



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“
ФАКУЛТЕТ ФАРМАЦИЯ

КАТЕДРА ФАРМАКОЛОГИЯ, ТОКСИКОЛОГИЯ И ФАРМАКОТЕРАПИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен

„Доктор“

Димана Димитрова Георгиева

Варна, 2023

Медицински университет „проф. Д-р Параскев Стоянов“

Факултет фармация

Катедра фармакология, токсикология и фармакотерапия

Димана Димитрова Георгиева

Синтезиране на пептидни молекули, аналози на лактоферицин, и изследване за антимикробно и противотуморно действие

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен

„Доктор“

Професионално направление: 7.3. Фармация

Научна специалност: „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“

Научни Ръководители:

доц. Тамара Пайпанова, д.х.

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

Официални рецензенти:

проф. Валентина Боянова Петкова - Димитрова, д.ф.н.

проф. Илко Николаев Гетов, д.ф.

Дисертационният труд съдържа 153 страници и е онагледен с 75 фигури и 21 таблици. Литературната справка включва 187 литературни източници, от които 6 на кирилица и 181 на латиница. Номерацията на фигурите и таблиците в автореферата съответства на тази от дисертацията.

Дисертационният труд е одобрен и предложен за защита от Катедра „Фармакология, токсикология и фармакотерапия“, Факултет „Фармация“ при Медицински университет ”Проф. Д-р Параскев Стоянов” – гр. Варна. Със заповед № Р-109-235 от 11.04.2023 година е насочен за публична защита пред Научно жури в състав:

проф. Валентина Боянова Петкова - Димитрова, д.ф.н.

доц. Калина Гочева Андреевска д.ф.

проф. Илко Николаев Гетов, д.ф.

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

проф. Калоян Добринов Георгиев д.ф.н.

Експерименталната работа е извършена в Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев” - БАН, секция: „Молекулен дизайн и биохимична фармакология”. Мас-спектралните анализи са проведени в Faculty of Science, University of Pecz, Hungary, Institute of Bioanalysis. Проучването за хидролитична стабилност и антимикробен ефект са проведени в Медицински университет – гр. Варна. В процеса на работа получихме ценна методична и практическа помощ от колегите, работещи в съответните звена, за което им изказваме най - искрената си благодарност.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 30.06.2023 г. от 10:00 часа в електронна платформа – Webex.

...На баща ми доц. Димитър Димитров, който мечтаеше да прочете тези редове. Той запали интереса ми към науката и беше моя водеща сила!!!♥

СЪДЪРЖАНИЕ

I.	ВЪВЕДЕНИЕ.....	1
II.	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	3
III.	ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ	4
1.	МЕТОДОЛОГИЯ	4
1.1.	Използвана апаратура	4
1.1.1.	Апаратура за пептиден синтез.....	4
1.1.2.	Апаратура за химически анализ	4
1.1.3.	Апаратура за определяне на цитотоксичност	5
1.2.	Използвани реактиви.....	5
1.2.1.	Използвани аминокиселини.....	5
1.2.2.	Реагенти използвани в пептидният синтез	5
1.2.3.	Буферни разтвори, използвани за анализ на хидролитична олигопептидна стабилност	7
1.2.4.	Реагенти, бактериални щамове и хранителни среди за определяне на бактериална активност.....	8
1.2.5.	Реагенти, среди и клетъчни линии за <i>in vitro</i> определяне на цитотоксичност	9
1.3.	Методи за синтез и пречистване на синтезираните пептиди.....	10
1.3.1.	Твърдофазен метод за пептиден синтез.....	10
1.3.2.	Пречистване чрез колонна гел-хроматография.....	13
1.4.	Методи за оценяване на химична чистота	13
1.4.1.	Тънкослойна хроматография	13
1.4.2.	Високоэффективна течна хроматография (RP-HPLC).....	15
1.4.3.	Капилярна електрофореза (CE)	15
1.5.	Методи за потвърждаване на структурата	16
1.5.1.	Електроспрей-йонизационна масспектрометрия (ESI-MS)	16
1.6.	Метод за определяне на хидролитична и химична стабилност.....	16
1.6.1.	UV-VIS спектроскопия.....	16

1.7.	Методи за оценка на биологична активност	17
1.7.1.	Микробиологични методи за определяне на антимикробни ефекти спрямо бактериални и гъбични щамове	17
1.7.2.	<i>In vitro</i> методи за оценка на цитотоксичност	20
2.	СИНТЕТИЧНИ ПРОЦЕДУРИ.....	22
2.1.	Синтез на защитени небелтъчни аминокиселини, необходими за пептидният синтез.....	22
2.1.1.	Получаване на N α -9-Fluorenylmethoxycarbonyl-p-fluoro-L-phenylalanine, Fmoc-L-Phe(p-F)-OH	22
2.1.2.	Получаване на N α -9-Fluorenylmethoxycarbonyl, N ^G -ter-butyloxy carbonyl-canavanine, Fmoc-L-Cav(Boc)-OH.....	23
2.1.3.	Получаване на N α -ter-Butyloxycarbonyl -6-fluoro-D-Tryptophan, Boc-D-Trp(6F)-OH.....	24
2.2.	Твърдофазен пептиден синтез на LfcinB(20-25) пептидни аналози	24
2.2.1.	Заместване на природните базични (Arg с Lys) и ароматните (Trp с Phe) аминокиселини	27
2.2.2.	Пептидни миметици, съдържащи небелтъчни аминокиселини...	34
2.2.3.	Пептидни миметици, съдържащи D-аминокиселини	39
3.	ПРЕЧИСТВАНЕ И ОХАРАКТРИЗИРАНЕ НА СИНТЕЗИРАНИТЕ ПЕПТИДИ	48
3.1.	Пречистване на новосинтезираните олигопептидни аналози на LfcinB(20-25).....	48
3.2.	HPLC-MS анализ на новосинтезираните олигопептидни аналози на LfcinB(20-25).....	48
3.3.	Определяне на хидролитичната и химична стабилност на новосинтезираните олигопептидни аналози на LfcinB(20-25)	50
3.3.1.	Хидролитична стабилност на LfcinB1	50
3.3.2.	Хидролитична стабилност на LfcinB2	52
3.3.3.	Хидролитична стабилност на LfcinB3	53
3.3.4.	Хидролитична стабилност на LfcinB4	55
3.3.5.	Хидролитична стабилност на LfcinB5	56

3.3.6.	Хидролитична стабилност на LfcinB6	58
3.3.7.	Хидролитична стабилност на LfcinB7	59
3.3.8.	Хидролитична стабилност на LfcinB8	61
3.3.9.	Хидролитична стабилност на LfcinB9	62
4.	БИОЛОГИЧЕН СКРИНИНГ	64
4.1.	Микробиологични методи	64
4.1.1.	Определяне на антимикробната активност чрез дисково– дифузионен метод с напоени стерилни дискове на Бауер-Кърби.....	64
4.1.2.	Определяне на Минимална бактерицидна концентрация	65
4.2.	Изпитване за цитотоксичен/антипролиферативен ефект	66
4.2.1.	Култивиране на клетките	66
4.2.2.	Оценка на клетъчната жизнестойност чрез Neutral red uptake тест	66
4.2.3.	Оценка на жизнестойността на клетките чрез използване на МТТ-тест 67	
IV.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ	69
1.	Моделиране на пептидни аналози/миметици на LfcinB(20-30)	71
2.	Синтез и анализ на пептидни аналози/миметици на LfcinB(20-30).....	79
2.1.	Получаване на защитени небелтъчни аминокиселини, необходими за пептидният синтез на LfcinB(20-30).....	79
2.2.	Получаване на LfcinB(20-25) аналози, модифицирани в N-края	82
3.	Определяне на хидролитична и химична стабилност на новосинтезираните олигопептидни аналози	90
4.	Микробиологично изследване на потенциална антимикробна активност на нови лактоферицинови производни.	93
4.2.	Определяне на минимална потискаща концентрация на LfcinB(20-25) аналози спрямо <i>Escherichia coli</i> – ATCC25922, <i>Staphylococcus aureus</i> – ATCC25923 и <i>Candida albicans</i> – ATCC10231.....	95
4.3.	Определяне на минимална бактерицидна и фунгицидна концентрация на лактоферицинови аналози В1÷9 спрямо <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> и <i>Candida albicans</i>	99

5.	Изпитване за цитотоксичност, антипролиферативен и потивотуморен ефект на LfcinB аналози	100
5.1.	Оценка за цитотоксичен ефект чрез Neutral Red Uptake in vitro test (NRU-анализ)	101
5.2.	Оценка за антипролиферативен ефект чрез МТТ-тест.....	102
5.3.	Индекс на селективност (SI):.....	104
6.	Връзка структура-активност	106
V.	ИЗВОДИ.....	110
VI.	ПРИНОСИ.....	112
VII.	ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	114
VIII.	НАУЧНИ ПРОЕКТИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	116

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Използвани съкращения на латиница:

ACV	Ацикловир; Aciclovir®
BLF	Говежди лактоферин
Boc	Третична бутилоксикарбонилна група
BOP	1H-бензотриазол-1-ил-N-окси-трис(диметил амино) фосфониев хексафлуорофосфат
C. albicans	Candida albicans
DCC	Дициклохексилкарбодимид
DCE	Дихлоретан
DCM	Дихлорметан
DIC	N,N'-диизопропилкарбодимид
DIPEA	Диизопропилетиламин
DMEM	Модифицирана среда Dulbecco
DMF	N-диметилформаид
DMSO	диметилсулфоксид
EARS-Net	Европейската мрежа за наблюдение на антимикробната резистентност
EtOAc	Етилацетат
EDAC	1-етил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид
EtOH	Етанол
E.coli	Escherichia coli
Fmoc	9-флуоренилметилоксикарбонил
HBTU	1,1,3,3-тетраметилурониев хексафлуорофосфат
HOBt	1-хидроксибензотриазол

HPLC	Високо ефективна течна хроматография
HSV	Herpes simplex вирусните инфекции
LF	Лактоферин
Lfcin B	Говежди лактоферицин
Lfcin H	Човешки лактоферицин
MeOH	Метанол
MRSA	Метицилин-резистентните Staphylococcus aureus
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиевбромид
PyBOP	Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate
Resin	Твърд носител – смола
RP-MPLC	Течна хроматография при средно налягане – обратна фаза
SPPS	Твърдофазен пептиден синтез
S. aureus	Staphylococcus aureus
TBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
t-Bu	Третична бутилова група
TFA	Трифлуороцетна киселина
TLC	Тънкослойна хроматография
Trp (W), Arg (R), Lys (K), Phe (F), Tyr (Y), Gln (Q), Met (M),	Аминокиселини: Триптофан, Аргинин, Лизин, Фенилаланин, Тирозин, Глутамин, Метионин

Използвани съкращения на български:

АК	Аминокиселина
АМП	Антимикробни пептиди
БАН	Българска академия на науките
ДДМ	Дисково-дифузионен метод
ИЧ	Инфрачервена спектрофотометрия
МБК	Минимална бактерицидна концентрация
МПК	Минимална потискаща концентрация

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Бактериалните инфекции представляват голяма заплаха за общественото здраве в световен мащаб. След въвеждането им през 50-те години на миналия век, антибиотиците се използват широко за лечение на микробни инфекции и усложненията от тях.

Десетилетия по-късно, голяма част от антибиотиците се предписват без достатъчно показания, без направена антибиограма или не се прилагат съгласно предписанието, което има водещо значение за развитието на резистентни бактериални щамове. Всеки патогенен микроорганизъм може да развие резистентност към прилагания антибиотик, което води до необходимостта от търсенето на нови молекули за борба с микробната лекарствена резистентност.

Антимикробните пептиди (АМП) са обещаващ клас съединения за справяне с нарастващата антибиотична резистентност. Те представляват нова алтернатива в превенцията и контрола на мултирезистентни щамове.

АМП са незаменима част от нашата (вродена и придобита) имунна система. Повечето от тях имат бактерицидно и фунгицидно действие, а в някои случаи е доказан и антивирусен и противотуморен ефект. Независимо от техния широк спектър на действие, повечето АМП показват ниска цитотоксичност срещу нормални клетки на бозайници. Високата специфичност и ниската токсичност, както и уникалният им механизъм на действие (деформиране на мембраните на патогените), са основа за непрекъснато растящия брой клинични проучвания.

Използвайки нативната структура на вече познати природни АМП, чрез химични методи, могат да се създадат техни миметици (аналози). Целта е постигане на по-висока бионаличност, стабилност, ефикасност и селективност, спрямо нативните структури.

В настоящия труд е представен синтезът, антимикробните и антипролиферативните ефекти на пептидните миметици на LfcinB(20-30) по отношение на грам-положителни и грам-отрицателни бактерии и на туморигенни и нетуморигенни човешки клетъчни линии. Използването на небелтъчни аминокиселини (АК) за изграждането на поредица от нови пептидни аналози на LfcinB(20-30) разширява концепцията за пептидомиметиците и е обещаващ подход при дизайна на потенциално по-ефективни антимикробни агенти.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Синтез на линейни катионни пептиди аналози на LfcinB(20-30) и провеждане на *in vitro* скрининг за потенциално антибактериално и/или противотуморно действие.

Въз основа на целта се поставиха следните задачи:

1. Получаване на защитени, небелтъчни аминокиселини, необходими модификанти за провеждане на последващ пептидният синтез;
2. Провеждане на твърдофазен пептиден синтез за получаване на линейни катионни пептидни аналози на LfcinB(20-30);
3. Изследване на химичната времева и рН-зависима стабилност на новосинтезираните пептидни молекули;
4. Изследване на инхибиторната активност на синтезираните пептидни миметици за потенциален антимикробен ефект, спрямо грам положителни, грам отрицателни бактериални щамове и гъбички;
5. Изследване на синтезираните LfcinB(20-30) миметици за потенциално цитотоксично действие;
6. Да се анализира приносът на направените модификации в структурата на LfcinB(20-30) и да се направи опит за извеждане на закономерност за взаимовръзка между химична структура и проявената биологична активност на синтезираните пептидните миметици.

III. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

1. МЕТОДОЛОГИЯ

1.1. Използвана апаратура

1.1.1. Апаратура за пептиден синтез

- Автоматичен пептиден синтезатор Activo P14 (Activotec, Cambridge, UK); мануален пептиден синтезатор RWTH (Aachen, Germany); електромагнитна бъркалка (MMS-3000, Boeco Germany); ротационен вакуум изпарител (Büchi, Switzerland); Водна помпа (Assistant, Germany); лиофолизатори Telstar Cryodos (Telstar Industrial S.L., Spain) и Lyovac GT2 (Leybold-Heraeus GmbH, Germany).

1.1.2. Апаратура за химически анализ

- Апарат UV-VIS (T60-UV-Visible Spectrophotometer със софтуер UVWin6 Software (PG instruments, UK); UV-Cabinet II (CAMAG, Switzerland) за UV-детекция на тънкослойни хроматограми;
- HPLC анализите извършихме на апарати Shimadzu CLASS-VP V5.032 (Genzo Shimadzu, Japan); Agilent Technologies HP 1100 (Agilent Technologies, USA) и Dionex, UltiMateR 3000 LC система (Thermo Fischer Scientific Corp. USA);
- Използвани колони и мобилни фази: Merck Millipore, Germany, ZIC® - HILIC, (100 x 4,6 mm) с мобилна фаза: 0.005 M CH₃COONH₄/ацетонитрил; Beckman Coulter USA, Beckman Ultrasphere® RP C18 (250 x 4,6 mm) с мобилна фаза: 0.01M K₂HPO₄/ацетонитрил; Waters USA, Atlantis® dC18, (4.6 x 150 mm) с мобилна фаза: ацетонитрил/0.1% мравчена киселина;

- Химическата структура беше определена чрез ESI-MS Agilent 6530 Series Q-TOF LC/MS System (Santa Clara, CA, USA);
- Течна хроматографска система за средно налягане Duramat (CfB Prominent, Germany) за пречистване на съединенията;
- Електрофоретичните анализи извършихме на апарат за капилярна електрофореза BeckmanP/ACE (Beckman Coulter Inc., Pasadena, CA, USA).

1.1.3. Апаратура за определяне на цитотоксичност

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

1.2. Използвани реактиви

Всички реактиви, използвани в експерименталната работа, са с висока степен на чистота („Analytical grade“ или „HPLC-grade“).

1.2.1. Използвани аминокиселини

N α -Fmoc-защитени АК: Fmoc-Phe(4F)-OH, Boc-D-Trp(6F)-OH, Fmoc-L-Cav(Boc)-OH, са синтезирани в Институт по молекулярна биология, „Акад. Румен Цанев“ - БАН, секция: „Молекулен дизайн и биохимична фармакология“.

N α -Fmoc-защитените АК: Fmoc-L-Phe-OH; Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-L-Lys(Boc)-OH; Fmoc-D-Tyr(Et)-OH Fmoc-L-Gln-OH; Fmoc-L-Trp(Boc)-OH; Fmoc-D-Agb(Boc,Pbf)-OH са закупени от Iris Biotech GmbH (Germany) и Merck (Germany).

1.2.2. Реагенти използвани в пептидният синтез

- **Защитни реактиви:** N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimide (Fmoc-OSu) - (Iris Biotech GmbH, Germany); Di-tert-butyl dicarbonate (Boc)₂O (Fluka; Switzerland);

- **Кондензиращи реагенти:** O-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyl uronium hexafluorophosphate (HBTU), Hydroxybenzotriazole HOBt, (Iris Biotech GmbH, Germany); O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl carbamide-tetrafluoroborate (TBTU); Benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP); Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate (PyBop) (Iris Biotech GmbH, Germany);
- **Бази:** N,N-Diisopropylethylamine DIPEA (Fluka), Et3N (Ferak), NaHCO₃, Piperidine (Merck);
- **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 (C₂H₅)₂O (Merck); Димелтилформаид (DMF) (Merck);
- **Реагенти използвани за деблокиране на АК:** 20% пиперидин (Merck); 20% Piperidin/DMF (20 mL Пиперидин в 80 mL DMF); трифлуороцента киселина (TFA) (Merck); 1,0 % TFA/DCM (0,66 mL 99% TFA в 99,34 mL DCM);
- **Смоли:** Wang смола (Wachem, Iris Biotech GmbH, Germany); 2-хлоротритил хлоридна смола (2-Chlorotritylchloride resin) (Iris Biotech GmbH, Germany); H-L-Arg(Pbf)-Chlorotritylchloride resin (Merck и Iris Biotech GmbH, Germany);
- **Хроматографски реагенти:** За анализ за определяне на химическата чистота чрез тънкослойна хроматография (TLC), използвахме алуминиеви плаки Kieselgel 60 F254 (Merck, 64271, Darmstadt, Germany) и следните подвижни фази: 1) CH₃CN:H₂O (4:1); 2) EtOAc:n-BuOH:AcOH:H₂O (2:1:1:1); 3) CHCl₃:MeOH:H₂O (80:30:5); 4) C₆H₆:CH₃COCH₃:AcOH (100:50:2); 5) EtOH:NH₃ (6:4); 6)

CHCl_3 :MeOH:AcOH (95:5:5), и следните реагенти за визуализиране:

- **Нинхидринов разтвор:** 5g нинхидрин е разтворен в 50 ml 2N CH_3COOH и 950 ml n-BuOH;
- **Хлорна среда:** к. HCl и KMnO_4 ;
- **Реактив на Райндал:** 10g N,N,N',N'-тетраметил- 4,4'-диамино дифенилметан се разтваря в 30 ml CH_3COOH , разрежда се с 600 ml вода и се прибавят 5g KI.
- Sephadex G-25f (Pharmacia Fine Chemicals AB, Sweden) използвахме за пречистване на синтезираните пептиди.

1.2.3. Буферни разтвори, използвани за анализ на хидролитична олигопептидна стабилност

Всички буферни разтвори са приготвени съгласно описаните в European Pharmacopoeia методологии:

- **Буферен разтвор с рН 2.0:** 6.57 g KCl се разтварят в 100 ml свободна от CO_2 вода. Към получения разтвор бяха прибавени 119.0 ml 0.1 mol/l HCl. Полученият разтвор се разрежда с H_2O до 1000 ml;
- **Буферен разтвор с рН 7.4:** 2.38 g Na_2HPO_4 , 0.19 g KH_2PO_4 и 8.0 g NaCl се разтварят в 250 ml дестилирана вода. Полученият разтвор се разрежда с H_2O до 1000 ml;
- **Буферен разтвор с рН 9.0:** *Разтвор I:* 6.18 g H_3BO_3 се разтварят в 0.1 mol/l KCl и се разрежда до 1000.0 ml със същия разтворител; *Разтвор II:* 0.1 mol/l NaOH. Буферният разтвор се приготвя при смесването на 1000 ml от разтвор I и 420 ml от разтвор II.

Определянето на хидролитичната стабилност е извършено в катедра по Фармацевтична химия, Факултет по фармация - гр. Варна. Изказвам благодарности на доц. Илиян Колев и гл.ас. Силвия Стамова, за безрезервната помощ!

1.2.4. Реагенти, бактериални щамове и хранителни среди за определяне на бактериална активност

1.2.4.1. Бактериални щамове

- *Escherichia coli* – ATCC25922 - (MicroSwabs[®], осигурен от Ridacom, България);
- *Staphylococcus aureus* – ATCC25923 - (MicroSwabs[®], осигурен от Ridacom, България);
- *Candida albicans* – ATCC10231 - (MicroSwabs[®], осигурен от Ridacom, България).

Изолирането, идентифицирането и определянето на антимикробна активност е извършено в Катедра по микробиология към Медицински университет – гр. Варна. *Изказвам благодарности на доц. Нели Ерменлиева и доц. Емилия Георгиева за подадената ръка и топлото отношение.*

1.2.4.2. Хранителни среди:

- Mueller Hinton Agar - хранителна среда (HiMedia[®], осигурен от Ridacom, България);
- Сабуро с декстроза (Sabouraud Dextrose агар) - хранителна среда (HiEncap[®], закупени от Ridacom, България);
- Кръвен агар - гранулирана хранителна среда (HiEncap[®], закупени от Ridacom, България);
- Мозъчно-сърдечен бульон (Brain Heart Infusion broth) - хранителна среда (HiMedia[®], осигурен от Ridacom, България);
- Агар ЕМВ, Levine – хранителна среда (осигурена от Бул-Био – НЦЗПБ ЕООД, България).

1.2.5. Реагенти, среди и клетъчни линии за *in vitro* определяне на цитотоксичност

1.2.5.1. Реагенти и среди

DMEM (Dulbecco Modified Eagle's medium) (Gibco, Austria) с добавен 10% фетален телешки серум (Gibco, Austria), 100 U/ml пеницилин (Lonza, Belgium) и 0,1 mg/ml стрептомицин (Lonza, Belgium); пластмасови фласки (Greiner, Germany); трипсин/EDTA (Flow Lab, Australia); МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромид), (Sigma Chemical Co.); L-глутамин, стерилен фосфатен буфер (PBS), етилов алкохол – 96%, метанол, изопропанол (Merk, Germany); диметилсулфоксид (DMSO), (Sigma Chemical Co.); S-буфер (1M сорбитол, 25 mM NaH₂PO₄, pH 6,5) (Sigma Chemical Co.); лизис разтвор (146 mM NaCl, 30 mM EDTA, pH 8,1 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1% N-lauroylsarcosine; pH 9) (Sigma Chemical Co.); SYBR green (Molecular Probes Inc.); Tris-borate-EDTA (TBE) буфер за 5x концентриран р-р (54 g Tris base, 27.5 g boric acid, 20 mL от 0.5 M EDTA (pH 8.0), дейонизирана вода до 1L) (Sigma Chemical Co.).

1.2.5.2. Клетъчни линии

In vitro тестове за определяне на цитотоксичност, антипролиферативен и антитуморен ефект на новосинтезираните пептиди (аналози на LfcinB), върху панел от туморни и нормални клетъчни линии. При *in vitro* експериментите бяха използвани следните нормални и туморни клетъчни линии:

- 1) BALB/c 3T3 (ATCC[®] CCL-163[™]) – миши ембрионални фибробласти;
- 2) MCF-10A (ATCC[®] CRL-10317[™]) – нетуморогенна клетъчна линия от епител на млечна жлеза;
- 3) MCF-7 (ATCC[®] HTB-22[™]) – луминален аденокарцином на млечна жлеза тип А (ER+, PR+, HER2-);

- 4) MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) – тройно негативен карцином на млечна жлеза (ER-, PR-, HER2-).

Всички използвани клетъчни линии са осигурени от колекцията от клетки, с които разполага Институтът по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ при БАН.

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

1.3. Методи за синтез и пречистване на синтезираните пептиди

1.3.1. Твърдофазен метод за пептиден синтез

Всички пептиди са синтезирани с помощта на твърдофазен пептиден синтез. SPPS включва поредица от повтарящи се реакции протичащи върху полимерен носител (смола). След прикачването на първата АК към смолата, желаната пептидна последователност се образува по линеен път от C- към N-края чрез поредица от повтарящи се цикли на $\text{N}\alpha$ -деблокиране и аминокиселинни кондензиращи (образуващи пептидни връзки) реакции (*Фигура 15*). В работата бяха използвани $\text{N}\alpha$ -Fmoc-блокирани L-аминокиселини с подходящо защитена странична функционална група. За мониторинг ефективността на свързване на аминокиселините в хода на синтеза, както и за успешната $\text{N}\alpha$ -Fmoc-депротекция беше използван Кайзер тест.

Протокол за SPPS по Fmoc – стратегия

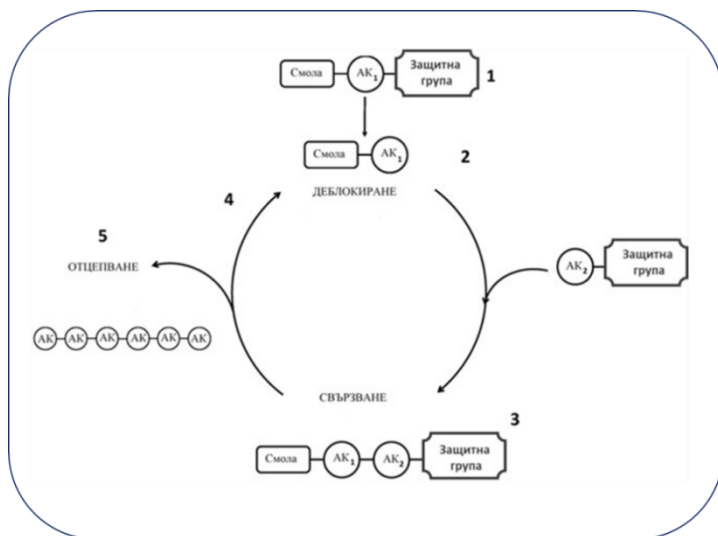
- 1) Подготовка на смолата чрез набъбване и последователно промиване в DMF (15 минути) и DCM (15 минути);
- 2) Свързване на първата активирана аминокиселина, разтворена в минимално количество DCM или DMF. Реакцията се провежда при стайна температура в продължение на около 3h интензивно разклащане; след

това се прибавя абс. MeOH, реакцията се разклаща енергично за 10 минути, с което зрънцата от смолата които не са се натоварили с АК се блокират – “capping” за последващите етапи и смолата отново се промива с DMF; след промиване на смолата се провежда Кайзер тест. При успешно кондензиране се преминава към стъпка 3;

- 3) Деблокиране на Fmoc – групата с 25% пиперидин в DMF;
- 4) Разтворът на пиперидин се отстранява с четирикратно промиване както следва: 2 x 1 минута с DMF, 2 x 1 минута с DCM, 2 x 1 минута с DMF, 2 x 1 минута с DCM. Провежда се Кайзер тест за установяване на успешното отстраняване на Fmoc – групата;
- 5) Следва кондензация на втората по ред АК. Тя протича при интензивно разклащане за 4h в присъствието на трикратен излишък от Fmoc-AA-OH, PyBOP, база DIPEA, HOBT и разтворител DMF;
- 6) След кондензация на втората аминокиселина, следва промиване на дипептид-смолата; Кайзер – тест; деблокиране на Fmoc – защитената аминокгрупа с 20% пиперидин в DMF; промиване с DMF и DCM (съгласно стъпка 4); Кайзер тест;
- 7) Преминава се към кондензация на третата по ред АК (повтарят се условията по точка 5 и 6), до получаване на желания пептид;
- 8) Пълното протичане на реакциите на отстраняване на Fmoc – групата и на реакциите на образуване на пептидната връзка се съблюдава чрез стандартен Кайзер – тест;
- 9) Отцепването на пептида от смолата и едновременното деблокиране на страничните вериги (отстраняване на Boc- и tBu-защитните групи) става чрез промиване посредством трикратно добавяне на воден разтвор на трифлуорооцетна киселина (TFA) и триизопропил силан (TIPS). Реакцията се провежда при стайна температура, като извлеченото

количество пептид се преципитира с абс. диетилов етер и филтрува на студено при около 5°C.

- 10) Полученият пептид се разтваря в минимално количество дестилирана вода и се пречиства чрез гел-филтрация върху Sephadex G-25 с елуент CH_3COOH . Филтратите се събират, лиофилизират се за около 12 часа до суха маса.



Фигура 15. Стандартна схема за провеждане на твърдофазен пептиден синтез по (De Luca et al., 2021)

Протокол за определяне на натовареността на смолата чрез Кайзер тест

Смолата се промива с DCM под вакуум. С метална шпатула се взимат зрънца от смолата и се прехвърлят в стъклена епруветка. Последователно се накапват по 4 капки (1:1:1) от *реагент А*, *реагент В* и *реагент С*, както следва:

Реагент А: 5 гр. нинхидрин разтворен в 100 мл. етанол;

Реагент В: 400 мг. фенол разтворен в 100 мл. етанол;

Реагент С: 2 мл. 0.01M KCN/100 мл. пиридин.

Епруветката се поставя за 30 секунди във вряща dH₂O. На фона на бял лист и светлина се определя оцветяването на зрънцата от смолата. Синият цвят означава наличието на свободна NH₂ група, безцветно оцветяване – наличие на Fmoc – защитна група.

Така описаният стандартен SPPS протокол беше използван като отправна схема за синтеза на целевите пептиди, като всяка група пептиди беше синтезирана с конкретни оптимизирани промени, отнасящи се до времето на реакции, използвани еквиваленти и кондензационни реагенти и избрани подходящи защитни групи.

За пречистването на крайните пептиди след приключване на SPPS от остатъчни смоли, скъсени пептиди или не напълно деблокирани пептиди, както и за анализ на пречистените пептидни фракции се използват съвременни аналитични техники.

1.3.2.Пречистване чрез колонна гел-хроматография

За обезсоляване и пречистване на синтезираните пептидите използвахме колонна гел-хроматография, чрез гел-филтрация върху Sephadex G-25 (колони 110*2.7 cm) с елуент 10% CH₃COOH при скорост на потока 10 ml/min. Във всяка отделна епруветка се събират по 5ml от елуента. Чистота на пептидните фракции се определят чрез нанасяне на проби върху хроматографска плака. Събраните чисти пептидни фракции се лиофилизират до сухо на апарат Telstar Cryodos-80 при температура -50°C и се съхраняват при -20°C.

При необходимост, пептидите се пречистваха и чрез течна колонна хроматография върху силикагел и елуент MeOH:EtOAc:H₂O (30:80:5).

1.4. Методи за оценяване на химична чистота

1.4.1.Тънкослойна хроматография

Тънкослойната хроматография е използвана с цел качествено доказване химичната чистота на пречистените пептиди. За наблюдение на тънкослойните хроматограми е използван UV-VIS (Cole Parmer, USA),

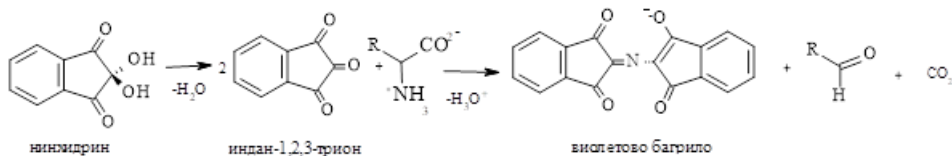
хроматографска плака DC-Kieselgel 60 F254 (Merck). Количеството на нанесената проба е 10 μ l, разстояние за развиване на хроматограмата – 10-12 cm. Използваните подвижни фази са: система СТ₁ - CHCl₃:MeOH:H₂O (80:30:5); система ВАО - C₆H₆:AcOH:CH₃COOH (100:50:2); система ВAW – n-BuOH:CH₃COOH:H₂O (4:1:5). 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 α -аминокиселини с нинхидрин се получава интензивно пурпурно-виолетово багрило (*Фигура 16*):



Фигура 16. 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. Обезцветената плака се напръсква с реактив на Райндел. Наблюдава се синьо оцветяване, което определя защитената АК (*Sinhababu et al., 2013*).

1.4.2. Високоэффективна течна хроматография (RP-HPLC)

За оценка на химичната чистота на синтезираните аминокиселини и хексапептиди е използвана Високоэффективна течна хроматография (RP-HPLC). Анализите са извършени с помощта на течни хроматографски системи - LKB Bromma (LKB-produkter AB, Sweden) и Waters Alliance (Waters Corporation, USA), снабдени с фотодиоден детектор. Използвана е хроматографска колона XTerra® MS RP-C18, с параметри - размер на частиците 3,5 μm , вътрешен диаметър 3.0 mm и дължина 150 mm.

Изследването е проведено с инжектиране на проба с обем 10 μL . 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. UV-детекцията е проведена при аналитична дължина на вълната 220 nm.

1.4.3. Капилярна електрофореза (CE)

CE е използвана за определяне чистотата на синтезираните небелтъчни АК и на избрани ологодептиди. За провеждане на анализа е използвана напълно автомазирана 3DCE система (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) снабдена с диоден детектор. Хроматографски условия: работен буфер (pH 7,4), състоящ се от 20 mM Tris (2,2'-бипиридин)рутений(II)/(2,2,2-трифлуороетил) фосфат, 5 mM H_3PO_4 , 50 mM SDS (натриев додецилсулфат); капилярна колона 40 cm x 50 μm с ефективна дължина 29 cm; приложено електрическо поле: +15 kV, 25 μA ; температура: 25°C; UV – детекция при дължина на вълната от 206 nm.

1.5. Методи за потвърждаване на структурата

1.5.1.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, вътрешен диаметър 2.1 mm и дължина от 100 mm. Хроматографски условия: система за градиентно елуиране, съставена от елуент А: H₂O + 0.1% HCOOH, елуент В: ACN/0.1% HCO₂H 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.

1.6. Метод за определяне на хидролитична и химична стабилност

1.6.1.UV-VIS спектроскопия

За контрол на Кратковременната химична и хидролитична стабилност на синтезираните LfcinB(20-30) аналози беше използвана UV-VIS спектрофотометрия. Съобразни количества от всеки пептид са прецизно претеглени с помощта на аналитична везна и разтворени в така приготвените буфери. Концентрацията на всеки образец е определена да бъде еквивалентна на 0.5×10^{-4} mol/l. Получените разтвори се темперират в термостат (модел Memmert loading models 30-1060, Atmosafe), при температура 37°C. Аликвоти от 1.0 ml от всеки разтвор се отпипетират на равни интервали от време (0, 60, 120, 180, 240, 300 и 360 min). Всички

спектри са заснети на UV-VIS спектрометър, модел T60, снабден със софтуер UVWin6. При измерването е използвана кварцова кювета с оптичен път 1.0 см. Абсорбируемостта на пробите е измерена в интервала 200÷400 nm. Анализът на хидролитичната олигопептидна стабилност е проведен в по-тесен интервал - от 240 до 280 nm.

1.7. Методи за оценка на биологична активност

1.7.1. Микробиологични методи за определяне на антимикробни ефекти спрямо бактериални и гъбични щамове

Методите които приложихме за изследване на микробна чувствителност са описаните по-долу три метода: дисково – дифузионен метод на Бауер-Кърби; метод на серийните разреждания за определяне на МПК и определяне на минимална бактерицидна концентрация. За достоверност на резултатите всички изпитвания са изпълняват в 3 повторения.

1.7.1.1. Дисково–дифузионен метод с напоени стерилни дискове на Бауер-Кърби.

Методът е разработен през 1940 г. (*Heatley, 1944*) и се използва за тестване на микробна чувствителност. Основава се на използването на постоянна концентрация на пептид (или антибиотик), натоварен в резервоар (или филтърна хартия) и поставен върху твърда хранителна среда. По наличието и ширината на чистата от бактериален растеж зона около резервоара/хартията, се определя чувствителността на изследвания микроорганизъм към дадения пептид (или антибиотик). Диаметърът на зоната е пропорционален на чувствителността на тествания микроорганизъм. Дисково-дифузионният метод (ДДМ) е предназначен за изпитване чувствителността на бързо растящи аеробни бактерии. Методът може да се прилага и за вискателни микроорганизми (*Streptococcus, Haemophilus, N. Gonorrhoeae* и др.), за които има въведени стандарти (*CLSI, n.d.; Humber et al., 1975*).

Принцип на Дисково-дифузионния метод

При ДДМ петритата с агар се инокулират със стандартизиран инокулум от изпитвания микроорганизъм. След това върху повърхността на агаровата среда се поставят дискове от филтърна хартия (около 6 mm в диаметър), напоени с разтвор (в желаната концентрация) на изпитваното съединение (пептид, антибиотик). Могат да се поставят няколко диска, всеки от който да съдържа различен антимикуробен агент. Петритата се инкубират при подходящи условия. Антимикуробният агент дифундира в агара и инхибира растежа на тестовия микроорганизъм. След това се измерват диаметрите на инхибираната зона (*Jorgensen and Ferraro, 2009*). Тъй като инхибирането на бактериалния растеж не означава бактериална смърт, този метод не може да разграничи бактерициден от бактериостатичен ефект. Освен това ДДМ не е подходящ за определяне на МПК, защото е невъзможно да се определи количеството на антимикуробния агент, дифундираше в агаровата среда. С него може да се определи приблизителна МПК, което се изчислява за някои микроорганизми и антибиотици чрез сравняване зоните на инхибиране с готови алгоритми. Когато е необходимо по-точно определяне чувствителността на антимикуробните агенти, се отчита МПК чрез методи със серийни разреждания на антибиотика в бульон или агар.

Лесното изпълнение на ДДМ, възможността за изпитване на чувствителността към относително голям брой и разнообразни антимикуробни агенти, както и ниската цена, е довела до широкото му прилагане в микробиологичните лаборатории (*Balouiri et al., 2016; Бъчварова, А. et al., 2016*).

1.7.1.2. Метод на серийните разреждания

- ***Определяне на Минимална потискаща концентрация***

Методът на серийни разреждания е най-подходящ за определяне стойностите на МПК, тъй като той предлага възможност да се определи концентрацията на тестовия антимикуробен агент в бульонна среда

(микроразреждане или макроразреждане). Методът на разреждане с бульон се използва за количествено измерване на антимикробната активност *in vitro* срещу бактерии и гъбички. Записаната стойност на МПК се определя като най-ниската концентрация на анализирания антимикробен агент, чрез която се инхибира растежът на тествания микроорганизъм и обикновено се изразява в mg/ml или mg/l.

Микро- или макроразреждането в бульон е един от най-прилаганите методи за тестване на чувствителност към антимикробни вещества. Процедурата включва приготвяне на двукратни разреждания на антимикробния агент (напр. 1, 2, 4, 8, 16 и 32 mg/ml) в течна среда за растеж. При макроразреждането се използват епруветки с минимален обем от 2 ml.

МПК представлява най-ниската концентрация на тествания антимикробен агент (пептид, антибиотик), която напълно инхибира растежа на организма в епруветките или в ямките, установена с невъоръжено око.

Известно е, че размерът на инокулума (*Gehrt et al., 1995*), видът на растежната среда (*Meletiadis et al., 2001*), времето на инкубация и методът на приготвяне на инокулума могат да повлияят на стойностите на МПК (*Gomez-Lopez et al., 2005; Rodriguez-Tudela et al., 2003*).

1.7.1.3. Определяне на Минимална бактерицидна концентрация

Определянето на минимална бактерицидна концентрация или минимална фунгицидна концентрация може да се определи с помощта на методите на разреждане в бульон. МБК се определя като най-ниската концентрация на антимикробния агент (пептид, антибиотик), необходим за унищожаване на 99,9% от крайния инокулум, след 24-часово инкубиране. МФК се дефинира също като най-ниската концентрация на лекарството, която дава 99,9% фунгициден ефект в сравнение с първоначалния инокулум (*Arikan, 2007*).

1.7.2. *In vitro* методи за оценка на цитотоксичност

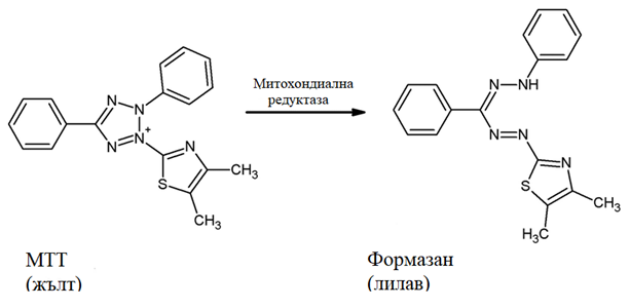
1.7.2.1. Оценка на клетъчната жизнестойност чрез Neutral red uptake тест

NRU-анализ е колориметричен метод за оценка на клетъчната жизнестойност при *in vitro* условия. Този метод се основава на способността на живите клетки да включват в лизозомите си багрилото „неутрално червено“ (3-амино-7-диметиламино-2-метилфеназин хидрохлорид) (Repetto et al., 2008). Тестът определя средните токсични концентрации (IC₅₀ стойностите) на изследваните вещества, чрез които може да се направи първоначална оценка на възможната токсичност на веществото. Тя представлява реална основа за изчисляване на стартовата концентрация за извършване на допълнителни *in vitro* анализи и определяне първоначалната доза при *in vivo* токсикологични експерименти с животни.

1.7.2.2. Оценка на виталността на клетките чрез използване на МТТ-тест

МТТ-тестът е най-често използваният метод за оценка на клетъчна жизнестойност 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 през 1983г. от Mossmann (Mossmann, 1983). Представлява колориметричен метод. Основава се на редуцията на жълтата тетразолиево сол - МТТ (4,5-диметилтиазол-2-)-2,5-дифенил тетразолиев бромид) до водонеразтворими виолетови формазанови кристали, което се осъществява под действие на митохондриалните редуктази (Фигура 17). Образуването на виолетови кристали е правопрпорционално на активността на митохондриалните ензими и съответства на броя на жизнестойните клетки.



Фигура 17. Превръщане на МТТ във формазанови кристали (*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 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 анализа, се изразява като процент жизнеспособност на клетките, съгласно следното уравнение:

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

2. СИНТЕТИЧНИ ПРОЦЕДУРИ

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

2.1.1. Получаване на *N*-**α**-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*p*-fluoro-L-phenylalanine, Fmoc-L-Phe(*p*-F)-OH

Таблица 5А. Стехиометрични изчисления за получаване на Fmoc-L-Phe(*p*-F)-OH

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

А: 1,00 g от АК (L-Phe(*p*-F)-OH) се разтваря в 9,12 ml вода, а 2,025 g Fmoc-OSu в 15,82 ml C₃H₆O (ацетон). В облодънна колба се смесват двата разтвора. С цел алкализирание на сместа и достигане на pH 8÷8,5, се добавя Et₃N. Разбърква се с електромагнитна бъркалка в продължение на 2 часа. Чрез TLC се определя пълното протичане на реакцията. Следва изпаряване на ротационен вакуум изпарител. Разтворът се подкислява с 1,5 N HCl (36,49 ml) до достигане на pH 2÷2,5. Резултатната смес се поставя в делителна фуния и се екстрахира четири пъти с EtOAc. Полученият екстракт се промива (с воден разтвор на NaCl), суши (с Na₂SO₄) и се филтрува (през нагънат филтър). Чрез ротационен вакуум изпарител, използваният разтворител (EtOAc) се изпарява до сухо. Получават се кристали, които се разтварят в DCM. Прибавя се петролев етер към разтвора, след което защитената АК изкрystalизира. Получената кристална маса се филтрува под вакуум на шотов филтър и се промива. Суши се в ексикатор за 30 мин, след което се претегля. Добив: 1,97g (89%)

Таблица 5В. Стехиометрични изчисления за получаване на Fmoc-L-Phe(p-F)-OH

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

В: В облодънна колба се разтваря 1,83 g АК (L-Phe(p-F)-OH) в 9 ml H₂O. Към получения разтвор се прибавят изчислените количества NaHCO₃ и Fmoc-OSu, разтворен в ацетон (**Таблица 5В**). Следи се стойността на рН да е 8÷8,5. Разбърква се чрез електромагнитна бъркалка в продължение на 2 h. Чрез TLC се определя пълното протичане на реакцията. Следва изпаряване на ротационен вакуум изпарител. Разтворът се подкислява с 1,5 N HCl (36,49 ml) до достигане на рН 2÷2,5. Резултатната смес се поставя в делителна фуния и се екстрахира два пъти с EtOAc. Полученият екстракт се промива (с воден разтвор на NaCl), суши (с Na₂SO₄) и се филтрува (през нагънат филтър). Чрез ротационен вакуум изпарител, използваният разтворител (EtOAc) се изпарява до сухо. Получават се кристали, които се разтварят в DCM. Прибавя се петролев етер към разтвора, след което защитената АК изкрystalизира. Получената кристална маса се филтрува под вакуум на шотов филтър и се промива. Суши се в ексикатор за 30 мин, след което се претегля. Добив: 3,69g (91%).

2.1.2. Получаване на α -9-Fluorenylmethyloxycarbonyl, N^G-ter-butylxy carbonyl-canavanine, Fmoc-L-Cav(Boc)-OH

Получаването на защитени АК се извършва в два етапа по метод описан от Пайпанова и съавт. през 1997г. (*Paipanova et al., 1997*). В първият етап от синтеза се защитава α -аминогрупата с базично лабилната Fmoc-група до получаване на α -9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-canavanine.

Във вторият етап се защитава страничната аминогрупа в гуанидиновата функционална група до получаване на *N* α -9-Fluorenylmethyloxycarbonyl, *N*^G-*ter*-butyloxycarbonyl-canavanine.

От получения в първия етап *Fmoc-L-Cav-OH* се претеглят 1,19 g (3mmol) и се разтварят в 10 ml 10% воден разтвор на Na_2CO_3 . При разбъркване се добавя разтвор на $(\text{Voc})_2\text{O}$ (0,86g, 4mmol в 10 ml диоксан). Реакционно време за протичане на процеса - 3 часа на електромагнитна бъркалка. Органичните разтворители се отстраняват чрез вакуум изпарител. Разтворът се подкислява с 1 N HCl до достигане на pH 2÷3 и се екстрахира с AcOEt (4 x 20ml). След екстракцията, разтворът се неутрализира до pH 7 с 5% NaHCO_3 . Разтворът се концентрира до обем около 10ml, добавя се топла вода и защитената АК рекристализира. Филтрува се и се суши над P_2O_5 . Добив: 0,82 g (91%).

2.1.3. Получаване на *N* α -*ter*-Butyloxycarbonyl -6-fluoro-D-Tryptophan, Voc-D-Trp(6F)-OH

Получаването на *Voc-D-Trp-OH* се извършва в един етап, като *N* α -аминогрупата се защитава с киселинно лабилната *Voc*-защитна група по метода описан подробно по-горе в т. 2.1.2.

2.2. Твърдофазен пептиден синтез на LfcinB(20-25) пептидни аналози

Пептидният синтез на LfcinB(20-30) аналози осъществихме по твърдофазния метод за пептиден синтез, използвайки *Fmoc/tBu*-стратегия за изграждането на пептидната верига. Последната включва използването на 2-хлоротритил хлоридна смола (2, α -dichlorobenzhydryl-polystyrene) омрежена с 1% дивинилбензен (DVB) с натоварване 1.4mmol/g. Синтезът се провежда в полипропиленов реакционен съд върху механична клатачка. Последователното свързване на всяка аминокиселина е извършено в присъствието на 2mol излишък на *Fmoc-AA*, 1mol *HOBT* (1*H*-Benzotriazole-1-ol), 1mol *PyBOP* (benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate) и 2mol излишък от

N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA) в Dimethylformamide (DMF). Приключването на всеки един етап от присъединяването на АК се следи с помощта на Kaiser-тест. Fmoc групата се отцепва чрез добавяне на 20% пиперидин в DMF. Основни етапи на SPPS:

- *Подготовка на смолата*

Оставихме 2-хлоротритил хлоридната смола (с натоварване 1,4 mmol/g) да набъбне в DMF или DCM за 30 min, след което я промихмe с DMF и DCM. След това пристъпихме към кондензация на първата АК (Аргинин, Arg, R).

- *Свързване на първата аминокиселина към смолата*

Първата аминокиселина (Arg) се разтваря в минимално количество DCM (10ml). Ако АК не се разтваря напълно в DCM, се прибавя и малко количество DMF и прибавя съответното количество кондензиращата база (DIPEA). Разтворът се добавя към набъбналата смола. Реакционният съд се разклаща енергично на клатачна машина в продължение на 3 h. След това това, реакционната смес се филтрува под вакуум и към смолата се прибавя абс. MeOH. Реакцията се разклаща енергично за още 10 min, с което зрънцата от смолата които не са се натоварили с АК се блокират “capping” за последващите етапи. Смолата се промива последователно с DMF, DCM и MeOH, изсушава се добре и се определя натоварването ѝ.

- *Деблокиране на Fmoc-групата*

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

- *Кондензация на следващата по ред аминокиселина*

Към промитата пептидил-смола се прибавя втората АК (Триптофан, Trp, W) и кондензиращите реагенти – PyBop в присъствието на НОВТ, разтворени в минимално количество DMF и DCM. Добавя се база DIPEA и реакционният съд се разклаща на клатачна машина в продължение на 90 минути.

Ходът на куплунг-реакцията се контролира чрез Кайзер-тест.

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

- *Деблокиране и кондензация*

След кондензация на втората АК (Tgr), следва промиване на пептидил-смолата и снемане на защитата на NH₂ – групата по описания по-горе начин. Стъпките на кондензация и деблокиране се повтарят за всяка следваща Fmoc-AK до получаване на необходимата пептидна последователност.

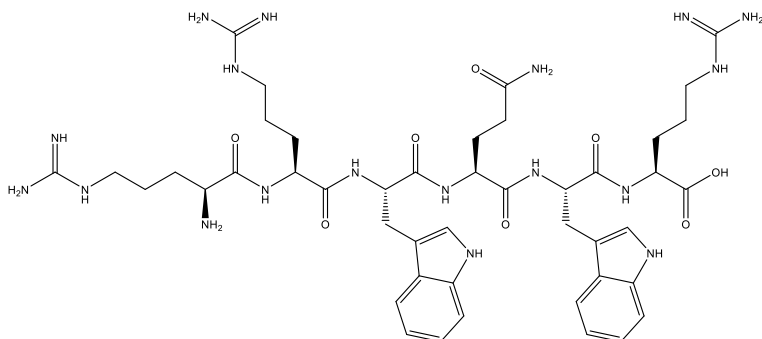
- *Отцепване на пептида от смолата и деблокиране на страничните групи*

След приключване на синтеза следва ацидолитично отцепване на пептида от смолата и крайно деблокиране на всички останали защитни групи (Boc-, Tgt-, tBu-). В случаите, когато крайната защита е Boc-група, ацидолитичното отцепване на пептида от смолата и крайното деблокиране на всички останали защитни групи (Boc-, Tgt-, tBu-) става едновременно, чрез трикратно добавяне на разтвор, съдържащ TFA и „скевинджъри“ в следните количествени съотношения: TFA (16.5 ml); фенол (1 g); H₂O (1 ml) и тиоанизол (1 ml). След всяко добавяне на деблокиращите реагенти, реакционният съд се разклаща за 30 минути и извлеченото количество пептид се филтрува на студено. Трите филтратата се събират в облодънна колба, изпаряват се до сухо на ротационен вакуум изпарител и преципитират след добавяне на петролев етер/диизопропилов етер (50:50). В случаите, когато крайната защита е

Фмос-група, първо трябва да се деблокира и отсрани защитната група с 20% Piperidine/DMF и след това да се отдели пептида от смолата и да се отстранят страничните защитни групи.

2.2.1. Заместване на природните базични (Arg с Lys) и ароматните (Trp с Phe) аминокиселини

2.2.1.1. Синтез на нативната последователност Fmoc-Arg²⁰-Arg²¹-Trp²²-Gln²³-Trp²⁴-Arg²⁵-2-CTR (LfcinB1) (Фигура 18)



Фигура 18. Структурна формула на Arg²⁰-Arg²¹-Trp²²-Gln²³-Trp²⁴-Arg²⁵ (LfcinB1)

Таблица 6. Стехиометрични изчисления за получаване на LfcinB1

	M, g/mol	n, mmol	m, g	V, ml	Eq.	ρ, g/cm ³
Fmoc-L-Arg(Pbf)-2-Chlorotriyl chloride resin	-	0,60	1,0	-		-
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH	526,60	1,2	0,632	-	2	-
Fmoc-L-Gln-OH	368,39	1,2	0,442	-	2	-
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH	526,60	1,2	0,632	-	2	-
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	648,77	1,2	0,778	-	2	-
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	648,77	1,2	0,778	-	2	-
HOBT	135,13	1,2	0,162	-	2	-
PyBOP	520,39	1,2	0,624	-	2	-
DIPEA	129,25	2,4	0,311	0,412	4	0,755

- При синтеза на LfcinB1, използвахме 2-хлоротритил хлоридна смола с прикачена към нея първа аминокиселина: Към 1,0g (0,60 mmol) вече набъбнала **Fmoc-L-Arg(Pbf)-2-CTR** се прибавя втората аминокиселина **Fmoc-L-Trp(Boc)-OH** в количество 0,632g (1,2 mmol), която е предварително разтворена в минимално количество DCM (1-2 ml).
- Добавят се кондензиращите агенти HOBt (0,162g) и PyBOP (0,624g) – *in situ* активиране.
- В реакционния съд се добавя и 0,412 ml DIPEA (2,4 mmol).
- Реакционната смес се разклаща на клатачна машина в продължение на 90 минути.
- След всяко свързване, пептидил-смолата се промива последователно с DCM (5 x 2 min), следвано от DCM/MeOH (1:1) (2 x 2 min), MeOH (3 x 2 min) и DMF (2 x 2 min).
- Деблокирането на Fmoc-групата се извършва чрез двукратно добавяне на 20% пиперидин в DMF: Първо се добавят 5 ml 20% пиперидин в DMF и се разклаща 5 мин. на клатачна машина, след което се добавят нови 5 ml 20% пиперидин в DMF и се клати 20 мин.
- След деблокиране на Fmoc-групата, смолата се промива последователно с DMF, DMF/DCM (1:1) и DCM (5 ml) и се пристъпва към кондензация на следващата АК.
- В отделен съд, в 1-2 ml DCM се разтварят 0,442g (1,2 mmol) **Fmoc-L-Gln-OH**. Към него се добавят и кондензиращите реагенти HOBt 0,162g и PyBOP 0,624g. Всичко това се добавя към реакционната смес, след което се слага и 0,412ml DIPEA (2,4 mmol) и се разклаща на клатачна машина в продължение на 90 минути.
- Стъпките се повтарят при присъединяване на всяка следваща АК (**Таблица 6**), както следва:
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH в количество от 0,632 g (1,2 mmol)

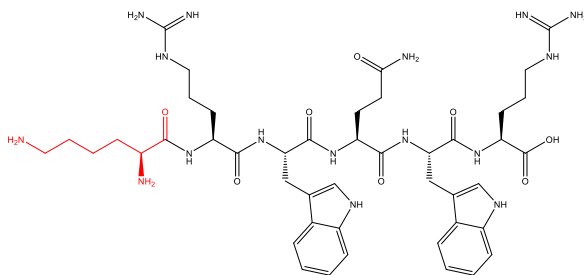
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH в количество от 0,778 g (1,2 mmol)

Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH в количество от 0,778 g (1,2 mmol)

- Посредством Кайзер-тест се следи степента на протичане на реакцията.
- Чрез трикратно прибавяне на 16.5 ml TFA; 1 g фенол; 1 ml H₂O и 1 ml тиоанизол, пептидът се отцепва от смолата и се отстраняват всички останали защитни групи. Реакцията на деблокиране протича за 30 мин при непрекъснато разбъркване на клатачна машина. Полученото количество пептид се филтрува на студено. В облодънна колба се събират трите филтрата и се изпаряват до сухо на ротационен вакуум изпарител. След преципитиране с охладен диетилов етер, пептида се изолира, пречиства (гел-филтрация) и лиофилизира. Добив: 66% (Mw: 987.54).

2.2.1.2. Синтез на пептиден аналог **Fmoc-Lys²⁰-Arg²¹-Trp²²-Gln²³-Trp²⁴-Arg²⁵-2-CTR (LfcinB2)**

LfcinB2 е синтетичен аналог на нативния фрагмент LfcinB20-25, при който в 1-ва позиция е направена замяна на Arg с базичната аминокиселина Lys (**Фигура 19**).



Фигура 19. Замяна на Arg с Lys в първа позиция от молекулата на LfcinB(20-25)

Таблица 7. Стехиометрични изчисления за получаване на **LfcinB2**

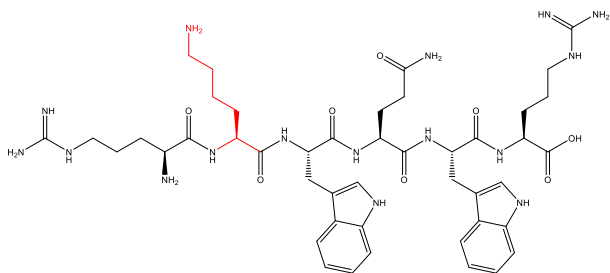
	M, g/mol	n, mmol	m, g	V, ml	Eq.	ρ , g/cm ³
Fmoc-L-Arg(Pbf)-2-Chlorotriyl chloride resin	-	0,60	1,0	-		-
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH	526,60	1,2	0,632	-	2	-
Fmoc-L-Gln-OH	368,39	1,2	0,442	-	2	-
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH	526,60	1,2	0,632	-	2	-
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	648,77	1,2	0,778	-	2	-
Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	468,54	1,2	0,562	-	2	-
HOBT	135,13	1,2	0,162	-	2	-
PyBOP	520,39	1,2	0,624	-	2	-
DIPEA	129,25	2,4	0,311	0,412	4	0,755

- При синтеза на LfcinB2, използвахме 2-хлоротритил хлоридна смола с прикачена към нея първа аминокиселина: Към 1,0g (0,60 mmol) вече набъбнала **Fmoc-L-Arg(Pbf)-2-CTR** се прибавя втората аминокиселина **Fmoc-L-Trp(Boc)-OH** в количество 0,632g (1,2 mmol), която е предварително разтворена в минимално количество DCM (1-2 ml).
- Добавят се кондензиращите агенти HOBT (0,162g) и PyBOP (0,624g) – *in situ* активирани.
- В реакционния съд се добавя и 0,412 ml DIPEA (2,4 mmol).
- Реакционната смес се разклаща на клатачна машина в продължение на 90 минути.
- След всяко свързване, пептидил-смолата се промива последователно с DCM (5 x 2 min), следвано от DCM/MeOH (1:1) (2 x 2 min), MeOH (3 x 2 min) и DMF (2 x 2 min).
- Деблокирането на Fmoc-групата се извършва чрез двукратно добавяне на 20% пиперидин в DMF: Първо се добавят 5 ml 20% пиперидин в DMF и се разклаща 5 мин. на клатачна машина, след което се добавят нови 5 ml 20% пиперидин в DMF и се клати 20 мин.

- След деблокиране на Fmoc-групата, смолата се промива последователно с DMF, DMF/DCM (1:1) и DCM (5 ml) и се пристъпва към кондензация на следващата АК.
- В отделен съд, в 1-2 ml DCM се разтварят 0,442g (1,2 mmol) **Fmoc-L-Gln-OH**. Към него се добавят и кондензиращите реагенти HOBT 0,162g и PyBOP 0,624g. Всичко това се добавя към реакционната смес, след което се слага и 0,412ml DIPEA (2,4 mmol) и се разклаща на клатачна машина в продължение на 90 минути.
- Стъпките се повтарят при присъединяване на всяка следваща АК (*Таблица 7*), както следва:
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH в количество от 0,632 g (1,2 mmol)
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH в количество от 0,778 g (1,2 mmol)
Fmoc-L-Lys(Boc)-OH в количество от 0,562 g (1,2 mmol)
- Посредством Кайзер-тест се следи степента на протичане на реакцията.
- Чрез трикратно прибавяне на 16.5 ml TFA; 1 g фенол; 1 ml H₂O и 1 ml тиоанизол, пептидът се отцепва от смолата и се отстраняват всички останали защитни групи. Реакцията на деблокиране протича за 30 мин при непрекъснато разбъркване на клатачна машина. Полученото количество пептид се филтрува на студено. В облодънна колба се събират трите филтратата и се изпаряват до сухо на ротационен вакуум изпарител. След преципитиране с охладен диетилов етер, пептида се изолира, пречиства (гел-филтрация) и лиофилизира. Добив: 75% (Mw: 959.53).

2.2.1.3. Синтез на хексапептида **Fmoc-Arg²⁰-Lys²¹-Trp²²-Gln²³-Trp²⁴-Arg²⁵-2- CTR (LfcinB3)**

LfcinB3 е аналог на нативния фрагмент LfcinB(20-25), при който в 2-ра позиция е направена замяна на Arg с базичната аминокиселина Lys (*Фигура 20*).



Фигура 20. Замяна на Arg с Lys във втора позиция от молекулата на LfcinB(20-25)

Таблица 8. Стехиометрични изчисления за получаване на **LfcinB3**

	M, g/mol	n, mmol	m, g	V, ml	Eq.	ρ , g/cm ³
Fmoc-L-Arg(Pbf)-2-Chlorotriyl chloride resin	-	0,60	1,0	-		-
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH	526,60	1,2	0,632	-	2	-
Fmoc-L-Gln-OH	368,39	1,2	0,442	-	2	-
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH	526,60	1,2	0,632	-	2	-
Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	468,54	1,2	0,562	-	2	-
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	648,77	1,2	0,778	-	2	-
HOBT	135,13	1,2	0,162	-	2	-
PyBOP	520,39	1,2	0,624	-	2	-
DIPEA	129,25	2,4	0,311	0,412	4	0,755

• При синтеза на LfcinB3, използвахме 2-хлоротритил хлоридна смола с прикачена към нея първа аминокиселина: Към 1,0g (0,60 mmol) вече набъбнала Fmoc-L-Arg(Pbf)-2-CTR се прибавя втората аминокиселина Fmoc-L-Trp(Boc)-OH в количество 0,632g (1,2 mmol), която е предварително разтворена в минимално количество DCM (1-2 ml).

• Добавят се кондензиращите агенти HOBT (0,162g) и PyBOP (0,624g) – *in situ* активиране.

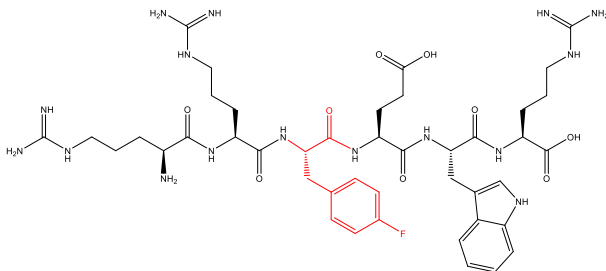
- В реакционния съд се добавя и 0,412 ml DIPEA (2,4 mmol).
- Реакционната смес се разклаща на клатачна машина в продължение на 90 минути.
- След всяко свързване, пептидил-смолата се промива последователно с DCM (5 x 2 min), следвано от DCM/MeOH (1:1) (2 x 2 min), MeOH (3 x 2 min) и DMF (2 x 2 min).
- Деблокирането на Fmoc-групата се извършва чрез двукратно добавяне на 20% пиперидин в DMF: Първо се добавят 5 ml 20% пиперидин в DMF и се разклаща 5 мин. на клатачна машина, след което се добавят нови 5 ml 20% пиперидин в DMF и се клати 20 мин.
- След деблокиране на Fmoc-групата, смолата се промива последователно с DMF, DMF/DCM (1:1) и DCM (5 ml) и се пристъпва към кондензация на следващата АК.
- В отделен съд, в 1-2 ml DCM се разтварят 0,442g (1,2 mmol) Fmoc-L-Gln-OH. Към него се добавят и кондензиращите реагенти HOBT 0,162g и PyBOP 0,624g. Всичко това се добавя към реакционната смес, след което се слага и 0,412ml DIPEA (2,4 mmol) и се разклаща на клатачна машина в продължение на 90 минути.
- Стъпките се повтарят при присъединяване на всяка следваща АК (*Таблица 8*), както следва:
 - Fmoc-L-Trp(Boc)-OH в количество от 0,632 g (1,2 mmol)
 - Fmoc-L-Lys(Boc)-OH в количество от 0,562 g (1,2 mmol)
 - Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH в количество от 0,778 g (1,2 mmol)
- Посредством Кайзер-тест се следи степента на протичане на реакцията.
- Чрез трикратно прибавяне на 16.5 ml TFA; 1 g фенол; 1 ml H₂O и 1 ml тиоанизол, пептидът се отцепва от смолата и се отстраняват всички останали защитни групи. Реакцията на деблокиране протича за 30 мин при непрекъснато разбъркване на клатачна машина. Полученото количество пептид се филтрува на студено. В облодънна колба се събират трите филтрата и се изпаряват до сухо на ротационен вакуум изпарител. След преципитиране с охладен диетилов етер, пептида се

изолира, пречиства (гел-филтрация) и лиофилизира. Добив: 60% (Mw: 959.53).

2.2.2. Пептидни миметици, съдържащи небелтъчни аминокиселини

2.2.2.1. Синтез на хексапептида Fmoc-Arg²⁰-Arg²¹-Phe(4F)²²-Gln²³-Trp²⁴-Arg²⁵-2-CTR (LfcinB5)

Създадохме пептиден миметик на LfrinB (20-25), модифициран с непротеиногена аминокиселина. За промените в N-края на нативната молекула, избрахме замяната на триптофановия остатък в 3-та позиция (*Фигура 21*) с неговите синтетичен аналог Fmoc-L-Phe(4F)-OH.



Фигура 21. Замяна на Trp с Phe(4F) в трета позиция от молекулата на LfcinB(20-25)

Таблица 9. Стехиометрични изчисления за получаване на LfcinB5

	M, g/mol	n, mmol	m, g	V, ml	Eq.	ρ , g/cm ³
Fmoc-L-Arg(Pbf)-2-Chlorotriyl chloride resin	-	0,60	1,0	-		-
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH	526,60	1,2	0,632	-	2	-
Fmoc-L-Gln-OH	368,39	1,2	0,442	-	2	-
Fmoc-L-Phe(4F)-OH	405,42	1,2	0,486	-	2	-
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	648,77	1,2	0,778	-	2	-
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	648,77	1,2	0,778	-	2	-
HOBT	135,13	1,2	0,162	-	2	-
PyBOP	520,39	1,2	0,624	-	2	-
DIPEA	129,25	2,4	0,311	0,412	4	0,755

• При синтеза на LfcinB5, използвахме 2-хлоротритил хлоридна смола с прикачена към нея първа аминокиселина: Към 1,0g (0,60 mmol) вече набъбнала Fmoc-L-Arg(Pbf)-2-CTR се прибавя втората аминокиселина Fmoc-L-Trp(Boc)-OH в количество 0,632g (1,2 mmol), която е предварително разтворена в минимално количество DCM (1-2 ml).

• Добавят се кондензиращите агенти HOBT (0,162g) и PyBOP (0,624g) – *in situ* активирани.

• В реакционния съд се добавя и 0,412 ml DIPEA (2,4 mmol).

• Реакционната смес се разклаща на клатачна машина в продължение на 90 минути.

• След всяко свързване, пептидил-смолата се промива последователно с DCM (5 x 2 min), следвано от DCM/MeOH (1:1) (2 x 2 min), MeOH (3 x 2 min) и DMF (2 x 2 min).

• Деблокирането на Fmoc-групата се извършва чрез двукратно добавяне на 20% пиперидин в DMF: Първо се добавят 5 ml 20% пиперидин в DMF и се разклаща 5 мин. на клатачна машина, след което се добавят нови 5 ml 20% пиперидин в DMF и се клати 20 мин.

- След деблокиране на Fmoc-групата, смолата се промива последователно с DMF, DMF/DCM (1:1) и DCM (5 ml) и се пристъпва към кондензация на следващата АК.

- В отделен съд, в 1-2 ml DCM се разтварят 0,442g (1,2 mmol) Fmoc-L-Gln-OH. Към него се добавят и кондензиращите реагенти HOBt 0,162g и PyBOP 0,624g. Всичко това се добавя към реакционната смес, след което се слага и 0,412ml DIPEA (2,4 mmol) и се разклаща на клатачна машина в продължение на 90 минути.

- Стъпките се повтарят при присъединяване на всяка следваща АК (*Таблица 9*), както следва:

Fmoc-L-Phe(4F)-OH в количество от 0,486 g (1,2 mmol)

Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH в количество от 0,778 g (1,2 mmol)

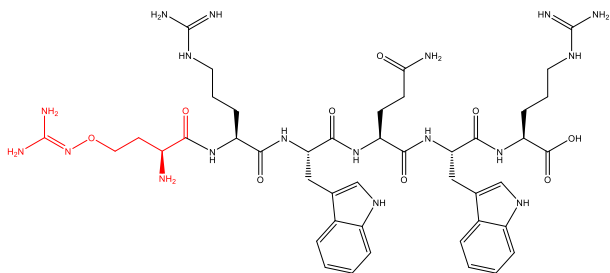
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH в количество от 0,778 g (1,2 mmol)

- Посредством Кайзер-тест се следи степента на протичане на реакцията.

- Чрез трикратно прибавяне на 16.5 ml TFA; 1 g фенол; 1 ml H₂O и 1 ml тиоанизол, пептидът се отцепва от смолата и се отстраняват всички останали защитни групи. Реакцията на деблокиране протича за 30 мин при непрекъснато разбъркване на клатачна машина. Полученото количество пептид се филтрува на студено. В облодънна колба се събират трите филтрата и се изпаряват до сухо на ротационен вакуум изпарител. След преципитиране с охладен диетилов етер, пептида се изолира, пречиства (гел-филтрация) и лиофилизира. Добив: 59% (Mw: 965.52).

2.2.2.2. Синтезиране на хексапептида Fmoc-Cav²⁰-Arg²¹-Trp²²-Gln²³-Trp²⁴-Arg²⁵-2-CTR (LfcinB8)

LfcinB8 е аналог на нативния фрагмент LfcinB(20-25), при който в 1-ва позиция е направена замяна на Arg с неговия небелтъчен аналог Cav (*Фигура 22*).



Фигура 22. Замяната на Arg с Cav на първа позиция от молекулата на LfcinB(20-25)

Таблица 10. Стехиометрични изчисления за получаване на LfcinB8

	M, g/mol	n, mmol	m, g	V, ml	Eq.	ρ , g/cm ³
Fmoc-L-Arg(Pbf)-2-Chlorotriyl chloride resin	-	0,60	1,0	-		-
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH	526,60	1,2	0,632	-	2	-
Fmoc-L-Gln-OH	368,39	1,2	0,442	-	2	-
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH	526,60	1,2	0,632	-	2	-
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	648,77	1,2	0,778	-	2	-
Fmoc-L-Cav(Boc)-OH	498,53	1,2	0,598	-	2	-
HOBT	135,13	1,2	0,162	-	2	-
PyBOP	520,39	1,2	0,624	-	2	-
DIPEA	129,25	2,4	0,311	0,412	4	0,755

• При синтеза на LfcinB8, използвахме 2-хлоротритил хлоридна смола с прикачена към нея първа аминокиселина: Към 1,0g (0,60 mmol) вече набъбнала Fmoc-L-Arg(Pbf)-2-CTR се прибавя втората аминокиселина Fmoc-L-Trp(Boc)-OH в количество 0,632g (1,2 mmol), която е предварително разтворена в минимално количество DCM (1-2 ml).

• Добавят се кондензиращите агенти HOBT (0,162g) и PyBOP (0,624g) – *in situ* активиране.

• В реакционния съд се добавя и 0,412 ml DIPEA (2,4 mmol).

- Реакционната смес се разклаща на клатачна машина в продължение на 90 минути.

- След всяко свързване, пептидил-смолата се промива последователно с DCM (5 x 2 min), следвано от DCM/MeOH (1:1) (2 x 2 min), MeOH (3 x 2 min) и DMF (2 x 2 min).

- Деблокирането на Fmoc-групата се извършва чрез двукратно добавяне на 20% пиперидин в DMF: Първо се добавят 5 ml 20% пиперидин в DMF и се разклаща 5 мин. на клатачна машина, след което се добавят нови 5 ml 20% пиперидин в DMF и се клати 20 мин.

- След деблокиране на Fmoc-групата, смолата се промива последователно с DMF, DMF/DCM (1:1) и DCM (5 ml) и се пристъпва към кондензация на следващата АК.

- В отделен съд, в 1-2 ml DCM се разтварят 0,442g (1,2 mmol) Fmoc-L-Gln-OH. Към него се добавят и кондензиращите реагенти HOBt 0,162g и PyBOP 0,624g. Всичко това се добавя към реакционната смес, след което се слага и 0,412ml DIPEA (2,4 mmol) и се разклаща на клатачна машина в продължение на 90 минути.

- Стъпките се повтарят при присъединяване на всяка следваща АК (*Таблица 10*), както следва:

- Fmoc-L-Trp(Вос)-OH в количество от 0,632 g (1,2 mmol)

- Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH в количество от 0,778 g (1,2 mmol)

- Fmoc-L-Cav(Вос)-OH в количество от 0,598 g (1,2 mmol)

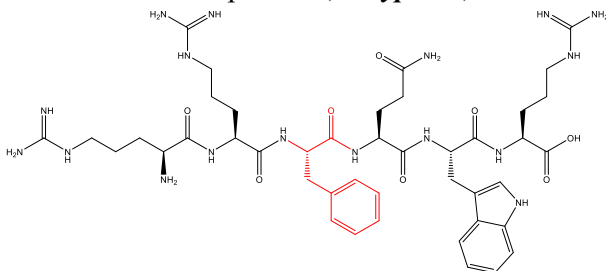
- Посредством Кайзер-тест се следи степента на протичане на реакцията.

- Чрез трикратно прибавяне на 16.5 ml TFA; 1 g фенол; 1 ml H₂O и 1 ml тиоанизол, пептидът се отцепва от смолата и се отстраняват всички останали защитни групи. Реакцията на деблокиране протича за 30 мин при непрекъснато разбъркване на клатачна машина. Полученото количество пептид се филтрува на студено. В облудънна колба се събират трите филтрата и се изпаряват до сухо на ротационен вакуум изпарител. След преципитиране с охладен диетилов етер, пептида се изолира, пречиства (гел-филтрация) и лиофилизира. Добив: 56% (Mw: 988.59).

2.2.3. Пептидни миметици, съдържащи D-аминокиселини

2.2.3.1. Синтез на олигопептида последователност D-Arg²⁰-Arg²¹-Phe²²-Gln²³-Trp²⁴-Arg²⁵-2-CTR (LfcinB4)

LfcinB4 е аналог на нативния фрагмент LfcinB(20-25), при който в първа позиция L-Arg е заместен с неговия енантиомер **D-Arg**, а в 3-та позиция е направена замяна на Trp с Phe (**Фигура 23**).



Фигура 23. Замяна на Trp с **Phe** в трета позиция от молекулата на LfcinB(20-25)

Таблица 11. Стехиометрични изчисления за получаване на **LfcinB4**

	M, g/mol	n, mmol	m, g	V, ml	Eq.	ρ, g/cm ³
Fmoc-L-Arg(Pbf)-2-Chlorotryl chloride resin	-	0,60	1,0	-	-	-
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH	526,60	1,2	0,632	-	2	-
Fmoc-L-Gln-OH	368,39	1,2	0,442	-	2	-
Fmoc-L-Phe-OH	387,43	1,2	0,465	-	2	-
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	648,77	1,2	0,778	-	2	-
Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH	648,77	1,2	0,778	-	2	-
HOBT	135,13	1,2	0,162	-	2	-
PyBOP	520,39	1,2	0,624	-	2	-
DIPEA	129,25	2,4	0,311	0,412	4	0,755

• При синтеза на LfcinB4, използвахме 2-хлоротритил хлоридна смола с прикачена към нея първа аминокиселина: Към 1,0g (0,60 mmol)

вече набъбнала Fmoc-L-Arg(Pbf)-2-CTR се прибавя втората аминокиселина Fmoc-L-Trp(Boc)-OH в количество 0,632g (1,2 mmol), която е предварително разтворена в минимално количество DCM (1-2 ml).

- Добавят се кондензиращите агенти HOBt (0,162g) и PyBOP (0,624g) – *in situ* активиране.

- В реакционния съд се добавя и 0,412 ml DIPEA (2,4 mmol).

- Реакционната смес се разклаща на клатачна машина в продължение на 90 минути.

- След всяко свързване, пептидил-смолата се промива последователно с DCM (5 x 2 min), следвано от DCM/MeOH (1:1) (2 x 2 min), MeOH (3 x 2 min) и DMF (2 x 2 min).

- Деблокирането на Fmoc-групата се извършва чрез двукратно добавяне на 20% пиперидин в DMF: Първо се добавят 5 ml 20% пиперидин в DMF и се разклаща 5 мин. на клатачна машина, след което се добавят нови 5 ml 20% пиперидин в DMF и се клати 20 мин.

- След деблокиране на Fmoc-групата, смолата се промива последователно с DMF, DMF/DCM (1:1) и DCM (5 ml) и се пристъпва към кондензация на следващата АК.

- В отделен съд, в 1-2 ml DCM се разтварят 0,442g (1,2 mmol) Fmoc-L-Gln-OH. Към него се добавят и кондензиращите реагенти HOBt 0,162g и PyBOP 0,624g. Всичко това се добавя към реакционната смес, след което се слага и 0,412ml DIPEA (2,4 mmol) и се разклаща на клатачна машина в продължение на 90 минути.

- Стъпките се повтарят при присъединяване на всяка следваща АК (*Таблица 11*), както следва:

- Fmoc-L-Phe-OH в количество от 0,465 g (1,2 mmol)

- Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH в количество от 0,778 g (1,2 mmol)

- Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH в количество от 0,778 g (1,2 mmol)

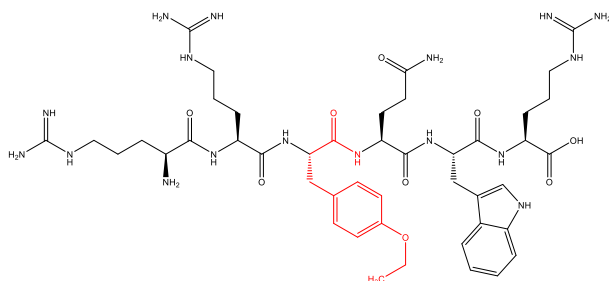
- Посредством Кайзер-тест се следи степента на протичане на реакцията.

- Чрез трикратно прибавяне на 16.5 ml TFA; 1 g фенол; 1 ml H₂O и 1 ml тиоанизол, пептидът се отцепва от смолата и се отстраняват всички останали защитни групи. Реакцията на деблокиране протича за 30 мин

при непрекъснато разбъркване на клатачна машина. Полученото количество пептид се филтрува на студено. В облодънна колба се събират трите филтрата и се изпаряват до сухо на ротационен вакуум изпарител. След преципитиране с охладен диетилов етер, пептида се изолира, пречиства (гел-филтрация) и лиофилизира. Добив: 45% (Mw: 948.53).

2.2.3.2. Синтезиране на хексапептида Fmoc-Arg²⁰-Arg²¹-D-Tyr(Et)²²-Gln²³-Trp²⁴-Arg²⁵-2-CTR (LfcinB6)

Аналог на нативния фрагмент LfcinB(20-25), при който в 3-та позиция е направена замяна на Trp с небелтъчната АК - D-Tyr(Et) (Фигура 24).



Фигура 24. Замяна на Trp с D-Tyr(Et) в трета позиция от молекулата на LfcinB(20-30)

Таблица 12. Стехиометрични изчисления за получаване на **LfcinB6**

	M, g/mol	n, mmol	m, g	V, ml	Eq.	ρ, g/cm³
Fmoc-L-Arg(Pbf)-2-Chlorotriyl chloride resin	-	0,60	1,0	-		-
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH	526,60	1,2	0,632	-	2	-
Fmoc-L-Gln-OH	368,39	1,2	0,442	-	2	-
Fmoc-D-Tyr(Et)-OH	431,48	1,2	0,518	-	2	-
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	648,77	1,2	0,778	-	2	-
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	648,77	1,2	0,778	-	2	-
HOBT	135,13	1,2	0,162	-	2	-
PyBOP	520,39	1,2	0,624	-	2	-
DIPEA	129,25	2,4	0,311	0,412	4	0,755

• При синтеза на LfcinB6, използвахме 2-хлоротритил хлоридна смола с прикачена към нея първа аминокиселина: Към 1,0g (0,60 mmol) вече набъбнала Fmoc-L-Arg(Pbf)-2-CTR се прибавя втората аминокиселина Fmoc-L-Trp(Boc)-OH в количество 0,632g (1,2 mmol), която е предварително разтворена в минимално количество DCM (1-2 ml).

• Добавят се кондензиращите агенти HOBT (0,162g) и PyBOP (0,624g) – *in situ* активирани.

• В реакционния съд се добавя и 0,412 ml DIPEA (2,4 mmol).

• Реакционната смес се разклаща на клатачна машина в продължение на 90 минути.

• След всяко свързване, пептидил-смолата се промива последователно с DCM (5 x 2 min), следвано от DCM/MeOH (1:1) (2 x 2 min), MeOH (3 x 2 min) и DMF (2 x 2 min).

• Деблокирането на Fmoc-групата се извършва чрез двукратно добавяне на 20% пиперидин в DMF: Първо се добавят 5 ml 20% пиперидин в DMF и се разклаща 5 мин. на клатачна машина, след което се добавят нови 5 ml 20% пиперидин в DMF и се клати 20 мин.

- След деблокиране на Fmoc-групата, смолата се промива последователно с DMF, DMF/DCM (1:1) и DCM (5 ml) и се пристъпва към кондензация на следващата АК.

- В отделен съд, в 1-2 ml DCM се разтварят 0,442g (1,2 mmol) Fmoc-L-Gln-OH. Към него се добавят и кондензиращите реагенти HOBt 0,162g и PyBOP 0,624g. Всичко това се добавя към реакционната смес, след което се слага и 0,412ml DIPEA (2,4 mmol) и се разклаща на клатачна машина в продължение на 90 минути.

- Стъпките се повтарят при присъединяване на всяка следваща АК (*Таблица 12*), както следва:

Fmoc-D-Trp(Et)-OH в количество от 0,518 g (1,2 mmol)

Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH в количество от 0,778 g (1,2 mmol)

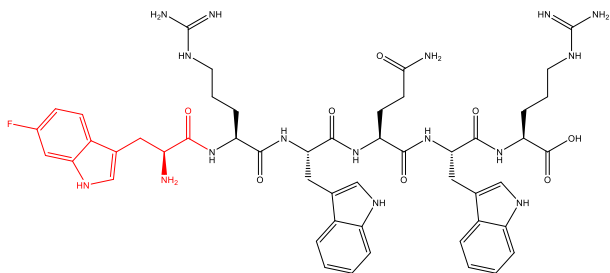
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH в количество от 0,778 g (1,2 mmol)

- Посредством Кайзер-тест се следи степента на протичане на реакцията.

- Чрез трикратно прибавяне на 16.5 ml TFA; 1 g фенол; 1 ml H₂O и 1 ml тиоанизол, пептидът се отцепва от смолата и се отстраняват всички останали защитни групи. Реакцията на деблокиране протича за 30 мин при непрекъснато разбъркване на клатачна машина. Полученото количество пептид се филтрува на студено. В облодънна колба се събират трите филтрата и се изпаряват до сухо на ротационен вакуум изпарител. След преципитиране с охладен диетилов етер, пептида се изолира, пречиства (гел-филтрация) и лиофилизира. Добив: 49% (Mw: 992.55).

2.2.3.3. Синтезиране на хексапептида **Woc-D-Trp(6F)²⁰-Arg²¹-Trp²²-Gln²³-Trp²⁴-Arg²⁵-2-CTR (LfcinB7)**

Аналог на нативния фрагмент LfcinB(20-25), при който в 1-ва позиция е направена замяна на Arg с D-Trp(6F) (*Фигура 25*).



Фигура 25. Замяна на Arg с **D-Trp(6F)** в първа позиция от молекулата на LfcinB(20-25)

Таблица 13. Стехиометрични изчисления за получаване на **LfcinB7**

	M, g/mol	n, mmol	m, g	V, ml	Eq.	ρ , g/cm ³
Fmoc-L-Arg(Pbf)-2-Chlorotriyl chloride resin	-	0,60	1,0	-		-
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH	526,60	1,2	0,632	-	2	-
Fmoc-L-Gln-OH	368,39	1,2	0,442	-	2	-
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH	526,60	1,2	0,632	-	2	-
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	648,77	1,2	0,778	-	2	-
Boc-D-Trp(6F)-OH	322,34	1,2	0,389	-	2	-
HOBT	135,13	1,2	0,162	-	2	-
PyBOP	520,39	1,2	0,624	-	2	-
DIPEA	129,25	2,4	0,311	0,412	4	0,755

• При синтеза на LfcinB7, използвахме 2-хлоротритил хлоридна смола с прикачена към нея първа аминокиселина: Към 1,0g (0,60 mmol) вече набъбнала Fmoc-L-Arg(Pbf)-2-CTR се прибавя втората аминокиселина Fmoc-L-Trp(Boc)-OH в количество 0,632g (1,2 mmol), която е предварително разтворена в минимално количество DCM (1-2 ml).

• Добавят се кондензиращите агенти HOBT (0,162g) и PyBOP (0,624g) – *in situ* активиране.

• В реакционния съд се добавя и 0,412 ml DIPEA (2,4 mmol).

- Реакционната смес се разклаща на клатачна машина в продължение на 90 минути.

- След всяко свързване, пептидил-смолата се промива последователно с DCM (5 x 2 min), следвано от DCM/MeOH (1:1) (2 x 2 min), MeOH (3 x 2 min) и DMF (2 x 2 min).

- Деблокирането на Fmoc-групата се извършва чрез двукратно добавяне на 20% пиперидин в DMF: Първо се добавят 5 ml 20% пиперидин в DMF и се разклаща 5 мин. на клатачна машина, след което се добавят нови 5 ml 20% пиперидин в DMF и се клати 20 мин.

- След деблокиране на Fmoc-групата, смолата се промива последователно с DMF, DMF/DCM (1:1) и DCM (5 ml) и се пристъпва към кондензация на следващата АК.

- В отделен съд, в 1-2 ml DCM се разтварят 0,442g (1,2 mmol) Fmoc-L-Gln-OH. Към него се добавят и кондензиращите реагенти HOBt 0,162g и PyBOP 0,624g. Всичко това се добавя към реакционната смес, след което се слага и 0,412ml DIPEA (2,4 mmol) и се разклаща на клатачна машина в продължение на 90 минути.

- Стъпките се повтарят при присъединяване на всяка следваща АК (*Таблица 13*), както следва:

 - Fmoc-L-Trp(Вос)-OH в количество от 0,632 g (1,2 mmol)

 - Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH в количество от 0,778 g (1,2 mmol)

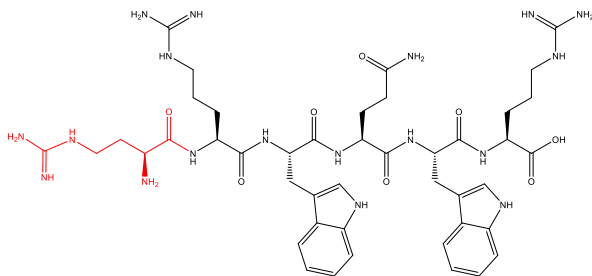
 - Вос-D-Trp(6F)-OH в количество от 0,389 g (1,2 mmol)

- Посредством Кайзер-тест се следи степента на протичане на реакцията.

- Чрез трикратно прибавяне на 16.5 ml TFA; 1 g фенол; 1 ml H₂O и 1 ml тиоанизол, пептидът се отцепва от смолата и се отстраняват всички останали защитни групи. Реакцията на деблокиране протича за 30 мин при непрекъснато разбъркване на клатачна машина. Полученото количество пептид се филтрува на студено. В облодънна колба се събират трите филтрата и се изпаряват до сухо на ротационен вакуум изпарител. След преципитиране с охладен диетилов етер, пептида се изолира, пречиства (гел-филтрация) и лиофилизира. Добив: 63% (Mw: 1035.51).

2.2.3.4. Синтезиране на хексапептида **Fmoc-D-Agb**²⁰-Arg²¹-Trp²²-Gln²³-Trp²⁴-Arg²⁵-2-CTR (LfcinB9)

Аналог на нативния фрагмент LfcinB(20-25), при който в 1-ва позиция е направена замяна на Arg със неговия скъсен небелтъчен аналог D-Agb (*Фигура 26*).



Фигура 26. Замяна на Arg с **D-Agb** в първа позиция от молекулата на LfcinB(20-25)

Таблица 14. Стехиометрични изчисления за получаване на **LfcinB9**

	M, g/mol	n, mmol	m, g	V, ml	Eq.	ρ , g/cm ³
Fmoc-L-Arg(Pbf)-2-Chlorotriethyl chloride resin	-	0,60	1,0	-		-
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH	526,60	1,2	0,632	-	2	-
Fmoc-L-Gln-OH	368,39	1,2	0,442	-	2	-
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH	526,60	1,2	0,632	-	2	-
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	648,77	1,2	0,778	-	2	-
Fmoc-D-Agb(Pbf,Boc)-OH	734,86	1,2	0,882	-	2	-
HOBT	135,13	1,2	0,162	-	2	-
PyBOP	520,39	1,2	0,624	-	2	-
DIPEA	129,25	2,4	0,311	0,412	4	0,755

• При синтеза на LfcinB9, използвахме 2-хлоротритил хлоридна смола с прикачена към нея първа аминокиселина: Към 1,0g (0,60 mmol)

вече набъбнала Fmoc-L-Arg(Pbf)-2-CTR се прибавя втората аминокиселина Fmoc-L-Trp(Вос)-ОН в количество 0,632g (1,2 mmol), която е предварително разтворена в минимално количество DCM (1-2 ml).

- Добавят се кондензиращите агенти НОВt (0,162g) и PyBOP (0,624g) – *in situ* активиране.

- В реакционния съд се добавя и 0,412 ml DIPEA (2,4 mmol).

- Реакционната смес се разклаща на клатачна машина в продължение на 90 минути.

- След всяко свързване, пептидил-смолата се промива последователно с DCM (5 x 2 min), следвано от DCM/MeOH (1:1) (2 x 2 min), MeOH (3 x 2 min) и DMF (2 x 2 min).

- Деблокирането на Fmoc-групата се извършва чрез двукратно добавяне на 20% пиперидин в DMF: Първо се добавят 5 ml 20% пиперидин в DMF и се разклаща 5 мин. на клатачна машина, след което се добавят нови 5 ml 20% пиперидин в DMF и се клати 20 мин.

- След деблокиране на Fmoc-групата, смолата се промива последователно с DMF, DMF/DCM (1:1) и DCM (5 ml) и се пристъпва към кондензация на следващата АК.

- В отделен съд, в 1-2 ml DCM се разтварят 0,442g (1,2 mmol) Fmoc-L-Gln-ОН. Към него се добавят и кондензиращите реагенти НОВt 0,162g и PyBOP 0,624g. Всичко това се добавя към реакционната смес, след което се слага и 0,412ml DIPEA (2,4 mmol) и се разклаща на клатачна машина в продължение на 90 минути.

- Стъпките се повтарят при присъединяване на всяка следваща АК (**Таблица 14**), както следва:

- Fmoc-L-Trp(Вос)-ОН в количество от 0,632 g (1,2 mmol)

- Fmoc-L-Arg(Pbf)-ОН в количество от 0,778 g (1,2 mmol)

- Fmoc-D-Agb(Pbf,Вос)-ОН в количество от 0,882 g (1,2 mmol)

- Посредством Кайзер-тест се следи степента на протичане на реакцията.

- Чрез трикратно прибавяне на 16.5 ml TFA; 1 g фенол; 1 ml H₂O и 1 ml тиоанизол, пептидът се отцепва от смолата и се отстраняват всички останали защитни групи. Реакцията на деблокиране протича за 30 мин

при непрекъснато разбъркване на клатачна машина. Полученото количество пептид се филтрува на студено. В облодънна колба се събират трите филтрата и се изпаряват до сухо на ротационен вакуум изпарител. След преципитиране с охладен диетилов етер, пептида се изолира, пречиства (гел-филтрация) и лиофилизира. Добив: 43% (Mw: 972.51).

3. ПРЕЧИСТВАНЕ И ОХАРАКТРИЗИРАНЕ НА СИНТЕЗИРАНИТЕ ПЕПТИДИ

3.1. Пречистване на новосинтезираните олигопептидни аналози на LfcinB(20-25)

Получената кристална маса от TFA-солта на съответният пептид се филтрува, суши и подлага на пречистване и обезсоляване чрез колонна гел-филтрация върху Sephadex G25 с 10% CH₃COOH. Събирахме фракции от по 5 мл за всяка епруветка и анализирахме с ТСХ. Събраните фракции, съдържащи целевият продукт замразихме с течен азот и лиофилизирахме до сухо на апарат Telstar Cryodos-80 при температура -50°C. Така получените пептиди използвахме в следващите експерименти.

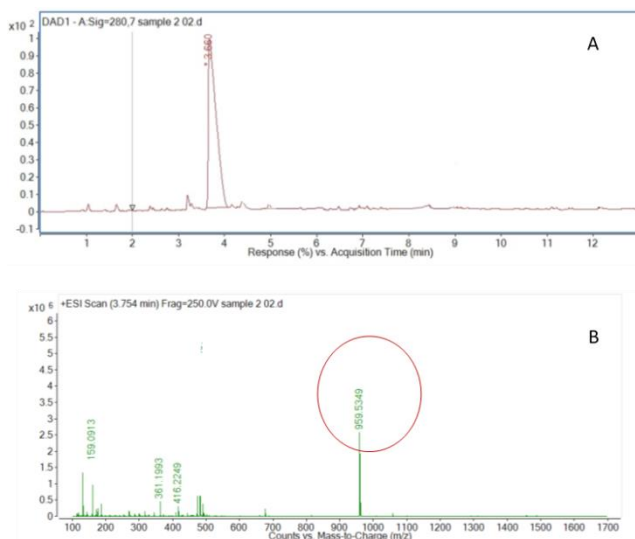
3.2. HPLC-MS анализ на новосинтезираните олигопептидни аналози на LfcinB(20-25)

Химическата чистотата на всички синтезирани пептиди беше проверена чрез аналитична RP-HPLC, а идентичността им беше потвърдена с мас-спектрометрия.

Пептиди анализирахме чрез аналитична RP-HPLC върху хроматографска колона Aeris® 2,6 μm PEPTIDE XB-C18, вътрешен диаметър 2.1 mm и дължина от 100 mm.). Разтворител А е 0.1% TFA (v/v) във вода и разтворител В е 0.1% TFA (v/v) в 80% воден ацетонитрил. Елуирането се извършва с линеен градиент 1–80% от разтворител В за 30 минути при скорост на потока 1 mL/min. HPLC разделянията се наблюдават при 220 nm.

Използвахме и хроматографска колона XTerra® MS RP-C18, с параметри - размер на частиците 3,5 µm, вътрешен диаметър 3.0 mm и дължина 150 mm. Анализът проведехме 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 и инжектиране на проба с обем 10 µL. UV-детекцията е проведена при аналитична дължина на вълната 220 nm.

Молекулното тегло на пептидите се идентифицира чрез електроспрей маспектрометър Agilent 6530 Series Q-TOF LC/MS System (Santa Clara, CA, USA), като за целта използвахме хроматографска колона Aeris® 2,6 µm PEPTIDE XB-C18, вътрешен диаметър 2.1 mm и дължина от 100 mm. Хроматографски условия: система за градиентно елуиране, съставена от елуент А: H₂O + 0.1% HCOOH, елуент В: ACN/0.1% HCO₂N 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 (*Фигура 27*).



Фигура 27 : (A) Хроматографски профил и (B) MALDI-TOF маспектър на суров **LfcinB2 (KRWQWR)**

3.3. Определяне на хидролитичната и химична стабилност на новосинтезираните олигопептидни аналози на LfcinB(20-25)

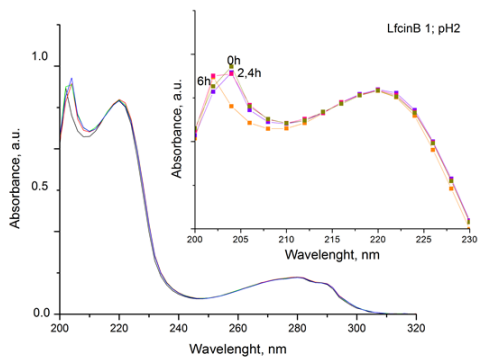
Анализът на кратковременната химична и хидролитична стабилност на пептидните аналози на LfcinB(20-25) е осъществен с помощта на метода на UV-Vis спектроскопия. Всички изследвания бяха проведени с UV-Vis спектрофотометър, модел T60 (PG instruments limited, UK). Спектрите на изследваните пептиди бяха снети в кварцова кювета (с вместимост 4.0 ml) с дебелина на оптичния път 1.0 cm, в интервала 240÷280 nm.

Всички проби (LfcinB1÷ LfcinB9) бяха изследвани в разтвор (с концентрация 0.5×10^{-4} mol/l). Работните разтвори (в различни буфери) бяха термостатирани при 37 °C.

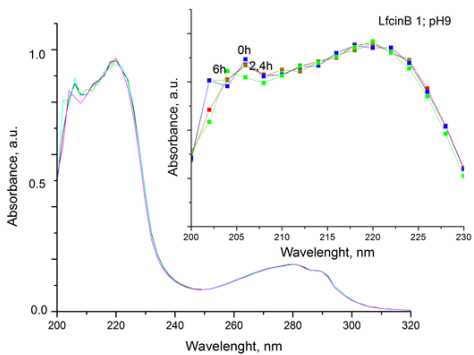
Аликвоти от по 3.0 ml от всеки един работен разтвор се отпипетират на равни интервали от време (0, 60, 120, 180, 240, 300 и 360 min) за проследяване на хидролитичната стабилност. Абсорбционните максимуми (λ_{\max}) са представени в nm, а абсорбсорбируемостта (A) – представени в относителни единици (a.u.).

3.3.1. Хидролитична стабилност на LfcinB1

В рамките на проведеното изследване (до 6-тия час), олигопептидът LfcinB1 показва относителна структурна стабилност, както в среда с алкално, така и с кисело pH на буфера (*Фигури 28 и 29*).

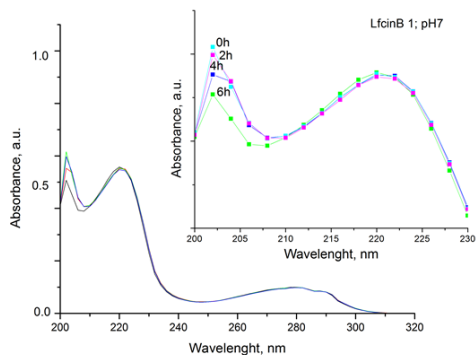


Фигура 28. UV спектри на LfcinB1 в буферна среда с рН 2



Фигура 29. UV спектри на LfcinB1 в буферна среда с рН 9

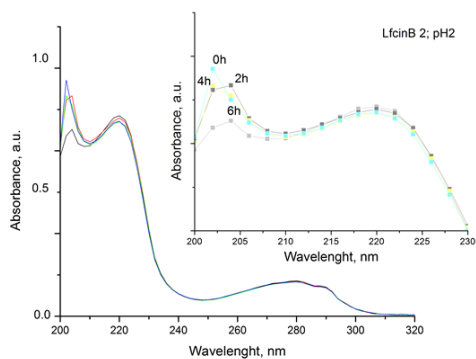
В неутрална среда обаче, същият пептид проявява известна структурна неустойчивост (**Фигура 30**).



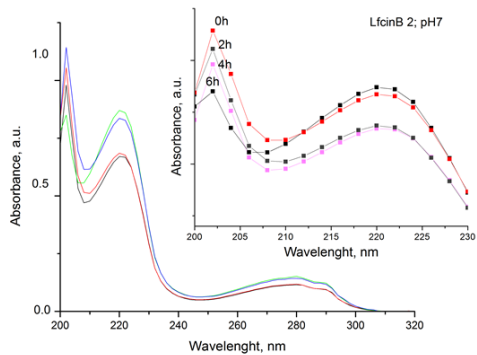
Фигура 30. UV спектри на LfcinB1 в буферна среда с рН 7

3.3.2. Хидролитична стабилност на LfcinB2

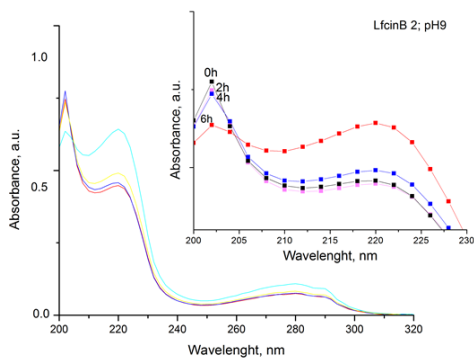
Пептидният аналог LfcinB2 проявява относителната висока структурна стабилност и в трите буферни среди (**Фигури 31, 32 и 33**) проявена до четвъртия експозиционен час на изследването. Впоследствие настъпват хидролитични за олигопептида процеси.



Фигура 31. UV спектри на LfcinB2 в буферна среда с рН 2



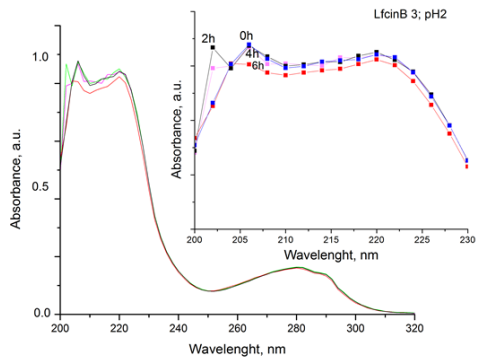
Фигура 32. UV спектри на LfcinB2 в буферна среда с рН 7



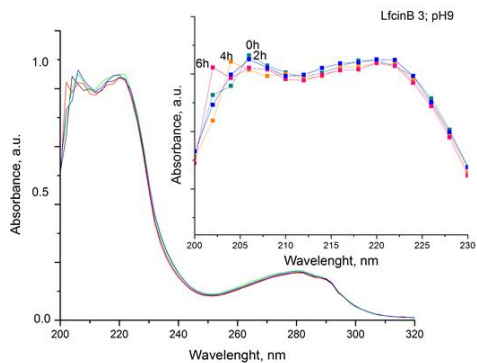
Фигура 33. UV спектри на LfcinB2 в буферна среда с рН 9

3.3.3. Хидролитична стабилност на LfcinB3

Новосинтезираният аналог LfcinB3 демонстрира висока структурна стабилност в среда с кисело (**Фигура 34**) и алкално (**Фигура 35**) рН на разтвора.

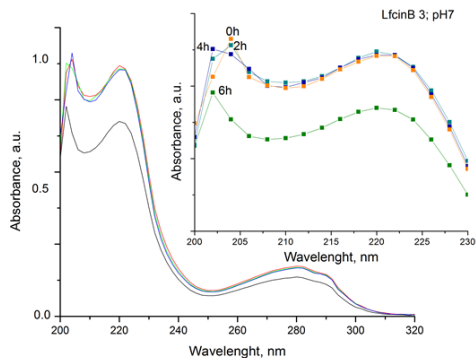


Фигура 34. UV спектри на LfcinB3 в буферна среда с рН 2



Фигура 35. UV спектри на LfcinB3 в буферна среда с рН 9.

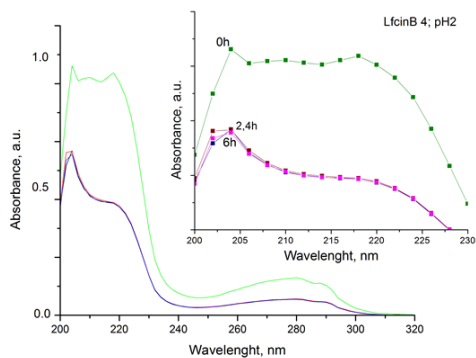
По аналогия с LfcinB2 в среда с неутрално рН, стабилността на LfcinB3 се запазва до четвъртия експозиционен час (**Фигура 36**), след което се наблюдават известни структурни промени.



Фигура 36. UV спектри на LfcinB3 в буферна среда с рН 7

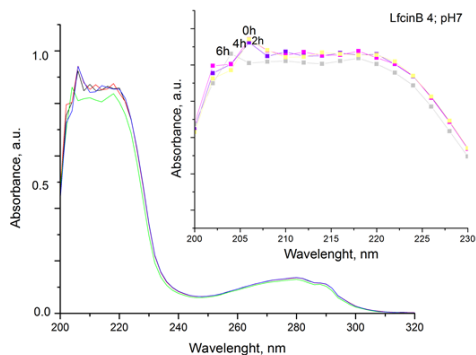
3.3.4. Хидролитична стабилност на LfcinB4

В среда с кисело рН на разтвора, изследваният LfcinB4 проявява значителна структурна нестабилност (**Фигура 37**). Като при това за времето до втория експозиционен час се наблюдават значителни изменения в абсорбируемостта му.

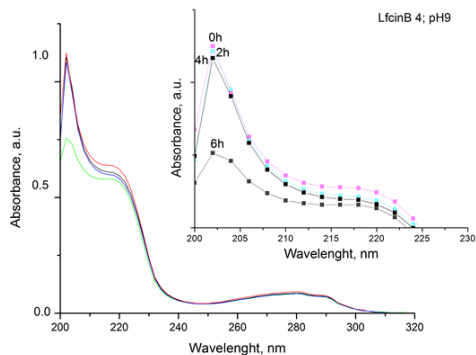


Фигура 37. UV спектри на LfcinB4 в буферна среда с рН 2

В неутрална буферна среда (**Фигура 38**), олигопептидът проявява относителна стабилност, а в алкална такава (**Фигура 39**), той показва характерното за останалите олигопептиди поведение - стабилност до 4-ти час.



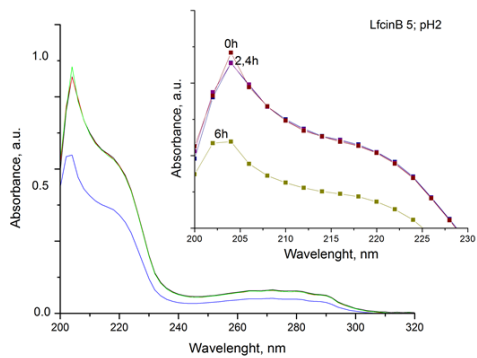
Фигура 38. UV спектри на LfcinB4 в буферна среда с рН 7



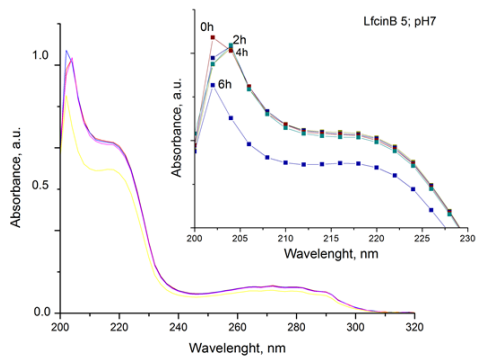
Фигура 39. UV спектри на LfcinB4 в буферна среда с рН 9

3.3.5. Хидролитична стабилност на LfcinB5

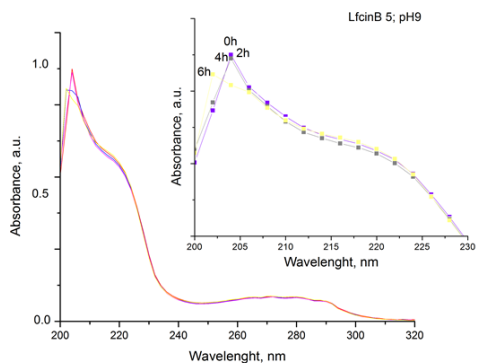
Във всяка една от буферните среди (**Фигура 40, 41, 42**), изследваният олигопептид LfcinB5, проявява относителна стабилност до четвъртия час. След това се регистрират значителни промени в абсорбируемостта на хексапептида. Измененията свързваме с настъпилите химични (хидролитични) промени в състава на изследвания аналит.



Фигура 40. UV спектри на LfcinB5 в буферна среда с рН 2



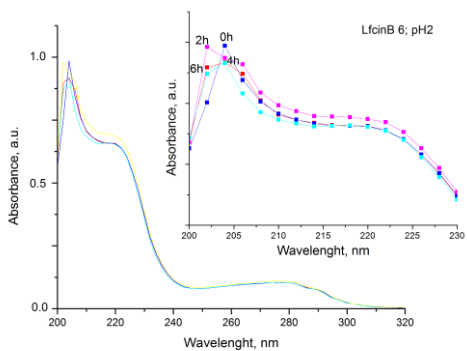
Фигура 41. UV спектри на LfcinB5 в буферна среда с рН 7



Фигура 42. UV спектри на LfcinB5 в буферна среда с рН 9

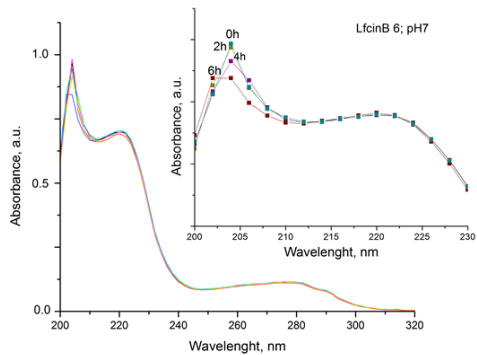
3.3.6. Хидролитична стабилност на LfcinB6

В киселият буфер (**Фигура 43**), изследваният LfcinB6 олигопептид проявява относително висока структурна стабилност, запазена в рамките на проведения експеримент.

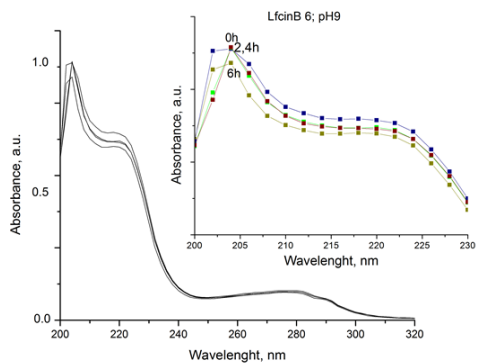


Фигура 43. UV спектри на LfcinB6 в буферна среда с рН 2

В средите с рН 7 и рН 9 на разтвора, LfcinB6 проявява аналогично с това на LfcinB5 поведение (**Фигура 44 и 45**).



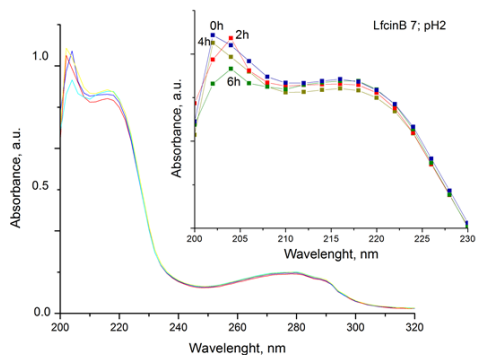
Фигура 44. UV спектри на LfcinB6 в буферна среда с pH 7



Фигура 45. UV спектри на LfcinB6 в буферна среда с pH 9

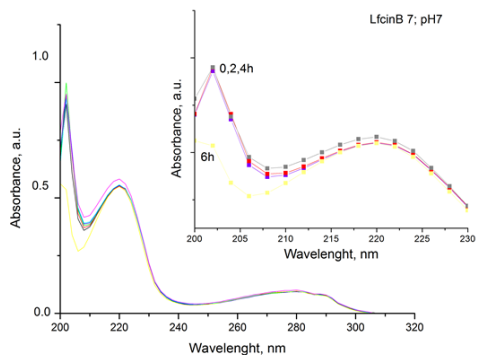
3.3.7. Хидролитична стабилност на LfcinB7

Пептидният аналог LfcinB7, в паритет с LfcinB6, проявява относителна стабилност в кисела среда (**Фигура 46**) на разтвора.

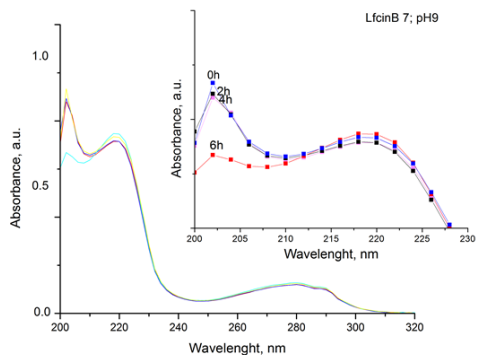


Фигура 46. UV спектри на LfcinB7 в буферна среда с рН 2

В неутрално (**Фигура 47**) и в алкално (**Фигура 48**) рН на разтвора, LfcinB7 запазва своята стабилност до 4-тия час на изследването, а след това се наблюдава прогресивното ѝ намаляване.



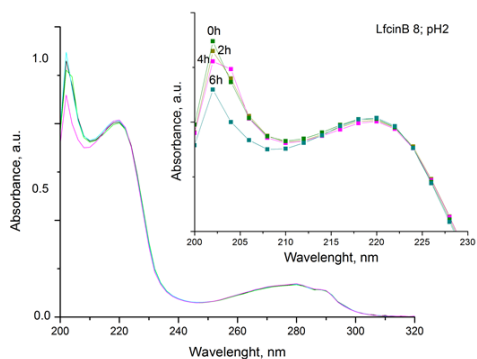
Фигура 47. UV спектри на LfcinB7 в буферна среда с рН 7



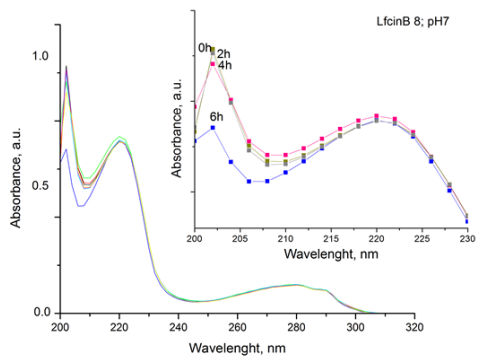
Фигура 48. UV спектри на LfcinB7 в буферна среда с рН 9

3.3.8. Хидролитична стабилност на LfcinB8

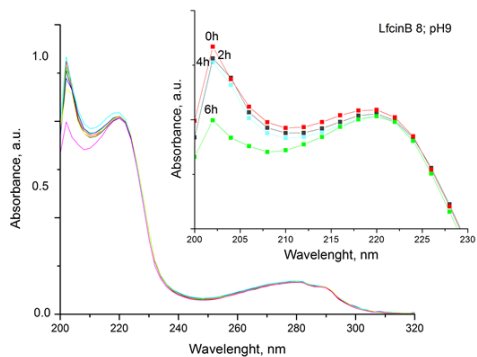
След 4-тият час, във всяка една от използваните буферни среди (рН 2, рН 7 и рН 9) се регистрират промени в абсорбируемостта на LfcinB8. Преди това пептидът показва относителна структурна стабилност (Фигури 49, 50 и 51).



Фигура 49. UV спектри на LfcinB8 в буферна среда с рН 2



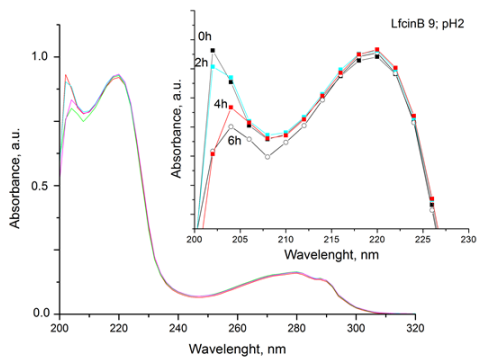
Фигура 50. UV спектри на LfcinB8 в буферна среда с рН 7



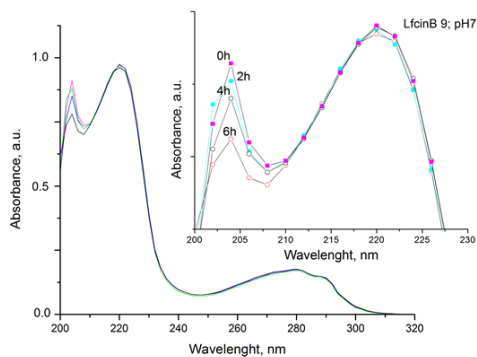
Фигура 51. UV спектри на LfcinB8 в буферна среда с рН 9

3.3.9. Хидролитична стабилност на LfcinB9

При LfcinB9 в среда на раствора с рН 2 (**Фигура 52**) и рН 7 (**Фигура 53**) се наблюдават прогресивни промени в целостта на пептида.

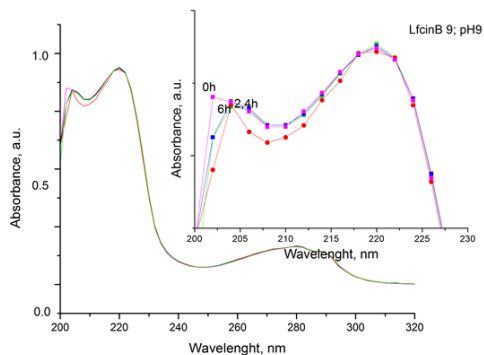


Фигура 52. UV спектри на LfcinB9 в буферна среда с рН 2



Фигура 53. UV спектри на LfcinB9 в буферна среда с рН 7

При рН 9 на средата, олигопептът проявява стабилност в целия времеви интервал на изследването (**Фигура 54**).



Фигура 54. UV спектри на LfcinB9 в буферна среда с рН 9

4. БИОЛОГИЧЕН СКРИНИНГ

4.1. Микробиологични методи

4.1.1. Определяне на антимикробната активност чрез дисково-дифузионен метод с напоени стерилни дискове на Бауер-Кърби.

Използваната среда е Мюлер-Хинтонов агар. Прави се плътна посявка с тампон на изследвания щам, след което Петриевите панички се оставят на стайна температура за 15 мин. Стандартизира се до стойности 0,5 MF с денситометър. Поставят се антибиотичните дискчета (Hi Media - 7 mm) и се накапва по 40 μ l от изследвания разтвор. Използвани са референтни щамове на *Escherichia coli* – ATCC25922, *Staphylococcus aureus* – ATCC25923 и *Candida albicans* – ATCC10231. Заложенихме 5 различни концентрации от изследваните пептиди в интервала от 6 ÷ 96 μ g/ml. Направихме аеробно култивиране на пробите за *E. coli* и *S. aureus* - 24 часа при температура 37 ° C, а за *C. albicans* – 48 часа при температура 35 ° C.

Направихме аеробно култивиране на пробите за *E. coli* и *S. aureus* - 24 часа при температура 37 ° C, а за *C. albicans* – 48 часа при температура 35 ° C.

Метод на серийните разреждания

❖ Определяне на Минимална потискаща концентрация

Използваната среда е т. нар. Brain Heart Infusion Broth (мозъчно-сърдечен бульон).

В серия от 5 проби с по 1 µl хранителна среда направихме разреждане на изследвания разтвор. Най-високата концентрация е 96 µg/ml като всяка следваща епруветка е с двойно падащо разреждане, разреждана в бульон с обем 1 ml. Крайните концентрации на изследвания пептид са 6, 12, 24, 48 и 96 µg/ml. Използвани са референтни щамове на *Escherichia coli* – ATCC25922, *Staphylococcus aureus* – ATCC25923 и *Candida albicans* – ATCC10231 в количество по 0,1 ml във всяка епруветка. Стандартизира се до стойности 0,5 MF с денситометър. Направихме аеробно култивиране на пробите за *E. coli* и *S. aureus* - 24 часа при температура 37 ° C, а за *C. albicans* – 48 часа при температура 35 ° C.

МПК се определя от последната епруветка, при която няма макроскопски видима мътнина (**Фигура 67,68,69**).

4.1.2. Определяне на Минимална бактерицидна концентрация

Направихме пресявки от епруветки, които демонстриращи бистър разтвор– 1 йозе, и разнесохме върху хранителните среди: Левин за *E. coli*, кръвен агар за *S. aureus* и Сабуро за *C. albicans*. Пробите култивирахме аеробно за 24 часа при температура 37 ° C за *E. coli* и *S. aureus*, а за *C. albicans* – 48 часа при температура 35 ° C. Минималната бактерицидна концентрация се определя от последното разреждане, при което бактериалния растеж е задържан до 99,9%.

4.2. Изпитване за цитотоксичен/антипролиферативен ефект

4.2.1.Култивиране на клетките

Клетъчните линии бяха култивирани в среда DMEM (4,5 g/l глюкоза), 10% фетален телешки серум, 100 U/мл пеницилин и 0.1 mg/ml стрептомицин в пластмасови съдове за клетъчно култивиране с площ 25 cm² и 75 cm². Клетките бяха поддържани в логаритмична фаза на растеж при 37°C и атмосфера с 5% съдържание на CO₂. За провеждане на опити *in vitro*, клетките в експоненциална фаза на растеж, след трипсинизация бяха доведени до необходимата концентрация и бяха посяти в 96-ямкови плаки за клетъчно култивиране (1×10⁴ клетки/ямка). След 24 часа култивиране, при споменатите вече условия, клетките бяха третираны с изследваните пептиди, съгласно опитната постановка.

Суспензионните клетки се поддържат в инкубатор на 37°C при влажна атмосфера в присъствие на 5% CO₂. 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 5×10⁵ клетки/мл.

4.2.2.Оценка на клетъчната жизненост чрез Neutral red uptake тест

За този експеримент използвахме мишите ембрионални фибробласти (BALB/c 3T3, clone A31), които култивирахме в съдове за клетъчно култивиране с площ 75 cm², като адхезивна, монослойна клетъчна култура, при стандартни условия за клетъчно култивиране. Клетките бяха посявани в количество 1 × 10⁴ клетки / 100 µl културална среда / ямка в 96 – ямкови плаки за клетъчно култивиране. Следва инкубация за 24 часа, при стандартни условия за осъществяване на клетъчната адхезия върху повърхността на ямката. След това клетките се третират с разтвор на изследваните пептиди в двойно нарастващи

концентрации (от 15 до 4000 μM). След 24 часа инкубация добавихме културална среда съдържаща “неутрално червено“. След още 3 часа инкубация ямките се промиват с PBS, pH 7.4 и се добавя лизиращ разтвор (Етанол/Оцетна киселина/dH₂O = 49/1/50). Оптичната плътност беше измерена, чрез TECAN microplate reader, при $\lambda = 540 \text{ nm}$.

4.2.3. Оценка на виталността на клетките чрез използване на МТТ-тест

Протокол за култивиране на монослойни клетки:

Антипролиферативната активност на изследваните пептиди определихме, чрез стандартен МТТ-тест. Посяхме клетките в 96-ямкови плаки за клетъчно култивиране в концентрация 1×10^3 клетки на ямка, след което ги инкубирахме за 24 ч. при температура 37°C и в присъствие на 5% CO₂. Отляхме средата за клетъчно култивиране и добавихме свежа среда. След което прибавихме изследваният пептид в двукратни нарастващи концентрации (от 7.5 μM до 2000 μM). Инкубирахме за 72 ч на 37°C, 5% CO₂. Аспирирахме хранителната среда, съдържаща изследвания пептид и добавихме свежа среда съдържаща 10% FBS (фетален говежди серум). За оценка на ефектът промихме клетъчните култури двукратно с PBS (фосфатно - буферен физиологичен разтвор - pH 7.4). Добавихме по 100 μl работен разтвор на МТТ (0.5 mg/ml) във всяка ямка на 96-ямковата плака и отново инкубирахме при 37°C за 3 часа. Супернатантата се аспирира и се добавят по 100 μl /ямка от лизиращия разтвор (DMSO/Етанол=1/1, v/v), необходим за разтварянето на получения от ензимната реакция формазан. Плаките поставихме на клатачна машина за 15-30 мин. до разтваряне на формазановите кристали. След разтваряне на кристалите в плаките, измерихме оптичната плътност с ELISA microplate reader (TECAN, Sunrise™, Grödig/Salzburg, Austria) при дължина на вълната 570 nm и референтна стойност при 620 nm.

Процентът на клетъчна пролиферация изчислихме, по следната формула:

$$\text{Клетъчна жизненост (\%)} = \frac{\text{OD570 (проба)}}{\text{OD570 (проба)}} \times 100$$

За разтварянето на формазаановите кристали се използва лизис буфер - DMSO в етанол (съотношение 1:1) и към всяка ямка се добавя 100 μl от лизиращия разтвор;

Плаките се поставят на клатачка за 15-30 мин. до разтваряне на формазаановите кристали;

След разтваряне на кристалите в плаките, се отчита абсорбцията на микро ELISA plate reader (Bio-Tek), $\lambda=550 \text{ nm}$, при референтна стойност 630 nm.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Терапевтичните протеини или пептиди са се доказали като антимикробни агенти, а също така и като агенти използвани при лечението на неопластичните заболявания. Въпреки това, съществуват редица ограничаващи фактори за тяхното приложение, които включват непредвидима фармакокинетика и нежелани ефекти: включително ниска метаболитна стабилност към протеолиза в гастро-интестиналния тракт, ниска абсорбция след орално приложение, ниска проникваща способност, бърза екскресия през черния дроб и бъбреците, както и нежелани ефекти, поради взаимодействието на гъвкавите пептиди с някои рецептори.

Въпреки всички тези недостатъци, пептидната химия е трайно ориентирана към превъзможване на гореспоменатите проблеми чрез въвеждане на структурни и функционални специфични модификации. Всички тези промени са съчетани в разработването на т.н. пептидомиметици.

Модификации, включващи въвеждането на D-аминокиселини и непротеиногенни аминокиселини, промяна на пептидната връзка или включването на други органични молекули с доказана биологична активност, представляват пептидомиметичен подход, способен да трансформира така пептидите, че да се повиши специфичността и афинитета им.

Моделирането на пептиди с потенциално фармакологично и терапевтично приложение се основава на синтезата на серии от структурно сходни вещества и проследяване на връзката структура-действие в стандартни фармакологични тестове, чрез които може да се предскаже тяхната клинична ефективност.

Така например, успешният подход при създаването на нови структурни аналози-агонисти, респ. антагонисти на известни биологично-активни вещества включва няколко задължителни етапа:

- Откриване на малки, активни фрагменти от пептидите, които съдържат информацията на големия пептид;

- Увеличаване на стабилността, което се постига чрез откриване на първоначалната степен и място на деградация, като в последствие местата на отцепване на пептида се заместват с неприродни АК-остатъци (напр. D-АК, N- или С-алкилирани АК) или чрез замяна на пептидната връзка в тези позиции с псевдопептидна връзка (-CH₂NH- ; -CSNH- ; -CH₂S- и др.). Включването на непротеиногенни аминокиселини може да подобри стабилността, потентността, пропускливостта и бионаличността на пептидните терапии. Различните стратегии са гликозилиране, метилиране, амидиране, модификации на терминалните АК остатъци, въвеждане на вътрешно молекулни водородни връзки или хидрофобни остатъци, и др. Включените пептидни градивни елементи могат да бъдат допълнително модифицирани с различни пост-транслационни реакции (фосфорилиране, гликозилиране, естерифициране и др.).
- Усилване на потентността (мощността) - тези подобрения се постигат или чрез въвеждането на такива химични групи, главно в страничните вериги на изграждащите ги АК, които се оказват по-удобни при взаимодействието лиганд-рецептор или чрез промяна в цялостната конформация на пептида, така че да се свърже възможно най-добре с рецептора;
- Подобряване на селективността - този ефект вероятно е свързан със специфични геометрични и функционални изисквания на молекулите-рецептори. Тук се използват два подхода:

- АК замени в различни позиции на пептидната молекула или създаване на конформационно затруднени аналози (пептиди с вътрешномолекулен мост с α -спираловидна структура), като се излиза от предположението, че пептидът-лиганд, приемайки различна конформация, може да взаимодейства с различен рецепторен подтип.

- Друг успешен подход в рамките на пептидните изследвания е създаването на структурно ограничени пептиди, генерирани чрез циклизирането им, като целта е да се подобри селективното свързване, поглъщането, потентността и стабилността на линейните прекурсори. Въпреки това не всички стратегии за циклизация и ограничени геометрии подобряват тези свойства в еднаква степен. Линейните аналози в много случаи показват дори по-добри таргетни свойства, в сравнение с техните циклични еквиваленти.

Независимо обаче от значителните успехи постигнати до сега, все така актуално остава търсенето на нови аналози с по-висока биологична активност, специфичност на действие и плазмена устойчивост.

1. Моделиране на пептидни аналози/миметици на LfcinB(20-30)

Постигането на целите на дисертационният труд се основава на разбирането, че създаването на нови ефективни терапевтици на базата на АМП е сложен и многоетапен процес, изискващ мултидисциплинарен подход в следните области: биоорганична и фармацевтична химия, биофизика, микробиология, молекулярна биология и фармакология.

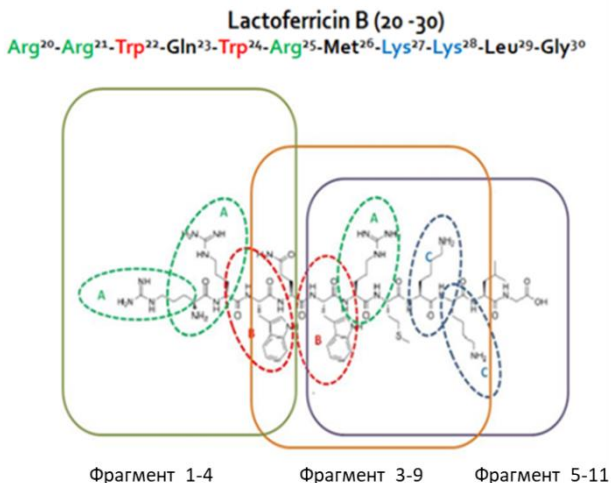
Изследванията ни основно бяха насочени към получаване на къси катионни пептиди съдържащи в молекулата си както природните базични аминокиселини Arg и Lys, така и ароматните Phe и Trp. Проектирането и разработването на такъв вид АМП, предлага редица предимства. Такива вещества могат лесно да бъдат получени чрез твърдофазен органичен синтез, като в същото време се пречистват по-лесно. Синтезите им са по-кратки и изискват значително по-малко разтворители. Това са предимства, които са важни от икономическа и екологична гледна точка. В допълнение улесняват възможността за определяне взаимовръзката молекулна структура – биологична активност.

За получаване на „моделните“ катионни пептиди ние избрахме говеждият лактоферицин LfcinB. Той е високо-активен представител от семейството на катионните АМП. Нативната молекула на LfcinB е със

следната аминокиселинна последователност: 17
 FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF 41 / Phe¹⁷-Lys¹⁸-Cys¹⁹-Arg²⁰-
 Arg²¹-Trp²²-Gln²³-Trp²⁴-Arg²⁵-Met²⁶-Lys²⁷-Lys²⁸-Leu²⁹-Glu³⁰-Ala³¹-Pro³²-
 Ser³³-Ile³⁴-Thr³⁵-Cys³⁶-Val³⁷-Arg³⁸-Arg³⁹-Ala⁴⁰-Phe⁴¹.

От литературата е известно, че активността на лактоферицина се дължи главно на наличието на пет аргининови и четири хидрофобни остатъка (Phe и Trp), които са отговорни за взаимодействието с отрицателно заредената бактериална мембрана (*Vargas Casanova et al., 2017*). Тази последователност може да бъде допълнително съкратена с цел да се създадат високоефективни антимикуробни агенти, съдържащи минимален антибактериален мотив. Такъв скъсен мотив е съставен от две хидрофобни обемни единици, в следствие на което са дефинирани два катионни заряда. По този начин проектирахме малки пептидни фрагменти, както е показано на **Фигура 55**.

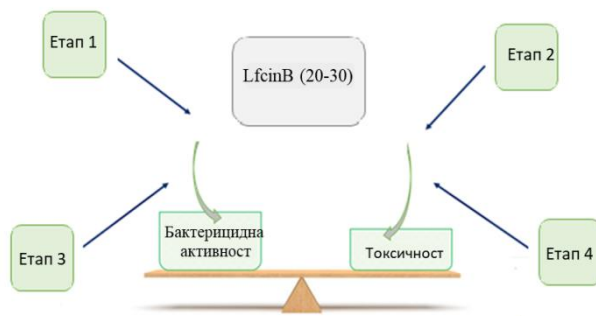
Фрагментът LfcinB(20-30) беше избран за „целеви“ в нашето разработване:



Фигура 55. Възможни модификации в молекулата на LfcinB(20-30)

За получаването на пептидни аналози на LfcinB(20-30), с потенциална повишена антимикуробна активност и ниска

цитотоксичност, ние следвахме оптимизирана стратегия, включваща четири последователни етапа (*Фигура 56*).



Фигура 56. Схема на стратегиите за пептидна оптимизация на LfcinB(20-30). Етап 1 - моделиране; Етап 2 - синтез; Етап 3 - физикохимична оценка; Етап 4 - фармакологична и биологична оценка

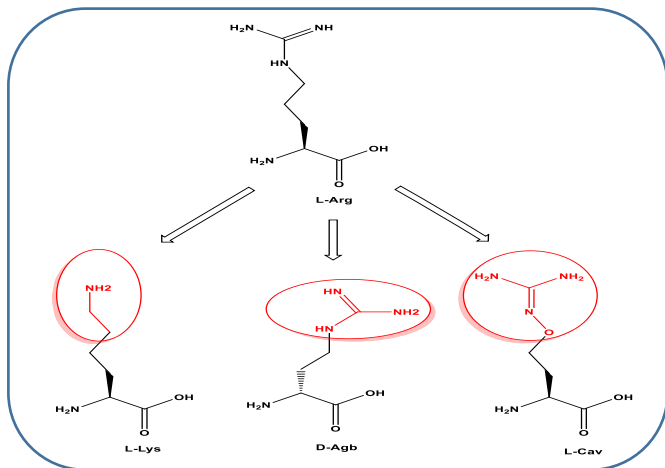
За да проектираме и идентифицираме новите селективни АМП, ние разработихме „**шаблонно**“ базиран метод на проектиране (template-based desing method, TBDM). Този метод го приложихме чрез сравняване на редица структурно хомоложни фрагменти от нативен LfcinB(20-25), както и извличане на консервативни модели въз основа на типа остатък (като зареден, полярен, хидрофобен и т.н.).

Един подход, който би ни позволил да увеличим ефективността на пептида, като същевременно намалим дължината на последователността, е въвеждането на неприродни аминокиселинни аналози на Trp и Phe, присъстващи в естествената форма на лактоферицин. Селективното заместване на аминокиселини в пептидна последователност с неприродни аналози е добре установена стратегия за промяна свойствата на пептида. Халогенирането е свързано с активността, специфичността и стабилността на антимикробните пептиди (*Monroe, 2007*). Със замяната на Trp остатъци с халогенирани Trp и Phe ние очаквахме да се

стабилизира вторичната структура и да се подобрят антибактериалните свойства.

Докладваните до сега многобройни проучвания за връзката между структура и ефект показват, че най-активни и най-селективно действащи аналози са тези, които имат в молекулата си едновременно както основните аминокиселини Arg и Lys (*Cárdenas-Martínez et al., 2021; Dean et al., 2011*), така и ароматните Trp и Phe. Установено е, че най-важната предпоставка за мощната антимикробна активност на тези аналози, богати на Arg, Lys и Trp, е наличието в структурата им на поне три остатъка от всяка от тези аминокиселини.

В късите катионни микробни пептиди, положителните заряди обикновено се осигуряват от Arg. Доколкото ни е известно, въпреки голямото количество данни за връзката структура-активност, нито едно проучване все още не е фокусирано единствено върху катионния принос на аргининовите аминокиселинни остатъци. От друга страна, аргининовите миметици са обект за дизайн на много биологично-активни пептиди с оглед повишаване на тяхната селективност и бионаличност. В настоящият дисертационен труд ние си поставихме за цел да проучим подробно ролята на Arg в късите катионни микробни пептиди, чрез въвеждане на няколко негови структурни аналози. Също така предположихме, че оралната бионаличност на този клас пептиди може да бъде значително увеличена чрез заместване на Arg с по-слаби базични АК, каквито са например Cav и Lys (*Фигура 57*).



Фигура 57. Структурни формули на аминокиселините аргинин, лизин, D-2-амино-4-гуанидино маслена киселина (Agb) и канаванин

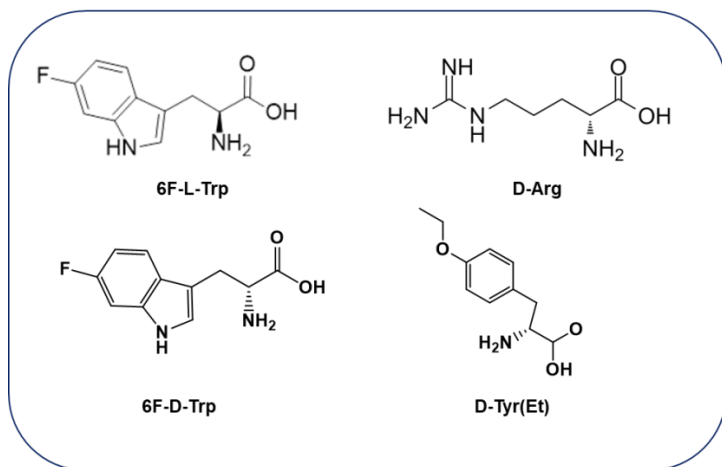
В редица синтетични пептиди, Arg е катионен остатък, който е предпочитан за модифициране. Това се дължи на факта, че неговата странична верига може лесно да взема участие, както в електростатични взаимодействия, така и във водородни свързвания. От друга страна, често липсата или ниската биологична активност 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 пептидни аналози на LfcinB, съдържащи аргинин със скъсена странична верига (Agb), такива съдържащи гуанидинова група с висок поляритет или с намалени основни свойства (например съдържащият кислороден атом вместо една метиленова група в структурата си Cav), ще доведат до повишаване стабилността, по-лесното преминаване през клетъчната мембрана, а с това да се увеличи и потентността на съответните модифицирани пептидни аналози (*Delage et al., 2010*).

Дзимбова и др., 2019 г. (*Dzimbova et al., 2019*) установяват, че аналозите на Arg със скъсена верига (като Agb) могат да инхибират три основни ензима в метаболизма му: синтаза на азотен оксид (eNOS),

аргинин-глицин амидинотрансфераза (AGAT) и аргининосуцинат синтаза (ASS). Освен това, Henklein и Th. Bruckdorfer докладват, че стабилността на пептидите се увеличава, ако аргининът е заменен с хомолог, съдържащ една метиленова група по-малко (Agb) (*Henklein, Petra and Bruckdorfer, Thomas, 2008*).

Вторият аргининов аналог, с който избрахме да работим е канаванина (Cav). Той е естествена непротеиногенна аминокиселина, която проявява токсичност спрямо гъбички, дрожди, бактерии, водорасли, насекоми, растения и бозайници (*Staszek et al., 2017*). Посочената токсичност се обуславя от близкото структурно сходство с аргинина. То определя и способността му да се свързва с аргинил-tРНК синтетазата и да предизвиква клетъчна смърт (*Bence and Crooks, 2003; D.R. Nurcahyanti and Wink, 2017; Ho Jang et al., 2002; Naha et al., 1980; Nurcahyanti and Wink, 2016; Rosenthal, 1998, 1977*). Заместването на аргинина от канаванина по време на транслацията на нови протеини води до получаването на белтъци с нарушена функция. По този начин се нарушава по-нататъшната им роля в клетъчните процеси (*Rosenthal, 1977*). От друга страна вследствие на високото си структурно сходство с Arg, канаванинът не се разпознава от транспортните и метаболитните системи като чужда молекула, следствие на което не се формира лекарствена резистентност (*Bence and Crooks, 2003*).

За подобряване стабилността на пептидите, много подходящ подход е модифицирането чрез добавяне на D-аминокиселини, неприродни аминокиселини и аналози на ароматни АК (Тур) (*Фигура 58*).

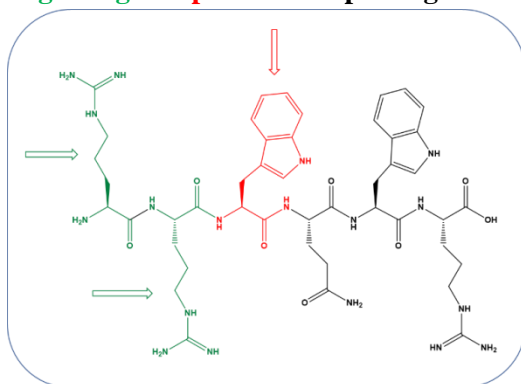


Фигура 58. Химични структури UAA: 6F-L-Trp; 6F-D-Trp, D-Arg и D-Tyr(Et)

Като се има предвид, че ензимът е стереоспецифичен, включването на неприродни D-аминокиселини в АК последователност на LfcinB(20-30), може да обърне стереохимията и да предотврати разграждането на пептидите от пептидазите.

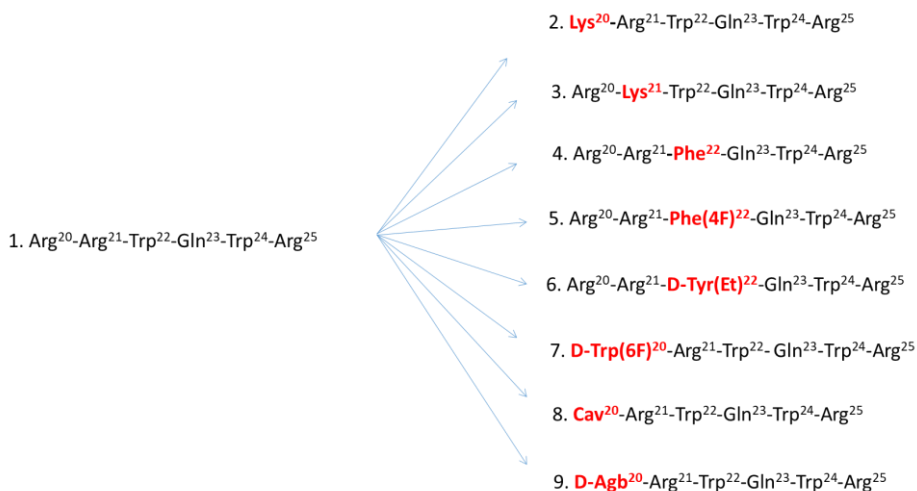
Съгласно установените по-горе закономерности по отношение връзка структура-активност, характерни за синтетичните АМП и в търсенето на нови LfcinB(20-30) аналози с подобен фармакологичен профил, в настоящият дисертационен труд ние се спряхме на разработването на скъсени линейни хексапептидни аналози – фрагменти от N-края на LfcinB(20-30). На **фигура 59** са обобщени модификациите, предприети за промяна на структурата на изходната молекула, в хода на дизайн и синтез на целевите пептиди.

LfcinB(20-25)
Arg²⁰-Arg²¹-Trp²²-Gln²³-Trp²⁴-Arg²⁵



Фигура 59. Предприети замени в молекулата на LfcinB(20-25)

Тези модификации включват, замяна на Arg-остатък в **1** или **2** позиция с по-слабо базичната аминокиселина Lys и неприродната аминокиселина канаванин (Cav), както и със структурния аналог на Arg – D-Agb; на ароматната аминокиселина Trp в позиция **3** с Phe, небелтъчната ароматна халогенирана аминокиселина Phe(4F) и D-Tyr(Et). Arg-остатък в **1** беше заместен с ароматната небелтъчна халогенирана киселина D-Trp(6F) (**Фигура 60**).

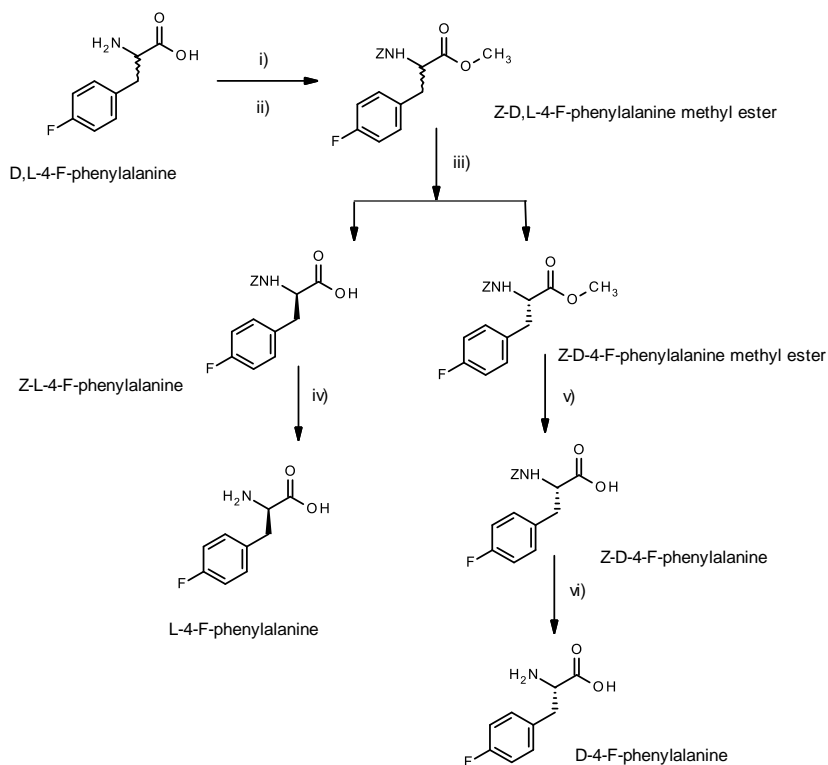


Фигура 60. Схематично представяне на синтезираните 9 на брой хексапептида и направените в тях замени

2. Синтез и анализ на пептидни аналози/миметици на LfcinB(20-30)

2.1. Получаване на защитени небелтъчни аминокиселини, необходими за пептидният синтез на LfcinB(20-30)

Изхождайки от стратегията, която планирахме за получаване на аналозите на LfcinB(20-30), първоначално синтезирахме небелтъчни аминокиселинни модификанти, които са подходящо защитени – халогенираните Phe и Trp, както и базичната АК - канаванин (Cav). Халогенираните аминокиселини H-L-Phe(4-F)-ОН и H-D-Trp(6-F)-ОН са синтезирани в Института по молекулярна биология, БАН, съгласно процедури (**Фигура 61**), описани по-рано от (Aleksiev *et al.*, 1981; Rajanova, 2000).



Фигура 61. Синтетична схема за синтез на H-L-Phe(4-F)-OH

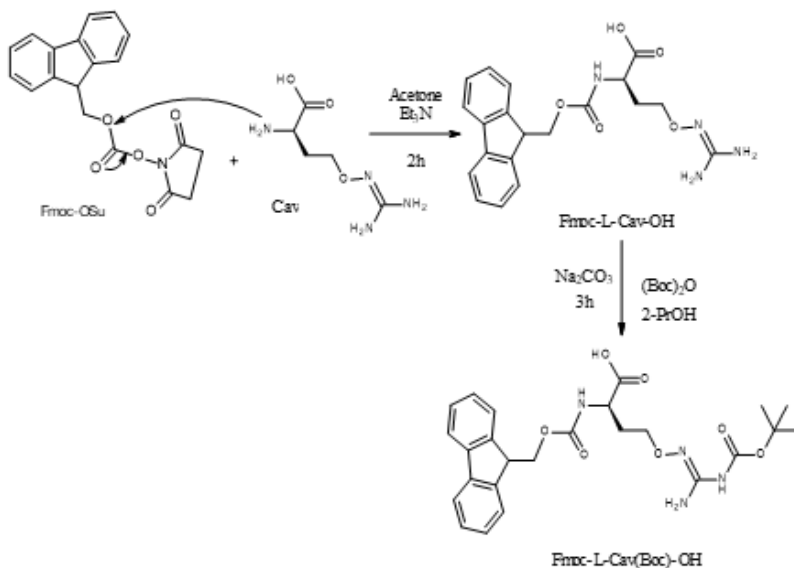
За получаването на Fmoc-защитени производни: Fmoc-L-Phe(4-F)-OH използвахме като реагент Fmoc-OSu, по метода описан от Даналев през 2020г. (*Danalev et al., 2020*). В разработената процедура съответните халогенирани аминокиселини използвахме с 10% излишък от спрямо реагента Fmoc-OSu, разтворени в минимум обем от диоксан/водна фаза (1:10) и двоен излишък на натриев карбонат, спрямо аминокиселинният компонент. Реакцията е най-ефективна, когато реагентите се разбъркват енергично при стайна температура. Полученият Fmoc-L-Phe(4-F)-OH е с висок добив от 85% и висока химична чистота.

Хиралният аналог на триптофана D-Trp(6F)-OH е синтезиран в Института по молекулярна биология - БАН. Получаването на Вос-D-

Trp(6F)-OH се извършва в един етап, като N α -аминогрупата се защитава с киселинно лабилната Boc-защитна група.

Получаването на Fmoc-L-Cav(Boc)-OH се извършва на два етапа, по метод описан от Пайпанова и колектив през 1997 (*Paipanova et al., 1997*). В първият етап от синтеза се защитава N α -аминогрупата с базично лабилната Fmoc-група до получаване на N α -Fmoc-Cav. При вторият етап от синтеза се защитава страничната аминогрупа в гуанидиновата функционална група до получаване на N α -Fmoc, N^G-Boc- Cav (**Фигура 62**).

След изтичане на реакционното време, количеството на получената N α -защитена аминокиселина Fmoc-L-Cav-OH е с 93% добив. При вторият етап от синтеза се получава Fmoc-L-Cav(Boc)-OH, с добив от 91% и висока химична чистота доказано чрез TLC и HPLC (*Paipanova et al., 1997*).



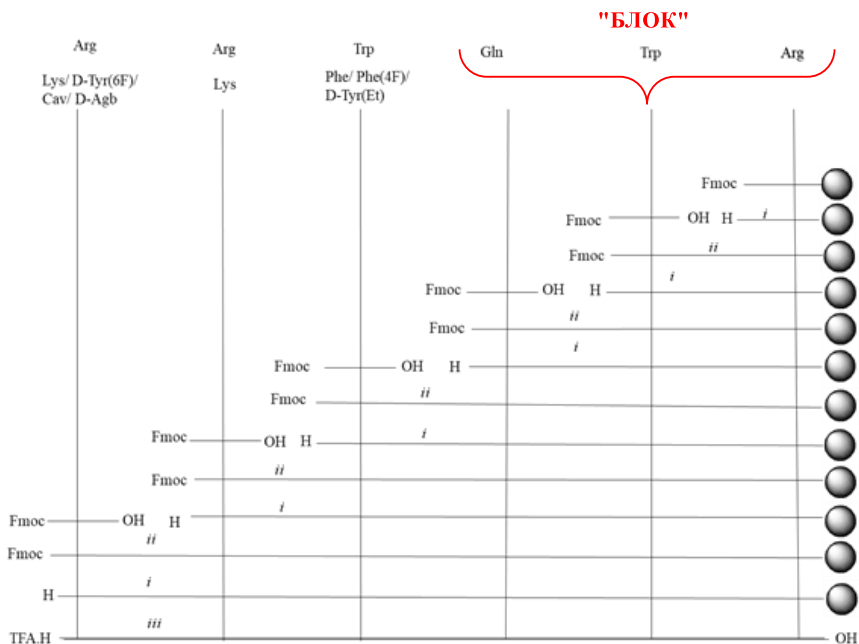
Фигура 62. Синтетична схема за получаване на Fmoc-L-Cav(Boc)-OH по метода описан от (*Paipanova et al., 1997*)

2.2. Получаване на LfcinB(20-25) аналози, модифицирани в N-края

Основната цел на тези изследвания беше да се намери осъществима и най-ефективна стратегия/схема за получаване аналозите на LfcinB(20-25).

Всички АК изграждащи пептидите са със своята особеност и подходът към тях е специфичен. Всички използвани АК са защитени в N α -амино функцията с базичната Fmoc-защитна група. За защита на страничната гуанидиногрупа на Arg използвахме (Pbf), за Agb използвахме (Pbf, Boc) и (Boc)₂-защита на оксигуанидино-функцията на Cav.

Синтезът на нативния пептид LfcinB1, както и неговите аналози LfcinB2 - LfcinB9 реализирахме чрез синтез върху полимерен носител и с прилагане на стандартен Fmoc/tBu протокол следвайки схемата представена на **Фигура 63**.



Фигура 63. Синтез на блок трипептид: i) 20% пиперидин/DMF 20 min; ii) 3 equiv. TBTU/НОВt/DIPEA, DMF; Синтез на **LfcinB(1-9)** пептиди: i) 20% пиперидин/DMF 20 min; ii) 1,1 equiv. НОВt, PyBOP, разтворени в DMF и DCM, DIPEA 90 min; iii) - а) 20% пиперидин/DMF 20 min; б) TFA/DCM 75 min или TFA, скевинджъри 45 min.

Синтезираните от нас 9 хексапептида, включващи една нативна последователност и осем нейни алалога, съдържат консервативен участък от три АК (Gln²³-Trp²⁴-Arg²⁵) в своя С-край. При всички новосинтезирани пептиди тази последователност се запазва непроменена. Направените промени засягат само позиции 20, 21 и 22 (Arg-Arg-Trp).

Първоначално синтезирахме линейният С-крайен „блок“ използвайки, 2-хлоротритил хлоридна смола, с прикачен към нея Arg. Куплунг реакциите се осъществиха чрез активиране с TBTU/НОВt/DIPEA. Конюгирането на първите три АК, под формата на блок се прави с цел да се съкрати времето за синтез и да се избегнат

загуби от реактанти по време на синтеза. Използват се по-малко количество реактиви и за деблокиране и промиване, с което се намалява и разхода на целия синтетичен процес.

Блок трипептидът разделяме на девет тегловни части и продължаваме синтеза до получаване на нативната пептидна последователност (LfcinB1) и останалите осем нейни пепидни аналози (LfcinB2, LfcinB3, LfcinB4, LfcinB5, LfcinB6, LfcinB7, LfcinB8 и LfcinB9) следвайки схемата представена на **Фигура 63**.

Пептидите LfcinB2 и LfcinB3 модифицирани с Lys в позиция 20 или 21, показваха добра синтетична ефективност, състояща се от по-кратка продължителност на процеса за синтез, като същевременно се поддържа и висока хроматографска чистота. Lys е аминокиселина, която въвежда положително зареден товар в пептида. По-лесното му включване в нарастващата пептидната верига при SPPS-Fmoc/tBu отчасти се дължи на факта, че аминокгрупата в страничната верига на Lys е защитена с Boc група. Тя е по-малка по обем от Pbf, като по този начин причинява по-малко пространствено препятствие и изисква по-малко време и реагенти за завършване на реакцията на свързване.

В хода на нашите изследвания, резултатите подчертават редица проблеми свързани с вграждането на Arg, които са в съгласие с предишни наши изследвания, а именно изискващо дълго време за реакция и голям разход от реагенти. Силно основната и нуклеофилна гуанидинова група на Arg изисква изтегляне на електрони и обемна защитна група в страничната верига, като например силно киселинната Pbf-група. Това затруднява завършването на всяка една реакция на свързване на Fmoc-Arg(Pbf)-OH, както и отстраняването на Pbf-групата в процеса на деблокиране по време на SPPS. Освен това, за пептиди съдържащи Arg остатъци, броят на циклите на свързване е по-голям, отколкото за тези, съдържащи Lys. В допълнение е необходимо също така и 4-часово увеличение на процеса на деблокиране, което потвърждава отново, че синтезът на Arg пептиди е по-трудоемък и изисква по-големи разходи.

От друга страна, получените незадоволителни резултати (отчетен нисък добив) по време на пептидния синтез на LfcinB9, наложи

повторение на куплунга с двукратен излишък от Fmoc-Agb(Pbf, Boc)-OH. Това потвърждава и данните представени от други автори (*Dzimbova et al., 2019*) за трудното вграждане на Agb в биологично активни пептиди.

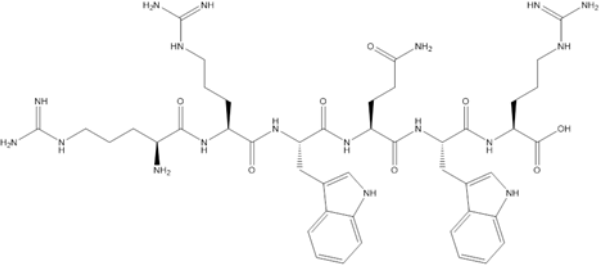
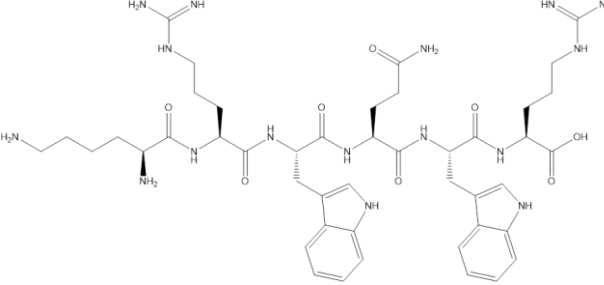
Химичния синтез на Arg-Arg- и D-Agb-Arg-последователности (в пептиди LfcinB1, LfcinB4, LfcinB5, LfcinB6 и LfcinB9) са проблематични. Въпреки предприетите промени, отчетените добиви и на петте пептида останаха незадоволителни. Това ни накара да направим смяна на реагента за кондензация от TBTU със силно реактивоспособният реагент PyBOP. Процесът се проведе в съотношение на реактантите – 1 еквивалент Fmoc-AK, 1 еквивалент PyBOP, 1 еквивалент HOBT и 2,75 еквивалента DIPEA. Установихме, че реакцията протича за 15 минути и води до получаването на суров пептид с висока чистота от (80 %).

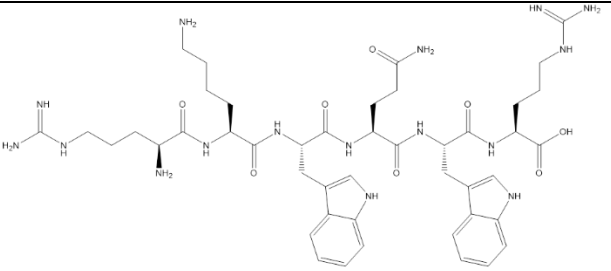
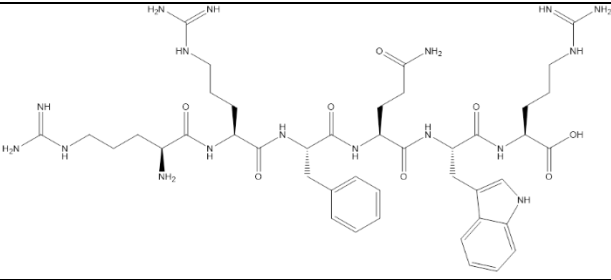
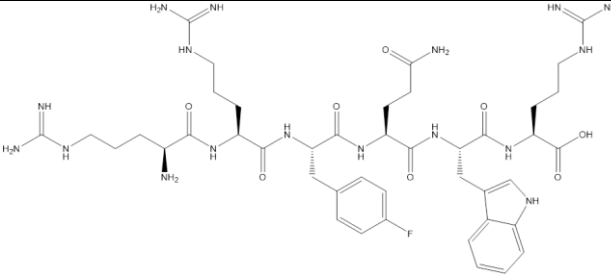
Това, че PyBOP е по-реактивоспособен от останалите реагенти и не се въвежда с трикратен излишък е важно за получаването на пептиди, включващи непротеиногенни АК, които са много скъпи.

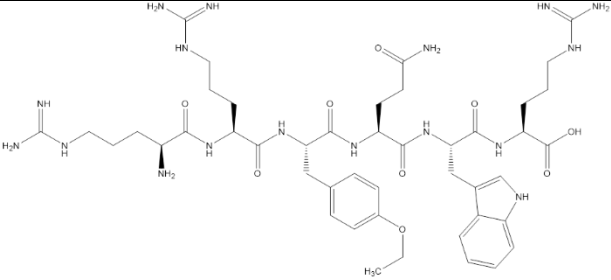
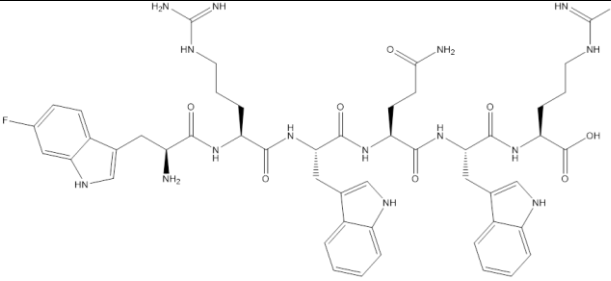
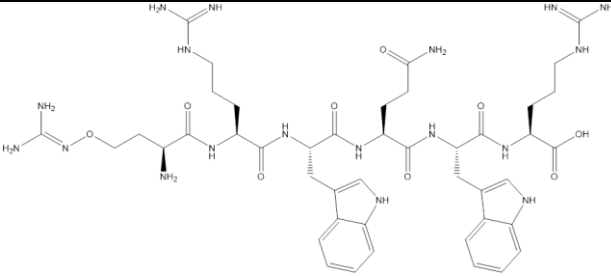
Всички синтезирани пептиди бяха определени с висока степен на чистота над 95%, посредством високоефективна течна хроматография (RP-HPLC). Структурната идентичност на пептидите беше потвърдена чрез измерване на молекулната маса на съединенията с помощта на електроспрей-йонизационна маспектрофотометрия (ESI-MS).

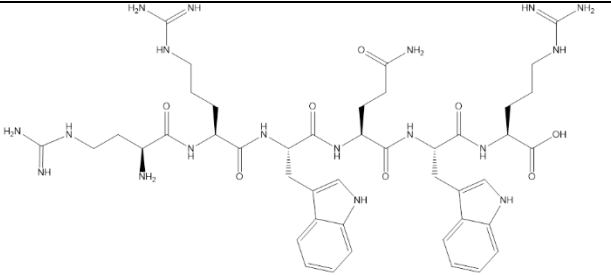
В **Таблица 15** са представени структурните формули и физикохимични данни на новосинтезираните пептиди.

Таблица 15. Структурни формули и физикохимични данни на синтезираните пептиди

Шифър	Пептидни аналози на LfcinB (20-25)	Химическа структура	Нетен заряд	Добив %	Чистота HPLC (t _R) %	Брутна формула	MW [M + H ⁺]
LfcinB1	Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg	 <p>The structure shows a linear peptide chain with the sequence Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg. The N-terminus is a primary amine (H₂N), and the C-terminus is a carboxylic acid (COOH). The side chains include two arginine residues (long aliphatic chains with guanidinium groups), two tryptophan residues (indole rings), and one glutamine residue (amide group).</p>	3+	66	99 (3.8)	C ₄₅ H ₆₆ N ₁₈ O ₈	987.53844
LfcinB2	Lys-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg	 <p>The structure shows a linear peptide chain with the sequence Lys-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg. The N-terminus is a primary amine (H₂N), and the C-terminus is a carboxylic acid (COOH). The side chains include one lysine residue (long aliphatic chain), one arginine residue (long aliphatic chain with guanidinium group), two tryptophan residues (indole rings), and one glutamine residue (amide group).</p>	3+	75	95 (3.7)	C ₄₅ H ₆₆ N ₁₆ O ₈	959.5322

LfcinB3	Arg-Lys-Trp- Gln-Trp-Arg		3+	60	97 (3.8)	C ₄₅ H ₆₆ N ₁₆ O ₈	959.5322
LfcinB4	D-Arg-Arg- Phe-Gln-Trp- Arg		3+	45	98 (3.4)	C ₄₃ H ₆₅ N ₁₇ O ₈	948.5275
LfcinB5	Arg-Arg- Phe(4F)-Gln- Trp-Arg		3+	59	98 (3.2)	C ₄₃ H ₆₄ F ₁ N ₁₇ O ₈	965.5181

LfcinB6	Arg-Arg-D-Tyr(Et)-Gln-Trp-Arg		3+	49	96 (4.7)	C ₄₅ H ₆₉ N ₁₇ O ₉	992.5537
LfcinB7	D-Trp(6F)-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg		2+	63	96 (4.6)	C ₅₀ H ₆₃ F ₁ N ₁₆ O ₈	1035.5098
LfcinB8	Cav-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg		3+	56	98 (4.9)	C ₄₄ H ₆₄ N ₁₈ O ₉	988.5919

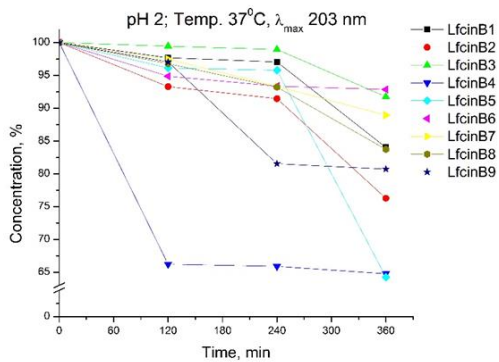
LfcinB9	D-Agb-Arg- Trp-Gln-Trp- Arg		3+	43	97 (3.9)	C ₄₄ H ₆₄ N ₁₈ O ₈	972.5149
---------	--	---	----	----	-------------	--	----------

3. Определяне на хидролитична и химична стабилност на новосинтезираните олигопептидни аналози

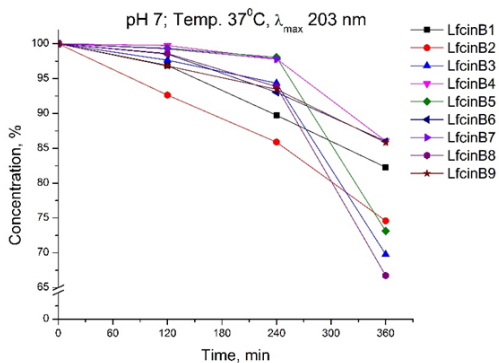
Ефективността и терапевтичната активност на повечето органични съединения (лекарства), вкл. и на пептидите, се предопределя до известна степен от тяхната хидролитична стабилност. Изборът на фармакологично-активен структурен мотив е от съществено значение в разработването на нови терапевтици. Той е определящ до голяма степен както за хидролитичната стабилността на получената нова молекула, така и за фармакокинетичното (вкл. и динамично) ѝ поведение в организма.

Хидролизът е основната метаболитна трансформация, определяща биологичният пептиден полуживот. Скоростта, с която amidната връзка хидролизара зависи от температурата и рН на средата. Попаднали в стомашното съдържимо, пептидите денатурират. Впоследствие, под действието на пептидази, те губят своята структурна цялост. Познанията за поведението на дадено съединение в буферни разтвори с различно рН дава възможност да се определят границите, при които то запазва своята структура и концентрация във времето. Това спомага да се определят условията, при които молекулата е най-податлива на разграждане и да се вземе под внимание за последващи процеси на оптимизация.

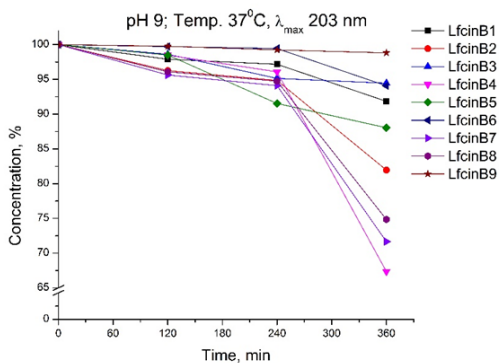
За да определим хидролитичната стабилност на синтезираните хексапептиди (LfcinB1÷LfcinB9), ние изследвахме тяхното поведение в три различни буферни среди с рН, близко до това на физиологичните условия, а именно: Стомашен сок - рН = 2.0; Кръвна плазма – рН = 7.4; Дуоденум и тънки черва – рН = 9.0. Установените промените в състава на изследваните олигопептиди, изразена в проценти, са представени на *фигури 64, 65 и 66.*



Фигура 64. Фигура анализираща стабилността на изследваните олигопептиди в среда с кисело рН



Фигура 65. Фигура анализираща стабилността на изследваните олигопептиди в среда с неутрално рН



Фигура 66. Фигура анализираща стабилността на изследваните олигопептиди в среда с алкално рН

От получените резултати, може да се обобщи, че:

- ✓ В среда с кисело рН хексапептидите LfcinB1, LfcinB3, LfcinB6 и LfcinB7 проявяват относително висока структурна стабилност. В същата среда целостта на LfcinB2 и LfcinB5 се запазва само до четвърти час, а тази на LfcinB4, LfcinB8 и LfcinB9 – прогресивно намалява;
- ✓ В среда с неутрално рН структурна цялост показват олигопептидите LfcinB4 и LfcinB6. Пептидните аналози LfcinB3, LfcinB5, LfcinB7 и LfcinB8 са стабилни до четвърти час. В целия период на изследване стабилността на LfcinB1, LfcinB2 и LfcinB9 намалява прогресивно;
- ✓ В алкална среда пептиди LfcinB1, LfcinB3, LfcinB5, LfcinB6 и LfcinB9 запазват своята структурна цялост в целия експериментален ход, а останалите четири аналога я демонстрират само до 4 час.

В заключение може да се каже, че пептидни аналози LfcinB1, LfcinB3 и LfcinB6 проявяват максимална структурна стабилност в среди с различно рН.

Таблица 16. Хидролитична и химична стабилност (в %) на новосинтезираните олигопептиди, демонстрирана в 4 час

Шифър	Пептидни анализи на LfcinB(20-25)	Стабилност (%)		
		pH 2	pH 7	pH 9
LfcinB1	Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg	98	91	97
LfcinB2	Lys-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg	92	87	95
LfcinB3	Arg-Lys-Trp-Gln-Trp-Arg	100	95	95
LfcinB4	D-Arg-Arg-Phe-Gln-Trp-Arg	66	98	97
LfcinB5	Arg-Arg-Phe(4F)-Gln-Trp-Arg	96	98	92
LfcinB6	Arg-Arg-D-Tyr(Et)-Gln-Trp-Arg	93	93	100
LfcinB7	D-Trp(6F)-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg	93	98	94
LfcinB8	Cav-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg	93	94	95
LfcinB9	D-Agb-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg	81	93	100

Анализирайки представените в **Таблица 16** резултати, може да заключим, че всички пептиди запазват висока хидролитична и химична стабилност до 4 час на изследването. LfcinB1 и LfcinB3 се отличават с по-висока стабилност, спрямо останалите пептиди. Единствено LfcinB4 показва структурна нестабилност в кисела среда.

В хода на изработването на дисертационният труд бяха проведени и изследвания върху биологичната активност (антимикробни и цитотоксични/антипролиферативни ефекти) на описани по-горе LfcinB(20-25) миметици.

4. Микробиологично изследване на потенциална антимикробна активност на нови лактоферицинови производни.

За целите на дисертационния труд особен интерес представлява изследването на антимикробния потенциал на новите анализи на лактоферицин В – нативната молекула LfcinB1 и осем нейни аналога (LfcinB2÷LfcinB9), съдържащи мотивът RRWQWR.

Целта на проведените *in vitro* тестовете е да се определи ефекта на новосинтезираните пептидни анализи. Като потенциални антимикробни агенти, тествахме пептидомиметиците срещу подбрани Грам (+) и Грам (-) аеробни бактерии, както и един гъбичен щам: - *E. coli* (Грама (-)), *S. aureus* (Грама (+)) и гъбичен *Candida albicans* (Атанасова-Стамова,

Силвия Йорданова, 2021). Избрани бяха едни от най-честите причинители на гнойно-възпалителните заболявания и вътреболничните инфекции, локализирани в различни части на организма.

В хода на провежданото изследване са приложени две методики за изпитване на антимикробна активност: дифузионен метод и определяне на МПК и МБК. Използвахме полярен разтворител етанол, който подобрява разтворимостта на пептидите, както и тяхната стабилност. В концентрация 20% етанолът не потиска растежа на микроорганизмите, но е добър разтворител за пептидите. За провеждане на изследването използвахме разтвор от EtOH/dH₂O в съотношение 20/80 (V/V) (Hussein et al., 2021; Needham, 1970; Simirgiotis et al., 2020). Микробните щамове които бяха използвани са съответно: *Escherichia coli* – ATCC25922; *Staphylococcus aureus* – ATCC25923; *Candida albicans* – ATCC10231. Лактоферициновите аналози (LfcinB1÷LfcinB9) тестирахме в концентрации вариращи в диапазона 6÷96 µg/ml, като контрола изследвахме антимикробната активността на разтворителите спрямо целевите микроорганизми.

4.1. Определяне на антимикробни ефекти спрямо бактериални и гъбични щамове чрез дисково – дифузионния метод в агар.

При проведения дифузионен метод не наблюдавахме проява на антибактериална активност от изследваните съединения в нито един от използваните разтвори спрямо *E. coli* - ATCC25922 и *Candida albicans* – ATCC10231. Определена антимикробна активност беше отчетена само при пробите от LfcinB1, LfcinB3, LfcinB5 и LfcinB6 срещу *S. aureus*.

Пептидите LfcinB1, LfcinB3 и LfcinB6 проявяват активност в концентрация от 48 µg/ml, и със зони на инхибиране съответно от 10, 11 и 10 mm. Най-изявен антимикробен ефект показва аналогът LfcinB3. При концентрация от 96 µg/ml спрямо същият патоген, беше отчетена антимикробна активност за пептидните аналози LfcinB1, LfcinB3, LfcinB5 и LfcinB6, като зоните на инхибиране са съответно 13, 13, 9 и 11 mm. Трябва да се отбележи, че при тази концентрация LfcinB1 и LfcinB3

показват по-изразен инхибиращ ефект в сравнение с останалите целеви проби. За пептидите LfcinB2, LfcinB4, LfcinB7, LfcinB8 и LfcinB9 не беше отчетен антимикуробен ефект. Резултатите от проведените изследвания са обобщени и предствени в **Таблица 17**.

Таблица 17. Отчитане на антимикуробна активност на LfcinB1÷LfcinB9 към *Staphylococcus aureus* (зони на инхибиране в мм)

	Концентрации на разтвори с Ethanol + Aqua destilata в µg/ml, 20/80 ,V/V				
	96	48	24	12	6
пептид	<i>Staphylococcus aureus</i>				
LfcinB 1	13	10	-	-	-
LfcinB 2	-	-	-	-	-
LfcinB 3	13	11	-	-	-
LfcinB 4	-	-	-	-	-
LfcinB 5	9	-	-	-	-
LfcinB 6	11	10	-	-	-
LfcinB 7	-	-	-	-	-
LfcinB 8	-	-	-	-	-
LfcinB 9	-	-	-	-	-

*(-) няма зони на инхибиране

*(9,10,11,13) – зона на инхибиране, отчетена в mm (d)

4.2. Определяне на минимална потискаща концентрация на LfcinB(20-25) аналози спрямо *Escherichia coli* – ATCC25922, *Staphylococcus aureus* – ATCC25923 и *Candida albicans* – ATCC10231.

Получените резултати от проведеното изследване са представени в **Таблица 18** и **фигури 67 (A,B), 68, 69, 70**.

При определяне на МПК на LfcinB1 спрямо *S. aureus* отчетохме активност при концентрация 48 µg/ml, а срещу *Candida albicans* – 96 µg/ml (**Фигури 67(A,B) и 68**). Не беше отчетена антимикуробна активност спрямо щама *Escherichia coli* – ATCC25922. От тестваните аналози на LfcinB определен потенциал на антимикуробни агенти спрямо *S. aureus* демонстрираха пептидите LfcinB1, LfcinB3, LfcinB5, LfcinB6 при най-

високите заложенi концентрации от 96 и 48 µg/ml., което е показано на **Фигури 67(A,B) и 69**. За пептидите LfcinB2, 4, 7, 8 и 9 не беше отчетено антимикробно действие спрямо нито един от тестваните микроорганизми (**Фигура 70**). При този метод на изследване, нито един от изследваните аналози на LfcinB не показва антимикробно действие спрямо *Escherichia coli* и *Candida albicans*. Отчетените резултатите от проведеното изследване за определяне на МПК по метода на серийните разреждания, напълно съответстваха на получените резултати от тестовете проведени чрез ДДМ на Бауер-Кърби. Антимикробен потенциал имат само LfcinB1, LfcinB3, LfcinB5 и LfcinB6. При направените тестове с новосинтезираните лактоферицинови аналози срещу *Escherichia coli* и *Candida albicans* не отчетохме действие, задържащо микробния растеж.

Таблица 18. Метод на серийни разреждания за определяне на минимална потискаща концентрация на лактоферицинови аналози спрямо *Staphylococcus aureus* – ATCC25923 и *Candida albicans* – ATCC10231

Концентрации на разтвори с Ethanol + Aqua destillata в µg/ml, 20/80 ,V/V															
	96	48	24	12	6	96	48	24	12	6	96	48	24	12	6
	<i>Staphylococcus aureus</i>					<i>Escherichia coli</i>					<i>Candida albicans</i>				
LfcinB1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
LfcinB2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LfcinB3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LfcinB4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LfcinB5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LfcinB6	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LfcinB7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LfcinB8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LfcinB9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*(-) липса на микробен растеж;

*(+) визуално отчитане на микробна мътнина (микробен растеж)



(A)

(B)

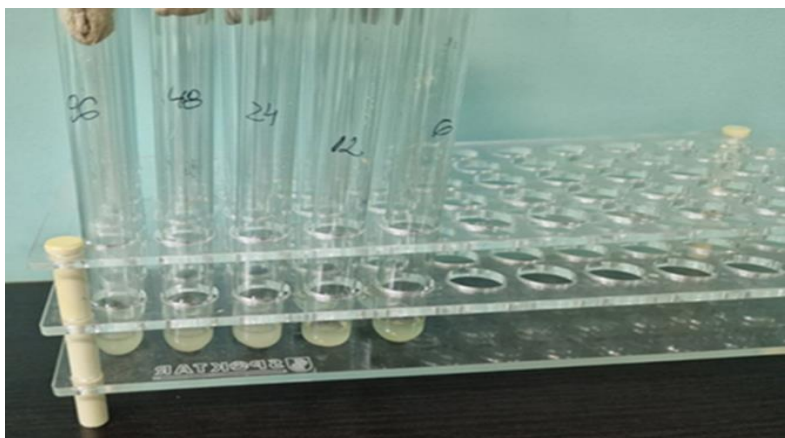
Фигура 67 (А, В). Определяне на МПК (48 $\mu\text{g/ml}$, 96 $\mu\text{g/ml}$), по метода на серийните разреждания, на LfcinB1 спрямо *S. aureus* – ATCC25923



Фигура 68. Отчитане на минимална потискаща концентрация (96 $\mu\text{g/ml}$), по метода на серийните разреждания, на LfcinB1 спрямо *Candida albicans* – ATCC10231



Фигура 69. Отчитане на минимална потискаща концентрация (96 и 48 $\mu\text{g/ml}$), по метода на серийните разреждания, на LfcinB3, LfcinB5 и LfcinB6, спрямо *Staphylococcus aureus* – ATCC25923

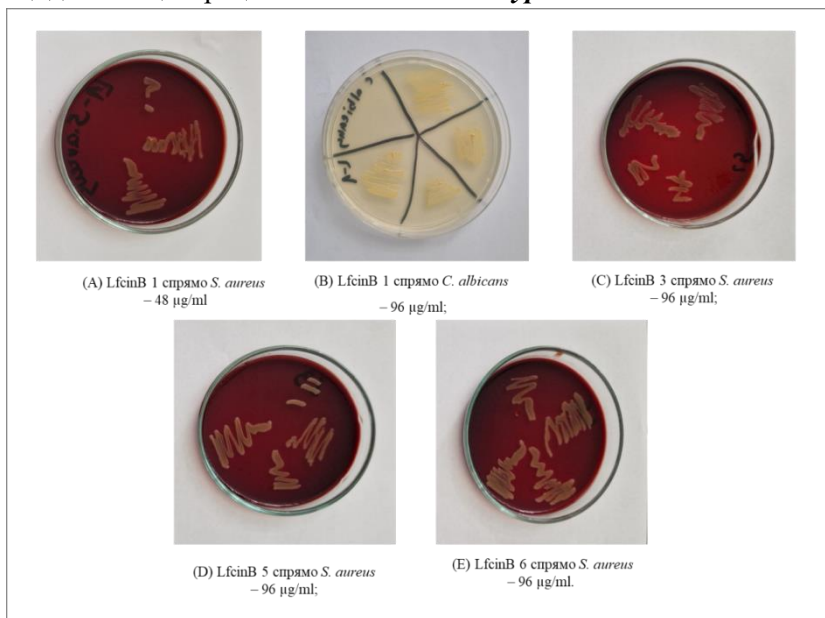


Фигура 70. Отчитане на минимална потискаща концентрация, по метода на серийните разреждания, на LfcinB2, LfcinB4, LfcinB7, LfcinB8 и LfcinB9, спрямо *Staphylococcus aureus* – ATCC25923

4.3. Определяне на минимална бактерицидна и фунгицидна концентрация на лактоферинови аналози В1÷9 спрямо *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*

След определянето на МПК на тестовите разтвори от всички епруветки с бистър разтвор, при които не отчетохме микробна мътнина, направихме пресявки върху агарови среди: Кръвен агар за *S. aureus* и Сабуро агар за *Candida albicans* (Sabouraud agar).

От направените изследвания, получихме следните минимални бактерицидни концентрации посочени във **Фигура 71**:



Фигура 71(A,B,C,D,E). Минимални бактерицидни концентрации на LfcinB1, LfcinB3, LfcinB5 и LfcinB6.

Срещу *S. aureus*, LfcinB1 демонстрира инхибиращ ефект при по-ниска концентрация (48 µg/ml), спрямо другите целеви пептиди (**Фигура 71(A)**). Единствено той потвърждава и потискащ ефект срещу *C. albicans* при концентрация от 96 µg/ml. (**Фигура 71(B)**).

При най-високите заложенни концентрации от 96 µg/ml. срещу *S. aureus*, антимикробна активност показаха LfcinB3, LfcinB5 и LfcinB6 (**Фигура 71 А,В,С,Д,Е**), което потвърждава получените от нас резултати от тестовете проведени чрез ДДМ и метода на серийните разреждания за определяне на МПК.

Таблица 19. Определяне на минимална потискаща и минимална бактерицидна концентрации на лактоферицинови аналози, спрямо *Escherichia coli* – ATCC25922, *Staphylococcus aureus* – ATCC25923 и *Candida albicans* – ATCC10231

щам пептид	<i>E. coli</i> (ATCC25922)		<i>S. aureus</i> (ATCC25923)		<i>C. albicans</i> (ATCC10231)	
	МПК	МБК	МПК	МБК	МПК	МБК
LfcinB1	-	-	96 и 48 µg/ml	48 µg/ml	96 µg/ml	96 µg/ml
LfcinB2	-	-	-	-	-	-
LfcinB3	-	-	96 и 48 µg/ml	96 µg/ml	-	-
LfcinB4	-	-	-	-	-	-
LfcinB5	-	-	96 и 48 µg/ml	96 µg/ml	-	-
LfcinB6	-	-	96 и 48 µg/ml	96 µg/ml	-	-
LfcinB7	-	-	-	-	-	-
LfcinB8	-	-	-	-	-	-
LfcinB9	-	-	-	-	-	-

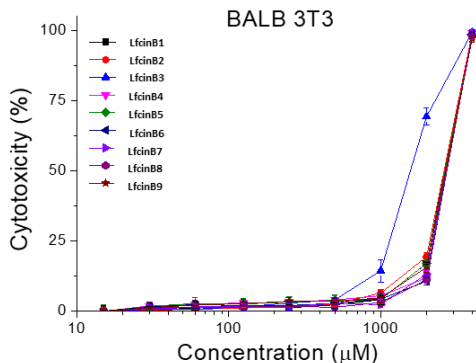
От направената заключителна **Таблица 19**, се вижда, че пептидите LfcinB1, LfcinB3, LfcinB5 и LfcinB6 проявяват МПК и МБК срещу *S. aureus* в концентрация от 96 µg/ml. Срещу *C. albicans*, активност демонстрира само LfcinB1 отново в максимално заложената концентрация. Нито нативният пептид, нито неговите аналози показват инхибиращ ефект срещу *E. coli*.

5. Изпитване за цитотоксичност, антипролиферативен и потивотуморен ефект на LfcinB аналози

Установено е, че някои катионни АМП проявяват антитуморна активност. Това ни насочи към изследване на цитотоксичните/антипролиферативните ефекти на

новосинтезираните от нас пептидни аналози. Съединенията бяха тествани върху различни клетъчни линии (ракови и нетуморогенни).

5.1. Оценка за цитотоксичен ефект чрез Neutral Red Uptake in vitro test (NRU-анализ)

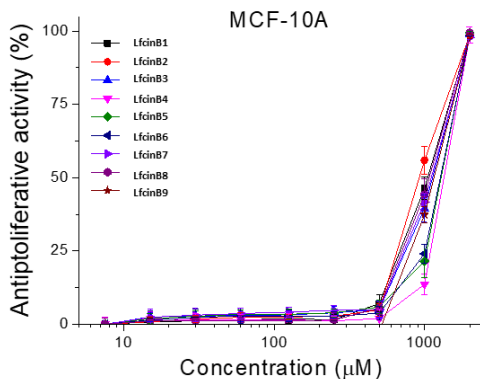


Фигура 72. Цитотоксичен ефект на пептиди LfcinB1÷LfcinB9 върху BALB/с3Т3 клетки, след 72 часа третиране в концентрации от 15 до 4000 µM. n = 4

Изследването за определяне на евентуална цитотоксичност на новосинтезираните пептидни аналози проведохме с миши ембрионални фибробласти BALB/с3Т3 клон А31. Както се вижда от профила на графиката представена на **Фигура 72**, наблюдаваната цитотоксичност е от дозозависим тип, за изследваните пептиди. Въз основа на получените сигмоидални криви изчислихме IC_{50} стойностите (**Таблица 20**). Изследваните пептиди не проявяват цитотоксичен ефект, при концентрации по-малки от 1000 µM. За пептидът LfcinB3 изчислената IC_{50} стойност е 1663.98 ± 19.38 , при всички останали пептиди IC_{50} стойностите надвишават 2770 µM, като разликата между тях не е статистически значима.

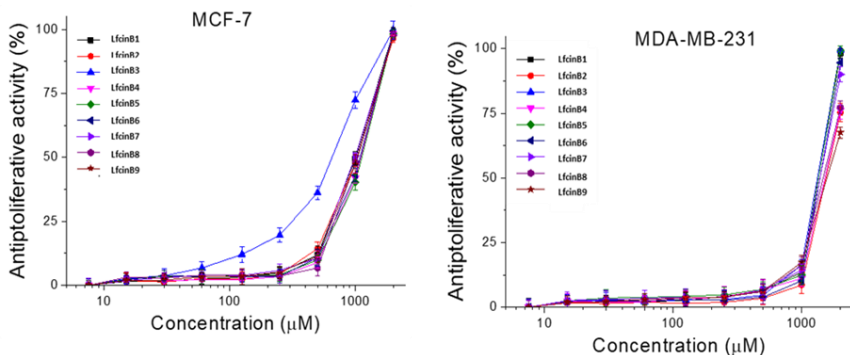
5.2. Оценка за антипролиферативен ефект чрез МТТ-тест

В първата група експерименти бяха изследвани антипролиферативните ефекти на пептиди LfcinB1÷LfcinB9 след 72 часа върху, нетуморогенната клетъчна линия MCF-10A (*Фигура 73*).



Фигура 73. Антипролиферативен ефект на пептиди LfcinB1÷LfcinB9, при нетуморогенната клетъчна линия MCF-10A (модел на здрава тъкан). Изследвани концентрации от 7.5 до 2000 µM. n = 4

От анализа на получените резултати се установи, че в тествания концентрационен диапазон от 500 µM, върху нетуморогенната клетъчна линия MCF-10A не се наблюдава антипролиферативен ефект. Изчислените IC₅₀ стойностите са между 1000 и 1500 µM (*Таблица 20*).



Фигура 74. Антитуморна активност на пептиди LfcinB1÷LfcinB9, определена при туморните клетъчни линии MCF-7 и MDA-MB-231 (модел на рак на гърдата). Изследвани концентрации от 7.5 до 2000 µM. n = 4

Следващата група експерименти проведохме върху клетъчните линии MCF-7 и MDA-MB-231 (**Фигура 74**). Клетъчната линия MCF-7 е модел на луминален-А тип, хормон зависим рак на гърдата. Изчислените IC_{50} стойностите са сходни с тези при нетуморогенните клетки (MCF-10A), с изключение на пептида LfcinB3, при който се наблюдава повишен антипролиферативен ефект със стойност на $IC_{50} = 690.32 \pm 39.28$. При моделът на базален тип рак на гърдата (MDA-MB-231) изследваните пептиди са не активни.

Резултатите от изпитването за цитотоксичен и антипролиферативен ефект на новосинтезираните лактоферицинови аналози можем да обобщим в **Таблица 20**.

Таблица 20. Определени средни IC₅₀ стойности, изразени в $\mu\text{M} \pm \text{SD}$

Активност/ Кл. линия Пептид	IC ₅₀ \pm SD (μM)			
	Цитотоксична активност	Антипролиферативна активност		
		BALB 3T3	MCF-10A	MCF-7
LfcinB1	2810,13 \pm 5,53	1069,99 \pm 64,7	1013,38 \pm 48,32	1428,6 \pm 24,61
LfcinB2	2777,82 \pm 29,38	945,26 \pm 45,32	1049,89 \pm 72,8	1621,56 \pm 38,53
LfcinB3	1663,98 \pm 19,38	1175,03 \pm 65,01	690,32 \pm 39,28	1405,76 \pm 19,31
LfcinB4	2874,08 \pm 29,33	1427,8 \pm 36,85	1143,7 \pm 27,53	1599,58 \pm 45,67
LfcinB5	2817,61 \pm 20,67	1362,99 \pm 50,32	1168,03 \pm 44,05	1432,91 \pm 27,3
LfcinB6	2892,97 \pm 20,23	1348,42 \pm 30,51	1121,66 \pm 37,81	1472,22 \pm 9,33
LfcinB7	2864,73 \pm 24,42	1148,69 \pm 43,89	995,22 \pm 13,08	1472,57 \pm 30,44
LfcinB8	2893,66 \pm 11,6	1098,42 \pm 86,94	1042,22 \pm 26,32	1552,00 \pm 31,44
LfcinB9	2845,15 \pm 19,8	1208,09 \pm 35,76	1055,19 \pm 62,47	1650,26 \pm 26,31

5.3. Индекс на селективност (SI):

Един основен проблем на противораковите лекарствени средства е тяхната ниска селективност спрямо туморните клетки. Известно е, че повечето използвани в клиничната практика противоракови лекарства повлияват развитието (пролиферацията) не само на раковите, но и на нормалните човешки клетки като сериозен страничен ефект. Ето защо при разработването на нови противоракови съединения е много важно да се определи дали и до каква степен тези новосинтезирани вещества повлияват пролиферацията и на нормалните клетки. Поради тази причина е въведен индексът на селективност (англ. selectivity index, SI) като важна характеристика за вещества, показали многообещаваща биологична активност. Накратко SI се дефинира като съотношението на IC₅₀ стойностите на изследваното вещество на нераковата (референтна) клетъчна линия към неговите IC₅₀ стойности на всяка една тествана раковата клетъчна линия. Колкото по-голяма е стойността на SI, толкова по-селективно е съединението спрямо туморните клетки като стойности на SI > 2 се считат за изразена селективност. В идеалния случай изследваната проба трябва да убие раковите клетки, но не трябва да

засяга нормалните такива. От получените стойности за SI може да се определи дали изпитваната проба подлежи на последващи проучвания.

Ние проведехме скрининг, проучващ селективността на синтезираните пептиди спрямо луминален аденокарцином на млечна жлеза тип А (MCF-7) и тройно негативен карцином на млечна жлеза (MDA-MB-231). Чрез първоначалното изследване, което направихме на нативната последователност и на осемте нейна налалога, определихме, че най-висока стойност на SI (1,7) показва LfcinB3. Останалите осем проби не показват селективност към раковите клетъчни линии (MCF-7, MDA-MB-231). От получените резултати върху двете туморогенни клетъчни линии се отчита по-висока активност спрямо MCF-7. На **Таблица 21** е представен индексът на селективност (SI) на пептидните аналози.

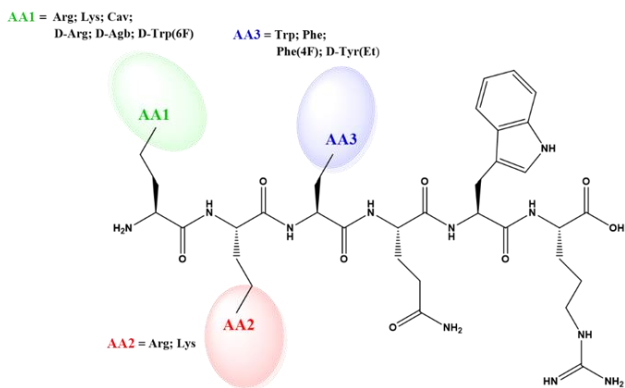
Таблица 21. Селективен индекс

Кл. линия Пептид	SI	
	MCF-7	MDA-MB-231
LfcinB1	1,06	0,75
LfcinB2	0,9	0,58
LfcinB3	1,7	0,84
LfcinB4	1,25	0,89
LfcinB5	1,17	0,95
LfcinB6	1,2	0,92
LfcinB7	1,15	0,78
LfcinB8	1,05	0,71
LfcinB9	1,14	0,73

Като заключение от проведените тестове за цитотоксичност и антипролиферативни ефекти върху изследваните ракови клетки може да се обобщи, че LfcinB(20-25) и неговите аналози като цяло не проявяват активност в тествания концентрационен диапазон.

6. Връзка структура-активност

Главната цел на настоящата дисертация е да се направи оценка на терапевтичния потенциал свързан с появата на антибактериален, цитотоксичен или антипролиферативен ефект при новосинтезираните пептидни миметици, включващи небелтъчни базични и ароматни АК. Съобразно така поставената цел, изследвахме селективността и биологичните ефекти (антибактериални, цитотоксични и антипролиферативни) посредством скрининг на новосинтезираните пептиди върху различни бактериални и гъбични щамове, ракови клетки и една неракова клетъчна линия. Изследването на LfcinB(20-25) аналозите беше провокирано от желанието ни да установим влиянието на вида и броя химични модификации, върху тяхната активност, съпоставяйки резултатите спрямо ефектите на изходния пептид. Впоследствие, получените резултати от биологичните тестове ни дадоха възможност да установим тенденциите, свързани с вида (качествена оценка) и броя (количествена оценка) на АК последователности в структурата на синтезираните пептиди.



Фигура 75. Анализ на взаимовръзка химическа структура-биологична активност (SAR) въз основа на синтезираните и изследвани в настоящата дисертация LfcinB(20-25) аналози.

Съществуват някои основни закономерности по отношение връзка структура-биологична активност, характерни за скъсените LfcinB аналози. Установено е, че за антимикробния ефект е важно наличието на RRWQWR мотивът, съответстващ на аминикиселинната последователност 20-25 от молекулата на LfcinB (*Huertas Méndez et al., 2017*). С цел да изясним връзката структура-биологична активност, синтезирахме нативният аналог LfcinB1 и осем негови миметика LfcinB2÷LfcinB9. Направените от нас модификации са в N-края на молекулата, засягащи позиците 20-21-22 (*Фигура 75*).

Първата част от нашите изследвания беше свързана с изследване на химичната стабилност на модифицираните пептиди при използването на спектрофотометричен (UV-Vis) метод. В резултат на проведените времево- и рН-зависими експерименти установихме, че тестваните пептидни миметици във всички случаи са химично и хидролитично стабилни в разтвор за повече от 4 часа. Аналогът LfcinB3, при който Arg е заменен с Lys в 21 позиция, демонстрира по-висока хидролитична стабилност, в среди с различно рН спрямо нативният LfcinB1 (*Фигури 64, 65 и 66*). В кисела среда, имитираща рН на стомах, LfcinB3 показва 100% стабилност до 4 час (*Фигура 64, Таблица 16*). При внасяне обаче на същата АК - Lys на 20 позиция (LfcinB2), устойчивостта намалява и пептидът отчита по-ниска хидролитична стабилност, спрямо нативния LfcinB1.

Всички аналози на LfcinB имат подобрена хидролитична стабилност в неутрално рН 7.4, с изключение на LfcinB2. Модификациите, включващи непротеиногенни D-АК, като D-Тур(Ет)(LfcinB6) в 22 позиция и D-Агб(LfcinB9) в 20 позиция, подобряват хидролитичната стабилност в алкално рН - 100% до 4 час (*Таблица 16*).

Направените модификации в структурата на LfcinB с по-слабо базични АК като Lys; ароматни АК(Трп); непротеиногенни L- и D-АК, водят до подобрена хидролитична стабилност.

В заключение може да се каже, че пептидни аналози LfcinB3 и LfcinB6 проявяват максимална структурна стабилност в среди с различно рН.

Втората част от нашите изследвания беше свързана с проверка за антимикробното действие на пептидите LfcinB1÷LfcinB9. Експериментите бяха проведени върху общо три щама - два бактериални и един гъбичен щам: (*Escherichia coli* (Грам (-)), *Staphylococcus aureus* (Грам (+)) и гъбичен *Candida albicans*).

Определена антимикробна активност проявяват три от новосинтезираните аналози на LfcinB(20-25). Замяната на Arg с Lys в 21 позиция (LfcinB3), запазва антимикробната активност на нативната последователност (**Таблица 16, 18 и 20; Фигури 67, 69, 71**). Антимикробна активност проявяват и пептидите със замяна на Trp в позиция 3 с Phe(4F) аналог LfcinB5 и с D-Tyr(Et) аналог LfcinB6.

Във всички случай модификациите в позиция 20 на проучваният фрагмент не се толерират. Запазването на Arg в тази позиция (LfcinB3, LfcinB5 и LfcinB6) е важно за проявата на антимикробния ефект. Активност спрямо *S. aureus* демонстрират само аналози, съдържащи Arg в позиция 20.

Основавайки се на получените данни за антимикробният ефект на пептидите изведохме следния ред на активност спрямо тестваните антибактериални щамове: **LfcinB3 ~ LfcinB1 > LfcinB6 > LfcinB5**. Получените модифицирани пептиди определихме като перспективни за бъдещи изследвания.

Като краен етап на нашите изследвания всички пептиди LfcinB1÷LfcinB9 бяха тествани за цитотоксичен/антипролиферативен ефект. Експериментите бяха проведени върху общо три ракови клетъчни линии (MDA-MB-231, MCF-7 и MCF-10A) и две неракови клетъчни линии (MCF-10A и BALB/c 3T3).

От проведените тестове за цитотоксични/антипролиферативни ефекти върху изследваните ракови клетки може да се обобщи, че направените структурни модификации не водят до проява на цитотоксичност в рамките на тестваният концентрационен диапазон, с изключение на LfcinB3, който демонстрира повишен антипролиферативен ефект срещу модел на луминален тип А хормон зависим рак на гърдата (**Таблица 20, Фигура 74**).

Така проведените експерименти ни позволиха да постигнем една от основните цели на настоящия дисертационен труд, а именно да се изведат някои закономерности на взимовръзката химическа структура-биологична активност (англ. structure-activity relationships, SAR).

Като обобщение може да заключим, че единичната замяна на Arg²⁰ в мотива на RRWQWR определихме като модификация, която не води до появата на търсения биологичен ефект. Останалите модификации направени в позиции Arg²¹ и Trp²² определяме като положителни и могат да послужат като векторни молекули за понататъшното разработване на нови LfcinB антимикробни аналози.

V. ИЗВОДИ

1/ Получени са три защитени производни на небелтъчните аминокиселини Phe(4-F), Trp(6-F) и Cav: Fmoc-L-Phe(4-F)-OH, Boc-D-Trp(6-F)-OH и Fmoc-L-Cav(Boc)-OH с висок добив и химическа чистота. Те са целеви модификанти за синтеза на лактоферицинови олигопептидни аналози.

2/ Чрез твърдофазен пептиден синтез са получени нативна молекула **RRWQWR** и осем аналога на говеждият лактоферицин(20-25) с висок добив, химична чистота от 98% и коректна молекулна маса. Проучени и установени са най-ефективните кондензационни реагенти и защитни групи на АК за синтеза на целевите молекули. Направени са замени в първа, втора и трета позиция на фрагмента **RRWQWR** :

- В първа позиция Arg е заменен с неговият структурен непротеиногенен аналог Cav (LfcinB8), с протеиногенната аминокиселина Lys (LfcinB2), както и с D-аминокиселините – D-Trp(6F) (LfcinB7) и D-Agb (LfcinB9);
- Във втора позиция замяна е направена на Arg с Lys (LfcinB3);
- В трета позиция Trp е заменен с Phe (LfcinB4), Phe(4F) (LfcinB5) и D-Tyr(Et) (LfcinB6).

3/ Определена е хидролитичната и химична стабилност на новосинтезираните пептидни молекули. Всички изследвани аналози показаха висока стабилност (>95%) както в рН-зависимите, така и във времево-зависимите експерименти. Установената висока стабилност при всички LfcinB1-пептидомиметици показват, че в рамките на проведените тестове,

не променят химическата си структура. Най-висока структурна стабилност проявяват пептидите LfcinB1, LfcinB3 и LfcinB6.

4/ От изследваната инхибиторната активност на пептидните молекули спрямо *Escherichia coli* - ATCC25922, *Staphylococcus aureus* - ATCC25923 и *Candida albicans* - ATCC10231 могат да се направят следните изводи:

- Срещу *Staphylococcus aureus* - ATCC25923, антимикробна активност демонстрират четири хексапептидни аналога - LfcinB1, LfcinB3, LfcinB5 и LfcinB6.
- Минимална фунгицидна концентрация демонстрира само LfcinB1 спрямо *Candida albicans* - ATCC10231 при концентрация от 96 µg/ml.

5/ При изследваните пептиди наблюдаваната активност (цитотоксична и антипролиферативна) е от дозозависим тип:

- При проведенят NRU-анализ върху нетуморогенната клетъчна линия BALB/c 3T3 изследваните пептиди не проявяват цитотоксичен ефект, при концентрации по-малки от 1000 µM.

Тестваните хексапептиди не показват значим антипролиферативен ефект върху нетуморогенните клетки. Най-висок инхибиторен ефект демонстрира пептидът LfcinB3 (690,32 ± 39,28) спрямо луминален аденокарцином на млечна жлеза тип А (MCF-7).

VI. ПРИНОСИ

Настоящето научно изследване е с фундаментална насоченост, като основният научен принос се състои в разширяване на познанията в областта на разработването на биологично активни пептиди и установяване на взаимовръзката структура-биологична активност. В настоящата дисертация са включени изследвания свързани с целенасочения ефективен твърдофазен синтез, определяне на хидролитична стабилност и биологичен ефект на нови пептидни аналози/миметици на **RRWQWR**.

1/ Получени са 9 говежди лактоферицинови аналози на фрагмента **RRWQWR** (от които 8 новосинтезирани и неописани в литературата), при които са направени замени в N-края на молекулата с небелтъчни базични и ароматни АК;

2/ Изследвана е антибактериалната и антипролиферативната активност на общо 9 пептидни аналози. Направена е оценка на въведените модификации (АК замяна) на базата на взаимовръзката структура-биологичен ефект, и е определен потенциалът на пептидите да бъдат използвани като агенти за третиране на бактериални и ракови клетки. Данните за хидролитичната стабилност на изследваните съединения са основа за последващи процеси на оптимизация и селекция на нови активни структури;

3/ Експериментално е доказано, че замяната на Arg²¹ с Lys и Trp²² с небелтъчни АК потенцира или запазва биологичният ефект на LfcinB(20-25) аналозите, докато замяната на Arg²⁰ води до загубата на ефективността на молекулата;

4/ Идентифицирани са три съединения (LfcinB3, LfcinB5 и LfcinB6), като водещи последователности за бъдещо разработване

на по-ефективни LfcinB(20-30)-миметици, които могат да послужат като основа за последваща оптимизация при разработването на биологично активни пептиди. Изследователските резултати ще провокират последващи, надграждащи фундаментални проучвания в областта на лактоферициновите аналози, при разработване на нов клас по-активни и специфични лекарствени продукти.

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

Публикации:

1. **Dimitrova D**, Lambev M, Hristova A, Mihaylova S, Valcheva-Kuzmanova S, Pajpanova TI (2018) Антимикробни пептиди – потенциално решение срещу микробната резистентност. *Варненски медицински форум 7: 195-202.*
2. **Dimitrova D**, Hristova A, Lambev M, Mihaylova S, Pajpanova TI, Valcheva-Kuzmanova S (2019) Review on the pharmacological activities of lactoferricin and lactoferricin analogues. *Scripta Scientifica Medica 51 (2): 15-22.*
3. **Dimitrova D** (2022) Short peptide analogs of LfcinB synthesized by Solid Phase Peptide Synthesis as an alternative to global microbial resistance. *Acta Scientifica Naturalis 9 (1): 56–64.*

Участия в научни форуми:

1. **Dimitrova D**, Hristova A, Lambev M, Pajpanova T, Valcheva-Kuzmanova S Antimicrobial peptides.Lactoferrin activity. Национална научна конференция „15 години фармация в Медицински университет – Пловдив“, гр. Девин, 01-03 юни 2018 г.
2. **Dimitrova D**, Lambev M, Hristova A, Mihaylova S, Valcheva-Kuzmanova S, Pajpanova TI Антимикробни пептиди – потенциално решение срещу микробната резистентност. Седма научна сесия за преподаватели и студенти на Медицински колеж – гр. Варна, 05-06 октомври 2018 г.
3. **Dimitrova D**, Sandor V, Mihaylova S, Dzimbova T, Radeva G, Kilar F, Pajpanova T Synthesis and Analysis of Short Cationic Antimicrobial Peptides Structural Analogues of LfB(20-30). Юбилейна научна конференция „100 години от рождението на Акад. Румен Цанев“; 5-7 октомври 2022г, София

Участия в международни научни форуми:

1. **Dimitrova D**, Sandor V, Iliev I, Mihaylova S, Dzimbova T, Radeva G, Kilar F, Pajpanova T Antimicrobial peptides structural analogues of lfb(20-30). 36th European and 12th international peptide symposium august 28 to september 2, 2022; Barcelona, Spain

VIII. НАУЧНИ ПРОЕКТИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Проект на тема: **„Фармакобиохимични изследвания на моделни катионни пептиди с потенциално антимикробно действие“**. Ръководител – от страна на МУ Варна - проф. Н. Негрев, от страна на ИМБ–БАН – доц. Т. Пайпанова. Източник на финансиране – Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - гр. Варна, 2015-2016
2. 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“ – гр. Варна.