

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

BULGARIAN ACADEMY OF SCIENCES

ИНСТИТУТ  
ПО МИНЕРАЛОГИЯ И КРИСТАЛОГРАФИЯ  
“АКАД. ИВАН КОСТОВ”

INSTITUTE  
OF MINERALOGY AND CRYSTALLOGRAPHY  
“ACAD. IVAN KOSTOV”

София 1113  
ул. "Акад. Г. Бончев", бл. 107  
Тел.: (+3592) 9797055  
Факс: (+3592) 9797056  
E-mail: mincryst@clmc.bas.bg



1113 Sofia, Bulgaria  
"Acad. G. Bonchev" St., bl. 107  
Phone: (+3592) 9797055  
Fax: (+3592) 9797056  
URL: <http://www.imc.bas.bg>

## РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд на инж. Александра Д. Калистратова,  
представен за присъждане на образователна и научна степен „доктор“  
по научната специалност 4.2 „Химически науки“ (Органична Химия)

Рецензент: проф. д-р Борис Шивачев, Институт по минералогия и кристалография "Акад. Иван Костов" - БАН

Темата на представената от инж. Александра Д. Калистратова дисертация е **„Модифициране свойствата на биологично активни пептиди: Нови приложения на реакцията за O-N трансфер на ацилна група и димеризация на незащитени пептиди“** (Nouveaux développements de la réaction de transfert O-N acylique et Dimérisation de peptides non protégés, Tuning bioactive peptides properties: New developments in the O-N acyl transfer reaction and Dimerization of unprotected peptides, тема на френски и английски език). Научни ръководители на проф. д-р Емилия Найденова от катедра "Органична химия" на Химикотехнологичен и металургичен университет - София, и проф. д-р Жил Сюбра от Института по био-молекули на Университета Монпелие – Франция. Езикът, на който е написан дисертационният труд е английски, но това е разбираемо отчитайки факта, че работата по дисертацията е осъществена едновременно в двата университета а формата на редовна докторантура е *“cotutelle”*, сътрудничество което допринася за продължение на френско-езичното обучение провеждано в ХТМУ.

Инж. Александра Д. Калистратова е завършила средното си образование в езикова гимназия (френски и английски език) “Симеон Радев” гр. Перник през 2004 г. и същата година е приета в ХТМУ в специалност „Индустриална химия – с преподаване на френски език. През 2010 г. се дипломира като „Магистър“, а от месец март 2011 г. е зачислена като редовен докторант в ХТМУ и Университета Монпелие – Франция. Докторантката е положила в срок

специализиращите и общо профилни изпити, предвидени в програмата. Дисертационният труд е представен на 109 страници. Той съдържа **86** фигури, **16** схеми, **20** таблици и са цитирани 107 литературни източника. Състои се от три главни части: литературен обзор (20 стр.), Резултати и обсъждане (39 стр.) и Протоколна експериментална част (32 стр.), в която са описани отделните синтези и използваните протоколи и методи. Целта и задачите са ясно формулирани в отделна глава:

**целта** е „изучаване на реакцията за O-N трансфер на ацилна група и на възможностите за нейното приложение в пептидния синтез, както и димеризация на незащитени пептиди“.

**Конкретните задачи са четири:**

1. Синтез на 1,4-дiazепин-2,5-диони чрез O-N трансфер на ацилна група.
2. Синтез на пептиди с  $i, i+3$  вътрешно молекулен мост чрез O- N трансфер на ацилна група.
3. Димеризация на незащитени пептиди чрез 1,3-диполярно циклоприсъединяване на органични азиди и алкини („клик" реакция) и чрез образуване на силоксанови връзки.
4. Пречистване и охарактеризиране на новосинтезираните пептидни аналози.

В уводната част на дисертацията (2 стр.) е обоснован интереса и актуалността на дисертацията на инж. Александра Д. Калистратова: пептидите са клас кратки аминокиселинни секвенции, с аналогични функции на белтъците и лекарствените форми. За разлика от белтъците, пептидите могат да бъдат получени по синтетичен път и за разлика от лекарствените форми, усвояването, транспорта и взаимодействието на пептидите в организма е улеснено. От синтетична гледна точка, разработването на нови стратегии (протоколи) за твърдофазен пептиден синтез, пептиден синтез в разтвор, O-N трансфер на ацилна група и реорганизация допринасят при пептидния синтез, подобряването на разтворимостта и стабилизация на вторичната структура на аминокиселинните секвенции.

В направения литературен обзор инж. Александра Д. Калистратова описва за методите за синтез на пептиди, използваните „coupling“ реагенти, употребата на O-N трансфер на ацилна група при пептидния синтез, стратегиите за димеризация на пептиди и потенциалните биологични цели: белтъците p53, хормон на растежа – HGH.

В раздела с „Резултати и обсъждане“, глави III – IV, докторантката разглежда синтеза и изследването на задачите формулирани за реализирането на целта на дисертацията.

За решаването на първата цел „Синтез на 1,4-дiazепин-2,5-диони чрез O-N трансфер на ацилна група“ са проведени серия от експерименти. Считаю, че общата схема за синтез на

1,4-дiazепин-2,5-диони, основаваща се на литературни източници 67-70 от дисертацията, е правилно подбрана (Фиг. III.2), като при изборът и са липсвали обективни факти за появилите се трудности. Избраните псевдо-дипептиди са с  $\alpha$ - и  $\beta$ -амино киселини:

- Boc-D- $\beta$ -homoSer(H-Phe)-OH;
- Boc-Ser(H- $\beta$ Ala)-OH.

Направени са опити за синтез и циклизация в разтвор и твърдофазно. Проведените синтези са много стъпкови (Схема III.1), като докторантката е успяла да преодолее синтетичните трудности в разтвор, без тези от последната стъпка (4) Схема III.1.

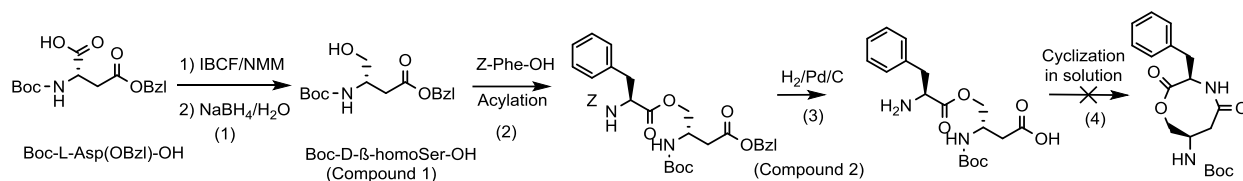


Схема III.1

Интересно е че, за разлика от синтеза в разтвор, който е оптимизиран до последното циклизиране, то твърдофазният синтез е значително по проблемен. Резултатите от опитите/комбинациите с различни смоли (два вида), смяна на защитни групи, ацилиращи реагенти и т.н. и при двата псевдо пептида на практика не могат да се сравнят със резултатите от синтеза проведен в разтвор. Последната стъпка, желаната вътрешномолекулярна циклизация (4) не се реализира, като се наблюдава между-молекулярна циклизация и образуването на съответния цикличен псевдо тетрапептид вместо очаквания цикличен псевдо дипептид (Фиг. 10 от дисертацията).

Втората задача е „Синтез на пептиди с  $i$ ,  $i+3$  вътрешно молекулен мост чрез O- N трансфер на ацилна група“. Резултатите от проведените изследвания са отразени в приетата работа в *Journal of peptide science*, „A switchable stapled peptide“. Общата схема за синтез е дадена на Фиг. 20. от дисертацията. Желаният псевдо пептид (Fmoc-Leu1-Leu2-Xxx-Aib4-Leu5-Leu6-Yyyy7-Pro8-NH<sub>2</sub>) се получава чрез твърдофазен пептиден синтез а реакцията на O-N трансфер на ацилна група се използва за възстановяване на структурата на биологично активния пептид като рН се наглася до неутрално (фосфатен буфер рН 7.4). Структурната единица, която ще бъде използвана за осъществяването на трансфера (вътрешно-молекулярния мост), се синтезира предварително в разтвор и се въвежда в пептидната последователност, след което се инициира образуването на вътрешно-молекулярния мост. Оригиналноста на работата се състои във въвеждането на алтернативен подход в сравнение с ref. 47-49, използващ Ser за свързване на 3 и 7 АК от използваните секвенции, което подобрява разтворимостта (до последната стъпка възвръщаща биологично активната

структурата на пептида), улеснява пречистването и не изисква специални условия за повторно нагъване (рефолдинг) – потвърдено чрез кръгов дихроизъм.

Трета дефинирана задача е: Димеризация на незащитени пептиди чрез 1,3-Диполярно циклоприсъединяване на органични азиди и алкини (пример за „клик" реакция). „Клик" реакцията е приложена за димеризирането на пептидите WTr53 и GHRP-6. Пептидна последователност (WTr53 или GHRP-6) е синтезирана чрез твърдофазен пептиден синтез, съответните линкери, 4-пентинова киселина и 2-азидооцетна киселина, са свързани към С-крайната свободна аминокиселинна група на пептида. Димеризирането използващо формиране на силиконов мост (N-terminal при WTr53 ) се извършва в присъствието на меден йодид и DIEA в DMF чрез микровълнов синтез. При GHRP-6, който е използван като моделен пептид, освен N-крайна димеризация е осъществена С-крайна и „internal“ (вътрешна, странична верига) димеризация. Проведените изследвания достигат до 78% и 90% добив съответно при WTr53 и GHRP-6, който (добив) не се влияе от удължаване на времето на протичане на реакцията. Сравнението на добива при N-крайна, С-крайна и „internal“ (вътрешна, странична верига) димеризация не показва съществени разлики (90 - до 95% добив).

Опитната част предоставя подробни описания; а получените продукти са много добре охарактеризирани с подходящи техники.

Направените изводи са коректни, а от посочените приноси на дисертационния труд изпъкват двата свързани с образуването на между молекулен мост в пептидната верига и последващо възвръщане на биологичната активност на пептида:

- За първи път е предложена стратегия за образуване на вътрешно-молекулен мост чрез естерификация между две аминокиселини, участващи в пептидна верига, свързана към твърдофазен носител.
- За първи път е приложена реакцията за O-N трансфер на ацилна група за синтез на пептиди с  $i, i+3$  вътрешно-молекулен мост и  $\alpha$ -спирална структура.

Правилно е посочена и необходимостта за провеждане на биологични тестове със синтезираните димери, което ще даде възможност за оценяване на влиянието на направените модификации в пептидната верига и установяване на връзката структура-биологична активност.

Получените резултати са описани подробно и с разбиране в дисертационния труд (на английски език), в автореферата (на български език) и в една приета за печат публикация, в *Journal of peptide science* (IF, 1.546) и са докладвани на три международни форума.

В обобщение на казаното до тук може да се заключи, че инж. Александра Д. Калистратова успешно се е справила със заплануваните задачи и изследвания на получените съединения, притежава добри познания по темата и е овладял много техники на анализ. В рамките на дисертационния труд е извършена огромна по количество и качество експериментална работа, която разкрива потенциала за бъдещи изследвани с оглед на практическото приложение на синтезираният клас съединения в областта на фармацията.

В заключение представените в дисертацията резултати са актуални, правилно научно интерпретирани, допълващи съществуващите знания, а част от тях са оригинални приноси (новости в науката). Те напълно отговарят на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ХТМУ-София. Въз основа на изложеното до тук, с убеденост давам положителна оценка на дисертационния труд на инж. Александра Д. Калистратова. Предлагам на уважаемите членове на научното жури да подкрепят присъждането на образователната и научна степен "доктор" по научната специалност 4.2 „Химически науки“ (Органична Химия) на инж. Александра Д. Калистратова.

София,

18. 12 . 2015

проф. д-р Борис Шивачев