



Professor Iliya Rashkov
Laboratory of Bioactive Polymers
Institute of Polymers
Bulgarian Academy of Sciences
1113 Sofia, Bulgaria
e-mail: rashkov@polymer.bas.bg
or rashkov_iliya@yahoo.fr

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд
инж. Александра Делчева Калистратова
за придобиване на образователната и научна степен „доктор”
по научна специалност 4.2. Химически науки (Органична химия)

Рецензент: проф. дхн Илия Благоев Рашков, чл.-кор. на БАН
от Института по полимери – БАН

Дисертацията на г-жа Калистратова е на тема „Модифициране свойствата на биологично активни пептиди: Нови приложения на реакцията за *O-N* трансфер на ацилна група и димеризация на незащитени пептиди”. Тя е съставена по следния начин:

Уводът описва интереса към лекарствените средства на основата на пептиди и предимствата и недостатъците на пептидите за изготвянето на лекарствени средства, и оттам – ползата от модификацията на пептиди.

Първата глава на тази дисертация е посветена на преглед на литературата (19 страници), фокусиран върху синтеза на пептиди и използване на реакцията на *O-N* трансфер на ацилна група в синтеза на пептиди. Обсъдени са стратегиите за синтез на пептиди с вътрешномолекулен мост. Обърнато е внимание на проблема с разтворимостта на пептиди с въглеродороден мост във връзка с разработените в дисертацията пептиди с вътрешномолекулен мост, чувствителни към рН. Очаквах, че прегледът на литературата ще завърши със заключение, което определя по-точно причините за провеждане на изследването, извършено в рамките на дисертацията, но такова заключение липсва.

Втората глава (2 страници) представя целта на дисертацията - да се разработят нови стратегии за модифициране на пептиди: изучаване на реакцията на *O-N* трансфер на ацилна група и възможностите за използването ѝ в пептиден синтез, както и димеризацията на незащитени пептиди.

За да постигне тази цел, инж. Калистратова е трябвало да реши редица задачи:

- Синтез на 1,4-дiazепин-2,5-диони чрез реакцията на *O-N* трансфер на ацилна група;
- Синтез на пептид с вътрешномолекулен мост чрез *O-N* трансфер на ацилна група
- Димеризация на незащитени пептиди чрез "клик" реакция и образуване силоксанови връзки;
- Пречистване и анализ на новосинтезираните пептидни аналози.

В тази глава, изборът на целеви продукти би могъл да бъде по-добре обоснован, в съответствие с тяхната потенциална биологична активност. Темата е продължение на изследванията, провеждани от екипа на проф. Subra и екипа на проф. Найденова в областта на пептидното инженерство – една много обещаваща област.

Третата глава (27 страници) е посветена на резултатите, получени с помощта на реакцията на *O-N* трансфер на ацилна група за синтеза на циклични псевдопептиди - diaзепиндиони, и на синтеза на пептиди с вътрешномолекулен мост чрез *O-N* трансфер на ацилна група.

Стратегията, използвана за синтеза на diaзепиндиони, се състои в синтеза на дипептид от α и β -аминокиселини, последвана от вътрешномолекулен циклизация, депротекция на амина, защитен с BOC (*трет*-бутилоксикарбонил) чрез обработване с трифлуороцетна киселина и трансфер на ацилна група при неутрални условия. Изучени са различни методологии - в разтвор и върху твърдофазен носител.

За синтез в разтвор са синтезирани и изследвани два моделни псевдопептида, базирани на α и β -аминокиселини: Boc-D- β -homoSer(H-Phe)-OH и Boc-Ser(H- β Ala)-OH. Стратегията за синтез в разтвор не е успяла в стадия на вътрешномолекулен циклизация, независимо от използвания метод. Вместо вътрешномолекулен циклизация, се образува съответният цикличен димер (цикличен тетрапептид). Тази стратегия е изоставена.

Синтезът върху твърдофазен носител е следващият избор в дисертацията, с цел да се създаде псевдо-разредена среда за етапа на циклизиране, която да доведе до благоприятни условия за вътрешномолекулен циклизация. Първо е развита нова стратегия за естерификация на алкохоли, свързани към смолата, с участието на ди-*трет*-бутилдикарбонат/4-диметиламинопиридин (Boc₂O/DMAP) като реагенти. Използвани са две смоли - пипеколинова смола и 2-хлоротритилова смола. В случая на синтеза върху пипеколинова смола, пречките в етапа на ацилиране не са преодолені успешно, въпреки прилагането на различни стратегии за естерификация. Синтезът върху 2-хлоротритилова смола се е сблъскал с проблеми, вероятно свързани с

пространствено запречване от тритиловата група. Независимо от използваната стратегия, синтезът на диазепин-диони се е оказала неуспешна. Направено е предположение, че при активирането на карбоксилната група протича вторична реакция - вътрешномолекулно прегрупиране, която води до разграждане на съединението и образуването на странични продукти. Бих искал да отбележа, че не са уточнени причините за избора на литиев хидроксид (обикновено използван хидролизиращ агент). Биха могли да бъдат обсъдени други агенти, например литиев йодид, известен с приноса си за избягване на рацемизацията, наблюдавана при хидролиза с литиев хидроксид (E. Biron, Kessler H., J. Org Chem 2005, 70: 5183-9).

Във втората част на тази глава, инж. Калистратова е насочила усилията си върху разработването на нова стратегия за синтез върху твърдофазен носител на пептид с вътрешномолекулен мост чрез *O-N* трансфер на ацилна група, както и за изпълнението на тази реакция на трансфер. За да провери валидността на стратегията, инж. Калистратова синтезира моделен пептид, основан на пептидна последователност, известна със своята склонност към образуване на α -спирала. След като изучава различни стратегии, инж. Калистратова успешно синтезира целевия пептид с вътрешномолекулен мост чрез прилагане на подходящите свързващи агенти *N,N*-диизопропилкарбодиимид/хидроксibenзотриазол/4-диметиламинопиридин (DIC/HOBt/DMAP). Реакция на трансфер на ацилна група е проведена при pH 7.4.

В четвъртата глава (9 страници) е представена алтернативна стратегия, разработена за димеризация на незащитени пептиди на базата на образуване на силоксанови връзки. Синтезирани са четири пептида: димерът на пептид WTr53 и три димери на аналог на пептида, освобождаващ хормона на растеж GHRP-6. Предложена и експериментално потвърдена е хипотезата, че реакцията на димеризация зависи от пептидната последователност. Отбелязано е, че тази част от работата се разработва в момента с цел сравняване на биологичния ефект на мономера и на димерите.

Експерименталната част е описана в пета глава (33 страници). В тази глава реакционните условия на осъществените синтези са подробно описани и е представена информация за получените съединения, включително формулите им и данни от анализите. Би било полезно да се уточнят добивът и чистотата на всеки етап на реакцията. Тази глава е най-дългата, защото отразява значителна по обем и трудност експериментална работа, която е била грижливо проведена от инж. Калистратова.

Като се има предвид големия брой на синтезите, за улесняване на читателя на дисертацията би било полезно номерът на страницата, където може да се намери информация за дадено съединение, да бъде уточнен. С други думи, частта Резултати и обсъждане (глави 3 и 4) и експерименталната част (Глава 5) биха могли да бъдат по-тясно свързани. Информацията за добива и за чистотата на продуктите, получени на всеки етап от предложените стратегии, би бил едно полезно допълнение към експерименталната част.

Основните приноси на дисертацията на инж. Калистратова са разработените нови стратегии: *i*) за синтез върху твърда подложка на пептид с вътрешномолекулен мост, превключваем чрез O-N трансфер на ацилна група, и *ii*) за димеризацията на незащитени пептиди, на основата на образуване на силоксанови връзки.

Би било интересно и полезно, ако дисертацията завършваше с излагане на перспективите, които открива този труд.

Инж. Калистратова е извършила значителна работа, при която тя е имала възможност за използване на микровълнов синтезатор за твърдофазен пептиден синтез - оборудване, което има предимства пред конвенционалните системи. Тя е усвоила много техники за анализ - аналитична и препаративна високоефективна течна хроматография (HPLC), течна хроматография, свързана с мас спектрометрия с йонизация чрез електроразпръскване (LC/MS ESI), ^1H NMR спектроскопия, анализи за кръгов дихроизъм.

Получените резултатите са предмет на две публикации – едната - приета в научно списание с рецензенти и импакт фактор, и една - в процес на подготовка, както и 3 съобщения на национални научни конференции.

Авторефератът отразява правилно и пълно постигнатите в дисертационния труд резултати.

Като имам предвид гореизложеното, подкрепям кандидатурата на инж. Александра Делчева Калистратова за придобиване на образователната и научна степен „доктор” по научна специалност 4.2. Химически науки (Органична химия)



София, 11 декември 2015

Илия Рашков