

DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-11-22-30  
© Коллектив авторов, 2020

А. В. Тарасюк, Н. М. Сазонова, А. Г. Ребеко, И. О. Логвинов,  
С. В. Николаев, Т. А. Антипова, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин

## ДИЗАЙН, СИНТЕЗ ДИПЕПТИДНЫХ МИМЕТИКОВ 1-Й ПЕТЛИ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЙ И ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ *IN VITRO*<sup>#</sup>

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова», Россия, 125315, Москва, Балтийская, 8.

<sup>#</sup> Материал частично опубликован в форме академических тезисов [1].

\* Автор для связи: тел: 8(916)803-33-35;

e-mail: tata-sosnovka@mail.ru

Ранее в НИИ фармакологии имени В. В. Закусова был создан димерный дипептидный миметик наиболее экспонированной 4-й петли фактора роста нервов (NGF) гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина) (ГК-2), активирующий специфические TrkA рецепторы и обладающий нейропротекторной активностью *in vitro* ( $10^{-5}$  –  $10^{-9}$  М) и *in vivo* (0,1 – 10 мг/кг ip, po). В данной работе на основе бета-изгиба (-Lys<sup>32</sup>-Gly<sup>33</sup>-Lys<sup>34</sup>-Glu<sup>35</sup>-) 1-й петли NGF сконструирован и синтезирован его миметик гексаметилендиамид бис-(N-аминокапроил-глицил-L-лизина) (ГК-6). В структуре ГК-6 был сохранен центральный дипептидный фрагмент бета-изгиба -Gly<sup>33</sup>-Lys<sup>34</sup>-, остаток -Lys<sup>32</sup> заменен на его биоизомер — остаток 6-аминокапроновой кислоты и димерная структура NGF воспроизведена димеризацией по С-концу с помощью бивалентного гексаметилендиаминового спейсера. Для изучения связи структуры и активности ГК-6 проведена последовательная замена боковых групп а.о. пептида на водород и получены гексаметилендиамиды бис-(N-ацетил-глицил-L-лизина) (ГТС-611) и бис-(N-аминокапроил-глицил-лизина) (ГТС-613). Миметик ГК-6 и его аналог ГТС-613, содержащие в своей структуре N-аминокапроильный радикал, обладают нейропротекторным эффектом в концентрациях  $10^{-6}$  и  $10^{-5}$  М в условиях окислительного стресса на культуре нейронов HT22. Дипептид ГТС-611, в котором аминокaproильный фрагмент заменен на ацетильный, в этих условиях нейропротекторной активностью не обладал, что говорит о важности Lys<sup>32</sup> в NGF для ее проявления. В отличие от миметика 4-й петли ГК-2, миметики 1-й петли ГК-6 и ГТС-611 проявляли дифференцированную активность на клетках PC12.

**Ключевые слова:** миметик; дипептид; ГК-6; ГТС-611; ГТС-613; NGF; нейропротекторная активность; дифференцирующая активность; связь структура — активность.

Ранее в НИИ фармакологии имени В. В. Закусова на основе структуры β-изгиба наиболее экспонированной 4-й петли фактора роста нервов (NGF) был создан димерный дипептидный миметик гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина) (ГК-2) [1 – 5]. Показано, что ГК-2 способен активировать TrkA рецептор и PI3/Акт-сигнальный путь [6, 7]. В экспериментах *in vitro* ГК-2 в микроаномольных концентрациях проявлял свойственную NGF нейропротекторную активность [8]. В экспериментах *in vivo* нейропротекторные свойства ГК-2 установлены на экспериментальных моделях болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и ишемического инсульта головного мозга [7]. В отличие от полноразмерного NGF, ГК-2 не обладал дифференцирующей активностью [1].

В настоящей работе получены 3 миметика другой, 1-й петли NGF. Изучено *in vitro* их влияние на нейропротекторную и дифференцирующую активность. При конструировании новых миметиков мы основывались на литературных данных по кристаллической структуре гомодимера NGF (pdb ID: 1btg) [9]. Можно видеть, что 1-я петля NGF также, как и 4-я, экспони-

рована, что может обеспечить вклад в связывание нейротрофина с TrkA рецептором. Основой для моделирования выбрана последовательность наиболее экспонированной части 1-й петли NGF, ее β-изгиба (-Lys<sup>32</sup>-Gly<sup>33</sup>-Lys<sup>34</sup>-Glu<sup>35</sup>-). В структуре миметика сохраняли центральный дипептидный фрагмент β-изгиба (Gly<sup>33</sup>-Lys<sup>34</sup>), который, исходя из геометрических соображений, способен наиболее глубоко проникать в зону связывания рецептора и наиболее полно распознаваться им. Предшествующий аминокислотный остаток Lys<sup>32</sup> заменяли его биоизомером — остатком 6-аминокапроновой кислоты. Основываясь на данных о взаимодействии нейротрофинов с Trk-рецепторами в димерной форме, 2 миметика β-изгиба были димеризованы голова-к-голове гексаметилендиаминовым спейсером. Таким образом, был получен димерный дипептидный миметик 1-й петли NGF ГК-6 – гексаметилендиамид бис-(N-аминокапроил-глицил-L-лизина). Для изучения влияния природы N-ацильного и бокового радикала лизина на активность ГК-6 были сконструированы 2 аналога ГК-6 (рис. 1): гексаметилендиамид бис-(N-ацетил-глицил-L-лизина) (ГТС-611) и

гексаметилендиамид бис-(N-аминокапроил-глицил-глицина) (ГТС-613). Их нейропротекторная активность изучена *in vitro* на нейрональной культуре НТ-22 в условиях окислительного стресса, вызванного H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Кроме того, для миметиков ГК-6 и ГТС-611 на клетках РС-12 изучена дифференцировочная активность.

### Экспериментальная химическая часть

В работе использовали коммерчески доступные L-аминокислоты и их производные фирм Sigma и Fluka. Температуру плавления определяли на приборе Optimet MPA100 (Stanford Research Systems, США) в открытых капиллярах без корректировки. Спектры <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР регистрировали по шкале δ, м.д., на спектрометре Bruker FOURIER 300 HD (300 и 75 МГц, соответственно) в растворах ДМСО-d<sub>6</sub>, внутренний стандарт тетраметилсилан (0 м.д.). Отнесение сигналов сделано на основании анализа одномерных и двумерных гомоядерных спектров <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY и гетероядерных спектров <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C COSY (HSQC и HMBC).

Удельное оптическое вращение регистрировали на автоматическом поляриметре ADP 440 Polarimeter (Bellingham+Stanley Ltd., Великобритания). ТСХ выполняли на стеклянных пластинках DC Kieselgel 60 G/F<sub>254</sub> (Merck, Германия) в системах растворителей: хлороформ – метанол, 6:1 (А); хлороформ – ацетон, 2:1 (Б); хлороформ – метанол – вода – уксусная кислота, 15:10:2:3 (В); хлороформ – метанол – вода – уксусная кислота, 8:10:2:3 (Г); *n*-бутанол – уксусная кислота – вода, 3:1:1 (Д); хлороформ – метанол – вода – уксусная кислота, 10:15:2:3 (Е); бензол – метанол, 2:1 (И); диоксан – вода, 9:1 (К).

Аминосодержащие соединения обнаруживали нингидрином, соединения с амидными группами – хлор-толидиновой пробой, соединения с открытой карбоксильной группой – бромкрезоловым зеленым, содержащие ароматические группы соединения – в УФ-лучах.

ДМФА очищали перегонкой над нингидрином. Диэтиловый эфир хранили над твердым NaOH. Этилацетат, дихлорметан, хлороформ, бензол, ацетон, гексан, петролейный эфир, MeOH и этанол (все х.ч.) использовали без дополнительной очистки.

Соединения, полученные ранее в нашей лаборатории: Z-Gly-OH (1), Z-Gly-OSu (2), (Z-Gly-L-Lys(Boc)-NH)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (8), (H-Gly-L-Lys-(Boc)-NH)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (9) [17]; Z-L-Lys(Boc)-OSu (5), (Z-L-Lys(Boc)-NH)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (6), (H-L-Lys(Boc)-NH)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (7) [18].

### Синтез исходных соединений

**N-трет-Бутилоксикарбонил-6-аминогексановая кислота, (Boc-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-COOH) (3)** получена по методу [11]. К раствору 15,00 г (114,4 ммоль) 6-аминокапроновой кислоты в 115 мл 1 М NaOH и при перемешивании последовательно приливали раствор 5,72 г NaHCO<sub>3</sub> в 57,2 мл воды и 115 мл изопропилового спирта. Далее при комнатной температуре к реакционной массе порционно прибавляли 35 мл (139,5 ммоль) ди-трет-бутилпироксикарбоната в течение 20 мин и пе-

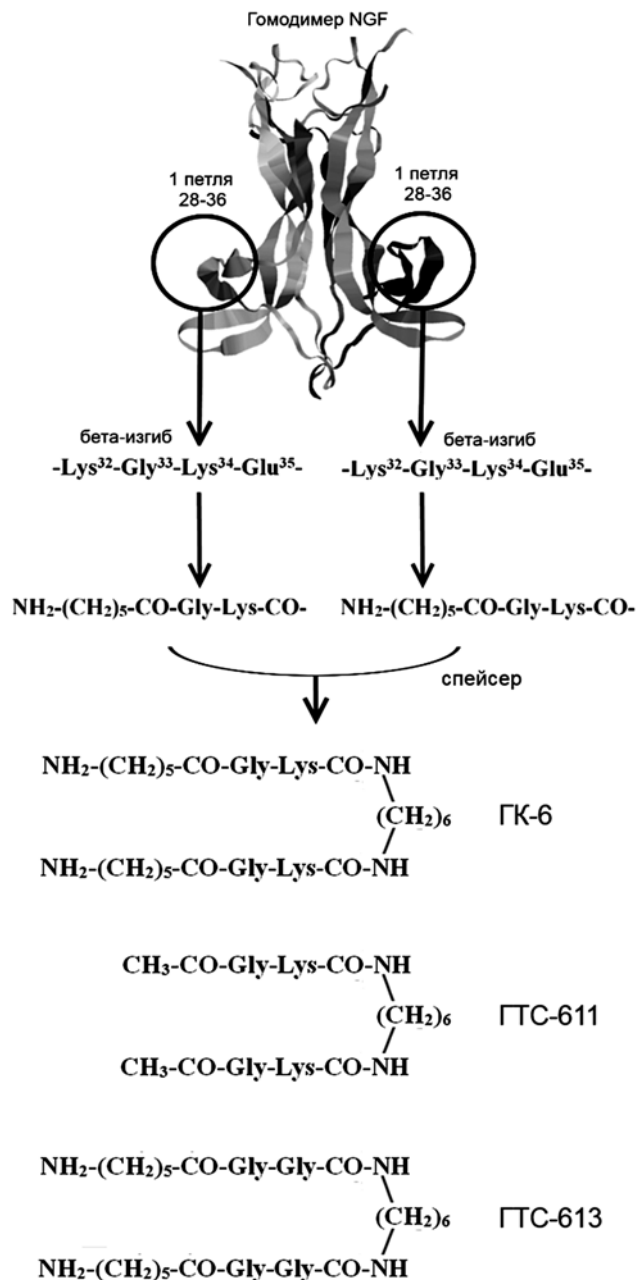


Рис. 1. Конструирование миметиков NGF ГК-6, ГТС-611 и ГТС-613.

ремешивали 18 ч. Реакционную массу разбавляли 150 мл воды и экстрагировали 2 × 110 мл петролейного эфира (для удаления избытка ди-трет-бутилпироксикарбоната). Водный раствор подкисляли 1 М HCl при температуре 0–5 °С до pH ~ 3,0 и экстрагировали продукт 3 × 200 мл этилацетата. Раствор этилацетата промывали 200 мл воды, 190 мл насыщенного раствора NaCl, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Получали 21,82 г (~ 82 %) продукта в виде желтого масла, которое сушили в вакууме и использовали в дальнейшем без очистки. R<sub>f</sub> 0,74 (А), R<sub>f</sub> 0,65 (Б), R<sub>f</sub> 0,79 (этилацетат). Спектр <sup>1</sup>H ЯМР ДМСО-d<sub>6</sub>, δ, м.д.: 1,19–1,26 (м, 2H, C<sup>α</sup>H<sub>2</sub> Аса), 1,30–1,36 (м, 11H, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Аса, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 1,42–1,52 (м, 2H, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Аса), 2,17 (т, J

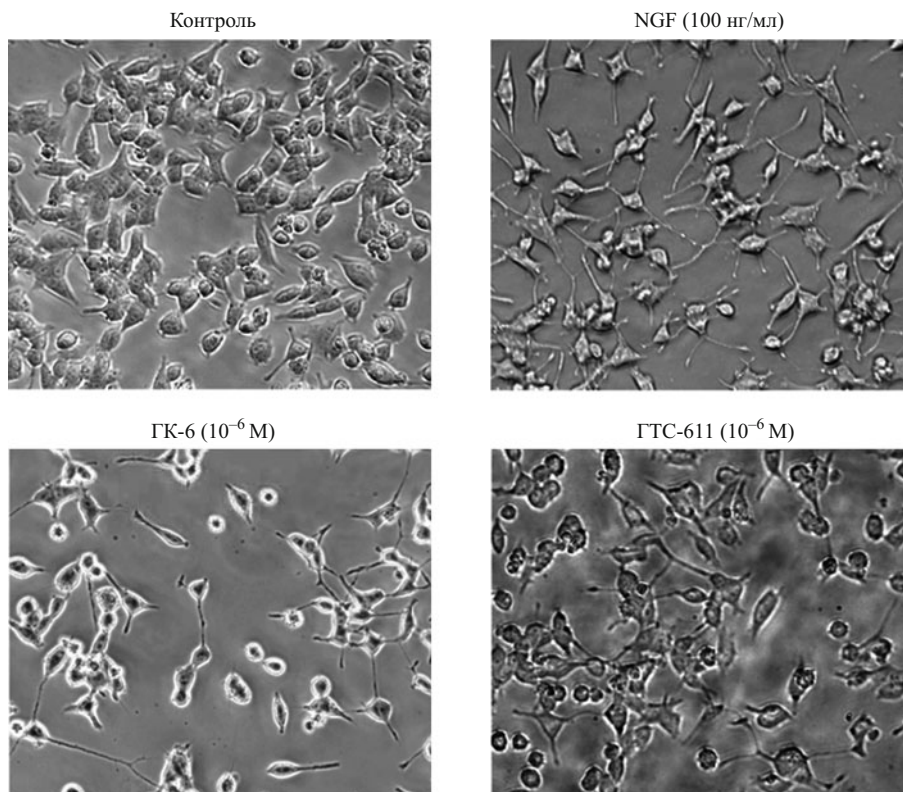


Рис. 2. Дифференцировочная активность пептидов ГК-6 и ГТС-611 на клетках феохромоцитомы крысы линии PC-12. Фазовый контраст, увеличение  $\times 100$

7,4 Гц, 2H,  $C^{\alpha}H_2$  Аса), 2,87 (м, J 5,4 Гц, 2H,  $C^{\epsilon}H_2$  Аса), 6,78 (т,  $^3J$  5,40 Гц, 1H,  $NH-(CH_2)_5-CO$  Аса), 12,00 (с, 1H, COOH).

**N-Оксисукцинимидный эфир *трет*-бутилоксикарбонил-6-аминогексановой кислоты, (Вос-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-COOSu) (4).** К раствору 21,82 г (0,0943 моль) Вос-Аса-ОН в 150 мл этилацетата при перемешивании последовательно добавляли 11,94 г (0,1037 моль) N-гидроксисукцинимид и 80 мл этилацетата. Реакционную смесь охлаждали до 0 – + 5 °С и прикапывали раствор 22,38 г (0,1084 моль) ДЦГК в 120 мл этилацетата. Реакционную смесь перемешивали при охлаждении в течение 1,5 ч и 20 ч при комнатной температуре. Затем добавляли 1,26 г щавелевой кислоты (для удаления избытка ДЦГК), выдерживали 1 ч, осадок ДЦГМ отфильтровывали, промывали на фильтре 100 мл этилацетата. Фильтрат упаривали в вакууме при температуре 45 °С. Полученное масло затирали под диэтиловым эфиром, выдерживали ночь в холодильнике, образовавшийся осадок отфильтровывали, хорошо отжимали, сушили в эксикаторе над CaCl<sub>2</sub>. Выход 27,87 г (~ 90 %), белое кристаллическое вещество.  $R_f$  0,88 (А),  $R_f$  0,82 (этилацетат);  $T_{пл}$  81 – 85 °С. Спектр <sup>1</sup>H ЯМР ДМСО-d<sub>6</sub>,  $\delta$ , м.д.: 1,31 – 1,37 (м, 13H,  $C^{\gamma}H_2$   $C^{\delta}H_2$  Аса, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 1,56 – 1,65 (м, 2H,  $C^{\beta}H_2$  Аса), 2,65 (т, J 7,4 Гц, 2H,  $C^{\alpha}H_2$  Аса), 2,80 (с, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- OSu), 2,89 (м, J 5,4 Гц, 2H,  $C^{\epsilon}H_2$  Аса), 6,79 (т, J 5,4 Гц, 1H, NH Аса).

**N-Оксисукцинимидный эфир уксусной кислоты (Ac-OSu)** получали как описано [19] из 13,4 г

(0,1164 моль) N-гидроксисукцинимид с выходом 96 %.  $R_f$  0,85 (А),  $R_f$  0,56 (этилацетат),  $R_f$  0,70 (К);  $T_{пл}$  130 – 134 °С. Спектр <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>),  $\delta$ , 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 [19]:  $T_{пл}$  133 – 134 °С.

**N-трет-Бутилоксикарбонил-глицин, (Вос-Gly-OH) (12)** получали по методу [11] с выходом 81 %.  $R_f$  0,85 (В), 0,91 (Д),  $R_f$  0,25 (Б);  $T_{пл}$  88 – 91 °С. Лит. данные [20]:  $T_{пл}$  87 – 88 °С.

**N-Оксисукцинимидный эфир *трет*-бутилоксикарбонил-глицина, (Вос-Gly-OSu) (13)** получали аналогично [18], выход 81 %.  $R_f$  0,76 (В),  $R_f$  0,75 (Б),  $R_f$  0,81 (этилацетат);  $T_{пл}$  131 – 134 °С. Лит. данные [21]:  $T_{пл}$  155 °С.

**Синтез гексаметилендиамида бис-(6-аминокапроил-глицил-L-лизина), ГК-6**

**Гексаметилендиамид бис-(N-трет-бутилоксикарбонил-6-аминокапроил-глицил-N<sup>ε</sup>-трет-бутилоксикарбонил-лизина), (Вос-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-CO-Gly-L-Lys(Вос)-NH-)(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (10).** К раствору 4,50 г (6,6 ммоль) (H-Gly-L-Lys(Вос)-NH-)(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (9) в 40 мл ДМФА прибавляли раствор 4,73 г (14,4 ммоль) Вос-Аса-OSu в 45 мл ДМФА, перемешивали 12 ч при комнатной температуре, затем прибавляли 0,16 мл N,N-диметил-1-аминопропана (ДМАПА) и перемешивали 30 мин. Реакционную смесь разбавляли 200 мл этилацетата, 150 мл воды, водный слой экстрагировали 200 мл этилацетата. Этилацетатный раствор промывали 100 мл воды, упаривали, к остатку добавляли 200 мл диэтилового эфира и выдерживали ночь в холо-

дильнике, осадок отфильтровывали и промывали диэтиловым эфиром (30 мл). Сушили в эксикаторе над  $\text{CaCl}_2$ , получали 6,2 г (~ 85 %) хроматографически гомогенного продукта в виде кристаллического вещества белого цвета.  $R_f$  0,90 (В),  $R_f$  0,81 (Д),  $R_f$  0,6 (А);  $T_{\text{пл}}$  148 – 155 °С. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м.д.: 1,23, 1,37, 1,45 и 1,61 (четыре м, 64Н, 2  $\text{C}^\beta\text{H}_2\text{C}^\alpha\text{H}_2\text{C}^\delta\text{H}_2$  Lys, -NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-, 2  $\text{C}^\delta\text{H}_2\text{C}^\beta\text{H}_2\text{C}^\alpha\text{H}_2$  Аса, 4 -O(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, Вос), 2,11 (т, J 6,8 Гц, 4Н, 2  $\text{C}^\alpha\text{H}_2$  Аса), 2,87 (м, 8Н, 2  $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$  Lys, 2  $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$  Аса), 3,02 (м, 4Н, HN-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-), 3,68 (уш.с, 4Н, 2 CH<sub>2</sub> Gly), 4,15 (м, 2Н, 2  $\text{C}^\alpha\text{H}$  Lys), 6,75 (уш.с, 4Н, 2  $\text{N}^\epsilon\text{H}$  Lys и 2 NH Аса), 7,87 – 7,90 (м, 2Н, 2 NH Lys, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-), 8,05 (уш.с, 2Н, 2 NH Gly).

**Ацетат гексаметилендиамида бис-(N-6-аминокапроил-глицил-L-лизина), 4CH<sub>3</sub>COOH · (Аса-Gly-L-Lys-NH-)<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (ГК-6).** Соединение **10** (6,2 г, 5,6 ммоль) обрабатывали 100 мл 100 % ТФУ, через 1 ч реакционную смесь упаривали и остаток растирали с 200 мл диэтилового эфира. Растворитель декантировали, полученный продукт растворяли в 500 мл воды и очищали на колонке со 100 мл SP-сефадекса в градиенте 0,1 М → 0,6 М пиридин-ацетатного буфера с добавлением аммиака. Соответствующие фракции (ТСХ контроль) собирали и упаривали, переупаривали с изопропанолом, полученный остаток сушили в вакуум-эксикаторе над  $\text{CaCl}_2$  и получали 3,6 г (90 %) конечного продукта в виде твердого белого вещества.  $R_f$  0,02 (В),  $R_f$  0,08 (Д),  $R_f$  0,50 (Е);  $[\alpha]_D^{20}$  – 23,34° (с, 1; вода). Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м.д.: 1,23, 1,27, 1,37, 1,48 и 1,61 (пять м, 32Н, 2  $\text{C}^\beta\text{H}_2\text{C}^\alpha\text{H}_2\text{C}^\delta\text{H}_2$  Lys, -NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-, 2  $\text{C}^\delta\text{H}_2\text{C}^\beta\text{H}_2\text{C}^\alpha\text{H}_2$  Аса), 1,73 (с, 12Н, 4CH<sub>3</sub> Ас), 2,12 (т, J 7,2 Гц, 4Н, 2  $\text{C}^\alpha\text{H}_2$  Аса), 2,64 (м, 8Н, 2  $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$  Lys, 2  $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$  Аса), 3,01 (м, 4Н, HN-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-), 3,67 (уш.с, 4Н, 2 CH<sub>2</sub> Gly), 4,16 (м, 2Н, 2  $\text{C}^\alpha\text{H}$  Lys), 8,08 (т, J 5,3 Гц, 2Н, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-), 8,18 (д, J 8,0 Гц, 2Н, 2 NH Lys), 8,46 (т, J 5,6 Гц, 2Н, 2 NH Gly). 2N<sup>+</sup>H<sub>3</sub> Lys и 2N<sup>+</sup>H<sub>3</sub> Аса обмениваются с H<sub>2</sub>O растворителя.

#### Синтез гексаметилендиамида бис-(N-ацетил-глицил-L-лизина), ГТС-611

**Гексаметилендиамид бис-(N-ацетил-глицил-N $\epsilon$ -трет-бутилоксикарбонил-L-лизина), (Ac-Gly-L-Lys-(Вос)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (11).** К раствору 3,0 г (4,36 ммоль) (H-Gly-L-Lys-(Вос)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (**9**) в 40 мл ДМФА при перемешивании на магнитной мешалке и при температуре +5 °С одномоментно прибавляли 1,51 г (9,59 ммоль) AcOSu. Реакционную смесь выдерживали при этой температуре 1,5 ч, далее 12 ч при комнатной температуре. ДМФА упаривали в вакууме при температуре 40 °С, к “гелевому” остатку приливали 40 мл ацетона и выдерживали 1 ч до формирования кристаллического осадка. Ацетоновый раствор декантировали, осадок промывали горячим ацетоном 2 × 30 мл с фильтрованием на насадке для гигроскопических веществ, сушили в вакууме водоструйного насоса 2 ч, далее в эксикаторе над  $\text{CaCl}_2$ , получали 2,3 г (81 %) хроматографически гомогенного продукта (**11**) в виде белых кристаллов с легким бежевым оттенком.

$R_f$  0,91 (Г),  $R_f$  0,82 (И),  $R_f$  0,78 (этилацетат);  $T_{\text{пл}}$  125 – 139 °С. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м.д.: 1,21, 1,36 и 1,59 (три м, 38Н, 2  $\text{C}^\alpha\text{H}_2$   $\text{C}^\delta\text{H}_2$   $\text{C}^\beta\text{H}_2$  Lys, -NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Вос), 1,84 (с, 6Н, 2 CH<sub>3</sub> Ас), 2,86 (м, 4Н, 2  $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$  Lys), 3,00 (м, 4Н, -NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-), 3,69 (уш.с, 4Н, 2 CH<sub>2</sub> Gly), 4,14 (м, 2Н, 2  $\text{C}^\alpha\text{H}$  Lys), 6,76 (т, J 5,4 Гц, 2Н, 2  $\text{N}^\epsilon\text{H}$  Lys), 7,84 (т, J 5,4 Гц 2Н, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-), 7,93 (д, J 7,7 Гц, 2Н, 2 NH Lys), 8,10 (т, J 5,3 Гц, 2Н, 2 NH Gly).

**Дитрифторацетат гексаметилендиамида бис-(N-ацетил-глицил-L-лизина), 2CF<sub>3</sub>COOH · (Ac-Gly-L-Lys-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (ГТС-611).** Раствор 0,3 г (0,46 ммоль) соединения **11** в 10 мл смеси 100 % ТФУ и CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> в соотношении 1:1 перемешивали при комнатной температуре 2 ч, затем реакционную массу упаривали, переупаривали с хлористым метиленом (2 × 15 мл), остаток затирали под сухим диэтиловым эфиром с декантацией (3 × 20 мл) и оставляли под диэтиловым эфиром (20 мл) на 2 ч для формирования осадка. Осадок отфильтровывали и сушили на насадке для гигроскопических веществ, досушивали в эксикаторе под вакуумом над  $\text{CaCl}_2$  (15 мм рт. ст.). Получали 0,26 г (87 %) хроматографически гомогенного продукта в виде белого кристаллического вещества ( $T_{\text{пл}}$  не измеряли, гигроскопично).  $R_f$  0,27 (Г). Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м.д.: 1,21, 1,36, 1,49 и 1,64 (четыре м, 20Н, 2  $\text{C}^\alpha\text{H}_2$   $\text{C}^\delta\text{H}_2$   $\text{C}^\beta\text{H}_2$  Lys, -NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-), 1,84 (с, 6Н, 2 CH<sub>3</sub> Ас), 2,74 (м, 4Н, 2  $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$  Lys), 3,01 (м, 4Н, -NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-), 3,69 (д, J 4,0 Гц, 4Н, 2 CH<sub>2</sub> Gly), 4,16 (м, 2Н, 2  $\text{C}^\alpha\text{H}$  Lys), 7,74 (уш.с, 6Н, 2 N<sup>+</sup>H<sub>3</sub> Lys), 7,88 (т, J 7,9 Гц, 2Н, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-), 8,01 (д, J 8,0 Гц, 2Н, 2 NH Lys), 8,18 (т, J 8,2 Гц, 2Н, 2 NH Gly).

#### Синтез гексаметилендиамида бис-(N-6-аминокапроил-глицил-глицина), ГТС-613

**Гексаметилендиамид бис-(трет-бутилоксикарбонил-глицина), (Вос-Gly-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (14).** К раствору 13,9 г (51 ммоль) Вос-Gly-OSu (**13**) в 70 мл ДМФА, при перемешивании приливали раствор 2,7 г (23,22 ммоль) гексаметилендиамина в 30 мл ДМФА, при этом выпадало небольшое количество сероватого осадка, который через 2,5 ч полностью растворялся. Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре, далее оставляли на ночь без перемешивания. ДМФА упаривали в вакууме при температуре 40 °С, к остатку приливали 200 мл дистиллированной воды, предварительно нагретой до 43 – 45 °С и оставляли при комнатной температуре до формирования осадка. Хорошо сформированный осадок отфильтровывали, промывали водой до нейтральной реакции и 50 мл гексана, сушили на воздухе. Получали 9,0 г (90 %) хроматографически гомогенного соединения **14** в виде белого кристаллического вещества.  $R_f$  0,91 (В),  $R_f$  0,88 (Д),  $R_f$  0,13 (Б);  $T_{\text{пл}}$  60 – 62 °С. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР ДМСО- $d_6$ ,  $\delta$ , м.д.: 1,23 (м, 4Н, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-), 1,37 (уш.с, 22Н, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3,03 (м, 4Н, -NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-), 3,48 (д, J

6,0 Гц, 4Н, 2 CH<sub>2</sub> Gly), 6,86 (т, J 6,0 Гц, 2Н, 2NH Gly), 7,68 (т, J 5,1 Гц, 2Н, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-).

**Дитрифторацетат гексаметилендиамида бис-глицина, 2CF<sub>3</sub>COOH · (H-Gly-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (15).** Раствор 2,0 г (46,45 ммоль) соединения **14** в смеси 25 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> и 10 мл 100 % ТФУ перемешивали при комнатной температуре 2 ч, затем реакционную массу упаривали, переупаривали с хлористым метиленом (2 × 15 мл), остаток затирали под сухим диэтиловым эфиром с декантацией (3 × 20 мл) и оставляли под диэтиловым эфиром (20 мл) на 2 ч для формирования осадка. Осадок отфильтровывали и сушили на насадке для гигроскопичных веществ. Получали 1,9 г (90 %) хроматографически гомогенного продукта **15** в виде белого кристаллического вещества (*T*<sub>пл</sub> не измеряли, гигроскопично). *R*<sub>f</sub> 0,33 (Г), *R*<sub>f</sub> 0,28 (Д); *T*<sub>пл</sub> 165 – 167,5 °С. Спектр <sup>1</sup>Н ЯМР ДМСО-d<sub>6</sub>, δ, м.д.: 1,27 (м, 4Н, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-), 1,41 (м, 4Н, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-), 3,10 (м, 4 Н, -NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-), 3,52 (уш.с, 4Н, 2 CH<sub>2</sub> Gly), 8,10 (уш. с, 6Н, 2 N<sup>+</sup>H<sub>3</sub> Gly), 8,39 (т, J 5,2 Гц, 2Н, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-).

**Гексаметилендиамид бис-(трет-бутилоксикарбонил-глицил-глицина), (Boc-Gly-Gly-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (16).** К раствору 1,0 г (2,18 ммоль) соединения **15** в 15 мл ДМФА приливали 0,83 мл (4,8 ммоль) ДИПЭА и при перемешивании прибавляли 1,31 г (4,8 ммоль) Вос-Gly-OSu (**13**). Реакционную смесь перемешивали 4 ч при комнатной температуре, далее оставляли на ночь без перемешивания. ДМФА упаривали в вакууме роторного испарителя при температуре 53 °С, далее переупаривали с водой (3 × 20 мл), к остатку приливали 50 мл дистиллированной воды, предварительно нагретой до 45 °С, и оставляли до формирования осадка. Осадок отфильтровывали, промывали водой до нейтральной pH, далее гексаном (20 мл) и ацетоном (20 мл), сушили на воздухе, получали 0,97 г (82 %) хроматографически гомогенного продукта **16** в виде белого кристаллического вещества. *R*<sub>f</sub> 0,88 (В), *R*<sub>f</sub> 0,73 (Д), *R*<sub>f</sub> 0,36 (А); *T*<sub>пл</sub> 131 – 134 °С. Спектр <sup>1</sup>Н ЯМР ДМСО, δ, м.д.: 1,24 (м, 4Н, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-), 1,39 (уш.с, 22Н, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-, 2 -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3,03 (м, 4 Н, -NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-), 3,55 и 3,65 (два д, J 5,8 и 5,6 Гц, 8Н, 2 CH<sub>2</sub> <sup>1</sup>Gly и 2 CH<sub>2</sub> <sup>2</sup>Gly), 7,04 и 8,01 (два т, J 5,4, 5,1 Гц, 4Н, 2NH <sup>1</sup>Gly и 2 NH <sup>2</sup>Gly), 7,68 (т, J 5,1 Гц, 2Н, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-).

**Дитрифторацетат гексаметилендиамида бис-(глицил-глицина), 2CF<sub>3</sub>COOH · (H-Gly-Gly-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (17).** Раствор 2,0 г (46,45 ммоль) соединения **16** в смеси 30 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> и 15 мл 100 % ТФУ перемешивали при комнатной температуре 2 ч, затем реакционную массу упаривали, переупаривали с хлористым метиленом (2 × 15 мл), остаток промывали (энергично встряхивая) сухим диэтиловым эфиром с декантацией (2 × 15 мл), остаток диэтилового эфира упаривали, к остатку приливали 35 мл ацетонитрила (масло полностью растворяется), выдерживали 30 мин, выпавший осадок отфильтровывали и сушили на насадке для гиг-

роскопичных веществ. Получали 1,89 г (90 %) хроматографически гомогенного продукта **17** в виде белого кристаллического вещества. *R*<sub>f</sub> 0,18 (В), *R*<sub>f</sub> 0,14 (Д); *T*<sub>пл</sub> 175 – 178 °С. Спектр <sup>1</sup>Н ЯМР ДМСО-d<sub>6</sub>, δ, м.д.: 1,23 (м, 4Н, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-), 1,37 (м, 4Н, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-), 3,04 (м, 4 Н, -NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-), 3,61 (м, 4Н, 2CH<sub>2</sub> <sup>2</sup>Gly), 3,75 (д, J 5,7 Гц, 4Н, 2 CH<sub>2</sub> <sup>1</sup>Gly), 7,96 (т, J 5,5 Гц, 2Н, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-), 8,11 (уш. с, 6Н, 2 N<sup>+</sup>H<sub>3</sub> <sup>2</sup>Gly), 8,64 (т, J 5,7 Гц 2Н, NH <sup>1</sup>Gly).

**Гексаметилендиамид бис-(N-6-трет-бутилоксикарбонил-аминокапроил-глицил-глицина), (Boc-Aca-Gly-Gly-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (18).** Дитрифторацетат **17** массой 1,89 г (3,3 ммоль) растворяли в 25 мл ДМФА и приливали 1,22 мл (7 ммоль) ДИПЭА, при этом реакционная масса приобретала гелевый вид, далее приливали раствор 2,28 г (7,3 ммоль) Вос-Aca-OSu (**4**) в 15 мл ДМФА и перемешивали 18 ч, ДМФА упаривали на роторном испарителе в вакууме масляного насоса при температуре 40 °С. К остатку в виде подвижного геля желтого цвета приливали 40 мл ацетонитрила и оставляли на ночь для формирования осадка. Осадок отфильтровывали, промывали 15 мл ацетонитрила и 15 мл диэтилового эфира. Выход 1,77 г (70 %), белый кристаллический продукт. *R*<sub>f</sub> 0,83 (В), *R*<sub>f</sub> 0,11 (А); *T*<sub>пл</sub> 220 °С (с разлож.). Спектр <sup>1</sup>Н ЯМР ДМСО-d<sub>6</sub>, δ, м.д.: 1,22 (м, 8Н, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-, 2 C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> Aca), 1,36 (м, 8Н, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-, 2 C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub> Aca), 1,47 (м, 4Н 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Aca), 2,11 (т, J 5,7 Гц 2Н, 2 C<sup>α</sup>H<sub>2</sub> Aca), 2,87 (м, 4Н, 2 C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> Aca), 3,03 (м, 4 Н, -NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-), 3,63 (д, J 6,0 Гц 4Н, 2CH<sub>2</sub> <sup>2</sup>Gly), 3,66 (д, J 6,0 Гц, 4Н, 2 CH<sub>2</sub> <sup>1</sup>Gly), 6,78 (т, J 5,0 Гц 2Н, 2 NH Aca), 7,72 (т, <sup>3</sup>J 5,5 Гц, 2Н, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-), 8,09 (т, J 5,5 Гц, 2Н, 2NH <sup>2</sup>Gly), 8,14 (т, J 5,0 Гц 2Н, NH <sup>1</sup>Gly).

**Дитрифторацетат гексаметилендиамида бис-(N-6-аминокапроил-глицил-глицина), 2CF<sub>3</sub>COOH · (Aca-Gly-Gly-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (ГТС-613).** Раствор 0,30 г (0,389 ммоль) соединения **18** в 5 мл смеси 100 % ТФУ и 15 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> перемешивали при комнатной температуре 2 ч, реакционную массу упаривали, затем переупаривали с хлористым метиленом (2 × 15 мл), остаток затирали под сухим диэтиловым эфиром с декантацией (3 × 20 мл) и оставляли под диэтиловым эфиром (20 мл) на 2 ч для формирования осадка. Осадок отфильтровывали и сушили на насадке для гигроскопичных веществ, досушивали в эксикаторе под вакуумом над CaCl<sub>2</sub> (15 мм рт. ст.), получали 0,23 г (87 %) хроматографически гомогенного ГТС-613 в виде белого кристаллического вещества. *R*<sub>f</sub> 0,18 (В), *R*<sub>f</sub> 0,14 (Д); *T*<sub>пл</sub> 112 – 120 °С (с разлож.). Спектр <sup>1</sup>Н ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>), δ, м.д.: 1,23 – 1,26 (м, 4Н, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-), 1,29 – 1,31 (м, 4Н, 2 C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> Aca), 1,38 (м, 4Н, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-), 1,46 – 1,57 (м, 8Н, 2C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub> и 2C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Aca), 2,11 (т, J 7,4 Гц, 4Н, 2 C<sup>α</sup>H Aca), 2,77 (м, 4Н, 2 C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> Aca), 3,03 (м, 4Н, -NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3,65 и 3,69 (два д, J 5,8, 5,6 Гц, 8Н, 2 CH<sub>2</sub> <sup>2</sup>Gly и 2CH<sub>2</sub> <sup>1</sup>Gly), 7,75 (уш.с, 8Н, 2 N<sup>+</sup>H<sub>3</sub> Aca, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-), 8,10 и 8,16 (два т, J 5,8,

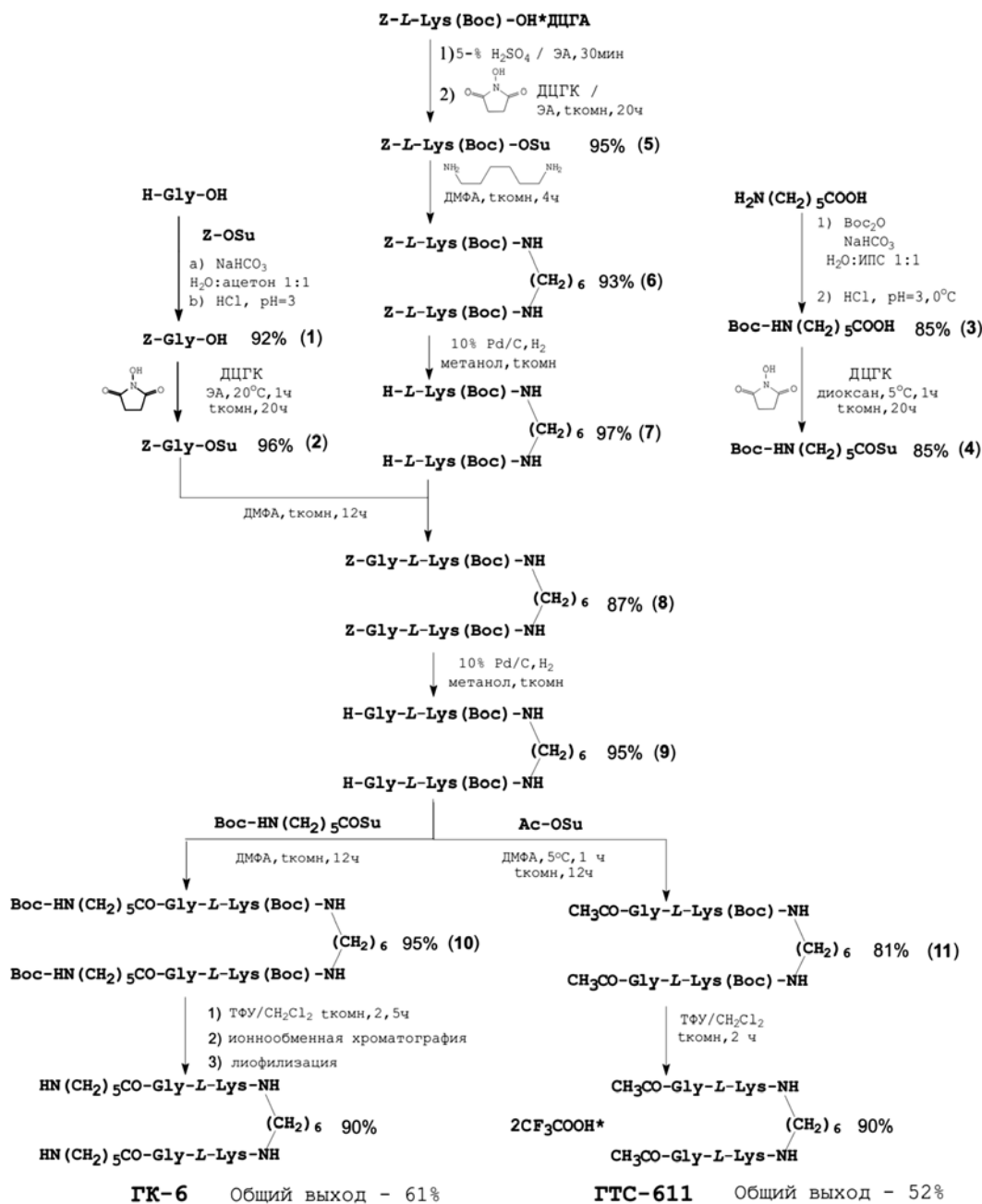


Схема 1. Синтез дипептидных миметиков 1-й петли NGF ГК-6 и ГТС-611

5,6 Гц, 2 NH <sup>2</sup>Gly и 2NH <sup>1</sup>Gly). Спектр <sup>13</sup>C ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>), δ, м.д.: 173,18 (с, 2C, 2CO, Aca), 169,86 и 168,94 (два с, 4C, 2CO <sup>2</sup>Gly и 2CO <sup>1</sup>Gly), 158,79 (кв, 2C, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> 34,27 Гц, CF<sub>3</sub>COOH), 116,84 (кв, 2C, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> 295,03 Гц, CF<sub>3</sub>COOH), 42,74 и 42,47 (два с, 4C, 2C<sup>α</sup> <sup>2</sup>Gly и 2C<sup>α</sup> <sup>1</sup>Gly), 39,21 (с, 2C, 2 C<sup>ε</sup> Aca), 38,94 (с, 2C, 2 C<sup>1</sup> спейсера), 35,32 (с, 2C, 2 C<sup>δ</sup> Aca), 29,46 (с, 2C, C<sup>2</sup> спейсера), 27,29 (с, 2C, 2 C<sup>δ</sup> Aca), 26,51 (с, 2C, 2 C<sup>3</sup> спейсера), 25,95 (с, 2C, 2C<sup>γ</sup> Aca), 25,01 (с, 2C, 2C<sup>β</sup> Aca).

#### Экспериментальная биологическая часть

**Нейропротекторную активность** соединений определяли [13] на культуре immortalized клеток гиппокампа мыши линии HT-22. Клетки рассеивали в 96-луночных планшетах с плотностью 3500 клеток на

луночку в среде DMEM (HyClone, США), содержащей 5 % телячьей эмбриональной сыворотки (Gibco, США) и 2 mM L-глутамин (ICNPharmaceuticals, США), и инкубировали при 37 °C в 5 % CO<sub>2</sub> до образования монослоя. Пептиды вносили за 24 ч до повреждающего воздействия в диапазоне конечных концентраций от 10<sup>-5</sup> до 10<sup>-8</sup> М.

Для моделирования окислительного стресса использовали H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в конечной концентрации 1,5 mM. Клетки с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> инкубировали в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °C 30 мин [22]. Далее среду заменяли на нормальную и через 4 ч определяли жизнеспособность клеток с помощью бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) (AppliChem, Panreac, Германия). Оптическую плотность измеряли на спектро-

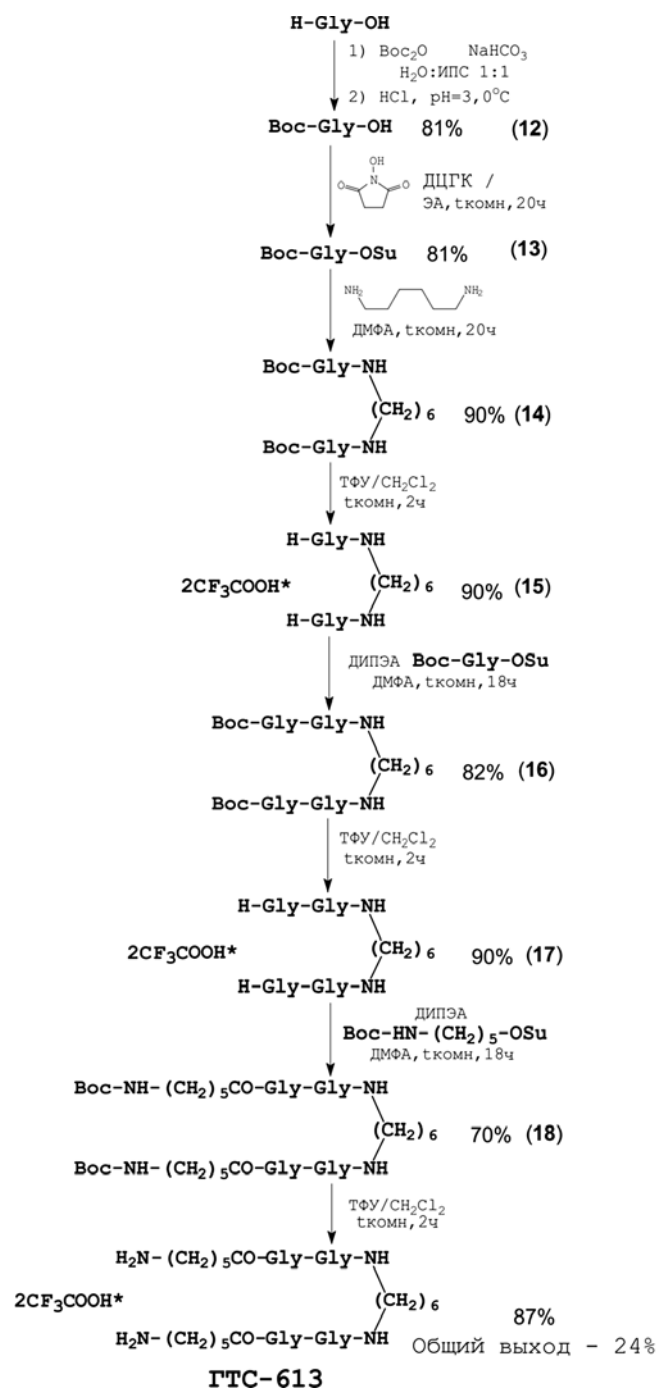


Схема 2. Синтез дипептидного миметика 1-й петли NGF ГТС-613

фотометре “Multiscan EX” (Thermo) при длине волны 600 нм.

Активность в опытах по противодействию окислительному стрессу рассчитывали по формуле:

$$A(\%) = \frac{(D_{\text{эксп}} - D_{\text{H}_2\text{O}_2})}{D_{\text{контр}} - D_{\text{H}_2\text{O}_2}} \cdot 100 \%,$$

где  $D_{\text{эксп}}$  – оптическое поглощение в опыте,  $D_{\text{H}_2\text{O}_2}$  – оптическое поглощение активного контроля (с  $\text{H}_2\text{O}_2$ ),  $D_{\text{контр}}$  – оптическое поглощение пассивного контроля (без  $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Статистический анализ проводили с помощью стандартного пакета программ “Statistica 6.0” (Statsoft,

Inc., США). Результаты МТТ-теста анализировали с помощью непараметрической статистики и анализа качественных данных по критерию Краскела – Уоллиса с последующим тестом по Дану (ANOVA). Результаты считались значимыми при  $p \leq 0,05$ .

Для определения дифференцированной активности пептидных миметиков фактора роста нервов NGF использовали клетки феохромоцитомы линии PC12. Клетки культивировали в среде ДМЕМ с добавлением 5 % эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при температуре 37 °C и 5 %  $\text{CO}_2$  до образования монослоя. Недифференцированные клетки PC12 рассеивали с плотностью 3,5 тыс. на лунку в среде ДМЕМ с 1 % сывороткой FBS. В момент посева в среду культивирования добавляли NGF (BD Bioscience, Великобритания) в качестве положительного контроля в конечной концентрации 100 нг/мл ( $\approx 10^{-9}$  М). Такая концентрация NGF используется в экспериментах по выявлению нейропротекторной и дифференцирующей активности на клетках PC12 [23] и не является токсичной для клеток [24]. Дипептиды ГК-6 и ГТС-611 вносили в концентрации  $10^{-6}$  М.

Далее исследуемые пептиды и NGF вносили в среду каждые 48 ч в течение 6 сут [25]. На 7 день проводили фотографирование клеток с использованием микроскопа Nikon Eclipse TS100-F (Япония) при увеличении  $\times 100$ . Дифференцированными считались клетки, имевшие отростки длиной, превышающей диаметр тела клетки.

Статистическую обработку данных проводили с использованием *U*-критерия Манна – Уитни. Данные представлены в виде  $m \pm s.d$ . Данные считались достоверными при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

#### Синтез миметиков 1-й петли NGF ГК-6, ГТС-611 и ГТС-613

Синтез ГК-6 и ГТС-611 проводили методами классического пептидного синтеза в растворе с последовательным наращиванием пептидной цепи с С-конца с использованием Z/Boc-стратегии защитных групп и метода активированных N-оксисукцинимидных эфиров (схема 1).

Пептиды ГК-6 и ГТС-611 синтезировали, исходя из коммерчески доступных Z-L-Lys(Boc)-OH, H-Gly-OH и 6-аминокапроновой кислоты. Z-защищенный глицин (1) получали реакцией натриевой соли глицина с бензилоксикарбонилсукцинимидом (Z-OSu) в водно-ацетоновом растворе [10]. Boc-защищенную аминокaproновую кислоту Boc-Aca-OH (3) получали с использованием ди-*трет*-бутилпирокарбоната по методу Позднева [11]. N-Оксисукцинимидные эфиры Z/Boc-защищенного лизина (5), Boc-Aca-OH (4) и Z-глицина (2) синтезировали по Андерсену [12] с использованием N-гидросукцинимидов и дициклогексилкарбодиимида (ДЦГК) при температуре от 0 °C до + 5 °C. Конденсация активированного эфира защищенного L-лизина (5) с гексаметилендиамином в ДМФА при комнатной температуре давала с выходом

93 % соответствующий гексаметилендиамид (Z-L-Lys(Boc)-NH)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (**6**), который затем подвергали Z-деблокированию с помощью гидрогенолиза водородом в присутствии 10 % Pd/C. Полученный продукт **7** конденсировали в ДМФА с Z-Gly-OSu (**2**), получая с выходом 95 % (Z-Gly-L-Lys(Boc)-NH)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (**8**). После удаления Z-группы каталитическим гидрогенолизом получали бис-дипептид (H-Gly-L-Lys(Boc)-NH)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (**9**), который далее ацилированием Boc-Аса-OSu (**4**) и Ac-OSu в ДМФА переводили в N-аминокапроильное и N-ацетильное производные (Boc-Аса-Gly-L-Lys(Boc)-NH)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (**10**) и (Ac-Gly-L-Lys(Boc)-NH)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (**11**) с выходами 95 и 81 % соответственно. Удаление Boc-защиты с полученных бис-дипептидов **10** и **11** ацидолизом ТФУ в дихлорметане приводило к трифторацетатам ГК-6 и ГТС-611. Целевой пептид ГК-6 переводили в бессолеую форму с помощью ионообменной хроматографии (SP-сефадекс, пиридин-ацетатный буфер), очищали ОФ ВЭЖХ и лиофилизировывали. Общий выход ГК-6 и ГТС-611 составил 61 и 52 % соответственно. Структура и диастереомерная чистота (> 98 %) всех получен-

ных соединений были подтверждены методом <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C ЯМР-спектроскопии.

Синтез ГТС-613 проводили с помощью Boc-стратегии защитных групп (схема 2). На первой стадии из глицина получали Boc-Gly-OH (**12**), затем его активированный эфир **13**, который конденсировали с гексаметилендиамином, получая бис-глицин **14** с выходом 90 %. Дальнейший ацидолиз ТФУ в дихлорметане приводил к трифторацетату бис-глицина **15**, который переводили в свободное основание с помощью ДИ-ПЭА и конденсировали с эфиром **13**, получая бис-дипептид **16**. Ацидолиз пептида **16** и дальнейшее ацилирование эфиром **4** приводило к N-аминокапроильному производному бис-дипептида **18**, финальное удаление Boc-защиты приводило к целевому ГТС-613 в виде дитрифторацетата с общим выходом по глицину 24 %. Пептид ГТС-613 был гомогенен по данным ТСХ. Структура и диастереомерная чистота (> 98 %) подтверждены методом <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C ЯМР-спектроскопии.

**Нейропротекторную активность** синтезированных пептидов изучали на модели окислительного стресса с перекисью водорода на культуре иммортализованных клеток гиппокампа мыши линии НТ-22 [13] в интервале концентраций 10<sup>-5</sup> – 10<sup>-8</sup> М. Пептиды вносили за 24 ч до повреждающего агента. Результаты представлены в табл. 1.

ГК-6 обладал нейропротекторной активностью в концентрациях до 10<sup>-6</sup> М, увеличивая жизнеспособность клеток на 66 % от максимально возможного. В этих условиях NGF увеличивал жизнеспособность на 97 %. При замене остатка лизина на остаток глицина (соединение ГТС-613) нейропротекторная активность сохранилась. Дипептид ГТС-613 был активен до концентрации 10<sup>-6</sup> М с выраженностью эффекта 44 %. В то же время замена N-аминокапроильного радикала на ацетильный (соединение ГТС-611) привела к полной потере активности.

Таким образом, для проявления нейропротекторной активности миметика 1-й петли NGF димерного дипептида ГК-6 критична природа N-концевого заместителя, играющего роль остатка Lys<sup>32</sup>. Остаток C-концевого лизина, соответствующего Lys<sup>34</sup> в последовательности NGF, важной роли в нейропротекторной активности не играет.

Таблица 1  
Влияние миметиков NGF ГК-6, ГТС-611 и ГТС-613 на жизнеспособность нейронов в условиях окислительного стресса (МТТ-тест)

Название групп	Концентрация, М	МТТ-тест, D <sub>600</sub> , среднее ± СКО	Активность, А(%)
Контроль	0	0,427 ± 0,071	100
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,5 · 10 <sup>-3</sup>	0,350 ± 0,032 <sup>^</sup>	0
NGF	~ 10 <sup>-9</sup>	0,425 ± 0,047*	97*
Контроль	0	0,127 ± 0,005	100
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,5 · 10 <sup>-3</sup>	0,097 ± 0,007 <sup>^</sup>	0
ГК-6	10 <sup>-5</sup>	0,117 ± 0,008*	66 ± 26*
	10 <sup>-6</sup>	0,117 ± 0,009*	66 ± 30*
	10 <sup>-7</sup>	0,100 ± 0,005	10 ± 17
	10 <sup>-8</sup>	0,112 ± 0,010	41 ± 33
Контроль	0	0,134 ± 0,008	100
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,5 · 10 <sup>-3</sup>	0,093 ± 0,004 <sup>^</sup>	0
ГТС-611	10 <sup>-5</sup>	0,097 ± 0,008	11 ± 21
	10 <sup>-6</sup>	0,101 ± 0,007	22 ± 19
	10 <sup>-7</sup>	0,101 ± 0,005	22 ± 14
	10 <sup>-8</sup>	0,103 ± 0,006	16 ± 16
Контроль	0	0,176 ± 0,002	100
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,5 · 10 <sup>-3</sup>	0,135 ± 0,004 <sup>^</sup>	0
ГТС-613	10 <sup>-5</sup>	0,155 ± 0,015*	49 ± 36**
	10 <sup>-6</sup>	0,153 ± 0,013*	44 ± 32*
	10 <sup>-7</sup>	0,150 ± 0,012	36 ± 29
	10 <sup>-8</sup>	0,149 ± 0,007	34 ± 17

**Примечание:** вещества вносили за 24 ч до повреждения. Достоверность отличий: <sup>^</sup> – от контроля (p ≤ 0,001); \* от H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (\* p ≤ 0,05, \*\* p ≤ 0,01) критерий Краскела – Уоллиса с последующим тестом по Дану, n = 12. Активность рассчитывали по формуле:

$$A(\%) = \frac{(D_{\text{экс}} - D_{\text{H}_2\text{O}_2})}{D_{\text{контр}} - D_{\text{H}_2\text{O}_2}} \cdot 100\%, \text{ где } D_{\text{экс}} - \text{оптическое поглощение раствора в опыте, } D_{\text{H}_2\text{O}_2} - \text{оптическое поглощение раствора активного контроля (с H}_2\text{O}_2), D_{\text{контр}} - \text{оптическое поглощение пассивного контроля (без H}_2\text{O}_2).$$

твора в опыте, D<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> – оптическое поглощение раствора активного контроля (с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), D<sub>контр</sub> – оптическое поглощение пассивного контроля (без H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Таблица 2  
Средняя длина отростков дифференцированных клеток после внесения NGF, ГК-6 и ГТС-611 в культуру клеток феохромоцитомы крысы РС-12

Название группы	Средняя длина отростков дифференцированных клеток, мкм
Контроль	0
NGF	59,6 ± 11,0*
ГК-6	44,5 ± 8,5 <sup>^</sup>
ГТС-611	36,0 ± 6,2 <sup>#</sup>

Достоверность отличий: \* p ≤ 0,05 от контроля; <sup>^</sup> p ≤ 0,05 от NGF; <sup>#</sup> p ≤ 0,05 от ГК-6; <sup>#</sup> p ≤ 0,05 по U-критерию Манна – Уитни.



**Дифференцировочная активность на клетках РС-12 миметиков NGF – ГК-6 и ГТС-611.** Для оценки способности пептидных миметиков фактора роста нервов NGF вызывать дифференцировку использовали клетки феохромоцитомы линии РС12. Известно, что эти клетки содержат TrkA и p75 рецепторы и при добавлении NGF дифференцируются по нейрональному типу [14]. Пептиды ГК-6 и ГТС-611 вносили в культуральную среду в концентрации  $10^{-6}$  М. Как видно из рис. 2 NGF индуцировал дифференцировку клеток РС-12. Дифференцирующее действие ГК-6 было слабее, чем у NGF, а у ГТС-611 еще менее выражено. Средняя длина отростков дифференцированных клеток после внесения NGF составляла  $59,6 \pm 11,0$  мкм, ГК-6 –  $44,5 \pm 8,5$  мкм, ГТС-611 –  $36,0 \pm 6,2$  мкм (табл. 2).

Таким образом, замена N-аминокапроильного радикала ГК-6 на ацетильный приводит к утрате нейропротекторной, но не дифференцировочной активности.

Причинные закономерности обнаруженной зависимости клеточных эффектов синтезированных соединений от их структуры возможно связаны со спецификой активации пострецепторных путей трансдукции, примеры которой представлены в наших предыдущих исследованиях [15, 16].

Работа выполнена в рамках гос. задания (тема № 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”).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Гудашева, Т. А. Антипова, С. Б. Середенин, *Докл. АН*, **434(4)**, 549 – 552 (2010).
2. Патент РФ № 2410392 (2011).

3. Патент США № 9683014 В2 (2017).
4. Патент КНР № 102365294 В (2016).
5. Патент ЕПВ EP № 2397488 (2019).
6. Т. А. Gudasheva, P. Y. Povarnina, T. A. Antipova, et al., *J. Biomed. Sci.*, **22(1)**, 1 – 10 (2015).
7. С. Б. Середенин, Т. А. Гудашева, *Ж. неврол. и псих. имени С. С. Корсакова*, **6**, 63 – 70 (2015).
8. Т. А. Антипова, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин, *Бюл. экперим. биол. и мед.*, **150(11)**, 537 – 540 (2010).
9. D. R. Holland, L. S. Cousins, W. Meng, et al., *J. Mol. Biol.*, **239(3)**, 385 – 400 (1994).
10. A. Raquet, *Can. J. Chem.*, **60(8)**, 976 – 980 (1982).
11. В. Ф. Позднеев, *Химия природ. соедин.*, **6**, 764 – 767 (1974).
12. G. W. Anderson, J. E. Zimmerman, *J. Am. Chem. Soc.*, **86(9)**, 1839 – 1842 (1964).
13. G. R. Jackson, K. Werrbach-Perez, E. L. Ezell, et al., *Brain Res.*, **592(1–2)**, 239 – 248 (1992).
14. J. H. Chang, E. Mellon, N. C. Schanen, et al., *J. Biol. Chem.*, **278(44)**, 42877 – 42885 (2003).
15. Т. А. Gudasheva, P. Povarnina, A. V. Tarasiuk, S. B. Seredenin., *Cur. Pharm. Design.*, **25**, 729 – 737 (2019).
16. Р. У. Островская, С. В. Иванов, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин, *Acta Naturae*, **11(1)**, 48 – 57 (2019).
17. Н. М. Сазонова, А. В. Тарасюк, Ю. Н. Фирсова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **54(2)**, 24 – 31 (2020); *Pharm. Chem. J.*, **54(2)**, 126 – 133 (2020); *Pharm. Chem. J.*, **54(2)**, 126 – 133 (2020).
18. Н. М. Сазонова, А. В. Тарасюк, Д. В. Курилов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **49(7)**, 10 – 19 (2015); *Pharm. Chem. J.*, **49(7)**, 439 – 448 (2015).
19. С. М. Андреев, Л. А. Павлова, Ю. А. Давидович и др., *Изв. АН СССР*, 1078 – 1081 (1980).
20. *Org. Synth. Coll.*, **7**, 70 (1990).
21. T. Munegumi, T. Yamada, *Int. J. Polymer Sci.*, ID 8364710, 1 – 17 (2017).
22. K. Riveles, L. Z. Huang, M. Quik, *Neurotoxicology*, **29(3)**, 421 – 427 (2008).
23. Y. Gong, J. Wu, H. Qiang, et al., *BMB Reports.*, **41(4)**, 287 – 293 (2008).
24. D. L. Senger, R. B. Campenot, *J. Cell Biol.*, **138(2)**, 411 – 412 (1997).
25. V. Kukhtina, V. Tsetlin, Yu. Utkin, et al., *J. Natural Toxins.*, **10(1)**, 9 – 16 (2001).

Поступила 15.05.20

## DESIGN AND SYNTHESIS OF NGF 1ST LOOP DIPEPTIDE MIMETICS, AND IN VITRO STUDY OF THEIR NEUROPROTECTIVE AND DIFFERENTIATIVE ACTIVITIES

A. V. Tarasyuk<sup>1</sup>, N. M. Sazonova<sup>1\*</sup>, A. G. Rebeke<sup>1</sup>, I. O. Logvinov<sup>1</sup>, S. V. Nikolaev<sup>1</sup>, T. A. Antipova<sup>1</sup>, T. A. Gudasheva<sup>1</sup>, and S. B. Seredenin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> V. V. Zakusov State Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125315 Russia

\* e-mail: tata-sosnovka@mail.ru

Previously, a dimeric dipeptide mimetic of the most exposed nerve growth factor (NGF) loop 4 was created in the Zakusov Institute of Pharmacology. This compound, bis-(N-monosuccinyl-L-glutamyl-L-lysine) hexamethylenediamide (GK-2), activated specific TrkA receptors and exhibited neuroprotective activity both *in vitro* (at  $10^{-5}$  –  $10^{-9}$  M) and *in vivo* (at 0.1 – 10 mg/kg ip, po). In the present article, we describe the design and synthesis of NGF loop 1 mimetic bis-(N-aminocaproyl-glycyl-L-lysine) hexamethylenediamide (GK-6) on the basis of its beta-turn (-Lys32-Gly33-Lys34-Glu35-). The central dipeptide beta-turn fragment -Gly33-Lys34- was retained in the GK-6 structure, the Lys32 residue was replaced by its bioisostere (6-aminocaproic acid residue), and the NGF dimeric structure was reproduced by dimerization at the C-terminus using a bivalent hexamethylenediamine spacer. In order to study the relationship between the structure and activity of GK-6, we performed sequential replacement of the amino acid residues of peptide by hydrogen, and obtained bis-(N-acetyl-glycyl-L-lysine) hexamethylenediamide (GTS-611) and bis-(N-aminocaproyl-glycyl-glycine) hexamethylenediamide (GTS-613). Mimetic GK-6 and its analog GTS-613, both containing an N-aminocaproyl moiety in their structure, demonstrated a neuroprotective effect at concentrations of  $10^{-6}$  M and  $10^{-5}$  M under conditions of oxidative stress on the culture of HT22 neurons. The GTS-611 dipeptide, in which the aminocaproyl fragment was replaced by acetyl, did not show neuroprotective activity under these conditions, which indicated the importance of Lys32 in NGF for its manifestation. Unlike the mimetic of NGF loop 4 (GK-2), the mimetics of NGF loop 1 (GK-6 and GTS-611) exhibited differentiative activity on PC12 cells.

**Keywords:** mimetic; dipeptide; GK-6; GTS-611; GTS-613; nerve growth factor; neuroprotective activity; differentiative activity; structure – activity relationship.