

# TỔNG HỢP HÓA HỌC CÁC PEPTID CÓ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG TRONG PHÒNG CHỐNG BỆNH SỐT RÉT

Nguyễn Thị Thanh Vân<sup>1\*</sup>

## TÓM TẮT

**Mục tiêu:** Tổng hợp hóa học các peptid có khả năng ứng dụng trong phòng chống sốt rét (F1 và N-Me-F1), phân tích khả năng liên kết với kháng nguyên xuyên màng 1 (AMA1) và chống lại sự xâm nhập hồng cầu (RBC) của các peptid trên.

**Đối tượng, phương pháp:** Các peptid được tổng hợp bằng phương pháp pha rắn (SPPS), tinh chế bằng HPLC; sau đó được phân tích bằng phản ứng miễn dịch với enzyme (ELISA) và cộng hưởng Plasmon bề mặt (SPR).

**Kết quả:** F1 và 12 N-Me-F1 trừ Arg-3, Leu-4 và Pro-9 đã được tổng hợp thành công. Trong số đó, G8, A10, S11, S12, F13 và S14 cho kết quả ức chế cao hơn so với F1 wt; W2, L5 và F7 làm giảm khả năng liên kết với AMA1; các peptid còn lại (G1, G6 và M15) cho kết quả liên kết với AMA1 tương tự như F1.

**Kết luận:** Các thử nghiệm sinh học ban đầu của các peptid này đã cho kết quả khả quan với 6 N-Me-F1 peptid có ái lực liên kết với AMA1 cao hơn so với F1. Các peptid này cũng tương quan tốt với các thử nghiệm sinh hóa.

**Từ khóa:** Kháng nguyên xuyên màng 1, N-Methyl scan, tổng hợp peptid bằng pha rắn.

## ABSTRACT

**Objectives:** To synthesize antimalaria peptides (F1 and N-Me-F1), then testing the ability to bind Apical membrane antigen 1 (AMA1) and to inhibit the invasion of red blood cells of those analogues.

**Subjects and methods:** All peptides were synthesized via solid phase peptide synthesis (SPPS), purified via high performance liquid chromatography (HPLC) and then tested the inhibition of ELISA and analyzed Surface Plasmon Resonance (SPR).

**Results:** F1 and 12 N-Me-F1 except Arg-3, Leu-4 and Pro-9, have been successfully synthesized in which G8, A10, S11, S12, F13 and S14 show better inhibition than F1 wt; W2, L5 and F7 reduced ability to bind AMA1; the remaining methylations (G1, G6 and M15) exhibited similar binding to native F1 in this assay.

**Conclusions:** Initial investigations into the biological activity of these peptides were performed with six N-Me-F1 peptides have much better binding ability to AMA1 than the native F1 peptide. These peptides also correlated well with these bioassays.

**Keywords:** AMA1, N-Methyl scan, SPPS.

Chịu trách nhiệm nội dung: Nguyễn Thị Thanh Vân, Email: vanhoangsk@gmail.com

Ngày nhận bài: 27/02/2024; mời phản biện khoa học: 5/2024; chấp nhận đăng: 20/5/2024.

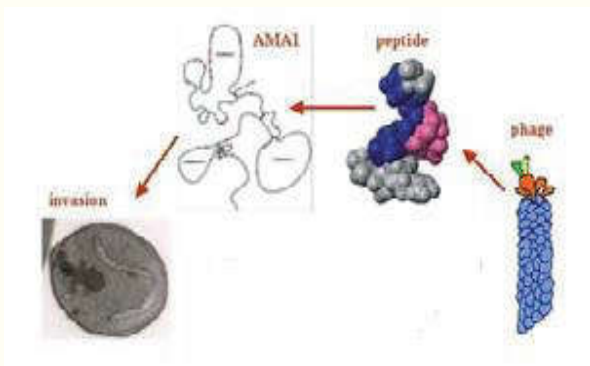
<sup>1</sup>Viện Y học dự phòng Quân đội.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sốt rét (SR) là một bệnh truyền nhiễm do các loài kí sinh trùng *Plasmodium* gây ra, lây truyền từ người này sang người khác qua trung gian truyền bệnh là muỗi *Anopheles*. Bệnh gây ảnh hưởng nghiêm trọng tới sức khỏe của cá nhân và cộng đồng, là gánh nặng kinh tế đối với nhiều quốc gia trên thế giới. Theo WHO, hiện nay, trên thế giới mới có hai loại vắc-xin phòng chống SR cho trẻ em được khuyến nghị sử dụng là RTS,S/AS01 (năm 2021) và R21/Matrix-M (năm 2023) [1]. Có

nhiều phương pháp tiếp cận với bệnh SR để tìm ra một vắc-xin hiệu quả và peptid là hợp chất có cấu trúc protein nhỏ, có khả năng đáp ứng được mục tiêu này.

Kháng nguyên xuyên màng 1 (AMA1) là một màng protein phổ biến chung cho tất cả các loài kí sinh trùng *Plasmodium* và đã được chứng minh là quan trọng với kí sinh trùng xâm chiếm hồng cầu của vật chủ. Do đó, đây là một mục tiêu hướng đến để điều chế các chất kháng lại sự xâm chiếm trên (hình 1) [2, 3, 4]. Tuy nhiên, ái lực, hoạt tính sinh học và sự ổn định của các peptid này thường thấp.



Hình 1. Peptid liên kết với kháng nguyên SR và ức chế xâm chiếm hồng cầu.

Nghiên cứu của Keizer và các cộng sự [5] về F1-F3 và 3 peptid khác (hình 2) đã đánh giá mối quan hệ về ái lực của *P. falciparum* AMA1 với cạnh tranh thử nghiệm miễn dịch enzyme (ELISA). Kết quả cho thấy, F1 là chuỗi đại diện nhất trong các peptid này có ái lực cao nhất đối với *P. falciparum* AMA1 [4, 5], nhưng F1 lại không liên kết với *P. chabaudi* AMA1.

F1	GWRLLGFGPASSFSM
tF1	GWRLLGFGPA
sF1	AMSPWFRSLGFGSLG
F1tbp	CKIGFGPDPTFSSC
F2	TRLFRVPVLP SGVTS
F3	PFARAPVEHHDVVGL

Hình 2. Trình tự liên kết của các peptid tương tác với AMA1.

Kết quả cũng chỉ ra rằng F1 là peptid hiệu quả nhất trong việc kháng lại merozoite xâm chiếm hồng cầu. Từ kinh nghiệm trong việc làm tăng độ ổn định và khả năng liên kết với AMA1 của peptid R1 (VFAEFLPLFSKFGSRMHILK) bởi hệ thống các *N*-methyl backbone của Harris và các cộng sự [4], *N*-methyl scan của F1 đã được tổng hợp theo phương pháp tổng hợp peptid theo pha rắn với mong muốn một số peptid sẽ tăng khả năng liên kết với AMA1 và chống lại sự xâm nhập hồng cầu của các peptid trên.

Từ thực tiễn trên, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm tổng hợp các peptid có khả năng ứng dụng trong phòng chống sốt rét (F1 và *N*-Me-F1), phân tích khả năng liên kết với kháng nguyên xuyên màng 1 (AMA1) và chống lại sự xâm nhập hồng cầu (RBC) của các peptid trên.

## 2. HÓA CHẤT, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Hóa chất nghiên cứu

Chlorotriptyl resin, *N,N*-diisopropylethylamine, piperidine, hydroxybenzo-triazole, HBTU, HOBt,

HATU/HOAt, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Leu-OH, và Fmoc-Met-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, MTBD, 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-ene, methyl triflate, *o*-nitro-benzene-sulfonyl chloride, chloranil, TFA, DTT, TIPS, TNBS, *N*-Me-Gly-1, Ala-10, R1... và một số dung môi.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Fmoc-NMe-Gly-OH, Fmoc-NMe-Phe-OH, Fmoc-NMe-Ala-OH, Fmoc-NMe-Leu-OH và Fmoc-NMe-Met-OH được tổng hợp dựa vào phương pháp tách khử các 5-oxazolidinone tương ứng, sử dụng  $BF_3 \cdot Et_2O$  và triethylsilane [6]. Nối Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH vào mạch peptid theo phương pháp *N*-methylation "on-resin" của Miller and Scanlan [7]. Tất cả các peptid tổng hợp riêng rẽ theo pha rắn, kiểm chứng bằng phổ khối ESIMS, tinh chế bằng HPLC và sau đó phân tích phản ứng miễn dịch với enzyme (ELISA) và phân tích cộng hưởng Plasmon bề mặt (SPR).

- Tổng hợp 1,3-Oxazolidin-5-ones: trộn *N*-Fmoc-axit amin (25 mmol) với PTSA (475 mg, 2,5 mmol), lượng dư paraformaldehyde (3,0g) trong toluene (20 mL) và hạt molecular sieves 4 Å (1,0 g). Cho hỗn hợp trên phản ứng trong lò vi sóng (2.450 MHz) rồi pha loãng trong lượng dư EtOAc. Lọc dung dịch hữu cơ được làm sạch bởi dung dịch  $Na_2CO_3$  bão hòa (40 mL  $\times$  3). Tiếp theo, làm khô EtOAc bằng  $MgSO_4$  và cô đặc, tinh chế bằng sắc kí cột với dung môi EtOAc/hexane 20-40%.

- Tổng hợp *N*-Fmoc-*N*-methylated axit amin: Hòa tan Oxazolidinone (20 mmol) trong dichloromethane (DCM) (50 mL) cho vào hỗn hợp trên  $BF_3 \cdot OEt_2$  (40 mmol) và  $Et_3SiH$  (40 mmol), khuấy trộn từ 2-24 giờ, kiểm tra bằng TLC. Cô đặc sản phẩm thô rồi hòa tan trong EtOAc (150 mL) và chiết bằng dung dịch  $NaHCO_3$  10% (3  $\times$  50 mL). Lọc dung dịch nước được thu lại và axit hóa tới pH 2 bằng HCl loãng (10%), sau đó chiết lại bằng EtOAc (3  $\times$  50 mL), làm khô bằng  $MgSO_4$ , lọc, cô đặc, làm khô.

- Dẫn xuất của Resin: Ngâm 2-Chlorotriptyl chloride (0,5 g, 0,5 mmol) trong DCM khô (10 mL) khoảng 15 phút. Trong một bình khác, Fmoc-Met-OH (0,5 mmol) hoặc Fmoc-*N*-Me-Met-OH được hòa tan trong DCM khô và DIPEA (2,5 mmol) rồi cho vào bình chứa resin, rung lắc 2 giờ, thêm MeOH (2 mL) và rung lắc 30 phút. Sau đó, lọc và làm sạch Resin bằng DCM (3  $\times$  10 mL), DMF (3  $\times$  10 mL), DCM (3  $\times$  10 mL) rồi làm khô.

- Phương pháp tổng hợp bằng pha rắn:

+ Loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc: cho dung dịch 20% piperidine DMF (10 mL) vào Fmoc-peptidyl resin, rung lắc hỗn hợp phản ứng trong 10 phút. Tiếp theo

làm sạch và làm khô resin. + HBTU/HOBt - kết nối trung gian: ngâm Peptidyl CITrt resin (0,31 mmol) nở trong dung dịch DCM:DMF (6 mL, 1:1). Trong một bình khác, hòa tan Fmoc-axit amin (2 eq, 0,62 mmol), HBTU (2 eq, 0,62 mmol) và HOBt (2 eq, 0,62 mmol) trong dung dịch DCM:DMF (10 mL, 1:1). Tiếp theo, cho DIPEA (4 eq, 1,24 mmol) vào dung dịch không màu trên và hỗn hợp phản ứng được khuấy trộn trong 5 phút [11]. Sau đó, cho dung dịch này vào peptidyl CITrt resin và rung lắc từ 5-12 giờ rồi làm sạch và làm khô resin. Kiểm chứng sự kết thúc phản ứng hoàn toàn bằng TNBS test [12].

+ *N*-Methyl hóa trên Resin [7]: sau bước loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc, CITrt resin được làm sạch và làm khô. Trong một bình khác, hòa tan *o*-NBS (3 eq, 0,93 mmol) và 2,4,6-collidine (5 eq, 1,55 mmol) trong DCM (10 mL). Cho dung dịch này vào peptidyl CITrt resin và rung lắc 2 giờ. Sau khi làm sạch và làm khô, cho DMF (10 mL) và TBD (4 eq, 1,24 mmol) vào CITrt resin. Dung dịch DBU (5 eq, 1,55 mmol) và 2-mercaptoethanol (10 eq, 3,1 mmol) trong DMF (5 mL) được cho vào resin trên trong DMF (5 mL) và rung lắc khoảng 30 phút. Sử dụng Chloranil test để kiểm tra phản ứng kết thúc.

+ Tách Peptid khỏi Resin và tinh chế:

\* *Tách bỏ Resin khỏi mạch peptid tiền thân để phân tích phổ khối*: cho một lượng nhỏ hạt resin (1-2 mg) phản ứng với 3-5 giọt dung dịch TFA 2% trong DCM vào 1 ống Eppendorf khoảng 1-2 phút. Hạt resin sẽ chuyển sang màu đỏ tươi. Cô đặc hỗn hợp trên bằng dòng khí N<sub>2</sub> và hòa tan lại trong MeOH (0,6-1,0 mL), sau đó lọc để loại bỏ các hạt resin. Mẫu này dùng để chạy khối phổ ESIMS và MS/MS để kiểm chứng mạch peptid. Với F1, sau khi loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc có phổ M+1 2133.1, M+Na 2155.1 và *N*-methylated F1 có phổ M+1 2147.1, M+Na 2169.1.

\* *Tách đồng thời Peptid khỏi Resin/loại bỏ nhóm bảo vệ mạch nhánh*: loại bỏ nhóm bảo vệ *N*-cuối cùng của amin, làm sạch resin sau đó làm khô qua đêm. Cho Peptidyl CITrt resin (100 mg) phản ứng với dung dịch TFA/DTT/H<sub>2</sub>O/TIPS (95/2/2/1, 1 mL) khoảng 2-2,5 giờ trong môi trường khí N<sub>2</sub>. Tiếp theo, lọc, làm sạch lại resin bằng TFA (3 × 0.3 mL). Sau khi thể tích TFA được làm giảm bằng dòng khí N<sub>2</sub>, cho ether lạnh (-20°C, 5 mL) vào ống trên tạo thành chất kết tủa màu trắng. Quay li tâm peptid dạng huyền phù trên (-20 °C, 5mL), gạn cẩn thận lớp ether thu được peptid thô. Hòa tan peptid thô trong 30% ACN/nước và làm khô lạnh dung dịch trên, thu được peptid thô (40-50 mg).

\* *Phân tích và tinh chế bằng HPLC*: hòa tan Peptid khô trong dung môi 20% ACN:milliQ H<sub>2</sub>O

(10 mL), sau đó được lọc. Lấy 10 µL dung dịch trên làm mẫu chạy ESIMS nhằm kiểm chứng peptid tổng hợp có trong hỗn hợp thô trên (F1 có phổ M+H 1612.2, M+Na 1634.2; *N*-Me-F1 có phổ M+H 1626.2, M+Na 1648.2). Lấy 20 µL sản phẩm thô trên chạy phân tích HPLC, cột Apollo 5µ, C<sub>18</sub> (250 mm × 4,6 mm). Sản phẩm thô trên được rửa giải bằng gradient từ 0-60% buffer B (0,1% TFA trong ACN) trong buffer A (0,1% TFA in H<sub>2</sub>O) trong 60 phút với tốc độ dòng 0,5 mL/phút, bước sóng 220 nm. Thu lại các mẫu tách tương thích và làm lạnh khô, thu được F1 (8%) và *N*-Me-F1 (5,5-8,0%). Lấy peptid sau khi làm khô để chạy phân tích với độ tinh khiết là 92,5-100%.

- Phương pháp xét nghiệm sinh học:

+ Phản ứng miễn dịch liên kết enzyme (ELISA): sử dụng 100 µl F1 gắn biotin hoặc R1 để phủ 96 giếng khoang nhựa phủ streptavidin (Peirce) ở nồng độ 2 µg/ml (1,2 µM). Các kháng nguyên được pha trong buffer (0,1% albumin huyết thanh bò, 0,05% Tween 20 trong phosphate buffered). Các đĩa được ủ tĩnh qua đêm ở 4°C, sau đó rửa sạch bốn lần với 200 µl dung dịch rửa đệm. 3D7 AMA1 được tăng liều từ 1 µg/ml (~ 15 nM) trong dung dịch đệm rửa và 100 µl của kháng nguyên được ủ trong các giếng cho 1,5 giờ. Để đánh giá khả năng liên kết 3D7 AMA1 với immobilized peptid, 100 µl huyết thanh đa giá thô chống lại 3D7 AMA1 và pha loãng 1/3.000 trong dung dịch đệm rửa đã được áp dụng vào từng giếng và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. 100 µl horseradish peroxidase liên hợp chống kháng thể thô (Chemicon) đã được pha loãng 1/2.000 trong đệm rửa, sau đó áp dụng cho từng giếng và ủ trong 1 giờ. 150 µl chất nền ABTS (0,98 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic axit), axit citric 0,98 mM và 0,003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) đã được thêm vào từng giếng và ủ trong 45 phút trước khi phân tích quang phổ ở 414 nm. 100 µl peptid ức chế/hỗn hợp AMA1 được áp dụng vào các giếng chứa immobilized F1 hoặc R1 peptid.

+ Phân tích cộng hưởng Plasmon bề mặt (SPR):

\* *Lượng tối thiểu để gắn biotin*: AMA-1 (3D7) protein được thay đổi dung dịch đệm bởi kích thước sắc kí trên cột Superdex x 200 (10/300 GL) trước cân bằng trong dung dịch đệm HBS-P (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20). Các peak monomer protein được thu lại và được cô đặc bằng máy li tâm Pall Nanosep Omega (MWCO = 3 kDa) bằng cách quay 14.000 x g trong ~ 10 phút. Lượng AMA1 (3D7) cô đặc (~5 × 10<sup>-10</sup>) là gắn biotin "tối thiểu" trên đá lạnh trong 2 giờ, sử dụng tỉ lệ 1: 1 của EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Pierce) và AMA1 (3D7) protein.



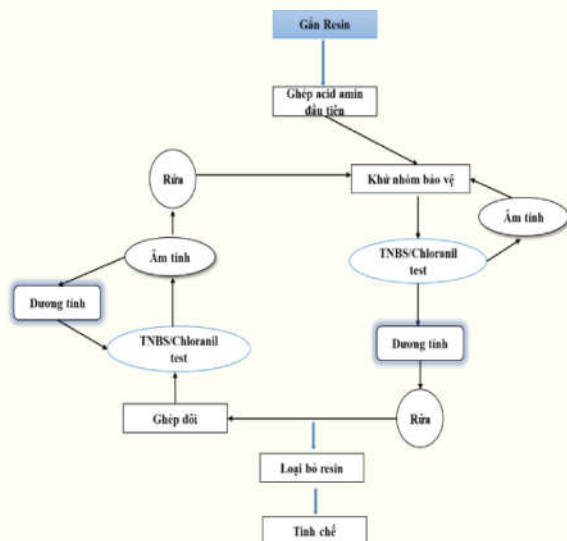
\* *Biotin CAPture Chip tải và chụp của biotinylated AMA1 (3D)*: các Biotin chip cảm biến CAP được nạp chạy với dung dịch đệm HBS-P (10 mM HEPES; pH 7,4; 150 mM NaCl, 0,005% (v/v) polysorbate 20). Tiêm các giải thuốc thử trên tất cả 4 cell dòng chảy trong 5 phút, tốc độ dòng 2 ml/phút ở 25°C dẫn đến lượng cố định của ~3.600 RU trên tất cả 4 cell dòng chảy (1 RU = 1 pg protein/mm<sup>2</sup>). Các AMA1 biotinylated (3D7) được pha loãng đến ~1 mg/ml và tiêm với tốc độ 10 µL/phút với lượng nhỏ aliquots trên dòng cell 2 cho đến khi đạt mức độ mong (~2.000 RU).

\* *Thí nghiệm liên kết SPR và phân tích dữ liệu*: tất cả các thí nghiệm liên kết SPR được thực hiện ở 25°C trong dung dịch đệm liên kết SPR (50mM HEPES, pH7,4, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween20, 5% (v/v) DMSO). Đầu tiên hòa tan các peptid trong DMSO 100% với 50 mM, sau đó pha loãng 2 lần từ 64 µM tới 1 µM. Loạt mẫu này bao gồm cả mẫu “zero buffer blank” được lần lượt tiêm tại 60 µL/min qua chip cảm biến CAP chứa AMA1 gắn biotin (3D7). Theo dõi giai đoạn peptid liên kết và phân ly với thời gian tương ứng là 30 giây và 60 giây.

- Các kĩ thuật thực nghiệm thực hiện tại Phòng thí nghiệm Khoa Hóa, Trường Đại học La Trobe, thành phố Melbourne, Australia, từ tháng 01/2006 đến tháng 11/2010.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

#### 3.1. Tổng hợp peptid theo pha rắn



Hình 3. Sơ đồ tổng hợp peptid [8].

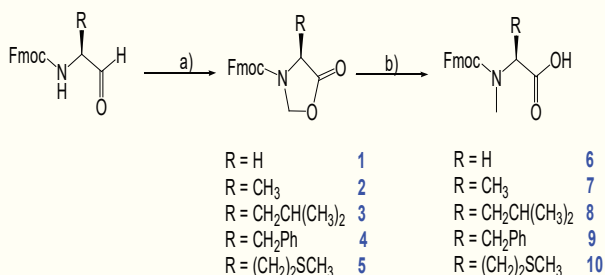
Hình 3 mô tả các nguyên tắc chung của SPSS là một trong những chu kì lặp đi lặp lại của các mối ghép đôi-rửa-khử bảo vệ-rửa [8]. Điển hình là

*N*-cuối cùng của amine của peptid gắn trên pha rắn đã tự do ghép đôi với một axit amin có *N*- được bảo vệ [9]. Tiếp theo là quá trình khử bảo vệ của chất này để tạo thành một *N*-cuối cùng mới của amine mà một axit amin khác có thể được ghép đôi. Các bước ghép đôi và khử bảo vệ được lặp đi lặp lại và kiểm tra cho đến khi tất cả các axit amin trong chuỗi peptid đã thêm vào và peptid mong muốn được tạo thành sau khi loại bỏ resin.

#### 3.2. Tổng hợp peptid chống SR F1 và các dẫn xuất *N*-Methylated-scan của F1 bằng pha rắn

##### 3.2.1. Tổng hợp các *N*-Methylated axit amin bằng pha lỏng

Bước đầu tiên của nghiên cứu này là tổng hợp các *N*-methylated peptid. Fmoc-*N*-methylated của 5 axit amin kỵ nước (Gly, Ala, Leu, Phe, Met) được tổng hợp thành công thông qua sự tạo thành oxazolidinone [10] tương ứng **1-5** (sơ đồ 1) cho hiệu suất phản ứng tốt (80-92%) (bảng 1) trong lò vi sóng (2.450 MHz) từ 3-5 phút, với việc sử dụng các dung môi như toluen, xúc tác PTSA và một lượng dư của paraformaldehyde.



Sơ đồ 1. Tổng hợp *N*-Methyl axit amin. a) (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>, xúc tác PTSA, toluene, lò vi sóng 2450 MHz, 3-5 phút; b) Et<sub>3</sub>SiH, BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, DCM.

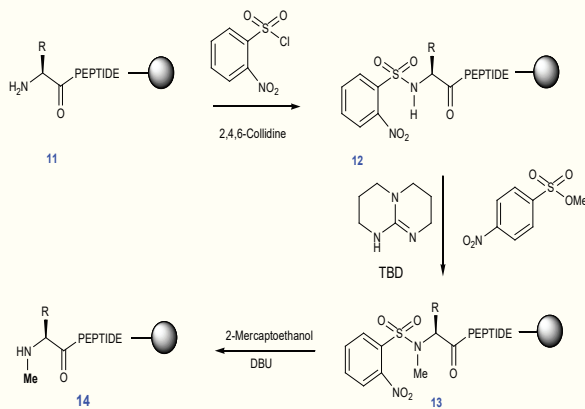
Giai đoạn tiếp theo, tách khử 5-oxazolidinones 1-5 để tạo thành *N*-methyl axit amin 6-10 với hiệu suất phản ứng cao (85-95%) (bảng 1) bằng cách cho phản ứng với Et<sub>3</sub>SiH và các axit Lewis BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O trong dichloromethane (DCM).

Bảng 1. Hiệu suất phản ứng tổng hợp *N*-Methyl-α-axit amin qua Oxazolidinones

Axit amin	Oxazolidinones		<i>N</i> -Methyl-α-axit amin	
	STT chất	% hiệu suất	STT chất	% hiệu suất
Fmoc-Gly	1	80	6	90
Fmoc-L-Ala	2	90	7	91
Fmoc-L-Leu	3	90	8	93
Fmoc-L-Phe	4	92	9	85
Fmoc-L-Met	5	80	10	95

3.2.2. Tổng hợp N-Methylated axit amin bằng pha rắn

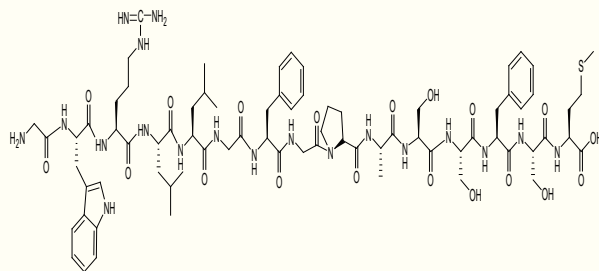
Phương pháp trong phần 3.2.1 không áp dụng được cho các Fmoc-axit amin có nhóm chức ở mạch nhánh, mặc dù, nhóm chức đã được bảo vệ vì trong điều kiện phản ứng có tính axit khi tham gia quá trình tách khử thì các nhóm bảo vệ đó sẽ bị phá vỡ. Do đó, phương pháp ba bước của Miller và Scanlan [7] dùng trong tổng hợp N-methylated axit amin bằng pha rắn đã được ứng dụng cho các axit amin còn lại (Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH). Resin-peptid 11 (sơ đồ 2) với Fmoc đã được loại bỏ cho phản ứng với o-NBS và 2,4,6-collidine tạo thành hợp chất 12. Tiếp theo, hợp chất 12 phản ứng với methyl p-nitrobenzenesulfonate với sự có mặt của TBD tạo thành hợp chất 13. Gỡ bỏ nhóm o-nosyl bằng phản ứng với 2-mercaptoethanol và bazơ (DBU) tạo thành amin bậc 2 N-Me trong hợp chất 14 và các bước ghép đôi tiếp theo để nối dài mạch peptid được tiếp tục thực hiện [7].



Sơ đồ 2. Tổng hợp N-Methyl-F1 "trên resin".

3.2.3. Tổng hợp F1 và các dẫn xuất N-Methylated F1

Sơ đồ 3 mô tả cấu tạo, thứ tự liên kết của Peptid F1 gồm 15 axit amin. Sau khi axit amin cuối ghép vào mạch peptid, resin và các nhóm bảo vệ nhóm chức được loại bỏ và tinh chế bằng HPLC.



Sơ đồ 3. Cấu trúc của peptid F1.

Các dẫn xuất của F1 với một N-Methyl của mỗi axit amin trừ Arg-3, Leu-4 và Pro-9 được tổng hợp ở bảng 2. Proline chứa amin bậc 2 nên nếu N-Me ở Pro-9 thì sẽ chấm dứt các liên kết tiếp của

peptid. N-Me-Arg-3 and N-Me-Leu-4 không tổng hợp thành công do có sự khó liên kết giữa resin-bound N-methylated peptid với các axit amin bên cạnh (Trp, Arg). Do đó F1 và 12 N-methylated dẫn xuất của F1 được tổng hợp riêng rẽ bằng phương pháp tổng hợp peptid bằng pha rắn như sự khởi đầu của "N-methyl scan."

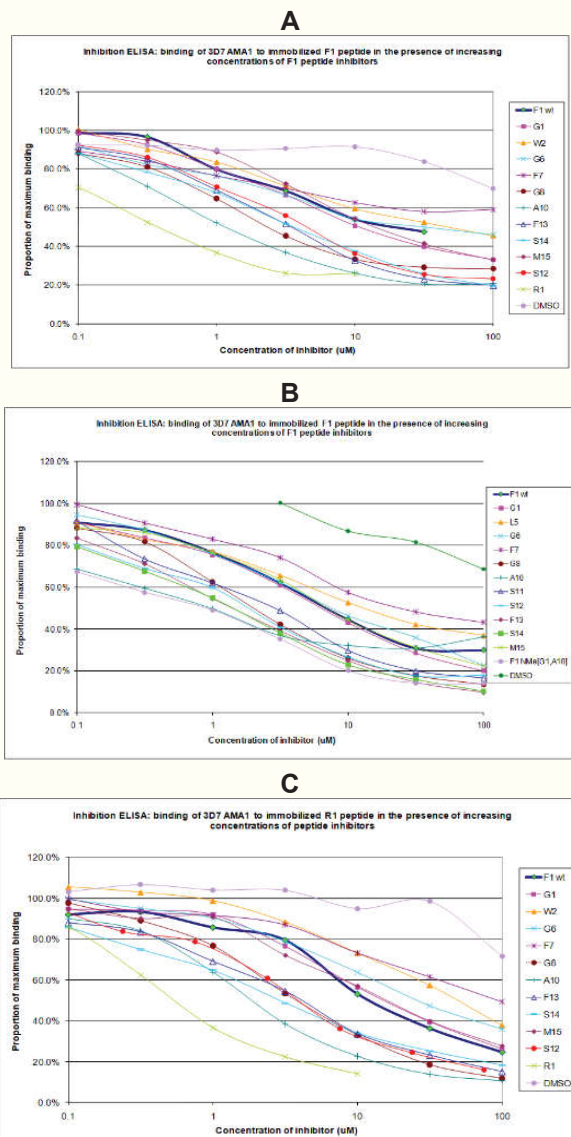
Bảng 2. Thứ tự liên kết của F1 và các N-Methylated F1.

Peptid	Trình tự liên kết
Native F1	GWRLLGFGPASSFSM
N-Me-Gly-1	(N-Me)GWRLLGFGPASSFSM
N-Me-Trp-2	G(N-Me)WRLLGFGPASSFSM
N-Me-Leu-5	GWRL(N-Me)LGFGPASSFSM
N-Me-Gly-6	GWRL(N-Me)GFGPASSFSM
N-Me-Phe-7	GWRLG(N-Me)FGPASSFSM
N-Me-Gly-8	GWRLLG(N-Me)GPASSFSM
N-Me-Ala-10	GWRLLGFGP(N-Me)ASSFSM
N-Me-Ser-11	GWRLLGFGPA(N-Me)SSFSM
N-Me-Ser-12	GWRLLGFGPAS(N-Me)SFSM
N-Me-Phe-13	GWRLLGFGPASS(N-Me)FSM
N-Me-Ser-14	GWRLLGFGPASSF(N-Me)SM
N-Me-Met-15	GWRLLGFGPASSFS(N-Me)M

3.3. Phản ứng miễn dịch liên kết enzyme (ELISA)

Một lượng không đổi F1 phage (hình 4A và 4B) và R1 phage (Hình 4C) tương tác với immobilized 3D7 AMA1 với nồng độ ngày càng tăng của F1 và dẫn xuất N-Me-F1 peptid. Các đồ thị cho thấy một loạt những thay đổi trong hoạt động liên kết của N-Me-F1 với AMA1. Khả năng liên kết của R1 với AMA1 lớn hơn so với khả năng liên kết với AMA1 của F1 và các dẫn xuất N-Me-F1.

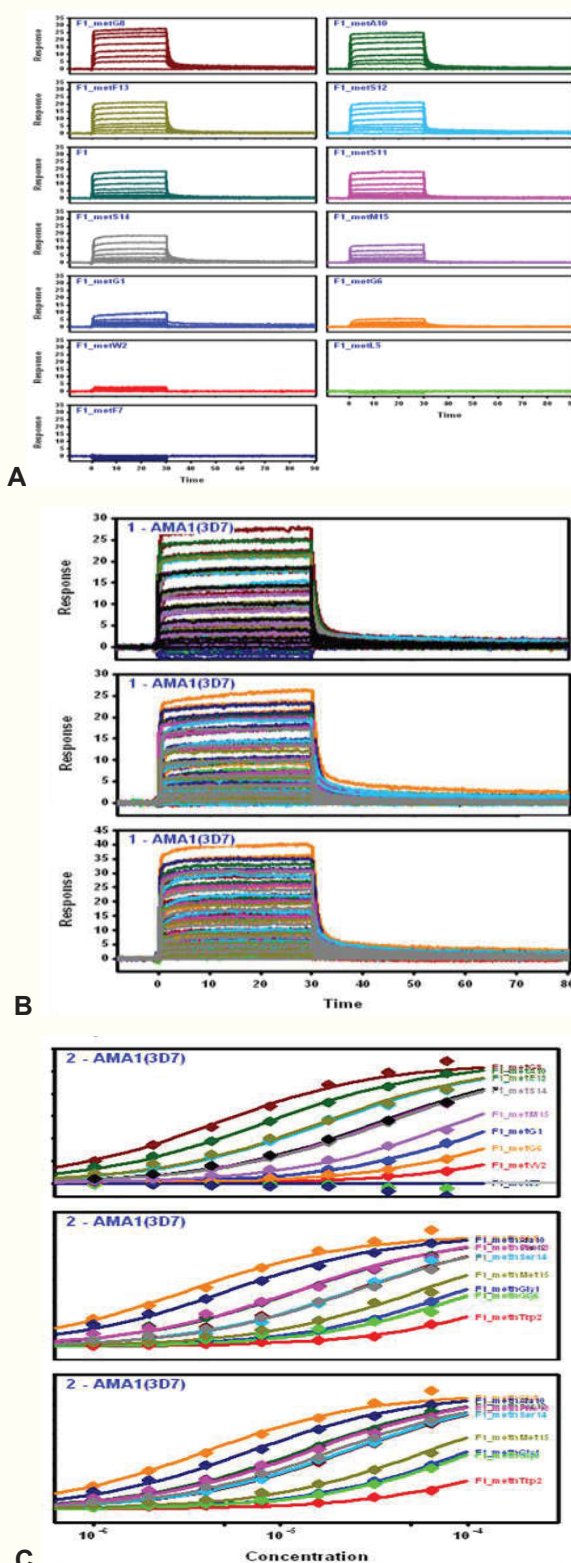
Dựa vào các ảnh hưởng của sự methyl hóa, các peptid có thể được chia thành ba loại: Các dẫn xuất N-Me-F1 có khả năng ức chế cao hơn so với F1 wt là G8, A10, S11, S12, F13 và S14. Điều đó có thể khẳng định rằng các dẫn xuất N-Me-F1 trong vùng các axit amin từ 8-14 cho kết quả tăng ái lực liên kết. Hình 4A cũng chỉ rõ peptid N-Me-A10 có ảnh hưởng lớn nhất trong liên kết với AMA1. Peptid có 2 axit amin đã methyl hóa ở vị trí G1, A10 (Hình 4B) cho thấy mức độ ức chế cao nhất, điều đó là phù hợp với dẫn xuất đơn N-Me-A10 peptid. Các peptid đã methyl hóa ở axit amin W2, L5 và F7 làm giảm ái lực liên kết với AMA1. Trong thí nghiệm này, các peptid đã methyl hóa ở G1, G6 và M15 cho kết quả liên kết với AMA1 tương tự như của peptid F1.



Hình 4 So sánh khả năng liên kết của F1, R1 và các dẫn xuất N-Me-F1 với AMA1. Tên các peptid tương ứng với vị trí axit amin đã N-methyl hóa.

3.4. Phân tích cộng hưởng Plasmon bề mặt (SPR):

Liên kết cảm biến gram SPR của mỗi peptid với AMA1 được thể hiện ở Hình 5A. Hình ảnh cũng cho thấy rõ sự gia tăng liên kết thể hiện ở tăng biên độ liên kết chặt chẽ của peptid G8 and A10 với AMA1 trong khi L5 và F7 không có sự liên kết với AMA1. Các peptid còn lại có những dấu hiệu tương tác với AMA1, một số peptid có khả năng liên kết yếu. Cụ thể, liên kết cảm biến gram đã cho kết quả như sau: Các peptid W2, G6, G1 và M15 đã không đáp ứng đủ yêu cầu cho độ phù hợp chính xác của các liên kết ở mức cân bằng cho tỉ lệ đơn giản (1:1) liên kết đẳng nhiệt. Về số học ái lực, liên kết của tất cả các peptid F1 được tính dựa trên số liệu liên kết phù hợp với giá trị cố định R<sub>max</sub> (khả năng liên kết tối đa immobilized AMA1 với peptid F1) và từ thực nghiệm cho các peptid có liên kết tốt nhất, G8 và A10 (Hình 5B, 5C).



Hình 5 (A) Kết quả liên kết của F1 và các dẫn xuất N-Me-F1 với AMA1. (B) Màng bảo vệ liên kết cảm biến gram của F1 liên kết với AMA1. (C) Tương tác ở mức cân bằng T=25-28 giây, Đồ thị dựa vào nồng độ của các peptid cho tỉ lệ đơn giản 1:1 liên kết đẳng nhiệt.



Kết quả ái lực liên kết từ 3 phản ứng liên kết được trình bày trong bảng 3, dưới dạng trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn. Kết quả cho thấy, độ tăng ái lực liên kết của F1 (15 mer) từ G8, A10, S12 và F13 methyl hóa với kết quả tốt nhất ở G8, điều đó có thể do các axit amin kỵ nước gần G8 đã làm tăng ái lực liên kết của hệ thống methyl hóa.

**Bảng 3. Ước tính ái lực ( $K_D$ ) cho Methylated F1 liên kết với AMA1 (3D7) được xác định tại 25°C (n = 3, lặp lại thí nghiệm 3 lần).**

Peptide	$K_D$ ( $\mu$ M)	Rank
<b>G8</b>	<b>3,5 <math>\pm</math> 0,4</b>	<b>1</b>
<b>A10</b>	<b>6,0 <math>\pm</math> 0,8</b>	<b>2</b>
S12	12,4 $\pm$ 0,4	3
F13	12,5 $\pm$ 1,5	4
<b>F1</b>	<b>22,0 <math>\pm</math> 3,1</b>	<b>5</b>
S14	23,4 $\pm$ 1,3	6
S11	23,5 $\pm$ 0,6	7
M15	55,7 $\pm$ 2,9	8
G1	99,2 $\pm$ 5,4	9
G6	140 $\pm$ 44	10
W2	335 $\pm$ 86	11
L5	No binding	12
F7	No binding	13

#### 4. KẾT LUẬN

F1 và 12 dẫn xuất methyl hóa *N*-methylated của F1 đã được tổng hợp thành công bằng phương pháp tổng hợp SPPS. Các thử nghiệm sinh học ban đầu của các peptid này cho kết quả khả quan với 6 *N*-Me-F1 peptid có ái lực liên kết với AMA1 cao hơn so với F1.

Các kĩ thuật quét (scan) *N*-methyl hóa được mô tả trong nghiên cứu này có thể áp dụng cho tất cả 20 axit amin phổ biến và các axit amin không có trong tự nhiên.

Kĩ thuật này kết hợp với hiển thị phage thư viện các peptid có thể cung cấp một phương pháp có khả năng cung cấp các peptid/protein ứng dụng trong điều trị và còn có thể tối ưu hóa được động học của các phân tử.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. WHO (2023), *WHO recommends R21/Matrix-M vaccine for malaria prevention in updated advice on immunization.*
2. Christopher A.M, Robin F.A, Michael F, Raymond S.N (2011), "Apical membrane antigen 1 as

an anti-malarial drug target", *Curr. Top. Med. Chem.*, 11(16), 2039-47.

3. Scanlon D, Harris K.S, Coley A.M, Karas J.A, Casey, J.L., Hughes, A.B., Foley, M. (2008), "Comprehensive *N*-Methyl scanning of a potent peptide inhibitor of malaria invasion into erythrocytes leads to pharmacokinetic optimization of the molecule", *Int. J. Pept. Res. Ther.* 14, 381-386.
4. Harris K.S, Casey J.L, Coley A.M, Karas J.A, Sabo J.K, Tan Y.Y, Dolezal O, Norton R.S, Hughes A.B, Scanlon D, Foley M, (2009), "Rapid optimization of a peptide inhibitor of malaria parasite invasion by comprehensive *N*-Methyl scanning", *J. Biol. Chem.*, 284, 9361-9371.
5. Keizer D.W, Miles L.A, Li F, Nair M, Anders R.F, Coley A.M, Foley M, Norton R.S (2003), "Structures of phage-display peptides that bind to the malarial surface protein, apical membrane antigen 1, and block erythrocyte invasion", *Biochem.* 42, 9915-9923.
6. Aurelio L, Hughes A.B (2009), "Synthesis of *N*-Alkyl amino acids", *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany*, Vol. 1, 2652-2667.
7. More J.M.R (2004), "Peptide Library Synthesis. Laboratory", *UCSF.*
8. Aurelio L, Brownlee R.T.C, Hughes A.B, Sleebs B.E (2000), "The facile production of *N*-Methyl amino acids via oxazolidinones", *Aust. J. Chem.*, 53, 425-433.
9. Moore J.M.R, Galicia S.J, McReynolds A.C, Nguyen N.H, Scanlan T.S, Guy R.K, (2004), "Quantitative proteomics of the thyroid hormone receptor-coregulator interactions", *J. Biol. Chem.*, 279, 27584-27590.
10. Aurelio L, Brownlee R.T.C, Hughes A.B (2004), "Synthetic preparation of *N*-methyl-alpha-amino acids", *Chem. Rev.*, 104, 5823-5846.
11. Albericio F, Kates S.A, (2000), "Coupling methods: solid-phase formation of amide and ester bonds"; *Marcel Dekker, Inc.*: New York.
12. Di Fenza A, Tancredi M, Galoppini C, Rovero P, (1998), "Racemization studies of Fmoc-Ser(tBu)-OH during stepwise continuous-flow solid-phase peptide synthesis", *Tetrahedron Lett.*, 39, 8529-8532. □