

4. Резюмета на основните резултати и научните приноси;

РЕЗЮМЕТА НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ НА Д-Р ЕМИЛИЯ НАЙДЕНОВА ПРЕДСТАВЕНИ ЗА УЧАСТИЕ В КОНКУРС ЗА „ПРОФЕСОР” - 4.2 ХИМИЧЕСКИ НАУКИ /ОРГАНИЧНА ХИМИЯ/

A1.

N. Pencheva, P. Milanov, , L. Vezekov, T. Pajpanova, **E. Naydenova**, "Opioid profiles of Cys²-containing enkephalin analogues" *Eur. J.Pharm*, 498, 249-256, **2004**

За да се установят структурните особености определящи δ -опиоид рецепторните свойства на енкефалиновите аналози съдържащи Cys(O₂NH₂) в позиция 2 беше синтезирана серия от Cys²-съдържащи производни. Новите аналози бяха тествани за тяхната ефективност за потискане на електрически предизвикани контракции на *vas deferens* от мишка (съдържащ преимуществено енкефалин селективни δ -опиоидни рецептори) и на илеум от морско свинче (μ и κ -рецептори). Беше изследвана и тяхната пептидазна устойчивост. Отношението IC₅₀ при илеум от морско свинче към IC₅₀ при *vas deferens* от мишка, показващо селективността към δ -опиоидни рецептори, беше високо за Cys(O₂NH₂)-съдържащи аналози и по-специално за [Cys(O₂NH₂)², Leu⁵]енкефалин, който бе около 7 пъти по-селективен отколкото δ -опиоид рецептор селективния лиганд цикло [D-Pen², D-Pen⁵]енкефалин (DPDPE). Дисоциационната константа (K_A) и относителната ефикасност (e_{rel}) на съединенията в изолирани *vas deferens* от мишка бяха определени чрез използване на експлицитни формули. Формулите бяха извлечени чрез екстраполация на получените експериментални данни с двупараметрична хиперболична функция.

От получените стойности за K_A и e_{rel} предполагахме че:

(i) въвеждането на Cys(O₂NH₂)² в молекулата на [Leu⁵]енкефалин силно увеличава ефективността и не променя значително афинитета на съответните аналози към δ -опиоидните рецептори; [Cys(O₂NH₂)², Leu⁵]енкефалина има по-висок афинитет от DPDPE, но той е по-малко устойчив на ензимно разграждане; ефективността намалява при модификации в които има метионин в позиция 5.

(ii) D-конфигурацията на Cys(O₂NH₂)²-съдържащи аналози увеличава тяхната пептидазна устойчивост, но редуцира тяхната ефективност и афинитет към δ -опиоидните рецептори.

(iii) Заместването на Cys(O₂NH₂) с Neu(O₂NH₂) редуцира ефективността, афинитета и активността на съответните аналози и запазва тяхната чувствителност към ендогенни пептидази.

(iv) Заместването на сулфонамидната група с бензилова група в молекулата на Cys в позиция 2 намалява ефективността и афинитета на новите аналози спрямо δ -опиоидните рецептори, но е свързано с устойчивостта към ензимно разграждане.

Резултатите получени в това изследване позволяват: (!) рецепторният афинитет и ефикасността на агонистите да се включат като съображения при дизайна на

съединения, респективно лекарства, касаещи δ -опиоидните рецепторни свойства на новосинтезирани съединения; и (2) да се опишат някои структурни изисквания, които обуславят типа на опиоидния профил, респективно селективността към опиоидни рецептори.

A2.

Boris Shivachev, Rosica Petrova and **Emilia Naydenova**. Dimorphism in 3'-aminocyclohexanespiro-5'-hydantoin, *Acta Crystallographica Section C* 61, 524-526, 2005

Хидантоините и циклоалканспирохидантоините са обект на обширни изследвания поради техните биологични свойства. Настоящата работа е част от нашите изследвания върху охарактеризирането и изследването на биологичната активност на аминокicloалканспиро-5-хидантоините. Беше установено, че синтезираният от нас 3-аминоциклохексанспиро-5-хидантоин може да кристализира като два различни структурни полиморфа, и двата моноклини и еднаква $P2_1/c$ пространствена група. В първата структура има 2 молекули в асиметрична единица, едната от които чрез водородни връзки формира вълнообразни слоеве, докато другата образува верига разположена перпендикулярно на слоевете. Във втората структура има само една независима молекула. Молекулите образуват вериги посредством две водородни връзки при $N1 \cdots O2(x-1, y, z)$ и $N4 \cdots O1(x+1, y, z)$. Първият полиморф беше получен чрез прекристализация из метанол. Вторият полиморф се утаява от разтвор на 3-аминоциклохексанспиро-5-хидантоин в метанол съдържащ и $B(OH)_3$ в съотношение 1:1 по време на опитите да се получи борно производно.

A3.

Emilia Naydenova, M.Topashka-Ancheva, Petar Todorov, Ts. Yordanova, Kolio Troev, Novel α -Aminophosphonic acids. Design, Characterization and Biological activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 2190-2196, 2006

Синтезирани са нови α -аминофосфоновы киселини при реакция на производни на 1,3-оксазолидин-2-он с формалдехид и фосфорен трихлорид. При алкалната хидролиза на съответните оксазолидинонфосфонати с натриева основа във вода, бяха получени (2-хидрокси-1,1-диметилетил)аминометилфосфонова киселина и (2-хидроксипропил) аминометилфосфонова киселина с висок добив. Окислението на (2-хидрокси-1,1-димети летил)аминометилфосфоновата киселина в присъствие на CdO и вода доведе до получаването на N-фосфонометил-2-метил-1-пропанова киселина. Тази аминокиселина е производно на N-фосфонометилглицина (глифосат). Освен **хербицидна** активност, редица производни на N-фосфонометилглицина проявяват и антивирусна активност, като инхибират вирусите, причинители на някои херпесни инфекции, инфлуенца, риновируси и други. Тези съединения проявяват и противотуморно действие. Установено е, че те преминават през мембраните на раковите клетки 4-5 пъти по-лесно, отколкото тези на нормалните клетки.

Структурата на крайните продукти беше доказана с помощта на ИЧ, 1H , ^{13}C , и ^{31}P ЯМР и мас-спектроскопия. Важно за общото охарактеризиране на новосинтезираните аминокиселини, е изследването на тяхното действие върху генетичния апарат на клетката. За първи път са изследвани генотоксичния, цитотоксичния и антипролиферативен ефект на тези съединения върху подходяща тест система и е отчетен характера на тяхното действие върху основното биологично

свойство на еукариотната клетка – способността и за митотично делене. Установената корелация между умерения кластогенен ефект и ниските стойности на митотичния индекс, дава основание за провеждане на изследвания, върху туморни клетъчни линии с оглед установяване на очаквано противотуморно действие на тези съединения.

A4.

Emilia D. Naydenova*, Vanya I. Zhivkova, Rositza N. Zamfirova, Lubomir T. Vezekov, Yordanka G. Dobrinova and Polina I. Mateeva. Synthesis and biological activity of nociceptin/orphanin FQ(1–13)NH₂ analogues modified in 9 and/or 13 position, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16 , 4071–4074, 2006.

Ноцицептинът, известен още и като орфанин FQ (N/OFQ), е невропептид, структурно подобен на опиоидните пептиди (особено на динорфин А), който не взаимодейства с класическите опиоидни рецептори. Хептадекапептидът N/OFQ (Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln) селективно активира свой собствен рецептор NOP, наречен по-рано ORL₁ или OP₄, който е нов член на групата на опиоидните рецептори. Целта на настоящото изследване беше синтез и биологичен скрининг на нови аналози на N/OFQ(1–13)NH₂, най-скъсеният фрагмент, който притежава същата активност, както природния пептид ноцицептин. За да изследваме ролята на Lys, ние заместихме Lys в позиции 9 и/или 13 с неговите структурни аналози Orn, Dab (диаминобутанова киселина) или Dar (диаминопропанова киселина). Биологичната активност на новите аналози на ноцицептина беше изследвана *in vitro* върху електрически предизвикани съкращения на гладко-мускулни сегменти от простатичната част на vas deferens от плъх. Новите N/OFQ(1-13)NH₂– аналози показаха силно инхибиторно действие върху електрически предизвикани съкращения на гладки мускули и че тази тяхна активност не е свързана с класическите опиоидни рецептори. Опиоидният антагонист налоксон не променя съществено инхибиторното действие на новосинтезираните пептиди.

При заместването на Lys с Orn на 9-та позиция се повишава инхибиторната активност и максималния ефект на пептида [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ в сравнение с N/OFQ(1-13)NH₂, докато при заместването с Dab и Dar се понижава инхибиторната активност

A5.

Boris Shivachev, Rosica Petrova and **Emilia Naydenova**. 3'-Aminocyclohexanespiro-5'-hydantoin–phenylboronic acid (1/1). *Acta Crystallographica* E62, o3887–o3889, 2006

В настоящата публикация се разглежда кристалната структура на 3-аминоциклохексанспиро-5-хидантоин и фенилборна киселина (1/1). Молекулите в образувания се кристал се държат заедно чрез O—H...O, N—H...O и C—H...O водородни връзки и чрез N—H...π взаимодействия. Хидроксилните групи от фенилборната киселина са в *syn* позиция. Ароматния и хидантоиновия пръстен са разположени равнинно, а циклохексановия пръстен е в конформация стол.

A6.

Petar Todorov, **Emilia Naydenova**, Rosica Petrova, Boris Shivachev and Kolio Troev. [(4,4-Dimethyl-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl)methyl]phosphonic acid

Съединение (4,4-диметил-2-оксо-1,3-оксазолидин-3-ил)метилфосфонова киселина, синтезирано като междинен продукт при получаването на нови производни на N-фосфометилглицина, беше доказано и с помощта на рентгено-структурен анализ. Съединението кристализира в моноклинната пространствена група $P2_1/c$ с една независима молекула в елементарна клетка с параметри $a = 9.277(5)$, $b = 6.721(3)$, $c = 14.875(2)$ Å и $\beta = 94.61(4)^\circ$. Дължините на връзките и ъглите в молекулата са сравними с наблюдаваните в други аналогични съединения. Структурните геометрични особености на 2-оксазолидиновия пръстен, също са сравними с описаните в литературата, като той е в конформация „плик“, най-отдалечен от равнината на пръстена е C5 атома. Дължините на връзките P1-O4 и P1-O5 са съответно 1.543(2) и 1.553(2) Å.

В кристалната структура всяка една молекула се свързва, чрез O-H...O водородни връзки с четири съседни молекули, образувайки вериги успоредни на оста b . Стабилизацията на кристалната структура се подпомага от C-H...O взаимодействия ($C5-H5A...O5^i$ и $C6-H6B...O4^i$; $(i) x, 3/2-y, -1/2+z$), свързващи веригите по оста c образувайки “псевдо-равнини” успоредни на bc .

Пресметнатите, чрез *DFT* стойности на дължините на връзките и между молекулни ъгли, съвпадат с експерименталните стойности от рентгено-структурния анализ.

A7.

E. Naydenova, K. Troev, M. Topashka-Ancheva, G. Hägele, I. Ivanov, A. Kril. Synthesis, Cytotoxicity and Clastogenicity of Novel α - Aminophosphonic Acids. *Amino Acids* 33 (4), pp. 695-702, 2007

Аминофосфоновите киселини се разглеждат като структурни аналози на съответните аминокиселини и представляват важен и недостатъчно изучен клас потенциални биологично активни съединения. Разработването на нови методи за получаване на α -аминофосфоновы киселини е от особен интерес. Синтезиран и охарактеризиран е α -етил- N-(фосфометил)глицин по два начина: а) от 3-етил-2-хидрокси-2-оксо-1,4,2-оксазафосфоринан и б) от α -етил- α -N-(хидроксиетиламино)метил фосфонова киселина. Изследвани са цитотоксичния, кластогенния и антипролиферативния ефекти на всички синтезирани съединения както и на техни натриеви и изопропиламониєви соли. Изследванията за токсичност на новосинтезираните α -аминофосфоновы киселини са направени върху EBTr (говежда ембрионална клетка от трахея) епителна клетъчна линия и показват че α -етил- N-(фосфометил)глицина има значително по-ниска токсичност в сравнение с глифозата и неговата изопропиламониєва сол. Цитотоксичността допълнително се понижава два пъти при α -етил- N-(фосфометил)глицин.изопропил амониевата сол. Биологичните изследвания показаха че новосинтезираните съединения притежават две основни биологични характеристики. Те слабо увреждат хромозомната структура на нормалните костномозъчни клетки в опитни животни и значително подтискат клетъчната пролиферация. Тези характеристики са предпоставка за изследване на тези вещества за потенциален цитостатичен ефект върху подходящи туморни линии.

A8.

Emilia D. Naydenova , Petar T. Todorov , Margarita N. Topashka-Ancheva , Georgi Ts. Momekov , Tsvetelina Z. Yordanova , Spiro M. Konstantinov ^cand Kolio D. Troev . Novel N-(phosphonomethyl) glycine derivatives. Design, characterization and biological activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 43 (6), pp. 1199-1205, 2008

Синтезирахме и охарактеризирахме серия от нови α,α -дизаместени циклични производни на N-фосфонометилглицина. Отчитайки факта, че циклолевцина има антинеопластичен ефект, ние синтезирахме новите α -циклоалканаминометилфосфонове киселини с 5-, 6-, 7-, 8- и 12- членен пръстен с цел изследване и сравняване на биологичната им активност с изходните циклоалканаминокарбоксилните киселини, и установяване влиянието на големината на пръстена в молекулата върху тяхната биологична активност. Цикличните производни на α -аминометилфосфоновите киселини, получихме по метода на *Kabachnik – Fields* и структурата на крайните продукти доказахме с помощта на ^1H , ^{13}C , $^{31}\text{P}\{\text{H}\}$ - ЯМР и ИЧ-спектроскопия. Съединенията показаха умерен кластогенен ефект, ниска антипролиферативна активност върху костномозъчните клетки на мишките от линията *C57Bl* и добре изразен цитотоксичен ефект спрямо човешки туморни клетъчни линии: остра миелоидна левкемия HL-60, хронична миелоидна левкемия LAMA-84 и K-562, не-Ходжкинов лимфом DOHH-2, Ходжкинов лимфом HD-MY-Z и карцином на пикочния мехур Ej. От данните за противотуморната активност установихме, че : Въвеждането на фосфонометилната група в цикличните аминокиселини води до значително увеличаване на противотуморната активност, а с увеличаване на големината на пръстена в молекулата на съединенията нараства и противотуморната им активност. Съединенията с 8- и 12- членен пръстен показаха най- висока активност спрямо не-Ходжкинов лимфом DOHH-2.

A9.

Petar Todorov, **Emilia Naydenova**, Julita Popova and Kolio Troev. Synthesis and Characterization of Novel (9H-Fluoren-9-ylamino)carbonylamino methylphosphonic acid , *Heteroatom Chemistry*, 19,7,719-722, 2008

Новата (9H-флуорен-9-иламино)карбониламинометилфосфонове киселина синтезирахме от 1-(9H-флуорен-9-ил)карбамид в присъствие на формалдехид и фосфорен трихлорид. За целта, първо получихме спиро-(флуорен-9,4'-имидазолидин)-2',5'-дион, по метода на *Bucherer-Bergs*. При алкалната му хидролиза с $\text{Ba}(\text{OH})_2$ вместо очакваната 9-амино-9-флуоренкарбоксилна киселина ние изолирахме в чист вид и с високи добиви 1-(9H-флуорен-9-ил)карбамид. Опитите ни да получим диметил[(9H-флуорен-9-иламино)карбонил]- аминометилфосфонат, по класическата реакция на *Kabachnik – Fields*, с параформалдехид и диметилхидрогенфосфонат, в присъствието на триетиламин в среда от метанол, се оказаха неуспешни. За това ние приложихме реакцията на *Pikl u Engelmann*. Структурите на всички съединения доказахме чрез ^1H -, ^{13}C - и ^{31}P - ЯМР и ИЧ-спектроскопия.

A10.

Petar T Todorov, Rosica N Petrova, Emilia D Naydenova, Boris Lubomirov Shivachev, Structure, conformation and hydrogen bonding of two amino-cycloalkanespiro-5-hydantoins, *Central European Journal of Chemistry*, 7(1), 14-19, 2009

Структурните характеристики на хидантоините и спирохидантоините представляват интерес при разработването на нови лекарства за по-доброто разбиране на връзката структура-активност. Тази работа е част от наши изследвания върху синтез, охарактеризиране и биологична активност на аминок-циклоалканспиро-5-хидантоини и техни метални комплекси. В тази статия съобщаваме, че беше определена кристалната структура на 3-амино-циклохептанспиро-4'-имидазолидин-2',5'-дион (I) или 3-амино-1,3-дiazаспиро[4.6]ундекан-2,4-дион и 3-амино-циклооктанспиро-4'-имидазолидин-2',5'-дион (II) или 3-амино-1,3-дiazаспиро[4.7]додекан-2,4-дион. И в двете съединения молекулите са съединени чрез N-H.....O и N-H.....N взаимодействия, дължащи се на полярната хидантоинова група, образувайки слоеста структура. В тези структури циклоалкановите пръстени са издадени навън от централната по-полярна зона. Наблюдаваните молекулни структури са сравнени с такива оптимизирани чрез теория на функционалната плътност (DFT)

A11.

Petar T. Todorov, Emilia D. Naydenova*, Kolio D. Troev. Synthesis of novel aminophosphonic acids with hydantoin structure. *Heteroatom Chemistry*, 20(2), 87 – 90, 2009

Известно е, че хидантоините замествени при C-5 са важни лекарствени средства. В литературата няма данни за получаването на аминок-фосфоновы киселини съдържащи хидантоинова структура. Новите аминок-фосфоновы киселини синтезирахме по два метода. За синтеза на [(5,5-диметил-2,4-диохоимидазолидине-1,3-диил)диметил]дифосфоновая киселина използвахме метода на *Engelmann* и *Pikl*, с изходни реагенти 5,5-диметил хидантоин, фосфорен трихлорид и формалдехид в молно отношение 1:2:2. Диметил[(5,5-диметил-2,4-диохоимидазолидин-3-ил)аминометил]фосфонат (4) и диметил[(3-[(диметоксифосфорил)-метил]амино-5,5-диметил-2,4-диоксоимидазолидин-1-ил)метил] фосфонат (4') получихме с добър добив от 3-амино-5,5-диметилимидазолидин-2,4-дион по реакцията на *Kabachnik-Fields*. Структурите доказахме чрез ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, and ^{31}P - ЯМР и ИЧ-спектроскопия.

A12.

Daniel Kushev, Venelin Enchev, **Emilya Naydenova**, Roumiana Detcheva, Nadejda Spassovska and Konstantin Grancharov. Synthesis, structure and cytotoxicity of Platinum(IV) complexes of 3-aminocyclohexanespiro-5-hydantoin and 3-aminocycloheptanespiro-5-hydantoin, *Croatica Chemica Acta*, 82 (3) 607–612, (2009)

Цисплатината (*cis*-DDP) се използва в химиотерапията на различни видове тумори. Някои от тях обаче, развиват резистентност и това намалява ефективността на лечението. Това налага разработването на нови комплекси. Един от подходите за преодоляване на този проблем е получаването на Pt^{IV} комплекси.

Синтезирани и охарактеризирани са два нови комплекса на платина(IV) с 3-аминоциклохексанспиро-5-хидантоин и 3-аминоциклохептанспиро-5-хидантоин.

Структурата на синтезираните съединения е потвърдена чрез ИЧ- и ^1H -ЯМР-спектрални данни. Извършени са *Ab initio* изчисления с цел да се определи електронната структура и геометрията на изследваните съединения.

Извършени са *in vitro* изследвания за цитотоксичност върху миши еритролеукемични клетки (MEL), F4N. Получените резултати показаха, че в сравнение с аналогични комплекси с платина (II), които бяха обект на наши изследвания в друга работа, новополучените съединения имат по-ниска биологична активност. Допускаме, че в клетките Pt^{IV} комплексите претърпяват бърза редукция до съответните Pt^{II} съединения и на това се дължи понижената активност. Това насочва бъдещите изследвания към получаването на *trans*- Pt^{IV} комплекси или Pt^{IV} комплекси съдържащи смесени аминокислотни лиганди, като NH_3 и 3-аминоциклоалканспиро-5-хидантоин, които да имат забавена *in vivo* редукция и по-висока активност спрямо устойчиви на цисплатина туморни клетки.

A13.

Elina Tzvetanova, Almira Pavlova, Albena Alexandrova, Galina Nenkova, Lubomir Petrov, Margarita Kirkova, Radoslav Girchev and **Emilia Naydenova**. Are Nociceptin(1-13) NH_2 and its structural analogue [Orn⁹] Nociceptin(1-13) NH_2 able to affect brain antioxidant status in control and kainic acid-treated rats? *Cell Biochemistry & Function*, 27(4):243-50, 2009

Изследвани са *in-vivo* ефектите на ноцицептин /OFQ(1-13) NH_2 върху нивото на липидната пероксидация и клетъчно ензимни (суперокси дисмутаза, глутатион пероксидаза и глутатион редуктаза) и неензимни (глутатион) антиоксиданти в мозъка на контролни и третирани с каинова киселина плъхове. Ефектите на N/OFQ(1-13) NH_2 са сравнени с тези на неговия структурен аналог [Orn⁹]N/OFQ(1-13) NH_2 , в който лизина в 9-та позиция е заместен с орнитин. Каиновата киселина увеличава липидната пероксидация (4 и 24 часа след третирането) и намалява нивото на глутатиона (1 час след инжектиране). Ние не успяхме да намерим никакви промени в антиоксидантната ензимна активност независимо от времето за прилагане на каинова киселина.

В сравнение с ефектите на каиновата киселина, N/OFQ(1-13) NH_2 и [Orn⁹] N/OFQ(1-13) NH_2 , инжектирани 30 минути преди каиновата киселина нямат ефекти върху никой от параметрите изследвани в мозъка. Нещо повече неuropeptидите не изменят антиоксидантния статус в мозъка в контролните животни. От направените изследвания може да се заключи, че N/OFQ(1-13) NH_2 и [Orn⁹] N/OFQ(1-13) NH_2 , нямат нито промените антиоксидантна активност.

A14.

Naydenova ED*, Todorov PT, Troev KD. Recent synthesis of aminophosphonic acids as potential biological importance. *Amino Acids*, 38(1):23-30, 2010.

Аминофосфоновите киселини са важен клас биологично активни съединения. Техния синтез е от значителен интерес както за синтетичната органична химия, така и за медицинската химия. Въпреки че, фосфоновата и карбоксилната групи значително се различават по вид, размер и киселинност, α -аминофосфоновите киселини се разглеждат като структурни аналози на съответните аминокиселини и в преходното състояние напълно наподобяват пептидния хидролиз. Настоящата обзорна статия обобщава последните изследвания в областта на синтеза, охарактеризирането и биологичната активност на α -аминофосфоновите киселини и техни N-аналози. Показано е тяхното значение като водещи съединения за получаването на нови лекарствени средства и

особено при дизайна на такива с противотуморно действие. Подробно са разгледани изследванията на върху производните на N-(фосфонометил) глицина.

A15.

L. Kasakov, M. Nashar, E. **Naydenova**, L. Vezenkov, M. Vlaskovska. In vitro studies of the activity of newly synthesized nociceptin / orphanin FQ receptor ligand analogues. **Protein & Peptide Letters**, 17(5):616-20, 2010

Известно е, че хексапептидите Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH₂ или и Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Ile-Lys-NH₂ в *in vitro* и *in vivo* експерименти действат като парциални агонисти на NOP – рецептора. Базирайки се на тези пептиди ние синтезирахме нови аналози, в които лизина в 6-та позиция е заместен с орнитин, диаминобутанова (Dab) и диаминопропанова (Dap) киселини. Това ни позволи да изследваме връзката структура-биологична активност и да определим влиянието на дължината на страничната верига. За да установим влиянието върху биологичната активност на свободната N-крайна аминокислотна група, ние получихме и съответните деацилирани пептиди. Биологичната активност на новите аналози на ноцицептина беше изследвана *in vitro* върху електрически предизвикани съкращения на гладко-мускулни сегменти от простатичната част на vas deferens от плъх.

Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH₂ и неговите аналози показаха силен инхибиторен ефект

върху неврогенните съкращения без да оказват влияние върху мускулния тонус, което е характерно за агонистите на ноцицептиновия рецептор. За разлика Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Ile-Lys-NH₂ и неговите аналози показаха силен инхибиторен ефект върху мускулния тонус и незначителен ефект върху неврогенните съкращения. Това е характерно за NOP рецепторните антагонисти. Най-активни са пептидите с Dab или Dap. Изследването показва че заместването на Lys с негови структурни аналози с по-къса странична верига може да увеличи активността на пептидите, като агонисти или антагонисти.

A16.

Todorov P, **Naydenova E**, Nikolova RP, Shivachev BL. Ammonium hydrogen (RS)-[(5-methyl-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl)methyl]phosphonate. **Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online** 66 (1), pp. o6, 2010

Фосфоновите и аминокислотните производни намират широко приложение при получаването на хербициди, като свързващи агенти в металната екстракция и като биологично активни вещества в медицината. Като част от нашите изследвания върху връзката структура биологична активност на фосфоновите и аминокислотните производни ние определихме структурата на (RS)-[(5-метил-2-оксо-1,3-оксазолидин-3-ил)метил]фосфонат.NH₄

Асиметричната единица на разглежданото съединение съдържа една молекула под формата на амониева сол. (с един протон прехвърлен от фосфоновата група към амониевата.)

В кристалната структура метилоксазолидиноновата единица е не подредена в повече от две позиции. В една от тях оксазолидиновия пръстен е почти равнинен, докато в друга приема конформация плик. Дължината на връзките и ъглите имат нормални стойности и са сравними с такива в подобни структури.

Кристалната структура показва тридименсионална мрежа от О-Н.....О и N-Н.....О водородни връзки, които допълнително я стабилизират.

A17.

Emilia D. Naydenova, Petar T. Todorov and Kolio D. Troev. Synthesis and Characterization of Novel Cycloalkanespiro-5-hydantoin phosphonic acids. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 185 (7), 1315-1320, 2010

α -Аминофосфоновите киселини са структурни аналози на аминокарбоксилните киселини и притежават разнообразна биологична активност като: противотуморна, противовирусна, антибактериална и др. Установеният антипролиферативен ефект съчетан с ниска токсичност върху бозайници ги прави значими за разработването на нови противотуморни средства.

Синтезирана и охарактеризирана е серия от нови циклоалканспиро-5-хидантоин фосфонове киселини. При взаимодействие на циклоалканспиро-5-хидантоин с формалдехид и фосфорен трхлорид в съотношение 1:2:2 по модифициран от нас метод, получихме смес от [(2,4-диоксо-1,3-дiazаспиро-алкан-3-ил)-метил]фосфонове киселини и [(2,4-диоксо-1,3-дiazаспиро-алкан-1,3-диил)диметил]дифосфонове киселини. Техните структури са потвърдени чрез ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ и ^{31}P ЯМР и ИЧ-спектрални данни.

A18.

Todorov, P.T., **Naydenova, E.D.** Synthesis and characterization of novel dipeptide mimetics with hydantoin moiety. *Comptes Rendus Chimie*, 13 (11), 1424-1428, 2010

Хидантоините са важен клас биологично активни съединения, които представляват интерес както за химици така и за медици и фармаколози. Целта на настоящата работа бе синтез и охарактеризиране на нови хидантоинови производни, като потенциални биологично активни вещества.

Синтезирани са различни производни на 5,5-диметилхидантоин с добър добив, чрез TBUT (2-(1-ОН-бензотриазол-1-ил)1,1,3,3-тетраметилкарбамидететрафлуороборат) / DIEA (N,N-диизопропилетиламин) метода. За получаването на новите производни (2-амино- N-(4,4-диметил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)ацетамид, 2-амино-N-(4,4-диметил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)-3-фенилпропанамид и 2-амино-4-метил-N-(4,4-диметил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пентанамид) като изходни съединения използвахме 3-амино-5,5-диметилимидазолидин-2,4-дион и съответните защитени аминокиселини: Boc-Gly-OH, Boc-L-Leu-OH, Z-L-Phe-OH, Z-Gly-OH. Новите дипептидни миметици получихме след деблокиране на защитните Boc- и Z-групи, чрез обработване а TFA (трифлороцетна киселина) за Boc- и каталитично хидрогениране в присъствие на Pd/C катализатор за бензилоксикарбонилните (Z-) групи. Новосинтезираните съединения охарактеризирахме чрез ИЧ, МС и ЯМР (^1H и ^{13}C) спектрални данни.

A19.

Naydenova ED, Todorov PT, Mateeva PI, Zamfirova RN, Pavlov ND, Todorov SB. Synthesis and biological activity of novel small peptides with aminophosphonates moiety as NOP receptor ligands. *Amino Acids* 39 (5), 1537-1543, **2010**

Целта на настоящото изследване бе синтез и биологичен скрининг на нови аналози на Ас-RYYRWK-NH₂, модифицирани в N-края с 1-[(метоксифосфоно)метиламино]цикло алканкарбоксилни киселини. Новите лиганди за ноцицептин/орфанин FQ (N/OFQ) рецептора (NOP) получихме чрез твърдофазен пептиден синтез – Fmoc стратегия. Синтезираните съединения тествахме за агонистична активност *in vitro* върху електрически предизвикани съкращения на гладкомускулни сегменти от простатичната част на *vas deferens* от плъх, порода Wistar. Нашите резултати показаха, че заместването на аргинина (Arg) в първа позиция с аминоксфосфонат намалява значително афинитета на лигандите към NOP рецептора. Освен това увеличаването на пръстена (с 5-8 въглеродни атоми) допълнително намалява както активността така и селективността. Когато Arg¹ е запазен в хексапептидната молекула афинитета и селективността към NOP рецептора се запазва (съединение 6). Въз основа на направените изследвания допускаме, че гладкомускулното инхибиране при останалите съединения (със заместен Arg¹) се дължи на взаимодействия на тези пептидни аналози с класическите опиоидни рецептори (δ, μ, κ), а не с ноцицептиновия рецептор.

A20.

Petar T. Todorov, Ogniana Aneva, **Emilia D. Naydenova**. Synthesis of Phosphorus-Containing Dipeptide Mimetics via Kabachnik-Fields Reaction. *Heteroatom Chemistry*, **2011**, DOI 10.1002/hc

През последните години нашата изследователска група синтезира и изучи биологичната активност на редица нови α-аминоксфонове киселини и техни производни. Като част от нашите изследвания бяха синтезирани и охарактеризирани серия от нови хидантоин фосфонове киселини и техни аналози. Основната цел на настоящата работа бе синтеза на нови фосфор съдържащи дипептидни миметици като потенциални биологично активни вещества и е продължение на наши предишни изследвания. По реакцията на Kabachnik-Fields синтезирахме диметил(2-(4,4-диметил-2,5-диоксоимидазolidин-1-иламино)-2-оксоетиламино)метилфосфонат, диметил(1-(4,4-диметил-2,5-диоксоимидазolidин-1-иламино)-4-метил-1-оксопентан-2-иламино)метилфосфонат и диметил(1-(4,4-диметил-2,5-диоксоимидазolidин-1-иламино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-иламино)метил фосфонат. Новосинтезираните съединения охарактеризирахме чрез елементарен анализ, ИЧ и ЯМР (¹H, ¹³C, ³¹P) спектрални анализи.

A21.

Nikola Pavlov, Pierre Gilles, Claude Didierjean, Emmanuel Wenger, **Emilia Naydenova**, Jean Martinez, and Monique Calmès. Asymmetric Synthesis of beta2-Tryptophan Analogues via Friedel-Crafts Alkylation of Indoles with a Chiral Nitroacrylate" *Journal of Organic Chemistry*, **76**, 6116-6124, **2011**, dx.doi.org/10.1021/jo200733t

Асиметричното алкилиране по *Friedel-Crafts* на различно заместени индоли със

хирален нитроакрилат доведе до получаване на оптично активни аналози на β -триптофан. Това беше постигнато на базата на многоетапна синтеза включваща синтез на хирално спомагателно съединение, редукция на нитро група, отстраняване на хиралното спомагателно съединение и въвеждане на Fmoc- група. Реакциите протичат с добри добиви и висока диастереоселективност (над 90:10). Ние разработихме нов синтетичен метод за получаване на енантиочисти β -триптофанови аналози((S)-2-индолил- β -аланини). Показхме че β -нитроакрилата е подходящо спомагателно съединение за асиметрично алкилиране на индоли по *Friedel-Crafts*.

B22.

Petar T. Todorov, **Emilia D. Naydenova**, Margarita N. Topashka-Ancheva, Tsvetelina Yordanova and Kolio D. Troev. Synthesis, genotoxic and antiproliferative effects of new aminophosphonic acids. - **Bulgarian Chemical Communication**, 38(1), 20-23, 2006

СИНТЕЗ, ГЕНОТОКСИЧЕН И АНТИПРОЛИФЕРАТИВЕН ЕФЕКТИ НА НОВИ АМИНОФОСФОНОВИ КИСЕЛИНИ

Резюме. Голяма част от настоящото изследване на аминокислотите и производните им, е фокусирано върху тяхната хербицидна, антивирусна и антитуморна активности. Настоящата разработка представлява първото изследване, на новосинтезираните аминокислотите за генотоксичност и възможна цитостатична активност. Като изходни съединения за получаване на новите аминокислотите, използвахме производни на 1,3-оксазолидин-2-он, фосфорен трихлорид и формалдехид. Получените съединения са охарактеризирани с помощта на ^1H , ^{13}C и ^{31}P ЯМР спектроскопия.

B23.

L. Vezenkova, V. Zhivkova, **E. Naydenova**. Design and synthesis of new analogues of the nociceptin/orphanin FQ receptor ligands Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH₂ and Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Ile-Lys-NH₂. **Bulgarian Chemical Communication**, 38(1), 64-66, 2006

ДИЗАЙН И СИНТЕЗ НА НОВИ АНАЛОЗИ НА ЛИГАНДИТЕ НА НОЦИЦЕПТИН/ОРФАНИН FQ РЕЦЕПТОРА Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH₂ И Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Ile-Lys-NH₂

Резюме. Хексапептидите Ac-Arg-Tyr-Tyr-XXX-NH₂, идентифицирани чрез скрининг на синтетични пептидни комбинаторни библиотеки, представляват най-късата пептидна последователност, която взаимодейства селективно с NOP-рецептора. Най-висока активност притежават пептидите Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH₂ и Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Ile-Lys-NH₂, които се използват като химичен шаблон за изследване на връзката структура-активност с цел идентифицирането на нови лиганди на NOP-рецептора. В настоящата работа твърдофазният пептиден синтез беше използван за синтез на серия от нови аналози на гореспоменатите хексапептиди чрез заместване на Lys с Orn, диаминобутанова (Dab) и диаминопропанова (Dap) киселина. Биологичната активност на литературните пептиди и на новите производни ще бъде изследвана *in vitro* върху електрически стимулирани *vas deferens* от плъх.

B24.

G. Momekov, P. Todorov, **E. Naydenova**, A. Kostovski and K. Troev, Cytotoxic activity of new α -aminophosphonic acids against human malignant cell lines. *Pharmacia* 54:9–11, 2007

ЦИТОТОКСИЧНА АКТИВНОСТ НА НОВИ α -АМИНОФОСФОНОВИ КИСЕЛИНИ

Резюме. Цитотоксичността на новосинтезираните съединения, беше определена върху човешки туморни клетъчни линии. Всички изследвани съединения показват концентрационно-зависима цитотоксична активност спрямо левкемични клетки, установена след 72 h непрекъснато експониране, определена е и стойността на IC50. За да се изясни механизма на наблюдаваната цитотоксичност, ние проведохме количествено определяне на способността на новосинтезираните съединения **1-5**, към предизвикване на олигонуклеозомални–ДНК фрагментации – който са ключов критерий за апоптозата, която беше определена, чрез ‘Cell Death Detection’ ELISA-тест.

B25.

P. Markova, R. Girchev, **E. Naydenova**, L. Vezenkov, Heart rate variability after application of nociceptin analog N/OFQ(1-13)NH₂ in spontaneously hypertensive rats, *Trakia Journal of Sciences*, 5(3-4), 1-6, 2007

ВАРИАБИЛНОСТ НА СЪРДЕЧНАТА ЧЕСТОТА СЛЕД ПРИЛОЖЕНИЕ НА НОЦИЦЕПТИНОВ АНАЛОГ N/OFQ(1-13)NH₂ У СПОНТАННО-ХИПЕРТЕНЗИВНИ ПЛЪХОВЕ P.

Резюме. Изследван беше ефектът на ноцицептиновия аналог N/OFQ(1-13)NH₂ върху бързите осцилации на интерпулсовия интервал (IPI) у будни нормотензивни плъхове от линията Wistar и у спонтанно-хипертензивни плъхове от линията SHR.

МЕТОДИ: След контролен период N/OFQ(1-13)NH₂ (100 nmol/kg) беше прилаган венозно. Вълната на кръвното налягане беше регистрирана директно, чрез артериален катетър имплантиран в a.femoralis, по време на контролния период и след приложението на N/OFQ(1-13)NH₂. Интерпулсовият интервал беше определен като време между два последователни диастолни минимума във вълната на артериалното налягане. В спектрограмите за IPI, получени чрез FFT алгоритъм, бяха изследвани мощностите на колебания (P) в зоните на ниски (LF), средни (MF) и високи (HF) честоти. Симпатико-вагусовият баланс беше определен чрез отношението P_{MF}/P_{HF} .

РЕЗУЛТАТИ: У плъховете Wistar, пет минути след приложението на N/OFQ(1-13)NH₂, P_{LF} , P_{MF} и отношението P_{MF}/P_{HF} се понижиха през първи, втори и трети 10 минутен интервал, ($p < 0.05$). У плъховете SHR, приложението на N/OFQ(1-13)NH₂ не промени спектралните характеристики на IPI.

ИЗВОДИ: N/OFQ(1-13)NH₂ подтиска бързите осцилации на IPI, медирани предимно от симпатиковата нервна активност у нормотензивни плъхове Wistar. Отсъствието на промени у SHR могат да бъдат резултат на установената при тях повишена симпатикова нервна активност към сърцето, която вероятно редуцира капацитета на механизмите контролиращи сърдечната честота да отговорят на стимулирането на OP_4 рецепторите.

B26.

R.A.Girchev, P.P.Markova, **E.D.Naydenova**, L.T.Vezenkov. Fast oscillations of arterial blood pressure during nociceptin analogues application in *Wistar* rats. ***Bulgarian Chemical Communication*** 41(2), 127-132, 2009

БЪРЗИ ОСЦИЛАЦИИ НА АРТЕРИАЛНОТО НАЛЯГАНЕ У ПЛЪХОВЕ *Wistar* ПО ВРЕМЕ НА ПРИЛОЖЕНИЕТО НА НОЦИЦЕПТИНОВИ АНАЛОЗИ

Резюме. Ефектите на ноцицептиновите аналози N/OFQ(1-13)-NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)-NH₂ върху бързите колебания на артериалното налягане бяха изследвани на будни нормотензивни плъхове *Wistar*. Артериалното кръвно налягане (ABP) беше регистрирано директно през катетър имплантиран във феморалната артерия, чрез трансдюсер за налягане Gould Statham, свързан към Biopac MP100WS. След контролен период ефектите на N/OFQ(1-13)-NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)-NH₂ прилагани съответно в еднакви дози 100nmol/kg т.м., i.v. бяха изследвани в 9 последователни 10-минутни интервала. Спектрограмите за систолното (SAP), диастолното (DAP) и средното (MAP) артериално кръвно налягане бяха получени чрез Бърза Фурие трансформация в Lab View 3.1.1. В спектрограмите на SAP, DAP и MAP бяха изследвани спектралните мощности (P) в зоните на ниски (LF), средни (MF) и високи (HF) честоти. Приложението както на N/OFQ(1-13)-NH₂ така и на [Orn⁹]N/OFQ(1-13)-NH₂ не промени средните стойности на ABP по време на целия експеримент. Приложението на N/OFQ(1-13)-NH₂ предизвика понижаване на P_{LF} в спектрограмите на SAP: от 2.37± 0.31 на 1.46±0.34, 1.38±0.33 и на 1.55±0.23 mm Hg²; DAP: от 2.17±0.39 на 1.29±0.24, 1.02±0.20 и на 1.31±0.19 mm Hg² и MAP от 2.24±0.35 на 1.42±0.25, 1.14±0.10 и на 1.42±0.15 mm Hg² в първите три изследвани интервала, (*p* <0.05). Намалена беше също P_{MF} в спектрограмите на SAP с 34.5%, 47.9%, 43.7%; DAP с 46.9%, 41.6%, 43.1% и MAP с 42.3%, 40.4%, 36.8%, (*p* <0.05) в същите изследвани периоди. Приложението на [Orn⁹]N/OFQ(1-13)-NH₂ не предизвика промени бързите осцилации на артериалното налягане. Заместването на лизин с орнитин в 9^{та} позиция премахва ефекта на ноцицептиновия аналог N/OFQ(1-13)-NH₂ върху вариабилността на артериалното кръвно налягане у плъхове *Wistar*.

B27.

R. Girchev¹, P. Markova¹, **E. Naydenova**, L. Vezenkov. The influence of nociceptin analogues on the modulation of blood pressure oscillation in spontaneously hypertensive rats. ***Trakia Journal of Sciences***, 8(Suppl.2), 107-113, 2010

ВЛИЯНИЕ НА НОЦИЦЕПТИНОВИТЕ АНАЛОЗИ ВЪРХУ МОДУЛАЦИЯТА НА КОЛЕБАНИЯТА НА КРЪВНОТО НАЛЯГАНЕ В СПОНТАННО ХИПЕРТЕНЗИВНИ ПЛЪХОВЕ

Резюме. Целта на настоящата работа бе да се изследва влиянието на ноцицептиновите аналози: N/OFQ(1-13)NH₂; [Dab⁹]/OFQ(1-13)-NH₂ и [Dap⁹]/OFQ(1-13)-NH₂ върху колебанията на кръвното налягане в будни спонтанно хипертензивни плъхове (SAR).

МЕТОДИ: Ноцицептиновите аналози бяха прилагани интравенозно в равни дози-100 nmol/kg b.w. Вълната на кръвното налягане беше регистрирана директно, чрез артериален катетър имплантиран във феморалната артерия, по време на контролния период и след приложението на ноцицептиновите аналози. В спектрограмите за систолното (SAP), диастолното (DAP) и средното (MAP) артериално кръвно налягане,

получени чрез FFT (Бърза Фурие трансформация) алгоритъм, бяха изследвани спектралните мощности (P) в зоните на ниски (LF), средни (MF) и високи (HF) честоти.

РЕЗУЛТАТИ: N/OFQ(1-13)NH₂ не повлиява колебанието на кръвното налягане в SAR

Заместването на лизин с диамибутанова киселина (Dab) в 9^{та} позиция предизвиква намаляване на симпатико медираните колебания в спектрограмите на кръвното налягане в SHR. Заместването на лизина с диаминопропанова киселина в 9^{та} позиция повлиява и симпатико и неврохуморал медираните колебания в спектрограмите на кръвното налягане в SHR.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Получените резултати показват функционалната роля на аминокиселините намиращи се в 9^{та} позиция в структурата на ноцицептина за реализиране на техните ефекти върху бързите колебания на артериалното кръвно налягане както в нормотензивни така и в спонтанно хипертензивни плъхове.

B28.

Margarita N. Topashka-Ancheva, Petar T. Todorov, Tsvetelina Z. Gerasimova, **Emilia D. Naydenova**. Genotoxic and antiproliferative effects of recent synthesized hydantoin-phosphonic derivatives. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 46(2), 191-196, **2011**.

Резюме. Настоящата работа е продължение на нашите изследвания върху синтеза, охарактеризирането и биологичните изследвания на нови α -аминофосфоновы киселини и техни производни, като потенциални биологично активни вещества. Разглеждат се изследванията върху генотоксичния и антипролиферативния ефект на наскоро синтезирани нови аминокиселини с хидантоинов пръстен в молекулата. Тези ефекти за [(5,5-диметил-2,4-диохоимидазолидин-1,3-диил)диметил]дифосфоновая киселина, диметил[(5,5-диметил-2,4-диохоимидазолидин-3-ил)аминометил]фосфонат и диметил[(3-[(диметокси-фосфорил)-метил]амино-5,5-диметил-2,4-диоксоимидазолидин-1-ил)метил] фосфонат са изследвани за първи път. Те показаха умерен кластогенен и висок антипролиферативен ефект върху ICR миши костномозъчни клетки.

B29.

Elena Dzhambazova, Adriana Bocheva, Petar Todorov, Nikola Pavlov, **Emilia Naydenova**. Nitric oxideergic system involvement in analgesic effects of nociceptin receptor ligands with aminophosphonates moiety. *Compt. rend. Acad. Bulg. Sci.*, **2011**

Резюме. Изучено е участието на нитрикоксайдергичната система в ефектите на аналозите на Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH₂ показали статистически достоверен аналгетичен ефект спрямо ноцицептина чрез прекурсор и инхибитор на азотноокисната синтаза (NOS). Ефектите на новосинтезирани N-модифицирани хексапептидни аналози върху ноцицепцията са изследвани в мъжки плъхове Wistar посредством два теста, въвеждащи механо- и терморепторите (PP- paw-pressure, HP- hot-plate); Хексапептидите **2** (Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH₂), **3**, **4** (с включени аминокиселинни остатъци с 5 и 7 членен пръстен съответно) и **6** (със запазен Arg в първа позиция) статистически достоверно понижават противоболковия ефект на L-NAME за целия период на изследване при PP и HP тестове (p<0.01), което говори за

вероятно антиопиоидно действие. В ефектите участва и нитрикоксайергичната система, тъй като аналозите потиснаха и аналгетичният ефект на L-arginine. В опитите L-NAME (10mg/kg, i.p.) и L-arginine (1mg/kg, i.p.) бяха въвеждани 20 мин преди инжектиране на изследваните вещества. Като обобщение можем да кажем, че аналгетичните ефекти на новосинтезираните хексапептидни аналози 3, 4 и 6 са по-силни в сравнение с тези на аналог 2. В тях участват опиоидергичната, нитрикоксайергичната и ноцицептиновата невротрансмитерни системи. Вероятно наред с опиоидното действие те притежават и антиопиоидно.

B30.

P. Mateeva, R. Zamfirova, T. Paypanova, E. Naydenova, L. Vezekov Changes in the biological activity of N/OFQ(1-13)NH₂ after substitution of Lys⁹ by canavanine, Dab and Dar *Compt. rend. Acad. Bulg. Sci.*, 2011

Резюме. Изследвани са ефектите на N/OFQ(1-13)NH₂ аналози, в които Lys в позиция 9 е заменен с Dab (диаминобутанова киселина), Dar (диаминопропанова киселина) и Cav (канаванин), върху електрически стимулирани гладко-мускулни препарати от *vas deferens* на плъх, *in vitro*. Заместването с Dab и Dar, които са структурни аналози на Lys, но с по-къса странична верига, води до намаляване на афинитета и ефикасността към ноцицептиновия рецептор. Заместването на Lys^{9/13} с Cav, действа върху селективността на пептида. Новите пептиди биха могли да активират както NOP рецептора, така и налоксон-чувствителните опиоидни рецептори. Установихме, че Lys⁹ е с по-голямо значение за взаимодействието с рецептора отколкото Lys¹³.

C31.

V. I. Zhivkova, E.D. Naydenova, L.T. Vezekov, R.N. Zamfirova, S.B. Todorov, Analogues of nociceptin/orphanin FQ. Synthesis and biological activity, *Peptides 2004, Proceedings of 3rd International Peptide Symposium/28th European Peptide Symposium*, 972-973, 2005

Ноцицептин/Орфанин FQ е невропептид, който селективно взаимодейства с опиоиден свой собствен рецептор, наречен NOP рецептор. Синтезирани са серия от нови аналози на ноцицептина и е изследвана тяхната биологична активност. Влиянието на лизина е установено, чрез неговото последователно заместване с орнитин в пептидите : H-Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Orn¹³-NH₂ (1), H-Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Orn⁹-Ser-Ala-Arg-Lys-NH₂ (2), H-Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Orn⁹-Ser-Ala-Arg-Orn¹³-NH₂ (3). За установяване значението на аланина и за да се увеличи стабилността спрямо ензимно разграждане е синтезиран пептида [βAla¹¹]N/OFQ(1-13)NH₂ (4). Синтезиран е и аналог (5) на N/OFQ(1-9)NH₂, при който веригата е удължена с един аминокиселинен остатък чрез включване на Trp между Arg⁸ и Lys⁹ и е постигната последователност Arg-Trp-Lys-NH₂. Пептидите са получени чрез твърдофазен пептиден синтез, Fmoc стратегия върху Rink-amide смола. Биологичната активност е изследвана *in vitro*. В изследваната концентрация новите аналози на NC инхибират електрически предизвикани контракции на *vas deferens* от плъх. Ефектите са най-изразени при съединения 2 и 3 (50% и 70% съответно).

C32.

P. Stathopoulos, F. Rodis, **E. Naydenova**, D. Tsoukatos, M. Sakarellos-Daitsiotis, C. Sakarellos, A. Tselepis, V. Tsikaris, : Mapping the fibrinogen binding sites of the GPIIb/IIIa receptor using synthetic peptides derived from the GPIIIa subunit, **Peptides 2004**, Proceedings 3rd International Peptide Symposium/28th European Peptide Symposium, 770-771, **2005**

Образуването на тромби играе важна роля в острия коронарен синдром. Този процес изисква активиране на тромбоцитите, в които хетеродимерния комплекс от GPIIb/IIIa рецептора изменя конформация си и придобива способност да разпознава фибриногена. Фибриногена се свързва с рецептора посредством RGD последователността (α 95-97 и α 572-574) и карбоксилния край на додекапептида HHLGGAKQAGDV от γ -веригата (γ -400-411). Много методи са използвани за определяне на областта от GPIIb/IIIa рецептора, която е въввлечена в тромбоцитната агрегация.

Целта на това изследване е да се установи участието на GPIIIa :589-644 последователността в процеса на тромбоцитната агрегация използвайки синтетични пептиди. Синтезирани са пептидите VEC(Acm)KKFDRGALHDENTC(Acm)NR (GPIIIa 615-633), KKFDRGALHDENT (GPIIIa 618-630), (S,S) VECKKFDRGALHDENTCNR (GPIIIa 615-633 (S,S)) и SVSRNRDAPEGG (GPIIIa 211-222) чрез твърдофазен пептиден синтез, стъпка по стъпка, върху Wang-смола, Fmoc/tBu стратегия. Кондензационните реакции са извършени при молно съотношение аминокиселина/ TBTU/HOBt/смола 3/3/3/1. Отстраняването на Acm групата и формирането на дисулфидната връзка се извърши в твърда фаза с една стъпка чрез талиев(III)трифлуороацетат ($Tl(tfa)_3$) в ДМФ/1% анизол в съотношение $Tl(tfa)_3$ /пептидил смола 1,2/1. Пептидът се сваля от смолата с 95% трифлуороцетна киселина в присъствие на триизопропилсилан (TIS) и вода. Всички пептиди са пречистени чрез RP-HPLC върху полупрепаративна колона C₁₈. Чистотата на пептидите беше проверена чрез аналитична RP-HPLC, а точната молекулна маса беше потвърдена чрез ESI-MS (електроспрей йонизационна мас-спектрометрия). Инхибирането на тромбоцитната агрегация беше определено с помощта на PRP (Human Platelet Rich Plasma). Резултатите от биологичните изследвания показват, че GPIIIa 618-630 пептида вероятно инхибира тромбоцитната агрегация чрез взаимодействие с фибриногена.

C33.

P. Stathopoulos, F. Rodis, **E. Naydenova**, D. Tsoukatos, M. Sakarellos-Daitsiotis, C. Sakarellos, A. Tselepis and V. Tsikaris, Mapping the binding sites of the GPIIIa subunit of platelet receptor GPIIb/IIIa, **4th Hellenic Forum on Bioactive Peptides**, (Eds Paul Cordopatis, Evy M.-Zoupa, George Pairas), 361-364, **2005**

Проведени са обширни изследвания, включващи комбинация от имунологични, биохимични и мутационни подходи, за определянето на активния център на GPIIIa подединицата на фибриногена. Въпреки, че в литературата са се появили известни различия за предложения регион, GPIIIa 211-222 последователността е общоприета като свързващ център на рецептора. В предишни изследвания ние успяхме да определим свързващия участък вътре в GPIIIa подединицата, която е въввлечена в процеса на агрегиране, използвайки 20-пептиди, покриващи външноклетъчния регион

на GPIIb/IIIa. От биологичните изследвания заключихме, че някои от 20-пептидите включени в GPIIb/IIIa: 289-356, 385-440 и 589-644 региона проявяват инхибиторна активност, която може да ги охарактеризира като възможен фибриноген взаимодействащ участък. В тази работа представяме синтеза и анти-тромбоцитните свойства на различни пептиди, произлизащи от GPIIb/IIIa 589-644 последователността. Пептидът GPIIb/IIIa (211-222) беше използван като контролен пептид в биологичните опити. Беше намерено, че пептиди GPIIb/IIIa 211-222 и GPIIb/IIIa 618-630 в крайна концентрация 1mM проявяват най-висок инхибиторен ефект върху стимулирана с ADP агрегация на човешки тромбоцити и свързан с FITC-Fg за акривирание на GPIIb/IIIa рецептора.

C34.

Petar T. Todorov¹, Georgi Ts. Momekov, **Emilia D. Naydenova***, Kolio D. Troev Antitumor activity of new α -aminophosphonic acids. *Peptides 2006. Proceeding of 29th European Peptide Symposium*, (Eds: K.Rolka, P.Rekowski, J.Silberring) 152-153, **2007**

Аминофосфоновите киселини са важен клас биологично активни съединения с разнообразни биологични ефекти и незначителна токсичност спрямо клетки от бозайник. Тези съединения са ефективни при потискане нарастването на тумори и се изследват като потенциални противотуморни средства. Настоящата работа е продължение на наши предшестващи изследвания. Зависимостта между умерения кластогенен ефект и ниските стойности на митотичния индекс ни даде основание за изследване на цитотоксичната активност. Изследвани са 6 нови α -аминофосфоновите киселини и един фосфонопептид, синтезиран чрез твърдофазен пептиден синтез (SPPS), върху Wang смола. Противотуморната активност беше определена с помощта на МТТ-тест върху човешки туморни клетъчни линии (остра миелоидна левкемия HL-60, хронична миелоидна левкемия LAMA-84 и K-562, не-Ходжкинов лимфом DOHH-2, Ходжкинов лимфом HD-MY-Z и карцином на пикочния мехур Ej.) и цисплатина, като референтно съединение. Новите аминофосфонати показаха цитотоксична активност спрямо туморните клетки в микромолярни концентрации. Включването на Ala-Ala към 1-(диметоксифосфорил метил amino)циклохексанкарбоксилна киселина доведе до загуба на активността.

C35.

Girchev R, P. Markova, **E. Naydenova**, L. Vezencov. Sympatho-vagal balance after application of nociceptin analog [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ in conscious rats. *Collection, Symp. Series*, (Ed.J.Slaninova), **11**, 37-39, **2009**

Изследвано е влиянието на ноцицептиновите аналози N/OFQ(1-13)NH₂ и [Dab⁹]/OFQ(1-13)-NH₂ (100 nmol/kg, i.v.) върху симпатико-вагусовият баланс през 90-минутен период, определено чрез отношението P_{MF}/P_{HF} в спектрограмите на интерпулсовия интервал в плъхове от линията Wistar

N/OFQ(1-13)NH₂ намалява P_{MF}/P_{HF} ($p < 0.05$) като резултат от намалението в P_{MF} .

[Dab⁹]/OFQ(1-13)-NH₂ също намалява P_{MF}/P_{HF} ($p < 0.05$), но като резултат от увеличаването на P_{HF} . Измененията в симпатико-вагусовия баланс след приложение на

N/OFQ(1-13)NH₂ или [Dab⁹]/OFQ(1-13)-NH₂ е резултатът от влиянието върху различните дялове на автономната нервна система.

C36.

Petar T. Todorov, **Emilia D. Naydenova**, Georgi Momekov, Kolio D. Troev. Synthesis of novel hydantoin-phosphonic acids and dipeptides consist hydantoin structure with potential biological activity. **Peptides 2008**, *Proceeding of 30th European Peptide Symposium*, Hilkka Lankinen, Jari Vallivirta, Tomas Strandin, Jussi Hepojoki (Editors), 52-53, **2008**

Синтезирани са нови хидантоин-фосфонови киселини и дипептиди включващи хидантоинова структура в молекулата си. Новите дипептиди са синтезирани чрез пептиден синтез в разтвор при взаимодействие на Вос- или Z-аминокиселини (Gly, Phe, Tyr, Ser) с 3-аминохидантоини. Като кондензиращ реагент е използван TBTU/DIEA. Циклоалканспиро-5-хидантоините с 5-, 6-, 7- и 8-членен пръстен са получени от съответните циклични кетони по реакцията на Bucherer-Lieb и са превърнати в 3-амино производни чрез взаимодействие с NH₂NH₂·H₂O по модифициран от нас метод. Защитните групи на пептидите са отстранени чрез каталитично хидрогениране в присъствие на Pd/C за бензилоксикарбонилните (Z-) и трифлороцетна киселина (TFA) за бутилоксикарбонилните (Вос-) групи. Изходните хидантоини са използвани и за получаването на нови α-аминофосфонови киселини. Всички новосинтезирани съединения са охарактеризирани с ИЧ, ¹H, ¹³C{¹H} и ³¹P-ЯМР спектрални данни. Структурата на новите дипептиди е доказана чрез електроспрей маспектрометрия (ES-MS). В ход са биологични изследвания.

C37.

Emilia D. Naydenova, Petar T. Todorov, Nikola D. Pavlov, Elena B. Dzhambazova and Adriana I. Bocheva. N/OFQ(1-13)NH₂ analogues with aminophosphonate moiety: synthesis and analgesic activity. **Peptides 2010**, *Proceedings of the 31st European Peptide Symposium*, Michal Lebl, Morten Meldal, Knud J. Jensen, Thomas Hoeg-Jensen (Editors), 486-487, **2010**

Ноцицептина (N/OFQ) е неuropeпид (хептадекапептид: Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln), който селективно взаимодейства с опиоидно подобен рецептор (ORL₁ или NOP) и е нов член на групата на опиоидните рецептори. Системата ноцицептин-NOP участва в модулирането на множество процеси. Ноцицептинът оказва влияние върху усещанията за болка, страх, върху апетита, двигателната активност, обучението и паметта. N/OFQ(1-13)NH₂ е най-късият фрагмент, който запазва активността на природния пептид. Изследванията върху връзката структура –биологична активност показват, че N- и C-крайните модификации в N/OFQ водят до създаването на високо активни лиганди за NOP рецептора. Целейки разработването на лиганди за NOP рецептора, които да имат силно изразена аналгетична активност са синтезирани и тествани за ноцицептивен ефект, серия от N-модифицирани с аминоксифосфонатен остатък аналози на N/OFQ(1-13)NH₂. Новите аналози са синтезирани чрез твърдофазен пептиден синтез, Fmoc-стратегия. В първа позиция са включени 1-[(метоксифосфоно) метиламино]циклоалканкарбоксилни киселини.

Аналгетичната активност е изследвана с два ноцицептивни теста *paw-pressure* (PP) и *hot-plate* (HP). В PP теста всички нови аналози значително намаляват болковия праг сравнени с N/OFQ(1-13)NH₂ с изключение на аналог 5 в 20-та минута . Аналози 3

и **6** в 10-та минута и аналог **5** в 20-та минута показаха статистически значим и краткотраен аналгетичен ефект в сравнение с контролата.

C38.

A. Bocheva, E. Dzhambazova, P. Todorov, N. Pavlov, **E. Naydenova** . Effects of naloxone and JTC-801 on analgesic activity of novel N/OFQ(1-13)NH₂ analogues. *Proceedings of the 22nd American Peptide Symposium*, (Editor: Michal Lebl), American Peptide Society, **2011**

Синтезирани са N-модифицирани аналози на N/OFQ(1-13)NH₂ чрез твърдофазен пептиден синтез, Fmoc (9-флуоренилметоксикарбонил)-стратегия. Биологичната активност на новите пептидни аналози с аминоксифонатен остатък бе определена по време на остра болка при мъжки плъхове порода *Wistar* чрез *paw-pressure (PP)* тест. За да се изясни въвличането на ноцицептиновата и опиоидергичната системи в антиноцицептивните ефекти на аналози **3**, **5** и **6** (показали активност при предишни наши изследвания) са използвани JTC-801, N-(4-амино-2-метилхинолин-6-ил)-2-(4-етилфенокси-метил)бензамид монохидрохлорид, нов активен NOP рецептор антагонист, както и налоксон (Nal), като опиоиден антагонист, който блокира класическите опиоидни рецептори. JTC-801 приложен 10 минути преди инжектиране на новите аналози значително намалява болковия праг за целия изследван период. Този ефект е много по-силно изразен при N/OFQ(1-13)NH₂ (около 70%). Налоксона приложен 20 минути преди изследваните пептиди значително намалява техните аналгетични ефекти до хипералгезия. Получените резултати показват, че в аналгетичните ефекти на новите аналози **3**, **5** и **6**, с включени 1-[(метоксифосфоно)метиламино]циклоалканкарбоксилна киселина в позиция 1, са въвличени и ноцицептиновата и опиоидергичната системи с което се показва опиоиден и не-опиоиден механизъм в механизма на тяхното действие.

C39.

Emilia D. Naydenova, Nikola D. Pavlov, Petar T. Todorov, Elena B. Dzhambazova and Adriana I. Bocheva. Analgesic effects of novel hexapeptide analogues as nociceptin receptor ligands. *Proceedings of the 22nd American Peptide Symposium*, (Editor: Michal Lebl), American Peptide Society, **2011**

Хексапептидите с обща формула Ac-RYYR/KW/IR/K-NH₂ са идентифицирани чрез комбинаториални библиотеки, като най-малката последователност с висок афинитет и селективност към NOP рецептора и със значителен аналгетичен ефект. Синтезирани са нови N-модифицирани хексапептидни аналози с цел по-висока аналгетична активност и по-добра устойчивост на ензимно разграждане. Изследвани са ефектите на налоксон (Nal) и JTC-801 (NOP рецептор антагонист) в аналгетичната активност на новите аналози. Получените резултати показаха, че включването на 1-[(метоксифосфоно)метиламино] циклоалканкарбоксилна киселина в позиция 1 от молекулата на H-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH₂ увеличава аналгетичния ефект в аналози **3** и **4** и, че увеличаването на пръстена (8 атома) в съединение **5** намалява този ефект. Аналгетичният ефект е по-изразен в съединение **6**, в което Arg¹ е запазен. Нашите резултати показаха, че JTC-801 инхибира аналгетичния ефект при **3**, **4** и **6** в *PP* тест, докато Nal предизвиква хипералгезия (изключение прави **3**). Това предполага въвличането на ноцицептин и опиоид невромедиаторните системи в механизма на тяхното действие по време на остра болка.

Справка за научните приноси

Обобщена справка за научните трудове:

Общ брой научни трудове представени за участие в конкурса **39**

Общ импакт фактор – 40,35

1. Публикации в периодични и други научни издания

А. В международни списания с импакт фактор 21

В. В български списания 9

С. Доклади на научни форуми в пълен текст 9

2. Участия в други научни форуми (постери) **40**

3. Предстоящи за публикуване научни трудове **4**

(в международни списания)

Справка за приносите на научните разработки

Основните приноси на научните разработки са главно в следните направления:

I. Синтез и биологично действие на пептиди и аминокиселинни производни.

II. Синтез, и охарактеризиране на производни на спирохидантоини и хидантоини; α -аминофосфонови киселини и пептиди получени на базата на спирохидантоини;

III. Синтез, спектрално охарактеризиране и изследване на биологичните свойства на α -аминофосфонови киселини и пептиди с тяхно участие

I. Синтез и биологично действие на пептиди и аминокиселинни производни.

I.1. Синтез и свойства на пептиди с опиоидна активност

Приносът на научен труд №1 се изразява в синтеза на серия от нови енкефалинови аналози, съдържащи S-цистеинови производни и изследване на тяхната опиоидна активност с цел изясняване на зависимостите структура- биологична активност. Изследвана е и тяхната пептидазна устойчивост.

С помощта на математически модел е определена константата на дисоциация (K_A) и относителната ефективност (e_{rel}) на съединенията в изолирани *vas deferens* от

мишка. Въз основа на получените фармакологични данни и от получените стойности за K_A и e_{rel} е установено че:

- въвеждането на $Cys(O_2NH_2)^2$ в молекулата на $[Leu^5]$ енкефалин силно увеличава ефективността и не променя значително афинитета на съответните аналози към δ -опиоидните рецептори; $[Cys(O_2NH_2)^2, Leu^5]$ енкефалина има по-висок афинитет от DPDPE, но той е по-малко устойчив на ензимно разграждане; ефективността намалява при модификации в които има метионин в позиция 5.
- D-конфигурацията на $Cys(O_2NH_2)^2$ -съдържащи аналози увеличава тяхната пептидазна устойчивост, но редуцира тяхната ефективност и афинитет към δ -опиоидните рецептори.
- Заместването на $Cys(O_2NH_2)$ с $HCys(O_2NH_2)$ редуцира ефективността, афинитета и активността на съответните аналози и запазва тяхната чувствителност към ендогенни пептидази.
- Заместването на сулфонамидната група с бензилова група в молекулата на Cys в позиция 2 намалява ефективността и афинитета на новите аналози спрямо δ -опиоидните рецептори, но повишава устойчивостта към ензимно разграждане.
- Резултатите получени в това изследване позволяват да се опишат някои структурни изисквания, които обуславят селективността към опиоидните рецептори.

1.2. Синтез и свойства на антикоагулантни пептиди

Научни трудове №№ 32 и 33 са върху синтез и свойства на пептиди с 20-аминокиселинна последователност, с цел да се установи ролята на GPIIIa подединицата от тромбоцитния рецептор GPIIb/IIIa.

Синтезирани, пречистени и охарактеризирани са пептидите: VEC(Acm)KKFDRGALHDENTC(Acm)NR (GPIIIa 615-633), KKFDRGALHDENT (GPIIIa 618-630), (S,S) VECKKFDRGALHDENTCNR (GPIIIa 615-633 (S,S)) и SVSRNRDAPEGG (GPIIIa 211-222).

Синтезите са извършени по време на специализацията ми в Университета в Янина, Гърция, чрез твърдофазен пептиден синтез (SPPS). По време на тази специализация твърдофазният метод е усвоен и в момента успешно се прилага у нас.

Определено е инхибирането на тромбоцитната агрегация с помощта на PRP (Human Platelet Rich Plasma) и резултатите от биологичните изследвания показват, че GPIIb/IIIa 618-630 пептида вероятно инхибира тромбоцитната агрегация чрез взаимодействие с фибриногена.

1.3. Синтез и свойства на ноцицептинови аналози

1.3.1. Синтез и свойства на нови аналози на N/OFQ(1-13)NH₂

Ноцицептинът, известен още и като Орфанин FQ (N/OFQ), е невропептид, структурно подобен на опиоидните пептиди (особено на динарфин A), който не взаимодейства с класическите опиоидни рецептори (δ -, μ -, κ -). Хептадекапептидът N/OFQ (Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln) селективно активира свой собствен рецептор NOP (ORL₁ или OP₄), който е нов член на групата на опиоидните рецептори. **Научни трудове №№ 4 и 31** отразяват нашите изследвания върху синтеза и биологичната активност на нови аналози на N/OFQ(1-13)NH₂, най-скъсеният фрагмент, който притежава същата активност, както природния пептид ноцицептин. Като значителен принос на нашата работа може да се отбележи получаването на голям брой нови аналози, в които Lys в позиции 9 и 13 последователното и едновременното е заместван с Orn, Dab (диаминобутанова киселина), Dar (диаминопропанова киселина). За повишаване на устойчивостта спрямо ензимно разграждане Ala¹¹ е заместен с β -Ala.

За получаването им е използван съвременния твърдофазен метод за пептиден синтез, Fmoc-стратегия. При проведени *in vitro* биологични изпитания върху електрически предизвикани гладкомускулни съкращения на vas deferens от плъх е установено значението на Lys^{9,13} и на дължината на страничната верига върху биологичните свойства на новосинтезираните пептиди.

- Установено е, че при заместването на Lys с Orn на 9-та позиция се повишава инхибиторната активност и максималния ефект на новия аналог в сравнение с литературния фрагмент. Следователно, скъсяването на страничната верига в Lys⁹ с една CH₂-група води до повишаване на инхибиторната активност.

- Заместването на Lys¹³ с Orn, на Lys⁹ с Dab и Dar, както и едновременното заместване на Lys^{9,13} с Orn, Dab и Dar, води до понижаване на биологичната активност спрямо N/OFQ(1-13)NH₂.

- Новите аналози на N/OFQ(1-13)NH₂ показват силно инхибиторно действие върху електрически предизвикани съкращения на гладки мускули и тази тяхна активност не е свързана с класическите опиоидни рецептори. Опиоидният антагонист налоксон не променя съществено инхибиторното действие на новосинтезираните пептиди, което показва участие на NOP рецептора.

С най-активния пептид [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ са проведени допълнителни биологични изследвания, които са отразени в **Научни трудове №№13, 25-27 и 35.**

Изследвани са *in-vivo* ефектите на ноцицептин /OFQ(1-13)NH₂ върху нивото на липидната пероксидация и клетъчно ензимни (суперокси дисмутаза, глутатион пероксидаза и глутатион редуктаза) и неензимни (глутатион) антиоксиданти в мозъка на контролни и третирани с каинова киселина плъхове. Ефектите на N/OFQ(1-13)NH₂ са сравнени с тези на неговия структурен аналог [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, в който лизина в 9-та позиция е заместен с орнитин. Установено е, че неuropeптидите не изменят антиоксидантния статус в мозъка в контролните животни. От направените изследвания може да се заключи, че N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹] N/OFQ(1-13)NH₂, нямат нито про- нито антиоксидантна активност.

Изследвана е вариабилността на сърдечната честота след приложение на N/OFQ(1-13)NH₂ и е установено, че :

- подтиска бързите осцилации на интерпулсовия интервал (IPI) у будни нормотензивни плъхове от линията *Wistar*
- не промени спектралните характеристики на IPI у спонтанно-хипертензивни плъхове от линията *SHR*.

Изследвани са ефектите на N/OFQ(1-13)-NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)-NH₂ върху бързите колебания на артериалното налягане на будни нормотензивни плъхове *Wistar*.

Установено е, че прилагането на [Orn⁹]N/OFQ(1-13)-NH₂ не предизвика промени в бързите осцилации на артериалното налягане. Заместването на лизин с орнитин в 9-та позиция премахва ефекта на ноцицептиновия аналог N/OFQ(1-13)-NH₂ върху вариабилността на артериалното кръвно налягане у плъхове *Wistar*.

В **научен труд №30** са представени нашите изследвания върху *in vitro* ефектите на N/OFQ(1-13)NH₂ аналози, в които Lys в позиция 9 е заменен с Dab, Dar и Cav (канаванин), върху електрически стимулирани гладко-мускулни препарати от *vas*

deferens на плъх. Заместването с Dab и Dap, води до намаляване на афинитета и ефикасността към ноцицептиновия рецептор. Заместването на Lys^{9/13} с Cav, действа върху селективността на пептида. Установено е, че новите пептиди биха могли да активират както NOP рецептора, така и налоксон-чувствителните опиоидни рецептори. Установено е, че Lys⁹ има по-голямо значение за взаимодействието с рецептора отколкото Lys¹³.

1.3.2. Синтез и свойства на нови аналози на хексапептидни лиганди на ноцицептиновия рецептор

Хексапептидите Ac-Arg-Tyr-Tyr-XXX-NH₂, идентифицирани чрез скрининг на синтетични пептидни комбинаторни библиотеки, представляват най-късата пептидна последователност, която взаимодейства селективно с NOP-рецептора. Най-висока активност притежават пептидите Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH₂ и Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Ile-Lys-NH₂, които се използват като химичен шаблон за изследване на връзката структура-активност с цел идентифицирането на нови лиганди на NOP-рецептора.

Приносите на **Научни трудове №№15 и 23** се изразяват в синтеза на серия от нови лиганди на NOP-рецептора и изследване на тяхната биологична активност с цел изясняване на зависимостите структура-активност.

- Синтезирани са аналози на Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH₂ и Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Ile-Lys-NH₂, в които Lys в 6-та позиция е заместен с неговите структурни аналози Orn, диаминобутанова (Dab) и диаминопропанова (Dap) киселина. За получаване на аналозите е използван твърдофазен пептиден синтез Fmoc (9-флуоренил метоксикарбонил) стратегия, поради предимствата, които има тя пред Boc- стратегията.

- Изследвана е биологичната активност на новите производни *in vitro* върху електрически стимулирани *vas deferens* от плъх и е сравнена с тази на литературните пептиди.

- Установено е, че Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH₂ и неговите аналози показват силен инхибиторен ефект върху невrogenните съкращения без да оказват влияние върху мускулния тонус, което е характерно за агонистите на ноцицептиновия рецептор. За разлика Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Ile-Lys-NH₂ и неговите аналози показват силен инхибиторен ефект върху мускулния тонус и незначителен ефект върху невrogenните съкращения, което е характерно за NOP рецепторните антагонисти.

- Изследването показва че най-активни са пептидите с Dab или Dar и, че заместването на Lys с негови структурни аналози с по-къса странична верига може да увеличи активността на изследваните пептидите, като агонисти или антагонисти.
- Изследвано е влиянието на свободната N- крайната аминокиселинна група, като са проведени опити с получените деацилирани пептиди и е установено, че Ac- групата е важна за биологичната активност.

1.4. Синтез и охарактеризиране на аминокиселинни производни

Триптофанът е основна аминокиселина, която освен че играе важна роля в биосинтеза на протеини, е прекурсор на основни съединения като мелатонин (хормона на съня) или при синтеза на невромедиатора серотонин (хормонът на щастието). Триптофанът и неговите производни са широко използвани в различни области, свързани с откриването на нови лекарствени средства. Доказано е че α -триптофанът инхибира индоламин 2,3-диоксигеназа (DIO – ензим който е частично отговорен за депресивните и поведенчески състояния), докато β -триптофанът притежава антихипертензивна активност. Аналозите на тази аминокиселина са важни при синтеза на пептиди и пептидомиметици както и аналози на някои природни продукти. В сътрудничество с колеги от „Институт по Биомолекули Макс Мусерон“, Университет Монпелие 2 е разработен нов синтетичен метод за получаване на енантиочисти β -триптофанови аналози((S)-2-индолил- β -аланини)(публикация №21). Показано е, че β -нитроакрлата е подходящо спомагателно съединение за асиметрично алкилиране на индоли по *Friedel-Crafts*. Синтезите са осъществени на базата на многоетапна синтеза включваща синтез на хирално спомагателно съединение, редукция на нитро група, отстраняване на хиралното спомагателно съединение и въвеждане на Fmoc- група. Реакциите протичат с добри добиви и висока диастереоселективност (над 90:10).

Настоящото изследване е част от докторска дисертация, която предстои да бъде защитена.

Новополучените съединения са използвани за синтезиране на нови биологичноактивни пептиди с опиоидно действие, аналози на хексапептидния лиганд на ноцицептина:Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH₂. Резултатите предстои да бъдат публикувани

II. Синтез и охарактеризиране на производни на спирохидантоини и хидантоини; на α -аминофосфонови киселини и пептиди получени на базата на спирохидантоини;

II.1. Синтез, спектрално охарактеризиране и изследване на биологичните свойства на производни на спирохидантоини и хидантоини.

Спирохидантоините и техните производни намират широко приложение във фармацевтичната промишленост, поради своята биологична активност. Те проявяват антитуморно, антиепилептично и антиконвулсивно действие. Използват се и при лечение на аритмия и астма. Интересът към тези съединения нараства и след откриването на способността им да инхибират алдозоредуктазата, която превръща глюкозата в сорбитол и води до усложнения при диабетно болни - диабетичен катаракт, невропатия, нефропатия, ретинопатия и др. Спирохидантоините представляват интерес и като изходни продукти за синтеза на непротеинови аминокиселини и пептиди с тяхно участие.

Нашите изследвания в тази област започнаха със синтезирането на изходните спирохидантоини от съответните циклични кетони под действие на KCN и $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ по реакцията на Bucherer-Bergs, след което бяха синтезирани и охарактеризирани редица техни производни.

Структурните им характеристики представляват интерес при разработването на нови лекарства за по-добро разбиране на връзката структура - биологична активност. В **научни трудове №№ 2, 5 и 10** са представени резултатите от рентгеноструктурните изследвания на синтезирани от нас 3-амино-циклоалканспиро-5-хидантоини. Определена е кристалната структура на 3-амино-циклохексанспиро-5-хидантоина, както и на 3-амино-циклохептанспиро-5-хидантоина и 3-амино-циклооктанспиро-5-хидантоина. Установено е, че 3-амино-циклохексанспиро-5-хидантоинът кристализира в две различни структури. Полиморф I се състои от две самостоятелни молекули, а полиморф II от една. В първата структура има 2 молекули в асиметрична единица, едната от които чрез водородни връзки формира вълнообразни слоеве, докато другата образува верига разположена перпендикулярно на слоевете. Във втората структура има само една независима молекула. Молекулите образуват верига посредством две водородни връзки при $\text{N1} \dots \text{O2}(x-1,y,z)$ и $\text{N4} \dots \text{O1}(x+1,y,z)$. Циклохексановия

пръстен е в конформация стол със сходни на референтните торзионни ъгли. Наблюдаваните молекулни структури са сравнени с такива оптимизирани чрез теория на функционала на електронната плътност (DFT).

Научен труд №12 е продължение на наши предишни разработки върху синтеза, охарактеризирането и противотуморните свойства на платинови комплекси с лиганди 3-амино-циклоалканспиро-5-хидантоини, които широко се цитират в литературата. Цисплатината (*cis*-DDP) се използва в химиотерапията на различни видове тумори. Някои от тях обаче, развиват резистентност и това намалява ефективността на лечението. Това налага разработването на нови комплекси. Един от подходите за преодоляване на този проблем е получаването на Pt^{IV} комплекси. Приносите на тази работа се изразяват в синтеза и охарактеризирането на два нови комплекса на платина(IV) с 3-аминоциклохексанспиро-5-хидантоин и 3-аминоциклохептанспиро-5-хидантоин.

Електронната структура и геометрията на изследваните съединения е определена чрез *Ab initio* изчисления. Извършени са *in vitro* изследвания за цитотоксичност върху миши еритролевкимични клетки (MEL), F4N, които показват че новосинтезираните комплекси имат по-ниска биологична активност в сравнение с аналогични комплекси с платина (II), които са обект на наши предишни изследвания.

От направените изследвания допускаме, че в клетките Pt^{IV} комплексите претърпяват бърза редукция до съответните Pt^{II} съединения и на това се дължи понижената активност. Това насочва бъдещите изследвания към получаването на *trans*-Pt^{IV} комплекси или Pt^{IV} комплекси съдържащи смесени аминокиселини лиганди, като NH₃ и 3-аминоциклоалканспиро-5-хидантоин, които да имат забавена *in vivo* редукция и по-висока активност спрямо устойчиви на цисплатина туморни клетки.

Получените резултати ни дадоха основание да разширим и задълбочим нашите изследвания, като включим и модифициран с аминокиселини 3-амино-5,5-диметилхидантоин (**публикация №18**).

Синтезирани и охарактеризирани са новите дипептидни миметици: 2-амино- N-(4,4-диметил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)ацетамид, 2-амино-N-(4,4-диметил-2,5-диоксо имидазолидин-1-ил)-3-фенилпропанамид и 2-амино-4-метил-N-(4,4-диметил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пентанамид).

Поради значителната пространствена запреченост, най-често използваните методи за пептиден синтез се оказаха неподходящи. За формирането на пептидната

вързка успешно приложихме TBUT (2-(1-ОН-бензотриазол-1-ил)1,1,3,3-тетраметилкарбамидтетрафлуороборат) / DIEA (N,N-диизопропилетиламин) метода. Предимство на използвания метод е получаването на високи добиви и бързо протичане на кондензацията. В ход са допълнителни биологични изследвания.

II.2. Синтез, спектрално охарактеризиране и изследване на биологичните свойства на α -аминофосфонови киселини и пептиди получени на базата на хидантоини и спирохидантоини.

Известно е, че хидантоините заместени при C-5 са важни лекарствени средства. В литературата няма данни за получаването на аминоксфононови киселини съдържащи хидантоинова структура и за това ние разширихме нашите изследвания в това направление. Приносите на **научни трудове №№ 11, 17, 20 и 28** са в синтеза и охарактеризирането нови хидантоин-фосфонови производни.

- Новите аминоксфононови киселини са синтезирани по два метода: на *Engelmann* и *Pikl* и на *Kabachnik-Fields*, а техните структури са потвърдени чрез ИЧ, ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ и ^{31}P - ЯМР спектрални данни.

За синтеза на [(5,5-диметил-2,4-диоксоимидазолидин-1,3-диил)диметил]дифосфонова киселина успешно е използван метода на *Engelmann* и *Pikl*, с изходни реагенти 5,5-диметил хидантоин, фосфорен трихлорид и формалдехид в молно отношение 1:2:2. [(4,4-диметил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)-амино]метилфосфонова киселина и (5,5-диметил-2,4-диоксо-3-[(фосфометил)амино]имидазолидин-1-илметил)фосфонова киселина са получени след алкална хидролиза на диметил[(5,5-диметил-2,4-диоксоимидазолидин-3-ил)аминометил]фосфонат и диметил[(3-[(диметоксифосфорил)-метил]амино-5,5-диметил-2,4-диоксоимидазолидин-1ил)метил]фосфонат. Последните се получават в съотношение 2:1 при взаимодействието на 3-амино-5,5-диметилимидазолидин-2,4-дион, диметил-Н-фосфонат, параформалдехид и триетиламин в среда от метанол по реакцията на *Kabachnik-Fields* (**публикация №11**).

- За първи път е изследван техният генотоксичен и антипролиферативен ефект. Те показат умерен кластогенен и висок антипролиферативен ефект върху ICR миши костномозъчни клетки (**публикация №28**).

- Синтезирани и охарактеризирани са серия от нови циклоалканспиро-5-хидантоин фосфонови киселини. При взаимодействие на циклоалканспиро-5-хидантоин

с формалдехид и фосфорен трихлорид, са получени [(2,4-диоксо-1,3-дiazаспиро-алкан-3-ил)-метил]фосфонови киселини и [(2,4-диоксо-1,3-дiazаспиро-алкан-1,3-диил)диметил]дифосфонови киселини с 5-, 6-, 7- и 8-членен пръстен. (**публикация №17**).

- Синтезирани и охарактеризирани са серия от нови фосфор съдържащи дипептидни миметици като потенциални биологично активни вещества По реакцията на Kabachnik–Fields са получени: *диметил(2-(4,4-диметил-2,5-диоксоимидазолидин-1-иламино)-2-оксоетиламино)метилфосфонат*, *диметил(1-(4,4-диметил-2,5-диоксоимидазолидин-1-иламино)-4-метил-1-оксопентан-2-иламино)метилфосфонат* и *диметил(1-(4,4-диметил-2,5-диоксоимидазолидин-1-иламино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-иламино) метил фосфонат*, описани в **публикация А20**.

III. Синтез, спектрално охарактеризиране и изследване на биологичните свойства на α -аминофосфонови киселини и пептиди с тяхно участие

III.1.Синтез, спектрално охарактеризиране и изследване на биологичните свойства на α -аминофосфонови киселини

Аминофосфоновите киселини са важен клас биологично активни съединения. Особен интерес за химиците-синтетици и фармаколозите, представляват производните на аминофосфоновите киселини, поради разнообразната им биологична активност.

От синтетичните α -аминофосфонови киселини най-подробно е изучен N-фосфонометилглицина (глифосат). Той е основната субстанция на тоталния хербицид “Раундъп”, намиращ широко приложение в селското стопанство. Освен *хербицидна* активност, редица производни на N-фосфонометилглицина проявяват и антивирусна активност, като инхибират вирусите, причинители на някои херпесни инфекции, инфлуенца, риновируси и други. Тези съединения проявяват и противотуморно действие. Установено е, че те преминават през мембраните на раковите клетки 4-5 пъти по-лесно, отколкото тези на нормалните клетки.

Голяма част от изследванията ни са в областта на целенасочения синтез на нови α -аминофосфонови киселини, тяхното охарактеризиране и определянето на

биологичната им активност, и са представени в публикации №№ 3, 6- 9, 14-обзорна статия, 16, 22, 24, и 34. Потенциалът на тази група съединения като биологично активни вещества и перспективността на работата по създаването на нови производни на N-фосфонометилглицина с противотуморна активност, са били основен мотив в нашите научни разработки.

- Синтезирани са с висок добив 5 нови, неописани в литературата α -аминофосфонови киселини, на базата на 1,3-оксазолидин-2-он по реакцията на *Pikl u Engelmann*. Синтезираната N-фосфонометил-2-метилпропанова киселина е производна на N-фосфонометилглицина. Структурата на новосинтезираните α -амино фосфонови киселини, е доказана с помощта на ИЧ-, ЯМР- (^1H , ^{13}C , ^{31}P) спектроскопия.

- Структурата на (4,4-диметил-2-оксо-1,3-оксазолидин-3-ил)метилфосфоновата киселина е доказана и чрез рентгенно-структурен анализ.

- По метода на *Kabachnik-Fields*, са синтезирани и охарактеризирани 5 нови, циклоалканаминофосфонови киселини, производни на N-фосфонометилглицина.

- Новата (9H-флуорен-9-иламино)карбониламинометилфосфонова киселина е синтезирана от 1-(9H-флуорен-9-ил)карбамид по реакцията на *Pikl u Engelmann*.

- Синтезирани са 2 нови фосфонопептида, чрез твърдофазен пептиден синтез по Fmoc-стратегията.

- За първи път е изследван кластогеният и антипролиферативен ефект на новосинтезираните аминокиселини съединения.

Установената корелация между умерения кластогенен ефект и ниските стойности на митотичния индекс, ни даде основание за провеждане на нови изследвания, върху туморни клетъчни линии с оглед установяване на очаквано *противотуморно* действие на тези съединения. Резултатите от цитотоксичните изследвания показват, че новите аминокиселини проявяват *противотуморната* активност, съчетана с ниска *кластогенност*. От направените изследвания на новосинтезираните циклични аминокиселините е установено, че :

- въвеждането на фосфонатна група в молекулата на съответните циклични аминокиселини, води до възникване на *противотуморна* активност

- нарастването на молекулната маса, респективно на големината на циклоалкановия пръстен в молекулата на изследваните аминоксифосфонати, води до повишаване на противотуморна активност.

Разработването на нови методи за получаване на α -аминоксифосфонови киселини е от особен интерес. Синтезиран и охарактеризиран е α -етил- *N*-(фосфонометил)глицин по два начина: а) от 3-етил-2-хидрокси-2-оксо-1,4,2-оксазафосфоринан и б) от α -етил- α -*N*-(хидроксиетиламино)метил фосфонова киселина (**публикация №А7**). Изследвани са цитотоксичния, кластогенния и антипролиферативния ефекти на всички синтезирани съединения както и на техни натриеви и изопропиламониеви соли. Изследванията за токсичност на новосинтезираните α -аминоксифосфонове киселини са направени върху ЕВТг (говежда ембрионална клетка от трахея) епителна клетъчна линия и показват, че:

- α -етил- *N*-(фосфонометил)глицина има значително по-ниска токсичност в сравнение с глифозата и неговата изопропиламониева сол.

- Цитотоксичността допълнително се понижава два пъти при α -етил- *N*-(фосфонометил)глицин.изопропил амониевата сол.

- Биологичните изследвания показват, че новосинтезираните съединения притежават две основни биологични характеристики. Те слабо увреждат хромозомната структура на нормалните костномозъчни клетки в опитни животни и значително подтискат клетъчната пролиферация. Тези характеристики са предпоставка за изследване на тези вещества за потенциален цитостатичен ефект върху подходящи туморни линии.

III.2. Синтез и изследване на биологичните свойства на пептиди с участие на α -аминоксифосфонове киселини

Основавайки се на богатия опит, който имаме както в твърдофазния пептиден синтез, така и в получаването на α -аминоксифосфонове киселини ние синтезирахме нови аналози на Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH₂, модифицирани в *N*-края с 1-[(метокси фосфоно)метиламино]циклоалканкарбоксилни киселини. Приносите на тези изследвания са представени в научни трудове №№ 19, 29 и 39.

- Синтезирани са нови хексапептидни аналози, в които Arg в първа позиция е заместен с 1-[(метоксифосфоно)метиламино]циклоалканкарбоксилни киселини с 5-, 7- и 8-членен пръстен.

- Синтезиран е и хептапептиден миметик в, който преди Arg¹ е прикачен 1-[(метоксифосфоно)метиламино]циклопентанкарбоксилен остатък. Това дава възможност да се установи значението на Arg¹ и ацетилната група.

- Синтезите са проведени по твърдофазния метод, Fmoc- стратегия и Rink Amide MBHA смола, като носител. Поради слабата разтворимост на α -аминофосфонатите, кондензационните реакции с 1-[(диметоксифосфоно)метиламино]циклоалканкарбоксилните киселини са проведени в ДМФ и голям излишък на N,N-диизопропилетиламин (DIEA) в продължение на 15 часа. Установено е, че по време на деблокирането на пептида от смолата, с помощта на трифлорооцетна киселина (TFA), само една от метокси- групите на аминоксифоновия остатък се отстранява.

След подходящо пречистване и идентифициране с новите съединения бяха проведени *in vitro* скринингови изследвания за агонистична активност върху електрически предизвикани съкращения на гладко-мускулни сегменти от простатичната част на *vas deferens* от плъх, порода Wistar. Установено е, че:

- заместването на аргинина (Arg) в първа позиция с аминоксифонат намалява значително афинитета на лигандите към NOP рецептора.
- увеличаването на пръстена (от 5 до 8 въглеродни атоми) допълнително намалява както активността така и селективността.
- Когато Arg¹ е запазен в хексапептидната молекула афинитета и селективността към NOP рецептора се запазва .

Въз основа на направените изследвания допускаме, че гладко-мускулното инхибиране при останалите съединения (със заместен Arg¹) се дължи на взаимодействия на тези пептидни аналози с класическите опиоидни рецептори (δ , μ , κ), а не с ноцицептиновия рецептор.

С получените аналози са проведени допълнителни *in vivo* изследвания за установяване на техните аналгетични ефекти. Ефектите на новосинтезирани N-модифицирани хексапептидни аналози върху ноцицепцията са изследвани в мъжки плъхове Wistar посредством два теста, възбуждащи механо- и терmoreцепторите (*PP-paw-pressure*, *HP-hot-plate*);

Изследвани са ефектите на налоксон (Nal) и JTC-801(NOP рецептор антагонист) в аналгетичната активност на новите аналози. Получените резултати показват, че

- включването на 1-[(метоксифосфоно)метиламино]циклоалканкарбоксилна киселина в позиция 1 от молекулата на H-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH₂ увеличава аналгетичния ефект
- увеличаването на пръстена (8 атома) води до намаляване на този ефект.
- Аналгетичният ефект е по-изразен в съединението, в което Arg¹ е запазен.

Резултатите показват, че JTC-801инхибира аналгетичния ефект в *PP* тест, докато Nal предизвиква хипералгезия. Това предполага въвличането на ноцицептин и опиоид невромедиаторните системи в механизма на действие по време на остра болка.

Хексапептидите с включени аминоксифосфонатни остатъци с 5 и 7 членен пръстен съответно и със запазен Arg в първа позиция статистически достоверно понижават противоболковия ефект на L-NAME за целия период на изследване при *PP* и *HP* тестове, което показва, че освен опиоидно, те притежават и антиопиоидно действие. В ефектите участва и нитрикоксайергичната система, тъй като аналозите потискат и аналгетичният ефект на L-arginine.

Синтезирани са и N-модифицирани аналози на N/OFQ(1-13)NH₂ и са проведени аналогични биологични изследвания *in vitro* (резултатите са представени в подготвена и изпратена за публикуване работа) и *in vivo* - част от изследванията са докладвани на 31-ви Европейски Пептиден Симпозиум и на 22-ри Американски пептиден симпозиум.(публикации №№37 и 38).

Изследванията по N-модифицирани аналози на ноцицептиновия рецептор с потенциално аналгетично действие са част от текущ договор финансиран от „Фонд Научни Изследвания”.