

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на тему:
**«НОВЫЕ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПЕПТИДЫ МЕДИЦИНСКОГО
НАЗНАЧЕНИЯ»,**

представленной на соискание ученой степени «доктора философии» (PhD) по специальности 6D072100 – «Химическая технология органических веществ»
КЕНЖЕБАЕВОЙ БИБІГУЛ АЙВАРҚЫЗЫ

Общая характеристика работы. Диссертационная работа посвящена разработке синтеза нового пептида, а также модификации известных пептидов для обозначения значимости конкретного аминокислотного остатка к стабильности селективных пептидов. Данная работа изучает синтез, идентификацию и разделение пептидов с помощью массовой спектрометрии, и спектрометрии ядерного магнитного резонанса.

Актуальность темы заключается в синтезе новых **органических соединений** - пептидов, обладающих опухоль-таргетным **потенциалом** и получении новых органических субстанций, применяемых для лечения онкологических заболеваний.

Онкологические заболевания являются одними из наиболее распространенных в Казахстане, в частности, рак предстательной железы. Ежегодно в мире выявляется 1,3 млн новых случаев, а в Казахстане регистрируется более 1200 впервые выявленных случаев рака предстательной железы в год.

Тем временем, традиционная и общепринятая химиотерапия злокачественных новообразований использует препараты основного действия, которые после введения распространяются по всему организму и приводит к нежелательным последствиям.

Поэтому в мире разрабатывают и апробируют специальные методы и препараты для более эффективного лечения онкобольных пациентов. Наиболее перспективным является разработка и применение лекарственных веществ – нацеленный агент для лечения различных онкозаболеваний, а также позволяющим наблюдать за этим процессом.

Несмотря на некоторые достижения в терапии рака, основной проблемой все-таки является недостаточная избирательность противоопухолевых терапевтических агентов.

В этой связи на сегодняшний день наиболее перспективными в борьбе с раком выявлены опухоль-таргетные пептиды. Поэтому разработка методов использования таргетной химиотерапии, использующей проникающие в клетки пептиды, помогает распределить препарат на рецепторах клеток-мишеней, разрушает мембраны раковых клеток и сдерживает доступ к здоровым клеткам, что увеличивает эффективность действия лечящих препаратов.

Новым прорывом в лечении раковых заболеваний стала фотодинамическая терапия (ФДТ). Это уникальная методология, основанная

на применении фотосенсибилизаторов, которая продемонстрировала невероятные возможности в лечении онкобольных пациентов, безопасности и снижении токсичности по сравнению с химиотерапией. Однако самые ранние фотосенсибилизаторы (первого и второго поколения), созданные или только изучаемые, в своем большинстве не проявляли избирательности по отношению к больным клеткам и имели тенденцию накапливаться в коже и других здоровых тканях. Это, в свою очередь, вызывало реакцию фоточувствительности кожи на свет.

Цель работы: синтез новых органических соединений на основе аминокислот, обладающих опухольтаргетными свойствами, а также исследование физико-химических свойств синтезированных пептидов.

Задачи исследования:

1) Синтез нового органического соединения CWKUreaE на основе аминокислот Fmoc-L-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, H-Fmoc-Lys-OtBu*HCl и смолы Fmoc-Glu(OtBu)-Wang, обладающего опухольтаргетными свойствами в ручном и автоматическом режиме.

2) Определение оптимальных условий синтеза пептида

3) Изучение физико-химических свойств синтезированных пептидов

4) Модификация (аланиновое сканирование) пептида CRGDK на основе Fmoc-L-Cys (Trt)-OH, Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-wang смолы, обладающих свойствами доставки лекарств к раковым клеткам.

5) Модификация (аланиновое сканирование) пептида CGNKRTR на основе Fmoc-L-Cys (Trt)-OH, Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)- OH и смолы Fmoc-L-Lys(Boc)-wang, обладающих опухоль-таргетными свойствами.

Методология и методы исследования: в процессе работы использовались стандартные методы твердофазного синтеза пептидов. Для подтверждения структуры полученных в результате синтеза соединений использовались современные методы физико-химического анализа: жидкостная хроматография (ЖХ-МС), масс-спектрометрия (МС), ядерный магнитный резонанс (ЯМР). Проведено разделение и определение чистоты полученных веществ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Объекты исследования: гидрохлорид трет-бутилового эфира N-альфа-(9-флуоренилметилоксикарбонил)-L-лизина (Fmoc-L-Lys-OtBu HCl), N-альфа-(9-флуоренилметилоксикарбонил)-N-ин-трет-бутилоксикарбонил-L-триптофан (Fmoc-L-Tryptophan-(Boc)-OH), N-альфа-(9-флуоренил-метилокси-карбонил)-S-третил-L-цистеин (Fmoc-Cys(Trt)-OH), 5-трет-бутиловый 1-(4-бензилоксибензиловый) эфир Fmoc-L-глутаминовой кислоты, связанная со смолой Ванга.

Научная новизна. Впервые был синтезирован новый пептид CWKUreaE на основе аминокислот Fmoc-L-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, H-Fmoc-Lys-OtBu*HCl и смолы Fmoc-Glu(OtBu)-Wang resin.

Определен химический состав и физико-химические свойства нового синтезированного пептида.

Впервые выполнена модификация (аланиновое сканирование) пептидов CGNKRTR и CRGDK на основе Fmoc-L-Cys (Trt)-OH, Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-wang смолы.

Проведен комплекс технологических, физических, химических исследований для обоснования разработки лекарственных средств, обладающих противораковым воздействием, на основе нового синтезированного пептида.

Практическая значимость исследования. Синтез нового пептида на основе селективных аминокислот, модификация пептидов и изучение физико-химических свойств были выполнены для обоснования эффективности полученных пептидов при лечении раковых клеток.

Основные положения, выносимые на защиту:

- синтез пептида CWKUreaE для определения расположения раковых клеток;
- возможность и перспективность использования пептидов в обнаружении и лечении раковых клеток;
- подбор оптимальных условий для модифицированной аминокислоты;
- модификация пептидов CRGDK и CGNKRTR для выявления значимости функциональных групп;
- фактическая возможность применения жидкостной хроматографии для разделения и очистки органических соединений;
- определение стабильности пептидов.

Степень достоверности. Достоверность проведенных исследований подтверждена экспериментальными данными, полученными с помощью современных физико-химических и химических методов: жидкостной хроматографии, масс-спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Личный вклад диссертанта. Личный вклад автора состоит в сборе, анализе и обобщении имеющихся научных публикаций по способам химической модификации и адресной доставки лекарственных средств на основе пептида, изучении возможностей получения биосовместимых продуктов с помощью многокомпонентных реакций и подходов динамической комбинаторной химии, в формулировании научных гипотез и их проверки в результате проведения химических и физических экспериментов, обработке, анализе и обобщению полученных спектральных данных и результатов исследований.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и обсуждения, заключения и списка использованных источников. Работа изложена на 93 страницах, содержит 56 рисунков, 21 таблицу и 86 использованных источника.

КЕНЖЕБАЕВА БИБІГҮЛ АЙВАРҚЫЗЫНЫҢ

6D072100 – «Органикалық заттардың химиялық технологиясы»

мамандығы бойынша философия докторы (PhD)

дәрежесін алу үшін ұсынылған

«Медициналық қолдануға арналған жаңа модификацияланған пептидтер»

тақырыбындағы диссертациялық жұмысының

АҢДАТПАСЫ

Жұмыстың жалпы сипаттамасы. Диссертациялық жұмыс жаңа пептидтердің синтезін дамытуға, сондай-ақ белгілі пептидтерді модификациялауға арналған, селективті пептидтердің тұрақтылығы үшін белгілі бір амин қышқылы қалдығының маңыздылығын көрсетуге арналған. Бұл жұмыс масс-спектрометрия және ядролық магниттік-резонанстық спектрометрия көмегімен пептидтердің синтезін, идентификациясын және бөлінуін зерттейді.

Тақырыптың өзектілігі мынада жаңа органикалық қосылыстардың синтезі – ісікке бағытталған **потенциалы** бар пептидтер және қатерлі ісіктерді емдеу үшін қолданылатын жаңа органикалық заттардың өндірісі.

Қазақстанда онкологиялық аурулар, атап айтқанда, қуық асты безінің қатерлі ісігі жиі кездеседі. Жыл сайын әлемде 1,3 миллион жаңа жағдай анықталса, Қазақстанда жылына 1200-ден астам простата обырының жаңадан анықталған жағдайы тіркеледі.

Сонымен қатар, қатерлі ісіктердің дәстүрлі және дәстүрлі химиотерапиясында біріншілік әсер ететін препараттар қолданылады, олар енгізілгеннен кейін бүкіл денеге таралады және жағымсыз салдарға әкеледі.

Сондықтан дүние жүзінде онкологиялық науқастарды тиімдірек емдеу үшін арнайы әдістер мен препараттар жасалып, сынақтан өтуде. Өртүрлі онкологиялық ауруларды емдеуге арналған мақсатты агент, сондай-ақ осы процесті байқауға мүмкіндік беретін дәрілік заттарды әзірлеу және пайдалану ең перспективалы болып табылады.

Қатерлі ісік терапиясының кейбір жетістіктеріне қарамастан, негізгі мәселе әлі де ісікке қарсы емдік агенттердің селективтілігінің болмауы болып табылады.

Осыған байланысты бүгінгі күні ісікке бағытталған пептидтер қатерлі ісікке қарсы күресте ең перспективалы болып анықталды. Сондықтан жасушаға енетін пептидтерді пайдалана отырып, мақсатты химиотерапияны қолдану әдістерін әзірлеу препаратты мақсатты жасушалардың рецепторларына таратуға көмектеседі, рак клеткаларының мембраналарын бұзады және сау жасушаларға қол жеткізуді тежейді, бұл емдеу препараттарының тиімділігін арттырады.

Фотодинамикалық терапия (PDT) қатерлі ісік ауруын емдеудегі жаңа серпіліс болды. Бұл фотосенсибилизаторға негізделген бірегей әдістеме, химиотерапиямен салыстырғанда онкологиялық науқастарды қауіпсіз және

уыттылығы төмендетілген емдеуде керемет уәде берді. Дегенмен, жасалған немесе енді ғана зерттеліп жатқан ең ерте фотосенсибилизаторлар (бірінші және екінші ұрпақтар) көп жағдайда ауру жасушаларға селективтілік танытпады және теріде және басқа сау тіндерде жиналуға бейім болды. Бұл, өз кезегінде, терінің жарыққа фотосезімталдық реакциясын тудырды.

Жұмыстың мақсаты: ісіктерге бағытталған қасиеттері бар аминқышқылдары негізінде жаңа органикалық қосылыстарды синтездеу, сонымен қатар синтезделген пептидтердің физика-химиялық қасиеттерін зерттеу.

Зерттеу мақсаттары:

- 1) және Fmoc-Glu(OtBu) аминқышқылдарына негізделген жаңа CWKUreaE органикалық қосылысының синтезі. -Қолмен және автоматты режимде ісікке қарсы қасиетке ие Ван шайыры .
- 2) Пептидтер синтезінің оңтайлы шарттарын анықтау
- 3) Синтезделген пептидтердің физика-химиялық қасиеттерін зерттеу
- 4) Fmoc-L-Cys (Trt)-OH, Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-L негізіндегі CRGDK пептидінің модификациясы (аланинді сканерлеу) -Arg (Pbf)-OH, Fmoc - L - Lys (Woc) -ванг шайырлары қатерлі ісік жасушаларына дәрі-дәрмек жеткізу қасиеті бар.
- 5) Fmoc-L-Cys (Trt)-OH, Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-L негізіндегі CGNKRTR пептидінің модификациясы (аланинді сканерлеу) -Arg (Pbf)-OH және Fmoc - L - Lys (Woc)-wang шайырлары, олардың ісіктерді анықтау қасиеттері бар.

Әдістеме және зерттеу әдістері: жұмыс барысында қатты фазалық пептидтік синтездің стандартты әдістері қолданылды. Синтез нәтижесінде алынған қосылыстардың құрылымын растау үшін физика-химиялық талдаудың заманауи әдістері қолданылды: сұйық хроматография (LC-MS), масс-спектрометрия (MS), ядролық магниттік резонанс (ЯМР). Алынған заттардың бөлінуі және тазалығын анықтау жоғары өнімді сұйық хроматография көмегімен жүзеге асырылды.

Зерттеу объектілері: N-альфа-(9-фторенилметилоксихарбонил)-L-лизин терт-бутил эфир гидрохлориді (Fmoc - L - Lys - OtBu HCl), N -альфа-(9-фторенилметилоксихарбонил)-N - in-терт-бутилоксихарбонил- L -триптофан (Fmoc - L - триптофан- (Woc) -OH), N -альфа-(9-фторенил-метил-окси - карбонил)-S - тритил- L -цистеин (Fmoc - Cys (Trt) -OH), Fmoc - L - глутамин қышқылы 5-терт-бутил 1-(4-бензилоксибензил) эфир Ван шайырымен байланысқан.

Ғылыми жаңалық. Алғаш рет жаңа пептид CWKUreaE Fmoc-L-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Woc)-OH, H-Fmoc-Lys-OtBu*HCl және Fmoc-аминқышқылдары негізінде синтезделді. Glu(OtBu)-Wang шайыры

Жаңа синтезделген пептидтің химиялық құрамы мен физика-химиялық қасиеттері анықталды.

Алғаш рет CGNKRTR және CRGDK пептидтерінің модификациясы (аланинді сканерлеу) Fmoc-L-Cys (Trt)-OH, Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-L-

Gly-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc -L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-wang шайыры.

Жаңа синтезделген пептид негізінде ісікке қарсы әсері бар препараттардың дамуын негіздеу үшін технологиялық, физикалық және химиялық зерттеулер кешені жүргізілді.

Зерттеудің практикалық маңызы. Алынған пептидтердің ісік жасушаларын емдеудегі тиімділігін негіздеу үшін селективті аминқышқылдары негізінде жаңа пептидтің синтезі, пептидтердің модификациясы және физика-химиялық қасиеттерін зерттеу жүргізілді.

Қорғауға ұсынылатын негізгі ережелер:

- қатерлі ісік жасушаларын орналасуын анықтау үшін cwkureae пептидінің синтезі;

- қатерлі ісік жасушаларын анықтау мен емдеуде пептидтерді қолдану мүмкіндігі мен болашағы;

- модификацияланған амин қышқылы үшін оңтайлы жағдайларды таңдау;

- функционалды топтардың маңыздылығын анықтау үшін crgdk және CGNKRTR пептидтерін өзгерту;

- органикалық қосылыстарды бөлу және тазарту үшін сұйық хроматографияны қолданудың нақты мүмкіндігі;

- пептидтердің тұрақтылығын анықтау.

Сенімділік дәрежесі. Жүргізілген зерттеулердің сенімділігі қазіргі заманғы физика-химиялық және химиялық әдістерді қолдану арқылы алынған тәжірибелік мәліметтермен расталады: сұйық хроматография, масс-спектрометрия, жоғары өнімді сұйық хроматография.

Диссертанттың жеке үлесі. Автордың жеке үлесі пептидті препараттарды химиялық модификациялау және мақсатты жеткізу әдістері бойынша қолда бар ғылыми жарияланымдарды жинаудан, талдаудан және қорытындылаудан, көпкомпонентті реакциялар мен динамикалық комбинаторлық химия тәсілдерін қолдану арқылы биоүйлесімді өнімдерді алу мүмкіндіктерін зерттеуден, ғылыми гипотезаларды тұжырымдау мен оларды сынаудан тұрады. нәтижесінде химиялық және физикалық эксперименттер жүргізу, алынған спектрлік мәліметтерді және зерттеу нәтижелерін өңдеу, талдау және қорытындылау.

Диссертацияның құрылымы мен көлемі. Диссертация кіріспеден, әдебиеттерге шолудан, эксперименттік бөлімнен, нәтижелер мен талқылаудан, қорытындыдан және пайдаланылған әдебиеттер тізімінен тұрады. Жұмыс 93 бетте берілген, 56 сурет, 21 кесте және пайдаланылған 86 дереккөзден тұрады.

ABSTRACT

To the Ph.D. thesis

"THE NEW MODIFIED PEPTIDES FOR THE MEDICAL USE"

Submitted for the degree of "Doctor of Philosophy" (Ph.D.) in the specialty
6D072100 - "Chemical Technology of Organic Substances" of

KENZHEBAYEVA BIBIGUL AIVARKYZY

General description of work. The dissertation work is devoted to the development of the synthesis of a new peptide, as well as modification of known peptides to indicate the significance of a specific amino acid residue to the stability of selective peptides. This work studies the synthesis, identification and separation of peptides using mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectrometry.

The relevance of the topic lies in synthesis of new **organic compounds** - peptides with tumor- targeting **potential** and production of new organic substances used for the treatment of cancer.

Oncological diseases are among the most common in Kazakhstan, in particular prostate cancer. Every year, 1.3 million new cases are detected in the world, and in Kazakhstan, more than 1,200 newly diagnosed cases of prostate cancer are registered per year.

Meanwhile, traditional and conventional chemotherapy for malignant neoplasms uses drugs of primary action, which, after administration, spread throughout the body and lead to undesirable consequences.

Therefore, special methods and drugs are being developed and tested around the world for more effective treatment of cancer patients. The most promising is the development and use of medicinal substances - a targeted agent for the treatment of various oncological diseases, as well as allowing observation of this process.

Despite some advances in cancer therapy, the main problem is still the lack of selectivity of antitumor therapeutic agents.

In this regard, today tumor- targeted peptides have been identified as the most promising in the fight against cancer. Therefore, the development of methods for using targeted chemotherapy using cell-penetrating peptides helps distribute the drug to the receptors of target cells, destroys the membranes of cancer cells and inhibits access to healthy cells, which increases the effectiveness of the treatment drugs .

Photodynamic therapy (PDT) has become a new breakthrough in the treatment of cancer. A unique photosensitizer-based methodology has demonstrated incredible promise in treating cancer patients with safety and reduced toxicity compared to chemotherapy. However, the earliest photosensitizers (first and second generations), created or just being studied, for the most part did not show selectivity towards diseased cells and tended to accumulate in the skin and other healthy tissues. This, in turn, caused the skin to react photosensitivity to light.

Purpose of the work: synthesis of new organic compounds based on amino acids with tumor-targeting properties, as well as study of the physicochemical properties of the synthesized peptides.

Research objectives:

1) Synthesis of a new organic compound CWKUreaE based on the amino acids Fmoc-L-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, H-Fmoc-Lys-OtBu*HCl and Fmoc-Glu (OtBu)-Wang resin , having tumor- targeting properties in manual and automatic mode .

2) Determination of optimal conditions for peptide synthesis

3) Study of the physicochemical properties of synthesized peptides

4) Modification (alanine scanning) of the CRGDK peptide based on Fmoc - L- Cys (Trt)-OH, Fmoc -L- Asp (OtBu)-OH, Fmoc -L- Gly -OH, Fmoc - Ala -OH, Fmoc -L- Arg (Pbf)-OH , Fmoc - L - Lys (Boc) -wang resins with drug delivery properties to cancer cells .

5) Modification (alanine scanning) of the CGNKRTR peptide based on Fmoc -L- Cys (Trt)-OH, Fmoc -L- Asp (OtBu)-OH, Fmoc -L- Gly -OH, Fmoc - Ala -OH, Fmoc -L- Arg (Pbf)-OH and Fmoc - L - Lys (Boc)-wang resins , which have tumor- targeting properties.

Methodology and research methods: standard methods of solid-phase peptide synthesis were used during the work. To confirm the structure of the compounds obtained as a result of the synthesis, modern methods of physicochemical analysis were used: liquid chromatography (LC-MS), mass spectrometry (MS), nuclear magnetic resonance (NMR). The separation and determination of the purity of the obtained substances was carried out using high-performance liquid chromatography.

Objects of study: N-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-L-lysine tert-butyl ester hydrochloride (Fmoc - L - Lys - OtBu HCl), N -alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-N - yne-tert- butyloxycarbonyl - L -tryptophan (Fmoc - L - Tryptophan- (Boc) -OH) , N -alpha-(9-fluorenyl-methyl-oxy -carbonyl)-S - trityl - L- cysteine (Fmoc - Cys (Trt) -OH), Fmoc - L - glutamic acid 5-tert-butyl 1-(4-benzyloxybenzyl) ester bound to Wang resin .

Scientific novelty. For the first time, a new peptide CWKUreaE was synthesized based on the amino acids Fmoc -L- Cys (Trt)-OH, Fmoc -L- Trp (Boc)-OH, H- Fmoc - Lys-OtBu * HCl and Fmoc-Glu (OtBu) -Wang resin resin .

The chemical composition and physicochemical properties of the new synthesized peptide were determined.

For the first time, modification (alanine scanning) of the peptides CGNKRTR and CRGDK was performed based on Fmoc-L-Cys (Trt)-OH, Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc -L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-wang resin.

A set of technological, physical, and chemical studies was carried out to substantiate the development of drugs with anticancer effects based on a new synthesized peptide.

Practical significance of the study. The synthesis of a new peptide based on selective amino acids, modification of peptides, and study of physicochemical properties were carried out to substantiate the effectiveness of the resulting peptides in the treatment of cancer cells.

Main provisions submitted for defense:

- synthesis of the CWKUreaE peptide to determine the location of cancer cells;
- the possibility and prospects of using peptides in the detection and treatment of cancer cells ;
- selection of optimal conditions for the modified amino acid;
- modification of peptides CRGDK and CGNKRTR to reveal the significance of functional groups ;
- the actual possibility of using liquid chromatography for the separation and purification of organic compounds;
- determination of peptide stability.

Degree of confidence. The reliability of the research carried out is confirmed by experimental data obtained using modern physicochemical and chemical methods: liquid chromatography, mass spectrometry, high-performance liquid chromatography.

Personal contribution of the dissertation candidate. The author's personal contribution consists of collecting, analyzing and summarizing available scientific publications on methods of chemical modification and targeted delivery of peptide-based drugs. She studied the possibilities of obtaining biocompatible products using multicomponent reactions and dynamic combinatorial chemistry approaches, formulating scientific hypotheses and testing them as a result conducting chemical and physical experiments, processing, analyzing and summarizing the obtained spectral data and research results.

Structure and scope of the dissertation. The dissertation consists of an introduction, literature review, experimental part, results and discussion, conclusion and list of sources used. The work is presented on 93 pages, contains 56 figures, 21 tables and 86 sources.