



PROSPERITAS VESTRA FINIS NOSTRA!

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ  
СТОЯНОВ“- ВАРНА**

**ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА**

**КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И КЛИНИЧНА  
ФАРМАКОЛОГИЯ И ТЕРАПИЯ**

**МОМЧИЛ КОНСТАНТИНОВ ЛАМБЕВ**

**НОВИ RGD/ПОЛИАМИНИ – СИНТЕЗ И ПРОУЧВАНЕ ЗА  
ПРОТИВОТУМОРНА АКТИВНОСТ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен

**„Доктор“**

по научна специалност „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“

Научни ръководители:

доц. Тамара Пайпанова, д.х.

проф. д-р Стефка Вълчева-Кузманова, д.м.н.

**Варна**

**2022 г.**

*Дисертационният труд е обсъден на заседание на Катедрен съвет на Катедрата по фармакология и клинична фармакология и терапия при Медицински университет – Варна и е насочен за публична защита пред научно жури в състав:*

- 1. Проф. д-р Стефка Вълчева-Кузманова, д.м.н. – председател (рецензия)*
- 2. Доц. Калоян Георгиев, д.ф.н. (становище)*
- 3. Проф. Милен Димитров, д.ф. (рецензия)*
- 4. Доц. Иванка Пенчева – Ел Тиби, д.ф. (становище)*
- 5. Доц. Мая Георгиева, д.ф. (становище)*

*Дисертационният труд съдържа общо 127 страници, онагледен е с 33 фигури, 4 схеми и 6 таблици. Книготисът включва 263 заглавия. Номерацията на фигурите, схемите и таблиците в автореферата съответства на тази от дисертационния труд.*

*Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 25.07.2022 г. от 10:00 ч. на онлайн заседание на научното жури.*

*Материалите по защитата са публикувани на интернет-страницата на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.*

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Използваните символи и съкращения са в съответствие с препоръките на IUPAC-IUB комисията за биохимична номенклатура (*J.Biol.Chem.* 264, 669, 1989). Всички използвани аминокиселини, без допълнително уточнение, са с L-конфигурация.

*Използвани съкращения на латиница:*

ABS	абсорбция
ACN	ацетонитрил
AcOH	оцетна киселина
AGAT	аргинин-глицин амидинотрансфераза
Antp	антенапедия
ASS	аргининосукцинат синтаза
BDDC	бис[4-(2,2-диметил-1,3-диоксолил)метил]карбодиимид
Boc	третична бутилоксикарбонилна група
BOP	1H-бензотриазол-1-ил-N-оксис-трис(диметил амино) фосфониев хексафлуорофосфат
bRo5	разширено правило на Липински
CE	капилярна електрофореза
CPP	клетъчно-преминаващ протеин или пептид
CTR	хлоротритилхлорид резин
DAE	етилендиамин
DAP	пропилендиамин
DCC	дициклохексил карбодиимид

DCE	дихлоретан
DCM	дихлорметан
DDM	аспартат-аспартат-метионин
DDS	лекарство-доставящи системи
DIC	диизопропилкарбодимид
DIPEA	N, N-диизопропилетиламин
DMEM	хранителна среда тип Dulbecco Modified Eagle's
DMF	N-диметилформаид
DMSO	диметилсулфоксид
EC	ендоцитоза
ECM	екстрацелуларен матрикс
EDAC	N-(3-диметиламинопропил-N'-етилкарбодимид
EDTA	етилендиамино тетраоцетна киселина
EGF	епидермален растежен фактор
eNOS	ендотелна азотен оксид синтетаза
ESI-MS	електроспрей-йонизационна масспектрометрия
EtOAc	етил ацетат
EtOH	етанол
Fab	антиген-свързващ фрагмент
FBS	фетален телешки серум
Fmoc	9-флуоренилметилоксикарбонилна група

FN	фибронектин
HBA	акцептор на водородни връзки
HBD	донор на водородни връзки
HBTU	1,1,3,3 – тетраметилурониев хексафлуорофосфат
HDAC	хистон деацетилаза
hEGF	човешки епидермален растежен фактор
HOBT	1-хидроксibenзотриазол
HPLC	високоэффективна течна хроматография
HPMA	N-(2-хидроксипропил)метакриламид
IC <sub>50</sub>	инхибираща концентрация, при 50% от случаите
IP	интраперитонеален
MAP	моделен амфипатичен пептид
MeOH	метанол
MTT	3-(4, 5-диметилтиазол-2-ил)-2, 5- дифенилтетразол бромид
NPs	наночастици
nRotB	брой въртящи се връзки
OD	оптична плътност
Pbf	пентаметил-2,3-дихидробензофуран-5- сулфонил
PBS	стерилен фосфатен буфер
PGA	полигликолова киселина
PLA	полимлечна киселина

PLGA	полилактид-ко-гликолид
PyBop	бензотриазол-1-ил-окси-трис- пиролидинофосфониев хексафлуорофосфат
RDD	рационален лекарствен дизайн
RGD	аргинил-глицил-аспарагинова киселина
Ro5	правилото на Липински
RP-HPLC	високоэффективна течна хроматография
SDS	натриев додецилсулфат
SPPS	твърдофазен пептиден синтез
SYBR Green	N',N'-диметил-N-[4-[(E)-(3-метил-1,3- бензотиазол-2-илиден)метил]-1- фенилхинолин-1-иум-2-ил]-N- пропилпропан-1,3-диамин
Tat	трансактивиращ транскрипционен активатор
TBTU	бензотриазолил-тетраметилурониев тетрафлуороборат
TCTU	O-(1H-6-хлоробензотриазол-1-ил)-1,1,3,3- тетраметилурониев тетрафлуороборат
TDBTU	N,N,N',N'-тетраметил-O-(3,4-дихидро-4- оксо-1,2,3-бензотриазин-3-ил)урониев тетрафлуороборат
TFA	трифлуороцетна киселина
TGF	трансформиращ растежен фактор
THP	тумор-насочен пептид

TIPS	триизопротил силан
TLC	тънкослойна хроматография
TNF	тумор-некротизиращ фактор
TPSA	топологична полярна повърхност
UV-VIS	ултравиолетова спектрофотометрия
VEGF	съдов ендотелиален растежен фактор

*Използвани съкращения на български:*

АК	аминокиселина
БАН	Българска академия на науките
ГИТ	гастро-интестинален тракт
дАТФ	деоксиаденозинтрифосфат
ДНК	деоксирибонуклеинова киселина
НСИ	Национален статистически институт
ПЕГ	полиетиленгликол
СПИН	синдром на придобитата имунна недостатъчност
СЗО	Световна здравна организация
ЦНС	централна нервна система

## СЪДЪРЖАНИЕ

<b>I. ВЪВЕДЕНИЕ</b> .....	<b>10</b>
<b>II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b> .....	<b>12</b>
<b>III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ</b> .....	<b>13</b>
1. Материали .....	13
1.1. Реагенти.....	13
1.1.1. Използвани аминокиселинни и амини .....	13
1.1.2. Реагенти за пептиден синтез .....	13
1.1.3. Реагенти, използвани при определяне на цитотоксичност.....	14
1.2. Клетъчни линии .....	14
1.3. Апаратура.....	15
1.3.1. Апаратура пептиден синтез .....	15
1.3.2. Апаратура за анализ .....	16
1.3.3. Апаратура за определяне на цитотоксичност .....	16
2. Методи.....	16
2.1. Химични методи.....	16
2.1.1. Методи за синтез .....	16
2.1.2. Хроматографски методи за пречистване и оценка на продуктите .....	18
2.1.2.1. Колонна гел-течна хроматография .....	18
2.1.2.2. Тънкослойна хроматография (TLC).....	18
2.1.2.3. Високоэффективна течна хроматография (HPLC) – с конвенционални носители <sup>19</sup>	
2.1.2.4. Капилярна електрофореза.....	20
2.1.3. Метод за структурен анализ на синтезираните пептиди и пептидни аналози...	20
2.2. Биологични методи .....	21
2.2.1. <i>In vitro</i> методи за оценка на цитотоксичност.....	21
2.2.1.1. Култивиране на клетките .....	21
2.2.1.2. Тест за жизненост с трипаново синьо.....	21
2.2.1.3. Оценка на виталността на клетките чрез използване на МТТ-тест .....	22
2.3. Математически методи .....	25
2.3.1. Статистическа обработка на данните .....	25
2.3.2. <i>In silico</i> метод за изчисляване на молекулни дескриптори от “Правилото 5 на Липински” (Ro5).....	25
<b>IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ</b> .....	<b>26</b>
1. Моделиране на пептидни аналози/миметици на RGD .....	26
2. Синтез на аналози на RGD.....	28



2.1. Получаване на защитени, небелтъчни аминокиселини, необходими за пептидния синтез RGD аналози модифицирани в N-края.....	33
2.2. Получаване на RGD и аналози, модифицирани в N-края или C-края.....	34
2.3. Синтез на RGD, R(NO <sub>2</sub> )GD и RGD-OMe .....	36
2.4. Синтез на CavGD.....	37
2.5. Синтез на AgbGD и AgrGD.....	38
3. Получаване на защитени биогенни диамини, модификанти за синтеза на пептидните конюгати .....	42
4. Конюгиране на RGD и неговите аналози с полиамини .....	43
5. Охарактеризиране на новосинтезираните аналози на RGD .....	47
6. Изпитване за цитотоксичен ефект на новосинтезираните аналози на RGD и на техните конюгати с полиамини.....	49
7. Оценка за преминаване на веществата през биологични мембрани чрез изчисляване на данни за молекулните дескриптори с помощта на софтуера Molinspiration Cheminformatics® .....	59
<b>V. ИЗВОДИ .....</b>	<b>64</b>
<b>VI. НАУЧНИ ПРИНОСИ .....</b>	<b>66</b>
<b>VII. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....</b>	<b>67</b>
<b>VIII. НАУЧНИ ПРОЕКТИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....</b>	<b>69</b>

## **I. ВЪВЕДЕНИЕ**

Злокачествените новообразувания са на едно от първите места по честота на заболяванията, водещи до смърт и са основен проблем на общественото здравеопазване. В България наред с хипертонията и сърдечно-съдовите заболявания, онкологичните се определят като едни от най-рисковите. Дори и днес, различаването на злокачествените от доброкачествените форми е проблем и повечето случаи на рак се диагностицират едва след разрастване на туморна маса.

Що се отнася до химиотерапията при туморни заболявания, един от основните проблеми е свързан с това, че лекарствата не са селективни по отношение на раковите и на нормалните клетки. Получаващото се в резултат увреждане на нормалните клетки води до тежки нежелани лекарствени реакции. Това от своя страна ограничава приложението на противотуморните лекарства до най-високата поносима доза. Освен това, някои от химиотерапевтиците не са разтворими и е много трудно да бъдат въведени в клетката.

Известно е също така, че ако определена монотерапия не показва желан терапевтичен ефект, то комбинирането на две или повече лекарства може да се приложи успешно при лечението на инфекции, хипертония, СПИН или рак. Този подход има някои недостатъци, свързани с фармакокинетиката на прилаганите вещества, възможните нежелани лекарствени реакции и евентуалните междумолекулни взаимодействия.

През последните години се използва нов подход за лекарствен дизайн - комбиниране на два или повече фармакологични ефекта в един лиганд. Бивалентната молекула запазва ефикасността на терапията на отделните лекарствени вещества (синергичен ефект, по-ниски дози и малък брой странични ефекти). Също така се преодоляват някои ограничения, които се наблюдават при едновременното им прилагане.

Повечето от прилаганите агенти проявяват своя цитотоксичен ефект чрез индукция на апоптоза. Един от механизмите, на които се основава бързото и неконтролируемо нарастване и метастазирание на солидните тумори е способността им да предизвикват ангиогенеза. По този начин се осигурява доставката на кислород и хранителни вещества, необходими за по-нататъшната им пролиферация и растеж. Инхибирането на процеса на ангиогенеза е важна стратегия за селективно ограничаване на туморния растеж. Много усилия са насочени към дизайн на инхибитори на ангиогенезата като антинеопластични

агенти. В последните години направлението за създаване на антиангиогенни лекарства придобива особена актуалност, във връзка с първите терапевтични успехи на препаратите *Herceptin*<sup>®</sup> и *Pentosan*<sup>®</sup>, при лечение на метастазирани карциноми.

Известно е, че някои туморни клетки могат да експресират на повърхността си интегрини  $\alpha_v\beta_3$  и  $\alpha_v\beta_5$ , които разпознават и се свързват специфично с пептидната последователност Arg-Gly-Asp (RGD). За лекарствения дизайн особено атрактивни са рецепторите, към които се свързва RGD, тъй като те участват в различни физиологични процеси, например тромбоцитна агрегация и ангиогенеза, а също и в патологични като кардиоваскуларни нарушения. Конюгирането на RGD-пептиди с подходящи цитостатици води до активното им насочване към туморните клетки. Този подход представлява перспективна стратегия за оптимизиране на противотуморната терапия.

Използването на пептиди, които могат директно да бъдат насочени към туморните клетки, без да се засягат нормалните клетки - т.нар. „прицелна” терапия, се развива като алтернативна стратегия на конвенционалната химиотерапия. По-ниската им молекулна маса, по-лесното придвижване и по-добрата проникваща способност са предимства, които определят олигопептидите и техните миметици като по-перспективни агенти в сравнение със съответните високо-молекулни съединения.

**Цел на настоящия дисертационен труд е получаване на нови хибридни структури – RGD/полиамини и последващ биологичен скрининг за потенциалната им цитотоксичност.**

В хода на експериментите бяха синтезирани и охарактеризирани линейни пептидни миметици на RGD, както и техни конюгати с природни и синтетични полиамини. Получените от нас пептидни миметици ни позволиха да бъде проведено *in vitro* изследване за потенциален цитотоксичен ефект.

Представените в дисертационния труд резултати биха могли да послужат за основа на бъдещи насочени синтези - един от съвременните стратегически подходи при създаването на нови лекарствени средства.

## **II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

Въз основа на изложените по-горе основни изводи от литературния обзор е формулирана целта на настоящия дисертационен труд, а именно:

### **ЦЕЛ**

**Получаване на нови хибридни структури – RGD\полиамини и биологичен скрининг за потенциално цитотоксично действие.**

Във връзка с изпълнението на така формулираната цел си поставихме следните задачи:

### **ЗАДАЧИ**

1. Получаване на защитени небелтъчни аминокиселини, модификанти за синтеза на RGD пептидни аналози;
2. Синтез на RGD пептидни аналози;
3. Синтез на аналози на биологични диамини;
4. Синтез на RGD\полиаминови конюгати;
5. Охарактеризиране на новосинтезираните пептидни аналози;
6. Прогнозиране на фармакологична или биологична активност след перорален прием на новосинтезираните съединения;
7. *In vitro* изследване за потенциален цитотоксичен ефект на новосинтезираните пептидни аналози и RGD\полиаминови конюгати.

### III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### 1. Материали

##### 1.1. Реагенти

Всички разтворители и реагенти, използвани в настоящата дисертация са с висока степен на чистота „ч.з.а.“ („Analytical grade” или „HPLC-grade”).

##### 1.1.1. Използвани аминокиселинни и амини

Амини: 1,2-ethylenediamine, 1,3-diaminopropane, (Iris Biotech GmbH, Germany).

Незащитени АК: L-Cav-OH (Reatec, Germany);

На-Фмос-защитени АК: Fmoc-L-Arg(NO<sub>2</sub>)-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”. Fmoc-L-Gly-OH; Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-L-Asp(tBu)-OH Fmoc-L-Agb(Boc<sub>2</sub>)-OH; Fmoc-L-Agp(Boc<sub>2</sub>)-OH са закупени от Iris Biotech GMBH (Germany) и Merck (Germany).

##### 1.1.2. Реагенти за пептиден синтез

Защитни реагенти: N-(9-Fluoronylmethoxycarbonyloxy)succinimide (Fmoc-OSu) (Iris Biotech GmbH, Germany) и Di-tert-butyl decarbonate (Boc)<sub>2</sub>O (Fluka).

Кондензиращи реагенти: O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl carbamide-tetrafluoroborate (TBTU), O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) (Iris Biotech GmbH, Germany), hydroxybenzotriazole (HOBT), Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) (Iris Biotech GmbH, Germany), N-(3-Dimethylammonopropyl-N'-ethylcarbodiimide (EDAC) (Merck).

Бази: Диизопропилетиламин (DIPEA) (Fluka), Et<sub>3</sub>N (Ferak), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> .

Органични разтворители: дихлоретан (етилен хлорид, DCE) (Merck); дихлорметан (метилен хлорид, DCM)(Merck); метанол (MeOH) (Merck); етанол (EtOH) (Merck); етил ацетат EtOAc (Merck); 2-пропанол 2-PrOH (Merck); диетилов етер (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>O (Merck); диметилформамид (DMF) (Merck); 20% пиперидин (Merck); 20% Piperidin/DMF (20 mL Piperidin в 80 mL DMF); трифлуороцетна киселина (TFA) (Merck); 1,0 % TFA/DCM (0,66 mL 99% TFA в 99,34 mL DCM).

Смоли: 2-Chlorotriylchloride resin (Iris Biotech GmbH, Germany); H-L-Asp(<sup>t</sup>Bu)-Chlorotriylchloride resin; 1,2-ethylenediamine-CTR; 1,3-diaminopropane-CTR (Iris Biotech GmbH, Germany).

Хроматографски реагенти: За TLC използвахме алуминиеви плаки Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Мегск, 64271, Darmstadt, Germany) и следните подвижни фази: 1) CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (4:1); 2) EtOAc:n-BuOH:AcOH:H<sub>2</sub>O (2:1:1:1); 3) CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (80:30:5); 4) C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>:CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>:AcOH (100:50:2); 5) EtOH:NH<sub>3</sub> (6:4); 6) CHCl<sub>3</sub>:MeOH:AcOH (95:5:5). За течната колонна хроматография използвахме Sephadex G-25f (Pharmacia Fine Chemicals AB, Sweden);

Нинхидринов разтвор: 5g нинхидрин е разтворен в 50 ml 2N CH<sub>3</sub>COOH и 950 ml n-BuOH;

Хлорна среда: к. HCl и KMnO<sub>4</sub>;

Реактив на Райндал: 10g N,N,N',N'-тетраметил- 4,4'-диамино-дифенилметан се разтваря в 30 ml CH<sub>3</sub>COOH, разрежда се с 600 ml вода и се прибавят 5g KI;

### **1.1.3. Реагенти, използвани при определяне на цитотоксичност**

Dulbecco Modified Eagle's medium (DMEM) (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 (FlowLab, 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 (Merck, Germany); диметилсулфоксид (DMSO) (Sigma Chemical Co.); S-буфер (1M сорбитол, 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 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 (ТВЕ) 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.).

### **1.2. Клетъчни линии**

Описаното скринингово токсикологично проучване е проведено върху панел от трансформирани клетъчни линии от различни тъкани:

1. MDA-MB-231 (монослойна, инвазивна човешка клетъчна линия от аденокарцином на гърдата);

2. HepG2 (монослойна клетъчна линия от човешки хепатоцелуларен карцином);
3. MCF-7 (човешка монослойна неинвазивна клетъчна линия от аденокарцином на млечната жлеза);
4. PC-3 (монослойна клетъчна линия от човешки аденокарцином на простата);
5. HT-29 (монослойна клетъчна линия от човешки карцином на дебелото черво);
6. A-549 (аденокарциномни човешки алвеоларни базални епителни клетки);
7. MCF-10A (човешка, нетуморогенна клетъчна линия от епител на млечна жлеза);
8. 3T3 – миша, ембрионална, фибробласна клетъчна линия.

Всички използвани клетъчни линии са от клетъчната библиотека, с която разполага Институтът по молекулярна биология.

В работата са използвани консумативи (епруветки, връхчета за пипети, пипети, петрита, микроплаки, матраци и др.) за еднократна употреба, както и реактиви (клетъчни среди, буфери, дестилирана вода и др.), които са автоклавиращи.

### 1.3.Апаратура

#### 1.3.1. Апаратура пептиден синтез

- Автоматичен пептиден синтезатор Activo P14 (Activotec, Cambridge, UK);



Фигура 12. Автоматичен пептиден синтезатор Activo P14

- Мануален пептиден синтезатор RWTH (Aachen, Germany) за химичен синтез;

- Капилярки Micro-Haematocrit-tubes: Length  $75 \pm 0,5$  mm; Inner  $\varnothing 1,15 \pm 0,05$  mm; Outer  $\varnothing 1,55 \pm 0,05$  mm (Assistant);

- Кювети: оптичен път 1,8 mm;

- За определяне на оптичния ъгъл на въртене използвахме Polarimeter 141 (Perkin Elmer, USA);

- Използвани лиофилизатори – Telstar Cryodos (Telstar Industrial S.L., Spain) и LyovacGT2 (Leybold-Heraeus GmbH, Germany).

### **1.3.2. Апаратура за анализ**

- Апарат UV-VIS (Cole Parmer, USA) при 254 nm; UV-Cabinet II (CAMAG); за UV-детекциите на тънкослойните хроматограми;

- HPLC анализите извършихме на апарати Shimadzu CLASS-VP V5.032 и Agilent Technologies HP 1100 и Dionex, UltiMateR 3000 LC система;

- Използвани колони и мобилни фази: ZIC® - HILIC (100 x 4,6 mm) с мобилна фаза: 0.005 M  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ /ацетонитрил; Beckman Ultrasphere® RP C18 (250 x 4,6 mm) с мобилна фаза: 0.01M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ /ацетонитрил; Atlantis® dC18, 4.6 x 150 mm с мобилна фаза: ацетонитрил/0.1% мравчена киселина;

- Течна хроматографска система за средно налягане Duramat (CfB Prominent, Germany) за пречистване на съединенията;

- Капилярната електрофореза извършихме на апарат BeckmanP/ACE (Beckman Coulter Inc., Pasadena, CA, USA)

### **1.3.3. Апаратура за определяне на цитотоксичност**

- ELISA четец (TECAN, Sunrise®, Grodig/Salzburg, Austria).

## **2. Методи**

### **2.1. Химични методи**

#### **2.1.1. Методи за синтез**

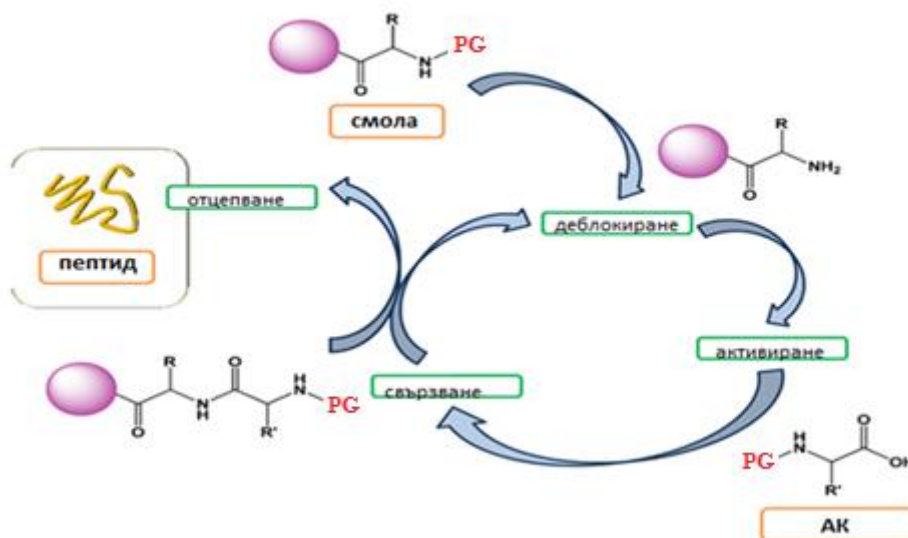
Изследваните пептиди, аминокиселинни аналози, техните производни и защитените диамини са синтезирани по два метода: в разтвор и чрез твърдофазен пептиден синтез върху полимерен носител.



За провеждане на твърдофазния пептиден синтез е подбрана Fmoc/<sup>t</sup>Bu стратегията върху полимерни носители Wang resin (Wang 1973) и 2-Chlorotriyl chloride resin (Barlos *et al.* 1989), с прилагане на различни кондензационни реагенти за активиране в присъствие на DIPEA или DIPEA/HBTU (диизопропилетиламин/1,1,3,3-тетраметилуруониев хексафлуорофосфат) (Chan and White 2000). Синтезът включва следните етапи от валидизиран стандартен протокол:

### ***Стандартен протокол за SPPS по Fmoc-стратегия***

- 1) Подготовка на смолата чрез набъбване в DMF или DCM;
- 2) Свързване на първата активирана аминокиселина (защитена  $\alpha$ -аминогрупа, както и подходящо защитена странична функционална група), разтворена в минимално количество DCM или DMF (ако изходната АК е добре разтворима в DCM) в присъствие на DIPEA. Реакцията се провежда при стайна температура в продължение на около 3 часа;
- 3) Деблокиране на Fmoc-групата с 25% пиперидин в DMF;
- 4) Стъпка (i): Кондензация на втората по ред АК при използване на трикратен излишък от Fmoc-AA-OH, DIC (N,N-диизопропилкарбодиимид), база DIPEA, HOBt и разтворител DMF. Реакцията се провежда при стайна температура до пълно превръщане на изходните съединения;
- 5) Стъпка (ii): След кондензация на втората АК следва промиване на дипептид-смолата и деблокиране Fmoc-защитена аминокиселина с 25% пиперидин в DMF и чрез промиване с DMF на получения дипептид-смола;
- 6) Стъпка (i): Кондензация на третата по ред АК, както е описано в точка 4, до получаване на желания пептид;
- 7) Стъпка (ii): Отцепването на пептида от смолата и едновременното деблокиране на страничните вериги (отстраняване на Boc и <sup>t</sup>Bu защитните групи) става чрез промиване посредством трикратно добавяне на воден разтвор на трифлуороцетна киселина (TFA) и триизопропил силан (TIPS). Реакцията се провежда при стайна температура, TFA се изпарява под вакуум до минимум разтворител, и се преципитира със студен диетилов етер. Получените пептиди се пречистват чрез гел-филтрация с 10% CH<sub>3</sub>COOH и се лиофилизират;
- 8) Пълното протичане на реакциите на отстраняването на Fmoc групата и на реакциите на образуване на пептидната връзка се съблюдава чрез стандартен Кайзер-тест



Фигура 13. Схема на твърдофазен пептиден синтез по Wang

## 2.1.2. Хроматографски методи за пречистване и оценка на продуктите

### 2.1.2.1. Колонна гел-течна хроматография

Колонна гел-хроматография се използва за обезсоляване на пептидите чрез гел-филтрация върху Sephadex G-25 (колони 110\*2.7 cm) с елуент 10%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и скорост на потока 10 mL/min. В отделни епруветки се събират по 5ml. Чистите пептидни фракции се определят чрез нанасяне на проби върху хроматографска плака. Събраните чисти пептидни фракции се лиофилизират до сухо с апарат Telstar Cryodos-80 при температура  $-50^\circ\text{C}$  и се съхраняват при  $-20^\circ\text{C}$ .

При необходимост пептидите се пречистват чрез течна колонна хроматография върху силикагел и елуент  $\text{MeOH}:\text{EtOAc}:\text{H}_2\text{O}$  (30:80:5).

### 2.1.2.2. Тънкослойна хроматография (TLC)

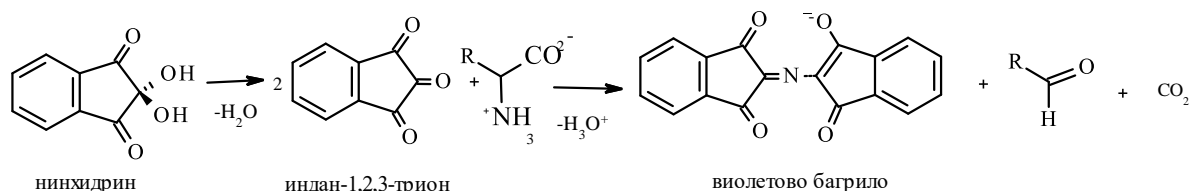
Тънкослойната хроматография е използвана с цел качествено доказване на пречистените пептиди. За наблюдение на тънкослойните хроматограми е използван UV-VIS (Cole Parmer, USA), хроматографска плака DC-Kieselgel 60  $\text{F}_{254}$  (Merck). Количеството на нанесената проба е 10 $\mu\text{l}$ , разстояние за развиване на хроматограмата – 10-12 cm. Използваните подвижни фази са: система CT1 -  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (80:30:5); система BAO -  $\text{C}_6\text{H}_6:\text{AcOH}:\text{CH}_3\text{COOH}$  (100:50:2); система BAW –  $n\text{-BuOH}:\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O}$  (4:1:5). Анализът е проведен при дължина на вълната 220 nm.

Начин на работа:

1/ На алуминиева плака с помощта на капилярка се нанася анализираното вещество. След това плаката се поставя в съответната хроматографска система;

2/ След изваждане на хроматограмата, плаката се изсушава и се детектира разделянето на анализирани вещества с помощта на UV- лампа, при  $\lambda=220$  nm;

3/ Детектираната хроматограма се проявява, като се напръсква с нинхидринов разтвор и се нагрява 5 min, при 110°C. Реакцията с нинхидрин (хидрат на индан-1,2,3-трион) се използва в качествения анализ за доказване на първични амини. В TLC се прилага за визуализация на зоните. При обработка на  $N\alpha$ -аминокиселини с нинхидрин се получава интензивно пурпурно-виолетово багрило:



**Фигура 14.** Реакция за доказване на първични амини (*Moore and Stein 1954*)

4/ Оцветената (след напръскване с нинхидрин) плака се поставя в хлорна среда. Хроматограмата се обезцветява и изважда от средата;

5/ Обезцветената плака се напръсква с реактив на Райндел. Наблюдава се синьо оцветяване, което определя защитената АК.

### 2.1.2.3. Високоэффективна течна хроматография (HPLC) – с конвенционални носители

Високоэффективна течна хроматография (RP-HPLC) е използвана за оценка на химическата чистота на синтезираните аминокиселини и пептиди. Анализите са извършени с помощта на течни хроматографски системи - LKB Bromma (Sweden) и Waters Alliance (Waters Corporation, USA), снабдени с фотодиоден детектор. Използвана е хроматографска колона XTerra<sup>®</sup> MS C18 с обърнати фази, размер на частиците 3,5  $\mu$ m, вътрешен диаметър 3.0 mm и дължина 150 mm.

Анализът е проведен при следните хроматографски условия: система за изократно елуиране, съставена от ACN/0.05%TFA 5/95 (v/v) при температура 25°C, скорост на потока 0.4 ml/min. Обем на инжектираните проби - 20 µL. UV-детекцията е осъществена при аналитична дължина на вълната 240 nm.

#### **2.1.2.4. Капилярна електрофореза**

СЕ е използвана за определяне чистотата на синтезираните небелтъчни аминокиселини и на избрани олигопептиди.

Хроматографските условия, при които беше извършен анализа са следните: работен буфер: 20 mM Tris, 5mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM SDS (натриев додецилсулфат), рН=7; ефективна капилярна дължина: 290/400 mm; вътрешен диаметър: 50 µm; електрическо поле: + 15 kV, 25 µA; температура: 25°C; UV детекция при λ=206 nm.

#### **2.1.3. Метод за структурен анализ на синтезираните пептиди и пептидни аналози**

##### *Електроспрей-йонизационна масспектрометрия (ESI-MS)*

За структурен анализ на новосинтезираните АК и целеви олигопептиди, обект на изследванията в настоящата дисертация, е използвана електроспрей-йонизационна масспектрометрия (ESI-MS). Определена е молекулната маса на новополучените съединения, отговаряща на тяхната йонизирана (протонирана или депротонирана) форма, съобразно броя на свободните amino- и карбоксилни групи като съставна част от тяхната структура. Анализите са осъществени в Institute of Bioanalysis, University of Pecz, Hungary. Мас-спектрите са снети с електроспрей масспектрометър Agilent 6530 Series Q-TOF LC/MS System (Santa Clara, CA, USA). Използвана е хроматографска колона Aeris® 2,6 µm PEPTIDE XB-C18 с вътрешен диаметър 2.1 mm и дължина от 100 mm. *Хроматографски условия:* система за градиентно елуиране, съставена от елуент А: H<sub>2</sub>O + 0.1% HCOOH, елуент В: ACN/0.1% HCO<sub>2</sub>H при температура 24°C, скорост на потока 0.4 mL/min. Обемът на инжектираните проби е 5.0 µL. UV-детекцията е проведена при аналитична дължина на вълната 240 nm.

## 2.2. Биологични методи

### 2.2.1. *In vitro* методи за оценка на цитотоксичност

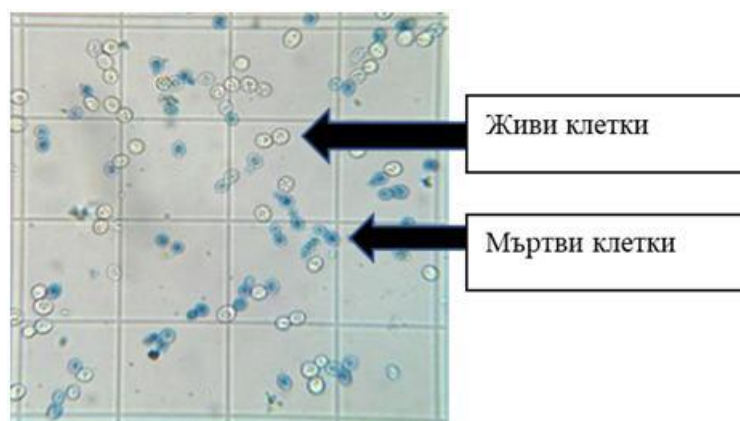
#### 2.2.1.1. Култивиране на клетките

Монослойните клетъчни линии се инкубират при 37°C, във влажна атмосфера, със съдържание на 5% CO<sub>2</sub>. Клетките се култивират в модифицирана среда - DMEM, съдържаща 10% FBS, 100 µg/mL стрептомицин и 100 U/mL пеницилин. Хранителната среда за MCF-10A е допълнена с 10 µg/ml инсулин, хидрокортизон и EGF (20 ng/ml човешки епидермален растежен фактор (hEGF) и 0.05 mM хидрокортизон.

Суспензионните клетки се поддържат в инкубатор на 37° C при влажна атмосфера в присъствие на 5% CO<sub>2</sub>. Те се култивират в хранителна среда MEM (модификация на Dulbecco, Gibco). Към средата се добавя 10% телешки серум, L-глутамин- 1% и антибиотици (0,05% канамицин). Клетките се пасажират през ден в концентрация 5x10<sup>5</sup> клетки/мл.

#### 2.2.1.2. Тест за жизненост с трипаново синьо

Тестът за жизненост чрез оцветяване с трипаново синьо (Trypan Blue) представлява количествено определяне на виталността на клетките. Използва се способността на органичното багрило да навлиза единствено в мъртвите клетки (клетки с нарушени клетъчни мембрани). След проникване в мъртвата клетка, трипановото синьо се свързва с вътреклетъчни протеини и я оцветява в синьо. Живите клетки остават неочетени.



Фигура 15. Микроскопски анализ с трипаново синьо (*Balacheva et al. 2012*)

Оцветяването се осъществява при смесване на клетъчна суспензия с равно количество 0,4% трипаново синьо, разтворено в PBS, след което се инкубира за 3 мин.

Броят на живите и мъртвите клетки се определя с камера на Бюркер под светлинен микроскоп с помощта на стандартна мрежа. Изброяват се клетките в три големи квадрата по диагонал (един голям квадрат се състои от 16 малки квадрата)+2 малки квадрата, или общо 50 малки квадрата. Изчислява се средната стойност от три независими експеримента и се определя инхибиторната доза - IC<sub>50</sub>. Това е концентрацията, при която 50% от клетките са мъртви.

#### ***Протокол за култивиране на суспензионни клетъчни линии:***

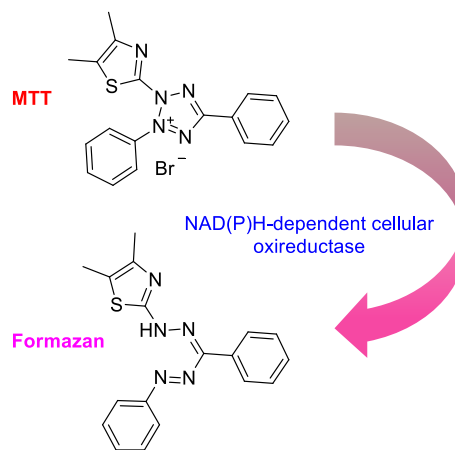
1. Суспензионната клетъчна линия се съхранява в течен азот. При размразяване на клетките, крио-епруветката се поставя на водна баня при 37° C за 1-2 минути, след което клетъчната суспензия се прехвърля в 5-10 ml темперирана среда;
2. Центрофугира се за 3 мин. на 1000-2000 обор./мин., за да се отстрани криопротектанта;
3. Супернатантата се отстранява и към утаените клетки се прибавя 5 ml хранителна среда с 20% серум;
4. Клетъчната суспензия се прехвърля в матрак и се поставя в термостат за 24 часа;
5. Клетките се разсеят в нови матрачета в концентрации ( $3 \times 10^5$  кл/мл) в модифицирана среда Dulbecco (MEM) (Gibco, Австрия), допълнена с 2 mM глутамин + 10% фетален телешки серум (FBS) и антибиотици (0,05% канамицин);
6. Клетъчната култура се поддържа в експоненциална фаза на растеж, като се разрежда със свежа среда с 10% серум (1:3);
7. При провеждане на теста клетките се разреждат до нужната концентрация. Броенето се извършва с камера на Бюркер под светлинен микроскоп.

#### **2.2.1.3. Оценка на виталността на клетките чрез използване на МТТ-тест**

МТТ – тестът е най-често използваният метод за оценка на клетъчна жизнеспособност и цитотоксичност, както и за скрининг на потенциални лекарства. Той установява линейна зависимост между метаболитно активните клетки и получения цвят.

Това позволява точно количествено определяне на промените в скоростта на клетъчна смърт или пролиферация (*van de Loosdrecht et al. 1994*).

МТТ анализът е описан за първи път от Mossman (1983) (*Mosmann 1983*) като колориметричен метод, основан на редукцията на жълтата тетразолиева сол - (4,5-диметилтиазол-2-)-2,5-дифенил тетразолиев бромид (МТТ) под действие на митохондриалните сукцинатдеhidрогенази в живите клетки до водонерастворими виолетови формазанови кристали. Образуването на виолетови кристали е правопрпорционално на активността на митохондриалните ензими и съответства на броя на жизнеспособните клетки.



**Фигура 16.** Превръщане на МТТ във формазанови кристали под действието на митохондриалните дехидрогенази (*Bahuguna et al. 2017*)

Намаляването на интензивността на пурпурния цвят означава намален брой клетки или цитотоксичност на даденото вещество.

Провежда се изпитване за определяне на оптичната плътност (OD) на формазана, получен от биологичната проба след редукция на МТТ. За целта се използва ELISA четец за микроплаки (BioTek) при дължина на вълната  $\lambda=550$  nm с референтна дължина на вълната  $\lambda=630$  nm. Отчетената абсорбция на пробите при  $\lambda=550$  nm е мярка за концентрацията на формазана и количеството жизнеспособни клетки. Абсорбцията на пробите се представя като процент от контролата.

Цитотоксичността на тестваните съединения, определена чрез МТТ анализ, се изразява като процент жизнеспособност на клетките, съгласно следното уравнение:

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

***Протокол за култивиране на монослойни клетки:***

1. Монослойните клетъчни линии се култивират в Dulbессо модифицирана среда (DMEM) (Gibco, Австрия), допълнена с 10% фетален телешки серум (Gibco, Австрия), 100 U/ml пеницилин и 0.1 mg/ml стрептомицин (Gibco, USA) в матраци;
2. Клетките в експоненциална фаза на растеж, след третиране с Trypsin-EDTA, се посяват в 96-ямкови плаки (Greiner, Германия) в избрани концентрации (например-  $2 \times 10^4$  клетки/ямка) в обем 100  $\mu$ l. Остава се една свободна ямка за празна проба за определяне екстинкцията на чистия разтвор при спектрофотометричното измерване след обработка с МТТ;
3. Остава се ямки за контроли с хранителна среда и контроли със съответните разтворители (DMSO и H<sub>2</sub>O);
4. Култивираните клетки се третират с аминокиселинни аналози в широк концентрационен диапазон (2 mM - 1 mM - 0,5 mM - 0,25 mM - 0,125 mM - 0,62 mM - 0,03 mM). Аминокиселинните аналози са разтворени в диметил сулфоксид (DMSO). Пептидите и техните аналози са разтворени във вода;
5. Клетките се оставят да се прикрепят за дъното на плаката в продължение на 24 часа в инкубатор на 37°C и 5% CO<sub>2</sub>;
6. След инкубиране на третираните клетки се извършва колориметричен анализ с МТТ тест (Sigma Chemical Co.). Той се провежда 24 и 72 часа след третиране. Работният разтвор на МТТ се приготвя в стерилен фосфатен буфер в концентрация 5 mg/ml и се филтрува през 0,2  $\mu$ m филтър. Така приготвеният разтвор може да се съхранява при 4°C и е стабилен в рамките на 30 дни. За тази цел към получения разтвор на МТТ (5 mg/ml в PBS) се прибавя 1 ml МТТ в 15 ml среда (DMEM). Във всяка ямка се добавят по 100  $\mu$ l от този разтвор. След добавянето на МТТ разтвора, плаките с клетки се инкубират в продължение на 3.5 часа. Това позволява метаболизирането на МТТ. След приключване на инкубацията средата се отстранява;



7. За разтварянето на формазановите кристали се използва лизис буфер - DMSO в етанол (съотношение 1:1) и към всяка ямка се добавя 100  $\mu$ l от лизиращия разтвор;
8. Плаките се поставят на клатчка за 15-30 мин. до разтваряне на формазановите кристали;
9. След разтваряне на кристалите в плаките, се отчита абсорбцията (OD) на микро ELIZA plate reader (Bio-Tek),  $\lambda=550$  nm, при референтна стойност 630 nm.

## **2.3. Математически методи**

### **2.3.1. Статистическа обработка на данните**

Статистическият анализ на данните беше извършен чрез компютърна програма GraphPad 6.0 и използване на one-way ANOVA. Статистическата достоверност е отбелязана както следва: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

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

За определяне параметрите на Ro5, топологичната полярна повърхност (TPSA) и процента на абсорбция (%ABS) беше използван *in silico* метод – софтуер Molinspiration Cheminformatics 2019 (<https://www.molinspiration.com/>) (Mihaylova 2019). %ABS е изчислен по следната формула (Zhao *et al.* 2002):

$$\%ABS = 109 - [0.345 \times TPSA]$$

## IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

### 1. Моделиране на пептидни аналози/миметици на RGD

Употребата на пептиди и протеини в терапията на неопластични заболявания е доказала своя положителен ефект. Наред с него обаче, използването им е съпроводено с проява на някои нежелани ефекти и непредвидимо фармакокинетично поведение.

За създаването на пептиди с потенциално фармакологично значение и терапевтично приложение се използва метода на синтез на серия от вещества със сходна структура. Изследва се зависимостта между промяната в строежа и терапевтичния ефект, който тя предизвиква. Това от своя страна позволява адекватно прогнозиране на терапевтичната им ефикасност.

Характерна особеност на модифицираните пептиди е тяхната изменена структура, осигуряваща им значителна устойчивост. Тя също така възпрепятства специфичното взаимодействие ензим-субстрат, поради нарушаване на комплементарността. Присъщата устойчивост на получените пептиди ги определя като отлични антагонисти, поради запазване на конфигурацията им. Именно тези свойства обуславят все по-широкото приложение на пептидите в терапията.

Въпреки посочените предимства редица са факторите, ограничаващи пептидната употреба. Сред тях с особено значение трябва да се посочат ниската метаболитна стабилност в ГИТ, а също и ограничената им абсорбция след орален прием, бързата екскреция и възможността за взаимодействие с различни рецептори, което води до проява на нежелани ефекти.

Изследванията в областта на лекарствения дизайн са насочени именно към преодоляване на описаните дотук недостатъци на пептидния клас съединения. Значителна част от тях могат да бъдат преодолені чрез въвеждане на структурни промени, които да подобрят фармакокинетичните им параметри. Това води до разработването на пептидомиметици, отличаващи се с повишена специфичност, поради въвеждане на D-аминокиселини, както и непротеиногенни аминокиселини.

За постигане целта на настоящия дисертационен труд използвахме т. нар. рационален лекарствен дизайн (rational drug design, RDD). При този подход се вземат предвид съществуващите данни за биологичната мишена, към която е насочено действието на новополучените молекули (RGD и/или модифицирана аминокиселина).

Подходите за получаване на пептидни миметици – агонисти или антагонисти включват следните етапи:

- ✓ Определяне на активни фрагменти от пептиди, носещи информация за пептидната структура на изходната молекула;
- ✓ Повишаване на стабилността – Първоначално се определя мястото на деградация, а в последствие местата за отцепване на пептида се заместват, например с аминокиселини (*Hu et al. 2016*). Освен че повлиява стабилността, внасянето на АК-и оказва положителен ефект и върху силата на действие, пропускливостта и бионаличността на модифицираните пептидни аналози. Включването в структурата на неприродни остатъци може да се постигне посредством процеси на метилиране, гликозилиране, амидиране, внасяне на водородни връзки, промени на крайните аминокиселинни остатъци, хидрофобни остатъци и др. Освен това отделните пептидни структури, които участват в изграждането, могат да се подложат на допълнителна модификация чрез различни посттранслационни реакции (фосфорилиране, естерифициране, гликозилиране и др.);
- ✓ Повишаване на потентността – осигурява се чрез добавянето на различни функционални групи в страничната верига, които да улеснят свързването на лиганда с рецептора. Това може да бъде постигнато и чрез промяна в конформацията на пептида (*Hu et al. 2016*);
- ✓ Създаване на конформационно затруднени аналози – възможността на пептида да променя своя строеж, определя способността му да взаимодейства с различни рецепторни подтипове. Това дава отражение в по-широкото приложение на пептидните модификации. Конформационно затруднените аналози се отличават с наличието на вътрешномолекулен мост с  $\alpha$ -спираловидна структура. Създаването на структурно ограничени пептиди представлява значителен интерес в областта на пептидната химия. Това се дължи до голяма степен на възможността да се подобри селективното свързване, поглъщане, мощност и стабилност на линейните прекурсори. За съжаление обаче не всички подходи водят до подобряване на изброените параметри. Често линейните аналози показват по-добри свойства в сравнение с техните циклични еквиваленти.

Множество новосинтезирани пептиди не могат или преминават частично през клетъчната мембрана. Това е причина за тяхната ниска или липсваща активност (*Yang and Hinner 2015*). Поради този факт голяма част от изследванията на нови пептиди се фокусират върху техните свойства като насочващи молекули при противотуморна терапия.

Освен като насочващи молекули те могат да изпълняват функцията на лекарство-доставящи системи, а също и да улесняват преминаването през клетъчната мембрана. Не на последно място те могат да бъдат използвани и като самостоятелни противотуморни агенти (*Chatzisideri et al. 2018*).

Проведените при разработването на настоящия дисертационен труд изследвания бяха насочени към синтезиране на RGD пептидни молекули и техни конюгати с полиамини, с цитотоксичен и антипролиферативен ефект.

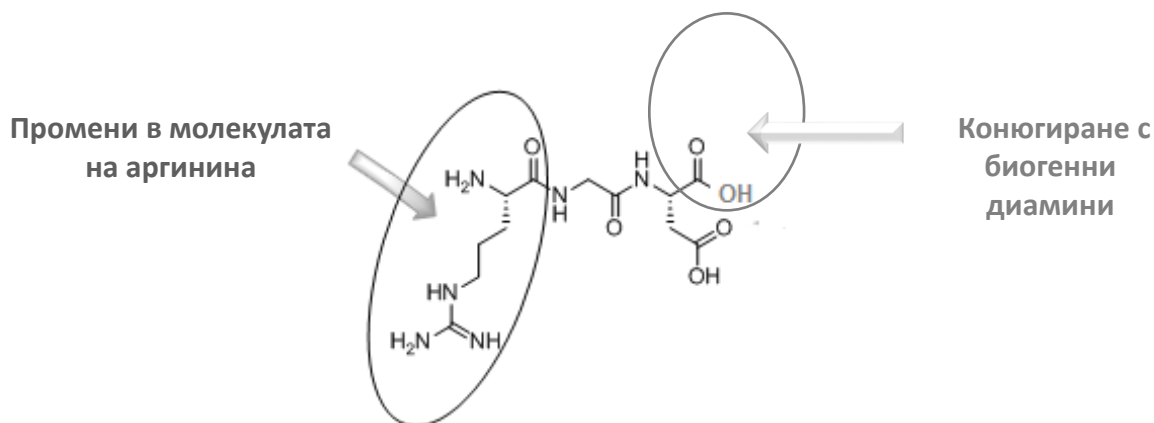
## **2. Синтез на аналози на RGD**

Един от основните подходи при създаване на лекарствени средства с пептидна структура, е търсенето на такава синтетична модификация в страничните вериги на природните аминокиселини, при която след включването им в пептидната верига да се получат биологично-активни аналози с подобрен фармакокинетичен потенциал.

До момента са синтезирани множество линейни и циклични аналози на RGD. Причините за повишения интерес към този пептид са неговите разнообразни терапевтични ефекти. Редица негови аналози се отличават с противотуморно действие и се използват при диагностика и лечение на хормон-зависими тумори и техните симптоми. Въпреки постигнатите успехи, продължава стремежът към получаването на молекули с подобрени биологична активност, специфичност на действие и устойчивост в плазмата.

При проведени предишни изследвания са получени и определени цитотоксичен и генотоксичен ефект на модифицирани с небелтъчни аминокиселини RGD пептидни аналози (*Balacheva et al. 2012; Georgiev et al. 2012*). След установяване на някои зависимости между структурата и действието на тези пептиди и следвайки установената тенденция за получаване на аналози с подобрени фармакокинетика и фармакодинамика ние синтезирахме поредица от нови RGD аналози. За получаването им използвахме следните три подхода (Фиг. 17):

- 1/ Включване в молекулата на пептида на небелтъчни аминокиселини;
- 2/ Свързване на получените RGD аналози с други молекули, които притежават доказано противотуморно действие (биогенни диамини);
- 3/ Получаване на аналози на RGD, модифицирани в N- или C-края.



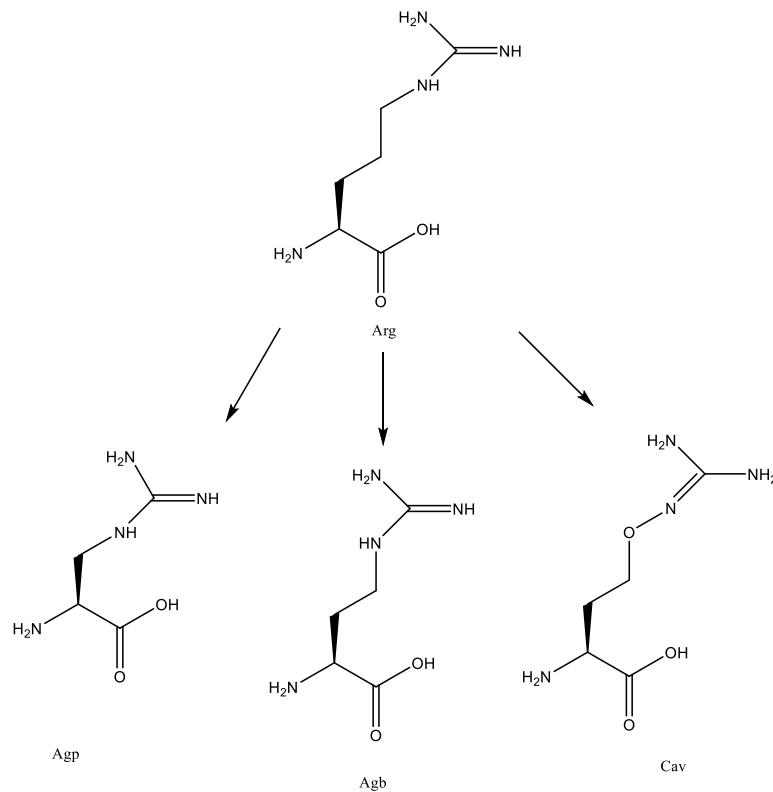
Фигура 17. Предприети промени в молекулата на RGD

При *първия подход* бяха създадени пептидни миметици на RGD, модифицирани с непротеиногенни аминокиселини. За промените в N-края на нативната молекула, избрахме замяната на аргининовия остатък в 1-ва позиция с неговите синтетични аналози Agb (*L*-2-амино-4-гуанидино маслена киселина) и Agr (*L*-2-амино-3-гуанидино пропионова киселина), както и с неговия природен антиметаболит – канаванин (Cav, *L*-2-амино-4-гуанидиноокси маслена киселина) (Фиг. 18). По този начин бяха синтезирани 3 аналога на RGD – AgbGD, AgrGD и CavGD.

Аргининът (Arg или R) е предпочитан за модифициране катионен остатък в редица синтетични пептиди. Това се дължи на факта, че неговата странична верига може лесно да взема участие, както в електростатични взаимодействия, така и във водородни свързвания.

От друга страна, често липсата или ниската биологична активност на редица ново синтезирани пептиди се дължи на тяхното затруднено преминаване през клетъчната мембрана (Yang and Hinner 2015). Въз основа на това очаквахме, че синтетичните аргининови миметици със скъсена странична верига (например Agr и Agb), както и на такива съдържащи гуанидинова група с висок поляритет или с намалени основни свойства (например съдържащият кислороден атом вместо една метиленова група в

структурата си канаванин), ще доведат до повишаване стабилността, по-лесното преминаване през клетъчната мембрана, а с това и потентността на съответните модифицирани пептидни аналози (Фиг. 18).



**Фигура 18.** Модификации в молекулата на аргинин

Аргининовите миметици са обект за дизайн на биологично-активни пептиди с цел повишаване на тяхната селективност и бионаличност. Опити върху животни показват, че аминокиселината притежава модулиращ ефект върху процесите на развитие на тумори. Например, мишки с трансплантирани тумори, които приемат аргинин, показват засилен растеж на тумора, докато изчерпването му инхибира развитието на чернодробни метастази (*Delage et al. 2010*).

Гуанидиновата група в молекулата на Arg има значение за регулиране на структурата и функцията на протеините. Някои производни на аргинин и канаванин влияят върху патологичната ангиогенеза. Аргининът инхибира ендотелната азотен оксид

синтетаза (eNOS) и с това повлиява VEGF каскадата, чийто биомолекули са отговорни за ангиогенезата (Vallance P., et al., 2000).

Дзимбова и др., 2019 г. (Dzimbova et al. 2019) установяват, че аналозите на аргинин със скъсена верига Agb и Agr могат да инхибират три основни ензима в метаболизма му: азотен оксид синтаза (eNOS), аргинин-глицин амидинотрансфераза (AGAT) и аргининосукцинат синтаза (ASS). Освен това, P. Henklein и Th. Bruckdorfer, 2008 г. (Henklein and Bruckdorfer 2008) докладват, че стабилността на пептидите се увеличава, ако аргининът е заменен с хомолог, съдържащ една или две метиленови групи по-малко (Agb или Agr). Установено е също, че аминокиселинният аналог, при който веригата е скъсена с две метиленови групи, проявява стабилност към ензимно разграждане от трипсин в рамките на 24 часа.

Канаванинът представлява естествена непротеиногенна аминокиселина, която притежава изразена токсичност към редица организми, например: гъби, дрожди, бактерии, водорасли, насекоми, растения и бозайници (Staszek et al. 2017). Посочената токсичност се обуславя от близкото структурно сходство с аргинина. То определя способността му да се свързва с аргинил-тРНК синтетазата и да предизвиква клетъчна смърт. Заместването на аргинина от канаванина по време на трансляцията на нови протеини дава резултат в получаването на белтъци с нарушена функция. По този начин се нарушава по-нататъшната им роля в клетъчните процеси (Rosenthal 1977).

Канаванинът е обещаващ противотуморен агент, поради способността си да инхибира един от основните процеси при развитието на туморните клетки. По-конкретно той подтиска техния растеж *in vitro* и *in vivo* чрез включването си в новосинтезиращи се пептиди (Rosenthal 1998; Bence and Crooks 2003). Характерно за канаванина е проявата на избирателно токсично действие спрямо пролифериращите клетки (Naha et al. 1980). Съществуват данни, според които той причинява смърт при човешки левкемични клетки, като активира каспаза-3 (Ho Jang et al. 2002). Проучвания в последните години съобщават, че канаванинът проявява цитотоксичност *in vitro* и спрямо други туморни клетъчни линии като аденокарцином на белия дроб, рак на пикочния мехур и на маточната шийка.

В подкрепа на твърдението, че Cav може да се използва успешно в противотуморната терапия, са данните относно неговия синергизъм с цитостатични лекарства (5-fluorouracil, Doxorubicin, Cisplatin) и гама-радиация. Предполага се, че той

сенсibiliзира раковите клетки към прилаганата терапевтична схема (*Nurcahyanti and Wink 2016; D.R. Nurcahyanti and Wink 2017*).

Друга причина, поради която избрахме да включим Cav в нашето изследване е близката му структура до аргинина. Вследствие на високото си структурно сходство канаванинът не се разпознава от транспортните и метаболитните системи като чужда молекула и не се формира лекарствена резистентност (*Bence and Crooks 2003*).

**Вторият подход**, който предприехме с цел увеличаване устойчивостта на пептидите срещу ензимно разграждане, включваше както модификация в първа позиция, така и свързване с биогенни диамини (етилендиамин и пропилендиамин) чрез амидиране на карбоксилната група на аспарагиновата киселина (Asp, D) в С-края. Получени бяха също така и осем пептидни конюгата – RGDDAE, AgbGDDAE, AgpGDDAE, CavGDDAE, RGDDAP, AgbGDDAP, AgpGDDAP и CavGDDAP чрез амидиране на RGD и неговите структурни аналози с биогенните диамини етилендиамин (DAE) и пропилендиамин (DAP).

С-крайното амидиране се асоциира с биоактивната конформация на пептидите и тяхното взаимодействие и селективност към целевите рецептори. Премахването на амидната група при тези пептиди често води до загуба на активност. Предприетата модификация в С-края на RGD чрез конюгиране с биогенни диамини представлява възможен подход за определяне на биологичното и структурното участие на С-крайното амидиране.

При **третия подход** бяха синтезирани структурни аналози на RGD. Целта на предприетите модификации в структурата на изходния пептид е получаване на молекули с повишен инхибиторен ефект и устойчивост на действието на ензими, отговарящи за разрушаването на пептидната структура. Предприетите промени включват замяна на една от метиловите групи в страничната верига на аргинина с нитрогрупа. Освен това беше проведена и естерификация на карбоксилната група на Asp, в резултат на която се получава метилов естер на нативния RGD пептид. Друга модификация, която предприехме при този подход, беше замяната на Arg, с неговия непротеиногенен аналог Cav.

Пептидният синтез на RGD-аналозите и конюгатите е осъществен както по класическия метод „в разтвор“, така и по SPPS, използвайки Fmoc-стратегията за



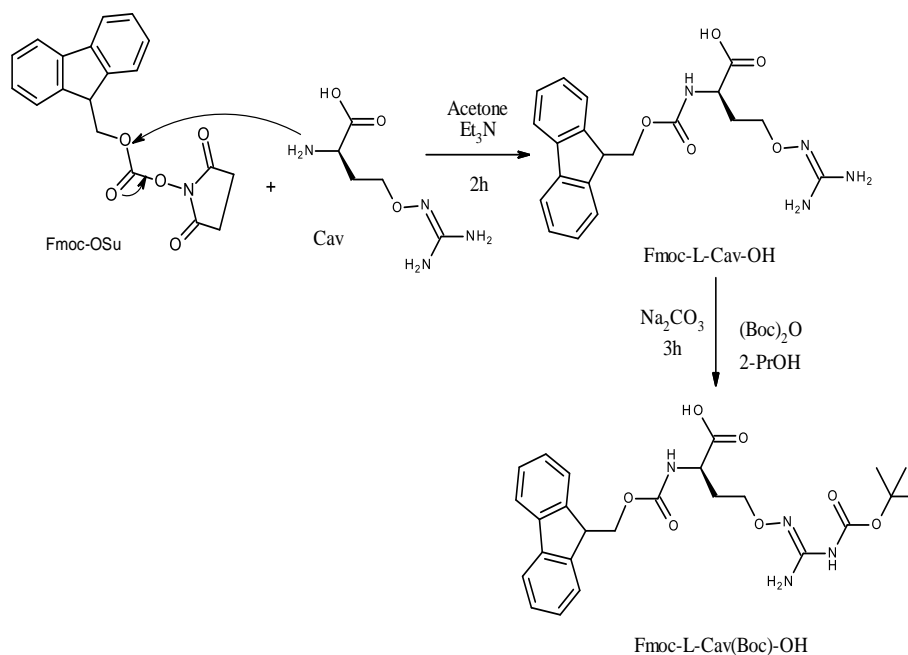
изграждането на пептидната верига. Приложена е фрагментна кондензация, която да започне с образуването на дипептид както от С-края, така и от N-края на трипептида.

### **2.1.Получаване на защитени, небелтъчни аминокиселини, необходими за пептидният синтез RGD аналози модифицирани в N-края**

С цел по-лесното протичане на процесите на синтез на новите аналози и конюгати на RGD, както и избягване на свързване към гуанидиновата група на канаванина се наложи получаване на негови защитени производни:  $N\alpha$ -9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-canavanine (Fmoc-*L*-Cav-OH),  $N\alpha$ -9-Fluorenylmethyloxycarbonyl,  $N^G$ -ter-butyloxycarbonyl-canavanine (Fmoc-*L*-Cav(Boc)-OH),  $N\alpha$ -ter-Butyloxycarbonyl,  $N^G$ -ter-butyloxycarbonyl-canavanine (Boc-*L*-Cav(Boc)-OH), както и  $N\alpha$ -ter-Butyloxycarbonyl,  $N^G$ -ter-butyloxycarbonyl-canavanine succinimide ester (Boc-*L*-Cav(Boc)-OSu).

Получаването на Fmoc-*L*-Cav(Boc)-OH се извършва на два етапа, по метод описан от Rajanova et al., 1997. В първия етап от синтеза се защитава  $N\alpha$ -аминогрупата с базично лабилната Fmoc-група до получаване на  $N\alpha$ -9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-canavanine. При втория етап от синтеза се защитава страничната аминогрупа в гуанидиновата функционална група до получаване на  $N\alpha$ -9-Fluorenylmethyloxycarbonyl,  $N^G$ -ter-butyloxycarbonyl-canavanine (Фиг.19).

След изтичане на реакционното време, количеството на получена  $N\alpha$ -защитена аминокиселина Fmoc-*L*-Cav-OH е 3,70 гр. (93%). При втория етап от синтеза се получава Fmoc-*L*-Cav(Boc)-OH, с добив 0,82 гр. (91%) и висока химическа чистота доказани чрез TLC и HPLC (Rajanova et al. 1997).



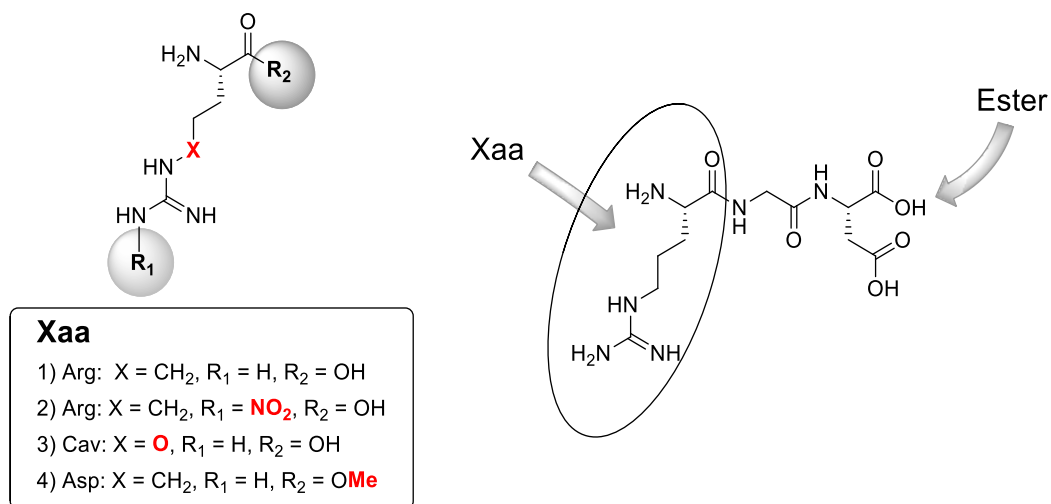
**Фигура 19.** Схема за синтез на Fmoc-L-Cav(Boc)-OH

Получаването на Boc-L-Cav(Boc)-OH се извършва в един етап, по метод описан от Рајранова et al., 1997, като N $\alpha$ -амино- и N<sup>G</sup>-гуанидиногрупите се защитават едновременно с киселинно лабилната Boc-защитна група (Рајранова et al. 1997).

След предварително получаване на ди-Boc-защитения канаванин – Boc-Cav(Boc)-OH, се получава активираният естер Boc-L-Cav(Boc)-OSu чрез HNOSu/DCC в среда от THF с 75% добив.

## 2.2. Получаване на RGD и аналози, модифицирани в N-края или C-края

С цел търсене на аналози на RGD с по-голяма устойчивост към действието на ензими и респективно удължен ефект, са синтезирани субституирани аналози (Фиг. 20) CavGD, R(NO<sub>2</sub>)GD и RGD-OMe.



**Фигура 20.** Структура на RGD, R(NO<sub>2</sub>)GD, CavGD и RGD-OMe

Биологични изследвания на тези нови аналози, проведени от Balacheva и сътр. и Georgiev и сътр., показват, че те имат способността да инхибират клетъчния растеж *in vitro*. Нещо повече, естерифицирането на карбоксилната функция на Asp води до чувствително увеличение на инхибиторната активност спрямо нативния RGD. Освен това се наблюдава по-ясно изразен цитотоксичен и генотоксичен ефект (*Balacheva et al. 2012; Georgiev et al. 2012*).

Необходимостта от по-нататъшно изясняване на механизма на действие на RGD, CavGD, R(NO<sub>2</sub>)GD и RGD-OMe, ни провокира да продължим нашите изследвания в две насоки:

- Търсене на нови схеми за синтез на CavGD, R(NO<sub>2</sub>)GD и RGD-OMe;
- Разширяване на гамата структурни аналози, включвайки в първа позиция отново непротеиногенни АК-и (Agb и Agr), както и на протеиногенния аргинин (Arg), в ролята на референтно вещество (*Georgiev et al. 2012*).

Пептидният синтез на RGD аналозите може да бъде осъществен както по класическия метод „в разтвор“, така и по SPPS, използвайки Fmoc-стратегията за изграждането на пептидната верига. Фрагментната кондензация може да започне с образуване на дипептид както от C-, така и от N-края на трипептида. Използваните методи за активиране, както и защитните групи за страничните функционални групи на АК трябва да удовлетворяват техните индивидуални особености. За образуване на пептидната връзка са използвани широка гама от съвременни активиращи реагенти – DCC, HONSu, HOBT, TBTU, DIC, HBTU, BOP и PyBOP (Литературен обзор, стр. 43).

Това разнообразие от реагенти и методи за синтез е наложено от наличието на полярна странична функционална група в молекулата на използваните аминокиселини, която в повечето случаи е силно реакционно способна.

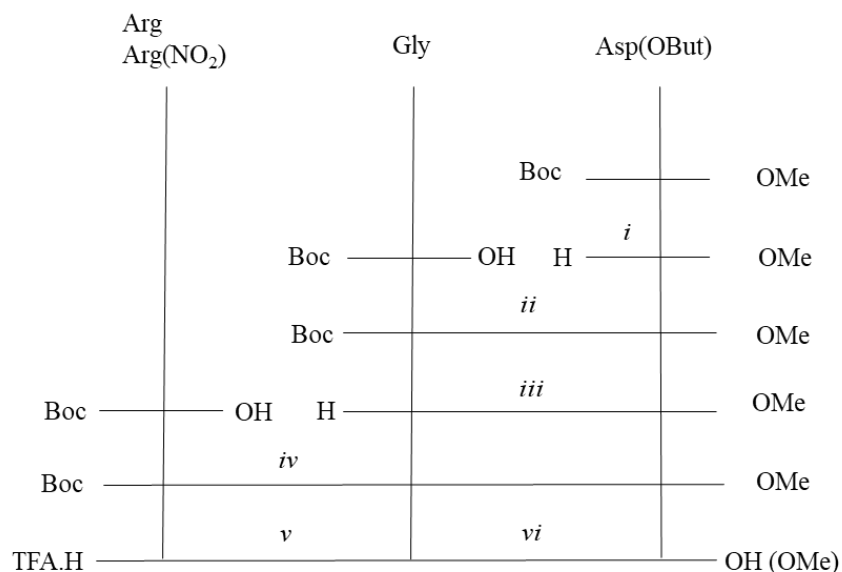
Изборът на комбинации от защитни групи за N $\alpha$ -аминофункцията и N $\epsilon$ -аминофункцията в страничната верига на Arg и Cav, наложи използването на различни схеми за пептиден синтез. Подбраните подходи са специфични за всеки един трипептид и осигуряват неговото получаване с по-висока чистота и по възможност – с по-висок добив.

### 2.3. Синтез на RGD, R(NO<sub>2</sub>)GD и RGD-OMe

Получаването на RGD (**1**) и аналозите (**2** и **3**) е осъществено по класическия метод за синтез в разтвор следвайки стандартен протокол който протича по следните етапи:

- 1) Деблокиране на защитената аминогрупа на първата аминокиселина с 1N HCl и трикратна екстракция с етил ацетат (EtOAc), промиване, изпаряване под вакуум;
- 2) Първо кондензиране (реакция на образуване на първата амидна връзка) посредством използването на 1,1-кратен излишък от кондензационните реагенти TBTU (2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylammonium tetrafluoroborate), HOBT (1H-benzotriazol-1-ol) в присъствието на базата DIPEA (*N,N*-diisopropylamine) в разтворител DMF (*N,N*-dimethylformamide). Реакцията се провежда при стайна температура до пълното изразходване на изходните съединения;
- 3) Деблокиране и кондензация до получаването на желания пептид;
- 4) Реакция на осапунване (деестерификация) на получения пептид след третирането му със смес от 1N NaOH в метанол (MeOH);
- 5) Ацидолитично деблокиране на получения пептид посредством прибавянето на излишък от TFA (трифлуорооцетна киселина) и разбъркване на получената смес при стайна температура;
- 6) Пълното протичане на реакциите на отстраняване на Boc- и tBu- защитните групи и на реакциите на образуване на пептидната връзка се съблюдава чрез стандартен Райндел и нинхидринов тест.

За получаването на трите пептида използвахме тактиката на свързване **1+2**, както е показано на Фигура 21.



**Фигура 21.** Обща схема за пептиден синтез на RGD аналози в разтвор: (i) 1.0 N HCl, 3 x EtOAc; (ii) 1,1 equiv. TBTU/HOBt/DIPEA, DMF; (iii) 1.0 N HCl, 3 x EtOAc; (iv) 1,1 equiv TBTU/HOBt/DIPEA, DMF; (v) 1.0 N HCl NaOH, MeOH; (vi) TFA, r.t., 2h

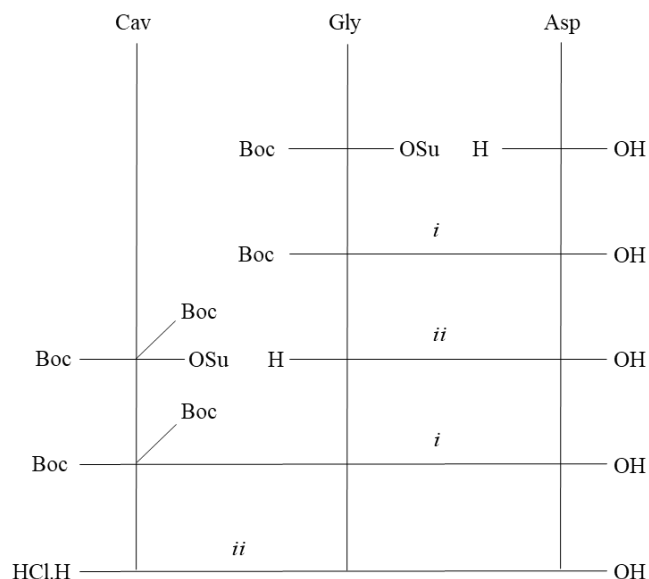
За С-края от молекулата на RGD при синтезата на всички трипептиди е използван Boc-Asp(tBu)-OMe. След ацидолитично деблокиране на Boc-защитната група с 1.0 N HCl, изолираният хидрохлорид HCl.H-Asp(tBu)-OMe се свързва с Boc-Gly-OH чрез кондензационния реагент TBTU. Последва отново ацидолитично деблокиране на Boc-защитната група с 1.0 N HCl, при което полученият дипептид се изолира отново като хидрохлорид и се свързва чрез TBTU съответно с Boc-Arg-OH или с Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-OH. Получават се два защитени трипептид Boc-Arg-Asp(tBu)-OMe и Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Asp(tBu)-OMe.

Деестерифицирането на пептидите се извършва количествено с висока чистота и добив чрез хидролиза на съответния естер с 1.0 N NaOH в среда на MeOH. На всеки етап от синтетичния процес междинните продукти се изолират и пречистват. Крайното деблокиране на трипептидите се осъществява чрез ацидолиза с TFA до получаване на трипептидите **1-3** във вид на TFA сол.

#### 2.4. Синтез на CavGD

След направените първоначални сравнителни синтези, най-подходящ за получаването на аналога CavGD (**6**), се оказа методът на активираните естери. Получаването на CavGD се извършва по оригинална схема за синтез, тактика 1+2 (Фиг. 22). Образуването на дипептида Boc-Gly-Asp-OH и последващата трипептидна

секвенция Boc-Cav(Boc)-Gly-Asp-OH бе осъществено по метода на активираните естери чрез предварително получаване на защитен, активиран естер на канаванина – Boc-Cav(Boc)-OSu. Предимство на този метод е, че в хода на нарастване на пептидната верига се използват незащитен в карбоксилната и страничната група Asp и лесно достъпните кондензационни агенти HNOSu и DCC.



**Фигура 22.** Схема за синтез на CavGD в разтвор: i) THF, Et<sub>3</sub>N, 24h; ii) 3N HCl/EtAc, 2h

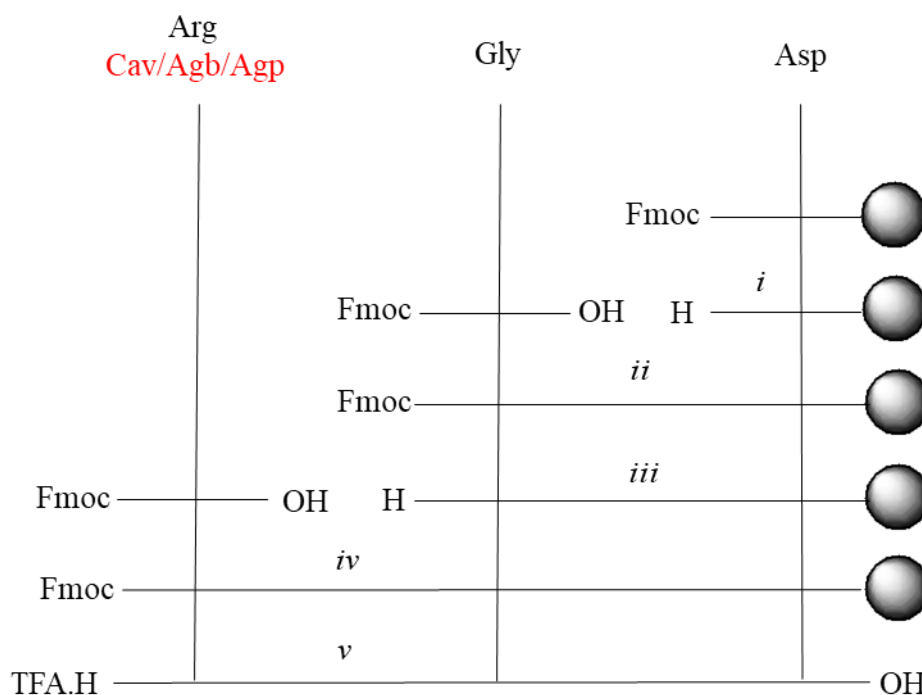
Получените резултати за добив и чистота, при използването на описания подход показват, че така подбраната синтетична схема е оптимална за синтез на посочения трипептид.

### 2.5. Синтез на AgbGD и AgpGD

Синтезът на пептиди **1**, **4-6** е реализиран чрез SPPS с използване на стандартна Fmoc/tBu стратегия.

При първата синтетична схема, която приложихме за получаване на трипептидите RGD, AgbGD и AgpGD (Фиг. 23), използвахме 2-хлоротритил хлоридна смола, върху която е закачена първата аминокиселина Fmoc-Asp(tBu) и специфични защитни групи за страничните групи на Arg, Agb и Agp. За Arg използвахме Pbf-защита за страничната гуанидиногрупа, а Pbf- и Boc-защита за гуанидино-функцията на Agb и Agp. Куплунг реакциите се осъществиха чрез активиране с DIC/NOBt/DIPEA (Фиг. 23).

Приключването на всеки един етап от присъединяване на аминокиселината се следи с помощта на Кайзер-тест. Fmoc-групата на получените пептид-смола Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-Asp(tBu)-Resin, Fmoc-Agb(Pbf, Boc)-Gly-Asp(tBu)-Resin и Fmoc-Agp(Pbf, Boc)-Gly-Asp(tBu)-Resin се деблокира чрез добавяне на 25% пиперидин в DMF. Отцепването на пептида от смолата с едновременното деблокиране на всички защитни групи, се извършва чрез ацидолиза с разтвор на TFA (~95%), със следния състав – TFA (16.5 ml) : фенол (1 g) : H<sub>2</sub>O (1 ml) : тиоанизол (1 ml) : етандитиол (0.5 ml).

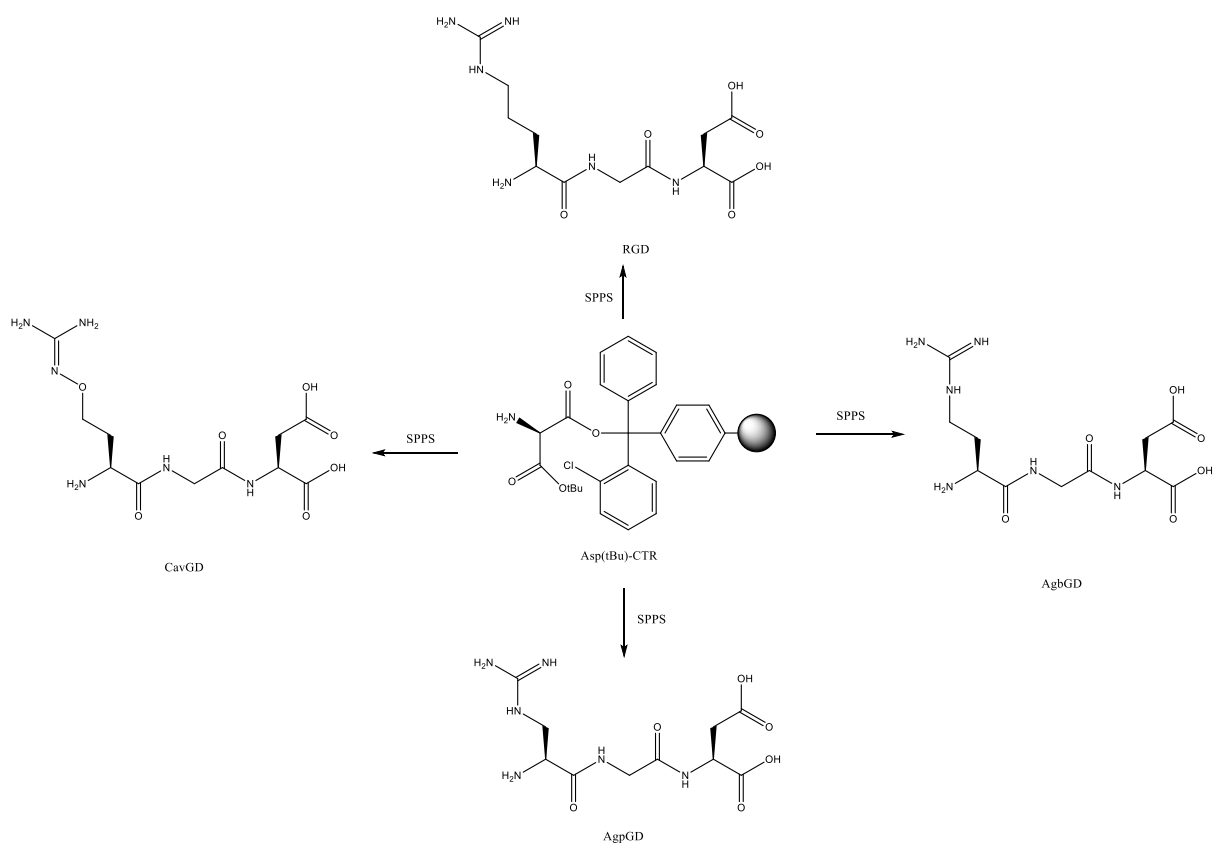


**Фигура 23.** Схема за синтез на RGD, CavGD, AgbGD и AgpGD: i) 20% пиперидин/DMF 20 min; ii) 3 eq. DIC/HOBt/DIPEA, 1h или 1 eq. PyBOP/1 eq. HOBt/2.75 eq. DIPEA, 15 min; iii) 20% пиперидин/DMF 20 min; iv) 3 eq. DIC/HOBt/DIPEA (3 eq. HBTU/HOBt/DIPEA) 1h или 1 eq. PyBOP/1 eq. HOBt/2.75 eq. DIPEA, 15 min; v) а) 20% пиперидин/DMF 20 min; б) TFA (~95%) 75 min или TFA (~95%), скевинджъри, 45 min

Получените незадоволителни резултати поради отчетения нисък добив по време на пептидният синтез, наложи повторение на куплунга с двукратен излишък от Fmoc-Agb(Pbf, Boc)-OH и Fmoc-Agp(Pbf, Boc)-OH. Получените от нас резултати потвърждават и данните представени от други автори (Dzimbova et al. 2019).

Въпреки предприетите промени, отчетените добиви и на трите пептида останаха незадоволителни. Това ни накара да направим смяна на реагента за кондензация от DIC с PyBOP.

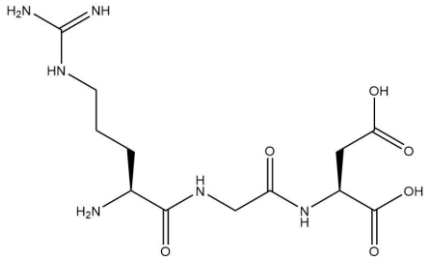
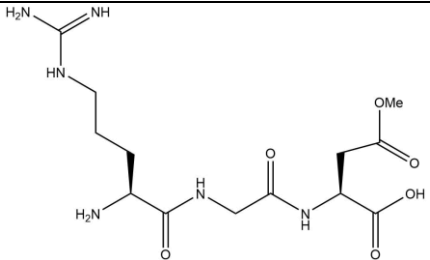
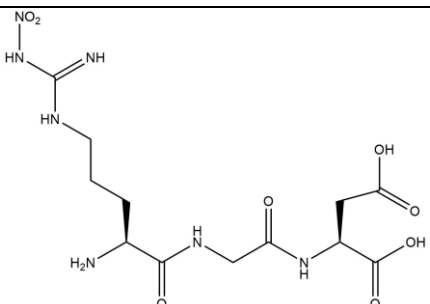
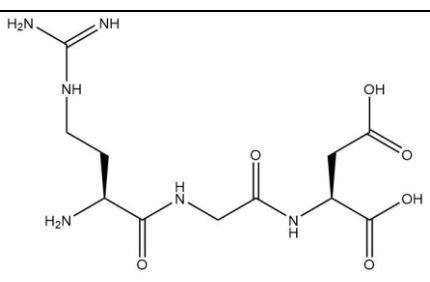
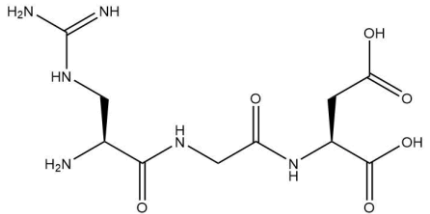
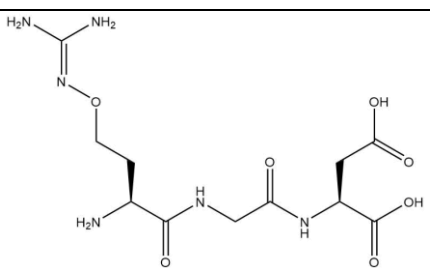
За да се изследва влиянието на кондезиращите реагенти върху скоростта на образуване на пептидната връзка, ние приложихме трета синтетична схема (Фиг. 24). За получаване на AgbGD, AgrGD и CavGD пептидите променихме също така и защитните групи за гуанидино функциите на Agb и Agr. За Cav използвахме Boc-защита за странична гуанидиногрупа и (Pbf, Boc) и (Boc)<sub>2</sub>-защита за гуанидино-функцията на Agb и Agr. За куплунг реакциите използвахме силно реактивоспособния кондензационен реагент PyBOP. Процесът се проведе в съотношение на реактантите – 1 еквивалент Fmoc-Agb(Boc<sub>2</sub>)-OH или Fmoc-Agr(Boc<sub>2</sub>)-OH или Fmoc-Cav(Boc)-OH, 1 еквивалент PyBOP, 1 еквивалент HOBT и 2,75 еквивалента DIPEA. Реакцията протича в продължение на 15 минути. Установихме също така, че Agb защитен с (Pbf, Boc) води до получаването на суров пептид с висока чистота от (80%), докато защитеният Agr(Boc<sub>2</sub>) води до суров пептид с чистота (66%). Предимството на описаната синтетична схема спрямо първите две е високата скорост на протичане на процеса, а също и намаляване на количеството на реактантите, повишаване на добивите и чистотата на крайните новосинтезирани пептидни аналози (Фиг. 24).



**Фигура 24.** Новосинтезирани RGD, CavGD, AgbGD и AgrGD



**Таблица 1.** Аналитични данни на синтезираните пептиди

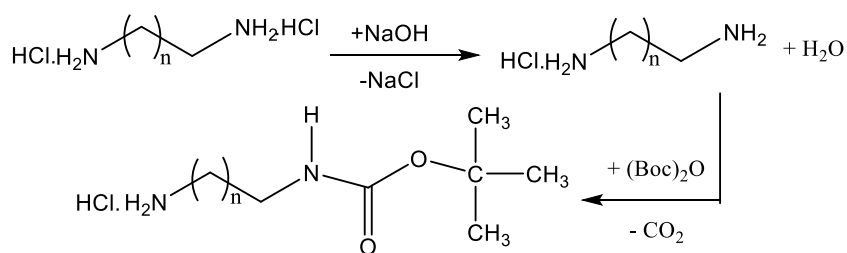
<i>Пептиди</i>	<i>Химична структура</i>	<i>Молекулна формула</i>	<i>Молна маса (g/mol)</i>	<i>Добив (%)</i>	<i>HPLC чистота (% RT)</i>	<i>СЕ чистота (% RT)</i>
RGD		$C_{12}H_{22}N_6O_6$	346.344	81	99	99
RGD-OMe		$C_{13}H_{24}N_6O_6$	360.371	86	95	95
R(NO <sub>2</sub> )GD		$C_{12}H_{21}N_7O_8$	391.341	85	98	96
AgbGD		$C_{11}H_{20}N_6O_6$	332.317	89	100	100
AgpGD		$C_{10}H_{18}N_6O_6$	318.290	84	99	96
CavGD		$C_{11}H_{20}N_6O_7$	348.316	87	99	97

### 3. Получаване на защитени биогенни диамини, модификанти за синтеза на пептидните конюгати

При голяма част от пептидите наблюдаваната активност, която проявяват се дължи на С-крайното амидиране. Елиминирането на амидната група, в повечето случаи води до липса на активност. В резултат на това може да се заключи, че амидната група оказва влияние върху биоактивността на пептида. От друга страна се смята, че тази модификация е свързана с взаимодействия и избирателност към рецепторните молекули. Поради възможността за разбиране на влиянието на С-крайното амидиране синтезът беше насочен към конюгиране на RGD в С-края с биогенните диамини: етилендиамин и пропилендиамин.

Характерно свойство на някои аналози на полиамините е способността им да имитират регулаторните функции на естествените полиамини. Те индуцират катаболитни процеси, инхибират синтеза и намаляват количеството на естествените полиамини, което води до спиране на туморния растеж. Конюгирането на полиамини с RGD може да подобри доставянето на полиамини до туморните клетки, поради афинитета на пептида за свързване с интегринови рецептори, свръхекспресирани по повърхността им. Освен това и двете групи молекули притежават цитотоксични свойства, което може да повиши ефективността на терапията.

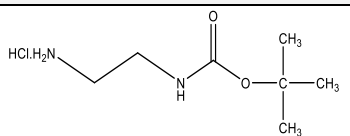
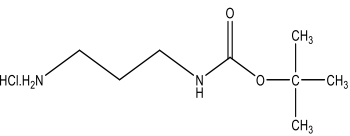
Необходимите за получаването на конюгати с RGD биогенни диамини защитихме с киселинно - лабилната защитна N-третична бутилоксикарбонилна група (Boc). За целта беше използван метод описан от Виденов (*Videnov et al. 1993*) (Фиг. 25)



**Фигура 25.** Реакционна схема на защита на аминната група на етилендиамин и пропилендиамин чрез използването на  $(\text{Boc})_2\text{O}$ .

На Таблица 2 са представени химичните формули на получените полиамини и техния добив.

**Таблица 2.** Наименования, молна маса, добив, молекулни и структурни формули на използваните в пептидния синтез защитени диамини

Диамини	Химична формула	Структурна формула	Молна маса	Добив
Boc-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> .HCl	C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl		174.24	61 %
Boc-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> .HCl	C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl		188.27	63 %

#### 4. Конюгиране на RGD и неговите аналози с полиамини

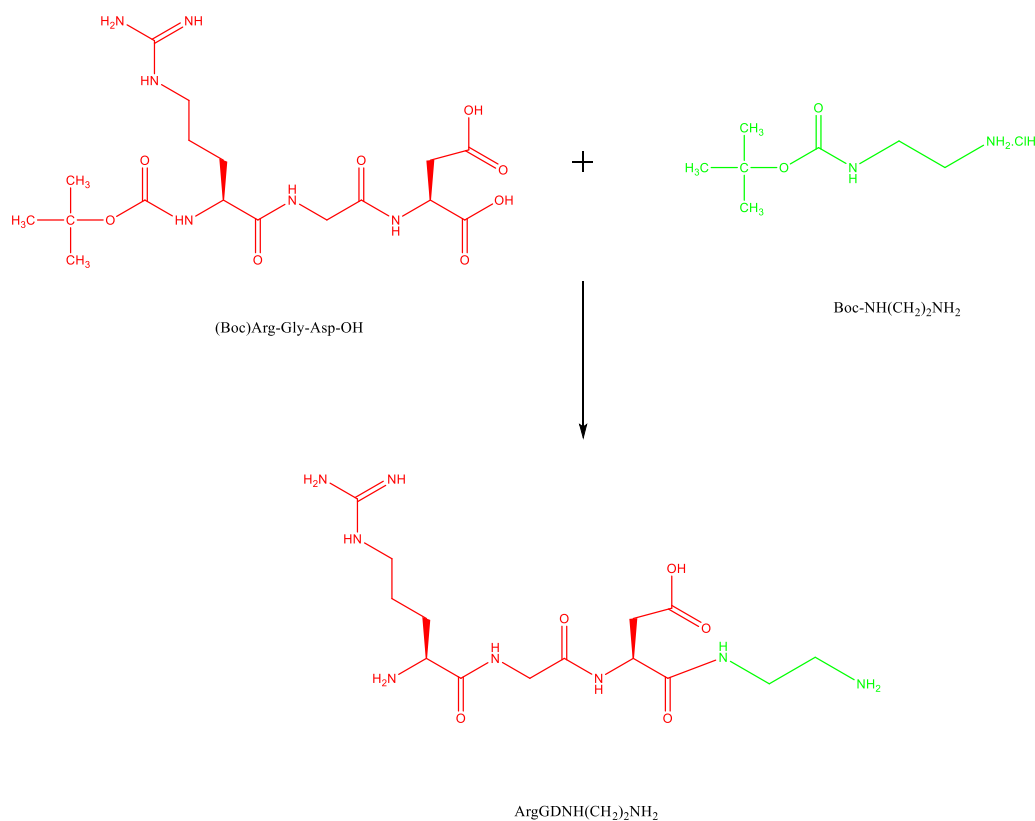
Съвременните изследвания са фокусирани върху разработването на различни по функция пептиди, играещи ролята на специфични тумор-насочващи вектори, спомагащи преминаването през клетъчната мембрана. Често тези пептиди се използват в лекарствения дизайн като „Троянски кон“, който способства навлизането на даден препарат, конюгиран към тях (*Chatzisideri et al. 2018*). Нашите усилия се насочиха към създаването на нови RGD аналози, които действат като тумор-насочващи пептиди и към подобряване на тяхната цитотоксична активност чрез конюгирането им с други тумор-специфични молекули. Като възможен начин за разгадаване на биологичното и структурно участие на такива молекули се спряхме на биогенните диамини етилендиамин и пропилендиамин.

Интересът ни към подобни конюгирани структури бе привлечен и поради възможността им да бъдат използвани като „градивни единици“ в лекарствения дизайн.

Синтезът на пептидните конюгати е извършен след първоначален скрининг за цитотоксична и антипролиферативна активност на използваните RGD аналози.

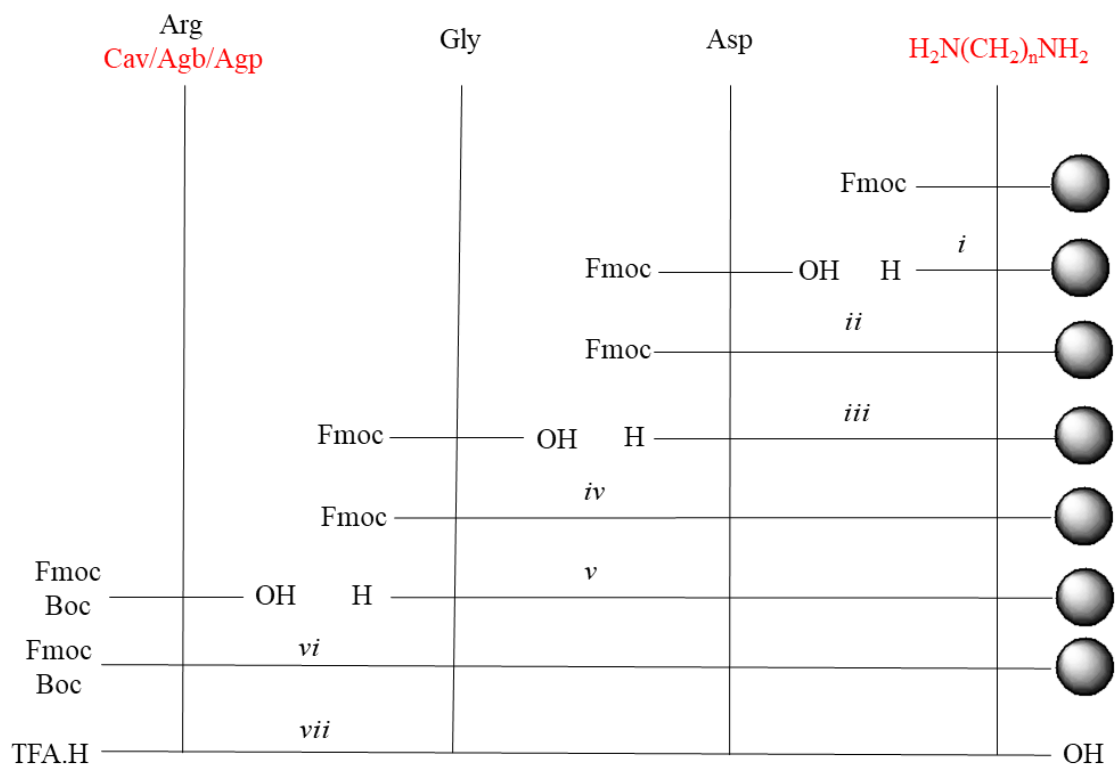
Успешни опити за получаване на пептидните конюгати ArgGDNH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (RGDDAE), AgpGDNH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (AgpGDDAE), AgbGDNH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (AgbGDDAE), CavGDNH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (CavGDDAE), ArgGDNH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> (RGDDAP), AgpGDNH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> (AgpGDDAE), AgbGDNH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> (AgbGDDAE), CavGDNH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> (CavGDDAE) бяха проведени в разтвор чрез директна кондензация на защитените трипептиди Boc-Arg-Gly-Asp-OH и Boc-Cav(Boc)-OH със защитения Boc-

$\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$  и съответно  $\text{Boc-NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$  чрез активиращ реагент TBTU в присъствие на DIPEA. Крайното деблокиране на пептидите осъществихме ацидолитично с 3N HCl/EtOAc. След пречистването на суровите продукти чрез прекристализиране с метанол/вода, желаните пептиди бяха получени с високи добиви от 75%.



**Фигура 26.** Схема за синтез на ArgGDDAE

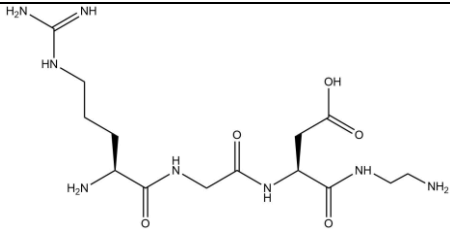
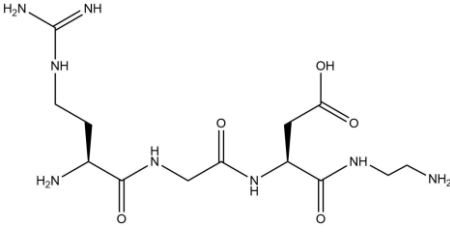
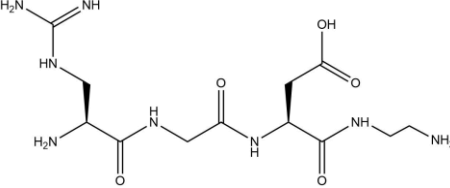
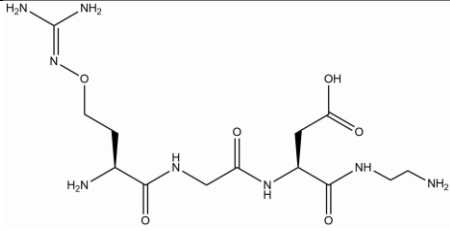
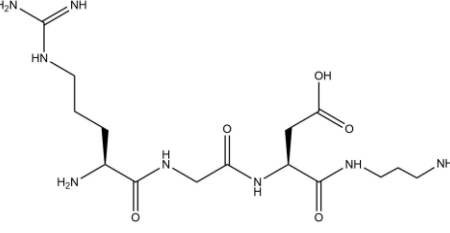
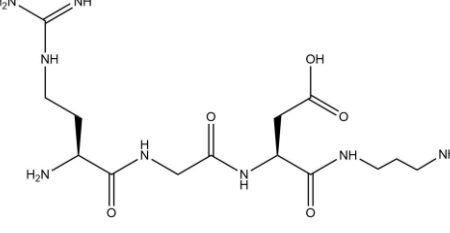
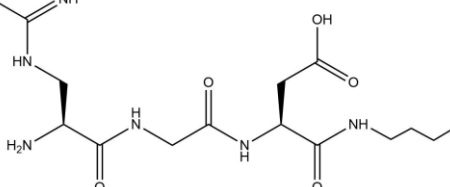
За синтезирането на конюгатите на RGD и аналозите му съдържащи небелтъчните аминокиселини Cav, Agb и Agr с двата биогенни диамина, приложихме стандартен твърдофазен пептиден синтез по Fmoc/tBu стратегия върху 2-хлоротритил хлоридна смола. За конюгирането използвахме кондензационният реагент PyBOP в присъствието на HOBT и база DIPEA. Приключването на всеки един етап от присъединяването на аминокиселина се следи с помощта на Кайзер-тест. Fmoc-групата се отцепва чрез добавяне на 25% пиперидин в DMF. Отцепването на пептида от смолата и крайното деблокиране на всички останали защитни групи (Boc- и tBu) е извършено чрез трикратно добавяне на разтвор, състоящ се от TFA и скевинджъри в следните количествени отношения: TFA (16.5 ml); фенол (1 g); H<sub>2</sub>O (1 ml) и тиоанизол (1 ml) (Фиг. 27).

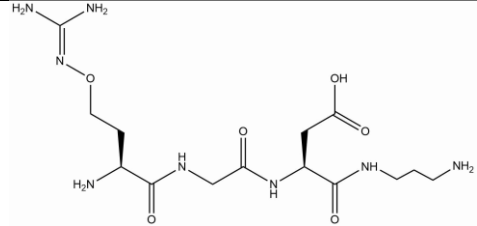


**Фигура 27.** Схема за синтез на RGD и неговите аналози с полиамини: i) 20% пиперидин/DMF 20 min; ii) HBTU/DIPEA 1h; iii) 20% пиперидин/DMF 20 min; iv) HBTU/DIPEA 1h; v) 20% пиперидин/DMF 20 min; vi) HBTU/DIPEA 1h; vii) a) 20% пиперидин/DMF 20 min; b) TFA/DCM 75 min

На Таблица 3 са представени химичните формули, молекулните маси, чистотата и добива на новополучените RGD\полиаминови конюгати.

**Таблица 3.** Наименования, химична структура и молна маса на синтезираните пептидни конюгати

<i>Пептидни конюгати</i>	<i>Химична структура</i>	<i>Молна маса</i>
RGDDAE	 <p>The structure shows a peptide backbone with a D-arginine residue at the N-terminus, followed by two D-glutamic acid residues, and a D-alanine residue at the C-terminus. The side chain of the second glutamic acid is a 2-aminoethyl group.</p>	<b>388.42</b>
AgbGDDAE	 <p>The structure is identical to RGDDAE, showing a peptide backbone with a D-arginine residue, two D-glutamic acid residues, and a D-alanine residue. The side chain of the second glutamic acid is a 2-aminoethyl group.</p>	<b>374.40</b>
AgpGDDAE	 <p>The structure is identical to RGDDAE, showing a peptide backbone with a D-arginine residue, two D-glutamic acid residues, and a D-alanine residue. The side chain of the second glutamic acid is a 2-aminoethyl group.</p>	<b>360.37</b>
CavGDDAE	 <p>The structure is identical to RGDDAE, showing a peptide backbone with a D-arginine residue, two D-glutamic acid residues, and a D-alanine residue. The side chain of the second glutamic acid is a 2-aminoethyl group.</p>	<b>390.39</b>
RGDDAP	 <p>The structure is identical to RGDDAE, showing a peptide backbone with a D-arginine residue, two D-glutamic acid residues, and a D-alanine residue. The side chain of the second glutamic acid is a 2-aminoethyl group.</p>	<b>402.46</b>
AgbGDDAP	 <p>The structure is identical to RGDDAE, showing a peptide backbone with a D-arginine residue, two D-glutamic acid residues, and a D-alanine residue. The side chain of the second glutamic acid is a 2-aminoethyl group.</p>	<b>388.43</b>
AgpGDDAP	 <p>The structure is identical to RGDDAE, showing a peptide backbone with a D-arginine residue, two D-glutamic acid residues, and a D-alanine residue. The side chain of the second glutamic acid is a 2-aminoethyl group.</p>	<b>374.40</b>

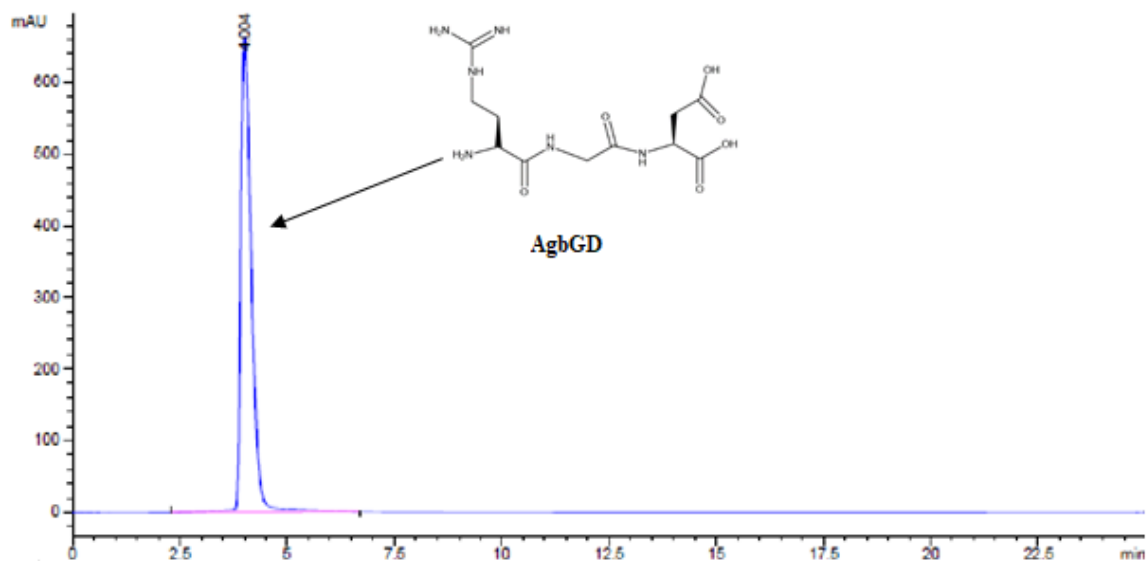
CavGDDAP		404.42
----------	--	--------

## 5. Охарактеризиране на новосинтезираните аналози на RGD

Новосинтезираните пептиди бяха пречистени чрез колонна гел - филтрационна хроматография върху Sephadex G-25 с 10% оцетна киселина. Чистите пептидни фракции бяха лиофилизирани.

Степента на химичната им чистота бе определена чрез RP-HPLC и CE. 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 AgbGD, определена чрез RP-HPLC и времето на задържане при изократно елуиране, е показано на Фигура 28.



Пептид	Време на задържане (min)	Височина на пика (AU)	Площ (%)
AgbGD	4.004	0.663	100

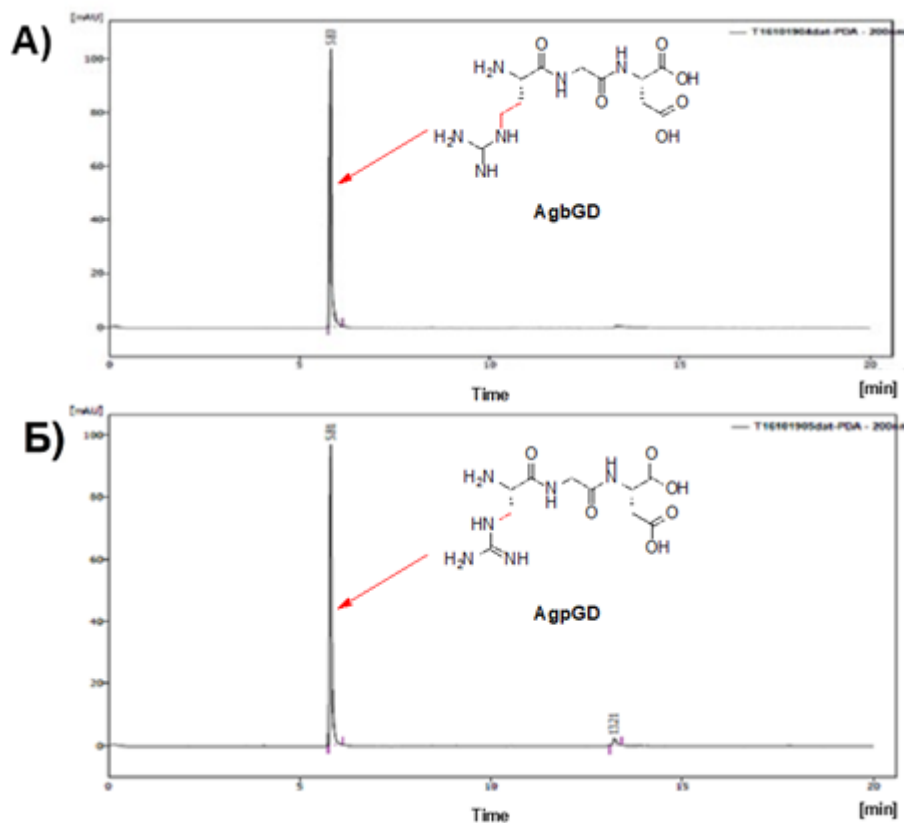
**Фигура 28.** Определяне на химическа чистота на пептид AgbGD Колона: ZIC<sup>®</sup> - HILIC (100 x 4,6 mm); мобилна фаза: 0.005 M CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (pH=6,8)/ацетонитрил, 50:50. UV детекция – при 206 nm

При провеждане на капиларна електрофореза е важно да се подбере подходящ буфер. Причината е, че той определя заряда на молекулата на анализа и съответно скоростта на миграция. Буферният разтвор трябва да се характеризира с добър буферен капацитет (контрол на pH), ниска проводимост и добра UV прозрачност (особено в ниската UV област). Добавянето в буфера на реагенти, образуващи мицели, е ефективен подход за постигане на по-висока селективност (особено за неутрални разтвори).

За определяне химичната чистота на част от синтезираните пептиди, в буферния разтвор добавихме анионно повърхностно активно вещество – SDS (натриев додецилсулфат). При електрофореза се 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 анализ е включен в мицели, толкова скоростта на миграция е по-ниска. Времевият прозорец на миграция на анализа ( $t_R$ ) е ограничен между времето на преминаване на основния разтвор ( $t_0$ ) и този на мицела ( $t_{mc}$ ).



На Фигура 29 са представени електроферограмите на новополучените AgbGD и AgpGD. Чистотата на синтезираните пептиди е висока, добивите са в границите 96 – 100%.



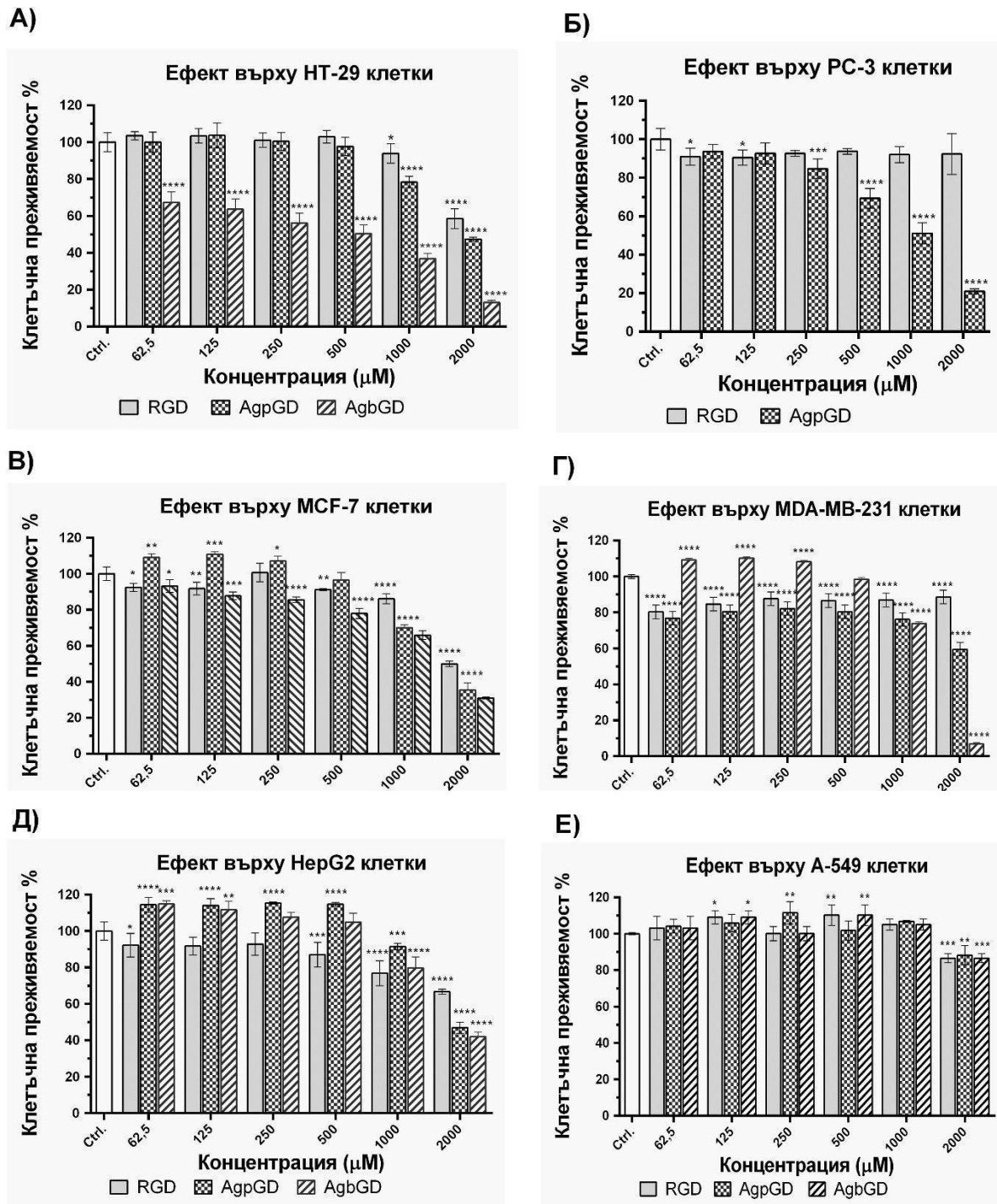
Пептид	Време на задържане (min)	Височина на пика (AU)	Площ (%)
AgbGD	5.825	0.104	100
AgpGD	5.813	0.097	96

**Фигура 29.** Електроферограма на AgbGD (А) и AgpGD (Б), подвижен буфер: 20 mM Tris, 5mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM SDS, pH 7; с капилляра: 290/400 μm, U = 15 kV, I = 38 μA, T = 23°C, 200 nm

## 6. Изпитване за цитотоксичен ефект на новосинтезираните аналози на RGD и на техните конюгати с полиамини

За да бъде определена активността на RGD и неговите новосинтезирани структурни аналози и конюгати с биогенни диамини, приложихме *in vitro* изследване за цитотоксичен и антипролиферативен ефект с помощта на МТТ тест. При проведения тест бяха отчетени резултати на 24 часа, даващи информация относно цитотоксичния потенциал на изследваните пептиди. Антипролиферативният ефект бе оценен при отчитане на процента живи клетки на 72 часа от началото на изследването.

Антипролиферативната активност на миметиците AgbGD и AgrGD, както и на изходния RGD беше изследвана *in vitro* върху шест туморни клетъчни линии: HT-29, PC-3, MCF-7, MDA-MB-231, HepG2, A-549 и една нетуморогенна – MCF-10A.



**Фигура 30.** Ефект на RGD и неговите аналози (AgrGD и AgbGD) върху клетъчната преживяемост, след 72 часа третиране на следните клетъчни линии: А) HT-29, Б) PC-3, В) MCF-7, Г) MDA-MB-231, Д) HepG2, Е) A-549. \*\*\*\*P<0,0001, \*\*\*P<0.001, \*\*P< 0.01 и \*P<0.05

Клетките бяха инкубирани в среда DMEM (Dulbecco Modified Eagle's medium) с 10% фетален телешки серум и антибиотици в инкубатор, поддържащ влажна атмосфера с 5% CO<sub>2</sub> и 37°C за 72 часа.

При провеждане на теста пептидите бяха приложени в концентрация от 2000 до 62.5 μM по метода на двойно разреждане. След това бе определена тяхната оптична плътност при λ=550 nm, при референтна стойност λ=630 nm.

Клетъчната линия HT-29 е изолирана от аденокарцином на дебелото черво. Според СЗО през 2018 колоректалният рак е на второ място по брой новозаболенели и починали (*Martínez-Maqueda et al. 2015*).

На Фигура 30 са представени обобщени резултати от изследването за цитотоксичност на RGD и неговите новосинтезирани аналози, спрямо HT-29 клетки. Най-изразен доза-зависим цитотоксичен ефект проявява AgbGD. Неговият цитотоксичен ефект е статистически значим при всички концентрации. RGD и AgpGD проявяват антипролиферативна активност само в концентрации 1000 и 2000 μM.

Ракът на простатата е най-често срещаното злокачествено заболяване при мъжете. То е на второ място по смъртност сред останалите видове туморни заболявания (*Tai et al. 2011*). Поради това клетъчна линия PC-3 попада във фокуса на проведените от нас изследвания. AgpGD проявява ефект върху клетъчната преживяемост, при концентрации – 250 – 2000 μM, докато нативният RGD пептид не демонстрира статистически значима активност върху PC-3 клетъчната линия (Фиг. 30Б).

Изследване за цитотоксичност на трите пептида беше проведено и върху MCF-7 клетъчна линия (Фиг. 30В). Нативният пептид проявява статистически значима антипролиферативна активност в най-високата приложена концентрация. Новосинтезираните аналози проявяват ефект при концентрации между 250 и 2000 μM, за AgbGD и между 1000 и 2000 μM, за AgpGD. При ниските приложени концентрации изходният трипептид и новосинтезираните аналози не проявяват изразен ефект върху клетъчната преживяемост.

Антипролиферативната активност на RGD и неговите аналози беше изследвана и върху MDA-MB-231 клетъчна линия от рак на гърдата, която се характеризира с резистентност към значителен брой противотуморни агенти (*Razak et al. 2019*). AgbGD проявява най-значителен ефект от трите приложени пептида при максимално

приложената концентрация. RGD също показва статистически значима активност при най-високите приложени дози, но в по-ниска степен спрямо AgbGD. Ефектът, който демонстрира AgrGD е сравним с този на нативния RGD пептид, но за разлика от него проявяват по-изразена активност в най-високата приложена концентрация – 2000  $\mu\text{M}$ .

Известно е, че хепатоцелуларният карцином е петото по честота злокачествено заболяване в световен мащаб и третото по смъртност след карцинома на белия дроб и на стомаха (*Sherman 2010*). Продължителността на живота при пациенти с хепатоцелуларен карцином остава незадоволителна. Поради това, за изследване бе подбрана HepG2 клетъчна линия, получена от човешки хепатоцелуларен карцином.

Подобно на представените дотук резултати при HepG2 се запазва тенденцията, новосинтезираните аналози да проявяват по-изразен антипролиферативен ефект. RGD проявява своята антипролиферативна активност в ниска степен, при по-голяма част от приложените концентрации. Тя е статистически значима между 500 и 2000  $\mu\text{M}$ . За разлика от изходният пептид, новосинтезираните аналози показват изразен ефект само в най-високите приложени концентрации. Като дори при 2000  $\mu\text{M}$  AgrGD и AgbGD имат по-изразена активност, в сравнение с RGD.

Цитотоксичният ефект на RGD и неговите аналози беше изследван и при A-549 клетъчна линия, която е широко използвана в белодробната клетъчна биология (*Swain et al. 2010*). Резултатите показват, че A-549 клетките са нечувствителни към действието на AgbGD, AgrGD и RGD. Вероятно това се дължи на факта, че при клетъчна линия A-549 експресията на  $\alpha_v\beta_3$  интегрин е ниска или дори липсва (*Hou et al. 2016*).

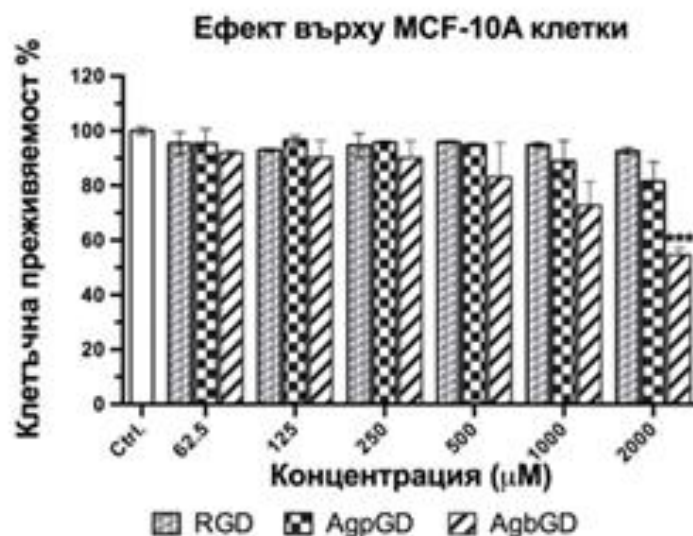
Според Barczyk и сътр. RGD-пептидът е молекулата, която най-често се свързва специфично с интегриновите рецептори (например  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_{II}\beta_3$ ) (*Barczyk et al. 2010*).

Интегрините са основни клетъчно-адхезивни рецептори. Отделните видове интегрини са специализирани в изпълнението на определени функции (*Aszodi 2003; Schwander et al. 2003; Barczyk et al. 2010*). Например те участват в преобразуването на вътреклетъчните сигнали, които предизвикват клетъчна миграция (*Aplin et al. 1998; Schwartz and Shattil 2000*), в клетъчната пролиферация и осигуряват преживяемостта, както и в клетъчната адхезия към протеини от ЕСМ. Инхибирането на интегриновите рецептори води до подтискане на клетъчната миграция, апоптоза и блокиране на туморната ангиогенеза и метастазирание (*Jin and Varner 2004*). Използването на интегринови антагонисти, специфично насочени към туморната микросреда, могат

значително да повлияят развитието на тумора (*Desgrosellier and Cheresh 2010*) и прогресията на заболяването.

Установено е, че част от интегрините имат афинитет само към един протеинов лиганд от ЕСМ (например  $\alpha_5\beta_1$  разпознава фибронектин), други могат да се свързват с няколко вида лиганди -  $\alpha_v\beta_3$  взаимодейства с витронектин, фибронектин и фибриноген, които участват в процесите на туморна ангиогенеза (*Jin and Varner 2004*).

При изследването на антипролиферативната активност на трите пептида не се наблюдава ефект спрямо нетуморогенната клетъчна линия MCF-10A (Фиг. 31). Изключение прави аналогът AgbGD, който проявява статистически значим ефект върху преживяемостта на клетките, в най-високите приложени концентрации – 1000 и 2000  $\mu\text{M}$ . Този резултат показва, че тестваните молекули не проявяват ефект върху здрави клетки, което определя тяхната специфичност към туморните клетки и е предпоставка за по-малък брой нежелани странични ефекти.



**Фигура 31.** Антипролиферативна активност на RGD, AgpGD и AgbGD върху клетъчната преживяемост след 72 часа третиране на MCF-10A клетъчна линия. Еднопосочен ANOVA със сравнителен пост тест на Dunnett, като адаптираната *P*-стойност е отбелязана както следва:

\*\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\*\* $P < 0.001$  и \*\* $P < 0.01$

Резултатите представени в Таблица 4 обобщават данните, получени при изследване на антипролиферативната активност на RGD, AgbGD и AgpGD, върху изследваните

клетъчни линии. Най-изразен инхибиторен ефект проявява AgbGD върху HT-29 клетъчна линия ( $IC_{50} = 300 \pm 10 \mu M$ ), докато RGD и AgpGD не демонстрират активност в приложените концентрации. AgpGD демонстрира повишена активност ( $IC_{50} = 1100 \pm 10 \mu M$ ) върху PC-3 клетки, в сравнение с нативния пептид ( $IC_{50} > 2000 \mu M$ ). Обобщените резултати от изследването за антипролиферативен ефект на RGD и неговите новосинтезирани аналози върху клетъчните линии MCF-7 и MDA-MB-231, показват, че RGD и AgpGD не демонстрират активност в приложените концентрации. За разлика от тях AgbGD показва инхибиторен ефект при двете клетъчни линии, съответно при концентрации  $1400 \pm 10 \mu M$ , за MCF-7 клетъчна линия и  $1700 \pm 20 \mu M$ , при MDA-MB-231. При изследването стана ясно, че A-549 клетъчна линия не е чувствителна към действието на RGD и неговите аналози. Спрямо клетките от HepG2 клетъчната линия и трите пептида не показаха инхибиторна активност, както и при нетуморогенната клетъчна линия MCF-10A.

**Таблица 4.**  $IC_{50}$  стойности на RGD и неговите производни AgbGD и AgpGD след 72 часа третиране (тествана концентрация 60 – 2000  $\mu M$ )

Пептид	$IC_{50} \pm SD (\mu M)^1$						
	HT-29	PC-3	MCF-7	MDA-MB-231	HepG2	A-549	MCF-10A
<b>RGD</b>	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.
<b>AgbGD</b>	$300 \pm 10$	н.а.	$1400 \pm 10$	$1700 \pm 20$	н.а.	н.а.	н.а.
<b>AgpGD</b>	н.а.	$1100 \pm 10$	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.
<b>Cisplatin</b>	10	2					
<b>5-FU</b>	60						

<sup>1</sup>Стойности на  $IC_{50}$  със стандартно отклонение SD; н.а. = няма активност при концентрации от 2000  $\mu M$ .

Базирайки се на получените данни може да се направи заключение, че скъсяването на дължината на страничната верига при Arg с една метиленова група (AgbGD), повишава цитотоксичния ефект в сравнение с изходния RGD пептид. Активността на изследваните пептиди е дозозависима и клетъчно-специфична.

Сравнихме получените от нас резултати с описани в литературата данни относно антипролиферативния ефект на две лекарствени вещества, използвани като стандарт в

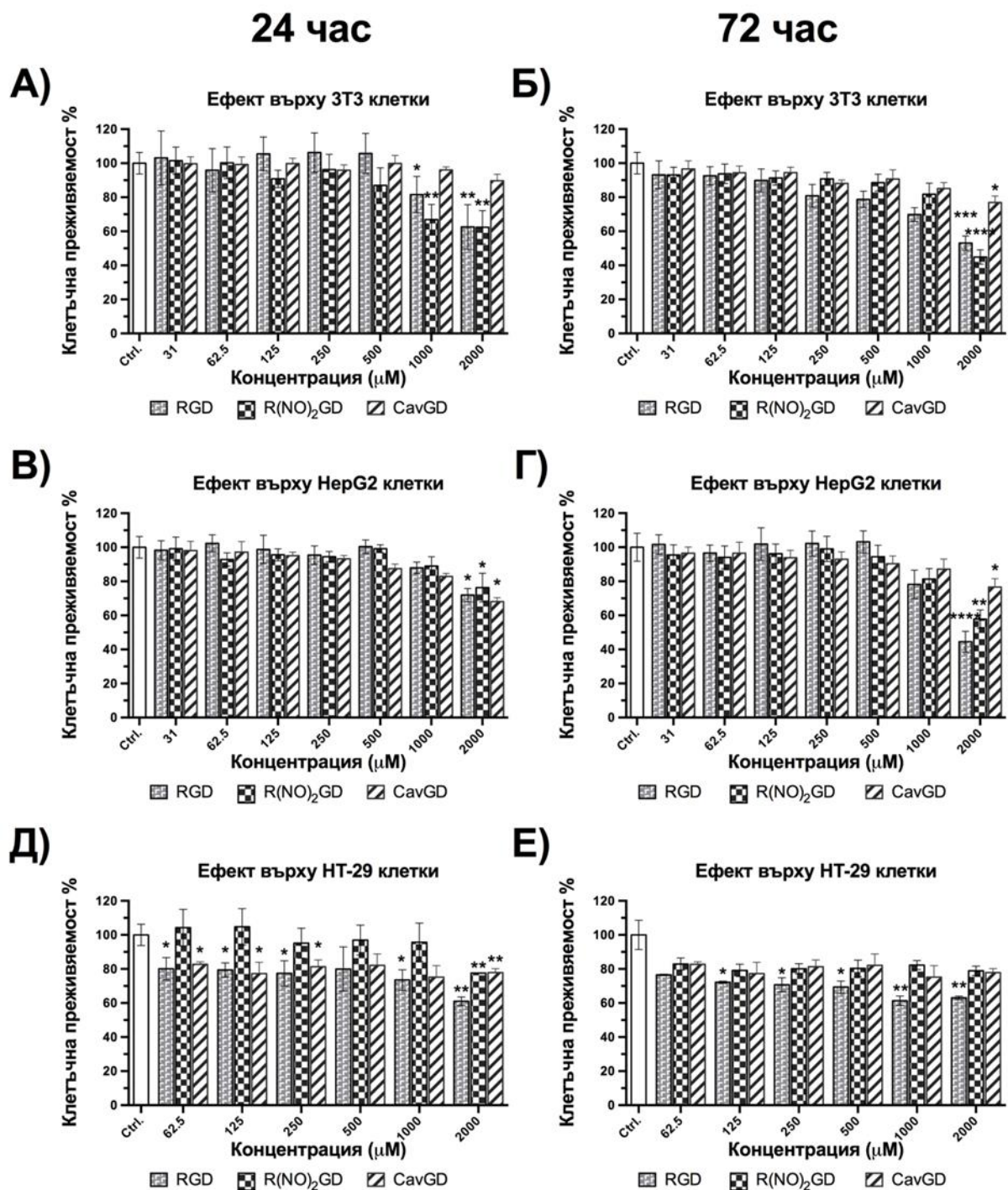
лечението на злокачествени образувания – Cisplatin и 5-fluorouracil (5-FU). Yildirim и Aydemir изследват цитотоксичния ефект на двете вещества върху HT-29 и PC-3 клетъчни линии. Техните резултати показват IC<sub>50</sub> на Cisplatin съответно 10µM, при HT-29 клетките и 2µM, при PC-3 клетъчна линия. 5-FU показва IC<sub>50</sub> при HT-29 клетъчна линия, която е в концентрация 60µM (*Yildirim and Aydemir 2020*).

От проведения сравнителен анализ (Таблица 4) можем да заключим, че стандартните химиотерапевтици демонстрират по-висока IC<sub>50</sub>, в сравнение с новосинтезираните от нас пептидни аналози. Въпреки това може да отбележим някои основни предимства на ArgGD и ArgbGD пред Cisplatin и 5-FU. Аналозите на RGD се насочват специфично към туморните клетки, като по този начин става възможно избягването на съществен недостатък на Cisplatin и 5-флуороурацила, а именно цитотоксичния им ефект и върху клетки от здрави тъкани. Други странични ефекти, които могат да се проявят след терапия със стандартните химиотерапевтици са нефро-, ото-, невро- и хепатотоксичност (*Bademci et al. 2021*). Освен това, както беше отбелязано в литературния обзор, природната структура на пептидите позволява да се метаболизират до аминокиселини, които могат да се екскретират от организма с ниска имуногенност.

След като бе проведено проучване на цитотоксичната активност на аналози на RGD, при които Arg е заместен с негови структурни аналози, изследвахме и пептиди, модифицирани по два начина отново в N-края.

При първия подход Arg беше заместен с Cav, в резултат се получава CavGD. Другата промяна, която предприехме, е включването на NO<sub>2</sub>-група в молекулата на аргинина до получаване на R(NO<sub>2</sub>)GD. Целта бе да се определи дали тези промени ще доведат до повишаване на антипролиферативния и цитотоксичен ефекти на новосинтезираните аналози. Активността на пептидите бе изследвана посредством провеждане на МТТ тест върху следните клетъчни линии: 3T3, HepG2 и HT-29, за период от 24 (цитотоксичен ефект) и 72 (антипролиферативен ефект) часа.

Приложените концентрации на пептидите бяха между 2000 и 30 µM, по метода на двойното разреждане. Резултатите са представени на Фигура 32.



**Фигура 32.** Цитотоксичен и антипролиферативен ефект на RGD и неговите аналози CavGD и R(NO<sub>2</sub>)GD върху клетъчната преживяемост на 3Т3, HepG2 и HT-29 клетъчни линии, след 24 (А, В и Д) и 72 часа (Б, Г и Е) третиране. Еднопосочен ANOVAsъс сравнителен пост тест на Dunnett, като адаптираната *P*-стойност е отбелязана както следва: \*\*\*\**P*<0.0001, \*\*\**P*<0.01 и \**P*<0.05

3Т3 е миша ембрионална фибробластна клетъчна линия с нетуморен характер. Причината за включването ѝ в изследването е проследяване на ефекта върху здрави



клетки, тъй като по-голямата част от туморните терапевтици повлияват и нормалните клетки. Данните, получени от провеждането на МТТ тест върху 3Т3, отразяват специфичността на пептидите към туморните клетки.

При 3Т3 клетъчната линия RGD, R(NO<sub>2</sub>)GD и CavGD проявяват ниска инхибираща активност. Нативният пептид и неговият аналог, с добавена нитрогрупа в гуанидиновата група на Arg, демонстрират статистически значим цитотоксичен ефект след 24 часа третиране при 1000 и 2000 μM. В максимално приложената концентрация клетъчна преживяемост на клетките третирани с R(NO<sub>2</sub>)GD е сравнима с тази на клетките, върху които е приложен изходния RGD (Фиг. 32А). Изследването на антипролиферативната активност на трите пептида върху 3Т3 клетъчната линия, показва, че и трите молекули проявяват ефект при 2000 μM. Най-изразено действие върху пролиферацията на клетките проявява R(NO<sub>2</sub>)GD, последван от RGD и CavGD.

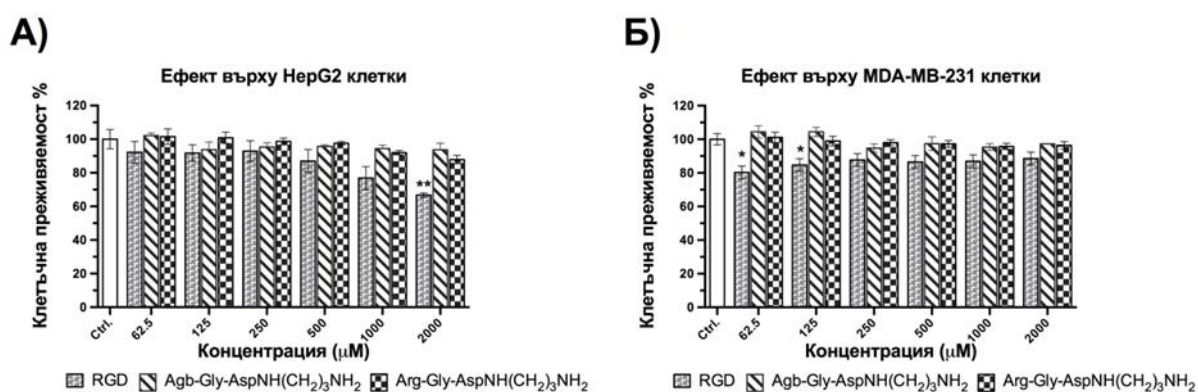
Трите пептида показват сравними резултати и при третирането на HerG2 клетките. Цитотоксичният (Фиг. 32В) и антипролиферативният (Фиг. 32Г) ефекти са най-изразени при нативния RGD пептид при максимална концентрация – 2000 μM. При изследването на клетъчната преживяемост след 24 часа третиране с аналозите на изходния трипептид, техният ефект е по-слаб (R(NO<sub>2</sub>)GD) или сравним с този на RGD – CavGD. Аналозите на RGD демонстрират и по-слаба активност при повлияване на пролиферацията на клетките от HerG2 клетъчната линия, като в този случай аналога с включена допълнителна нитрогрупа в молекулата на аргинина проявява по-изразен ефект, в сравнение с CavGD.

Проведохме изпитване за цитотоксичен и антипролиферативен ефект на RGD и аналозите му и върху HT-29 клетъчната линия. След 24 часа третиране с проучваните молекули статистически значим ефект върху преживяемостта на клетките показват и трите пептида. Той е най-изразен при нативния RGD пептид (Фиг. 32Д). Освен това той демонстрира и статистически значим антипролиферативен ефект след 72 часа третиране върху HT-29 (IC<sub>50</sub> = 1500 ± 20 μM), докато аналозите му не проявяват ефективност (Фиг. 32Е).

От получените резултати можем да заключим, че замяната на Arg с Cav или добавянето на нитрогрупа в гуанидиновата, не водят до повишаване на цитотоксичния и антипролиферативния ефекти върху трите изследвани клетъчни линии.

Предприета бе и структурна модификация на RGD и в неговия C-край, а именно конюгирахме него и AgbGD с биогенния диамин – пропилендиамин.

Проведохме сравнителен анализ относно цитотоксичния ефект на двата новополучени конюгата, единият с модификация само в С-края: RGDDAP, а другият с предприети промени в N- и С-края на молекулата на нативния пептид: AgbGDDAP. Изследвахме тяхната цитотоксичност върху две туморни клетъчни линии – HerG2 и MDA-MB-231. Резултатите от MTT теста, след 72 часово третиране са представени на Фигура 33. Те показват, че RGD проявява статистически значим ефект в концентрации 1000 и 2000  $\mu\text{M}$ . Новополучените конюгати не показват активност, в никоя от приложените концентрации върху клетки от същата клетъчна линия. Цитотоксичният ефект върху MDA-MB-231 е най-изразен при изходния RGD пептид, в концентрации 62.5 и 125  $\mu\text{M}$ . При тестваните конюгати не е отчетена активност, в нито една от приложените концентрации.



**Фигура 33.** Изследване на антипролиферативния ефект на RGD, AgbGDDAP и RGDDAP след 72 часа третиране на клетъчни линии HerG2 (А) и MDA-MB-231 (Б). Еднопосочен ANOVA със сравнителен пост тест на Dunnett, като адаптираната *P*-стойност е отбелязана както следва: \*\* $P < 0.01$  и \* $P < 0.05$

При изследваните пептидни конюгати не се наблюдава антипролиферативен ефект върху използваните клетъчни линии. Отчетено е, че единствено AgbGD проявява  $IC_{50}$  стойност от  $1730 \mu\text{M} \pm 200$ , при MDA-MB-231 клетъчна линия.

**Таблица 5.** IC<sub>50</sub> стойности на RGD и неговите производни AgbGD, AgbGDDAP и RGDDAP измерени след 72 часа (тествана конц. 62 - 2000 μM).

Пептид	IC <sub>50</sub> ± SD (μM) <sup>1</sup>	
	НерG2	MDA-MB-231
<b>RGD</b>	н.а.	н.а.
<b>AgbGD</b>	н.а.	1730 ± 200
<b>AgbGDDAP</b>	н.а.	н.а.
<b>RGDDAP</b>	н.а.	н.а.

<sup>1</sup>Стойност на IC<sub>50</sub> със стандартно отклонение (SD); н.а. = няма активност при концентрации от 2000 μM.

В заключение конюгирането на диамин в С-края на молекулата на RGD и AgbGD не води до повишаване на антипролиферативната им активност.

Получените резултати сравнихме с предишни наши данни. От проведения сравнителен анализ може да се направи заключение, че въвеждането на по-липофилен заместител на същата позиция посредством метоксилиране на С-края на RGD – RGD-OMe, е преимуществено по-благоприятно както за увеличаване на цитотоксичните и антипролиферативни ефекти, така и за повишаване на селективността (Balacheva et al. 2012).

#### **7. Оценка за преминаване на веществата през биологични мембрани чрез изчисляване на данни за молекулните дескриптори с помощта на софтуера Molinspiration Cheminformatics®**

Получените *in vitro* резултати за цитотоксичния ефект и антипролиферативна активност на новосинтезираните пептиди не са достатъчни, за да бъдат разглеждани като потенциален лекарствен продукт. Причината за това е, че резултатите получени при проведените дотук изследвания не носят информация за фармакокинетичното поведение на новосинтезираните молекули. За пълно описване на фармакокинетичните параметри – определяне на възможността на новосинтезираните пептиди да достигат до мястото на действие, осигуряване на подходяща бионаличност, преминаване през клетъчните мембрани, протичане на процеса на биотрансформация и екскреция от човешкия организъм, проведохме *in silico* изследване на синтезираните пептиди, с помощта на софтуера Molinspiration Cheminformatics®. Основният алгоритъм, по който работи той, включва изчисляване на молекулните дескриптори по Правилото на Липински. То дава

възможност за оценка на лекарственото подобие и позволява предсказване дали дадено химично съединение притежава фармакологична или биологична активност при перорално приложение.

Правилото на Липински или „Правилото 5“ (Ro5) е формулирано от Christopher Lipinski през 1997г (*Lipinski et al. 2001*). То се използва, за да даде насоки дали нови молекули са подходящи да бъдат лекарства. Според него лошата абсорбция и инфилтрация са по-вероятни, когато донорите на водородните връзки - nOH, nNH (HBD) са над 5, акцепторите на водородни връзки - nO, nN (HBA) са над 10, молекулното тегло ( $M_w$ ) е над 500 и изчисленият LogP (CLogP) е по-голям от 5 и по-малък от 0. Допуска се нарушението само на един от посочените параметри. С негова помощ също може да се опишат и свойствата на молекулата: абсорбция, разпределение, метаболизъм и екскреция (ADME) (*Mihaylova 2019*).

През 2014 (*Doak B. et al.; 2014*) са дефинирани стойностите на разширените граници на правилото на Липински (bRo5), които се отнасят за молекули с пептидна структура:  $M_w \leq 1000$  Da,  $-2 \leq cLogP \leq 10$ ,  $HBD \leq 6$ ,  $HBA \leq 15$ , топологична полярна повърхност (TPSA)  $\leq 250 \text{ \AA}^2$  и брой въртящи се връзки (nRotB)  $\leq 20$ .

С помощта на тези данни може да се предвиди способността на получените пептиди да преминават през клетъчната мембрана на таргетните клетки. Друг показател, който може да бъде прогнозиран, е обемът на разпределение на веществата в кръвта. Тези данни позволяват да бъде определен вида на лекарствената форма, в която да бъдат включени получените пептиди и да се постигне максимална бионаличност (*Mihaylova 2019*).

Включването на *in silico* методи при разработването на нови терапевтични молекули води до намален брой експериментални проучвания и скъсява времето за достигане до фазата на предклинични и клинични изследвания. За целта на нашето изследване бяха изчислени параметрите на Ro5, TPSA и процента на абсорбция (%ABS). Резултатите са представени в Таблица 6.

Процентът на абсорбция се изчислява по следната формула (*Zhao et al. 2002*):

$$\%ABS = 109 - [0.345 \times TPSA]$$

Коефициентът на разпределение в системата n-octanol-вода се използва като количествена мярка за липофилността на съединенията, която характеризира способността им за преминаване през клетъчната мембрана.

Стойностите на молекулните дескриптори на новосинтезираните пептиди, техните аналози и конюгати, са извън границите на bRo5. Следователно молекулите не са подходящи за перорален прием. Това налага търсенето на други подходящи пътища на въвеждане в организма. Причините, поради които новополучените съединения не отговарят на изискваните резултати са големият брой протонни донори – nOH, nNH = 9 ÷ 12, както и изявените им хидрофилни свойства – miLogP = -5.08 ÷ -4.71. Друг фактор, който показва, че приложението *per os* при новосинтезираните молекули няма да доведе до ефективна бионаличност, е ниският процент абсорбция, между 24.48% до 32.85%.

Резултатите от *in silico* изследването на веществата показват, че ако те бъдат приложени като самостоятелна лекарствена форма, ще трябва да се използва парентерален път на въвеждане. Подходящи начини за приложение са интравенозната инфузия или инжектиране, при които пептидите, аналозите им или новополучените им конюгати директно ще бъдат включени в кръвообръщението. След това посредством своята избирателност ще достигнат до туморната тъкан, където да проявят своето цитотоксично действие. Тези начини на въвеждане имат своите недостатъци, сред които са стресът, травмирането на тъканта в мястото на инжектиране или инфузиране, нуждата да се прилага от специализиран персонал и др.

Поради това търсенето на подходяща лекарствена форма, която може да се прилага перорално, е от особено значение. Така ще се увеличи комплайънсът от страна на пациента, което ще доведе и до повишени резултати от прилаганата терапия.

**Таблица 6.** Физикохимични характеристики на новосинтезираните съединения, определени с програмата Molinspiration Cheminformatics®

Съединение	miLogP <sup>a</sup>	TPSA <sup>b</sup>	nON <sup>c</sup>	nOHNH <sup>d</sup>	n-RotB <sup>e</sup>	Mol Vol <sup>f</sup>	Mw <sup>g</sup>	%ABS <sup>h</sup>	nviolation <sup>i</sup>
1 RGD	-4.88	220.72	12	10	12	304.35	346.34	32.85	2
2 AgbGD	-4.99	220.72	12	10	11	287.55	332.21	32.85	2
3 AgpGD	-5.08	220.72	12	10	10	270.75	318.29	32.85	2
4 CavGD	-4.91	227.16	13	9	13	293.12	349.30	30.63	2
5 RGDDAE	-4.83	238.54	13	12	14	353.63	388.43	26.70	2
6 RGDDAP	-4.71	238.54	13	12	15	370.43	402.46	26.70	2
7 AgbGDDAE	-4.94	238.54	13	12	13	336.83	374.40	26.70	2
8 AgbGDDAP	-4.83	238.54	13	12	14	353.63	388.43	26.70	2
9 AgpGDDAE	-5.04	238.54	13	12	12	320.02	360.38	26.70	2
10 AgpGDDAP	-4.94	238.54	13	12	13	336.83	374.40	26.70	2
11 CavGDDAE	-4.86	244.98	14	11	15	342.39	391.38	24.48	2
12 CavGDDAP	-4.73	244.98	14	11	16	359.19	405.41	24.48	2

<sup>a</sup>Коефициент на разпределение в система n-octanol-вода (miLogP); <sup>b</sup>Топологична полярна повърхност;

<sup>c</sup>Брой акцептори на протони; <sup>d</sup>Брой донори на протони; <sup>e</sup>Брой (rotatable) въртящи се връзки;

<sup>f</sup>Молекулен обем; <sup>g</sup>Молекулно тегло; <sup>h</sup>Процент абсорбция (%ABS); <sup>i</sup>брой нарушения на Ro5 и bRo5

Напредъкът в изучаването на туморните тъкани и по-лесната достъпност до материали като липиди, полимери, неорганични и биомакромолекулни носители и полимерни хидрогели водят до повишаване на използването им за получаване на лекарствени форми, с включени в тях противотуморни средства. До момента в противотуморната терапия се използват: мезопорести системи, липозоми, полимерни наночастици (мицели, дендримери), хидрогели и др. Малките размери и голямата специфична повърхност на наночастиците позволяват използването им за високоефективно доставяне на вещества с белтъчна структура, лекарства и средства за образна диагностика до туморните клетки след перорален прием (*Senapati et al. 2018*).

Липозомите могат да се използват като носители, както на хидрофилни, така и на липофилни вещества (*Senapati et al. 2018*). До момента противотуморни лекарствени вещества, които са включени в липозоми се намират в различни етапи от клинични изпитвания. Основно тяхно предимство е намаленото елиминиране и защитата на активното вещество от заобикалящата го среда (*Olusanya et al. 2018*).

Друг вид лекарствена форма с изменено освобождаване, която може да се използва за прицелно доставяне на лекарствени вещества, е т.нар. електронна капсула. Тя предоставя възможност за доставяне на вещества с пептидна структура до определен участък в ГИТ, което позволява да се избегне действието на солната киселина и ензими върху молекулата (*Fassih 2017*).

В различни етапи от клинични проучвания се изследват мицели, които се използват като носители на противотуморни агенти при рак на гърдата (*Oprita and Sevastre 2021*).

В мезопорести наночастици със силициев диоксид могат да се включат хидрофобни лекарствени вещества с нисък клетъчен пермеабилитет. Полимерни наночастици са използвани като носители на Doxorubicin и Tamoxifen (*Senapati et al. 2018*).

## V. ИЗВОДИ

Проведен е насочен синтез и систематично изследване на цитотоксичното и антипролиферативно действие на набор от RGD пептидни аналози модифицирани с небелтъчни аминокиселини, като е направен сравнителен анализ на ефектите им върху ракови и неракови клетки. Изследването включва 3 небелтъчни аминокиселини и техни производни, 2 биогенни диамина и 13 пептидни аналога на RGD.

1. Получени са 4 подходящо защитени производни на небелтъчната аминокиселина канаванин: N $\alpha$ -9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-canavanine (Fmoc-L-Cav-OH), N $\alpha$ -9-Fluorenylmethyloxycarbonyl, N<sup>G</sup>-ter-butylloxycarbonyl-canavanine (Fmoc-L-Cav(Boc)-OH), N $\alpha$ -ter-Butylloxycarbonyl, N<sup>G</sup>-ter-butylloxycarbonyl-canavanine (Boc-L-Cav(Boc)-OH), N $\alpha$ -ter-Butylloxycarbonyl, N<sup>G</sup>-ter-butylloxycarbonyl-canavanine succinimide ester (Boc-L-Cav(Boc)-OSu), целеви модификанти за синтеза на аналози и конюгати на RGD.

2. Получени са защитени производни на биогенните диамини (1,2-етилендиамин и 1,3-пропилендиамин) с N-третична бутилоксикарбонилна група (Boc) с подобрени добиви, които са използвани за получаване на целеви конюгати с RGD.

3. Получени са посредством нови синтетични схеми, с повишен добив и чистота необходимите референтни пептиди: RGD, R(NO<sub>2</sub>)GD, RGD-OMe и CavGD.

4. Синтезирани са чрез твърдофазен пептиден синтез с висок добив (81-89%) два нови RGD аналога (AgpGD, AgbGD), модифицирани с аргининови миметици. Получените пептиди са с висока химическа чистота от 95-100%, доказана чрез RP-HPLC и CE. Това показва, че в хода на синтеза са подбрани най-подходящите защитни групи и кондензиращи реагенти.

5. Синтезирани са 8 нови неописани в литературата конюгати на RGD и негови миметици с биогенни диамини: RGDDAE, AgpGDDAE, AgbGDDAE, CavGDDAE, RGDDAP, AgpGDDAP, AgbGDDAP, CavGDDAP. Разработени са два метода за техния синтез – в разтвор и върху полимерен носител. Прилагането на класическия метод в разтвор позволява разширяване на набора от биогенни диамини за следващ избор. При твърдофазния пептиден синтез има възможност за използване на диамини, които предварително са прикачени за смолата.

6. Определено е цитотоксичното и антипролиферативно действие *in vitro* на новосинтезирани пептидни аналози на RGD и на конюгати на RGD с биогенни диамини (RGD, AgbGD, AgpGD, CavGD, R(NO<sub>2</sub>)GD, RGDDAP и AgbGDDAP). Проведените експериментални изследвания показват:



- Активността на новосинтезираните пептиди е доза-зависима и клетъчно-специфична.
- При изследване на цитотоксичната активност *in vitro* на RGD и неговите аналози върху шест човешки туморни клетъчни линии (MCF-7, MDA-MB-231, HT-29, HepG2, PC-3 и A-549), както и върху три нетуморогенни клетъчни линии (3T3, MCF-10A), най-висок инхибиторен ефект показва пептидът AgpGD върху PC-3 клетки. Тестваните пептиди не показват значим ефект върху нетуморогенните MCF-10A клетки.
- При *in vitro* определяне на цитотоксичната активност на избрани конюгати на RGD и AgbGD с пропилендиамин, върху HepG2 и MDA-MB-231 клетъчни линии, новополучените молекули не показват антипролиферативни ефекти.

7. С помощта на *in silico* метод са получени стойностите на молекулните дескриптори на новосинтезираните пептидни аналози и техните конюгати. Данните показват, че всички новосинтезирани молекули нямат абсорбция след перорален прием. Следователно бионаличността ще бъде ниска, което ще доведе до слаб терапевтичен ефект.

8. При опита за извеждане на зависимостта химична структура – биологично действие за новосинтезираните RGD аналози е установено:

- Скъсяването на дължината на страничната верига на аминокиселината Arg в RGD пептида променя активността, като повишава цитотоксичния ефект на новополучените пептиди;
- Резултатите от изследването за антипролиферативен ефект на RGD аналозите, модифицирани в първа позиция на RGD като CavGD и R(NO<sub>2</sub>)GD, показват, че двата аналога не проявяват повишен цитотоксичен ефект върху тестваните клетъчни линии. Активността на новосинтезираните пептиди е доза-зависима и клетъчно-специфична;
- Резултатите от изследването на антипролиферативния ефект на RGD пептиди, модифицирани в С-края с пропилендиамин, не показват повишаване на инхибиторните ефекти в сравнение с изходните пептиди. Така получените резултати предоставят възможност за бъдещи изследвания, насочени към установяване на антипролиферативната и цитотоксична активност на останалите новополучени конюгати.

## VI. НАУЧНИ ПРИНОСИ

Представеното научно изследване в настоящата дисертация е в основата си с фундаментален характер. Научната му значимост се състои в обогатяване на съществуващите знания в областта на целенасочения синтез на биологично активни пептиди и установяване на връзката структура – действие/активност.

1. Синтезирани са аналози на нативния RGD пептид, при които са предприети структурни промени, като замяна на Arg с негови структурни непротеиногенни аналози, включване на нитро група в гуанидиновата функция на Arg, както и естерифициране на карбоксилната група на Asp:
  - синтезирани са аналозите R(NO<sub>2</sub>)GD и CavGD, при които Arg е заменен с небелтъчната аминокиселина канаванин по нови високоефективни схеми;
  - за първи път са синтезирани RGD аналозите AgpGD и AgbGD чрез замяна на Arg с неговите нор-аргигинови миметици.
2. Синтезиран е структурен аналог на RGD, при който Arg е заменен с Cav.
3. За първи път са синтезирани нови хибридни структури, които не са описани в литературата – RGD\полиаминови конюгати (RGDDAE, AgbGDDAE, AgpGDDAE, CavGDDAE, RGDDAP, AgbGDDAP, AgpGDDAP, CavGDDAP).
4. За първи път са получени данни за значима антипролиферативна активност на новосинтезираните аналози на RGD – AgpGD и AgbGD, които могат да послужат като основа за последваща оптимизация за разработването на противотуморни лекарства.
5. За първи път е изследван антипролиферативен ефект на конюгати на RGD със синтетични биогенни диамини.
6. Получените резултати за молекулните дескриптори на новополучени молекули, показващи ниска перорална бионаличност, могат да послужат за последващи надграждащи проучвания с цел разработване на подходяща лекарствена форма за перорален прием.

## VII. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### Публикации

1. Balacheva AA, **Lambev MK**, Pashov I, Detcheva RL, Sázelova P, Momekov GTs, Kašička V, Pajpanova TI, Golovinsky EV (2017) Synthesis, analysis and biological evaluation of new RGD mimetics. *Bulgarian Chemical Communications Special Issue E*: 07 – 10. (IF 0.238)
2. Hristova A, Dimitrova D, **Lambev M**, Mihaylova S (2018) Комплементарна и алтернативна медицина в лечението на ракови заболявания. *Варненски медицински форум* 7(3): 183-188.
3. **Lambev M**, Hristova A, Dimitrova D, Mihaylova S, Valcheva-Kuzmanova S, Pajpanova T (2018) Аспекти на приложение на RGD-пептидите. *Варненски медицински форум* 7(3): 189-194.
4. Balacheva A, **Lambev M**, Detcheva R, Bruckdorfer T, Pajpanova T (2020) Synthesis and biological evaluation of novel RGD analogues. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy* 55(4): 698-701.
5. **Ламбев М**, Балачева А, Димитрова Д, Христова А, Пайпанова Т, Вълчева-Кузманова Ст (2020) Съвременна терапия на рака и потенциална роля на RGD пептидите и полиамините като противотуморни агенти. *Наука фармакология* 11(2): 42-48.

### Участия в научни форуми

1. **Ламбев М**, Балачева А, Дечева Р, Пайпанова Т Синтез и анализ на нови хибридни структури – RGD\полиамини. Втори докторантски симпозиум „Молекулярната биология – нови хоризонти“ на Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“, БАН, 06-07 април 2017 г.
2. **Lambev M**, Hristova A, Dimitrova D, Pajpanova T, Valcheva-Kuzmanova S Methods for proving cytotoxicity. Национална научна конференция „15 години фармация в Медицински университет – Пловдив“, Девин, 01-03 юни 2018 г.
3. Balacheva A, **Lambev M**, Detcheva R, Bruckdorfer T, Pajpanova T *In vitro* assessment of the cytotoxic effects of novel RGD analogues and conjugates. Осми български пептиден симпозиум с международно участие, Стара Загора, 08-10 юни 2018 г.

4. Hristova A, Dimitrova D, **Lambev M**, Mihaylova S Комплементарна и алтернативна медицина в лечението на ракови заболявания. Седма научна сесия за преподаватели и студенти на Медицински колеж – Варна, 05-06 октомври 2018 г.
5. **Lambev M**, Hristova A, Dimitrova D, Mihaylova S, Valcheva-Kuzmanova S, Payranova T Аспекти на приложение на RGD-пептидите. Седма научна сесия за преподаватели и студенти на Медицински колеж – Варна, 05-06 октомври 2018 г.
6. Balacheva A, **Lambev M**, Detcheva R, Bruckdorfer T, Payranova T Synthesis and *in vitro* Assessment of the cytotoxic effects of novel RGD analogues and conjugates. 35 European peptide symposium, Dublin City University, Ireland, 26<sup>th</sup> – 31<sup>th</sup> August 2018.

## **VIII. НАУЧНИ ПРОЕКТИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

1. Проект на тема: **„Нови RGD\полиамини – синтез и проучване за противотуморна активност“**, проект № 17010/2017 г. на фонд „Наука“, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна. Ръководител на проекта: проф. д-р Стефка Вълчева-Кузманова, д.м.н., базова организация: Факултет „Медицина“, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна.
2. Проект на тема: **„Холистичен подход при прицелна терапия на рака“**, проект ДН 19-17/2017 г. на фонд „Научни изследвания“, Министерство на образованието и науката. Ръководител на проекта: доц. Тамара Иванова Пайпанова, дх., базова организация: Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“, гр. София.