

4855789

СТЕПАНОВ ЕВГЕНИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**СИНТЕЗ, СТРУКТУРА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ  
АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ  
АДАМАНТАНОВЫЙ ФРАГМЕНТ**

02.00.03 – Органическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

24 ФЕВ 2011

Москва – 2010

На правах рукописи



**СТЕПАНОВ ЕВГЕНИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ**

**СИНТЕЗ, СТРУКТУРА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ  
АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ  
АДАМАНТАНОВЫЙ ФРАГМЕНТ**

02.00.03 – Органическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Самарский государственный университет» на кафедре органической, биоорганической и медицинской химии

*Научный руководитель:* доктор химических наук, профессор  
Пурыгин Пётр Петрович

*Официальные оппоненты:* доктор химических наук, профессор  
Орлов Владимир Юрьевич

доктор химических наук, профессор  
Моисеев Игорь Константинович

*Ведущая организация:* Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова»

Защита состоится «03» 02 2011 г. в 10<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 212.139.01 при Московском государственном текстильном университете имени А.Н. Косыгина по адресу: 119071, г. Москва, ГСП-1, Малая Калужская ул., д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный текстильный университет имени А.Н. Косыгина»

Автореферат разослан «27» 12 2010 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор химических наук, профессор

*Аким*

Кильдева Н.Р.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Разработка новых лекарственных средств для борьбы с различными заболеваниями является приоритетным направлением деятельности химиков в современной медицине. Особую роль играют вирусные заболевания человека, такие как грипп, гепатит, СПИД и другие, уносящие миллионы жизней по всему миру. С другой стороны, постоянно появляются новые штаммы вирусов, устойчивые к существующим лекарственным препаратам, например вирусы птичьего, свиного гриппа и т.п.

Имеющиеся на сегодня наиболее активные противовирусные препараты, созданные на основе нуклеозидов и нуклеотидов, далеко не всегда эффективны, а в качестве профилактических средств крайне дороги. Поэтому при конструировании молекул новых лекарственных препаратов перспективными являются аминокислоты и пептиды, так как они экономически более доступны и могут подвергаться различным структурным модификациям. Использование аминокислот и пептидов также позволяет получать малотоксичные препараты.

Производные адамантана довольно давно и широко применяются в медицине и фармакологии. Эти соединения проявляют достаточно широкий спектр биологической активности: противогрибковая, противомикробная, нейropsychотропная активности и др. Но наиболее известными являются противовирусные свойства производных адамантана. Например, такие производные адамантана как ремантадин и амантадин являются эффективными препаратами в отношении различных штаммов вируса гриппа А. Однако данные препараты не действуют на штамм вируса свиного гриппа H1N1.

Компьютерные методы в настоящее время интенсивно применяются для поиска новых мишеней и базовых структур новых лекарств, а также для оптимизации их фармакодинамических и фармакокинетических характеристик. Польза компьютерных методов поиска новых лекарственных препаратов заключается в повышении безопасности и эффективности новых препаратов, путем заранее предсказанной токсичности и/или новых видов биологической активности.

В связи с этим актуальной задачей является синтез, компьютерный расчет и изучение биологической активности различных пептидов и аминокислот, модифицированных различными адамантильными остатками.

**Цель работы.** Синтез и исследование биологических свойств аминокислот и пептидов, модифицированных адамантильными фрагментами. Установление для молекул синтезированных соединений взаимосвязей между их физико-химическими свойствами (гидрофобность, наличие внутримолекулярных водородных связей) и биологической активностью с использованием компьютерных методов расчета.

**Научная новизна.** В результате проделанной работы были синтезированы модифицированные адамантильным остатком пептиды и аминокислоты, среди них 23 соединения получены впервые.

Проведено исследование активности полученных соединений против вируса свиного гриппа H1N1, а также проведено исследование

53

иммуномодулирующего действия полученных тетрапептидов *in vitro* на крови пациентов с различными иммунными заболеваниями.

При помощи ряда программ МОЕ 2009.10, ACD/Labs 12.0, Discovery Studio Visualizer 2.5, проведены компьютерные расчеты молекул синтезированных соединений, найдены их конформеры с глобальными энергетическими минимумами, для которых проанализированы конформации и водородные связи, проведена оценка гидрофобности молекул синтезированных веществ.

С помощью программного пакета PASS Professional 2007 предсказана биологическая активность синтезированных соединений.

На основании компьютерных расчетов, исследований иммуномодулирующих свойств, анализа активности соединений против вируса свиного гриппа H1N1 показано, что существует корреляция между предсказательной способностью программы PASS Professional 2007 и проявлением реальной биологической активности, а также между структурой молекулы, наличием внутримолекулярных водородных связей, наличием гидрофобных фрагментов и биологической активностью.

**Практическая значимость.** Два синтезированных тетрапептида обладают иммуномодулирующим действием, их влияние на отдельные звенья иммунной системы зависит от степени ее активации. Среди полученных веществ выделены соединения с высокой активностью против вируса свиного гриппа H1N1. Особенностью наиболее активных синтезированных противовирусных соединений, является простота их получения и экономическая доступность.

#### **На защиту выносятся:**

- синтез модифицированных адамантильными остатками аминокислот и пептидов;
- данные компьютерных расчетов синтезированных соединений (поиск конформеров с наименьшей энергией, гидрофобность, внутримолекулярные водородные связи, предсказание биологической активности);
- изучение биологической активности полученных соединений (иммуномодулирующее действие, активность против вируса свиного гриппа H1N1);
- установление взаимосвязей между компьютерными расчетами и результатами биологической активности.

**Апробация работы.** Основные результаты работы представлялись на XVIII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Москва, 2007), XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2008), XXXV Самарской областной студенческой научной конференции (Самара, 2009), VII Всероссийской интерактивной (с международным участием) конференции молодых ученых «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Саратов, 2010), XLI научной конференции студентов (Самара, 2010).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 12 работ: 5 статей в центральной печати, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 7 тезисов докладов международных, российских и областных конференций.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа изложена на 145 страницах, включая введение, литературный обзор, обсуждение результатов, экспериментальную часть, выводы и список литературы, 4 рисунка, 29 таблиц. Список цитируемой литературы включает 140 ссылок. Приложение содержит 9 страниц. Обзор литературы посвящен проблемам синтеза и исследованиям биологической активности пептидов.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

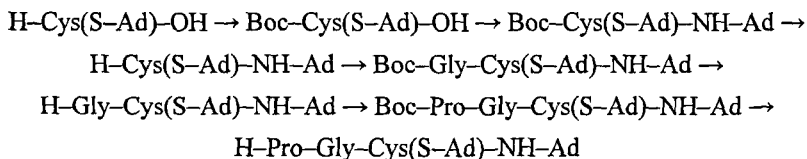
### 1. Синтез пептидов в растворе, на примере синтеза H-Pro-Gly-Cys(S-Ad)-NH-Ad

Для синтеза коротких пептидов с одинаковой эффективностью можно применять как классический синтез пептидов в растворе, так и твердофазный метод синтеза. Твердофазный метод синтеза был применен для ряда некоторых трипептидов, состоящих из остатков пролина и глицина, а также для синтеза тетрапептидов. Остальные соединения синтезированы с помощью классического синтеза пептидов в растворе.

Для классического синтеза в растворе были выбраны следующие методы образования пептидной связи:

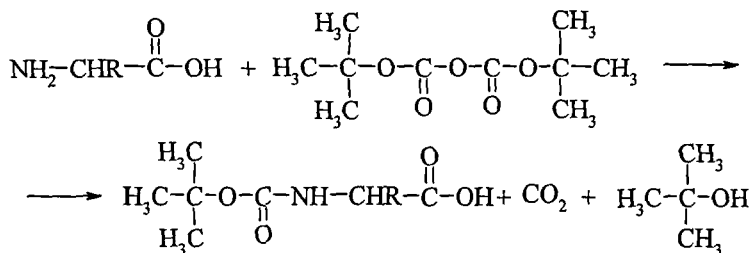
- карбодимидный метод;
- метод активированных эфиров.

#### Общая схема синтеза H-Pro-Gly-Cys(S-Ad)-NH-Ad



Для создания пептидной связи необходимо блокировать одну из реакционноспособных группировок аминокислоты. Для защиты N-конца аминокислот и пептидов использовалась легко удаляемая в сильнокислой среде *трет*-бутилоксикарбонильная группа (Boc). Карбобензокси-защитная группа (*Z*-группа) не была использована из-за сложности ее введения, но в синтезах целевых соединений использовались готовые *Z*-аминокислоты и пептиды.

Введение Boc-группы осуществлялось обработкой аминокислот *ди-трет*-бутиллипиокарбонатом по следующей схеме:

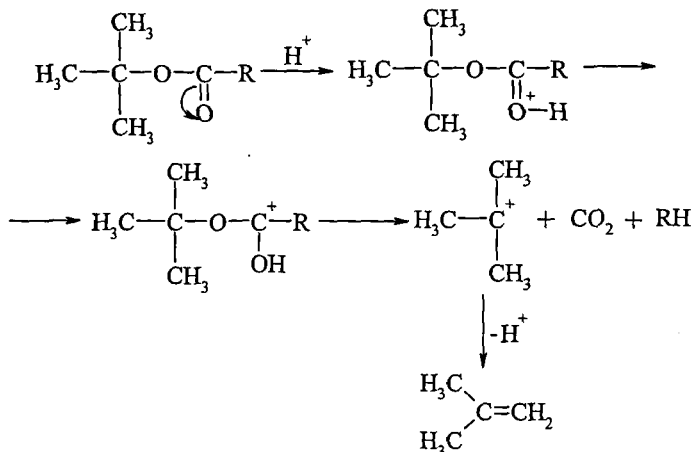


где R = -CH<sub>2</sub>-S-Ad.

Реакция осуществляется в слабощелочной среде, без образования побочных продуктов и с высокими выходами целевых соединений.

Снятие Вос-защиты происходит в сильноокислой безводной среде в мягких условиях. Присутствие воды ведет к расщеплению пептидных связей. Поэтому была использована 100% муравьиная кислота.

Вос-группа удаляется кислотами по предполагаемому мономолекулярному механизму:

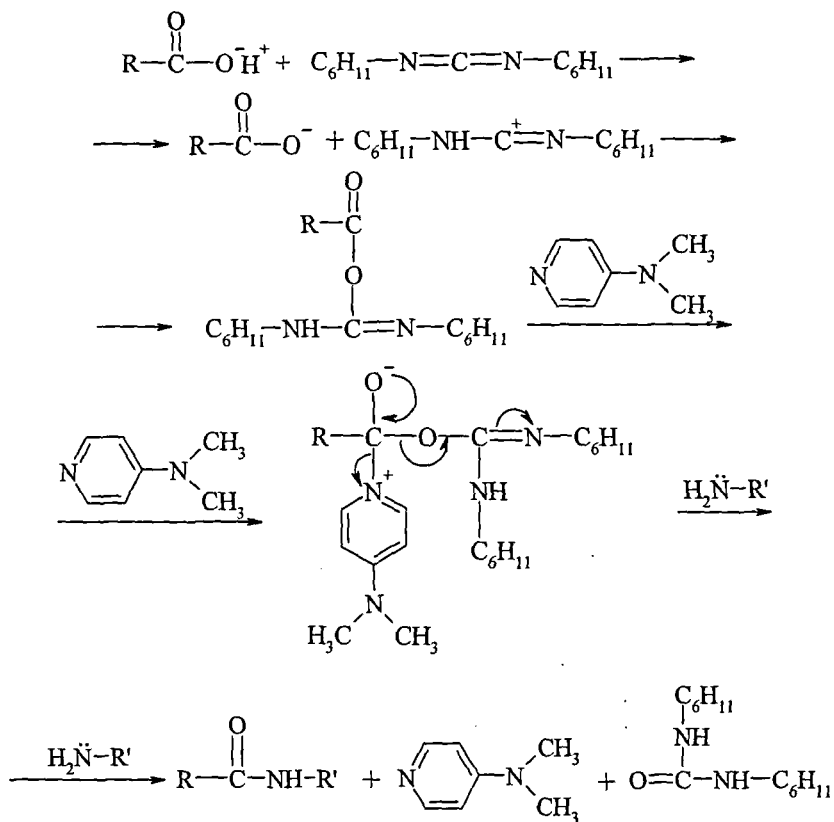


где R = остаток аминокислоты или пептида.

Образование пептидной связи представляет собой нуклеофильную атаку карбонильного атома углерода одной аминокислоты азотом аминогруппы другой аминокислоты. Это достигается за счет активации карбоксильной группы заместителями, оттягивающими электронную плотность (индукционный эффект электроотрицательных заместителей или эффект сопряжения с π-электронной системой).

Дициклогексилкарбодимид (DCC) способен легко реагировать с карбоновыми кислотами с образованием реакционноспособных O-ацелизомочевин.

Хорошим катализатором, повышающим выход при использовании DCC является 4-диметиламинопиридин (DMAP). Но так как данный катализатор повышает рацемизацию аминокислотных остатков, то его использовали за один час до окончания реакции. Реакция образования пептидной связи в этом случае протекает по следующему механизму:

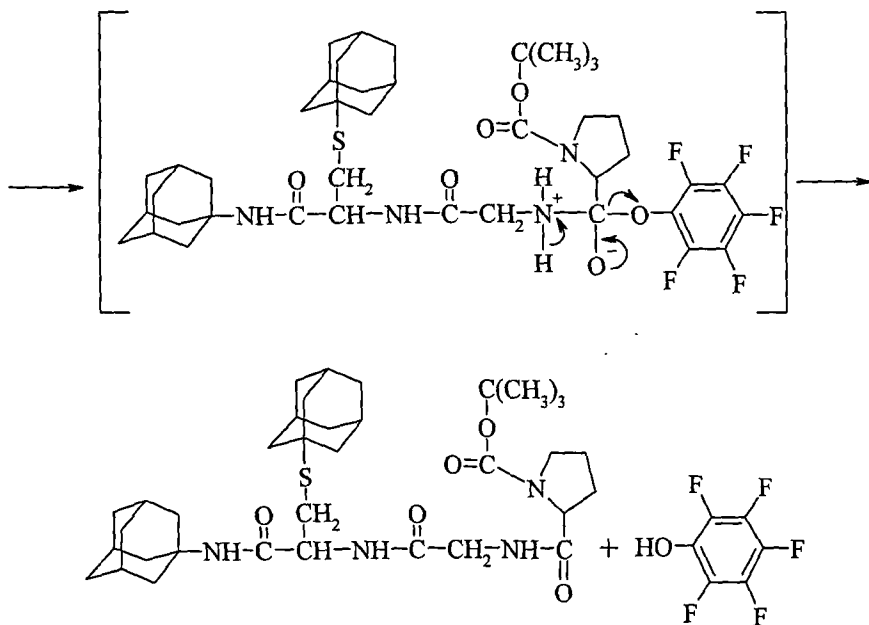
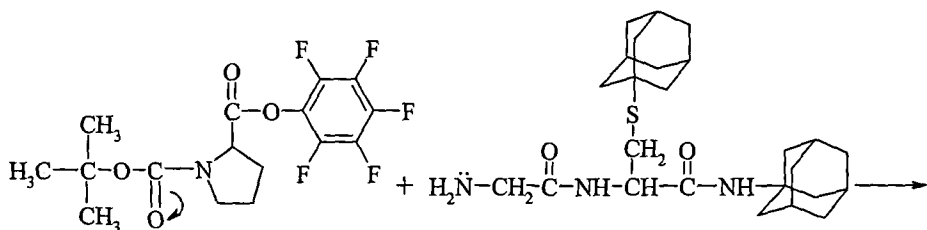


где R, R' = остаток аминокислоты или пептида.

В случае проведения реакции модификации адамантильным остатком аминокислот по C-концу: R = остаток Вос-защищенной аминокислоты; R' = 1-адамантил.

Метод активированных эфиров заключается в использовании сложных эфиров, содержащих электроакцепторные группы. На примере синтеза трипептида Вос-Pro-Gly-Cys(S-Ad)-NH-Ad образование пептидной связи с применением замещенных фениловых эфиров можно представить следующим образом:





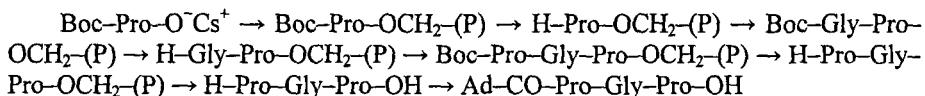
Чем сильнее электроноакцепторные свойства замещенной фенильной группы, тем легче и быстрее проходит реакция образования пептидной связи. Поэтому предпочтительнее было использовать именно пентафторфениловые эфиры, а не пентахлорфениловые и *n*-нитрофениловые эфиры, которые также широко распространены в пептидном синтезе.

## 2. Твердофазный синтез пептидов, на примере синтеза Ad-CO-Pro-Gly-Pro-OH

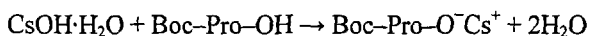
Идея твердофазного синтеза заключается в придании пептидной цепи способности не растворяться в растворителях, используемых для реакции. После присоединения очередного аминокислотного остатка не прореагировавшие реагенты удаляются промыванием полимера.

В твердофазном синтезе была выбрана Вос-стратегия с использованием метода активированных эфиров. В качестве твердой фазы использовалась хлорметилированная смола Меррифилда.

Общая схема синтеза Ad-CO-Pro-Gly-Pro-OH



Получение цезиевой соли глицина проводили в водно-спиртовом растворе, постепенно повышая pH до 7 при помощи 2 М раствора моногидрата гидроокиси цезия:

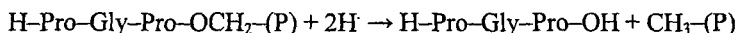


Ковалентное присоединение первого аминокислотного остатка к твердой фазе осуществлялось по методу Гизина. Для повышения выхода продуктов реакции, данный метод усовершенствован за счет использования межфазного катализа, с применением в качестве катализатора иодида тетра-*n*-бутиламмония. Применение данного катализатора позволило повысить выход аминоацелированного полимера, провести синтез при температуре 50 °C и уменьшить расход Woc-Pro.

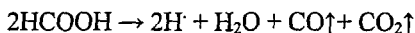
Удаление Вос-группы идет также по мономолекулярному механизму. Но в условиях твердофазного синтеза необходимо учитывать тот факт, что для удаления данной защитной группы с хорошим выходом, необходимо набухание гранул полимера. Поэтому в данном случае используют растворы кислот в органических растворителях, например 50% раствор трифторуксусной кислоты в дихлорметане.

Образование пептидной связи происходит таким же образом, как в классическом растворном синтезе пептидов. Только используется 3- или 4-х кратный избыток реагентов, для достижения практически количественного выхода на каждой стадии реакции присоединения последующего аминокислотного остатка.

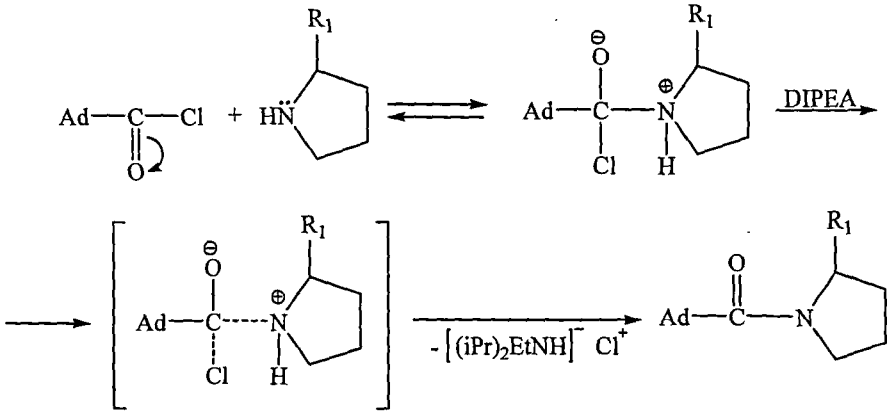
Отщепление пептида от твердой фазы осуществляется путем переносного гидрирования. На данной стадии используется ацетат палладия (II) и восстановитель – формиат аммония или 100% муравьиная кислота:



Восстановительное расщепление связи C-O происходит за счет атомарного водорода, который выделяется в ходе разложения муравьиной кислоты или формиатов над палладиевым катализатором:



Модификацию адамантными производными по N-концу осуществляли взаимодействием пептида с хлорангидридом 1-адамантанкарбоновой кислоты. Для связывания хлороводорода и ускорения реакции добавлялся диизопропилэтиламин (DIPEA). Реакция идет по механизму нуклеофильного замещения ВAc2:



$\text{R}_1 = \text{-Gly-Pro-OH}$

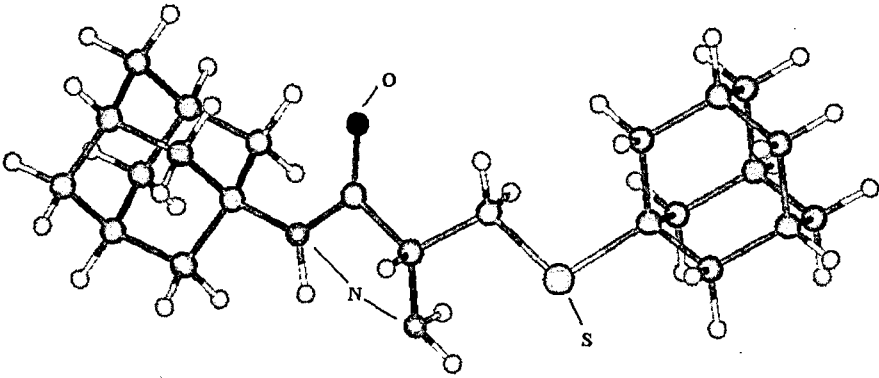
### 3. Анализ внутримолекулярных водородных связей в точках глобального энергетического минимума

Для поиска глобального энергетического минимума использовалась программа Molecular Operating Environment 2009.10 (МОЕ 2009.10) с силовым полем MMFF94x, которое разработано для расчета конформаций структур биоолигомеров и биополимеров. После предварительной оптимизации структур пептидов проводился конформационный поиск с целью нахождения конформера с наименьшей энергией из ста возможных конформеров для данной структуры. Выбор данной программы обусловлен возможностью поиска устойчивых конформеров сложных молекул, имеющих большое количество степеней конформационной свободы.

После минимизации энергии молекул был проведен их анализ на наличие внутримолекулярных водородных связей в полученных соединениях в программе Discovery Studio Visualizer 2.5.

#### H-Cys(S-Ad)-NH-Ad

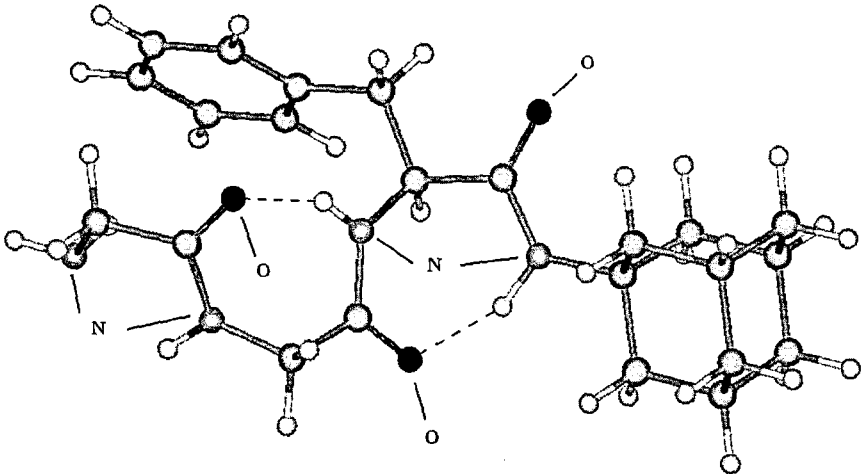
Водородные связи отсутствуют, поскольку геометрия молекулы в условиях энергетического минимума не позволяет им образоваться.



### H-Gly-Gly-Phe-NH-Ad

Водородные связи между:

- 1) атомом кислорода карбонильной группы Gly1 и атомом водорода амидной группы Phe3;
- 2) атомом кислорода карбонильной группы Gly2 и атомом водорода амидной группы Ad.



#### 4. Расчет гидрофобности синтезированных соединений

С помощью программы ACDLabs 12.0 были рассчитаны значения логарифмов коэффициентов распределения  $\lg P$  для синтезированных соединений. Коэффициент распределения  $P$  — безразмерная величина, характеризующая распределение вещества в системе *n*-октанол-вода, в которой *n*-октанол имитирует липидный слой. Если  $\lg P$  равен нулю, то вещество одинаково хорошо растворяется как в органическом слое, так и в водном. Если больше нуля, то исследуемое вещество растворимо в органическом слое, а если меньше, то в водном.

Таблица 1

Гидрофобность модифицированных адамантильным остатком соединений в сравнении с не модифицированными аналогами

№	Пептид	$\lg P_i$	$\lg P_i - \lg P_{i+1}$
1	H-Cys(S-Ad)-Ad	$5,39 \pm 0,56$	6,13
	H-Cys-OH	$-0,74 \pm 0,72$	
2	H-Pro-Gly-Cys(S-Ad)-Ad	$4,69 \pm 0,73$	6,27
	H-Pro-Gly-Cys-OH	$-1,58 \pm 0,60$	
3	H-Phe-Gly-Cys(S-Ad)-Ad	$6,50 \pm 0,74$	6,27
	H-Phe-Gly-Cys-OH	$0,23 \pm 0,63$	
4	Ad-CO-Phe-Gly-Cys(S-Ad)-Ad	$9,26 \pm 0,76$	9,03
	H-Phe-Gly-Cys-OH	$0,23 \pm 0,63$	
5	Ad-CH <sub>2</sub> -CO-Phe-Gly-Cys(S-Ad)-Ad	$9,79 \pm 0,76$	9,56
	H-Phe-Gly-Cys-OH	$0,23 \pm 0,63$	

Таким образом, гидрофобный вклад одной и той же адамантильной группы в одном и том же положении зависит от природы аминокислотных остатков входящих в состав соединения, но не зависит от наличия других адамантильных остатков.

### 5. Компьютерная оценка биологической активности

Расчет вероятностей проявления ( $P_a$ ) и не проявления ( $P_i$ ) различных видов биологической активности проведен в программе PASS Professional 2007.

Рассчитаны вероятности лекарственного подобия, вероятности проявления различных видов фармакологических эффектов, молекулярных механизмов, побочных и токсических эффектов, метаболизма. Из множества полученных значений выбирались восемь фармакологических эффектов следующих типов:

- первые 7 приведенных значений соответствуют вероятности проявления противовирусной активности (особенно против вируса гриппа), а также вероятности проявления иммуномодулирующей и иммуностимулирующей активностей;
- последнее значение – это максимальная вероятность проявления токсического эффекта.

Таблица 2

Биологическая активность H-Cys(S-Ad)-NH-Ad предсказанная с помощью программы PASS Professional 2007

H-Cys(S-Ad)-NH-Ad		
$P_a$	$P_i$	Активность
0,686	0,128	иммуномодулирующая (ВИЧ)

H-Cys(S-Ad)-NH-Ad		
P <sub>a</sub>	P <sub>i</sub>	Активность
0,559	0,118	антивирусная (Arbovirus)
0,495	0,075	антивирусная (Picomavirus)
0,278	0,128	антивирусная (Poxvirus)
0,358	0,076	антивирусная (Adenovirus)
0,366	0,109	иммуностимулирующая
0,367	0,082	антивирусная (Influenza)
0,294	0,269	ДНК-повреждающая

На примере данного соединения видно, что имеется достаточно большая вероятность проявления им антивирусных свойств и, в частности, интересующей нас активности против вируса гриппа. Вероятность проявления токсического эффекта (повреждение ДНК) практически равна вероятности не проявления данного эффекта.

#### 6. Результаты исследования биологической активности полученных соединений

Исследование биологической активности полученных соединений проводили с помощью классического иммуноферментного анализа, используя штамм вируса свиного гриппа (A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl). Результаты противовирусной активности некоторых соединений приведены в таблице 3.

Таблица 3

Результаты испытаний некоторых синтезированных соединений против вируса гриппа А, штамм (A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl)

№	Вещество	Концентрация, мкг/мл	ОП	ОПср	ОПк.к	ОПв.к	Процент ингибирования, %
1	H-Cys(S-Ad)-NH-Ad	10	0,320	0,323	0,342	0,810	104,131
			0,330				
			0,319				
2	H-Pro-Gly-NH-Ad	10	0,610	0,636	0,389	0,494	-135,238
			0,688				
			0,610				

3	H-Gly-Pro-Gly-NH-Ad	5	0,775	0,713	0,475	0,904	44,565
			0,656				
			0,707				
4	3AdCO*Lys-Ile-Ile-Lys	10	0,436	0,479	0,389	0,494	14,286
			0,474				
			0,527				
5	H-Val-Val-Pro-CO-NH-Ad	10	0,865	0,661	0,360	0,680	5,941
			0,665				
			0,656				
6	Ремантадин Ad-CH(CH <sub>3</sub> )-NH <sub>2</sub>	10	0,447	0,487	0,389	0,494	6,984
			0,517				
			0,496				

ОП – оптическая плотность;

ОПср. – среднее значение оптической плотности;

ОПв.к. – оптическая плотность вирусного контроля;

ОПк.к. – оптическая плотность клеточного контроля.

Расчет производился по следующей формуле (результаты округлялись до тысячных):

$$\text{Процент ингибирования (\%)} = 100 - \{[(\text{ОПср.} - \text{ОПк.к.}) / (\text{ОПв.к.} - \text{ОПк.к.})] * 100\}$$

Среди исследованных веществ, два вещества показали степень ингибирования достаточную для использования данных веществ в разработке на их основе лекарственных препаратов:

- H-Gly-Pro-Gly-NH-Ad – 45%;
- H-Cys(S-Ad)-NH-Ad – 100%.

Особенностью синтезированных наиболее активных противовирусных соединений, является простота их получения и экономическая доступность.

Некоторые из синтезированных соединений, например H-Pro-Gly-NH-Ad ускоряют рост вируса. В присутствии данных соединений вирус быстрее размножается, чем по сравнению с чистой питательной средой. Возможно несколько причин возникновения данного факта:

- вещества меняют pH вирусных эндосом и это способствует ускорению стадии высвобождения нуклеокапсида вируса;
- ускоряется мембранное связывание частиц вируса и клеток-мишеней, за счет чего вирус быстрее проникает внутрь клетки;
- вновь образовавшиеся вирусные частицы легче покидают клетки-мишени.

Для синтезированных тетрапептидов программа PASS Professional 2007 показала самую высокую комплексную иммуномодулирующую активность, порядка 73–91% для H-Lys-Ile-Ile-Lys-OH и 60–84% для модифицированного

адамантильным остатком соединения  $3\text{Ad-CO}^*\text{Lys-Ile-Ile-Lys-OH}$ . Для данных соединений было проведено пилотное исследование иммуномодулирующего действия *in vitro* на крови пациентов с различными иммунными заболеваниями.

Таблица 4

Виды воздействия тетрапептидов на кровь пациентов в зависимости от вида иммунного заболевания

Вид заболевания	$\text{H-Lys-Ile-Ile-Lys-OH}$	$3\text{Ad-CO}^*\text{Lys-Ile-Ile-Lys-OH}$
Аутоиммунные заболевания	снижение ФАЛ повышение $\gamma$ -интерферона снижение ИЛ-1 снижение ФНО- $\alpha$	снижение ФАЛ снижение $\gamma$ -интерферона не влияет на ИЛ-1 $\beta$ не влияет на ФНО- $\alpha$
Иммунодефицит	повышение ФАЛ снижение $\gamma$ -интерферона повышение ИЛ-1 $\beta$ повышение ИЛ-6 повышение ФНО- $\alpha$	не влияет на ФАЛ не влияет на $\gamma$ -интерферон снижение ИЛ-1 $\beta$ снижение ИЛ-6 снижение ФНО- $\alpha$
Хронический лимфолейкоз	не влияет на ФАЛ не влияет на $\gamma$ -интерферон повышение ИЛ-1 $\beta$ повышение ИЛ-6 снижение ФНО- $\alpha$	снижение ФАЛ снижение $\gamma$ -интерферона снижение ИЛ-1 $\beta$ снижение ИЛ-6 не влияет на ФНО- $\alpha$

Примечание:

- ФАЛ – фагоцитарная активность лимфоцитов;
- ИЛ-1 $\beta$  – интерлейкин-1 $\beta$ ;
- ИЛ-6 – интерлейкин-6;
- ФНО- $\alpha$  – фактор некроза опухоли- $\alpha$ .

Показано, что оба тетрапептида обладают иммуномодулирующим действием. Влияние на отдельные звенья иммунной системы зависит от степени ее активации. В большинстве случаев действие веществ на иммунологические параметры противоположно.

#### 7. Изучение корреляции между компьютерными методами оценки и биологической активностью синтезированных соединений

На активность против вируса свиного гриппа H1N1 влияет пространственное строение молекулы в совокупности с наличием водородных связей:

- молекула не должна быть слишком большой по размерам и желательно иметь цилиндрическую форму, как например  $\text{H-Cys(S-Ad)-NH-Ad}$ ;
- в молекуле должны оставаться свободными функциональные группы, способные образовывать водородные связи с остатками аминокислот в белковой спирали M2 вируса гриппа;
- в молекуле должны присутствовать некоторые гидрофобные составляющие (адамантильный фрагмент, остаток фенилаланина, остаток пролина и т.п.)



для того, чтобы молекула могла закрепиться в вирусном канале M2 также за счет гидрофобных взаимодействий. Хотя прямой корреляции между гидрофобностью и биологической активностью не обнаружено.

С помощью программы PASS Professional 2007 можно с достаточно большой вероятностью предсказать наличие некоторых видов биологической активности: иммуномодулирующая и антивирусная активность.

## ВЫВОДЫ

1. Методом классического пептидного синтеза в растворе и с помощью твердофазного метода осуществлен синтез 26 коротких пептидов и аминокислот. Среди синтезированных соединений, все модифицированные адамантильными остатками пептиды и аминокислоты получены впервые. Индивидуальность полученных соединений подтверждена данными ТСХ, а структура – данными элементного анализа, ЯМР  $^1\text{H}$  и масс-спектрокопии.

2. Проведено исследование биологической активности полученных соединений. Показано, что тетрапептиды  $\text{H-Lys-Ile-Ile-Lys-OH}$  и  $3\text{Ad-CO}^*\text{Lys-Ile-Ile-Lys-OH}$  обладают выраженным иммуномодулирующим действием. Изучена степень ингибирования вируса свиного гриппа А, штамм (A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw), в сравнении с известным противовирусным препаратом ремантадином, который не ингибирует репликацию вируса свиного гриппа H1N1. Среди исследованных веществ, два вещества показали максимальную степень ингибирования репликации вируса:

- $\text{H-Gly-Pro-Gly-NH-Ad}$  – 45%;
- $\text{H-Cys(S-Ad)-NH-Ad}$  – 100%.

Модифицированные адамантильным остатком 6-аминогексановая кислота и D-норлейцин показали высокую ингибирующую активность при слабой вирусной нагрузке (концентрация частиц вируса в 100 раз меньше стандартной):

- $\text{Ad-CH}_2\text{-CO-D-norLeu-OH}$  – 82%
- $\text{Ad-CH}_2\text{-CO-NH-(CH}_2\text{)}_5\text{-COOH}$  – 100%

Некоторые соединения, например  $\text{H-Pro-Gly-NH-Ad}$ , напротив, ускоряют вирусную репликацию.

3. Для молекул синтезированных веществ с помощью программы MOE 2009.10 найдены конформеры с глобальными энергетическими минимумами. В программе Discovery Studio Visualizer 2.5 проведен анализ конформаций и водородных связей для молекул полученных соединений в точках глобального минимума. Установлено, что водородные связи при данных конформациях находятся внутри молекулы, а гидрофобные фрагменты (адамантильные и фенильные остатки) ориентированы наружу, что позволяет таким пептидам при плохой растворимости в воде легко проходить через липидные бислои биологических мембран. Оценка гидрофобности молекул синтезированных веществ при помощи программы ACD/Labs 12.0 показала, что гидрофобный вклад одной и той же адамантильной группы в одном и том же положении зависит от природы аминокислотных остатков входящих в состав соединения, но не зависит от наличия других адамантильных остатков.

4. Предсказана биологическая активность синтезированных соединений при помощи программного пакета PASS Professional 2007. Среди предсказанных видов биологической активности были выделены иммуномодулирующие, иммуностимулирующие, антивирусные свойства. Компьютерная оценка показала, что в большинстве случаев модификация пептидов адамантильным остатком повышает вероятность проявления антивирусной и иммуномодулирующей активности и снижает токсичность соединений.

5. На примере исследованных антивирусных активностей синтезированных соединений и пилотного исследования иммуномодулирующих свойств, показано, что существует определенная корреляция между предсказательной способностью программы PASS Professional 2007 и проявлением реальной биологической активности. Показана взаимосвязь между структурой молекул, наличием водородных связей, наличием гидрофобных фрагментов и их антивирусной и иммуномодулирующей активностью.

#### **Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:**

1. Пурьгин П.П., Срибная О.С., Степанов Е.А., Данилин А.А. Твердофазный метод синтеза потенциальных противовирусных препаратов пептидной природы // Вестник СамГУ – Естественнонаучная серия. 2010. №2 (76). – С.159-168.
2. Степанов Е.А., Пурьгин П.П., Чунаев А.О. Получение некоторых потенциально биологически активных трипептидов, с помощью твердофазного синтеза // Бутлеровские сообщения. 2010. Т.19, №1. – С.17-24.
3. Степанов Е.А., Пурьгин П.П., Чунаев А.О., Обухов С.В. Получение некоторых потенциально биологически активных трипептидов. Активность против вируса свиного гриппа // Бутлеровские сообщения. 2010. Т.21, №7. – С.14-23.
4. Степанов Е.А., Пурьгин П.П., Чунаев А.О., Обухов С.В. Получение некоторых потенциально биологически активных трипептидов на основе S-адамантил-1-цистеина. Активность против вируса свиного гриппа // Бутлеровские сообщения. 2010. Т.21, №8. – С.1-11.
5. Степанов Е.А., Пурьгин П.П., Чунаев А.О. Получение новых антивирусных препаратов пептидной природы // Бутлеровские сообщения. 2009. Т.15, № 2. – С.43-48.
6. Степанов Е.А., Чунаев А.О. Синтез адамантансодержащих гетероциклов / Тезисы докладов XVIII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии: В 5 т.; т.5 – М.: Граница, 2007. – С.223.
7. Чунаев А.О., Степанов Е.А. Получение некоторых азотсодержащих гетероциклов адамантанового ряда / Материалы докладов XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых

- «Ломоносов» / М.: Издательство МГУ; СП МЫСЛЬ, 2008. — 1 электрон. опт. диск (CD-ROM); 12 см. – С.535.
8. Степанов Е.А., Чунаев А.О., Пурьгин П.П. Региоселективный синтез адамантансодержащих пептидов без предварительной защиты С-концевой аминокислоты / Тезисы докладов XXIV Международной Чугаевской конференции по координационной химии, Санкт-Петербург 15-19 июня 2009 г. Санкт-Петербург: АНО «Русский запад», 2009. – С.532-533.
  9. Гасова М.И., Пурьгин П.П., Степанов Е.А. Изучение антибактериальных свойств модифицированных пептидов / Тезисы докладов XXXV Самарской областной студенческой научной конференции. 14-24 апреля 2009 г., Самара. 2009. – С.160.
  10. Степанов Е.А., Пурьгин П.П., Чунаев А.О. Активность адамантансодержащих пептидов против вируса свиного гриппа / Тезисы докладов VII Всероссийской интерактивной (с международным участием) конференции молодых ученых «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии». 15 июня. Саратов, 2010. – С.120-121.
  11. Лачугина О.Д., Пурьгин П.П., Степанов Е.А. Синтез модифицированных адамантильным остатком пептидов, с потенциальной антивирусной активностью / Тезисы докладов XLI научной конференции студентов. 5-12 апреля 2010 года, Самара, Россия. – С.45.
  12. Обухов С.В., Пурьгин П.П., Степанов Е.А. Синтез и структура адамантилсодержащих трипептидов с возможным антивирусным действием / Тезисы докладов XLI научной конференции студентов. 5-12 апреля 2010 года, Самара, Россия. – С.48.

Подписано в печать 14.12.10 Формат бумаги 60x84/16  
Бумага множ. Усл.печ.л. 1,13 Заказ 410 Тираж 80  
ГОУВПО «МГУ им. А.Н. Косыгина»,  
119071, Москва, ул. Малая Калужская, 1