



Синтез и изучение антидепрессантоподобного эффекта гексаметилендиамида бис-(*N*-моносукцинил-*D*-серил-*D*-лизина), энантиомера дипептидного миметика BDNF ГСБ-106

Сазонова Н. М., Тарасюк А. В., Филиппова М. Ю., Мельникова М. В., Никифоров Д. М.,
Поварнина П. Ю., Гудашева Т. А., Дорофеев В. Л.

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»,
Москва, Российская Федерация

Аннотация

Ранее нами на основе β -изгиба четвертой петли мозгового нейротрофического фактора был получен ГСБ-106 (гексаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина), обладающий выраженными нейропротекторной и антидепрессивной активностями в дозах 0,1–10 мг/кг при внутривентриальном и пероральном введении. Для выявления стереоспецифичности антидепрессантоподобного эффекта ГСБ-106 в настоящей работе синтезирован его энантиомер (ГСБ-106DD) и изучены его антидепрессантоподобные свойства. Показано, что у ГСБ-106DD антидепрессантоподобный эффект при внутривентриальном введении в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг отсутствует. Делается вывод о стереоспецифичности антидепрессантоподобной активности ГСБ-106, т. е. о её зависимости от конфигурации аминокислотных остатков.

Ключевые слова: мозговой нейротрофический фактор; BDNF; дипептидный миметик; ГСБ-106; энантиомер; стереоспецифичность; антидепрессивная активность

Для цитирования:

Сазонова Н. М., Тарасюк А. В., Филиппова М. Ю., Мельникова М. В., Никифоров Д. М., Поварнина П. Ю., Гудашева Т. А., Дорофеев В. Л. Синтез и изучение антидепрессантоподобного эффекта гексаметилендиамида бис-(*N*-моносукцинил-*D*-серил-*D*-лизина), энантиомера дипептидного миметика BDNF ГСБ-106. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(3):25–37. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-3-25-37>. EDN: CDTRWE

Поступила: 26.06.2024. **В доработанном виде:** 27.07.2024. **Принята к печати:** 07.09.2024. **Опубликована:** 30.09.2024.

Synthesis and the antidepressant-like activity investigation of bis-(*N*-monosuccinyl-*D*-seryl-*D*-lysine) hexamethylenediamide, the DD-enantiomer of the BDNF dipeptide mimetic, compound GSB-106

Nellya M. Sazonova, Alexey V. Tarasyuk, Maria Yu. Filippova, Marina V. Melnikova, Dmitry M. Nikiforov,
Polina Yu. Povarnina, Tatiana A. Gudasheva, Vladimir L. Dorofeev

Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation

Abstract

Previously, based on the β -turn of the fourth loop of the brain-derived neurotrophic factor, we obtained GSB-106 (bis-(*N*-monosuccinyl-*L*-seryl-*L*-lysine) hexamethylenediamide), that has pronounced neuroprotective and antidepressant activities in doses of 0.1–10 mg/kg with intraperitoneal and oral administration. For identifying the stereospecificity of the antidepressant-like effect of GSB-106, in this work its enantiomer (GSB-106DD) was synthesized and its antidepressant-like properties were studied. It was shown that GSB-106DD has no antidepressant-like effect when administered intraperitoneally in doses of 0.1 and 1.0 mg/kg. It can be assumed that the stereospecificity of the antidepressant-like activity of GSB-106 dependence on the configuration of amino acid moieties.

Keywords: brain-derived neurotrophic factor; BDNF; dipeptide mimetic; GSB-106; enantiomer; stereospecificity; antidepressant activity

For citations:

Sazonova NM, Tarasyuk AV, Filippova MYu, Melnikova MV, Nikiforov DM, Povarnina PYu, Gudasheva TA, Dorofeev VL. Synthesis and the antidepressant-like activity investigation of bis-(*N*-monosuccinyl-*D*-seryl-*D*-lysine) hexamethylenediamide, the DD-enantiomer of the BDNF dipeptide mimetic, compound GSB-106. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(3):25–37. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-3-25-37>. EDN: CDTRWE

Received: 26.06.2024. **Revision received:** 27.07.2024. **Accepted:** 07.09.2024. **Published:** 30.09.2024.

Введение / Introduction

Хорошо известно о ключевой роли BDNF в патогенезе депрессии и его антидепрессантоподобном потенциале [1].

В «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» в соответствии с оригинальной гипотезой о ведущей роли центральных участков бета-изгибов в распознавании белковых лигандов рецептором, на основе структуры бета-изгиба наиболее экспонированной 4-й петли мозгового нейротрофического фактора (BDNF) был создан его димерный дипептидный миметик гексаметилендиамид *бис*-(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина) (ГСБ-106) [2–6]. ГСБ-106, аналогично полноразмерному BDNF, активировал TrkB рецепторы и их основные пострецепторные сигнальные пути PI3K/AKT, MAPK/ERK и PLC γ [7, 8]. Селективность взаимодействия ГСБ-106 с TrkB рецепторами была подтверждена с помощью нокаутных по генам *trka* и *trkb* гиппокампальных клеток мыши линии HT-22 [9].

Дипептид ГСБ-106 проявил антидепрессантоподобную активность в батарее тестов на грызунах (тест вынужденного плавания по Порсолту, тест вынужденного плавания в сосуде с вращающимися колесами по Номура, тест подвешивания за хвост) при системном введении, включая пероральное, в диапазоне доз 0,1–5 мг/кг [10, 11]. Антидепрессантоподобная активность ГСБ-106 была также выявлена на экспериментальных моделях депрессивно-подобного состояния на мышах, воспроизводящих основные патофизиологические механизмы и симптомы депрессии. Так, на модели хронического социального стресса на мышах ГСБ-106 при хроническом пероральном введении (0,1 мг/кг) после окончания стрессирования полностью противодействовал проявлению агедонии и снижению иммунореактивности к синаптофизину и транскрипционному фактору CREB (маркер нейропластичности), а также к его фосфорилированной форме, в гиппокампе [12]. Введение ГСБ-106 мышам на фоне хронического непредсказуемого умеренного стресса (хронически, перорально, на фоне стресса, 1 мг/кг) полностью препятствовало развитию депрессивноподобного состояния по результатам теста вынужденного плавания, а также снижению содержания BDNF в префронтальной коре и гиппокампе [13]. Также ГСБ-106 противодействовал развитию депрессивноподобного состояния у крыс с экспериментальным ишемическим инсультом, индуцированным окклюзией средней мозговой артерии [14]. С помощью фармакологического ингибиторного анализа было показано, что антидепрессантоподобная активность ГСБ-106 опосредована активацией TrkB рецепторов и трёх их основных пострецепторных сигнальных каскадов PI3K/AKT, MAPK/ERK и PLC γ [15].

В рамках Государственной программы «Фарма 2020» был завершён полный цикл доклинических исследований ГСБ-106 в качестве перспективного, первого в классе антидепрессанта с нейротрофическим механизмом действия (Гос. контракт №14–N08–12–0086).

При производстве оптически активных лекарственных препаратов важно знать, как на их активность может повлиять возможная рацемизация. Эти данные получают при изучении стереоспецифичности эффектов фармакологически активной субстанции.

Целью данной работы явилось выявление стереоспецифичности антидепрессантоподобного действия ГСБ-106. Для этого был синтезирован энантиомер ГСБ-106 — гексаметилендиамид *бис*-(*N*-моносукцинил-*D*-серил-*D*-лизина) (ГСБ-106DD) и изучена его антидепрессантоподобная активность в тесте вынужденного плавания по Порсолту на мышах.

Материалы и методы / Materials and methods

Список сокращений

Ag — арильный заместитель; Boc — трет-бутилоксикарбонил; COSY — гомоядерная корреляция; DMSO — диметилсульфоксид; HSQC — гетероядерная одноквантовая корреляция; HMBC — гетероядерная многосвязная корреляция; Lys — лизил; OPfr — пентафторфенил; OSu — оксисукцинил; Pd/C — катализатор: наночастицы палладия на поверхности активированного угля; TFA — трифторуксусная кислота; Ser — серил; Z — бензилоксикарбонил; ДИПЭА — диизопропилэтиламин; ДМПДА — диметилпропилендиамин; ДМФА — диметилформамид; ДЦГК — дициклогексилкарбодиимид; ДЦГМ — дициклогексилмочевина; т.пл. — температура плавления; ТСХ — тонкослойная хроматография; ТФУ — трифторуксусная кислота; ЭА — этилацетат; ЯМР — ядерный магнитный резонанс.

Исходные вещества и вспомогательные реагенты

В работе использовали коммерческие аминокислоты *H*-*D*-Ser-OH, *Z*-*D*-Lys(Boc)-OH**D*CHA, а также вспомогательные реагенты пентафторфенол (Pfr-OH), трифторуксусная кислота (ТФУ) и дициклогексилкарбодиимид (ДЦГК) (Sigma-Aldrich, Германия; AlfaAesar, США).

Растворители: этилацетат, диметилформамид (ДМФА), диэтиловый эфир, дихлорметан, гексан, MeOH были получены у ООО ТД «Химмед» (Россия). ДМФА очищали перегонкой в вакууме над нингидрином. Диэтиловый эфир выдерживали над NaOH, затем фильтровали через бумажный фильтр. Дихлорметан пропускали через колонку с Al₂O₃. Этилацетат и спирты использовали без дополнительной очистки.

Аналитические методы

Температуру плавления определяли на приборе Optimelt MPA100 (Stanford Research Systems, Великобритания) в открытых капиллярах и не корректировали. Удельное оптическое вращение регистрировали на автоматическом поляриметре ADP 440 Polarimeter (Bellingham+Stanley Ltd., Великобритания), удельный угол оптического вращения ($[\alpha]_D$) определяли по формуле $[\alpha]_D = [\alpha]_{\text{набл}}/c$, где $[\alpha]_{\text{набл}}$ — наблюдаемое значение угла оптического вращения, c — концентрация в % (m/V). Строение и диастереомерную чистоту целевых пептидов и промежуточных соединений устанавливали методами одномерной ^1H -, ^{13}C — и двумерной (COSY — гомоядерная корреляция, HSQC — гетероядерная одноквантовая корреляция, HMBC — гетероядерная многосвязная корреляция) ЯМР-спектроскопии. Спектры ^1H — и ^{13}C —ЯМР регистрировали в шкале δ , м. д. на спектрометре Bruker FOURIER 300 HD (Bruker Corporation, Leipzig, Germany, 300 и 75 МГц для ядер ^1H — и ^{13}C , соответственно) в растворах DMSO- d_6 и CDCl_3 , внутренний стандарт тетраметилсилан (0 м.д.). Константа спин-спиновой взаимодействия J приведена в Гц. Для обозначения резонансных сигналов использовали следующие сокращения: с — синглет, д — дублет, т — триплет, м — мультиплет.

Тонкослойную хроматографию (ТСХ) выполняли на стеклянных силикагелевых пластинах DC Kieselgel 60 G/F₂₅₄ (Merck, Германия) в системах растворителей: этилацетат (А); гексан—этилацетат, 1:3 (Б); гексан—этилацетат, 1:5 (В); хлороформ—метанол, 6:1 (Г); хлороформ—метанол, 1:1 (Д); бензол—метанол, 1:4 (Е); *n*-бутанол—уксусная кислота—вода, 3:1:1 (Ж); хлороформ—метанол—вода—уксусная кислота, 15:10:2:3 (З); хлороформ—метанол—вода—уксусная кислота, 8:10:2:3 (И); хлороформ—метанол—уксусная кислота, 80:10:1 (К); метанол—вода, 1:1 (Л); метанол—вода, 2:1 (М). Аминосодержащие соединения обнаруживали нингидрином, соединения с амидными группами — с помощью хлор-толидиновой пробы, соединения с открытой карбоксильной группой — бромкрезоловым зелёным.

Синтез ГСБ-106DD

N-оксисукцинимидный эфир *N*^α-бензилоксикарбонил-*N*^ε-трет-бутилоксикарбонил-*D*-лизина, Z-D-Lys(Boc)-OSu (I). К суспензии 5,02 г (9,26 ммоль) Z-D-Lys(Boc)-OH • DCHA в 43 мл этилацетата (ЭА) приливали 18 мл 5,96 % H_2SO_4 и перемешивали в течение 30 мин до полного растворения осадка при комнатной температуре. Через 30 мин органический слой отделяли, а воднокислый экстрагировали ЭА (2 × 20 мл). Органические растворы объединяли, промывали дистиллированной водой (2 × 25 мл) и насыщенным раствором NaCl (40 мл). Этилацетатный раствор высушивали над безводным

Na_2SO_4 в течение 1 ч, осушитель отфильтровывали, промывали на фильтре 50 мл ЭА. Фильтрат упаривали на ротаторном испарителе при температуре 50 °С до прекращения погона. Получали 3,52 г (9,26 ммоль) Z-D-Lys(Boc)OH в виде светло-жёлтого масла. R_f 0,16 (А), R_f 0,24 (Г), R_f 0,50 (В). Спектр ^1H -ЯМР (DMSO- d_6), δ , м.д.: 1,38 (уш.с, 13H, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ $\text{C}^\delta\text{H}_2$ Lys, -OC(CH₃)₃ Boc), 1,62 (м, 2H, C^βH_2 Lys), 2,89 (м, 2H, $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ Lys), 3,92 (м, 1H, C^αH Lys), 5,03 (с, 2H, -OCH₂- Z), 6,77 (уш. т, 1H, $\text{N}^\epsilon\text{H}$ Lys), 7,35 (м, 5H, -C₆H₅ Z), 7,54 (д, 1H, 3J 7,4 Гц, NH Lys).

К полученному Z-D-Lys(Boc)-OH приливали 50 мл ЭА и при перемешивании добавляли 1,25 г (10,8 ммоль) *N*-гидроксисукцинимид и 20 мл ЭА. Реакционную смесь охлаждали до +8 — +10 °С, прибавляли раствор 2,30 г (11,0 ммоль) дициклогексилкарбодиимида (ДЦГК) в 25 мл ЭА и перемешивали при охлаждении в течение 2 ч, затем ещё 20 ч при комнатной температуре. Выпавший осадок дициклогексилмочевины (ДЦГМ) отфильтровывали, промывали на фильтре 60 мл охлаждённого (+10 °С) ЭА. Фильтрат упаривали в вакууме при температуре 50 °С, полученное масло затирали под сухим диэтиловым эфиром (60 мл), выдерживали ночь в холодильнике, осадок отфильтровывали, промывали на фильтре сухим диэтиловым эфиром (60 мл), высушивали в эксикаторе над CaCl_2 , получали 3,80 г (90 %) **Z-D-Lys(Boc)-OSu** в виде кристаллического вещества белого цвета. R_f 0,83(А), R_f 0,73(Г); т.пл. 91–97 °С (из диэтилового эфира); $[\alpha]_D^{27} + 16,2^\circ$ ($c = 2$; диоксан), $[\alpha]_D^{25} + 21,2^\circ$ ($c = 1$; этанол). Спектр ^1H -ЯМР (DMSO- d_6), δ , м. д.: 1,37 (уш.с, 13H, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ $\text{C}^\delta\text{H}_2$ Lys, -OC(CH₃)₃ Boc), 1,78 (м, 2H, C^βH_2 Lys), 2,81 (с, 4H, -CH₂CH₂- OSu), 2,88 (м, 2H, $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ Lys), 4,40 (м, 1H, C^αH Lys), 5,07 (с, 2H, -OCH₂- Z), 6,79 (уш. т, 1H, $\text{N}^\epsilon\text{H}$ Lys), 7,37 (м, 5H, -C₆H₅ Z), 8,04 (д, 1H, 3J 7,8 Гц, NH Lys).

Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3), δ , м.д.: 1,43 (с, 9H, -OC(CH₃)₃ Boc), 1,52 (м, 4H, $\text{C}^\delta\text{H}_2$ $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Lys), 1,91–1,99 (м, 2H, C^βH_2 Lys), 2,84 (с, 4H, -CH₂CH₂- OSu), 2,88 (м, 2H, $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ Lys), 3,12 (м, 2H, $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ Lys), 4,72 (м, 2H, C^αH и $\text{N}^\epsilon\text{H}$ Lys), 5,13 (с, 2H, -OCH₂- Z), 5,59 (уш. с, 1H, NH Lys), 7,37 (м, 5H, -C₆H₅ Z).

Спектр ^{13}C -ЯМР (CDCl_3), δ , м.д.: 168,70 (с, 2C, 2 CO -OSu), 168,23 (с, 1C, CO Lys), 156,25 (с, 1C, -CO-OC(CH₃)₃ Boc), 155,73 (с, 1C, -CO-O-CH₂- Z), 136,02 (с, 1C, -O-CH₂-C- Ar), 128,55 и 128,28 (два с, 5C, -C₆H₅- Z), 79,23 (с, 1C, -OC(CH₃)₃ Boc), 67,34 (с, 1 C, -OCH₂- Z), 52,23 (с, 1C, C^α), 39,72 (с, 1C, C^ϵ), 31,88 (с, 1C, C^β), 29,41 (с, 1C, C^δ), 28,42 (с, 3C, -OC(CH₃)₃ Boc), 25,59 (с, 2C, -CH₂CH₂- OSu), 21,84 (с, 1C, C^γ). $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_8$.

Лит. [16]: т.пл. 97–99 °С (i-PrOH); $[\alpha]_D^{22} + 16,0^\circ$ ($c = 2$; диоксан). Лит. [17]: т.пл. 96–100 °С.

N-Бензилоксикарбонил-*D*-серина, Z-D-Ser-OH (II) получали аналогично Z-L-Ser-OH по методике [18] из 50 г (0,475 моль) H-D-Ser-OH с выходом

50 % в виде белого кристаллического вещества. R_f 0,10 (А), R_f 0,42 (Д), R_f 0,77 (Ж); т.пл. 110–116 °С (ЭА); $[\alpha]_D^{25} - 4,6^\circ$ (с = 7; АсОН), $[\alpha]_D^{25} - 20,5^\circ$ (с = 1; ЭА), $[\alpha]_D^{25} - 10,5^\circ$ (с = 1; ацетон). Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$), δ , м.д.: 3,66 (с, 2H, C^βH_2 , Ser), 4,05 (м, 1H, C^αH , Ser), 5,04 (с, 2H, $-\text{OCH}_2-$, Z), 7,36 (м, 6H, $-\text{C}_6\text{H}_5$, Z и N^αH , Ser), 12,61 (ш.с., ^1H , COOH). Спектр ^1H -ЯМР (CD_3COCD_3), δ , м.д.: 3,45–4,45 (ш.с. $-\text{COOH}$ и $-\text{OH}$, Ser), 3,89 и 3,97 (два м, 2H, C^βH_2 , Ser), 4,34 (м, 1H, C^αH , Ser), 5,11 (с, 2H, $-\text{OCH}_2-$, Z), 6,41 (д, 1H, N^αH , Ser), 7,34–7,39 (м, 5H, $-\text{C}_6\text{H}_5$, Z).

Лит. [19]: т.пл. 119 °С; $[\alpha]_D^{25} - 5,6^\circ$ (с = 7; АсОН). Лит. [20]: т.пл. 114–115 °С.

Пентафторфениловый эфир *N*-бензилоксикарбонил-*D*-серина, *Z*-*D*-Ser-OPfp (III) получали аналогично *Z*-L-Ser-OPfp по методике [18] из 47 г (0,197 моль) *Z*-D-Ser-ОН с выходом 81 % в виде белого кристаллического вещества. R_f 0,77 (Г), R_f 0,81 (Б), R_f 0,76 (В); т.пл. 132–136 °С (петролейный эфир); $[\alpha]_D^{23} + 17,35^\circ$ (с = 1; ЭА). Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$), δ , м.д.: 3,85 (м, 2H, C^βH_2 Ser), 4,58 (м, 1H, C^αH Ser), 5,09 (с, 2H, $-\text{OCH}_2-$ Z), 5,22 (т, 1H, J 5,8 Гц, $-\text{OH}$ Ser), 7,31–7,38 (м, 5H, $-\text{C}_6\text{H}_5$ Z), 7,95 (д, 1H, J 7,6 Гц, NH Ser). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3), δ , м.д.: 4,27 (два д, 2H, ^2J 10,99 Гц, C^βH_2 Ser), 4,86 (м, 1H, C^αH Ser), 5,18 (с, 2H, $-\text{OCH}_2-$ Z), 5,80 (д, 1H, J 7,6 Гц, NH Ser), 7,37–7,40 (м, 5H, $-\text{C}_6\text{H}_5$ Z).

Гексаметилендиамид бис-(*N*-бензилоксикарбонил-*N*^ε-трет-бутилоксикарбонил-*D*-лизина) (*Z*-*D*-Lys(Boc)-NH-)₂(CH₂)₆ (IV). К раствору 3,80 г (7,96 ммоль) *Z*-D-Lys(Boc)-OSu в 25 мл диметилформамида (ДМФА) при перемешивании приливали раствор 0,425 г (3,617 ммоль) гексаметилендиамина в 12 мл ДМФА, при этом выпадало небольшое количество серого осадка, который в течение 2 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 150 мл дистиллированной воды, предварительно нагретой до 43–45 °С, 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 дистиллированной водой до нейтральной реакции, хорошо отжимали на фильтре, досушивали на воздухе. Получали 2,70 г (89 %) (***Z*-D-Lys(Boc)-NH-)₂(CH₂)₆**) в виде белого кристаллического вещества. R_f 0,55(А), R_f 0,24 (Б), R_f 0,84 (Г); т.пл. 154–157 °С; $[\alpha]_D^{25} + 7,6^\circ$ (с = 1; метанол), $[\alpha]_D^{25} + 9,2^\circ$ (с = 0,3; этанол), $[\alpha]_D^{24} + 7,39^\circ$ (с = 1; этанол). Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$), δ , м.д.: 1,23 (м, 4H $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}-$), 1,36 (уш.с., 30H, 2 $\text{C}^\delta\text{H}_2$, 2 $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Lys, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, 2 $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ Boc), 1,50 (м, 4H, C^βH_2 Lys), 2,86 (м, 4H, $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ Lys), 3,02 (м, 4H, $-\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NH}-$), 3,88

(м, 2H, C^αH Lys), 5,0 (с, 4H, $-\text{OCH}_2-$ Z), 6,76 (уш. т, 2H, $\text{N}^\epsilon\text{H}$ Lys), 7,37 (м, 12H, 2 $-\text{C}_6\text{H}_5$ Z, 2 NH Lys), 7,83 (уш.т, 2H, $-\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NH}-$).

Лит. [16]: т.пл. 151–154 °С; $[\alpha]_D^{25} + 9,0^\circ$ (с = 0,3; этанол).

Гексаметилендиамид бис-(*N*^ε-трет-бутилоксикарбонил-*D*-лизина), (*H*-D-Lys(Boc)-NH-)₂(CH₂)₆ (V). Раствор 2,6 г (3,1 ммоль) IV в 85 мл метанола подвергали гидрогенолизу в присутствии 0,38 г 10 % Pd/C 50 % влажности при комнатной температуре. По исчезновении исходного вещества (ТСХ контроль) катализатор отфильтровывали, промывали 40 мл метанола. Метанольный раствор упаривали в вакууме при температуре 50 °С до прекращения погона, полученное бесцветное масло выдерживали при температуре 4 °С в смеси диэтилового и петролейного эфиров в соотношении 3:1 в течение 12 ч. Образовавшийся твёрдый остаток после декантации растворителей высушивали в вакууме водоструйного насоса (насадка для фильтрования гигроскопичных веществ). Получали 1,75 г (95 %) V в виде белого кристаллического вещества, который высушивали в вакууме водоструйного насоса (насадка для фильтрования гигроскопичных веществ), получали 1,75 г (95 %) V в виде белого кристаллического вещества. R_f 0,10 (Г), R_f 0,44 (Е), R_f 0,80 (З); т.пл. 81–85 °С (диэтиловый эфир-петролейный эфир); $[\alpha]_D^{25} - 12,64^\circ$ (с = 1; метанол). Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$), δ , м.д.: 1,24 (м, 4H, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}-$), 1,28 (м, 4H, 2 C^γH Lys), 1,37 (уш.с., 26H, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, 2 $\text{C}^\delta\text{H}_2$ Lys, 2 $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ Boc), 1,48 (м, 4H, 2 C^βH_2 Lys), 2,87 (м, 4H, $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ Lys), 3,00–3,07 (м, 6H, 2 C^αH Lys, $-\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NH}-$), 6,75 (т, 2H, J 5,4 Гц, 2 $\text{N}^\epsilon\text{H}$ Lys), 7,78 (т, 2H, J 5,6 Гц, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}-$).

Гексаметилендиамид бис-(*N*-бензилоксикарбонил-*D*-серил-*N*^ε-трет-бутилокси-карбонил-*D*-лизина), (*Z*-D-Ser-D-Lys(Boc)-NH-)₂(CH₂)₆ (VI). К раствору 1,84 г (3,21 ммоль) V в 20 мл ДМФА одномоментно присыпали 3,1 г (7,65 ммоль, 38 %-ный изб.) *Z*-D-Ser-OPfp III и приливали 10 мл ДМФА. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при комнатной температуре, далее приливали 0,154 мл диметиламинопропиламина (ДМАПА) и выдерживали 50 мин при перемешивании. Реакционную массу выливали в дистиллированную воду (300 мл) и оставляли на 12 ч при комнатной температуре. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали 150 мл воды, 50 мл гексана и 50 мл диэтилового эфира. Осадок высушивали в вакууме (15 мм.рт.ст.) над CaCl_2 . Получали 2,80 г (86 %) продукта в виде белого кристаллического вещества. R_f 0,56 (К), R_f 0,71 (Г); т.пл. 169,5–173 °С; $[\alpha]_D^{23} + 13,6^\circ$ (с = 1; метанол). Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$), δ , м.д.: 1,24–1,37 (м, 16H, 2 $\text{C}^\gamma\text{H}_2\text{C}^\delta\text{H}_2$ Lys, $-\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NH}-$), 1,37 (с, 18H, 2 $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ Boc), 1,48 и 1,64 (два м, 4H, 2 C^βH_2 Lys), 2,86 (м, 4H, 2 $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ Lys), 3,01 (м, 4H,

-NHCH₂(CH₂)₄CH₂NH-), 3,57 (м, 4H, 2 C^βH₂ Ser), 4,13 (м, 4H, 2 C^αH Ser, 2 C^αH Lys), 5,04 (уш.с, 6H, 2-ОСН₂- Z, 2 -ОН Ser), 6,72 (уш.т, 2H, 2 N^εH Lys), 7,28-7,36 (м, 12H, -C₆H₅ Z, 2 NH Ser), 7,80 (уш.т, 2H, -NH(CH₂)₆NH-), 7,95 (д, 2H, J 6,71 Гц, 2 NH Lys).

Гексаметилендиамид бис-(D-серил-N^ε-трет-бутилоксикарбонил-D-лизина), (H-D-Ser-D-Lys(Boc)-NH-)₂(CH₂)₆ (VII). Раствор 2,70 г (2,66 ммоль) VI в 100 мл MeOH подвергали гидрогенолизу в присутствии 0,40 г 10 % Pd/C 50 % влажности при перемешивании в атмосфере водорода и при комнатной температуре. По окончании гидрирования (ТСХ-контроль), катализатор отфильтровывали, промывали 50 мл метанола, фильтрат упаривали, далее переупаривали с 20 мл бензола, к пенообразному остатку приливали 100 мл смеси петролейного и диэтилового эфиров в соотношении 3:1 и оставляли на ночь в холодильнике, растворители декантировали, а твёрдый остаток высушивали в вакууме (15 мм рт.ст.) над CaCl₂, получали 1,85 г (96 %) VI в виде белого аморфного порошка. R_f 0,53 (E), R_f 0,93 (Г), R_f 0,47 (Ж); т.пл. 100–112 °С с разложением; [α]_D²⁴ + 10,53° (с = 1; метанол). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-d₆), δ, м.д.: 1,20 и 1,29-1,36 (два м, 16H, 2 C^γH₂C^δH₂ Lys, -NHCH₂(CH₂)₄CH₂NH-), 1,36 (с, 18H, 2 -OC(CH₃)₃ Boc), 1,49 и 1,59 (два м, 4H, 2 C^βH₂ Lys), 2,85 (м, 4H, 2 C^εH₂ Lys), 3,02 (м, 4H, -NHCH₂(CH₂)₄CH₂NH-), 3,32 (м, 2H, 2 C^αH Ser), 3,47 (м, 4H, 2 C^βH₂ Ser), 4,20 (м, 2H, 2 C^αH Lys), 4,87 (уш.с, 2H, 2 -ОН Ser), 6,74 (уш.т, 2H, 2 N^εH Lys), 7,93 (уш.т, 2H, -NH(CH₂)₆NH-), 8,03 (уш.с, 2H, 2 NH Lys).

Гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-D-серил-N^ε-трет-бутилокси-карбонил-D-лизина), (HOOC(CH₂)₂CO-D-Ser-D-Lys(Boc)-NH-)₂(CH₂)₆ (VIII). К раствору 1,781 г (2,38 ммоль) VII в 25 мл ДМФА при +5 °С и перемешивании одномоментно прибавляли раствор 0,566 г (5,658 ммоль, 40 % изб.) янтарного ангидрида в 5 мл ДМФА. Остатки ангидрида смывали 10 мл охлажденного (+10 °С) ДМФА. Реакционную смесь перемешивали при охлаждении 1,5 ч и 12 ч при комнатной температуре. По окончании реакции (ТСХ контроль) ДМФА упаривали и переупаривали с дистиллированной водой (3 × 20 мл), остатки воды удаляли переупариванием с ацетонитрилом (25 мл), маслообразный остаток затирали под сухим диэтиловым эфиром (2 × 25 мл) с декантацией, далее оставляли на ночь в холодильнике под свежей порцией сухого диэтилового эфира (50 мл). 2/3 объёма эфира декантировали, а осадок отфильтровывали в вакууме на насадке для гигроскопичных веществ, полученный кристаллический продукт высушивали в вакууме над CaCl₂, получали 2,05 г (91 %) VIII хроматографически гомогенного продукта в виде белого кристаллического вещества R_f 0,74 (E), R_f 0,80 (Ж); т.пл. 145–164 °С с разлож.; [α]_D²² + 22,5° (с = 1; метанол). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-d₆), δ, м.д.:

1,21 (м, 8H, 2 C^γH₂ Lys, -NH(CH₂)₂(CH₂)₂(CH₂)₂NH-), 1,36 (уш.с, 26H, 2 C^δH₂ Lys, 2 -OC(CH₃)₃ Boc, -NHCH₂CH₂(CH₂)₂CH₂CH₂NH-), 1,49 и 1,68 (два м, 4H, 2 C^βH₂ Lys), 2,41 (м, 8H, 2 -CH₂CH₂- Suc), 2,86 (м, 4H, 2 C^εH₂ Lys), 3,00 (м, 4H, -NHCH₂(CH₂)₄CH₂NH-), 3,51 и 3,59 (два м, 4H, 2 C^βH₂ Ser), 4,10 (м, 2H, 2 C^αH Lys), 4,27 (м, 2H, 2 C^αH Ser), 5,11 (уш.с, 2H, 2 -ОН Ser), 6,75 (уш.т, 2H, 2 N^εH Lys), 7,66 (уш.т, 2H, -NH(CH₂)₆NH-), 7,88 (уш.д, 2H, 2 NH Lys), 8,08 (уш.д, 2H, 2 NH Ser).

Дитрифторацетат гексаметилендиамида бис-(N-моносукцинил-D-серил-D-лизина), 2 CF₃COOH·(HOOC(CH₂)₂CO-D-Ser-D-Lys-NH-)₂(CH₂)₆ (IX). К суспензии 0,50 г (0,53 ммоль) VIII в 15 мл CH₂Cl₂ приливали 5 мл ТФУ и перемешивали при комнатной температуре, по исчезновению исходного вещества (ТСХ-контроль, 2,5 ч) реакционную смесь упаривали на ротаторном испарителе, переупаривали с CH₂Cl₂ (2 × 15 мл), ещё подвижный остаток затирали под сухим диэтиловым эфиром с декантацией (3 × 20 мл). Далее оставляли под свежей порцией (20 мл) сухого диэтилового эфира на 2 ч, осадок отфильтровывали (насадка для фильтрования гигроскопичных веществ), досушивали в вакууме диафрагменного насоса при 9 мм рт.ст. Соединение IX подвергали 2-кратной лиофилизации для удаления избытка ТФУ. Для этого весь продукт растворяли в деионизованной воде (25 мл), раствор пропускали через фильтр с полиэфирсульфоновой мембраной с диаметром пор 0,45 мкм (производство Швейцария, компании Techno Plastic Product) и лиофилизировали. Получали 0,34 г дитрифторацетата ГСБ-106DD в виде аморфного белого вещества. R_f 0,11 (Ж), R_f 0,55 (И), R_f 0,42 (М); [α]_D²⁴ + 27,88° (с = 1; метанол). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-d₆), δ, м.д.: 1,20 (м, 4H, -NH(CH₂)₂(CH₂)₂(CH₂)₂NH-), 1,33 (м, 8H, 2 C^γH₂ Lys, -NHCH₂CH₂(CH₂)₂CH₂CH₂NH-), 1,50 (м, 4H, 2 C^δH₂ Lys), 1,50 и 1,72 (два м, 4H, 2 C^βH₂ Lys), 2,41 (м, 8H, 2 -CH₂CH₂- Suc), 2,75 (м, 4H, 2 C^εH₂ Lys), 3,00 (м, 4H, -NHCH₂(CH₂)₄CH₂NH-), 3,52 и 3,60 (два м, 4H, 2 C^βH₂ Ser), 4,12 (м, 2H, 2 C^αH Lys), 4,25 (м, 2H, 2 C^αH Ser), 5,23 (с, 2H, 2 -ОН, Ser), 7,71 (уш.с, 6H, 2 N^εH₃ Lys), 7,96 (д, 2H, J 8,0 Гц, 2 NH Lys), 8,10 (д, 2H, J 6,6 Гц, 2 NH Ser), 12,14 (с, 2H, 2 COOH Suc).

Спектр ¹³C-ЯМР (DMCO-d₆), δ, м.д.: 174,46 (с, 2 C, 2 COOH Suc); 172,14; 171,53; 170,81 (три с, 6 C, 2 CO-NH-Suc, 2 CO Lys, 2 CO Ser); 62,17 (с, 2 C, 2 C^β Ser); 55,72 (с, 2 C, 2 C^α Ser); 53,04 (с, 2 C, 2 C^α Lys); 39,18 (с, 2 C, 2 C^ε Lys); 39,05 (с, 2 C, -NHCH₂(CH₂)₄CH₂NH-); 31,27 (с, 2 C, 2 C^β Lys); 30,31 (с, 2 C, 2 -CH₂COOH, Suc); 29,57 (с, 2 C, 2 -COCH₂CH₂- Suc); 29,31 (с, 2 C, -NHCH₂CH₂(CH₂)₂CH₂CH₂NH-); 27,04 (с, 2 C, 2 C^δ Lys); 26,44 (с, 2 C, -NH(CH₂)₂(CH₂)₂(CH₂)₂NH-); 22,90 (с, 2 C, 2 C^γ Lys); 117,5 (кв, 2C, ¹J_{C-F} 300,25 Гц, CF₃COOH), 158,6 (кв, 2C, ²J_{C-F} 31,29 Гц, CF₃COOH).

Гексаметилендиамида бис-(*N*-моносукцинил-*D*-серил-*D*-лизина), (HOOC-(CH₂)₂CO-*D*-Ser-*D*-Lys-NH)₂(CH₂)₆. (ГСБ-106DD). К раствору 0,34 г (0,349 ммоль) IX в 15 мл абс. этанола добавляли ДИПЭА до pH 6–6,5 и смесь оставляли в холодильнике на ночь, выпавший осадок отфильтровывали с использованием насадки для гигроскопичных веществ, промывали этанолом (3 × 10 мл). Осадок растворяли в 15 мл дистиллированной воды, раствор пропускали через фильтр (диаметр пор 0,45 мкм), затем лиофилизовывали. Получали 0,247 г (0,285 ммоль) (~82 %) ГСБ-106DD в виде белого аморфного вещества. *R*_f 0,19 (3), *R*_f 0,53 (И), *R*_f 0,42 (М); [α]_D²⁵ + 42,4° (с = 1; вода). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆), δ, м.д.: 1,21 (м, 4H, -NH(CH₂)₂(CH₂)₂(CH₂)₂NH-), 1,36 (м, 8H, 2 C^γH₂ Lys, -NHCH₂CH₂(CH₂)₂CH₂CH₂NH-), 1,53 (м, 4H, 2 C^δH₂ Lys), 1,64 (м, 4H, 2 C^βH₂ Lys), 2,23–2,44 (м, 8H, 2 -CH₂CH₂- Suc), 2,77 (м, 4H, 2 C^εH₂ Lys), 3,01 (м, 4H, -NHCH₂(CH₂)₄CH₂NH-), 3,59 и 3,66 (два м, 4H, 2 C^βH₂ Ser), 4,05 (м, 4H, 2 C^αH Lys), 4,11 (м, 2H, 2 C^αH Ser), 7,57 (уш. т, 2H, -NH(CH₂)₆NH-), 8,17 (уш. д, 2H, 2 NH Lys), 8,23 (уш. д, 2H, 2 NH Ser).

Спектр ¹³C-ЯМР (DMCO-*d*₆), δ, м.д.: 176,07; 172,61; 171,82; 170,90 (четыре с, 8 C, 2 COOH Suc, 2 CO Suc, 2 CO Lys, 2 CO Ser); 61,66 (с, 2C, 2 C^β Ser); 56,72 (с, 2C, 2 C^α Ser); 53,76 (с, 2C, 2 C^α Lys); 39,06 (с, 2C, -NHCH₂(CH₂)₄CH₂NH-); 38,38 (с, 2C, 2 C^ε Lys); 31,55 и 31,46 (2с, 4C, 2 -CH₂CH₂- Suc); 30,49 (с, 2C, 2 C^β Lys); 29,17 (с, 2C, -NHCH₂CH₂(CH₂)₂CH₂CH₂NH-); 26,78 (с, 2C, 2 C^δ Lys); 26,47 (с, 2C, -NH(CH₂)₂(CH₂)₂(CH₂)₂NH-); 22,56 (с, 2C, 2 C^γ Lys).

Изучение биологической активности *in vivo* / Study of biological activity *in vivo*

Животные. Исследование проведено на 42 мышах-самцах линии BALB/с массой 19–22 г, полученных в Филиале «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Эта линия мышей часто применяется в тесте вынужденного плавания, так как из-за высокого уровня тревожности склонна к депрессивно-подобному поведению, вызванному стрессом [21]. Установлено, что мыши Balb/с отвечают на действие широкого спектра антидепрессантов [22]. Животных содержали при естественной смене светового режима со свободным доступом к стандартному корму и воде. Эксперименты с животными проводили в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств», межгосударственными стандартами серии «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» ГОСТ 33215-2014 и ГОСТ 33216-2014

(Приложение А к Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях (ETS N 123)). Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» (протокол № 2 от 30 января 2023 г.).

Тест вынужденного плавания / Forced swimming test

Данный тест [23] является наиболее распространенным для выявления соединений с антидепрессантной активностью, поскольку чувствителен к действию антидепрессантов с разным механизмом действия и обладает высокой прогностической валидностью [24]. В основе метода лежит наблюдение, что мышь, помещённая в ситуацию неизбежного плавания, в конце концов перестаёт совершать попытки выбраться и принимает характерную позу имобильности (отказ от активно-оборонительного и исследовательского поведения), что интерпретируют как отчаяние [25]. Поза имобильности у мышей показана на рис. 1.



Рис. 1. Характерная поза имобильности у мышей в тесте вынужденного плавания

Fig. 1. Typical immobility posture in mice in the forced swim test

Тест на мышах проводили по модифицированной методике с двумя сессиями плавания. Установка для проведения теста (ООО «НПК Открытая наука», Москва, Россия) представляла собой 5 цилиндров из прозрачного пластика диаметром 10 см и высотой 30 см. Цилиндры заполняли водой температурой 22–23 °С на 2/3 высоты — уровень, при котором животные не имеют возможности опираться на дно цилиндра лапами или хвостом. Животных помещали в цилиндры с водой на 10 мин. Через 24 ч проводили тестовую посадку — животных повторно помещали в те же условия на 5 мин. Поведение животных регистрировали при помощи видеокамеры. Обработку видеоданных осуществляли с помощью программы RealTimer (ООО «НПК Открытая наука», Москва, Россия). Регистрировали суммарное время сохранения животными позы иммобильности. Снижение суммарного времени иммобильности рассматривалось как показатель антидепрессантоподобной активности.

Дизайн эксперимента

Мышей случайным образом разделили на 4 группы по 10–11 животных:

1. Контроль ($n = 10$);
2. ГСБ-106 (DD) ($n = 10$), 0,1 мг/кг;
3. ГСБ-106 (DD) ($n = 11$), 1 мг/кг;
4. Амитриптилин ($n = 11$), 10 мг/кг.

Исследуемое соединение разводили в дистиллированной воде и вводили внутривенно (в/б)

через 1 ч после первой сессии плавания. Дозы исследуемого соединения выбраны на основе активных доз его LL-стереоизомера [26]. В качестве препарата сравнения использовали классический антидепрессант Амитриптилин в виде раствора для инъекций (ФГУП «Московский эндокринный завод», Москва Россия, который вводили в том же режиме в дозе 10 мг/кг, в/б. Доза амитриптилина выбрана на основании данных литературы [27].

Контрольные животные получали в/б дистиллированную воду. Объем введения составлял 10 мл на 1 кг массы мышей. Дизайн эксперимента представлен на рис. 2.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку полученных в ходе экспериментов данных проводили с помощью компьютерной программы GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. В связи с нормальностью распределения выборок статистическую значимость межгрупповых различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с последующими попарными межгрупповыми сравнениями с помощью теста Даннета. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные на рисунках представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего.

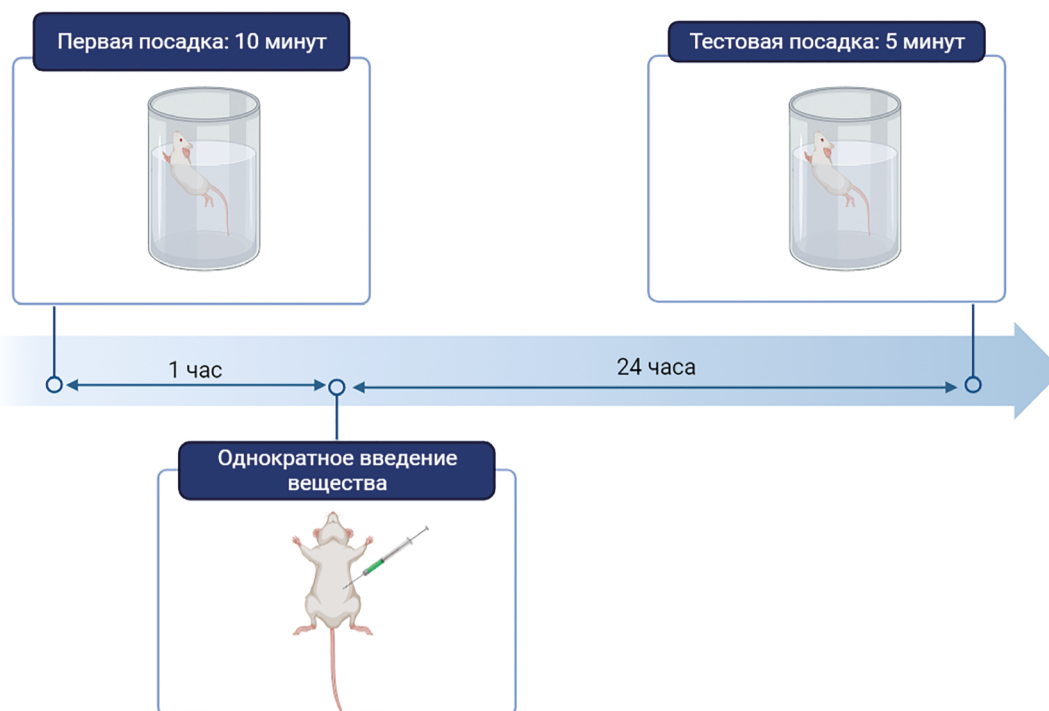


Рис. 2. Дизайн эксперимента
Fig. 2. Design of experiment

Результаты и их обсуждение / Results and Discussion

Синтез ГСБ-106DD

Соединение ГСБ-106DD получали методами классического пептидного синтеза в растворе наращиванием пептидной цепи с С-конца с использованием Z/Boc-стратегии защитных групп и метода активированных N-гидроксисукцинимидных и пентафторфениловых эфиров по общей схеме, представленной на рис. 3.

ГСБ-106DD синтезировали, исходя из коммерчески доступных энантиомерно чистых H-D-Ser-OH и Z-D-Lys(Boc)-OH. На первой стадии получали активированные эфиры защищённых аминокислот. Активированный N-оксисукцинимидный эфир Z/Boc-защищённого лизина (I) получали с выходом 90 %, используя дициклогексилкарбодиимид (ДЦГК) и N-гидроксисукцинимид, синтез вели в этилацетате при +8—+10 °С. Карбобензокси-защищённый серин (II) получали взаимодействием N-бензилоксикарбонилсукцинимида (ZOSu)

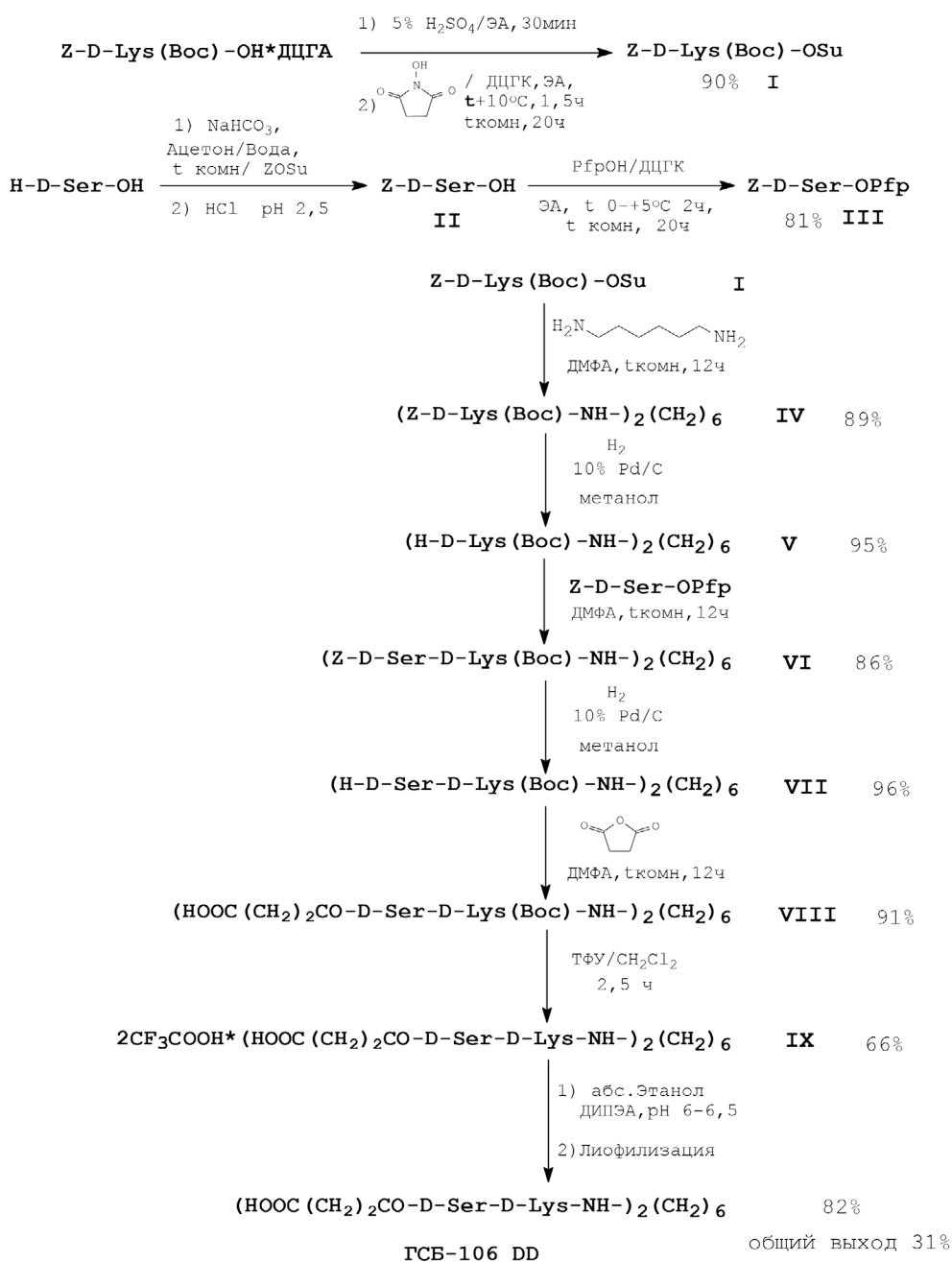


Рис. 3. Схема синтеза ГСБ-106DD
Fig. 3. Synthesis scheme for GSB-106DD

с *D*-серином в смеси ацетон–вода в соотношении 1:1 в присутствии бикарбоната натрия при температуре 20–22 °С [16]. Активированный пентафторфениловый эфир *Z-D-Ser-OPfp* (III) получали с выходом 81 %, используя ДЦГК и пентафторфенол, проводя синтез в этилацетате при 0–+5 °С (28). Конденсация *Z-D-Lys(Boc)-OSu* (I) с гексаметилендиамином в ДМФА при комнатной температуре приводила к бис-продукту (IV) с выходом 89 %, который затем *Z*-деблокировали в условиях каталитического гидрогенолиза (10 % Pd/C), получая гексаметилендиамид бис-(*N*^ε-трет-бутилоксикарбонил-*D*-лизина) (V) с 95 % выходом. Взаимодействием пентафторфенилового эфира (III) и бис-лизина (V) в ДМФА получали продукт (*Z-D-Ser-D-Lys(Boc)-NH*)₂(CH₂)₆ (VI) с выходом 86 %. Бис-дипептид (VI) подвергали каталитическому гидрогенолизу (10 % Pd/C), получая гексаметилен-

диамид бис-(*D*-серил-*N*^ε-трет-бутилоксикарбонил-*D*-лизина) (VII) с выходом 96 %. *Z*-деблокированный бис-дипептид (VII) ацилировали янтарным ангидридом в ДМФА, получая *N*-моносукцинильное производное бис-дипептида (VIII) с выходом 91 %. Кислотный ацидолиз (трифторуксусная кислота) соединения (VIII) приводил к дитрифторацетату (IX). Чистота дитрифторацетата (IX) составляла 98 %, по данным ОФ ВЭЖХ (τ = 12,00 мин). Дитрифторацетат (IX) обрабатывали ДИПЭА в абсолютном этаноле, осадок отфильтровывали, промывали абсолютным этанолом, растворяли в воде и лиофилизировывали. Общий выход ГСБ-106DD составлял 31 % в расчёте на исходный защищённый лизин. Структура и диастереомерная чистота ГСБ-106DD (X) были подтверждены методами одномерной и двумерной ¹H-ЯМР и ¹³C-ЯМР-спектроскопии (табл. 1).

Таблица 1

Физико-химические свойства и данные ЯМР для ГСБ-106DD и ГСБ-106

Table 1

Physico-chemical properties and NMR data for GSB-106DD and GSB-106

Физико-химические характеристики	ГСБ-106LL	ГСБ-106DD
Удельный угол оптического вращения, [α] _D	[α] _D ²³ – 44,4° (с, 1; вода)	[α] _D ²⁵ + 42,4° (с, 1; вода)
Подтверждение структуры – ¹ H-ЯМР (DMSO-d ₆), δ, м.д.	ГСБ-106LL	ГСБ-106DD
м, 4H, -NH(CH ₂) ₂ (CH ₂) ₂ (CH ₂) ₂ NH-	1,20	1,21
м, 8H, 2 C ^α H ₂ Lys, -NHCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂ CH ₂ NH-	1,37	1,36
два м, 8H, 2 C ^β H ₂ Lys, 2 C ^δ H ₂ Lys	1,52-1,70	1,52-1,70
м, 8H, 2 -CH ₂ CH ₂ - Suc	2,07-2,47	2,23-2,44
м, 4H, 2 C ^α H ₂ Lys	2,75	2,77
м, 4H, -NHCH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₂ NH-	3,03	3,01
два м, 4H, 2 C ^β H ₂ Ser	3,62 и 3,69	3,59 и 3,66
м, 4H, 2 C ^α H Lys	4,03	4,05
м, 2H, 2 C ^α H Ser	4,03	4,11
уш. т, 2H, -NH(CH ₂) ₆ NH-	7,53	7,57
уш. д, 2H, 2 NH Lys	8,32	8,17
уш. д, 2H, 2 NH Ser	8,36	8,23
Подтверждение структуры – ¹³ C-ЯМР (DMSO-d ₆), δ, м.д.		
четыре с, 8C, 2 COOH Suc, 2 CO Suc, 2 CO Lys, 2 CO Ser	177,16; 175,08; 172,02; 171,00	176,07; 172,61; 171,82; 170,90
с, 2C, 2 C ^β Ser	61,34	61,66
с, 2C, 2 C ^α Ser	57,31	56,72
с, 2C, 2 C ^α Lys	54,17	53,76
с, 2C, -NHCH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₂ NH-	39,03	39,06
с, 2C, 2 C ^ε Lys	37,89	38,38
два с, 4C, 2 -CH ₂ CH ₂ - Suc	32,36 и 33,08	31,55 и 31,46
с, 2C, 2 C ^β Lys	30,03	30,49
с, 2C, -NHCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂ CH ₂ NH-	29,14	29,17
с, 2 C, 2 C ^δ Lys	26,68	26,78
с, 2 C, -NH(CH ₂) ₂ (CH ₂) ₂ (CH ₂) ₂ NH-	26,45	26,47
с, 2C, 2 C ^γ Lys	22,37	22,56

В спектре ^1H -ЯМР ГСБ-106DD наблюдались сигналы альфа-протонов Lys и Ser, сигналы CH_2 -групп (C^βH_2 , $\text{C}^\delta\text{H}_2$, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$, $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ - Lys, C^βH_2 - Ser, C^1H_2 , C^2H_2 , C^3H_2 — спейсера и C^1H_2 , C^2H_2 , сукцинильного остатка), а также сигналы амидных NH-групп (NH - Lys, NH - Ser и NH — спейсера). В спектре ^{13}C -ЯМР наблюдались сигналы атомов углерода — пять сигнала карбонильных групп, два сигнала C^αH групп и 10 сигналов CH_2 групп (C^βH_2 , $\text{C}^\delta\text{H}_2$, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$, $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ - Lys, C^βH_2 - Ser, C^1H_2 , C^2H_2 , C^3H_2 — спейсера и C^1H_2 , C^2H_2 , сукцинильного остатка). В спектре ^{13}C ЯМР характерные сигналы (квартеты) CF_3 и CO групп трифторуксусной кислоты отсутствовали.

ГСБ-106DD был охарактеризован хроматографической подвижностью в тонком слое силикагеля в различных системах растворителей и удельным углом оптического вращения $[\alpha]_D$ (табл. 1).

Сравнение физико-химических свойств ГСБ-106DD и ГСБ-106 показало, что оба соединения идентичны по хроматографической подвижности, спектрам ^1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР и абсолютным величинам $[\alpha]_D$. Отличия, как и положено для энантиомеров, наблюдались только в знаке удельного угла оптического вращения (см. табл. 1).

Антидепрессантоподобную активность ГСБ-106DD изучали в тесте вынужденного плавания по Порсолту на мышах [23] с использованием в качестве положительного контроля антидепрессанта амитриптилина в дозе 10 мг/кг внутривнутрибрюшинно [27].

Время иммобильности в контрольной группе составляло в среднем 166,3 с. Амитриптилин статистически значимо снижал ($p < 0,0001$) его до 102,2с. Дипептид ГСБ-106DD в отличие от его активного L,L-энантиомера в обеих изученных дозах не оказывал статистически значимого влияния на этот параметр. Время иммобильности в группах мышей, получавших ГСБ-106DD в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг составляло в среднем 151,0 и 151,3 с (рис. 4).

Выводы / Conclusions

Дипептид ГСБ-106DD, в отличие от его L,L-энантиомера, не проявляет антидепрессантоподобных эффектов. Таким образом, антидепрессантоподобная активность ГСБ-106 является стереоспецифичной.

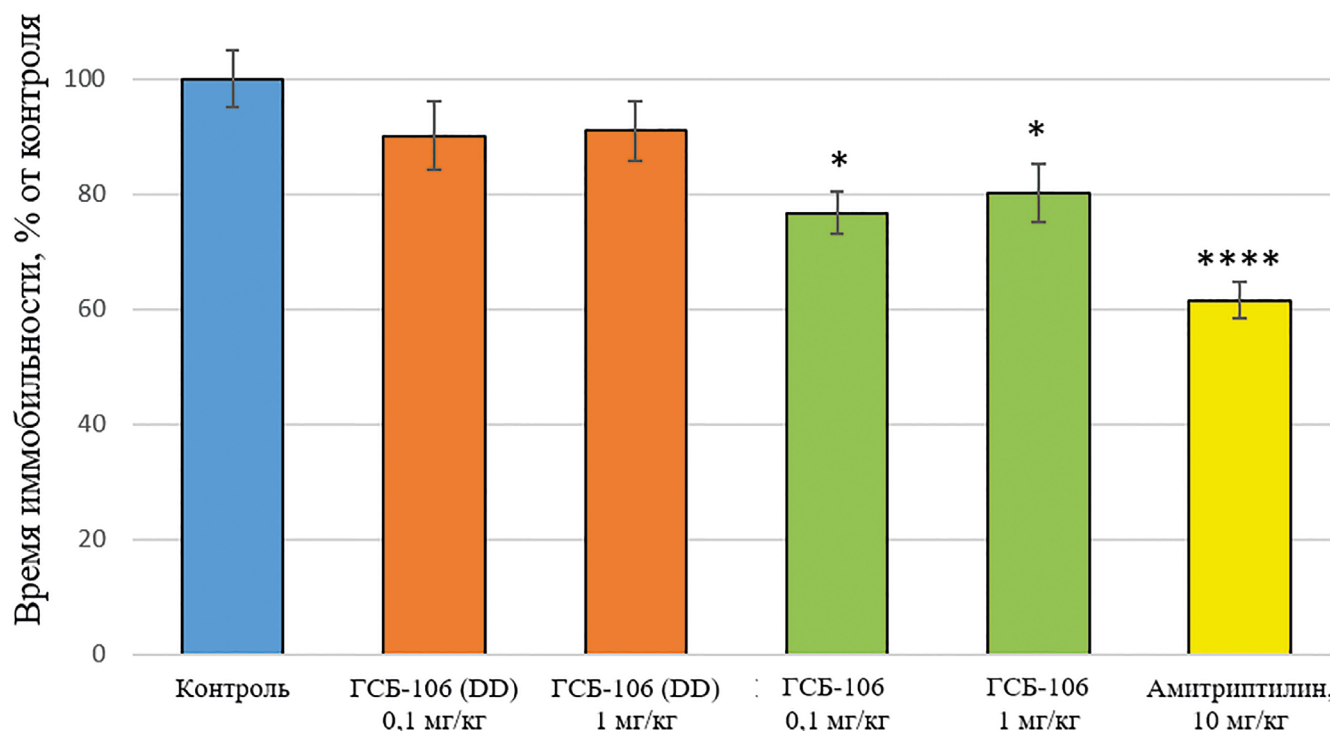


Рис. 4. Результаты исследования антидепрессантоподобной активности ГСБ-106DD в тесте вынужденного плавания в сравнении с Амитриптилином и ГСБ-106

Fig. 4. Results of a study of the antidepressant-like activity of GSB-106DD in the forced swimming test in comparison with Amitriptyline and GSB-106

Примечания: Данные по ГСБ-106 ранее опубликованы в работе [26]. Время иммобильности приведено в % от контрольной группы. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. * — $p < 0,05$, **** — $p < 0,0001$ по сравнению с контрольной группой.
Notes: Data on GSB-106 were previously published in [26]. The immobilization time is given in % of the control group. The data is presented in the form of averages and standard errors of the mean. * — $p < 0.05$, **** — $p < 0.0001$ compared to the control group.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

Финансирование

Работа выполнена без спонсорской поддержки.

ADDITIONAL INFORMATION

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

Authors' participation

All authors made a significant contribution to the preparation of the work, read and approved the final version of the article before publication.

Funding

The work was carried out without sponsorship.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Сазонова Нелля Михайловна

к. х. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7608-7419>
РИНЦ SPIN-код: 8835-7887

Nellya M. Sazonova

PhD, Cand. Sci. (Chemistry), Senior Research Scientist of the Laboratory of Peptide Bioregulators of the Medicinal Chemistry Department Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7608-7419>
RSCI SPIN code: 8835-7887

Тарасюк Алексей Валерьевич

Автор, ответственный за переписку

к. х. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
e-mail: tarasyuk_av@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9750-4157>
РИНЦ SPIN-код: 9670-2415

Alexey V. Tarasyuk

Corresponding author

PhD, Cand. Sci. (Chemistry), Senior Research Scientist of the Laboratory of Peptide Bioregulators of the Medicinal Chemistry Department Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation
e-mail: tarasyuk_av@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9750-4157>
RSCI SPIN code: 9670-2415

Филиппова Мария Юрьевна

Инженер 1-й категории лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

Maria Yu. Filippova

Engineer 1st category of laboratory of peptide bioregulators of medicinal chemistry department Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

Мельникова Марина Валерьевна

м. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов
отдела химии лекарственных средств
ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических
технологий», Москва, Российская Федерация

Никифоров Дмитрий Михайлович

м. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов
отдела химии лекарственных средств
ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических
технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8901-3101>
РИНЦ SPIN-код: 7028-8335

Поварнина Полина Юрьевна

к. б. н., в. н. с. лаборатории пептидных
биорегуляторов отдела химии лекарственных
средств, ФГБНУ «ФИЦ оригинальных
и перспективных биомедицинских и
фармацевтических технологий», Москва,
Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>
РИНЦ SPIN-код: 5498-6724

Гудашева Татьяна Александровна

д. б. н., профессор, член-корреспондент РАН,
руководитель отдела химии лекарственных
средств «ФИЦ оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических
технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5185-4474>
РИНЦ SPIN-код: 4970-0006

Дорофеев Владимир Львович

д. фарм. н., профессор, и/о генерального ди-
ректора «ФИЦ оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических техноло-
гий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0004-3584-3742>

Marina V. Melnikova

Junior Researcher of Laboratory of Peptide Bioregu-
lators of Medicinal Chemistry Department Federal
Research Center for Innovator and Emerging Bio-
medical and Pharmaceutical Technologies, Moscow,
Russian Federation

Dmitry M. Nikiforov

Junior Researcher of Laboratory of Peptide Bioregu-
lators of Medicinal Chemistry Department Federal
Research Center for Innovator and Emerging Bio-
medical and Pharmaceutical Technologies, Moscow,
Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8901-3101>
RSCI SPIN code: 7028-8335

Polina Yu. Povarnina

PhD, Cand. Sci. (Biol.), Leading Research Scientist
of the Laboratory of Peptide Bioregulators of the
Medicinal Chemistry Department Federal Research
Center for Innovator and Emerging Biomedical and
Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian
Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>
РИНЦ SPIN-код: 5498-6724

Tatiana A. Gudasheva

PhD, Dr. Sci. (Biology), Professor, RAS correspond-
ing member, Head of medicinal chemistry depart-
ment Federal research center for innovator and
emerging biomedical and pharmaceutical technolo-
gies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5185-4474>
RSCI SPIN code: 4970-0006

Vladimir L. Dorofeev

PhD, Dr. Sci. (Pharm), Professor, Acting General
Director of Federal research center for innovator
and emerging biomedical and pharmaceutical tech-
nologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0004-3584-3742>

Список литературы / References

- Castrén E, Monteggia LM. Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in Depression and Antidepressant Action. *Biol Psychiatry*. 2021 Jul 15;90(2):128-136. doi: 10.1016/j.biopsych.2021.05.008.
- Патент РФ на изобретение №2410392 / 27.01.2011 Бюл. № 3. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. Дипептидные миметики нейротрофинов NGF и BDNF. [Patent RUS №2410392 / 27.01.2011. Byul. №3. Seredenin SB, Gudasheva TA. Dipeptide mimetics of NGF and BDNF neurotrophins. (In Russ.)]. Доступно по: <https://clck.ru/3DDshf> Ссылка активна на 20.06.2024.
- Patent US-9683014-B2. 2017/06/20. Seredenin SB, Gudasheva TA. Dipeptide mimetics of NGF and BDNF neurotrophins. Available at: <https://clck.ru/3DDt8W> Accessed Jun 20, 2024.
- Patent CN 102365294 B, 2016/02/17. Available at: <https://clck.ru/3DDt89> Accessed Jun 20, 2024.
- Patent EP-2397488-B1. 2019/03/27. Seredenin SB, Gudasheva TA. Dipeptide mimetics of NGF and BDNF neurotrophins. Available at: <https://clck.ru/3DDtBS> Accessed Jun 20, 2024.
- Patent EP 0 296506 A2, 2018. Available at: <https://clck.ru/3DDtDn> Accessed Jun 20, 2024.
- Гудашева Т.А., Логвинов И.О., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Дипептидный миметик 4-й петли мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 активирует TrkB, Erk, Akt и способствует выживаемости нейронов *in vitro*. Доклады Академии наук. 2013;451(5):577-580. [Gudasheva TA, Logvinov IO, Antipova TA, Seredenin SB. Dipeptide mimetics of different NGF and BDNF loops activate PLC- γ 1. *Reports of the Russian Academy of Sciences*. 2020;494(1):486-490. (In Russ.)]. doi: 10.7868/S0869565213240250.
- Гудашева Т.А., Логвинов И.О., Николаев С.В. и др. Дипептидные миметики отдельных петель NGF и BDNF активируют PLC- γ 1. Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2020;494(1):486-490. [Gudasheva TA, Logvinov IO, Nikolaev SV, et al. Dipeptide mimetics of different NGF and BDNF loops activate PLC- γ 1. *Reports of the Russian Academy of Sciences. Life Sciences*. 2020;494(1):486-490. (In Russ.)]. doi: 10.31857/S2686738920050133.
- Антипова Т.А., Логвинов И.О., Деев И.Е. и др. Фармакогенетический анализ взаимодействия низкомолекулярного миметика BDNF дипептида ГСБ-106 с Trk рецепторами. Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2023;511(1):391-394. [Antipova TA, Logvinov IO, Deyev IE, et al. Pharmacogenetic analysis of the interaction of the low-molecular weight BDNF mimetic dipeptide GSB-106 with Trk receptors. *Reports of the Russian Academy of Sciences. Life Sciences*. 2023;511(1):391-394. (In Russ.)]. doi: 10.31857/S2686738923600218. EDN: JFIMHI
- Середенин С.Б., Воронина Т.А., Гудашева Т.А. и др. Антидепрессивный эффект оригинального низкомолекулярного миметика BDNF, димерного дипептида ГСБ-106. *Acta Naturae*. 2013;5(4(19)):116-120. [Seredenin SB, Gudasheva TA, Voronina TA. Antidepressant effect of the original low molecular weight mimetic BDNF, dimeric dipeptide GSB-106. *Acta Naturae*. 2018;10(3(88)):88-92. (In Russ.)].
- Поварнина П.Ю., Гарибова Т.Л., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Дипептидный миметик мозгового нейротрофического фактора обладает свойствами антидепрессанта при пероральном введении. *Acta Naturae*. 2018;10(3(88)):88-92. [Povarnina PYu, Garibova TL, Gudasheva TA, Seredenin SB. Dipeptide mimetic of brain neurotrophic factor has the properties of an antidepressant when administered orally. *Acta Naturae*. 2018;10(3(88)):88-92. (In Russ.)].
- Gudasheva TA, Talerova AV, Mezhlumyan AG, et al. Low-Molecular Weight BDNF Mimetic, Dimeric Dipeptide GSB-106, Reverses Depressive Symptoms in Mouse Chronic Social Defeat Stress. *Biomolecules*. 2021 Feb 10;11(2):252. doi: 10.3390/biom11020252.
- Vakhitova YV, Kalinina TS, Zainullina LF, et al. Analysis of Antidepressant-like Effects and Action Mechanisms of GSB-106, a Small Molecule, Affecting the TrkB Signaling. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 13;22(24):13381. doi: 10.3390/ijms222413381.
- Povarnina PY, Antipova TA, Logvinov IO, et al. Chronically Administered BDNF Dipeptide Mimetic GSB-106 Prevents the Depressive-like Behavior and Memory Impairments after Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *Curr Pharm Des*. 2023;29(2):126-132. doi: 10.2174/1381612829666230103161824.
- Mezhlumyan AG, Talerova AV, Povarnina PY, et al. Antidepressant-like Effects of BDNF and NGF Individual Loop Dipeptide Mimetics Depend on the Signal Transmission Patterns Associated with Trk. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022 Feb 24;15(3):284. doi: 10.3390/ph15030284.
- Paquet A. Introduction of 9-fluorenylmethyloxycarbonyl, trichloroethoxycarbonyl, and benzyloxycarbonyl amine protecting groups into O-unprotected hydroxyamino acids using succinimidyl carbonates. *Canadian Journal of Chemistry*. 1982;60(8):976-980. doi: 10.1139/v82-146.10.1139/v82-146.
- Kuhler JL, Brooks RT, Helms WK et al. Selective synthesis applying amino acids with basic side chains as peptide precursors. *Afr. J. Pure Appl. Chem*. 2009;3(6):108-115.
- Сазонова Н.М., Тарасюк А.В., Шумский А.Н. и др. Синтез и биологические свойства нового дипептидного миметика 2-й петли мозгового нейротрофического фактора. Химико-фармацевтический журнал. 2018;52(9):14-21. [Sazonova NM, Tarasyuk AV, Shumskii AN, et al. Synthesis and biological properties of new dipeptide mimetic of brain derived neurotrophic factor loop. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;52(9):14-21. (In Russ.)]. doi: 10.30906/0023-1134-2018-52-9-14-21.
- Baer E, Maurukas J. Phosphatidyl serine. *J Biol Chem*. 1955 Jan;212(1):25-38.
- Scheurer A, Mosset P, Bauer W, Saalfrank RW. A Practical Route to Regiospecifically Substituted (R)- and (S)-Oxazolyphenols. *Eur J Org Chem*. 2001;3067-3074. doi:10.1002/1099-0690(200108)2001:163.0.CO;2-0
- Belzung C, Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav Brain Res*. 2001 Nov 1;125(1-2):141-9. doi: 10.1016/S0166-4328(01)00291-1.
- Lucki I. Behavioral Despair. *Encycl. Psychopharmacol*. 2014;1-5. doi: 10.1007/978-3-642-27772-6_141-2.
- Yankelevitch-Yahav R, Franko M, Huly A, Doron R. The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *J Vis Exp*. 2015 Mar 2;(97):52587. doi: 10.3791/52587.
- Abdelhamid RE, Kovács KJ, Nunez MG, Larson AA. Depressive behavior in the forced swim test can be induced by TRPV1 receptor activity and is dependent on NMDA receptors. *Pharmacol Res*. 2014 Jan;79:21-7. doi: 10.1016/j.phrs.2013.10.006.
- Belzung C, Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav Brain Res*. 2001 Nov 1;125(1-2):141-9. doi: 10.1016/S0166-4328(01)00291-1.
- Angoa-Pérez M, Kane MJ, Briggs DI, et al. Mice genetically depleted of brain serotonin do not display a depression-like behavioral phenotype. *ACS Chem Neurosci*. 2014 Oct 15;5(10):908-19. doi: 10.1021/cn500096g.
- Тарасюк А.В., Гудашева Т.А., Сазонова Н.М. и др. Анализ зависимости структура-активность в ряду аналогов ГСБ-106-дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора. *Биоорганическая химия*. 2014;40(2):142-156. [Tarasyuk AV, Gudasheva TA, Sazonova NM, et al. Study of structure-activity relationship in series of Gsb-106 analogues-dipeptide mimetics of brain-derived neurotrophic factor. *Bioorg Khim*. 2014;40(2):142-156. (In Russ.)]. doi: 10.7868/S0132342314020134.
- Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Помогайбо С.В. и др. Дизайн и синтез дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора. *Биоорганическая химия*. 2012;38(3):280-290. [Gudasheva TA, Tarasyuk AV, Pomogaibo SV, et al. Design and Synthesis of Dipeptide Mimetics of Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2012;38(3):280-290. (In Russ.)].
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1977 Oct;229(2):327-36.