

РЕЗЮМЕТА НА ОСНОВНИТЕ НАУЧНИ РЕЗУЛТАТИ, ПАТЕНТИ И ВНЕДРЯВАНИЯ

на гл. ас. д-р инж. Данчо Любенов Даналев

A1. L. Vezekov, **D. Danalev**, B. Grigorova, Synthesis of new analogues of antistasin and ghilantens, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 2003, 6, 115-118

Фактор Ха (fXa) е серинова протеаза, активираща превръщането на протромбина в тромбин. Основната роля на fXa в каскадата на кръвната коагулация предполага, че неговите инхибитори могат да намерят практическо приложение като антикоагулантни лекарства. Антистазинът е произведен чрез рекомбинантна техника с използване на инсекти, мая и животински клетки. В това изследване ние представяме синтеза и биологичната активност на четири нови аналози на рекомбинантен антистазин и гилантени с цел да изследваме връзката структура-биологична активност.

A2. **D. Danalev**, L. Vezekov, B. Grigorova, Design, synthesis and structure-activity relationship of a series of fragment analogues of antistasin (ATS) and ghilantens (GLS), *Bioorg&Med. Chem. Lett.*, 2005, 15, 4217-4220

Синтезирани са серия от нискомолекулни пептидни инхибитори на Фактор Ха, фрагментни аналози на антистазин и гилантените, използвайки твърдофазен пептиден синтез. Новите аналози съдържат различни базични аминокиселини в 109 позиция. С цел да изследваме ролята на тези аминокиселини всички новосинтезирани съединения бяха изпитани за антикоагулантна активност. За да изследваме промяната в антикоагулантната активност бяха синтезирани и пептиди чрез замяна на С-крайната COOH група с CONH₂. Биологичната активност на всички съединения беше изследвана по отношение на АРТТ (активирано парциално тромбoplastиново време) и бяха определени IC₅₀ стойностите (концентрациите при които има удвояване на АРТТ в човешка плазма).

A3. **D. Danalev**, L. Yotova, L. Vezekov, Investigation of kinetic parameters in vitro of serine proteinases included in the blood coagulation cascade, *Protein & Peptide Letters*, 2006, 13 (6), 535-537

През последните години смъртните случаи, дължащи се на хемостатични нарушения надминават тези предизвикани от тумори. Големи усилия се влагат в превенцията и лечението на някои заболявания като артериалните тромбози. Антистазинът е

антикоагулантен протеин с молекулна маса 15кDa изолиран от слюнчените жлези на мексиканската пиявица *Haementeria officinalis*. Доказано е, че той е мощен инхибитор на Фактор Ха от каскадата на кръвната коагулация. В предишна наша работа ние сме докладвали синтеза на някои скъсени аналози на антистазина, които преставяват хибридни структури между неговите изоформи 2 и 3 и трипептидни инхибитори на серинови протеинази. Тук ние докладваме инхибиторните константи, механизма и типа на инхибиране на тези скъсени аналози на антистазина. Всички те показват висока антикоагулантна активност *in vitro* в човешка плазма.

A4. D. Danalev, M. Koleva, D. Ivanova, L. Vezenkov, N. Vassilev, Synthesis of two peptide mimetics as markers for chemical changes of wool's keratin during skin unhairing process, *Protein & Peptide Letters*, 2008, 15 (4), 341-345

Обезкосмяването на овчи кожи с предварителна алкална обработка на вълната води до образуването на два неприродни дипептидни миметика лизиноаланин и орнитиноаланин. Те се получават като резултат от хидролизата на кератина на косъма. Промените в молекулата на кератина го правят устойчив спрямо сулфидно разграждане. Ние синтезирахме и охарактеризирахме тези два неприродни дипептида. Бяха изследвани структурата и механизма на тяхното получаване в експериментални условия. Беше демонстрирано използването на тези съединения като маркери за контрол на промените в кератина на косъма по време на обезкосмяването.

A5. L. Vezenkov, M. Georgieva, **D. Danalev**, Tch. Ivanov, G. Ivanova, Synthesis and characterization of new galanthamine derivatives comprising peptide moiety, *Protein & Peptide Letters*, 2009, 16 (9), 1024-1028

Бяха синтезирани нови аналози на галантамина, съдържащи пептидни фрагменти в 6 или 11 позиция на галантаминовата молекула, чрез реакция между галантамин и дипептиди и трипептиди, производни на N-(3,4-дихлорофенил)-Д,Л-аланин-ОН. Най-добри резултати по отношение на добиви, лесно пречистване на целевите продукти и леснота на реализация на синтетичната схема бяха постигнати с използване на цианометиллов естер на Вос-глицин като активирано съединение.

A6. I. Ivanov, L. Vezenkov, **D. Danalev**, New peptide analogues of β -secretase inhibitor OM 99-2, modified in P3-position, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 2009, 11, 47-50

Най-късата пептидна структура, притежаваща β -секретазна инхибиторна активност открита до сега е тетрапептида Boc-Val-Asp-Leu-Ala-OH (ОМ 99-2). Ние синтезирахме шест пептидни миметика, аналози на ОМ 99-2, използвайки конвенционален пептиден синтез в разтвор. Всички новосинтезирани съединения бяха охарактеризирани чрез тънкослойна хроматография, точки на топене, ъгъл на оптично въртене и масспектрометрия. Биологични изпитания са в ход.

A7. S. Vezenkov and D. Danalev, From molecule to sexual behavior: The role of the neuropentapeptide Proctolin in acoustic communication in the male grasshopper *Chorthippus biguttulus*, *European Journal of Pharmacology* 2009, 216, 57-60

Звуковата комуникация при скакалеца *Chorthippus biguttulus* е подходящ и удобен поведенчески модел за изследване на неврофизиологичните ефекти и разкриване на молекулните механизми на специфични неuropeптиди. Невропептидът проктолин играе модулираща роля в мозъчната невронална мрежа, която контролира звуковата комуникация (стридулация), респективно сексуалното поведение на мъжките от вида *Chorthippus biguttulus*. Активирането на проктолиновите рецептори инициира изпълнението на любовна песен, второ ниво на сексуално поведение, предхождано от серенада, контролирано от мускариновите ацетилхолинови рецептори. Фармакологичните изследвания направени от нас показаха, че вътреклетъчната сигнална каскада на фосфолипаза Ц е свързана с любовното пеене, тъй като неомидинът и литиевите йони имаха силен инхибиторен ефект върху стимулираното от проктолина пеене. Нещо повече, форболовият естер (аналог на вторичния посредник диацилглицерол), инжектиран в чувствителните към проктолин места в мозъка, предизвиква стридулация самостоятелно. Това показва, че протеинкиназа Ц медира ефектите на активираната фосфолипаза Ц. Получените резултати показват възможните молекулярни механизми, които участват при взимането на решение в мозъчен център, контролиращ сексуалното поведение – какво (чрез промяна на контекста на изпълняваната песен), кога (чрез контрол на инициацията на продуциране на звуци) и колко продължително (чрез повишаване нивото на възбудния процес) мъжкия скакалец да произвежда видово и полово специфични звуци.

A8. D. Danalev, L. Vezenkov, V. Lozanov, A. Bakalova, Design, synthesis and structure-activity relationship of new 109-116 fragment analogues of antistasin and ghilantens, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2010, 16(2), 107-110

Чрез твърдофазен пептиден синтез бяха синтезирани серия от нискомолекулни пептидни инхибитори, аналози на антистазина и гилантените. Тези съединения се различават по аминокиселината в 109 позиция (различни базични аминокиселини) или по тази в 115 позиция (Val или Ile), както и по модификацията на пролиновия остатък в 116 позиция

(като свободна киселина или като амид). Беше изследвана антикоагулантната активност на тези съединения. Беше определена IC_{50} на новосинтезираните съединения чрез измерване на активираното парциално тромбoplastиново време. Чрез използване на уравнението на Михаелис-Ментен беше определен смесен тип на инхибиране на новосинтезираните съединения спрямо тромбина и Фактор Ха.

A9. I. Minchev, **D. Danalev**, L. Vezekov, L. Nikolaeva-Glomb, A. Galabov, An original strategy for Gln containing peptide synthesis using SPPS and Glu(OH)-1-OAll, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2010, 16(3), 233-238

Използвайки мултиплициран пептиден синтез в разтвор в паралел, ние синтезирахме серия от 24 съединения, аналози на трипептидната последователност Z-Leu-Phe-Gln-H, модифицирани с имидазол остатък. Беше създадена ефективна и лесна за изпълнение схема за включване на имидазоловия хетероцикъл към С и/или N-края на глутаминовия остатък чрез използване на алилна защитна група за α -COOH функцията на Fmoc-Glu. Подходът с използване на Fmoc-Glu-1-OAll като първа аминокиселина, свързана към смолата, е една добра алтернатива за включване на голям брой аминокиселини и/или хетероциклени съединения към пептиди. Предварителни биологични изследвания за антивирусна активност на новосинтезираните съединения показват, че включването на имидазолов хетероцикъл към пептидите повлиява положително антивирусната им активност спрямо *Coxsackieviruses B1* и *Poliovirus type 1* вируси.

A10. S. Bayryamov, **D. Danalev**, N. Vassilev, Ribozymomimetic chemical synthesis of peptide bond using phosphorous acid /oxirane mediators, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 2011, 186 (2), 338-344

Беше създадена моделна система имитираща природната рибозома, както и начина на рибозимно действие. Тя използва оксиранови аналози като кондензиращо средство и H_3PO_3 като активатор на карбоксилната група и защита на аминокиселините. С цел да демонстрираме способността на H_3PO_3 / оксирановата система да имитира синтезата в природата на пептидна връзка, осъществяваща се в рибозомата, както и да имитира синтеза и хидролизата на междомолекулна връзка в рибозимата ние синтезирахме четири модели съединения, съдържащи амидна връзка използвайки H_3PO_3 / оксирановата система.

A11. D. Danalev, L. Legentil, R. Daniellou, C. Nugier-Chauvin, V. Ferrières, Direct access to new β -D-galactofuranosyl-L-cysteine and serine, *Tetrah. Lett.*, 2011, 52, 1121-1123

Галактофуранозните посттранслационни модификации, макар и много редки, са наблюдавани в някои биомолекули продуцирани от паразити. Докато хексапиранозиди са вече били свързвани към различни пептиди и протеини, само няколко хексафуранозиди са неприродно свързвани към аминокиселини. Тук ние докладваме методология за гликозилиране за получаване на S-алкил, O-серин и S-цистеин- β -D-галактофуранозиди, излизайки от галактофуранозидни донори. Сравнени бяха O-ацетил, тиюимидаил и ацетимидаилни донори по отношение на добиви и селективност при тяхната реакция с меркаптани, L-цистеин и L-серин. Установихме, че тиюимидатите са най-добрите донори за гликозилиране на аминокиселини.

A12. D. Danalev, N. Lubin-Germain, S. Serfaty, J.Y. LeHuerou, J. Augé, J. Uziel, P. Griesmar, Titan based hybrid organic-inorganic gels comprising carbohydrate moiety, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 2011, **accepted**

Синтезирани бяха серия от гелове на основата на титан, съдържащи въглехидратни мотиви. Използваните захари съдържат специфична хидразидна група, като комплексообразувател. В допълнение тази група образува стабилни хидрати, които позволяват бавното отделяне на вода по време на гелообразуването. Използваните в това изследване съединения образуват прозрачни и стабилни гелове с титанов алкоксид без добавка на допълнително количество вода. ИЧ спектралните данни показват, че някои от съединенията образуват монодентатни, а други бидентатни лиганди. Калориметричните изследвания с Тиан-Калвет калориметър потвърждават заключенията направени от интерпретацията на ИЧ данните. Избраната стратегия за синтез дава възможност за получаване на хибридни органично-неорганични материали чрез добавка на природни хелатни лиганди с цел намаляване скоростта на реакцията на хидролиз-поликондензация, протичаща по време на зол-гел процеса. В допълнение по този начин използваните като инхибитори въглехидрати остават инкорпорирани в получения гел. На база на ИЧ данните ние предлагаме различни типове на координация на тези лиганди спрямо титана. Допълнителни СЕМ изследвания показват влиянието на лигандите върху структурата на получените ксерогелове.

A13. L. Vezenkov, J. Sevalle, **D. Danalev**, T. Ivanov, A. Bakalova, M. Georgieva and F. Checler, Galanthamin based hybrid molecules with acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and γ -secretase inhibition activities, *Curr. Alz. Res.*, 2011, **accepted**

В предишна наша работа ние осъществихме дизайн и синтез на нови пептидсъдържащи анализи на галантамина. Тези съединения ние анализирахме за инхибиторна активност спрямо ацетилхолинестеразата, бутилхолинестеразата и γ -секретазата, три ензима играещи централна роля при различни невродегенеративни заболявания, включително болестта на Алцхаймер. Тези фармакологични агенти са еднакво активни спрямо ацетилхолинестеразата, но показват драстично по-висока инхибиторна активност спрямо бутилхолинестеразата, като някои от съединенията показват 100 пъти по-висока активност от изходния галантамин. Двата галантаминови амида, които показват ниска активност спрямо ацетилхолинестеразата, са най-активни спрямо бутилхолинестеразата (респективно 106 и 133 пъти по-активни от изходния галантамин). Интересно е, че пет от шестте съединения показват рядко добра инхибираща активност и спрямо γ -секретазата. Така ние създадохме нови съединения със значителна активност спрямо няколко ензима, които са ключови при различни нарушения при няколко невродегенеративни болести. Тези смесени инхибитори представляват потенциални лекарствени препарати, способни да блокират дегенеративния процес при тези заболявания.

Б1. Везенков, Любомир Т; Георгиева, Мария Г; **Даналев, Данчо Л**; Иванов, Чавдар Б; Бакалова, Анастасия Т; Христов, Крум К; Митев, Ваньо И. Производни на галантамина, методи за тяхното получаване и използването им. № на патентната заявка е BG 110141 от 23. 05. 2008

Настоящото изобретение се отнася до нови съединения, които представляват производни на галантамина, до методи за тяхното получаване и до използването им за профилактика и/или лечение на невродегенеративни заболявания, в това число сенилна деменция и болест на Алцхаймер.

Б2. Vezenkov L., Georgieva M., **Danalev D.**, Ivanov, Tchavdar B., Bakalova A., Hristov K., Danchev N., Mitev V., New galanthamine derivatives containing peptide fragment, useful as active substances for prophylaxis and treatment of neurodegenerative disease e.g. senile dementia and Alzheimer's disease – 2008, EP2123328-B1

Настоящото изобретение се отнася до нови съединения, които представляват производни на галантамина, до методи за тяхното получаване и до използването им за профилактика и/или лечение на невродегенеративни заболявания, в това число сенилна деменция и болест на Алцхаймер.

Б3. Даналев Д., Везенков Л. - Технология за производство на L-carnitine таблетна форма – 2008, фирма БиоМеда, Пловдив

Във фирма БиоМеда-гр. Пловдив беше внедрена наша разработка за производство таблетна форма на аминокиселината L-carnitine, намерила широко приложение като хранителна добавка.

Б4. Бърдаров В., Даналев Д., Везенков Л. – Внедряване на метод ИЕС 1998 за определяне на фуранови производни в отработени трансформаторни масла за нуждите на Националната Електрическа Компания.

По предложение и за нуждите на Националната Електрическа компания наш колектив внедри в ХТМУ, катедра „Органична химия” метод ИЕС 1998 за определяне на фуранови производни в отработени трансформаторни масла. Концентрацията на същите е от съществено значение за профилактиката и безопасната работа на трансформаторите във всички електроцентрали в РБългария.

В1. B. Grigorova, D. Danalev, L. Vezenkov, Structure-activity relationship of short analogues of antistasin (ATS) and ghilantens (GLS) including different basic amino acids in 109 position, Peptides, Proceedings of the 28-th European Peptide Symposium, 2004, 908-909

Докладвани са резултати върху синтезата на осем нови аналози на рекомбинантния антистазин и гилантените, съдържащи базични аминокиселини в 109 позиция. Четири от тях са под формата на свободни откъм С-края киселини, а четири са превърнати в амиди, с цел да се изследва ролята на тази модификация и на базичните аминокиселини в 109 позиция върху антикоагулантните свойства на пептидите. Докладвани са и IC50 стойностите на новосинтезираните съединения намерени чрез изследване на активираното парциално тромбoplastиново време. Изведени са някои зависимости структура-биологична активност.

В2. L. Yotova, D. Danalev, L. Vezenkov, Investigation of kinetic parameters in vitro of serine proteinases included in the blood coagulation cascade, Proceeding of International Symposium BioPS'2005, October 25-26, Sofia, III.13-III.20

С цел да се повиши антикоагулантната активност на изоформи 2 и 3 на антистазина ние синтезирахме серия от хибридни структури, съдържащи тези две изоформи, комбинирани с трипептидни последователности, известни от литературата с високата си инхибиторна активност спрямо серинови протеинази. За да изследваме селективността на

новополучените съединения по отношение на протеиназите от каскадата на кръвната коагулация ние проведохме серия от кинетични експерименти с новосинтезираните продукти и трипсин, фактор Ха, тромбин и плазмин. Бяха изследвани както естеразната, така и амидазната активност спрямо тези ензими. Изчислени бяха и инхибиторните константи K_m и V_{max} и беше определен вида на инхибиране на новосинтезираните съединения. Беше установена липса на селективност спрямо някои от ензимите от каскадата на кръвната коагулация, а инхибирането беше в един и същи концентрационен диапазон.

B3. D. Danalev and L. Vezenkov, New fragment analogues of antistasin's (ATS) active site – design, synthesis and structure-activity relationship, Peptides, Proceedings of the 29-th European Peptide Symposium, 2006, 148-149

Синтезирани бяха два ундекапептида и два декапептида, аналози на домейн I и домейн II от активния център на серия антикоагулантни белтъци изолирани от кръвосмучещи животни. Целта на настоящото изследване беше да се изследва антикоагулантната активност на ундекапептидите намиращи се точно в активния център на тези белтъци, да се изследва ролята на аминокиселината цистеин, замествайки я с меркаптопропанова киселина и ролята на аминокиселините Arg³² и Asn⁸⁷. За целта всички новосинтезирани пептиди бяха изследвани за антикоагулантна активност по отношение на активираното парциално тромбoplastиново време и бяха установени IC₅₀ стойностите им. Беше доказано, че наличието на Arg³² и Asn⁸⁷ не е от съществено значение за антикоагулантната активност. Замяната на Cys³³ с Mpa не повлиява антикоагулантната активност на получения аналог, а замяната на Cys⁸⁸ с Mpa води до намаляване на активността 10 пъти.

B4. D. Danalev and Lyubomir Vezenkov, New amide analogues of antistasin isoform 2 and 3, Peptides, Proceedings of the 30-th European Peptide Symposium, 2008, 220-221

Синтезирани бяха серия от амидни аналози на изоформа 2 и 3 на антикоагулантния протеин антистазин. Целта на настоящото изследване беше да се установи дали замяната на С-крайната COOH функция на синтезирани по-рано аналози с CONH₂ ще повлияе антикоагулантната активност на съединенията. Чрез изследване на активираното парциално тромбoplastиново време и определяне на IC₅₀ стойностите за новосинтезираните аналози беше установено, че споменатата по-горе замяна води до многократно нарастване на антикоагулантната активност.

B5. S. Bayryamov, **D. Danalev**, N. Vassilev, Efficient chemical synthesis of amides and peptides using phosphonic acid/alkylene oxide chemistry, Peptides, Proceedings of the 30-th European Peptide Symposium, 2008, 130-131

Изследвана беше възможността за използване на системата H_3PO_3 / оксиран като имитация на реакциите на синтез и хидролиз в рибозимите. Ние доказахме, че тази система успешно имитира природния синтез на пептидна връзка в рибозомата, като с нейна помощ синезирахме серия от четири моделни съединения съдържащи амидна връзка.

B6. I. Ivanov, **D. Danalev**, L. Vezenkoy, Design And Synthesis Of New Peptide Mimetics With Potential β -secretase Inhibition Activity, Peptides, Proceedings of the 30-th European Peptide Symposium, 2008, 240-241

Тук ние докладваме синтезата и охарактеризирането на серия от аналози на най-късата установена пептидна последователност с доказана β -секретазна инхибиторна активност. Новосинтезираните аналози бяха модифицирани в С-края си чрез превръщането им във фениламиди и 3,4-диметоксибензиламиди. От друга страна чрез заместване на аминокиселината Ala с β -Ala ние си поставихме за цел да установим на по-късен етап дали осигуряването на по-ригидна първична структура би довела до увеличаване на β -секретазната инхибиторна активност.

B7. **D. Danalev**, N. Lubin-Germain, J. Uziel, J. Augé, Synthesis of glycopeptides potential inhibitors of human rhinovirus 3C protease, Peptides, Proceedings of the 31-th European Peptide Symposium, 2010, 92-93

Тук ние докладваме синтезата на серия пептиди аналози на трипептидната последователност Z-Leu-Phe-Gln-H, специфично модифицирани в С-края си с Михаел акцептори, с потенциална антивирусна активност. Аминокиселината Leu, за която е доказано, че не изпълнява съществена роля за активността на пептида, беше заменена с аминокиселините Lys и Ser, с цел осигуряване на две допълнителни функционални групи NH_2 (от страничната верига на Lys) и OH (от страничната верига на Ser), към които да могат на по-късен етап да се прикачат въглехидратни остатъци с подобна активност, които да повишат антивирусното действие на пептидните молекули и които имат доказани противопаразитни свойства.

B8. **D. Danalev**, L. Vezenkoy and N. Vassilev, Synthesis of tacrine analogues comprising peptide moiety, Peptides, Proceedings of the 31-th European Peptide Symposium, 2010, 304-305

Докладвана е синтезата на серия от аналози на ацетилхолинестеразния инхибитор такрин, намерил приложение при лечение на болни от болестта на Алцхаймер. Използваните пептидни аналози са производни на N-(3,4-дихлорофенил)-Д,Л-аланин-ОН, който е с доказана инхибиторна активност спрямо γ -секретазата, ензим, изпълняващ ключова роля при болни от болестта на Алцхаймер. Целта беше да се създадат хибридни структури с двоен фармакологичен ефект – от една страна инхибиране на ацетилхолинестеразата посредством такриновата молекула, а от друга страна инхибиране на γ -секретазата, посредством пептидния мотив. Синтезирани и доказани бяха и хибридни структури съдържащи „ръкав” от 6-аминохексанова киселина с цел разделяне на двата активни фрагмента от молекулата.

B9. D. Danalev, Jean-Marie Ringear, Stéphane Serfaty, Jean-Yves Le Huérou, Emmanuel Caplain, Lyubov K.Yotova, Pascal Griesmar, Synthesis of new polymer matrices including amino acids, Peptides, Proceedings of the 31-th European Peptide Symposium, 2010, 70-71

Докладвана беше синтезата на полимерни матрици, включващи специфично модифицирани аминокиселини. Модифицирани бяха аминокиселините Lys и Asp, като моно- и дитиоморфолинови производни. Целта на тази модификация беше да се създадат структури, способни да инхибират микробиалнопредизвиканата корозия и те да бъдат вложени в получаването на полимерни матрици с цел приложението им като защитни повърхности за резервоари с гориво в танкеростроенето, самолетостроенето, автомобилостроенето и др.

Г.1. Koleva M., Pepeldjiska N., Ivanova D., Vezenkova L., **Danalev D.**, Comparison of some dates of two unhairing methods of sheep skins for dressing, J. UCTM, (2003), 2, 385-388

Сравнени са два метода за обезкосмяване на овчи кожи – ензимен и с алкална предварителна обработка. Определени са тоталните азот, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ и Na_2S в отпадните води. Получената вълна е охарактеризирана по отношение на някои показатели като добив, съдържание на мазнини, алкална разтворимост, киселинна разтворимост и карбамид-дисулфидна разтворимост. Докладвани са и някои резултати относно аминокиселинното съдържание на получената по двата метода вълна.

Г2. D. Danalev, L. Yotova, L. Vezenkova, Investigation of the inhibiting effect of Phe-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys on the serine proteinases included in the blood coagulation cascade, Bulgarian Chemical Communications, Volume 38, Number 1 (pp. 3–6) 2006, Proceeding of 4-th Bulgarian Peptide Symposium

Изследвана е кинетиката на инхибиране на сериновите протеинази от каскадата на кръвната коагулация тромбин, фактор Ха и плазмин от новосинтезиран фрагментен аналог на изоформа 2 на антистазина Phe-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys. Като сравнение е използвана кинетиката на инхибиране на сериновата протеаза трипсин. За разлика от природната изоформа 2 на антистазина, при новосинтезираният аналог ние доказахме смесен тип на инхибиране, като са изчислени кинетичните константи K_m и V_{max} с помощта на уравнението на Михаелис-Ментен.

Г3. D. L. Danalev and L. T. Vezencov, Design, synthesis and anticoagulant studies of new antistasin isoform 2 and 3 analogues, Bulgarian Chemical Communications, 2009, Proceeding of the 5-th Bulgarian Peptide Symposium, v. 41 (2), 99-103

Един от най-важните ензими в каскадата на кръвната коагулация е Фактор Ха. Ето защо неговите инхибитори са една обещаваща алтернатива срещу тромботични заболявания. В предишна наша работа, ние докладваме синтезата на хибридни структури между изоформи 2 и 3 на антистазина и активните последователности D-Phe-Pro-Arg; D-Arg-Gly-Arg; Phe-Ile-Arg и Tyr-Ile-Arg. Освен аналозите с С-крайна COOH група, беше синтезиран и хексапептид амида D-Phe-Pro-Arg-Pro-Lys-Arg- NH_2 . Той показва 60 пъти по-висока биологична активност от природната изоформа 3 на антистазина и няколко пъти по-висока активност от всички останали новосинтезирани аналози. В настоящата работа ние описваме синтеза и биологичната активност на С-крайните амидни аналози на всички по-рано синтезирани пептиди с цел да изведен зависимостта структура-биологична активност. Антикоагулантната активност беше измерена по отношение на АРТТ и бяха определени IC_{50} стойностите за всички новосинтезирани съединения. Серия от тези и предишни наши експерименти с подобна замяна на С-крайната COOH с амидна функция, показват по-добрата антикоагулантна активност на амидите в сравнение с С-крайните свободни киселини.

Г4. M. Koleva, D. Danalev, D. Ivanova, L. Vezencov and N. Vassilev, Synthesis of two peptide mimetics as markers for chemical changes of wool's keratin during skun unhairing process and comparison of the wool quality obtained by ecological methods for skins unhairing, Bulgarian Chemical Communications, 2009, Proceeding of the 5-th Bulgarian Peptide Symposium, v. 41 (2), 160-164

През последните няколко години основно внимание се обръща на подобряване на съществуващите методи за обезкосмяване на кожи. Основните разработки са насочени към намиране на бързи и ефективни методи за обезкосмяване със запазване на свойствата на получените кожи чрез предварителна алкална обработка и чрез ензимни методи. Процеса на обезкосмяване на овчи кожи с предварителна алкална обработка на вълната

води до получаването на два неприродни пептидни миметици лизиноаланин (Lys* - Ala) и орнитиноаланин (Orn* - Ala). Те се получават ато резултат от процеса на хидролиза на кератина. Промените в кератина на вълната го правят резистентен към сулфидно разграждане. Ние синтезирахме и охарактеризирахме тези два пептидни миметика. Беше показана възможността за използването им като маркери за контрол на промените в кератина на вълната по време на процеса на обезкосмяване. Сравнението направено между данните на трите проби добита вълна и препоръките за нейното използване показва, че този отпадък може да се счита за суровина/суров материал/ съобразно неговите химични и физични показатели.

Г5. D. Danalev and L. Yotova, Synthesis of model peptide substrates and investigation of the reaction of their phenylacetyl protecting group enzyme transformation by means of penicillin G acylase, Bulgarian Chemical Communications, 2009, Proceeding of the 5-th Bulgarian Peptide Symposium, v. 41 (2), 122–126

Откриването на нови защитни групи за органичния синтез, основани на стереоспецифични и стереоселективни реакции, е важно за практиката, особено при синтеза на полусинтетични антибиотици и биологично активни пептиди. Целта на настоящата работа е да изследваме кинетиката на ензимна хидролиза на фенилацетилна група в синтетични пептидни субстрати. Бяха използвани два моделни пептиди, съдържащи съответно една и три фенилацетилни защитни групи. Тук ние докладваме синтеза и охарактеризирането на моделните субстрати. Ензимната хидролиза беше направена с помощта на Пеницилин G ацилаза в широк рН диапазон 6÷9. Използваните субстратни концентрации бяха 0.4mM – 40mM. Максимална степен на конверсия 75.5% (рН 9), близка до тази при рН 7.8 (74.5%) беше наблюдавана за 3 до 10 минути. При рН 6.5 и 7 степента на хидролиза беше съответно 62.5% и 37.5%. Беше изследвана възможността за провеждане на реакцията в присъствие на соли на различни метални комплексообразуватели CuSO₄·5H₂O, NiCl₂, Ni(NO₃)₂ и MnCl₂. Беше постигната 100% степен на конверсия на фенилацетилната група в присъствие на 10% Ni(NO₃)₂ за 9 минути и пълно изтегляне на химичното равновесие в посока на процеса на хидролиза в присъствие на 25% Ni(NO₃)₂.

Г6. I. Ivanov, D. Danalev and L. Vezenkov, New peptide mimetics with potential β -secretase inhibition activity, Bulgarian Chemical Communications, 2009, Proceeding of the 5-th Bulgarian Peptide Symposium, v. 41 (2), 143-148

Болестта на Алцхаймер (БА) е засегнала около 20 души по целия свят. Последните проучвания показват, че през следващите 20-30 години броят им ще се удвои поради нарастващата продължителност на човешкия живот. Превръщането на разтворимия β амилоиден пептид (A β) в неговата неразтворима форма е ключов стадий в прогресията на

БА. А β се получава като резултат от разкъсване на прекурсорния β амилоиден пептид, което е катализирано от различни протеинази, известни като α , β и γ -секретази. Ето защо инхибирането на някой от тези ензими е обещаваща алтернатива при лечението на БА. Най-късата пептидна структура, с установена инхибиторна активност срещу β -секретазата е Glu-Val-Asp-Leu-Ala. В литературата са публикувани множество изследвания, показващи ролята на различните аминокиселини в този пептид за инхибиторната му активност и са изведени някои зависимости структура-активност. Основавайки се на тези литературни данни ние направихме дизайн и синтезирахме 10 пептидни миметици с потенциална β -секретазна инхибираща активност, с помощта на стандартен пептиден синтез в разтвор. Всички новосинтезирани съединения бяха охарактеризирани чрез TLC, Т.т. и $[\alpha]_D^{25}$. Биологичните изследвания са в ход.

Г7. M. Evlogieva, **D. Danalev**, D. Tanev, L. Vezenkova, B. Damianova, Investigation of fatty acids composition in food additives using gas chromatography-mass spectrometry, 2010 JUCTM, , 45 (1): 87-92

Беше направено качествено определяне на мастни киселини в пет хранителни добавки от търговската мрежа в Европа, съдържащи екстракт от риба. За разделяне на компонентите на сместа беше създадена нова, проста за изпълнение методология, използваща препаративна тънкослойна хроматография, последвана от дериватизираща процедура и качествено определяне с помощта на газ хроматография комбинирана с масспектрометрия. Установено беше че четири от изследваните проби са напълно идентични по отношение на съдържанието на триглицериди и свободни мастни киселини. Качественото определяне на вторични съединения показва, че в проби 1,2 и 5 има само една зона от вторични компоненти, докато в проби 3 и 4 има четири зони от тях.