



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

ДЕПАРТМЕНТ ПО ХИМИЧНИ НАУКИ

КАТЕДРА „ОРГАНИЧНА ХИМИЯ”

Светлана Цончева Стайкова

**ТВЪРДОФАЗЕН ПЕПТИДЕН СИНТЕЗ НА
СОМАТОСТАТИНОВИ АНАЛОЗИ С ОЧАКВАНО
ПРОТИВОТУМОРНО ДЕЙСТВИЕ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен „доктор”
по научна специалност 4.2. Химически науки /Органична химия/

Научни ръководители: проф. д-р инж. Емилия Найденова
проф. дхн инж. Любомир Везенков

Научно жури:

1. доц. д-р Данчо Даналев - председател, рецензент
2. доц. д-р Тамара Пайпанова - рецензент
3. проф. дхн Любомир Везенков
4. проф. д-р Рени Калфин
5. доц. д-р Иванка Станкова

София, 2013

Дисертационният труд е написан на 96 страници и съдържа 38 фигури, 8 таблици и 1 схема. Цитирани са 178 източника.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на разширен научен съвет на научното звено на катедра „Органична химия”, състояло се на 14. 12. 2012 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 15. 04. 2013 г. от 14.00 часа в зала 424, сграда „А” на ХТМУ.

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

БЛАГОДАРЯ

НА НАУЧНИТЕ МИ РЪКОВОДИТЕЛИ

ПРОФ. ЕМИЛИЯ НАЙДЕНОВА И ПРОФ. ЛЮБОМИР ВЕЗЕНКОВ!

БЛАГОДАРЯ НА КОЛЕКТИВА ОТ КАТЕДРА „ОРГАНИЧНА ХИМИЯ”!

***БЛАГОДАРЯ НА ПРОФ. ДИАНА ВЕСЕЛИНОВА И ДОЦ. ИВАН ГОШЕВ ЗА
СЪДЕЙСТВИЕТО ПРИ ПРОВЕЖДАНЕ НА БИОЛОГИЧНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ!***

БЛАГОДАРЯ ЗА СЪДЕЙСТВИЕТО НА ДОЦ. ТАМАРА ПАЙПАНОВА!

БЛАГОДАРЯ ЗА ПОДКРЕПАТА НА ДОЦ. ДАНЧО ДАНАЛЕВ

И ИНЖ. СТАЙКО СТАЙКОВ!

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Всички аминокиселини са обозначени чрез трибуквените им съкращения, приети от системата на IUPAC

Ac5c	1-аминоциклопентан карбоксилна киселина
Ac6c	1-аминоциклохексан карбоксилна киселина
Aib	α -аминоизобутанова киселина
Acn	Ацетамидометил
AcOH	Оцетна киселина
AAPH	2,2'-азобис-2-метил-пропанимидамид дихидрохлорид
Boc	Третичен бутилоксикарбонил
BOP	бензотриазол-1-ил-N-окси-фосфониев хексафлуорофосфат
Dab	2,4-диаминобутанова киселина
Dap	2,3-диаминопропанова киселина
DCC	N,N'-дициклохексилкарбодиимид
DCM	Дихлорометан
DIC	N,N'-диизопропилкарбодиимид
DIPEA	N,N'-диизопропилетиламин
DOX	Доксорубуцин
DMF	N,N'-диметилформаид
Fmoc	9-Флуоренилметилоксикарбонил
GA	3,4,5-трихидроксибензоена киселина
GH	Растежен хормон
GPCR	Рецептори, свързани с G-белтъци

GTP	Гуанозинтрифосфат
HOBt	1-Хидроксibenзотриазол
HORAC	Метод за определяне на антиоксидантна активност спрямо хидроксилни радикали
HPLC	Високо ефективна течна хроматография
IC ₅₀	Концентрация на цитостатика, при която се наблюдава 50% смъртност на клетките
IGF-I	Инсулин-подобен растежен фактор
MTS	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сулфофенил)-2Н-тетразолиева сол
NADH	Никотинамид-аденин-динуклеотид, редуциран
NADPH	Никотинамид-аденин-динуклеотид фосфат, редуциран
ORAC	Метод за определяне на антиоксидантна активност спрямо пероксилни радикали
PES	N-етилдибензопиразиниев етилсулфат
ROS	Реактивни кислородни видове
RNS	Реактивни азотни видове
SST	Соматостатин
sstr	Соматостатинов рецептор
SPPS	Твърдофазен пептиден синтез
<i>t</i> -Bu	Третична бутилова група
TBTU	2-(1Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилкарбамид тетрафлуороборат
TCEP	Трис(2-карбоксиетил)фосфин
TCTU	O-(1Н-6-хлорбензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурониев тетрафлуороборат

TFA	Трифлуорооцетна киселина
TIS	Триизопропилсилан
Tle	2-амино-3,3-диметил бутанова киселина (трет. левцин)
Tl(tfa) ₃	Талиев трифлуороацетат
TROLOX	6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина

ВЪВЕДЕНИЕ

Онкологичните заболявания, наред със сърдечно съдовите заболявания са водещ медицински проблем на нашия век. Раковите заболявания са вторите по разпространение заболявания след сърдечно-съдовите. В България различните видове рак са причина за 13-15% от общата смъртност на населението. Противно на световната реалност, у нас смъртността от рак драстично се увеличава. По статистика на Министерството на здравеопазването и Националния център по опазване и контрол на общественото здраве ежегодно у нас от онкологични заболявания се разболяват средно по 34 000 души. Поради относителната ефективност и значителните нежелани странични реакции на съществуващите досега методи на лечение на раковите заболявания се търсят нови по-ефективни лекарствени препарати, с по-малко странични ефекти и по-висока селективност. Ето защо научните изследвания в световен мащаб са насочени, както в създаването и изследването на нови противоракови средства така и в търсене на пътища за намаляване токсичността и повишаване на селективността на използваните в клиничната практика такива. Надеждна алтернатива на масово използваните до сега онкотерапевтици представляват пептидите. Установено е, че редица пептиди, синтезирани на основата на природни компоненти проявяват противотуморна активност *in vitro* и/или *in vivo*. Основното им преимущество пред класическата лекарствена терапия е силно редуцираната токсичност. Наред с това е необходимо те да притежават и висока плазмена устойчивост, биологична активност, както и да се синтезират лесно и с високи добиви.

Хормонът соматостатин е природен пептид, изпълняващ редица биологични функции в човешкия организъм, наред с които показва и противотуморна активност. Недостатък на този пептид, подобно на останалите природни пептиди е, че бързо се разгражда под действие на пептидазите. Ето защо са синтезирани различни соматостатинови аналози с цел повишаване, както на биологичната им активност, така и на плазмената им устойчивост. Някои от тях се използват в клиничната практика при терапията и диагностиката на ракови заболявания, а други са в процес на клинично изследване.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Научните изследвания са насочени към създаването на скъсени соматостатинови аналози с оглед терапевтичното им приложение при ракови заболявания, за използването им като противовъзпалителни и противоболкови средства при заболявания като ревматоиден артрит и др. Някои от създадените до момента намират приложение в клиничната практика при третирането и диагностиката на хормон-зависими тумори, както и симптомите свързани с тях (Октреотид, Вапреотид и др.).

Целта на настоящата дисертационна работа е синтез и биологичен скрининг на модифицирани скъсени аналози на Соматостатин, както и изследване на връзката структура – биологична активност.

Въз основа на така формулираната цел си поставихме следните задачи:

1. Синтез и изследване на цитотоксичната активност на модифицирани в 5-а и 6-а позиция циклични октапептидни амидни аналози на соматостатиновия аналог Октреотид (D-Phe¹-c(Cys²-Phe³-D-Trp⁴-**Lys**⁵-**Thr**⁶-Cys⁷)-Thr⁸-ol).

2. Синтез и изследване на цитотоксичната активност на модифицирани в 5-а и 6-а позиция циклични октапептидни аналози на Вапреотид (RC-160: D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-**Lys**⁵-**Val**⁶-Cys)-Trp-NH₂) и RC-121 (D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-**Lys**⁵-**Val**⁶-Cys)-Thr-NH₂).

3. Синтез на нови линейни аналози на соматостатиновия аналог BIM-23052 (DC-23-99 D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂), в който аминокиселината Thr в 6-а позиция да бъде заместена с пространствено запрещените Tle, Ac5c, Ac6c и Aib.

4. Синтез и изследване на цитотоксичната активност на линейни аналози на соматостатиновия аналог BIM-23052, включващи към аминокрая последователността Pro-Phe/D-Phe-Val/D-Val-Tyr-Leu-Ile, съставена от хидрофобни аминокиселини с цел улесняване проникването в клетъчната мембрана.

5. Изследване на антиоксидантната активност на новосинтезираните пептиди.

ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ

1. Методи на синтез

Синтезите извършихме чрез твърдофазен метод за пептиден синтез (SPPS–Solid Phase Peptide Synthesis) - Fmoc – стратегия. Като твърдофазен носител използвахме Rink Amide MBHA смола за получаването на C-крайни амиди. Методът се основава на последователното свързване на активирани аминокиселини с Fmoc - защитена α -аминогрупа, както и подходящо защитена странична функционална група към неразтворим полимерен носител. Защитните групи за трифункционалните аминокиселини бяха така подбрани, че да се отстраняват лесно при деблокиране на пептидите от смолата и да не се деблокират в условията на създаване на пептидната връзка. Те бяха защитени както следва: Thr като N^{α} -Fmoc-Thr(tBu)-OH, Cys като N^{α} -Fmoc-Cys(Asm)-OH, Lys като N^{α} -Fmoc-Lys(Boc)-OH, Orn като N^{α} -Fmoc-Orn(Boc)-OH, Dab като N^{α} -Fmoc-Dab(Boc)-OH, Dar като N^{α} -Fmoc-Dar(Boc)-OH, D-Trp като N^{α} -Fmoc-D-Trp(Boc)-OH, Tyr като N^{α} -Fmoc-Tyr(tBu)-OH. За защита на $^{\alpha}$ N-аминогрупата на N-крайната аминокиселина избрахме трет.-бутилоксикарбонилната група (Boc), което позволява едновременно ѝ деблокиране заедно с останалите странични защитни групи в крайния етап на синтезата. Като кондензиращи реагенти използвахме TBTU (2-(1-ОН-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметил карбамид тетрафлуороборат) или DIC (N,N' -диизопропилкарбодиимид) и антирацемизираща добавка - HOBT (1-хидроксibenзотриазол). Реакциите на кондензация с посочените кондензиращи реагенти провеждахме със смес от: Fmoc-аминокиселина/ TBTU (TCTU)/ DIEA/ HOBT/пептидил-смола в отношение 3/3/9/3/1. DIC използвахме в много редки случаи, когато при многократно повторение на кондензациите с TBTU и TCTU реакцията не протичаше. Реакциите на кондензация с DIC проведохме при взаимодействие на DIC, HOBT, N-защитена аминокиселина (Fmoc-аминокиселина, карбоксилен компонент) и пептидил-смола (аминокомпонент) съответно в отношение 3/3/3/1. Fmoc-групата бе деблокирана преди всяка кондензация с помощта на 20% разтвор на пиперидин в DMF. Пълното протичане на реакциите на отстраняване на Fmoc-групата и на образуване на пептидната връзка следяхме чрез стандартен Кайзер тест. Образуването на дисулфидния мост в цикличните пептиди бе извършено върху твърдофазния носител с помощта на $Tl(tfa)_3$ в присъствие на анизол и среда на DMF. S-ацетамидометилната (Asm) защитна група на цистеиловите остатъци се деблокира едновременно със създаването на дисулфидния мост, докато страничните групи на останалите

аминокиселини са защитени. Тяхното отстраняване се извърши при крайното деблокиране на пептида от смолата с помощта на смес от 95% трифлуорооцетна киселина (TFA), 2,5% триизопропилсилан (TIS) и 2.5% д.Н₂О. Пептидът бе утаен чрез прибавяне на охладен безводен етилов етер.

2. Методи за анализ и идентификация

Пептидите бяха доказани и охарактеризирани чрез електроспрей йонизационна мас-спектрометрия, комбинирана с високо ефективна течна хроматография с обърната фаза на HPLC апарат Waters 600 S controller с photodiode array-детектор, колона C₁₈ 3.5 μ m (125x2.1 mm) (Waters Co) при скорост на потока 200 μ l/min и линеен бинарен градиент на фаза В (0.1% НСООН/АсСN) от 10% до 90% за 15 мин (фаза А: 0.1% НСООН/Н₂О). Определени са специфичните ъгли на оптично въртене. Наличието на дисулфиден мост е доказано чрез редукция на цикличните пептиди с ТСЕР (трис-(2-карбоксиетил)-фосфин) и последващо масспектрометриране.

3. Методи за изследване на *in vitro* цитотоксичната активност

Цитотоксичната активност на пептидите бе изследвана чрез MTS метод (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay) върху четири туморни и една нетуморна клетъчни линии с човешки произход:

- Нер G-2: клетъчна линия, получена от карцином на черен дроб
- MDA-MB-231 - клетъчна линия, получена от аденокарцином на млечна жлеза
- HT-29 - клетъчна линия, получена от аденокарцином на дебело черво
- HeLa - клетъчна линия, получена от карцином на маточна шийка
- Лер-3 - нормална диплоидна клетъчна линия, получена от бял дроб на 3-месечен ембрион.

MTS реактивът (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сулфофенил)-2Н-тетразолиева сол) се редуцира под действие на кофакторите на дехидрогеназните ензими NADPH и NADH в метаболитно активните (живи) до цветен продукт формаза. Количеството формаза, разтворен в културалната среда е правопропорционално на броя на живите клетки и се отчита при измерване на абсорбцията при 490 nm. Клетките бяха инкубирани с изследваните съединения в концентрации $4 \cdot 10^{-3}$ - $4 \cdot 10^{-8}$ М. Клетъчната виталност е изчислена в проценти спрямо нетретираната със субстанциите контрола (100% преживяемост). Относителната грешка ($RE \pm \max 5\%$) при изчислението на клетъчната виталност е изчислена с помощта на програмния продукт "Excel 2007". IC₅₀/EC₅₀ стойностите са изчислени с помощта на програмния продукт "Origin 6.1".

4. Методи за изследване на антиоксидантна активност

4.1. HORAC (Hydroxyl Radical Averting Capacity) - метод за определяне на антиоксидантна активност спрямо хидроксилни радикали ($\bullet\text{OH}$)

Метода се основава на *in situ* генериране на хидроксилни радикали ($\bullet\text{OH}$) чрез каталитично разлагане на водороден пероксид с помощта на дивалентни соли на метали (Co^{2+}) (Фентонова реакция) в присъствие на флуоресцираща молекула и антиоксидант и последващо отчитане на флуоресценцията на пробата. Измерената флуоресценция е обратно пропорционална на количеството на генерираните хидроксилни радикали. Антиоксидантната способност на изследваното вещество се отчита с помощта на флуоресцин-динатриева сол (λ_{ex} 493 nm, λ_{em} 518 nm), при период на наблюдение - 30 min. Отчетената флуоресценция в присъствие на изследваните съединения се сравнява с празна проба и стандартна проба с галова киселина (GA). Резултатите за антиоксидантна активност са представени като $M_{\text{станд.екв. GA}}/M_{\text{проба}}$.

4.2. ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) - метод за определяне на антиоксидантна активност спрямо пероксилни радикали ($\text{ROO}\bullet$)

Метода е аналогичен на предходния. Генерирането на пероксилни радикали се осъществява при термично разлагане на AAPH (2,2'-азобис-2-метилпропанимидаид дихидрохлорид). Като стандарт е използван водоразтворимият аналог на витамин Е TROLOX (6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина). Получените резултати са представени като $\mu M_{\text{екв. TROLOX}}/M_{\text{изследвано вещество}}$.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Синтез на октапептидни амидни аналози на Октреотид

1.1. Синтез на аналози включващи диаминоалканови киселини в 5-а позиция и Tle в 6-а позиция.

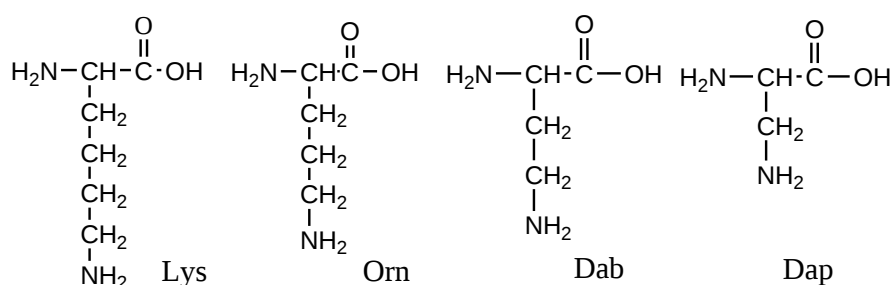
Октреотид (Сандостатин, SMS 201-995: D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys)-Thr-ol) е соматостатинов аналог, който намира приложение в клиничната практика при третиране на ендокринни тумори на храносмилателната система, акромегалия и др. Този аналог е 45-75 пъти по-ефективен в сравнение със соматостатина по отношение инхибиране секрецията на растежен хормон, като инхибира секрецията на инсулин и глюкагон в по-слаба степен и притежава противотуморна активност в изследвания *in vitro* и *in vivo*. В нашите изследвания той бе използван като моделен пептид.

От литературата е известно, че съществуват някои закономерности по отношение връзката структура-активност, характерни за скъсените соматостатинови аналози. Установено е, че важен за биологичната активност е фрагмент, образуващ β -извивка с последователност Phe/Tyr-Trp-Lys-Thr/Val, съответстваща на аминокиселините от 7 до 10 в структурата на соматостатин-14. Също така включването на D-аминокиселини в пептидната верига удължава плазмения полуживот и увеличава биологичната активност, като най-подходяща D-аминокиселина е D-Trp вместо Trp в позиция 4 в октапептидните аналози. Заместването на тази аминокиселина с други води до понижаване на активността. Аминокиселините, разположени в позиция 3 и 6 в октапептидните аналози също оказват голямо влияние върху активността, като с най-добра активност са Phe³/Thr⁶ или Tyr³/Val⁶ заместените октапептидни аналози.

β -структурата, необходима за проява на биологичната активност, се стабилизира чрез вътрешно-молекулна водородна връзка, образувана между N- и C-крайните аминокиселини D-Phe¹ и Thr(ol)⁸. Заместването на C-крайната карбоксилна група с амидна също повишава биологичната активност на аналозите, което е установено след изследване на активността им по отношение инхибиране секрецията на растежен хормон. Соматостатиновите аналози Ланреотид, RC-121, TT-232, притежаващи противотуморна активност *in vitro* и *in vivo* също са под формата на амиди.

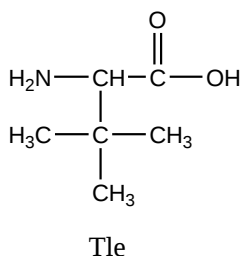
Съгласно установените закономерности по отношение връзката структура-активност, характерни за синтетичните соматостатинови аналози ние синтезирахме серия от аналози на Октреотид със следите модификации:

- Аминокиселината Lys, разположена в 5-а позиция заместихме с Orn (орнитин) и неприродните диаминоалканови киселини Dap (диаминопропанова киселина) и Dab (диаминобутанова киселина). Тези аминокиселини се различават по броя на -CH₂ групите в страничните вериги, а това променя разстоянието на -NH₂ групата в страничната верига от основната пептидна верига и може да окаже влияние върху биологичната активност (Фиг. 1). Целта бе да установим как посочените аминокиселини повлияват активността на новосинтезираните аналози. Известно е, че този лизинов остатък е заместван само с Orn.



Фиг. 1. Структура на Lys, Orn, Dab (2,4-диаминобутанова киселина) и Dap (2,3-диаминопропанова киселина).

- Аминокиселината Thr, разположена в 6-а позиция заместихме с пространствено запречената неприродна аминокиселини Tle (трет. левцин) (Фиг. 2). От литературата е известно, че тази аминокиселина е замествана само с Val.



Фиг. 2. Структура на Tle (2-амино-3,3-диметил бутанова киселина).

- Всички новосинтезирани пептиди са С-крайни амиди с цел повишаване устойчивостта на ензимно разграждане и съответно биологичната активност.

- Съществено значение за активността на соматостатиновите аналози има и дисулфидния мост, образуван в случая между Cys-2 и Cys-7. Част от новосинтезираните аналози са в ациклична форма, в която сулфхидрилните групи на цистеиловите остатъци са защитени с ацетамидометилна (Acm) група. Това дава възможност да оценим значението на дисулфидния мост за биологичната активност на пептидите. От литературата е известно, че някои сходни линейни соматостатинови

аналози проявяват активност и в редуцирана форма, но при изследвания по отношение активността им за потискане освобождаването на растежен хормон.

- Ние синтезирахме и референтния соматостатинов аналог RC-102 (пептид 5) (D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys)-Thr-NH₂), за да сравним неговата *in vitro* противотуморна активност с тази на останалите новосинтезирани аналози. От литературата е известно, че RC-102 инхибира секрецията на растежен хормон, инсулин и глюкагон.

Синтезите извършихме чрез твърдофазен метод за пептиден синтез (SPPS–Solid Phase Peptide Synthesis) по Fmoc – стратегия. Като твърдофазен носител използвахме Rink Amide MBHA смола за получаването на C-крайни амиди.

Защитните групи за трифункционалните аминокиселини бяха така подбрани, че да се отстраняват лесно при деблокиране на пептидите от смолата и да не се деблокират в условията на създаване на пептидната връзка. Те бяха защитени както следва: Thr като N^α-Fmoc-Thr(tBu)-OH, Cys като N^α-Fmoc-Cys(Acm)-OH, Lys като N^α-Fmoc-Lys(Boc)-OH, Orn като N^α-Fmoc-Orn(Boc)-OH, Dab като N^α-Fmoc-Dab(Boc)-OH, Dar като N^α-Fmoc-Dar(Boc)-OH, D-Trp като N^α-Fmoc-D-Trp(Boc)-OH. За защита на α-N-аминогрупата на N-крайната аминокиселина избрахме трет.-бутилоксикарбонилната група (Boc), което позволява едновременното ѝ деблокиране заедно с останалите странични защитни групи в крайния етап на синтезата.

Като кондензиращи реагенти използвахме TBTU (2-(1-ОН-бензотриазол-1-ил)1,1,3,3-тетраметил карбамид тетрафлуоро-борат) или DIC (N,N'-диизопропилкарбодиимид) и антирацемизираща добавка - HOBT (1-хидроксibenзотриазол). Реакциите на кондензация с посочените кондензиращи реагенти провеждахме със смес от: Fmoc-аминокиселина/ TBTU (TCTU)/ DIEA/ HOBT/пептидил-смола в отношение 3/3/9/3/1. DIC използвахме в много редки случаи, когато при многократно повторение на кондензациите с TBTU и TCTU реакцията не протичаше. . Реакциите на кондензация с DIC проведохме при взаимодействие на DIC, HOBT, N-защитена аминокиселина (Fmoc-аминокиселина, карбоксилен компонент) и пептидил-смола (аминокомпонент) съответно в отношение 3/3/3/1. При различните кондензации и по двата метода варирахме излишъците на реагентите (от четирикратен до двукратен), както и реакционното време (от 2.5 до 5-6 часа) в зависимост от броя на повторенията на опитите до протичането на успешна кондензация. Пълното протичане

на реакциите на отстраняване на Fmoc-групата и на реакциите на образуване на пептидната връзка следяхме чрез стандартен Кайзер тест.

Новите съединения синтезирахме по следната обща схема:

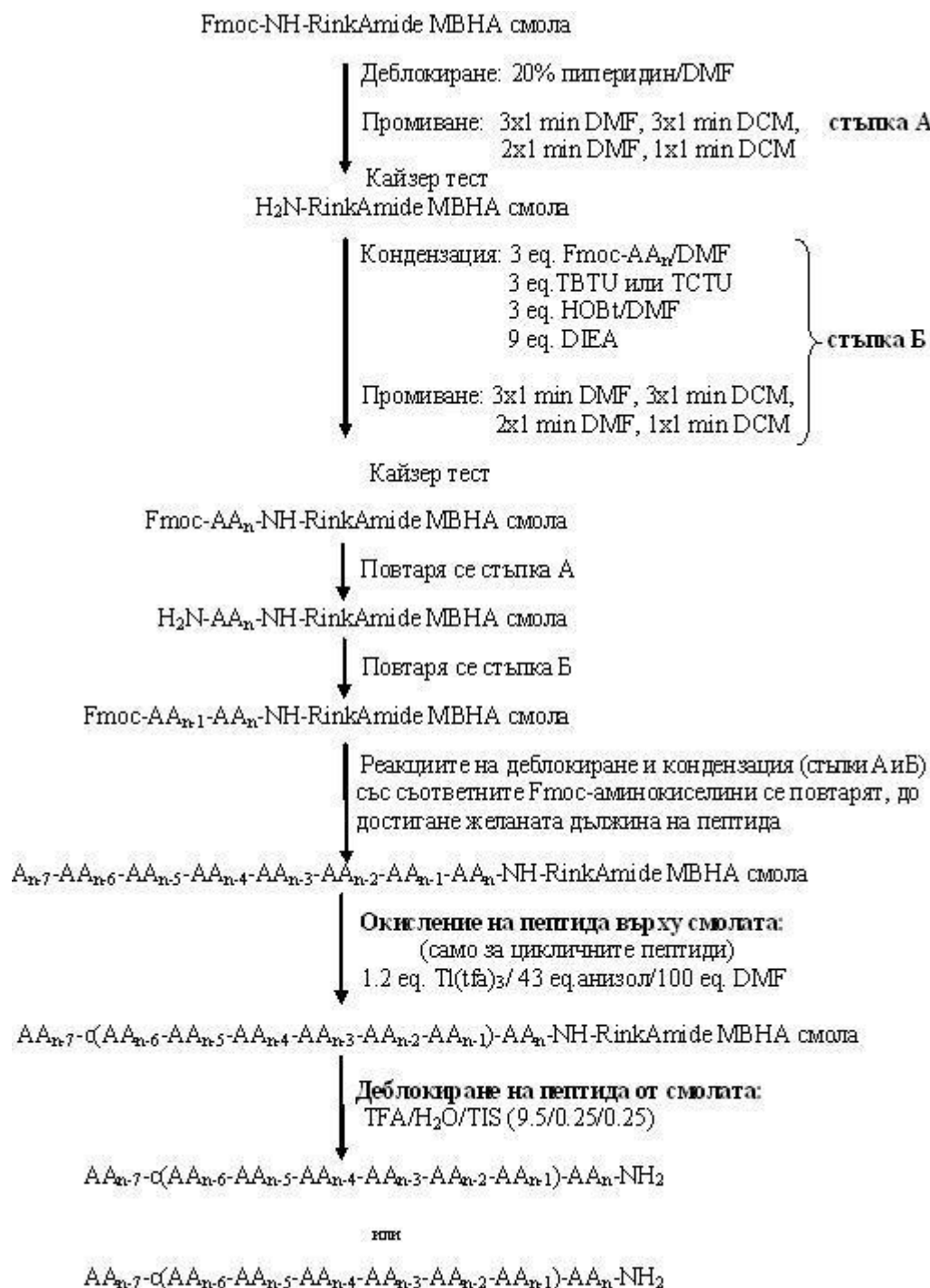


Схема 1. Обща схема на твърдофазен пептиден синтез по Fmoc-стратегия.

Образуването на дисулфидния мост извършихме върху твърдофазния носител с помощта на $\text{Ti}(\text{tfa})_3$, в присъствие на анизол в среда от DMF при 0°C за 2.5 часа. Цистеиловите остатъци бяха защитени със S-ацетамидометилна (Acm) група, която се деблокира едновременно със създаването на дисулфидния мост, докато страничните групи на останалите аминокиселини бяха защитени. Тяхното отстраняване се извърши при крайното деблокиране на пептида от смолата с помощта на TFA. Този метод на окисление ни дава редица предимства в сравнение с останалите методи за окисление:

- снижаване до минимум възможността за образуване на димери, тъй като реакцията се извършва върху твърдофазния носител при голямо разреждане;
- бързо протичане на реакцията – в рамките на 2.5 часа;
- $\text{Ti}(\text{tfa})_3$ е умерен окислител, който дава по-добри добиви и чистота на желаните продукти в сравнение с останалите методи за създаване на дисулфидна връзка;
- лесно отстраняване на остатъчните количества $\text{Ti}(\text{tfa})_3$, чрез промиване на окислената пептидил-смола;

Данните за добива, молекулните маси и специфичните ъгли на оптично въртене на пептидите **1- 5** и **1a-5a** са обобщени в Таблица 1.

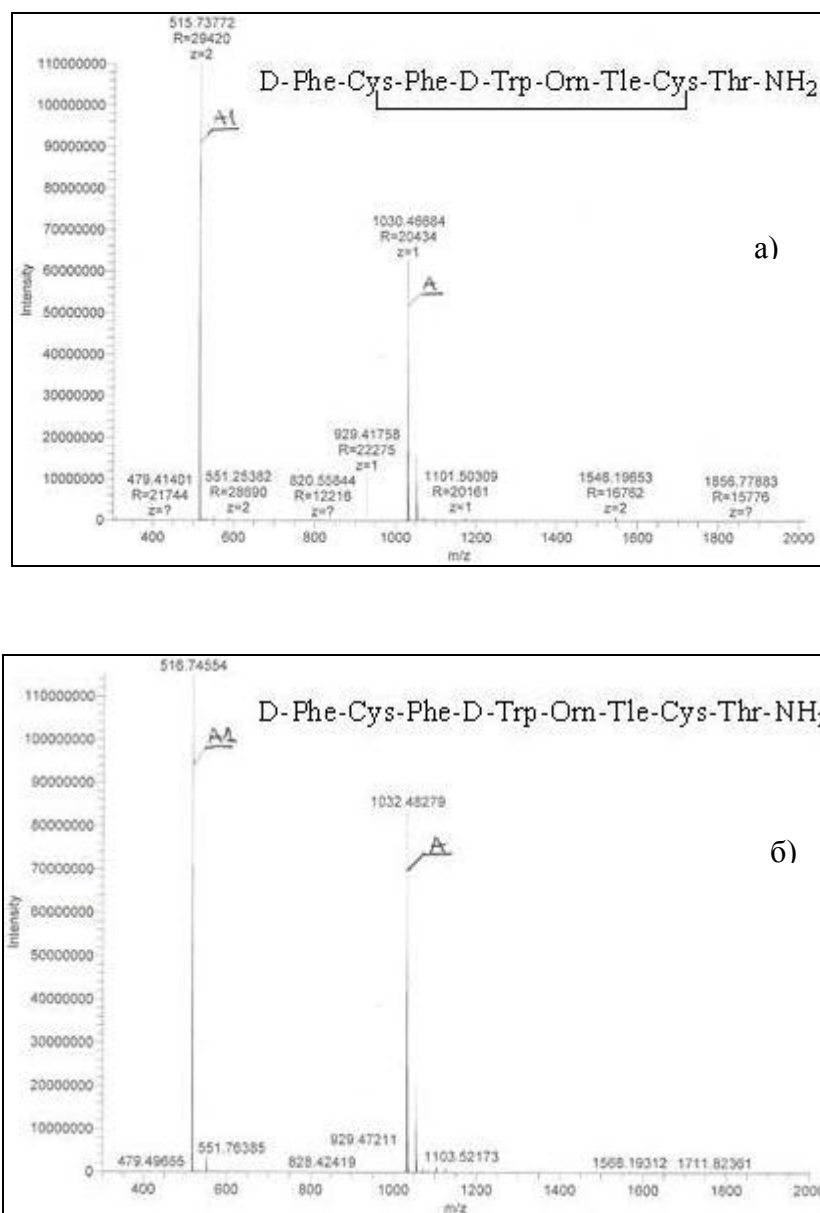
Табл. 1. Структура и характеристика на синтезираните аналози на Октреотид:

№	СТРУКТУРА	БРУТНА ФОРМУЛА	Изчислена MM_{exact}	Намерена $[\text{MH}]^+$	t_R (мин)	α_{546}^{20} *	ПД [%]
1	D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Dab-Tle-Cys)-Thr-NH ₂	C ₄₉ H ₆₅ N ₁₁ O ₉ S ₂	1015.4408	1016.4514	10.51	-76.19	89.1
1a	D-Phe-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Dab-Tle-Cys-(Acm)-Thr-NH ₂	C ₅₅ H ₇₇ N ₁₃ O ₁₁ S ₂	1159.5307	1160.5376	9.12	-45.45	96.8
2	D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Dap-Tle-Cys)-Thr-NH ₂	C ₄₈ H ₆₃ N ₁₁ O ₉ S ₂	1001.4252	1002.9167	9.31	-74.42	89.9
2a	D-Phe-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Dap-Tle-Cys-(Acm)-Thr-NH ₂	C ₅₄ H ₇₅ N ₁₃ O ₁₁ S ₂	1145.515	1146.5208	9.34	-206.89	96.6
3	D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Lys-Tle-Cys)-Thr-NH ₂	C ₅₁ H ₆₉ N ₁₁ O ₉ S ₂	1043.4721	1044.1667	9.30	-73.68	78.9
3a	D-Phe-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Lys-Tle-Cys-(Acm)-Thr-NH ₂	C ₅₇ H ₈₁ N ₁₃ O ₁₁ S ₂	1187.562	1188.0834	9.00	-43.9	93
4	D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Orn-Tle-Cys)-Thr-NH ₂	C ₅₀ H ₆₇ N ₁₁ O ₉ S ₂	1029.4565	1030.4668	10.37	-65.22	80
4a	D-Phe-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Orn-Tle-Cys-(Acm)-Thr-NH ₂	C ₅₆ H ₇₉ N ₁₃ O ₁₁ S ₂	1173.5463	1174.5507	9.04	-38.095	81
5	D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys)-Thr-NH ₂	C ₄₉ H ₆₇ N ₁₁ O ₁₀ S ₂	1031.4357	1032.4401	8,7	-55.32	82
5a	D-Phe-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys(Acm)-Thr-NH ₂	C ₅₅ H ₇₇ N ₁₃ O ₁₂ S ₂	1207.52	1208.5219	8.46	-40.00	82

α_{546}^{20} : Ъгъл на оптично въртене, измерен при 20°C , разтворител: H₂O (c = 0.25); t_R - време на задържане на основния пик на $[\text{MH}]^+$; ПД: практичен добив в %

Наличието на образуваните дисулфидните мостове бе доказано чрез редукция на цикличните пептиди с реагента ТСЕР (трис-(2-карбоксиетил)-фосфин) и последващ мас спектрометричен анализ на редуцираните пептиди. Така например МС-анализа на

пептид **4** с ММ 1029.74 дава пик на $[MH]^+$ с ММ 1030.5, докато след редукция с ТСЕР ММ на пептид **4** е 1031.76, а $[MH]^+$ е със стойност 1032.5 (Фиг. 3).



Фиг. 3. MS хроматограма на пептид **4** преди (а) и след (б) редукция с ТСЕР

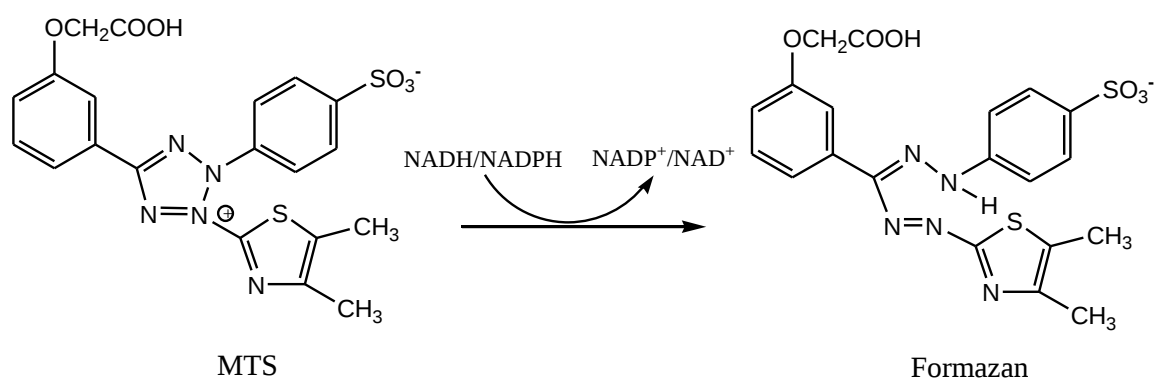
1.2. Изследване на биологичната активност *in vitro* на пептиди 1–5.

In vitro противотуморната активност на пептиди **1-5** бе изследвана в няколко вида туморни клетъчни линии:

- Hep G-2: клетъчна линия, получена от карцином на черен дроб
- MDA-MB-231: клетъчна линия, получена от аденокарцином на млечна жлеза
- HT-29: клетъчна линия, получена от аденокарцином на дебело черво
- HeLa: клетъчна линия, получена от карцином на маточна шийка

Важно значение от биологична гледна точка има това дали веществата притежават селективност към туморните клетки и как повлияват жизнеността на нормалните клетки. Ето защо част от съединенията бяха изследвани и върху Lep-3 нормална диплоидна клетъчна линия, получена от бял дроб на 3-месечен ембрион. Всички клетки, използвани в изследванията за биологична активност са с човешки произход.

Цитотоксичността на аналозите спрямо различните клетъчни линии бе изследвана чрез MTS метод с помощта на кита CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. При този метод се отчита клетъчната жизненост въз основа на конверсията на MTS реактив (реагент на Оуен, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сулфофенил)-2Н-тетразолиева сол) до цветен продукт – формазан в присъствие на феназин етилсулфат (PES) под действие на NADPH или NADH – кофактори на дехидрогеназните ензими в метаболитно активните (живи) клетки (Фиг. 4). Количеството формазан, разтворен в културалната среда е правопрпорционално на броя на живите клетки и се отчита при измерване на абсорбцията при 490 nm.



Фиг. 4. Редукция на MTS реактив до цветния продукт Формазан с участието на митохондриалните дехидрогенази в живите клетки.

Бяха изчислени IC_{50} , съответно EC_{50} стойностите за всяко изследвано вещество. IC_{50} стойностите показват количеството изследвана субстанция, при което 50% от клетките умират. EC_{50} показва половината от максималната ефективна концентрация и представлява способността на дадено вещество да предизвика даден биологичен ефект на половина от максималната му възможна стойност.

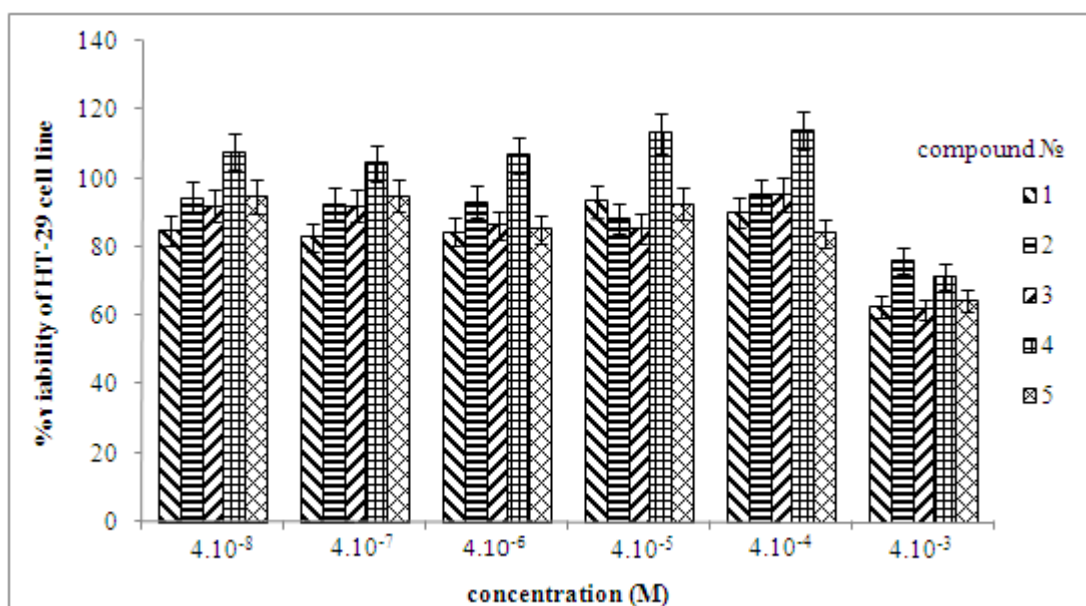
Клетките са инкубирани с различно количество от изследваните съединения в концентрации $4 \cdot 10^{-3}$ - $4 \cdot 10^{-8}$ M, като необходимото количество пептид е разтворено в д. H_2O . Клетъчната жизненост на всяка проба е изчислена в проценти спрямо нетретирана контрола, чиято клетъчна жизненост е приета за 100%.

Според изчислените IC₅₀ стойности пептиди **1** - **5** показват умерена *in vitro* противотуморна активност, най-силно изразена в MDA-MB-231, HeLa и Hep G-2 клетъчни линии. Най-висока цитотоксична активност (IC₅₀ 0.033 mM) е установена за пептид **2** (D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-**Dap**-**Tle**-Cys)-Thr-NH₂) спрямо MDA-MB-231 клетъчна линия (Табл. 3).

Табл. 2. *In vitro* цитотоксичност на пептиди **1-5** след третиране в продължение на 24 h.

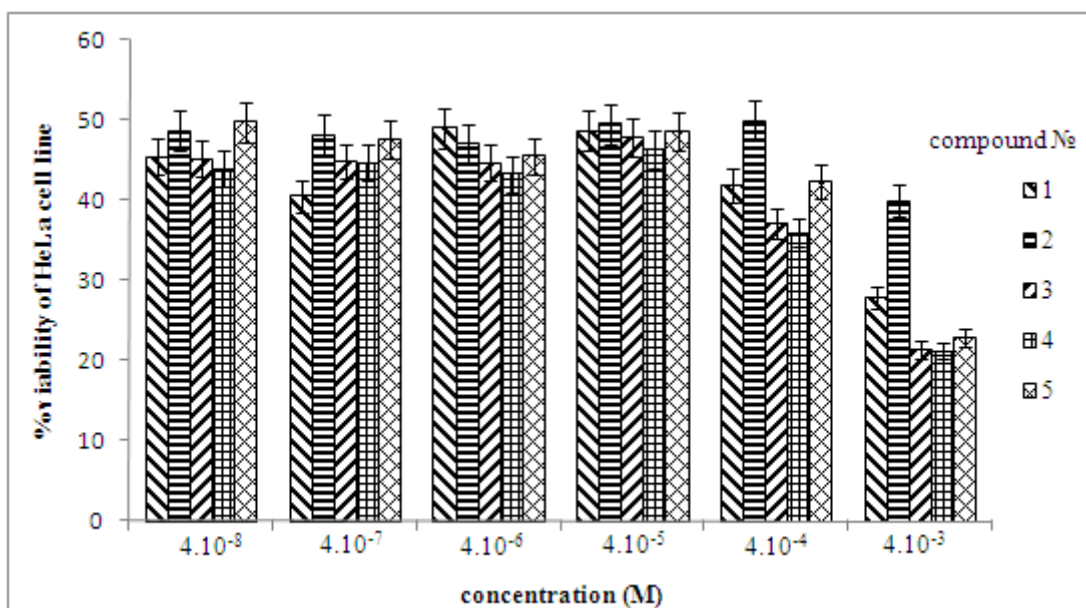
Comp.	IC ₅₀ ± SE (mM)			
	MDA-MB-231	HT-29	HeLa	HepG-2
1	0.27 ± 0.16	2.97 ± 0.08	0.44 ± 0.06	0.59 ± 0.13
2	0.03 ± 0.01	3.74 ± 0.06	3.47 ± 0.03	1.85 ± 0.12
3	1.23 ± 0.15	3.38 ± 0.11	0.43 ± 0.08	0.5 ± 0.16
4	0.21 ± 0.10	0.99 ± 0.13	0.65 ± 0.08	0.53 ± 0.15
5	0.54 ± 0.18	nd	0.42 ± 0.07	0.83 ± 7.48

HT-29 клетъчна линия показва по-слаба чувствителност към пептиди **1-5**. В този случай виталността спада до ок. 60% при концентрация 10⁻³ M (Фиг. 5).

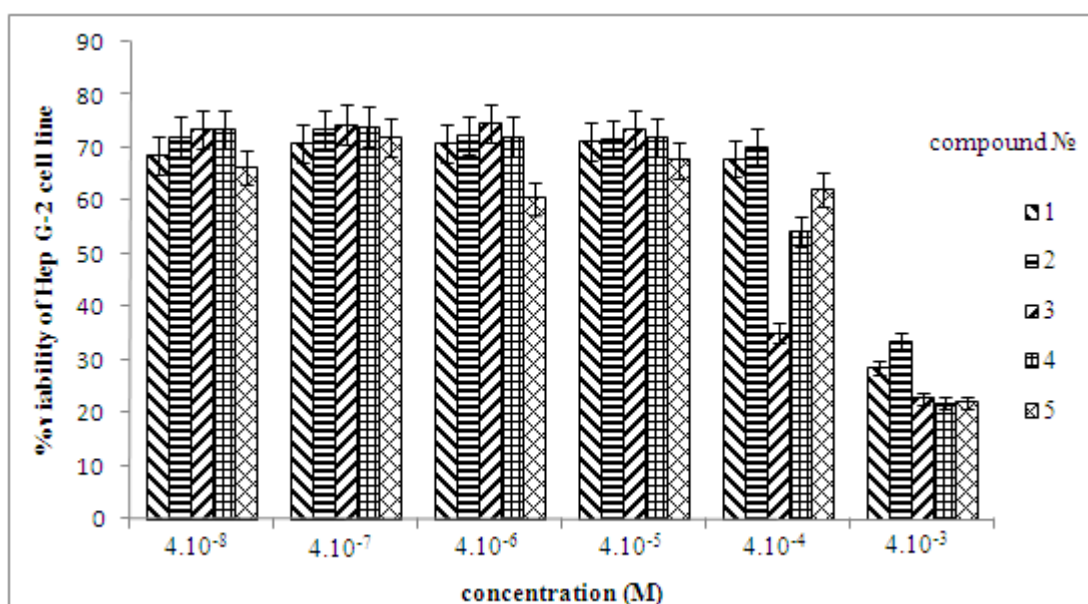


Фиг. 5. Клетъчна виталност на HT-29 клетъчна линия след третиране със съединения **1** - **5** в продължение на 24 h.

Клетъчни линии HeLa и Hep G-2 проявяват по-висока чувствителност и към петте изследвани съединения. Отчетеният клетъчен виталитет е 50% за HeLa и 74% за Hep G-2 клетъчни линии при всички изследвани концентрации. При най-високата изследвана концентрация – 10^{-3} М жизнеспособността на клетките спада до 22% за пептиди **3** и **4** и 28% за пептид **1** и в двете клетъчни линии (Фиг. 6 и 7). Референтния пептид **5** (RC-102) подтиска развитието на тези клетки до около 50% при концентрация $4 \cdot 10^{-8}$ М, а при $4 \cdot 10^{-3}$ М тази стойност спада до 22 %.

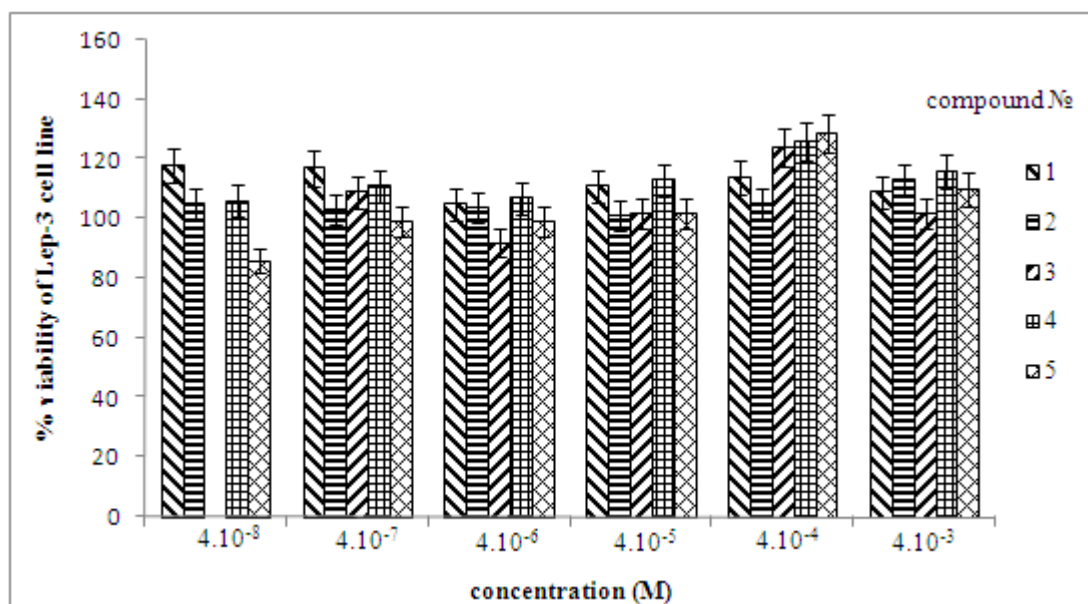


Фиг. 6. Клетъчна виталност на HeLa клетъчна линия след третиране със съединения **1** - **5** в продължение на 24 h.



Фиг. 7. Клетъчна виталност на Hep G-2 клетъчна линия след третиране със съединения **1** - **5** в продължение на 24 h.

Нормалната диплоидна клетъчна линия Lep-3 не се повлиява от пептиди **1** - **5** - отчетената клетъчна жизненост при всички концентрации бе над 100 % (Фиг. 8).



Фиг. 8. Клетъчна виталност на Lep-3 клетъчна линия след третиране със съединения **1-5** в продължение на 24 h.

Във всички случаи, в които установената клетъчната жизненост е около 100% изследваните съединения не притежават цитотоксично действие и не стимулират клетъчната пролиферация.

Липсата на антипролиферативен ефект спрямо нормалната Lep-3 клетъчна линия има важно значение тъй като това означава, че новосинтезираните съединения не са цитотоксични спрямо нормални клетки.

Новосинтезираните пептидни аналози **1-5** повлияват жизнеспособността на изследваните клетки по различен начин като цитотоксичността им зависи не само от приложената концентрация, но и от вида на клетките. Резултатите показват, че дължината на страничната верига на аминокиселината, разположена в позиция 5 (Lys, Orn, Dab или Dar) не оказва голямо влияние върху *in vitro* противотуморната активност на пептидите. Аминокиселината Tle, разположена в позиция 6 не повишава активността, тъй като пептиди **3** (Lys⁵, Tle⁶) и **референтния пептид 5** (Lys⁵, Thr⁶) имат сходна активност в чувствителните клетки - HeLa и Hep G-2. В тези два вида клетъчни линии антипролиферативна активност показват всички съединения (**1-5**) във всички изследвани концентрации.

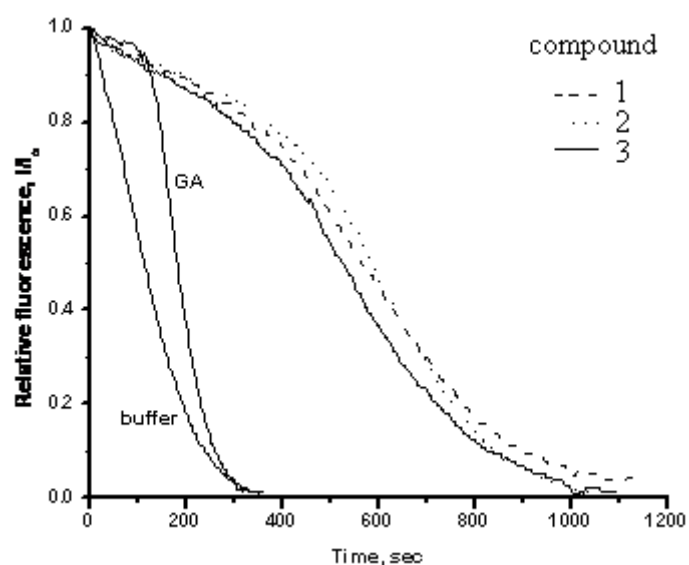
Получените резултати се потвърждават и от изследванията на други учени. Horvath и съавтори установяват, че соматостатиновия хептапептиден аналог TT-232 потиска развитието на HT-29 клетъчна линия в концентрация $4 \cdot 10^{-5}$ M, което се наблюдава в нашите изследвания за пептиди **1** и **3** при $4 \cdot 10^{-3}$ M. Tsagaracis и сътр. показват, че Октреотид в концентрация 10^{-8} M потиска жизнеспособността на Нер G-2 клетъчна линия, докато по-ниски концентрации стимулират развитието на клетките. В нашите изследвания референтния пептид **5** (RC-102) показва цитотоксична активност при всички изследвани концентрации (10^{-3} - 10^{-8} M), като отчетената клетъчна жизненост варира от 22 до 66%. Според изследванията на Kalfin и Alexandrova SST-14 не повлиява значително жизнеността на Нер G-2 клетъчна линия в концентрация 10^{-9} M до 10^{-5} M. В нашите изследвания новосинтезираните пептиди повлияват активността на Нер G-2 клетките при концентрация 10^{-3} - 10^{-8} M. Nagy и сътр. установяват, че соматостатиновите аналози RC-160 и RC-121, свързани с цитотоксичните съединения доксорубин (DOX) и 2-пирино-DOX (AN-201) притежават антипролиферативен ефект върху MDA-MB-231 клетъчната линия с IC_{50} 10^{-10} M. При същото изследване, но само с пептидите, използвани като носители - RC-160 и RC-121 е установено, че те не притежават цитотоксично действие в концентрации до 10^{-6} M. Синтезираните от нас пептиди **1-5** потискат MDA-MB-231 клетките в концентрация $4 \cdot 10^{-3}$ M, като пептид **2** показва цитотоксична активност с IC_{50} 0.033 mM.

В резултат на извършените изследвания можем да обобщим, че пептиди **1-5** показват специфичност на действие като повлияват туморните клетки без да засягат нормалните. Това има важно практическо значение, тъй като липсата на цитотоксичност към нормалните тъканни клетки предполага по-ниска или липса на токсичност на съединенията при евентуална лекарствена терапия.

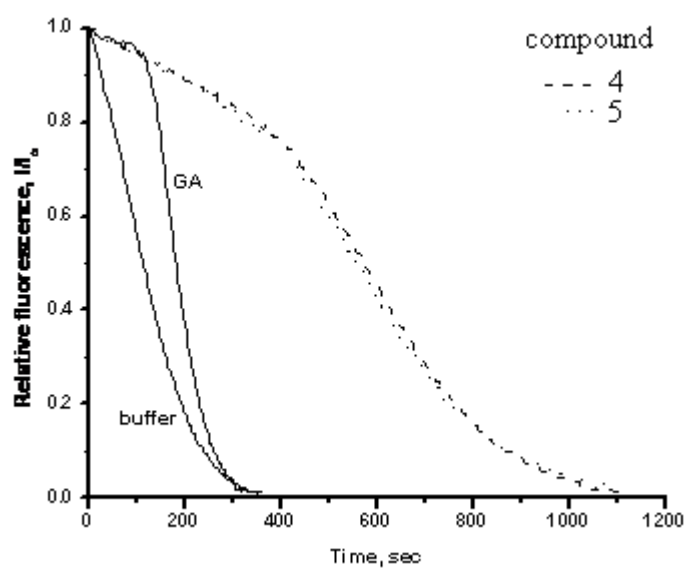
1.3. Изследване на антиоксидантна активност на пептиди 1-5.

Антиоксидантният капацитет бе проследен по два метода – HORAC (Hydroxyl Radical Averting Capacity) и ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Резултатите са представени като $M_{\text{станд.екв. GA}}/M_{\text{проба}}$ за HORAC и $M_{\text{станд.екв. TROLOX}}/M_{\text{проба}}$ за ORAC метода.

Експериментално получените криви, показващи изменението на флуоресценция във времето, измерена по HORAC метода на съединения **1-5**, както и на стандартите и празните проби са представени на Фиг. 9 и 10:

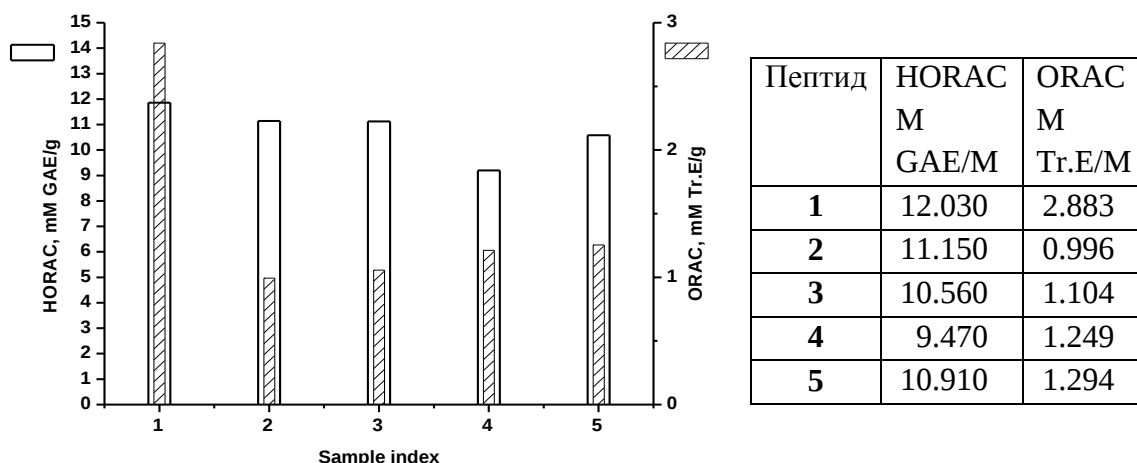


Фиг. 9. Флуоресценция, измерена чрез HORAC метод за пептиди **1**, **2** и **3**.



Фиг. 10. Флуоресценция, измерена чрез HORAC метод за пептиди **4** и **5**.

Всички изследвани съединения проявяват значително по-висока антиоксидантна активност в сравнение със стандартите галова киселна и тролокс. И при двата метода най-висока активност е установена за пептид **1** (Фиг. 11).



Фиг. 11. Антиоксидантна активност на пептиди 1-5, измерена по HORAC и ORAC методи; GAE: еквиваленти галова киселина, Tr.E – еквиваленти TROLOX.

От получените резултати се вижда, че няма големи разлики в антиоксидантната активност на пептиди 1-5, измерена по HORAC метод. Най-висока активност при този тест показва пептид 1. Всички съединения от тази група са значително по-активни от използвания стандарт – галова киселина, което показва, че те са добри хелатори на метални йони като по този начин предотвратяват протичането на Фентоновата реакция и генерирането на хидроксилни радикали. Резултатите, получени по ORAC метода са сходни. Отново пептид 1 показва най-силно изразена антиоксидантна активност в сравнение с останалите пептиди, а пептид 2 показва най-ниска активност (от порядъка на два пъти по-слабо активен в сравнение с пептид 1). Стойностите за антиоксидантна активност са близки и би следвало в нашия случай тя да не повлиява съществено противотуморната активност на пептидите. За изясняване връзката между антиоксидантната и противотуморната активност на пептидите са необходими допълнителни изследвания.

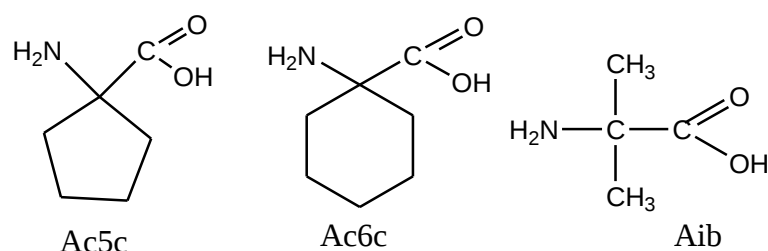
1. 4. Синтез на аналози включващи α,α -диалкилирани аминокиселини в 6-та позиция.

Известно е, че α,α -диалкилираните аминокиселини индуцират конформационно напрежение в основната пептидна верига и така стабилизират желаната конформация.

От направения литературен преглед се вижда, че модифицирани с α,α -диалкилирани аминокиселини аналози се характеризират с наличието на β -извивка, образувана между аминокиселините D-Trp-Lys (или Orn). При *in vivo* изследвания на

противотуморната активност върху мишки, заразени с РТС клетки от аденокарцином на дебело черво), някои от тях проявяват активност. Това ни даде основание за извършване на други подобни модификации в синтетични соматостатинови аналози, при което очакваме повишаване или запазване на противотуморната активност.

Синтезирана е серия от аналози на Октреотид, в които Thr, разположен в 6-а позиция заместихме с пространствено запречените неприродни аминокиселини Tle (трет. левцин), Ac5c (аминоциклопентанова киселина), Ac6c (аминоциклохексанова киселина) и Aib (аминоизобутанова киселина) (Фиг. 30).



Фиг. 12. Структура на Ac5c (1-аминоциклопентан карбоксилна киселина), Ac6c (1-аминоциклохексан карбоксилна киселина), Aib (α -аминоизобутанова киселина).

Синтезите извършихме чрез твърдофазен метод за пептиден синтез (SPPS–Solid Phase Peptide Synthesis) по Fmoc – стратегия както вече е описано.

Данните за добива, молекулните маси и специфичните ъгли на оптично въртене на пептидите **6-11** са обобщени в Таблица 4.

Табл. 3. Структура и характеристика на синтезираните аналози на Октреотид:

№	СТРУКТУРА	БРУТНА ФОРМУЛА	Изчислена ММ _{exact}	Намерена [МН] ⁺	t _R (мин)	α_{546}^{20} *	ПД [%]
6	D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Lys-Aib-Cys)-Thr-NH ₂	C ₄₉ H ₆₅ N ₁₁ O ₉ S ₂	1015.4408	1016.4504	11.00	- 45.16	75.25
7	D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Lys-Ac5c-Cys)-Thr-NH ₂	C ₅₁ H ₆₇ N ₁₁ O ₉ S ₂	1041.4565	1042.4659	11.41	- 36.84	77.5
8	D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Lys-Ac6c-Cys)-Thr-NH ₂	C ₅₂ H ₆₉ N ₁₁ O ₉ S ₂	1055.4721	1056.4778	11.04	- 69.23	61.75
9	D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Orn-Aib-Cys)-Thr-NH ₂	C ₄₈ H ₆₃ N ₁₁ O ₉ S ₂	1001.4252	1002.4330	11.6	- 43.75	60.25
10	D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Orn-Ac5c-Cys)-Thr-NH ₂	C ₅₀ H ₆₅ N ₁₁ O ₉ S ₂	1027.4408	1028.4464	10.52	- 60.87	49.5
11	D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Orn-Ac6c-Cys)-Thr-NH ₂	C ₅₁ H ₆₇ N ₁₁ O ₉ S ₂	1041.4565	1042.4633	10.85	- 48.00	50

α_{546}^{20} : Ъгъл на оптично въртене, измерен при 20°C, разтворител: H₂O (c = 0.25); t_R- време на задържане на основния пик на [МН]⁺; ПД: практичен добив в %

С новосинтезираните пептиди ще бъдат извършени биологични изследвания.

2. Синтез на октапептидни аналози на Вапреотид (RC-160) и RC-121.

Соматостатиновите аналози RC-160 (Vapreotide, D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys)-Trp-NH₂) и RC-121 (D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys)-Thr-NH₂) се характеризират с висока антихормонална активност по отношение на растежен хормон (съответно 199 и 135 пъти по-високо активни от SST), инсулин, глюкагон, стомашна киселина и проявяват *in vitro* и *in vivo* противотуморна активност. Аналогът RC-160 намира приложение в клиничната практика при лечението акутни гастро-езофагеални варици. И двата аналога са използвани като носители за цитотоксични съединения като доксорубицин (DOX), по-активното му производно 2-пиролинодоксорубицин (2-pyrrolino-DOX (AN-201)) и други, прилагани в класическата терапия на ракови заболявания. Получените пептидни конюгати проявяват *in vitro* цитотоксична активност в туморни клетъчни линии с IC₅₀ 10⁻⁷М - 10⁻¹⁰М и инхибират секрецията на растежен хормон. В *in vivo* изследвания тези съединения също проявяват противотуморна активност, но със значително по-ниска токсичност.

За тези соматостатинови аналози важат аналогични закономерности по отношение връзката структура – активност, описани по-горе. В аналогът RC-160 характерната β-структура, формирана от аминокиселините Tyr-Trp-Lys-Val се стабилизира чрез вътрешно-молекулна водородна връзка, образувана между N- и C-крайните аминокиселини D-Phe¹ и Trp⁸-NH₂. В аналогът RC-160 C-крайния Trp допринася за стабилизиране на третичната структура чрез участието му в т. нар. стекинг взаимодействия с ароматните странични вериги на другите ароматни аминокиселини. Това обяснява защо хидрофилната аминокиселина Thr⁸ в RC-121 може да бъде заменена с хидрофобния Trp. За разлика от аналога Октреотид, който включва комбинацията Phe³/ Thr⁶ аналозите RC-160 и RC-121 съдържат аминокиселините Tyr³/Val⁶. Ароматните аминокиселини Tyr³ and D-Trp⁴ имат ключово значение за противотуморната активност на пептидите, като включването на D-аминокиселини като D-Trp⁴ в пептидната верига увеличава плазмения полуживот и биологичната активност на синтетичните аналози. Важна за активността е и аминокиселината Val, разположена в позиция 6. Доказано е, че Tyr³/Val⁶, наред с Phe³/ Thr⁶ замесените октапептидни аналози проявяват значително по-висока активност.

Съгласно установените закономерности по отношение връзката структура-активност, характерни за синтетичните соматостатинови аналози ние синтезирахме серия аналози на RC-160 и RC-121. За разлика от предходните аналози на Октреотид,

които включват Phe в позиция 3, пептидите от тази група притежават Tug в трета позиция. В новосинтезираните аналози на RC-160 и RC-121 извършихме аналогични модификации, както и в предходните аналози на Октреотид.

- Аминокиселината Lys, разположена в 5-а позиция заместихме с Orn (орнитин) и неприродните диаминоалканови киселини Dap (диаминопропанова киселина) и Dab (диаминобутанова киселина).

- Аминокиселината Val, разположена в позиция 6 заместихме с Tle (трет. левцин).

- Новосинтезираните аналози притежават дисулфиден мост между Cys-2 и Cys-7, тъй като той е от съществено значение за активността. Част от пептидите са в ациклична форма със Асм-защитени сулфхидрилни групи с цел да оценим значението на дисулфидния мост за биологичната активност на пептидите.

Пептидите (**1T** - **4T**) бяха синтезирани и охарактеризирани аналогично на предходните. Аминокиселината Tug бе защитена като N^α-Fmoc-Tyr(tBu)-ОН. (приложение). Доказателство за получаване на пептид **3T** (ММ 1059.467) е наличието на пик 1060.4778 (МН⁺) и пик 530.7428

Данните за добива, молекулните маси и специфичните ъгли на оптично въртене на пептидите **1T** - **4T** са представени в Таблица 5.

Табл. 4. Структура и характеристика на синтезираните аналози на RC-160 и RC-121:

№	СТРУКТУРА	БРУТНА ФОРМУЛА	Изчислена ММ _{exact}	Намерена [МН] ⁺	t _R (мин)	α ₅₄₆ ²⁰ *	ПД [%]
1T	D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-Dab-Tle-Cys)-Thr-NH ₂	C ₄₉ H ₆₅ N ₁₁ O ₁₀ S ₂	1031.4357	1032.25	5.26	-62.5	87
1Ta	D-Phe-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Dab-Tle-Cys-(Acm)-Thr-NH ₂	C ₅₅ H ₇₇ N ₁₃ O ₁₂ S ₂	1175.5256	1176.53	5.25	-111.11	91
2T	D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-Dap-Tle-Cys)-Thr-NH ₂	C ₄₈ H ₆₃ N ₁₁ O ₁₀ S ₂	1017.4201	1018.25	5.23	-36.36 n-42.86	90
2Ta	D-Phe-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Dap-Tle-Cys-(Acm)-Thr-NH ₂	C ₅₄ H ₇₅ N ₁₃ O ₁₂ S ₂	1161.51	1162.1667	5.31	-46.15	95
3T	D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Tle-Cys)-Thr-NH ₂	C ₅₁ H ₆₉ N ₁₁ O ₁₀ S ₂	1059.467	1060.4778	14.06	-66.67	72.5
3Ta	D-Phe-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Lys-Tle-Cys(Acm)-Thr-NH ₂	C ₅₇ H ₈₁ N ₁₃ O ₁₂ S ₂	1203.5569	1204.5652	12.54	-40	40
4T	D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Tle-Cys)-Thr-NH ₂	C ₅₀ H ₆₇ N ₁₁ O ₁₀ S ₂	1045.4514	1046.4572	8.7	-70.59	78
4Ta	D-Phe-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Orn-Tle-Cys-(Acm)-Thr-NH ₂	C ₅₆ H ₇₉ N ₁₃ O ₁₂ S ₂	1189.5413	1190.5466	8,45	-43.24	80

α₅₄₆²⁰: Ъгъл на оптично въртене, измерен при 20°C, разтворител: H₂O (c = 0.25); t_R- време на задържане на основния пик на [МН]⁺; ПД: практичен добив в %

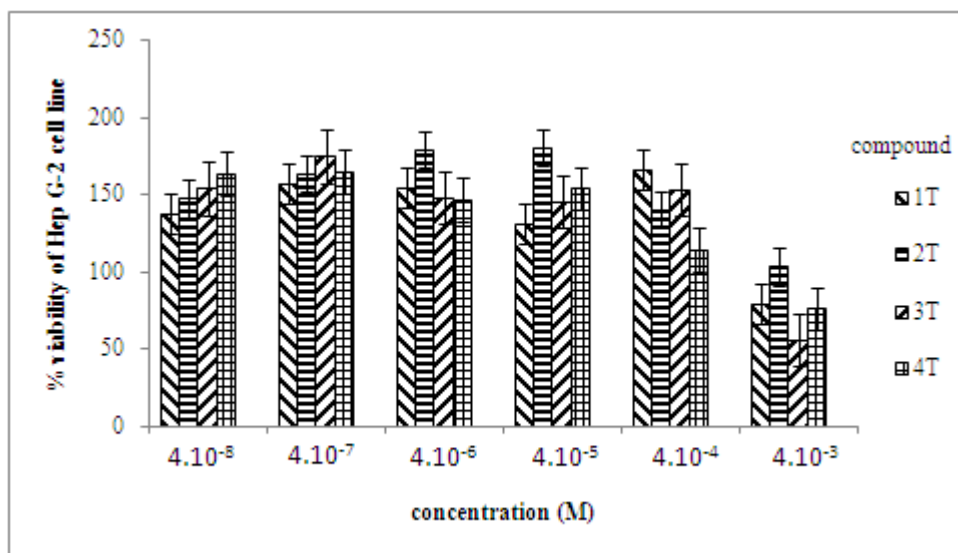
2.1. Изследване на биологичната активност *in vitro* на пептиди 1Т - 4Т.

Биологичните изследвания бяха проведени аналогично на предходната група съединения. Цитотоксичната активност на пептиди 1Т - 4Т бе изследвана в Нер G-2, MDA-MB-231, HT-29 и HeLa туморни клетъчни линии при концентрации от 4×10^{-8} М - 4×10^{-3} М. Клетъчната жизненост на всяка проба е изчислена в проценти спрямо нетретирана контрола, чиято клетъчна жизненост е приета за 100%.

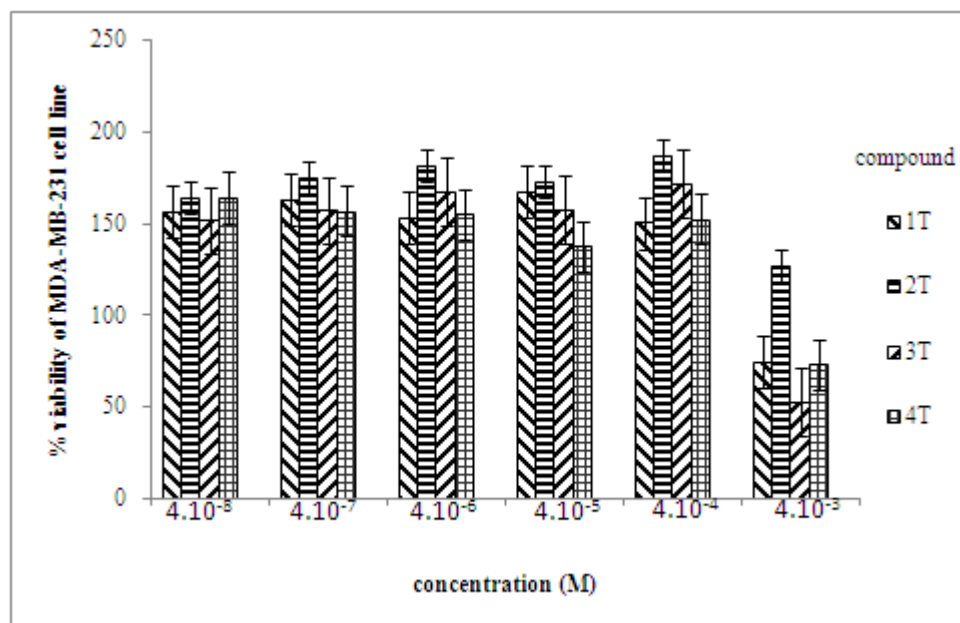
Изследваните клетъчни линии показват специфичен отговор спрямо отделните субстанции.

Нер G-2 и MDA-MB-231 клетките проявяват най-висока чувствителност спрямо пептиди 1Т, 3Т и 4Т. Цитотоксичност е установена при концентрация $4 \cdot 10^{-3}$ М, като пептид 3Т е с най-висока активност (53% жизнеспособност за MDA-MB-231 и 56% за Нер G-2) (Фиг. 31 и 32). Пептиди 1Т и 4Т инхибират виталността в по-слаба степен – 73-74% за 1Т и 73-76% за 4Т и в двете клетъчни линии. Изчислените IC_{50} стойности потвърждават тези резултати (Табл. 6).

Пептиди 1Т, 3Т и 4Т упражняват цитотоксично действие спрямо Нер G-2 и MDA-MB-231 клетките в концентрация $4 \cdot 10^{-3}$ М. Отчетена е 53% виталност за MDA-MB-231 и 56% за Нер G-2 при третиране с пептид 3Т. Пептид 2Т не показва цитотоксичен ефект в тези клетъчни линии.



Фиг. 13. Клетъчна виталност на Нер G-2 клетъчна линия след третиране със съединения 1Т – 4Т в продължение на 24 h.



Фиг. 14. Клетъчна виталност на MDA-MB-231 клетъчна линия след третиране със съединения **1T** – **4T** в продължение на 24 h.

Спрямо клетъчна линия HeLa цитотоксична активност показват пептиди **3T** (65.7 % виталност), **1T** (88% виталност) и **3T** (97% виталност) при концентрация 10^{-3} M. Най-активен е пептид **4T**, за който е изчислена IC_{50} 0.03 mM.

Пептиди **1T-4T** не показват цитотоксична активност спрямо HT-29 клетъчна линия, дори и при най-високите концентрации отчетената жизнеспособност е над 100%. Пептиди **2T** и **3T** стимулират клетъчния растеж. Това се подвърждава и от получените EC_{50} стойности (Табл. 6). Според изчислените IC_{50} стойности новосинтезираните аналози показват *in vitro* противотуморна активност, в HeLa, Hep G-2 и MDA-MB-231 клетъчни линии. Най-висока цитотоксична активност (IC_{50} 30 μ M) е изчислена пептид **4T**(D-Phe-c(Cys-Туг-D-Trp-Оrn-Tle-Cys)-Thr-NH₂) спрямо HeLa – IC_{50} 30 μ M:

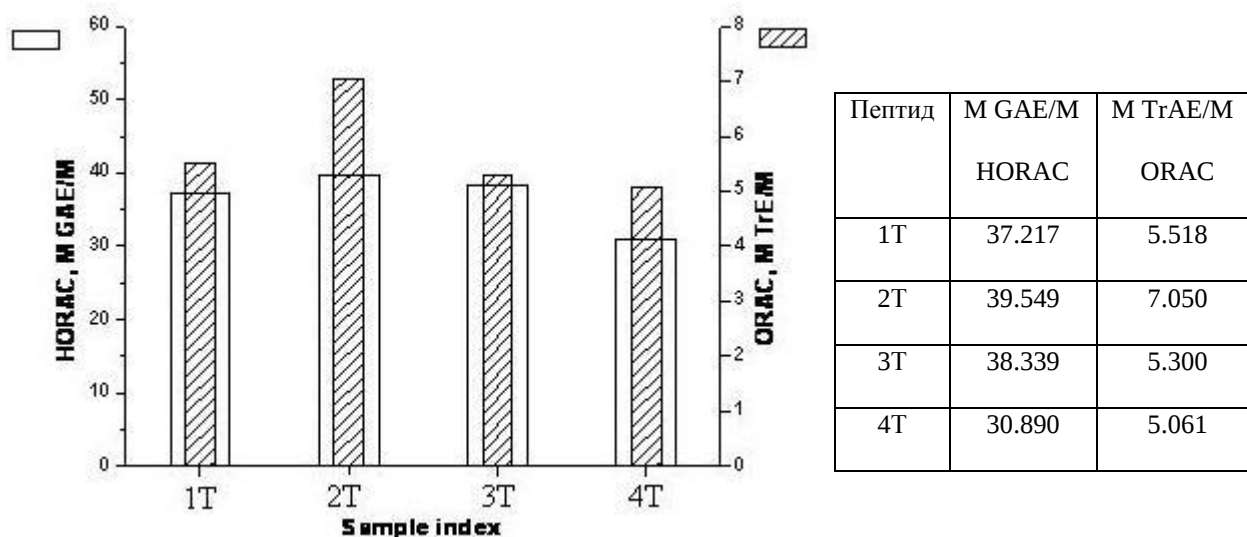
Табл. 5. *In vitro* цитотоксичност на пептиди **1T-4T** след третиране в продължение на 24h.

Comp.	MDA-MB-231		HT-29		HeLa		HepG-2	
	$IC_{50} \pm SE$ (mM)	$EC_{50} \pm SE$ (μ M)	$IC_{50} \pm SE$ (mM)	$EC_{50} \pm SE$ (μ M)	$IC_{50} \pm SE$ (mM)	$EC_{50} \pm SE$ (μ M)	$IC_{50} \pm SE$ (mM)	$EC_{50} \pm SE$ (μ M)
1T	0.95 $\pm$ 0.18	-	-	0.01 $\pm$ 0.12	0.58 $\pm$ 0.07	-	3.51 $\pm$ 0.17	-
2T	3.67 $\pm$ 0.14	-	-	310 $\pm$ 0.15	0.35 $\pm$ 0.115	-	0.41 $\pm$ 0.15	-
3T	3.39 $\pm$ 0.24	-		60.2 $\pm$ 0.18	0.38 $\pm$ 0.21	-	6.94 $\pm$ 0.22	-
4T	4.48 $\pm$ 0.18	-	nd	nd	0.03 $\pm$ 0.1	-	0.45 $\pm$ 0.18	-

Изследванията показват, че цитотоксичността на пептиди **1T-4T** зависи не само от приложените количества, но и от вида на клетъчната линия. Пептид **3T** (Lys⁵, Tle⁶), следван от пептиди **1T** (Dab⁵, Tle⁶) и **4T** (Orn⁵, Tle⁶) потискат клетъчния растеж на MDA-MB-231, Hep G-2 и HeLa клетките в концентрация 4.10^{-3} М. Пептид **2T**, който притежава същата структура, но включва Dap⁵ не притежава цитотоксично действие във всички изследвани клетъчни линии. Следователно дължината на страничната верига на заместителите в позиция 5 оказва влияние върху активността на пептидите. Аминокиселината Tle включена в позиция 6 не влияе съществено върху активността на пептидите. Аналогично на пептиди **1-5**, пептиди **1T-4T** също показват най-висока активност спрямо HeLa и Hep G-2 клетките, следвани от MDA-MB-231 и HT-29. Различната чувствителност на изследваните клетъчни линии спрямо новосинтезираните пептиди – аналози на Октреотид, RC-160 и RC-121 може да се обясни с различен афинитет към съответните соматостатинови рецептори.

2.2. Изследване на антиоксидантна активност на пептиди 1T-4T.

Изследванията за антиоксидантна активност бяха проведени по HORAC и ORAC методи аналогично с тези проведени за пептиди **1-5**. Получените резултати са представени в Фиг. 15.



Фиг. 15. Антиоксидантна активност на пептиди **1T-4T** измерена по методи HORAC и ORAC; GAE: еквиваленти галова киселина, Tr.E – еквиваленти TROLOX.

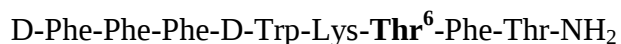
Всички изследвани пептиди проявяват значително по-висока антиоксидантна активност в сравнение с използваните стандарти – галова киселина и Тролокс. Това показва, че изследваните пептиди действат като ефективни хелатори на Me^{2+} като по този начин могат да неутрализират генерираните хидроксилни и пероксилни радикали. Най-висока активност е отчетена за пептид **2T**, който включва аминокиселината Dap в позиция 5. рКа за $-ε-NH_2$ групата за Lys е 10.53 и би следвало да се понижава в реда Orn>Dab>Dap. Следователно Dap може да отдава най-лесно H-атом от страничната аминогрупа в сравнение с Dab, Orn и Lys, което е в съответствие с получените резултати. Пептиди **1T-4T** показват около три пъти по-висока антиоксидантна активност в сравнение с пептиди **1-5** от предходната група (аналози на Октретид). Това вероятно се дължи на наличието на аминокиселината Trp, разположена в позиция 3 вместо Phe. За изясняването на връзката между противотуморната и антиоксидантната активност на пептидите са необходими допълнителни изследвания.

3. Синтез на линейни соматостатинови аналози на BIM 23052.

BIM-23052 (DC-23-99) D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr- NH_2 е линеен SST аналог с установена *in vitro* GH-инхибиторна активност в nM концентрации. Той се характеризира с висок афинитет спрямо sstr5, sstr3 и sstr2, а sstr5 и sstr2 присъстват във висока степен в клетъчните мембрани на голям брой туморни клетки. Това ни даде основание да синтезираме модифицирани аналози на BIM 23052, за които да очакваме наличието на противотуморна активност. За линейните соматостатинови аналози от този тип е установено, че характерната $β$ -извивка, образувана между аминокиселините D-Trp-Lys се стабилизира не посредством ковалентна химична връзка между цистеиновите остатъци, както е при цикличните аналози, а с участието на нековалентни химични връзки, възникващи между страничните вериги на отделните аминокиселинни остатъци. Тези взаимодействия са от два типа. Първия тип взаимодействие се реализира, когато аминокиселини, притежаващи хидрофобна странична верига са разположени в или близо от двата края на пептида. Между тях се осъществяват се хидрофобни взаимодействия, които се дължат на тенденцията, характерна за такива остатъци, да избягват контакт с полярни субстанции. Тези взаимодействия подпомагат заемането на полуциклична конформация на пептида в обкръжението на полярните разтворители във физиологични условия. Втория тип взаимодействия възникват между електрондонорни групи и електрон-акцепторни групи на аминокиселинни остатъци,

разположени в срещуположните краища на пептида, което също спомага образуването на полуциклична форма.

С цел изследване връзката структура-биологична активност извършихме следните модификации в новосинтезираните аналози на BIM-23052:

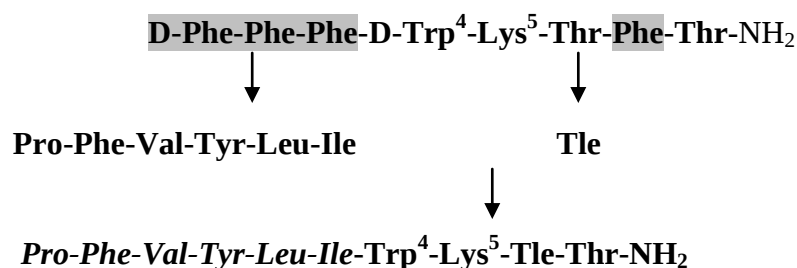


- Заместихме Thr, разположен в позиция 6 с конформационно запречените Tle, Aib, Ac5c и Ac6c с цел да стабилизираме необходимата за активността структура (пептиди **1B-5B**).

- Синтезирахме референтния пептид BIM-23052 (DC-23-99) - **пептид 1B**, за да сравним неговата *in vitro* противотуморна активност с тази на останалите аналози.

Тъй като е доказано, че оптимизирането на хидрофобността на соматостатиновите аналози повишава биологична им активност ние синтезирахме серия модифицирани аналози на BIM-23052, включващи хидрофобната последователност Pro-Phe-Val-Tyr-Leu-Ile. Тази последователност улеснява проникването на различни субстанции (пептиди) през клетъчната мембрана. Целта бе да проследим как тя ще повлияе активността. В аналозите от тази група извършихме следните модификации:

BIM-23052



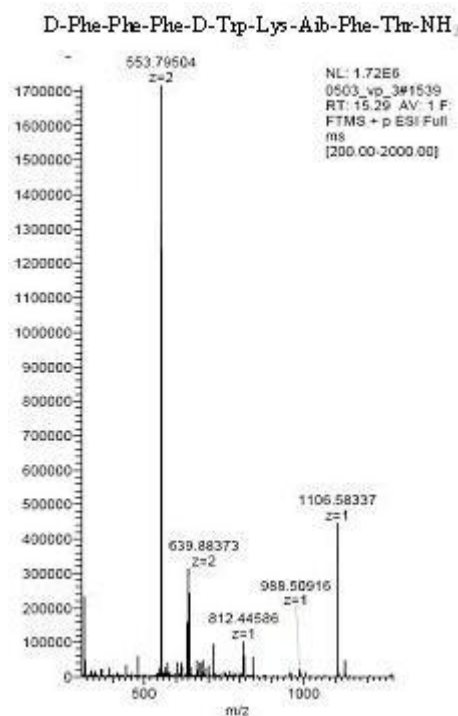
- Включихме по една D-аминокиселина (в позиции 2, 3 или 7) с цел повишаване на плазмената устойчивост.

- Заместихме Thr, разположен в позиция 6 с конформационно запречения Tle за да стабилизираме необходимата за активността конформация.

- Заместихме Phe-остатъци с последователността Pro-Phe-Val-Tyr-Leu-Ile с цел оптимизиране хидрофобността на пептидите и улесняване проникването в клетъчната мембрана с цел да повишим биологичната активност.

Пептидите бяха синтезирани и анализирани аналогично на пептидите от предходните серии. Например доказателство за получаване на пептид **3B** (MM

1105.5749) е наличието на пик А 1106.5834 (MH^+) и пик А1 553.795, чиято стойност е една втора от пик А (Фиг. 16).



Фиг. 16. MS – хроматограма на пептид **3B**.

Данните за добива, молекулните маси и специфичните ъгли на оптично въртене на пептидите **1B** – **5B** и са представени в Таблица 7.

Табл. 6. Структура и характеристика на синтезираните аналози на B1M-23052:

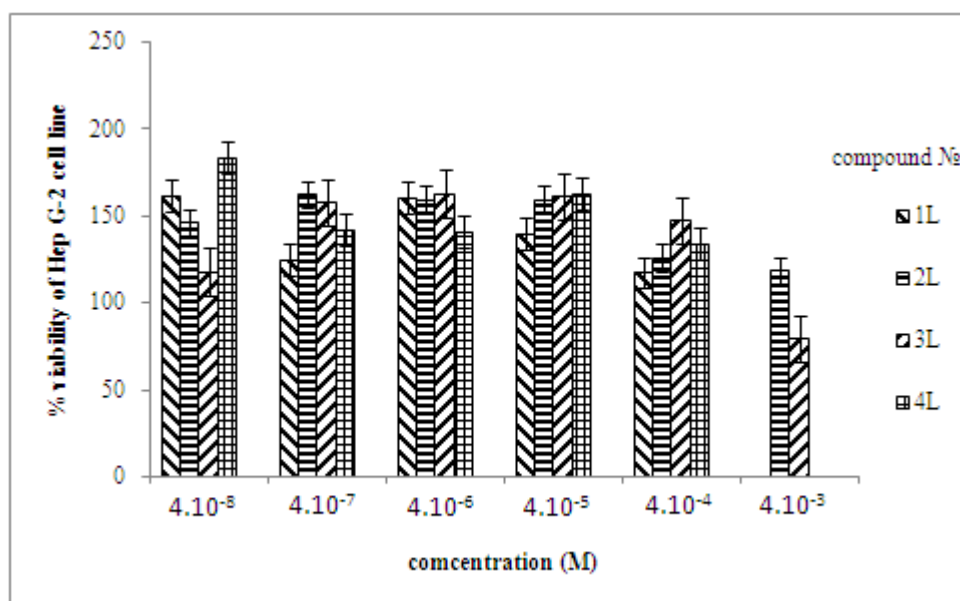
№	СТРУКТУРА	БРУТНА ФОРМУЛА	Изчислена MM_{exact}	Намерена $[MH]^+$	t_R (мин)	α_{546}^{20}	ПД [%]
1B	D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH ₂	C ₆₁ H ₇₅ N ₁₁ O ₁₀	1121.5698	1122.5812	16.05	- 66.67	49.5
2B	D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Tle-Phe-Thr-NH ₂	C ₆₃ H ₇₉ N ₁₁ O ₉	1133.6062	1134.6154	15.37	- 33.33	41.7
3B	D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Aib-Phe-Thr-NH ₂	C ₆₁ H ₇₅ N ₁₁ O ₉	1105.5749	1106.5834	15.39	- 26.09	33.5
4B	D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Ac5c-Phe-Thr-NH ₂	C ₆₃ H ₇₇ N ₁₁ O ₉	1131.5906	1132.5989	15.73	- 10.44	51.3
5B	D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Ac6c-Phe-Thr-NH ₂	C ₆₄ H ₇₉ N ₁₁ O ₉	1146.6062	1146.6124	16.10	- 50.00	51
1L	Pro-D-Phe-Val-Tyr-Leu-Ile-Trp-Lys-Tle-Thr-NH ₂	C ₆₇ H ₉₉ N ₁₃ O ₁₂	1277.7536	1278.76123	18.80	-63.19	50
2L	Pro-Phe-D-Val-Tyr-Leu-Ile-Trp-Lys-Tle-Thr-NH ₂	C ₆₇ H ₉₉ N ₁₃ O ₁₂	1277.7536	1278.76135	18.22	-35.3	33.4
3L	Pro-Phe-Val-Tyr-Leu-Ile-D-Trp-Lys-Tle-Thr-NH ₂	C ₆₇ H ₉₉ N ₁₃ O ₁₂	1277.7536	1278.7617	14.05	-15.38	52.8
4L	Pro-D-Phe-Val-Tyr-Leu-Ile-D-Trp-Lys-Tle-Thr-NH ₂	C ₆₇ H ₉₉ N ₁₃ O ₁₂	1277.7536	1278.7609	14.87	-45.28	51.3

α_{546}^{20} : Ъгъл на оптично въртене, измерен при 20°C, разтворител: H₂O (c = 0.25); t_R - време на задържане на основния пик на $[MH]^+$; ПД: практичен добив в %

3.1. Изследване на биологичната активност *in vitro* на пептиди 1L-4L

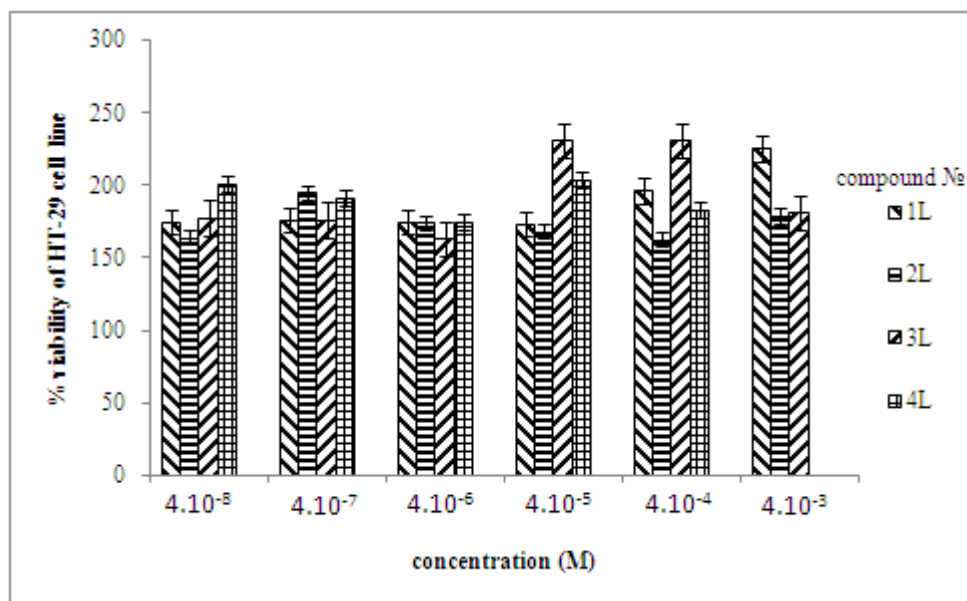
Цитотоксичната активност на пептиди **1L-4L** бе изследвана аналогично на предходните пептиди. Резултатите показват, че туморните клетки реагират специфично на изследваните пептидни.

Виталността на Нер G-2 клетките не се променя значително след третиране с пептиди **1L-4L**. Пептид **3L** показва цитотоксичен ефект в концентрация – $4 \cdot 10^{-3}$ M, при която клетъчната виталност се понижава до 79 % (Фиг. 17).

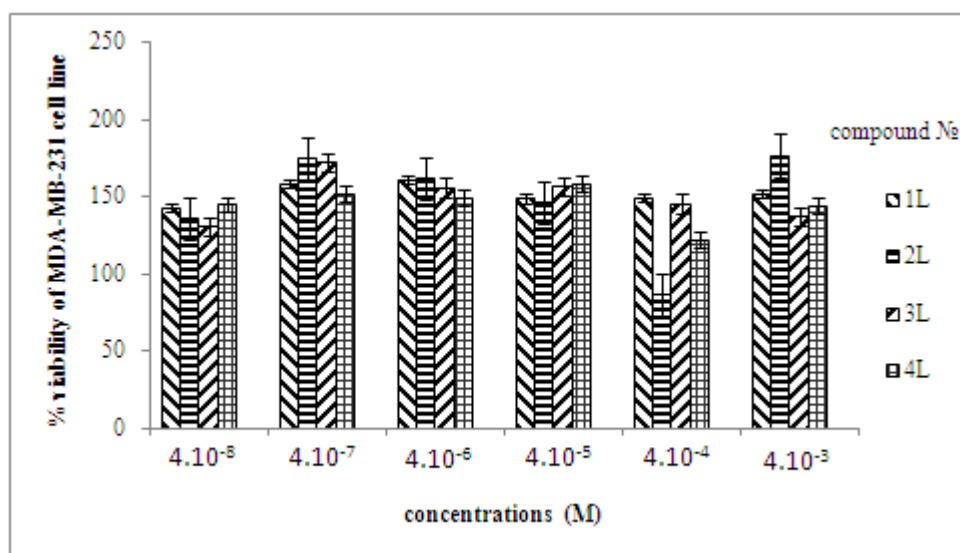


Фиг. 17. Клетъчна виталност на Нер G-2 клетъчна линия след третиране с пептиди **1L-4L** в продължение на 24 h.

Пептиди **1L-4L** не показват цитотоксично действие спрямо HT-29 клетъчна линия – дори и в най-високите концентрации клетките пролиферират и виталността им не пада под 100% (Фиг. 18). Пептид **1L** оказва стимулиращо клетките действие в най-висока степен. Тези резултати се потвърждават и от изчислените EC_{50} стойности (Табл. 8). Аналогични резултати се установиха и за MDA-MB-231 (Фиг. 19).

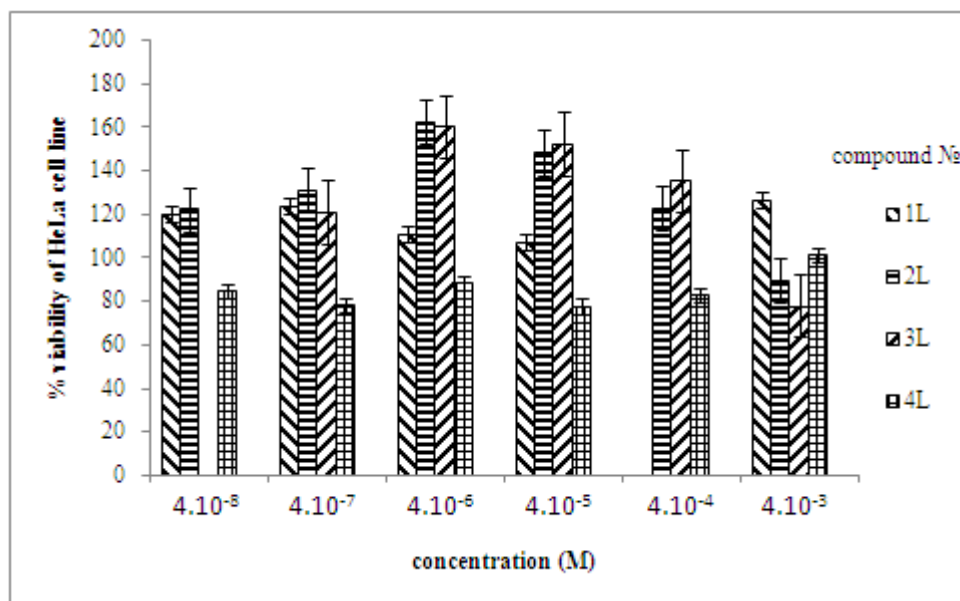


Фиг.18. Клетъчна виталност на HT-29 клетъчна линия след третиране с пептиди **1L–4L** в продължение на 24 h.



Фиг. 19. Клетъчна виталност на MDA-MB-231 клетъчна линия след третиране с пептиди **1L–4L** в продължение на 24 h.

Както и в предходните изследвания HeLa клетките проявяват по-висока чувствителност към изследваните субстанции. В този случай пептиди **3L** и **4L** ограничават в слаба степен клетъчната пролиферация. Пептид **4L** подтиска клетъчния виталитет дори в най-ниската изследвана концентрация $4 \cdot 10^{-8}$ M, при която е отчетена около 85% виталност. Пептид **3L** проявява цитотоксичност само в най-високата концентрация $4 \cdot 10^{-3}$ M (виталност 78 %) (Фиг. 38).



Фиг. 20. Клетъчна виталност на HeLa клетъчна линия след третиране с пептиди **1L–4L** в продължение на 24 h.

Можем да обобщим, че пептиди **2L** (Pro-Phe-D-Val-Tyr-Leu-Ile-Trp-Lys-Tle-Thr-NH₂) и **3L** (Pro-Phe-Val-Tyr-Leu-Ile-D-Trp-Lys-Tle-Thr-NH₂) инхибират клетъчния растеж на HeLa и Hep G-2 туморни клетъчни линии при концентрация 10⁻³М (ок. 80% виталност). IC₅₀ стойностите, изчислени за всички съединения в четирите клетъчни линии показват инхибиторен ефект спрямо HeLa и Hep G-2 (Табл. 8). Най-добри резултати са получени за пептид **1L** в Hep G-2 клетъчна линия (IC₅₀ 0.11 mM) [178].

Табл. 7. *In vitro* цитотоксичност на пептиди **1L–4L** след третиране в продължение на 24 h.

Comp.	MDA-MB-231		HT-29		HeLa		HepG-2	
	IC ₅₀ ± SE (mM)	EC ₅₀ ± SE (mM)	IC ₅₀ ± SE (mM)	EC ₅₀ ± SE (mM)	IC ₅₀ ± SE (mM)	EC ₅₀ ± SE (mM)	IC ₅₀ ± SE (mM)	EC ₅₀ ± SE (mM)
1L	-	5.10 ⁻⁵ ± 0.03	-	0.42 ± 0.11	-	3.07 ± 0.04	0.11 ± 0.12	-
2L	-	3.78 ± 0.17	-	nd	0.44±0.13	-	0.39 ± 0.13	-
3L	-	4.10 ⁻⁵ ± 0.08	-	0.01 ± 0.13	0.77±0.19	-	0.89±0.17	-
4L	-	nd	-	3.48 ± 0.07	-	0.7 ± 0.11	nd	-

В резултат на направените изследвания можем да обобщим, че ниската цитотоксична активност на пептиди **1L–4L** може да се дължи на липсата на дисулфиден мост, отсъствие на взаимодействие или липса на съответните соматостатинови рецептори в изследваните клетъчни линии.

ИЗВОДИ

Въз основа на проведените експериментални изследвания и получените резултати могат да бъдат направени следните изводи:

1. Чрез твърдофазен пептиден синтез по Fmoc-стратегия са синтезирани и охарактеризирани 5 нови циклични и 5 нови ациклични модифицирани амидни аналози на соматостатиновия аналог Октреотид.

- Установено е, че цикличните аналози **1-5** показват умерена цитотоксична активност в *in vitro* изследвания върху туморни клетъчни линии (Hep G-2, MDA-MB-231, HT-29, HeLa).

- Установено е, че новосинтезираните пептиди показват специфичност на действие и не повлияват нормалната диплоидна клетъчна линия (Lep 3).

- Установено е, че аналог **2** (D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-**Dap-Tle**-Cys)-Thr-NH₂) показва най-висока цитотоксична активност спрямо MDA-MB-231 клетъчна линия с IC₅₀ 0.033 mM.

- Установено е влиянието на дължината на страничната веригата на аминокиселината, разположена в позиция 5.

- Установено е, че заместването на Thr, разположен в позиция 6 с Tle води до запазване на цитотоксичната активност.

- При проведени изследвания за определяне на антиоксидантната активност е установено, че аналози **1-5** показват антиоксидантна активност значително по-висока в сравнение с използваните стандарти.

2. Чрез твърдофазен пептиден синтез по Fmoc-стратегия са синтезирани охарактеризирани 4 нови циклични и 4 нови ациклични соматостатинови аналози на RC-121 и RC-160 (Вапреотид).

- Установено е, че цикличните аналози **1T-4T** при *in vitro* биологични изследвания показват по-ниска цитотоксичност спрямо Hep G-2, MDA-MB-231 и HeLa в сравнение с аналози **1-5**.

- Установено е, че аналози **1T-4T** не повлияват HT-29 клетъчна линия.

- Установено е, че най-висока цитотоксична активност показва аналог **4T**(D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-**Orn-Tle**-Cys)-Thr-NH₂) спрямо HeLa с IC₅₀ 0.033 mM.

- При изследвания за определяне на антиоксидантната активност пептиди **1T-4T** показват значително по-висока активност в сравнение с използваните стандарти.

- Установено е, че аналози **1T-4T**, включващи Tug в позиция 3 показват по-висока активност в сравнение с пептиди **1-5** с Phe в позиция 3.

3. Установено е, че аналози, включващи комбинацията Phe³/Tle⁶ потискат клетъчната жизнеспособност в по-висока степен.

4. Чрез твърдофазен пептиден синтез по Fmoc-стратегия са синтезирани и охарактеризирани 5 нови линейни аналози на линейния соматостатиновия аналог BIM-23052, в който аминокиселината Thr в 6-а позиция е заместена с пространствено запрещените Tle, Ac5c, Ac6c и Aib.

5. Чрез твърдофазен пептиден синтез по Fmoc-стратегия са синтезирани и охарактеризирани 4 нови линейни аналози на BIM-23052, включващи към amino края хидрофобната последователност Pro-Phe/D-Phe-Val/D-Val-Tyr-Leu-Ile.

- При проведени *in vitro* биологични изследвания е установено, че D-Trp е от съществено значение за биологичната активност на тези аналози.

- Установено е, че пептиди **3L** (Pro-Phe-Val-Tyr-Leu-Ile-D-Trp-Lys-Tle-Thr-NH₂) и **4L** (Pro-D-Phe-Val-Tyr-Leu-Ile-D-Trp-Lys-Tle-Thr-NH₂), които включват D-Trp в позиция 7 инхибират в умерена степен клетъчния растеж на HeLa и Hep G-2 туморни клетъчни линии.

ПРИНОСИ

1. Научната значимост на дисертационния труд се състои в обогатяване на съществуващите знания в областта на целенасочен синтез на биологично активни пептиди и установяване на връзката структура – биологична активност.
2. Синтезирани са неописани в литературата скъсени соматостатинови аналози, модифицирани с неприродните аминокиселини Tle, Ac5c, Ac6c, Aib, Dab и Dar в позиции 5 и 6 и е установено значението им за биологичната активност.
3. Успешно е извършено образуването на дисулфиден мост върху твърдофазен носител с помощта на $\text{Ti}(\text{tfa})_3$. Доказана е значимостта на дисулфидната връзка за проявяване на по-висока биологична активност.
4. Част от новосинтезираните пептиди показват *in vitro* цитотоксична активност и специфичност на действие спрямо някои от изследваните туморни клетъчни линии, като не повлияват нормалната Lер-3 клетъчна линия. Липсата на цитотоксичност спрямо нормалните тъканни клетки предполага по-малко нежелани странични реакции при евентуално терапевтично приложение.
5. Синтезирани са нови линейни аналози на BIM-23052, включващи хидрофобната последователност Pro-Phe/D-Phe-Val/D-Val-Tyr-Leu-Ile. Въвеждането на тази последователност не води до повишаване на *in vitro* противотуморната активност в сравнение с аналозите на Октреотид, Вапреотид (RC-160), RC-121. Изследванията потвърждават значението на D-Trp за проява на цитотоксична активност.
6. Всички новосинтезирани пептиди проявяват по-висока антиоксидантна активност в сравнение с използваните стандарти - галова киселина и тролокс.

За установяване на връзката цитотоксичност - антиоксидантни свойства следва да бъдат направени допълнителни изследвания.

Възможности за по-нататъшно развитие на настоящата разработка е изследването на апоптоза, свързването със соматостатиновите рецептори, както и свързване на соматостатинови аналози с цититостатици, наложени в класическата химиотерапия. Тази стратегия ще доведе до значително понижение на токсичността на химиотерапевтика.

Списък на научните публикации, свързани с дисертационния труд

1. **S. Staykova**, E. Naydenova, D. Wesselinova, A. Kalistratova, L. Vezenkov, Synthesis and *in vitro* study of the anticancer activity activity of new analogs of Octreotide, ***Protein and Peptide Letters***, 19, 1257-1262, **2012**, IF=1.94
2. **S. Ts. Staykova**, E. D. Naydenova, D. W. Wesselinova, L. T. Vezenkov, Synthesis and *in vitro* antitumor activity of new linear somatostatin analogs, ***Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy***, 47, 3, 297-302, **2012**.
3. **S. Ts. Staykova**, B. D. Mihaylova, I. G. Goshev, D. W. Wesselinova, L. T. Vezenkov, E. D. Naydenova, Antioxidant capacity of new analogs of octreotide, ***Bulgarian Chemical Communications***, Volume 44, Number 3, pp 233-237, **2012**. IF=0.280
4. **Svetlana Ts. Staykova**, Emilia D. Naydenova, Diana W. Wesselinova, Liubomir T. Vezenkov, Synthesis and anticancer activity of new analogs of Vapreotide and RC-121, **32th Peptides 2012**, Proceedings of 32th European Peptide Symposium – in press
5. **Svetlana Ts. Staykova**, Emilia D. Naydenova, Diana W. Wesselinova, Liubomir T. Vezenkov, Solid phase peptide synthesis and *in vitro* antitumor activity of new analogues of somatostatin. Научни трудове на Рсенския Университет, **2012** – in press

Списък на научните форуми с участия, свързани с с дисертационния труд

1. **S. Staykova**, A. Kalistratova, E. Naydenova, L. Vezenkov. A solid phase peptide synthesis of novel oktapeptide analogs of somatostatin. **VIII Scientific Poster Session**, 18 May **2011**, UCTM, Sofia, Bulgaria.

Представен постер, публикувано резюме в сборник /Abstracts, p. 102; C.V.II.98/

2. **S. Staykova**, A. Kalistratova, L. Vezenkov, E. Naydenova. Synthesis of novel oktapeptide analogs of somatostatin with potential anticancer activity. **Seventh national conference on chemistry** – 26-29 May **2011**, Sofia, Bulgaria.

Представен постер, публикувано резюме в сборник /Abstracts, p. 22; 2-P5/

3. **S. Staykova**, E. Naydenova, D. Wesselinova, A. Kalistratova, L. Vezenkov. Synthesis and *in vitro* antitumor evaluation of new oktapeptide analogs of somatostatin. **6th Bulgarian Peptide Symposium**, 29 September – 01 October **2011**, Panchishte, Bulgaria.

Представен доклад и публикувано резюме в сборник /Abstracts, p. 16; L9/

4. **S. Ts. Staykova**, E. D. Naydenova, D. W. Wesselinova, L. T. Vezenkov, Synthesis and *in vitro* antitumor activity of new linear somatostatin analogues, **IX Scientific Poster Session**, 18 May **2012**, UCTM, Sofia, Bulgaria.

Представен постер, публикувано резюме в сборник /Abstracts, p. 110; VI-1/

5. **Svetlana Ts. Staykova**, Ivan G. Goshev, Diana W. Wesselinova, Liubomir T. Vezenkov, Aleksandra D. Kalistratova, Emilia D. Naydenova, Antioxidant and *in vitro* anticancer activity of new analogs of Octreotide , **IX Scientific Poster Session**, 18 May **2012**, UCTM, Sofia, Bulgaria.

Представен постер, публикувано резюме в сборник /Abstracts, p. 111; VI-2/

6. **Svetlana Ts. Staykova**, Emilia D. Naydenova, Diana W. Wesselinova, Liubomir T. Vezenkov, Synthesis and anticancer activity of new analogs of Vapreotide and RC-121, **32 European Peptide Symposium**, 2-7 September 2012, Athens, Greece.

Представен постер, публикувано резюме: JOURNAL OF PEPTIDE SCIENCE Volume: **18** Supplement: **1** Pages: **S147-S147** Published: **SEP 2012**

7. **Svetlana Ts. Staykova**, Emilia D. Naydenova, Diana W. Wesselinova, Liubomir T. Vezenkov, Solid phase peptide synthesis and *in vitro* antitumor activity of new analogues of somatostatin, 02-03.11. 2012, Conference with international interest, Razgrad, Bulgaria.

Представен доклад

Първа награда за най-добър доклад

Списък на научни проекти, разработени по темата

1. Договор № 10794 /2010/ при НИС на ХТМУ: “Синтез на пептиди с очаквано противотуморно действие”
2. Договор № 10917 /09.05.2011/ при НИС на ХТМУ: „Синтез на пептиди с очаквано противотуморно действие”
3. Договор № 11070 при НИС на ХТМУ: „Синтез на пептиди с очаквано противотуморно действие”