

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

Սարգսյան Տաթևիկ Հովհաննեսի

ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԼ ՏԵՂԱԿԱԼՎԱԾ ՈՉ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑԱՅԻՆ
α-ԱՄԻՆԱԹՅՈՒՆՆԵՐ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՂ ԴԻ- ԵՎ ՏՐԻՊԵՊՏԻԴՆԵՐԻ
ՍԻՆԹԵԶԸ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՍԵՐԻՆԱՅԻՆ
ՊՐՈՏԵԱԶՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿՐՎ

Գ.00.14 - «Կենսատեխնոլոգիա» և
Բ.00.10 - «Կենսօրգանական քիմիա» մասնագիտություններով
քիմիական գիտությունների թեկնածուի գիտական
աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՄԵՂՄԱԳԻՐ

Երևան – 2012

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

Саргсян Татевик Оганнесовна

СИНТЕЗ ДИ- И ТРИПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ФУНКЦИОНАЛЬНО-
ЗАМЕЩЕННЫЕ НЕБЕЛКОВЫЕ α-АМИНОКИСЛОТЫ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА
АКТИВНОСТЬ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук по специальностям

03.00.14 – «Биотехнология» и

02.00.10 – «Биоорганическая химия»

Ереван – 2012

Ատենախոսության թեման հաստատվել է «Կենսատեխնոլոգիայի ԳՀԻ» ՓԲԸ (ներկայումս ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա») ԳԱԿ և ԵՊՀ քիմիայի ֆակուլտետի գիտական խորհուրդներում:

Գիտական ղեկավարներ՝

ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս, պրոֆեսոր
Ս. Ս. Մաղյան
ք.գ.թ. Յու. Մ. Դանդան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

ք.գ.դ. Ա.Ե. Աղաջանյան
ք.գ.դ. Վ.Ս. Հարությունյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

ՀՀ ԳԱԱ Օրգանական և դեղագործական
քիմիայի գիտատեխնոլոգիական կենտրոն

Պաշտպանությունը կայանալու է 2012 թ. հուլիսի 20-ին, ժամը 14⁰⁰-ին
ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ԲՈՒՀ-ի Կենսատեխնոլոգիայի
018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցե՝ 0056, ՀՀ, ք. Երևան, Գյուրջյան փողոց, 14, հեռ/ֆաքս (374 10) 65 41 83:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա»
ԳԱԿ-ի գրադարանում:

Մեղմագիրն առաքված է 2012 թ. հունիսի 20-ին:

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար, կ.գ.թ.,՝

Գ.Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена на заседаниях ученых советов ЗАО «НИИ Биотехнологии» (ныне НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА) и химического факультета ЕГУ.

Научные руководители:

академик НАН РА, профессор
А.С. Сагиян

к.х.н. Ю.М. Дангян

Официальные оппоненты:

д.х.н. А.Е. Агаджанян

д.х.н. В.С. Арутюнян

Ведущая организация:

Научно-технологический центр органической и
фармацевтической химии НАН РА

Защита диссертации состоится «20» июля 2012 г. в 14⁰⁰ часов на заседании
специализированного совета ВАК-а 018 Биотехнологии при НПЦ
«Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна, 14, тел/факс (374 10) 65 41 83.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПЦ «Армбиотехнология»
НАН РА.

Автореферат разослан «20» июня 2012 г.

Ученый секретарь специализированного совета, к.б.н.

Г.Е. Аветисова

ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Խնդրի արդիականությունը: Կենսաբանորեն և դեղաբանորեն ակտիվ քիրալային օրգանական միացությունների սինթեզը համարվում է ժամանակակից կենսատեխնոլոգիայի և կենսաօրգանական քիմիայի կարևորագույն ուղղություններից մեկը: Նման միացությունների շարքին են պատկանում բնական պեպտիդները և նրանց սինթետիկ նմանակները, որոնք՝ շնորհիվ կառուցվածքային յուրահատկությունների և կենսաբանական հատկությունների, այսօր անփոխարինելի տեղ են զբաղեցնում բժշկության, դեղագործության, գիտության ու տեխնիկայի այլ ոլորտներում, որոնց ստացումն ու հետազոտումը հիմնարար և կիրառական մեծ հետաքրքրություն է ներկայացնում: (Norbert Sewald and Hans-Dieter Jakubke. 2009):

Պեպտիդները՝ շնորհիվ կառուցվածքային առանձնահատկությունների, օժտված են սպիտակուցների և բջջային այլ մակրոմոլեկուլների հետ փոխազդելու պոտենցիալ ունակությամբ: Դրանք որոշ ֆերմենտների (պրոտեազների, կինազների, ֆոսֆոլիպազների, տրանսֆերազների և այլն) կարևոր սուբստրատներ են, իսկ նրանց նմանակները հաջողությամբ կիրառվում են տարբեր մետաբոլիկ պրոցեսների մեխանիզմների հետազոտման գործընթացներում՝ որպես ֆերմենտների արգելակիչներ (Weidner, J. R., Dunn, B. M. 1991):

Կենսաբանորեն ակտիվ բնական պեպտիդները հաջողությամբ կիրառվում են նաև բժշկագիտության բնագավառում, որպես դեղապատրաստուկներ: Ժամանակակից դեղագործության արդիական խնդիրներից է օրգանիզմի համար օտարածին պեպտիդային կառուցվածքի դեղապատրաստուկների ստացումը: Բնական պեպտիդի կառուցվածքում սպիտակուցային ամինաթթվի փոխարինումը նրա ոչ սպիտակուցային նմանակով բերում է դեղի ազդեցության պրոլոնգացմանը և արդյունավետության մեծացմանը: (Rivier, J., Brown, M., 1976, Затевахин И.И., Шегалов 2000):

Չնայած այն հանգամանքին, որ այսօր երկար պեպտիդները հիմնականում սինթեզվում են պոլիմերային հենքի վրա, ոչ սպիտակուցային ամինաթթուներ պարունակող նոր պեպտիդների սինթեզը նպատակահարմար է իրականացնել դասական պեպտիդային սինթեզի մեթոդներով, քանի որ այս դեպքում կարևոր է միջանկյալ արգասիքների անջատումը և ուսումնասիրումը, ինչը դժվար է իրականացնել պոլիմերային հենքի վրա մատրիցային սինթեզի ժամանակ: (M. G. Dutta 2011):

Պեպտիդային սինթեզի հայտնի եղանակների շարքում կարելի է առանձնացնել ակտիվացված էսթերների մեթոդը, որը ապահովում է սինթեզի համեմատաբար բարձր ելքեր և որի դեպքում նպատակային արգասիքի ոչ ցանկալի ռացեմիզացման վտանգը նվազագույն է:

Բնական պեպտիդների և նրանց սինթետիկ նմանակների կենսաբանական հատկությունների ուսումնասիրությունը համարվում է դժվար և բազմաձևավա աշխատանք, քանի որ պեպտիդների ազդեցությանը ենթակա քիրալները բազմաթիվ են: Դրանց շարքին են պատկանում պրոտեոլիտիկ ֆերմենտները, որոնց ազդեցության խանգարումը օրգանիզմում հարուցում է ախտածին երևույթներ: (Rinderknrecht, H. 1993):

Հետևաբար, ակտիվացված էսթերների կիրառմամբ ոչ սպիտակուցային ամինաթթուներ պարունակող պեպտիդների սինթեզը և պրոտեազների վրա նրանց ազդեցության հետազոտումը արդիական խնդիր է:

Հետազոտության նպատակն ու խնդիրները: Ատենախոսական աշխատանքի նպատակն է տարբեր կառուցվածքի ալիֆատիկ, արոմատիկ և հետերոցիկլիկ տեղակալիչներով էնանտիոմերապես մաքուր ոչ սպիտակուցային ամինաթթուներից կազմված նոր պեպտիդների սինթեզի մեթոդների մշակումը, նմուշների ստացումը և սերինային պրոտեազների ակտիվության վրա նրանց ազդեցության հետազոտումը:

Արդյունքների մեկնաբանությունը առավել բովանդակալից դարձնելու համար նպատակ է դրվել մոլեկուլային մակարդակով ուսումնասիրել լիզանոնների (ոչ սպիտակուցային ամինաթթուներից կազմված պեպտիդների) հետ ֆերմենտների փոխազդեցության հնարավոր տարբերակները համակարգչային ծրագրերի (դոքինգ անալիզ) կիրառմամբ:

Վերոնշյալ նպատակին հասնելու համար պլանավորվել է հետևյալ հիմնական խնդիրների լուծումը,

- մշակել քենոտակտիկ N-ֆորմիլմեթիոնիլ պեպտիդների սինթեզի եղանակ,
- մշակել տարբեր կառուցվածքի ալիֆատիկ, արոմատիկ և հետերոցիկլիկ տեղակալիչներով ոչ սպիտակուցային (S)- և (R)- α -ամինաթթուներ պարունակող N-ֆորմիլմեթիոնիլ դի- և տրիպեպտիդների սինթեզի մեթոդներ,
- մշակել ալիֆատիկ և հետերոցիկլիկ տեղակալված ոչ սպիտակուցային ամինաթթուներ պարունակող նոր դի- և տրիպեպտիդների սինթեզի մեթոդներ՝ BOC պաշտպանիչ խմբի կիրառմամբ,
- համակարգչային AutoGrid 4 և AutoDock 4 ծրագրերի կիրառմամբ սինթեզված հետերոցիկլիկ տեղակալված դի- և տրիպեպտիդների շարքում բացահայտել ցլի լյարդի տրիպսինի և *Tritirachium album* Limber սնկից անջատված պրոտեինազ K-ի պոտենցիալ արգելակիչները,
- ուսումնասիրել սինթեզված հետերոցիկլիկ տեղակալիչներով α -ամինաթթուներից կազմված նոր դի- և տրիպեպտիդների ազդեցությունը ցլի լյարդի տրիպսինի և *T. album*-ի պրոտեինազ K-ի ակտիվության վրա:

Աշխատանքի գիտական նորույթը: Ակտիվացված էսթերների մեթոդի կիրառմամբ մշակվել են N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնինի և N-տրեոթրեոթրապիլարբոնիլ-(S)-ալանինի հենքի վրա կառուցված էնանտիոմերապես մաքուր ոչ սպիտակուցային ամինաթթուներ պարունակող դի- և տրիպեպտիդների սինթեզի մեթոդներ: Յուրյ է տրվել, որ ամինաթթուների կոդոնսման ռեակցիաները հիմնականում ընթանում են համենատարբար արագ և ռացեմիզացիայի բացակայությամբ:

Սինթեզվել են գրականության մեջ չնկարագրված տարբեր ալիֆատիկ, արոմատիկ և հետերոցիկլիկ տեղակալիչներով էնանտիոմերապես մաքուր (S)- և (R)- α -ամինաթթուներ պարունակող ավելի քան 34 նոր դի- և տրիպեպտիդներ, որոնց կառուցվածքը և կոնֆիգուրացիան պարզաբանվել է ժամանակակից ֆիզիկաքիմիական անալիզի մեթոդներով:

Առաջին անգամ հետազոտվել է 1,2,4-տրիազոլային օղակ պարունակող ամինաթթուների և նրանցից կազմված պեպտիդների ազդեցությունը ցլի լյարդի

տրիպսինի և T. album-ի պրոտեինազ K-ի ակտիվության վրա: Յույց է տրվել, որ այդ միացությունները ոչ միայն ճնշում, այլ նաև կարող են խթանել ֆերմենտների ակտիվությունը:

Աշխատանքի կիրառական նշանակությունը: Մշակվել է պոտենցիալ քեմոտակտիկ ակտիվությամբ օժտված N-ֆորմիլմեթիոնիլ պեպտիդների սինթեզի մատչելի մեթոդ, որի կիրառմամբ սինթեզվել են ավելի քան 25 դի- և տրի-պեպտիդներ՝ գանազան ալիֆատիկ, արոմատիկ և հետերոցիկլիկ տեղակալիչներով էնանտիոմերապես մաքուր (S) և (R)- α -ամինաթթուների օգտագործմամբ: Մշակված մեթոդը հաջողությամբ կարելի է կիրառել N-ֆորմիլմեթիոնիլ պեպտիդների կազմի մեջ այլ, ոչ սպիտակուցային ամինաթթուներ ներմուծելու համար, իսկ սինթեզված նոր պեպտիդները, կարող են մոտ ապագայում հաջողությամբ ապրանքայնացվել միջազգային շուկայում:

Սինթեզված ոչ սպիտակուցային ամինաթթուներ պարունակող պեպտիդների կենսաբանական հատկությունների հետազոտման արդյունքում որոշ նմանակների մոտ հայտնաբերվել են սերինային պրոտեազների արտահայտված արգելակիչ ակտիվություններ, որոնց հետագա կատարելագործումը կարող է բերել նոր հակավիրուսային դեղապատրաստուկների ստացմանը:

Պաշտպանության ներկայացվող դրույթները:

- Քեմոտակտիկ ազդեցությամբ օժտված դիպեպտիդների սինթեզի մշակված մեթոդներ,
- Ալիֆատիկ և հետերոցիկլիկ տեղակալիչներ պարունակող ոչ սպիտակուցային ամինաթթուներ պարունակող N-For- և BOC-պաշտպանված դի- և տրիպեպտիդների (ավելի քան 34 մուդ) սինթեզ:
- Տեղակալված 1,2,4-տրիազոլային օղակ պարունակող α -ալանինի մնացորդներից կազմված պեպտիդների ազդեցության հետազոտում տրիպսինի և պրոտեինազ K-ի ակտիվության վրա:
- Դրանց շարքում պոտենցիալ արգելակիչների բացահայտման նպատակով համակարգչային AutoGrid 4 և AutoDock 4 ծրագրերի կիրառմամբ նրանց փոխազդեցությունների մոդելավորում:

Աշխատանքի կապը գիտական ծրագրերի և թեմաների հետ: Աշխատանքն իրականացվել է Միջազգային գիտատեխնիկական կենտրոնի #2780 (2002-05թթ.), A-1247 (2004-08թթ.) և A-1677 (2008-11թթ.) դրամաշնորհների, ինչպես նաև Հայկենսատեխնոլոգիա ԳԱԿ-ի բազային գիտահետազոտական ծրագրերի շրջանակներում:

Հեղինակի անձնական ներդրումը: Հեղինակի անձնական ներդրումը ներառում է աշխատանքի հետ առնչվող գիտական գրականության վերլուծությունն ու ընդհանրացումը, հետազոտության հիմնական փորձարարական խնդիրների իրականացումն ու ամփոփումը, տպագրվող գիտական հոդվածների մախապատրաստումը և ատենախոսության կազմումը:

Աշխատանքի քննարկումը և տպագրությունները: Ատենախոսության նյութը շարադրված է 3 գիտական հոդվածների և 1 թեզիսի տեսքով: Աշխատանքի առանձին արդյունքները գեկուցվել են State-of the-Art Biotechnology in Armenia & ISTC contribution, Tsakhadzor, 2008, Հայկական քիմիական ընկերության առաջին գիտաժողով «Հայաստանի քիմիական գիտության արդի խնդիրները», 2008, գիտաժողովներին և «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գիտական խորհրդի նիստերում:

Աշխատանքի իրականացման վայրը: Աշխատանքն իրականացվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի պեպտիդների սինթեզի լաբորատորիայում:

Աշխատանքի ծավալը և կառուցվածքը: Ատենախոսությունը կազմված է նախաբանից և չորս գլուխներից, (գրական ակնարկ, խնդրի դրվածք և հետազոտման օբյեկտի ընտրություն, արդյունքների քննարկում, փորձնական մաս), եզրակացությունից և գրականության ցանկից: Աշխատանքը շարադրված է 134 էջի վրա, բերված են 26 սխեմա, 24 նկար և 3 աղյուսակ: Գրականության ցանկն ընդգրկում է 231 գիտական տպագիր հոդվածներ:

ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ.

Նվիրված է գրականության ամփոփմանը և նկարագրված են սպիտակուցային և ոչ սպիտակուցային ամինաթթուներ պարունակող պեպտիդների կիրառման հնարավոր ոլորտները: Առանձին բաժին նվիրված է ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների ստեխիոմետրիկ ասիմետրիկ սինթեզի նկարագրությանը: Ներկայացված են դասական, պինդ ֆազային և ասիմետրիկ պեպտիդային սինթեզի եղանակները: Մանրամասն նկարագրված են նաև ռացեմիզացիայի խնդիրները պեպտիդային սինթեզում:

ԳԼՈՒԽ 2. ԽՆԴՐԻ ԴՐՎԱԾՔԸ ԵՎ ՀԵՏԱԶՈՏՄԱՆ ՕԲՅԵԿՏԻ ԸՆՏՐՈՒԹՅՈՒՆ.

Հետազոտության հիմնական առարկա են հանդիսացել քենտակտիկ դի-պեպտիդների սինթեզը և նրանց կիրառումը ոչ սպիտակուցային ամինաթթուներից կազմված նոր դի- և տրիպեպտիդների ստացման ռեակցիաներում, ինչպես նաև սինթեզված պեպտիդների շարքում սերինային պրոտեազների նոր արդյունավետ արգելակիչների բացահայտումը:

ԳԼՈՒԽ 3. ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐԻ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄ.

3.1. Քենտակտիկ ազդեցությամբ օժտված N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-դիպեպտիդների սինթեզը

Քենտակտիկ ազդեցությամբ N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ պեպտիդների կենսաբանական հատկությունները բավականին ուսումնասիրված են, սակայն գրականության մեջ բացակայում են աշխատանքները նրանց ստացման մեթոդների վերաբերյալ:

Սույն աշխատանքում նշված պեպտիդների ստացման համար մշակված մեթոդը բաղկացած է հետևյալ փուլերից.

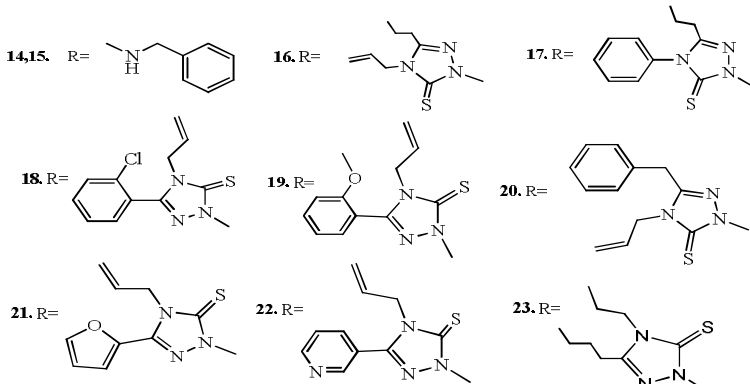
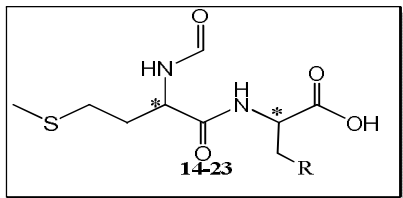
ա) N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնինի ստացում,

բ) N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնինի ակտիվացված էսթերի ստացում և նրա կոնդենսում հաջորդ ամինաթթվի հետ, առանց վերջինիս կարբօքսիլային խմբի պաշտպանման: Բավականին բարձր ելքերով իրականացվել է (S)-մեթիոնինի (1ա) և (R)-մեթիոնինի (1բ) N-ացիլումը 98%-ոց մրջնաթթի և կոնցենտրիկ բացախանիդրիդի օգտագործմամբ (3:1 հարաբերությամբ): (Մխենա 1):

3.2. Էնանտիոմերապես մաքուր ոչ սպիտակուցային ամինաթթուներ պարունակող N-ֆորմիլդի- և տրիպեպտիդների սինթեզը

3.2.1. N-ֆորմիլդի- և տրիպեպտիդների սինթեզը պլանինի ոչ սպիտակուցային նմանակների կիրառմամբ

Ոչ սպիտակուցային ամինաթթու պարունակող N-ֆորմիլդիպեպտիդների սինթեզը իրականացվել է նրանց սպիտակուցային նմանակների սինթեզին համանման: (Նկար 1):



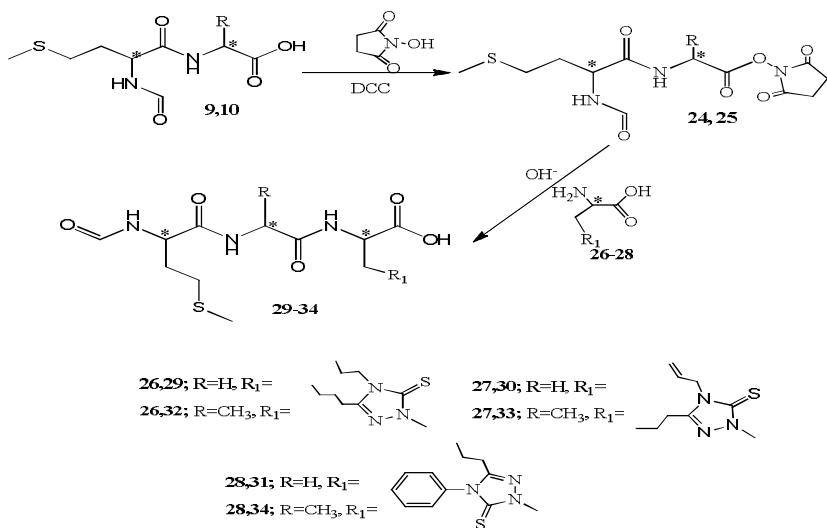
Նկար 1: Տեղակալված 1,2,4-տրիազոլային և արոմատիկ օդակ պարունակող որոշ N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլդիպեպտիդների կառուցվածքը:

Սինթեզվել են N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-(N-բենզիլամինո)- α -ալանին (14), N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(R)-(N-բենզիլամինո)- α -ալանին (15), N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)- β -[4-ալիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանին (16), N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)- β -[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանին (17), N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)- β -[4-ալիլ-3-(2'-քլորֆենիլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանին (18), N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)- β -[4-ալիլ-3-(2'-մեթօքսիֆենիլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանին (19), N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)- β -[4-ալիլ-3-բենզիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանին (20), N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)- β -[4-ալիլ-3-(ֆուրան-2-իլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանին (21), N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)- β -[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանիններ (22ա,բ) և N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)- β -[4-պրոպիլ-3-բուրիլ-

5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ- α -ալանին (**23**), դիպեպտիդներ որոնց կառուցվածքը հետազոտվել և հաստատվել է ՄՄՌ- սպեկտրոֆիտական եղանակով: Հետազոտությունների արդյունքում պարզվել է, որ տեղակալված ալանինի մնացորդի տրիազոլային օղակի 3-րդ դիրքում պիրիդին սեղակալիչի առկայության դեպքում տեղի է ունենում մեթիոնինի մնացորդի մասնակի ռացեմիզացում, վերջինիս ածխածնի ատոմի ինվերսիայի շնորհիվ, որը բերում է համապատասխանաբար N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)- β -[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանինի (**22a**) և N-ֆորմիլ-(R)-մեթիոնիլ-(S)- β -[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանինի (**22բ**) դիաստերիոմեր խառնուրդի առաջացմանը: Այդ փաստը հաստատելու համար մեր կողմից իրականացվել է հանդիպակաց սինթեզ, որի ժամանակ որպես ելանյութ օգտագործվել է N-ֆորմիլ-(R)-մեթիոնինը: Մինթեզված դիպեպտիդների կառուցվածքի ՄՄՌ- սպեկտրոֆիտական հետազոտման ժամանակ պրոտոնների համապատասխանեցման համար բացի ^1H ՄՄՌ- սպեկտրոմետրից ստացվել է նաև 2D ՄՄՌ- սպեկտրոմերը - Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC):

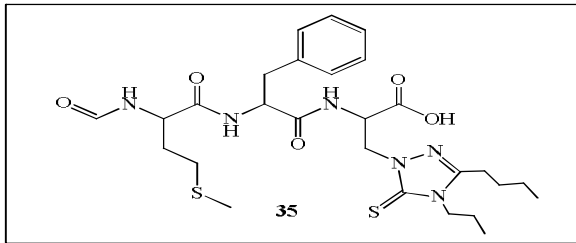
Այնուհետև տրիազոլային օղակ պարունակող ամինաթթուները կիրառվել են տրիպեպտիդների ստացման ռեակցիաներում: Դրա համար նույն սկզբունքով N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլզիցին (**9**) և N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-ալանին (**10**) դիպեպտիդներից ստացվել են համապատասխան N-օքսիտուկցինիմիդային ակտիվացված էսթերները (OSu) (**24**) և (**25**), որոնք այնուհետև հիմնա-ջրային լուծույթում կոնդենսվել են տարբեր էնանտիոմերապես մաքուր ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների (ՈՍԱԹ) հետ, առաջացնելով N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլզիցին-ՈՍԱԹ և N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-ալանին-ՈՍԱԹ: (Մխենա 3):

Մխենա 3



Այս եղանակով սինթեզվել են N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլգլիցիլ պարունակող տրիպեպտիդներ՝ N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլգլիցիլ-(S)-β-[4-պրոպիլ-3-բութիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (29), N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլգլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (30), N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլգլիցիլ-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (31) և N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-ալանիլ պարունակող տրիպեպտիդներ՝ N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-ալանիլ-(S)-β-[4-պրոպիլ-3-բութիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (32), N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-ալանիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (33), N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-ալանիլ-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (34):

Վերը նկարագրված եղանակով այս աշխատանքում հաջողվել է սինթեզել նաև N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-ֆենիլալանիլ-(S)-β-[4-պրոպիլ-3-բութիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին կարևոր պեպտիդը (35), որը պարունակում է բարձր քանակությամբ ազոտային օժտված N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-ֆենիլալանինի մնացորդ: (Նկար 2):



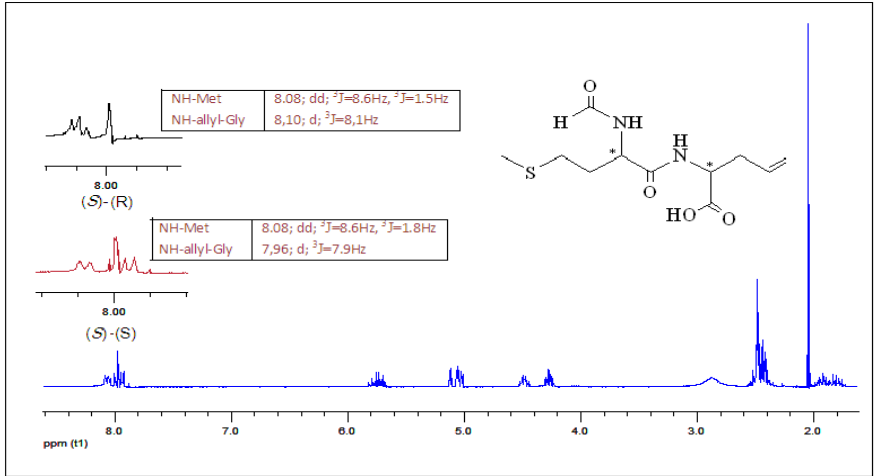
Նկար 2: *N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-ֆենիլալանիլ-(S)-ալանիլ-(S)-β-[4-պրոպիլ-3-բութիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինի կառուցվածքը:*

Համաձայն ¹H-ՄՄՆ սպեկտրադիտակն անալիզի տվյալների 35 տրիպեպտիդը ստացվում է մաքուր դիաստերեոմերի տեսքով:

3.2.2. Ալիֆատիկ α-ալիլգլիցին և β-հիդրօքսիլեյցին պարունակող N-ֆորմիլդի- և տրիպեպտիդների սինթեզը

Ստորև ներկայացված բոլոր ալիֆատիկ N-ֆորմիլդիպեպտիդները ստացվել են N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ քանոտակտիկ դիպեպտիդների սինթեզի համար նախորդ գլխում բրված մեթոդով: Դրա համար որպես ոչ սպիտակուցային ամինաթթվային բաղադրիչ օգտագործվել են (S)- և (R)-α-ալիլգլիցինի և (2S,3R)- և (2R,3S)-β-հիդրօքսիլեյցինի օպտիկապես մաքուր իզոմերները, որոնք արդեն օժտված են տարբեր կենսաբանական ակտիվություններով: Այդ ամինաթթուների հիման վրա սինթեզված որոշ դիպեպտիդների կենսաբանական հատկությունների հետազոտման արդյունքում արձանագրվել են նկատելի ակտիվություններ: Սինթեզված պեպտիդներից յուրաքանչյուրի անջատման և մաքրման համար մշակվել են օպտիմալ պայմաններ, հաշվի առնելով պեպտիդի բաղադրության մեջ առկա ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների առանձնահատկությունները: Բոլոր

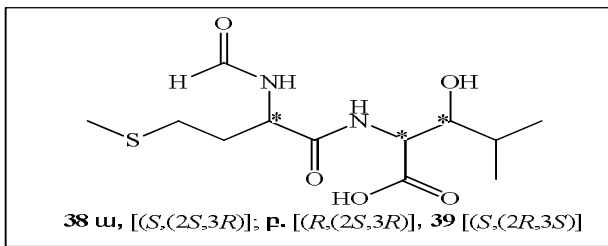
սինթեզված նոր դի- և տրիպեպտիդների կառուցվածքը ուսումնասիրվել է ¹H-ՄՄՆ-սպեկտրադիտակահան անալիզի մեթոդով: (Նկար 3):



Նկար 3: *N*-ֆորմիլ-*(S)*-մեթիոնիլ- α -ալիլգլիցինի ¹H-ՄՄՆ- սպեկտրը: (Առանձնացված են ամիդային և ֆորմիլ խմբերի պրոտոնների ազդանշանները *(S,S)*- և *(S,R)*- իզոմերների համար):

Նկար 3-ում բերված է *N*-ֆորմիլ-*(S)*-մեթիոնիլ- α -ալիլգլիցին դիպեպտիդների ՄՄՆ- սպեկտրագրաման: Նկար 3-ից ակնհայտորեն երևում է *N*-ֆորմիլ-*(S)*-մեթիոնիլ- α -ալիլգլիցինի *(S,S)* (36) և *(S,R)* (37) դիաստրեոմերները տարբերվում են իրարից ալիլգլիցինի մնացորդի ամիդային պրոտոնի ազդանշանների քիմիական շեղման և սպին-սպինային փոխազդեցության հաստատունի արժեքների հաշվին:

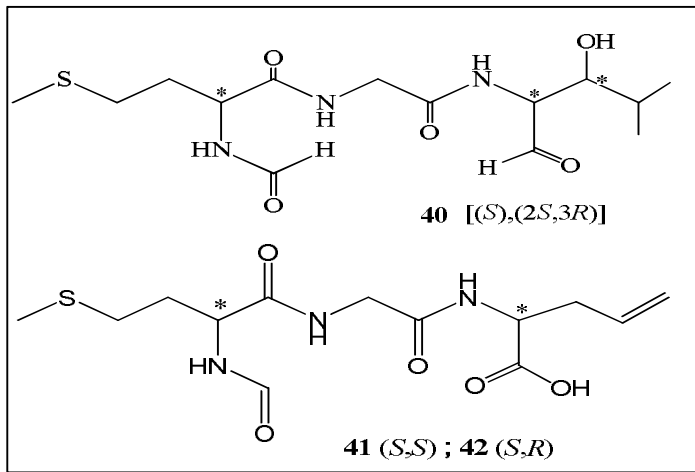
ՄՄՆ- տվյալները վկայում են այն մասին, որ որոշ դեպքերում *N*-ֆորմիլ-*(S)*-մեթիոնիլ-*(2S,3R)*- β -հիդրօքսիլեյցին (38) և *N*-ֆորմիլ-*(S)*-մեթիոնիլ-*(2R,3S)*- β -հիդրօքսիլեյցին (39) դիպեպտիդների սինթեզի ռեակցիաներում նկատվում է մասնակի ռացեմիզացում: (Նկար 4):



Նկար 4: Սինթեզված *N*-ֆորմիլ-*(S)*-մեթիոնիլ- β -հիդրօքսիլեյցինի ստրեոիզոմերների կառուցվածքը:

N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-β-հիդրօքսիլէյցին [(S),(2S,3R)] և [(R),(2S,3R)] ստերեոիզոմերները առաանձնացվել են աշտարակային ադսորբցիոն քրոմատոգրաֆիայի եղանակով:

Այնուհետև նշված ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների հիման վրա սինթեզվել են N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլզիլիցիլ-(2S,3R)-β-հիդրօքսիլէյցին (**40**), N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլզիլիցիլ-(S)-α-ալիլիզիլցին (**41**) և N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլզիլիցիլ-(R)- α-ալիլիզիլցին (**42**) տրիպեպտիդները: (Նկար 5):



Նկար 5: N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլզիլիցիլ-(2S,3R)-β-հիդրօքսիլէյցին և N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլզիլիցիլ-(S)- և (R)-α-ալիլիզիլցին տրիպեպտիդների կառուցվածքը:

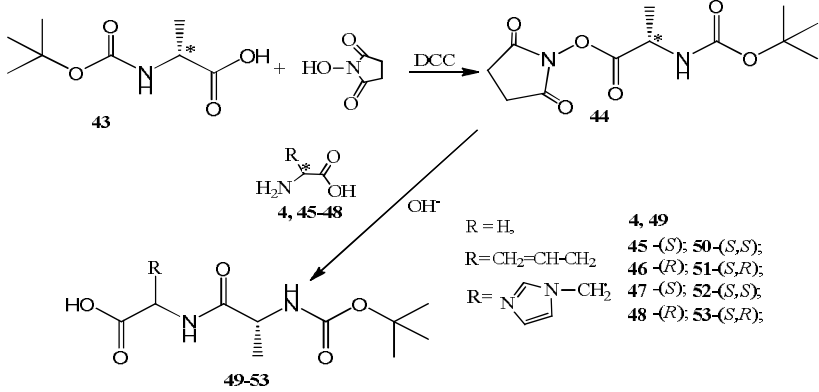
Տրիպեպտիդների սինթեզի արդյունքում ուղեկցող դիաստերեոիզոմերի բացակայությունը վկայում է, որ ելային N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլզիլիցինի դիպեպտիդի ստացման փուլում մեթիոնինի քիրալային ածխածնի ատոմի ինվերսիա տեղի չի ունենում:

3.3. N-Տրեպտոքսիկարբոնիլ (BOC) դի- և տրիպեպտիդների սինթեզը

Առաջին փուլում հայտնի մեթոդով սինթեզվել է BOC-(S)-ալանին (**43**) պաշտպանված ամինաթթուն, որը այնուհետև ռեակցիայի մեջ է դրվել N-հիդրօքսիսուկցինիմիդի (HOSu) հետ, դիցիլոնիտրոբիկարբոնիլիմիդի (DCC) ներկայությամբ: Ստացվել է N-BOC-(S)-ալանինի N-օքսիսուկցինիմիդային ակտիվացված էսթեր (**44**), որը կախված հետագա ռեակցիայից կարող է օգտագործվել անմիջապես, կամ էլ նախապես բյուրեղացնելուց հետո:

Հաջորդ փուլում դիօքսանի միջավայրում 0.5N ջրային NaOH-ի ներկայությամբ իրականացվել է N-BOC-(S)-ալանինի ակտիվացված էսթերի ռեակցիան հաջորդ ազատ ամինաթթվի հետ: (Մխենա 4):

Մխենա 4

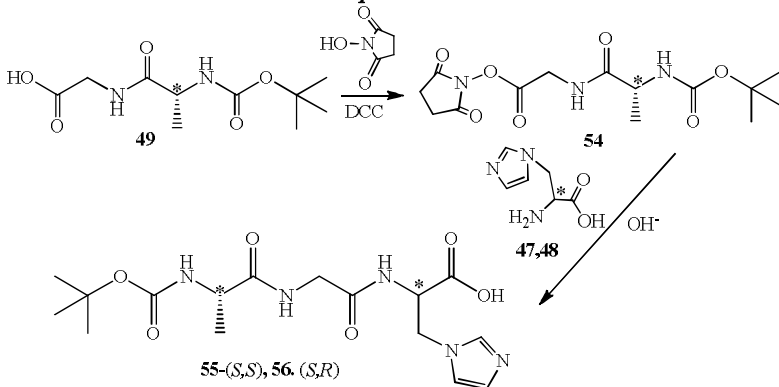


Արդյունքում սինթեզվել են BOC-(S)-ալանիլզին (49), BOC-(S)-ալանիլ-(S)-ալիլզին (50), BOC-(S)-ալանիլ-(R)-ալիլզին (51), BOC-(S)-ալանիլ-(S)-β-(N-իմիդազոլի)ալանին (52) և BOC-(S)-ալանիլ-(R)-β-(N-իմիդազոլի)ալանին (53) դիպեպտիդները:

Սինթեզված դիպեպտիդների կառուցվածքը ուսումնասիրվել է ¹H-ՄՄՈ-սպեկտրադիտական անալիզի մեթոդով: Պարզվել է, որ սինթեզված բոլոր դիպեպտիդների (49-53) մոտիվները պարունակում են միայն մեկ դիաստերեոմեր, ինչը վկայում է սինթեզի գործընթացում ռացեմիզացման բացակայության մասին:

Տրիպեպտիդների ստացման համար սինթեզված BOC-(S)-ալանիլզին (49) դիպեպտիդը նախ միջանկյալ ակտիվացվել է N-հիդրոքսիսուկցինիմիդային էսթերի տեսքով (54) և այնուհետև փոխազդեցության մեջ է դրվել ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների հետ, առաջացնելով BOC-(S)-ալանիլզին-(S)-β-(N-իմիդազոլի)ալանին (55) և BOC-(S)-ալանիլզին-(R)-β-(N-իմիդազոլի) ալանին (56) տրիպեպտիդները: (Մխենա 5):

Մխենա 5



3.4. Պեպատիղների անջատումը և մաքրումը

Կոնդենսման ռեակցիայի արդյունքում ստացված պեպատիղների անջատման և մաքրման մեթոդների ընտրությունը կախված է ստացված մոլեկուլների բևեռվածության աստիճանից, բյուրեղացման ունակությունից և այլ հատկություններից: Սույն աշխատանքում մշակվել են սինթեզված վերջնանյութերի անջատման երեք եղանակներ:

1. Ռեակցիոն խառնուրդը չեզոքացվում է 5%-ոց ծծմբական թթվով (կամ 10%-ոց կիտրոնաթթվով) և ջուր/օրգանական լուծիչը վակուումի պայմաններում հեռացնելուց հետո, մնացորդը տաքացնելով լուծվում է օրգանական լուծիչում (էթիլացետատ կամ էթիլացետատ/մեթանոլ), այնուհետև ֆիլտրվում է անօրգանական խառնուրդներից: Ստացված էթիլացետատի լուծույթից սառը պայմաններում բյուրեղացվում է պեպատիղը, բյուրեղները անջատում են ֆիլտրմամբ և անհրաժեշտության դեպքում լրացուցիչ վերաբյուրեղացվում են էթիլացետատ/հեքսան խառնուրդից: Այս եղանակով սինթեզվել են **10, 13, 22ա,բ, 52, 53** դիպեպատիղները և **55, 56** տրիպեպատիղները:

2. Ռեակցիոն խառնուրդը խառնման պայմաններում չեզոքացվում է 10%-ոց կիտրոնաթթվով նախապես ավելացնելով էթիլացետատ, այնուհետև խառնուրդը տեղափոխվում է սառնարան: Հաջորդ օրը առաջացած պեպատիղի բյուրեղները ֆիլտրվում և լվացվում են էթիլացետատով: Այս մեթոդով անջատվել են **11** և **21** դիպեպատիղները:

3. Ռեակցիոն խառնուրդը խառնման պայմաններում չեզոքացվում է 10%-ոց կիտրոնաթթվով (նախապես ավելացնելով էթիլացետատ), օրգանական շերտը անջատվում է, իսկ անօրգանական շերտը աղարկվում, կրկին էքստրակտվում էթիլացետատով և միացված օրգանական շերտերը չորացվում են մագնեզիումի սուլֆատով: Չորացնելուց հետո լուծիչը հեռացվում է, իսկ պեպատիղը վերաբյուրեղացվում է էթիլացետատ/հեքսան լուծիչների խառնուրդից: Այս եղանակով անջատվել են **9, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41,42, 50,51** պեպատիղները:

Անջատված պեպատիղները լրացուցիչ մաքրվել են վերաբյուրեղացմամբ, իսկ որոշ դեպքերում նաև՝ աշտարակային քրոմատոգրաֆիայի մեթոդով:

Պեպատիղների վերաբյուրեղացման համար օգտագործվել են (մեթանոլ, էթիլացետատ և հեքսան) լուծիչներից կազմված խառնուրդներ:

Վերջնանյութերի մաքրության աստիճանը ստուգվել է նաև ՆՇՀ անալիզի եղանակով:

Չափվել է նաև սինթեզված նոր դի- և տրի պեպատիղների տեսակարար օպտիկական պտույտի արժեքները: Աղուսյակ 1:

Աղուսյակ 1-ում բերված են սինթեզված պեպատիղների վերաբյուրեղացման պայմանները, R_F-ի և [α]_D²⁰-ի արժեքները:

Մինթեզված պեպտիդների վերաբյուրեղացման պայմանները, R_f -ի և $[\alpha]_d^{20}$ -ի արժեքները:

Համարանիշը	Լուծիչների համակարգ	ՆՇՔ		$[\alpha]_d^{20}$
		Լուծիչների համակարգ	R_f -ի արժեք	
2ա	CH ₃ COOC ₂ H ₅ / C ₆ H ₁₂	<i>p</i>	0.5	+7.5 ⁰ (c = 3.6; MeOH)
2բ	CH ₃ COOC ₂ H ₅	<i>p</i>	0.5	-7.5 ⁰ (c = 0.4; MeOH)
9	CH ₃ COOC ₂ H ₅ / C ₆ H ₁₂	<i>p</i>	0.35	+13,13 ⁰ (c = 0.66; MeOH).
10	CH ₃ COOC ₂ H ₅	<i>p</i>	0.4	-18,01 ⁰ (c = 0.5; MeOH)
11	CH ₃ COOC ₂ H ₅	<i>p</i>	0.55	+10,01 ⁰ (c = 0.55; MeOH)
12	CH ₃ COOC ₂ H ₅ / C ₆ H ₁₂	<i>p</i>	0.45	+18,33 ⁰ (c = 0.3; MeOH)
13	CH ₃ COOC ₂ H ₅ / C ₆ H ₁₂	<i>p</i>	0.43	-
14	-	<i>p</i>	0.3	+35,01 ⁰ (c = 0.3; MeOH)
15	-	<i>p</i>	0.3	-
16	CH ₃ COOC ₂ H ₅ / C ₆ H ₁₂	<i>p</i>	0.35	-44.74 ⁰ (c = 0.413; MeOH)
17	CH ₃ COOC ₂ H ₅ / C ₆ H ₁₂	<i>p</i>	0.4	-35.34 ⁰ (c = 0.78; MeOH)
18	CH ₃ COOC ₂ H ₅ / C ₆ H ₁₂	<i>p</i>	0.4	-39.73 ⁰ (c = 0.245; MeOH)
19	CH ₃ COOC ₂ H ₅ / C ₆ H ₁₂	<i>p</i>	0.45	-34.74 ⁰ (c = 0.609; MeOH)
20	CH ₃ COOC ₂ H ₅ / C ₆ H ₁₂	<i>p</i>	0.4	+133 ⁰ (c = 0.06; MeOH):
21	-	<i>p</i>	0.45	-25.098 ⁰ (c = 0.051; MeOH)
22ա, բ	CH ₃ COOC ₂ H ₅ / CH ₃ OH	<i>p</i>	0.35	-
23	CH ₃ COOC ₂ H ₅	<i>p</i>	0.4	-30.357 ⁰ (c = 0.28; MeOH).
36	CH ₃ COOC ₂ H ₅ / C ₆ H ₁₂	<i>p</i>	0.4	-3,15 ⁰ (c = 0.81; MeOH)
37	CH ₃ COOC ₂ H ₅ / C ₆ H ₁₂	<i>p</i>	0.4	-37.06 ⁰ (c = 0.85; MeOH)
38	-	<i>p</i>	0.35	-
39	-	<i>p</i>	0.35	-

Աղյուսակ 1-ի շարունակությունը

29	CH ₃ COOC ₂ H ₅	q	0.4	-23,75° (c = 0.4; MeOH)
30	CH ₃ COOC ₂ H ₅	q	0.4	-12,69° (c = 0.52; MeOH)
31	CH ₃ COOC ₂ H ₅ / CH ₃ OH	q	0.45	-6,6° (c = 0.5; MeOH):
40	-	q	0.4	-
41	CH ₃ COOC ₂ H ₅ /C ₆ H ₁₂	q	0.45	+20,759° (c = 0.26; MeOH)
42	CH ₃ COOC ₂ H ₅ /C ₆ H ₁₂	q	0.45	-32,91° (c = 0.82; MeOH)
32	CH ₃ COOC ₂ H ₅ / CH ₃ OH	q	0.5	-4,0° (c = 0.25; MeOH)
33	CH ₃ COOC ₂ H ₅ / CH ₃ OH	q	0.5	-36,25° (c = 0.66; MeOH)
34	CH ₃ COOC ₂ H ₅ / CH ₃ OH	q	0.5	-
35	CH ₃ COOC ₂ H ₅ / CH ₃ OH	q	0.4	-20,02° (c = 0.35; MeOH)
49	CH ₃ COOC ₂ H ₅ /C ₆ H ₁₂	w		-
50	CH ₃ COOC ₂ H ₅ /C ₆ H ₁₂	w	0.35	+6,732° (c = 0.85; MeOH)
51	CH ₃ COOC ₂ H ₅ /C ₆ H ₁₂	w	0.45	-36,429° (c = 0.81; MeOH)
52	CH ₃ COOC ₂ H ₅ / CH ₃ OH	p	0.45	+3,0159° (c = 0.69; MeOH)
53	CH ₃ COOC ₂ H ₅ / CH ₃ OH	p	0.3	-37,016° (c = 0.71; MeOH):
55	CH ₃ COOC ₂ H ₅ / CH ₃ OH	q	0.3	-
56	CH ₃ COOC ₂ H ₅ / CH ₃ OH	q	0.3	-

ա) CH₃COOC₂H₅:CHCl₃:CH₃OH (5:5:1); p) CH₃COOC₂H₅:CHCl₃:CH₃OH (3:3:1);

զ) CH₃COOC₂H₅:CHCl₃:CH₃OH (2:2:1):

Ինչպես երևում է աղյուսակից, BOC-դիպեպտիդների անջատման ժամանակ բուֆերային լուծույթում զերակշռում են համեմատաբար ցածր պոլյարությամբ (հիդրոֆոբ) լուծիչները՝ քլորոֆորմ և էթիլացետատ: Նրանց մասնաբաժինը N-ֆորմիլպեպտիդների դեպքում և երբևէրևում է, ի օգուտ հիդրոֆիլ լուծիչի (մեթանոլ): Նրբաշերտ քրոմատոգրաֆիայի տվյալները օգտագործվել են որպես ցուցանիշներ աղտորեցիոն քրոմատոգրաֆիայի եղանակով նյութերի հետագա մաքրման ժամանակ:

Ակտիվացված էսթերների եղանակով պեպտիդների սինթեզի ժամանակ մասնակի ռացեմիզացման երևույթ նկատվել է միայն երեք դեպքում՝ (*S,R*) և (*R,S*) հիդրօքսիլեյցիններ և (*S*)-β-[4-ալլիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին ոչ սպիտակուցային ամինաթթուներ պարունակող դիպեպտիդների սինթեզի գործընթացում:

Յույց է տրվել, որ աշտարակային քրոմատոգրաֆիայի եղանակով N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(2S,3R)-հիդրօքսիլեյցինի սինթեզի խառնուրդից հնարավոր է անջատել առաջացած երկու դիաստերեոիզոմերները՝ (S),(2S,3R) և (R),(2S,3R), որոնց կառուցվածքը և երկրաչափական կոնֆիգուրացիան պարզաբանվել է ՄՄՌ-սպեկտրադիտակաճան եղանակով: Ռեակցիոն խառնուրդից անջատված նյութերի ՄՄՌ-սպեկտրադիտակաճան անալիզը բացահայտել է դիաստերեոմերների հետևյալ հարաբերությունը՝ [(S),(2S,3R)]/[(R),(2S,3R)]=12/88:

Աշտարակային քրոմատոգրաֆիայի մեթոդով հաջողվել է անջատել միևնույն (R),(2S,3R) (38բ) դիաստերեոմերը: Ենթադրվում է, որ մասնակի ռացեմիզացման է ենթարկվել մեթիոնին մնացորդի քիրալային կենտրոնը: Դրա մասին է վկայում N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլգլիցիլ-(2S,3R)-հիդրօքսիլեյցինի տրիպեպտիդի սինթեզի ժամանակ մասնակի ռացեմիզացման բացակայությունը:

Ռացեմիզացման երրորդ դեպքը նկատվել էր, N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնինի-սուլցինիմիդային էսթերի և (S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօբտ-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինի կոնդենսման ռեակցիայի ժամանակ: Ինչպես երևում է, բոլոր երեք դեպքերում էլ համակարգում առկա են հիմնային բնույթի ամինաթթուներ, որոնք տեսականորեն ընդունակ են նպաստելու ռացեմիզացման պրոցեսին: Քանի որ որոշակի դժվարություններ են առաջացել **22ա և 22բ** դիաստերեոմեր դիպեպտիդների քրոմատոգրաֆացման ժամանակ, դրանց մոտ իզոմերման պրոցեսների վերջնական հաստատման համար իրականացվել է հանդիպակաց սինթեզ N-For-(R)-Met-ի կիրառմամբ և ՄՄՌ-սպեկտրադիտակաճան եղանակով ցույց է տրվել, որ ռեակցիաների արդյունքում ստացված միևնույն և մածոր դիաստերեոմերների հարաբերությունները ենթարկվում են հակադարձ փոփոխման:

3.5. Ոչ սպիտակուցային ամինաթթուներ պարունակող պեպտիդների ազդեցությունը սերինային պրոտեազների ակտիվության վրա

Սույն աշխատանքում հետազոտվել են մեր կողմից սինթեզված ոչ սպիտակուցային ամինաթթուներից կազմված պեպտիդների և նրանց ելանյութերի՝ ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների ազդեցությունը սերինային պրոտեազների ակտիվության վրա: Հետազոտությունները իրականացվել են երկու ճանապարհով՝ համակարգչային ծրագրերի օգնությամբ (դոքիմեզ անալիզ) սպիտակուցի հետ լիզանոլի փոխազդեցության մոդելավորում և փորձարկվող միացությունների առկայությամբ: Ֆերմենտի ակտիվության որոշում:

Ծրագրավորման օգնությամբ հաշվարկվել է Գ-իպսի ազատ էներգիան (ΔG) և լիզանոլ-մակրոմոլեկուլ փոխազդեցության համապատասխան դիսոցման հաստատունը (K_D), որոնց արժեքների հիման վրա գնահատվել է հետազոտվող սպիտակուցների հետ լիզանոլների կոմպլեքս առաջացնելու ունակությունը: Արդյունքում պարզվել է, որ սինթեզված պեպտիդների և նրանց բաղադրիչ ամինաթթուների մեծամասնությունը փոխազդում են տրիպսինի հետ, առաջացնելով կոմպլեքս: Սակայն նշված միացություններից ոչ մեկը կոմպլեքս չի առաջացրել պրոտեինազ K-ի հետ: Հաշվարկային տվյալները բերված են աղյուսակ 2-ում:

Աղյուսակ 2

AutoGrid4 և AutoDock համակարգչային ծրագրերի օգնությամբ մոլեկուլային մոդելավորման տվյալները, հիմնված պրոտեազ լիգանդ փոխազդեցության դրբինգ անալիզի վրա:

Փորձարկված որոշ հետերոցիկլիկ տեղակալված ամինաթթուներ և նրանցից կազմված պեպտիդներ	Պրոտեինազ K		Տրիպսին	
	Կապման ազատ էներգիա (ΔG) (կկալ/մոլ)	Արգելավման հաստատուն (K _i)	Կապման ազատ էներգիա (ΔG) (կկալ/մոլ)	Արգելավման հաստատուն (K _i)
(S)-β-[4-ալլիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	- 5,51	0,09 մմոլ	+ 31,4	-
(S)-β-[4-ալլիլ-3-(2'-քլորֆենիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	-5,50	93,57 մկմոլ	+317,04	-
(S)-β-[4-ալլիլ-3-(2'-մետօքսիֆենիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	-5,82	+113,31	-	-
(S)-β-[4-ալլիլ-3-բենզիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	-5,42	106,68 մկմոլ	+135,22	-
(S)-β-[4-ալլիլ-3-(ֆուրան-2-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	-5,84	52,17 մկմոլ	+119,91	-
(S)-β-[4-ալլիլ-3-պիրիդին-3'-իլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	-5,01	212,80 մկմոլ	+99,74	-
(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	- 6,43	0.02 մմոլ	+ 1,75	-
(S)-β-[4-պրոպիլ-3բուրիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	-5,63	74,54 մկմոլ	+122,87	-
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալլիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (16)	-4,01	1,14 մմոլ		-
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (17)	-3,34	54,55 մկմոլ	+113,31	-
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալլիլ-3-(2'-մետօքսիֆենիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (19)	+4,82	-	480,73	-
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալլիլ-3-(2'-քլորֆենիլ)-5-թիօքսո-1,2,4տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (18)	-5,50	93,57 մկմոլ	+356,89	-

Աղյուսակ 2-ի շարունակությունը

N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալլիլ-3-(ֆուրան-2-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (21)	-5.04	22,23 մկմոլ	+524,76	-
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալլիլ-3-բենզիլ-5-թիօքսո-1,2,4տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (20)	-2.15	0.07 մմոլ	+117.14	-
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ -(S)-β-[4-ալլիլ-3-պիրիդին-3'-իլ-5-թիօքսո-1,2,4- տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (22ա)	-5,27	3,54 մմոլ	+205,69	-
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-պրոպիլ-3-բուքիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (23)	-3.18	820.35 մկմոլ	+150.13	-
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլգլիցիլ-(S)-β-[4-պրոպիլ-3-բուքիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (29)	0,08	870,26 մկմոլ	+149,15	-
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլգլիցիլ-(S)-β-[4-ալլիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (30)	-3,16	482,20 մկմոլ	+97,46	-
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլգլիցիլ-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (31)	-4,73	342,51 մկմոլ	+680,27	-
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-ալանիլ-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (34)	-6,08	34,95 մկմոլ	+947,83	-
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-ալանիլ-(S)-β-[4-ալլիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (33)	-3,67	2,05 մմոլ	+784,10	-
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-ալանիլ-(S)-β-[4-պրոպիլ-3բուքիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (32)	+10,21	-	+126,50	-
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-ֆենիլալանիլ-(S)-β-[4-պրոպիլ-3բուքիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (35)	-3.04	5.98 մկմոլ	+257.85	-

Համաձայն դրքինգ անալիզի տվյալների, տրիպսինի հետ կոմպլեքս կարող են առաջացնել հետևյալ ոչ սպիտակուցային ամնաթթուները և նրանցից կազմված պեպտիդները՝ (S)-β-[4-ալլիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, (S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, (S)-β-[4-ալլիլ-3-(2'-քլորֆենիլ)-5-թիօքսո-1,2,4տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, (S)-β-[4-ալլիլ-3-(2'-մեթօքսիֆենիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, (S)-β-[4-ալլիլ-3-բենզիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, (S)-β-[4-ալլիլ-3-(ֆուրան-2-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, (S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալլիլ-3-պիրիդին-3'-իլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը (22ա), N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալլիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը (16), N-ֆորմիլ-(S)-մե-

թիոնիլ-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը (17), N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլգլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը (30), N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլգլիցիլ-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը (31):

Այնուհետև ուսումնասիրվել է օպտիկապես ակտիվ ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և պեպտիդների ազդեցությունը **T.album**-ի պրոտեինազ K-ի և ցիլյարդի տրիպսինի ակտիվության վրա: Չափումների արդյունքում հայտնաբերվել են որոշակի հատկություններով օժտված միացություններ:

- Միացություններ, որոնք չեն ազդում տրիպսինի և պրոտեինազ K-ի ակտիվության վրա՝ (S)-β-[4-ալիլ-3-(2'-քլորֆենիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, (S)-β-[4-ալիլ-3-(2'-մետօքսիֆենիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլգլիցիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը (30), N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-ալանիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը (33):
- Միացություններ, որոնք ճնշում են պրոտեինազ K-ի ակտիվությունը, բայց չեն ազդում տրիպսինի ակտիվության վրա՝ (S)-β-[4-ալիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, (S)-β-[4-ալիլ-3-բենզիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը:
- Միացություններ, որոնք խթանում են պրոտեինազ K-ի ակտիվությունը, բայց չեն ազդում տրիպսինի ակտիվության վրա՝ N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(ֆուրան-2-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը (21):
- Միացություններ, որոնք խթանում են և պրոտեինազ K-ի և տրիպսինի ակտիվությունը՝ (S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, (S)-β-[4-պրոպիլ-3բուքիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-ալանիլ-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը (34):
- Միացություններ, որոնք ճնշում են և տրիպսինի և պրոտեինազ K-ի ակտիվությունը՝ N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(2'-մեթօքսիֆենիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը (19), N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ գլիցիլ-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը (31):
- Միացություններ, որոնք խթանում են տրիպսինի ակտիվությունը, բայց չեն ազդում պրոտեինազ K-ի ակտիվության վրա՝ (S)-β-[4-ալիլ-3-(ֆուրան-2-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը (17), N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը (22ա):
- Միացություններ, որոնք ճնշում են տրիպսինի ակտիվությունը, բայց չեն ազդում պրոտեինազ K-ի ակտիվության վրա՝ N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը (16):

Աղյուսակ 3

Ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների և նրանցից կազմված պեպտիդների ազդեցությունը սերինային պրոտեազների վրա:

Փորձարկված որոշ հետերոցիկլիկ տեղակալված ամինաթթուներ և նրանցից կազմված պեպտիդներ	Կոնցենտ. (մմոլ/լ)	Պրոտեոլիտիկ Կ (%)	Տրոպիկին (%)
Ստուգիչ	-	100,0	100,0
(S)-β-[4-ալիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	70,5	-
(S)-β-[4-ալիլ-3-(2'-քլորֆենիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	81,3	99,3
(S)-β-[4-ալիլ-3-(2'-մետօքսիֆենիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	80,2	109,0
(S)-β-[4-ալիլ-3-բենզիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	39,9	94,8
(S)-β-[4-ալիլ-3-(ֆուրան-2-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	54,4	146,9
(S)-β-[4-ալիլ-3-պիրիդին-3'-իլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	155,3	146,6
(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	57,6	-
(S)-β-[4-պրոպիլ-3-բութիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին	5	135,0	123,1
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (16)	5	-	64,9
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (17)	5	68,5	120,9
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(2'-մետօքսիֆենիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (19)	5	69,0	69,8
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(2'-քլորֆենիլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (18)	2	65,0	67,0
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-(ֆուրան-2-իլ)-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (21)	2	152,1	107,3
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-բենզիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (20)	5	127,2	87
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալիլ-3-պիրիդին-3'-իլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (22ա)	5	84,2	121,6
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-պրոպիլ-3-բութիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (23)	5	156,1	81,0

Աղյուսակ 3-ի շարունակությունը

N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլգլիցինի-(S)-β-[4-ալլիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (30)	5	98,0	95,1
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլգլիցինի-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (31)	5	73,7	76,7
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-ալանին-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (34)	2	122,3	112
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-ալանին-(S)-β-[4-ալլիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (33)	2	111	84
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլգլիցինի-(S)-β-[4-պրոպիլ-3բուքիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (29)	2	102	95
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-ալանին-(S)-β-[4-պրոպիլ-3բուքիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (32)	5	135	78
N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-ֆենիլալանին -(S)-β-[4-պրոպիլ-3բուքիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (35)	5	114,2	103,5

Ինչպես երևում է աղյուսակի տվյալներից (S)-β-[4-ալլիլ-3-բենզիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին, (S)-β-[4-ալլիլ-3-(ֆուրան-2-իլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին, (S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին հետերոցիկլիկ տեղակալված ոչ սպիտակուցային ամինաթթուները և N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալլիլ-3-(2'-մետօքսիֆենիլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (19), N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (17) դիպեպտիդները ճնշում են պրոտեինազ K-ի ակտիվությունը, իսկ N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալլիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (16), N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-β-[4-ալլիլ-3-(2'-մետօքսի-ֆենիլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանին (19) դիպեպտիդները ճնշում են տրիպսինի ակտիվությունը:

Տրիպսինի նոր արգելակիչներ են հանդիսանում մաս սույն աշխատանքի շրջանակներում սինթեզված հետևյալ ալիֆատիկ տեղակալիչներով ամինաթթուներից կազմված դիպեպտիդները՝ N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)-ալլիլ-գլիցինը, N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(R)-ալլիլգլիցինը, N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(2S,3R)-հիդրօքսիլեյցինը (36), N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(2R,3S)-հիդրօքսիլեյցինը (37):

Հետևաբար, կարելի է ենթադրել, որ նշված միացությունները կարող են հանդես գալ որպես պրոտեինազ K-ի և տրիպսինի պոտենցիալ արգելակիչների կարևոր բաղադրամասեր: Մասնավորապես դրանցից որոշները կարող են կիրառվել հակավիրուսային դեղապատրաստուկների ստացման գործընթացում:

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Ակտիվացված էսթերների եղանակի կիրառմամբ մշակվել են քանոտակտիկ ակտիվությամբ օժտված N-Formyl-(S)-Met-Gly, N-Formyl-(S)-Met-(S)-Ala, N-Formyl-(S)-Met-(S)-Leu, N-Formyl-(S)-Met-(S)-Phe և N-Formyl-(S)-Met-(S)-Val դիպեպտիդների սինթեզի մեթոդներ, հետազոտվել և պարզաբանվել են

սինթեզված նոր պեպտիդների կառուցվածքը և դիաստերեոմերային մաքրությունը:

2. Մշակվել են ալիֆատիկ տեղակալիչներով՝ (S)- և (R)- α -ալիլզինցին, (2S,3R) և (2R,3S)- β -հիդրօքսիլեյցին, արոմատիկ տեղակալիչով՝ (R)- և (S)-(N-բենզիլամինո)- α -ալանին և հետերոցիկլիկ տեղակալիչներով՝ N-(S)- և (R)- β -(N-իմիդազոլի)ալանին, 3 և 4 դիրքերում տեղակալված 5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլային օդակ պարունակող ալանիններ ((S)- β -[4-ալիլի-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանին(S)- β -[4-ալիլի-3-(2'-քլոր-ֆենիլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանին, (S)- β -[4-ալիլի-3-բենզիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանին, (S)- β -[4-ալիլի-3-(2'-մետօքսիֆենիլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանին, (S)- β -[4-ալիլի-3-(ֆուրան-2-իլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանին, (S)- β -[4-ալիլի-3-պիրիդին-3'-իլ]-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանին, (S)- β -[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանին, (S)- β -[4-պրոպիլ-3բութիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանին) օպտիկապես մաքուր ոչ սպիտակուցային ամինաթթուներից կազմված N-For- և BOC դի- և տրիպեպտիդների սինթեզի մեթոդներ: Հետազոտվել և պարզաբանվել են սինթեզված նոր պեպտիդների կառուցվածքը և դիաստերեոմերային մաքրությունը:
3. Ցույց է տրվել, որ BOC-պեպտիդների ստացման գործընթացում ռացեմիզացում տեղի չի ունենում, իսկ N-For-պեպտիդների սինթեզի ժամանակ պեպտիդի կառուցվածքի մեջ հիմնային բնույթի ոչ սպիտակուցային ամինաթթու ներմուծելու դեպքում (օրինակ, β -[4-ալիլ-3-(պիրիդին-3'-իլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանին, β - β -հիդրօքսիլեյցին) նկատվում է մասնակի ռացեմիզացում: Ստացված դիաստերեոմեր պեպտիդների կառուցվածքը և կոնֆիգուրացիան բնութագրվել են ՄՄՌ- սպեկտրոփոսկան անալիզի եղանակով:
4. Հետազոտությունների արդյունքում սինթեզված նոր միացությունների շարքում բացահայտվել են սերինային պրոտեազներին (տրիպսինի և պրոտեինազ K-ի) ճնշող (կամ արգելակիչ) միացություններ: Դրանք են՝ (S)- β -[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանինը, (S)- β -[4-ալիլի-3-բենզիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանինը, N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)- β -[4-ալիլի-3-(2'-մետօքսիֆենիլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանինը, N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)- β -[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանինը, N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)- β -[4-ալիլի-3-պրոպիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանինը, N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)- β -[4-ալիլի-3-(2'-մետօքսիֆենիլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանինը, N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)- β -[4-ալիլի-3-(2'-քլորֆենիլ)-5-թիօքս-1,2,4տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանին:
5. Սինթեզված նոր պեպտիդների և ելանյութ հանդիսացող ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների շարքում բացահայտվել են նաև պրոտեինազ K ֆերմենտի ակտիվությունը խթանող միացություններ: Դրանք են՝ (S)- β -[4-ալիլի-3-պիրիդին-3'-իլ]-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանինը, N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)- β -[4-պրոպիլ-3-բութիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանինը, N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնիլ-(S)- β -[4-ալիլի-3-(ֆուրան-2-իլ)-5-թիօքս-1,2,4տրիազոլ-1-իլ]- α -ալանին:

6. Համակարգչային դրքինգ անալիզի միջոցով ցույց է տրվել, որ սինթեզված միացություններից ոչ մեկը չի փոխազդում պրոտեինազ K-ի հետ, բայց դրանցից որոշները կարող են ազդել նրա ակտիվության վրա: Ցույց է տրվել նաև, որ նշված միացությունների գերակշռող մասը կարող է փոխազդել տրիպսինի հետ ճնշելով կամ խթանելով նրա ակտիվությունը:

Ատենախոսության հիմնական արդյունքները տպագրված են հետևյալ աշխատանքներում

1. Danghyan Yu. M., **Sargsyan T.O.**, Jamgaryan S.M., Gulumyan E.A. Saghayan A.S. *Synthesis of peptides based on nonprotein α -amino acids* // State-of the-Art Biotechnology in Armenia & ISTC contribution, Tsakhadzor, Republic of Armenia, September 28- October 02, **2008**, p. 116.
2. Ю.М. Дангян, **Т.О. Саргсян**, С.М. Джамгарян, Е.А. Гюлумян, Г.А. Паносян, А.С. Сагян. *Синтез новых аналогов хемотактических пептидов с использованием небелковых аминокислот* // Хим. журн. Армении, **2010**, т. 63, № 3, с. 385-393.
3. Ю.М. Дангян, **Т.О. Саргсян**, С.М. Джамгарян, Э.А. Гюлумян, Г.А. Паносян и А.С. Сагян *Синтез производных ди- и трипептидов, содержащих оптически активные небелковые аминокислоты α -аллилглицина и β -(N-имидазол)аланина*// Хим. журн. Армении, **2010**, т. 63, № 1, с. 95-100.
4. **Т.О. Саргсян** *Синтез N-формилди- и трипептидов с использованием (S)- β -(4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)- α -аланина и изучение их влияния на активность сериновых протеаз*// Хим. журн. Армении, **2011**, т. 64, № 4, с. 518-523.

САРГСЯН ТАТЕВИК ОГАНЕСОВНА

Синтез ди- и трипептидов, содержащих функционально-замещенные небелковые α -аминокислоты и их влияние на активность сериновых протеаз

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: ди- и трипептиды, небелковая аминокислота, активированный эфир, рацемизация, ингибитор, трипсин, протеиназа К.

Диссертационная работа посвящена синтезу ди- и трипептидов, содержащих небелковые аминокислоты, и исследованию влияния полученных пептидов на активность трипсина и протеиназы К. Работа выполнена в лаборатории пептидного синтеза НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Первый этап работы заключался в разработке методик получения хемотактических пептидов – N-формил-(S)-метионилглицина, N-формил-(S)-метионил-(S)-аланина, N-формил-(S)-метионил-(S)-лейцина, N-формил-(S)-метионил-(S)-фенилаланина и N-формил-(S)-метионил-(S)-влайна,

которые в дальнейшем использовались в качестве исходных соединений. Синтез хемотактических пептидов, осуществленный методом активированных эфиров (N-оксисукцинимидный эфир), не приводит к образованию побочных продуктов рацемизации.

Следующим этапом работы явился синтез методом активированных эфиров ди- и трипептидов. Синтез проводился на базе N-формил-(S)-метиона и BOC-(S)-аланина, с участием энантиомерно-чистых небелковых аминокислот – (S)- и (R)- α -аллилглицинов, (S)- и (R)- β -имидазол- α -аланинов, (S,R)- и (R,S)- β -гидроксилейцинов, (S)- и (R)- β -(N-бензиламино)- α -аланинов и (S)- β -[4-аллил-3-пропил-, (S)- β -[4-фенил-3-пропил-, (S)- β -[4-аллил-3-(2'-хлорфенил)-, (S)- β -[4-аллил-3-(2'-метоксифенил)-, (S)- β -[4-аллил-3-бензил-, (S)- β -[4-аллил-3-(фуран-2-ил)-, (S)- β -[4-аллил-3-пиридин-3'-ил)-, (S)- β -[4-пропил-3-бутил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланинов. Отработаны способы выделения и очистки целевых пептидов, зависящие, в основном, от характера групп входящих в состав небелковых аминокислот. Использование метода ЯМР («Центр исследования строения молекул» НАН РА) и адсорбционной колоночной хроматографии позволило получить данные о диастереомерной чистоте полученных пептидов. Выяснилось, что применение трет-бутилоксикарбонильной защитной группы обеспечивает получение диастереомерно-чистых продуктов, а при использовании формильной группы, в случаях использования аминокислот основного характера - (S,R)- и (R,S)- β -гидроксилейцинов и (S)- β -[4-аллил-3-(пиридинил-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланина, наблюдалась частичная рацемизация до ~15%. Во-втором случае, явление частичной рацемизации было подтверждено встречным синтезом с использованием N-формил-(R)-метионина.

В рамках выполненной диссертационной работы получено и охарактеризовано 34 ди- и трипептида, а так же N-формил-(S)- и N-формил-(R)-метионины.

Заключительным этапом работы явилось исследование влияния пептидов и исходных аминокислот на активность сериновых протеаз. Исследования проведены вначале с помощью компьютерных программ (Docking analyse) моделированием взаимодействия лиганда с белком. В результате моделирования выяснено, что большинство исследованных соединений образуют комплексы с трипсином, но не взаимодействуют с протеиназой К.

Затем опытным путем было показано влияние аминокислот и пептидов на активность сериновых протеаз. Показано, что следующие соединения: (S)- β -[4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин, (S)- β -[4-аллил-3-бензил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин, N-формил-(S)-метионил-(S)- β -[4-аллил-3-(2'-метоксифенил)-5-тиоксо-1,2,4-

триазол-1-ил]- α -аланин, N-формил-(*S*)-метионил-(*S*)- β -[4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин, N-формил-(*S*)-метионил-(*S*)- β -[4-аллил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин, N-формил-(*S*)-метионил-(*S*)- β -[4-аллил-3-(2'-хлорфенил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин, оказывают ингибирующее действие на активность трипсина и протеиназы К.

Выявлены также соединения увеличивающие протеолитическую активность протеиназы К – (*S*)- β -[4-фенил-3-(пиридин-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин, N-формил-(*S*)-метионил-(*S*)- β -[4-пропил-3-бутил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин, N-формил-(*S*)-метионил-(*S*)- β -[4-аллил-3-(фуран-2-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин.

По теме диссертационной работы опубликовано 4 работы (из них 1 тезис).

TATEVIK SARGSYAN

SYNTHESIS OF DI- AND TRIPEPTIDES CONTAINING FUNCTIONALLY-SUBSTITUTED NONPROTEINOGENIC α -AMINO ACIDS AND THEIR EFFECT ON ACTIVITY OF SERRINE PROTEASES

SUMMARY

Key words: di- and tripeptides, nonproteinogenic amino acid, activated ester, racemization, inhibitor, trypsin, proteinase K

The thesis is devoted to the synthesis of di- and tripeptides containing nonproteinogenic amino acids and study of the effect of the synthesized peptides on activity of trypsin and proteinase K. The work was carried out in the laboratory of peptide synthesis of the Scientific and Production Center "Armbiotechnology" of the National Academy of Sciences, RA.

The first stage of work was to develop methods for production of chemotactic peptides - N-For-(*S*)-Met-Gly, N-For-(*S*)-Met-(*S*)-Ala, N-For-(*S*)-Met-(*S*)-Le and N-For-(*S*)-Met-(*S*)-Phe that were later on used as initial compounds. Synthesis of chemotactic peptides conducted by the methods of activated esters (N-oxysuccinimide ester) did not lead to formation of by-products of racemization.

As the next stage of work appeared synthesis by the method of activated esters based on N-For-(*S*)-Met and BOC-(*S*)-Ala, di- and tripeptides with involvement of enantiomerically pure nonproteinogenic amino acids - (*S*)- and (*R*)- α -allyl-Gly, (*S*)- and (*R*)- β -imidazolyl- α -Ala, (*S,R*)- and (*R,S*)- β -hydroxy-Leu, (*S*)- and (*R*)- β -(N-benzylamino)- α -Ala and (*S*)- β -[4-allyl-3-propyl-, (*S*)- β -[4-phenyl-3-propyl-, (*S*)- β -[4-allyl-3-(2'-chlorophenyl)-, (*S*)- β -[4-allyl-3-(2'-

metoxy-phenyl)-, (*S*)- β -[4-allyl-3-benzyl-(*S*)- β -[4-Allyl-3-(furan-2-yl)-, (*S*)- β -[4-allyl-3-pyridin-3'-yl)-, (*S*)- β -[4-propyl-3-butyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -Ala. The methods for isolation and purification of target peptides have been elaborated. They were shown to depend mainly on the character of groups constituting the composition of nonproteinogenic amino acids. The NMR method (performed at the "Molecule Structure Research Center" under the RA National Academy of Sciences) and the method of adsorption column chromatography enabled to obtain data concerning diastereomeric purity of the synthesized peptides. It was ascertained that involvement of tert-butylloxycarbonyl protecting group ensured obtaining of diastereomerically pure products without racemization. And involvement of the formyl group in case of using amino acids of basic nature (*S,R*)- and (*R,S*)- β -hydroxy-Leu and (*S*)- β -[4-allyl-3-pyridin-3'-yl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -Ala resulted in partial racemization up to ~15%. In the second case the occurrence of partial racemization was confirmed by counter synthesis with involvement of N-For (*R*)-Met.

In the framework of the performed thesis 34 di- and tripeptides, as well as N-For-(*S*)-Met and N-For-(*R*)-Met have been obtained and characterized.

The final stage of work was devoted to study of the influence of peptides and initial amino acids on activity of serine proteases. The investigations were first carried out by means of computer programs (Docking analysis) through modeling the interaction of ligand with protein. Modeling revealed that the major part of the investigated compounds formed complexes with trypsin but they did not interact with proteinase K.

The effect of amino acids and peptides on activity of serine proteases was shown then experimentally. It was shown that the following compounds (*S*)- β -[4-phenyl-3-propyl-5-tioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -Ala, (*S*)- β -[4-allyl-3-benzyl-5-tioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -Ala, N-For-(*S*)-Met-(*S*)- β -[4-allyl-3-(2'-metoxphenyl)-5-tioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -Ala, N-For-(*S*)-Met-(*S*)- β -[4-phenyl-3-propyl-5-tioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -Ala, N-For-(*S*)-Met-(*S*)- β -[4-allyl-3-propyl-5-tioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -Ala, N-For-(*S*)-Met-(*S*)- β -[4-allyl-3-(2'-chlorphenyl)-5-tioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -Ala had inhibiting effect on activity of trypsin and proteinase K.

The compounds increasing proteolytic activity of proteinase K have also been revealed. They are (*S*)- β -[4-phenyl-3-(pyridin-3'-yl)-5-tioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -аланин, N-For-(*S*)-Met-(*S*)- β -[4-propyl-3-butyl-5-tioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -Ala, N-For-(*S*)-Met-(*S*)- β -[4-allyl-3-(furan-2-yl)-5-tioxo-1,2,4-triazol-1-yl]- α -Ala.

4 papers (including 1 abstract) have been published on the subject of the thesis.