

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ” – ВАРНА

ФАКУЛТЕТ ФАРМАЦИЯ

КАТЕДРА ХИМИЯ

Силвия Георгиева Михайлова

**СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧНА ОЦЕНКА НА ПЕПТИДНИ
КОНЮГАТИ SMAC-NT С КОМБИНИРАНО
АНТИНЕОПЛАСТИЧНО И АНАЛГЕТИЧНО ДЕЙСТВИЕ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор“ по научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества”

Научни Ръководители:

доц. Тамара И. Пайпанова, дх

доц. Калоян Д. Георгиев, дх

Официални рецензенти:

Проф. инж. Емилия Д. Найденова, дх

Доц. Илиян Н. Колев, дх

Варна, 2019

Дисертационният труд съдържа 148 страници и е онагледен с 40 фигури, 17 таблици, 10 схеми и 14 приложения. Литературната справка включва 177 литературни източници, от които 4 на кирилица и 173 на латиница. Номерацията на фигурите и таблиците в автореферата съответства на тази от дисертацията.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на разширен катедрен съвет на Катедра „Химия“ при МУ ”Проф. Д-р Параскев Стоянов” – Варна на 25.07.2019 година и е насочен за публична защита пред Научно жури в състав:

Проф. инж. Емилия Димитрова Найденова, д.х.

Проф. Любомир Евстатиев Македонски, д.х.

Доц. Тамара Иванова Пайпанова, д.х.

Доц. Доц. Галина Симеонова Радева, д.б.

Доц. Илиян Николов Колев, д.х.

Експерименталната работа е извършена в Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев” - БАН, секция: „Молекулен дизайн и биохимична фармакология”. Проучването за аналгетична активност е проведено в Института по невробиология – БАН, под ръководството на доц. Танчева. В процеса на работа получихме ценна методична и практическа помощ от колегите, работещи в съответните звена, за което им изказваме най - искрената си благодарност.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 12.12.2019г. от 11.30 часа в аудитория 104, Факултет „Фармация“ на открито заседание на Научното жури.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

2-CT	2-хлоротритил хлоридна смола
СЗО	Световна здравна организация
СЧТ	Стомашно-чревен тракт
AVPI	Тетрапептид Ala-Val-Pro-Ile
BBB	Кръвно-мозъчна бариера
Vcl-2	В-клетъчен лимфом/левкемия-2 протеин
Woc	третична бутилоксикарбонилна група
Bzl	Бензил
DCC	Дициклохексилкарбодиимид
DCE	дихлоретан
DIC	диизопропилкарбодиимид
DCM	Дихлорметан
DIPEA	Диизопропилетиламин
DMAP	4-Диметиламинопиридин
DMF	N-диметилформаид
EDAC	N-(3-Диметиламинопропил)-N'-етилкарбодиимид
EtOAc	Етилацетат
EtOH	Етанол
Fmoc	9-флуоренилметилоксикарбонилна група
HOBT	1-хидроксibenзотриазол
HF	Флуороводород
IAPs	Протеини, инхибитори на апоптозата
i-PrOH	2-пропанол
MTT	3-(4, 5-диметилтиазол-2-ил)-2, 5-дифенилтетразол бромид
n-BuOH	1-бутанол
NT	Невротензин
OSu	N-хидроксисукцинимиден естер
PyBop	Бензотриазол-1-ил-окси-трис-пиролидинофосфониев хексафлуорофосфат
SMAC	Втори, митохондриален активатор на каспази
SPPS	Твърдофазен пептиден синтез
TBTU	Бензотриазолил-тетраметилурониев тетрафлуороборат
t-Bu	третична бутилова група
TFA	трифлуороцетна киселина
TNF _α	тумор некротизиращ фактор алфа
Trt	трифенилметил (тритил)

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Съвременните епидемиологични анализи показват бързо нарастване на броя и относителния дял на пациентите с неопластични заболявания, всяка година в света се диагностицират около 14 млн. пациенти.. В публикация „Здравеопазване 2017”, НСИ посочва онкологичните заболявания като втората причина за смъртност на населението след болестите на органите на кръвообращението. Постиженията в молекулярната диагностика и персонализираната медицина дават възможност за прецизиране на терапевтичните схеми. В зависимост от вида и прогресията на тумора, съществуват различни типове терапевтични модалности. Отличителен белег на неопластичните клетки е тяхната висока резистентност към апоптоза. Целта на прилаганата фармакотерапия е да се ограничи туморния растеж (клетъчната пролиферация) или да се предизвика апоптоза на неопластичните клетки. В бъдеще таргентните терапии ще са водещи при лечението на голяма част от пациентите с неопластични заболявания, т.к. при прилагането им се увеличава възможността за благоприятен изход от заболяването, намаляват се нежеланите лекарствени ефекти върху здравите клетки, постига се по-добър клиничен ефект и по-добро качество на живот.

Проведени са редица предклинични проучвания от различни авторски колективи, които показват, че свръхекспресията на SMAC в неопластични клетки води до тяхната апоптоза. В този смисъл SMAC-миметиците следва да се разглеждат като нов клас таргентни лекарства с антинеопластична активност, които притежават способността да антагонизират протеините - инхибитори на апоптоза (IAPs).

През 1986 г. СЗО публикува относително прост алгоритъм за овладяване на болката, известен като "Аналгетична стълба на СЗО". Въпреки това, недостатъчно доброто контролиране на болката с опиоидни аналгетици и ограничените алтернативи за управление на хронична болка, продължават да бъдат нерешени проблеми в онкологичната практика по света. За подобряване фармакологичното повлияване на болката и минимизиране на специфичните странични ефекти от по-високите дози опиоидни аналгетици, учените търсят нови мултицелеви подходи, според които аналгетиците трябва да взаимодействат с различни рецептори, участващи в предаването и модулирането на болката.

Невротензинът е пептид, изграден от 13 аминокиселинни остатъка, открит както в централната нервна система (ЦНС), така и в периферните тъкани. пептид с широк спектър на биологична активност. В мозъчните структури той участва в налоксон-независимата антиноцицепция и се очертава като важен модулатор в регулацията на болката. Активният фрагмент на NT е C-крайната последователност от шест аминокиселинни остатъка Arg⁸-Arg⁹-Pro¹⁰-Tyr¹¹-Ile¹²-Leu¹³. Нативният невротензин не се използва в клиничната практика поради много краткия плазмен полуживот ($t_{1/2} \sim 3$ минути) и слабото преминаване през хемато-енцефалната бариера, което определя ниската му бионаличност.

През последните години се налага един нов подход в лекарствения дизайн - комбинирането на два или повече фармакологични ефекта в един лиганд. Актуална потребност за лечението на пациенти с онкологични заболявания е създаването на фармакологични средства с двойно действие – апоптотично и аналгетично.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Цел: Получаване на нови пептидни конюгати SMAC-NT, прилагане на подходящи аналитични методи за тяхното охарактеризиране и първоначален скрининг за потенциално антинеопластично и аналгетично действие.

Въз основа на целта се поставиха следните задачи:

1. Синтез на защитени АК, необходими за вграждането им в целевите пептидни аналози.
2. Синтез на SMAC-пептидни аналози.
3. Синтез на NT (8-13) аналози.
4. Синтез на нови SMAC-NT пептидни конюгати с подходящо подбрана структура.
5. Охарактеризиране на новосинтезираните пептидни аналози.
6. Определяне на стабилността на получените съединения при различни физиологични условия и след съхранение.
7. Определяне на молекулни дескриптори от “Правилото 5 на Липински” (Ro5).
8. Първоначален скрининг за потенциално цитотоксично и аналгетично действие.

III. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

1. МЕТОДОЛОГИЯ

1.1. Апаратура за пептиден синтез - автоматичен пептиден синтезатор **Activo P14** (Activotec, Cambridge, UK); мануален пептиден синтезатор **RWTH** (Aachen, Germany); лиофилизатори **Telstar Cryodos** (Telstar Industrial S.L., Spain) и **Lyovac GT2** (Leibold-Heraeus GmbH, Germany).

1.2. Реактиви

1.2.1. Използвани аминокиселини

α -Fmoc-защитените АК: Fmoc-L-Phe(p-F)-OH; Fmoc-L-Cav(Boc)-OH; Boc-L-Cav(Boc)-OH са синтезирани в Институт по молекулярна биология, „Акад. Румен Цанев” - БАН, секция: „Молекулен дизайн и биохимична фармакология”.

α -Fmoc-защитените АК: Fmoc-L-Phe-OH; Fmoc-L-Pro-OH; Fmoc-L-Val-OH; Fmoc-L-Ala-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-L-Leu-OH; Fmoc-L-Lys(Boc)-OH са закупени от Merck (Germany) и Iris Biotech GMBH (Germany).

1.2.2. Реагенти пептиден синтез

Всички разтворители и реагенти, използвани в експерименталната работа, са с висока степен на чистота („Analytical grade” или „HPLC-grade”).

Реагенти: Fmoc-OSu (Iris Biotech GmbH, Germany); (Boc)₂O (Fluka);

Кондензиращи реагенти: TBTU, HOBT, PyBop (Iris Biotech GmbH, Germany), EDAC (Merck);

Бази: DIPEA (Fluka), Et₃N (Ferak), NaHCO₃.

Органични разтворители: DCE (Merck); DCM (Merck); бензен (Merck); MeOH (Merck); EtOH (Merck); EtOAc (Merck); 2-пропанол (Merck); (C₂H₅)₂O; DMF (Merck); 20% Piperidin (Merck); 20% Piperidin/DMF (20 ml Piperidin в 80 ml DMF); TFA (Merck); 1 % TFA / DCM (0,66 ml 99 % TFA + 99,34 ml DCM);

Нинхидринов разтвор: 5g нинхидрин разтворен в 50 ml 2N CH₃COOH и 950 ml n-BuOH;

Хлорна среда: к.НCl и KMnO₄;

Райндal: 10 g N,N,N',N'-тетраметил- 4,4'-диамино-дифенилметан разтворен в 30 ml CH₃COOH, полученият разтвор се разрежда с 600 ml вода и се прибавят 5 g KI;

Смоли: 2-хлоротритил хлоридна смола (Iris Biotech GmbH, Germany); H-L-Leu-Chlorotritylchloride resin (Iris Biotech GmbH, Germany);

1.2.3. Буферните разтвори, използвани при определяне на хидролитична стабилност са приготвени според European Pharmacopoeia, 6th Edition:

(i) буферен разтвор с pH 2.0 – 6.57g KCl се разтварят във вода, свободна от CO₂ и се прибавят 119.0ml 0.1mol/l HCl. Полученият разтвор се долива с H₂O до 1000.0ml

(ii) буферен разтвор с pH 7.4 – 2.38g Na₂HPO₄, 0.19g KH₂PO₄ и 8.0g NaCl се разтварят в дестилирана вода. Долива се с H₂O до 1000.0ml.

(iii) буферен разтвор с pH 9.0 – смесват се 1000.0ml от разтвор I и 420.0ml от разтвор II разтвор I: 6.18g H_3BO_3 се разтварят в 0,1mol/l KCl и се разрежда до 1000.0ml със същия разтворител; разтвор II: 0.1mol/l NaOH

1.2.4. Реагенти за определяне на цитотоксичност

DMEM (Dulbecco Modified Eagle's medium) (Gibco, Austria) с добавен 10% фетален телешки серум (Gibco, Austria), 100 U/ml пеницилин (Lonza, Belgium) и 0,1 mg/ml стрептомицин (Lonza, Belgium); пластмасови фласки (Greiner, Germany); трипсин/EDTA (Flow Lab, Australia); МТТ (3-(4, 5-диметилтиазол-2-ил)-2, 5-дифенилтетразол бромид) (Sigma Chemical Co.); L-глутамин, стерилен фосфатен буфер (PBS), мравчена киселина, етилов алкохол – 96%, метанол, изопропанол (Merk, Germany); диметилсулфоксид (DMSO) (Sigma Chemical Co.); S-буфер (1M сорбитол, 25 mM NaH_2PO_4 , pH 6,5) (Sigma Chemical Co.); лизис разтвор (146 mM NaCl, 30 mM EDTA, pH 8,1 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1% N-lauroylsarcosine; pH 9) (Sigma Chemical Co.); SYBR green (Molecular Probes Inc.); Tris-borate-EDTA (TBE) буфер за 5x концентриран р-р (54 g Tris base, 27.5 g boric acid, 20 mL от 0.5 M EDTA (pH 8.0), дейонизирана вода до 1L) (Sigma Chemical Co.);

1.3. Методи за пречистване на синтезираните пептиди

1.3.1. Колонна гел-хроматография

Използвана е за пречистване на пептидите от техните соли чрез гел-филтрация върху Sephadex G-25 (колони 2.7cm x 110 cm) с елуент 10% CH_3COOH и скорост на потока 10 ml/h. Количество от по 5ml се събира в отделни епруветки. Чистите пептидни фракции се определят чрез нанасяне на проби върху хроматографска плака. След събиране на чистите пептидите фракции, те се лиофилизират

до сухо на апарат Telstar Cryodos-80 при температура -50°C и се съхраняват при -20°C .

1.3.2. Тънкослойна хроматография (TLC)

Използвана е при пречистване на пептидите, за тяхното качествено доказване, с цел събирането на отделните фракции. За визуализиране на тънкослойните хроматограми е използван **UVIS** (Cole Parmer, USA), хроматографска плака DC-Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck), количество на нанесената проба – 10 μl , разстояние за развиване на хроматограмата – 10-12 cm, подвижни фази: система $\text{ST}_1\text{-CHCl}_3\text{:MeOH:H}_2\text{O}$ (80:30:5); система **BAO** - $\text{C}_6\text{H}_6\text{:AcOH:CH}_3\text{COOH}$ (100:50:2); система **BAW** – $\text{n-BuOH:CH}_3\text{COOH:H}_2\text{O}$ (4:1:5) при дължина на вълната 220 nm.

1.3.3. Лиганд-обменна хроматография

Използвана е както за хиралното разделяне на D,L-Phe (4-F)-OH, така и за доказване на оптичната чистота на отделните енантиомерни форми на аминокиселината. Осъществена е с помощта на HPLC с UV-детекция на течен хроматограф HEWLETT PACKARD, HP 1090. Колона RP 5 μm , 4,6mm x 100mm с неподвижна фаза силикагел + 3-глицидоксипропилтриметокси силан + L-Нурго.

Колоната е предоставена от проф. Гералд Гюбиц, Институт по фармацевтични науки, Университет Карл-Францес, Грац, Австрия.

1.4. Методи за оценяване на химическа чистота

1.4.1. Високоэффективна течна хроматография (RP-HPLC)

RP-HPLC е използвана за оценяване химическата чистота на синтезираните аминокиселини и пептиди. Измерванията са проведени с помощта на течни хроматографски системи - LKB Bromma (Sweden) и Waters Alliance (Waters Corporation, USA) снабдени с фотодиоден детектор. Използвана е хроматографска колона XTerra® MS RP-C18, 125Å, 3.5 µm, 3 mm x 150 mm. Хроматографски условия: система за изократно елуиране, съставена от ACN/0.05%TFA 5/95 (v/v) при температура 25°C, скорост на потока 0.5 ml/min. Обем на инжектираните проби – 20 µL. UV-детекцията е проведена при аналитична дължина на вълната 220 nm.

1.4.2. Капилярна електрофореза (CE)

CE е използвана за определяне чистотата на синтезираните небелтъчните аминокиселини и на избрани олигопептидите. Хроматографски условия: работен буфер: 20 mM Tris, 5mM H₃PO₄, 50 mM SDS (sodium dodecyl sulfate), pH=7; капиляра 40 cm x 50 µm с ефективна капилярна дължина 29 cm; електрическо поле: + 15 kV, 25 uA; температура: 25 °C; UV детекция при 206 nm.

Лигандобменна CE е използвана за разделяне на енантиомерите на аминокиселините. Разделянето е проведено с помощта на напълно автоматизирана ^{3D}CE система (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) снабдена с диоден детектор. Хроматографски условия: работен буфер: 80 mM L-4-Нуро, 40 mM Cu₂SO₄ и 5 mM фосфатен буфер с pH 4,5. Капиляра от разтопен силициев диоксид 38.5 cm x 50 µm (Micro Quartz, Munich, Germany) с ефективна дължина 30 cm. Преди и след употреба, капилярата се промиват с 0.1 M NaOH и вода. Всички проби се инжектират хидродинамично

(10 mbar) за 1s. Електрическо поле: 5–20 kV; температура: 25 °C; UV детекция при 208 nm.

1.5. Методи за потвърждаване на структурата

1.5.1.Електроспрей-йонизационна масспектрометрия (ESI-MS)

ESI-MS е използвана за определяне масата на получените съединения, с което се потвърждава успешният им синтез и за анализиране на строежа и структурата на пептидите и пептид-конюгатите. Анализите са осъществени в Institute of Bioanalysis, University of Pecz, Hungary. Мас спектрите са снети с електроспрей мас спектрометър Agilent 6530 Series Q-TOF LC/MS System (Santa Clara, CA, USA). Използвана е хроматографска колона Aeris® 2,6 µm PEPTIDE XB-C18 с обърнати фази, вътрешен диаметър 2.1 mm и дължина 100 mm. Хроматографски условия: система за градиентно елуиране, съставена от елуент А: H₂O + 0.1% HCOOH; елуент В: ACN/0.1% HCOOH при температура 24°C, скорост на потока 0.4 ml/min. Обем на инжектираните проби – от 1 – 5 µL. UV-детекцията е проведена при аналитична дължина на вълната 240 nm.

1.5.2. Оптична активност

Оптичната активност беше измерена на поляриметър Perkin Elmer 241 Perkin Elmer (USA) снабден с Hg-лампа. Анализиранияте проби се темперират за 15-20 min на стайна температура, след което 1 mg от веществото се разтваря в 1,5ml DMF. За изчисляване на стойностите беше използвано следното уравнение:

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \alpha / (c \times d),$$

където: T-температура [$^{\circ}\text{C}$]; d-дължина на кюветата [dm]; α – специфична ротация; c-концентрация [g/100ml]; λ -дължина на вълната [nm].

1.5.3. ^1H – NMR – спектроскопия – на АК

ЯМР спектрите бяха записани на Bruker AC 250 спектрофотометър с висока разделителна способност. Като вътрешен стандарт е използван тетраметилсилан (TMS) – $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, т.к. е химически инертно и леснолетливо съединение. Химическите отмествания са измерени по δ -скалата и са представени в милионни части (ppm).

1.6. Метод за определяне хидролитична стабилност

➤ UV – спектрофотометрия

Необходимите количества от веществата са претеглени на аналитична везна и разтворени в 10ml буфер (концентрация 0.5×10^{-4} mol/l). Получените разтвори се темперират в термостат ES-20 LKB (Sweden) при температура 37°C . Аликвотни проби по 1 ml от анализирания разтвори се отпипетират на определени времеви интервали от 0, 60, 120, 180, 240 и 360 min. UV – спектрите са заснети на UV/VIS спектрофотометър Beckman DU650 (Beckman Instruments, USA) снабден с temperature-controlled cell changer; използвана е кварцова кювета от 1 ml. UV адсорбцията се измерва при 210-220nm. Когато в структурата на пептидите има включени ароматни АК (Phe, Tyr, Trp), измерванията се провеждат при 240-280nm.

1.7. Биологични тестове *in vivo*

1.7.1. Експериментални животни и условия

Експерименталното проучване за аналгетична активност е проведено в Института по невробиология – БАН, под ръководството на доц. Танчева. Използвани са бели мъжки мишки, линия ICR, с тегло 25-28g. Животните обитаваха стандартни поликарбонатни кафези с талаш, отговарящи на ISO 9001, при наличие на пространство, което съответства на законово установеното. На експерименталните животни са осигурени регулиран цикъл светлина/тъмнина – 12h/12h, свободен достъп до питейна вода и храна и температура $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Всички опити за аналгетична активност са извършени съгласно изискванията на Международната Асоциация за изследване на болката. При работата с животните се спазваха изискванията на Европейската конвенция и Директивата на Европейския парламент за протекция на експерименталните животни (Protection of animals used for experimental purposes, Council Directive 86/609/Eec of November 1986, Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the Council of September 2010).

1.7.2. Тест с прилагане на топлинно дразнене – Hot plate test

Топлинният стимул се прилага върху лапите на опитните животни. Всяка от мишките се поставя в стъклен цилиндър със сухо дъно и постоянна температура ($55-57^{\circ}\text{C}$) без риск от тъканна увреда. Реакцията на животното се изразява в близане на задните лапи, подскоци и изкачане извън контейнера. За период от 3 минути се проследяват броя на подскоците и близането на лапичките.

1.7.3. Тест с прилагане на химично дразнене – Acetic acid test

Остра висцерална болка се индуцира чрез интраперитонеално инжектиране на 0.1% разтвор на ледена оцетна киселина. 30 минути преди това, на експерименталните животни се инжектира разтвор с изследваното вещество в доза 5 mg/kg. Отчита се броя на абдоминалните спазми, предизвикани от оцетната киселина за период от 20 минути.

Експерименталните данни са обработени с ANOVA и са представени като средни стойности със съответните им стандартни грешки ($m \pm S.E.M$). Разликите между отделните групи се считат за надеждни при ниво на значимост $p < 0.05$. Всяка експериментална група съдържа минимум 6 животни.

1.8. *In vitro* цитотоксичност

Клетъчната виталност е измерена с помощта на МТТ тест по класическия метод описан от Mossmann и с направени модификации от Константинов и сътр. МТТ е колориметричен тест, който се основава на редукция на жълтото тетразолово багрило (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиев бромид (МТТ) до водонерастворими виолетови формазанови кристали (схема 2). Предимство на този метод е, че реакцията протича само в живи клетки с функциониращи митохондрии под действие на сукцинатдехидрогенази.

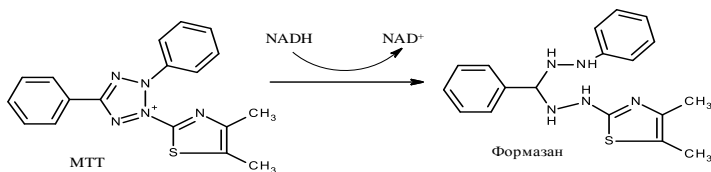


Схема 2: Редукция на тетразолиевата сол МТТ до формазан под действие на митохондриални дехидрогенази.

След навлизане в клетката жълтата тетразолиева сол чрез редукционна реакция се превръща в неразтворими формазанови кристали с виолетов цвят. Абсорбцията на пробите, измерена при 550 nm е мярка за концентрацията на формазана и съответно за броя на жизнеспособните клетки. Определя се IC₅₀ – концентрацията на веществото, необходима за 50% инхибиране *in vitro*. Скрининговото токсикологично проучване е проведено върху панел от трансформирани клетъчни линии от различни тъкани:

- MCF-7 епителна клетъчна линия, получена от аденокарцином на гърдата;
- 3Т3 – миша ембрионална фибробластна клетъчна линия;

Измерена е абсорбцията при дължина на вълната 550 nm на микро **ELIZA plate reader** (Bio-Tek) при референтна стойност от 630nm.

Получените стойности са преизчислени като процент от мъртвите клетки по формулата:

$$\% \text{ цитотоксичност} = 1 - \frac{\text{OD проба} - \text{OD празна контрола}}{\text{OD контрола} - \text{OD празна контрола}} \times 100$$

1.9. *In silico* метод за изчисляване на молекулни дескриптори от “Правилото 5 на Липински” (Ro5)

За намиране параметрите на Ro5, топологичната полярна повърхност (TPSA) и процента на абсорбция (%ABS) е използвана *in silico* изчислителна техника, програма Molinspiration Cheminformatics 2019 (<https://www.molinspiration.com/>). %ABS е изчислен по следната формула: % ABS = 109 – [0.345 × TPSA].

2. СИНТЕТИЧНИ ПРОЦЕДУРИ

2.1. Синтез на защитени, небелтъчни аминокиселини, необходими за пептидният синтез

2.1.1. Получаване на *Na-Carbobenzyloxy-p-fluoro-D,L-phenylalanine*, **Z-D,L-Phe(p-F)-OH**

Таблица 7. Стехиометрични изчисления за получаване на *Z-D,L-Phe(p-F)-OH*

Вещество	M, g/mol	n, mmol	m, g	V, ml	ρ , g/cm ³
D,L-Phe(p-F)-OH	183,18	10	1,83	-	-
Z-Osu	249,240	10	2,50	-	-
Na₂CO₃	105,990	15	1,60	-	-
Z-D,L-Phe(p-F)-OH	317,310	10	3,17	-	-

В 30ml вода се разтварят 1,83g (10mmol) D,L-Phe(p-F)-OH и 1,60g (15mmol) Na₂CO₃. Към този разтвор се добавят 2,50g (10mmol) Z-Osu, разтворени в 30ml ацетон. Реакционната смес се разбърка в продължение на 3 часа при стайна температура. След изтичане на реакционното време, разтворителите се отстраняват под вакуум, остатъкът се подкиселява с 1N HCl и се екстрахира трикратно с 50ml AcOEt. Водната фаза се неутрализира до pH 7 с 5% разтвор на NaHCO₃. След концентриране при ниско налягане до остатъчен обем от 10ml, продуктът изкрystalизира и се съхранява в хладилник през нощта. Чистият продукт рекристализира в топла вода, след което се суши (P₂O₅) и концентрира под вакуум. Добив: 3,01g (95%)

2.1.2. Получаване на метилов естер **Z-D,L-Phe(p-F)-OMe**

*Таблица 8. Стехиометрични изчисления за получаване на **Z-D,L-Phe(p-F)-OMe***

Вещество	M, g/mol	n, mmol	m, g	V, ml	ρ , g/cm ³
Z-D,L-Phe(p-F)-OH	317,310	3,6	1,14	-	-
DMAP	122,170	3,2	0,39	-	-
CH₃OH	32,04	3,69	0,237	0,3	0,791
EDCI	191,125	3,66	0,70	-	-
Z-D,L-Phe(p-F)-OMe	331,34	3,6	1,192	-	-

1,14g (3,6mmol) **Z-D,L-Phe(p-F)-OH** се разтварят в 8ml DCM. При непрекъснато разбъркване към разтвора се добавят 0,39g 4-Dimethylaminopyridine (DMAP) (3,2mmol) и 0,3ml (3,69mmol) абсолютен метанол. Разтворът се охлажда до -5 – 0⁰C в ледена баня и към него се добавят 0,70g (3,66mmol) EDCI. Разбърква се в продължение на 2 часа при 0⁰C. Органичната фаза се изпарява под вакуум, към остатъка се добавя вода и се екстрахира трикратно с по 20ml AcOMe. Обединените органични фази се промиват с наситен разтвор на NaCl и се сушат над Na₂SO₄. Крайният продукт преципитира след добавяне на етер. Добив: 1,08g (90%)

2.1.3. Получаване на **Z-L-Phe-(p-F)-OH** и **Z-D-Phe-(p-F)-OMe**

1,0g защитена аминокиселина се суспендира в среда от 10ml диоксан : 25 ml вода (3:7), а рН=8,0 се поддържа с Na₂CO₃ (3g). Сместа се темперира при 37⁰C, след което се прибавя 0,0124g ензим. Добив: 0,851g (85%)

2.1.4. Получаване на HBr. L-Phe-(p-F)-OH

Отстраняването на защитната Z-група се извършва със смес от 40% HBr и л.СН₃СООН. Реакцията протича при стайна температура за 1 час.

2.1.5. Получаване на *Na-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-p-fluoro-L-phenylalanine*, Fmoc-L-Phe(p-F)-OH

Таблица 9. Стехиометрични изчисления за получаване на Fmoc-L-Phe(p-F)-OH

Вещество	M, g/mol	n, mmol	m, g	V, ml	ρ , g/cm ³
L-Phe(p-F)-OH	183,18	5,459	1	-	-
Fmoc-Osu	337,340	6,004	2,025	-	-
Et ₃ N	101,190	10,918	1,102	1,519	0,726
Fmoc-L-Phe(p-F)-OH	405,431	5,459	2,213	-	-

1,00g L-Phe(p-F)-OH се разтваря в 9,12 ml вода, а 2,025g Fmoc-Osu в 15,82 ml ацетон. Двата разтвора се смесват в облодънна колба и получената реакционна смес се довежда до рН 8-8,5 чрез добавяне на Et₃N. Реакционната смес се разбърква в продължение на 2 h на електромагнитна бъркалка. Пълното протичане на реакцията се определя чрез TLC. След установяване на пълното протичане на реакцията, органичният разтворител се изпарява на ротационен вакуум изпарител, а към остатъка се прибавят 36,49 ml 1,5 N HCl, при разбъркване до рН 2-2,5. Получената смес се поставя в делителна фуния и се екстрахира 4 пъти с EtOAc. Резултатният екстракт се промива с воден разтвор на NaCl и се суши с Na₂SO₄, след което се филтрува на нагънат филтър. Разтворителят (EtOAc) се изпарява на ротационен вакуум

изпарител до сухо. Получените кристали се разтварят в DCM. Желаният продукт кристализира след прибавяне на PE към разтвора. Получената кристална маса се филтрува под вакуум на шотов филтър и се промива с PE. Суши се в ексикатор за 30 min, след което се претегля. Добив: 1,164g (53%)

Таблица 10. Стехиометрични изчисления за получаване на Fmoc-L-Phe(p-F)-OH

Вещество	M, g/mol	n, mmol	m, g
L-Phe(p-F)-OH	183,180	10	1,831
Fmoc-Osu	337,34	10	3,373
NaHCO₃	100,110	10	1,001
Fmoc-L-Phe(p-F)-OH	405,431	10	4,054

1,83g L-Phe(p-F)-OH се разтварят във вода (9 ml) в облодънна колба, прибавят се NaHCO₃ (1,001g), ацетон (9ml) и Fmoc-Osu (3,373g), като се проследява рН да е между 8-8,5. Получената реакционна смес се поставя на електромагнитна бъркалка и се разбърква в продължение на 2 h. Чрез TLC се определя пълното протичане на реакцията. След като е установено пълното протичане на реакцията, органичният разтворител (ацетон) се изпарява на ротационен вакуум изпарител до сухо, а остатъкът се подкиселява с 1,5 N HCl до рН 2-2,5. Падналата утайка се филтрува на шотов филтър (промива се с ацетон), след което се разтваря в EtOAc. Екстрахира се 2 пъти с EtOAc в делителна фуния. Резултатният екстракт се промива с воден разтвор на NaCl и се суши с Na₂SO₄, след което се филтрува на нагънат филтър. Разтворителят (EtOAc) се изпарява на ротационен вакуум изпарител до сухо, прибавя се PE, след което желания продукт кристализира, филтрува се под вакуум на шотов филтър и се

промива с PE. Суши се в ексикатор за 30 min, след което се претегля полученото количество. Добив: 3,357g (83%)

2.1.6. Получаване на *Na-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-canavanine*, Fmoc-L-Cav-OH

H-Cav-OH (2,74g 10mmol) се разтваря в 20ml вода с добавени 2,78ml TFA (20mmol). Към разтвора, на порции се прибавя разтвора на Fmoc-Osu (3,03g, 9mmol в 20ml ацетонитрил). рН на реакционната смес се поддържа в границите 8,0-8,5 чрез добавяне на Et₃N. Реакционната смес се разбърква на магнитна бъркалка в продължение на 2 часа, като протичането на реакцията се следи чрез TLC (системи СТ₁ и ВАО). След приключване на реакцията, органичните разтворители се изпаряват под вакуум. Полученият остатък се подкиселява с 1N HCl до рН=2-3. Полученият разтвор се екстрахира 4 x 20ml с AcOEt/n-BuOH (1:1). Органичните разтворители се изпаряват под вакуум, остатъкът се промива с наситен разтвор на NaCl до рН=7 и се суши (Na₂SO₄) под вакуум. Крайният продукт преципитира след добавяне на етер и се суши на P₂O₅. Добив: 3,70g (93%); R_f (СТ₁) 0.51, R_f (ВАО) 0.13; [α]_D²⁰ -13,8 (с1, DMF); ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 7.58 ppm (s(br), 4H, guanidine-NH), 7.71 ppm (m, 8H, Ar-H-Fmoc), 5.80 ppm (d, 1H, CH₂-Fmoc), 5.10-5.20 ppm (d, 2H, urethane-NH, CH-Fmoc), 4.25 ppm (m, 1H, α -CH), 3.80 ppm (m, 2H, γ -CH₂), 2.12 ppm (m, 2H β -CH₂).

2.1.7. Получаване на *Na-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl, N^G-tert-butylloxycarbonyl-L-canavanine*, Fmoc-L-Cav(Boc)-OH

1,19g (3mmol) от получения в първия етап Fmoc-L-Cav-OH се разтварят в 10ml 10% воден разтвор на Na₂CO₃. Към разтвора при разбъркване се добавя разтвор на (Boc)₂O (0,86g, 4mmol в 10ml dioxane). След приключване на реакционното време (3h на

магнитна бъркалка) органичните разтворители се отстраняват чрез вакуум изпарение, а водният разтвор се подкиселява с 1N HCl до pH=2-3 и се екстрахира с AcOEt (4 x 20ml). След екстракцията, разтворът се неутрализира с 5% NaHCO₃ до pH=7. Разтворът се концентрира при ниско налягане до обем около 10ml и се съхранява в хладилник през нощта. Суровият продукт рекристализира в топла вода и се суши над P₂O₅. Добив: 0,82g (91%); R_f(CT₁) 0,53; [α]_D²⁰ -10,4 (с1, DMF)

2.2. Твърдофазен пептиден синтез (SPPS)

Всички пептиди са синтезирани чрез стандартен Fmoc/^tBu SPPS върху 2-хлоротритил хлоридна смола (2,α-dichlorobenzhydryl-polystyrene) омрежена с 1% DVB (divinylbenzene) с натоварване 1.4mmol/g. Реакцията се провежда в полипропиленов реакционен съд върху механична клатачка. Последователното свързване на всяка аминокиселина е извършено в присъствието на 3mol излишък на Fmoc-AA, 3mol излишък на HOBT (1H-Benzotriazole-1-ol), 3mol излишък на EDAC *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride или 3mol излишък на PyBOP (benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate) и 5mol излишък от *N,N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) в Dimethylformamide (DMF). Приключването на всеки един етап от присъединяването на АК се следи с помощта на Kaiser-тест. Fmoc групата се отцепва чрез добавяне на 20% пиперидин в DMF. Основни етапи на SPPS:

Подготовка на смолата

2-хлоротритил хлоридна смола с натоварване 1,4 mmol/g се оставя да набъбне в DMF или DCM за 30 min, след което се

промива с DMF и DCM и се пристъпва към кондензация на първата АК.

Свързване на първата аминокиселина към смолата

Първата АК се разтваря в минимално количество DCM (10ml). Ако АК не се разтваря напълно в DCM, се прибавя и малко количество DMF. Разтворът се добавя към промитата смола и се прибавя съответното количество кондензиращата база (DIPEA). Реакционният съд се разклаща на клатачна машина в продължение на 3 h.

Деблокиране на Fmoc-групата

За да се свърже следващата АК, трябва да се отстрани Fmoc-защитата на предходната АК. Това става след обработване на смолата с 20% piperidin/ DMF.

Кондензация на следващата по ред аминокиселина

Към промитата пептидил-смола се прибавя втората АК и кондензиращите реагенти – НОВТ плюс **EDAC** или PyBop, разтворени в минимално количество DMF и DCM. Добавя се и кондензиращата база (DIPEA) и реакционният съд се разклаща на клатачна машина в продължение на 90 минути. Ходът на куплунг-реакцията се контролира чрез **Кайзер-тест** (схема 3), при използване на следните реагенти:

- реагент А: 16.5 mg KCN се разтварят в 25 ml дестилирана вода (0,001M KCN). 1.0 ml от получения разтвор се разрежда с 49 ml pyridine;
- реагент В: 1.0 g нинхидрин, разтворен в 20 ml n-butanol;
- реагент С: 40 g фенол се разтварят в 10 ml n-butanol.

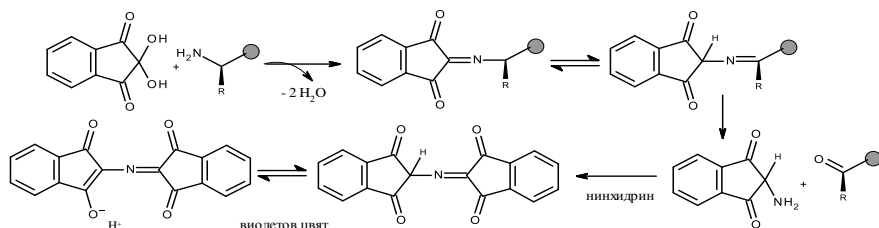


Схема 3: Кайзер тест

В чист съд се поставят няколко кристалчета от смолата (проба) и се прибавят последователно по ≈ 5 gtt от трите реагента. Едновременно с това в друг съд се приготвя контролна (празна) проба, съдържаща трите реагента. Двете проби се нагриват 5 min при 100°C , след което се сравняват по степента на оцветеност, а изследваната проба се разглежда под лупа за наличието на оцветени (от светло синьо до черно) зрънца пептидил-смола, което е индикация за наличието на свободни $\text{N}\alpha$ -аминогрупи, т.е., че куплунг реакцията не е протекла до край (непълно свързване). Ако разтворът остане безцветен или еднакво оцветен с празната проба и под лупа се наблюдават безцветни зрънца от пептидил-смола, то се преминава към деблокиране на $\text{N}\alpha$ аминокрупата и свързване на следващата АК.

Деблокиране и кондензация

След кондензация на втората АК, следва промиване на пептидил-смолата и снемане на защитата на NH_2 – групата по описания по-горе начин. Стъпките на кондензация и деблокиране се повтарят за всяка следваща Fmoc-АК до получаване на необходимата пептидна последователност.

Отцепване на пептида от смолата и деблокиране на страничните групи

След приключване на синтеза следва ацидолитично отцепване на пептида от смолата и крайно деблокиране на всички останали защитни групи (Woc-, Trt-, ^tBu-). В случаите, когато крайната защита е Woc-група, ацидолитичното отцепване на пептида от смолата и крайното деблокиране на всички останали защитни групи (Woc-, Trt-, ^tBu-) става едновременно, чрез трикратно добавяне на разтвор, съдържащ TFA и скевинджъри в следните количествени съотношения: TFA (16.5 ml); фенол (1 g); H₂O (1 ml) и тиоанизол (1 ml). След всяко добавяне на деблокиращите реагенти, реакционният съд се разклаща за 30 минути и извлеченото количество пептид се филтрува на студено. Трите филтратата се събират в облодънна колба, изпаряват се до сухо на ротационен вакуум изпарител и преципитират след добавяне на петролев етер/диизопропилов етер (50:50). В случаите, когато крайната защита е Fmoc-група, първо трябва да се деблокира и отсрани защитната група с 20% Piperidine/DMF и след това да се отдели пептида от смолата и да се отстранят страничните защитни групи.

Пречистване на пептида

Получената кристална маса от TFA-солта на съответния пептид се филтрува, суши и пречиства чрез колонна гел-филтрация върху Sephadex G25 с 10% CH₃COOH. Пептидите се замразяват с течен азот и лиофилизират до сухо на апарат Telstar Cryodos-80 при температура -50⁰C. Чистотата се оценява чрез аналитична RP-HPLC и капилярна електрофореза, а идентичността се потвърждава с мас-спектрометрия.

2.2.1. Синтез на AVPI пептидни аналози

Към 0,500g (0,790 mmol) вече набъбнала смола се прибавя изчисленото количество от първата АК, разтворена в минимално количество DCM (1-2 ml). Добавят се 0,405 ml DIPEA (2,370 mmol) и реакционната смес се разклаща на клатачна машина в продължение на 3 h. След всяко свързване, пептидил-смолата се промива последователно с DCM (5 x 2 min), DCM/MeOH (1:1) (2 x 2 min), MeOH (3 x 2 min) и DMF (2 x 2 min). Деблокирането на Fmoc-групата се извършва чрез двукратно добавяне на 20% piperidine в DMF (5 ml) и разклащане за 5 и 20 минути. След деблокиране на Fmoc-групата, смолата се промива последователно с DMF, DMF/DCM (1:1) и DCM (5 ml) и се пристъпва към кондензация на следващата АК. Изчисленото и претеглено количество АК се разтваря в минимално количество DCM, добавят се кондензиращите реагенти НОВТ 0,320g и EDAC 0,453g - *in situ* активирани и се добавят в реакционния съд. Прибавят се 0,405 ml база DIPEA и се разклаща на клатачна машина в продължение на 90 минути. Ходът на куплунг-реакцията се контролира чрез Кайзер-тест. След приключване на кондензацията на последната АК, отцепването на пептида от смолата, деблокирането на страничните групи и пречистването на крайния продукт се извършват по начин, описан в стандартния протокол за SPPS.

Ala-Val-Pro-Ile Добив: 79,2% [$C_{19}H_{34}N_4O_5$] (Mw: 398.502)
Analytical HPLC: $R_t = 18.62$ min, ESI – MS: 399, 2026 m/z, [M + H⁺].

Ala-Phe(F)-Pro-Ile Добив: 75,9% [$C_{23}H_{33}FN_4O_5$] (Mw: 464.536)
Analytical HPLC: $R_t = 19.2$ min, ESI – MS: 465, 0503 m/z, [M + H⁺].

Ala-Phe(F)-Pro-Phe(F) Добив: 73,5% [$C_{26}H_{30}F_2N_4O_5$] (Mw: 516.544)
Analytical HPLC: $R_t = 18.85$ min, ESI – MS: 517, 0628 m/z, [M + H⁺]

Ala-Val-Pro-Phe(F) Добив: 76,7% [C₂₂H₃₁FN₄O₅] (Mw: 450.509)
Analytical HPLC: R_t = 19.38 min, ESI – MS: 451, 1278 m/z, [M + H⁺]

2.2.2. Синтез на NT (8-13) и негови аналози

При синтеза на пептидите: **Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu**, **Arg-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu**, **Cav-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu**, **Cav-Arg-Pro-Phe(4F)-Ile-Leu** използвахме 2-СТ смола, към която се прибавя първата АК.

Към 0,500g (0,790 mmol) вече набъбнала смола се прибавя Fmoc-Leu-OH (0,279g; 0,790 mmol), разтворена в минимално количество DCM (1-2 ml). Добавят се 0,203 ml DIPEA (2,370 mmol) и реакционната смес се разклаща на клатачна машина в продължение на 3 h. След всяко свързване, пептидил-смолата се промива последователно с DCM (5 x 2 min), DCM/MeOH (1:1) (2 x 2 min), MeOH (3 x 2 min) и DMF (2 x 2 min). Деблокирането на Fmoc-групата се извършва чрез двукратно добавяне на 20% piperidine в DMF (5 ml) и разклащане за 5 и 20 минути. След деблокиране на Fmoc-групата, смолата се промива последователно с DMF, DMF/DCM (1:1) и DCM (5 ml) и се пристъпва към кондензация на следващата АК. Ходът на куплунг-реакцията се контролира чрез Кайзер-тест.

След приключване на кондензацията на последната АК, отцепването на пептида от смолата, деблокирането на страничните групи и пречистването на крайния продукт се извършат по начин, описан в стандартния протокол за SPPS.

При синтеза на пептидите: **Lys-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu**, **Cav-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu**, **Cav-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu** използвахме 2-СТ смола със закачена към нея първа АК. Към 0,500g (0,820 mmol) вече набъбнала смола H-Leu-2-СТ-resin се прибавя втората АК 0,159g (0,902 mmol) Fmoc-Ile-OH, разтворена в минимално количество DCM (1-2 ml). Добавят се кондензиращите реагенти НОВТ 0,061g

и PyBop 0,234g - *in situ* активиране. В реакционния съд се добавят и 0,154 ml кондензираща база – DIPEA (1,804 mmol). Етапите на SPPS следват стандартния протокол.

Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu Добив: 62,2% [C₃₈H₆₄N₁₂O₈] (Mw: 816,990) Analytical HPLC: R_t = 11.01 min, ESI – MS: 817,5043 m/z, [M + H⁺]

Lys-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu Добив: 63,1% [C₃₇H₆₂N₁₀O₉] (Mw: 790,959) Analytical HPLC: R_t = 10.89 min, ESI – MS: 791,4774 m/z, [M + H⁺]

Cav-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu Добив: 61,2% [C₃₇H₆₂N₁₀O₉] (Mw: 790,959) Analytical HPLC: R_t = 10.90 min, ESI – MS: 791,4774 m/z, [M + H⁺]

Cav-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu Добив: 63,2% [C₃₆H₆₀N₁₂O₁₀] (Mw: 820,944) Analytical HPLC: R_t = 9.95 min, ESI – MS: 821,4628 m/z, [M + H⁺]

Arg-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu Добив: 62,7% [C₃₇H₆₂N₁₂O₉] (Mw: 818,972) Analytical HPLC: R_t = 11.25 min, ESI – MS: 819,4835 m/z, [M + H⁺]

Cav-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu Добив: 68,2% [C₃₇H₆₂N₁₂O₉] (Mw: 818,972) Analytical HPLC: R_t = 11.01 min, ESI – MS: 819,4835 m/z, [M + H⁺]

Cav-Arg-Pro-Phe(4F)-Ile-Leu Добив: 67,7% [C₃₇H₆₁FN₁₂O₈] (Mw: 820,948) Analytical HPLC: R_t = 11.63 min, ESI – MS: 821,8541 m/z, [M + H⁺]

2.2.3. Синтез на нови хибридни пептиди – T-CON

При синтеза на хибридните пептиди, използвахме 2-СТ смола със закачена към нея първа АК. Следвани са стъпките на стандартния SPPS протокол.

T-CON A Ala-Val-Pro-Ile-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg

Добив: 76,5% [C₅₅H₁₀₆N₂₈O₁₁] (Mw: 1335.61) Analytical HPLC: R_t = 17.85 min, ESI – MS: 1336,3681 m/z, [M + H⁺]

T-CON C Ala-Val-Pro-Ile-Cav-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu

Добив: 72,8% [C₅₅H₉₂N₁₆O₁₄] (Mw: 1201.42) Analytical HPLC: R_t = 18.05 min, ESI – MS: 1202,0462 m/z, [M + H⁺]

T-CON D Ala-Val-Pro-Ile-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu

Добив: 59,1% [C₅₅H₉₂N₁₆O₁₂] (Mw: 1197.47) Analytical HPLC: R_t = 18.85 min, ESI – MS: 1198,5871 m/z, [M + H⁺].

IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Синтез на защитени, небелтъчни аминокиселини, необходими за пептидния синтез

1.1. Получаване на L-Phe(p-F)-OH

Разделянето на рацемичната смес D,L-Phe(p-F)-OH е осъществено чрез комбинация от ензимно и алкално осапунване. Ензимът, който е използван е алкална протеаза В-72, щам DY на *Bacillus subtilis*. Той проявява висока естеразна активност, което е предпоставка за високата оптична чистота на крайните продукти. При неговото използване е необходимо $\text{N}\alpha$ NH_2 -групата в субстрата да се защити, с което се увеличава хидрофобността на молекулата. За защита на аминогрупата се използва Benzyloxycarbonyl (Z-група), а за карбоксилната – естерно превръщане.

Предимство на ензимните методи е, че хидролизата протича при меки условия, с висок добив, за сравнително кратко време и при висока степен на оптическа и химична чистота на получените продукти. Недостатък на тези методи е, че ензимите не проявяват активност към D-формите.

Ензимната хидролиза протича сравнително бързо (около 3 часа). При това L-формата се превръща в Na – сол, а D-формата остава непроменена под форма на естер (схема 4). Двата изомера се разделят чрез екстракция с AcOEt, като L-формата остава във водната фракция, а D-формата преминава в органичната. D-изомерът претърпява алкална хидролиза след добавяне на 1N NaOH в метанол и индикатор фенолфталеин. Хидролизата се провежда за 1 час, с добив 90%. Отстраняването на Z-групата се извършва в силно кисела среда със смес от 40% HBr/10% л. CH_3COOH 50/50 (v/v). Химическата и хирална чистота на

продуктите са доказани чрез HPLC (фигура 26) и капиллярна електрофореза (СЕ) (фигура 27).

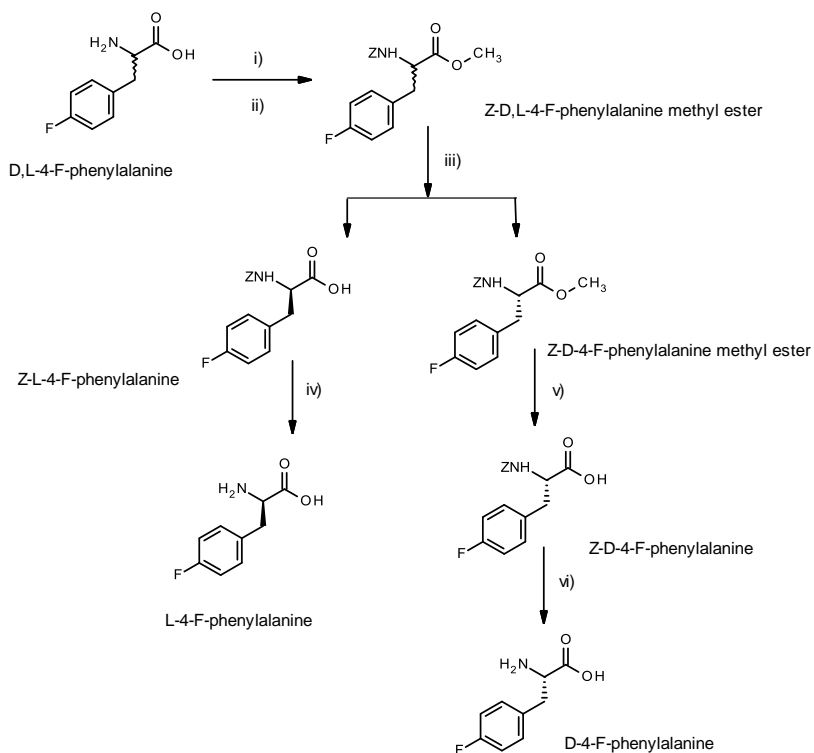
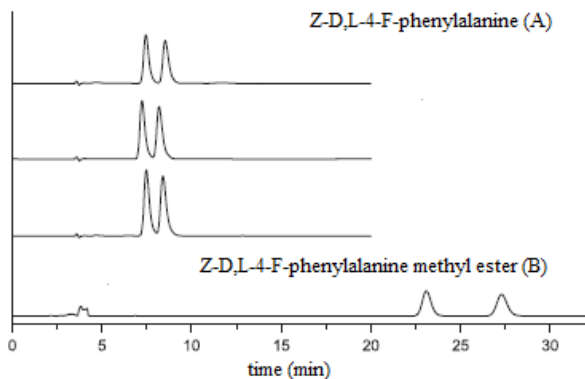
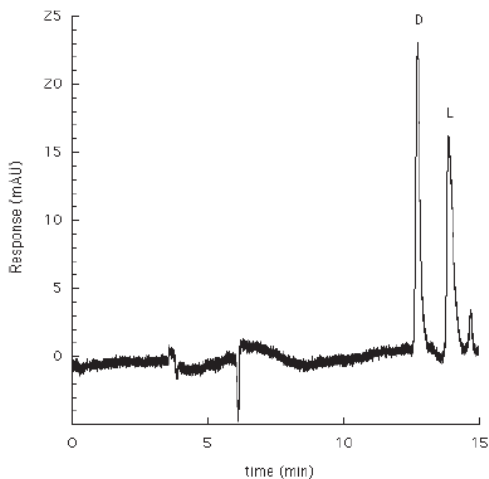


Схема 4: Хирално разделяне на рацемична смес от D,L-Phe(p-F)-OH i) Z-Osu/Na₂CO₃, H₂O/acetone, 3h; ii) DMAP/EDCl, MeOH, 0°C, 2h; iii) алкална протеаза (ензимно разделяне); iv) HBr/л. CH₃COOH; v) 1N NaOH; vi) HBr/л. CH₃COOH



Фигура 26: HPLC хроматограма от хирално разделяне на Na-защитен *D,L*-Phe(*p*-F)-OH, колона Chiralpak IC 5 μ m; 250 x 4.6 mm. (A) Мобилна фаза: MeOH/воден разтвор на мравчена киселина, pH 2.20, 55/45 (v/v); (B) Мобилна фаза: ACN/вода 45/55 (v/v).



Фигура 27: Електроферограма на хирално разделяне на *D,L*-4-Phe(*p*-F)-OH. Условия: 20 mM HO-L-4-Нуро, 10 mM Cu₂SO₄, фосфатен буфер с pH 4,5; хидродинамично инжектиране 10 mbar за 1 sec; електрическо поле +10 kV.

1.2. Синтез на Fmoc-L-Phe (p-F)-OH

За получаване на N α – защитен L-Phe(p-F)-OH, като защитна група е избрана Fmoc. Предимство на Fmoc/Bu-стратегията е, че временните и постоянните защитни групи се отстраняват по различни механизми, което позволява използването на по-мекки киселинни условия при крайното деблокиране и „откъсване” на пептида от смолата.

Fmoc-L-Phe(p-F)-OH е получен при взаимодействие на АК с Fmoc-Osu (**N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy) succinimide**) в ацетонова среда и в присъствие на база (NaHCO₃ или Et₃N). Механизмът на Fmoc-защита се състои в нуклеофилна атака на NH₂-групата на АК, с последващо заместване на отцепващата се сукцинимидна група и получаване на съответната защитена аминокиселина (схема 5).

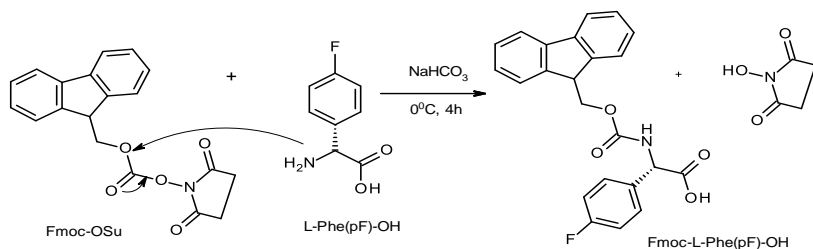


Схема 5: Получаване на N α -защитени p-флуор фенилаланин

Таблица 11: Добив на Fmoc-L-Phe(p-F)-OH

Вещество	База	m _T , g	m _{ек} , g	D (%)
Fmoc-L-Phe(p-F)-OH	Et ₃ N	2,213	1,164	53
Fmoc-L-Phe(p-F)-OH	NaHCO ₃	4,054	3,357	83

В таблица 11 са представени данните от проведения синтез на Fmoc-L-Phe(p-F)-OH при различни условия – с база Et₃N и NaHCO₃. Изчисленото очаквано количество (при добив 100%) е 2,213 г при използване на Et₃N и 4,054 г при използване на NaHCO₃. Експериментално получените количества са съответно 1,164 г (53%) и 3,357 г (83%). При използване на NaHCO₃ като база, се получава значително по-висок добив на Fmoc-L-Phe(p-F)-OH.

1.3. Синтез на Fmoc-L-Cav(Boc)-OH

Получаването на Fmoc-L-Cav(Boc)-OH се извършва на два етапа, по метод описан през 1997г., от Пайпанова и сътр [127]. В първия етап от синтеза се защитава *Na*-амино групата с Fmoc-група до получаване на *Na*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-canavanine. При втория етап от синтеза се защитава страничната amino група до получаване на (*Na*-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl, *N*^G-*ter*-butyloxycarbonyl-canavanin) (схема 6).

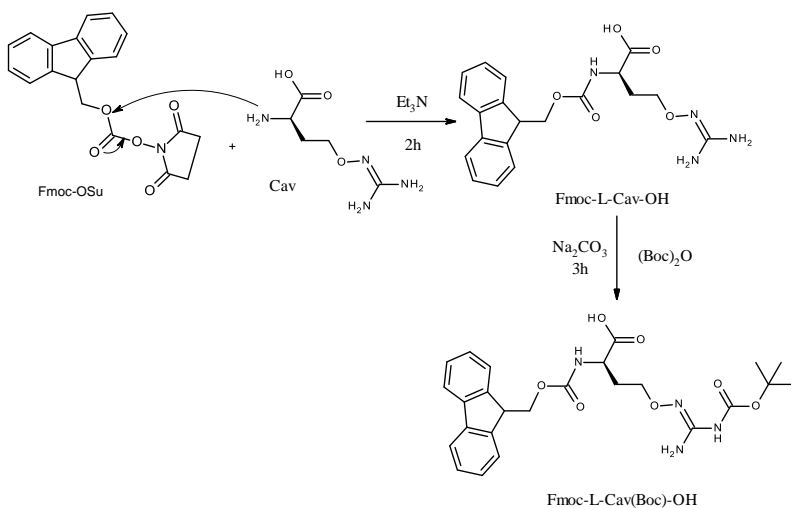


Схема 6: Синтез на Fmoc-L-Cav(Boc)-OH

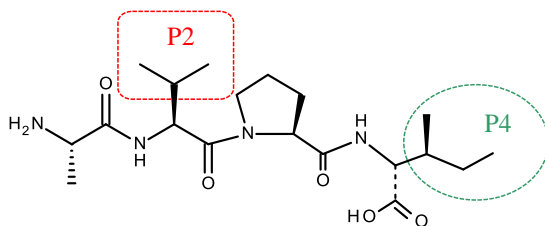
След изтичане на реакционното време, количеството на получената *Nα* – защитена аминокиселина Fmoc-L-Cav-OH е 3,70g (93%). При втория етап от синтеза се получава Fmoc-L-Cav(Boc)-OH, с добив 0,82g (91%). Получените кавананинови аналози са идентифицирани чрез елементен анализ, ¹H-NMR и MS. Специфичният ъгъл на въртене е определен с оглед на факта, че при синтеза на NT(8-13) пептидните аналози, е необходимо включването на ляво въртящия оптичен изомер на Fmoc-Cav(Boc)-OH. В таблица 12 са представени аналитичните данни на новосинтезираните съединения.

Таблица 12: Аналитични данни за Fmoc-L-Cav-OH и Fmoc-L-Cav(Boc)-OH

Съединение	Формула M.w.	[α] _D ²⁰ (c1,DMF)	MS [M+H] ⁺	Елементен анализ %					
				C		H		N	
				изчислен	намерен	изчислен	намерен	изчислен	намерен
Fmoc-L-Cav-OH	C ₂₀ H ₂₁ N ₄ O ₅ 397,41	-13,8	398,2531	60,44	60,32	5,32	5,65	14,09	14,33
Fmoc-L-Cav(Boc)-OH	C ₂₅ H ₃₀ N ₄ O ₇ 498,53	-10,4	499,4978	60,35	60,38	5,87	5,9	11,26	10,33

2. Синтез на AVPI пептидни аналози

В търсене на аналози на SMAC с подобрен фармакологичен профил вземе под внимание описаните в литературния обзор SAR-проучвания на McLendon и сътр. за влиянието на всеки един аминокиселинен остатък от AVPI последователността към афинитета на свързване с VIR-домейните на IAPs. Повърхностната модификация на пептидите е подход, при който в пептидния скелет се включват повече хидрофобни АК или чрез ковалентно конюгиране с липофилни групи, се цели повишаване на мембрания пермеабилитет. На фигура 28 са показани предприетите модификации в AVPI-тетрапептида. Аминокиселината Val (P2) и/или аминокиселината Le (P4) са заменени с *p*-флуорофенилаланин Phe(*p*-F). P1 (Ala) и P3 (Pro) са запазени непроменени, т.к. е доказано тяхното значение за ефективното IAP инхибиране.



Фигура 28: Предприети модификации в структурата на нативния AVPI-фрагмент

Включването на L-Phe(p-F) в структурата води до получаване на аналози със следните предимства: по-изразени липофилни отнасяния, по-висок афинитет към VIR-домейните и по-добра ензимна стабилност. Известно е, че спектралните характеристики на Phe при неговото халогениране се подобряват – значително се повишава интензивността на абсорбционните ивици ултравиолетовата област. След халогениране моларната абсорбируемост на Phe(p-F) е четири пъти по-висока от тази на Phe. Също така, спектърът на поглъщане придобива двойка добре дефинирани ивици в областта 260-270 nm, които помагат за идентифициране при смеси с други аминокиселини или при включване в пептид. За целите на настоящата работа бяха синтезирани 3 нови SMAC пептидни миметика, както и нативния AVPI тетрапептид. Използвахме стандартен Fmoc^tBu SPPS върху 2-хлоротритил хлоридна смола (2,α-dichlorobenzhydryl-polystyrene) с НОBT/EDAC/DIPEA активирани и вече получения Fmoc-L-Phe(p-F)-OH (схема 7).

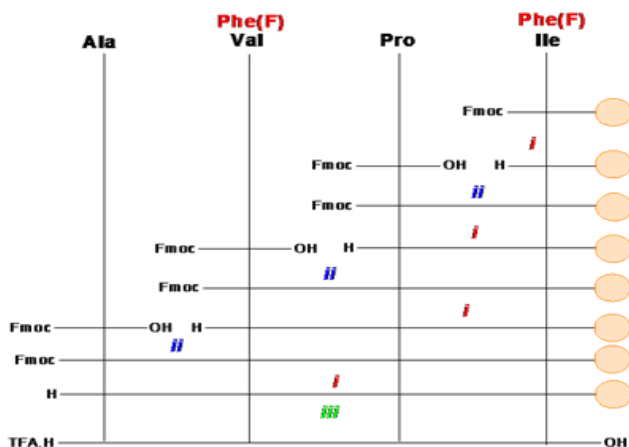


Схема 7: Синтез на AVPI – аналози
 20% пиперидин/DMF-20 мин; ii) НОBT/EDAC/DIPEA, DMF/DCM-1h;
 iii) TFA/DCM-90 min.

Структурните формули на синтезираните съединения са представени в таблица 13.

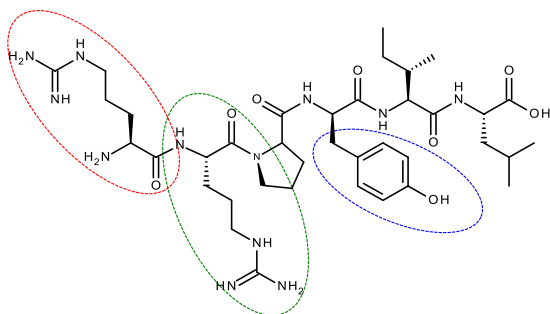
Таблица 13: Синтезирани AVPI – аналози

Съединение	Структурна формула
S4 Ala-Val-Pro-Ile	
S9 Ala-Val-Pro-Phe(F)	
S8 Ala-Phe(F)-Pro-Phe(F)	
S7 Ala-Phe(F)-Pro-Ile	

3. Синтез на NT(8-13) и негови аналози

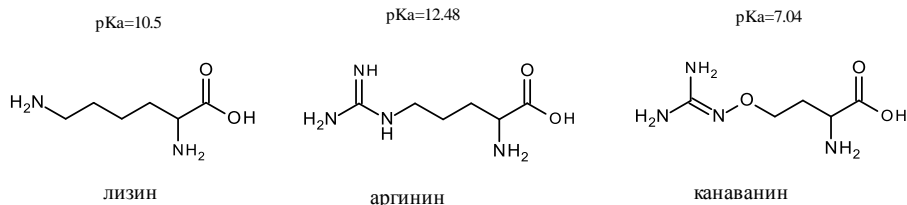
В мозъчните структури, NT участва в налоксон-независимата антиноцицепция и се очертава като важен модулатор на ноцицептивната регулация. Приложен интрацеребровентрикуларно (*i.c.v.*) предизвиква силна налоксон-нечувствителна аналгезия, което предполага, че ефекта му е независим от ендогенната опиоидна система и може да действа синергично с опиоидните аналгетици за намаляване на болката.

Химичната стабилност на пептидите зависи от състава и последователността на АК. SAR-проучвания при редица NT-аналози показват, че С-крайната последователност от шест аминокиселинни остатъка на NT **Arg⁸-Arg⁹-Pro¹⁰-Tyr¹¹-Phe¹²-Leu¹³** съдържа всички структурни изисквания за свързване и активиране на невротензиновите рецептори. Нативният NT (8-13) има слаба абсорбция след *per os* прием и слаба дифузия през BBB, което определя и ниската му бионаличност в мозъчната тъкан. Разкъсване на две от пептидните връзки в молекулата на NT (8-13) между Arg⁸-Arg⁹ и Tyr¹¹-Phe¹², води до бързо метаболитно разграждане и кратък плазмен полуживот (около 3 минути). Всички тези фактори ограничават приложението му в клиничната практика.



Фигура 29: Предприети модификации в структурата на нативния NT

С цел да се намали пресистемното ензимно разграждане и да се повиши пенетрацията през кръвно-мозъчната бариера, бяха синтезирани 5 NT (8-13) аналози (Т1-Т5) с промени в първите два аминокиселинни остатъка от последователността, а именно двата аргининови остатъка (фиг. 29). Замяната на крайния аргинин (Arg^8) с негов аналог води до получаване на производни с по-силно изразен биологичен ефект и по-висока стабилност към ензимно разграждане. Неприродните и небелтъчните аминокиселини влизат в състава на редица лекарствени средства и играят решаваща роля за фармакологичната им активност. Arg^8 е заменен с неговия непротеиногенен аналог – канаванин (Cav) 2-amino-4-[[[(diamino-methylidene)amino]oxy] butanoic acid. Cav е природна небелтъчна аминокиселина, която се среща в някои растения от семейство Fabaceae и е единствената АК, съдържаща гуанидиноокси-група в молекулата си. Вторият Arg остатък в молекулата на нативния NT е заменен с Lys, за който е известно, че не променя действието.



Фигура 30: Структурни формули на Lys, Arg и Cav

На фигура 30 са показани структурните формули на Lys, Arg и Cav. Кислородът е значително по-електроотрицателен от въглерода, което улеснява депротонирането и понижава рKa стойността на гуанидиноокси-групата на Cav до около 7.04 – доста по-ниска от рKa=12.48 на гуанидино-групата на аргинина. При физиологични условия Arg, силно базична аминокиселина, е напълно протониран. Замяната на Arg с Lys не променя много рKa стойността на страничната верига (при физиологични условия NH_2

– групата на Lys има $pK_a=10.5$). Разликата е в броя на свързващите атоми от страничната верига. При Arg те са три азотни атома, докато при Lys е само един. SAR проучванията показват, че последният C – краен остатък на пептида (Leu-OH) не трябва да се отстранява или амидира, т.к. това води до пълна загуба на биологичната активност.

Промените, направени в структурата на съединение T6 засягат и двете връзки, които най-често са подложени на ензимна хидролиза (фиг. 29). Arg⁸ е заменен с Cav, а Tyr¹¹ е заменен с небелтъчната АК – Phe(p-F)-OH.

Всички пептиди (T0-T6) са синтезирани чрез стандартен Fmoc/^tBu SPPS върху 2-хлоротритил хлоридна смола омрежена с 1% DVB с натоварване 1.4mmol/g. Последователното свързване на всяка аминокиселина е извършено в присъствието на 3mol излишък на Fmoc-AA, 3mol излишък на HOBt/PyBOP и 3mol излишък от DIPEA в DMF.

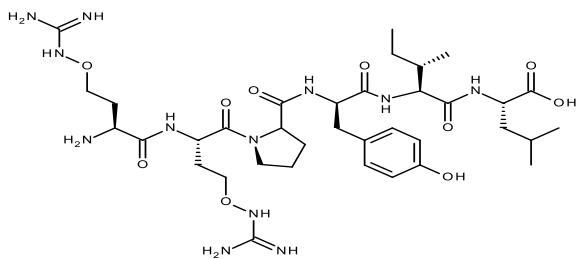
Структурните формули на синтезираните NT(8-13) – аналози са представени в таблица 14.

Таблица 14: Синтезирани NT – аналози

Съединение	Структурна формула
<p>T0 Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu</p>	
<p>T1 Lys-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu</p>	
<p>T2 Cav-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu</p>	

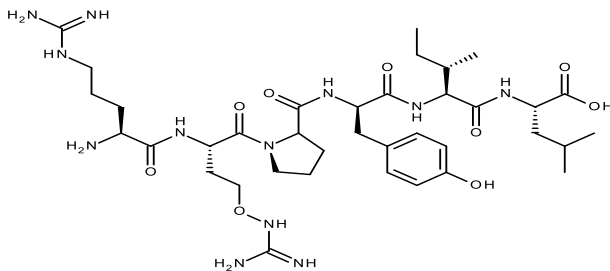
T3

Cav-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu



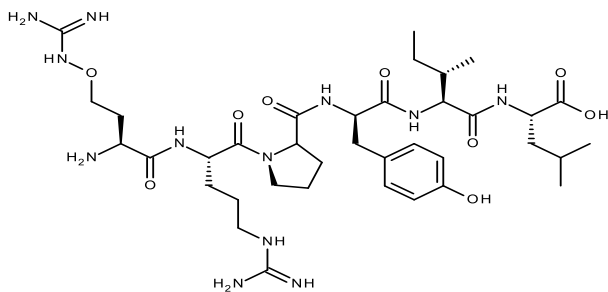
T4

Arg-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu



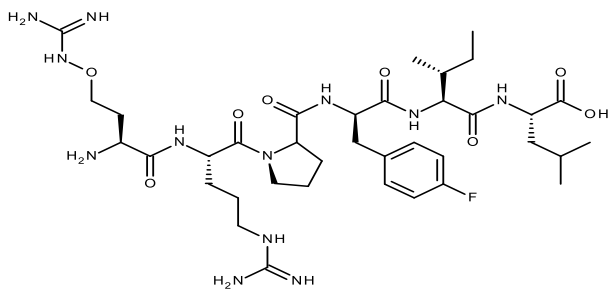
T5

Cav-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu



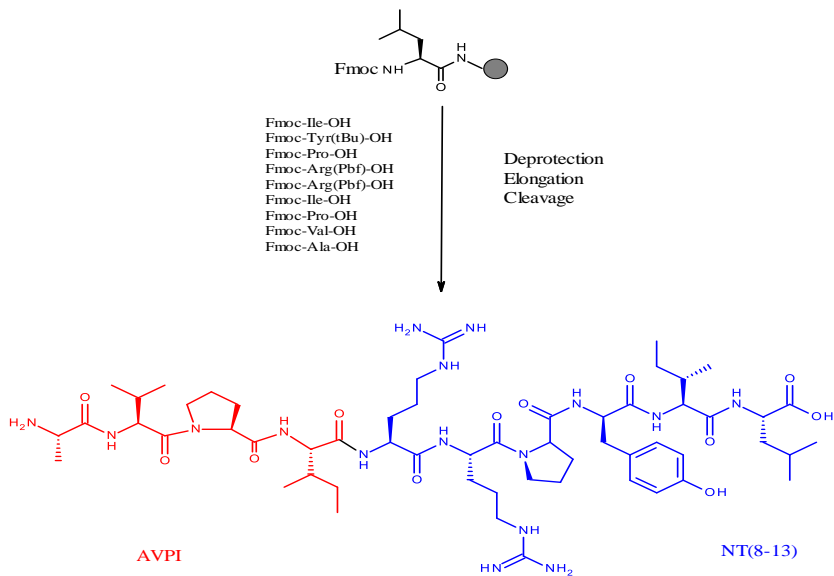
T6

Cav-Arg-Pro-Phe(4F)-Ile-Leu



4. Синтез на хибридни T-CON конюгати

При синтезирането на новите хибридни молекули T-CON използвахме подобрани SMAC и NT анализи, показали противотуморна или аналгетична активност при първоначалния скрининг. Пептидите са синтезирани чрез използване на стандартен Fmoc/^tBu SPPS върху 2-хлоротритил хлоридна смола с НОBT/PyBop/DIPEA активирани (схема 10).



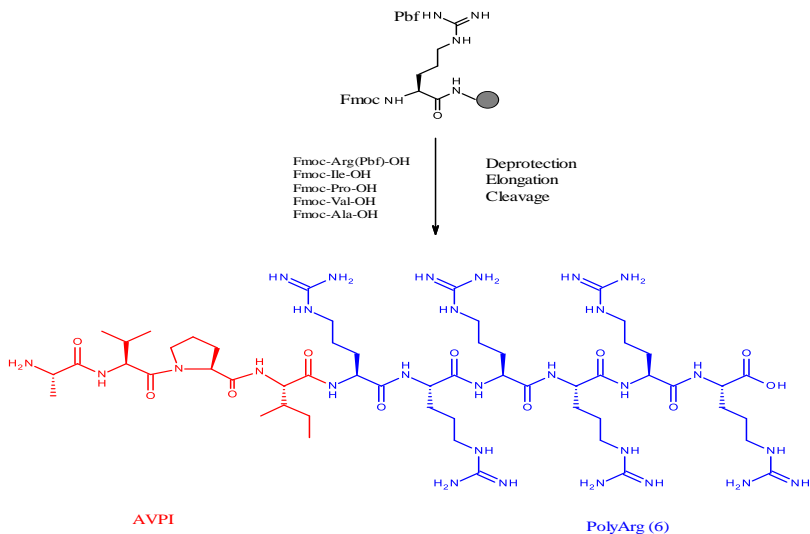


Схема 10: Синтез на хибридни T-CON

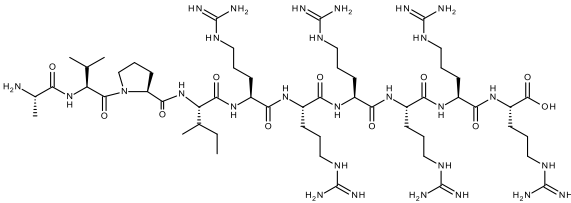
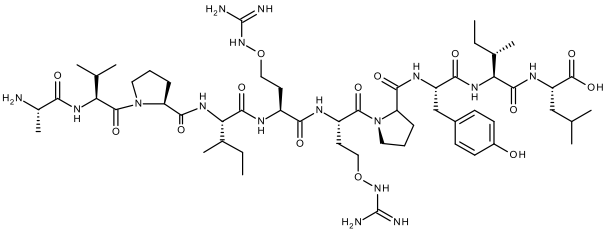
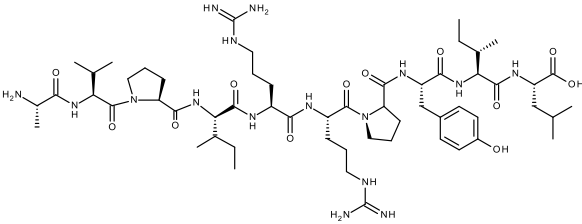
Структурните формули на синтезираните SMAC-NT конюгати са представени в таблица 15. Включването на полиаргининова верига в структурата на TCON-A е с цел да се повиши пенетрацията на молекулата през клетъчните мембрани, с което да се улесни достигането ѝ до мястото на действие.

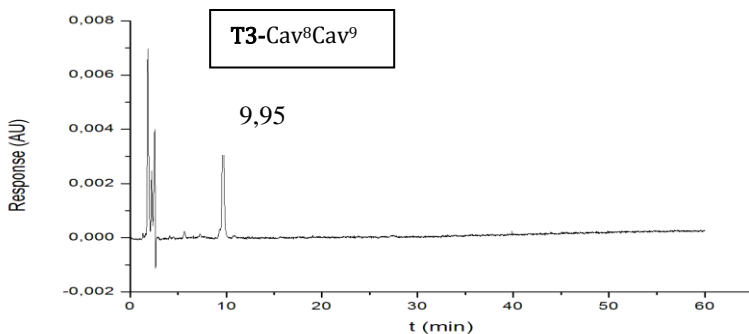
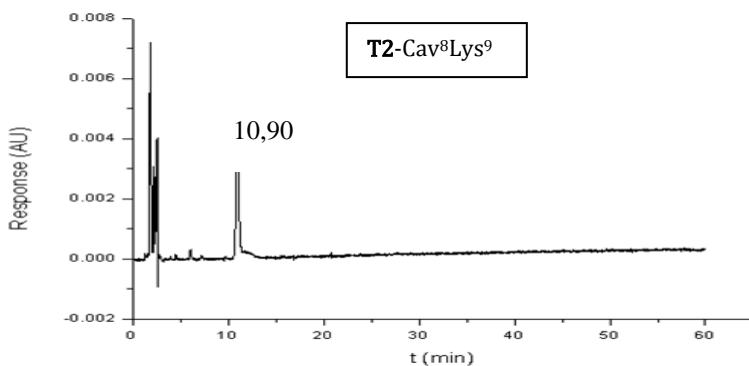
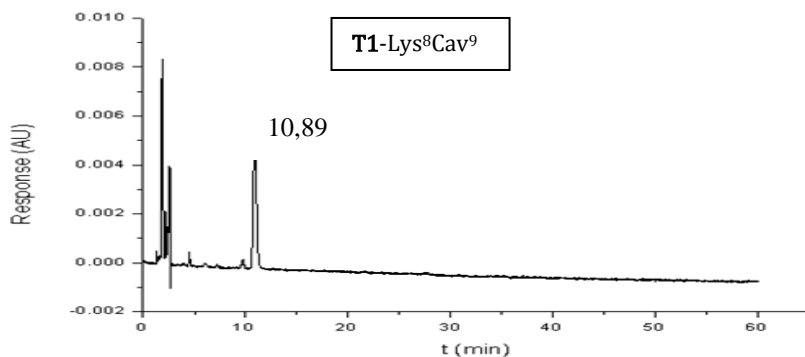
5. Охарактеризиране на новосинтезираните пептиди

След приключване на синтеза и пречистване на пептидите чрез гел-филтрация, степента на химическа чистота на получените съединения е определена чрез RP-HPLC и СЕ. Разделянето в обратно-фазова течна хроматография се основава на хидрофобни взаимодействия между анализа и стационарната фаза. Колкото по-хидрофобен е даден анализ, толкова по-силно се задържа върху стационарната фаза в RP-HPLC и обратно, хидрофилните анализи са значително солватирани от водните молекули, имат много нисък обем на задържане и бързо се елуират.

Степента на химическа чистота на синтезираните NT (8-13) пептидни аналози, определена чрез RP-HPLC и времената на задържане при изократно елуиране са показани на фигура 31.

Таблица 15: Синтезирани SMAC-NT – пептидни конюгати

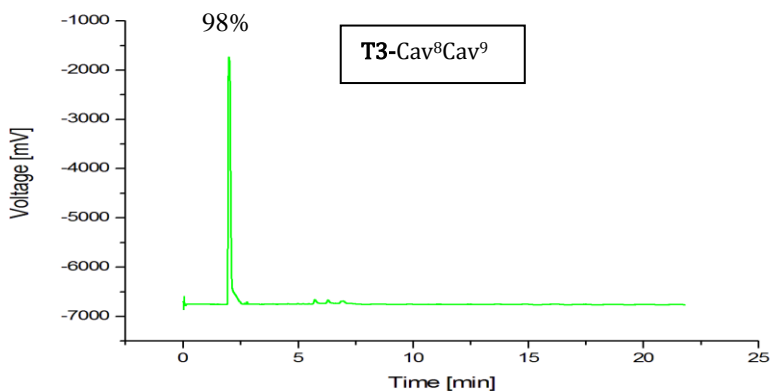
Съединение	Структурна формула
<p>TCON-A Ala-Val-Pro-Ile-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg</p>	
<p>TCON-C Ala-Val-Pro-Ile-Cav-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu</p>	
<p>TCON-D Ala-Val-Pro-Ile-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu</p>	



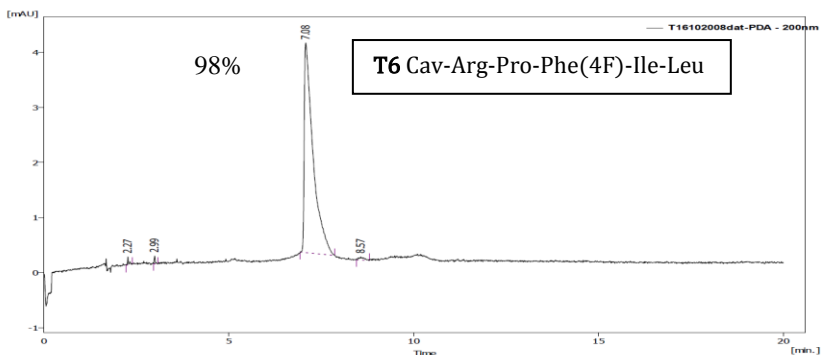
Фигура 31: HPLC – анализ на химическа чистота на T1, T2 и T3 (суров продукт). Колона: Xterra^R RP-C18, 125Å, 3.5 μm, 3 mm x 150 mm; мобилна фаза: ACN/0.05%TFA 5/95 (v/v), 0.5ml/min, изократно, 25⁰C, UV-детекция при 220nm

Капилярна електрофореза (СЕ)

За определяне химическата чистота на част от синтезираните пептиди, в буферния разтвор добавихме анионно повърхностно активно вещество – SDS (натриев додецилсулфат), което при електрофореза определя миграцията на мицела към положителния електрод. Скоростта на миграция на анализа зависи от коефициента на разпределение между мицеларната и не-мицеларната (водна) фаза. Колкото по-голям процент анализ е включен в мицели, толкова скоростта на миграция е по-ниска. Времевият прозорец на миграция на анализа (t_R) е ограничено между времето на преминаване на основния разтвор (t_0) и този на мицела (t_{mc}). Чистота на синтезираните пептиди е над 90%, добивите са в границите 61-79%.



Фигура 32: Електроферограма на T3: Хроматографски условия: Ефективна капилярна дължина 290/400 mm, silica fused; BGE: 20 mM Tris, 5 mM H₃PO₄, 50 mM SDS, pH 7,0, U = +15kV, I = 25uA, T=25°C, UV 206 nm



Result Table (Uncal - T16102008dat-PDA - 200nm)

	Retain Time [min]	Area [AU·s]	Height [AU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	TCA	TCA%
1	2.267	0.000314	0.000	0.5	3.6	0.02	0.138	1.51
2	2.992	0.000287	0.000	0.4	3.4	0.03	0.096	1.05
3	7.079	0.982760	0.004	98.2	91.5	0.23	8.866	98.72
4	8.567	0.000571	0.000	0.6	1.5	0.16	0.067	0.73
	Total	0.983932	0.004	100.0	100.0		9.166	100.00

Фигура 33: Электроферограма на T6: Хроматографски условия: Ефективна капиллярна дължина 340/407 mm, silica fused; BGE: 20 mM Tris, 5mM H₃PO₄, 50 mM SDS, pH 8,6, U = +25kV, I = 25uA, T=23°C, UV 200 nm

Резултатите, получени при охарактеризиране на синтезираните пептиди са обобщени в таблица 16.

Успешният синтез е потвърден чрез анализ на молекулното тегло. Използвана е електроспрей - йонизационна мас-спектрометрия, т.к. е мек метод за йонизация, който по време на анализа предизвиква минимална фрагментация на анализа. Маспектрометричният анализ потвърждава предварително изчислените молекулни маси на синтезираните пептиди.

Таблица 16: Аналитични данни на синтезираните пептиди

Код	Сруктура	Чистота суров продукт %	Брутна формула	М.в. изчислена g/mol	ESI - MS [M + H ⁺] m/z	$\alpha_{[546]}^{20}$	R _t (min)	D%
S4	Ala-Val-Pro-Ile	95	C ₁₉ H ₃₄ N ₄ O ₅	398.502	399.2026	-33,33	18,62	79,2
S7	Ala-Phe(F)-Pro-Ile	93	C ₂₃ H ₃₃ FN ₄ O ₅	464,536	465.0503	-26,09	19,20	75,9
S8	Ala-Phe(F)-Pro-Phe(F)	96	C ₂₆ H ₃₀ F ₂ N ₄ O ₅	516,544	517.0628	-29,44	18,85	73,5
S9	Ala-Val-Pro-Phe(F)	97	C ₂₂ H ₃₁ FN ₄ O ₅	450,509	451.1278	-24,69	19,38	76,7
T0	Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu	95	C ₃₈ H ₆₄ N ₁₂ O ₈	816.990	817.5043	-28,15	11,01	62,2
T1	Lys-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu	93	C ₃₇ H ₆₂ N ₁₀ O ₉	790.959	791.4774	-63,42	10,89	63,1
T2	Cav-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu	97	C ₃₇ H ₆₂ N ₁₀ O ₉	790.959	791.4774	-69,17	10,90	61,2
T3	Cav-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu	98	C ₃₆ H ₆₀ N ₁₂ O ₁₀	820.944	821.4628	-83,68	9,95	63,2
T4	Arg-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu	95	C ₃₇ H ₆₂ N ₁₂ O ₉	818.972	819.4835	-66,89	11,25	62,7
T5	Cav-Arg -Pro-Tyr-Ile-Leu	97	C ₃₇ H ₆₂ N ₁₂ O ₉	818.972	819.4835	-52,33	11,01	68,2
T6	Cav-Arg-Pro-Phe(F)-Ile-Leu	98	C ₃₇ H ₆₁ FN ₁₂ O ₈	820.948	821.8541	-66,67	11,63	67,7
T-CON A	Ala-Val-Pro-Ile-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg	90	C ₅₅ H ₁₀₆ N ₂₈ O ₁₁	1335,61	1336,3681	-10,44	17,85	76,5
T-CON C	Ala-Val-Pro-Ile-Cav-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu	93	C ₅₅ H ₉₂ N ₁₆ O ₁₄	1201,42	1202,0462	-51,00	18,05	72,8
T-CON D	Ala-Val-Pro-Ile-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu	95	C ₅₅ H ₉₂ N ₁₆ O ₁₂	1197.47	1198.5871	-50,27	18,05	59,1

Структурна особеност на аминокиселините е наличието на хирален център, респективно съществуването на D- и L-форми, което обуславя тяхната оптична активност. Известно е, че фармакологичното действие на повечето лекарствени продукти се дължи само на единия енантиомер. През 2004 година Abbott pharmaceuticals тестват различни AVPI аналози за афинитет на свързване с XIAP и откриват, че за ефективното свързване с BIR3 е определяща L-стереохимията на AVPI последователността. Определянето на оптичната активност на синтезираните пептиди е важно от гледна точка на тяхната ензимна стабилност и очакваните фармакологични ефекти. От данните в таблица 16 е видно, че всички синтезирани пептиди са ляво въртящи. Определеният специфичен ъгъл на оптично въртене показва, че по време на SPPS не настъпва рацемизация, което е постигнато чрез използване на подходящо подбраните кондензиращи реагенти.

6. Хидролитична стабилност при физиологични условия и след съхранение

6.1. Хидролитична стабилност при физиологични условия

Важен фактор, оказващ влияние върху ефективността и терапевтичната активност на нови съединения, проявяващи различни фармакологични ефекти е тяхната хидролитична стабилност при физиологични условия. Тясната връзка между стабилността на молекулата и фармакокинетичното ѝ поведение в организма е от съществено значение при разработването на нови биологично активни вещества и подбор на водещи активни структури. Метаболизмът на лекарствата често се осъществява чрез хидролиза. Скоростта на хидролиза на amidна връзка зависи от температурата и рН на средата. Ниското рН генерирано от солната киселина в стомаха, води до денатурация на протеините, което благоприятства действието на пептидазите и определя

слабата бионаличност на пептидните молекули. Познаването на "рН-профила" на едно съединение дава възможност да се определят границите, при които то запазва своята структура и концентрация във времето, показва условията, при които молекулата е най-податлива на разграждане и е от особено значение за последващи процеси на оптимизация.

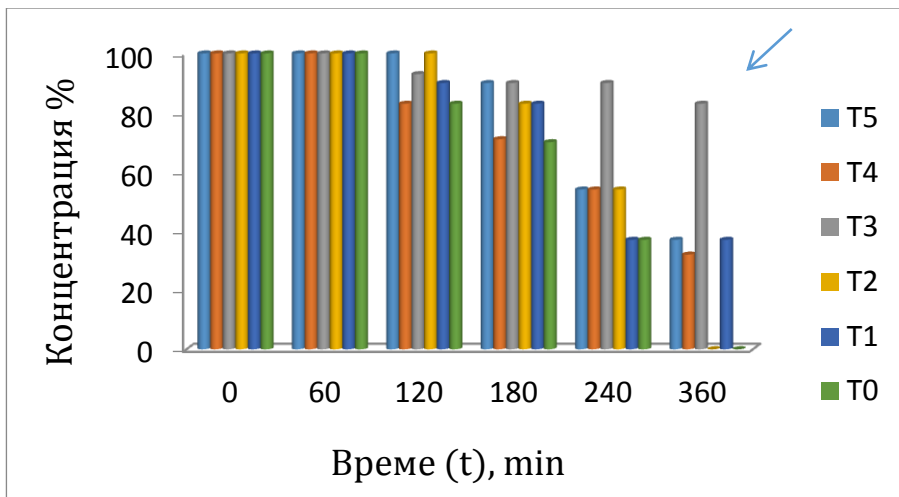
За определяне хидролитичната стабилност на новосинтезираните NT (8-13) аналози, изследвахме тяхното поведение при три различни, физиологични стойности на рН – 2.0 (стомах); 7.4 (кръвна плазма) и 9.0 (дуоденум и тънки черва) и температура 37⁰С. На определени времеви интервали измервахме абсорбцията на разтворите при 220 nm.

Според закона на Буге-Ламбер-Беер големината на лъчението, погълнато от разтвора е експоненциална функция на концентрацията на разтвореното абсорбиращо вещество и дължината на оптичния път в кюветата при определена стойност на λ .

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad \text{уравнение (1)}$$

Където: A - абсорбция; ϵ -моларна абсорбируемост, [$\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]; c-концентрация на изследваното вещество, [$\text{mol/l} = \text{M}$]; b - дебелина на слоя поглъщащо вещество (оптичен път), [cm].

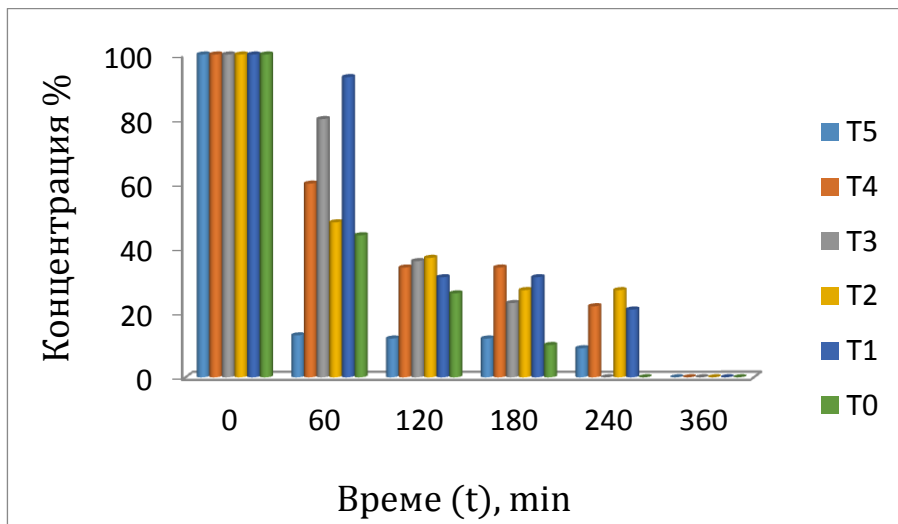
Концентрацията на съединенията е изчислена с помощта на уравнение (1). Зависимостта време/концентрация на NT(8-13) аналозите при трите стойности на рН е показана на фигури 34, 35 и 36.



Фигура 34: Зависимост време/концентрация на NT (8-13) аналози при 220 nm; pH=2.0; t=37°C

От представените данни на фигура 34 се вижда, че в солно-кисел буфер концентрацията на всички изследвани съединения остава непроменена през първия час от измерването. След 60^{-та} минута, концентрацията на нативния NT (8-13) (T0) постепенно намалява, като на четвъртия час тя е под 40%, а на шестия час – нула. Ниската хидролитична стабилност на нативния NT (8-13) фрагмент потвърждава необходимостта от разработване на нови, по-стабилни аналози. Концентрацията на T5 остава относително постоянна до третия час от изследването (90%), след което постепенно намалява до 37% в края на измерването. Хидролизата на T3 в киселата област протича с много малка скорост, като концентрацията му се запазва относително постоянна. За времето на изследване (6 часа), невротензиновия T3 - аналог остава с най-висока концентрация от всички разглеждани NT аналози (над 80%). Хидролизата на NT аналозите T1 и T2 протича с ниска скорост до 180^{-та} минута (концентрация около 80%). След третия

час концентрацията на T2 бързо намалява и до края на експеримента пада до 0. Концентрацията на T1 след третия час, до края на експеримента се запазва около 40%.

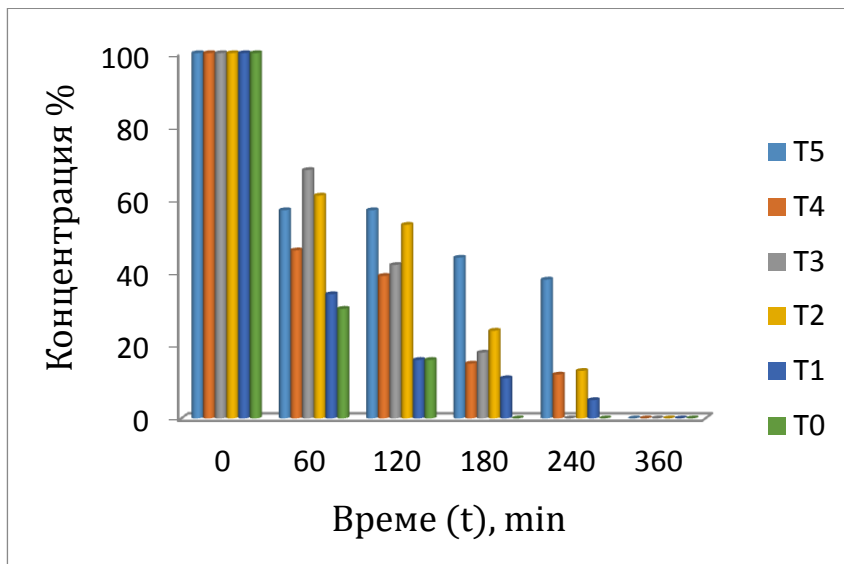


Фигура 35: Зависимост време/концентрация на NT (8-13) аналози при 220 nm; pH=7.4; t=37°C

На фигура 35 е представена зависимостта време/концентрация на NT-аналози при неутрално рН. T0 е нестабилен в неутрална среда. На 60^{-та} минута, концентрацията на T0 е 44%, а на третия час от експеримента е 10%.

Всички съединения показват по-ниска хидролитична стабилност при рН=7.4, спрямо стабилността им в кисела среда. След първия час, аналозите T1 и T3 показват най-висока стабилност, като тяхната концентрация е съответно 93% и 80%. Високата стабилност на T3 в киселата област (фиг. 34), както и запазване на концентрацията му (80%) през първия час в неутрално рН, може да окажат голямо значение на по-късен етап, при

определяне начина на приложение на пептида и изследване на неговите биологични ефекти. При останалите NT-анализи, през първия час, хидролизният процес протича с голяма скорост и на 60^{-та} минута концентрацията им е между 10% и 60%.



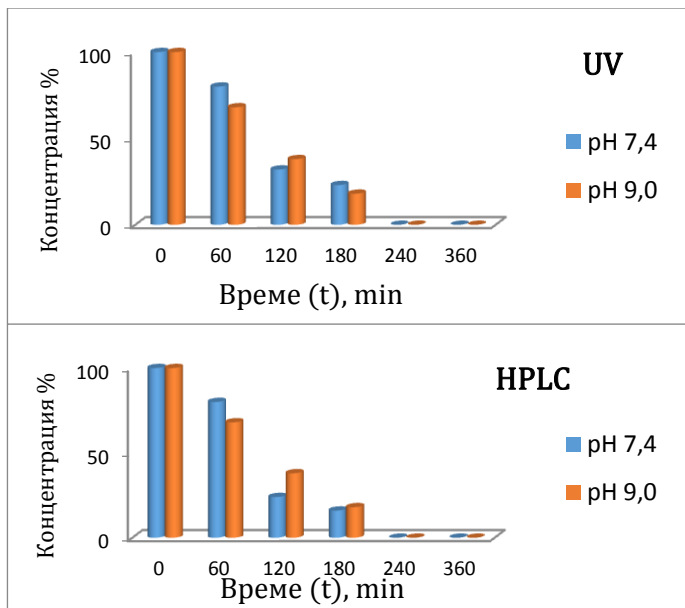
Фигура 36: Зависимост време/концентрация на NT (8-13) анализи при 220 nm; pH=9.0; t=37°C

Резултатите на фигура 36 показват, че скоростта на хидролиза се увеличава с нарастване на рН и синтезираните NT (8-13) анализи са чувствителни на хидролитично разпадане при стойности на рН=9.0. Концентрацията на T0 намалява много бързо (30% след първия час). Синтезираните анализи на NT показват по-добра стабилност в алкална среда, спрямо нативният NT, но концентрациите им са по-ниски в сравнение с концентрациите в кисела и неутрална среда. Изключение се наблюдава при T5, което показва по-добра стабилност в боратен буфер (концентрация след

първия час - 57%, която се запазва и през втория час от изследването), в сравнение със стабилността му във фосфатен буфер (концентрация на 60^{-та} минута - 13%). От всички разглеждани аналози, най-добра стабилност в алкална среда, след първия час показват Т3 и Т2 (концентрация съответно 68% и 61%). В хода на изследването се наблюдава, че концентрациите на тези две съединения бързо намаляват, докато концентрацията на Т5 се запазва най-висока (38% след четвъртия час).

6.2. Химическа стабилност при съхранение

Химическата стабилност при съхранение показва възможността дадена субстанция да остане непроменена вследствие на въздействия от типа на вътрешна реакция или външни фактори като въздух, топлина, светлина и пр. Всички синтезирани NT-аналози бяха съхранявани при температура -20⁰C в продължение на 1 година. Установихме, че съединенията запазват непроменени както физичните, така и химичните си свойства, и в този смисъл могат да бъдат считани за химически стабилни при тези условия. Проверихме хидролизната стабилност на Т3 в боратен и фосфатен буфер след съхранение, чрез UV-спектроскопия и HPLC. В предходното изследване невротензиновия Т3 - аналог показва най-висока стабилност при рН=2.0, която не е проверявана след едногодишно съхранение.



Фигура 37: Зависимост време/концентрация на Т3 при 220 nm; рН=7.4 и рН=9.0; t=37°C

От фигура 37 се вижда, че скоростта на протичане на хидролиза, респективно намаляването на концентрацията, определени чрез HPLC са сходни с данните получени при UV-спектrophотометрия. Потвърждава се добрата стабилност на Т3 през първия час в неутрално и алкално рН (концентрация - 80%). Зависимостта време/концентрация, представена на фигура 37 е сходна с тези на фигури 35 и 36 за Т3 аналога, което дава възможност да заключим, че е стабилен след 1 година съхранение.

7. Данни за молекулните дескриптори от “Правилото 5 на Липински” (Ro5), определени с програмата Molinspiration Cheminformatics, 2019

“Правилото 5 на Липински” (Ro5) се използва за оценка на лекарственото подобие и за предсказване възможността дадено химично съединение, притежаващо фармакологична или биологична активност има свойства, които да го правят активно след *per os* прилагане. То описва свойствата на молекулата, свързани с нейната фармакокинетика в човешкия организъм, включително абсорбция, разпределение, метаболизъм и екскреция (ADME). Ro5 препоръчва следните гранични стойности за някои молекулни параметри: хидрофобен параметър $\log P \leq 5$ и ≥ 0 , молекулна маса $M_w \leq 500$ Da, брой акцептори на протони (nO , nN) (HBA) ≤ 10 и брой донори на протони (nOH , nNH) (HBD) ≤ 5 . Правилото твърди, че за добра бионаличност след *per os* приложение, лекарствените продукти не трябва да нарушават посочените параметри по повече от един показател. За по-доброто оценяване на лекарственото подобие на пептидните молекули, това правило е променяно многократно. Настоящите разширени граници на физикохимичните свойства (bRo5) на пептидите са определени от следните стойности: $M_w \leq 1000$ Da, $-2 \leq cLogP \leq 10$, $HBD \leq 6$, $HBA \leq 15$, $PSA \leq 250 \text{ \AA}^2$, и $NRotB \leq 20$.

Чрез използване на *in silico* изчислителна техника по време на откриването и разработването на нови лекарствени молекули, значително се намалява броя на необходимите експерименталните проучвания. За физико-химично охарактеризиране на синтезираните пептиди - намиране параметрите на Ro5, топологичната полярна повърхност (TPSA) и процента на абсорбция (%ABS) използвахме програма Molinspiration Cheminformatics, 2019 (<https://www.molinspiration.com/>). Процента

на абсорбция е изчислен по следната формула: $\% \text{ ABS} = 109 - [0.345 \times \text{TPSA}]$. Резултатите са представени в таблица 17.

Коефициентът на разпределение в системата n-останол-вода се използва като количествена мярка за липофилността на съединенията, която характеризира способността им за преминаване през клетъчната мембрана. Намерените стойности на miLogP за всички съединения са отрицателни.

Аналозите на AVPI (S4 - S9) имат стойности на miLogP по-високи от -2 (-2.00 до -0.83) и попадат в разширените граници на Ro5 ($-2 \leq \text{cLogP} \leq 10$), което е предпоставка за тяхното преминаване през клетъчните мембрани. Всички AVPI-анализи (S4-S9) имат молекулно тегло под 1000 Da, което е в съответствие с bRo5 ($\text{Mw} \leq 1000 \text{ Da}$) и предполага, че молекулите ще бъдат лесно транспортирани и абсорбирани. Броят на връзките, донори и акцептори на протони е съответно 5 ($\text{HBD} \leq 6$) и 9 ($\text{HBA} \leq 15$), което също е в границите на bRo5. Всички пептидни производни S4-S9 имат еднаква стойност на TPSA - 141.83 Å, което е под границата от 160 Å и е индикатор за тяхната абсорбция. Изчисленият процент абсорбция за AVPI-аналозите е 60.07%. От стойностите на всички показатели за лекарствено подобие, може да се заключи, че прилагани самостоятелно, AVPI-аналозите могат да имат добра бионаличност след *per os* прием.

В проучване проведено от Doak и сътр., относно регистрираните лекарствени продукти с молекулни дескриптори извън Ro5 става ясно, че 25 продукта с пептидна структура, които са за орално приложение имат молекулна маса в границите 700-929 ($\bar{x} = 815$) Da. Синтезираните NT и негови аналози (T0-T6) имат $\text{Mw} = 790.96 - 820.97 \text{ Da}$, което попада в разширените граници на bRo5 ($\text{Mw} \leq 1000 \text{ Da}$). Пептидите са вещества с висок потенциал за образуване на водородни връзки. От една страна, броят на групите, донори на водород при NT аналозите (T0-T6) е много голям ($n\text{OHNH} = 14 -$

16), което определя минималното им разпределение през кръвно-мозъчната бариера и слабо навлизане в ЦНС. От друга страна, възможността за образуване на вътрешно-молекулни водородни връзки (IMHBs) е структурна характеристика, която допринася за подобряване на клетъчната пропускливост и пероралната бионаличност на съединения, попадащи в bRo5.

Молекулните дескриптори на синтезираните хибридни молекули (T-CON A, C и D) не попадат в границите на bRo5, което показва, че тези съединения няма да притежават фармакологична активност след *per os* прием и изключва възможността за тяхното перорално прилагане. Основните причини за ниската бионаличност са голямата молекулна маса ($M_w = 1197.49-1335.64$), високата полярност ($TPSA = 451.66 - 687.83 \text{ \AA}$) и значителната хидрофилност на молекулите, респективно ниския коефициент на разпределение $miLogP$ (от -6.08 до -3.40). Големият брой ротабилни връзки при тези съединения (над 20) също води до драстично намаляване в пермеабилитета и оралната бионаличност.

Таблица 17: Физикохимични характеристики на новосинтезираните съединения, определени с програмата Molinspiration Cheminformatics 2019

	Съединение	miLogP ^a	TPSA ^b	nON ^c	nOHNH ^d	nviolation	n-rotb ^e	Mol Vol ^f	Mw ^g	%ABS ^h
S4	Ala-Val-Pro-Ile	-2.00	141.83	9	5	0	9	385.60	398.50	60.07
S7	Ala-Phe(F)-Pro-Ile	-1.17	141.83	9	5	0	10	428.79	464.54	60.07
S8	Ala-Phe(F)-Pro-Phe(F)	-0.83	141.83	9	5	1	10	455.18	516.54	60.07
S9	Ala-Val-Pro-Phe(F)	-1.68	141.83	9	5	0	9	411.99	450.51	60.07
T0	Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu	-3.51	344.06	20	16	3	26	771.29	817.01	-9.70
T1	Lys-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu	-3.51	319.92	19	14	3	24	745.42	790.96	-1.37
T2	Cav-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu	-3.51	319.92	19	14	3	24	745.42	790.96	-1.37
T3	Cav-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu	-4.33	367.54	22	16	3	24	755.35	820.95	-17.80
T4	Arg-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu	-3.95	355.80	21	16	3	25	763.32	818.98	-13.75
T5	Cav-Arg -Pro-Tyr-Ile-Leu	-3.95	355.80	21	16	3	25	763.32	818.98	-13.75
T6	Cav-Arg-Pro-Phe(4F)-Ile-Leu	-3.31	335.57	20	15	3	25	760.23	820.97	-6.77
T-CON A	Ala-Val-Pro-Ile-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg	-6.08	687.83	39	35	3	51	1253.25	1335.64	/
T-CON C	Ala-Val-Pro-Ile-Cav-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu	-4.60	475.14	30	19	3	34	1121.41	1201.44	/
T-CON D	Ala-Val-Pro-Ile-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu	-3.40	451.66	28	19	3	36	1137.35	1197.49	/

8. Скрининг за аналгетична активност

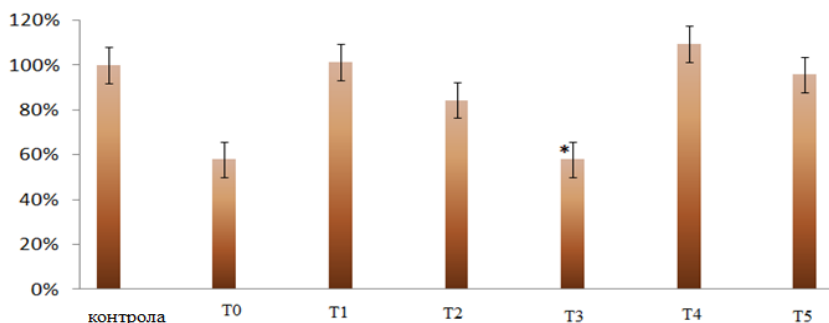
Бяха използвани два различни метода за тестване на аналгетична активност с цел идентифициране на възможни периферни и централни ефекти на изпитваните вещества. Тестът за предизвикване на гърчове с оцетна киселина (*acetic acid*) обикновено се използва за изследване на периферните аналгетични ефекти на лекарствата. Болката се индуцира чрез инжектиране на дразнители в перитонеалната кухина на мишки. Въпреки, че този тест е неспецифичен (например антихолинергични, антихистаминови и други средства също показват активност в теста), той се използва широко за провеждане на аналгетичен или противовъзпалителен скрининг. Аналгетичният ефект, наблюдаван при този тест, може да бъде реализиран чрез централни механизми, включващ опиоидни, допаминергични, норадренергични или серотонинергични рецепторни системи или чрез периферни механизми, участващи в инхибирането на простагландини, левкотриени и други ендогенни вещества, които са основни при индуцирането на болка. Болка, индуцирана от термичен стимул на горещата плоча (*Hot plate test*), е специфичен за централно медирана, но не и периферна ноцицепция.

8.1. Тестване за аналгетичния ефект на NT аналози при използване на *Acetic acid test*

Невротензин NT (8-13) и неговите аналози бяха тествани за аналгетична активност чрез използване на стандартен *acetic acid test*. От данните в литературата е известно, че ефекта на нативният NT(8-13) фрагмент върху модулацията на болковата сетивност е дозозависим и рецепторно-селективен. *Docking* проучване, проведено през 2017 година от Dzimbova и Rajpanova показва, че NT и неговите аналози (T1-T5) се свързват с активния център на

NTSR1 рецептора, който участва в опиоид-независимата антиноцицепция.

Резултатите от опита са представени на фигура 38. Интраперитонеалният (i.p.) път на въвеждане на NT аналози беше предпочетен въз основа на данните за техните физикохимични параметри (таблица 17). Броят на абдоминалните спазми, предизвикани от оцетната киселина е отчетен за период от 20 минути след инжектиране на изследваните вещества.



(* $p < 0,05$)

Фигура 38: Оценка на аналгетичния ефект (1% Acetic acid) след прилагане на NT аналози

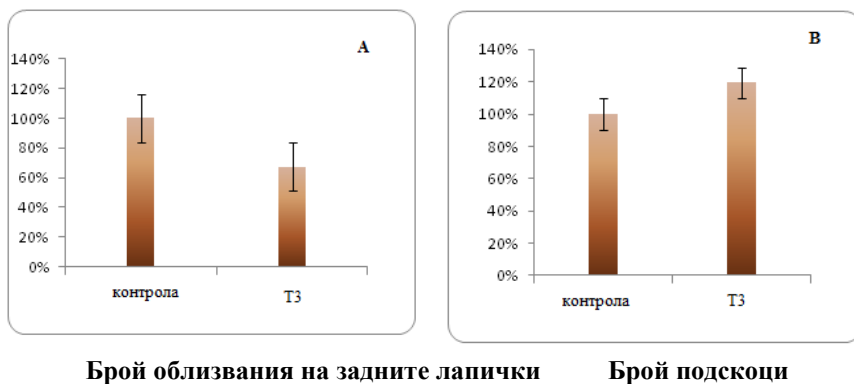
Нативният фрагмент на невротензин (T0) понижава болковата сетивност с близо 40%, спрямо контролната група. Аналозите T1, T4 и T5 не повлияват статистически значимо болковата чувствителност, а T2 аналога също показва незначителна активност (16%).

Единствено невротензиновия T3-аналог показва статистически значимо редуциране в броя на спазмите при модела за периферна болка (42% инхибиране при доза 5 mg/kg; $p < 0,05$), доближаващо се до това на нативния невротензин. Проявеният аналгетичен ефект от T3 може да се обясни с направените модификации в неговата

структура. От една страна, Arg играе решаваща роля за степента на свързване на молекулата с NT-рецептори, от друга страна, замаяната на двата Arg остатъка с Cav повишава стабилността на молекулата. От проведените изследвания за хидролитична стабилност (фиг. 35) се вижда, че T3 запазва своята концентрация (90%) в неутрално рН в първите 60 минути, което удължава времето на действие.

8.2. Тестване за аналгетична активност на невротензиновия T3-аналог при използване на *Hot plate test*

Вземайки под внимание резултатите, получени при модела на периферна болка, проучихме ефекта на невротензиновия T3 – аналог и при модел на централна болка (*Hot plate test*) при остро приложение. Отчитането на реакциите започва 10 мин. след инжектиране на изследвания пептид. Продължителността на наблюдението е 3 минути.



Фигура 39: Оценка на аналгетичния ефект (*Hot plate*) след прилагане на T3

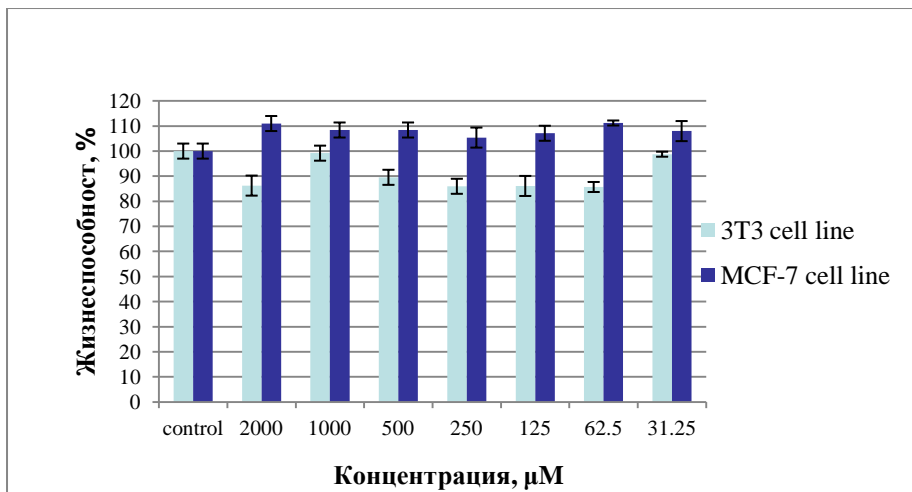
От графиката на фигура 39А се вижда, че след прилагане на ТЗ – аналога при доза от 5 mg/kg, броят на облизванията намалява, спрямо контролната група. Проследяването на отговора (облизване на задните лапички) при топлинно дразнене отразява по-добре аналгетичните ефекти на нови фармакологични агенти.

Броят на подскоците (фигура 39В) за времето на наблюдение е по-голям в групата с изследваното вещество, спрямо контролната група. Скачането е по-сложен отговор на организма и включва в себе си, както емоционална компонента, така и локомоторната система. Вероятно по-високият брой подскоци е в резултат от комбиниране на различни фактори.

9. Скрининг за цитотоксична активност

Проведохме първоначален скрининг за цитотоксична активност на нативния невротензин (NT 8-13) върху две клетъчни линии – MCF-7 и 3T3. Виталността на клетъчните линии беше оценявана с помощта на МТТ-тест.

MCF-7 е епителна клетъчна линия, получена от аденокарцином на гърдата, а 3T3 е миша ембрионална фибробластна клетъчна линия (не туморна). Използвахме 3T3 клетъчна линия, вземайки под внимание факта, че класическите антинеопластични лекарствени продукти не правят разлика между неопластични и нормални клетки. NT (8-13) беше приложен в максимална концентрация от 2000 μM и по метода на двойното разреждане до най-ниската 31.25 μM концентрация. Резултатите са представени на фигура 40.



Фигура 40: Сравнителна графика на клетъчната жизнеспособност на две различни клетъчни линии след 72h третиране с NT (8-13)

NT (8-13) показва слабо изразен цитотоксичен ефект върху 3T3 клетъчната линия след 72 h експозиция. При MCF-7 клетъчната линия се наблюдава увеличаване броя на жизнеспособните клетки във всички приложени концентрации. Увеличената пролиферация на неопластични клетки най-вероятно се дължи на увеличена експресия на NTSR1 рецептори в туморната маса, което се потвърждава от резултати публикувани от предишни проучвания.

NT (8-13) и неговите аналози са включени в хибридни молекули с цел повлияване болковия синдром при неопластично заболяване. Ако хибридният T-CON притежава цитотоксична активност, то тя най-вероятно би се дължала на SMAC-фрагмента от молекулата.

V. ИЗВОДИ

1. Синтезирани са 10 функционални производни на небелтъчните АК пара-флуорофенилаланин (H-Phe(p-F)-OH) и канаванин (H-Cav-OH), чрез предварително подбрани условия за синтез:

- Получени са подходящо защитени в N α - и C-функционалните групи рацемична небелтъчна АК пара-флуорофенилаланин: Z-D,L-Phe(p-F)-OH и Z-D,L-Phe(p-F)-OMe;

- Чрез комбиниране на 2 метода - ензимно и алкално осапунване, са получени 5 оптични изомера на защитените АК: Z-L-Phe-(p-F)-OH; Z-D-Phe-(p-F)-OMe; Z-D-Phe-(p-F)-OH и свободните АК: H-L-Phe-(p-F)-OH, H-D-Phe-(p-F)-OH.

- Синтезирана е N α защитената, небелтъчна АК - Fmoc-L-Phe(p-F)-OH, която е използвана при синтеза на целевите пептидни аналози.

- Синтезирани са 2 защитени аналога на небелтъчната АК канаванин - Fmoc-L-Cav-OH и Fmoc-L-Cav(OC)-OH.

- Структурата на всички синтезирани аминокиселинни производни е доказана чрез MS, елементен анализ и ъгъл на оптично въртене $[\alpha]_{546}^{20}$.

- С помощта на HPLC и CE е доказано успешното разделяне на двата енантиомера на H-D,L-Phe-(p-F)-OH, както и химическата чистота на крайните свободни АК - HBr.H- D-Phe-(p-F)-OH и HBr.H-L-Phe-(p-F)-OH.

2. Чрез използване на SPPS са синтезирани нативния AVPI фрагмент и 3 нови неописани в литературата AVPI-пептидни аналога. Чрез подходящо подбраните защитни групи и кондензиращи реагенти, синтезираните пептиди са получени в добиви 73%-79% и висока чистота 93%-97%, доказани чрез RP-

HPLC и CE. Всички съединения са охарактеризирани чрез ESI-MS и специфичен ъгъл на оптично въртене $[\alpha]_{546}^{20}$.

3. Чрез използване на SPPS са синтезирани нативния NT (8-13) фрагмент и 6 нови неописани в литературата NT (8-13) аналога. Използвани са различни кондензиращи реагенти и е подбран този, при който след деблокиране от смолата, получените пептиди са с висока чистота 93%-98% и добив 61%-68%, доказани чрез RP-HPLC и CE. Всички съединения са охарактеризирани чрез ESI-MS и специфичен ъгъл на оптично въртене $[\alpha]_{546}^{20}$.

4. Синтезирани са 3 нови, неописани в литературата SMAC-NT пептидни конюгата с подходящо подбрана структура: **T-CON A** - Ala-Val-Pro-Ile-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg; **T-CON C** - Ala-Val-Pro-Ile-Cav-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu; **T-CON D** - Ala-Val-Pro-Ile-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu. Чистотата на пептидните конюгати е 90%-95%, а добивите са в границите 59%-76%. Съединенията са охарактеризирани чрез ESI-MS и специфичен ъгъл на оптично въртене $[\alpha]_{546}^{20}$.

5. Определеният специфичен ъгъл на оптично въртене, за всички синтезирани пептиди показва, че по време на SPPS не настъпва рацемизация, което е постигнато чрез използване на подходящо подобрите кондензиращи реагенти.

6. Изследвана е хидролитичната стабилност на подбрани молекули при физиологични условия и след съхранение. Нативният NT (8-13) фрагмент показва ниска хидролитична стабилност и потвърждава необходимостта от разработването на нови, по-стабилни аналози. Стабилността на новосинтезираните NT-аналози в киселата област (pH=2.0) е по-висока от тази на нативния фрагмент. Хидролизата на T3 в солно-кисел буфер протича с

много малка скорост (Конс. = 90%), което дава основание да го считаме за стабилно при това рН. Резултатите показват също, че скоростта на хидролиза се увеличава с нарастване на рН и синтезираните NT аналози, са чувствителни на хидролитично разпадане при стойности на рН=7,4 и рН=9,0. От всички разглеждани NT-аналози, съединенията Т1 (Lys-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu) и Т3 (Cav-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu) показват най-висока стабилност в неутрално рН. След първия час, тяхната концентрация е съответно 93% и 80%. Високата стабилност на Т3 в киселата област, както и запазване на концентрацията му (80%) през първия час в неутрално рН, оказват голямо влияние в изследването на неговите биологични ефекти.

7. Определени са молекулни дескриптори от “Правилото 5 на Липински” (Ro5).

- При AVPI аналозите (съединения S4 - S9), всички молекулни дескриптори попадат в разширените граници на Ro5, което предполага, че молекулите ще бъдат лесно транспортирани и абсорбирани. За всички съединения S4-S9, изчисления процент абсорбция е 60.07%, което показва, че прилагани самостоятелно AVPI аналозите могат да имат добра бионаличност след *per os* прием.

- Молекулните маси на съединения Т0-Т6 попадат в разширените граници на bRo5 ($M_w \leq 1000$ Da). Броят на групите, донори на водород NT-аналозите е много голям ($n_{OHNH} = 14 - 16$), което определя минимално преминаване през кръвно-мозъчната бариера и слабо навлизане в ЦНС. От друга страна, възможността за образуване на вътрешно-молекулни водородни връзки (IMHBs) е структурна характеристика, която допринася за пероралната бионаличност на съединения, попадащи в bRo5.

- Молекулните дескриптори на синтезираните хибридни молекули (съединения T-CON A, C и D) не попадат в границите на bRo5, което изключва възможността за тяхното перорално прилагане, т.к. тези съединения няма да притежават фармакологична активност след *per os* прием.

8. От проведения първоначален скрининг за аналгетична активност на синтезираните аналози (T0-T5), чрез използване на тест с прилагане на химично дразнене (модел на периферна болка), могат да се направят следните изводи:

- нативният фрагмент на невротензин (T0) понижава болковата сетивност с 40%, спрямо контролната група;

- NT - аналозите T1, T4 и T5 не проявяват аналгетичен ефект, а T2 - аналога показва много слабо намаляване на болковата сетивност (16%);

- при NT - аналога T3 се наблюдава статистически значимо редуциране броя на спазмите при модел на периферна болка (42%; $p < 0,05$). Проявеният аналгетичен ефект на T3 може да се обясни с направените модификации в неговата структура. От една страна, Arg играе решаваща роля за степента на свързване на молекулата с NT-рецептори, от друга страна, замяната на двата Arg остатъка с Cav повишава стабилността на молекулата. Проведените изследвания за хидролитична стабилност показват, че T3 запазва своята концентрация (90%) в неутрално рН в първите 60 минути, което удължава времето на действие.

9. Проучен е ефекта на T3 аналога (Cav-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu) при модел на централна болка (Hot plate test). След прилагане на T3, броят на облизванията намалява, спрямо контролната група, което е показател за реализиране на аналгетичен ефект по централен механизъм.

10. Проведен е първоначален скрининг за цитотоксична активност на NT (8-13) върху две клетъчни линии – MCF-7 и 3T3. NT (8-13) увеличава пролиферацията на MCF-7 клетките, което най-вероятно се дължи на увеличена експресия на NTSR1 рецептори.

VI. ПРИНОСИ

1. Научното изследване в представения дисертационен труд по същността си е фундаментално. То е свързано с разработването, синтеза и определяне на биологичния ефект на нови хибридни пептиди.
2. Получените резултати разширяват познанието за ефектите, свързани с определени модификации в структурата на късоверижните пептиди.
3. Въз основа на проведените експерименти, са определени онези промени и заместители в молекулите, които повишават стабилността на молекулата и подобряват цитотоксичния/аналгетичния ефект на оригиналните изходни молекули.
4. Получените данни за хидролитичната стабилност на съединенията са основата за последващи процеси на оптимизация и селекция на нови активни структури.
5. Изследователските резултати и опит ще потенцират последващи, надграждащи фундаментални проучвания в областта на AVPI-миметиците и NT-миметиците, при разработването на нов клас по-активни и специфични лекарствени средства.
6. За първи път са изследвани за аналгетична активност новосинтезираните аналози T1-T5 на NT (8-13). При T3 е доказан централен механизъм за реализиране на аналгетичния ефект.
7. За първи път е проучена цитотоксичната активност на нативния NT (8-13) върху клетъчни линии – MCF-7 и 3T3. Доказан е пролиферативен потенциал върху MCF-7 клетъчната линия.

Публикации и участия, свързани с дисертацията

Публикации, свързани с дисертационния труд:

1. **Silvia Michailova**, Tatyana Dzimbova, Květa Kalíková, Eva Tesařová, Tamara Pajpanova CHEMICAL STABILITY OF NEW NEUROTENSIN (8-13) ANALOGUES. *BulgChemCommun*, 49, Special Issue E (pp. 113 – 117), 2017 ISSN: 0324-1130. (IF: 0.238)
2. **Силвия Михайлова** ТВЪРДОФАЗЕН ПЕПТИДЕН СИНТЕЗ (SPPS) Варненски медицински форум, т. 6, 2017, прил. 2 р. 415-421
3. **Silvia Mihaylova**, A. Tsvetkova, M. Arnaoudova, A. Todorova, V. Petkova, M. Dimitrov, M. Manova, Al. Savova CURRENT ISSUES REGARDING APPROVED PEPTIDE AND PROTEIN DRUGS IN BULGARIA, *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences* 2018, Volume 7, Issue 4, 708-717 Research Article ISSN 2278 – 4357 SJIF (IF: 7.421)

Доклади на научни форуми - 3:

1. Tatyana Dzimbova, **Silvia Mihailova**, Květa Kalíková, Eva Tesařová, Petra Sazelova, Eva Tesarova, Vaclav Kasicka, Tamara Pajpanova DESIGN, SYNTHESIS, ANALYSIS AND EVALUATION OF NEUROTENSIN (8-13) ANALOGUES CONTAINING NON-PROTEIN ARGININE AND LYSINE RESIDUES, 16th CEEPUS Symposium and Summer School on Bioanalysis, 07. 2016, Poland
2. **Силвия Михайлова**, Тамара Пайпанова ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ХИМИЧНА СТАБИЛНОСТ НА НОВОСИНТЕЗИРАНИ NT (8-13) АНАЛОЗИ ПРИ РАЗЛИЧНИ ФИЗИОЛОГИЧНИ УСЛОВИЯ И ПРИ СЪХРАНЕНИЕ ЧРЕЗ UV-СПЕКТРОСКОПИЯ И HPLC, Втори докторантски симпозиум "Молекулярна биология-нови хоризонти", 6 –7.04.2017 г. Институт по Молекулярна Биология „Акад. Румен Цанев“, БАН
3. **Силвия Михайлова** ТВЪРДОФАЗЕН ПЕПТИДЕН СИНТЕЗ (SPPS), Шеста научна сесия за преподаватели и студенти „75 години Медицински колеж-Варна“ 17-18 ноември 2017г. Медицински колеж-Варна

Постери на научни форуми - 3:

1. Svetlana Staykova, **Sylvia Mihailova**, Emilia Naydenova, Tamara Pajpanova, CHEMICAL STABILITY OF ANALOGUES OF OCTREOTIDE, 55 Years Anniversary Conference of the Roumen Tsanev Institute of Molecular Biology, Sofia, 5-6 October 2015
2. **Silvia Michailova**, Tatyana Dzimbova, Květa Kalíková, Eva Tesařová, Tamara Pajpanova, CHEMICAL STABILITY OF NEW NEUROTENSIN (8-13) ANALOGUES, 7th Bulgarian Peptide Symposium, 10-12.06.2016, Blagoevgrad, Bulgaria
3. **Silvia Michailova**, Maya Georgieva, Tatyana Dzimbova, Thomas Bruckdorfer, Tamara Pajpanova INFLUENCE OF ARGININE MIMETICS ON THE BIOLOGICAL EFFECTS OF NT(8-13) ANALOGUES, 8th Bulgarian Peptide Symposium Trakia University Stara Zagora 06. 2018

Участия в проекти:

1. „Фармакобиохимични изследвания на моделни катионни пептиди с потенциално антимикробно действие“. Ръководител – от страна на МУ Варна - проф. Н. Негрев, от страна на ИМБ–БАН – доц. Т. Пайпанова. Източник на финансиране – МУ-Варна