловый эфир хранили над твердым NaOH.

Ацетон, бензол, гексан, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, i-PrOH, MeOH и EtOH (все х.ч.) использовали без дополнительной очистки.

DIEA, NMM и TEA перегоняли при атмосферном давлении над КОН. Хранили над КОН в склянках темного стекла.

# 4.2 Синтез

# 4.2.1 Синтез миметиков 1-й петли BDNF 4.2.1.1 Синтез амида *N*-моносукцинил-*L*-метионил-*L*-серина, ГСБ-207

**Метиловый эфир** *N-трет*-бутилоксикарбонил-*L*-метионил-*L*-серина, Boc-Met-Ser-OMe (1). К раствору 6.38 г (41 ммоль) HCl • H-Ser-OMe и 15.8 г (41 ммоль) Boc-Met-ONp в 50 мл DMF при перемешивании прибавляли 5.7 мл (41 ммоль) TEA. Реакционную смесь выдерживали 18 ч при комнатной температуре. По завершении реакции (TCX контроль) прибавляли 2 мл *N*,*N*-диметил-1-аминопропана (DMAPA), перемешивали 30 мин и упаривали. К остатку добавляли 150 мл EtOAc и 100 мл воды. Органическую фазу последовательно промывали 3% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 х 60 мл) и 100 мл 2% HCl, сушили безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Остаток растворяли в 50 мл диэтилового эфира, добавляли гептан до помутнения (25 мл). Выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывали гептанои и высушивали. Получали 11.6 г (81%) продукта, R<sub>f</sub> 0.80 (B), R<sub>f</sub> 0.67 (M); т.пл. 65-68°C;  $[\alpha]_D^{20}$  -20.75° (с 0.4; MeOH). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.36 (с, 9H, -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 1.81 (м, 2H, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Met), 2.07 (с, 3H, -SCH<sub>3</sub>), 2.45 (т, *J* 5.3 Гц, 2H, C<sup>7</sup>H<sub>2</sub> Met), 3.62 (с, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.70 (м, 2H, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.08 (м, 1H, C<sup>a</sup>H Met), 4.33 (м, 1H, C<sup>a</sup>H Ser), 5.08 (м, 1H, -OH Ser), 6.98 (д, *J* 9.2 Гц, 1H, NH Met), 8.07 (д, *J* 8.0 Гц, 1H, NH Ser).

Амид *N-трет*-бутилоксикарбонил-*L*-метионил-*L*-серина, Boc-Met-Ser-NH<sub>2</sub> (2). Раствор 4.0 г (11.4 ммоль) (1) в 10 мл МеОН насыщали аммиаком при 0°С и выдерживали 3 сут при комнатной температуре в закрытой колбе. Затем упаривали, остаток кристаллизовали со смесью 30 мл диэтилового эфира и 5 мл ЕtOH. Образовавшиеся кристаллы отфильтровывали и высушивали. Получали 3.19 г (83.4 %) продукта,  $R_f$  0.71 (B),  $R_f$  0.57 (M); т.пл. 120-121°C;  $[\alpha]_D^{20}$  -12.25° (с 0.4; MeOH). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.38 (с, 9H, -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 1.82 (м, 2H,  $C^{\beta}H_2$  Met), 2.03 (с, 3H, -SCH<sub>3</sub>), 2.46 (т, *J* 5.2 Гц, 2H,  $C^{\gamma}H_2$  Met), 3.56 (м, 2H,  $C^{\beta}H_2$  Ser), 4.00 (м, 1H, С<sup>а</sup>Н Met), 4.17 (м, 1H, С<sup>а</sup>Н Ser), 7.12 и 7.23 (два с, 2H, NH<sub>2</sub> амид), 7.14 (д, *J* 9.1 Гц, 1H, NH Met), 7.65 (д, *J* 8.1 Гц, 1H, NH Ser).

Амид *N*-моносукцинил-*L*-метионил-*L*-серина), HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Met-Ser-NH<sub>2</sub> (ГСБ-207) (3). Раствор 2.99 г (8.9 ммоль) (2) в 15 мл трифторуксусной кислоты (ТFA), перемешивали 1 ч и упаривали. Остаток кристаллизовали под диэтиловым эфиром, образовавшиеся кристаллы отфильтровывали и промывали диэтиловым эфиром. Затем растворяли в 20 мл 50% EtOH, обрабатывали смолой Amberlite IRA-900 (-OH форма) до рН~9. фильтровали и упаривали. Повторно упаривали с добавлением DMF. Полученный остаток растворяли в 10 мл DMF и прибавляли 1.00 г (10 ммоль) янтарного ангидрида. Реакционную массу перемешивали 12 ч, затем прибавляли 25 мл воды. Выпавший белый осадок отфильтровывали, промывали водой, высушивали. Получали 0.96 г (32%, общий выход 21%) продукта,  $R_f$  0.45 (B),  $R_f$  0.11 (M); т.пл. 101-105°С;  $[\alpha]_D^{20}$  –14.25° (с 0.4; MeOH). Найдено, %: С 42.85; H 6.50; N 12.68;  $C_12H_{21}N_3O_6S$ . Вычислено, %: С 42.99; H 6.27; N 12.54. Масс-спектр (m/z) найдено 336.1218 [M+H]<sup>+</sup>.  $C_{12}H_{21}N_3O_6S$ . Вычислено 336.1224. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.75 и 1.90 (два м, 2H,  $C^{\beta}H_2$  Met), 2.03 (с, 3H, -SCH<sub>3</sub>), 2.41 (м, 4H, HOOCC<u>H<sub>2</sub>CH<sub>2</sub></u>), 2.44 (м, 2H,  $C^{\gamma}H_2$  Met), 3.58 (м, 2H,  $C^{\beta}H_2$  Ser), 4.31 (м, 1H,  $C^{\alpha}H$  Met), 4.16 (м, 1H,  $C^{\alpha}H$  Ser), 4.90 (уш. с, 1H, -OH Ser), 7.08 и 7.17 (два с, 2H, NH<sub>2</sub> амид), 8.16 (д, *J* 9.1 Гц, 1H, NH Met), 7.75 (д, *J* 8.2 Гц, 1H, NH Ser).

# 4.2.1.2 Синтез гептаметилендиамида бис-(*N*-моносукцинил-*L*-метионил-*L*-серина), ГСБ-214

Гидразид *N-трет*-бутилоксикарбонил-*L*-метионил-*L*-серина, Boc-Met-Ser-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub> (4). К раствору 6.31 г (18 моль) (1) в 10 мл МеОН прибавляли 3 мл гидразингидрата и выдерживали 2 ч. По исчезновению исходного соединения (ТСХ контроль) к реакционной массе добавляли 10 мл воды, выдерживали при -20°C 18 ч, выпавший осадок отфильтровывали, промывали охлажденным водным MeOH и высушивали на воздухе. Получали 6.31 г (100%) продукта, R<sub>f</sub> 0.66 (B), R<sub>f</sub> 0.47 (M); т.пл. 160-162°C;  $[\alpha]_D^{20}$  –21.75° (с 0.4; MeOH). Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.37 (с, 9H, -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 1.80 (м, 2H, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Met), 2.02 (с, 3H, -SCH<sub>3</sub>), 2.43 (т, *J* 5.2 Гц, 2H, C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> Met), 3.54 (м, 2H, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.00 (м, 1H, C<sup>α</sup>H Met), 4.19 (м, 1H, C<sup>α</sup>H Ser), 4.19 (д, *J* 4.0 Гц, 2H, -NH-N<u>H<sub>2</sub></u>), 4.88 (т, *J* 4.0 Гц, 1H, -OH Ser), 7.07 (д, *J* 9.1 Гц, 1H, NH Met), 7.69 (д, *J* 8.0 Гц, 1H, NH Ser), 9.02 (т, *J* 4.0 Гц, 1H, -N<u>H</u>-NH<sub>2</sub>).

Гептаметилендиамид бис-(*N*-трет-бутилоксикарбонил-*L*-метионил-*L*-серина), (Вос-Met-Ser-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub> (5). К 5.23 г (14.9 ммоль) (4) в 25 мл DMF, охлаждённому до -20°С, сначала прибавляли 50 мл 4М HCl в диоксане, а затем 1.75 мл (15 ммоль) *и*-бутилнитрита (BuONO), поддерживая температуру -20°C – -30°C. Реакционную смесь выдерживали 3 мин, после чего добавляли сначала 7.7 мл (45 ммоль) диизопропилэтиламина (DIEA), а затем раствор 0.91 г (7 ммоль) гептаметилендиамина в 3 мл DMF. Реакционную смесь выдерживали 12 ч при комнатной температуре, после чего прибавляли 250 мл EtOAc и 200 мл воды, органическую фазу промывали 2% HCl (2х100 мл) и 100 мл 3% NaHCO<sub>3</sub>, упаривали до объема ~ 60 мл. Наблюдалось постепенное выпадение осадка, количество которого увеличивалось в результате охлаждения раствора до -20°C. Выпавший осадок отфильтровывали при комнатной температуре, промывали EtOAc и высушивали. Получали 3.30 г (57%) продукта,  $R_f$  0.77 (B),  $R_f$  0.59 (M); т.пл. 160-162°C;  $[\alpha]_D^{20}$  –28.8° (с 0.4; MeOH). Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.18-1.40 (м, 10 H, -NHCH<sub>2</sub>(C<u>H</u><sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.37 (с, 18H, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 1.80 (м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Met), 2.02 (с, 6H, 2 -SCH<sub>3</sub>), 2.44 (т, *J* 5.5 Гц, 4H, 2 C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> Met), 3.02 (м, 4H, -NHC<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>C<u>H</u><sub>2</sub>NH-), 3.53 (м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 3.99 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Met), 4.17 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Ser), 7.12 (д, *J* 9.1 Гц, 2H, 2 NH Met), 7.68 (д, *J* 8.0 Гц, 2H, 2 NH Ser), 7.71 (т, *J* 5.5 Гц, 2H, -N<u>H(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>N<u>H</u>-).</u>

# Гептаметилендиамид *бис-(N-*моносукцинил-*L*-метионил-*L*-серина)

(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Met-Ser-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub> (ГСБ-214) (6). Навеску 3.14 г (4.1 ммоль) (5) растворяли в 20 мл TFA и перемешивали 30 мин, после чего упаривали. Остаток затирали с диэтиловым эфиром, декантировали, растворяли в 50 мл 50% EtOH, обрабатывали смолой Amberlite IRA-900 (OH- форма) до pH ~ 10, раствор упаривали, повторно упаривали с DMF (40 мл). Остаток растворяли в 10 мл DMF и прибавляли 1.00 г (10 ммоль) янтарного ангидрида. Реакционную массу перемешивали 2 ч, упаривали. Остаток растирали с ацетоном, отфильтровывали. К твердому остатку добавляли 30 мл EtOH и кипятили 30 мин (растворяется не полностью), выдерживали 30 мин при -20°С, отфильтровывали и последовательно промывали холодным EtOH, диэтиловым эфиром и гексаном. После высушивания получали 1.75 г (100%, общий выход 46%) продукта, R<sub>f</sub> 0.57 (В); т.пл. 162-163°С; [а]<sub>D</sub><sup>20</sup> – 9.0° (с 0.4; DMF). Масс-спектр (m/z) найдено 767.3304 [M+H]<sup>+</sup>. С<sub>31</sub>H<sub>54</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub>. Вычислено 767.3314. Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>), б, м.д.: 1.20-1.40 (м, 10H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.76 и 1.89 (два м, 4H, 2 С<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Met), 2.02 (с, 6H, 2 -SCH<sub>3</sub>), 2.40 (м, 8H, 2 HOOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.42 (м, 4H, 2 С<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> Met), 3.01 (M, 4H, - NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.55 (M, 4H, 2  $C^{\beta}$ H<sub>2</sub> Ser), 4.17 (M, 2H, 2  $C^{\alpha}$ H Ser), 4.30 (M, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Met), 7.61 (M, J 5.4 Γц, 2H, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>NH-), 7.76 (д, J 8.1 Γц, 2H, 2 NH Ser), 8.16 (д, J 9.2 Гц, 2H, 2 NH Met).

# 4.2.2 Синтез миметика 2-й петли BDNF гексаметилендиамида бис-(*N*-гексаноил-*L*-серил-*L*лизина), ГТС-201

*N*-Оксисукцинимидный эфир гексановой кислоты, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>COOSu (7). К 10.19 г 98%-ной (88 ммоль) гексановой кислоты в 40 мл EtOAc при перемешивании и комнатной температуре прибавляли 11.34 г 98%-ного (96.5 ммоль, 10% изб.) *N*- гидроксисукцинимида в 40 мл EtOAc. Реакционную смесь охлаждали до 0 - +5°C и прибавляли раствор 20.11г 99%-ного (96.5 ммоль, 10% изб.) дициклогексилкарбодиимида (DCC) в 40 мл EtOAc. Реакционную смесь перемешивали 1 ч, далее 20 ч при комнатной температуре. Выпавший осадок дициклогексилкарбомочевины (DCU) отфильтровывали и промывали 40 мл EtOAc, фильтраты объединяли и упаривали. Получали 16.33 г (89%) продукта в виде светло-желтого масла.  $R_f 0.78$ (EtOAc),  $R_f 0.76$  (Б). Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 0.87 (с, 3H, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CO), 1.33 (м, 4H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO), 1.64 (м, 2H, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.64 (т, *J* 8.2 Гц, 2H, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CO), 2.81 (м, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- -OSu).

*N*-Бензилоксикарбонил-*L*-серин, **Z**-Ser-OH (8). К раствору 30.30 г 99 % (30.0 г, 285.5 ммоль) серина в 400 мл дистиллированной воды, присыпали 23.98 г (285.5 ммоль) NaHCO<sub>3</sub>. К полученному раствору при перемешивании и температуре 20-22°C прибавляли раствор 71.86 г 99%-ного (71.14 г, 285.5 ммоль) Z-OSu в 400 мл ацетона. Реакционную массу перемешивали 5 ч, затем оставляли на ночь без перемешивания. Ацетон удаляли под вакуумом, водный раствор после промывки CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2x170 мл) подкисляли конц. HCl до pH~2.5 и экстрагировали EtOAc (3x285 мл). Этилацетатный раствор промывали 250 мл воды и 170 мл нас. NaCl. Растворитель упаривали, приливали 50 мл гексана и упаривали досуха при температуре 50°C. Белый пластинчатый осадок сушили в вакууме (15 мм.рт.ст.) над CaCl<sub>2</sub>. Получали 61.54 г (90%) Z-Ser-OH. R<sub>f</sub> 0.72 (K), R<sub>f</sub> 0.75 (B), R<sub>f</sub> 0.86 (И); т.пл. 118-120°C;  $[\alpha]_D^{25}$  +6.6° (с 7; AcOH). Лит.данные [162]: т.пл. 120°C;  $[\alpha]_D^{25}$  + 5.7° (с, 7, AcOH). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>), δ, м.д.: 3.66 (д, *J* 5.4 Гц, 2H, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.05 (дт, *J* 8.1 Гц и *J* 5.4 Гц, 1H, C<sup>α</sup>H Ser), 5.03 (с, 2H,-OC<u>H</u><sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Z), 7.30-7.40 (м, 5H, -C<sub>6</sub><u>H</u><sub>5</sub>Z), 7.34 (д, *J* 8.1 Гц, 1H, NH Ser).

Пентафторфениловый эфир *N*-бензилоксикарбонил-*L*-серина, Z-Ser-OPfp (9). В колбу ёмкостью 2 л, снабжённую термометром, обратным холодильником и механической мешалкой загружали 55.56 г (232.3 ммоль) (8), приливали 600 мл EtOAc и добавляли 47.50 г 99% (47.025 г, 255.4 ммоль, 10% изб.) пентафторфенола. Реакционную массу, в виде суспензии, охлаждали до 0°C - -3°C и при перемешивании прибавляли раствор 53.23 г 99%-ного (52.69 г, 254.5 ммоль, 10% изб.) DCC в 250 мл EtOAc с такой скоростью, чтобы температура в смеси не

поднималась выше 0°С. Выдерживали 1 ч, затем охлаждение убирали и перемешивали при комнатной температуре 20 ч, DCU отфильтровывали. Растворитель упаривали при температуре не выше 50°С, к остатку приливали 200 мл петролейного эфира и оставляли на 30 мин, после чего осадок отфильтровывали, промывали 50 мл петролейного эфира, сушили в вакууме (15 мм.рт.ст.) над CaCl<sub>2</sub> и парафином. Получали 85.88 г (91%) Z-Ser-OPfp. R<sub>f</sub> 0.82 (EtOAc), R<sub>f</sub> 0.32 (II), R<sub>f</sub> 0.76 (Г); т.пл. 150-154°С (петролейный эфир);  $[\alpha]_D^{23}$  -17.82° (с 1.05, EtOAc),  $[\alpha]_D^{20}$  - 15.7° (с 2; EtOH). Лит. данные [111]: т.пл. 142.5-143.5°С;  $[\alpha]_D^{22}$  -16.25° (с 2; EtOH). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 3.85 (м, 2H, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.56 (м, 1H, C<sup>α</sup>H Ser), 5.08 (с, 2H, -OCH<sub>2</sub>- Z), 5.23 (т, *J* 5.8 Гц, 1H, -OH Ser), 7.36 (м, 5H, -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> Z), 7.97 (д, *J* 7.6 Гц, 1H, NH Ser).

# *N*-оксисукцинимидный эфир *N*<sup>*α*</sup>-бензилоксикарбонил-*N*<sup>*ε*</sup>-*трет*-бутилоксикарбонил-*L*-лизина, Z-Lys(Boc)-OSu (10).

# <u>1-я часть</u>

К суспензии 100.00 г (178 ммоль) Z-L-Lys(Boc)-OH•DCHA в 600 мл EtOAc при комнатной температуре приливали 300 мл 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и перемешивали в течение 30 мин до полного растворения осадка. Органический слой отделяли от воднокислого. Водную фазу экстрагировали 100 ΜЛ EtOAc. Органические растворы объединяли, промывали дистиллированной водой (3х100 мл) и нас. NaCl (100 мл). Этилацетатный раствор сушиди над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в течение 30-40 мин, осушитель отфильтровывали, промывали на фильтре 50-60 мл EtOAc. Фильтрат упаривали в вакууме при температуре не выше 50-55°С. Получали 78.37 г Z-Lvs(Boc)-OH в виде желтого масла. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>), б. м.д.: 1.05-1.75 (м. 6H,  $-C^{\beta}H_2C^{\gamma}H_2C^{\delta}H_2$ - Lys), 1.38 (c, 9H,  $-OC(CH_3)_3$  Boc), 2.86 (m, 2H,  $C^{\varepsilon}H_2$  Lys), 3.61 (m, 1H,  $C^{\alpha}H_3$ Lys), 5.04 (c, 2H, -OCH<sub>2</sub>- Z), 6.55 (д, J 6.8 Гц, 1H, NH Lys), 6.73 (т, J 5.5 Гц, 1H, N<sup>e</sup>H Lys), 7.35 (м, 5H, -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Z).

## <u>2-я часть</u>

К раствору 78.37 г Z-Lys(Boc)-OH в 475 мл EtOAc при перемешивании последовательно добавляли 24.46 г (208 ммоль) *N*-гидроксисукцинимида и 100 мл EtOAc. Реакционную смесь охлаждали до  $+8^{\circ}$ C -  $+10^{\circ}$ C и прикапывали при перемешивании раствор 44.16 г (212 ммоль) DCC в 250 мл EtOAc. Реакционную смесь перемешивали при охлаждении в течение 1 ч и 20 ч при комнатной температуре. Осадок DCU отфильтровывали, промывали его на фильтре 100 мл EtOAc. Фильтрат упаривали до объёма 300 мл и помещали в холодильник на ночь. Вновь выпавший осадок DCU отфильтровывали, раствор упаривали в вакууме при температуре 50°C. Полученное масло затирали под диэтиловым эфиром (100 мл), выдерживали ночь в холодильнике, осадок отфильтровывали, промывали на фильтре диэтиловым эфиром (2x30 мл), сушили в эксикаторе над CaCl<sub>2</sub>, получали 81.60 г (96%) хроматографически гомогенного (**10**).

R<sub>f</sub> 0.81(A), R<sub>f</sub> 0.67(K), R<sub>f</sub> 0.94(B), R<sub>f</sub> 0.90(M); т.пл. 95-99°С; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -20.66° (с 0.41; EtOH). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.30-1.49 (м, 4H, C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub> Lys), 1.37 (с, 9H, -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 1.79 (м, 2H, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Lys), 2.81 (с, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- -OSu), 2.88 (м, 2H, C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> Lys), 4.42 (м, 1H, C<sup>α</sup>H Lys), 5.06 (с, 2H, -OCH<sub>2</sub>- Z), 6.78 (т, *J* 5.2 Гц, 1H, N<sup>ε</sup>H Lys), 7.36 (м, 5H, -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> Z), 8.04 (д, *J* 7.8 Гц, 1H, NH Lys). Литературные данные [101]: т.пл. 97-99°С.

Гексаметилендиамид *бис-(N^{\alpha}-бензилоксикарбонил-N^{\varepsilon}-трет-бутилоксикарбонил-L*лизина), (Z-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (11). К раствору 40.0 г (84 ммоль) Z-Lys(Boc)-OSu (10) в 200 мл DMF, при перемешивании приливали раствор 4.7 г (40 ммоль) гексаметилендиамина в 80 мл DMF, при этом выпадало небольшое количество осадка, который через 1.5 ч полностью растворялся. Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре, далее оставляли на ночь без перемешивания. Затем к реакционной смеси при перемешивании медленно приливали 800 мл дистиллированной воды, предварительно нагретой до 43-45°C, при этом выпадал белый творожистый осадок. Перемешивание вели до достижения температуры 20-22°С самоохлаждением, после чего оставляли на 12 ч при температуре 12-17°С. Хорошо сформированный осадок отфильтровывали, промывали водой до нейтральной реакции и сушили на воздухе. Получали 33.0 г (93%) хроматографически гомогенного (11) в виде белого кристаллического вещества.  $R_f 0.90$  (M); т.пл. 150-154°C;  $[\alpha]_D^{25} - 9.3^\circ$  (с 0.29; EtOH). Спектр <sup>1</sup>H-**MMP** (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, M.g.: 1.08-1.60 (M, 20H, 2 -C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.36 (с, 18H, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 2.87 (м, 4H, 2 С<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.02 (м, 4H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.88 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Lys), 5.00 (c, 4H, 2 -OCH<sub>2</sub>- Z), 6.74 (τ, J 5.2 Γμ, 2H, 2 N<sup>ε</sup>H Lys), 7.28 (д, J 8.0 Γμ, 2H, 2 NH Lys), 7.32 (м, 10H, 2 -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Z), 7.81 (т, *J* 5.5 Гц, 2H, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-).

Гексаметилендиамид *бис-(N<sup>£</sup>-трет*-бутилоксикарбонил-*L*-лизина), (H-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (12). Раствор 10.00 г (12 ммоль) (11) в 200 мл МеОН подвергали гидрогенолизу в присутствии 0.76 г 10% Pd/C 50%-ной влажности при комнатной температуре. По исчезновении исходного вещества (TCX контроль) катализатор отфильтровывали, промывали 100 мл МеОН. Метанольный раствор упаривали, к остатку приливали смесь петролейного и диэтилового эфиров в соотношении 3:1 и оставляли на ночь до выпадения осадка. Растворитель декантировали, а осадок сушили в вакууме. Получали 6.54 г (97%) хроматографически гомогенного (12). R<sub>f</sub> 0.48 (M), R<sub>f</sub> 0.68 (H), R<sub>f</sub> 0.39 (E), R<sub>f</sub> 0.21 (Б), R<sub>f</sub> 0.33 (И); т.пл. 81-84°C (из диэтилового эфира);  $[\alpha]_D^{25}$  +8.3° (с 1; EtOH). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.24, 1.35 и 1.51 (м, 20H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub> Lys, -NHCH<sub>2</sub>(C<u>H</u><sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.37 (с, 18H, 2 -OC(CH<sub>3</sub>) Boc), 2.88 (м, 4H, 2 C<sup>6</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.03 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Lys), 3.06 (м, 4H, -NHC<u>H<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>), 6.71 (т, *J* 5.2 Гц, 2H, 2 N<sup>6</sup>H Lys), 7.76 (т, *J* 5.6 Гц, 2H, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-).</u>

бис-(N-бензилоксикарбонил-L-серил-N<sup>e</sup>-mpem-бутилокси-Гексаметилендиамид карбонил-L-лизина), (Z-Ser-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (13). К раствору 5.00 г (8.74 ммоль) (12) в 20 мл свежеперегнанного DMF, в один прием присыпали 7.44 г (18.35 ммоль, 5%-ный изб.) (9) и приливали 10 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при комнатной температуре. Затем приливали 0.11 мл DMAPA, выдерживали 50 мин при перемешивании, после чего реакционную массу выливали в дистиллированную воду (150 мл) и оставляли на 12 ч при комнатной температуре. Осадок отфильтровывали, промывали 200 мл воды, 50 мл гексана и 50 мл диэтилового эфира. Осадок сушили в вакууме (15 мм.рт.ст.) над CaCl<sub>2</sub>. Получали 8.48 г (95 %) белого кристаллического продукта. R<sub>f</sub> 0.41 (Г), R<sub>f</sub> 0.92 (К); т.пл. 140-143°С; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup>-12.82° (с, 1; MeOH). Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.15-1.36 (м, 16H, 2 С<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub> Lys; -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.36 (с. 18H, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 1.49 и 1.64 (два м. 4H, 2 С<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Lys), 2.86 (м, 4H, 2 C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.00 (м, 4H, -NHC<u>H<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-)</u>, 3.56 (м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.09-4.15 (м. 4H, 2 C<sup>α</sup>H Ser, 2 C<sup>α</sup>H Lys), 5.03 (c, 4H, -OCH<sub>2</sub>-Z), 5.07 (yш.c, 2H, -OH Ser), 6.72 (τ, *J* 5.2 Γμ, 2H, 2 N<sup>ε</sup>H Lys ), 7.28-7.36 (м, 12H, 2 -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Z, 2 NH Ser), 7.79 (т, J 5.5 Гц, 2H, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 7.94 (д, J 8.0 Гц, 2H, 2 NH Lys).

Гексаметилендиамид *бис-(L-серил-N<sup>e</sup>-трет*-бутилоксикарбонил-*L*-лизина) (H-Ser-Lys-(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (14). К раствору 5.00 г (4.93 ммоль) (13) в 220 мл МеОН прибавляли 0.76 г 10% Рd/С 50%-ной влажности, и перемешивали в атмосфере водорода. По окончании гидрогенолиза (TCX-контроль), катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, далее переупаривали с 15 мл бензола, к пенообразному остатку приливали 20 мл петролейного эфира, растирали и оставляли на 2 ч, эфир декантировали, а осадок сушили в вакууме (15 мм.рт.ст.) над CaCl<sub>2</sub>. Получали 3.77 г (97%) белого порошка. R<sub>f</sub> 0.16 (И), R<sub>f</sub> 0.35 (Л), R<sub>f</sub> 0.74 (В); т.пл. 111-116.5°C (с разлож.);  $[\alpha]^{24}$  - 3.47° (с 1; MeOH). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.15-1.42 (м, 16H, 2 - C<sup>7</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys, -NHCH<sub>2</sub>(C<u>H</u><sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.36 (с, 18H, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 1.45 и 1.61 (два м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Lys), 2.85 (м, 4H, 2 C<sup>e</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.01 (м, 4H, -NHC<u>H<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.24 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Ser), 3.44 (м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.16 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Lys), 4.87 (уш.с, 2H, -OH Ser), 6.73 (т, *J* 5.1 Гц, 2H, 2 N<sup>e</sup>HLys), 7.93 (т, *J* 5.4 Гц, 2H, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 8.00 (д, *J* 7.6 Гц, 2H, 2 NH Lys).</u>

Гексаметилендиамид *бис-(N-гексаноил-L-серил-N<sup>\*</sup>-трет*-бутилоксикарбонил-Lлизина) (Hex-Ser-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (15). К раствору 4.00 г (5.4 ммоль) (14) в 30 мл DMF при температуре +5°C при перемешивании приливали раствор 2.76 г (0.013 моль, 20% изб.) (7) в 10 мл DMF, реакционную смесь выдерживали 1 ч, далее перемешивали при комнатной температуре 12 ч. Растворитель упаривали при температуре не выше 50°C, остаток затирали под диэтиловым эфиром (40 мл). Осадок отфильтровывали, промывали 20 мл диэтилового эфира. Полученный продукт суспендировали в 40 мл ацетона и кипятили, быстро отфильтровывали, промывали дополнительно 5 мл горячего ацетона, сушили в вакууме (15 мм.рт.ст.) над CaCl<sub>2</sub>. Получали 4.02 г (80%) продукта (**15**) в виде кристаллов легкого кремового оттенка. R<sub>f</sub> (основное пятно) 0.83 (K), R<sub>f</sub> 0.87(Ж); т.пл. 190-199°C (диэтиловый эфир);  $[\alpha]_D^{26.5}$  -1.80° (с 0.95; DMF). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 0.85 (т, *J* 7.0 Гц, 6H, 2 -CO(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub> Hex), 1.25-1.42 (м, 24H, 2 -C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>7</sup>H<sub>2</sub>- Lys, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-, 2 -CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> Hex), 1.36 (с, 18H, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 1.48 (м, 4H, 2 -COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> Hex), 1.67-1.49 (м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Lys), 2.13 (т, *J* 7.5 Гц, 4H, 2 -COCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub> Hex), 2.86 (м, 4H, 2 C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.01 (м, 4H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.49-3.60 (м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.13 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Ser), 4.30 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Lys), 5.07 (уш.с, 2H, 2 -OH Ser), 6.73 (т, *J* 6.0 Гц, 2H, 2 N<sup>ε</sup>H Lys), 7.75 (т, *J* 6.0 Гц, 2H, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-), 7.87 (д, *J* 7.0 Гц, 4H, 2 NH Lys, 2 NH Ser).

**Дитрифторацетат гексаметилендиамида** *бис-(N-гексаноил-L-серил-L-лизина)* - 2 **CF<sub>3</sub>COOH** • (Hex-Ser-Lys-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (16). К суспензии 1.60 г (1.7 ммоль) (15) в 15 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> при перемешивании и комнатной температуре приливали 5 мл 99%-ной TFA, перемешивали 1.5 ч (TCX контроль). Растворитель упаривали при 45°C, к еще подвижному маслу приливали диэтиловый эфир (20 мл) и затирали, образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали дополнительно 10 мл сухого диэтилового эфира и высушивали в вакууме (15 мм.рт.ст.) над CaCl<sub>2</sub>. Получали 1.50 г (91%) продукта в виде порошка светло кремового цвета. R<sub>f</sub> (основное пятно) 0.04 (K), R<sub>f</sub> 0.35 (Ж); т.пл. 102-140°C (с разлож.);  $[\alpha]^{25}$  -31.8° (с 1.05; MeOH). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>), δ, м.д.: 0.84 (т, *J* 7.0 Гц, 6H, 2 -COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> Hex), 1.23, 1.33, 1.50 (три м, 28H, 2 -C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>7</sup>H<sub>2</sub>- Lys; 2 -COCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub> Hex; -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.70-1.50 (м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Lys), 2.13 (т, *J* 7.5 Гц, 4H, 2 -COCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub> Hex), 2.74 (м, 4H, 2 C<sup>§</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.00 (м, 4H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.45 и 3.63 (два м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.15 (м, 2H, 2 C<sup>a</sup>H Lys), 4.27 (м, 2H, 2 C<sup>a</sup>H Ser), 5.23 (уш.с, 2H, 2 -OH Ser), 7.79 (уш.с, 8H, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-, 2 N<sup>+</sup>H<sub>3</sub> Lys), 7.94 (д, *J* 7.0 Гц, 2H, 2 NH Ser), 7.99 (д, *J* 8.0 Гц, 2H, 2 NH Lys).

Спектр <sup>13</sup>С-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>).  $\delta$ , м. д.: 173.1; 171.5; 170.9 (с, 6С, 6 СО), 117.6 (кв, 2С, <sup>1</sup>*J*<sub>C-F</sub> 298.8 Гц. <u>C</u>F<sub>3</sub>COOH), 159.1 (кв, 2С, <sup>2</sup>*J*<sub>C-F</sub> 31.3 Гц, CF<sub>3</sub>COOH), 62.2 (с, 2С, 2 С<sup> $\beta$ </sup> Ser), 55.5 (с, 2С, 2 С<sup> $\alpha$ </sup> Ser), 53.0 (с, 2С, 2 С<sup> $\alpha$ </sup> Lys), 39.0 (с, 4С, 2 С<sup> $\epsilon$ </sup> Lys и 2 С<sup>1</sup> спейсера), 35.5 (с, 2 С, 2 - CO<u>C</u>H<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub> Hex), 31.5; 31.4; 29.3; 27.1; 26.4; 25.3; 22.8; 22.4 (набор с, 15С, 2 С<sup>2</sup> и С<sup>3</sup>спейсера, 2 С<sup> $\gamma$ </sup>, 2 С<sup> $\delta$ </sup> и 2 С<sup> $\beta$ </sup> Lys), 2 -COCH<sub>2</sub>(<u>C</u>H<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub> Hex), 14.3 (с, 2С, 2 -COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub><u>C</u>H<sub>3</sub> Hex).

Диацетат гексаметилендиамида бис-(N-гексаноил-L-серил-L-лизина), (CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CO-Ser-Lys-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>, (ГТС-201) (17). К 0.80 г дитрифторацетата (16) приливали 15 мл 70% АсОН, после полного растворения вещества, растворитель упаривали при температуре не выше 45-50°С. Переупаривали трижды с АсОН, затем упаривали с толуолом (3х10 мл), диэтиловым эфиром (3х5 мл) получали 0.65 г (~ 92%) вспененного аморфного остатка. ГТС-201 очищали ОФ ВЭЖХ. Получали 128 мг (85%) очищенного продукта (чистота 98% по данным ОФ ВЭЖХ, время удерживания  $\tau = 12.0$  мин (УХ-1) в виде аморфного осадка с лёгким кремовым оттенком. R<sub>f</sub> 0.59 (Ж); т.пл. 110-125°С (с разлож.); [а]<sup>24.5</sup> D -14.9° (с 0.6; MeOH). Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (D<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>O=1:9), δ, м.д.: 0.76 (т, *J* 7.0 Гц, 6H, 2 -CO(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub> Hex), 1.18, 1.37, 1.49 и 1.58 (четыре м, 32H, 2 -COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> Hex, 2 - $C^{\delta}$ H<sub>2</sub>C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>2</sub>C<sup> $\gamma$ </sup>H<sub>2</sub>- Lys, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-, 2 -CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> Hex), 1.85 (с, 6H, 2 CH<sub>3</sub>COOH), 2.21 (т, J 7.5 Гц, 4H, 2 -COCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub> Hex), 2.89 (т, *J* 7.4 Гц, 4H, 2 С<sup>E</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.08 (м, 4H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 7.42 (уш.с, 4H, 2 N<sup>E</sup>H<sub>2</sub> Lys), 7.84 (т, *J* 4.9 Гц, 2H, 2 -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-), 8.17 (д, J 7.0 Гц, 2H, 2 NH Ser), 8.25 (д, J 7.0 Гц, 2H, 2 NH Lys).

Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 0.85 (т, *J* 7.0 Гц, 6H, 2 -CO(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C<u>H</u><sub>3</sub> Hex), 1.16-1.58 (м, 28H, 2 -COCH<sub>2</sub>(C<u>H</u><sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub> Hex, 2 C<sup> $\delta$ </sup>H<sub>2</sub>C<sup> $\gamma$ </sup>H<sub>2</sub> Lys, -NHCH<sub>2</sub>(C<u>H</u><sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.50-1.70 (м, 4H, 2 C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>2</sub> Lys), 1.88 (с, 6H, 2 C<u>H</u><sub>3</sub>COOH), 2.13 (т, *J* 7.5 Гц, 4H, 2 -COC<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub> Hex), 2.74 (м, 4H, 2 C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.00 (м, 4H, -NHC<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C<u>H</u><sub>2</sub>NH-), 3.45-3.63 (два м, 4H, 2 C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.15 (м, 2H, 2 C<sup> $\alpha$ </sup>H Lys), 4.27 (м, 2H, 2 C<sup> $\alpha$ </sup>H Ser), 7.78 (т, *J* 5.4 Гц, 2H, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 7.94 (д, *J* 7.0 Гц, 2H, 2 NH Ser), 8.01 (д, *J* 8.0 Гц, 2H, 2 NH Lys).

Спектр <sup>13</sup>С-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м. д.: 177.8, 173.3 и 172.3 (с, 6С, 6 СО), 61.1 (с, 2С, 2 С<sup> $\beta$ </sup> Ser), 55.8 (с, 2С, 2 С<sup> $\alpha$ </sup> Ser), 53.9 (с, 2С, 2 С<sup> $\alpha$ </sup> Lys), 39.4 (с, 4С, 2 С<sup> $\epsilon$ </sup> Lys и 2 С<sup>1</sup> спейсера), 35.4 (с, 2 С, 2 -СО<u>С</u>H<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub> Hex), 30.5, 30.4, 28.1, 26.4, 25.0, 22.7 и 21.7 (набор с, 15С, 2 С<sup>2</sup> и С<sup>3</sup> спейсера, 2 С<sup> $\gamma$ </sup>, 2 С<sup> $\delta$ </sup> и 2 С<sup> $\beta$ </sup> Lys, 2 -СОСH<sub>2</sub>(<u>C</u>H<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub> Hex), 13.2 (с, 2С, 2 -СО<u>С</u>H<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub><u>C</u>H<sub>3</sub> Hex). Сигналы углерода CF<sub>3</sub>COOH в спектре <sup>13</sup>С-ЯМР отсутствуют. Масс-спектр (m/z) найдено 743.5390 [M+H]<sup>+</sup>. С<sub>36</sub>H<sub>70</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub>. Вычислено 743.5389.

# 4.2.3 Синтез миметиков 4-й петли BDNF 4.2.3.1 Синтез амида *N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина ГСБ-104

*N*-Оксисукцинимидный эфир *N-трет*-бутилоксикарбонил-О-бензил-*L*-серина, Вос-Ser(Bzl)-OSu (18). К раствору 2.89 г (10 ммоль) Вос-Ser(Bzl)-OH в 50 мл ТГФ добавляли 1.17 г (11 ммоль) *N*-гидроксисукцинимида, раствор охлаждали до - 5°С и в течение 20 мин прикапывали раствор 2.07 г (10 ммоль) DCC в 20 мл ТГФ. Реакционную массу перемешивали 3 ч при комнатной температуре. Выпавший осадок DCU отфильтровывали, фильтрат упаривали, полученное масло кристаллизовали из изопропилового спирта. Кристаллы отфильтровывали, сушили в вакууме (15 мм.рт.ст.) над CaCl<sub>2</sub>. Выход 3.20 г (84%). R<sub>f</sub> 0.60 (A), R<sub>f</sub> 0.70 (H); т.пл. 106-108°C;  $[\alpha]_D^{20}$  -7.0° (c 1; DMF). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.39 (с, 9H, -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 2.42 (м, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> -OSu), 3.70 (м, 2H, С<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.39 (м, 1H, С<sup>α</sup>H Ser), 4.50 (с, 2H, -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> Bzl), 7.20-7.50 (м, 5H, -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> Bzl), 7.72 (д, *J* 8.0 Гц, 1H, NH Ser). Литературные данные [172]: т.пл. 112-113°C.

*N*-Оксисукцинимидный эфир *N*-трет-бутилоксикарбонил-*N*<sup>\*</sup>-2-хлорбензилоксикарбонил-*L*-лизина, Boc-Lys(*Z*(Cl))-OSu (19). К раствору 7.60 г (17 ммоль) Boc-Lys(*Z*(Cl))-OH в 150 мл ТГФ добавляли 2.08 г (18 ммоль) *N*-гидроксисукцинимида, раствор охлаждали до -5°C и в течение 30 мин прикапывали раствор 3.50 г (17 ммоль) DCC в 20 мл ТГФ, следя за тем, чтобы температура не превышала 0°C. Затем реакционную массу перемешивали 30 мин при -5 -0°C и 4 ч при комнатной температуре. Выпавший осадок DCU отфильтровывали, фильтрат упаривали. Полученное вязкое масло растворяли в 30 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Раствор выдерживали 24 ч при 0°C, образовавшийся осадок DCU отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме. Получали 6.80 г (83%) маслообразного хроматографически гомогенного продукта,  $R_f$ 0.40 (A).

Амид  $N^{\alpha}$ -трет-бутилоксикарбонил-N<sup>ε</sup>-2-хлорбензилоксикарбонил-*L*-лизина Вос-Lys(Z(Cl))-NH<sub>2</sub> (20). К раствору 1.5 г (3.62 ммоль) Вос-Lys(Z(Cl))-OH в 10 мл DMF при 0°С приливали 5 мл свежеприготовленного раствора аммиака в DMF Реакционную массу перемешивали 1 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляли на роторном испарителе, маслообразный остаток растворяли в 30 мл CHCl<sub>3</sub> и последовательно промывали по 30 мл водой, 5% NaHCO<sub>3</sub>, 1 M HCl и снова водой. Раствор упаривали, маслообразный остаток закристаллизовывали под диэтиловым эфиром, осадок отфильтровывали, сушили в эксикаторе над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (15 мм.рт.ст.). Получали 1.4 г (94%) хроматографически гомогенного белого порошка, R<sub>f</sub> 0.49 (A); т.пл. 105-106°C;  $[\alpha]^{20}_{D}$  - 8.5° (с 0.4; CHCl<sub>3</sub>). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.36 (с, 9H, -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 1.17-1.65 (м, 6H, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub> Lys), 2.97 (м, 2H, C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.80 (м, 1H, С<sup>а</sup>Н Lys), 5.07 (с, 2H, - ОС<u>H</u><sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 6.73 (д, *J* 7.7 Гц, 1H, NH Lys), 6.96 и 7.25 (два с, 2H, NH<sub>2</sub> амид), 7.37 (т, *J* 5.6 Гц, 1H, N<sup>6</sup>H Lys), 7.30-7.50 (м, 4H, ОСН<sub>2</sub>С<sub>6</sub><u>H</u><sub>4</sub>Cl).

**Трифторацетат амида**  $N^{\epsilon}$ -2-хлорбензилоксикарбонил-*L*-лизина CF<sub>3</sub>COOH • H-Lys(Z(Cl))-NH<sub>2</sub> (21). Раствор 400 мг (1.0 ммоль) (19) в смеси 3 мл TFA и 3 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> перемешивали 30 мин при комнатной температуре. Растворитель удаляли в вакууме, полученный остаток дважды упаривали с 10 мл диэтилового эфира и высушивали в вакууме (15 мм.рт.ст.) над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Получали 376 мг (93%) продукта в виде белых кристаллов, R<sub>f</sub> 0.05 (E); т.пл. 109-111°C. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.31 (м, 2H, C<sup>7</sup>H<sub>2</sub> Lys), 1.40 (м, 2H, C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub> Lys), 1.70 (м, 2H, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Lys), 2.99 (м, 2H, C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.68 (м, 1H, C<sup>α</sup>H Lys), 5.08 (с, 2H, OC<u>H</u><sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 7.31-7.52 (м, 4H, OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 7.57 и 7.88 (два с, 2H, NH<sub>2</sub> амид), 8.09 (с, 3H, N<sup>+</sup>H<sub>3</sub> Lys).

Амид  $N^{\alpha}$ -*трет*-бутилоксикарбонил-О-бензил-*L*-серил- $N^{e}$ -2-хлорбензилоксикарбонил-*L*-лизина, Boc-Ser(Bzl)-Lys(Z(Cl))-NH<sub>2</sub> (22). К раствору 350 мг (0.82 ммоль) (21) в 10 мл DMF добавляли 0.09 мл (0.82 ммоль) NMM, перемешивали 30 мин, затем добавляли раствор 314 мг (0.80 ммоль) (18) в 5 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при комнатной температуре. Полученную реакционную массу разбавляли 100 мл EtOAc и последовательно промывали водой (50 мл), 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (30 мл), 3% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (30 мл) и водой (2х50 мл), сушили безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Растворитель удаляли в вакууме, остаток кристаллизовали под диэтиловым эфиром, осадок отфильтровывали. Получали 525 мг (85%) конечного продукта в виде белого порошка, R<sub>f</sub> 0.60 (A); т.пл. 127-129°C; [ $\alpha$ ]<sup>20</sup><sub>D</sub> -2.5° (c 0.4; DMF). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.15-1.85 (м, 6H, -C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys), 1.37 (с, 9H, -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 4.53 (с, 2H, -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> Bzl), 5.06 (с, 2H, -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 7.05 (д, *J* 6.8 Гц, 1H, NH Ser), 7.09 и 7.25 (два с, 2H, NH<sub>2</sub> амид), 7.20-7.50 (м, 9H, -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 7.45 (т, *J* 5.6 Гц, 1H, N<sup>e</sup>H Lys), 7.92 (д, *J* 7.7 Гц, 1H, NH Lys).

Трифторацетат амида О-бензил-*L*-серил-*N*<sup>e</sup>-2-хлорбензилоксикарбонил-*L*-лизина, CF<sub>3</sub>COOH • H-Ser(Bzl)-Lys(Z(Cl))-NH<sub>2</sub> (23). Раствор 287 мг (0.5 ммоль) (22) в 2 мл ТFA перемешивали 30 мин при 20°C, затем упаривали. Остаток кристаллизовали под диэтиловым эфиром. Получали 265 мг (90%) продукта в виде белых кристаллов, т.пл. 153-155°C;  $[\alpha]^{20}_{D}$  + 6.25° (с 0.4; DMF). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.27 (м, 2H, C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> Lys), 1.39 (м, 2H, C<sup>6</sup>H<sub>2</sub> Lys), 1.54 и 1.65 (два м, 2H, C<sup>6</sup>H<sub>2</sub> Lys), 2.97 (м, 2H, C<sup>e</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.67 (м, 2H, C<sup>6</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.11 (м, 1H, C<sup>α</sup>H Ser), 4.24 (м, 1H, C<sup>α</sup>H Lys), 4.54 (с, 2H, -C<u>H</u><sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> Bzl), 5.07 (с, 2H, -OC<u>H</u><sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 7.14 и 7.45 (два м, 9H, -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub><u>H</u><sub>5</sub>, -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub><u>H</u><sub>4</sub>Cl), 7.35 (т, *J* 5.7 Гц, 1H, N<sup>e</sup>H Lys), 8.25 (уш. с, 3H, N<sup>+</sup>H<sub>3</sub> Ser), 8.57 (д, *J* 7.7 Гц, 1H, NH Lys). Амид *N*-моносукцинил-О-бензил-*L*-серил-*N*<sup>e</sup>-2-хлорбензилоксикарбонил-*L*-лизина HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Ser(Bzl)-Lys(Z(Cl))-NH<sub>2</sub> (24). К раствору 240 мг (0.40 ммоль) (23) в 4 мл DMF прибавляли 0.06 мл (0.44 ммоль) TEA, перемешивали 15 мин и затем прибавляли 60 мг (0.60 ммоль) янтарного ангидрида. Реакционную смесь перемешивали в течение 12 ч, по окончании реакции (TCX контроль) добавляли 25 мл воды. Выпавший белый осадок отфильтровывали, промывали водой, сушили в вакууме (15 мм.рт.ст.) над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Получали 207 мг (88%) продукта, R<sub>f</sub> 0.28 (A); т.пл. 158-166°C. Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.25 (м, 2H, C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> Lys), 1.35 (м, 2H, C<sup>6</sup>H<sub>2</sub> Lys), 1.52 и 1.68 (два м, 2H, C<sup>6</sup>H<sub>2</sub> Lys), 2.41 (м, 4H, HOOCC<u>H<sub>2</sub>CH<sub>2</sub></u>), 2.94 (м, 2H, C<sup>e</sup>H<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> – OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 7.34 (т, *J* 5.7 Гц, 1H, N<sup>e</sup>H Lys), 7.92 (д, *J* 7.7 Гц, 1H, NH Lys), 8.25 (д, *J* 8.0 Гц, 1H, NH Ser).

Амид *N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Ser-Lys-NH<sub>2</sub> (ГСБ-104) (25). К раствору 180 мг (0.30 ммоль) (24) в 10 мл DMF присыпали 180 мг 10%-ного Pd/C и реакционную смесь перемешивали в атмосфере водорода до исчезновения исходного соединения (ТСХ контроль) в течение 10 ч. Затем катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Получали 95 мг (общий выход 46%) продукта в виде белого порошка,  $R_f$  0.11 (E); т.пл. 136-138°C;  $[\alpha]_D^{20}$  -15.75° (с 0.4; DMF). Найдено, %: С 46.80; Н 7.39;N 16.68;  $C_{13}H_{24}N_4O_6$ . Вычислено, %: С 46.99; Н 7.23; N 16.87. Масс-спектр (m/z) найдено 333.1771 [M+H]<sup>+</sup>.  $C_{13}H_{24}N_4O_6$ . Вычислено 333.1769. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.29 (м, 2H, C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> Lys), 1.53 (м, 2H, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Lys), 1.79 (м, 2H, C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub> Lys), 2.51 (м, 4H, HOOCC<u>H<sub>2</sub>CH<sub>2</sub></u>), 2.75 (м, 2H, C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.91 и 4.16 (два м, 2H, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.40 (м, 1H, C<sup>α</sup>H Lys), 4.55 (м, 1H, C<sup>α</sup>H Ser), 7.10 и 7.21 (два с, 2H, NH<sub>2</sub> амид), 8.00 (д, *J* 7.6 Гц, 1H, NH Lys), 8.31 (д, *J* 8.1 Гц, 1H, NH Ser).

# 4.2.3.2 Синтез гексаметилендиамида бис-(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина) ГСБ-106

Гексаметилендиамид бис-(N-трет-бутилоксикарбонил- $N^{e}$ -2-хлорбензилоксикарбонил-*L*-лизина), (Boc-Lys(Z(Cl))-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (26). К раствору 3.50 г (6.80 ммоль) (19) в 40 мл EtOAc добавляли раствор 380 мг (3.30 ммоль) гексаметилендиамина в 5 мл EtOAc. Реакционную массу перемешивали в течение 1 ч, затем упаривали, остаток растворяли в 100 мл EtOAc и последовательно промывали 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50 мл), 3% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (50 мл) и водой (2х50 мл), фильтрат сушили безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упаривали. Полученный твёрдый кристаллический осадок сушили в вакууме (15 мм.рт.ст.) над CaCl<sub>2</sub>. Получали 2.40 г (85%) продукта, R<sub>f</sub> 0.45 (A); т.пл. 101-103°C;  $[\alpha]_D^{20}$  -7.3° (с 0.5; DMF). Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.29 (м, 8H, 2 С<sup> $\gamma$ </sup>H<sub>2</sub> Lys, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH-), 1.42 (с, 18H, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 1.55 (м, 8H, 2 С<sup> $\delta$ </sup>H<sub>2</sub> Lys, -NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.79 (м, 4H, 2 С<sup> $\beta$ </sup>H<sub>2</sub> Lys), 2.96 (м, 4H, 2 С<sup> $\epsilon$ </sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.20 (м, 4H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 4.53 (м, 2H, 2 С<sup> $\alpha$ </sup>H Lys), 5.34 (с, 4H, 2 CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 7.10 (д, *J* 7.8 Гц, 2H, 2NH Lys), 7.39 (т, *J* 5.7 Гц, 2H, 2 N<sup> $\epsilon$ </sup>H Lys), 8.01 (т, *J* 4.7 Гц, 2H, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-).

Дитририфторацетат гексаметилендиамида *бис-(N<sup>e</sup>-2-хлорбензилоксикарбонил-L-лизина),* 2 CF<sub>3</sub>COOH·(H-Lys(Z(Cl))-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (27). К 1.42 г (1.71 ммоль) (26) приливали 15 мл TFA и перемешивали 2 ч, по окончании реакции (TCX контроль) раствор упаривали с диэтиловым эфиром (2х20 мл). Полученную пену (затвердевшее масло) продукта затирали под диэтиловым эфиром. Выход 1.20 г (90%), R<sub>f</sub> 0.10 (B); т.пл. 87-90°C. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 0.95-1.75 (м, 20H, 2 -C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 2.98 (м, 4H, - NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.09 (м, 4H, 2 C<sup>e</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.70 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Lys), 5.07 (с, 4H, 2 - OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 7.37 (т, *J* 4.9 Гц, 2H, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-), 7.45 (м, 8H, 2 -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 8.23 (м, 6H, 2 N<sup>+</sup>H<sub>3</sub>Lys), 8.59 (т, *J* 6.0 Гц, 2H, 2 N<sup>e</sup>H Lys).

Гексаметилендиамид бис-( $N^{\alpha}$ -*трет*-бутилоксикарбонил-О-бензил-*L*-серил- $N^{e}$ -2хлорбензилоксикарбонил-*L*-лизина), (Boc-Ser(Bzl)-Lys(Z(Cl))-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (28). К раствору 1.13 г (1.25 ммоль) (27) в 25 мл DMF сначала прибавляли 0.45 мл (2.64 ммоль) DIEA, а затем 2.48 г (2.60 ммоль) (18). Реакционную смесь перемешивали 1 ч при комнатной температуре, добавляли 0.5 мл DMAPA, перемешивали 15 мин. Реакционную массу разбавляли 150 мл EtOAc, последовательно промывали по 40 мл водой, 3% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и снова водой, сушили безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Полученный остаток перекристаллизовывали из MeOH. Получали 1.25 г (75%) продукта в виде белого порошка, R<sub>f</sub> 0.40 (A), R<sub>f</sub> 0.60 (H); т.пл. 143-151°C; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> -2.5° (с 0.4; DMF). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 0.93-1.83 (м, 38H, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc, 2 -C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys, -NHCH<sub>2</sub>(C<u>H</u><sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 2.93 (м, 8H, 2 C<sup>e</sup>H<sub>2</sub> Lys, -NHC<u>H<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C<u>H</u><sub>2</sub>NH-), 3.59 (м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.20 (м, 4H, 2 C<sup>α</sup>H Lys, 2 C<sup>α</sup>H Ser), 4.47 (с, 4H, 2-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> Bzl), 5.07 (с, 4H, 2 -OC<u>H<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl)</u>, 7.00 (д, *J* 8.1 Гц, 2H, 2 N<sup>e</sup>H Lys), 7.91 (д, *J* 7.8 Гц, 2H, 2 NH Lys).</u>

Дитрифторацетат гексаметилендиамида *бис*-(О-бензил-*L*-серил-*N*<sup>e</sup>-2хлорбензилокси-карбонил-*L*-лизина), 2 CF<sub>3</sub>COOH·(H-Ser(Bzl)-Lys(Z(Cl))-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (29). 1.00 г (0.84 ммоль) (28) растворяли в 3 мл ТFA и перемешивали 40 мин, упаривали. Остаток переупаривали с диэтиловым эфиром (2х15 мл). Полученное масло кристаллизовали под диэтиловым эфиром. Получали 0.92 г (92%) бежевого порошка, хроматографически однородного,  $R_f 0.33$  (A),  $R_f 0.50$  (B); т.пл. 117-122°C;  $[\alpha]_D^{20} + 4.75^\circ$  (с 0.4; DMF). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.15-1.75 (м, 20H, 2 -CH<sub>2</sub><sup> $\beta$ </sup>CH<sub>2</sub><sup> $\gamma$ </sup>CH<sub>2</sub><sup> $\delta$ </sup>- Lys, -NHCH<sub>2</sub>(C<u>H</u><sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.00 (м, 8H, 2 C<sup> $\epsilon$ </sup>H<sub>2</sub> Lys, -NHC<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.90 (м, 4H, 2 C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.25 (м, 4H, 2 C<sup> $\alpha$ </sup>H Lys, 2 C<sup> $\alpha$ </sup>H Ser), 4.46 (с, 4H, 2 -C<u>H</u><sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> Bzl), 5.10 (с, 4H, 2 -OC<u>H</u><sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 7.04 (уш. с, 6H, 2 N<sup>+</sup>H<sub>3</sub> Ser), 7.20-7.50 (м, 20H, 2 -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, 2 -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub><u>H</u><sub>4</sub>Cl, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 7.74 (т, *J* 5.6 Гц, 2H, 2 N<sup> $\epsilon$ </sup>H Lys), 7.88 (д, *J* 7.6 Гц, 2H, 2 NH Lys).

Гексаметилендиамид *бис-(N*-моносукцинил-О-бензил-*L*-серил-*N*<sup>e</sup>-2-хлорбензилоксикарбонил-*L*-лизина), (HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Ser(Bzl)-Lys(Z(Cl))-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (30). К суспензии 0.80 г (0.72 ммоль) (29) в 5 мл DMF добавляли 0.1 мл (1.50 ммоль) ТЕА, перемешивали 30 мин, затем добавляли 0.408 г (4.08 ммоль) янтарного ангидрида. Реакционную смесь перемешивали 3 ч. По исчезновению исходного соединения (TCX контроль) реакционную массу выливали в холодную воду, выпавший белый осадок отфильтровывали, промывали водой, высушивали над CaCl<sub>2</sub> в вакууме (15 мм.рт.ст.). Получали 0.72 г (91%), R<sub>f</sub> 0.40 (M), R<sub>f</sub> 0.95 (B); т.пл. 128-130°C (EtOAc);  $[\alpha]_D^{20}$  - 11.25° (с 0.4; DMF). Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 0.95-1.78 (м, 20H, 2 -C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>7</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 2.42 (м, 8H, 2 HOOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.97 (м, 8H, 2 C<sup>e</sup>H<sub>2</sub> Lys, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.60 (м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.14 (м, 2H, 2 C<sup>a</sup>H Lys), 4.44 (м, 2H, 2 C<sup>a</sup>H Ser), 4.45 (с, 4H, 2 -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> Bzl), 5.07 (с, 4H, 2 -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 7.20-7.49 (м, 20H, 2 - CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, 2 -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-), 7.53 (т, *J* 5.6 Гц, 2H, 2 N<sup>e</sup>H Lys), 7.89 (д, *J* 7.3 Гц, 2H, 2 NH Lys), 8.24 (д, *J* 8.1 Гц, 2H, 2 NH Ser).

Гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина), (HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Ser-Lys-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (ГСБ-106) (31). К раствору 600 мг (0.50 ммоль) (30) в 50 мл МеОН прибавляли 500 мг 10% Pd/C и перемешивали в атмосфере водорода 6-12 ч до полного исчезновения исходного соединения (TCX-контроль). По окончании гидрогенолиза катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, твердый остаток промывали диэтиловым эфиром, перекристаллизовывали из смеси MeOH-Et<sub>2</sub>O, высушивали в вакууме (15 мм.рт.ст.). Получали 450 мг продукта (90%, общий выход 36%). R<sub>f</sub> 0.10 (E), R<sub>f</sub> 0.40 (B);  $\tau = 6.2$  мин (УХ-1); т.пл. 143-145°C (из MeOH-Et<sub>2</sub>O);  $[\alpha]_D^{20}$  -24.7° (с 0.4; DMF),  $[\alpha]_D^{25}$  – 44.5° (с 1; вода). Масс-спектр (m/z) найдено 747.4226 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>32</sub>H<sub>58</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub>. Вычислено 747.4247. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.10 (м, 4H, 2 C<sup>7</sup>H<sub>2</sub> Lys), 1.34 (м, 4H, 2 C<sup>6</sup>H<sub>2</sub> Lys), 1.70 (м, 4H, 2 C<sup>6</sup>H<sub>2</sub> Lys), 1.00-1.75 (м, 8H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 2.42 (м, 8H, 2 HOOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.74 (м, 4H, 2 C<sup>6</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.00 (м, 4H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.63 (м, 4H, 2 C<sup>6</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.14 (м, 2H, 2 C<sup>a</sup>H Lys), 4.27 (м, 2H, 2 C<sup>a</sup>H Ser), 7.68 (т, *J* 4.9 Гц, 2H, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 7.72 (уш.с, 4H, 2 N<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> Lys), 7.95 (д, *J* 7.8 Гц, 2H, 2 NH Lys), 8.10 (д, *J* 8.1 Гц, 2H, 2 NH Ser).

### 4.2.4 Синтез аналогов дипептида ГСБ-106

# 4.2.4.1 Синтез гексаметилендиамида *бис-(N-*моносукцинил-*L*-серил-*D*-лизина), (ГТ-106LD)

*N*-Оксисукцинимидный эфир *N*-бензилоксикарбонил-*N*<sup>е</sup>-*трет*-бутилоксикарбонил-*D*-лизина, *Z*-*D*-Lys(Boc)-OSu (32). Получали аналогично *Z*-*L*-Lys(Boc)-OSu (10) с выходом 90%,  $R_f 0.90$  (A),  $R_f 0.83$  (K); т.пл. 97 – 99°C (i-PrOH);  $[\alpha]_D^{22} + 16.0^\circ$  (с 2; диоксан). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.15-1.85 (м, 6H, -C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys), 1.35 (с, 9H, -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 2.66 (м, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- -OSu), 2.95 (м, 2H, C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> Lys), 4.36 (м, 1H, C<sup>α</sup>H Lys), 5.02 (с, 2H, -OC<u>H<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>),</u> 6.77 (т, *J* 5.7 Гц, 1H, N<sup>ε</sup>H Lys), 7.20-7.35 (м, 5H, -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 8.01 (д, *J* 7.8 Гц, 1H, NH Lys).

**Гексаметилендиамид** *бис-(N*-бензилоксикарбонил-*N*<sup>*e*</sup>-*трет*-бутилоксикарбонил-*D*лизина), (*Z*-*D*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (33). Получали аналогично (*Z*-*L*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (11) с выходом 93%, R<sub>f</sub> 0.90 (B), R<sub>f</sub> 0.93 (C); т.пл. 151-154°C; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> + 9.0° (с 0.3; EtOH). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.10-1.70 (м, 12H, 2 -C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys, м, 8H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.34 (с, 18H, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 2.87 (м, 4H, 2 C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.01 (м, 4H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.92 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Lys), 5.00 (с, 4H, 2 -OC<u>H</u><sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 6.80 (т, *J* 4.72 Гц, 2H, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 7.10-7.40 (набор м, 12H, 2 -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, 2H, 2 NH Lys), 7.78 (т, *J* 5.72 Гц, 2H, 2 N<sup>ε</sup>H Lys).

*N*-Бензилоксикарбонил-*D*-серин, Z-*D*-Ser-OH (34). Получали аналогично *L*-изомеру (8) с выходом 89%. R<sub>f</sub> 0.72 (K), R<sub>f</sub> 0.86 (И); т.пл. 119-120°C; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> - 5.6° (с 5; AcOH). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 3.65 (д, *J* 5.5 Гц, 2H, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.08 (м, 1H, C<sup>α</sup>H Ser), 5.03 (с, 2H, -OC<u>H</u><sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.30-7.40 (м, 5H, -C<sub>6</sub><u>H</u><sub>5</sub> Z), 7.33 (д, *J* 8.1 Гц, 1H, NH Ser).

Пентафторфениловый эфир *N*-бензилоксикарбонил-*D*-серина, *Z*-*D*-Ser-OPfp (35). Получали аналогично *L*-изомеру (9) с выходом 92%.  $R_f 0.82$  (EtOAc),  $R_f 0.33$  (П); т.пл. 150-154°C (петролейный эфир);  $[\alpha]_D^{22}$  + 15.8° (с 2; EtOH). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 3.86 (м, 2H,  $C^{\beta}H_2$  Ser), 4.50 (м, 1H,  $C^{\alpha}H$  Ser), 5.08 (с, 2H, -OC<u>H</u><sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.36 (м, 5H, -C<sub>6</sub><u>H</u><sub>5</sub> Z), 7.99 (д, *J* 7.6 Гц, 1H, NH Ser).

# Гексаметилендиамид *бис-(N-*бензилоксикарбонил-*L*-серил-*N<sup>e</sup>-трет*-бутилоксикарбонил-*D*-лизина), (Z-*L*-Ser-*D*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (36).

А) К раствору 3.80 г (4.52 ммоль) (**33**) в 30 мл МеОН присыпали 1.50 г 10% Pd/C и перемешивали в атмосфере водорода 1.5 ч до исчезновения исходного соединения (TCX контроль). Затем катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Полученное масло сушили в вакууме (15 мм.рт.ст.) над CaCl<sub>2</sub> и парафином.

Б) К раствору 2.52 г (4.4 ммоль) (H-*D*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> в 20 мл DMF прикапывали раствор 3.65 г (9.0 ммоль) Z-Ser-OPfp (9) в 10 мл DMF и перемешивали 2 ч при комнатной температуре (TCX контроль), добавляли 0.3 мл DMAPA, перемешивали 15 мин. Реакционную массу разбавляли 100 мл воды и упаривали до объёма 5-7 мл, охлаждали до 10°C и приливали при перемешивании 40 мл воды. Выпавший осадок отфильтровывали, последовательно промывали 3% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (30 мл) и водой (50 мл), сушили на воздухе. Получали 3.80 г (83%) продукта виде белого порошка. R<sub>f</sub> 0.90 (B), R<sub>f</sub> 0.85 (E); т.пл. 165-167°C;  $[\alpha]_D^{25}$  + 11.2° (c 1; MeOH). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.05-1.70 (м, 12H, 2 -C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys, м, 8H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.35 (c, 18H, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 2.85 (м, 4H, 2 C<sup>e</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.00 (м, 4H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.65 (м, 4H, 2 CH<sub>2</sub> Gly), 4.15 (м, 2H, 2 C<sup>a</sup>H Lys), 5.03 (c, 4H, 2 -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.14-7.37 (м, 10H, 2 -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.25 (т, *J* 4.7 Гц, 2H, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 7.28 (д, *J* 7.8 Гц, 2H, 2 NH Lys), 7.81 (т, *J* 5.7 Гц, 2H, 2 N<sup>e</sup>H Lys).

Гексаметилендиамид *бис-(N-моносукцинил-L-серил-N<sup>\*</sup>-трет*-бутилокси-карбонил-*D*-лизина), (HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-*L*-Ser-*D*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (37). К раствору 2.03 г (2 ммоль) (36) в 20 мл МеОН присыпали 0.50 г 10% Pd/С и реакционную смесь перемешивали в атмосфере водорода до исчезновения исходного соединения (TCX контроль) в течение 6 ч. Затем катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Полученное масло растворяли в 15 мл DMF, к полученному раствору приливали раствор 0.45 г (4.5 ммоль) янтарного ангидрида в 3 мл DMF. Реакционную массу перемешивали 12 ч, затем разбавляли 100 мл воды и оставляли полученный раствор на 12 ч. Выпавший белый осадок отфильтровывали, промывали водой, сушили в вакууме (15 мм.рт.ст.) над CaCl<sub>2</sub>. Получали 1.32 г (70%) продукта. R<sub>f</sub> 0.60 (B); т.пл. 157-160°C;  $[\alpha]_D^{25}$  + 8.0° (c 1; EtOH). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.00-1.75 (м, 12H, 2 -C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys, м, 8H, -NHCH<sub>2</sub>(C<u>H<sub>2</sub></u>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.36 (c, 18H, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 2.42 (м, 8H, 2 HOOCC<u>H<sub>2</sub>CH<sub>2</sub></u>), 2.80 (м, 4H, 2 C<sup>6</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.00 (м, 4H, -NHC<u>H<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.50 (м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.10 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Lys), 4.24 (м, 2H, 2 C<sup>a</sup>H Ser), 6.75 (т, *J* 5.7 Гц, 2H, 2 N<sup>ε</sup>H Lys), 7.76 (т, *J* 4.7 Гц, 2H, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 8.02 (д, *J* 7.8 Гц, 2H, 2 NH Lys), 8.08 (д, *J* 8.1 Гц, 2H, 2 NH Ser).</u> **Дитрифторацетат гексаметилендиамида** *бис-(N-моносукцинил-L-серил-D-лизина*), **2 СF<sub>3</sub>COOH•(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-***L***-Ser-***D***-Lys-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (ГТ-106LD) (38). К раствору 1.00 г (1.05 ммоль) (37) в 5 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> приливали 3 мл TFA и перемешивали 40 мин, по окончании реакции (ТСХ контроль) раствор упаривали с диэтиловым эфиром (4 х 10 мл). Полученное масло затирали под диэтиловым эфиром. Кристаллы отфильтровывали, сушили в вакууме (15 мм.рт.ст.) над КОН. Получали 0.93 г (91%, общий выход 44%) (38),** R<sub>f</sub> 0.15 (B);  $\tau$  = 6.1 мин (УХ-1); т.пл. 124-127°С; [ $\alpha$ ]<sup>25</sup><sub>D</sub> +12.0° (с 1; вода). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.00-1.80 (м, 12H, 2 -C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys, м, 8H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 2.43 (м, 8H, 2 HOOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.76 (м, 4H, 2 C<sup>6</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.00 (м, 4H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.52 (м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.15 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Lys), 4.27 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Ser), 7.70 (уш, с, 6H, 2 N<sup>ε+</sup>H<sub>3</sub> Lys), 7.75 (т, *J* 4.7 Гц, 2H, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-), 8.01 (д, *J* 7.8 Гц, 2H, 2 NH Lys), 8.07 (д, *J* 8.1 Гц, 2H, 2 NH Ser).

## 4.2.4.2 Синтез гексаметилендиамида бис-(*N*-моносукцинил-*D*-серил-*L*-лизина), ГТ-106DL

**Гексаметилендиамид** *бис-(N-бензилоксикарбонил-D-серил-N<sup>\*</sup>-трет*-бутилоксикарбонил-*L*-лизина), (*Z*-*D*-Ser-*L*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (39). К раствору 700 мг (1.22 ммоль) (H-*L*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (12) в 5 мл DMF прикапывали раствор 1012 мг (2.5 ммоль) *Z*-*D*-Ser-OPfp (35) в 5 мл DMF и перемешивали 4 ч при комнатной температуре (TCX контроль). Затем добавляли 0.3 мл DMAPA и перемешивали еще 20 мин. К реакционной смеси добавляли 20 мл воды и упаривали в вакууме (15 мм.рт.ст., при 50°C) до объема 2 мл, охлаждали до комнатной температуры и разбавляли 15 мл воды. Выпавший белый осадок отфильтровывали, промывали 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20 мл) и водой (50 мл), сушили на воздухе. Получали 1100 мг (80%) белого порошка. R<sub>7</sub> 0.95 (B), R<sub>7</sub> 0.90 (E); т.пл. 124-125°C;  $[\alpha]_D^{25} - 13.3°$  (с 0.7; MeOH). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.00-1.80 (м, 12H, 2 -C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>7</sup>H<sub>2</sub>C<sup>8</sup>H<sub>2</sub>- Lys, м, 8H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.36 (с, 18H, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 2.86 (м, 4H, 2 C<sup>e</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.01 (м, 4H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.36 (м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.12 (м, 4H, 2 C<sup>a</sup>H Lys, 2 C<sup>a</sup>H Ser), 5.03 (с, 4H, 2 -OC<u>H<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 6.71 (т, *J* 5.7 Гц, 2H, 2 N<sup>e</sup>H Lys), 7.20-7.40 (м, 10H, 2 -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub><u>H</u><sub>5</sub>), 7.30 (д, *J* 8.1 Гц, 2H, 2 NH Ser), 7.72 (т, *J* 4.7 Гц, 2H, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 8.04 (д, *J* 7.8 Гц, 2H, 2 NH Lys).</u>

**Гексаметилендиамид** *бис-(N-моносукцинил-D-серил-N<sup>e</sup>-трет*-бутилокси-карбонил-*L*-лизина), (HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-*D*-Ser-*L*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (40). К раствору 507 мг (0.45 ммоль) (39) в 30 мл МеОН прибавляли 200 мг 10% Pd/C и перемешивали в атмосфере водорода 4 ч до полного исчезновения исходного соединения (TCX контроль). По окончании гидрогенолиза катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Полученное масло растворяли в 7 мл DMF и приливали раствор 95 мг (0.95 ммоль) янтарного ангидрида в 2 мл DMF. Реакционную массу перемешивали 3 ч, затем добавляли 20 мл охлажденной воды (10°С), выдерживали полученный раствор 12 ч, выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой, сушили на воздухе, затем в вакууме (15 мм.рт.ст.) над CaCl<sub>2</sub>. Получали 360 мг (75%) продукта в виде белого порошка.  $R_f$  0.85 (B); т.пл. 143-146°С;  $[\alpha]_D^{25}$  - 4.2° (с 0.85; MeOH). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.00-1.73 (м, 12H, 2 - C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys, м, 8H, -NHCH<sub>2</sub>(C<u>H</u><sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.36 (с, 18H, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 2.40 (м, 8H, 2 HOOCC<u>H</u><sub>2</sub>C<u>H</u><sub>2</sub>), 2.86 (м, 4H, 2 C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.00 (м, 4H, - NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C<u>H</u><sub>2</sub>NH-), 3.38 (м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.10 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Lys), 4.24 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Ser), 6.72 (т, *J* 5.7 Гц, 2H, 2 N<sup>ε</sup>H Lys), 7.76 (т, *J* 4.7 Гц, 2H, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 8.02 (д, *J* 8.1 Гц, 2H, 2 NH Ser), 8.03 (д, *J* 7.8 Гц, 2H, 2 NH Lys).

Дитрифторацетат гексаметилендиамида *бис-(N-моносукцинил-D-серил-L-лизина),* 2 CF<sub>3</sub>COOH • (HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-*D*-Ser-*L*-Lys-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (ГТ-106DL) (41). К раствору 300 мг (0.28 ммоль) (40) в 5 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> приливали 3 мл TFA и перемешивали 30 мин, по окончании реакции (TCX контроль) раствор упаривали с диэтиловым эфиром (3 x 10 мл). Полученное масло затирали под диэтиловым эфиром. Дополнительно очищали кристаллический продукт высаживанием из метанольного раствора диэтиловым эфиром. Кристаллы отфильтровывали, сушили в вакууме (15 мм.рт.ст.) над CaCl<sub>2</sub>. Получали 245 мг (90%, общий выход 48%) продукта в виде белого порошка, R<sub>f</sub> 0.15 (B);  $\tau$  =6.1 мин (УХ-1); т.пл. 125-127°C; [ $\alpha$ ]<sup>25</sup><sub>D</sub> - 16.0° (c 1.2; вода). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.00-1.80 (м, 12H, 2 -C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>7</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys, м, 8H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 2.42 (м, 8H, 2 HOOCC<u>H<sub>2</sub>CH<sub>2</sub></u>), 2.74 (м, 4H, 2 C<sup>6</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.00 (м, 4H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.50 (м, 4H, 2 C<sup>6</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.13 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Lys), 4.25 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Ser), 7.67 (т, *J* 4.7 Гц, 2H, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 7.70 (уш, c, 6H, 2 N<sup>6+</sup>H<sub>3</sub> Lys), 7.94 (д, *J* 7.8 Гц, 2H, 2 NH Lys), 8.07 (д, *J* 8.1 Гц, 2H, 2 NH Ser).

## 4.2.4.3 Синтез гексаметилендиамида бис-(*N*-ацетил-*L*-серил-*L*-лизина), ГТ-106Ас

*N*-оксисукцинимидный эфир уксусной кислоты, CH<sub>3</sub>COOSu (42) получали как описано [179] из 12.0 г (0.2 моль) AcOH с выходом 86%. R<sub>f</sub> 0.85 (Б), R<sub>f</sub> 0.56 (EtOAc), R<sub>f</sub> 0.70 (К); т.пл. 130-134°С. Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>) δ, м.д.: 2.34 (с, 3H, CH<sub>3</sub>CO-), 2.80 (м, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-OSu). Лит. данные [179]: т.пл. 130°С.

Дигидрохлорид гексаметилендиамида *бис-(N^{e}-2-хлорбензилоксикарбонил-L-*лизина), 2 HCl • (H-Lys(Z(Cl))-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (43). К раствору 1.42 г (1.71 ммоль) (Вос-Lys(Z(Cl)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (26) в 10 мл диоксана прибавляли 10 мл 4 М HCl в диоксане. По окончании реакции (TCX контроль) раствор упаривали досуха и сушили в вакууме над КОН.

Полученную пену (затвердевшее масло) не обрабатывая, запускали в следующую стадию. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 0.95-1.75 (м, 20H, 2 -C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys, -NHCH<sub>2</sub>(C<u>H</u><sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 2.98 (м, 4H, -NHC<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C<u>H</u><sub>2</sub>NH-), 3.09 (м, 4H, 2 C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.70 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Lys), 5.07 (с, 4H, 2 -OC<u>H</u><sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 7.37 (т, *J* 4.9 Гц, 2H, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 7.20-7.45 (м, 8H, 2 -OCH<sub>4</sub>C<sub>6</sub><u>H</u><sub>4</sub>Cl), 8.23 (уш. с, 6H, 2 N<sup>+</sup>H<sub>3</sub> Lys), 8.59 (т, *J* 6.0 Гц, 2H, 2 N<sup>ε</sup>H Lys).

Гексаметилендиамид *бис-(N-трет*-бутилоксикарбонил-О-бензил-*L*-серил-*N*<sup>e</sup>-2хлорбензилокси-карбонил-*L*-лизина), (Boc-Ser(Bzl)-Lys(Z(Cl))-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (28). К раствору 1.13 г (1.44 ммоль) (43) в 25 мл DMF сначала прибавляли 0.46 мл (2.64 ммоль) DIEA, а затем 2.48 г (2.60 ммоль) Boc-Ser(Bzl)-OSu (18). Реакционную смесь перемешивали 1 ч, добавляли 0.5 мл DMAPA, перемешивали 15 мин, затем разбавляли 150 мл EtOAc, последовательно промывали водой (40 мл), 3% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (40 мл), 2% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (40 мл) и снова водой (30 мл), сушили безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Полученный остаток перекристаллизовывали из MeOH. Получали 1.54 г (85%) продукта в виде белого порошка, R<sub>f</sub> 0.40 (A), R<sub>f</sub> 0.60 (K); т.пл. 143-151°C; [ $\alpha$ ]<sup>20</sup> - 2.5° (c 0.4; DMF). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 0.93-1.83 (набор м, 38H, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc, 2 -C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup> $\delta$ </sup>H<sub>2</sub>- Lys, -NHCH<sub>2</sub>(C<u>H</u><sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 2.93 (м, 8H, 2 C<sup>e</sup>H<sub>2</sub> Lys, -NHC<u>H<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C<u>H</u><sub>2</sub>NH-), 3.59 (м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.20 (м, 4H, 2 C<sup>α</sup>H Lys, 2 C<sup>α</sup>H Ser), 4.47 (c, 4H, 2 -OC<u>H<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> Bzl), 5.07 (c, 4H, 2 -OC<u>H</u><sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 7.00 (д, *J* 8.1 Гц, 2H, 2 NH Ser), 7.19-7.50 (набор м, 20H, 2 -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub><u>H<sub>5</sub> Bzl, 2 -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub><u>H</u><sub>4</sub>Cl, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 7.77 (т, *J* 5.8 Гц, 2H, 2 N<sup>e</sup>H Lys), 7,91 (д, *J* 7.8 Гц, 2H, 2 NH Lys).</u></u></u>

Дигидрохлорид гексаметилендиамида *бис-*(О-бензил-*L*-серил-*N*<sup>¢</sup>-2-хлорбензилоксикарбонил-*L*-лизина), 2 HCl • (H-Ser(Bzl)-Lys(Z(Cl))-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (44). Растворяли 1.30 г (1.03 ммоль) (28) в 10 мл 4 М HCl в диоксане, перемешивали 40 мин, затем упаривали с диэтиловым эфиром (2 х 15 мл). Полученное масло затирали под эфиром, кристаллы отфильтровывали и сушили в вакууме (15 мм.рт.ст.) над КОН. Получали 0.89 г (76%) порошка, R<sub>f</sub> 0.33 (A), R<sub>f</sub> 0.50 (B), R<sub>f</sub> 0.67 (E); т.пл. 146-149°С. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.15-1.75 (м,20 H, 2 - $C^{\beta}H_2C^{\gamma}H_2C^{\delta}H_2$ - Lys, -NHCH<sub>2</sub>(C<u>H</u><sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.00 (м, 8H, 2 C<sup>¢</sup>H<sub>2</sub> Lys, -NHC<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C<u>H</u><sub>2</sub>NH-), 3.90 (м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.25 (м, 4H, 2 C<sup>α</sup>H Lys, 2 C<sup>α</sup>H Ser), 4.46 (с, 4H, 2 -OC<u>H</u><sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> Bzl), 5.10 (с, 4H, 2 -OC<u>H</u><sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 7.04 (с, 6H, 2 N<sup>+</sup>H<sub>3</sub> Ser), 7.20-7.50 (набор м, 20H, 2 -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> Bzl, 2 -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub><u>H</u><sub>4</sub>Cl, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 7.74 (т, *J* 5.6 Гц, 2H, 2 N<sup>¢</sup>H Lys), 7.88 (д, *J* 7.6 Гц, 2H, 2 NH Lys).

**Гексаметилендиамид** *бис-(N*-ацетил-О-бензил-*L*-серил-*N*<sup>*e*</sup>-2-хлорбензилоксикарбонил-*L*-лизина), (CH<sub>3</sub>CO-Ser(Bzl)-Lys(Z(Cl))-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (45). К раствору 0.800 г (0.70 ммоль) (44) в 5 мл DMF добавляли 0.25 мл (1.48 ммоль) DIEA, перемешивали 30 мин, затем присыпали 0.236 г (1.50 ммоль) Ac-OSu (**42**). Реакционную смесь перемешивали 48 ч, затем реакционную массу выливали в емкость с 20 мл холодной воды, через 2 ч, выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой, сушили в вакууме (15 мм.рт.ст.) над CaCl<sub>2</sub>. Выход 0.720 г (97%), R<sub>f</sub> 0.12 (A), R<sub>f</sub> 0.95 (B), R<sub>f</sub> 0.40 (Г); т.пл. 153-155°C (из EtOAc);  $[\alpha]_D^{20}$  -11.3° (с 0.4; DMF). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.00-1.75 (м, 20H, 2 -C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys, - NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.87 (с, 6H, 2 CH<sub>3</sub>CO-), 2.74 (м, 4H, 2 C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> Lys), 2.94 (м, 4H, - NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.59 (м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.15 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Lys), 4.55 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Ser), 7.20-7.50 (м, 18H, 2 -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> Bzl, 2 -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 7.52 (т, *J* 4.9 Гц, 2H, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-), 7.64 (, т, *J* 5.6 Гц, 2H, 2 N<sup>ε</sup>H Lys), 8.01 (д, *J* 7.8 Гц, 2H, 2 NH Lys), 8.15 (д, *J* 8.1 Гц, 2H, 2 NH Ser).

Гексаметилендиамид *бис-(N*-ацетил-*L*-серил-*L*-лизина), (CH<sub>3</sub>CO-Ser-Lys-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (ГТ-106Ас) (46). К раствору 600 мг (0.56 ммоль) (45) в 30 мл МеОН присыпали 500 мг 10% Рd/С и перемешивали в атмосфере водорода 6 ч. По окончании гидрогенолиз (ТСХ контроль), катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, твердый остаток растворяли в МеОН и высаживали диэтиловым эфиром. Получали 317 мг (90%) (общий выход 44%) продукта в виде белого порошка,  $R_f$  0.10 (E),  $R_f$  0.40 (B);  $\tau$ =11.8 мин (УХ-3); т.пл. 182-186°С; [ $\alpha$ ]  $_D^{20}$  - 42.9° (с 1; DMF). Масс-спектр (m/z) найдено 631.4141 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>28</sub>H<sub>52</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub>. Вычислено 631.4137. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.00-1.75 (м, 20H, 2 -C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys, - NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.90 (с, 6H, 2 CH<sub>3</sub>CO-), 2.75 (м, 4H, 2 C<sup>e</sup>H<sub>2</sub> Lys), 2.95 (м, 4H, - NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.70 (м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.21 (м, 2H, 2 C<sup>a</sup>H Lys), 4.55 (м, 2H, 2 C<sup>a</sup>H Ser), 7.52 (т, *J* 4.9 Гц, 2H, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-), 8.01 (д, *J* 7.8 Гц, 2H, 2 NH Lys), 8.15 (д, *J* 8.1, 2H, 2 NH Ser).

Гексаметилендиамид бис-(N-ацетил-L-серил-N<sup>\*</sup>-трет-бутилоксикарбонил-Lлизина), (CH<sub>3</sub>CO-Ser-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (47). К раствору 4.00 г (5.40 ммоль) (H-Ser-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (14) в 30 мл DMF охлажденному до + 5°C при перемешивании приливали раствор 2.02 г (13 ммоль) CH<sub>3</sub>COOSu (42) в 10 мл DMF, перемешивали 1 ч при + 5°C, затем охлаждение убирали и перемешивали при комнатной температуре 20 ч. Растворитель упаривали при температуре не выше 50°C, к остатку приливали 40 мл диэтилового эфира и оставляли при температуре + 10°C на 12 ч. Осадок отфильтровывали, промывали 20 мл диэтилового эфира. Полученный продукт суспендировали в 40 мл ацетона и кипятили 20 мин, отфильтровывали, промывали дополнительно 5 мл горячего ацетона, сушили в вакууме (15 мм.рт.ст.) над CaCl<sub>2</sub>. Получали 3.41 г (77%) (47) в виде порошка кремового цвета, R<sub>f</sub> (основное пятно) 0.31 (B); т.пл. 150-154°C (ацетон);  $[\alpha]_D^{29} - 21.39°$  (с 1; MeOH). Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (DMSO- *d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 1.10-1.65 (м, 20H, 2 -C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys, -NHCH<sub>2</sub>(C<u>H</u><sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.35 (c, 18H, 2 - OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 1.85 (c, 6H, 2 CH<sub>3</sub>CO), 2.85 (м, 4H, 2 C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> Lys), 2.98 (м, 4H, - NHC<u>H<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.47-3.55 (м, *J* 5.1 Гц, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.11 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Ser), 4.17 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Lys), 5.15 (т, 2H, 2 -OH Ser), 6.77 (т, *J* 5.8 Гц, 2H, N<sup>ε</sup>H Lys), 7.77 (т, *J* 4.9 Гц, 2H, - N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 7.98 (м, 4H, 2 NH Lys, 2 NH Ser).</u>

**Дитрифторацетат** гексаметилендиамида *бис-(N-ацетил-L-серил-L-лизина),* 2 CF<sub>3</sub>COOH • (CH<sub>3</sub>CO-Ser-Lys-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (48). Суспензию 1.00 г (1.20 ммоль) (47) в 10 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> и 10 мл ТFA перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Растворитель упаривали, затем упаривали с 15 мл бензола, маслообразный остаток затирали под 20 мл диэтилового эфира. Осадок отфильтровывали, промывали 10 мл сухого диэтилового эфира и высушивали в вакууме (15 мм.рт.ст.) над CaCl<sub>2</sub>. Получали 1.01 г (97%) в виде белого порошка. R<sub>7</sub>0.16 (B), R<sub>7</sub>0.33 (B2); т.пл. 143-150°C;  $[\alpha]^{30}_{D}$ -21.59° (с 1; MeOH). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 1.11-1.54 (три м, 16H, 2 - $C^{\beta}H_2C^{\gamma}H_2C^{\delta}H_2$ - Lys, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.72-1.79 (м, 4H, 2  $C^{\beta}H_2$  Lys), 1.87 (с, 6H, 2 CH<sub>3</sub>CO), 2.75 (м, 4H, 2 C<sup>c</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.03 (м, 4H, -NHC<u>H<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.52 и 3.61 (м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.17 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Lys), 4.30 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Ser), 4.47 (уш. с, 2H, 2 -OH Ser), 7.75 (м, 6H, 2 N<sup>+</sup>H<sub>3</sub> Lys), 7.77 (т, *J* 4.7 Гц, 2H, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 8.03 (д, *J* 7.9 Гц, 2H, 2 NH Ser), 8.05 (д, *J* 7.8 Гц, 2H, 2 NH Lys).</u>

**Диацетат гексаметилендиамида** *бис-(N-ацетил-L-серил-L-лизина)* (CH<sub>3</sub>CO-Ser-Lys-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> ГТ-106Ас (49). К 0.51 г (48) прибавляли 15 мл 10% АсОН, упаривали досуха на роторном испарителе, процесс переупаривания повторяли 5 раз, затем упаривали с бензолом (3x10 мл), диэтиловым эфиром (3x5 мл). Остаток в виде вспененного масла растворяли в 25 мл деионизованной воды, раствор пропускали через бумажный фильтр, раствор лиофилизировали. Получали 0.42 г (94%, общий выход 57% в расчете на Z-L-Lys(Boc)-OH) очищенного продукта в виде аморфного порошка, R<sub>7</sub>0.16 (B), R<sub>7</sub>0.33 (B2);  $[\alpha]^{30}_{D}$  - 25.6° (с 1; MeOH);  $\tau$ =5.2 мин (УХ-1). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 1.19, 1.33 и 1.46, (три м, 16H, 2 -C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>7</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys, -NHCH<sub>2</sub>(C<u>H</u><sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.71-1.78 (м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Lys), 1.86 (с, 6H, 2 CH<sub>3</sub>CO), 2.75 (м, 4H, 2 C<sup>6</sup>H<sub>2</sub> Lys), 2.99 (м, 4H, - NHC<u>H<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-)</u>, 3.46 и 3.57 (два м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.14 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Lys), 4.28 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Ser), 5.27 (уш. с, 2H, 2 -OH Ser), 7.77 (т, *J* 4.8 Гц, 2H, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 8.02 (д, *J* 8.1 Гц, 2H, 2 NH Ser), 8.08 (д, *J* 7.8 Гц, 2H, 2 NH Lys).

Спектр <sup>13</sup>С-ЯМР (D<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>O=1:9), δ, м. д.: 180.93 (с, 2С, 2СО, CH<sub>3</sub>COOH), 174.62; 173.37; 172.27 (набор с, 6С, 6 СО), 61.09 (с, 2С, 2 С<sup>β</sup> Ser), 55.81 (с, 2С, 2 С<sup>α</sup> Ser), 53.82 (с, 2С, 2 С<sup>α</sup> Lys), 39.30 (с, 4С, 2 С<sup>ε</sup> Lys и 2 С<sup>1</sup> спейсера), 30.32 (с, 2С, 2 С<sup>β</sup> Lys), 28.15 (с, 4С, 2 С<sup>γ</sup> Lys, 2 С<sup>2</sup> спейсера), 26.26 (с, 2С, 2 С<sup>8</sup> Lys), 25.53 (с, 2С, С<sup>3</sup>спейсера), 23.06 (с, 2С, 2 <u>С</u>H<sub>3</sub>COOH), 21.78 (с, 2С, 2 <u>С</u>H<sub>3</sub>CO-).

## 4.2.4.4 Синтез гексаметилендиамида бис-(*N*-моносукцинил-*L*-серил-глицина), ГТ-105

*N-трет*-бутилоксикарбонил-глицин, Вос-Gly-OH (50). К раствору 8.60 г (114.5 ммоль) глицина в 50 мл 1М NaOH добавили раствор 10.00 г NaHCO<sub>3</sub> в 50 мл воды, 30 мл i-PrOH и 30.00 г (137.4 ммоль, 20% избыток) ди-трет-бутилпирокарбоната. Смесь перемешивали 2 ч при комнатной температуре. По окончании реакции (TCX контроль в системе (A)). Затем разбавили водой до объёма 300 мл, избыток ди-трет-бутилпирокарбоната экстрагировали диэтиловым эфиром (2х100 мл). Водный раствор подкисляли 10 % раствором лимонной кислоты до pH=3, продукт экстрагировали EtOAc (3х100 мл). Органические фракции объединяли, промывали насыщенном раствором NaCl, высушили над безводным MgSO<sub>4</sub>, EtOAc упаривали, получали 16.25 г (81%) продукта в виде бесцветного прозрачного масла, которое при стоянии в холодильнике (+ 4°C, 24 ч) закристаллизовалось.  $R_f$  0.85 (B),  $R_f$  0.83 (E),  $R_f$  0.62 (A); т.пл. 86-89°C. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ , м.д.: 1.37 (c, 9H, -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 3.57 (д, *J* 6.15 Гц, 2H,  $C^{\alpha}H_2$  Gly), 7.04 (т, *J* 6.00 Гц, 1H, NH Gly), 12.42 (c, 1H, COOH).

*N*-оксисукцинимидный эфир *N-трет*-бутилоксикарбонил-глицина, Boc-Gly-OSu (51). Получали аналогично (18) с выходом 85%, R<sub>f</sub> 0.60 (A); т.пл. 165-167°C (i-PrOH). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.38 (с, 9H, -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 2.42 (с, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- -OSu), 3.56 (м, 2H, CH<sub>2</sub> Gly), 7.09 (т, *J* 6.6 Гц, 1H, NH Gly). Лит. данные [18]: т.пл. 168-170°C (i-PrOH).

Гексаметилендиамид бис-(*N*-трет-бутилоксикарбонил-глицина), (Boc-Gly-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (52). К раствору 380 мг (3.27 ммоль) гексаметилендиамина в 10 мл DMF прибавляли раствор 460 мг (1.69 ммоль) Boc-Gly-OSu (51) в 15 мл DMF. Реакционную массу перемешивали 3 ч при комнатной температуре, прибавляли 0.2 мл DMAPA, перемешивали 30 мин. Реакционную массу упаривали до маслообразного состояния, разбавляли 100 мл EtOAc и промывали последовательно нас. NaCl (2x30 мл), 3% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2x50 мл), 3% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2x50 мл) и нас. NaCl (2x50 мл), сушили безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Получали 600 мг (85%) продукта в виде желтого масла.  $R_f$  0.45 (A). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.10-1.40 (м, 8H, -NH-CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.37 (с, 18H, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 3.03 (м, 4H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.57 (м, 4H, 2 CH<sub>2</sub> Gly), 7.05 (т, *J* 6.6 Гц, 2H, 2 NH Gly), 7.68 (т, *J* 4.7 Гц, 2H, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-).

**Дитрифторацетат гексаметилендиамида** *бис*-глицина, 2 CF<sub>3</sub>COOH • (H-Gly-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (53). Раствор 410 мг (0.95 ммоль) (52) в 15 мл ТFA перемешивали 1 ч, затем упаривали с диэтиловым эфиром (5 х 20 мл). Полученную пену (затвердевшее масло) продукта затирали под диэтиловым эфиром и оставляли на 12 ч при комнатной температуре, кристаллы отфильтровывали, сушили на воздухе. Получали 366 мг (80%) продукта,  $R_f$  0.15 (B); т.пл. 87-90°C. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.27 и 1.41 (два м, 8H, -NHCH<sub>2</sub>(C<u>H</u><sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.50 (м, 4H, 2 CH<sub>2</sub> Gly), 8.05 (уш. с, 6H, N<sup>+</sup>H<sub>3</sub> Gly), 8.34 (уш. с, 2H, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-).

Гексаметилендиамид *бис-(N-трет*-бутилоксикарбонил-О-бензил-*L*-серил-глицина), (Boc-Ser(Bzl)-Gly-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (54). К раствору 280 мг (0.61 ммоль) (53) в 25 мл DMF прибавляли 0.24 мл (1.28 ммоль) DIEA и, через 15 мин, присыпали 530 мг (1.35 ммоль) Boc-Ser(Bzl)-OSu (18). Реакционную смесь перемешивали 5 ч при комнатной температуре, добавляли 0.5 мл DMAPA, перемешивали 20 мин. Реакционную массу разбавляли 70 мл EtOAc, последовательно промывали водой (30 мл), 3% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (30 мл), 2% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (30 мл) и снова водой (30 мл), сушили безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Полученный твёрдый остаток перекристаллизовывали из MeOH (2 мл). Получали 358 мг (75%) продукта в виде белого порошка, R<sub>7</sub> 0.30 (A), R<sub>7</sub> 0.60 (E); т.пл. 155-157°C. Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.10-1.40 (м, 8H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.38 (с, 18H, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 2.98 (м, 4H, -NHC<u>H<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C<u>H<sub>2</sub></u>NH-), 3.60 (м, 4H, 2 С<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 3.65 (м, 4H, 2 CH<sub>2</sub> Gly), 4.20 (м, 2H, 2 С<sup>α</sup>H Ser), 4.50 (с, 4H, 2 -OC<u>H<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.05 (т, *J* 6.6 Гц, 2 H, 2 NH Gly), 7.24-7.40 (м, 10H, 2 -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub><u>H<sub>5</sub>), 7.68</u> (т, *J* 4.7 Гц, 2H, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 8.22 (д, *J* 8.1 Гц, 2H, 2 NH Ser).</u></u>

Дитрифторацетат гексаметилендиамида бис-(О-бензил-*L*-серил-глицина), 2 CF<sub>3</sub>COOH • (H-Ser(Bzl)-Gly-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (55). Раствор 300 мг (0.38 ммоль) (54) в 5 мл TFA перемешивали 40 мин, затем реакционную массу упаривали с диэтиловым эфиром (3 x 20 мл). Получали 262 мг (85%) продукта в виде оранжевого масла.  $R_f$  0.15 (A). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSOd<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.18-1.42 (м, 8H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.03 (м, 4H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.74 (м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 3.68 (м, 4H, 2 CH<sub>2</sub> Gly), 4.10 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Ser), 4.54 (с, 4H, 2 -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.24-7.40 (м, 10H, 2 -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.91 (т, *J* 4.7 Гц, 2H, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-), 8.27 (6 H, уш. с, NH<sub>3</sub><sup>+</sup> Ser), 8.71 (т, *J* 6.6 Гц, 2H, 2 NH Gly).

Гексаметилендиамид *бис-(N-моносукцинил-О-бензил-L-серил-глицина),* (HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Ser(Bzl)-Gly-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (56). К раствору 250 мг (0.31 ммоль) (55) в 5 мл DMF добавляли 0.15 мл (0.80 ммоль) DIEA, перемешивали 20 мин, затем добавляли раствор 124 мг (1.24 ммоль) янтарного ангидрида в 2 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 4 ч и оставляли на 12 ч при комнатной температуре. По исчезновению исходного соединения (TCX контроль) реакционную массу выливали в охлажденную воду (5°С), выпавший белый осадок отфильтровывали, промывали водой, сушили в вакууме (15 мм.рт.ст.) над CaCl<sub>2</sub>. Получали 219 мг (90%) продукта в виде белого порошка,  $R_f$  0.40 (M); т.пл. 152-154°С. Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.08-1.41 (м, 8H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 2.43 (м, 8H, 2 HOOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.95 (м, 4H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.59 (м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 3.66 (м, 4H, 2 CH<sub>2</sub> Gly), 4.43 (м, 2H, 2 C<sup>a</sup>H Ser), 4.50 (с, 4H, 2 -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.20-7.49 (м, 10H, 2 -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.49 (т, *J* 4.7 Гц, 2H, - NHC(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-), 8.27 (т, *J* 6.6 Гц, 2H, 2 NH Gly), 8.30 (д, *J* 8.1 Гц, 2H, 2 NH Ser).

Гексаметилендиамид *бис-(N-моносукцинил-L-серил-глицина),* (HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Ser-Gly-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (ГТ-105) (57). К раствору 200 мг (0.25 ммоль) (56) в 30 мл МеОН прибавляли 100 мг 10% Pd/C и перемешивали в атмосфере водорода 6 ч до полного исчезновения исходного соединения (ТСХ контроль). По окончании гидрогенолиза катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, получали масло, которое упаривали с диэтиловым эфиром (2x5 мл). Твердый остаток растворяли в MeOH и высаживали диэтиловым эфиром, кристаллы отфильтровывали, сушили в вакууме (15 мм.рт.ст.) над CaCl<sub>2</sub>. Получали 133 мг (88%) (общий выход 29%) продукта в виде белого порошка. Дополнительно очищали ВЭЖХ ( $\tau$ =13.5 мин, УХ-4). R<sub>7</sub> 0.35 (B); т.пл. 149-151°C. Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.15-1.44 (м, 8H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 2.42 (м, 8H, 2 HOOCC<u>H</u><sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.02 (м, 4H, -NHC<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C<u>H</u><sub>2</sub>NH-), 3.57 (м, 4H, 2 С<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 3.63 (м, 4H, 2 CH<sub>2</sub> Gly), 4.16 (м, 2H, 2 С<sup>α</sup>H Ser), 7.57 (т, *J* 4.7 Гц, 2H -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 8.13 (д, *J* 8.1 Гц, 2H, 2 NH Ser), 8.15 (т, *J* 6.6 Гц, 2H, 2 NH Gly).

# 4.2.4.5 Синтез гексаметилендиамида бис-(*N*-моносукцинил-глицил-*L*-лизина) (ГТ-107) и его энантиомера ГТ-107D

*N*-бензилоксикарбонил-глицин (**Z**-Gly-OH) (58). Получали аналогично (8) из 10.0 г (0.13 моль) H-Gly-OH с выходом 92%. R<sub>f</sub> 0.15 (EtOAc), R<sub>f</sub> 0.71 (B); т.пл. 116-120°C. Лит. данные [30]: т.пл. 120°C.

*N*-оксисукцинимидный эфир *N*-бензилоксикарбонил-глицина, Z-Gly-OSu (59). Получали аналогично (10) из 50.0 г (0.24 моль) *Z*-Gly-OH с выходом 96%, R<sub>f</sub> 0.83 (EtOAc), R<sub>f</sub> 0.43 (П); т.пл. 108-110°C. Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ м.д.: 2.81 (с, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- -OSu), 4.21 (д, *J* 7.9 Гц, 2H, CH<sub>2</sub> Gly), 5.08 (с, 2H, -OCH<sub>2</sub>- *Z*), 7.36 (м, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> *Z*), 7.96 (т, *J* 7.9 Гц, 1H, NH Gly). Лит. данные [18]: т.пл. 111-115°C.

*бис-(N^{\alpha}-бензилоксикарбонил-глицил-N^{\varepsilon}-трет-бутилокси-*Гексаметилендиамид карбонил-L-лизина), (Z-Gly-L-Lys(Boc)-NH-)2(CH2)6 (60). К раствору 10.00 г (17.46 ммоль) (H-L-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (12) в 40 мл DMF прибавляли раствор 12.83 г (41.9 ммоль) Z-Gly-OSu (59) в 45 мл DMF, перемешивали 12 ч при комнатной температуре, затем прибавляли 0.87 мл DMAPA и перемешивали 30 мин. Далее реакционную смесь медленно выливали в 800 мл дистиллированной воды, при этом выпадал осадок. Раствор с осадком оставляли на ночь, затем сформированный отфильтровывали, хорошо осадок последовательно промывали дистиллированной водой до pH~7, гексаном (100 мл) и диэтиловым эфиром (50 мл), сушили в вакуум-эксикаторе над CaCl<sub>2</sub> (15 мм.рт.ст.). Получали 15.11 г (87%) хроматографически гомогенного продукта в виде белых кристаллов,  $R_f 0.63$  (Б),  $R_f 0.74$  (Г); т.пл. 111-117°С (с разлож.); [а]<sub>D</sub><sup>27</sup> - 14.8° (с 1; MeOH). Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.22-1.36 (м, 16H, 2 -С<sup>ү</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.36 (с. 18H, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 1.48 и 1.59 (два м, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Lys), 2.86 (м, 4H, 2 C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.01 (м, 4H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.65 (д, *J* 6.0 Гц, 2H, 2 СH<sub>2</sub> Gly), 4.14-4.21 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Lys), 5.03 (с, 4H, 2 -OCH<sub>2</sub>- Z), 6.74 (т, *J* 5.2 Гц, 2H, 2 N<sup>ε</sup>H Lys), 7.35 (м, 10H, 2 -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> Z), 7.46 (т, *J* 6.0 Гц, 2H, 2 NH Gly), 7.87 (т, *J* 5.3 Гц, 2H, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-), 7.91 (д. Ј 8.2 Гц, 2Н, 2 NH Lys).

Гексаметилендиамид бис-(глицил- $N^{\varepsilon}$ -трет-бутилоксикарбонил-L-лизина), (H-Gly-L-Lys-(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (61). К раствору 7.00 г (7.8 ммоль) (60) в 190 мл МеОН добавляли 0.80 г 10% Pd/C (50%-ной влажн.) и перемешивали в атмосфере водорода при комнатной температуре. По исходного вещества (TCX контроль) исчезновении катализатор отфильтровывали, промывали 100 мл МеОН. Метанольный раствор упаривали, к остатку приливали 60 мл диэтилового эфира и оставляли на ночь в холодильнике. Эфир декантировали, а остаток сушили в вакууме (15 мм.рт.ст, 40°С ~ 1 ч). Получали 4.79 г (95%) продукта в виде белого аморфного вещества.  $R_f$  (основное пятно) 0.69 (В),  $R_f$  0.21 (И); т.пл. 71-79°C;  $[\alpha]_{D}^{24}$  -10.4° (с 1; MeOH). Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>) δ, м.д.: 1.15-1.36 (м, 16H, 2 -С<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lvs, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.36 (с, 18H, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 1.49 и 1.58 (два м, 4H, 2 С<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Lys), 2.31 (уш.с. 2H, NH<sub>2</sub> Gly), 2.86 (м, 4H, 2 С<sup>®</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.02 (м, 4H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.09 (уш.с. 4H, 2 CH<sub>2</sub> Gly), 4.21 (M, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Lys), 6.74 (τ, *J* 5.0 Γц, 2H, 2 N<sup>ε</sup>H Lys), 7.92 (д, *J* 8.2 Γц, 2H, 2 NH Lys), 7.95 (т, *J* 5.2 Гц, 2H, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-).

Гексаметилендиамид *бис-(N-моносукцинил-глицил-№-трет-бутилокси-карбонил-L-лизина*), (HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-*L*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (62). К раствору 4.26 г (6.2 ммоль) (61) в 60 мл DMF при 0°C и перемешивании одномоментно прибавляли 1.40 г (14 ммоль) янтарного ангидрида. Реакционную смесь перемешивали при охлаждении 30 мин и 12 ч при комнатной температуре. По окончании реакции (ТСХ контроль) DMF упаривали, к остатку приливали 100 мл ацетонитрила, выдерживали в течение 40 мин, затем хорошо сформированный осадок отфильтровывали, промывали ацетонитрилом (2x25 мл) и диэтиловым эфиром (25 мл). Осадок в виде белого порошка сушили в вакуум-эксикаторе над CaCl<sub>2</sub> (15 мм.рт.ст.). Получали 4.40 г (84%), R<sub>f</sub> (основное пятно) 0.71 (И), R<sub>f</sub> 0.64 (Е); т.пл. 131-149°C (с разлож.);  $[\alpha]_D^{24}$  - 10.7° (с 1.05; MeOH). Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.15-1.42 (м, 16H, 2 - С<sup>7</sup>H<sub>2</sub>C<sup>8</sup>H<sub>2</sub>- Lys, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.36 (с, 18H, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 1.48 и 1.61 (два м, 4H, 2 C<sup>6</sup>H<sub>2</sub> Lys), 2.37-2.43 (м, 8H, 2 HOOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2.86 (м, 4H, 2 C<sup>6</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.01 (м, 4H, - NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.70 (д, 4H, 2 CH<sub>2</sub> Gly), 4.10-4.17 (м, 2H, 2 C<sup>a</sup>H Lys), 6.75 (т, *J* 5.4 Гц, 2H, 2NF Lys), 7.79 (т, *J* 5.4 Гц, 2H, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-), 7.85 (д, *J* 8.2 Гц, 2H, 2 NH Lys.), 8.17 (т, *J* 5.7 Гц, 2H, 2 NH Gly), 12.11 (уш.с, 2H, 2 -COOH).

Дитрифторацетат гексаметилендиамида *бис-(N-моносукцинил-глицил-L-лизина)*, 2 CF<sub>3</sub>COOH • (HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-L-Lys-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (63). К суспензии 1.00 г (1.1 ммоль) (62) в 15 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> приливали 5 мл TFA и перемешивали при комнатной температуре, по исчезновению исходного вещества (TCX контроль, ~ 1 ч) реакционную смесь упаривали, ещё подвижный остаток затирали под диэтиловым эфиром с декантацией (3 x 20 мл). Осадок отфильтровывали с помощью насадки для фильтрования гигроскопичных веществ. Получали 0.79 г (90%) продукта в виде белого кристаллического вещества.  $R_f$  (основное пятно) 0.21 (B);  $\tau$ = 9.1 мин (УХ-2); т.пл. 141-151°C (с разлож.);  $[\alpha]_D^{26}$  - 12.0° (с 1.1; MeOH). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ , м.д.: 1.23, 1.38, 1.51 и 1.66 (четыре м, 20H, 2 C<sup>6</sup>H<sub>2</sub>C<sup>7</sup>H<sub>2</sub>C<sup>6</sup>H<sub>2</sub> Lys, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 2.44 (м, 8H, 2 HOOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2.75 (м, 4H, 2 C<sup>6</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.02 (м, 4H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.70 (д, *J* 5.7 Гц, 4H, 2 CH<sub>2</sub> Gly), 4.13-4.19 (м, 2H, 2 C<sup>4</sup>H Lys), 7.71 (уш.с, 6H, 2 N<sup>+</sup>H<sub>3</sub> Lys), 7.80 (т, *J* 5.5 Гц, 2H, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-), 7.87 (д, *J* 8.0 Гц, 2H, 2 NH Lys), 8.20 (т, *J* 5.7 Гц, 2H, 2 NH Gly).

Гексаметилендиамид *бис-(N-моносукцинил-глицил-L-лизина)*, (HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-L-Lys-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (ГТ-107) (64). Навеску 0.8 г (63) растворяли в 5 мл воды и обрабатывали при перемешивании смолой Амберлит IRA-410 до стабилизации значения pH~5. Очистку проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Соответствующие фракции собирали (TCX контроль), упаривали и сушили в вакууме (15 мм.рт.ст.). Продукт лиофилизовывали, затем перекристаллизовывали из смеси EtOAc - EtOH (3:1). Получали 505 мг (75%) конечного продукта (общий выход 42%) в виде белого порошка,  $R_f$  0.14 (B),  $R_f$  0.38 (C);  $\tau$  =6.15 мин (УХ-2); т.пл. 137-139°C; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> - 15.7° (c 1; вода). Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.06-1.85 (м, 12H, 2 - C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys, м, 8H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 2.46 (м, 8H, 2 HOOCC(H<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.84 (м, 4H, 2

C<sup>6</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.05 (м, 4H, -NHC<u>H<sub>2</sub></u>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C<u>H<sub>2</sub></u>NH-), 3.69 (м, 4H, 2 CH<sub>2</sub> Gly), 4.10 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Lys), 7.80 (т, *J* 4.7 Гц, 2H, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 8.34 (д, *J* 7.8 Гц, 2H, 2 NH Lys), 8.64 (т, *J* 6.6 Гц, 2H, 2 NH Gly). Масс-спектр (m/z) найдено 687.4032 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>30</sub>H<sub>54</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>. Вычислено 687.4036.

Гексаметилендиамид *бис-(N<sup>α</sup>-бензилоксикарбонил-глицил-N<sup>ε</sup>-трет-бутилокси*карбонил-*D*-лизина), (Z-Gly-*D*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (65). Получали аналогично *L*-изомеру (60) с выходом 80%. R<sub>f</sub> 0.89 (B), R<sub>f</sub> 0.95 (C); т.пл. 122-125°C;  $[\alpha]_D^{25}$  + 11.0° (с 0.1; EtOH). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.10-1.75 (м, 12H, 2 -C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys; м, 8H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.36 (с, 18H, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 2.84 (м, 4H, 2 C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.00 (м, 4H, -NHC<u>H<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.60 (м, 4H, 2 CH<sub>2</sub> Gly), 4.21 (м, 2H, 2 C<sup>a</sup>H Lys), 5.00 (с, 4H, 2 -OC<u>H<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.14-7.37 (м, 10H, 2 -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.25 (т, *J* 4.7 Гц, 2H, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 7.28 (д, *J* 7.8 Гц, 2H, 2 NH Lys), 7.75 (т, *J* 5.7 Гц, 2H, 2 N<sup>ε</sup>H Lys).</u></u>

Гексаметилендиамид *бис-(N-моносукцинил-глицил-N<sup>e</sup>-mpem*-бутилоксикарбонил-*D*-лизина), (HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-*D*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (66). Получали и очищали аналогично *L*-изомеру (62) с выходом 83%.  $R_f$  0.80 (B),  $R_f$  0.68 (C); т.пл. 138-140°C;  $[\alpha]_D^{25}$  + 10.0° (c 1; EtOH). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.10-1.70 (м, 12H, 2 -C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys, м, 8H, -NHCH<sub>2</sub>(C<u>H<sub>2</sub></u>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.35 (c, 18H, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 2.34 (м, 8H, 2 HOOCC<u>H<sub>2</sub>CH<sub>2</sub></u>), 2.72 (м, 4H, 2 C<sup>e</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.00 (м, 4H, -NHC<u>H<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.60 (м, 4H, 2 CH<sub>2</sub> Gly), 4.15 (м, 2H, 2 C<sup>a</sup>H Lys), 6.71 (т, *J* 4.7 Гц, 2H, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 8.13 (д, *J* 7.8 Гц, 2H, 2 NH Lys), 8.87 (т, *J* 6.6 Гц, 2H, 2 NH Gly), 7.88 (т, *J* 5.7 Гц, 2H, 2 N<sup>e</sup>H Lys).</u>

Гексаметилендиамид *бис-(N-моносукцинил-глицил-D-лизина)*, (HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-Gly-*D*-Lys-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (ГТ-107D) (67). Получали аналогично *L*-изомеру (64) с выходом 80% (общий выход 38%),  $R_f$  0.14 (B),  $R_f$  0.38 (C);  $\tau$  =6.15 мин (УХ-2); т.пл. 137-139°C; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> + 18.0° (с 1; вода). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.10-1.75 (м, 12H, 2 -C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>- Lys, м, 8H, - NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 2.42 (м, 8H, 2 HOOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.75 (м, 4H, 2 C<sup>e</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.00 (м, 4H, - NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.68 (м, 4H, 2 CH<sub>2</sub> Gly), 4.12 (м, 2H, 2 C<sup>α</sup>H Lys), 7.65 (т, *J* 4.7 Гц, 2H, - NHCH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-), 8.30 (д, *J* 7.8 Гц, 2H, 2 NH Lys), 8.57 (т, *J* 6.6 Гц, 2H, 2 NH Gly).
# 4.2.5 Разработка метода синтеза ГСБ-106 4.2.5.1 Синтез ГСБ-106 с использованием Вос/Z-стратегии

Пентафторфениловый эфир *N-трет*-бутилоксикарбонил-*N*<sup>e</sup>-2-хлорбензилоксикарбонил-*L*-лизина, Boc-Lys(Z(Cl))-OPfp (68). К смеси 7.60 г (17 ммоль) Boc-Lys(Z(Cl))-OH и 3.33 г (18 ммоль) пентафторфенола в 80 мл ТГФ при – 5°С при перемешивании прикапывали раствор 3.50 г (17 ммоль) DCC в 20 мл ТГФ. Реакционную массу перемешивали ещё 3 ч при 0°С и оставляли на ночь в холодильнике (+ 8°C). Выпавшую DCU отфильтровывали, фильтрат упаривали, маслообразный остаток кристаллизовали из смеси EtOAc-гексан (1:5). Выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывали гексаном и сушили в вакууме. Выход 8.23 г (15 ммоль) 89%, R<sub>f</sub> 0.13 (H), R<sub>f</sub> 0.42 (C); т.пл. 104–105°С;  $[\alpha]_D^{20} – 25.8°$  (с 0.4; DMF). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1.29 (м, 2H, С<sup>7</sup>H<sub>2</sub> Lys), 1.42 (с, 9H -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 1.55 (м, 2H, C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub> Lys), 1.78 (м, 2H, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Lys), 4.42 (м, 1H, C<sup>α</sup>H Lys), 5.34 (с, 2H, -OC<u>H</u><sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 6.76 (д, 1H, NH Lys), 7.05-7.20 (м, 4H, -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub><u>H</u><sub>4</sub>Cl), 7.39 (т, 1H, N<sup>e</sup>H Lys). Литературные данные [172]: т.пл. 105-106 °C;  $[\alpha]_D^{20} – 17.3°$  (с 1; диоксан).

Пентафторфениловый эфир *N-трет*-бутилоксикарбонил-*O*-бензил-*L*-серина, Вос-Ser(Bzl)-OPfp (69). Получали аналогично (68). Выход 87%,  $R_f$  0.75 (A); т. пл. 38-40°C. Литературные данные [141]: 39-41°C. Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.39 (с, 9H, -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 3.70 (м, 2H, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.39 (м, 1H, C<sup>α</sup>H Ser), 4.50 (с, 2H, C<u>H</u><sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> Bzl), 7.20-7.50 (м, 5H, -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub><u>H</u><sub>5</sub> Bzl), 7.72 (д, *J* 8.0 Гц, 1H, NH Ser).

Активированные эфиры Boc-Ser(Bzl)-OSu (18) и Boc-Lys(Z(Cl))-OSu (19) были получены по описанным ранее методикам, но реакцию вели в EtOAc вместо ТГФ при комнатной температуре в течение 20 ч, выходы составляли ~ 85%.

Гексаметилендиамид бис-(N-трет-бутилоксикарбонил-N<sup>\*</sup>-2-хлорбензилоксикарбонил-L-лизина), (Boc-Lys(Z(Cl))-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (26). К раствору 2.00 г (3.66 ммоль) Вос-Lys(Z(Cl))-OPfp (68) в 20 мл EtOAc добавляли раствор 200 мг (1.72 ммоль) гексаметилендиамина в 5 мл DMF. Реакционную массу перемешивали 1 ч, затем упаривали, остаток растворяли в 100 мл EtOAc и последовательно промывали 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100 мл), 3% К<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100 мл) и водой (100 мл), органическую фракцию высушивали безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упаривали. Полученный кристаллический остаток промывали гексаном и высушивали в вакууме (15 мм.рт.ст.) над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> и парафином. Получали 1.45 г (1.59 ммоль) 92% продукта, R<sub>f</sub> 0.56 (EtOAc); т.пл. 109-114°C; [α]<sup>20</sup><sub>D</sub> – 12.0° (с 0.4; DMF).

Дигидрохлорид гексаметилендиамида *бис-(N<sup>e</sup>-2-хлорбензилокси-карбонил-L-*лизина), 2 HCl • (H-Lys(Z(Cl))-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (41). К раствору 1.42 г (1.71 ммоль) (26) в 10 мл диоксана прибавляли 10 мл 4 М HCl в диоксане. По окончании реакции (ТСХ контроль) раствор упаривали досуха и сушили в вакууме над КОН. Полученную пену (затвердевшее масло) не обрабатывая, запускали в следующую стадию.

Гексаметилендиамид бис-( $N^{\alpha}$ -трет-бутилоксикарбонил-О-бензил-L-серил- $N^{\epsilon}$ -2хлорбензилоксикарбонил-L-лизина), (Boc-Ser(Bzl)-Lys(Z(Cl))-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (28). К раствору 1.27 г (1.32 ммоль) (41) в 10 мл DMF прибавляли 0.46 мл (2.64 ммоль) DIEA и через 20 мин 2.44 г (2.65 ммоль) Boc-Ser(Bzl)-OPfp (69). Реакционную смесь перемешивали 2 ч при комнатной температуре, затем добавляли 0.5 мл (3.55 ммоль) DMAPA и перемешивали 15 мин. Реакционную массу разбавляли 150 мл EtOAc, последовательно промывали водой (100 мл), 3% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100 мл), 2% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100 мл) и снова водой (100 мл). Сушили безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. упаривали, остаток перекристаллизовывали из MeOH и сушили в вакууме над CaCl<sub>2</sub>. Выход 0.75 г (0.59 ммоль, 45%), R<sub>f</sub> 0.45 (A); т.пл. 147-150°C.

Далее синтетическая цепочка (28)  $\rightarrow$ (29)  $\rightarrow$ (30)  $\rightarrow$ (31, ГСБ-106).

### 4.2.5.2 Синтез ГСБ-106 с использованием Z/Boc - стратегии

Гидразид *N*–бензилоксикарбонил-*L*-серина, Z-Ser-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub> (70). К раствору 252 г (1 моль) Z-Ser-OMe в 600 мл MeOH добавляли 120 мл (2.4 моль) гидразингидрата и оставляли на ночь (кристаллизуется) при комнатной температуре. После выдерживания в морозильнике, выпавший осадок отфильтровывали и промывали холодным MeOH. Выход 216 г (0.86 моль) 86%, т.пл. 151-153°C. Литературные данные [172]: т.пл. 153-154°C.

# Гексаметилендиамид *бис-(N-*бензилоксикарбонил-*L*-серил-*N<sup>e</sup>-трет*-бутилоксикарбонил-*L*-лизина), (Z-Ser-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (13).

А) Раствор 3.80 г (4,52 ммоль) (11) в 50 мл МеОН подвергали гидрогенолизу в присутствии 10% Pd/C (1.90 г), затем упаривали, добавляли 30 мл DMF и упаривали до объема 20 мл при нагревании не выше 50°C.

Б) *Получение Z-Ser-N*<sub>3</sub>. К раствору 3.30 г (13 ммоль) Z-Ser-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub> (70) в 15 мл DMF при – 30°С, добавляли 9 мл (39 ммоль) 4 М HCl в диоксане и 1.5 мл (13.27 ммоль) н-бутилнитрита (BuONO), через 5 мин добавляли при – 20°С 5.4 мл (39 ммоль) ТЕА.

В) Далее к 20 мл раствора (H-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (12) в DMF добавляли 0.6 мл (5.37 ммоль) NMM и свежеприготовленный Z-Ser-N<sub>3</sub>, реакционную смесь оставляли на ночь (TCX контроль), затем добавляли 250 мл EtOAc и 150 мл воды. Органический слой отделяли и промывали 3% HCl (200 мл), водой (200 мл), 3% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (200 мл), и снова водой (100 мл). Раствор охлаждали до 0°C, выпавший осадок отфильтровывали, на фильтре промывали холодной водой и холодным EtOAc. Выход 3.10 г (3.05 ммоль) 67%,  $R_f$  0.20 (A),  $R_f$  0.90 (K); т.пл. 129-132°C.

Далее синтетическая цепочка (13)  $\rightarrow$ (14)  $\rightarrow$ (71)  $\rightarrow$ (72)  $\rightarrow$ (31, ГСБ-106).

Гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-серил-N<sup>e</sup>-mpem-бутилоксикарбонил-*L*-лизина), (HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-*L*-Ser-*L*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (71). В одногорлую круглодонную колбу ёмкостью 500 мл, загружали 33.87 г (45.3 ммоль) (H-L-Ser-L-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (14) и 130 мл DMF, перемешивали на магнитной мешалке при комнатной температуре до полного растворения. Далее при охлаждении на бане с холодной водой (10°C, охлаждение необходимо для снятия разогрева при добавлении янтарного ангидрида) присыпали 10.08 г 99%-ного (9.985 г 100%-ного, 0.099 моль) янтарного ангидрида. Через 10 мин баню убирали и перемешивали при комнатной температуре 8-12 ч. По окончании (ТСХ контроль), реакционную массу упаривали до 1/3 объёма. Остаток выливали в 1 л дистиллированной воды комнатной выдерживали ночь. Выпавший осадок отфильтровывали, температуры, промывали дистиллированной водой (2×100 мл), гексаном (2×50 мл) и диэтиловым эфиром (2×30 мл). Продукт высушивали в вакууме над CaCl<sub>2</sub>, получали 40.79 г (95%) хроматографически гомогенного продукта в виде белого кристаллического вещества, R<sub>f</sub> 0.57 (K), R<sub>f</sub> 0.79 (И); т. пл.112-113°С; [а] <sub>D</sub><sup>25</sup> - 19.22° (с 1; МеОН). Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), б, м.д.: 1.10-1.75 (м, 12Н, 2  $-C^{\beta}H_2C^{\gamma}H_2C^{\delta}H_2$  Lys; M, 8H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.35 (c, 18H, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc), 2.41 (M, 8H, 2 HOOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.86 (м, 4H, 2 С<sup>ε</sup>H<sub>2</sub>, Lys), 2.99 (м, 4H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.50 и 3.61 (два м, 4H, 2  $C^{\beta}H_{2}$ , Ser), 4.10 (м, 2H, 2  $C^{\alpha}H$ , Lys), 4.25 (м, 2H, 2  $C^{\alpha}H$  Ser), 6.72 (т, J 5.7 Гц, 2H, 2 N<sup>6</sup>H Lys), 7.64 (т, *J* 4.8 Гц, 2H, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 7.86 (д, *J* 7.8 Гц, 2H, 2 NH Lys), 8.05 (д, *J* 7.1 Гц, 2H, 2 NH Ser).

Дитрифторацетат гексаметилендиамида бис-(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина), 2 СF<sub>3</sub>COOH • (HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-*L*-Ser-*L*-Lys-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (72). В одногорлую круглодонную колбу ёмкостью 150 мл, загружали 5.0 г (4.4 ммоль) (71) и приливали 45 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. К образовавшейся суспензии при комнатной температуре приливали при перемешивании 15 мл TFA. Через 2 мин реакционная масса из суспензии переходила в прозрачный раствор, затем через 15-20 мин становилась мутной. Через 1.5 ч реакционную массу упаривали, переупаривали с CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2x20 мл), остаток дважды затирали под диэтиловым эфиром с декантацией (2x20 мл). Осадок отфильтровывали и высушивали в вакууме над CaCl<sub>2</sub>. Получали 4.63 г (90%) продукта в виде белого кристаллического вещества (не имеет четкой температуры плавления, очень гигроскопично),  $R_f$  0.41 (EtOAc),  $R_f$  0.20 (K);  $[\alpha]_D^{22} - 25.58^\circ$  (c 1; MeOH),  $[\alpha]_D^{32} - 46.23^\circ$  (с 1.1; вода). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 1.24 (м, 4H, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH-), 1.32 (м, 4H, 2 C<sup>7</sup>H<sub>2</sub> Lys), 1.39 (м, 4H, -NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.50 (м, 4H, 2 C<sup>6</sup>H<sub>2</sub> Lys), 3.02 (м, 4H, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.52 и 3.63 (два м, 4H, 2 C<sup>6</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4.13 (м, 2H, 2 C<sup>a</sup>H Lys), 4.27 (м, 2H, 2 C<sup>a</sup>H Ser), 7.69 (т, *J* 4.8 Гц, 2H, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-), 7.74 (уш.с, 6H, 2 N<sup>+</sup>H<sub>3</sub> Lys), 7.98 (д, *J* 7.8 Гц, 2H, 2 NH Lys), 8.12 (д, *J* 7.1 Гц, 2H, 2 NH Ser).

Гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина), (HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-L-Ser-L-Lys-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (ГСБ-106) (31). В стакане емкостью 2 л растворяли 50.0 г (0.0472 моль) (72) в 1.5 л дистиллированной воды, затем при перемешивании обрабатывали анионнообменной смолой IRA-400 в OH-форме до pH ~ 3. Смолу отфильтровывали и промывали на фильтре 1 л дистиллированной воды, промывные воды объединяли с фильтратом. Фильтрат наносили на колонку емкостью 0.5 л, заполненную 0.5 л катионообменной смолы СПС-Bio-SP в пиридиниевой форме. Промывали колонку 0.5 л дистиллированной воды (ТСХ контроль для проверки полноты нанесения вещества на смолу). Затем через колонку со смолой пропускали градиент 0 – 0.4 М пиридин-ацетатного буферного раствора. Собирали фракции по 150 мл, каждую фракцию проверяли по ТСХ на наличие пептида ГСБ-106 и возможных примесей. Фракции, содержащие целевое соединение объединяли и упаривали в вакууме (15 мм.рт.ст.) при температуре не выше 60°С. Получали твердый остаток – сырой продукт массой около 40 г, который затем помещали в одногорлую круглодонную колбу емкостью 1 л и растворяли субстанцию в 120 мл дистиллированной воды. Затем колбу замораживали и присоединяли к лиофильной сушилке Free Zone Labconco, вакуумировали в течение 24 ч. Получали 32.5 г ГСБ-106 (85%, общий выход 62%) в виде лиофилизата. Кристаллизовали ГСБ-106 растиранием лиофилизата под EtOH. R<sub>f</sub> 0.52 (B2), R<sub>f</sub> 0.22 (B), R<sub>f</sub> 0.69 (P), R<sub>f</sub> 0.51 (Л), R<sub>f</sub> 0.17 (Ж);  $[\alpha]_D^{22} - 46.1^\circ$ (с 1; вода).

Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>), б, м.д.: 1.21 (м, 4H, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH-), 1.38 (м, 8H, 2 С<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> Lys, -NHCH<sub>2</sub>C<u>H<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 1.46-1.83 (два м, 8H, 2 С<sup>δ</sup>H<sub>2</sub> Lys, 2 С<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Lys), 1.87 (с, 6H, CH<sub>3</sub>CO-), 2.01-2.30 (уш. т., 4H, 2 HOOCCH<sub>2</sub>C<u>H<sub>2</sub></u>CO-), 2.36-2.50 (уш. т., 4H, 2</u>

HOOCC<u>H</u><sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-), 2.76 (M, 4H, 2 C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub>Lys), 2.87-3.15 (M, 4H, -NHC<u>H</u><sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C<u>H</u><sub>2</sub>NH-), 3.40-3.79 (M, 4H, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 3.91-4.08 (4H, M, 2 C<sup>α</sup>H Lys, 2 C<sup>α</sup>H Ser), 7.50 (T, *J* 4.8 Γц, 2H, -N<u>H</u>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<u>H</u>-), 8.26-8.47 (M, 4H, 2 NH Lys, 2 NH Ser).

Спектр <sup>13</sup>С-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 22.16 (с, 2С, <u>C</u>H<sub>3</sub>CO-), 22.26 (с, 2С, С<sup> $\gamma$ </sup> Lys), 26.42 (с, 2С, C<sup>3</sup> спейсера), 26.62 (с, 2С, C<sup> $\delta$ </sup> Lys), 29.12 (с, 2С, C<sup>2</sup> спейсера), 29.86 (с, 2С, C<sup> $\beta$ </sup> Lys), 32.51 и 33.34 (два с, 2С, HOOC<u>C</u>H<sub>2</sub><u>C</u>H<sub>2</sub>CO-), 37.71 (с, 2С, C<sup> $\epsilon$ </sup> Lys), 38.99 (с, 2С, C<sup>1</sup> спейсера), 54.29 (с, 2С, C<sup> $\alpha$ </sup> Lys), 57.44 (с, 2С, C<sup> $\alpha$ </sup> Ser), 61.25 (с, 2С, C<sup> $\beta$ </sup> Ser), 170.98 (с, 2С, CO- Ser), 172.04 (с, 2С, CO- Lys), 173.02 (с, 2С, CH<sub>3</sub><u>C</u>O-), 175.34 (с, 2С, HOO<u>C</u>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-), 177.23 (с, 2С, HOOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-).

### 4.3 Разработка фармакопейной статьи предприятия на ФС ГСБ-106

Анализ проведен на трех образцах субстанции ГСБ-106, синтезированных по разработанному лабораторному регламенту получения ФС ГСБ-106.

ИК-спектры получены на ИК-спектрофотометре Vertex 70 («Вruker», Германия) в таблетках КВг (1 мг ГСБ-106 на 200 мг КВг).

#### 4.3.1 Определение посторонних примесей в ФС ГСБ-106 методом ТСХ

В качестве свидетелей использовали исходные и вспомогательные соединения, а также промежуточные продукты синтеза: DCU, *N*-гидроксисукцинимид, DMAPA, пентафторфенол, гексаметилендиамин, Z-L-SerOH (8), Z-L-SerOPfp (9), (Z-L-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (11), (H-L-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (12), (Z-L-Ser-L-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (13), (H-L-Ser-L-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (14), (HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-L-Ser-L-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (31). Хроматографирование в тонких слоях сорбента проведено на стеклянных пластинах Kieselgel 60  $F_{254}$ , Merck.

### 4.3.2 Определение посторонних примесей в ФС ГСБ-106 методом ОФ ВЭЖХ

Для определения посторонних примесей в образцах субстанции ГСБ-106 готовили растворы в подвижной фазе A с концентрацией 1 мг/мл. Содержание посторонних примесей определяли методом внешнего стандарта (концентрация раствора рабочего стандартного образца (РСО) - 0.005 мг/мл).

Проведение анализа: 0.010 г (точная навеска) образца субстанции помещали в мерную колбу вместимостью 10.0 мл, растворяли в достаточном объеме подвижной фазы А, доводили объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивали (испытуемый раствор).

0.005 г (точная навеска) РСО ГСБ-106 помещали в мерную колбу вместимостью 100.0 мл, растворяли в достаточном объеме подвижной фазы А, доводили объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивали (раствор 1). 1 мл полученного раствора 1 помещали в колбу

вместимостью 10.0 мл, добавляли достаточное количество подвижной фазы А, перемешивали и доводили тем же растворителем до метки (раствор 2).

По 20 мкл испытуемого раствора и раствора 2 хроматографировали. Хроматографирование испытуемого раствора проводили не менее 5 раз.

Содержание индивидуальной примеси в процентах оценивали по методу внешнего стандарта относительно площади пика РСО.

Пригодность хроматографической системы проверялась путем определения фактора ассиметрии пика ГСБ-106, эффективности хроматографической колонки и разрешению пиков ГСБ-106 и примеси с ближайшим временем удерживания. Эффективность хроматографической колонки оценивали по числу теоретических тарелок для пика ГСБ-106.

### 4.3.3 Определение остаточных органических растворителей в ФС ГСБ-106

Определение содержания воды в образцах субстанции ГСБ-106 проводили методом К. Фишера (ОФС.1.2.3.0002.15, ГФ XIII).

Содержание остаточных органических растворителей в субстанции было определено методом ГЖХ. Исходя из технологии синтеза ГСБ-106 в образцах субстанции в качестве остаточных растворителей могут содержаться AcOH и пиридин.

Определение остаточных органических растворителей проводили на газовом хроматографе Agilent 7890B с масс-селективным детектором Agilent 7000 с одноквадрупольным детектором и парофазным пробоотборником PAL3 («Agilent Technologies», США).

Анализ проводили в следующих условиях: кварцевая капиллярная колонка HP-FFAP («Agilent Technologies», США) длиной 30 м, внутренним диаметром 0.25 мм, толщиной фазы 0.25 мкм, газ-носитель – гелий, скорость потока газа-носителя через колонку 1.2 мл/мин. Температура испарителя поддерживалась 140°С. Режим программирования температуры термостата колонки:  $60^{\circ}$ C – 2 мин, от  $60^{\circ}$ C до  $210^{\circ}$ C нагревали со скоростью  $20^{\circ}$ C/мин и выдерживали 2 мин при конечной температуре. Общее время анализа – 14.5 мин. Ввод пробы осуществляли в режиме с делением потока (split) 1:5. Объем вводимой парогазовой фазы составлял 500 мкл. Температура равновесия составляла 80°С, время установления равновесия – 6 мин, температура проточной линии 85°С, время нагнетания – 5 с. Температура квадруполя 150°С, температура источника ионов 230°С. Использовалась ионизация электронным ударом при 70 эВ в режиме сканирования полного ионного потока (SCAN) в диапазоне от 10 до 1000 m/z.

Эталонные стандартные растворы остаточных растворителей:

- Класса 2: пиридин – 1 мг/мл в DMSO,

- Класса 3: АсОН – 25 мг/мл в воде

Приготовление исходного стандартного раствора смеси остаточных растворителей: 100 мкл каждого эталонного стандартного раствора переносили в пустой флакон объемом 10 мл, доводили объем до 10 мл водой, закрывали и перемешивали.

Приготовление рабочих стандартных растворов смеси остаточных растворителей: 1 мл исходного стандартного раствора смеси остаточных растворителей переносили в пустой флакон объемом 20 мл и добавляли 5 мл воды, герметично укупоривали, перемешивали и хроматографировали.

Приготовление испытуемого раствора: 50 мг субстанции анализируемого образца переносили в пустой флакон объемом 20 мл, доводили объем до 6 мл водой, герметично укупоривали, перемешивали и хроматографировали.

Вычисление содержания пиридина и AcOH в образцах проводили из соотношения площади соответствующего пика в испытуемом растворе к площади пика в рабочих стандартных растворах.

#### 4.3.4 Количественное определение содержания ГСБ-106 в ФС

Количественное определение субстанции ГСБ-106 проведено методом определения общего азота по Къельдалю. Минерализацию проб проводили на аппарате DK 6 (VELPscientifica, Италия) с вакуумным насосом JP и скруббером SMS (VELPscientifica, Италия). Перегонку с водяным паром проводили на приборе UDK 139 (VELPscientifica, Италия).

При расчете количественного содержания ГСБ-106 в образцах субстанции учитывали содержание воды и остаточных растворителей (AcOH).

## 4.4 Изучение фармакологической активности миметиков BDNF 4.4.1 Изучение нейропротекторной активности *in vitro*

*Нейропротекторная активность* миметиков BDNF изучалась согласно [98] на культуре иммортализованных клеток гиппокампа мыши линии HT-22. Клетки рассеивали в 96-луночные планшеты с плотностью 3500 клеток на лунку в среде DMEM (HyClon, CША), содержащей 5% телячьей эмбриональной сыворотки (Gibco, CША) и 2 мМ *L*-глутамина (ICN, CША), и инкубировали при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> до образования монослоя. Пептиды вносили в культуральную среду за 24 ч до повреждающего воздействия в диапазоне конечных концентраций от  $10^{-5}$  до  $10^{-8}$  М (до  $10^{-10}$  М для ГСБ-106). В качестве положительного контроля использовали BDNF в концентрации 50 нг/мл. Для моделирования окислительного стресса использовали H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 30 мин [205]. Далее среду заменяли на нормальную и через 4 ч определяли жизнеспособность клеток с помощью MTT-теста, используя бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-

ил)-2,5 дифенилтетразолия (МТТ) (Sigma, США). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре "MultiscanEX" (Thermo, США) при длине волны 600 нм.

Статистический анализ экспериментов *in vitro* проводили с помощью стандартного пакета программ «Statistica 6.0» (Statsoft, Inc., США). Результаты МТТ-теста анализировали с помощью критерия Краскела-Уоллиса с последующим тестом по Данну (One way ANOVA). Различия считали статистически значимыми при  $p \le 0.05$ . Данные представляли в форме средних и стандартных ошибок среднего.

#### 4.4.2 Изучение антидепрессивной активности in vivo

Изучение антидепрессивной активности пептидов проводилось в тесте вынужденного плавания по Порсолту [173]. Этот тест является хорошо валидированным и наиболее часто используемым для выявления соединений с антидепрессивной активностью. В эксперименте использовались мыши-самцы линии Balb/с весом 18-22 г. Животных содержали в условиях вивария при естественной смене светового режима со свободным доступом к стандартному гранулированному корму и воде. В каждой группе было по 10 мышей. В первый день животных помещали в узкую емкость с водой, температурой 22°С, на 10 мин. Через 60 мин животным вводили в/б пептид растворенный в дистиллированной воде, в дозах 0.1, 0.5, 1 и 5 мг/кг (из расчета 5 мл/кг). Группе «Контроль» вводили в/б дистиллированную воду в эквивалентном объеме. Через 22 ч животных повторно сажали в те же условия и на протяжении 5-минутного тестового периода регистрировали время сохранения животным характерной позы иммобильности (отказ от активно-оборонительного и исследовательского поведения). В качестве положительного контроля использовали классический антидепрессант Амитриптилин (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия), который вводили за 1 ч до тестовой посадки в дозе 10 мг/кг, в/б [81].

Статистический анализ. В экспериментах *in vivo* межгрупповые различия оценивали с помощью t-критерия Стьюдента и U-теста Манна-Уитни (при сравнении более 2 групп использовали поправку Бонферрони). Различия считали статистически значимыми при р ≤ 0.05. Данные представляли в виде медиан и квартилей.

### 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

#### 5.1 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 С-концевой амидной группы или С-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 Lсерин), 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.

### 5.2 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.

### 6. 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.
- Показано, что димерные миметики, подобно полноразмерному белку BDNF, обладают нейропротекторной активностью *in vitro* в условиях окислительного стресса в концентрациях 10<sup>-5</sup>-10<sup>-9</sup> М. Мономерные миметики в этих условиях неактивны или обладают обратным, нейродегенеративным эффектом.
- 3. Найдено, что в ряду синтезированных дипептидных миметиков BDNF с нейропротекторной димерный 4-й активностью только миметик петли *бис-(N-*моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина) (ГСБ-106) гексаметилендиамид 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.
- 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.

### 7. 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-106дипептидного 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 [Teкст] / 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.

 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.

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).

 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. Tallerova, 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

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 С07К 5/062, А61К 38/05, А61Р 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 А61К 38/05, А61Р 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.

### 8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беккер Х. Органикум. Практикум по органической химии т. 1, 2 / Х. Беккер, Р. Беккерт, В. Бергер, К. Гевальд, Ф. Генц, Р. Глух, Г. Домшке, Э. Затер, Р. Майер, П. Мец, К. Мюллер, Д. Пафель, Э. Фангхэнель, Ю. Фауст, М. Фишер, В. Хабихер, К. Шветлик, Г. Шмидт, К. Шольберг, Г. Цеппенфельд // М.: «Мир», 2008.
- Гудашева Т.А. Синтез, конформационный анализ и анксиолитическая активность ретропептидных аналогов холецистокинина-4 / Т.А. Гудашева, В.П. Лезина, Е.П. Кирьянова, В.С. Троицкая, Л.Г. Колик, С.С. Середенин // Химико-фармацевтический журнал. – 2006. – Т.40, №7. – С. 21-26.
- Гудашева Т.А. Новые низкомолекулярные миметики фактора роста нервов / Т.А. Гудашева, Т.А. Антипова, С.Б. Середенин // Доклады академии наук. – 2010. – Т. 434, №4. – С. 549-552.
- Гудашева Т.А. Дизайн и синтез дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора / Т.А. Гудашева, А.В. Тарасюк, С.В. Помогайбо, И.О. Логвинов, П.Ю. Поварнина, Т.А. Антипова, С.Б. Середенин // Биоорганическая Химия. – 2012. – Т. 38, № 3. – С. 280-290.
- Гудашева Т.А. Дипептидный миметик 4-й петли мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 активирует TrkB, Erk, Akt и способствует выживаемости нейронов in vitro / Т.А. Гудашева, И.О. Логвинов, Т.А. Антипова, С.Б. Середенин // Доклады Академии наук. – 2013. – Т. 451, №5. – С. 1-4.
- Гудашева Т.А. Дипептидные миметики отдельных петель NGF и BDNF активируют PLC-g1
   / Т.А. Гудашева, И.О. Логвинов, С.В. Николаев, Т.А. Антипова, П.Ю. Поварнина, С.Б. Середенин // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2020. Т. 494, № 1. С. 486-490.
- Ждан Н.С. Синтетические рибонуклеазы. 1. Синтез и свойства конъюгатов, содержащих РНК-связывающий фрагмент на основе остатков лизина и РНК-гидролизующий фрагмент, несущий остаток имидазола / Н.С. Ждан, И.Л. Кузнецова, А.В. Власов, В.Н. Силъников, М.А. Зенкова, В.В. Власов // Биоорганическая Химия. – 1998. – Т. 25, № 10. – С. 723-732.
- Позднев В.Ф. Применение ди-трет-бутилпирокарбоната для получения N-третбутилоксикарбонильных производных аминокислот / В.Ф. Позднев // Химия природных соединений. – 1974. – Т. 10, № 6. – С. 764-767.
- Середенин С.Б. Экспериментальная оценка терапевтического окна нейропротективной активности препарата ГК-2, низкомолекулярного миметика фактора роста нервов / С.Б. Середенин, П.Ю. Поварнина, Т.А. Гудашева // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2018. Т. 118, № 7. С. 49-53.

- Тарасюк А.В. Синтез и нейропротекторная активность *in vitro* аналогов димерного дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 с разной длиной спейсера / А.В. Тарасюк, Н.М. Сазонова, Д.В. Курилов, А.А. Лубин, Т.А. Антипова, Т.А. Гудашева // Химико-фармацевтический журнал. 2019. Т. 53, № 6. С. 3-10.
- Титце Л. Препаративная органическая химия. Реакции и синтезы в практикуме органической химии и научно-исследовательской лаборатории / Л. Титце, Т. Айхер // М.: «Мир», 1999.
- (Not author) A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: The BDNF Study Group (Phase III). // Neurology. – 1999. – Vol. 52. - № 7. – P. 1427-1433.
- Ahmed F. Dimerization of the Trk receptors in the plasma membrane: effects of their cognate ligands / F. Ahmed, K. Hristova // Biochem J. – 2018. – Vol. 475. - № 22. – P. 3669-3685.
- Albaugh P. Discovery of GNF-5837, a Selective TRK Inhibitor with Efficacy in Rodent Cancer Tumor Models / P. Albaugh, Y. Fan, Y. Mi, F. Sun, F. Adrian, N. Li, Y. Jia, Y. Sarkisova, A. Kreusch, T. Hood, M. Lu, G. Liu, S. Huang, Z. Liu, J. Loren, T.Tuntland, D.S. Karanewsky, H.M. Seidel, V. Molteni // ACS Med Chem Lett. – 2012. – Vol. 3. - № 2. – P. 140-145.
- Ali Shariati M. Small Molecule TrkB Neurotrophin Receptor Partial Agonist as Possible Treatment for Experimental Nonarteritic Anterior Ischemic Optic Neuropathy / M. Ali Shariati, V.Kumar, T. Yang, C. Chakraborty, B.A. Barres, F.M. Longo, Y.J. Liao // Curr Eye Res. – 2018. – Vol. 43. – № 12. – P. 1489-1499.
- Alonso M. BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation / M. Alonso, M.R. Vianna, A.M. Depino, T. Mello e Souza, P. Pereira, G. Szapiro, H. Viola, F. Pitossi, I. Izquierdo, J.H. Medina // Hippocampus. 2002. Vol. 12. № 4. P. 551-560.
- Altman J. The development of the rat spinal cord / J. Altman, S.A. Bayer // Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology. – 1984. – Vol. 85. – P. 1–164.
- Anderson G.W. The Use of Esters of N-Hydroxysuccinimide in Peptide Synthesis / G.W. Anderson, J.E. Zimmerman // Journal of the American Chemical Society. – 1964. – Vol.86, №. 9. – P.1839-1842.
- Arancibia S. Protective effect of BDNF against beta-amyloid induced neurotoxicity in vitro and in vivo in rats / S. Arancibia, M. Silhol, F. Moulière, J. Meffre, I. Höllinger, T. Maurice, L. Tapia-Arancibia // Neurobiol Dis. 2008. Vol. 31. № 3. P. 316-326.
- Arregui L. Adenoviral astrocyte-specific expression of BDNF in the striata of mice transgenic for Huntington's disease delays the onset of the motor phenotype / L. Arregui, J.A. Benítez, L.F. Razgado, P. Vergara, J. Segovia // Cell Mol Neurobiol. – 2011. – Vol. 31. – № 8. – P. 1229-1243.

- Aurikko J.P. Characterization of symmetric complexes of nerve growth factor and the ectodomain of the pan-neurotrophin receptor, p75NTR / J.P. Aurikko, B.T. Ruotolo, J.G. Grossmann, M.C. Moncrieffe, E. Stephens, V.M. Leppänen, C.V. Robinson, M. Saarma, R.A. Bradshaw, T.L. Blundell // J Biol Chem. 2005. Vol. 280. № 39. P. 33453-33460.
- 22. Autry A.E. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders / A.E. Autry, L.M. Monteggia // Pharmacol Rev. 2012. Vol. 64. № 2. P. 238-258.
- 23. Banfield M.J. Specificity in Trk receptor:neurotrophin interactions: the crystal structure of TrkB-d5 in complex with neurotrophin-4/5 / M.J. Banfield, R.L. Naylor, A.G. Robertson, S.J. Allen, D. Dawbarn, R.L. Brady // Structure. 2001. Vol. 9. № 12. P. 1191-1199.
- 24. Barde Y.A. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain / Y.A. Barde, D. Edgar, H. Thoenen // EMBO J. 1982. Vol. 1. № 5. P. 549-553.
- 25. Barde Y.A. Trophic factors and neuronal survival // Neuron. 1989. V. 6. P. 1525-1534.
- 26. Barrett G.L. The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. // Prog Neurobiol. 2000. –
  Vol. 61. № 2. P. 205-229.
- 27. Bath K.G. Variant BDNF (Val66Met) impact on brain structure and function / K.G. Bath, F.S. Lee
  // Cogn. Affect Behav. Neurosci. 2006. Vol. 6. № 1. P. 79–85.
- Bath K.G. BDNF control of adult SVZ neurogenesis / K.G. Bath, M.R. Akins, F.S. Lee // Dev Psychobiol. – 2012. – Vol. 54. – № 6. – P. 578-589.
- Bayer S. Development of the telencephalon: neural stem cells, neurogenesis and neuronal migration in The Rat Nervous System / S. Bayer, J. Altman // In: G. Paxinos, Ed., Elsevier, Waltham, Mass, USA. 2004. – P.27–73.
- Bergmann M. Über ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese // M. Bergmann, L. Zervas // Berichte. – 1932. – V.65. – P.1192-1201.
- Bertrand T. The crystal structures of TrkA and TrkB suggest key regions for achieving selective inhibition / T. Bertrand, M. Kothe, J. Liu, A. Dupuy, A. Rak, P.F. Berne, S. Davis, T. Gladysheva, C. Valtre, J.Y. Crenne, M. Mathieu // J Mol Biol. 2012. Vol. 423. № 3. P. 439-453.
- 32. Bertrand T. Crystal Structures of Neurotrophin Receptors Kinase Domain // Vitam Horm. 2017.
   Vol. 104. P. 1-18.
- 33. Bibel M. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR/ M. Bibel, E. Hoppe, Y.A. Barde // EMBO J. – 1999. – Vol. 18. – № 3. – P. 616-22.
- 34. Binder D.K. Brain-derived neurotrophic factor / D.K. Binder, H.E. Scharfman // Growth Factors.
   2004. P. 22. № 3. P. 123-131.
- Black I.B. Regulation of autonomic development // Annu. Rev. Neurosci. 1978. –Vol. 1. P. 183-214.

- 36. Boldrini M. Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressanttreated and untreated major depression / M. Boldrini, A.N. Santiago, R. Hen, A.J. Dwork, G.B. Rosoklija, H. Tamir, V. Arango, J. John Mann // Neuropsychopharmacol. – 2013. – Vol. 38. - № 6. – P. 1068-1077.
- 37. Butte M.J. Crystal structure of neurotrophin-3 homodimer shows distinct regions are used to bind its receptors / M.J. Butte, P.K. Hwang, W.C. Mobley, R.J. Fletterick // Biochemistry. 1998. Vol. 37. № 48. P. 16846-16852.
- 38. Caldeira M.V. BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons / M.V. Caldeira, C.V. Melo, D.B. Pereira, R.F. Carvalho, A.L. Carvalho, C.B. Duarte // Molecular and Cellular Neuroscience. 2007. Vol. 35. № 2. P. 208–219.
- Campenot R.B. Local control of neurite development by nerve growth factor // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. -1977. - Vol. 74. - № 10. - P. 4516-4519.
- 40. Cardenas-Aguayo Mdel C. Neurogenic and neurotrophic effects of BDNF peptides in mouse hippocampal primary neuronal cell cultures / C. Cardenas-Aguayo Mdel, S.F. Kazim, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal // PLoS One. – 2013. – Vol. 8. - № 1. – e53596.
- 41. Casaccia-Bonnefil P. P75 neurotrophin receptor as a modulator of survival and death decisions / P. Casaccia-Bonnefil, C. Gu, G. Khursigara, M.V. Chao // Microsc Res Tech. 1999. Vol. 45. № 4-5. P. 217-224.
- 42. Castren E. Neurotrophic effects of antidepressant drugs // Curr. Opin. Pharmacol. 2004. Vol.
  4. P. 58 –64.
- Chakrapani S. Neuroplasticity and the Biological Role of Brain Derived Neurotrophic Factor in the Pathophysiology and Management of Depression / S. Chakrapani, N. Eskander, L.A. De Los Santos, B.A. Omisore, J.A. Mostafa //. Cureus. – 2020. – Vol. 12. – № 11. – e11396.
- 44. Chao M.V. Neurotrophin signalling in health and disease / M.V. Chao, R. Rajagopal, F.S. Lee // Clin Sci. - 2006. - Vol. 110. - P. 167-173.
- 45. Chen C. 7,8-Dihydroxyflavone Ameliorates Scopolamine-Induced Alzheimer-Like Pathologic Dysfunction / C. Chen, X-H. Li, S. Zhang, Y. Tu, Y-M. Wang, H-T. Sun // Rejuvenation Res. 2014. Vol. 17. № 3. P. 249–254.
- 46. Chen J.G. [Effects of deoxygedunin on Alzheimer-like pathologic dysfunction induced by D-galactose combined with AlCl<sub>3</sub>] / J.G. Chen, Q.C. Jiang, B. Wen, R.Y. Wang, Y.G. Wu, X. Li // Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi. 2018. Vol. 34. № 6. P. 496-500.
- 47. Chiaramello S. BDNF/ TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways / S. Chiaramello, G. Dalmasso, L. Bezin, D. Marcel, F. Jourdan, P. Peretto, A. Fasolo, S. De Marchis // Eur J Neurosci. 2007. Vol. 26. № 7. P. 1780-1790.

- Choi H.S. (R)-2-Phenylpyrrolidine Substituted Imidazopyridazines: A New Class of Potent and Selective Pan-TRK Inhibitors / H.S. Choi, P.V. Rucker, Z. Wang, Y. Fan, P. Albaugh, G. Chopiuk, F. Gessier, F. Sun, F. Adrian, G. Liu, T. Hood, N. Li, Y. Jia, J. Che, S. McCormack, A. Li, J. Li, A. Steffy, A. Culazzo, C. Tompkins, V. Phung, A. Kreusch, M. Lu, B. Hu, A. Chaudhary, M. Prashad, T. Tuntland, B. Liu, J. Harris, H.M. Seidel, J. Loren, V. Molteni // ACS Med Chem Lett. – 2015. – Vol. 6. - № 5. – P. 562-567.
- 49. Cirulli A. Intrahippocampal administration of BDNF in adult rats affects short-term behavioral plasticity in the Morris water maze and performance in the elevated plus-maze / A. Cirulli, A. Berry, F. Chiarotti, E. Alleva // Hippocampus. 2004. Vol. 14. № 7. P. 802-807.
- Cobb J.A. Hippocampal volume and total cell numbers in major depressive disorder / J.A. Cobb,
   J. Simpson, G.J. Mahajan, J.C. Overholser, G.J. Jurjus, L. Dieter, N. Herbst, W. May, G. Rajkowska, C.A. Stockmeier // J Psychiatr Res. 2013. Vol. 47. № 3. P. 299-306.
- Colucci-D'Amato L. Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer / L. Colucci-D'Amato, L. Speranza, F. Volpicelli // Int J Mol Sci. – 2020. – Vol. 21. - № 20. – P. 7777.
- 52. Dechant G. Expression and binding characteristics of the BDNF receptor chick trkB / G. Dechant,
  S. Biffo, H. Okazawa, R. Kolbeck, J. Pottgiesser, Y.A. Barde // Development. 1993. Vol. 119.
   № 2. P. 545-558.
- 53. Dincheva I. The Role of BDNF in the Development of Fear Learning / I. Dincheva, N.B. Lynch,
  F.S. Lee // Depress Anxiety. 2016. Vol. 33. № 10. P. 907-916.
- Dmitrzak-Weglarz M. BDNF Met66 allele is associated with anorexia nervosa in the Polish population. / M. Dmitrzak-Weglarz, M. Skibinska, A. Slopien, A. Szczepankiewicz, F. Rybakowski, L. Kramer, J. Hauser, A. Rajewski // Psychiatr. Genet. – 2007. – Vol. 17. – P. 245– 246.
- 55. Duman R.S. Role of BDNF in the pathophysiology and treatment of depression: Activitydependent effects distinguish rapid-acting antidepressants / R.S. Duman, S. Deyama, M.V. Fogaça // Eur J Neurosci. – 2021. – Vol. 53. – № 1. – P. 126-139.
- Dwivedi Y. Involvement of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Late-Life Depression. // Am. J. Geriatr. Psychiatry. 2013. Vol. 21. № 5. P. 433–449.
- 57. Egan M.F. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function / M.F. Egan, M. Kojima, J.H. Callicott, T.E. Goldberg, B.S. Kolachana, A. Bertolino, E. Zaitsev, B. Gold, D. Goldman, M. Dean, B. Lu, D.R. Weinberger // Cell. 2003. Vol. 112. № 2. P. 257-269.

- 58. English A.W. Small-molecule trkB agonists promote axon regeneration in cut peripheral nerves / A.W. English, K. Liu, J.M. Nicolini, A.M. Mulligan, K. Ye // Proc Natl Acad Sci U S A. 2013. Vol. 110. № 40. P. 16217-16222.
- 59. Ernfors P. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits / P. Ernfors, K.F. Lee, R. Jaenisch // Nature. 1994. Vol. 368. № 6467. P. 147–150.
- 60. Feng D. Molecular and structural insight into proNGF engagement of p75NTR and sortilin / D. Feng, T. Kim, E. Ozkan, M. Light, R. Torkin, K.K. Teng, B.L. Hempstead, K.C. Garcia // J Mol Biol. 2010. Vol. 396. № 4. P. 967-984.
- 61. Fletcher J.M. Novel monocyclic and bicyclic loop mimetics of brain-derived neurotrophic factor / J.M. Fletcher, R.A. Hughes // J Pept Sci. 2006. Vol. 12. № 8. P. 515-524.
- Fletcher J.M. Design of a conformationally defined and proteolytically stable circular mimetic of brain-derived neurotrophic factor / J.M. Fletcher, C.J. Morton, R.A. Zwar, S.S. Murray, P.D. O'Leary, R.A. Hughes // J. Biol. Chem. – 2008. – Vol. 283. – P. 33375-33383.
- 63. Fletcher J.M. Modified low molecular weight cyclic peptides as mimetics of BDNF with improved potency, proteolytic stability and transmembrane passage in vitro / J.M. Fletcher, R.A. Hughes // Bioorg. Med.Chem. – 2009. – Vol. 17. – P. 2695-2702.
- 64. Fletcher J.M. Targeting TrkB with a Brain-Derived Neurotrophic Factor Mimetic Promotes Myelin Repair in the Brain / J.M. Fletcher, R.J. Wood, J. Nguyen, E.M.L. Norman, C.M.K. Jun, A.R. Prawdiuk, M. Biemond, H.T.H. Nguyen, S.E. Northfield, R.A. Hughes, D.G. Gonsalvez, J. Xiao, S.S. Murray // J Neurosci. –2018. Vol. 38. № 32. P. 7088-7099.
- 65. Fletcher J.M. Acute treatment with TrkB agonist LM22A-4 confers neuroprotection and preserves myelin integrity in a mouse model of pediatric traumatic brain injury / J.M. Fletcher, L.K. Dill, R.J. Wood, S. Wang, K. Robertson, S.S. Murray, A. Zamani, B.D. Semple // Exp Neurol. – 2021. – Vol. 339. – P. 113652.
- 66. Fobian K. Peptides derived from the solvent-exposed loops 3 and 4 of BDNF bind TrkB and p75(NTR) receptors and stimulate neurite outgrowth and survival / K. Fobian, S. Owczarek, C. Budtz, E. Bock, V. Berezin, M.V. Pedersen // J Neurosci Res. 2010. Vol. 88. № 6. P. 1170-1181.
- 67. Franco M.L. Interaction between the transmembrane domains of neurotrophin receptors p75 and TrkA mediates their reciprocal activation / M.L. Franco, K.D. Nadezhdin, T.P. Light, S.A. Goncharuk, A. Soler-Lopez, F. Ahmed, K.S. Mineev, K. Hristova, A.S. Arseniev, M. Vilar // J Biol Chem. 2021. Vol. 297. № 2. P. 100926.
- 68. García-Díaz Barriga G. 7,8-dihydroxyflavone ameliorates cognitive and motor deficits in a Huntington's disease mouse model through specific activation of the PLCγ1 pathway / G. García-

Díaz Barriga, A. Giralt, M. Anglada-Huguet, N. Gaja-Capdevila, J.G. Orlandi, J. Soriano, J.M. Canals, J. Alberch // Hum Mol Genet. – 2017. – Vol. 26. – № 16. – P. 3144-3160.

- 69. Gärtner A. Hippocampal long-termpotentiation is supported by presynaptic and postsynaptic tyrosine receptor kinase B-mediated phospholipase Cγ signaling / A. Gärtner, D.G. Polnau, V. Staiger, C. Sciarretta, L. Minichiello, H. Thoenen, T. Bonhoeffer, M. Korte // J. Neurosci. 2006. Vol. 26. № 13. P. 3496–3504.
- 70. Gharami K. Brain-derived neurotrophic factor over-expression in the forebrain ameliorates Huntington's disease phenotypes in mice. / K. Gharami, Y. Xie, J.J. An, S. Tonegawa, B. Xu // J Neurochem. – 2008. – Vol. 105. – № 2. – P. 369-379.
- 71. Gnahn H. NGF mediated increase of choline acetyltransferase (ChAT) in the neonatal rat forebrain: evidence for a physiological role of NGF in the brain? / H. Gnahn, F. Hefti, R. Heumann, M.E. Schwab, H. Thoenen // Brain Res. 1983. Vol. 285. № 1. P. 45-52.
- Gomez-Palacio-Schjetnan A. Neurotrophins and synaptic plasticity / A. Gomez-Palacio-Schjetnan, M.L. Escobar // Curr. Topics Behav.Neurosci. – 2013. – Vol. 15. – P. 117–136.
- 73. Gong Y. Crystal structure of the neurotrophin-3 and p75NTR symmetrical complex / Y. Gong, P. Cao, H.J. Yu, T. Jiang // Nature. 2008. Vol. 454. № 7205. P. 789-793.
- 74. Gordon T. The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. // Neurosurg Focus. 2009. –
   Vol. 26. № 2. P. E3.
- 75. Gottmann K. BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses / K. Gottmann, T. Mittmann, V. Lessmann // Experimental Brain Research.
   2009. Vol. 199. № 3-4. P. 203-234.
- 76. Grande I. The role of BDNF as a mediator of neuroplasticity in bipolar disorder / I. Grande, G.R. Fries, M. Kunz, F. Kapczinski // Psychiatry Investig. 2010. Vol. 7. № 4. P. 243-250.
- 77. Grob P.M. Affinity labeling and partial purification of nerve growth factor receptors from rat pheochromocytoma and human melanoma cells / P.M. Grob, C.H. Berlot, M.A. Bothwell // Proc Natl Acad Sci U S A. 1983. Vol. 80. № 22. P. 6819-6823.
- Gu F. Partial TrkB receptor activation suppresses cortical epileptogenesis through actions on parvalbumin interneurons / F. Gu, I. Parada, T. Yang, F.M. Longo, D.A. Prince // Neurobiol Dis. – 2018. – Vol. 113. – P. 45-58.
- 79. Guan J. Neuronal regeneration and protection by collagen-binding BDNF in the rat middle cerebral artery occlusion model / J. Guan, W. Tong, W. Ding, S. Du, Z. Xiao, Q. Han, Z. Zhu, X. Bao, X. Shi, C. Wu, J. Cao, Y. Yang, W. Ma, G. Li, Y. Yao, J. Gao, J. Wei, J. Dai, R. Wang // Biomaterials. 2012. Vol. 33. -№ 5. P. 1386-1395.
- 80. Gudasheva T.A. Dimeric dipeptide mimetics of the nerve growth factor Loop 4 and Loop 1 activate TrkA with different patterns of intracellular signal transduction / T.A. Gudasheva, P.Y.

Povarnina, T.A. Antipova, Y.N. Firsova, M.A. Konstantinopolsky, S.B. Seredenin // J Biomed Sci. – 2015. – Vol. 22. – Art. nr. 106.

- Bupta G. Pharmacological Evaluation of Antidepressant-Like Effect of Genistein and Its Combination with Amitriptyline: An Acute and Chronic Study / G. Gupta, T. Jia Jia, L.Y. Woon, D.K. Chellappan, M. Candasamy, K. Dua // Adv. Pharmacol. Sci. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–6.
- 82. Gwag B.J. Activation of NMDA receptors increases brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in the hippocampal formation / B.J. Gwag, J.E. Springer // Neuroreport. – 1993. – Vol. 18. – № 5(2). – P. 125-128.
- 83. Han J. Delayed administration of a small molecule tropomyosin-related kinase B ligand promotes recovery after hypoxic-ischemic stroke / J. Han, J. Pollak, T. Yang, M.R. Siddiqui, K.P. Doyle, K. Taravosh-Lahn, E. Cekanaviciute, A. Han, J.Z. Goodman, B. Jones, D. Jing, S.M. Massa, F.M. Longo, M.S. Buckwalter // Stroke. – 2012. – Vol. 43. - № 7. – P. 1918-1924.
- 84. Han Q. The promotion of cerebral ischemia recovery in rats by laminin-binding BDNF / Q. Han,
  B. Li, H. Feng, Z. Xiao, B. Chen, Y. Zhao, J. Huang, J. Dai // Biomaterials. 2011. Vol. 32. N
  <sup>o</sup> 22. P. 5077-5085.
- 85. Hashimoto K. Role of brain-derived neurotrophic factor in eating disorders: recent findings and its pathophysiological implications / K. Hashimoto, H. Koizumi, M. Nakazato, E. Shimizu, M. Iyo // Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2005. Vol. 29. № 4. P. 499-504.
- 86. He X.L. Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75 / X.L. He, K.C. Garcia // Science. 2004. Vol. 304. № 5672. P. 870-875.
- 87. Hendry I.A. The retrograde axonal transport of nerve growth factor / I.A. Hendry, K. Stöckel, H. Thoenen, L.L. Iversen // Brain. Res. 1974. Vol. 68. № 1. P. 103-121.
- 88. Hock C. Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brainderived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas / C. Hock, K. Heese, C. Hulette, C. Rosenberg, U. Otten // Arch Neurol. – 2000. – Vol. 57. – № 6. – P. 846-851.
- 89. Holden P.H. Immunoglobulin-like domains define the nerve growth factor binding site of the TrkA receptor / P.H. Holden, V. Asopa, A.G. Robertson, A.R. Clarke, S. Tyler, G.S. Bennett, S.D. Brain, G.K. Wilcock, S.J. Allen, S.K. Smith, D. Dawbarn // Nat Biotechnol. 1997. Vol. 15. № 7. P. 668-672.
- Hoshaw B.A. Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects / B.A. Hoshaw, J.E. Malberg, I. Lucki // Brain Res. – 2005. – Vol. 1037. – P. 204 – 208.
- 91. Howells D.W. Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra / D.W. Howells, M.J. Porritt, J.Y. Wong, P.E. Batchelor, R. Kalnins, A.J. Hughes, G.A. Donnan // Exp Neurol. – 2000. – Vol. 166. – № 1. – P. 127-135.

- 92. Hu Y. BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation / Y. Hu, S.J. Russek // J. Neurochem. 2008. Vol. 105. P. 1–17.
- 93. Hyman C. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra / C. Hyman, M. Hofer, Y.A. Barde, M. Juhasz, G.D. Yancopoulos, S.P. Squinto, R.M. Lindsay // Nature. 1991. Vol. 350. № 6315. P. 230-232.
- 94. Ibáñez C.F. Chimeric molecules with multiple neurotrophic activities reveal structural elements determining the specificities of NGF and BDNF / C.F. Ibáñez, T. Ebendal, H. Persson // EMBO J. 1991. Vol. 10. № 8. P. 2105-2110.
- 95. Ibáñez C.F. An extended surface of binding to Trk tyrosine kinase receptors in NGF and BDNF allows the engineering of a multifunctional pan-neurotrophin / C.F. Ibáñez, L.L. Ilag, J. Murray-Rust, H. Persson // EMBO J. 1993. Vol. 12. № 6. P. 2281-2293.
- 96. Ibanez C.F Neurotrophic factors: from structure-function studies to designing effective therapeutics // Trends Biotechnol. 1995. Vol. 13. № 6. P. 217-227.
- 97. Ibáñez C.F. Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors // Trends Neurosci. –
  1998. Vol. 21. № 10. P. 438-444.
- 98. Jackson G.R. Nerve growth factor effects on pyridine nucleotides after oxidant injury of rat pheochromocytoma cells / G.R. Jackson, K. Werrbach-Perez, E.L. Ezell, J.F. Post, J.R. Perez-Polo // Brain Res. 1992. Vol. 592. № 1. P. 239-248.
- 99. Jang S.W. Deoxygedunin, a natural product with potent neurotrophic activity in mice / S.W. Jang, X. Liu, C.B. Chan, S.A. France, I. Sayeed, W. Tang, X. Lin, G. Xiao, R. Andero, Q. Chang, K.J. Ressler, K. Ye // PLoS One. 2010. Vol. 5. № 7. P. e11528.
- Jang S.W. A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone
  / S.W. Jang, X. Liu, M. Yepes, K.R. Shepherd, G.W. Miller, Y. Liu, W.D. Wilson, G. Xiao, B. Blanchi, Y.E. Sun, K. Ye // Proc Natl Acad Sci U S A. 2010. Vol. 107. № 6. P. 2687-2692.
- M. Jaouadi. Novel preparation of N-protected amino acid active esters using 1,2,2,2-tetrachloroethyl carbonates / M. Jaouadi, J. Martinez, B.Castro // Journal of Organic Chemistry.
   1987. Vol.52. P.2364-2367.
- 102. Jiang C. The Role of Neurotrophins in Major Depressive Disorder / C. Jiang, R. Salton // Transl. Neurosci. – 2013. – Vol. 4. – № 1. – P. 46–58.
- 103. Jiang M. Small-molecule TrkB receptor agonists improve motor function and extend survival in a mouse model of Huntington's disease / M. Jiang, Q. Peng, X. Liu, J. Jin, Z. Hou, J. Zhang, S. Mori, C.A. Ross, K. Ye, W. Duan // Hum Mol Genet. – 2013. – Vol. 22. - № 12. – P. 2462-2470.

- 104. Johnson R.A. 7,8-dihydroxyflavone exhibits therapeutic efficacy in a mouse model of Rett syndrome / R.A. Johnson, M. Lam, A.M. Punzo, H. Li, B.R. Lin, K. Ye, G.S. Mitchell, Q. Chang // J Appl Physiol. – 2012. – Vol. 112. - № 5. – P. 704–710.
- 105. Jones K.R. Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development / K.R. Jones, I. Farinas, C. Backus, L.F. Reichardt // Cell. – 1994 – Vol. 76. - № 6. – P. 989–999.
- 106. Kajiya M. BDNF mimetic compound LM22A-4 regulates cementoblast differentiation via the TrkB-ERK/Akt signaling cascade / M. Kajiya, K. Takeshita, M. Kittaka, S. Matsuda, K. Ouhara, K. Takeda, T. Takata, M. Kitagawa, T. Fujita, H. Shiba, H. Kurihara // Int. Immunopharmacol. 2014. Vol. 19. № 2. P. 245-252.
- 107. Kaplan D.R. Neurotrophin signal transduction in the nervous system / D.R. Kaplan, F.D. Miller
   // Curr Opin Neurobiol. 2000. Vol. 10. № 3. P. 381-391.
- 108. Karege F. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs / F. Karege, G. Vaudan, M. Schwald, N. Perroud, R. La Harpe // Brain Res Mol Brain Res. 2005. Vol. 136. №1-2. P.29-37.
- 109. Kesslak J.P. Spatial learning is delayed and brain-derived neurotrohpic factor mRNA expression inhibited by administration of MK-801 in rats / J.P. Kesslak, K.R. Chuanq, N.C. Berchtold // Neurosci. Lett. – 2003. – Vol. 353. - № 2. – P. 95-98.
- 110. Kipnis P.A. TrkB agonists prevent postischemic emergence of refractory neonatal seizures in mice / P.A. Kipnis, B.J. Sullivan, B.M. Carter, S.D. Kadam // JCI Insight. 2020. Vol. 5. № 12. P. e136007.
- 111. Kisfaludy L.T. Synthesis of N-carbobenzoxyamino acid and peptide pentafluorophenyl esters as intermediates in peptide synthesis / L.T. Kisfaludy, J.E. Roberts, R.H. Johnson, G.L. Mayers, J. Kovacs // Journal of Organic Chemistry. – 1970. –Vol.35, № 10. – P.3563-3565.
- 112. Kline D.D. Exogenous brain-derived neurotrophic factor rescues synaptic dysfunction in Mecp2null mice / D.D. Kline, M. Ogier, D.L. Kunze, D.M. Katz // J. Neurosci. – 2010. – Vol. 30. – P. 5303–5310.
- 113. Knable M.B. Molecular abnormalities of the hippocampus in severe psychiatric illness: postmortem findings from the Stanley Neuropathology Consortium. / M.B. Knable, B.M. Barci, M.J. Webster, J. Meador-Woodruff, E.F. Torrey // Mol. Psychiatr. – 2004. – Vol. 9. – P. 609-620.
- 114. Kopec B.M. Noninvasive Brain Delivery and Efficacy of BDNF to Stimulate Neuroregeneration and Suppression of Disease Relapse in EAE Mice / B.M. Kopec, P. Kiptoo, L. Zhao, E. Rosa-Molinar, T.J. Siahaan // Mol Pharm. – 2020. – Vol. 17. – № 2. – P. 404-416.

- 115. Koponen E. Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor TrkB exhibit increased activation of the TrkB-PLCgamma pathway, reduced anxiety, and facilitated learning.
  / E. Koponen, V. Võikar, R. Riekki, T. Saarelainen, T. Rauramaa, H. Rauvala, T. Taira, E. Castrén // Mol. Cell. Neurosci. 2004. Vol. 26. № 1. P. 166-181.
- 116. Korte M. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain- derived neurotrophic factor / M. Korte, P. Carroll, E. Wolf, G. Brem, H. Thoenen, T. Bonhoeffer // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1995. – Vol. 92. – № 19. – P. 8856–8860.
- 117. Korte M. Virus-mediated gene transfer into hippocampal CA1 region restores long-term potentiation in brain-derived neurotrophic factor mutant mice / M. Korte, O. Griesbeck, C. Gravel, P. Carroll, V. Staiger, H. Thoenen, T. Bonhoeffer // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. № 22. P. 12547–12552.
- 118. Kraemer B.R. The biological functions and signaling mechanisms of the p75 neurotrophin receptor / B.R. Kraemer, S.O. Yoon, B.D. Carter // Handbook Exp. Pharmacol. – 2014. – Vol. 220. – P. 121–164.
- 119. Kram'ar E.A. BDNF upregulation rescues synaptic plasticity in middle-aged ovariectomized rats
  / E.A. Kram'ar, L.Y. Chen, J.C. Lauterborn, D.A. Simmons, C.M. Gall, G. Lynch // Neurobiology of Aging. – 2012. – Vol. 33. - № 4. – P. 708–719.
- 120. Kron M. A BDNF loop-domain mimetic acutely reverses spontaneous apneas and respiratory abnormalities during behavioral arousal in a mouse model of Rett syndrome / M. Kron, M. Lang, I.T. Adams, M. Sceniak, F. Longo, D.M. Katz // Disease Models & Mechanisms. – 2014. – Vol. 7. – P. 1047-1055.
- 121. Kunugi H. Interface between hypothalamic-pituitary-adrenal axis and brain-derived neurotrophic factor in depression / H. Kunugi, H. Hori, N. Adachi, T. Numakawa // Psychiatry Clin Neurosci.
   2010. Vol. 64. № 5. P. 447-459.
- 122. Lemmon M.A. Cell signaling by receptor tyrosine kinases / M.A. Lemmon, J. Schlessinger // Cell. – 2010. – Vol. 141. - № 7. – P. 1117-1134.
- 123. Levi-Montalcini R. Effects of mouse tumor transplantation on the nervous system // Ann N Y Acad Sci. – 1952. – Vol. 55. – № 2. – P. 330-344.
- 124. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later // Science. 1987. Vol. 237. № 4819. P. 1154-1162.
- 125. Li W. A small-molecule TrkB ligand restores hippocampal synaptic plasticity and object location memory in Rett syndrome mice / W. Li, A. Bellot-Saez, M.L. Phillips, T. Yang, F.M. Longo, L. Pozzo-Miller // Dis Model Mech. – 2017. – Vol. 10. - № 7. – P. 837-845.
- 126. Liepinsh E. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor / E. Liepinsh,
   L.L. Ilag, G. Otting, C.F. Ibáñez // EMBO J. 1997. Vol. 16. № 16. P. 4999-5005.

- 127. Lindholm J.S.O. Mice with altered BDNF signaling as models for mood disorders and antidepressant effects / J.S.O. Lindholm, E. Castrén // Frontiers in Behav. Neurosci. – 2014. – Vol. 8. – P. 143.
- 128. Liu X. A synthetic 7,8-dihydroxyflavone derivative promotes neurogenesis and exhibits potent antidepressant effect / X. Liu, C.B. Chan, S.W. Jang, S. Pradoldej, J. Huang, K. He, L.H. Phun, S. France, G. Xiao, Y. Jia, H.R. Luo, K. Ye // J Med Chem. 2010. Vol. 53. № 23. P. 8274–8286.
- 129. Liu X. Biochemical and biophysical investigation of the brain-derived neurotrophic factor mimetic 7,8-dihydroxyflavone in the binding and activation of the TrkB receptor / X. Liu, O. Obianyo, C.B. Chan, J. Huang, S. Xue, J.J. Yang, F. Zeng, M. Goodman, K. Ye // J Biol Chem. 2014. Vol. 289. № 40. P. 27571-27584.
- 130. Lu B. BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases / B. Lu, G. Nagappan, X. Guan, P.J. Nathan, P. Wren // Nat Rev Neurosci. 2013. Vol. 14. № 6. P. 401-416.
- 131. Luo D. 7,8-dihydroxyflavone protects 6-OHDA and MPTP induced dopaminergic neurons degeneration through activation of TrkB in rodents / D. Luo, Y. Shi, J. Wang, Q. Lin, Y. Sun, K. Ye, Q. Yan, H. Zhang // Neurosci Lett. – 2016. – Vol. 620. – P. 43–49.
- Maisonpierre P.C. NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression / P.C. Maisonpierre, L. Belluscio, B. Friedman, R.F. Alderson, S.J. Wiegand, M.E. Furth, R.M. Lindsay, G.D. Yancopoulos // Neuron. 1990. Vol. 5. № 4. P. 501–509.
- Makar T.K. TrkB agonist, 7,8-dihydroxyflavone, reduces the clinical and pathological severity of a murine model of multiple sclerosis / T.K. Makar, V.K.C. Nimmagadda, I.S. Singh, K. Lam, F. Mubariz, S.I.V. Judge, D. Trisler, Jr C.T. Bever // J Neuroimmunol. 2016. Vol. 292. P. 9–20.
- 134. Martinowich K. New insights into BDNF function in depression and anxiety / K. Martinowich,
  H. Manji, B. Lu // Nat Neurosci. 2007. Vol. 10. № 9. P. 1089-1093.
- 135. Masi G. The Hippocampus, Neurotrophic Factors and Depression. Possible implications for the pharmacotherapy of depression / G. Masi, P. Brovedani // CNS Drugs. – 2011. – Vol. 25. - № 11. – P. 913-932.
- 136. Massa S.M. Small molecule BDNF mimetics activate TrkB signaling and prevent neuronal degeneration in rodents / S.M. Massa, T. Yang, Y. Xie, J. Shi, M. Bilgen, J.N. Joyce, D. Nehama, J. Rajadas, F.M. Longo // J Clin Invest. 2010. Vol. 120. № 5. P. 1774-1785.

- 137. Matsumoto T. Brain-derived neurotrophic factor enhances depolarization-evoked glutamate release in cultured cortical neurons / T. Matsumoto, T. Numakawa, N. Adachi, D. Yokomaku, S. Yamagishi, N. Takei, H. Hatanaka // J Neurochem. 2001. Vol. 79. № 3. P. 522-530.
- 138. McDonald N.Q. New protein fold revealed by a 2.3-A resolution crystal structure of nerve growth factor / N.Q. McDonald, R. Lapatto, J. Murray-Rust, J. Gunning, A. Wlodawer, T.L. Blundell // Nature. – 1991. – Vol. 354. – № 6352. – P. 411-414.
- 139. McInnes C. Growth factor receptors: structure, mechanism, and drug discovery / C. McInnes,
  B.D. Sykes // Biopolymers. 1997. Vol. 43. № 5. P. 339-366.
- 140. McKinnon M.C. A meta-analysis examining clinical predictors of hippocampal volume in patients with major depressive disorder / M.C. McKinnon, K. Yucel, A. Nazarov, G.M. MacQueen // J. Psychiatry and Neurosci. – 2009 – Vol. 34. – № 1. – P. 41–54.
- 141. Meneses C. Multigram-scale synthesis of short peptides via a simplified repetitive solution-phase procedure / C. Meneses, L. Sarah. N. Tremblea // J. Org. Chem. – 2010. – Vol. 75. - № 10. – P. 564-569.
- 142. Miranda M. Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain / M. Miranda, J.F. Morici, M.B. Zanoni, P. Bekinschtein // Front Cell Neurosci. – 2019. – Vol. 13. – P. 363.
- 143. Mitre M. Neurotrophin signalling: novel insights into mechanisms and pathophysiology / M. Mitre, A. Mariga, M.V. Chao // Clin Sci (Lond). 2017. Vol. 131. № 1. P.13-23.
- 144. Monteggia L.M. Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function / L.M. Monteggia, M. Barrot, C.M. Powell, O. Berton, V. Galanis, T. Gemelli, S. Meuth, A. Nagy, R.W. Greene, E.J. Nestler // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol, 101. – P. 10827–10832.
- 145. Murray P.S. An overview of brain-derived neurotrophic factor and implications for excitotoxic vulnerability in the hippocampus / P.S. Murray, P.V. Holmes // Int J Pept. 2011. Vol. 2011. P. 654085.
- 146. Nadezhdin K.D. Structural Basis of p75 Transmembrane Domain Dimerization / K.D. Nadezhdin, I. García-Carpio, S.A. Goncharuk, K.S. Mineev, A.S. Arseniev, M. Vilar // J Biol Chem. -2016. Vol. 291. № 23. P. 12346-12357.
- 147. Naegelin Y. Levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with multiple sclerosis / Y. Naegelin, K. Saeuberli, S. Schaedelin, H. Dingsdale, S. Magon, S. Baranzini, M. Amann, K. Parmar, C. Tsagkas, P. Calabrese, I.K. Penner, L. Kappos, Y.A. Barde // Ann Clin Transl Neurol. 2020. Vol. 7. № 11. P. 2251-2261.
- 148. Nagahara A.H. Early BDNF treatment ameliorates cell loss in the entorhinal cortex of APP transgenic mice / A.H. Nagahara, M. Mateling, I. Kovacs, L. Wang, S. Eggert, E. Rockenstein,

E.H. Koo, E. Masliah, M.H. Tuszynski // J Neurosci. – 2013. – Vol. 33. - № 39. – P. 15596-15602.

- 149. Naumenko V.S. Effect of brain-derived neurotrophic factor on behavior and key members of the brain seretonon system in genetically predisposed to behavioral disorders mouse strains / V.S. Naumenko, E.M. Kondaurova, D.V. Bazovkina, A.S. Tsybko, M.A. Tikhonova, N.K. Popova // Neurosci. – 2012. – Vol. 214. – P. 59-67.
- 150. Neto F.L. Neurotrophins role in depression neurobiology: a review of basic and clinical evidence / F.L. Neto, G. Borges, S. Torres-Sanchez, J.A. Mico, E. Berrocoso // Curr Neuropharmacol. 2011. Vol. 9. P. 530–552.
- 151. Nguyen H.T.H. TrkB Agonist LM22A-4 Increases Oligodendroglial Populations During Myelin Repair in the Corpus Callosum / H.T.H. Nguyen, R.J. Wood, A.R. Prawdiuk, S.G.B. Furness, J. Xiao, S.S. Murray, Fletcher J.M. // Front Mol Neurosci. – 2019. – Vol. 12. – P. 205.
- 152. Nie S. Small molecule TrkB agonist deoxygedunin protects nigrostriatal dopaminergic neurons from 6-OHDA and MPTP induced neurotoxicity in rodents / S. Nie, Y. Xu, G. Chen, K. Ma, C. Han, Z. Guo, Z. Zhang, K. Ye, X. Cao // Neuropharmacology. – 2015. – Vol. 99. – P. 448-458.
- 153. Numakawa T. Actions of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Glucocorticoid Stress in Neurogenesis / T. Numakawa, H. Odaka, N. Adachi // Int J Mol Sci. 2017. Vol. 18. № 11. P. 2312.
- 154. Numata S. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism in schizophrenia is associated with age at onset and symptoms / S. Numata, S. Ueno, J. Iga, K. Yamauchi, S. Hongwei, K. Ohta, S. Kinouchi, S. Shibuya-Tayoshi, S. Tayoshi, M. Aono, N. Kameoka, S. Sumitani, M. Tomotake, Y. Kaneda, T. Taniguchi, Y. Ishimoto, T. Ohmori // Neurosci Lett. – 2006. – Vol. 401. - № 1-2. – P. 1-5.
- 155. Ochs G. A phase I/II trial of recombinant methionyl human brain derived neurotrophic factor administered by intrathecal infusion to patients with amyotrophic lateral sclerosis / G. Ochs, R.D. Penn, M. York, R. Giess, M. Beck, J. Tonn, J. Haigh, E. Malta, M. Traub, M. Sendtner, K.V. Toyka // Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord. – 2000. – Vol. 1. - № 3. – P. 201-206.
- 156. O'Connell L. TrkA amino acids controlling specificity for nerve growth factor / L. O'Connell, J.A. Hongo, L.G. Presta, P. Tsoulfas // J Biol Chem. 2000. Vol. 275. № 11. P. 7870-7877.
- 157. O'Leary P.D. Structure-activity relationships of conformationally constrained peptide analogues of loop 2 of brain-derived neurotrophic factor / P.D. O'Leary, R.A. Hughes // J. Neurochem. – 1998. – Vol. 70. – P. 1712-1721.
- 158. O'Leary P.D. Design of potent peptide mimetics of brain-derived neurotrophic factor / P.D.
   O'Leary, R.A. Hughes // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 28. № 11. P. 25738-25744.

- 159. Palasz E. BDNF as a Promising Therapeutic Agent in Parkinson's Disease / E. Palasz, A. Wysocka, A. Gasiorowska, M. Chalimoniuk, W. Niewiadomski, G. Niewiadomska // Int J Mol Sci. 2020. Vol. 21. № 3. P. 1170.
- 160. Pandey G.N. Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor signalling in postmortem brain of teenage suicide victims / G.N.Pandey, X. Ren, H.S. Rizavi, R.R. Conley, R.C. Roberts, Y. Dwivedi // Int. J. Neuropsychopharmacol. – 2008. – Vol. 11. – P. 1047–1061.
- 161. Parain K. Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra / K. Parain, M.G. Murer, Q. Yan, B. Faucheux, Y. Agid, E. Hirsch, R. Raisman-Vozari // Neuroreport. – 1999. – Vol. 10. – № 3. – P. 557-561.
- 162. PaQuet A. Introduction of 9-fluorenylmethyloxycarbonyl, trichloroethoxycarbonyl, and benzyloxycarbonyl amine protecting groups into O-unprotected hydroxyamino acids using succinimidyl carbonates // Can. J. Chem. – 1982. – Vol. 80. – P. 976-980.
- 163. Patapoutian A. Trk receptors: mediators of neurotrophin action / A. Patapoutian, L.F. Reichardt
  // Curr Opin Neurobiol. 2001. Vol. 11. № 3. P. 272-280.
- 164. Pattarawarapan M. Molecular basis of neurotrophin-receptor interactions / M. Pattarawarapan,
  K. Burgess // J Med Chem. 2003. Vol. 46. № 25. P. 5277-5291.
- Pencea V. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus / V. Pencea, K.D. Bingaman, S.J. Wiegand, M.B. Luskin // J. Neurosci. 2001. Vol. 21. № 17. P. 6706–6717.
- 166. Peng S. Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease / S. Peng, J. Wuu, E.J. Mufson, M. Fahnestock // J Neurochem. – 2005. – Vol. 93. - № 6. – P. 1412-1421.
- 167. Pérez P. NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains / P. Pérez, P.M. Coll, B.L. Hempstead, D. Martín-Zanca, M.V. Chao // Mol Cell Neurosci. 1995. Vol. 6. № 2. P. 97-105.
- 168. Pham K. Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus / K. Pham, J. Nacher, P.R. Hof, B.S. McEwen // Eur J Neurosci. 2003. Vol. 17. № 4. P. 879-886.
- 169. Phillips L.J. Stress, the hippocampus and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implication for the development of psychotic disorders / L.J. Phillips, P.D. McGorry, B. Garner, K.N. Thompson, C. Pantelis, S.J. Wood, G. Berqer // Aust. N. Z. J. Psychiatry. 2006. Vol. 40. № 9. P. 725-741.

- 170. Poduslo J.F. Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF / J.F. Poduslo, G.L. Curran // Brain Res Mol Brain Res. – 1996. – Vol. 36. - № 2. – P. 280-286.
- Polyakova M. BDNF as a biomarker for successful treatment of mood disorders: a systematic & quantitative meta-analysis / M. Polyakova, K. Stuke, K. Schuemberg, K. Mueller, P. Schoenknecht, M.L. Schroeter // J. Affect. Disord. 2015. Vol.174. P.432-440.
- 172. Popenoe E. A. Amino acid derivatives of D-glucosamine / E.A. Popenoe, D.G. Doherty, K.P. Link // J. Amer. Chem. Soc. 1953. Vol. 75. P. 3469.
- 173. Porsolt R.D. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments / R.D. Porsolt, G. Anton, N. Blavet, M. Jalfre // Eur. J. Pharmacol. 1978. Vol. 47. P. 379-391.
- 174. Pozzo-Miller L.D. Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice / L.D. Pozzo-Miller, W. Gottschalk, L. Zhang, K. McDermott, J. Du, R. Gopalakrishnan, C. Oho, Z.H. Sheng, B. Lu // J. Neurosci. 1999. Vol. 19. № 12. P. 4972–4983.
- 175. Qu Q. Structural characterization of the self\_association of the death domain of p75(NTR) / Q.
  Qu, J. Chen, Y. Wang, W. Gui, L. Wang, Z. Fan, T. Jiang // PLoS One. 2013. Vol. 8. № 3.
   P. e57839.
- 176. Radziejewski C. Dimeric structure and conformational stability of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 / C. Radziejewski, R.C. Robinson, P.S. DiStefano, J.W. Taylor // Biochemistry. – 1992. – Vol. 31. – № 18. – P. 4431-4436.
- 177. Radziejewski C. Heterodimers of the neurotrophic factors: formation, isolation, and differential stability / C. Radziejewski, R.C. Robinson // Biochemistry. 1993. Vol. 32. № 48. P. 13350-13356.
- 178. Rana T. Unfolding the Role of BDNF as a Biomarker for Treatment of Depression / T. Rana, T. Behl, A. Sehgal, P. Srivastava, S. Bungau // J Mol Neurosci. 2021. Vol. 71. № 10. P. 2008-2021.
- 179. Rappoport S. The chemical preparation of acetylaminoacyl-tRNA / S. Rappoport, Y. Lapidot // Methods in Enzymology. – 1974. – Vol.29. – P.685-688.
- Rattiner L.M. Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B involvement in amygdaladependent fear conditioning / L.M. Rattiner, M. Davis, C.T. French, K.J. Ressler // J. Neurosci. – 2004. – Vol. 24. – P. 4796–4806.
- 181. Ribasés M. Association of BDNF with restricting anorexia nervosa and minimum body mass index: a family-based association study of eight European populations / M. Ribasés, M. Gratacòs, F. Fernández-Aranda, L. Bellodi, C. Boni, M. Anderluh, M. Cristina Cavallini, E.

Cellini, D. Di Bella, S. Erzegovesi, C. Foulon, M. Gabrovsek, P. Gorwood, J. Hebebrand, A. Hinney, J. Holliday, X. Hu, A. Karwautz, A. Kipman, R. Komel, B. Nacmias, H. Remschmidt, V. Ricca, S. Sorbi, M. Tomori, G. Wagner, J. Treasure, D.A. Collier, X. Estivill // Eur J Hum Genet. – 2005. – Vol. 13. – № 4 – P. 428-434.

- 182. Robertson A.G. Identification and structure of the nerve growth factor binding site on TrkA / A.G. Robertson, M.J. Banfield, S.J. Allen, J.A. Dando, G.G. Mason, S.J. Tyler, G.S. Bennett, S.D. Brain, A.R. Clarke, R.L. Naylor, G.K. Wilcock, R.L. Brady, D. Dawbarn // Biochem Biophys Res Commun. 2001. Vol. 282. № 1. P. 131-141.
- 183. Robinson R.C. Structure of the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 3 heterodimer / R.C. Robinson, C. Radziejewski, D.I. Stuart, E.Y. Jones // Biochemistry. 1995. Vol. 34. № 13. P. 4139-4146.
- 184. Robinson R.C. The structures of the neurotrophin 4 homodimer and the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 4 heterodimer reveal a common Trk-binding site / R.C. Robinson, C. Radziejewski, G. Spraggon, J. Greenwald, M.R. Kostura, L.D. Burtnick, D.I. Stuart, S. Choe, E.Y. Jones // Protein Sci. 1999. Vol. 8. № 12. P. 2589–2597.
- 185. Rydén M. Functional analysis of mutant neurotrophins deficient in low-affinity binding reveals a role for p75LNGFR in NT-4 signalling / M. Rydén, J. Murray-Rust, D. Glass, L.L. Ilag, M. Trupp, G.D. Yancopoulos, N.Q. McDonald, C.F. Ibáñez // EMBO J. 1995 May 1;14(9):1979-90.
- 186. Saarelainen T. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects / T. Saarelainen, P. Hendolin, G. Lucas, E. Koponen, M. Sairanen, E. MacDonald, K. Agerman, A. Haapasalo, H. Nawa, R. Aloyz, P. Ernfors, E. Castrén // J Neurosci. – 2003. – Vol. 23. – № 1. – P. 349-357.
- 187. Santarelli L. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants / L. Santarelli, M. Saxe, C. Gross, A. Surget, F. Battaglia, S. Dulawa, N. Weisstaub, J. Lee, R. Duman, O. Arancio, C. Belzung, R. Hen // Science. – 2003. – Vol. 301. – P. 805-809.
- 188. Scharfman H. Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats / H. Scharfman, J. Goodman, A. Macleod, S. Phani, C. Antonelli, S. Croll // Experimental Neurology. – 2005. – Vol. 192. – № 2. – P. 348–356.
- 189. Schäbitz W.R. Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis / W.R. Schäbitz, T. Steigleder, C.M. Cooper-Kuhn, S. Schwab, C. Sommer, A. Schneider, H.G. Kuhn // Stroke. – 2007. – Vol. 38. - № 7. – P. 2165-2172.

- 190. Schmidt H.D. Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models / H.D. Schmidt, R.S. Duman // Neuropsychopharmacology. – 2010. – Vol. 35. - № 12. – P. 2378-2391.
- 191. Schneider R. A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors / R. Schneider, M. Schweiger // Oncogene. 1991. Vol. 6. № 10. P. 1807-1811.
- 192. Schwartz P.M. Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF (-/-) mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning / P.M. Schwartz, P.R. Borghesani, R.L. Levy, S.L. Pomeroy, R.A. Segal // Neuron. – 1997. – Vol. 19. – № 2. – P. 269–281.
- 193. Shi H. 7,8,3'-Trihydroxyflavone Promotes Neurite Outgrowth and Protects Against Bupivacaine-Induced Neurotoxicity in Mouse Dorsal Root Ganglion Neurons / Shi H., Luo X. // Med Sci Monit. – 2016. – Vol. 22. – P. 2301-2308.
- 194. Shirayama Y. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression / Y. Shirayama, A.C. Chen, S. Nakagawa, D.S. Russell, R.S. Duman // J. Neurosci. – 2002. – Vol 22. – P. 3251–3261.
- 195. Skaper S.D. The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors // CNS Neurol Disord Drug Targets. 2008. Vol. 7. № 1. P. 46-62.
- 196. Smeyne R.J. Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene / R.J. Smeyne, R. Klein, A. Schnapp, L.K. Long, S. Bryant, A. Lewin, S.A. Lira, M. Barbacid // Nature. 1994. Vol. 368. P. 246-249.
- 197. Soliman F. A genetic variant BDNF polymorphism alters extinction learning in both mouse and human / F. Soliman, C.E. Glatt, K.G. Bath, L. Levita, R.M. Jones, S.S. Pattwell, D. Jing, N. Tottenham, D. Amso, L.H. Somerville, H.U. Voss, G. Glover, D.J. Ballon, C. Liston, T. Teslovich, T. Van Kempen, F.S. Lee, B.J. Casey // Science. 2010. Vol. 327. № 5967. P. 863-866.
- 198. Stachel S.J. Maximizing diversity from a kinase screen: identification of novel and selective pan-Trk inhibitors for chronic pain / S.J. Stachel, J.M. Sanders, D.A. Henze, M.T. Rudd, H.P. Su, Y. Li, K.K. Nanda, M.S. Egbertson, P.J. Manley, K.L. Jones, E.J. Brnardic, A. Green, J.A. Grobler, B. Hanney, M. Leitl, M.T. Lai, V. Munshi, D. Murphy, K. Rickert, D. Riley, A. Krasowska-Zoladek, C. Daley, P. Zuck, S.A. Kane, M.T. Bilodeau // J Med Chem. – 2014. – Vol. 57. - № 13. – P. 5800-5816.
- 199. Stagni F. A flavonoid agonist of the TrkB receptor for BDNF improves hippocampal neurogenesis and hippocampus-dependent memory in the Ts65Dn mouse model of DS / F.

Stagni, A. Giacomini, S. Guidi, M. Emili, B. Uguagliati, M.E. Salvalai, V. Bortolotto, M. Grilli,
R. Rimondini, R. Bartesaghi // Exp Neurol. - 2017. - Vol. 298(Pt A). - P. 79-96.

- 200. Stanne T.M. Low Circulating Acute Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels Are Associated With Poor Long-Term Functional Outcome After Ischemic Stroke. / T.M. Stanne, N.D. Åberg, S. Nilsson, K. Jood, C. Blomstrand, U. Andreasson, K. Blennow, H. Zetterberg, J. Isgaard, J. Svensson, C. Jern // Stroke. 2016. Vol. 47. № 7. P. 1943-1945.
- 201. Suliman S. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) protein levels in anxiety disorders: systematic review and meta-regression analysis / S. Suliman, S.M.J. Hemmings, S. Seedat // Frontiers in Integrative Neurosci. – 2013. – Vol. 7. – P. 55.
- 202. Tikhonova M. Antidepressant-like effects of central BDNF administration in mice of antidepressant sensitive catalepsy (ASC) strain / M. Tikhonova, A.V. Kulikov // Chin J. Physiol. 2012. Vol. 55. № 4. P. 284-293.
- 203. Totoson P. Activation of endothelial TrkB receptors induces relaxation of resistance arteries / P. Totoson, M. Pedard, C. Marie, C. Demougeot // Vascul Pharmacol. 2018. Vol. 106. P. 46-53.
- 204. Travaglia A. Copper, BDNF and Its N-terminal domain: inorganic features and biological perspectives / A. Travaglia, D. La Mendola, A. Magrì, V.G. Nicoletti, A. Pietropaolo, E. Rizzarelli // Chemistry. 2012. Vol. 18. № 49. P. 15618-15631.
- 205. Ueda Y. A colorimetric assay method for the evaluation of neurotrophic activity in vitro / Y. Ueda, E. Walsh, H. Nakanishi, K. Yoshida // Neurosci Lett. 1994. Vol. 165. № 1-2. P. 203-207.
- 206. Ultsch M.H. Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC / M.H. Ultsch, C. Wiesmann, L.C. Simmons, J. Henrich, M. Yang, D. Reilly, S.H. Bass, A.M. de Vos // J Mol Biol. 1999. Vol. 290. № 1. P. 149-159.
- 207. Urfer R. The binding epitopes of neurotrophin-3 to its receptors trkC and gp75 and the design of a multifunctional human neurotrophin / R. Urfer, P. Tsoulfas, D. Soppet, E. Escandón, L.F. Parada, L.G. Presta // EMBO J. 1994. Vol. 13. № 24. P. 5896-5909.
- 208. Urfer R. Specificity determinants in neurotrophin-3 and design of nerve growth factor-based trkC agonists by changing central beta-strand bundle residues to their neurotrophin-3 analogs / R. Urfer, P. Tsoulfas, L. O'Connell, L.G. Presta // Biochemistry. 1997. Vol. 36. № 16. P. 4775-4781.
- 209. Urfer R. High resolution mapping of the binding site of TrkA for nerve growth factor and TrkC for neurotrophin-3 on the second immunoglobulin-like domain of the Trk receptors / R. Urfer, P. Tsoulfas, L. O'Connell, J.A. Hongo, W. Zhao, L.G. Presta // J Biol Chem. 1998. Vol. 273. № 10. P. 5829-5840.

- 210. Wainwright S.R. The neural plasticity theory of depression: assessing the roles of adult neurogenesis and PSA NCAM within the hippocampus / S.R. Wainwright, L.A. Galea // Neural. Plast. - 2013. - Vol. 213. - P. 805497.
- Wang B. 7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule tropomyosin-related kinase B (TrkB) agonist, attenuates cerebral ischemia and reperfusion injury in rats / B. Wang, N. Wu, F. Liang, S. Zhang, W. Ni, Y. Cao, D. Xia, H. Xi // J Mol Histol. 2014. Vol. 45. № 2. P. 129–140.
- 212. Wang T. Discovery of Disubstituted Imidazo[4,5-b]pyridines and Purines as Potent TrkA Inhibitors / T. Wang, M.L. Lamb, M.H. Block, A.M. Davies, Y. Han, E. Hoffmann, S. Ioannidis, J.A. Josey, Z.Y. Liu, P.D. Lyne, T. MacIntyre, P.J. Mohr, C.A. Omer, T. Sjögren, K. Thress, B. Wang, H. Wang, D. Yu, H.J. Zhang // ACS Med Chem Lett. 2012. Vol. 3. № 9. P. 705-709.
- 213. Wehrman T. Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors / T. Wehrman, X. He, B. Raab, A. Dukipatti, H. Blau, K.C. Garcia // Neuron. 2007. Vol. 53. № 1. P. 25-38.
- 214. Weickert C.S. Reduced brain-derived neurotrophic factor in prefrontal cortex of patients with schizophrenia. / C.S. Weickert, T.M. Hyde, B.K. Lipska, M.M. Herman, D.R. Weinberger, J.E. Kleinman // Mol. Psychiatry. – 2003. – Vol. 8. – P. 592–610.
- 215. Wellmer A. A double-blind placebo-controlled clinical trial of recombinant human brain-derived neurotrophic factor (rhBDNF) in diabetic polyneuropathy / A. Wellmer, V.P. Misra, M.K. Sharief, P.G. Kopelman, Anand P. // J Peripher Nerv Syst. – 2001. – Vol. 6. - № 4. – P. 204-210.
- 216. Wiesmann C. Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor / C. Wiesmann, M.H. Ultsch, S.H. Bass, A.M. de Vos // Nature. 1999. Vol. 401. № 6749. P. 184-188.
- 217. Williams G. Overcoming the inhibitors of myelin with a novel neurotrophin strategy / G. Williams, E.J. Williams, P. Maison, M.N. Pangalos, F.S. Walsh, P. Doherty // J Biol Chem. 2005. Vol. 280. № 7. P. 5862-5869.
- 218. Windisch J.M. Specific neurotrophin binding to leucine-rich motif peptides of TrkA and TrkB / J.M. Windisch, B. Auer, R. Marksteiner, M.E. Lang, R. Schneider // FEBS Lett. 1995. Vol. 374. № 1. P. 125-129.
- 219. Windisch J.M. Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 bind to a single leucine-rich motif of TrkB / J.M. Windisch, R. Marksteiner, M.E. Lang, B. Auer, R. Schneider // Biochemistry. 1995. Vol. 34. № 35. P.11256-11263.
- Wong A.W. TDP6, a brain-derived neurotrophic factor-based trkB peptide mimetic, promotes oligodendrocyte myelination / A.W. Wong, L. Giuffrida, R. Wood, H. Peckham, D. Gonsalvez, S.S. Murray, R.A. Hughes, J. Xiao // Mol. Cell. Neurosci. 2014. Vol. 63. P. 132-140.

- 221. Xiao J. A small peptide mimetic of brain-derived neurotrophic factor promotes peripheral myelination / J. Xiao, R.A. Hughes, J.Y. Lim, A.W. Wong, J.J. Ivanusic, A.H. Ferner, T.J. Kilpatrick, S.S. Murray // J. Neurochemistry. – 2013. – Vol. 125. – P. 386-398.
- 222. Xu B. The role of brain-derived neurotrophic factor receptors in the mature hippocampus: modulation of long-term potentiation through a presynaptic mechanism involving trkB / B. Xu, W. Gottschalk, A. Chow, R.I. Wilson, E. Schnell, K. Zang, D. Wang, R.A. Nicoll, B. Lu, L.F. Reichardt // J. Neurosci. 2000. Vol. 20. № 18. P. 6888–6897.
- 223. Xu R. Effects of synthetic neural adhesion molecule mimetic peptides and related proteins on the cardiomyogenic differentiation of mouse embryonic stem cells / R. Xu, S.P. Srinivasan, P. Sureshkumar, E.N. Nembo, C. Schäfer, J. Semmler, M. Matzkies, M. Albrechtsen, J. Hescheler, F. Nguemo // Cell Physiol Biochem. 2015. Vol. 35. № 6. P. 2437-2450.
- 224. Yan H. Disruption of cysteine-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligand binding / Yan H., Chao M.V. // J Biol Chem. 1991. Vol. 266. № 18. P. 12099-12104.
- 225. Yang T. A small molecule TrkB/TrkC neurotrophin receptor co-activator with distinctive effects on neuronal survival and process outgrowth / T. Yang, S.M. Massa, K.C. Tran, D.A. Simmons, J. Rajadas, A.Y. Zeng, T. Jang, S. Carsanaro, F.M. Longo // Neuropharmacology. – 2016. – Vol. 110(Pt A). – P. 343-361.
- 226. Yang T. The Role of BDNF on Neural Plasticity in Depression / T. Yang, Z. Nie, H. Shu, Y. Kuang, X. Chen, J. Cheng, S. Yu, H. Liu // Front Cell Neurosci. 2020. Vol.14. P.82.
- 227. Yang Y-J. Small-molecule TrkB agonist 7,8-dihydroxyflavone reverses cognitive and synaptic plasticity deficits in a rat model of schizophrenia / Y-J. Yang, Y-K. Li, W. Wang, J-G. Wan, B. Yu, M-Z. Wang, B. Hu // Pharmacol Biochem Behav. 2014. Vol. 122. P. 30–36.
- 228. Yu Q. 7,8,3'-Trihydroxyflavone, a potent small molecule TrkB receptor agonist, protects spiral ganglion neurons from degeneration both in vitro and in vivo / Q. Yu, Q. Chang, X. Liu, S. Gong, K. Ye, X. Lin // Biochem Biophys Res Commun. 2012. Vol. 422. № 3. P. 387-392.
- 229. Yu Q. Protection of spiral ganglion neurons from degeneration using small-molecule TrkB receptor agonists / Q. Yu, Q. Chang, X. Liu, Y. Wang, H. Li, S. Gong, K. Ye, X. Lin // J Neurosci. 2013. Vol. 33. № 32. P. 13042-13052.
- 230. Yu S.J. Local administration of AAV-BDNF to subventricular zone induces functional recovery in stroke rats / S.J. Yu, K.Y. Tseng, H. Shen, B.K. Harvey, M. Airavaara, Y. Wang // PLoS One. 2013. Vol. 8. № 12. e81750.
- 231. Zhang J.Y. Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents / J.Y. Zhang, X.G. Luo, C.J. Xian, Z.H. Liu, X.F. Zhou // Eur J Neurosci. – 2000. – Vol. 12. - № 12. – P. 4171-4180.

- Zhang M.W. 7,8-Dihydroxyflavone reverses the depressive symptoms in mouse chronic mild stress / M.W. Zhang, S.F. Zhang, Z.H. Li, F. Han // Neurosci Lett. 2016. Vol. 635. P. 33–38.
- 233. Zhang Y. Effects of BDNF-Transfected BMSCs on Neural Functional Recovery and Synaptophysin Expression in Rats with Cerebral Infarction / Y. Zhang, B. Qiu, J. Wang, Y. Yao, C. Wang, J. Liu // Mol Neurobiol. 2017. Vol. 54. № 5. P. 3813-3824.
- Zhang Z. 7,8-dihydroxyflavone prevents synaptic loss and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease / Z. Zhang, X. Liu, J.P. Schroeder, C.B. Chan, M. Song, S.P. Yu, D. Weinshenker, K. Ye // Neuropsychopharmacology. 2014. Vol. 39. № 3. P. 638-650.
- 235. Zhao S. Post-Injury Treatment of 7,8-Dihydroxyflavone Promotes Neurogenesis in the Hippocampus of the Adult Mouse / S. Zhao, A. Yu, X. Wang, X. Gao, J. Chen // J Neurotrauma.
   2016. Vol. 33. № 22. P.2055–2064.
- 236. Zhu S.W. Influence of differential housing on emocional behavior and neurotrophin levels in mice / S.W. Zhu, B.K. Yee, M. Nyffeler, B. Winblad, J. Feldon, A.H. Mohammed // Behav. Brain Res. 2006. Vol. 169. P. 10-20.
- 237. Zinkle A. A threshold model for receptor tyrosine kinase signaling specificity and cell fate determination / A. Zinkle, M. Mohammadi // A F1000Res. – 2018. – Vol. 7. – P. F1000 Faculty Rev-872.
- 238. Zintzaras E. Brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms and schizophrenia: a metaanalysis // Psychiatr Genet. – 2007. – Vol. 17. – № 2. – P. 69-75.
- 239. Zuccato C. Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease / C. Zuccato, E. Cattaneo // Prog Neurobiol. 2007. Vol. 81. № 5-6. P. 294-330.
- Zuccato C. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases / C. Zuccato, E.
   Cattaneo // Nat Rev Neurol. 2009. Vol. 5. № 6. P. 311-322.
- Zuccato C. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease / C.
  Zuccato, A. Ciammola, D. Rigamonti, B.R. Leavitt, D. Goffredo, L. Conti, M.E. MacDonald,
  R.M. Friedlander, V. Silani, M.R. Hayden, T. Timmusk, S. Sipione, E. Cattaneo // Science. –
  2001. Vol. 293. № 5529. P. 493-498.
## 9. БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю благодарность и признательность академику РАН Середенину С.Б. (научному руководителю ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова») и член-корреспонденту РАН Вахитовой Ю.В. (директору Института) за предоставленную возможность работать по такой интересной и перспективной теме. Выражаю благодарность и признательность моему руководителю член-корреспонденту РАН Гудашевой Т.А. за чуткое руководство работой и помощь в подготовке публикаций. Выражаю благодарность с.н.с., к.х.н. Сазоновой Н.М., инж. Помогайбо С.В, н.с., к.х.н. Курилову Д.В. за ценные советы и помощь в синтезе химических соединений; с.н.с., к. ф-м.н. Лезиной В.П. и н.с. Ребеко А.Г. за регистрацию и обсуждение ЯМРспектров соединений; зав. лаб., к.б.н. Антиповой Т.А. и н.с. Логвинову И.О. за проведение совместных *in vitro* исследований; с.н.с., к.б.н. Поварниной П.Ю. за проведение исследований на животных; н.с. Деевой О.А., в.н.с., к.х.н. Мокрову Г.В., с.н.с., к.б.н. Колясниковой К.Н и н.с. Григоркевич О.С. за дружескую поддержку.