



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

ДЕПАРТАМЕНТ ПО ХИМИЧНИ НАУКИ

КАТЕДРА „ОРГАНИЧНА ХИМИЯ”

инж. Александра Делчева Калистратова

**Модифициране свойствата на биологично активни пептиди:
Нови приложения на реакцията за *O-N* трансфер на ацилна
група и димеризация на незащитени пептиди**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен „доктор”

по научна специалност 4.2. Химически науки

(Органична химия)

Научни ръководители: проф. д-р Емилия Найденова
проф. д-р Жил Сюбра

Научно жури:

1. Доц. д-р Данчо Даналев - председател
2. Чл. кор. проф. Илия Рашков - рецензент
3. Проф. д-р Борис Шивачев - рецензент
4. Проф. д-р Жил Сюбра
5. Д-р Мюриел Амблар

София, 2015

Дисертационният труд е написан на 110 страници, съдържа 69 фигури и 19 схеми. Цитирани са 107 източника.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на разширен катедрен съвет съвет на научното звено на катедра „Органична химия”, състояло се на 11.11.2015 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 11.01.2016 г. от 16:00 часа в зала 424, сграда „А” на ХТМУ.

Материалите са на разположение на интересувашите се на интернет страницата на ХТМУ и в отдел „Научни дейности”, стая 406, етаж 4, сграда „А” на ХТМУ.

Използвани съкращения	4
Въведение	5
I. Цел и задачи на дисертацията.....	7
II. Експериментална част.....	9
II.1. Проучване възможностите за синтез на 1,4-дiazepин-2,5-диони чрез O-N трансфер на ацилна група.....	9
II.1.1. Синтез в разтвор.	10
II.1.1.1. Псевдо дипептид 1: синтез и резултати.....	10
II.1.1.1.а) Ацилиране по DIC/DMAP методът.....	10
II.1.1.1.б) Ацилиране по Boc ₂ O/Pyr/DMAP методът.	12
II.1.1.1.в) Циклизация/циклизиране.	13
II.1.1.2. Псевдо дипептид 2: синтез и резултати.....	13
II.1.2. Твърдофазен синтез.....	15
II.1.2.1. Твърдофазен синтез върху пипеколинова смола.....	16
II.1.2.1.а) Ацилиране по DIC/DMAP методът.....	17
II.1.2.1.б) Ацилиране в присъствието на Fmoc-βAla-Bt и DIEA	18
II.1.2.2. Твърдофазен синтез върху 2-Cl-третилна смола.....	19
II.2. Синтез на пептиди с i,i+3 вътрешномолекулен мост чрез O-N трансфер на ацилна група	23
II.2.1. Синтез на структурната единица, необходими за осъществяване на O-N ацил трансфера: Fmoc-Dap(Boc-Ser)-OH, (Fmoc-Bb-OH).	24
II.2.2. Синтез на пептид с i,i+3 вътрешномолекулен мост.....	25
II.2.2.1. Синтез на O-ацил изопептид с i,i+3 вътрешномолекулен мост	25
II.2.2.1.а) Ацилиране по DIC/DMAP методът.....	26
II.2.2.1.б). Ацилиране в присъствието на EDC/HOBt/DIEA.....	26
II.2.2.1.в). Ацилиране по Boc ₂ O/DMAP методът	27
II.2.2.1.г) Ацилиране в присъствието на DIC/HOBt/DMAP	28
II.2.2.2. Синтез на N-ацил пептид с i,i+3 вътрешномолекулен мост	28
II.3. Димеризация на незащитени пептиди	30

II.3.1. Димеризация на незащитени пептиди чрез 1,3-диполярно циклоприсъединяване на органични азида и алкини	30
II.3.2. Димеризация на незащитени чрез образуване на силоксанови връзки	31
II.3.2.1 N-крайна димеризация на пептид WTr53 и аналог на GHRP-6.....	32
II.3.2.1.а) N-крайна димеризация на пептид WTr53	33
II.3.2.1.б) N-крайна димеризация на аналог на GHRP-6	35
II.3.2.2. Димеризация с участието на страничната верига: димер на аналог на GHRP-6	36
II.3.2.3. С-крайна димеризация на аналог на GHRP-6	38
III. Изводи.....	40
IV. Приноси на дисертационния труд.....	41
Публикации, свързани с темата на дисертацията	42
Участия в международни и национални научни форуми	42
Използвана литература	43

Използвани съкращения

Съкращенията на всички аминокиселини са според приетите съкращения по IUPAC.

All	Алил
Alloc	Алилоксикарбонил
Bb	Building block
Boc	Третичен бутилоксикарбонил
Boc₂O	Вос анхидрид
BOP	Бензотриазол-1-ил-N-окси-фосфониев хексафлуорофосфат
Bzl	Бензил
DCM	Дихлорометан
DIC	<i>N,N'</i> -диизопропилкарбодиимид
DIEA	<i>N,N'</i> -диизопропилетиламин
DMAP	4-диметиламинопиридин
DMF	<i>N,N</i> -диметилформаид
EDC	1-етил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид
Eq	Еквивалент
Fmoc	9-флуоренилметилоксикарбонил
HOBT	1-хидроксибензотриазол
HPLC	Високоэффективна течна хроматография
IBCF	Изобутилхлороформат
Me	Метил
MeOH	Метанол
m/z	маса върху заряд
NMM	<i>N</i> -метилморфолин
PBS	Фосфатен буфер физиологичен разтвор
Pyr	Пиридин
tBu	третичен бутил
TFA	Трифлуорооцетна киселина
TFE	2,2-трифлуороетанол
THF	Тетрахидрофуран
TIS	Триизопропилсилан
Trt	Тритил (трифенилметил)
Z	Бензилоксикарбонил

Въведение

През последните години броят на одобрените лекарства, произведени от фармацевтичната промишленост, е намалял значително поради сериозните недостатъци на двете основни категории лекарства - малки молекули и протеинови терапевтични средства. Въпреки тяхната наличност като перорални препарати, стабилни и способни да проникват през мембраната, на малките молекули им липсва селективност, което води до натрупване в специфични органи, причинявайки някои токсични странични ефекти.

От друга страна, протеините се отличават с висока специфичност на действие, но ниска бионаличност, лоша мембранна пропускливост и нестабилност срещу ензимно разграждане. В резултат на това много усилия са насочени към синтеза и изследването на нови лекарствени средства, които се вписват между тези две категории, съчетаващи техните предимствата. ^{[1],[3]}

Напоследък интересът към пептидите като такива потенциални лекарствени средства е възобновен и се увеличава постоянно.^[2] По литературни данни лекарства на пептидна основа (включително и модифицирани пептиди) са приложени успешно при лечението на различни болести като рак на гърдата и рак на простатата (Goserelin познат още като Zoladex – аналог на гонадотропин-освобождаващия хормон, Plenaxis, Eligard, Enantone, Lucrin, Depot, и др.), диабет тип 1 и 2 (Symlin и Victoza), СПИН/ХИВ-1 инфекции (Fuzeon)^[4], множествена склероза (Copaxone), невроендокринни тумори (синтетични аналози на соматостатин, като Sandostatin и Somatuline), и други. ^{[1],[3]}

Пептидите могат да се разглеждат като молекули, които притежават свойствата на протеините да се свързват с определена специфична област, но са значително по-малки.

Освен това, те могат да бъдат получени чрез химичен синтез за разлика от протеините. В допълнение, през последните десетилетия пептидният синтез бе оптимизиран и подобрен, което ги прави по-лесни и по-евтини за получаване. Пептидите са по-малко имуногенни и проникват по-лесно в органите или туморите в сравнение с протеините. Освен това те са нетоксични за разлика от малките молекули. Обяснение на липсата на токсичност е фактът, че пептидите се разграждат до аминокиселини, които не представляват опасност за човешкото тяло. През последните десетилетия най-разпространеният и често използван метод за пептиден синтез е твърдофазният пептиден синтез, въведен за първи път от Мерифийлд през 60-те години.^[5] Първата аминокиселина се свързва към твърд полимерен носител (т.н. смоли), образувайки ковалентна връзка между карбонилната група и смолата (най-често чрез амидна или естерна връзка),

следвано от свързване чрез амидна връзка на останалите аминокиселини до получаване на желаната пептидна последователност. Последната стъпка се състои в отделяне на крайния пептид от смолата. Този метод позволява отстраняването на излишъка от реагенти при всеки етап от синтеза само чрез промиване и филтруване на смолата. По този начин се намалява значително времето, необходимо за получаването на пептида, а синтезите протичат обикновено с количествен добив.

Въпреки това пептидите до известна степен имат същите недостатъци като протеините - лоша бионаличност при орално приложение, кратък полуживот, причинен от тяхното бързо разграждане при контакт с ензими, бързо отстраняване от организма, както и ниска мембранна пропускливост.

Във връзка с това през годините са разработени и оптимизирани различни стратегии за подобряване устойчивостта на ензимно разграждане, както и подобряване на мембранната пропускливост. Като примери от литературата могат да бъдат цитирани: получаването на циклични пептиди,^{[6],[7]} на псевдопептиди с модифициране на връзките за увеличава устойчивостта им на пептидазно разграждане и метаболитната им стабилност,^[7] както и пептиди с вътрешномолекулен мост с α -спираловидна структура за повишаване на структурната им стабилност.^{[8],[9]}

Някои пептиди са слабо разтворими, което може да бъде обяснено със склонността им към агрегация и образуване на вътрешно- и външно-молекулни водородни връзки, което пречи на разтворимостта. Тези пептиди с трудни аминокиселинни последователности са силно хидрофобни, което води до агрегация в разтворите, използвани при пептидният синтез и пречистването. Колективите на Кисо и Мютер са разработили метод за синтеза на подобни пептиди, основан на реакцията за *O-N* трансфер на ацилна група, което води до значителни подобрения на крайния добив.^{[10],[11]}

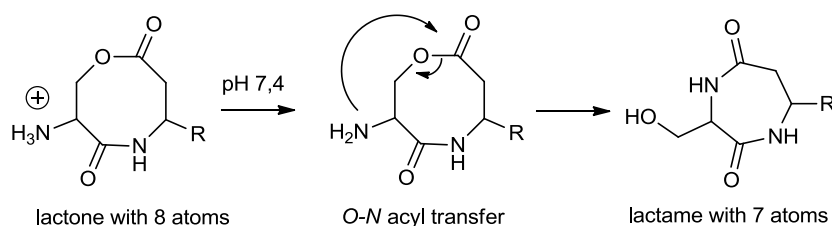
От друга страна, по литературни данни за подобряването на пептидната активност и стабилност е използвана реакцията на димеризация. Някои димери показват по-добри резултати при свързването с желаните цели от съответстващите им мономери. В литературата са описани димери на голям брой аналози на пептидни хормони^[12]: енкефалини^{[13],[14]}, серотонин^[15], брадикинин^{[16],[17]}, неврокинин^[18], субстанция P^[19], TGF- β ^[20]. Съвсем наскоро димеризация се прилага и към дизайна на инхибитори на протеин-протеинови взаимодействия.^[21]

I. Цел и задачи на дисертацията

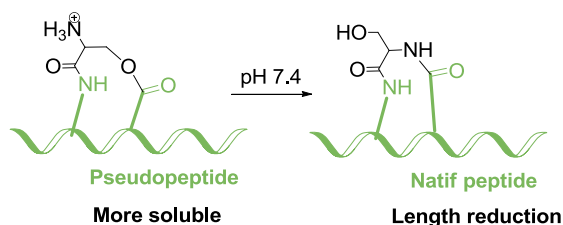
Целта на настоящата дисертация е изучаване на реакцията за *O-N* трансфер на ацилна група и на възможностите за нейното приложение в пептидния синтез, както и димеризация на незащитени пептиди.

За изпълнение на поставената цел си поставихме следните конкретни задачи:

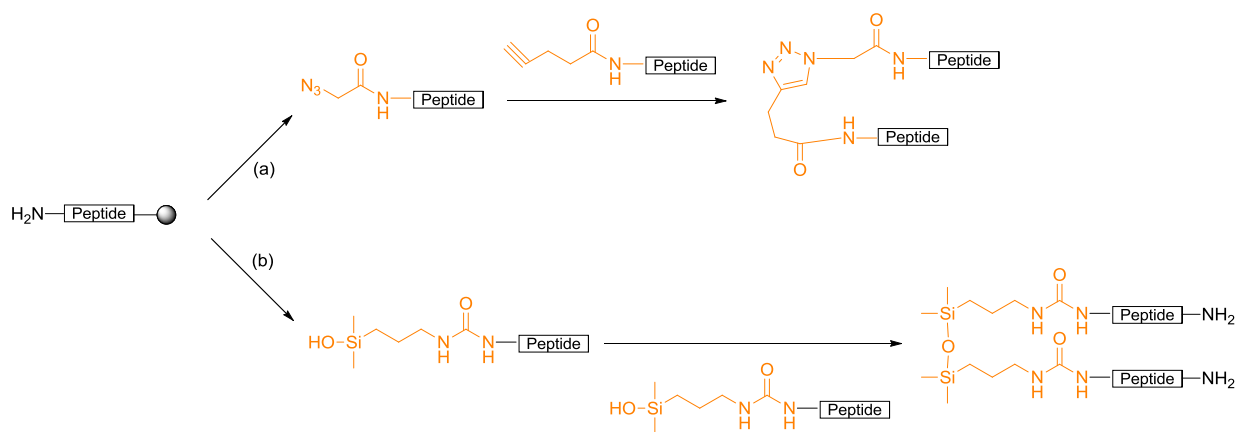
1. Синтез на 1,4-дiazепин-2,5-диони чрез *O-N* трансфер на ацилна група (Фиг. 1).
2. Синтез на пептиди с $i,i+3$ вътрешномолекулен мост чрез *O-N* трансфер на ацилна група (Фиг. 2).
3. Димеризация на незащитени пептиди чрез 1,3-диполярно циклоприсъединяване на органични азиди и алкини („клик” реакция) и чрез образуване на силоксанови връзки (Фиг. 3).
4. Пречистване и охарактеризиране на новосинтезираните пептидни аналози.



Фиг. 1. *O-N* трансфер на ацилна група за синтез на 1,4-дiazепин-2,5-диони чрез скъсяване на веригата от 8 на 7 атома.



Фиг. 2. *O-N* трансфер на ацилна група във физиологични условия за възстановяване на биологично активния изходен пептид.



Фиг. 3. Димеризация на незащитени пептиди чрез „клик” реакция (a) и чрез образуване на силоксанови връзки (b).

II. Експериментална част. Резултати и дискусия.

II.1. Проучване възможностите за синтез на 1,4-дiazепин-2,5-диони чрез O-N трансфер на ацилна група.

Както бе споменато в предишната глава, първата задача на настоящата работа бе синтез на малки циклични псевдо пептиди, 1,4-дiazепин-2,5-диони, като продължение на проведени в лабораторията от колеги изследвания.^[23]

Дiazепин-дионите са хетероциклични съединения, използвани за синтеза на конформационно запречени пептидомиметици. Това запречване би могло да доведе до подобряване биологичните свойства на молекулите, като например свързване с желаната цел или устойчивостта на пептида към ензимно разграждане.

В тази връзка първите ни усилия бяха насочени към синтез на 1,4-дiazепин-2,5-дионите от циклични псевдо дипептиди чрез реакцията за O-N трансфер на ацилна група, водеща до скъсяване на цикъла от 8 до 7 атома.

Общата стратегия се състои в синтез на псевдо дипептиди от α - и β -аминокиселини, вътрешномолекулна циклизация, деблокиране на **Вос**-амино защитната група в присъствие на TFA, и O-N трансфер на ацилна група във физиологична среда (**Схема 1**).

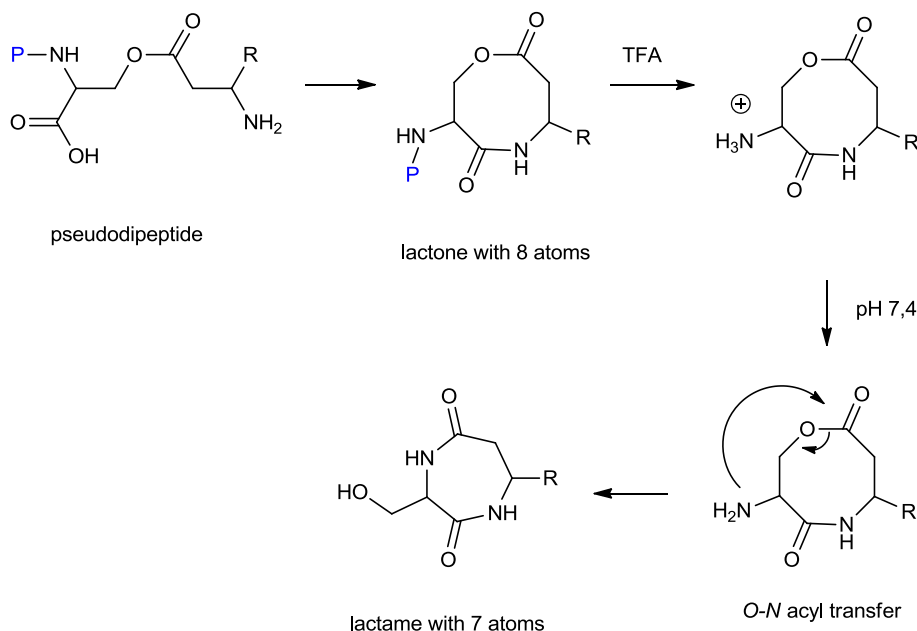


Схема 1. Обща схема за синтез на 1,4-дiazепин-2,5-диони.

Няколко методики бяха изследвани – синтез в разтвор и твърдофазен синтез.

II.1.1. Синтез в разтвор.

Бяха изследвани два моделни псевдо дипептида, съдържащи α - и β -аминокиселини:

- Псевдо дипептид 1: Boc-D- β -homoSer(H-Phe)-OH;
- Псевдодипептид 2: Boc-Ser(H- β Ala)-OH.

II.1.1.1. Псевдо дипептид 1: синтез и резултати.

Псевдо дипептид 1 беше синтезиран както е показано в **Схема 2**. Първата стъпка беше синтезирането на Boc-D- β -homoSer-OBzl чрез редукция на α -карбоксилната група на Boc-L-Asp(OBzl)-OH, което води до смяна на конфигурацията – от L към D (1). Следващата стъпка се състоеше в ацилиране с α -аминокиселината, Z-Phe-OH (2), следвана от деблокиране на **Z**- и **Bzl**-защитните групи (3). Последната стъпка бе опит за вътрешномолекулна циклизация (4), при което беше наблюдавана междумолекулна циклизация и образуването на съответния цикличен псевдо тетрапептид вместо очаквания цикличен псевдо дипептид.

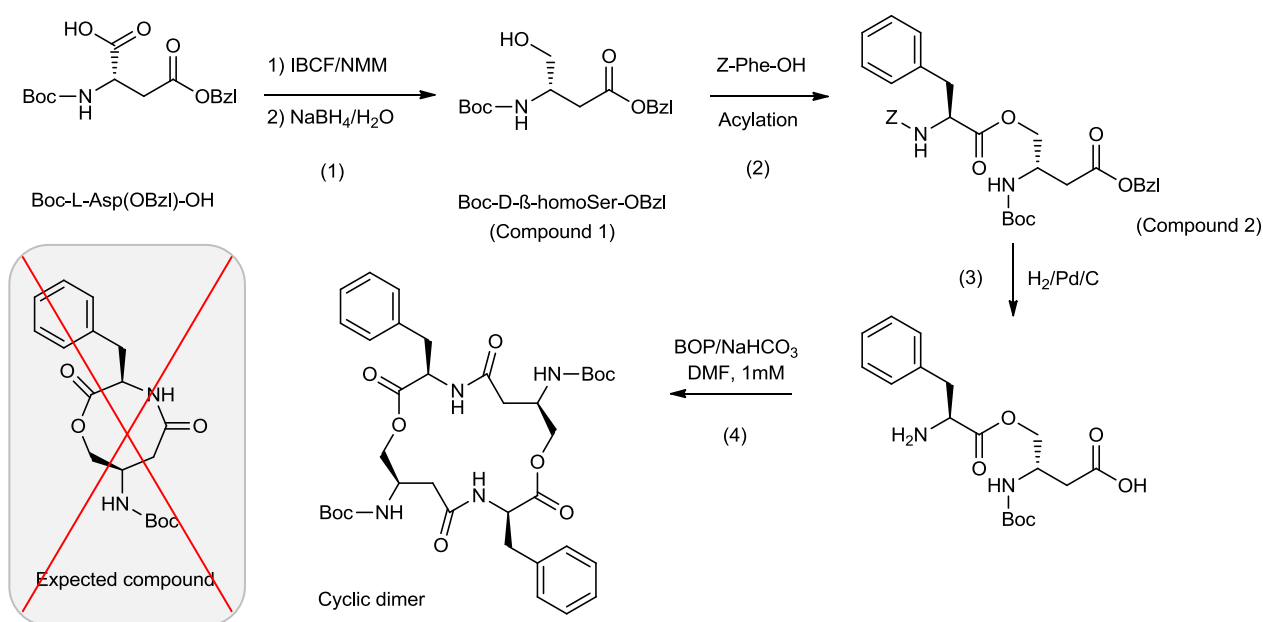


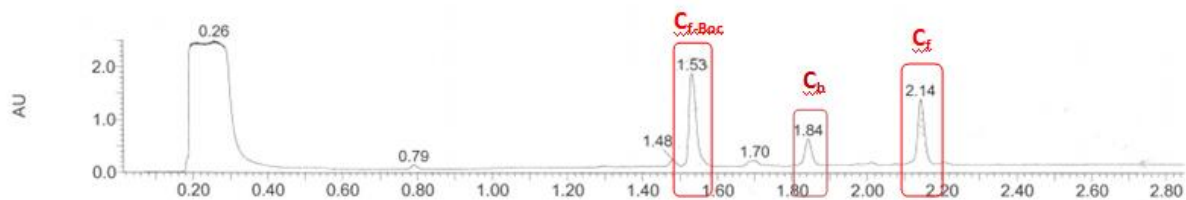
Схема 2. Синтез на Boc-D- β -homoSer(H-Phe)-OH, псевдо дипептид 1.

Бяха приложени два метода за ацилиране: DIC/DMAP и Boc₂O/Pyr/DMAP методите.

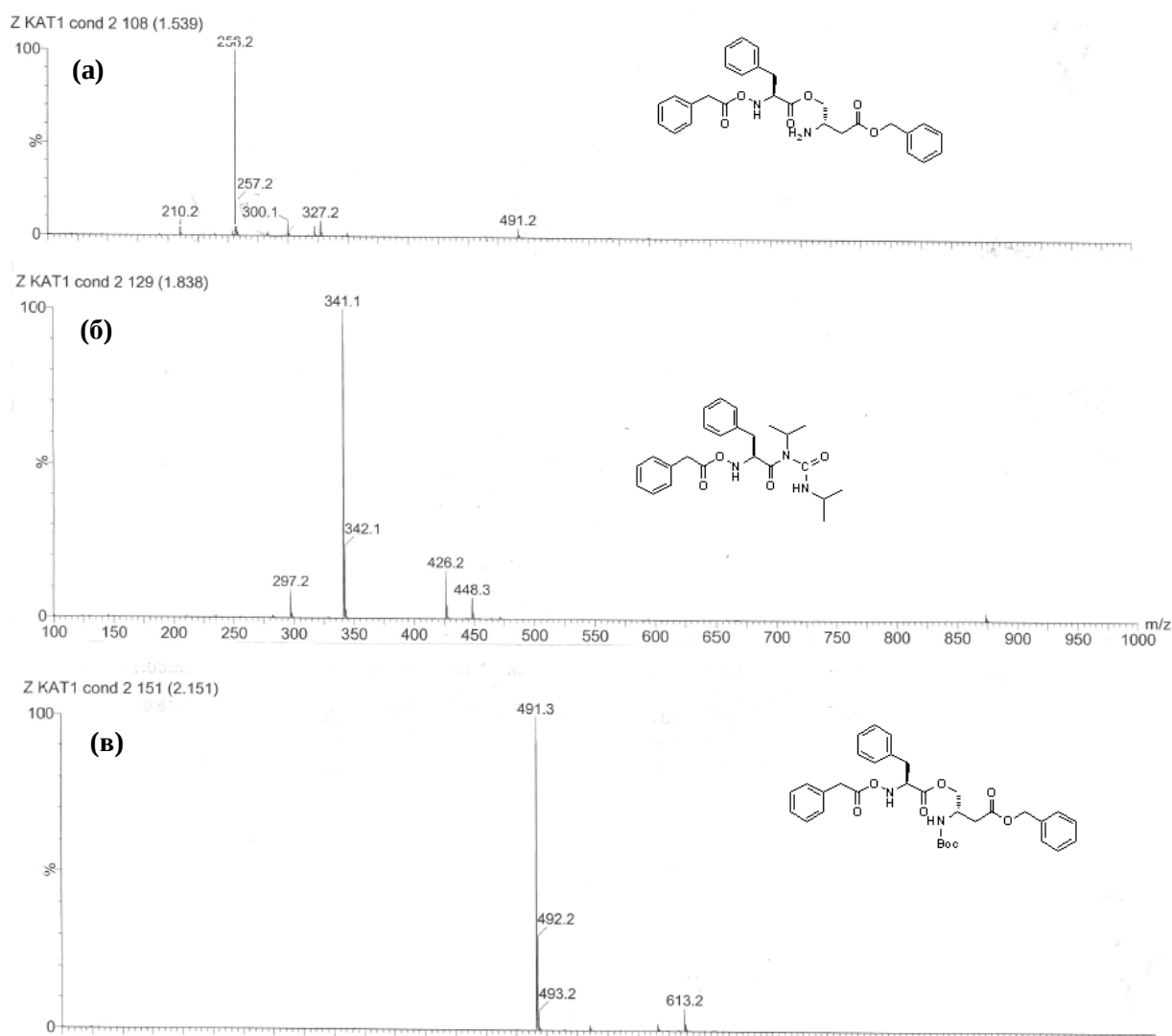
II.1.1.1.a) Ацилиране по DIC/DMAP методът.

Първият опит за ацилиране беше направен в присъствието на DIC/DMAP като ацилиращи реагенти. Реакцията беше следена чрез HPLC и LC/MS анализи. Мас-

спектрометричният анализ показва непълна естерификация, както и образуването на *N*-ацилкарбамид и деблокиране на *N*-**Boc**-групата на очакваното вещество като странични продукти (Фиг. 4, Фиг. 5 (a),(b),(c)).



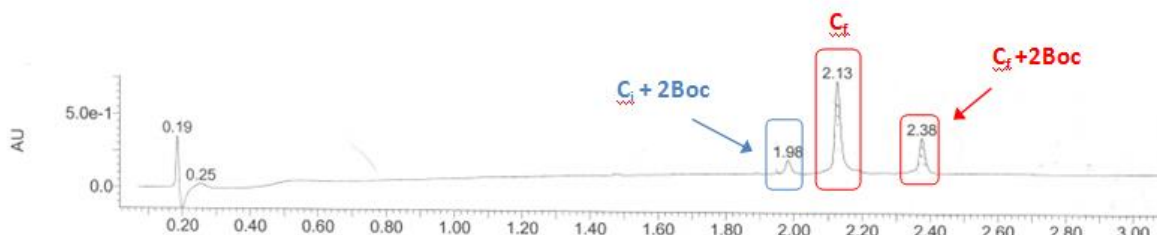
Фиг. 4. LC хроматограма на ацилиране с DIC/DMAP. C_{f-Boc} – очакван продукт без *N*-**Boc**-защитна групата (50%), C_b - *N*-ацилкарбамид (18%), C_f - очакван продукт (32%).



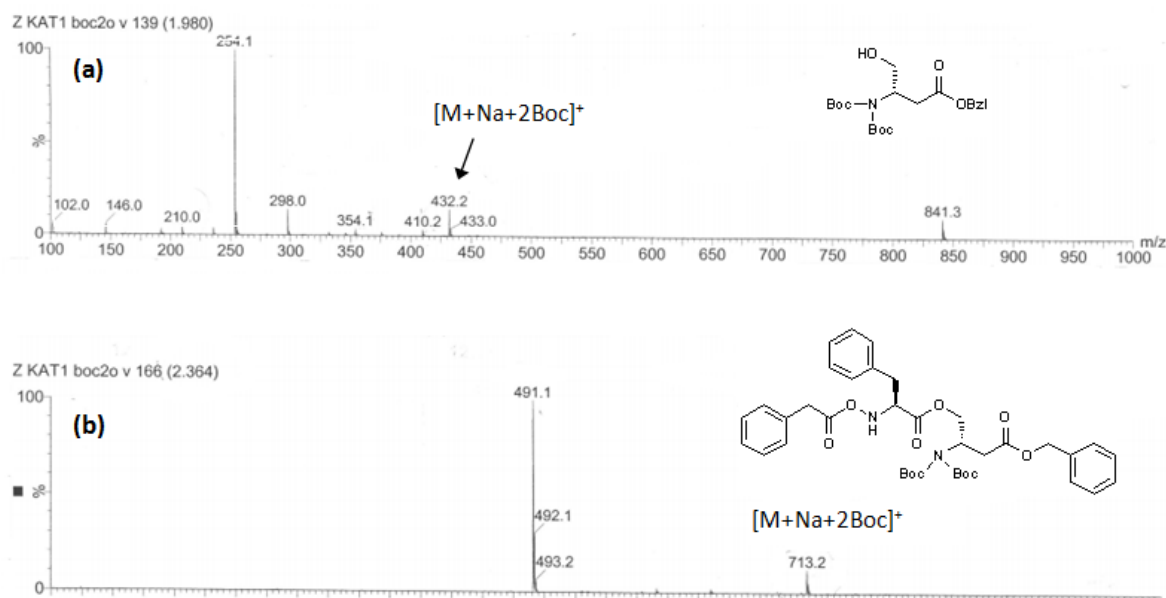
Фиг. 5. MS (ESI+) спектри на ацилиране с DIC/DMAP: (a) очакван продукт без *N*-**Boc**-защитна, (b) *N*-ацилкарбамид, (c) очакван продукт.

II.1.1.1.6) Ацилиране по Boc_2O /Pyr/DMAP методът.

При вторият опит за ацилиране DIC/DMAP бяха заменени с Boc_2O /Pyr/DMAP като ацилиращи реагенти. Реакцията беше следена чрез HPLC и LC/MS анализи. Мас-спектрометричният анализ показва образуването на други странични продукти: очакваното крайно вещество и изходното вещество с две **Boc**-защитни групи вместо една (7% и 25% съответно (Фиг. 6, Фиг. 7 (a),(b))).



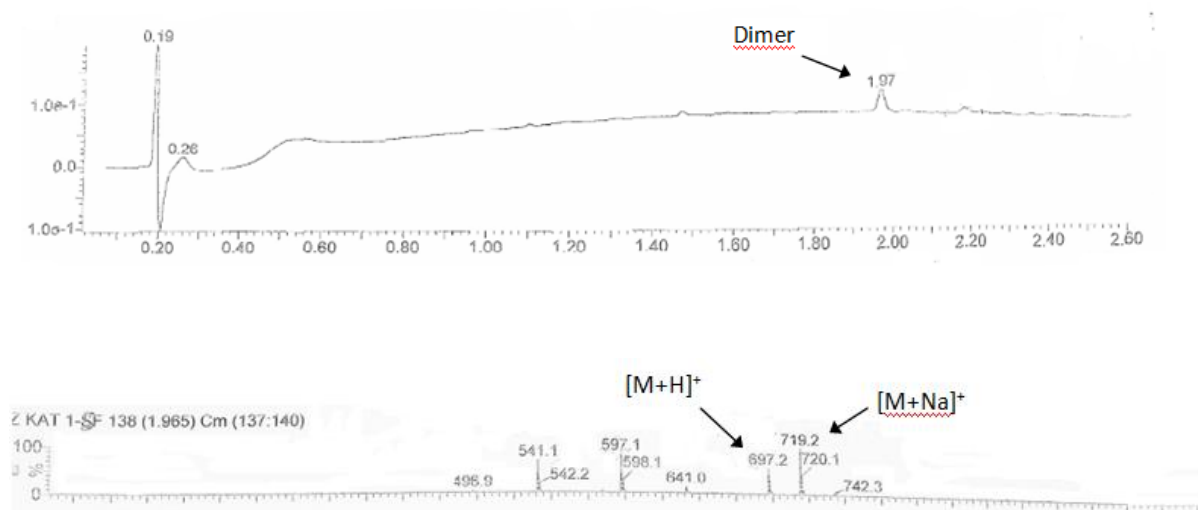
Фиг. 6. LC хроматограма на ацилирането с Boc_2O /Pyr/DMAP: C_i - Boc-D- β -homoSer-OBzl с две **Boc**-защитни групи (7%), C_f – очакван продукт (67%, **Compound 2**), $C_f+2\text{Boc}$ - очакван продукт с две **Boc**-защитни групи (25%).



Фиг. 7. MS (ESI+) спектри на ацилирането с Boc_2O /Pyr/DMAP: (a) Boc-D- β -homoSer-OBzl с две **Boc**-защитни групи, (b) очакван продукт с две **Boc**-защитни групи.

II.1.1.1.в) Циклизация/циклизиране.

Опитът за вътрешномолекулна циклизация беше осъществен в присъствието на $\text{BOP}/\text{NaHCO}_3$ като ацилиращи реагенти при 1mM концентрация в DMF. LC/MS спектрометричният анализ показва междумолекулна циклизация и образуването на съответния цикличен псевдо тетрапептид ($\text{MW} = 696,4 \text{ g/mol}$) вместо очаквания цикличен псевдо дипептид (Фиг. 8).



Фиг. 8. LC/MS анализ на циклизацията.

II.1.1.2. Псевдо дипептид 2: синтез и резултати.

Псевдо дипептид 2 беше синтезиран както е показано в Схема 3. Първата стъпка се състоеше в ацилирането между α -аминокиселината, Boc-Ser-OBzl, и β -аминокиселината, Z- β -Ala-OH по Boc₂O/Pyridine/DMAP методът (1) (Фиг. 9), следвана от деблокиране на Z- и Bzl-защитните групи (2). Последната стъпка бе опит за вътрешномолекулна циклизация (4). И тук също беше наблюдавана междумолекулна циклизация и образуването на съответния цикличен псевдо тетрапептид вместо очаквания цикличен псевдо дипептид (Фиг. 10).

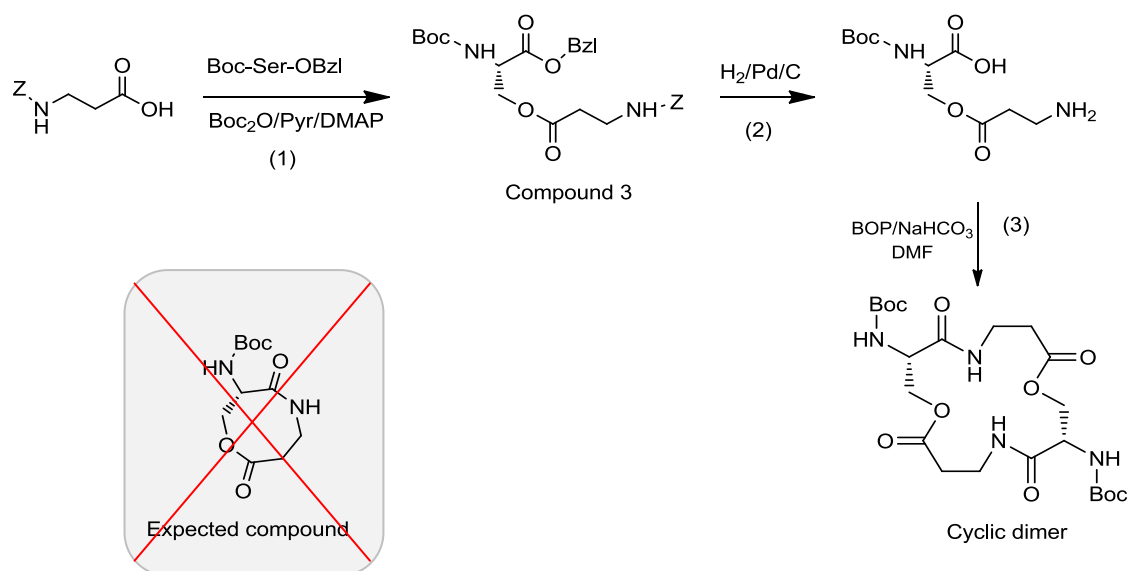
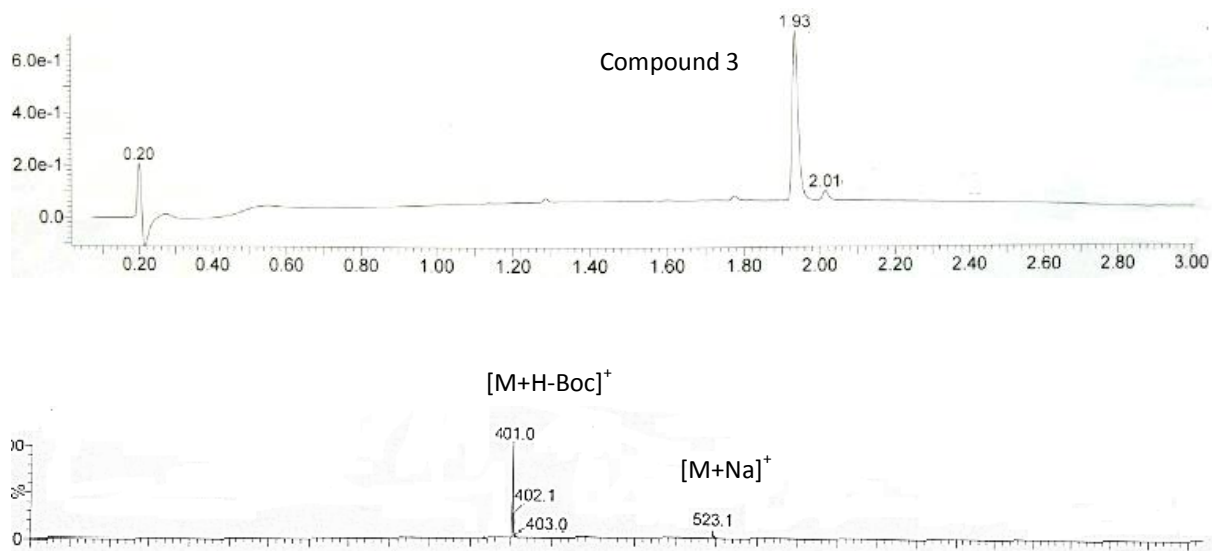
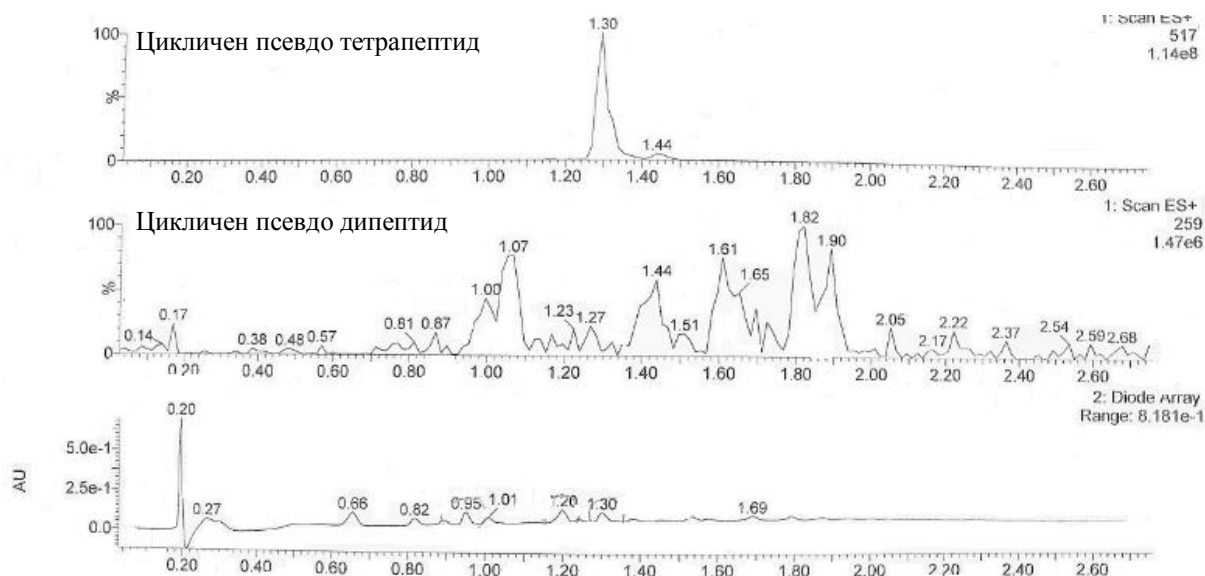


Схема 3. Синтез на Boc-Ser(H-βAla)-OH, псевдо дипептид 2.



Фиг. 9. LC/MS спектри на ацилирането с $\text{Boc}_2\text{O}/\text{Pyr}/\text{DMAP}$.



Фиг. 10. LC/MS (ESI+) спектри на циклизиращата стъпка: $[M+H]^+=259$ – молекулната маса на очаквания циклически псевдодипептид; $[M+H]^+=517$ – молекулната маса на получения циклически псевдотетрапептид.

Независимо от приложените методи, вътрешномолекулярна циклизация в разтвор не беше наблюдавана. Бе установено, че приложената стратегия за осъществяване на вътрешномолекулярна циклизация не води до желаните резултати и опитите за синтез в разтвор бяха преустановени.

II.1.2. Твърдофазен синтез.

Следващата ни стъпка беше да приспособим избраната стратегия към твърдофазния пептиден синтез с цел имитиране на разредена реакционна среда.

Общата схема за синтез е представена на **Схема 4.** и се състои в свързването на първата аминокиселина, H-Ser-OP, към твърдофазен носител, чрез свободната си аминогрупа, следвано от деблокиране на защитната група на карбоксилната функция и ацилиране (2) в подходящия според избраната за синтез стратегия ред. Следващите стъпки се състоят в деблокиране на N-*Fmoc*-защитната група (3.1), вътрешномолекулярна циклизация (3.2), отделяне на циклическия псевдодипептид от смолата в присъствието на TFA (4), и осъществяване на реакцията за O-N трансфер на ацилна група (5).

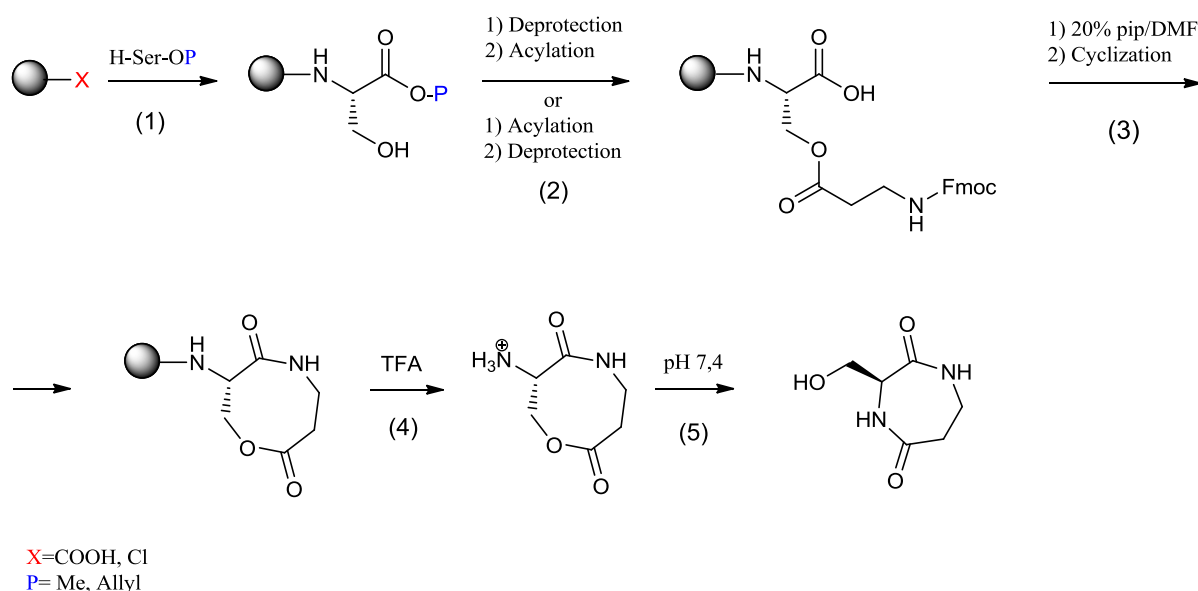
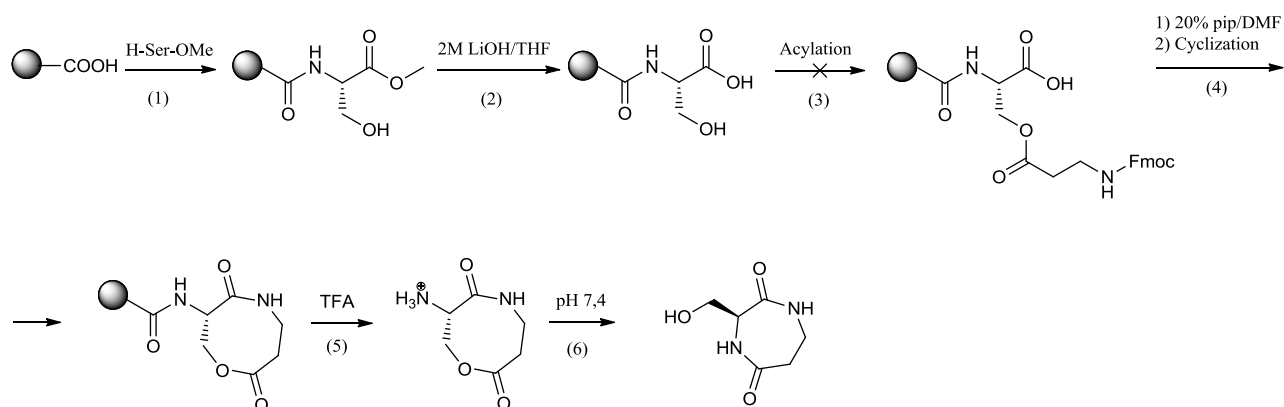


Схема 4. Обща схема за твърдофазен синтез на диазепин-диони от α Ser и β Ala.

За тази цел бяха използвани две смоли: 2-Cl-третилна смола и пипеколинова смола. Последната е разработена от колектив в лабораторията, в която са проведени експериментите по настоящата дисертационна работа.

II.1.2.1. Твърдофазен синтез върху пипеколинова смола.

Синтезът беше осъществен както е показано на **Схема 5**. и както е описано по-горе. HCl.H-Ser-OMe беше свързан към смолата в присъствието на BOP/DIEA в DMF (1). Смолата беше промита с DCM(x3), DMF (x3), DCM (x3) и изсушена под вакуум на стайна температура. Деблокирането на C-защитната група беше осъществено след хидролиза с LiOH/THF (2) на метиловия естер, следвано от ацилирането с предварително активираната карбоксилна група на Fmoc- β Ala-OH (3). Следващата стъпка беше опит за вътрешномолекулярна циклизация (4).



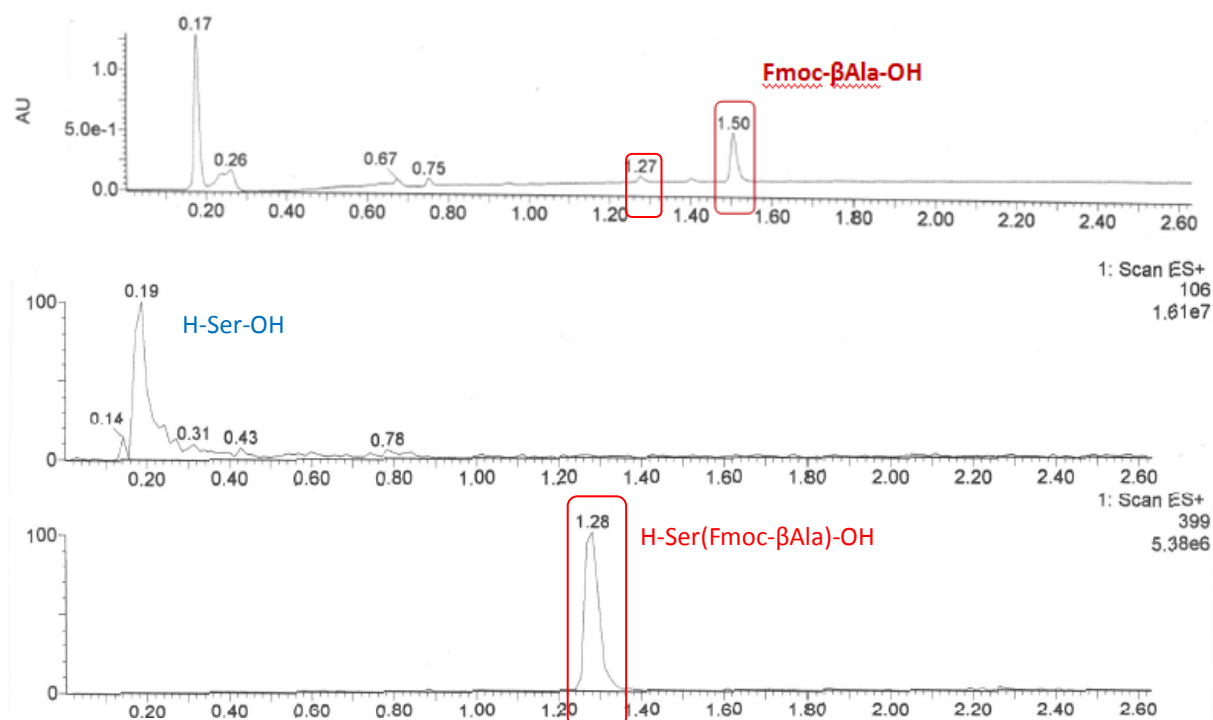
Acylation: DIC/DMAP, Fmoc-beta Ala-Bt, Boc₂O/DMAP

Схема 5. Синтез на цикличния псевдо дипептид върху пипеколинова смола.

Сблъскахме се със сериозни затруднения при ацилиращата стъпка. Различни стратегии за естерификация върху смолата бяха приложени с цел да намерим подходящия метод за осъществяване на тази така критична стъпка от нашия синтез.

II.1.2.1.a) Ацилиране по DIC/DMAP методът.

Ацилирането беше извършено в присъствието на DIC/DMAP. LC/MS анализът обаче показва само наличието на изходните вещества (Фиг. 11).



Фиг. 11. LC/MS (ESI+) спектри на ацилирането с DIC/DMAP.

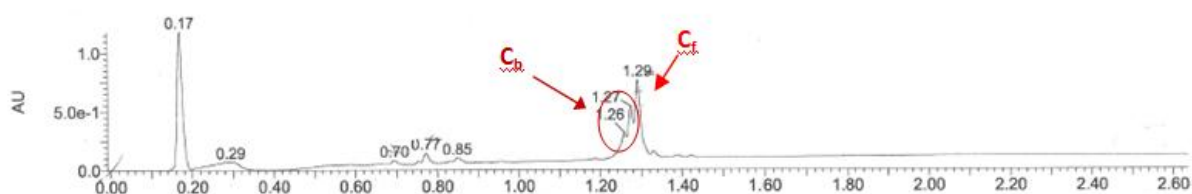
Тези резултати ни показаха две неща: първо, че има проблем със пипеколиновия линкер на смолата, и по-конкретно при стъпката на деблокиране, и второ, че естерификацията по този метод не се извършва.

Първият проблем може да бъде обяснен със същността на пипеколиновата смолата. При последната стъпка от приготвянето ѝ се прилага хидролиза с LiOH/THF за деблокиране на метиловата защитна група на пипеколиновата киселина. В нашия синтез, след свързването на серина към твърдофазния носител, използваме също обработка с LiOH за деблокиране на метиловата му защитна група, което е довело до допълнително деблокиране на пипеколиновия линкер. Анализите показаха, че в резултат на това има и свързване на Fmoc- β Ala-OH директно към смолата вместо към серина.

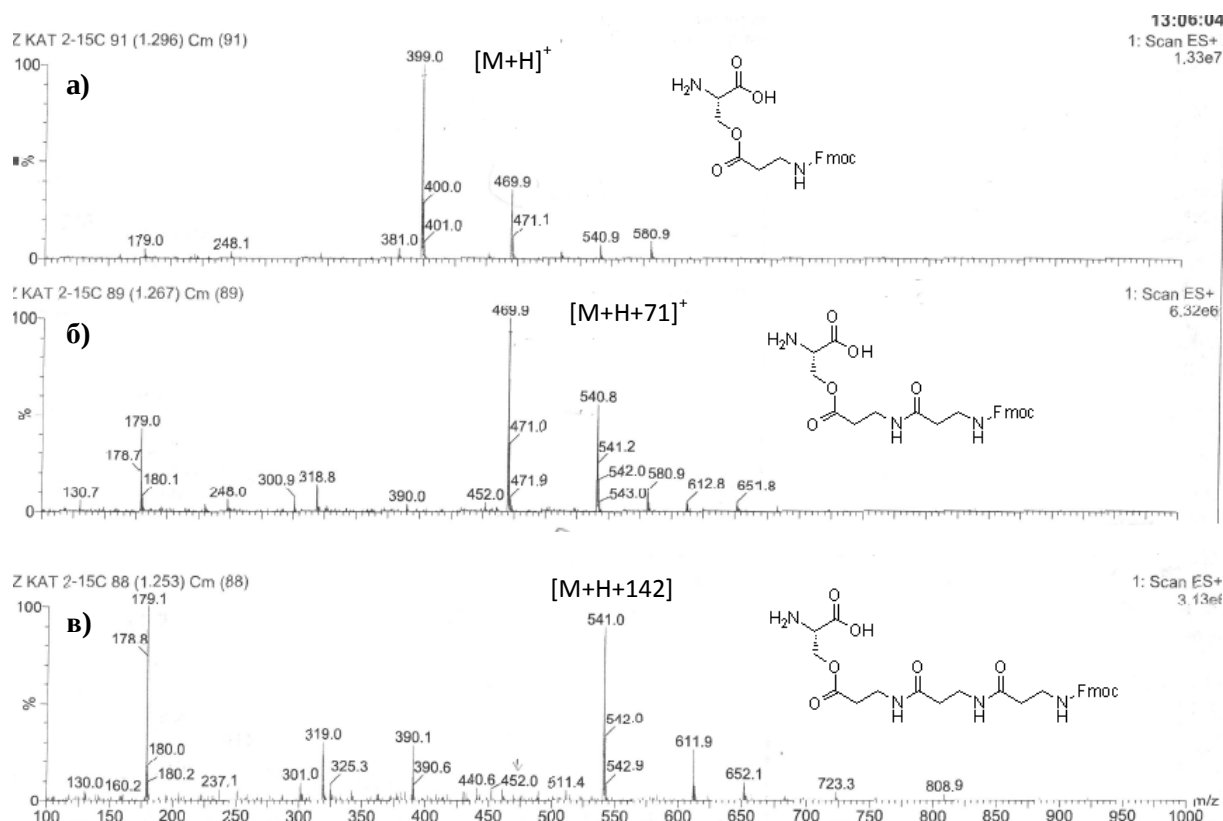
II.1.2.1.6) Ацилиране в присъствието на Fmoc- β Ala-Bt и DIEA .

Въпреки установените проблеми продължихме с опитите за намиране на ефикасен начин за ацилиране.

Използвахме Fmoc- β Ala-Bt (3 eq) в присъствието на DIEA (5 eq) и приложихме микровълнов синтез (30 мин. при 75°C, в DMF). Резултатите от LC/MS анализът показаха димеризация и полимеризация на β -аланина в резултат на деблокиране на **Fmoc**-защитната група по време на синтеза (Фиг. 12, Фиг. 13.а), б), в)).



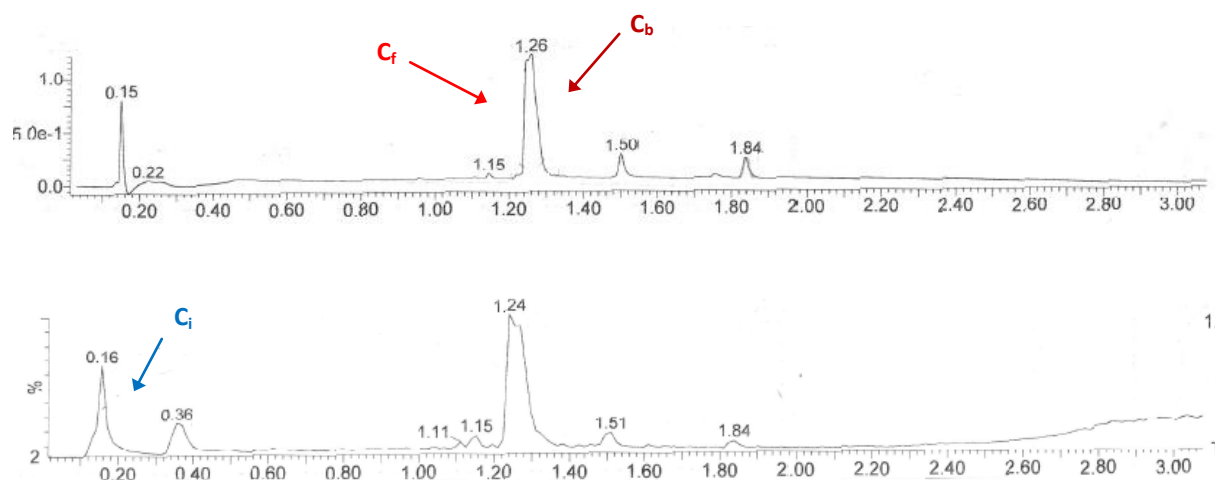
Фиг. 12. LC спектър на ацилирането с Fmoc- β Ala-Bt, C_f – очакван продукт, C_b – странични продукти, дължащи се на кондензирането между два и три β -аланини.

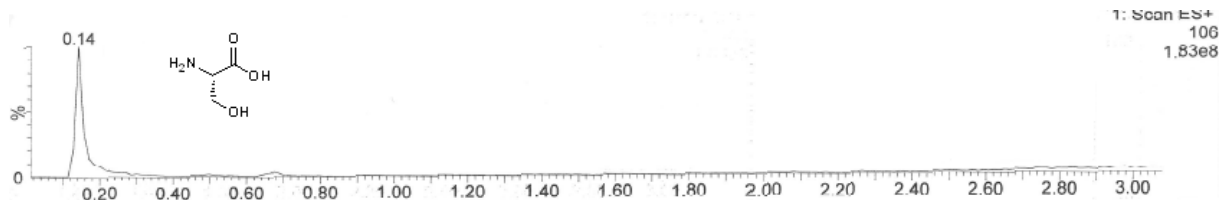


Фиг. 13. MS (ESI+) спектър на ацилирането с Fmoc- β Ala-Bt: **а)** очакван продукт, **б)** и **в)** странични продукти, дължащи се на кондензирането между два (**б)** и три (**в)** β -аланини.

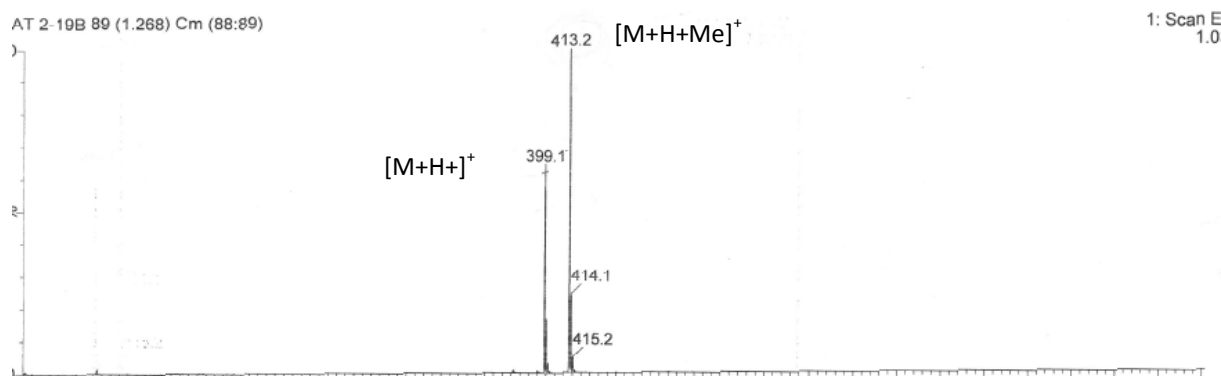
II.1.2.2. Твърдофазен синтез върху 2-Cl-тритилна смола.

Беше приложена същата стратегия като описаната в **Схема 5**. За ацилирането между серина и β -аланина бяха използвани Wsc_2O (1,1 eq)/DMAP (0,1 eq) като ацилиращи реагенти. LC/MS анализът показва наличието на три продукта: очакваното крайно вещество с и без метилова защитна група, и изходния серин (**Фиг. 14** и **Фиг. 15**).





Фиг. 14. LC спектри на ацилирането с $\text{Boc}_2\text{O}/\text{DMAP}$. **C_i** – H-Ser-OH, **C_f**- очакван продукт, **C_b** – очакван продукт с *Me*-защитна група (MW=412 g/mol).



Фиг. 15. MS (ESI+) спектър на ацилирането с $\text{Boc}_2\text{O}/\text{DMAP}$.

Тези резултати показаха непълна хидролиза при обработката с LiOH/THF . Тази стъпка беше повторена многократно, но пълна хидролиза не беше наблюдавана независимо от реакционното време. Това би могло да се обясни с пространствената запреченост на 2-Cl-тритил линкера.

За да избегнем проблемите, дължащи се на смолата, метиловата защитна група беше заменена с алилова, и синтезът беше осъществен както е показано на **Схема 6**.

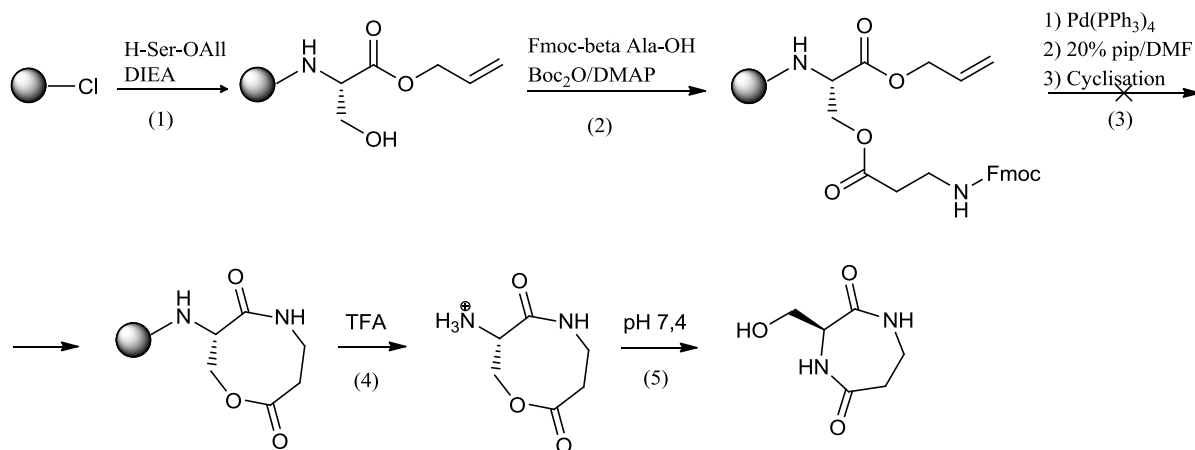
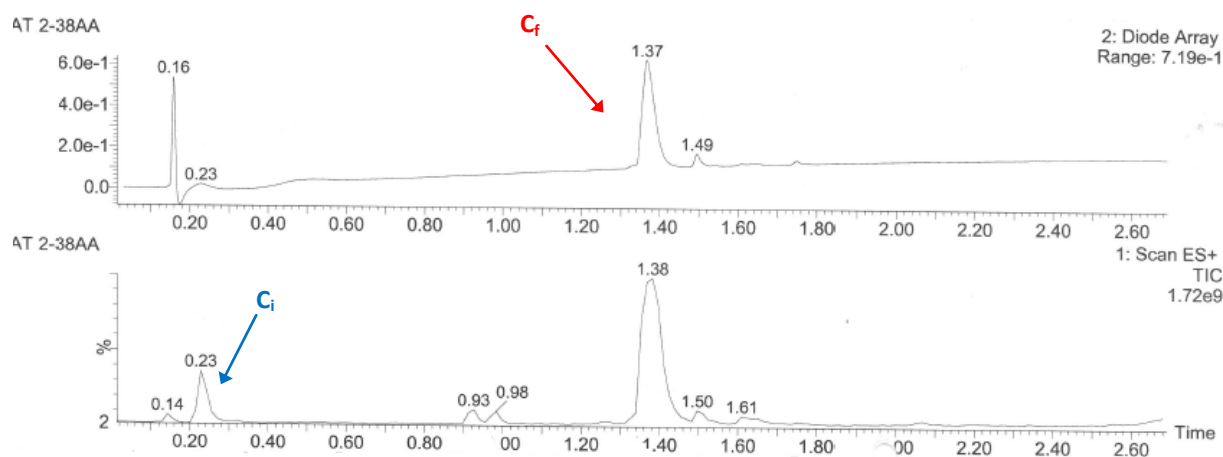
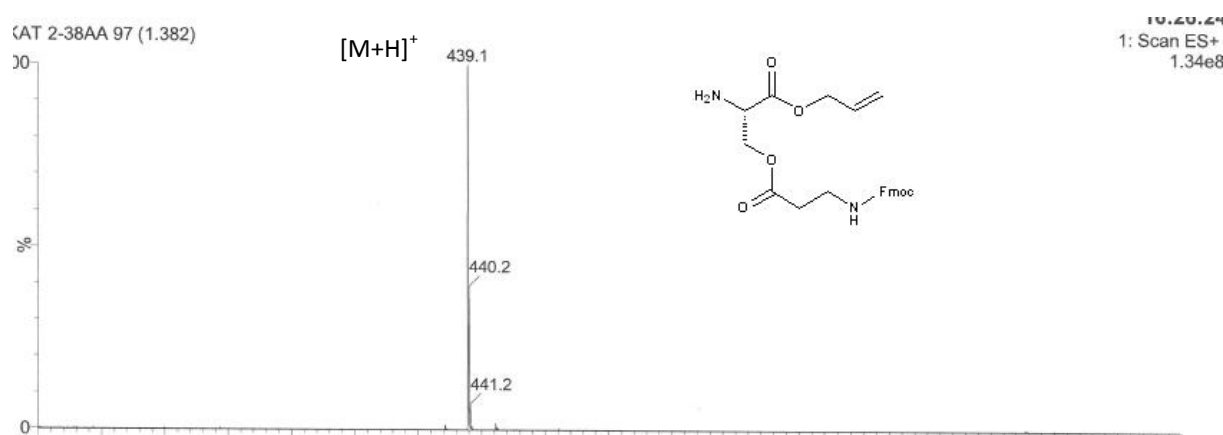


Схема 6. Синтез на моделния псевдо дипептид върху 2-Cl-тритил смола от H-Ser-OAlI.

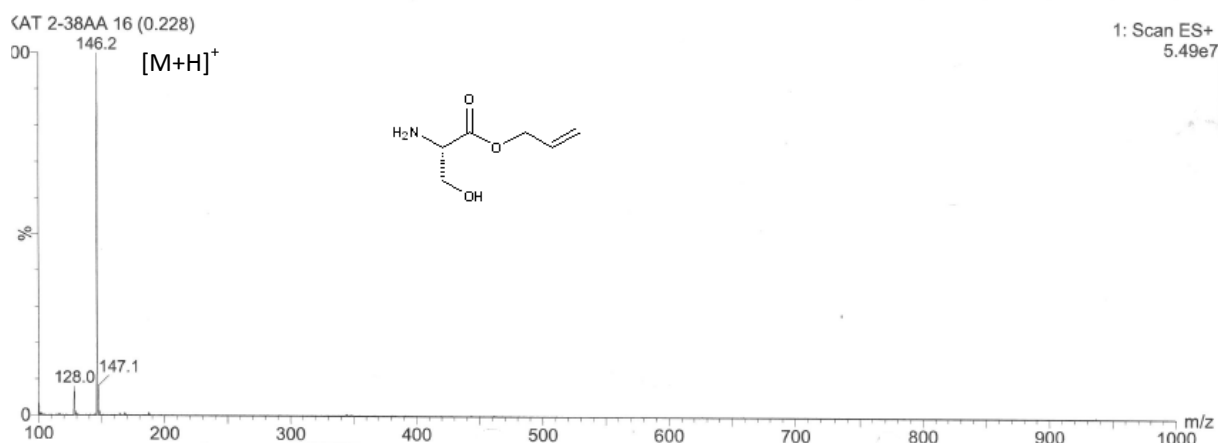
Стъпката за деблокиране на C-защитната алилова група (3) беше осъществена след ацилиращата стъпка (2). Ацилирането беше осъществено в присъствието на Voc_2O /DMAP. Тази стратегия беше оптимизирана чрез вариране на реакционните условия. Най-добри резултати бяха наблюдавани при използването на 4 eq Voc_2O , 4 eq Fmoc- β Ala-OH, и 0,3 eq DMAP с предварително преактивиране при 0°C за 30 мин. Реакционната смес беше прибавена към смолата и оставена да реагира за 4ч. LC/MS анализът показва 85% естерификация (Фиг. 16, Фиг. 17, Фиг. 18).



Фиг. 16. LC спектър на ацилирането с 4 eq Voc_2O . **C_f** – очакван продукт, **C_i** –изходния H-Ser-OAll.

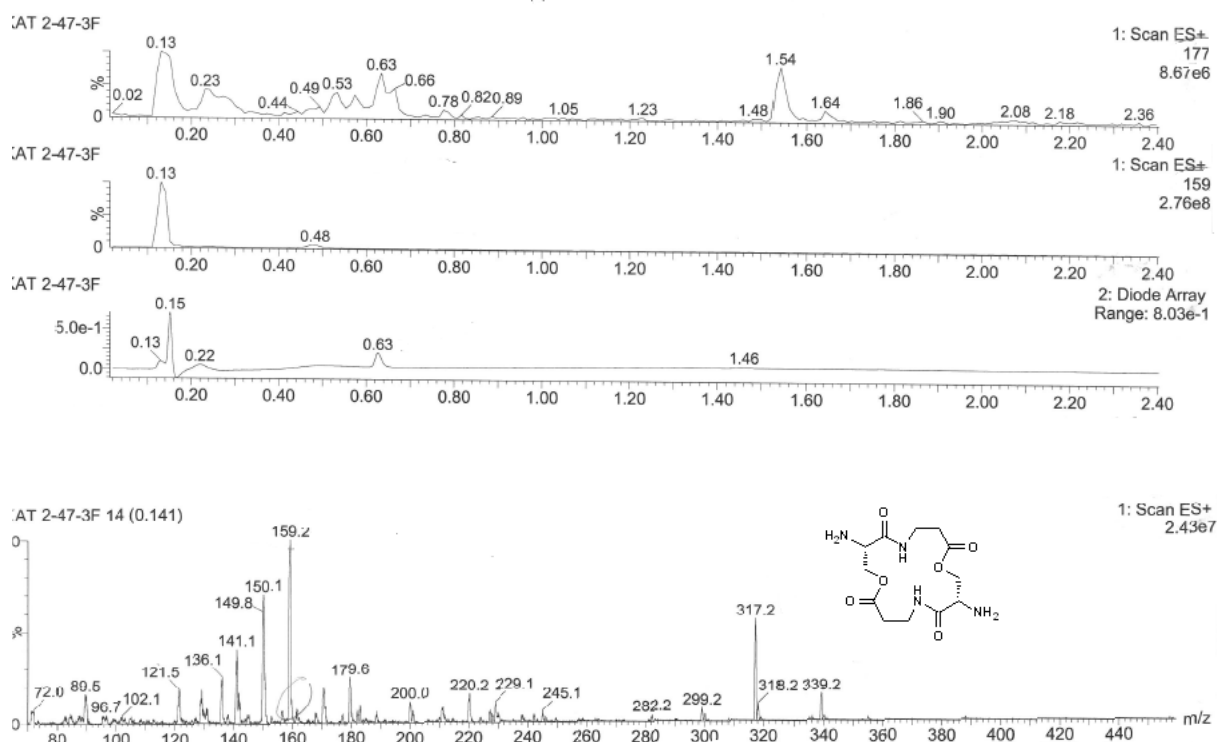


Фиг. 17. MS спектър на ацилирането с 4 eq Voc_2O : очакван продукт



Фиг. 18. MS спектър на ацилирането с 4 eq Boc_2O : изходния H-Ser-OAll.

Следващата стъпка след деблокирането се състоеше в опит за вътрешномолекулярна циклизация (3,3). И тук, както и при гореописаните опити, LC/MS анализът показва образуването на цикличен псевдо тетрапептид вместо желанния цикличен псевдо дипептид (Фиг. 18).

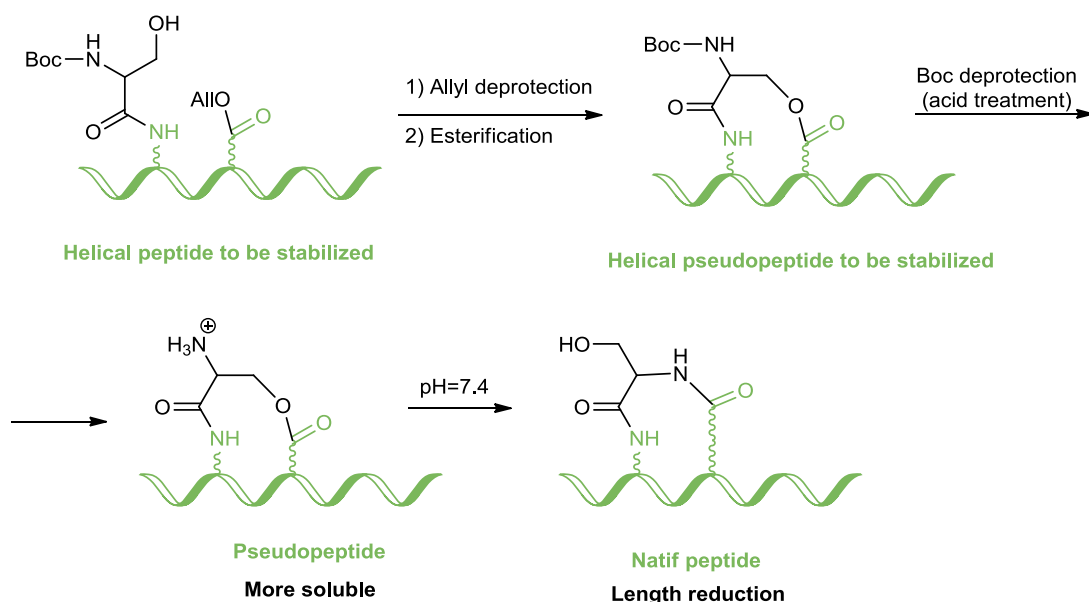


Фиг. 19. LC/MS спектри при циклизацията. Само молекулната маса на цикличния псевдо тетрапептид беше открита.

Независимо от приложените от нас стратегии, синтезът на 1,4-дiazepин-2,5-диони от съответния цикличен псевдо дипептид беше неуспешен.

II.2. Синтез на пептиди с $i,i+3$ вътрешномолекулен мост чрез O-N трансфер на ацилна група.

Общата схема за синтез е описана в **Фиг. 20**, и се състои в твърдофазен пептиден синтез на желания псевдо пептид, свалянето му от смолата, и осъществяване на реакцията за O-N трансфер на ацилна група за възстановяване на биологично активния пептид. Желаната пептидна последователност се синтезира по **Fmoc/tBu** стратегията за твърдофазен синтез. Структурната единица (building block, Bb), която ще бъде използвана за осъществяването на трансфера, се синтезира предварително в разтвор и се въвежда в пептидната последователност. Следва деблокирането на C-алил защитната група и образуването на вътрешномолекуления мост в присъствието на DIC/HOBt/DMAP като ацилиращи реагенти. Едновременно отделяне на пептида от смолата и деблокирането на N-Boc-защитната група става в присъствието на TFA/H₂O/TIS. Реакцията за O-N трансфер на ацилна група се осъществява в PBS буфер (фосфатен буфер физиологичен разтвор, pH=7,4), съдържащ 20% TFE.



Фиг. 20. Обща схема за синтез на пептид с $i,i+3$ вътрешномолекулен мост чрез O-N трансфер на ацилна група (твърдофазен пептиден синтез).

За осъществяване на поставената ни задача, беше избран следния литературен пептид: Boc-Leu¹-Leu²-Ser³-Aib⁴-Leu⁵-Leu⁶-Ser⁷-CO₂Me, заради вече известната му способност да образува α -спирала. С цел да приложим нашата стратегия за синтез на пептид с i,i+3 вътрешномолекулен мост чрез O-N трансфер на ацилна група, Ser³ и Ser⁷ бяха заменени с Dap³ и Asp⁷. Синтезът и получените резултати са описани в следващите глави.

II.2.1. Синтез на структурната единица, необходими за осъществяване на O-N ацил трансфера: Fmoc-Dap(Boc-Ser)-OH, (Fmoc-Bb-OH).

Синтезът на структурната единица е представен на **Схема 7**. и беше осъществен в разтвор. Boc-Ser-OH беше преактивиран в присъствието на DIC/HOBt (1ч.), за да реагира с аминогрупата от страничната верига на 2,3-диаминопропановата киселина (Dap) (18 ч. в DMF, при стайна температура). Крайният продукт беше изолиран под формата на бяло прахообразно вещество, с 40% добив и 99% чистота (**Фиг. 21**).

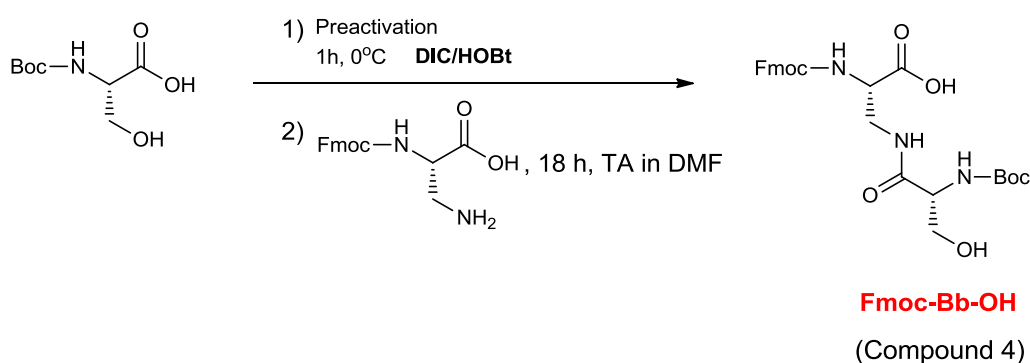
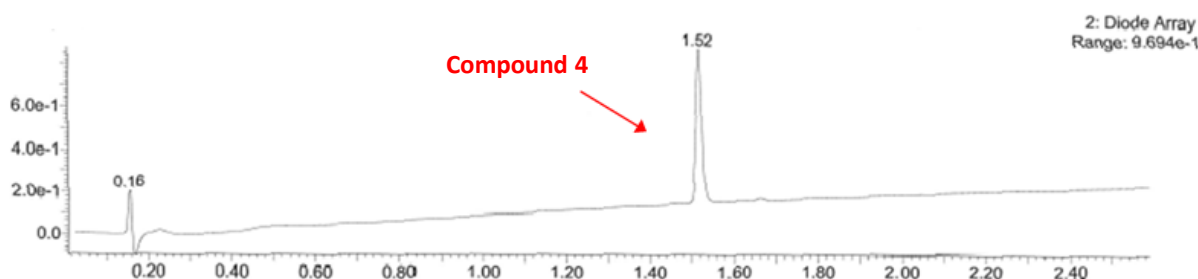
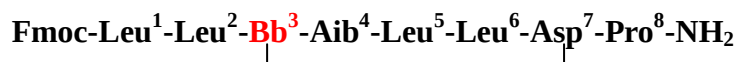


Схема 7. Схема за синтез на структурната единица, необходими за осъществяване на O-N ацил трансфера.



Фиг. 21. LC спектър на крайния продукт.

II.2.2. Синтез на пептид с *i,i*+3 вътрешномолекулен мост:



II.2.2.1. Синтез на *O*-ацил изопептид с *i,i*+3 вътрешномолекулен мост.

Синтезът е представен на **Схема 8**. Желаната пептидна последователност бе синтезирана по **Fmoc/tBu** стратегията за твърдофазен синтез. Структурната единица (Bb) беше въведена в пептидната последователност в присъствието на HATU/DIEA (2). Преди въвеждането на последните два левцита в позиция 1 и 2, беше деблокирана С-алил защитната група на аспарагиновата киселина (3), последвана от вътрешномолекулна циклизация (4). Различни експериментални условия за осъществяването на тази стъпка бяха изследвани (описани по-долу). След образуването на вътрешномолекуларния мост, последните два левцина бяха свързани към пептидната последователност следвайки **Fmoc/tBu** стратегията (5). Едновременното отделяне на *O*-ацил изопептида от смолата и деблокирането на N-**Boc**-защитната група беше осъществено в присъствието на TFA/H₂O/TIS (6).

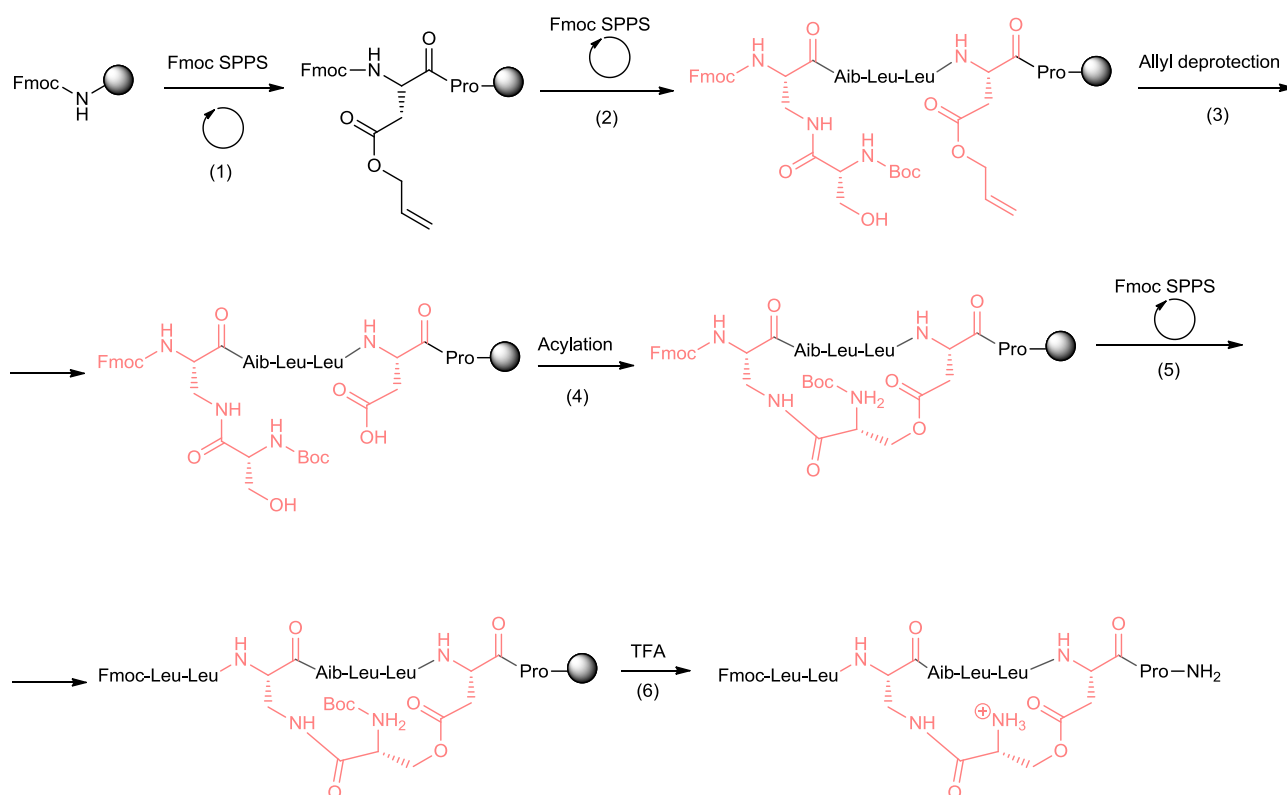
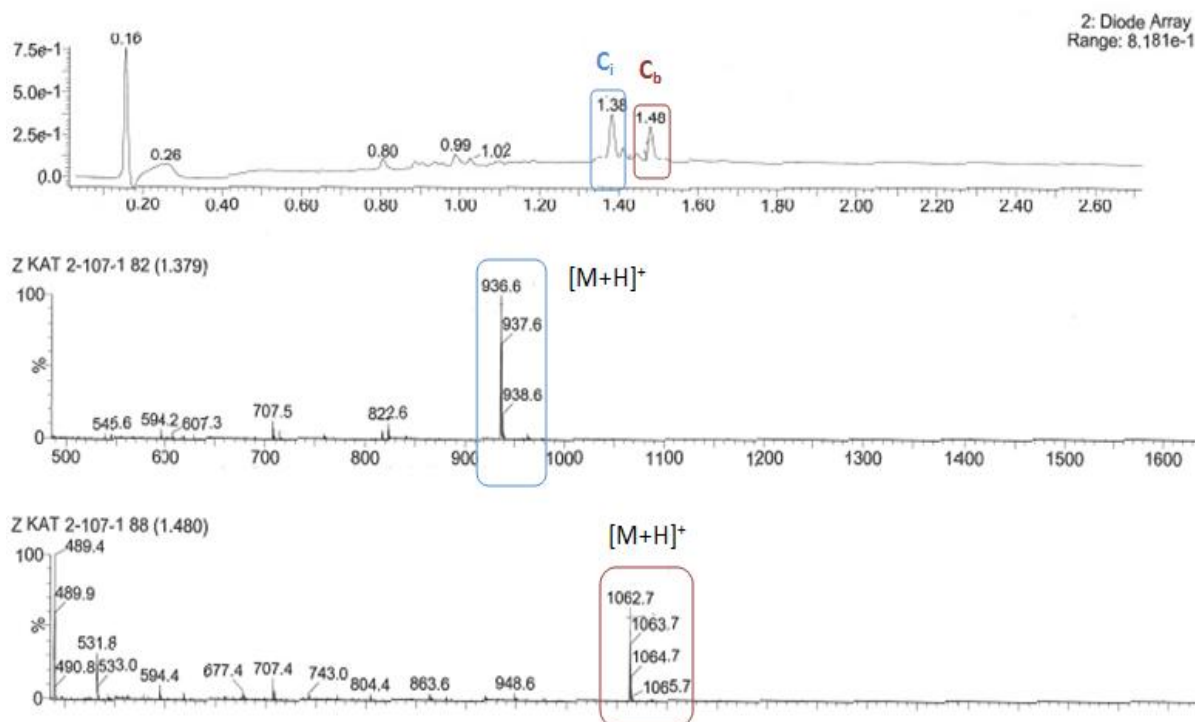


Схема 8. Синтез на *O*-ацил пептид с *i,i*+3 вътрешномолекулен мост.

II.2.2.1.a) Ацилиране по DIC/DMAP методът.

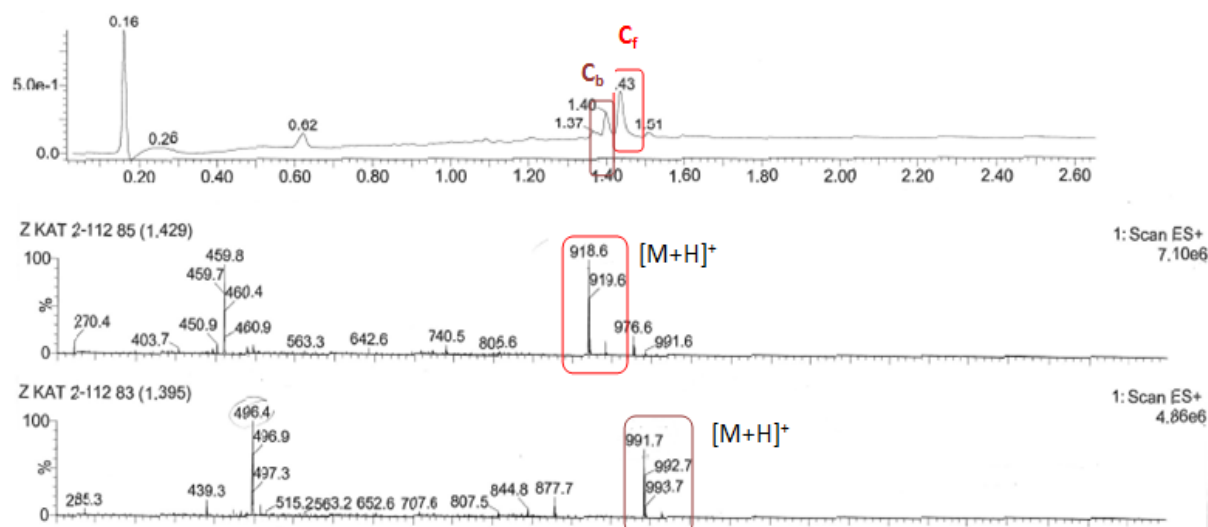
Първият изследван метод за ацилиране беше описания вече DIC/DMAP метод. И тук, както и при предишните опити, беше установено наличието на *N*-ацилкарбамид като страничен продукт, но не беше наблюдавана естерификация (Фиг. 22).



Фиг. 22. LC/MS (ESI+) спектри на ацилирането с DIC/DMAP: **C_i** – пептидът преди ацилирането, **C_b** – *N*-ацилкарбамид.

II.2.2.1.б). Ацилиране в присъствието на EDC/HOBt/DIEA.

При вторият изследван метод DIC/DMAP бяха заменени с EDC/HOBt/DIEA като ацилиращи реагенти. В този случай анализите показаха образуването на желания продукт (m/z 918.6), но беше установено също и наличието на неидентифициран страничен продукт с молекулна маса m/z 991.7, която отговаря на молекулната маса на изходния линеен продукт плюс фрагмент от 54 Da (Фиг. 23).

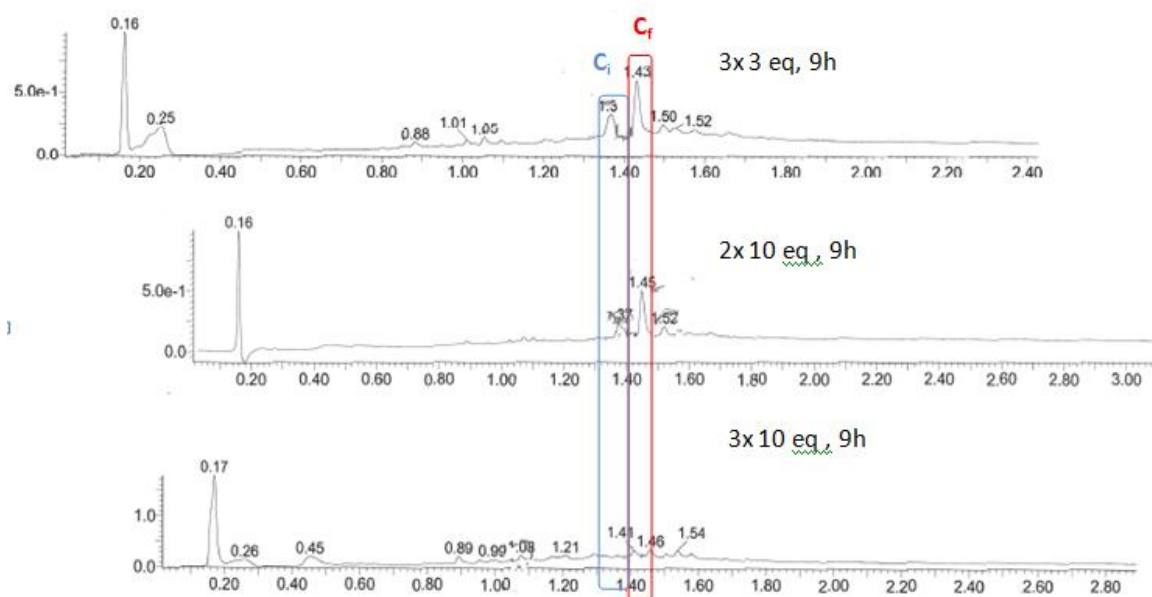


Фиг. 23. LC/MS (ESI+) спектри на ацилирането с EDC/HOBt/DIEA: **C_f** – очакван продукт (compound 2), **C_b** – неидентифициран страничен продукт.

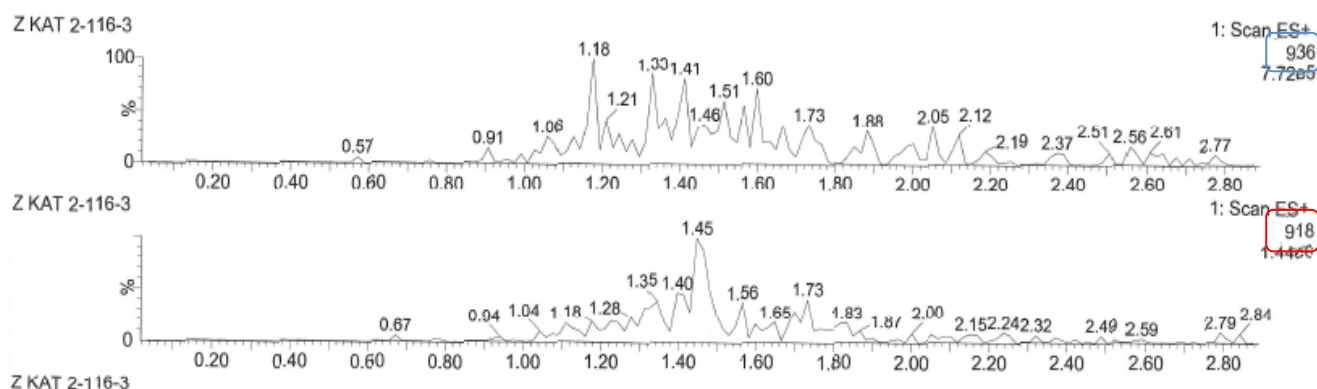
II.2.2.1.в). Ацилиране по Voc₂O/DMAP методът.

Третият изследван метод за ацилиране беше Voc₂O/DMAP методът. Бяха използвани различни реакционни условия, като варирахме еквивалентите, реакционното време, и температурата. С увеличаване на еквивалентите на Voc₂O, както и реакционното време, бе установено разпадане на линейния пептид (**Фиг. 24**).

След проведени, 3 пъти по 9 ч. всеки, опити за ацилиране с 10 eq of Voc₂O/DMAP, при мас-спектрометричния анализ не беше намерена нито молекулната маса на изходния линеен пептид, нито на очаквания пептид (**Фиг 25**).



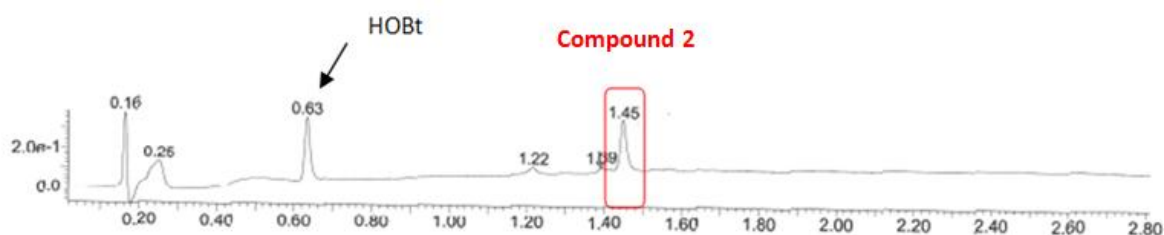
Фиг. 24. LC спектър на ацилирането с $\text{Voc}_2\text{O}/\text{DMAP}$: 3x 3eq, 2x 10 eq, 3x 10 eq, C_i – изходен пептид, C_f – очакван пептид (compound 2).



Фиг. 25. MS (ESI+) спектър на ацилирането: 3 пъти с 10 eq $\text{Voc}_2\text{O}/\text{DMAP}$. $[\text{M}+\text{H}]^+=936$ g/mol – молекулната маса на изходния линейен пептид; $[\text{M}+\text{H}]^+=918$ g/mol – молекулната маса на очаквания пептид с вътрешномолекулен мост.

II.2.2.1.г) Ацилиране в присъствието на DIC/HOBt/DMAP.

След проведените неуспешни опити се върнахме обратно на DIC/DMAP метода като този път добавихме и HOBt за потискане на образуването на *N*-ацилкарбамид. HPLC и LC/MS анализите показаха 90% ацилиране (Фиг. 26). След пречистване на крайния продукт, получения добив беше 11%.



Фиг. 26. LC спектър на ацилирането с DIC/HOBt/DMAP.

II.2.2.2. Синтез на *N*-ацил пептид с *i,i*+3 вътрешномолекулен мост: O-N трансфер на ацилна група.

Синтезираният *O*-ацил изопептид беше подложен на реакцията за *O*-*N* трансфер на ацилна група в присъствието на фосфатен буфер физиологичен разтвор и 20% TFE за 36ч (Схема 9). Реакцията на трансфер беше следена чрез LC/MS анализ (Фиг. 27). След пречистване крайният продукт беше анализиран чрез кръгов дихроизъм за установяване на наличието на α -спираловидна структура (Фиг. 28).

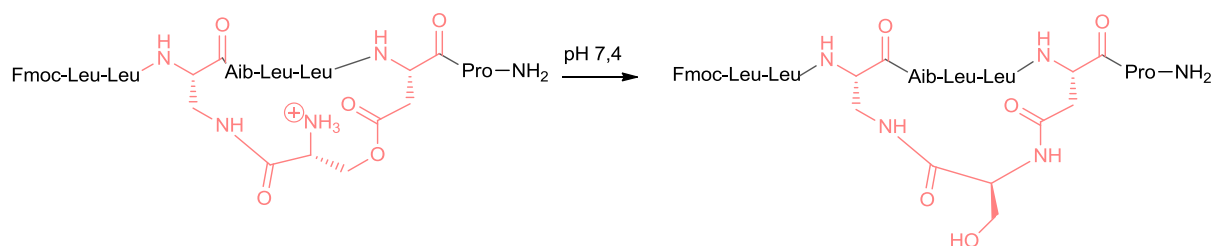
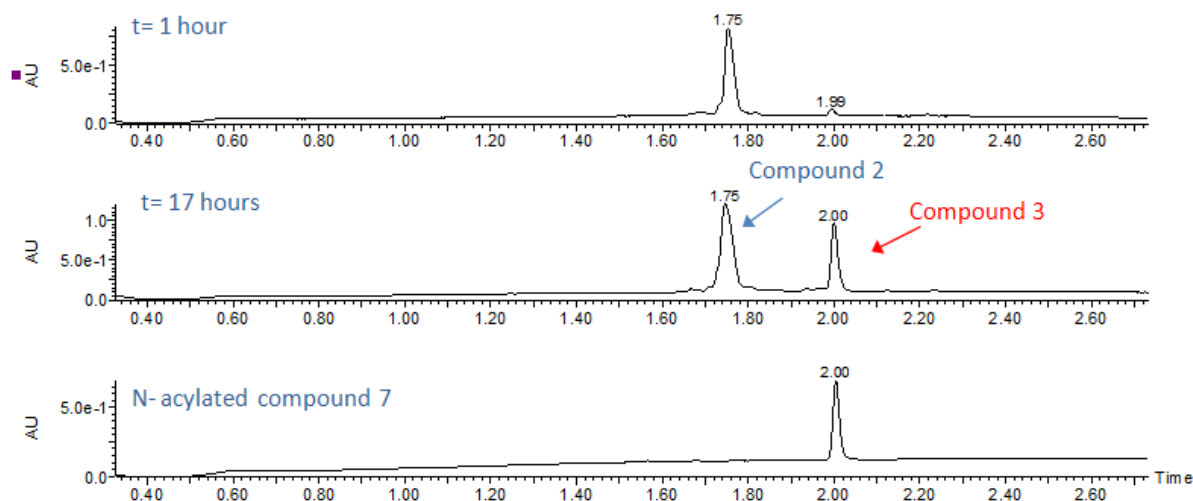
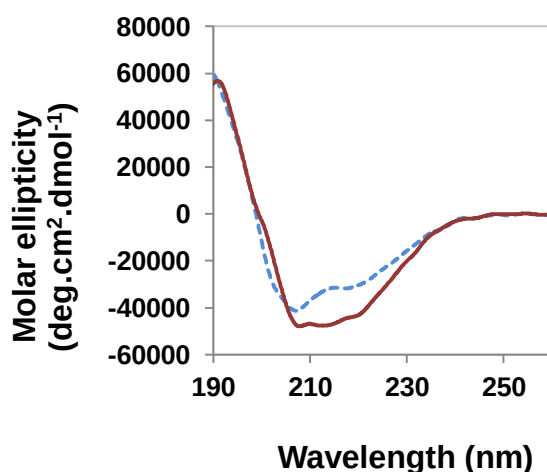


Схема 9. Синтез на *N*-ацил пептид с *i,i*+3 вътрешномолекулен мост: *O*-*N* трансфер на ацилна група.



Фиг. 27. LC спектър при *O*-*N* трансфера на ацилна група във физиологични условия.



Фиг. 29. CD спектър на *O*-ацил изопептида (синя прекъсната линия) и *N*-ацил пептид (червена непрекъсната линия) между 190 и 260 nm.

O-ацил изопептидът показва характерен за α -спиралата сигнал, с два локални минимума при 208 и 222 nm, и максимум при 190 nm, което ясно потвърди стабилизирането на вторичната структура чрез създаването на $i, i+3$ вътрешномолекулен мост. След *O-N* трансфер на ацилна група беше наблюдавано леко изместване на единия минимум – от 208 на 211 nm и наличието на ефект на Cotton, който би могъл да бъде свързан с промяна във вторичната структура на пептида след осъществения трансфер.

II.3. Димеризация на незащитени пептиди.

II.3.1. Димеризация на незащитени пептиди чрез 1,3-диполлярно циклоприсъединяване на органични азиди и алкини (пример за „клик” реакция). Синтез и резултати.

„Клик” реакцията беше приложена за димеризирането на пептида WTr53. Синтезът беше осъществен както е показано на **Схема 10**. Желаната пептидна последователност беше синтезирана по ***Fmoc/tBu*** стратегията за твърдофазен синтез (1). Смолата беше разделена на две и съответните линкери, 4-пентинова киселина и 2-азидооцетна киселина, бяха свързани с N-крайната свободна аминогрупа на пептида, непосредствено преди отделянето му от твърдофазния носител. Едновременно отделяне и деблокиране на защитните групи на страничните вериги беше осъществено в присъствието на TFA/H₂O/TIS (3). Димеризирането се извършва в присъствието на меден йодид и DIEA в DMF чрез микровълнов синтез (4).

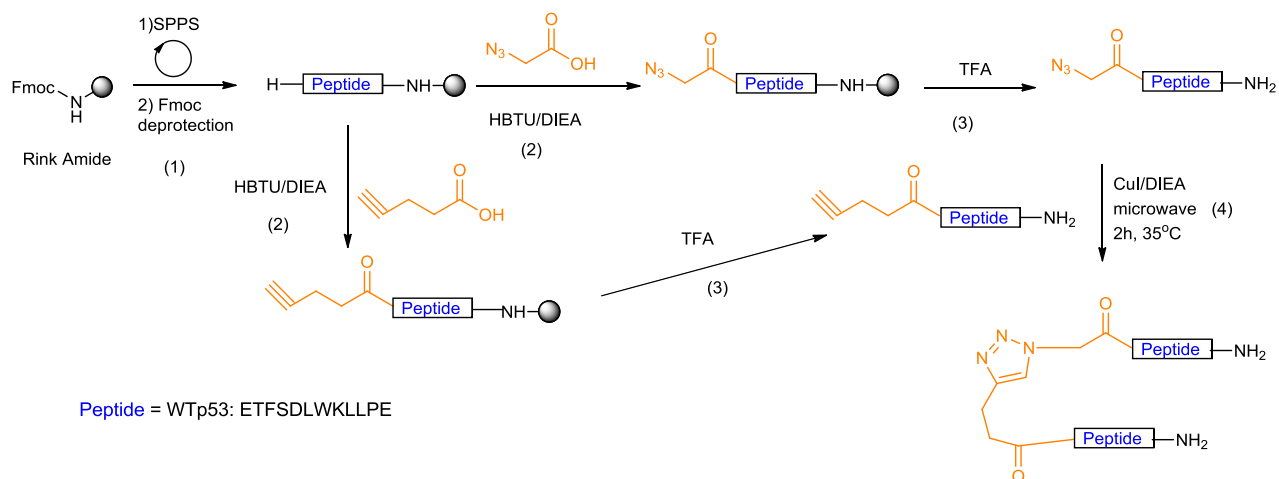
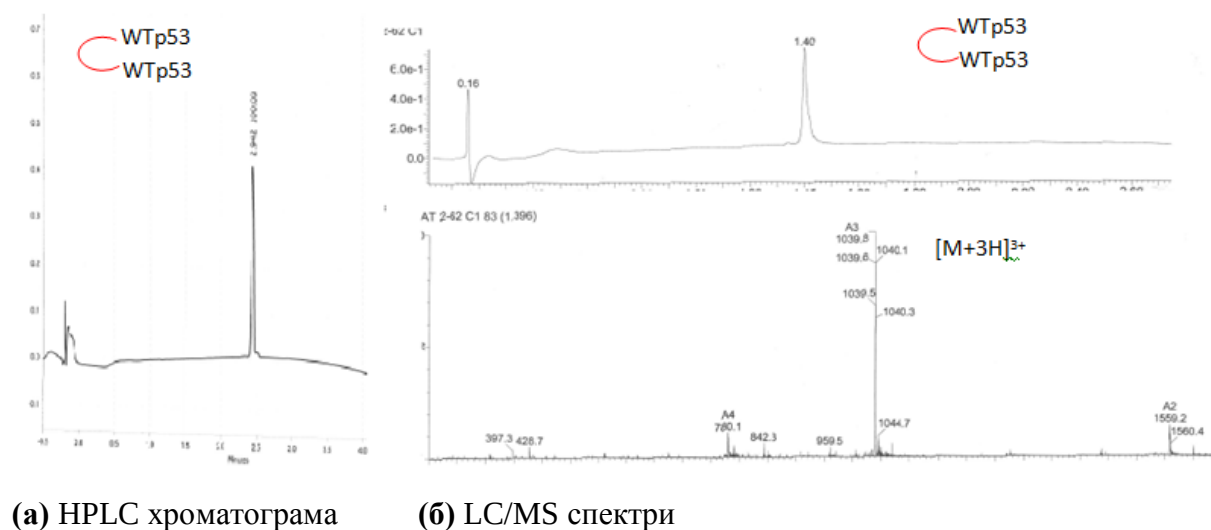


Схема 10. Обща схема за синтез на димер на пептид WTrp53.

Крайният продукт беше охарактеризиран чрез HPLC и LC/MS (**Фиг. 30**). След пречистване крайният димер беше изолиран с добив 68% и чистота 99%.



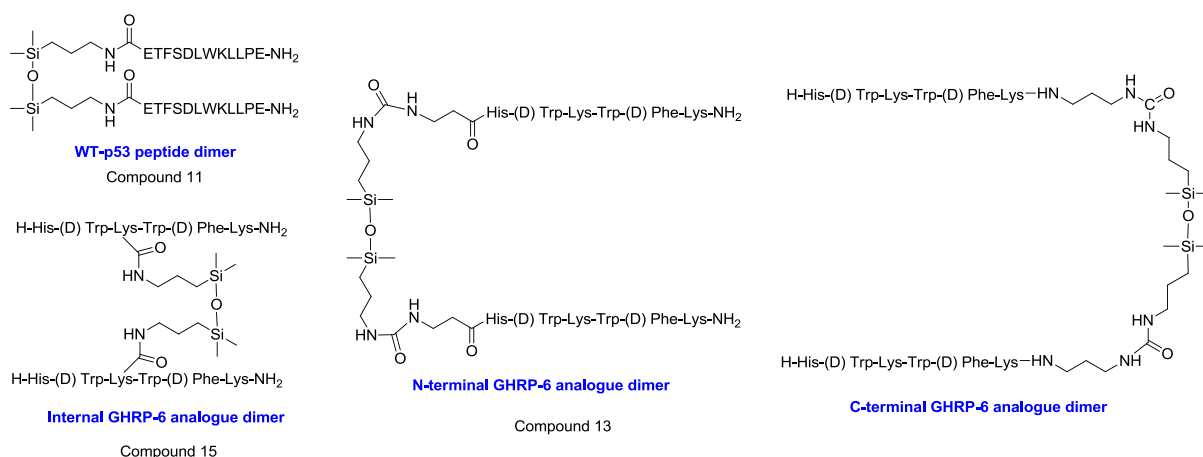
Фиг. 30. HPLC и LC/MS анализ на димер на пептид WTrp53.

II.3.2. Димеризация на незащитени чрез образуване на силоксанови връзки. Синтез и резултати.

Образуването на силоксанови връзки като метод за димеризация беше приложено за синтеза на димери на пептиди WTrp53 и GHRP-6. Бяха синтезирани четири пептида (**Фиг. 31**). Димерът на WTrp53 беше получен чрез N-крайна димеризация. Синтезирани

бяха и три аналога на хормона, стимулиращ отделянето на хормона на растежа, GHRP-6 с цел да се изследва:

- осъществяването на самата димеризация;
- да се оцени значението на мястото на димеризацията в пептидната последователност , в N-края, C-края или с участие на страничната верига;
- влиянието на димеризацията върху биологичната активност.



Фиг. 31. Димери на WTrp53 и аналози на GHRP-6.

II.3.2.1 N-крайна димеризация на пептид WTrp53 и аналог на GHRP-6.

Мономерите бяха синтезирани както е показано на **Схема 11**. Желаните пептидни последователности бяха синтезирана по **Fmoc/tBu** стратегията за твърдофазен синтез Rink- амидна смола (1). Диметилхидроксисилановият линкер беше кондензиран със свободната N-крайна аминогрупа (2). Едновременноното отделяне от смолата и деблокирането на защитните групи на страничните вериги беше осъществено в присъствието на TFA/H₂O/TIS (3). По време на обработката с TFA хлородиметилсилилната група от линкера хидролизира до съответната диметилхидроксисилилна група. Последната стъпка от синтеза се състоеше в хомодимеризация на синтезираните пептиди в неутрални условия (PBS pH=7,4) чрез образуването на силоксанови връзки (4).

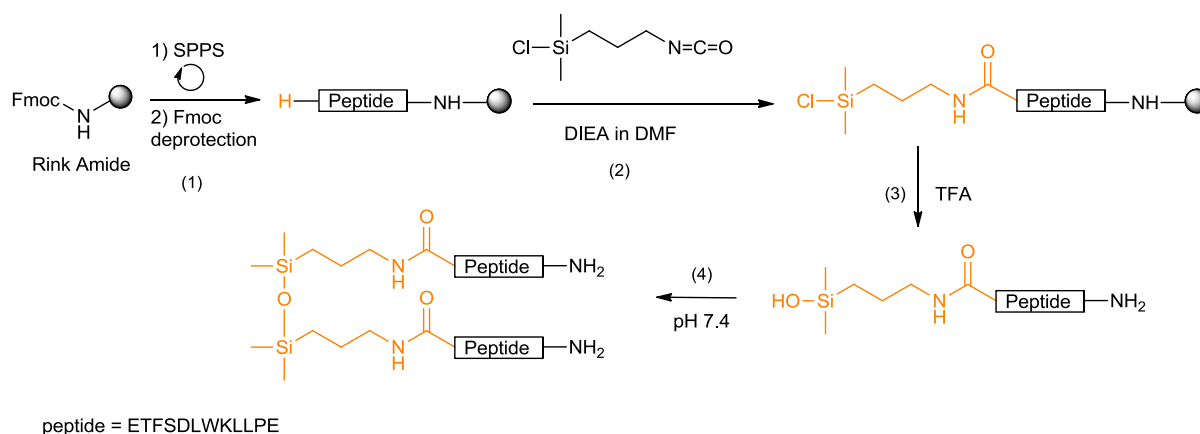
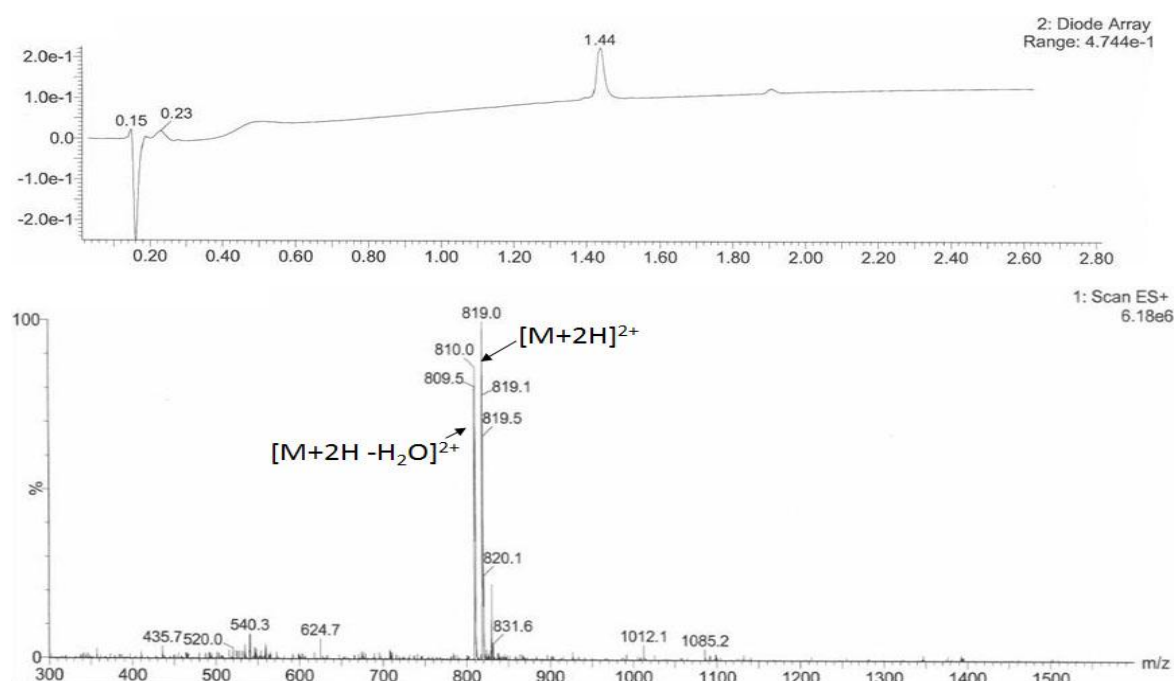


Схема 11. Обща схема за N-крайна димеризация.

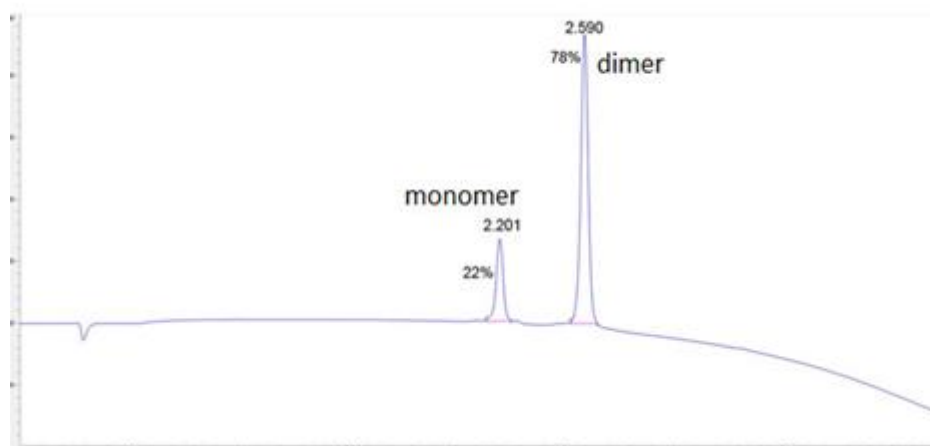
II.3.2.1.а) N-крайна димеризация на пептид WTr53.

Мономерът на пептид WTr53 беше синтезиран както е описано в предишната точка. След отделяне от твърдофазния носител и деблокиране на защитните групи на страничните вериги диметилхидроксисилиловият пептид беше утаен в диетил етер и пречистен чрез препаративно HPLC. Крайният продукт беше изолиран с 95% чистота (Фиг. 32).

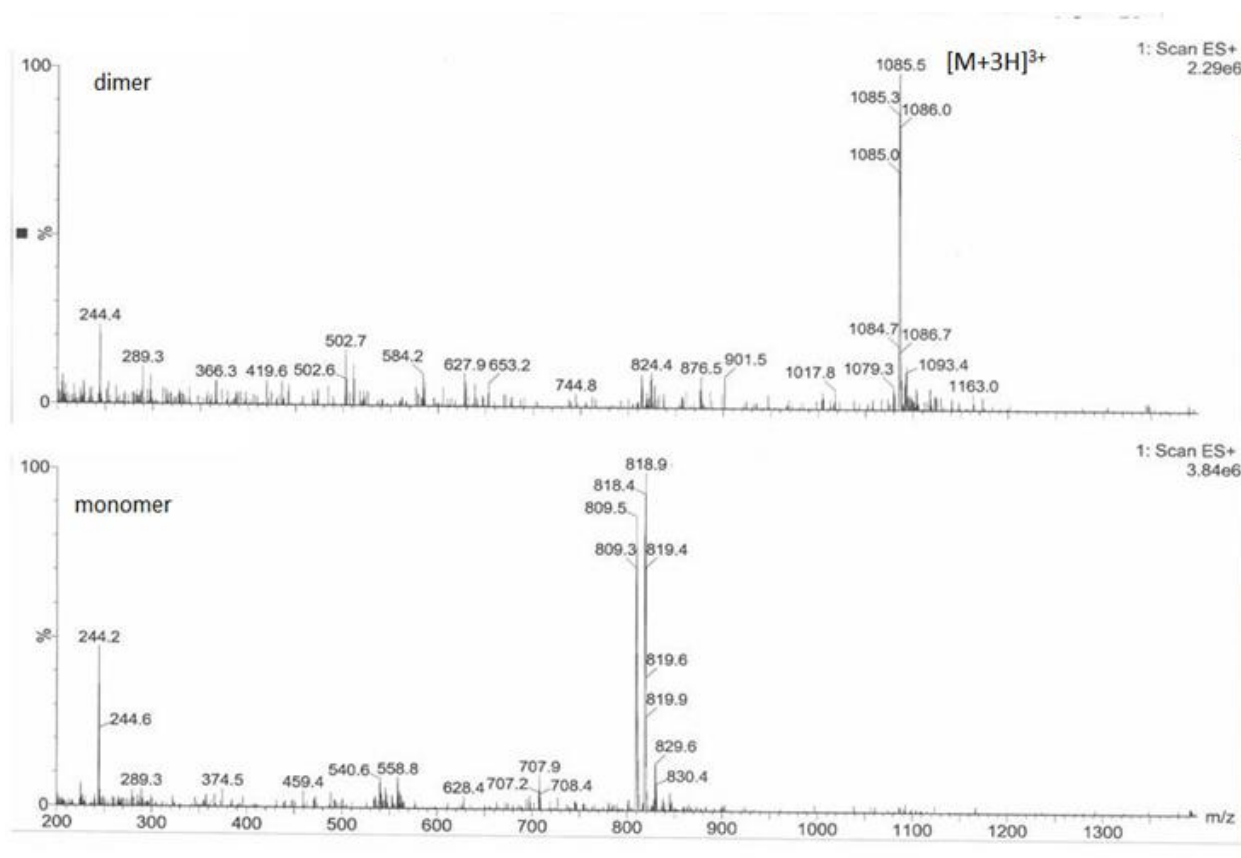


Фиг. 32. LC/MS (ESI+) спектри на синтезия мономер.

Димеризацията беше осъществена в амониев буфер с рН=7.0 и концентрация от 10mM. Чрез HPLC и LC/MS анализ установихме, 78% димеризация. Въпреки удължаване на реакционното време, пълна димеризация не беше наблюдавана (Фиг. 33, Фиг. 34).



Фиг. 33. HPLC хроматограма на N-краен димер на пептид WTr53.



Фиг. 34. MS спектър на N-краен димер на пептид WTr53.

II.3.2.1.6) N-крайна димеризация на аналог на GHRP-6.

Мономерът на аналог на GHRP-6 беше синтезиран и димеризиран по аналогичен начин (Схема 12) с добив от 90% и чистота от 98%. Крайният продукт беше охарактеризиран чрез HPLC, LC/MS и ^1H ЯМР.

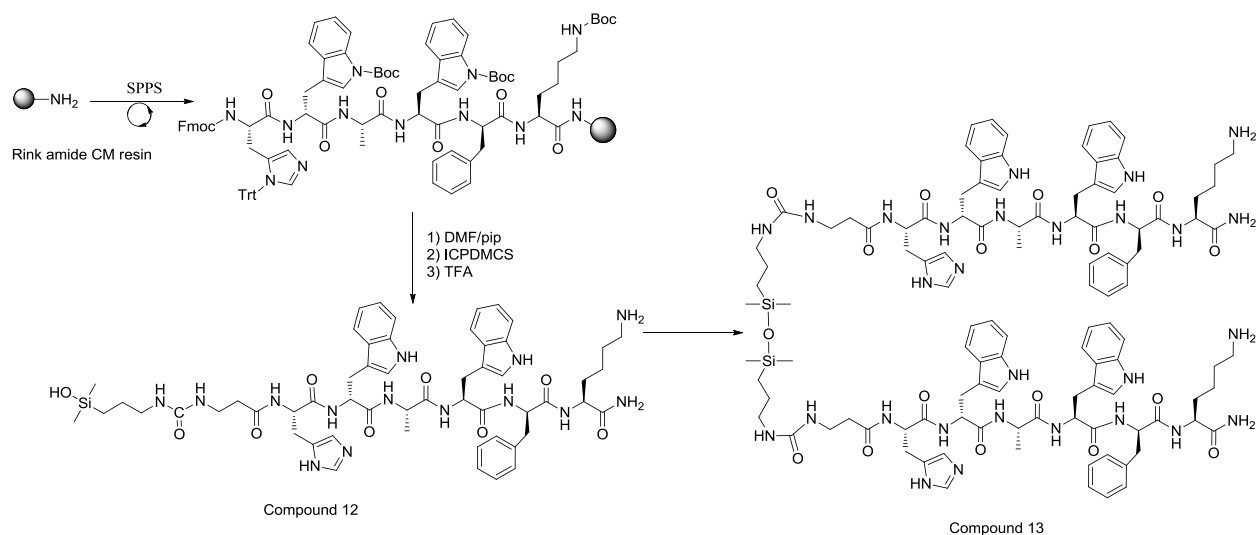
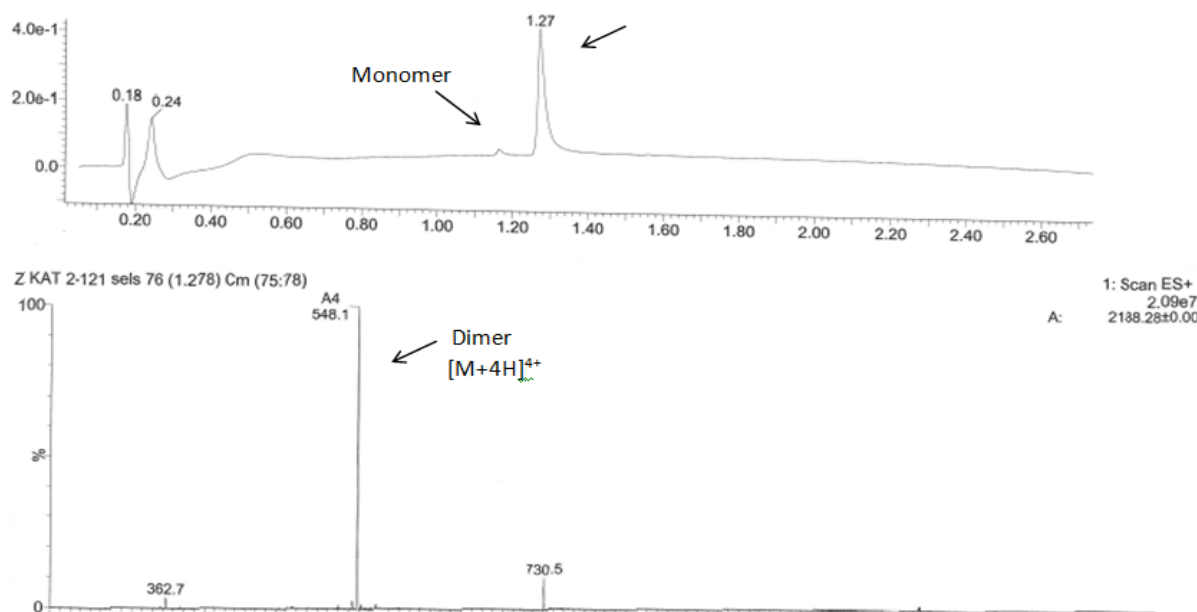


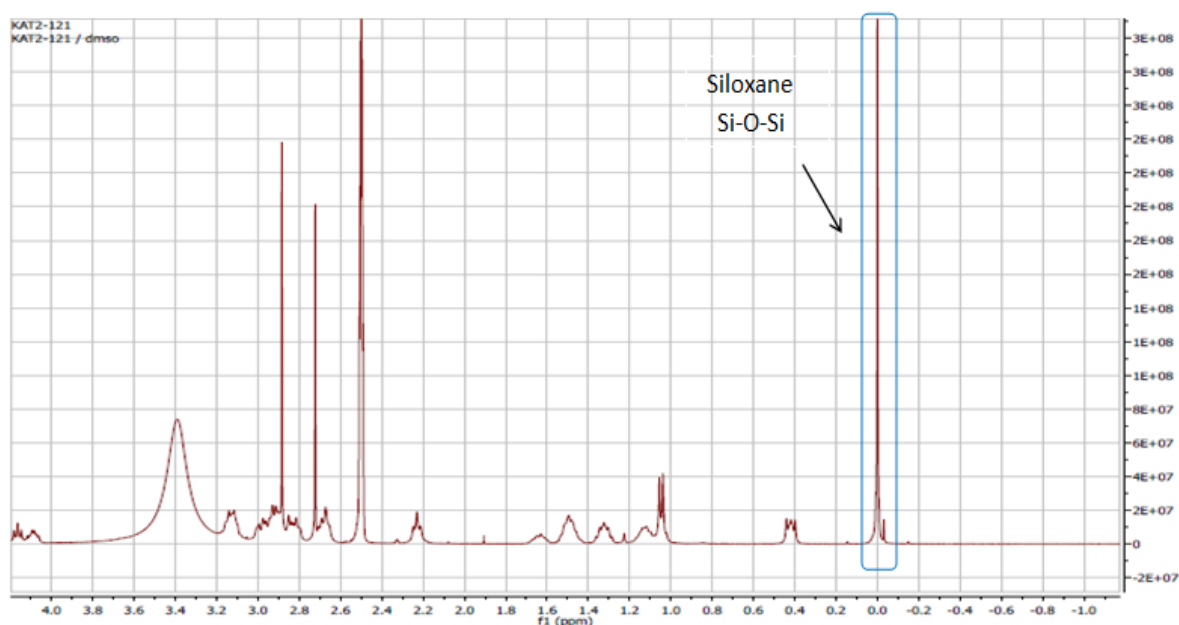
Схема 12. Синтез на N-краен димер на аналог на GHRP-6.

Димерите са чувствителни в киселинна среда и се разпадат до мономера. Тъй като при HPLC/LC/MS анализите се използва 1% TFA, е трудно да се определи дали димеризацията е протекла докрай или присъствието на изходното вещество (мономера) е в резултат на разпадна реакция (Фиг. 35).



Фиг. 35. LC/MS спектри на димер на аналог на GHRP-6 .

По-лесно и по-точно реакцията на димеризация може да бъде проследена чрез ^1H ЯМР анализ, само по химичното отместване на водородните атоми от метилсилановия остатък при 0.0 ppm. По този начин може да се определи и отношението димер/мономер. (Фиг. 36).



Фиг.36. ^1H -ЯМР спектър на димер на N-краен аналог на GHRP-6.

II.3.2.2. Димеризация с участието на страничната верига на лизин в позиция 3: димер на аналог на GHRP-6.

Желаната пептидна последователност беше синтезирана по *Fmoc/tBu* стратегията за твърдофазен синтез върху Rink- амидна смола (1), както е показано на **Схема 13**. След деблокирането на N-*Alloc* защитната група (2,1), диметилхидрокисилановият линкер беше кондензиран със свободната N-крайна аминогрупа на страничната верига на лизин в позиция 3 (2,2).

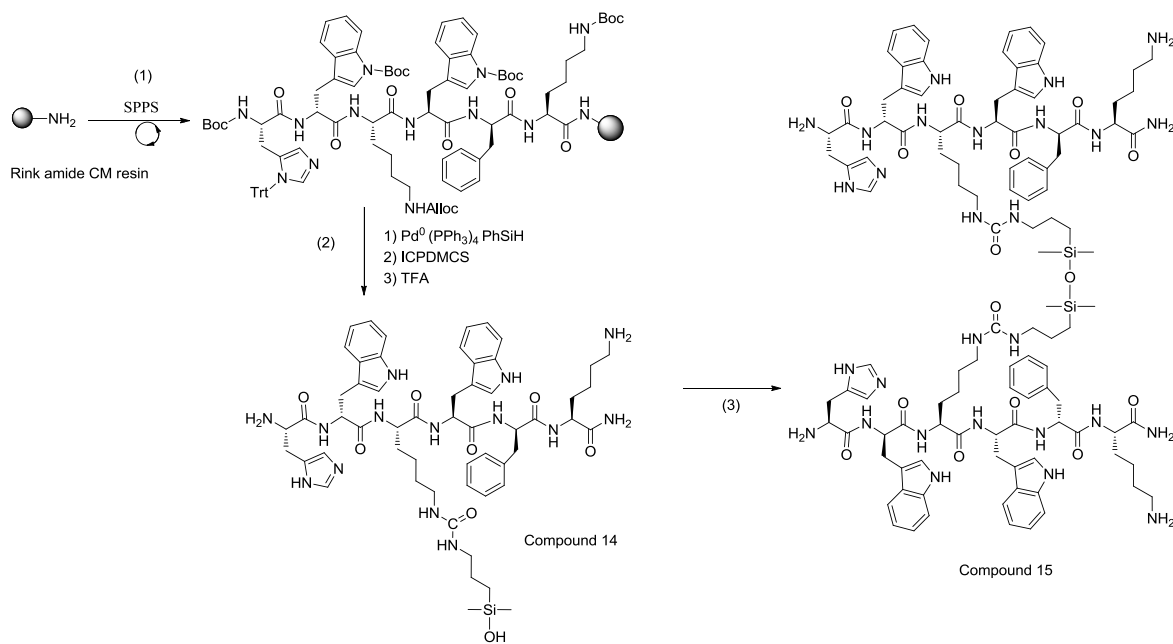
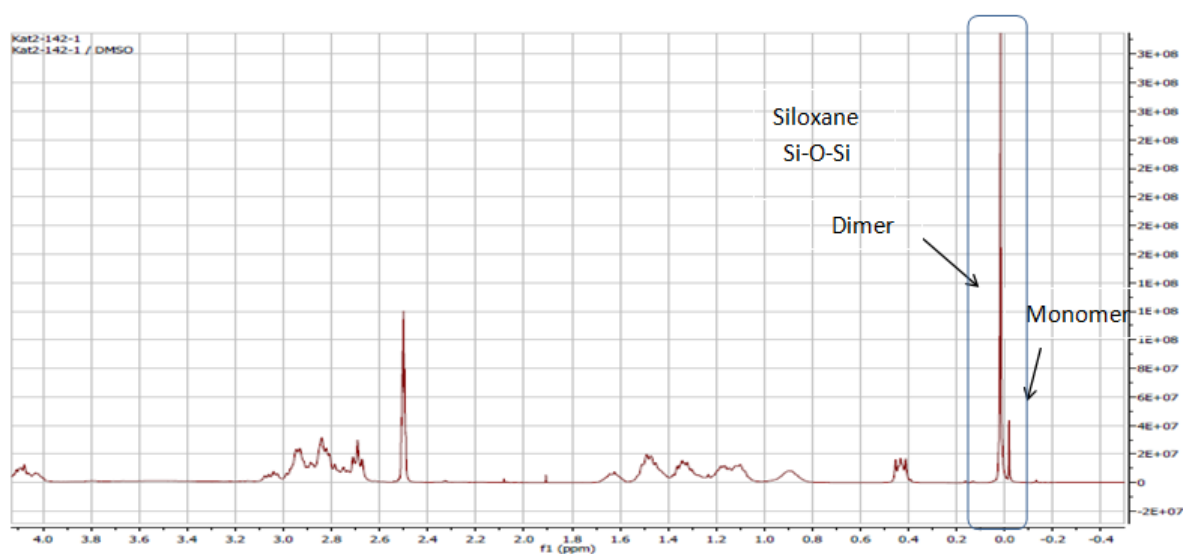


Схема 13. Синтез на димер на аналог на GHRP-6: Димеризация с участието на страничната верига.

Едновременно отделяне от смолата и деблокирането на защитните групи на страничните вериги беше осъществено в присъствието на $\text{TFA}/\text{H}_2\text{O}/\text{TIS}$ (2,3). По време на обработката с TFA хлородиметилсилилната група от линкера хидролизира до съответната диметилхидроксисилилна група. Последната стъпка от синтеза се състоеше в хомодимеризация на синтезираните пептиди в неутрални условия (PBS $\text{pH}=7,4$) чрез образуването на силоксанови връзки (3). Реакцията беше следена с ^1H ЯМР анализ, който показва непълна димеризация (92%) (Фиг. 37).



Фиг.37. ^1H -ЯМР спектър на димер на аналог на GHRP-6 при димеризация с участието на страничната верига.

II.3.2.3. С-крайна димеризация на аналог на GHRP-6.

Желаните пептидни последователности бяха синтезирани по **Fmoc/tBu** стратегията за твърдофазен синтез върху 2-Cl-тритилна смола с **N-Boc**-защитна група в N-края на пептида (1) съгласно **Схема 14**. Свалянето на пептида от смолата беше осъществено с TFE, за запазване на защитните групи на страничните вериги (2,1). Диметилхидросилановият линкер беше кондензиран със свободната С-крайна карбоксилна група (2,2). Деблокирането на защитните групи и едновременното хидролизиране на хлордиметилсилиловата група бе осъществено в присъствието на TFA/H₂O/TIS (2,3). Хомодимеризацията на синтезираните пептиди се извършва в неутрални условия (PBS pH=7,4) чрез образуване на силоксанови връзки (3).

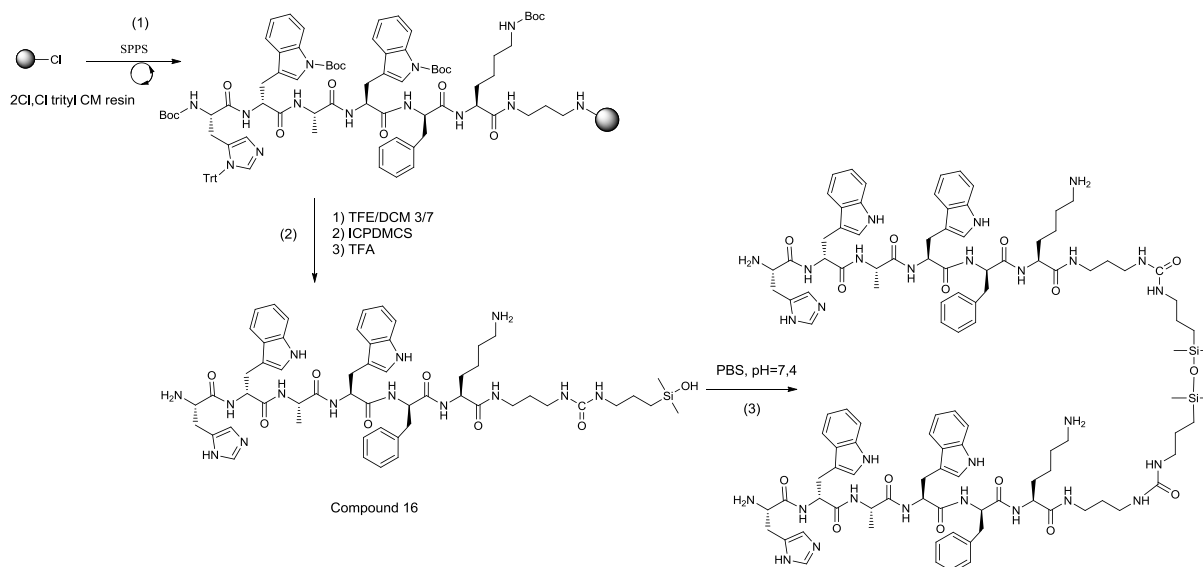
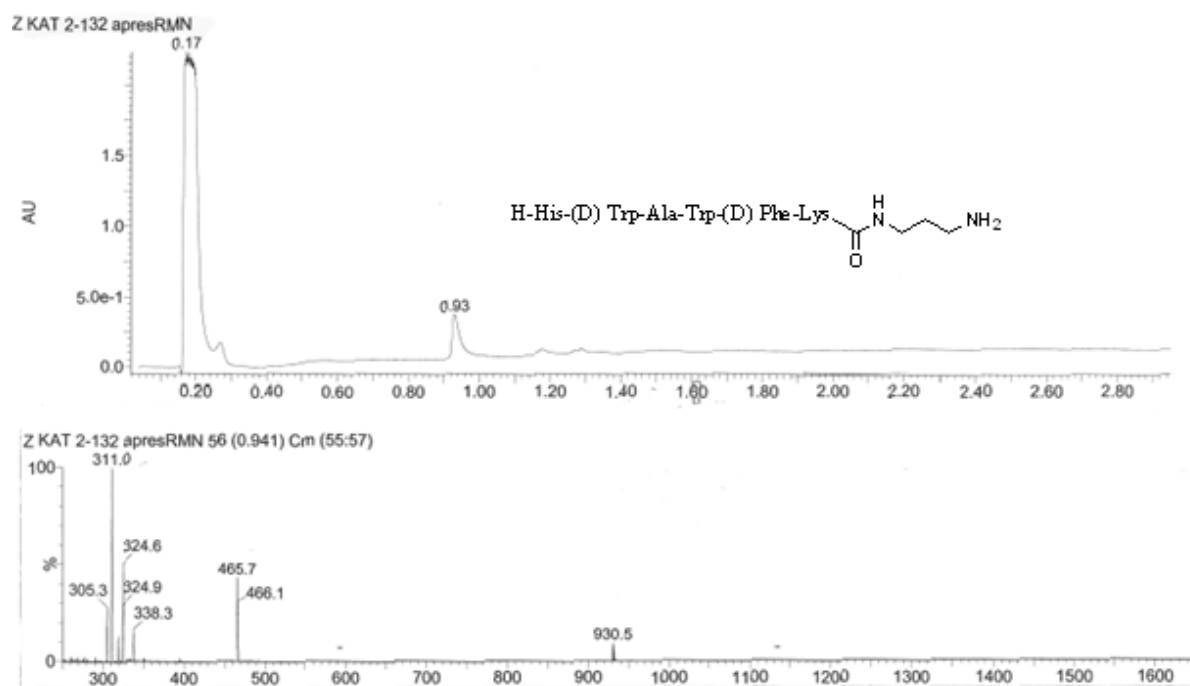


Схема 14. Синтез на N-краен димер на аналог на GHRP-6

След направените ^1H -ЯМР и LC/MS анализи беше установено, че крайният продукт се е разпаднал до изходното вещество без диметилхидроксисилановия линкер (**Фиг. 38**).



Фиг. 38. LC/MS спектри на крайният продукт след направеният ^1H -ЯМР анализ.

III. Изводи.

1. Установено е, че синтез на 1,4-дiazепин-2,5-диони чрез *O-N* трансфер на ацилна група не може да бъде осъществен чрез приложените от нас стратегии.
2. Синтезиран е пептиди с $i, i+3$ вътрешномолекулен мост с α -спирална структура чрез прилагане на реакцията за *O-N* трансфер на ацилна група .
3. Намерени са оптималните условия за синтез и пречистване на димер на WTr53 чрез 1,3-диполярно циклоприсъединяване на органични азиди и алкини. Полученият димер беше охарактеризиран със съвременни спектрални методи.
4. Синтезирани, пречистени и охарактеризирани чрез образуване на силоксанови връзки са:
 - димер на WTr53;
 - три димера на аналози на GHRP-6 чрез N-крайна, C-крайна димеризация и димеризация с участието на страничната верига.

След провеждане на биологични тестове със синтезираните димери ще бъде оценено влиянието на направените модификации в пептидната верига и установена връзката структура-биологична активност.

IV. Приноси на дисертационният труд

1. Разработена и оптимизирана е нова стратегия за естерификация на алкохоли, свързани към твърдофазен носител.
2. За първи път е предложена стратегия за образуване на вътрешномолекулен мост чрез естерификация между две аминокиселини, участващи в пептидна верига, свързана към твърдофазен носител.
3. За първи път е приложена реакцията за *O-N* трансфер на ацилна група за синтез на пептиди с $i,i+3$ вътрешномолекулен мост с α -спирална структура.

Публикации, свързани с темата на дисертацията

1. Aleksandra Kalistratova, Baptiste Legrand, Pascal Verdié, Emilia Naydenova, Muriel Amblard, Jean Martinez, and Gilles Subra. A switchable stapled peptide.

Article in press, *Journal of peptide science* (16 october 2015)

2. Aleksandra Kalistratova, Jeremie Ciccione, Cécile Echalié, Jean-Alain Fehrentz, Céline M'Kadmi, Baptiste Legrand, Muriel Amblard, Ahmad Medhi, Jean Martinez and Gilles Subra. Homodimerization of Unprotected Peptide Using Hybrid Hydroxydimethylsilane Peptides.

Article in progress.

Участия в международни и национални научни форуми

1. A. Kalistratova, E.Naydenova G.Subra, M. Amblard, , J. Martinez. Synthesis of a building block for stapled peptides. „Ден на науката и спорта”, X научна постерна сесия - Химикотехнологичен и Металургичен Университет – София, 17 Май 2013г.

Представен постер

2. A. Kalistratova, G.Subra, M. Amblard, E.Naydenova , J. Martinez. Solid-phase synthesis of stapled peptides via O-N acyl migration. XII научна постерна сесия, посветена на 70-годишнината на катедра “Обща и неорганична химия” - Химикотехнологичен и Металургичен Университет – София, 22 Май 2015г.

Представен постер

3. Aleksandra Kalistratova, Gilles Subra, Muriel Amblard, Emilia Naydenova and Jean Martinez. New approach for the synthesis of stapled peptides. Sixth International Scientific Conference of South-West University – Blagoevgrad, 10-14 juin 2015.

Изнесен доклад.

Исползвана литература

- [1] Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J.; Khrestchatisky, M. Synthetic Therapeutic Peptides: Science and Market. *Drug Discov. Today* **2010**, 15 (1-2), 40–56.
- [2] Fosgerau, K.; Hoffmann, T. Peptide Therapeutics: Current Status and Future Directions. *Drug Discovery Today* **2015**, 20 (1), 122–128.
- [3] Craik, D. J.; Fairlie, D. P.; Liras, S.; Price, D. The Future of Peptide-Based Drugs. *Chem Biol Drug Des* **2013**, 81 (1), 136–147.
- [4] LaBonte, J.; Lebbos, J.; Kirkpatrick, P. Enfuvirtide. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, 2 (5), 345–346.
- [5] Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85 (14), 2149–2154.
- [6] White, C. J.; Yudin, A. K. Contemporary Strategies for Peptide Macrocyclization. *Nat Chem* **2011**, 3 (7), 509–524.
- [7] Davies, J. S. The Cyclization of Peptides and Dipeptides. *J. Pept. Sci.* **2003**, 9 (8), 471–501.
- [8] Walensky, L. D.; Bird, G. H. Hydrocarbon-Stapled Peptides: Principles, Practice, and Progress. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (15), 6275–6288.
- [9] Verdine, G. L.; Hilinski, G. J. Stapled Peptides for Intracellular Drug Targets. *Meth. Enzymol.* **2012**, 503, 3–33.
- [10] Sohma, Y.; Sasaki, M.; Hayashi, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y. Novel and Efficient Synthesis of Difficult Sequence-Containing Peptides through O–N Intramolecular Acyl Migration Reaction of O-Acyl Isopeptides. *Chem. Commun.* **2004**, No. 1, 124–125.
- [11] Mutter, M.; Chandravarkar, A.; Boyat, C.; Lopez, J.; Santos, S. Dos; Mandal, B.; Mimna, R.; Murat, K.; Patiny, L.; Saucède, L.; Tuchscherer, G. Switch Peptides In Statu Nascendi: Induction of Conformational Transitions Relevant to Degenerative Diseases. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, 43 (32), 4172–4178.
- [12] Halazy, S. G-Protein Coupled Receptors Bivalent Ligands and Drug Design. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **1999**, 9 (4), 431–446.
- [13] Shimohigashi, Y.; Ogasawara, T.; Koshizaka, T.; Waki, M.; Kato, T.; Izumiya, N.; Kurono, M.; Yagi, K. Interaction of Dimers of Inactive Enkephalin Fragments with μ Opiate Receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1987**, 146 (3), 1109–1115.
- [14] Shimohigashi, Y.; Costa, T.; Chen, H.-C.; Rodbard, D. Dimeric Tetrapeptide Enkephalins Display Extraordinary Selectivity for the δ Opiate Receptor. *Nature* **1982**, 297 (5864), 333–335.

- [15] Portoghesi, P. S. From Models to Molecules: Opioid Receptor Dimers, Bivalent Ligands, and Selective Opioid Receptor Probes. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (14), 2259–2269.
- [16] Daffix, I.; Amblard, M.; Bergé, G.; Dodey, P.; Pruneau, D.; Paquet, J. L.; Fouchet, C.; Franck, R. M.; Defrène, E.; Luccarini, J. M.; Bélichard, P.; Martinez, J. Synthesis and Pharmacological Evaluation of Dimer Derivatives of the Bradykinin Receptor Antagonist HOE-140. *J. Pept. Res.* **1998**, *52* (1), 1–14.
- [17] Cheronis, J. C.; Whalley, E. T.; Allen, L. G.; Loy, S. D.; Elder, M. W.; Duggan, M. J.; Gross, K. L.; Blodgett, J. K. Design, Synthesis, and in Vitro Activity of Bis(succinimido)hexane Peptide Heterodimers with Combined B1 and B2 Antagonist Activity. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (3), 348–355.
- [18] Kodama, H.; Shimohigashi, Y.; Sakaguchi, K.; Waki, M.; Takano, Y.; Yamada, A.; Hatae, Y.; Kamiya, H. Dimerization of Neurokinin A and B COOH-Terminal Heptapeptide Fragments Enhanced the Selectivity for Tachykinin Receptor Subtypes. *European Journal of Pharmacology* **1988**, *151* (2), 317–320.
- [19] Higuchi, Y.; Takano, Y.; Shimazaki, H.; Shimohigashi, Y.; Kodama, H.; Matsumoto, H.; Sakaguchi, K.; Nonaka, S.; Saito, R.; Waki, M.; Kamiya, H. Dimeric Substance P Analogue Shows a Highly Potent Activity of the in Vivo Salivary Secretion in the Rat. *European Journal of Pharmacology* **1989**, *160* (3), 413–416.
- [20] Subra, G.; Amblard, M.; Verdié, P.; Komesli, S.; Dutartre, P.; Durand, P.; Renaut, P.; Martinez, J. Synthesis and TGF- β Receptor Binding Inhibition of Multibranched Compounds. *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26* (4), 496–510.
- [21] Lecis, D.; Mastrangelo, E.; Belvisi, L.; Bolognesi, M.; Civera, M.; Cossu, F.; De Cesare, M.; Delia, D.; Drago, C.; Manenti, G.; Manzoni, L.; Milani, M.; Moroni, E.; Perego, P.; Potenza, D.; Rizzo, V.; Scavullo, C.; Scolastico, C.; Servida, F.; Vasile, F.; Seneci, P. Dimeric Smac mimetics/IAP Inhibitors as in Vivo-Active pro-Apoptotic Agents. Part II: Structural and Biological Characterization. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, *20* (22), 6709–6723.
- [22] M. Bergmann, E. Brand, F. Weinmann, Umlagerungen peptidähnlicher Stoffe II: Derivate der γ -Amino- β -oxybuttersäure, *Hoppe. Seylers Z. Physiol. Chem.* **1923**, *131*, 1;
- [23] J. Lécaillon, P. Gilles, G. Subra, J. Martinez, and M. Amblard, Synthesis of cyclic peptides via O-N-acyl migration, *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 4674–46