



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ С ЦЕНТЪР ПО ФИТОХИМИЯ
Лаборатория “Химия и биофизика на протеини и ензими”

Боряна Красиминова Якимова

ДИЗАЙН И СИНТЕЗ НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ПЕПТИДИ
КАТО ПОТЕНЦИАЛНИ ИНХИБИТОРИ НА АНГИОТЕНЗИН
ПРЕВРЪЩАЩИЯ ЕНЗИМ (АСЕ I)

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор”

Професионално направление 4.2. „Химически науки“,
Научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и
физиологично активните вещества“

Научен ръководител:
проф. дн Иванка Стойнева

София, 2021 г.

Изследванията, свързани с дисертационния труд са проведени в лаборатория „Химия и биофизика на протеини и ензими“- Институт по органична химия с Център по фитохимия, Българска Академия на Науките

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от колоквиума „Функционални материали, компютърно моделиране и технологии“ при ИОХЦФ-БАН на 31.03.2021 г.

Дисертационният труд е изложен на 124 страници, включва 39 фигури, 6 таблици и 21 схеми. Библиографията обхваща 124 литературни източника. Резултатите са отразени в 4 научни публикации и са представени на 12 научни форума.

Номерацията на фигурите и таблиците в автореферата е същата, както в дисертацията.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на XX.XX.2021 год. от XX часа в зала 111, ул. „Акад. Г. Бончев“, блок 9, на открито заседание на Научното жури.

Материалите по защитата са на разположение за интересувашите се в канцеларията на ИОХЦФ-БАН, стая 206, ул. „Акад. Г.Бончев“, блок 9, гр. София.



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ С ЦЕНТЪР ПО ФИТОХИМИЯ
Лаборатория “Химия и биофизика на протеини и ензими”

Боряна Красиминова Якимова

ДИЗАЙН И СИНТЕЗ НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ПЕПТИДИ
КАТО ПОТЕНЦИАЛНИ ИНХИБИТОРИ НА АНГИОТЕНЗИН
ПРЕВРЪЩАЩИЯ ЕНЗИМ (АСЕ I)

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор”

Професионално направление 4.2. „Химически науки“,
Научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и
физиологично активните вещества“

Научен ръководител:
проф. дн Иванка Стойнева

София, 2021 г.

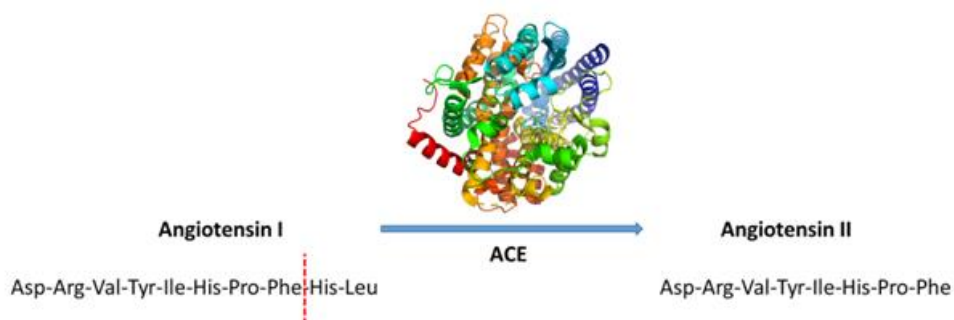
I. ВЪВЕДЕНИЕ

Хипертонията е водещ рисков фактор за здравето на хората в световен мащаб и това налага търсенето на нови подходи за решаване на този проблем. България е на едно от водещите места по заболявания свързани със сърдечно-съдовата система, което определя актуалността на изследванията в тази посока.

В клиничната практика за лечение на хипертония се използват: вазодилататори, диуретици, блокери на Са-канални, блокери на Ang II рецептори и инхибитори на ангиотензин превръщащият ензим - I (ACE I). Веществата, които повлияват функционирането на системата ренин-ангиотензин (RAS), са се доказали като най-ефективни медикаменти и постигат най-съществен ефект в нормализирането на артериалното кръвно налягане.

Във времето на „новата нормалност“ интересът към изследванията на нови инхибитори на ангиотензин-превръщащия ензим (ACE I) като модулатори на ренин-ангиотензиновата система (RAS) нараства много. Това се дължи не само на значението им като лекарства за лечение на хипертония, но и заради техният потенциал за изучаване на развитието на коронавирусната инфекция (COVID-19).

Ангиотензин I-превръщащият ензим (ACE I) въздейства не само върху трансформацията на ангиотензин I в ангиотензин II, който има вазопресорно действие в системата ренин-ангиотензин (RAS), а също така инактивира брадикинин, който притежава съдоразширяващи свойства.



Добре известно е, че в човешките тъкани ACE I се среща в две изоформи (2 домейна) - соматична и тестикуларна форма. Соматичният ACE I (sACE) има два структурно хомоложни активни центъра (N- и C-), докато тестикуларният ACE I (tACE) има един активен център, идентичен с C-центъра на соматичния ACE I- sACE. Има проучвания, които показват разлики в инхибиторната и субстратната селективност на N- и C-домейна на ACE I при хора, плъхове и мишки. Съществува още един хомолог на

ACE I, известен като ACE 2, и неговите протеинови рецептори са отговорни за свързване на коронавируса, предизвикващи заболяването Ковид-19.

Различни класове синтетични инхибитори на ангиотензин превръщащия ензим се използват при лечението на хипертония и на други свързани с това състояние сърдечно-съдови заболявания. Въпреки дългогодишната употреба в медицинската практика на различни синтетични инхибитори като каптоприл, лизиноприл, фозиноприл, еналаприл и др. те понякога имат нежелани странични ефекти като суха кашлица, кожни обриви, нарушена бъбречна функция, хиперкалиемия и др. Трябва да се отбележи, че често се наблюдава лоша корелация между инхибиторната активност на ACE I на биоактивни инхибитори *in vitro* и *in vivo*. Това може да се дължи отчасти на протеиназите в стомашно-чревния тракт или на ниската бионаличност на изследваните инхибитори.

В глобален аспект има нарастващ интерес към алтернативни източници на биоактивни продукти с антихипертензивно действие изолирани от природни обекти поради широкото им приложение в медицината за терапия и превенция на различни социални заболявания, както и като добавки към храни за спорта или включването им в диети при хора с наднормено тегло. Известно е, че почти всички изследвания върху пептидните инхибитори на ACE са проведени с препарати изолирани от природни източници. Очаква се, ACE I инхибитори, изолирани от различни естествени източници, ефективно да контролират нивото на кръвното налягане и в същото време да имат минимални странични ефекти. Количествата на тези пептиди варират в милиграмовата скала. Това налага търсенето на алтернативни пътища за получаването им в количества достатъчни за научни и приложни цели.

При дизайна на пептиди за терапевтични цели е необходима детайлна информация за конформационните изисквания на тези пептиди спрямо активният център на ACE I и постигане на максимална биологична активност. Интерес представлява да се изследват биологичните свойства на получени по химически път пептидни инхибитори на ACE I.

Използвани съкращения

RAS - Ренин-ангиотензинова система

ACE I - Ангиотензин-превръщащ ензим I

ANG II – Ангиотензин II

ACE 2 - Ангиотензин-превръщащ ензим 2

Fmoc-Cl – флуоренилметилокси карбонил хлорид

DMF - диметилформамид

Et₃N - триетиламин

FAPGG –N-[3-(2-Furyl) acryloyl]-Phe-Gly-Gly, N-[3-(2-фурил) акрилоил] – фенилаланил-глицил-глицин

AT –I –Ангиотензин I

AT –II - Ангиотензин II

II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Изследванията в този дисертационен труд са в областта на биоорганичната химия и са насочени към синтез на биологично активни съединения с потенциално приложение в биомедицината.

Основните цели на настоящият дисертационен труд са следните:

1. Да се осъществи структурен и синтезен дизайн на късоверижни пептиди, с потенциални свойства като инхибитори на ангиотензин-превръщащия ензим (ACE).
2. Да се реализира синтезен дизайн на аминокиселинни естери на моно- и дизахари като потенциални инхибитори на ангиотензин-превръщащия ензим (ACE) за фармацевтични цели и като хранителни добавки.
3. Провеждане на кинетични изследвания с новосинтезираните пептидни инхибитори с използване на флуорогенни субстрати

За осъществяване на тези цели бяха поставени следните задачи:

1. Твърдофазен и теченофазен синтез на късоверижни пептиди
2. Химичен синтез на цианметилови естери на различни аминокиселини
3. Намиране на ефективен метод за трансестерификация на цианметилови естери на аминокиселини с моно- и дизахариди
4. Пречистване, структурно охарактеризиране и доказване на синтезираните пептиди и аминокиселинни производни на захарите с ЯМР анализи и хроматографски методи.
5. Провеждане на *in vitro* „ и „*ex vivo* „ биологични изследвания с новосинтезираните съединения

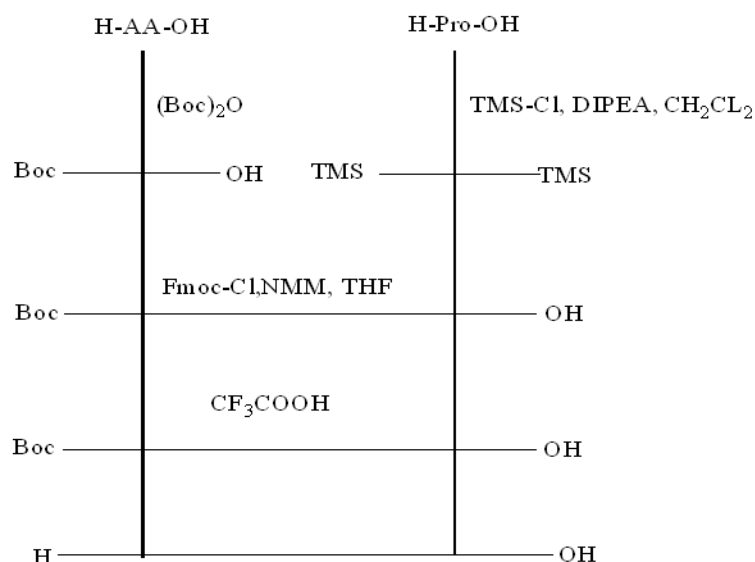
III. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

III.1 Синтез и пречистване на целевите пептиди

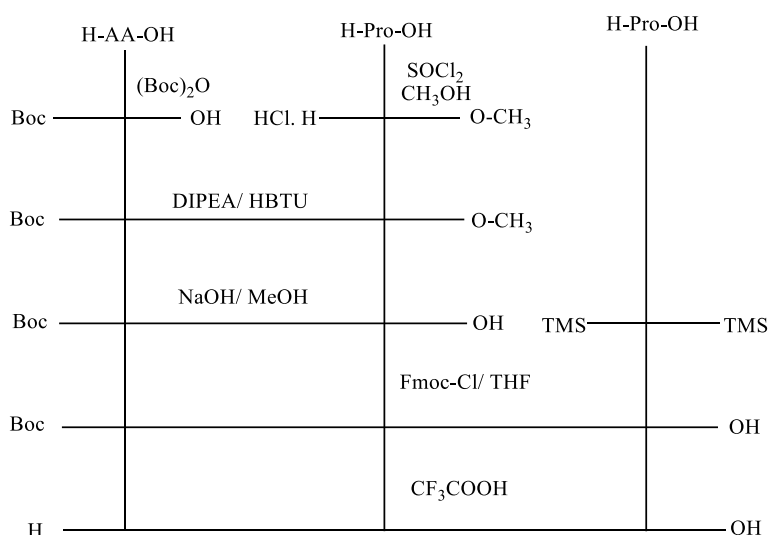
От литературни данни е известно, че са изолирани много късоверижни пептиди, които показват висока АСЕ инхибиторна активност *in vitro*, но на практика те са не приложими, тъй като бързо биха се хидролизирани от панкреатичните ензими в стомаха. При различни клинични изследвания е установено е, че пептидни структури съдържащи пролин в С-края си са устойчиви на протеазите в стомашно чревния тракт. От друга страна аминокиселината пролин е една от най-важните съставни части в много от лекарствата на основата на пептиди. Пролиновите производни - естери и соли се използват като активни съставки във фармакологията за лечение на тумори.

Природните АСЕ-инхибитори, показващи антихипертензивен ефект *in vivo* най-често са пролиновите трипептиди – H-Val-Pro-Pro-OH и H-Ile-Pro-Pro-OH или пептиди съдържащи тези фрагменти. Трипептидите H-Val-Pro-Pro-OH и H-Ile-Pro-Pro-OH, които се използват за инхибиторни изследвания *in vivo* и *in vitro* обикновено са изолирани от казеинови хидролизати и не се предлагат от фирмите производители на пептиди получени чрез химичен синтез. Една от причините е, че пептиди съдържащи пролилов остатък лесно образуват като страничен продукт дикетопиперазини, които трудно се отстраняват от реакционната смес, а самите пептиди се получават с ниски добиви и трудно се пречистват.

Структурно-функционални изследвания показват, че и редица дипептиди също оказват инхибиторен ефект върху АСЕ. Това беше мотивацията за синтез на пролинови дипептиди. Избраният подход с използване на Fmoc-Cl като кондензиращ агент при течнофазния синтез, се оказа особено ефективен и добивите на целевите продукти бяха в границите 55-85 %. Установено бе, че Fmoc-Cl като известен, кристален и достъпен на пазара, евтин реагент може да се използва успешно за образуване на пептидна връзка. Примерни схеми за течнофазен синтез на пролинови ди- и трипептиди за кинетични структурни и теоретични изследвания са показани на фиг.12 и фиг.13.



Фиг.12. Обща схема за течнофазен синтез на дипептиди, където AA= Val или Ile.



Фиг. 13. Обща схема за течно- фазен синтез на трипептиди, където AA= Val или Ile

В. Merrifield поставя началото на нов период в развитието на пептидната химия с пионерската си историческа работа за принципите и приложението на твърдофазния пептиден синтез. Неговата методология предлага един непрекъснат процес при който 1-та аминикиселина се свързва към неразтворим носител. Удължаването на пептидната верига се постига степенно, като се редуват процесите свързване и деблокиране, като страничните продукти се отстраняват чрез просто филтруване и промиване и накрая сваляне от смолата (Схема 1).

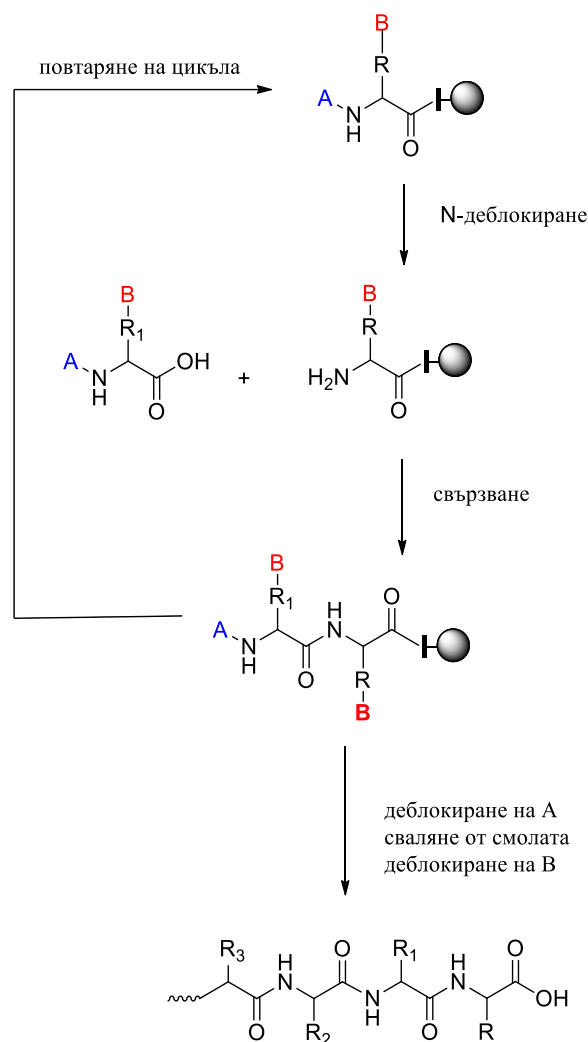


Схема 1. Моделно представяне на твърдофазен пептиден синтез: A: N- α - защитна група; B: Защитна група на страничната верига; R: Функционална група в С-края, най-често - OH или - NH₂.

Стратегията с използване на 2-Cl-тритил-хлоридна-смола при твърдофазния пептиден синтез (SPPS) се оказва особено ефективна при получаването на пролинови трипептиди и тетрапептид. При този метод не се наблюдава образуване на нежелани странични продукти - дикетопиперазини и др. Предимството на този метод е, че се избягват трудоемките и продължителни пречистващи процедури, които съпътстват течено-фазния синтез на всеки етап. Бяха използвани два вида смола: 2- Cl- тритил-хлоридна смола за синтеза на пептидите съдържащи аминикиселината пролин и Wang-смола за синтеза на съединенията, несъдържащи пролин в аминокиселинната си последователност. Примерни схеми за получаване на биоактивни пептиди обект на тази дисертация като H-Leu-Lys-Pro-OH и H -Ile-Ala-Lys-OH са показани на схема 12 и схема 17.

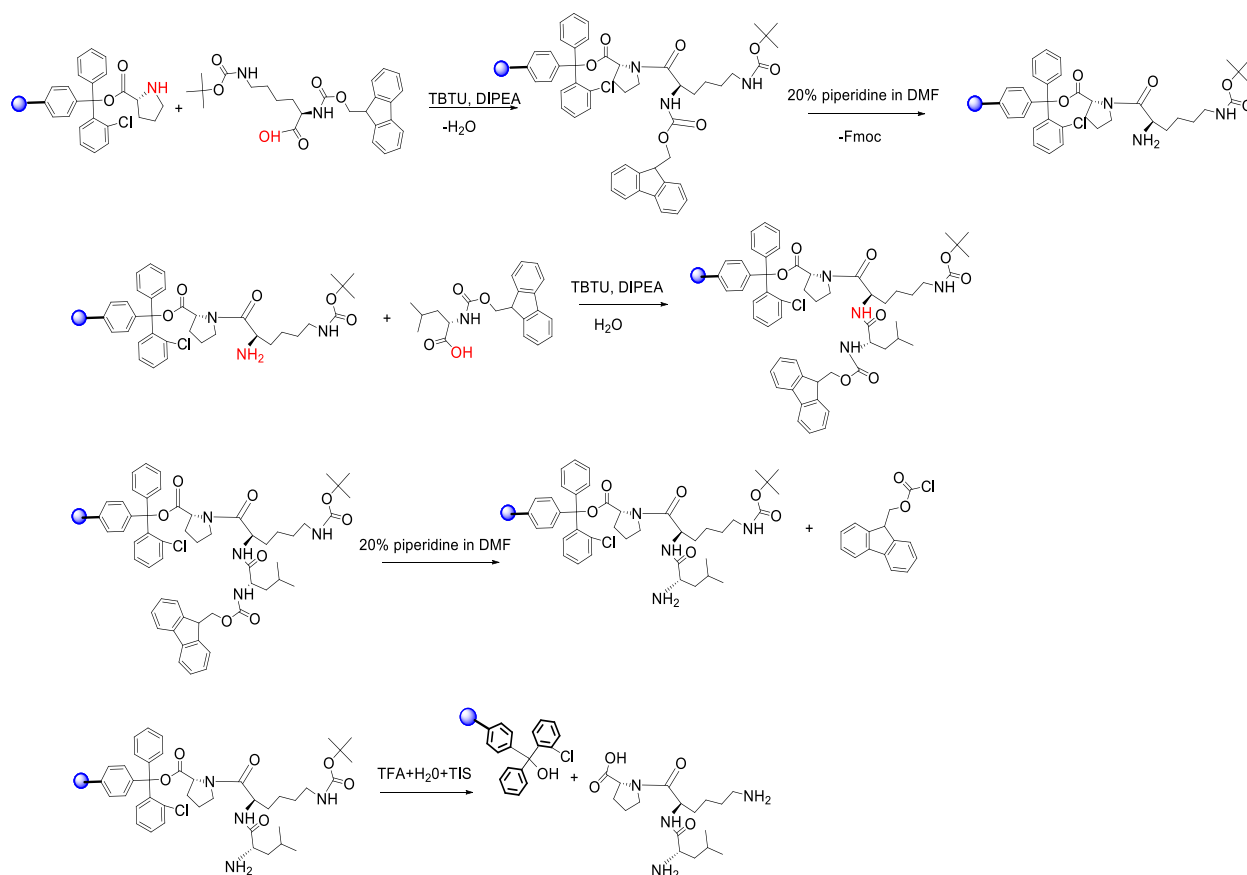


Схема 12. Реакционна схема на синтез на трипептида H-Leu-Lys-Pro-OH;

Реактиви и условия: Wang смола, Fmoc-Ala, Fmoc-Ile, HOBT, TBTU, DIPEA, TFA / триизопропилсилан / H₂O (95: 2.5: 2.5), стайна температура, 1.5ч. реакционно време.

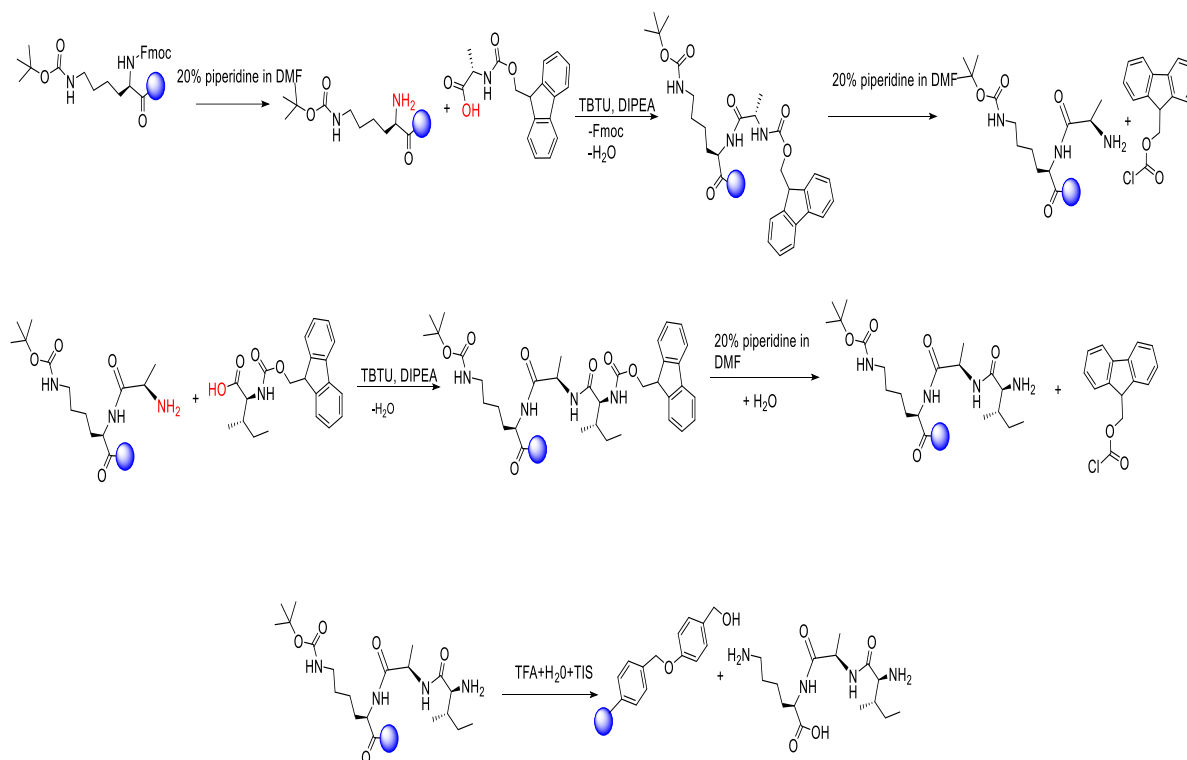
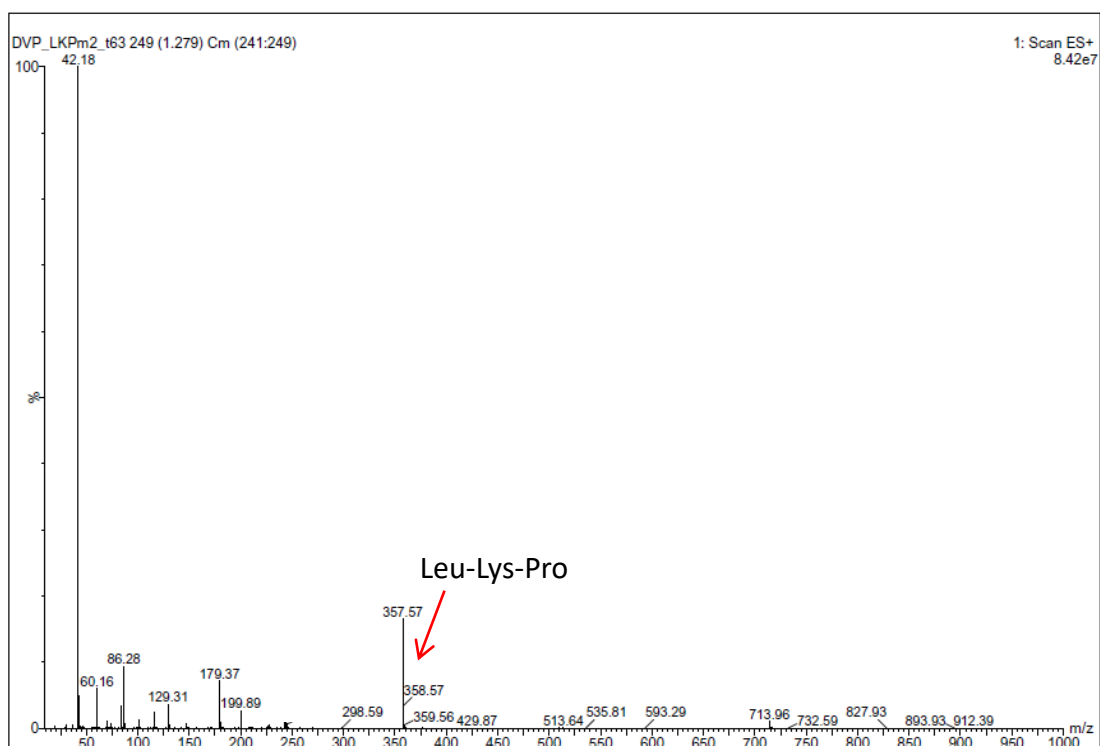
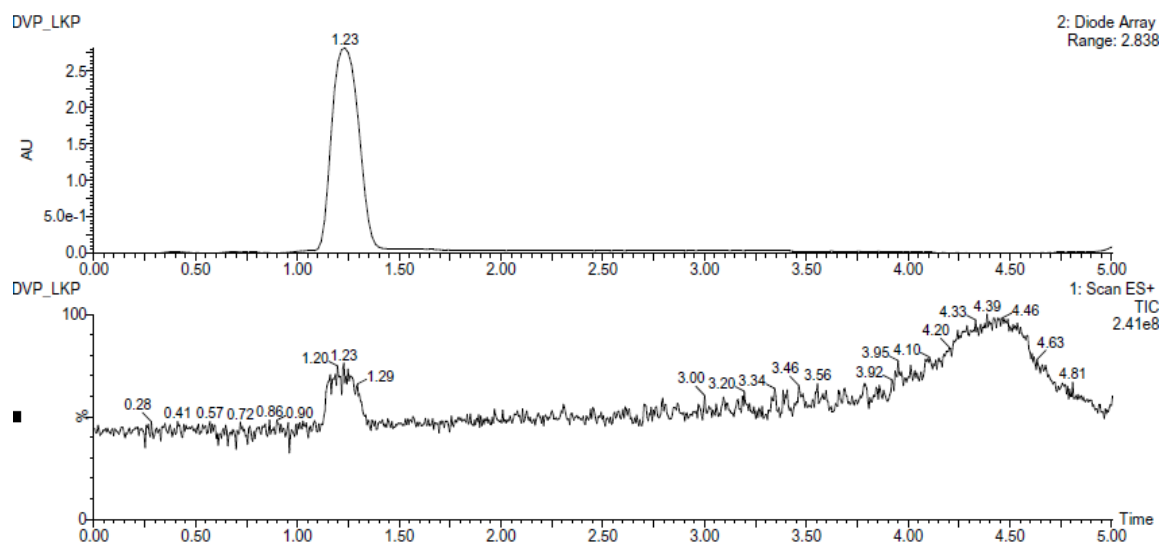


Схема 17. Реакционна схема на синтез на трипептида H-Ile-Ala-Lys-OH; Реактиви и условия: H-Pro-2-ClTrt смола, Fmoc-Lys (Boc), Fmoc-Leu, HOBT, TBTU, DIPEA, TFA / триизопропилсилан / H₂O (95: 2.5: 2.5), стайна температура, 1.5ч. реакционно време.

Целевите трипептиди H-Leu-Lys-Pro-OH, H-Ile-Ala-Lys-OH, H-Leu-Ala-Pro-OH, H-Leu-Arg-Pro-OH, H-Val-Ala-Pro-OH бяха пречистени чрез високоефективна течна хроматография (HPLC), VWR Hitachi „LaChrom Ellite”, помпа L-2130 UV-детектор L-2400, колона RP C-18 Vydac 238 TP, 250 x 4.6 mm, подвижна фаза CH₃CN / 0,1% TFA: H₂O / 0,1% TFA (30:70 v / v) и доказани с маспектрален анализ (Таблица 4, Фиг.23).

Таблица 4. Обобщени данни получени от маспектралния анализ на трипептидите

Трипептид	Данни от мас анализ [MH] ⁺	Изчислена молекулна маса g/mol
H-Leu-Lys-Pro-OH	357.51	356.47
H-Ile-Ala-Lys-OH	331.49	330.43
H-Leu-Ala-Pro-OH	300.05	299.18
H-Leu-Arg-Pro-OH	385.52	384.49
H-Val-Ala-Pro-OH	286.15	285.18



Фиг.23 HPLC профил и мас спектър на пречистен трипептида H-Leu-Lys-Pro-OH. Мас спектрите са направени на ACQUITY™ UPLC система (Waters), съчетана с Micromass® Q-ToF MICRO™ масспектрометър (Waters), оборудван с единичен квадруполен детектор на маса.

С прилагане на Fmoc стратегия и метода на твърдофазния пептиден синтез е реализиран синтез на следните късоверижни пептиди с добиви в границите 65-77%:

H-Val-Pro-Pro-OH
H-Ile-Pro-Pro-OH
H-Ile-Ala-Pro-OH
H-Leu-Lys-Pro-OH
H-Leu-Ala-Pro-OH
H-Leu-Arg-Pro-OH
H-Val-Ala-Pro-OH
H-Ile-Ala-Lys-OH
H-Val-Ala-Trp-OH
H-Val-Pro-Pro-Pro-OH

III.2. Изследвания чрез ЯМР техники и теоретични изчисления на *цис* и *транс* изомеризацията на дипептида H-Val-Pro-OH

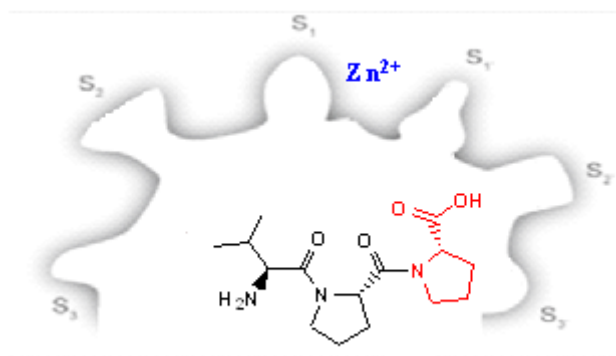
Пептидната връзка се характеризира с 2 изомерни форми - *цис* и *транс* , които се намират в динамично равновесие. В повечето пептиди влиянието на различни стерични фактори води до превес на *транс* изомера. Пролинът е единствената природна циклична аминокиселина. Вграждането на пролин в пептидни последователности води до значително по-голямо присъствие на *цис* изомера, именно поради уникалната структура на пролина. При изследване на връзката структура –биологична активност от особен интерес са реакциите на изомеризиране. Така за някои къси опиоидни пептиди, съдържащи пролилов остатък е необходимо той да бъде в *цис*-конформация за ефективно свързване със съответния рецептор.

Използваните в клиничната практика през последните двадесет години лекарства за лечение на хипертония са химически синтезирани инхибитори на ACE, които имат като C-краен остатък пролин. Както при каптоприла, така и при еналаприла е установено наличие на *цис*- и *транс*-изомери, като количественото им съотношение силно зависи от pH на средата.

Детайлните моделни изследвания с разнообразни подходи върху взаимодействието на инхибитори с активния център на ACE, показват значението на познаването на различните конформационни форми на тези съединения.

Инхибиторите, като субстратни мимики осъществяват главните си взаимодействия с активния център на ACE, чрез йонни или водородни връзки. ACE като

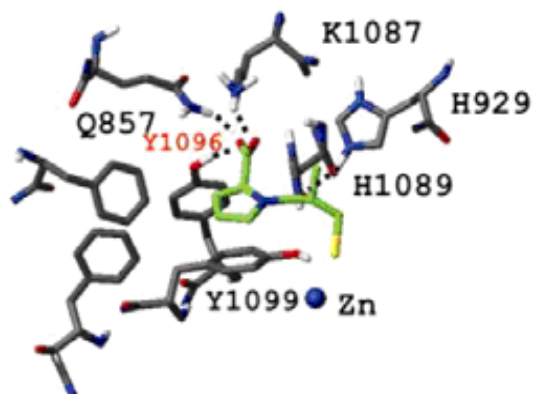
карбоксипептидаза проявява предпочитания към хидрофобни аминокиселини в С-края на субстрата/инхибитора. Системни изследвания показват, че карбоксилната група на пролина взаимодейства с S_2 подцентъра в активния център, което е представено на фиг.14. Функционалните групи, които могат да образуват координационни връзки с Zn^{2+} атом от активния център на ензима също са важен фактор за ефективно свързване.



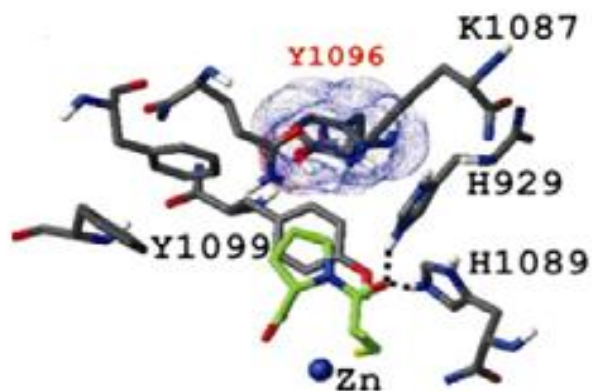
Фиг.14. Схематичен модел на свързване на пептиден инхибитор с ензимните подцентрове на ACE I.

Детайлните изследвания с разнообразни подходи върху *цис* и *транс* изомеризацията при различно рН показват, влиянието на различните конформационни форми за ефективно свързване и максимална инхибиторна активност. Кристалографски изследвания на ензим-инхибиторния комплекс АСЕ-каптоприл, показват че и при двата изомера карбоксилния кислород на пептидната връзка образува две здрави водородни връзки с аминокиселинните остатъци на His¹⁰⁸⁹ и His⁹²⁹ от активния център на АСЕ I. При *транс*-конформера на каптоприла, карбоксилната група на крайния пролин се свързва с S_2 подцентъра чрез йонни взаимодействия и водородни връзки с аминокиселинните остатъците на Lys¹⁰⁸⁷, Gln⁸⁵⁷ и Tyr¹⁰⁹⁶ (Фиг. 15).

При свързването на *цис*-конформера на инхибитора липсват важните взаимодействия на пирролидиновото ядро с Tyr¹⁰⁹⁶ и Lys¹⁰⁸⁷ и това води до по неблагоприятно свързване и по-неефективно инхибиране (Фиг.16).



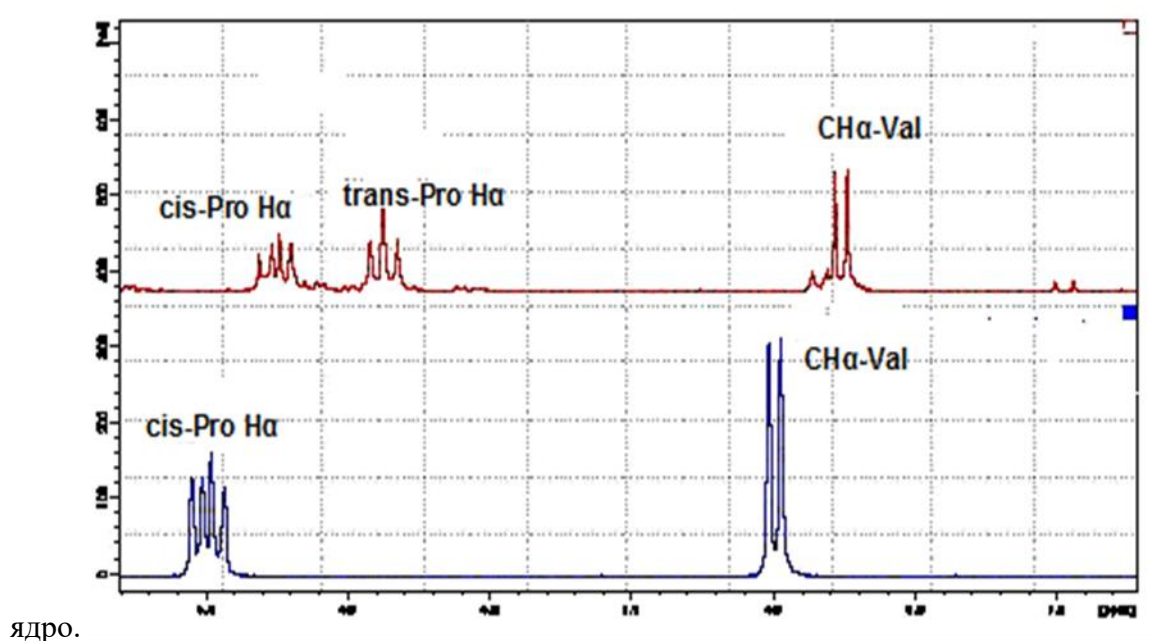
Фиг.15. Свързване на транс конформера на каптоприл с активния център на Sase I.



Фиг.16. Свързване на цис конформера на каптоприл с активния център на sACE I.

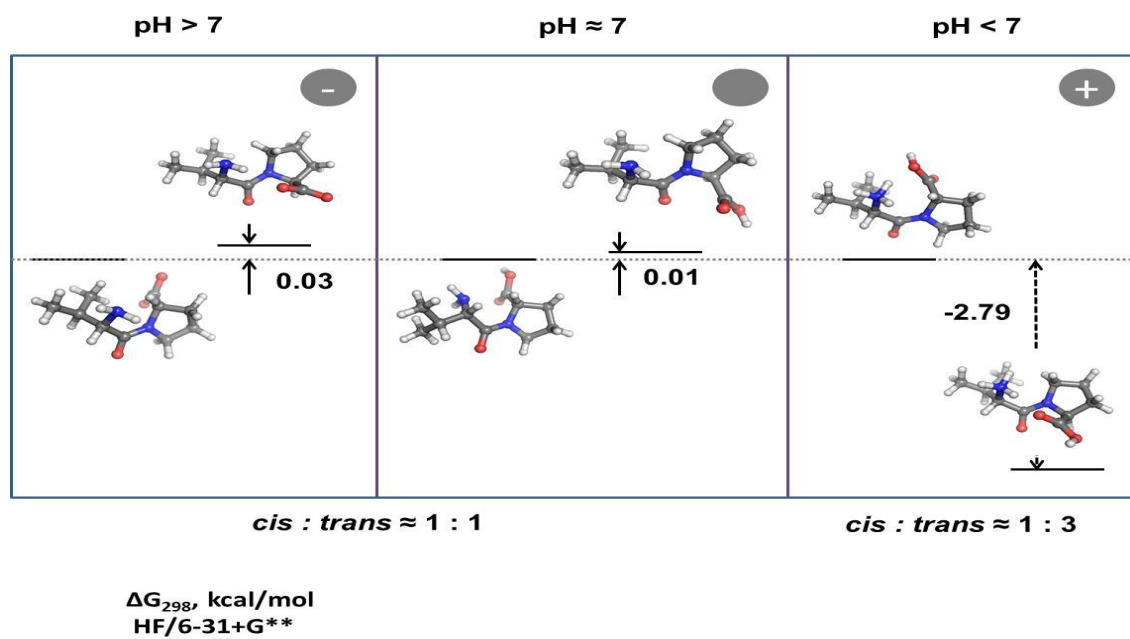
Известно е, че *цис* и *транс* изомерите на пролиновите пептиди в разтвор се намират в динамично равновесие в зависимост от рН, температура, разтворител и други фактори (Фиг.17).

Съотношението на *цис/транс* конформерите при пролиновите пептиди се определя от отношението на относителните интегрални на α -, δ протоните в пролиновото



Фиг.17. ^1H -NMR спектър на *cis* и *trans* изомери на пролинови пептиди измерен при рН 8.3.

Количеството пресметнати свободни енергии на Гибс (ΔG_{298}) на изомерите на дипептида (фиг. 18) предполагат присъствие и на *транс*-Val-Pro и на *цис*-Val-Pro (таблица 3). Пресмятанията на нива HF, MP2 и CCSD(T) показват, че и двата изомера са почти изоенергетични по отношение на свободните енергии на Гибс. В този случай влиянието на електронната корелационна енергия е незначителна. Изключение се наблюдава на ниво B3LYP, където *транс*-Val-Pro е слабо предпочитан.



Фиг.18. Оптимизирани *cis* и *trans* структури на Val-Pro на ниво MP2/6-31+G(d,p).

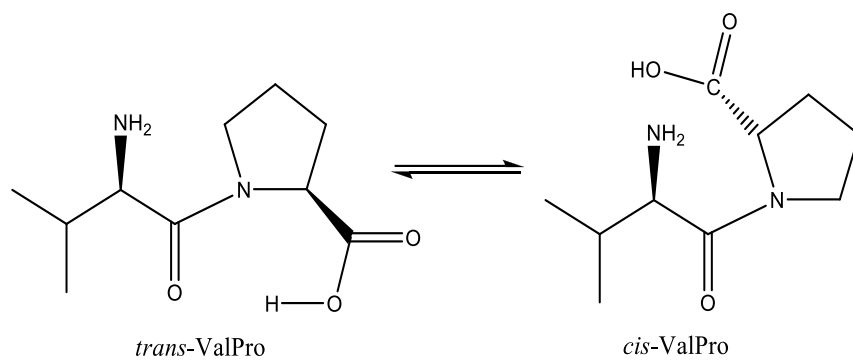


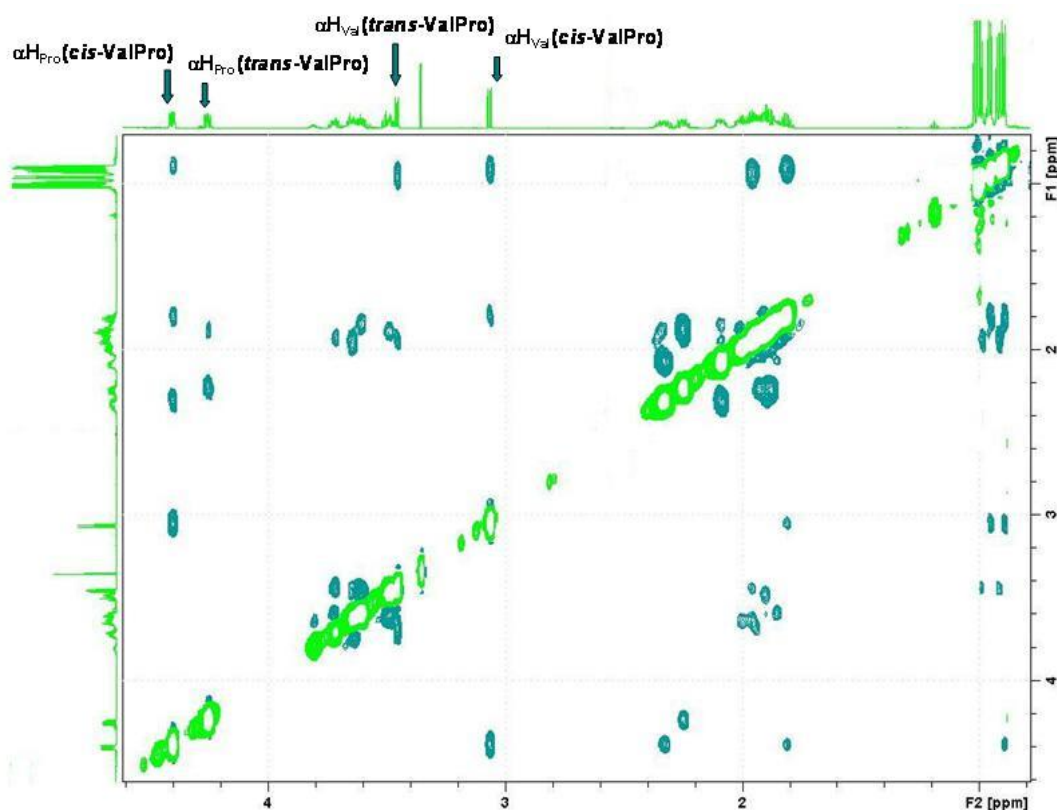
Таблица 3. Енергетични разлики (kcal mol⁻¹) между trans Val-Pro и cis Val-Pro и техните катионни и анниони форми пресметнати на различни изчислителни нива.

Structure	HF/6-31+G(d,p)		B3LYP/6-31+G(d,p)		MP2/6-31+G(d,p)		CCSD(T)/6-31+G(d,p)//MP2/6-31+G(d,p)	
	ΔH_0		ΔH_0		ΔH_0		ΔH_0	
	ΔG_{298}		ΔG		ΔG_{298}			ΔG_{298}
trans-Val-Pro (anion)	0.00	0.03	0.58	1.35	0.87	1.10	0.27	0.50
cis-Val-Pro (anion)	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
trans-Val-Pro	0.10	0.00	0.39	0.00	0.26	0.05	0.34	0.13
cis-Val-Pro	0.00	0.01	0.00	0.41	0.00	0.00	0.00	0.00
trans-Val-Pro (cation)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
cis-Val-Pro (cation)	2.67	2.79	5.84	5.76	5.28	5.26	5.90	5.88

Протонният ЯМР спектър на дипептида H-Val-Pro-OH в деутерирана вода, регистриран при 600 MHz на апарат Bruker Avance II+ 600 спектрометър показва дублиране на резонансни сигнали и наличието на смес от изомерни форми (*cis* и *trans* форми) на дипептида в съответствие с количествените химични пресмятания на различни изчислителни нива (Табл.3). Добре известно е, че пептидната връзка е планарна и това в повечето случаи означава, че α – въглеродните от аминокиселинните остатъци включени във връзката са в *транс* конформация. Въпреки това в пептиди съдържащи пролин, *cis* формата може да бъде относително стабилна, като в този случай пептида съществува като два изомера в разтвор. Поради частично двойния характер на амидната връзка и разумно високата бариера на конформационна трансформация, *цис-транс* изомеризацията на пептидни връзки е бавен процес по отношение на ЯМР анализа при нормални условия. ЯМР спектроскопията е удобен и бърз метод за проследяване на *cis-trans* изомеризацията на пептидни връзки в разтвор

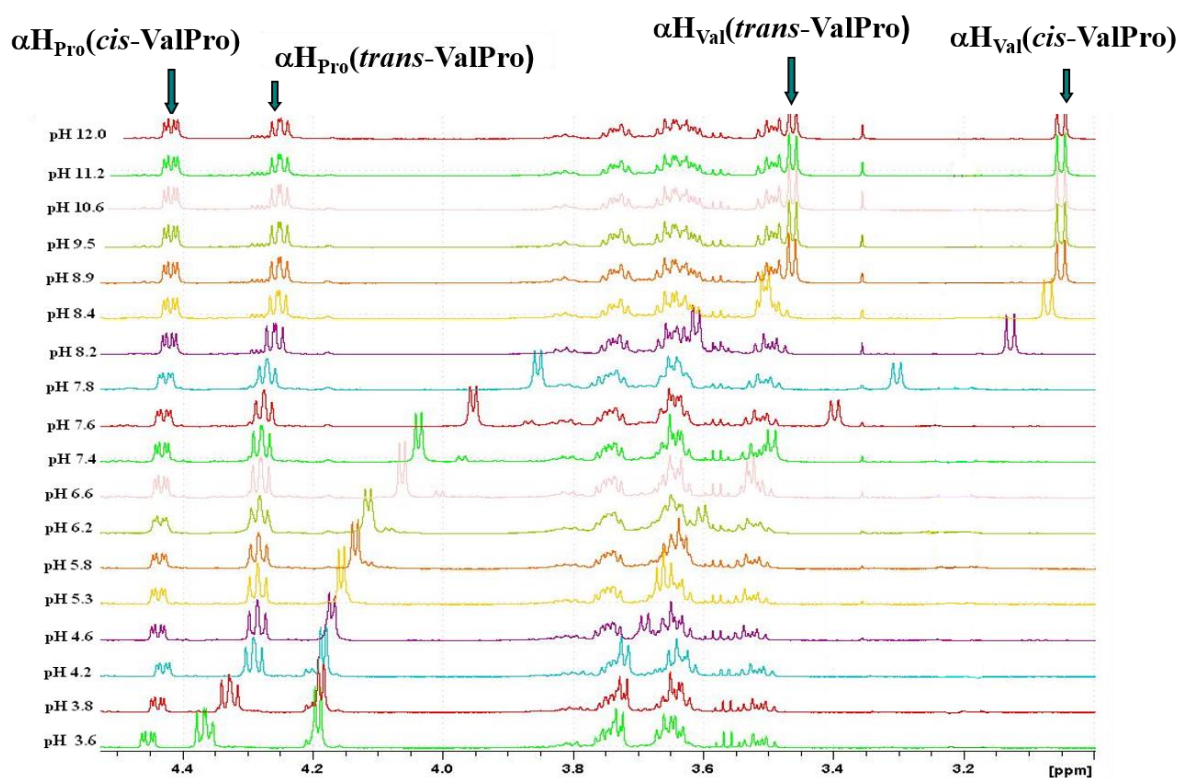
Определянето на протонните резонансни сигнали на H-Val-Pro-OH беше осъществено чрез 2D ¹H/¹H COSY, ¹H/¹H TOCSY и ¹H/¹H NOESY ЯМР анализи. Получените ЯМР данни, показват че синтезираният от нас H-Val-Pro-OH е като смес от двата изомера *цис* и *транс* в разтвор. Стереохимичните характеристики на H-Val-Pro-OH и разликата в резонансните сигнали на двете изомерни форми бяха установени чрез усредняване на протонните спин-спин свързващи константи, получени от анализа на ¹H ЯМР спектър и изучаване на Ядреният Ефект на Оверхаузер (Nuclear Overhauser Effect,

NOE). Типичен $^1\text{H}/^1\text{H}$ NOESY спектър на H-Val-Pro-OH в деутерирана вода (D_2O) и температура 300 K е представен на фиг.19.



Фиг.19. $^1\text{H}/^1\text{H}$ NOESY спектър на Val-Pro в разтвор на D_2O .

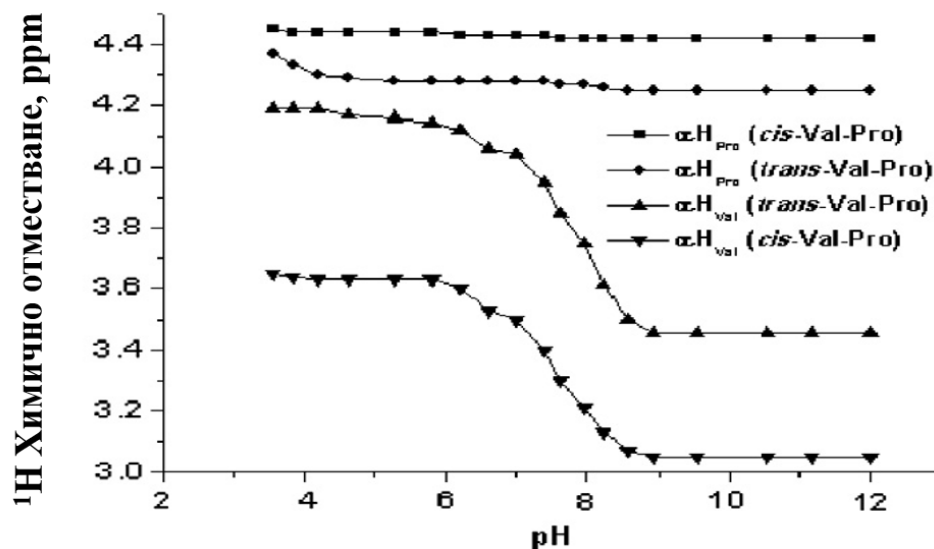
Характеристичните добре разделени петна, показващи наличието на дипол-диполни взаимодействия между резонансните сигнали при 4.41 ppm ($\alpha\text{H}_{\text{Pro}}(\text{cis-Val-Pro})$) и 3.07 ppm ($\alpha\text{H}_{\text{Val}}(\text{cis-Val-Pro})$) се наблюдават в 2D NOESY спектърта и могат да бъдат отнесени към αH -протоните на *cis*-Val-Pro изомерната форма. Не се наблюдават дипол-диполни взаимодействия между резонансните сигнали при 4.25 ppm ($\alpha\text{H}_{\text{Pro}}(\text{trans-Val-Pro})$) и 3.46 ppm ($\alpha\text{H}_{\text{Val}}(\text{trans-Val-Pro})$) в 2D NOESY спектърта, следователно сигналите могат да бъдат отнесени към αH -протоните на *trans*-Val-Pro изомерната форма. При *trans* изомерната форма на Val-Pro добре дефинирани взаимодействия свързани с Ядреният Ефект на Оверхаузер се наблюдават само между αH - и βH -протоните на пролина. Наличието на резонансни сигнали за β -, γ - и δ -протони от двете изомерни форми на Val-Pro беше потвърдено от получените с висока резолюция $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}/^1\text{H}$ TOCSY и $^1\text{H}/^1\text{H}$ NOESY спектри. Резонансните сигнали от ^1H ЯМР спектър на H-Val-Pro-OH са представени на фиг.20.



Фиг.20. ^1H NMR спектър на Val-Pro в разтвор на D_2O при pH 3.6-12.

За доказване на pH индуцираното изменение на протонните химични сигнали в молекулата на дипептида H-Val-Pro-OH и *cis-trans* изомеризацията на пептидната връзка, бяха получени ^1H ЯМР спектри при pH приблизително от 3-13 и *цис-транс* равновесието беше определено като функция от pH. ^1H ЯМР спектър получен при различни стойности на pH беше регистриран при 279 K, което води до забавяне на *цис-транс* изомеризацията на пептидната връзка. За оптимална степен на сравнение и наблюдение на pH индуцираните изменения върху химичните сигнали и интензивността на протонните резонансни сигнали на H-Val-Pro-OH, пълният набор от експериментални резултати е показан на фиг 20.

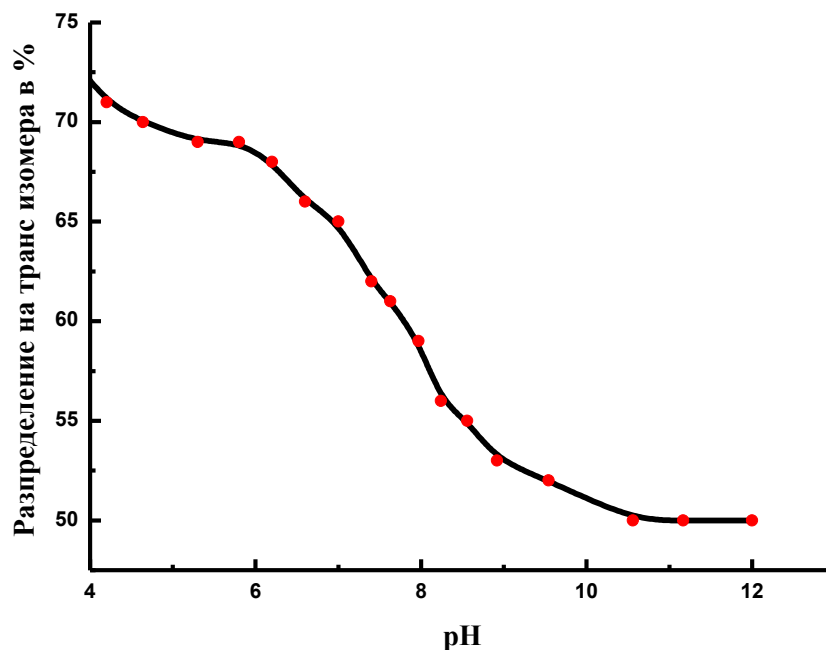
Най-важните pH зависими химични промени се наблюдават при $\alpha\text{H}_{\text{Val}}$ протоните на двете изомерни форми, докато $\alpha\text{H}_{\text{Pro}}$ остават относително незасегнати. На фиг.21 са показани pH индуцираните сигнали за *цис* и *транс* изомерните форми на H-Val-Pro-OH, получени от ^1H ЯМР спектър.



Фиг.21. Ph зависимост от химичните отмествания (ppm) за αH_{Pro} (*cis* –ValPro), αH_{Pro} (*trans* –ValPro), αH_{Val} (*trans*-Val-pro) и αH_{Val} (*cis* –ValPro) протоните на Val-Pro в разтвор на D₂O.

Относителното разпределение на *цис* и *транс* изомера беше установено от интегралната интензивност на резонансните сигнали при 4.41 и 4.26 ppm, характеристични за αH_{Pro} протоните на *цис* и *транс* изомерните форми. Тези сигнали позволяват правилно определяне на относителното ниво на двата конформера по отношение на пептидната връзка. Дипептидът H-Val-Pro-OH преминава преимуществено в *транс* изомерна форма (65-74%) при pH от 3 до 7. Това е в съответствие с пресмятанията за катионната форма на *цис* Val-Pro, която е предпочитана на всички изчислителни нива. Пресметнатата разлика в свободните енергии на Гипс на двата изомера е 2.79 kcal mol⁻¹ на HF ниво и силно нараства до 5.26-5.88 kcal mol⁻¹ на B3LYP, MP2 и CCSD(T) нива.

При физиологично важни стойности на pH между 7 и 8.5 количеството на *транс* изомера слабо намалява (65-55%), но все още преобладава. Нарастването на pH от 9 на 13 води до близки равни количества на *цис* (49-50%) и *транс* (50-51%) изомерите на H-Val-Pro-OH (фиг 22).



Фиг.22 .Разпределение на *trans*-изомера на H-Val-Pro-OH, определено от ^1H NMR спектър в разтвор на D_2O при pH 3.5-12 и температура 278 K.

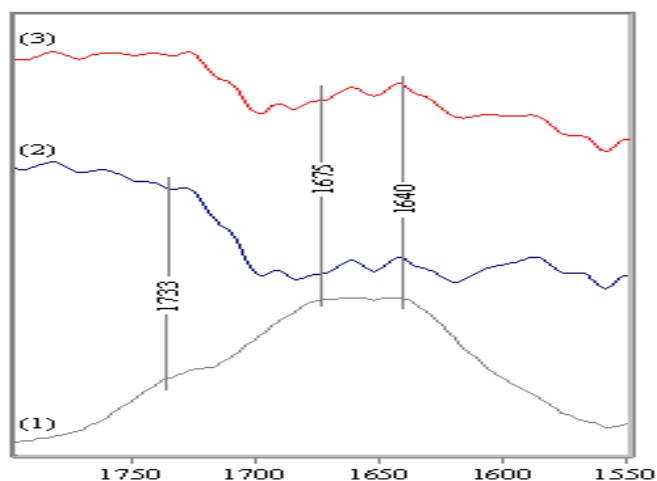
Пресмятанията за анионните изомерни форми на H-Val-Pro-OH на нива HF и CCSD(T) също предполагат съществуване на двата изомера.

Получените резултати показват, че *цис* - *транс* изомеризацията е строго pH зависима. В заключение може да се каже че, *транс* изомера на H-Val-Pro-OH е преобладаващият изомер, когато аминокислотната група е протонирана, но се наблюдава почти равно разпределение на *цис* и *транс* изомерите при неутралните и анионни форми на дипептида. Слабите стерични ефекти на отблъскване между протонираната аминокислотна група и карбоксилната група в молекулата на *транс* изомера в сравнение с *цис* изомерната форма може би е основната причина пролина съдържаща пептидна връзка да преминава преимуществено в *trans* изомерна форма при ниско pH.

III. 3. Спектрален и конформационен анализ на пролинови пептиди

В литературата се срещат оскъдни данни за изследвания на връзката структура / активност на пептидите с антихипертензивно действие. Няма данни и за влиянието на различните конформации върху биологичната активност на тези пептиди, но се предполага наличието на такива, поради съдържанието на пролинови остатъци. Спектралните изследвания са направени с прилагане на линейно-поляризирана ИЧ – спектроскопия в твърдо състояние .

Важните химични отмествания в протонните спектри на двата трипептида са: при 12 и 7.99 ppm при H-Val-Pro-Pro-OH и 12.58 и 8.08 ppm при H-Ile-Pro-Pro-OH като тези отмествания съответстват на OH групата от COOH група и първичните NH₂ групи. Тези резултати категорично показват, че трипептидите съществуват като неутрална H₂N-R-COOH форма в разтвор. Получените резултати от IR-LD чрез сравнение с прости аминокиселинни остатъци показват че, трипептидите H-Val-Pro-Pro-OH и H-Ile-Pro-Pro-OH се характеризират със серия от максимуми дължащи се на $\nu^{as}_{NH_2}$, $\nu^s_{NH_2}$ и $\nu_{C=O(COOH)}$ ивици при 3300cm⁻¹, 3200cm⁻¹, 3100cm⁻¹ и 1730cm⁻¹ придружено с изчезване на типичните за NH₃⁺ (L-Val или L-Ile странични вериги) и –COO⁻ (L-Pro странична верига) максимуми в спектралната област при 1630-1550 cm⁻¹ и при около 1400 cm⁻¹. Честотата на $\nu^s_{NH_2}$ се дължи на разцепване поради Ферми-резонанс и се наблюдава като дублет при 3200 cm⁻¹ и 3100 cm⁻¹, типично за случая когато - NH₂ група е включена в силни вътрешномолекулни взаимодействия. Последователното елиминирание на линиите за $\nu_{C=O(COOH)}$ при 1730 cm⁻¹ и $\nu_{C=O(Amide I)}$ в различно дихроично съотношение (Фиг.28) потвърждава адекватно различната ориентация на съответстващото разтягане на $\nu_{C=O}$ и преходните моменти на Amide I (които са депонирани на всяка ковалентна връзка) в молекулите на трипептидите. Нетипичната силна интензивност на двете ивици $\nu_{C=O}$ в сравнение с ивицата на $\nu_{C=O(COOH)}$ се обяснява с липсата на ефект на конюгация с амидните азотни атоми.

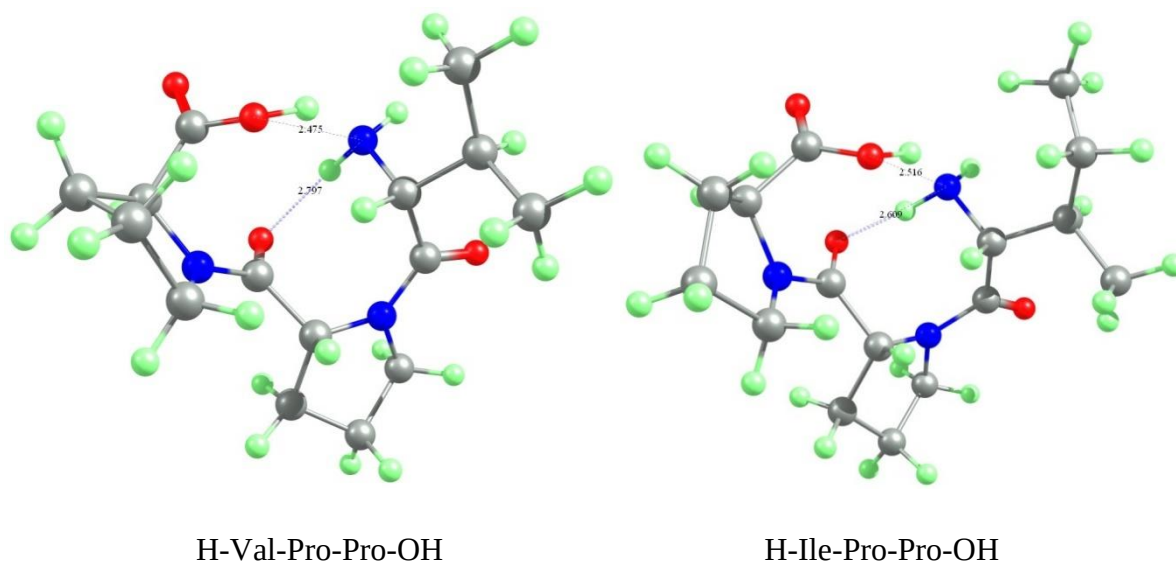


Абсорбция/Дължина на вълната (cm⁻¹)

Фиг.28. ИЧ спектри на Val-Pro-Pro: 1)неполяризиран ИЧ спектър; 2) ИЧ спектър при 1733 cm⁻¹; 3) ИЧ спектър при 1675 cm⁻¹

Според конформационния анализ стабизираните конформери на двата трипептида с най-ниска енергия от 0.6 и 1.2 kJ/mol, се характеризират с вътрешномолекулни водородни връзки $\text{NH}_2 \dots \text{O}=\text{C}-\text{N}$ (Amide) и $\text{O}=\text{C}-\text{OH} \dots \text{NH}_2$ с дължини 2.979 Å (средно силна) и 2.475 Å (силна) в H-Val-Pro-Pro-OH и с дължини от 2.599 Å и 2.507 Å в H-Ile-Pro-Pro-OH съответно (Фиг.29).

Извършеният конформационен анализ показва наличие на 2 здрави вътрешно молекулни водородни връзки $\text{NH}_2 \dots \text{O}=\text{C}-\text{N}$ (Amide) и $\text{O}=\text{C}-\text{OH} \dots \text{NH}_2$ с дължина от 2.979 Å и 2.475 Å при H-Val-Pro-Pro-OH и 2.599 Å и 2.500 Å при H-Ile-Pro-Pro-OH съответно. Наличието на два пролинови скелета води до стерични ограничения и стабилизиране на състояние със свободни карбоксилна и amino група.



Фиг.29. Представяне на образуваните водородни връзки в оптимизирани конформери на пролинови трипептиди.

В предишни изследвания е установено, че стойности около 2.800 Å са типични за amidни водородни връзки. Установяването на тази силна водородна връзка е една от причините за невъзможността за разграждане на тези пептиди от протеолитични ензими, което ги прави много подходящи за използване им като лекарства с антихипертензивен ефект и като хранителни добавки. От литературни данни е известно, че пролиновите пептиди са силни ACE инхибитори, което предполага че взаимодействието с активния център на ACE е свързано с вътрешномолекулни взаимодействия.

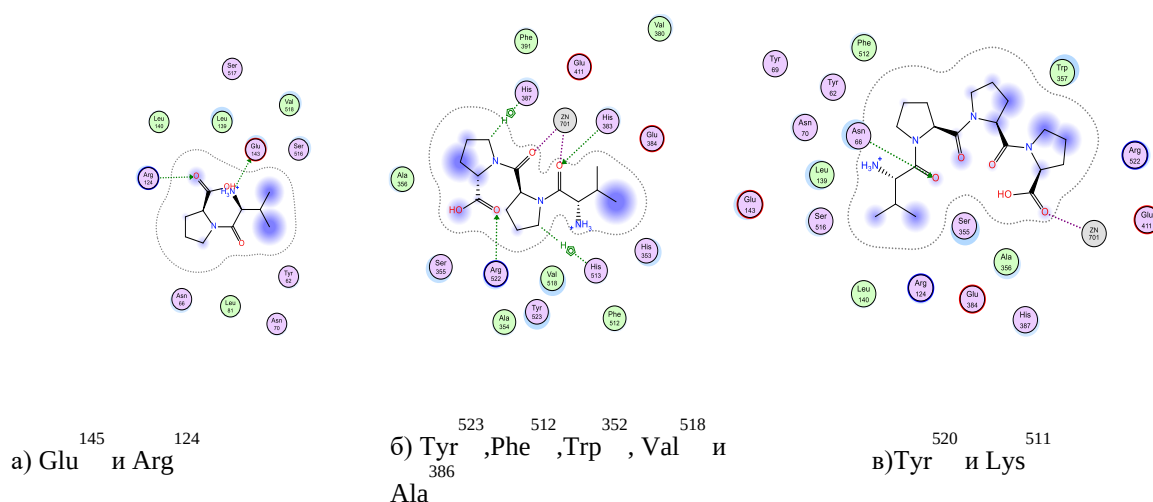
Експерименталната линейно поляризирана ИЧ спектроскопия (IR-LD) в твърдо състояние и протонните ЯМР спектри (^1H -NMR) във воден разтвор недвусмислено

показват, че и двата три пептида - H-Val-Pro-Pro-OH и H-Ile-Pro-Pro-OH присъстват в неутрална форма – $\text{H}_2\text{N-R-COOH}$.

III.4. Докинг симулации

С прилагане на програмата MOE2011 са осъществени докинг симулации с три от изследваните пролинови пептида H-Val-Pro-OH, H-Val-Pro-Pro-OH, H-Val-Pro-Pro-Pro-OH. За целта е ползван така наречения “Induced Fit” протокол, а замените са оптимизирани с прилагането на MMFF94x силово поле.

Резултатите получени от докинг симулациите са в съответствие с данните, получени за най-висока инхибиторна активност, наблюдавана при трипептида H-Val-Pro-Pro-OH. Най-здравите взаимодействия между подцентрове от активния център на ензима бяха регистрирани при взаимодействието с трипептида H-Val-Pro-Pro-OH чрез осъществяване на хидрофобни, електростатични и водородни взаимодействия. Получените предварителни резултати показват, че отрицателно заредената група на крайния пролинов остатък осъществява взаимодействие с Tyr⁵²³ от активния център на ензима. При тетрапептида H-Val-Pro-Pro-Pro-OH се регистрира взаимодействие с аминикиселинните остатъци на Tyr⁵²⁰ и Lys⁵¹¹. Двата пролинови остатъка при трипептида са разположени в хидрофобния S2 джоб на ензима. Предполага се, че те осъществяват взаимодействие чрез хидрофобни връзки с аминокиселинните остатъци Phe⁵¹², Trp³⁵², Val⁵¹⁸ и Ala³⁸⁶.



Фиг.30. Представяне на взаимодействието на различни лиганди от Pro-пептиди а) – H-Val-Pro-OH, б) – H-Val-Pro-Pro-OH и в) – H-Val-Pro-Pro-Pro-OH с аминокиселинни остатъци от активния център на ACE.

Сравнителният анализ показва, че H-Val-Pro-Pro-OH осъществява повече електростатични взаимодействия в сравнение с H-Val-Pro-OH и H-Val-Pro-Pro-OH. Очевидно е, че трипептидът формира две водородни връзки с Zn^{2+} анион от активния център на ензима, която е една от най-силните връзки осъществени между дадено съединение и активния център на съответния ензим. H-Val-Pro-Pro-OH образува две водородни връзки с His³⁸³ и Arg⁵²², H-Val-Pro-OH образува също две водородни връзки с Glu¹⁴³ и Arg²⁴, докато при H-Val-Pro-Pro-Pro-OH водородната връзка е само една-с Asn⁶⁶. Допълнитено H-Val-Pro-Pro-OH формира още две π водородни връзки с His³⁸⁷ и His⁵¹³. При всички случаи пептидът е ориентиран с най-липофилните си части към разтворителя-вода.

В заключение може да се обобщи, че трипептидът се свързва с активния център на ензима по най-ефективния начин благодарение на хидрофобни, електростатични и π -водородни взаимодействия.

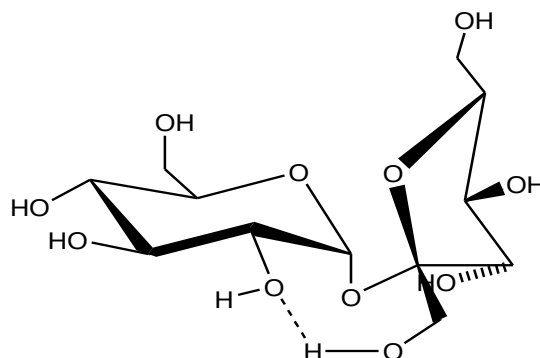
III.5. Синтез на амоникиселинни естери на захари

От литературни данни е известно, че моно-и полиацилирани захари с аминокиселини също проявяват ACE инхибиторна активност. Синтезът на аминокиселинни естери на захарозата се осъществява чрез ензимно катализирани реакции от липази и протеази като се получават основно естери на захарозата със заместена OH гр. на 6-^{та} позиция в глюкопиранозилния пръстен и със заместена OH гр. на 1-^{ва} позиция във фруктофуранозилния пръстен.

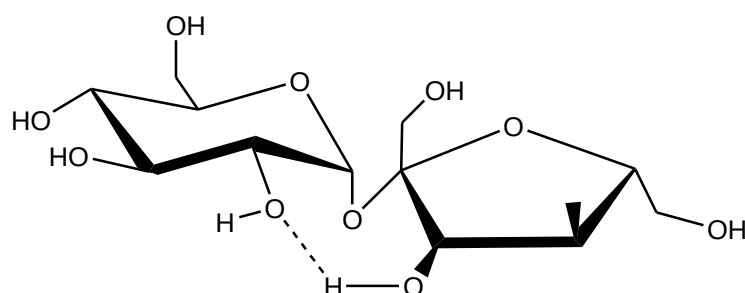
Различните региоизомери, въпреки сходството във физико-химичните си параметри притежават различна токсичност, миризма, вкус и различен начин на разграждане в организма. По тази причина в настоящият дисертационен труд усилията бяха насочени към създаване на лесен и ефективен метод за химичен синтез на аминокиселинни естери на захари заместени предпочитано на втора позиция.

При използваният метод за синтез на аминокиселинни естери на захарозата основно влияние оказват особеностите в структурата на захарната молекула. Реактивоспособността на захарозата зависи от структурата ѝ и конформационното и поведение във вода и апротонни полярни разтворители. Особено влияние оказват вътрешномолекулните и междумолекулните взаимодействия, определящи конформацията на молекулата. Изследванията показват, че конформацията ѝ в апротонен полярен разтворител като DMF не се различава съществено от тази във вакуум.

Кристалната структура на захарозата в апротонни полярни разтворители се поддържа от две вътрешномолекулни водородни връзки. Едната от тях е между кислородния атом на 2-^{pa} позиция при глюкопиранозилния пръстен и ОН гр. на 1-^{bo} място при фруктофуранозилния пръстен.



Другата конформационна форма се характеризира с образуването на вътрешномолекулна водородна връзка между кислородния атом на 2-^{po} при глюкопиранозилния пръстен и водородния атом от ОН гр. на 3-^{to} място при фруктофуранозилния пръстен.



Конформационната форма с водородна връзка между кислородния атом на 2-^{pa} позиция при глюкопиранозилния пръстен и ОН гр. на 1-^{bo} място при фруктофуранозилния пръстен по-предпочетена от тази между кислородния атом на второ място при глюкопиранозилния пръстен и водородния атом от хидроксилната група на трето място при фруктофуранозилния пръстен, като двете конформационни форми са в отношение 2:1.

В резултат на тези вътрешномолекулни взаимодействия ОН гр. на втора позиция при глюкопиранозилния пръстен става най-кисела в сравнение с останалите хидроксилни групи. В този случай с прооритет би следвало да протичат заместителни реакции при нея. Това се дължи на преразпределението на електронната плътност на О-атом от ОН гр. на 2-^{pa} позиция при глюкопиранозилния пръстен и Н-атом от ОН-групи

на 1-^{ва} и 3-^{та} позиция във фруктофуранозилния пръстен. При това водородният атом от ОН групата на 2-^{ра} позиция при глюकोпиранозилния пръстен става по-лабилен и под действие на база лесно може да се отцепи. В резултат на това се получава алкоксиден анион, който е добър нуклеофил. ОН групата на 2-^{ра} позиция при глюкопиранозилния пръстен е с ясно изразени кисели свойства в апротонен разтворител и още повече в полярен разтворител, защото се образуват директни водородни връзки.

Освен 2-^{та} ОН гр. от глюкопиранозилния пръстен могат да се депротонират и останалите хидроксилни групи, но веднага след това протича вътрешномолекулна и междумолекулна миграция на протон и отново се образува -алкоксид, който е термодинамично най-стабилен поради наличието на двете водородни връзки. Това показва, че в апротонни полярни разтворители реакционната способност се определя най-вече от киселия характер на хидроксилните групи.

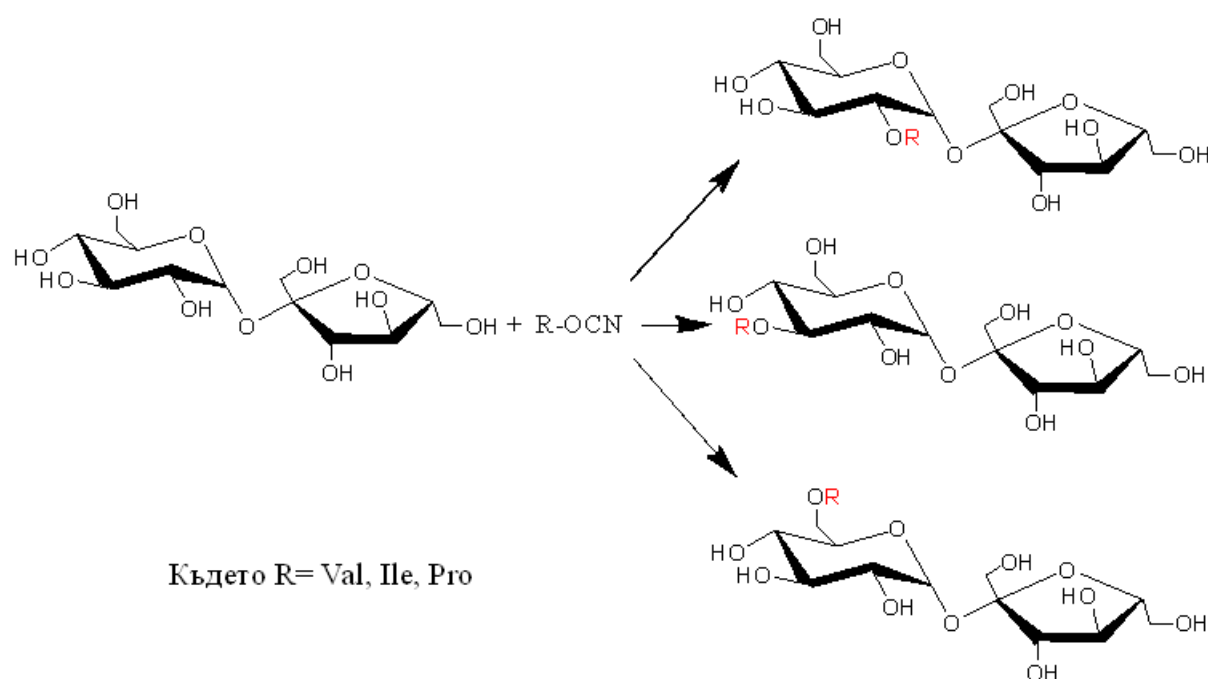
В този дисертационен труд бе избрано да се проведе реакция на трансестерифициране на аминокиселинни естери за получаване на моноацилирана захароза и глюкоза. Като аминоацилиращи агенти бяха използвани цианметилови естери на N-защитени аминокиселини, тъй като лесно се трансестерифицират поради липсата на пространствено пречене. Другата причина, поради която бяха използвани цианметилови естери бе лесният им синтез и високите добиви на крайният продукт. Всички реакции се проведоха в сухи разтворители, за да се избегне евентуална хидролиза. Синтезът на цианметилови естери бе проведен по метода на *P. Schultz*. По този метод не се използва разтворител с изключение на редки случаи, когато бе използвано минимално количество DMF за разтваряне на аминокиселината с цел да се благоприятства протичането на реакцията. Във всички случаи получаването на цианмерилови естери протичаше практически докрай, като добивите бяха над 80 %. При анализите, направени с тънкослойна хроматография след спиране на реакциите не се забелязваше присъствие на изходни N-защитени аминокиселини в реакционната смес.

За провеждането на реакцията на трансестерификация (аминоацилиране) бяха избрани следните условия:

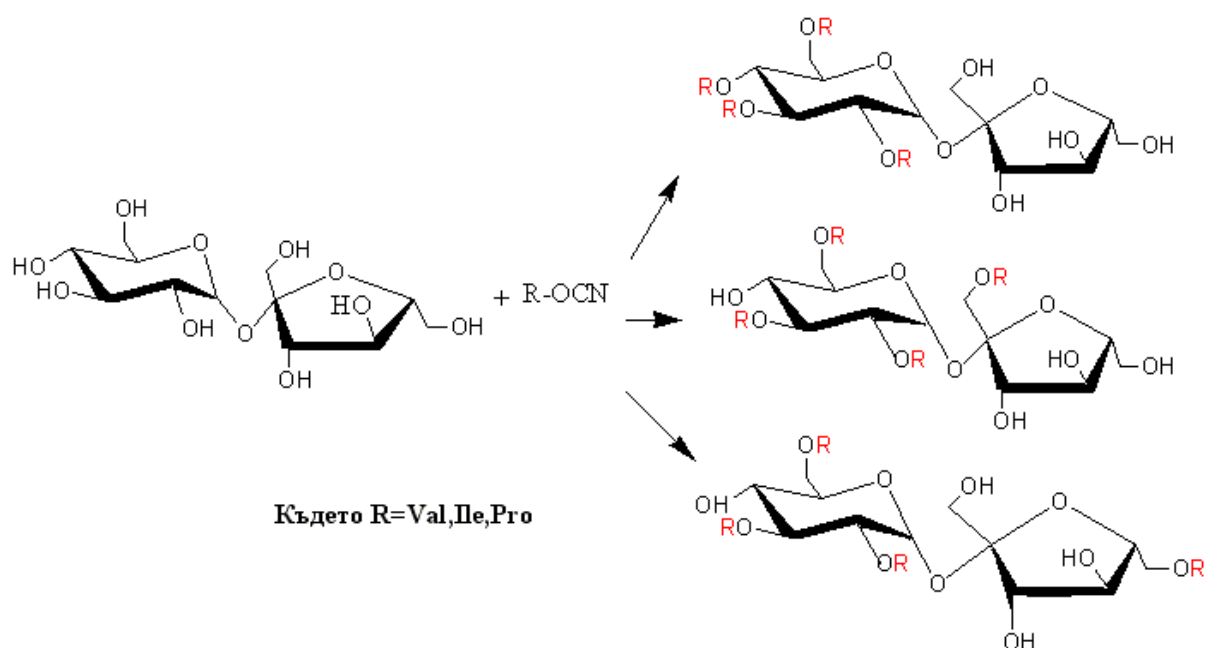
- всички реакции бяха проведени при стайна температура
- разтворител сух DMF
- база сух Et₃N
- като ацилиращи агенти бяха използвани цианметилови естери на съответните аминокиселини (L-Valine, L-Proline, L-Isoleucine)

- във всички реакции бяха използвани 2 моларни еквивалента незащитена захароза (глюкоза) към 1 моларен еквивалент цианметилов естер.

Точна количествена характеристика на съотношението на получените естери трудно може да се направи поради посочените по-горе причини. Анализът на получените ^{13}C спектри на синтезираните аминокацилирани захари показва, че след разделяне със силикагелна колонна хроматография и пречистване с високоефективна течна хроматография са изолирани като отделни фракции заместени производни на захарозата на 2-^{ра} и 3-^{та} позиция в глюкопиранозния пръстен, смес от естери със заместена ОН група на 2-^{ра} и 3-^{та} позиция, смес от 4 заместени хидроксилни групи в глюкопиранозния пръстен на захарозата, вероятно на 2-^{ра}, 3-^{та}, 4-^{та} и 6-^{та} позиция, смес от региоизомери със заместени 4 хидроксилни групи в захарозата – на 2-^{ра}, 3-^{та} и 6-^{та} позиция в глюкопиранозния пръстен и на 1-^{ва} позиция във фруктофуранозидазния пръстен, както и смес от естери със заместени отново 4 хидроксилни групи – на 2-^{ра}, 3-^{та} и 6-^{та} позиция в глюкопиранозния пръстен и на 6-^{та} позиция във фруктофуранозилния пръстен.

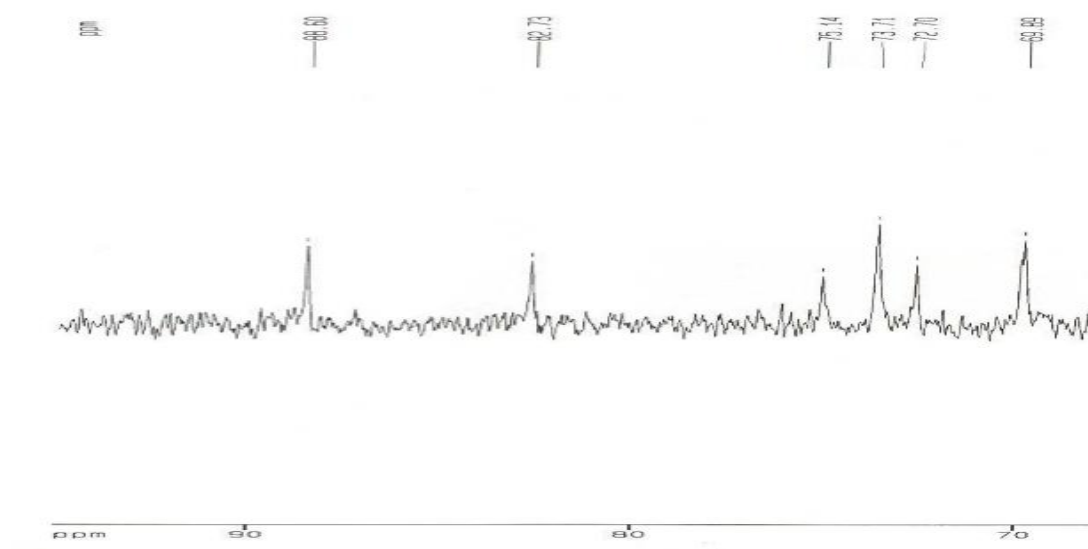


Фиг.20. Синтетична схема на аминокацилиране на захароза на 2-^{ра}, 3-^{та} и 6-^{та} позиция в глюкопиранозния пръстен.

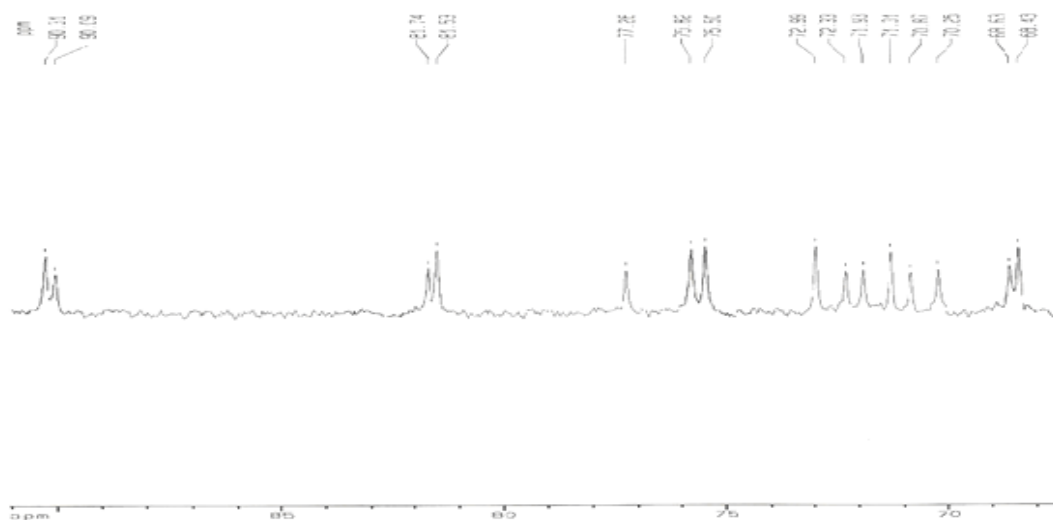


Фиг.21. Синтетична схема за аминокацилиране на захароза на 2-ра, 3-та, 4-та и 6-та позиция в глюкопиранозния пръстен и на 1-ва и 6-та позиция във фруктофуранозния пръстен.

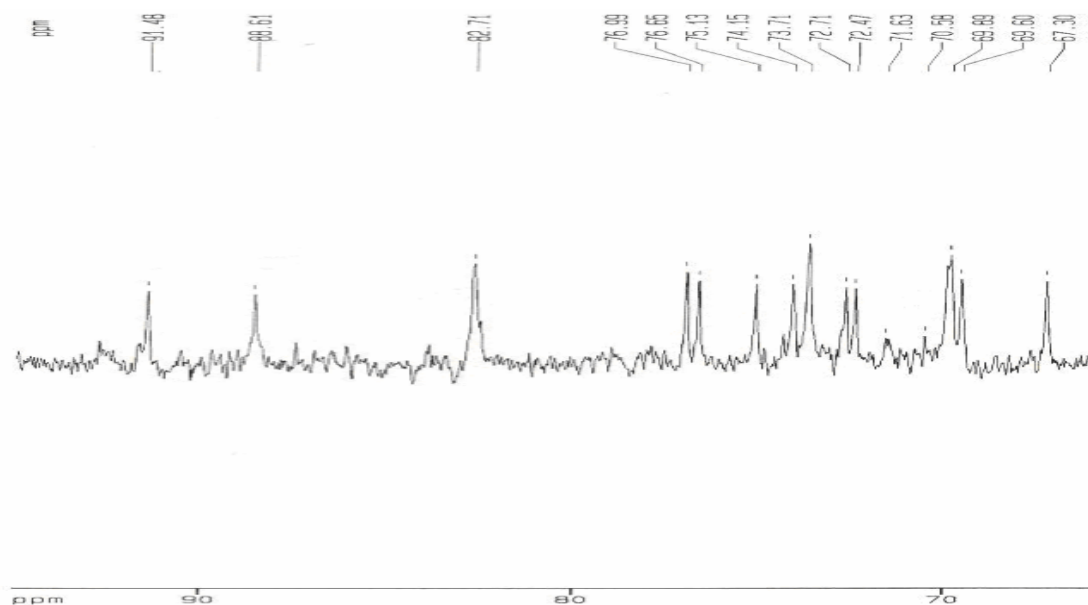
Примерни ^{13}C ЯМР спектри са показани на фиг.31, фиг.32, фиг.33 и фиг.34.



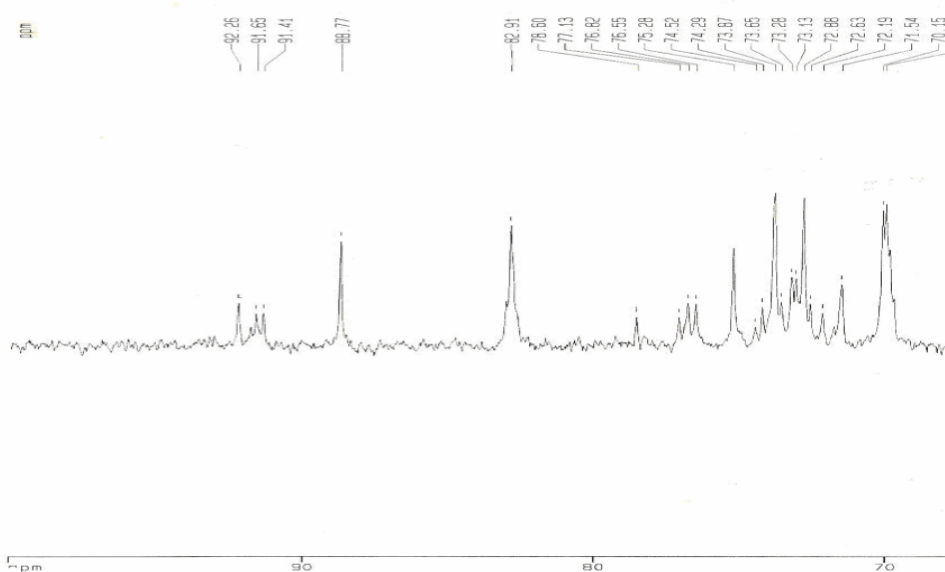
Фиг.31. ^{13}C спектър на валинов естер на захарозата със заместена ОН гр. на 2-ра позиция в глюкопиранозилния пръстен.



Фиг.32. ^{13}C спектър на смес от валинови естери на захарозата със заместена ОН гр. на 3-та позиция и заместена ОН гр на 4-та позиция в глюкопиранозилния пръстен.



Фиг.33. ^{13}C спектър на смес от валинови естери на захарозата с заместена ОН гр. на 3-та позиция и заместена ОН гр на 3-та позиция в глюкопиранозилния пръстен.



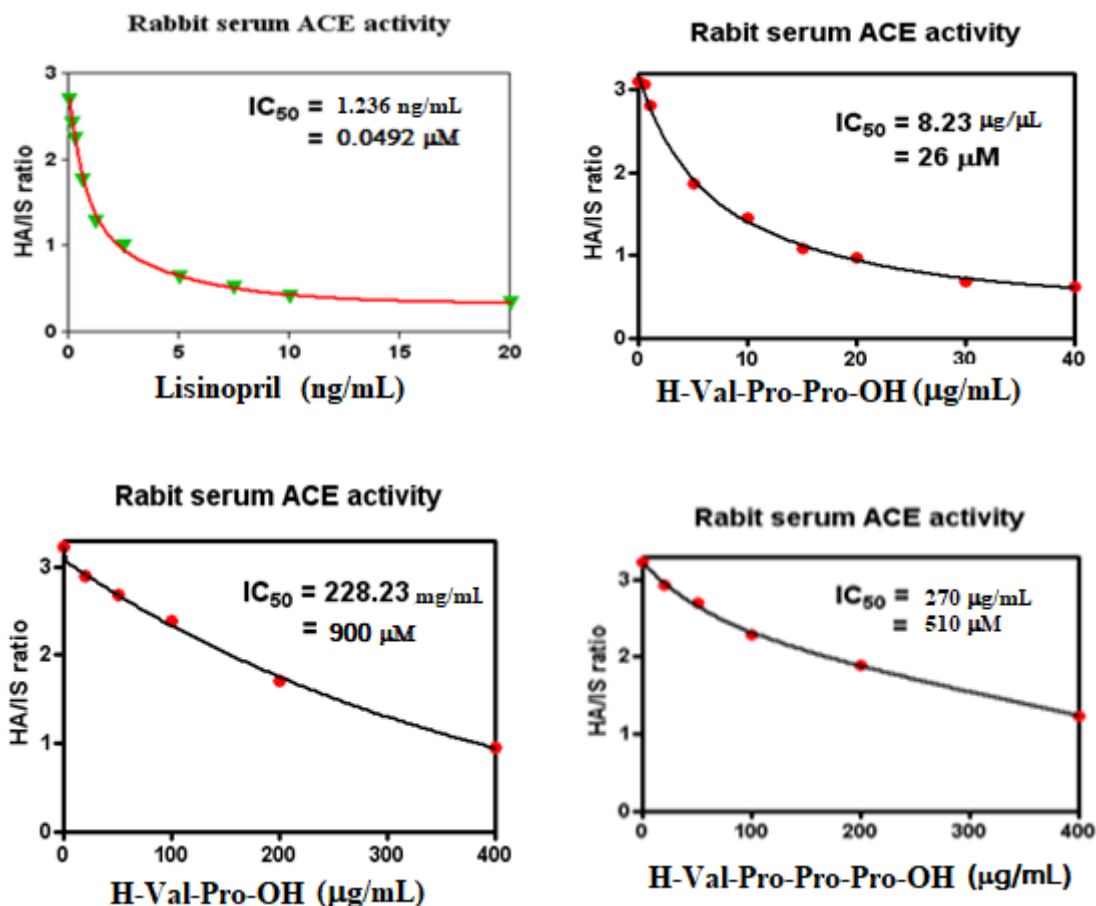
Фиг.34. ^{13}C Спектър на смес от валинови естери на захарозата със заместени ОН гр.на 2-ра, 3-та и 6-та позиция в глюкопиранозилния пръстен и заместена ОН гр.на 1-ва позиция във фруктофуранозилния пръстен.

Анализът на получените ЯМР спектри доказва, че е намерен лесен и ефективен начин за разделяне на получените региоизомери на естерифицирана с аминокиселини захароза.

III.6. Инхибиторна активност на синтезираните съединения

Литературни данни показват , че разликата в стойностите за IC_{50} е два до три пъти по-висока за трипептиди в сравнение с дипептиди изолирани от природни източници. На базата на тази информация бе очаквано,че синтезираният пролилов тетра пептид като потенциален инхибитор на ACE I може да покаже и по високи стойности от тези известни за различни трипептиди от литературни данни.

С използването на високо-ефективна течна хроматография и синтетичния субстрат Hip-His-Leu-OH на базата на синтетичният инхибитор Lizinopril бе определена инхибиторната активност и IC_{50} на пептидите H-Val-Pro-OH, H-Val-Pro-Pro-OH, H-Val-Pro-Pro-Pro-OH, както и на аминокиселините естери на глюкоза и захароза със съответните аминокиселини – валин, пролин и изолевцин. Получените резултати показаха, че всички изследвани пептиди проявяват инхибираща активност. Най-висока активност бе измерена за трипептида H-Val-Pro-Pro-OH $\sim 20\mu\text{g/ml}$ от него инхибират 60% от активността на ензима. Този резултат е сравним с известните в литературата стойности.



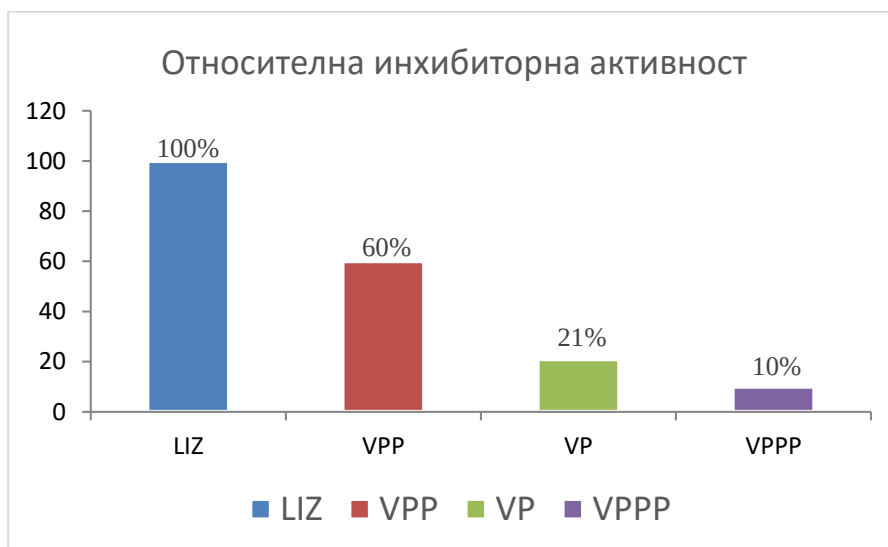
Фиг.35. Сравняване на инхибиторната АСЕ активност на пролинови пептиди с различна дължина на пептидната верига.

Аминоацилните естери на захарите са неефективни до 1mM концентрация. Групата на *Divakar* съобщават за доста широк диапазон на стойностите на IC_{50} на синтезираните от тях аминокацилни естери на захари в порядък от няколко микро мола до няколко мили мола. Синтезираните от тях съединения са получени при ензимно катализирана реакция с ензима липаза в органична среда и получените резултати се отнасят за смес от региоизомерни естери.

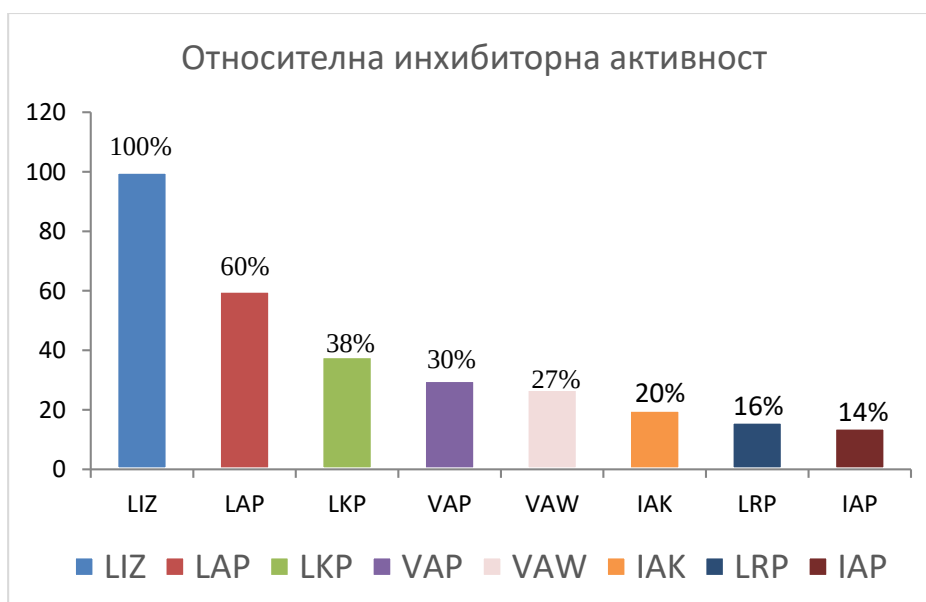
Методът с използването на високо-ефективна течна хроматография за определяне на относителната инхибиторна активност на съответни инхибитори на АСЕ има своите недостатъци. Този метод се ограничава не само от броя проби, които могат да бъдат анализирани в рамките на един ден (анализирането на всяка проба отнема 30-40мин.), но и включва използването на голям обем органични разтворители. Освен това често се наблюдава кристализиране на ацетатния буфер от мобилната фаза, което води до експериментални проблеми. Тези недостатъци ни насочиха към търсенето на по-

надежден, по-малко трудоемък и точен метод за анализ на инхибиторната активност на новосинтезираните къси пептидни инхибитори на ACE I.

За да определи инхибиторната активност на синтезираните пептиди бе използван и модифициран колориметричен метод на *Jimsheena&Gowda*. Чрез този метод се получават данни за качествена оценка на активността на инхибиторите на ACE I, за да се прецени с кои съединения да бъдат проведени биологични изследвания 'in vitro'. Получените резултати са представени на фиг.36 и Фиг.37.



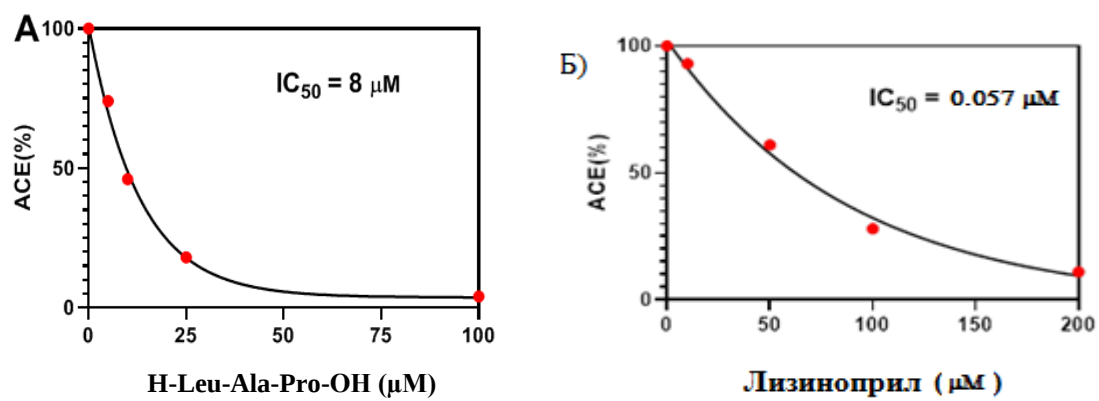
Фиг.36. Сравняване на относителната инхибиторна ACE активност на пролинови пептиди с различна дължина на пептидната верига спрямо Lizinopril.



Фиг.37. Сравняване на относителната инхибиторна ACE активност на пептиди с различна аминокиселинна последователност спрямо Lizinopril.

Проведени бяха кинетични изследвания с използване на флуорогенен синтетичен субстрат FAPGG, за да се определи вида инхибиране и IC_{50} на новите пептидни инхибитори. Като стандарт бе използван търговският препарат Lizinopril. Методологията с използване на субстрата FAPGG по метода на *Holmquist et al.* за изследване кинетиката на ACE предполага спазване на няколко условия за постигане на достоверни и повторими резултати. Установено беше, че е много важно преинкубирането на ензима в среда, съдържаща 300 mM NaCl за 5 мин., което е необходимо условие за по-висока ензимна активност. Поради много близките промени в абсорбционните пикове на субстрата FAPGG и получените продукти, пробите трябва да се инкубират дълго време поради относително ниските стойности на V_{max} . Затова бе направен експериментален опит, при който се следва разликата в абсорбцията при 340 nm след 30 мин. инкубация при 37°C срещу буферен разтвор при отсъствие или присъствие на инхибитори в различни концентрации. Инхибирането на активността на ензима зависи от концентрацията на инхибитора и следва крива на нелинейна регресия. По-високата инхибиторна активност на някои от пептидите се наблюдава в присъствието на аминокиселината Pro в C-края на веригата като се предполага, че в негово присъствие се повишава степента на свързване на инхибитора към ACE. От трите нови синтетични трипептида с краен Pro във веригата си с най-висока относителна инхибиторна активност е H-Leu-Ala-Pro-OH, следван от H-Leu-Lys-Pro-OH и H-Val-Ala-Pro-OH. Заместването на втора позиция на положително заредената аминокиселина лизин с хидрофобната аланин води до увеличение на приблизително два пъти стойността на IC_{50} . Заместването на хидрофобния пролин на трета позиция с положително заредения лизин значително променя стойността на IC_{50} . Природата на аминокиселината на първа позиция в пептидната верига също е важна, тъй като се наблюдава, че валина макар и хидрофобен като лейцина намалява инхибиторните свойства на съответния пептид H-Val-Ala-Pro-OH.

Представителни резултати от експериментите '*in vitro*' за изследване на кинетиката на пептидните инхибитори с пречистен ACE и използване на флуореген синтетичен субстрат FAPGG са представени на фиг. 38 (А - Б), а изчислените стойности на IC_{50} в таблица 5.



Фиг.38. Криви на инхибиране на ACE (2.5 mU) след инкубиране с H-Leu-Ala-Pro-OH (A) и Лизиноприл (Б).

Таблица 5. Получени стойности на IC₅₀ за изследваните съединения.

	Съединение	Химична формула	IC ₅₀
1	Val-Ala-Pro (VAP)		(66 μM)
2	Val-Ala-Trp (VAW)		(148 μM))
3	Leu-Lys-Pro (LKP)		(19 μM)
4	Leu-Ala-Pro (LAP)		(8 μM)
5	Ile-Ala-Lys (IAK)		(188 μM)
6	His-Phe-Tyr (HPY)		(>200 μM)
7	Ser-Tyr-Gly-Leu (SYGL)		(95 μM)
8	Lisinopril.2H ₂ O (LIS)		(0.057 μM)

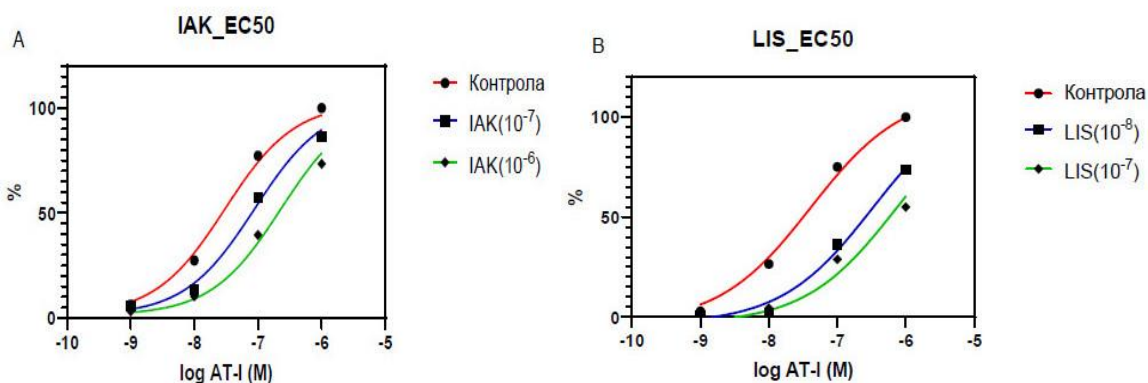
Получената стойност за IC₅₀ 8μM за H-Leu-Ala-Pro-OH е близка до IC₅₀ за природните млечно-кисели трипептиди H-Val-Pro-Pro-OH и H-Ile-Pro-Pro-OH. Този резултат показва, че получените по синтетичен път трипептиди проявяват същата биологична активност като природните и откриват перспектива за тяхното приложение за превенция или терапия на хипертония.

Резултатите от това изследване дават насоки относно по-добрия дизайн и подбор на нови инхибитори на ACE I.

III.7. Определяне на биологичната активност 'ex vivo' на новосинтезираните съединения

Добре известно е, че в много случаи ефективността на химичните съединения при *in vitro* експерименти не съвпада с ефективността, когато съединенията се тестват в модели, близки до клиничните условия. Такъв модел е проследяване на контрактилния отговор на илеума на плъх под въздействието на АТ-I при различни условия. В тази система свиването на илеума зависи главно от способността на ACE да превръща АТ-I в АТ-II в съответната тъкан. По този начин, сравнявайки големината на контракциите на изолирания орган при въвеждане в инкубационната среда на АТ-I с тези, получени след преинкубирането му с новосинтезираните пептиди може да се съди (индиректно) за тяхното въздействие върху активността на ACE. Бе установено, че всички изследвани трипептиди H-Val-Ala-Pro-OH (VAP), H-Val-Ala-Trp-OH (VAW), H-Leu-Lys-Pro-OH (LKP), H-Leu-Ala-Pro-OH (LAP), H-Ile-Ala-Lys-OH (IAK) намаляват доза-зависимо предизвиканите от АТ-I съкращения на сегментите. Това предполага, че най-вероятно тези съединения инхибират специфично активността на ACE I.

Отместването надясно на кумулативните криви на съкращение в присъствие на инхибитори на ACE говори за конкуретния характер на инхибиране (фиг.46)



Фиг.39. Илеум на плъх, кумулативна доза-отговор криви на АТ-I без или в присъствие на пептида H-Ile-Ala-Lys-OH (IAK) (A) и лизиноприл l(LIZ) (B).

Влиянието на различни инхибитори на ACE I върху съкратителният отговор на илеумот плъх след кумулативно титруване с нарастващи концентрации на АТ-I (отчетен чрез EC₅₀) най-показателно се изразява чрез отношението на EC₅₀ с към без инхибитор (т.нар. EC₅₀ ratio) (Таблица 6).

Таблица 6. Изчислени EC_{50} стойности за контракции на илеум на плъх след различни концентрации на АТ-I. Съотношението EC_{50} е съотношението на EC_{50} в присъствието на инхибитор, разделено на EC_{50} само на агонист (АТ-I)

	Контрола (АТ-I) (EC_{50})	$EC_{50}ratio$			
Концентрация		0.01 μM	0.1 μM	1 μM	10 μM
LAP	11.0^{-8}		3.562	4.55	
VAP	1.5^{-8}			1.777	5.947
LKP	5.5^{-8}		3.075	3.506	
IAK	3.04^{-8}		2.914	7.573	
VAW	1.98^{-8}		3.494	3.995	
LIS	4.09^{-8}	8.11	18.14		
Средна $\pm$ SD	$6.2^{-8} \pm 4.3$				

От петте нови синтезирани трипептиди четири от тях показаха почти еднакъв инхибиращ ефект върху ACE I на илеума (EC_{50} съотношение около 3.0 при 0.1 μM). H-Val-Ala-Pro-OH (VAP) е почти 100 пъти по-малко ефективен. Лизиноприлът е с най-ефективното съотношение EC_{50} - 8,11 при 0,01 μM . Сравнението на ефекта на съединенията *in vitro* и *in situ* върху активността на ACE I показва значителни разлики. В първия случай директно се изследват промените в количеството на използвания субстрат, докато във втория за активността се съди индиректно от контрактилния отговор на илеума към метаболита образуван в реакцията (АТ-II).

IV.Изводи

1. Намерен е ефективен нетрадиционен метод за течно-фазен синтез на пролинови ди- и трипептиди, с използване на Fmoc-Cl като кондензиращ агент, който води до получаване на пептиди с по-висок добив.
2. Осъществен е твърдофазен пептиден синтез (SPPS) с използване на Fmoc стратегия и 2-хлортритилхлоридна смола на къси пролинови пептиди: H-Val-Pro-Pro-OH, H-Ile-Pro-Pro-OH, H-Ile-Ala-Pro-OH, H-Val-Ala-Pro-OH, H-Leu-Arg-Pro-OH, H-Leu-Lys-Pro-OH, H-Leu-Ala-Pro-OH, H-Val-Pro-Pro-Pro-OH.
3. Реализиран е твърдофазен пептиден синтез (SPPS) с използване на Fmoc стратегия и Wang смола на пептидите H-Ile-Ala-Lys-OH и H-Val-Ala-Trp-OH.
4. Разработен е лесен и ефективен метод за трансестерификация на цианметилови естери на аминокиселини с моно - и дизахариди.
5. Осъществен е синтез и с ЯМР техники (2D COSY, DEPT135, HSQC) е доказана структурата на естери на захарозата със заместена OH гр. на 2-^{ра}, 3-^{та} и 6-^{та} позиция в глюкопиранозилния пръстен и естери със заместена OH гр. на 1-^{ва} позиция във фруктофуранозилния пръстен с аминокиселините - валин, пролин и изолевцин. Този клас съединения проявяват слаба инхибиторна активност.
6. С ЯМР техники е изследвана *цис-транс* изомеризацията на дипептида H-Val-Pro-OH. Установено е, че тя е строго рН зависима, което е в съответствие с направените теоретични изчисления.
7. На базата на получените резултати от проведените ИЧ изследвания може да се приеме, че силните вътрешномолекулни водородни връзки $\text{NH}_2 \dots \text{O}=\text{C}-\text{N}$ (Amide) и $\text{O}=\text{C}-\text{OH} \dots \text{NH}_2$ в трипептидите H-Val-Pro-Pro-OH и H-Ile-Pro-Pro-OH възпрепятстват разграждането на тези пептиди от протеолитични ензими.
8. Установена е значителна разлика в ефекта на изследваните пептиди *in vitro* и *ex vivo* върху активността на ACE I. При *in vitro* експериментите директно се изследват промените в количеството на използвания субстрат, докато при *ex vivo* информацията е индиректна от контрактилния отговор на илеума към метаболита ангиотензин- II (AT-II) образуван в реакцията.

V. Приноси

1. Разработена е процедура за твърдофазен синтез на нови късоверижни пептидни последователности, неописани досега в литературата и доказани като инхибитори на ангиотензин-превръщащия ензим.
2. Намерени са подходящи условия за разделяне на региоизомерни естери на захари чрез високоефективна течна хроматография при използване на аминоколонна и градиентно елуиране.
3. Синтезираните пролинови пептиди са с изразено антихипертензивно действие и биха намерили потенциално приложение за превенция и терапия в медицината и като хранителни добавки.
4. Получените резултати от *'in vitro'* и *"ex vivo"* изследванията дават насоки за дизайн и синтез на нови инхибитори на ACE.

Публикации във връзка с темата на дисертацията:

1. **Yakimova B.**, Mateeva P., Kardaleva P., Stoineva I., Todorova P., Zamfirova R. and Yanev S. 'In vitro and ex vivo studies on angiotensin-1 converting enzyme (ACE) inhibitory activity of short synthetic peptides', *Farmacia Journal* (**accepted, in press**) ISSN:0014-8237; Q2 IF(2019-2020) -**1.607**, SJR (2019)-0.36 (**2021**).
2. **Yakimova B.**, Petkova D., Karapetrova N., Stoineva I., Molecular design and chemical synthesis of peptide inhibitors of Angiotensin I converting enzyme (ACE) for prevention and therapy of hypertension. *Bulgarian Chemical Communications* ISSN:0861-9808, Special Issue E.(pp.11-15) Q4 **IF-0.238** (**2017**).
3. Ivanova G., **Yakimova B.**, Angelova S., Stoineva I., Enchev V., 'Influence of pH on the cis-trans isomerization of Valine-Proline dipeptide: An integrated NMR and theoretical investigation', *J. of Mol. Struct.* 975, p.330-334. ISSN:0022-2860 **Q2 IF-2.12** (**2010**).
4. Kolev Ts., Koleva B, Stoineva I., **Jakimova B.**, Tchorbanov B., Stabilization of neutral NH₂-R-COOH form of the antihypertensive peptides L-Valyl-L-Prolyl-L-Proline and L-Isoleucyl-L-Prolyl-L-Proline and their interaction with angiotensin-I-converting enzyme, *Protein Pept. Lett.*, 16 ISSN:0929-8665 p.112-115. **Q3 IF-1.16** (**2009**).

Списък на забелязаните цитати върху публикациите, включени в дисертацията:

Ivanova G., Yakimova B., Angelova S., Stoineva I., Enchev V., "Influence of pH on the cis-trans isomerization of Valine-Proline dipeptide: An integrated NMR and theoretical investigation", J. Mol. Struct., 975 (1-3), 330-334, (2010).

1. Aloui, G Développement méthodologiques pour l'analyse d'équilibres conformationnels par résonance magnétique nucléaire (Doctoral dissertation, Université Paris-Saclay; Université de Carthage (Tunisie), (2019)
2. Aloui, G., Bouabdallah, S., Baltaze, J. P., Pucheta, J. H., Touil, S., Farjon, J., & Giraud, N Monitoring Conformational Changes in an Enzyme Conversion Inhibitor Using Pure Shift Exchange NMR Spectroscopy. *ChemPhysChem*. (2019).
3. Newberry, R.W., Backbone Carbonyl Interactions in Proteins. The University of Wisconsin-Madison. (2016)
4. Bouabdallah, S., Dhia, M. B., Driss, M. R., & Touil, S. Investigation of the energy barrier to the rotation of amide cn bonds in ace inhibitors by NMR, dynamic HPLC and DFT, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 128, 416-425, (2016).
5. Newberry R. W., VanVeller B., Guzei U. and Ronald T. Raines R., " $n \rightarrow \pi^*$ Interactions of Amides and Thioamides: Implications for Protein Stability", *JACS*, 135, 7843-7846, (2013).
6. Maity, J., Gerling, U. I., Vukelić, S., Schäfer, A., & Koksche, B., Proline-glutamate chimera's side chain conformation directs the type of β -hairpin structure. *Amino acids*, 46(1), 177-186, (2014).
7. Bouabdallah, S., Ben Dhia, M. T., & Driss, M. R., Study of a Conformational Equilibrium of Lisinopril by HPLC, NMR, and DFT. *International journal of analytical chemistry*, (2014).

Ts. Kolev, B. Ivanova, I. Stoineva, B. Yakimova and B.Tchorbanov, "Stabilization of neutral NH₂-R-COOH form of the antihypertensive peptides L-Valyl- L -Prolyl- L -Proline and L -Isoleucyl- L -Prolyl- L -Proline", Protein and Peptide Letters, 16, 112-116, (2009).

1. Shenbagavalli, K., Yadav, S. K., Ananthappan, P., Sundaram, E., Ponmariappan, S., & Vasantha, V. S. A simple and fast protocol for the synthesis of 2-amino-4-(4-formylphenyl)-4 H-chromene-3-carbonitrile to develop an optical immunoassay for the quantification of botulinum neurotoxin type F. *New Journal of Chemistry*, 44(46), 20083-20091. (2020).
2. Borah, B., & Devi, T. G. Vibrational study on the molecular interaction of L-Proline and Para-Aminobenzoic acid. *Journal of Molecular Structure*, 1203,127396, (2020).
3. Chapkanov, A.G., Zareva, S.Y., L-valine and L-proline - solid-state IR-LD spectroscopic study, *Protein and Peptide Letters*, 17 (3), p.347-350, (2010).
4. Chapkanov, A.G., Dzimbova, T.A., Ivanova, B.B. "A facile synthesis and IR-LD spectral elucidation of N-acetyl amino acid derivatives", *Bulgarian Chemical Communications* 444, 228-232, (2012).

Участие в научни форуми:

1. Ангелова С. *, Кирчева Н., Добрев С., **Якимова Б.**, Стойнева И. 'Взаимодействие на инхибитори на Ангиотензин I Конвертиращия ензим (ACE) и HEXXH мотив', Юбилейна научна сесия посветена на Акад.Г.Близнаков, **18.11.2020** София, България, постер.
2. **Yakimova B.**, Mateeva P., Kardaleva P., Stoineva I., Todorova P., Zamfirova R. 'In vitro studies on Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of short synthetic peptides.' Third Scientific Conference 'Neurosciences-from theory to experiment and practice', **23-25.10.2020**, Бачиново,България, постер (2020).
3. Kircheva N., Dobrev S., **Yakimova B.**, Stoineva I., Angelova S. 'Molecular Insights into the Interaction of Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitors and HEXXH Motif', Third Scientific Conference 'Neurosciences-from theory to experiment and practice', **23-25.10.2020**, Бачиново, България, постер, (2020).
4. Stoineva I., and **Yakimova B.**, доклад "Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors a cornerstone in the prevention and treatment of hypertension", 30 years Chemical Education in South-West University'Neofit Rilski', Blagoevgrad, Bulgaria, 19-21oct. (2017).
5. **Yakimova B.**, Petkova D., and Stoineva, 'Molecular design and chemical synthesis of peptide inhibitors of angiotensin I converting enzyme (ACE) for prevention and therapy of hypertension' 7-th *Bulgarian Peptide Symposium* 10-12 юни, Благоевград, София, България (2016).
6. Yanachkova B., **Yakimova B.**, Tchorbanov B., Yordanov D., Stoineva I. 'Novel method for synthesis of carbohydrate amino acids conjugates with biological and surface active properties', 33-rd *European Peptide Symposium*, постер P079 София, България (2014).
7. Petkova D, **Yakimova B.**, Tchorbanov B. and Stoineva I. 'New Fluorogenic substrates for measurement of angiotensin converting enzyme activity', 33-rd *European Peptide Symposium* постер P305, София, България (2014).
8. **Yakimova B.**, Rangelov M., Petkova D., Tchorbanov B., Stoineva I. "A combined biological and theoretical study of prolyl peptides as inhibitors of angiotensin I converting enzyme". *Proceedings of the 32nd European Peptide Symposium (Peptides)*, 2-7 sept., Athens,Greece, pp. 424-425, ISSN: 0196-9781 (2012).

- 9. Yakimova B.,** Tchorbanov B., and Stoineva I., ‘Microwave assisted synthesis of sugar esters of amino acids’, poster MAOPS Congress , Florence, Italy **(2011).**
- 10. Yakimova B.,** Tchorbanov B., Deligeorgiev T., and Stpineva I., poster ‘Design and synthesis of novel fluorogenic substrates for two catalytic domains of angiotensin-converting enzyme (ACE)’, 6th Bulgarian Peptide Symposium, 30.09-01.10, Panichishte, Bulgaria **(2011).**
- 11. Yakimova B,** Stoineva I. and Tchorbanov B., poster P254 Investigation on inhibition of the two active sites of Angiotensin I converting enzyme (ACE) by modified prolyl peptides Danmark, Kopenhagen 31-st–European Peptide Symposium **(2010).**
- 12. Pandova B.,** Todorova V., **Yakimova B.,** Yanev S., Stoineva I., and Tchorbanov B., poster ‘In vitro screening of peptides and glycopeptides inhibitors of Angiotensin-converting enzyme’, 8th Southeast European Congress on Xenobiotics, Metabolism and Toxicity-XEMET, 1-5 oct., Thessaloniki,Greece **(2010).**
- 13. Якимова Б ,** Иванова Г. , Ангелова С. , Енчев В. , Чорбанов Б., Стойнева И. Sofia School of Protein Science, FEBS Practical and Lecture Course, 21-26 септември, 2009, София – постер P-4 Importance of cis/trans Isomerization for ACE Inhibitory Effect of Prolyl Peptides. **(2009).**
- 14. Stoineva I. , Yakimova B. ,** Ivanova G.,. Tchorbanov B. (11th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins, 3-7 август, 2009, Vienna, Austria, постер ‘Importance of cis/trans isomerization of prolyl peptides for inhibition of Angiotensin converting enzyme’,Amino Acids,37,(Supl.1),119, **(2009).**

Научен консултант на магистърски дипломни работи

1. Наталия Карапетрова Ф№ МС0972, тема: „Молекулен дизайн и химичен синтез на пептидни инхибитори на АСЕ за превенция и терапия на хипертония” защита март 2017 г.
2. Бончо Григоров Ф№ М 00354, тема: „Синтез на пролинови пептиди и аминикиселинни естери на захари с антихипертензивно действие”-2010 г.
3. Маргарита Сливкова Ф№ М00257, тема: „Синтез на пролинови пептиди с антихипертензивно действие”-2009 г.

Участие в научен проект по темата на дисертацията

1. проект КП-06-Н-21/5 от 18.12.2018 г. **„Полиморфизъм на Анготензин-І конвертирация ензим (АСЕ): изследване на някои биологични функции чрез нови природни и синтетични инхибитори“** с ръководител проф.д-р Росица Замфирова