



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ
ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНО И СИСТЕМНО ИНЖЕНЕРСТВО
КАТЕДРА „БИОТЕХНОЛОГИЯ”

ас. инж. Боряна Бисерова Борисова

Дизайн и синтез на фосфодиестеразни инхибитори
с двойна активност

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен „доктор”

по научна специалност 5.11. Биотехнологии

(Технология на биологично активните вещества)

Научен ръководител: проф. д-р инж. Данчо Даналев

Prof. Dr. Stephane Gerard

Научен консултант: Dr. Marie Laronze-Cochard

Научно жури:

1. проф. д-р инж. Емилия Найденова – председател
2. проф. д-р Рени Калфин - рецензент
3. проф. д-р Нели Георгиева
4. проф. дн Иванка Стойнева - рецензент
5. проф. дхн Любомир Везенков

София, 2025

Дисертационният труд е написан на 237 страници, съдържа 103 фигури и 29 таблици. Цитирани са 261 източника.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита а на заседание на разширен катедрен научен съвет на научното звено на катедра „Биотехнология”, състояло се на 07.11.2025

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 17.12.2025 г. от 14 часа в зала 301, сграда „А” на ХТМУ.

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

Съдържание

I.	Въведение	4
II.	Цел на дисертационния труд	7
III.	Резултати и обсъждания	8
1.	Пептиден фармакофор	9
1.1	Стратегия за FELL аналози	8
1.2	Аналози на FELL	10
2.	Изотиазолон фармакофор	14
2.1	Получаване на хлорирани производни	14
2.1.1	Синтез на аналози на ITZ от серия 4	16
2.1.2	S-окислителни реакции	21
2.2	Заместителни реакции на Suzuki-Miyaura, включващи ITZ съединения	23
2.2.1	5-серия ITZ аналози	23
2.2.2	4-серия ITZ аналози	31
2.3	Заключение относно Suzuki-Miyaura в сериите 4 и 5	35
2.4	Получаване на 4,5-диарилзаместени S-окислени изотиазолони	36
3	Пиридазинонов фармакофор	38
3.1	Получаване целевите пиридазинони	38
3.2	N-алкилиране към пиридазиноновата структура	40
3.3	Хидролиза на естерна група	41
4.	Пиролов фармакофор	42
IV.	Биологични изследвания	45
1.	PDE4B in-vivo изследване	46
2.	Противовъзпалителна активност	47
V.	Обобщение на публикуваните статии	47
1.	Замяна на различни хидрофобни аминокиселини на позиции 3 и 4 позиция	47
2.	Заместване на остатъка Phe с Tug на първа позиция в последователността FELL	50
3.	Конюгирана структура между пиролни фрагменти и FELL тетрапептид	51
VI.	Изводи	53
VII.	Приноси	55
СПИСЪК НА НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ		56
УЧАСТИЕ В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ		57

I. Въведение

Белодробните заболявания са сред най-често срещаните здравни проблеми в света, като причиняват около една шеста от всички смъртни случаи в световен мащаб [1]. Хроничните белодробни заболявания са част от групата, наречена неинфекциозни заболявания (НИЗ), заедно със сърдечно-съдовите заболявания, диабет и рак. Всички тези патологии са отговорни за смъртта на 41 милиона души годишно, което се равнява на 74% от всички смъртни случаи в световен мащаб. Различни фактори като генетика, хиперреактивност на дихателните пътища и възпаление играят важна роля в гореспоменатите заболявания [2]. По-конкретно, възпалените дихателни пътища, алвеоли и/или други структури на белите дробове са свързани с патогенезата на много заболявания, като астма, хронична обструктивна белодробна болест (ХОББ), остър респираторен дистрес синдром (ОРДС) при възрастни и идиопатична белодробна фиброза (ИБФ) [3,4]. ХОББ е третата водеща причина за смъртност в световен мащаб, като според световната здравна организация (СЗО) през 2019 г. е причинила 3,23 милиона смъртни случая, докато астмата е засегнала 262 милиона души през 2019 г. и е причинила 455 000 смъртни случая в света [5]. Смята се, че в страните с високи доходи тези цифри ще се увеличат до над 5,4 милиона за ХОББ до 2060 г. и 27 000 за астма в региона на Източното Средиземноморие до 2030 г. [6,7]. Проучване, проведено в университетската болница на Модена, Италия, е установило намаляване на дифузната способност на белите дробове за въглероден оксид [8]. Това представлява показател за остатъчно увреждане на белите дробове при пациенти, получили ХОББ или астма след възстановяване от инфекция с COVID-19. Освен това, изследователите отбелязват повишена честота на двете заболявания при пациенти преболели COVID-19.

Въпреки факта, че ХОББ и астмата са свързани с хронично възпаление на дихателните пътища, съществуват различия в клетъчните типове и медиаторите, участващи в патогенизата на двете заболявания [6]. Сред основните общи характеристики се открояват повишени нива на провъзпалителни медиатори, неутрофили, макрофаги и лимфоцити в белите дробове [9,10]. Като цяло, възпалението представлява нормална реакция на имунната система на организма към увреждане или инфекция, причинена от токсини, патогени, увредени клетки, дразнителни и алергени [11]. При респираторни заболявания всяка възпалителна реакция може да варира по своето местоположение и специфичност, но обща характеризира за всички е свръхпроизводството на белодробни клетки, последвано от активиране на имунни и възпалителни клетки, като цитокини, оксиданти и много други медиатори.

Кортикостероидите са най-ефективните противовъзпалителни средства, използвани за лечение на астма и ХОББ. Те проявяват своето действие чрез различни механизми, включително активиране на противовъзпалителни гени, потискане дейността на гени, свързани с възпалението, както и чрез редица посттранскрипционни ефекти [12]. Въпреки че нестероидните противовъзпалителни лекарства (НСПВ) и кортикостероидите имат съществена роля в овладяването на възпалителни процеси в човешкия организъм, техните съпътстващи дългосрочни нежелани ефекти отблъскват някои пациенти от приемането на тези медикаменти. Поради това е необходим незабавен, мощен и строго регулиран противовъзпалителен механизъм, който да подпомага поддържането на хомеостазата в дихателната система [13]. Следователно, все още съществува голяма нужда от откриването на нови терапевтични лекарства за контрол на възпалителните процеси.

От гледна точка на механизма на действие, възпалението представлява химичен сигнален път, който задейства процесите на заздравяване. Някои от споменатите по-горе неприятни стимули могат да предизвикат остро и/или хронично възпаление, което от своя страна води до увреждане на тъканите или до развитие на специфични заболявания [11]. Неконтролираното остро възпаление, както и неефективно, неправилно или забавено лечение, могат да допринесат за хроничен възпалителен процес, който уврежда тъканите на различни органи. Тези увреждания, както и самото възпаление, се характеризират с идентични признаци като болка, подуване, зачервяване, затопляне и загуба на функция [14 - 16]. Някои възпалителни медиатори, като неутрофили и моноцити, се срещат и при болкови синдроми, свързани с артрит, болки в гърба, главоболие и други състояния [17]. Следователно болката често е тясно свързана с възпалителните процеси. Освен това терапията, насочена към овладяване на възпалението и свързаните с него симптоми, като болката, представлява важна и обоснована посока за изследване на нови подходи за лечение.

В своята обзорна статия на F.J. Mendoza *et al.*, авторите обобщават слабата до умерена ефективност на наличните на пазара лекарства [18]. Облекчаването на болката и възпалението остава до голяма степен незадоволено откъм очакванията на пациентите. Възпалението представлява сложен патологичен процес, който не може да бъде ефективно контролиран чрез медикаменти, насочени само към една мишена. Поради това се налага разработването на стратегии за създаване на нови лекарства, способни да въздействат едновременно върху множество възпалителни процеси и съпътстващите ги състояния.

През последните години фосфодиестеразите (ФДЕ) се очертават като нови терапевтични мишени, като специално внимание се обръща на изоформата ФДЕ4 за лечение на възпалителни заболявания. От биологична гледна точка ФДЕ4 е преобладаващият изоензим,

който се намира в различни клетки на дихателните пътища, като епителни и имунни клетки, включително неутрофили, Т-клетки и макрофаги. Чрез инхибирането на ФДЕ4 може да се контролира както отпускането на гладката мускулатура на дихателните пътища, така и освобождаването на възпалителни модулатори. Следователно ФДЕ4 може да се счита за перспективна терапевтична мишена за лечение на възпалителни и/или белодробни заболявания [19]. Множество научни изследвания се фокусират върху разработването на нови инхибитори на ФДЕ4 (ФДЕИ), които включват в структурата си както нови, така и вече съществуващи съединения. Освен това, структурите, съчетани с обширна медицинска химия, доведоха до подобрения в селективността и ефикасността им по отношение на специфичните ФДЕ [20].

Въз основа на горепосочената информация, контекстът на настоящата докторантура се основава на предишни изследвания на Лабораторията по терапевтична химия ICMR (Institut de Chimie Moléculaire de Reims), UMR CNRS 7312, свързани с ФДЕ и разработването на техни инхибитори. Тези изследвания ще бъдат комбинирани с научните проучвания на проф. Даналев от ХТМУ-София, Катедра Биотехнологии, относно създаването на нови модифицирани противовъзпалителни пептиди. По този начин целта на тази настоящата дисертация е да се разработят нови пептиди и биоконюгати, с цел да се получи синергичен ефект върху различни пътища на един и същ патофизиологичен процес - възпаление.

II. Цел на дисертационния труд

Целта на настоящия дисертационния труд е да се направи молекулен дизайн на нови структури с потенциална противовъзпалителна и аналгетична активност.

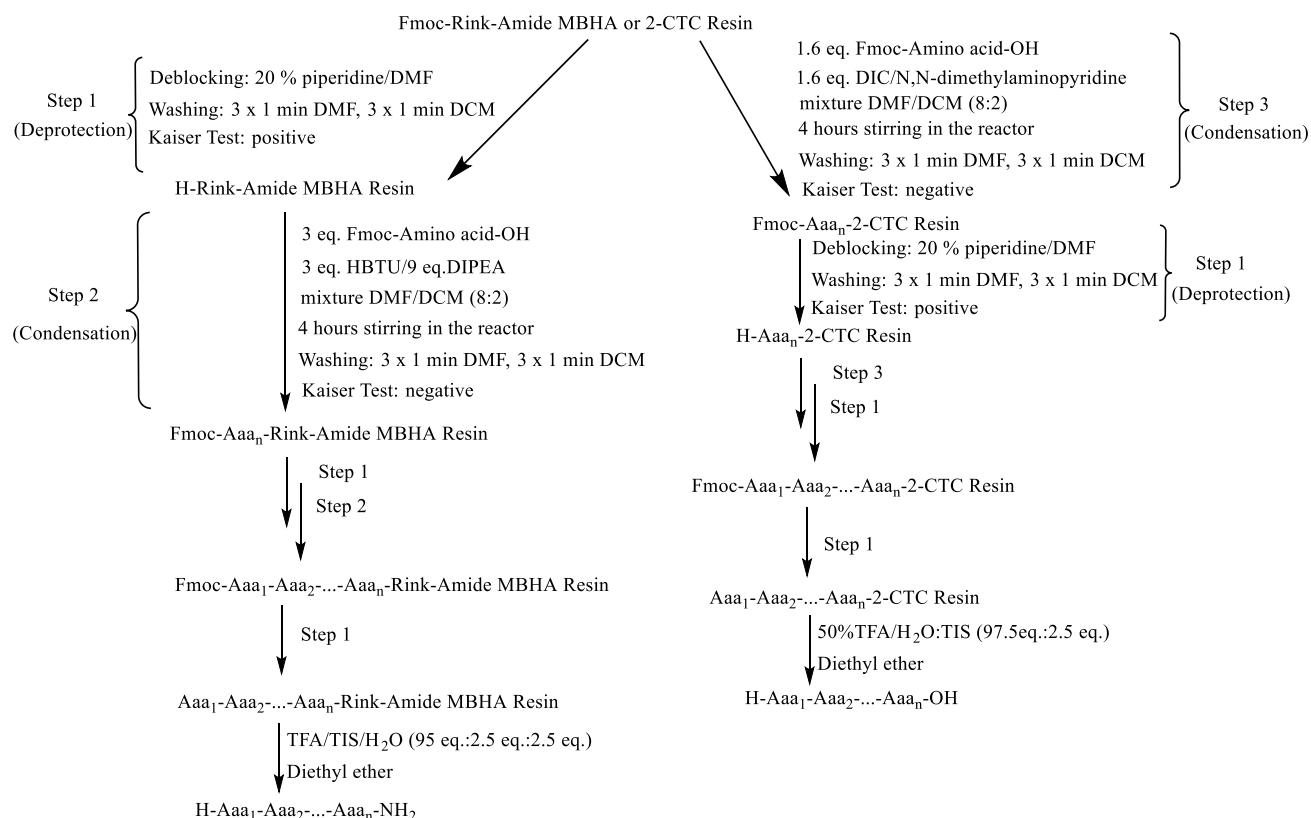
За постигане на тази цел бяха поставени и следните задачи:

1. Дизайн, синтез и охарактеризиране на нови аналози на тетрапептида FELL (Phe-Glu-Leu-Leu).
2. Дизайн, синтез и охарактеризиране на нови изотиазолонови аналози, притежаващи -COOH група
3. Дизайн, синтез и охарактеризиране на нови пиридазинонови аналози, притежаващи -COOH група
4. Определяне на биологичната активност на синтезираните пептиди
5. Синтез на биоконюгати между пиролов хетероцикъл и пептид с потенциална аналгетична активност

III. Резултати и обсъждания

1. Пептиден фармакофор

Всички пептидни аналози бяха синтезирани чрез твърдофазна пептидна синтеза (SPPS), Fmoc/OtBu стратегия съгласно Фигура 90.



Фигура 90 Обща процедура за целева пептидна синтеза

Стъпките на кондензация бяха реализирани с използване на HBTU/DIPEA или DIC/1-NOBt като кондензационна система. Пептидите бяха отрязани от съответната им смола Rink-amide MBHA или 2-CTC, като се използва смес TFA/TIS/дестилирана вода в съотношение 95:2,5:2,5 (v/v/v) или TFA/DCM (50:50), съответно.

1.1 Стратегия за FELL аналози

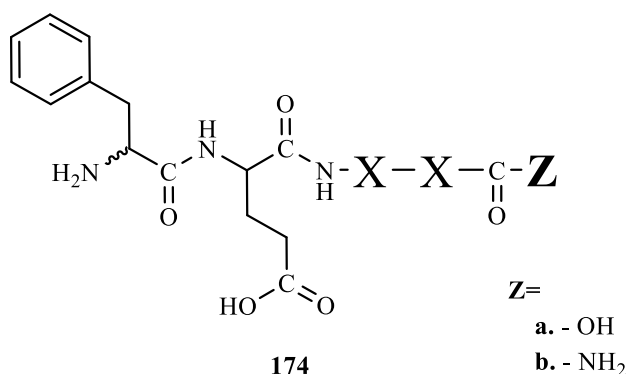
Открити са три аминокиселинни последователности с противовъзпалително действие в човешкия протеин Calcium Binding Protein, Spermatid Associated 1 (CABS1) – FELL (Phe-Glu-Leu-Leu), TDIFELL (Thr-Asp-Ile-Phe-Glu-Leu-Leu) и TDIFELLK (Thr-Asp-Ile-Phe-Glu-Leu-Leu-Lys). Всички три пептида притежават противовъзпалителна активност, тъй като намаляват общия брой на белите кръвни клетки (БКК) в бронхоалвеоларната течност (БАЛФ) в белите дробове (FELL – с 51%, TDIFELL – с 54% и TDIFELLK – с 57%) [21]. Поради техния механизъм на действие в белите дробове, тези пептиди могат потенциално да инхибират

формата ФДЕ4В, която е обект на настоящия дисертационен труд и заслужава по-ълбочено изследване.

Тъй като трите пептида не показват значителни различия по отношение на общото намаляване на БКК в БАЛФ, решихме първо да насочим вниманието си към най-късия пептид FELL, с цел подобряване на неговата активност чрез модификация на първичната му структура. Освен това, пептиди с противовъзпалително действие заслужават да бъдат изследвани и за други активности, свързани с възпалението, като например аналгетичната.

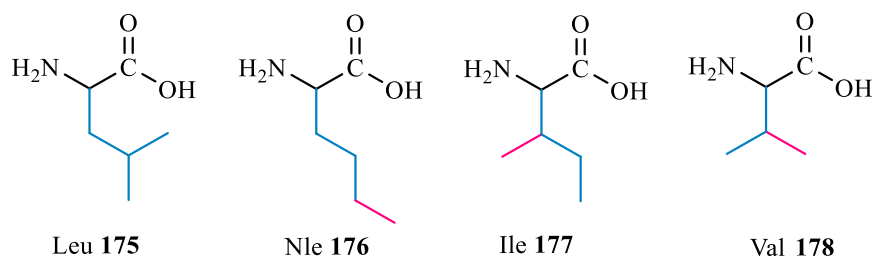
С цел да се намерят най-активните аминокиселинни последователности FELL, бяха вършени няколко модификации въз основа на заключенията на Mathison *et al.* [22,23]. Комбинацията от ароматичност на първата аминокиселина Phe от FEG, минимално натоварване на карбоксилната група на втората (глутаминова вместо аспарагинова киселина) и N- и C-крайни групи бяха от съществено значение за тяхната активност vs възпалителни фактори като цяло, при човека и нечовекоподобни бозайници [22] .

В допълнение, дизайнът на нови аналози на пептида FELL позволява да се изследва ролята на различни хидрофобни аминокиселини в трета и четвърта позиция на пептидната верига за активност vs ФДЕ4В, който участва в много възпалителни процеси. Като се има предвид, че много хормони в човешкия организъм, като окситоцин, вазопресин и др., се създават естествено като С-крайни амиди, за да бъдат по-стабилни vs ензимно разпознаване и значителна хидролиза, ние бихме оценили ефекта от модифицирането на С-края до амид. Като фармакокинетиката и фармакодинамиката на молекулата могат да бъдат повлияни от естестването на естествените L- с D-енантиомери на аминокиселините. По този начин, в този случай разликите между L- и D-стереоизомерите на първата позиция в аминокиселинната последователност също могат да бъдат от решаващо значение за достъпността и активността на този пептиден фармакофор, което изисква по-нататъшно изучаване. Беше предвидена синтеза на серия аналози на тетрапептида FELL с обща структура $\text{Phe}^1\text{-Glu}^2\text{-X}^3\text{-X}^4\text{-Z}$ (Фигура 2), където X = Leu, Nle, Ile или Val, Z = -NH₂ или -OH.



Фигура 91. Обща структура на синтезираните тетрапептиди, където X = Leu, Nle, Ile или Val

Разликите в химичните структури на страничните вериги между Leu и неговите аналози Nle, Ile и Val могат да се видят на Фигура 92, където разликата е оцветена в розово.



Фигура 92 Химична структура на Leu 175 и неговите аналози – Nle 176, Ile 177 и Val 178

Майчиния пептид FELL 153, описан в литературата от Laurent *et al.* също беше синтезиран като контрола за по-нататъшни биологични изследвания [21]. Удължаването на тетрапептида до пентапептид чрез добавяне на още един остатък Leu беше планирано, за да се проучи ролята на тази допълнителна аминокиселина. Това разширяване има за цел също да предостави сравнение между три- и тетрапептидите, описани по-горе и техния пентапептиден аналог. Подобно сравнение дава представа как дължината на пептида влияе върху биологичната активност.

1.2 Аналози на FELL

Бяха извършени няколко структурни модификации на референтния родителски пептид Phe¹-Glu²-Leu³-Leu⁴-OH, за да се намери най-активният потенциален инхибитор на ФДЕ4. Общата формула Phe¹-Glu²-X³-X⁴-Z е показана на Фигура 2 и бяха извършени различни модификации:

- Промени в 3-та и 4-та позиция на пептида
- Замяна на L- с D-изомер на пептида в 1^{ва} позиция
- Преобразуване на С-кайната карбоксилна група в амидна
- Увеличаване на пептидната верига чрез добавяне на допълнителен Leu остатък

В зависимост от модификациите на С-края са използвани Rink-amide MBHA за С-крайни амиди, или 2-СТС смола за С-крайни свободни киселини. Пептидите бяха синтезирани чрез използване на стандартен пептиден синтез върху полимерен носител (SPPS). В зависимост от степента на протичане на целевите реакции, когато се появяваше нужда от повтаряне на реакцията на кондензация на всяка следваща стъпка бяха използвани различни кондензиращи средства. Пептидите бяха получени чрез последователно повтаряне на две

стъпки - премахване на защитна група Fmoc (20-минутна реакция с 20% пиперидин в DMF) и кондензация (4-6 часа с активиращ агент и катализатор) на Fmoc защитени аминокиселини. Всяка стъпка се наблюдава с помощта на стандартния тест на Кайзер, известен с високата си чувствителност към първични амини. Сини смолни перли показват положително премахване на Fmoc група (свободна NH_2 група на АК), което позволява добавянето на следваща защитена аминокиселина. Безцветните перли показват липса на свободна NH_2 група, което означава успешна кондензация.

Всяка стъпка на кондензация изискваше HBTU или DIC като свързващи агенти, съответно с DIPEA или 1-OHbt. Свързващите реакции бяха проведени стриктно, като се използваше моларно съотношение на една от системите:

- аминокиселина/HBTU(PyBOP)/DIPEA/смола (3/3/9/1)
- аминокиселина/DIC/1-OHbt/смола (3/3/3/1),

Разграждането на получения краен пептид/биокоњугат се извършваше в две различни системи в зависимост от използваната смола:

- TFA/ TIS/ dH_2O (95/2,5/2,5) за смола Rink Amide MBHA
- TFA/ CH_2Cl_2 (50/50) за 2-CTC смола

Синтезираните пептидни последователности бяха получени като масла в TFA и допълнително утаяни в студен сух диетилов етер.

Аналитичните данни за синтезираните пептиди са показани в Таблица 5.

Таблица 5. Синтезирани и характеризирани аналози **179-191** на пептида FELL **153**

№	Код пептиди	Лаб. №	Структура	Молекулна формула	Добив %
1	FELL-NH ₂	179	H-Phe-Glu-Leu-Leu-NH ₂	C ₂₆ H ₄₁ N ₅ O ₆	98
2	FEnLnL-NH ₂	180	H-Phe-Glu-NLe-NLe-NH ₂	C ₂₆ H ₄₁ N ₅ O ₆	96
3	FEVV-NH ₂	181	H-Phe-Glu-Val-Val-NH ₂	C ₂₄ H ₃₇ N ₅ O ₆	90
4	FEII-NH ₂	182	H-Phe-Glu-Ile-Ile-NH ₂	C ₂₆ H ₄₀ N ₄ O ₇	93
5	fELLL-NH ₂	183	H-D-Phe-Glu-Leu-Leu-Leu-NH ₂	C ₃₂ H ₅₂ N ₆ O ₇	100
6	fELL-NH ₂	184	H-D-Phe-Glu-Leu-Leu-NH ₂	C ₂₆ H ₄₁ N ₅ O ₆	96
7	fEnLnL-NH ₂	185	H-D-Phe-Glu-NLe-NLe-NH ₂	C ₂₆ H ₄₁ N ₅ O ₆	96
8	fEII-NH ₂	186	H-D-Phe-Glu-Ile-Ile-NH ₂	C ₂₆ H ₄₁ N ₅ O ₆	94
9	fEVV-NH ₂	187	H-D-Phe-Glu-Val-Val-NH ₂	C ₂₄ H ₃₇ N ₅ O ₆	97
10	FELL-OH [113]	188	H-Phe-Glu-Leu-Leu-OH	C ₂₆ H ₄₀ N ₄ O ₇	51
11	FEnLnL-OH	189	H-Phe-Glu-Nle-Nle-OH	C ₂₆ H ₄₀ N ₄ O ₇	32
12	FEII-OH	190	H-Phe-Glu-Ile-Ile-OH	C ₂₆ H ₄₀ N ₄ O ₇	41
13	FEVV-OH	191	H-Phe-Glu-Val-Val-OH	C ₂₄ H ₃₆ N ₄ O ₇	45

С-крайните амиди бяха получени с добри добиви от над 89%, докато С-крайните свободни киселини бяха синтезирани с умерени до ниски добиви 38-51%. Разликата в добива може да се обясни с високата реактивност и чувствителност на 2-СТС смолата към влага, което е намалило нейното натоварване във времето и доведе до по-ниски синтетични добиви.

Тирозинът (Tyr) е хидроксилираната форма на фенилаланин (Phe), което прави двете аминокиселини структурно сходни. По този начин той представлява интерес за целите на този докторски проект за разработване на FELL аналози. В организма Phe **192** се превръща в Tyr **193** чрез действието на ензима фенилаланин хидроксилаза, който катализира добавянето на хидроксилна група (-OH) към ароматния пръстен (Схема 8). Хидроксилната група на Tyr увеличава неговата хидрофилност, подобрявайки разтворимостта му във вода. Тази промяна в разтворимостта може да повлияе на начина, по който всяка аминокиселина взаимодейства в рамките на протеините и в различни биологични системи. Освен това, допълнителната -OH група прави Tyr по-полярна, което му позволява да участва във взаимодействия с водородни връзки [24,25] .

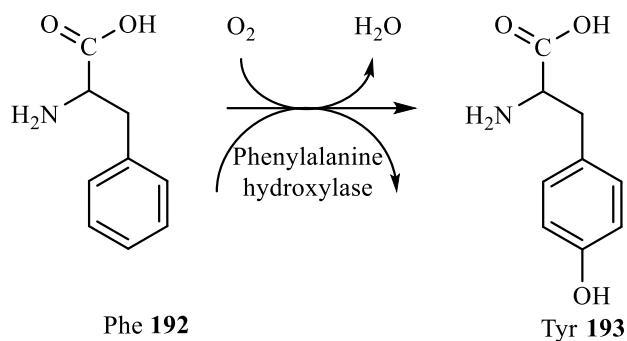


Схема 8 Физиологично превръщане на Phe **192** в Tyr **193**

Хидроксилната група в тирозина му позволява да участва във фосфорилиращи реакции, които са ключов процес във вътреклетъчните сигнални пътища. Изследвания на Schwartz и Murray показват фосфорилираща реакция между хидроксилната група на аминокиселините и гама фосфата на аденозин трифосфата (АТР), който е прекурсор на cAMP (Схема 9) [240] . Следователно, Tyr може да бъде включен в cAMP-зависими сигнални пътища, което е свързано с целите на настоящия дисертационен труд, фокусиран върху инхибирането на PDE и потенциалното повишаване на нивата на cAMP.

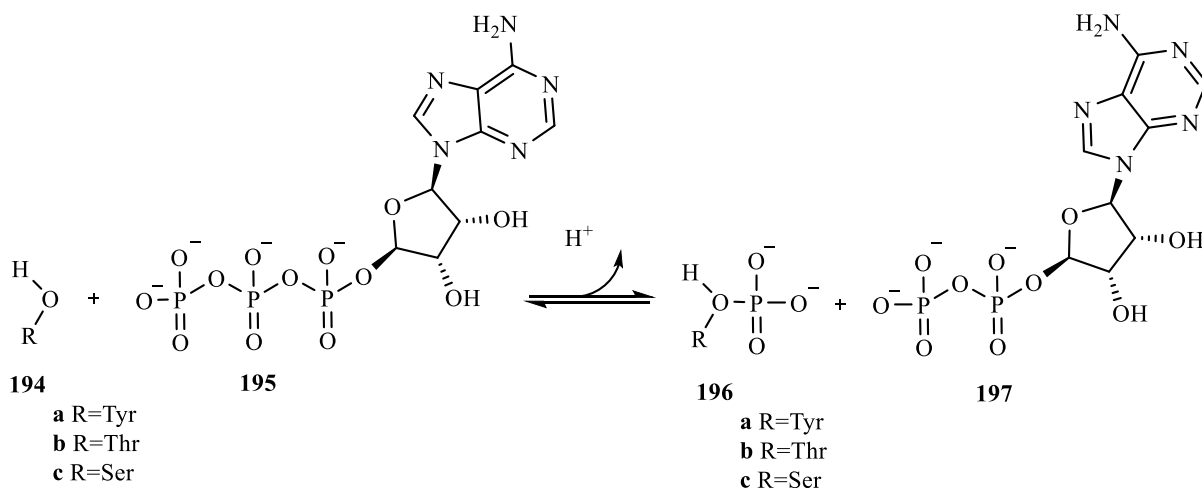


Схема 9. Реакция между аминокиселина, притежаваща –ОН група **194**, и АТР **195**

Синтезирани са четири аналога (**ВВ 9,10,15 и 16**), при които Phe е заменен с Tyr. От тях **ВВ9** и **10** имат С-крайна амидна модификация, а при **ВВ10** и **16** има замяна на L-Tyr с неговия D-изомер (Таблица 5).

Таблица 5. Синтезирани и характеризирани аналози 198-201 на YELL пептида

Ред	Код на пептидите	Лаб. №	Структура	Молекулна формула	Добив %
1	YELL-NH ₂	198	Tyr-Glu-Leu-Leu-NH ₂	C ₂₆ H ₄₀ N ₄ O ₈	89
2	yELL-NH ₂	199	D-Tyr-Glu-Leu-Leu-NH ₂	C ₂₆ H ₄₁ N ₅ O ₇	95
3	YELL-OH	200	Tyr-Glu-Leu-Leu-OH	C ₂₆ H ₄ 0N ₄ O ₈	39
4	yELL-OH	201	D-Tyr-Glu-Leu-Leu-OH	C ₂₆ H ₄ 0N ₄ O ₈	43

Допълнителна модификация структурата на беше извършена само върху майчиния пептид FELL и неговия C-краен амиден аналог. Вместо естествения Phe беше използван Phe остатък с флуорен атом в позиция 4 в ароматния пръстен. Флуорът често може да замести водорода в малки молекули, за да увеличи хидрофобността на фармацевтичните продукти и да подобри тяхната биодостъпност. Освен това, когато се разглеждат взаимодействията с рецептори и ензимни молекули, флуорът може да образува по-силни взаимодействия с активния център и по този начин да увеличи инхибирането, което може да доведе до по-добра активност. Също така, замяната на естествената аминокиселина с неестествена води до по-бавно разпознаване от ензима, което осигурява по-добра хидролитична стабилност и биодостъпност на молекулата [26,27] . Проучвания върху флуорирани фенилаланини, в частност, са показали, че тяхното включване може да подобри биофизичните, химичните и биологичните свойства на биоактивните съединения [28].

Таблица 7. Синтезирани 4F-FELL аналози 202 и 203

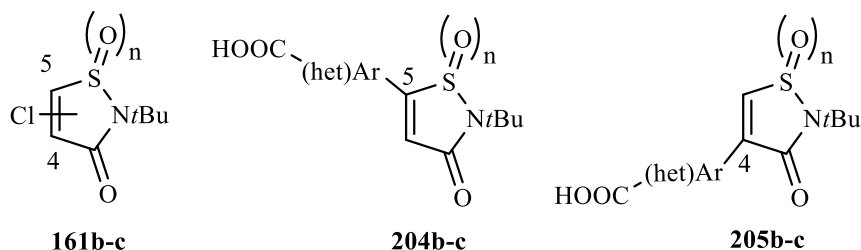
Ред	Код на пептидите	Лаб. №	Структура	Молекулна формула	Добив %
1	F(4-F)ELL-NH ₂	202	H-Phe(4F)-Glu-Leu-Leu-NH ₂	C ₂₆ H ₄₀ FN ₅ O ₆	97
2	F(4-F)ELL-OH	203	H-Phe(4F)-Glu-Leu-Leu-OH	C ₂₆ H ₃₉ F N ₅ O ₇	64

Всички 17 новосинтезирани пептиди са анализирани посредством LC/MS спектрометрия за определяне на техните честота и молекулни маси. Оптичните ротации бяха регистрирани на модулен циркулярен поляриметър MCP200.

2. Изотиазолон фармакофор

2.1 Получаване на хлорирани производни

Изхождайки от предишни разработки на Лабораторията по терапевтична химия в Реймс, Франция, 4- и/или 5-хлорзаместените S-(ди)оксидирани изотиазолонови (ITZ) съединения са ключови междинни продукти в синтеза на нашите ITZ фармакофори с киселинна функция **204** и **205** (Фигура 5). Получаването на различни производни и в достатъчно количество е от съществено значение за определяне на тяхната инхибиторна активност vs PDE4B. Преди да се извърши добавяне на киселинна функция, трябва да се подготвят съответните (дихлорирани) ITZ съединения **161b-c** (Схема5).



Фигура 93. Ключови междинни продукти ITZ **161b-c** и цели **204b-c** и **205b-c**

В лабораторията серията 5-заместени ITZ вече е широко изследвана и различни 5-заместени съединения са синтезирани и описани от Sapi *et al.* [185]. Подробната синтеза за получаване на ключовия междинен продукт 5-хлор ITZ **208a** е показана на Схема10 . 5-хлорираното производно **208a** беше получено с добър добив като нехлорирана молекула **163a**, която е необходима молекула, използвана като изходен материал за нови реакции. Тази тристепенна синтеза доведе и до получаването на други хлорирани продукти **164a**, **209a** и **210a**, но с по-ниски добиви, всички описани по-рано от Sapi *et al.* [185] .

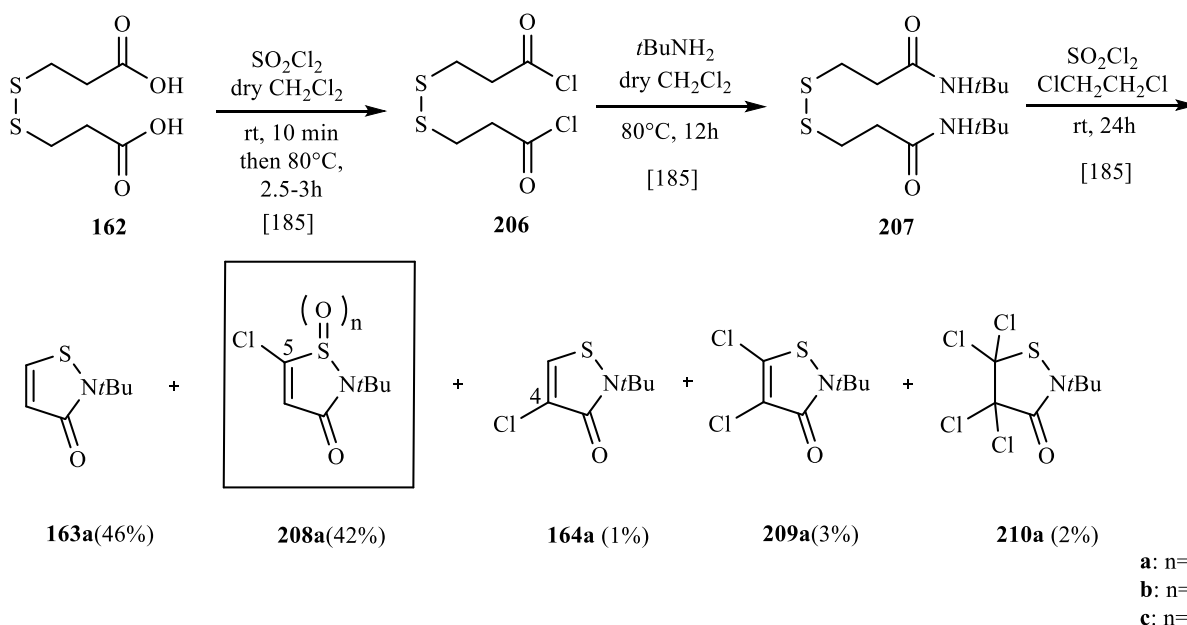


Схема 10. Обща стратегия на групата на Sapi за получаване на ITZ скелети **163a**, **164a**, **208a-210a** [185]

Благодарение на тази предишна работа на лабораторията, беше налично достатъчно количество от продукт **208a**, което позволи след последващо S-окисление, съединителни реакции *чрез* условия Suzuki-Miyaura да се постигне синтезът на целевите производни **204b-c** и **205b-c** (Фигура 93), притежаващи киселинна функция.

Освен това, съединение **163a** беше синтезирано предварително в грамажни количества, което позволи синтеза на и останалото количество позволи използването на 4-хлориран ITZ **164a**, второто семейство ITZ производни, изследвани в тази докторска работа.

2.1.1 Синтез на аналози на ITZ от серия 4

2.1.1.1 От S-неокислено **11a** и окислено ITZ **11b-c**

В литературата са публикувани много малко проучвания, посветени на хлорирането на ITZ в позиция 4. Сред наличните данни са използвани само три реагента: Cl₂ [31], SO₂Cl₂ [32,33] и N-хлоросуцинимид (NCS) [34] .

Патентът на Lewis *et al.* от 1978 г. представя само един пример за ITZ съединение от n-октиловата серия, което не се различава много от tBu групата по отношение на реактивността [248] . Описаната процедура включва разтваряне на 2 еквивалента NCS в хлороформ (CHCl₃) заедно с ITZ съединението **211a**. Реакцията е провеждана в продължение на 2.5 часа при стайна температура и 4-хлороизотиазолон **212a** е изолиран с нисък добив (14%, Схема 11). Освен това, в патента не се споменава друго потенциално изолирано производно по време на реакцията.

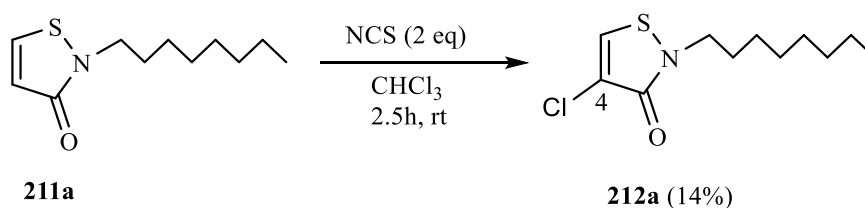


Схема 11 Синтез на 4-хлороизотиазолон **212a** от Lewis *et al.* [248]

В нашия случай хлориращите реакции бяха проведени, започвайки от съединение **163a** в присъствието на NCS, използвано при различни условия (Схема 12, Таблица 8). Целта на тези реакции беше да се намерят условия за селективно получаване на 4-моноклорирания продукт **164a** (Route A, Схема 6) с възможно най-висока степен на превръщане. Подобряването на условията би могло да увеличи степента на превръщане на реакцията и да намали добива на други потенциални ITZ производни, които могат да бъдат получени от тази реакция.

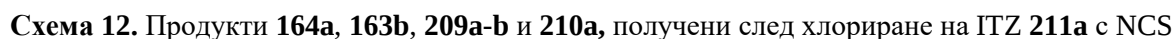


Таблица 8. Резултати от хлориращи реакции, проведени върху съединение **163a**

⁶, „сух“ означава, че CH_2Cl_2 е получен с помощта на апарат Pure Solvent®

В Таблица 8, ред 1, CHCl_3 е заменен с „производствено качество“ на CH_2Cl_2 и са използвани 2 еквивалента NCS, както е посочено в патента на Луис [248]. Независимо от патента, времето на реакцията е удължено (7 часа вместо 4,5 часа [248]), за да се постигне пълна конверсия на изходния материал **163a** (Таблица 8, ред 1). След пречистване на реакционната смес чрез флаш хроматография върху силикагел, очакваният 4-хлориран ITZ **164a** беше изолиран с нисък добив (7%). Допълнително, 4,5-дихлорирани и тетрахлорирани продукти **209a** и **210a** бяха получени съответно, като **209a** беше основният продукт (32% vs 2% за **210a**). Интересно е, че S-моноксидираните продукти **164b**, **164b** и **209b** могат да бъдат възстановени, въпреки че не са открити на TLC (UV = 254 nm), което предполага, че са се образували по време на пречистването. 4,5-дихлорираният продукт **209a** изглежда по-малко чувствителен към окисляване от 4-хлорирания **164a** (traces vs 18%).

За да се избегне реакцията на S-окисление, качеството на разтворителя (CH_2Cl_2) беше подобро, като се премина от „производствено качество“ към „изпарено/дестилирано“ качество, получено чрез дестилация под вакуум с помощта на ротационен изпарител (Таблица 8, ред 2). Тази промяна в процедурата доведе до намаляване на S-окислените продукти b и до получаване главно на 4-хлорзаместения ITZ **164b**. В сравнение с резултатите от ред 1 (Таблица 8), общото количество продукти **164** ($\approx 25\text{-}27\%$) и **211** ($\approx 13\text{-}17\%$) остана същото (Таблица 8, ред 1 vs ред 2), докато се наблюдава увеличение на 4,5-дихлорирания продукт **209a** (32 % vs 49 %), заедно с леко увеличение на **164b** (traces vs 2 %).

Признавайки получените резултати в Таблица 8, ред 2, беше предвидено намаляване на NCS еквивалентите (1 eq вместо 2 eq) (Таблица 8, ред 3). Целта на тази модификация беше, първо, да се намали образуването на дихлорирани продукти **209** и да се увеличи образуването на 4-хлорирани продукти **164**, както и да се избегне образуването на прекалено голямо количество S-моноксидирани продукти **b**, тъй като е известно, че NCS окислява атома на сярата в присъствието на източник на кислород (H_2O , O_2 и др.). При тези условия бяха наблюдавани S-моноксидирани продукти **164b** и **209b**, но в traces. Както се очакваше, количеството на дихлорирания продукт **209a** беше половината от наблюдаваното в ред 2 на Таблица 8. 4-хлорираният ITZ **164a** също беше получен с по-нисък добив отколкото в ред 2, Таблица 8 (14 % vs 21 %). Освен това реакцията не беше пълна (превърщане 92,5%).

Изследвайки възможния източник на кислород, решихме да използваме условията от ред 2 (Таблица 8) и сух разтворител CH_2Cl_2 при инертни условия (атмосферата и CH_2Cl_2 бяха дегазирани под аргон) (Таблица 8, ред 4). Общите добиви на 4-хлорирани видове **164** са се увеличили, докато тези на 4,5-дихлорирани **209** производни са намалели (Таблица 8, ред 4: $\approx 33\%$ vs ред 2: 51%). S-окислените съединения **b** бяха изолирани с по-високи добиви,

отколкото в експеримента от ред 2, но с по-ниски добиви от S-неокислените а (ред 5). При извършените ТЛХ от реакцията от ред 5 не са наблюдавани S-окислени съединения, с изключение на **163b**. Безводните реакционни условия (сух разтворител и инертна атмосфера) и получените резултати предполагат, че трябва да се проучи друг кислородно-медиран път, като например traces от вода, съдържащи се в силициевия флаш.

За да се потвърди горната хипотеза, в по-късен етап в реакционната смес беше въведен голям излишък от флаш силициев диоксид (200 % от теглото на изходния материал **163a**) (Таблица8 , ред 5). Бяха приложени условията от ред 4 (Таблица8), като по-добри за получаване на **164b**. Реакцията беше съхранявана в продължение на 24 часа при стайна температура. Новите условия позволиха получаването на по-голямо количество от 4-хлорираното S-окислено съединение **164b**, докато съотношението на дихлорираните продукти **209** и другите производни **164b** и **210a** остана подобно на това в ред 4 ($\approx 13\text{-}16\%$ и $\approx 3\text{-}2\%$). Така, както е описано в Таблица8 , ред 1, 4-хлорираният продукт **164a** е по-чувствителен към окисляване от 4,5-дихлорираната молекула **209a**. В този експеримент относителните общи съотношения на моно- и дихлорираните производни са почти еднакви (31% за **164a-b** vs 29% за **209a-b**). Тази реакция е по-малко селективна към моноклорирани съединения в сравнение с предходната (таблица8 , ред 4: 48% vs 31%).

Тези резултати са интересни, тъй като съединение **164b**, изходното вещество за следната ключова реакция на Suzuki-Miyaura, може да бъде получено в една стъпка (хлориране/S-моноксидация *по route C*, Схемаб , страница 103), вместо в две последователни стъпки (*routeи A и B*, Схемаб , страница 103 и Схема13), споменати по-горе в нашата стратегия.

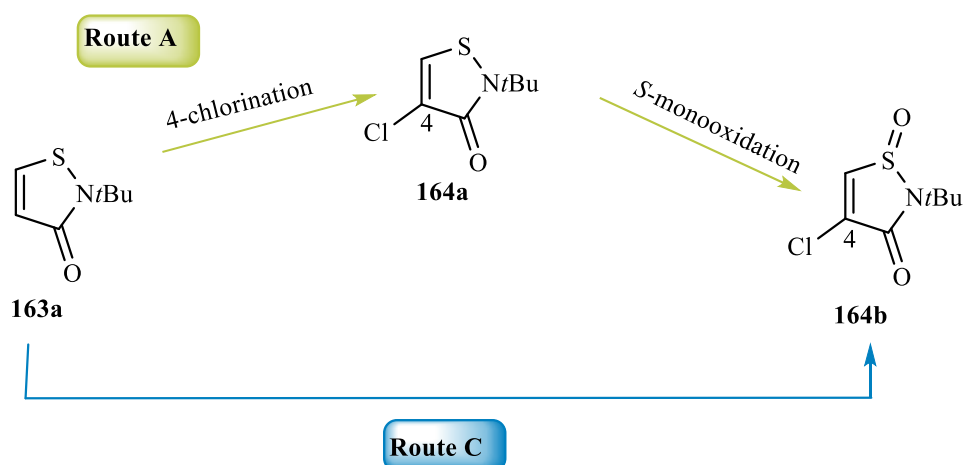


Схема 13. Схематично представяне на **Route A** и **B** за получаване на ITZ **164b**

След като бяха установени приемливи условия за получаване на **164b**, дойде време да се тестват тези реакционни условия в по-голям мащаб. Това ще ни позволи да оценим по-

подробно реакционните условия и да изолираме повече от необходимия продукт **164b** за продължаване на разработването на хибридна молекула, което е целта на тази докторска работа. Мащабът на реакцията беше увеличен от 200 mg на 600 mg (Таблица8 , ред 6), с очакването да се постигнат същите или подобни резултати като описаните в Таблица8 , ред 5.

Въпреки че реакцията беше проведена при същите условия, описани в Таблица8 , Ред 5, при увеличаване на мащаба на реакцията бяха наблюдавани леко различни резултати. Това може да се обясни с производителността и степента на стриктно спазване на условията на реакцията. Беше наблюдавано увеличение на добивът на неокисленото 4-хлорирано съединение **164a** в сравнение с неговия окислен аналог **164b**. И в двата експеримента **164b** беше изолиран с подобен добив (Таблица8 , Ред 6 vs Ред 5). Освен това тези условия доведоха до увеличени количества на всички дихлорирани видове **214a-b** (Таблица8 , Ред 5: 28% **209a** и traces от **209b** vs Ред 6: 35% **209a** и 2% **209b**). Подобно увеличение бе отбелязано и за тетрахлорирания ITZ **210a**. Въз основа на получения резултат може да се заключи, че увеличаването на мащаба на реакцията не доведе до подобряване на добивът на желаното съединение **164b** и намали селективността **164a/164b** (Таблица8 , ред 6: 6% vs ред 5: 2%).

Следователно се препоръчва тази хлорираща реакция да се извършва в малък мащаб (за предпочитане 200 mg) в няколко колби, като се спазва стриктно процедурата, описана в раздела „Експериментална част“. Изолирането на всички получени продукти и странични продукти може да се извърши чрез единична колонна хроматография с силициева стационарна фаза, като се комбинират всички реакционни смеси.

От тези резултати се налагат следните изводи, които подчертават потенциала на тази реакция за селективно получаване на 4-хлоро-S-моноксидирани или S-неоксидирани съединения (**164b** и **164a**) или 4,5-дихлорирани молекули **209a,b**:

- 4-хлор S-неокислено производно **164a** може да се получи с най-висок добив (26%) при условията, използвани в Таблица 8 , Ред 4
- Условията от Таблица 8 , Ред 5 показаха 4-хлор-S-моноксидизираното съединение **164b** с най-добър добив (23%) и най-висока селективност vs неговия S-неоксидиран аналог **164a** в много интересна едностадийна реакция от **163a**, когато се извършва в мащаб от 200 mg
- 4,5-дихлорираният изотиазолон **209a** винаги се изолираше, независимо от експеримента и условията на Таблица 8 Ред 2 позволява получаването му с добър добив и добра селективност vs монохлорирания ITZ **164**.

2.1.1.2 Опити за получаване на 4-хлориран S-моно- **164b** и S-диоксилиран **164c** ITZ по route Б

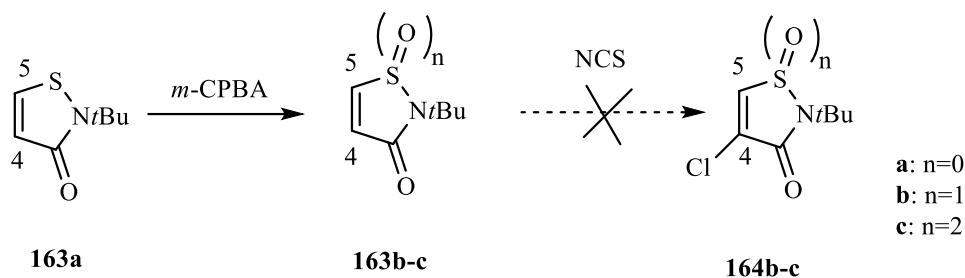


Схема 14. Схематично представяне на синтезирането на целевите ITZ **164b-c** по route Б

ITZ **163b** и **c** бяха налични в голямо количество в лабораторията и бяха получени от реакцията между *m*-CPBA и съответния 5-неоокислен ITZ **163a**. Опитите за хлориране на позиция 4 на S-окислените изотиазолони на **163b** и **163c**, при условията на Таблица 8, Ред 4, се провалиха след 2 дни разбъркване (Route B, Схема 6). Не е наблюдавано превръщане на изходния материал в S-диоксилизираното съединение **164c**, докато е получено само 1% от очакваното 4-хлорирано съединение **164b** и 99 % от изходния материал **163b** е възстановено (Схема 14).

S-окисляването вероятно е променило реактивността на въглеродните атоми C-4 и C-5 от ядрото ITZ към хлориращия агент NCS.

2.1.2 S-окислителни реакции

След извършване на всички реакции, описани в предходните подраздели, беше получено достатъчно количество от съединение **164a**, за да се извърши окисляване на S-атома от ITZ ядрото, следвайки route А (Схема 13). S-окислителни реакции бяха проведени и върху 5-хлороизотиазолон **209a** (наличен в лабораторията) и върху 4,5-дихлороизотиазолон **209a** (получен с помощта на NCS реагент (Схема 15)).

Независимо от изходния материал, S-окислителните реакции бяха проведени с вече закупена партида *m*-CPBA с производствена чистота 70 %. За да се използва пълният окислителен потенциал на *m*-CPBA, последният беше пречистен съгласно процедурата на лабораторията (4 промивки с буферен разтвор от Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ преди употреба).

Като разтворител за тази реакция беше използван сух CH₂Cl₂. Поради екзотермичността на окислителните реакции, въвеждането на *m*-CPBA в реакцията наложи добавянето му на части при ниски температури (0°C).

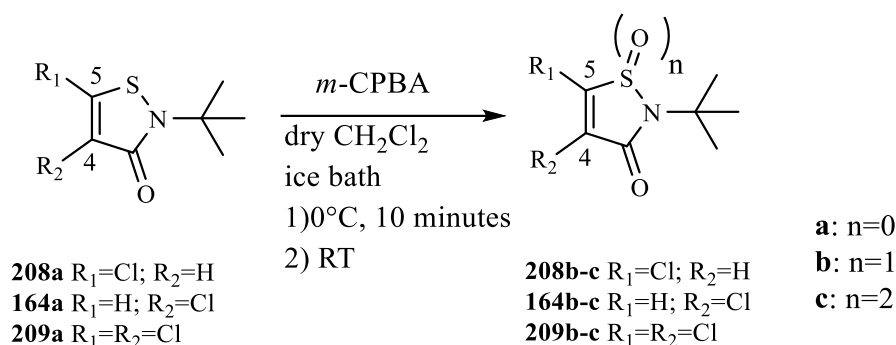


Схема 15. Условия на S-окислителната реакция на ITZ **208a**, **164a** и **209a**

Таблица 9. Резултати от S-окислението на ITZ-групата **208a**, **164a** и **209a**

№	Исходно вещество	m-CPBA Eq	Време ч	Химичен добив %	
				b	c
1	208a	1,4	18	74	traces
2	208a	3,0	48	traces	75
3	164a	1,0	4	78	traces
4	164a	4,6	45	traces	79
5	209a	1,3	4,5	91	traces
6	209a	4,4	45	1,5	72

Строгото следване на хода на реакцията на ТСХ позволи нейното спиране веднага след превръщането на изходния материал **a** в съответния му S-моноксидиран аналог **b**, за да се предотврати натрупването на неговата S-диоксидирана форма **v** или след превръщането на S-моноксидирания продукт в S-диоксидирания продукт **v**.

В края на реакцията суспензията беше филтрувана, за да се отстрани нереагиралият *m*-CPBA и неговите киселинни странични продукти. След това белият филтрат беше промит с 5 % алкален воден разтвор на $NaHCO_3$, за да се постигне отстраняване на киселинните частици под формата на соли. Пречистването на органичния слой чрез колонна хроматография върху силикагел доведе до получаване на S-моноксидирани и/или S-диоксидирани производни **b** и **c**, съответно (Таблица 9).

Както бе споменато по-рано, стриктното проследяване хода на реакцията, както и използваните еквиваленти *m*-CPBA, бяха ограничени поради неговата селективност.

Някои важни обобщаващи точки могат да се предположат, независимо от използваната серия за тези окислителни реакции (Таблица 9):

- S-моноксидационните реакции изискваха 1-1,4 моларни еквивалента на *m*-CPBA (ред 1, 3 и 5)
- S-диоксидационната реакция изисква излишък от *m*-CPBA (3,0-4,6 моларни еквивалента) (ред 2, 4 и 6)
- Химичният добив от реакцията на S-окисление е добър (71 % до 91 %), както и наблюдаваната селективност (вторият продукт на окислението **b** или **c** се получава с максимален химичен добив от 1.5 %, Таблица 9 , ред 6).
- В серия 5 реактивността на **208a** към условията на S-моноксидационната реакция е най-ниска в сравнение с другите серии: времето на реакцията е по-дълго (18 часа vs 4-4.5 часа, Таблица 9) и е необходимо повече *m*-CPBA (1.4 моларни еквивалента vs 1,0-1,3).
- S-моноксидацията на 4-хлороизотиазолон **164a** е описана като по-лесна от тази в 4,5-дихлор серията **209a**. Следователно най-ниският химичен добив, наблюдаван за **164b** (vs **209b**), вероятно се дължи на чувствителността на изотиазолоновия пръстен към условията на пречистване.

2.2 Реакции на Suzuki-Miyaura, включващи ITZ съединения

Главата ще бъде посветена на използването на различните подготвени S-(ди)окислени **208b-c**, **164b-c** и **209b-c** ITZ и арилборонови киселини, притежаващи карбоксилна киселинна.

2.2.1 5-серия ITZ аналози

Тъй като 5-заместените ITZ производни са разработвани в лабораторията, те са предпочитана стратегическа отправна точка за разработването на ITZ фармакофор като част от хибридна молекула.

2.2.1.1 Опити за кръстосано купелуване по Suzuki-Miyaura в 5-SO₂ITZ

Макар че реакциите на кръстосано купелуване по Suzuki-Miyaura, включващи S-(ди)окислени-5-хлороизотиазолони **208b-c**, са широко описани в литературата, но само четири от тях описват използването на боронова киселина, която има карбоксилна група [188,186,187,189]. Въпреки това, всички тези източници, публикувани от Nie *et al.* (Фигура 57), са трудни за използване, тъй като експерименталната процедура е описана на китайски език, а литературата е недостъпна [187,188] или се състои от патенти [186,188,189]. В тези разработки N-метил или N-незаместеният 5-хлороизотиазолон-1,1-диоксид **213** са реагирали с 3-карбоксифенилборонат **214** в присъствието на PdCl₂dppf.CH₂Cl₂, за да се получат ITZ **98bA** и **98bB** от биологичен интерес (Фигура 57, страница 70 и Схема 6).

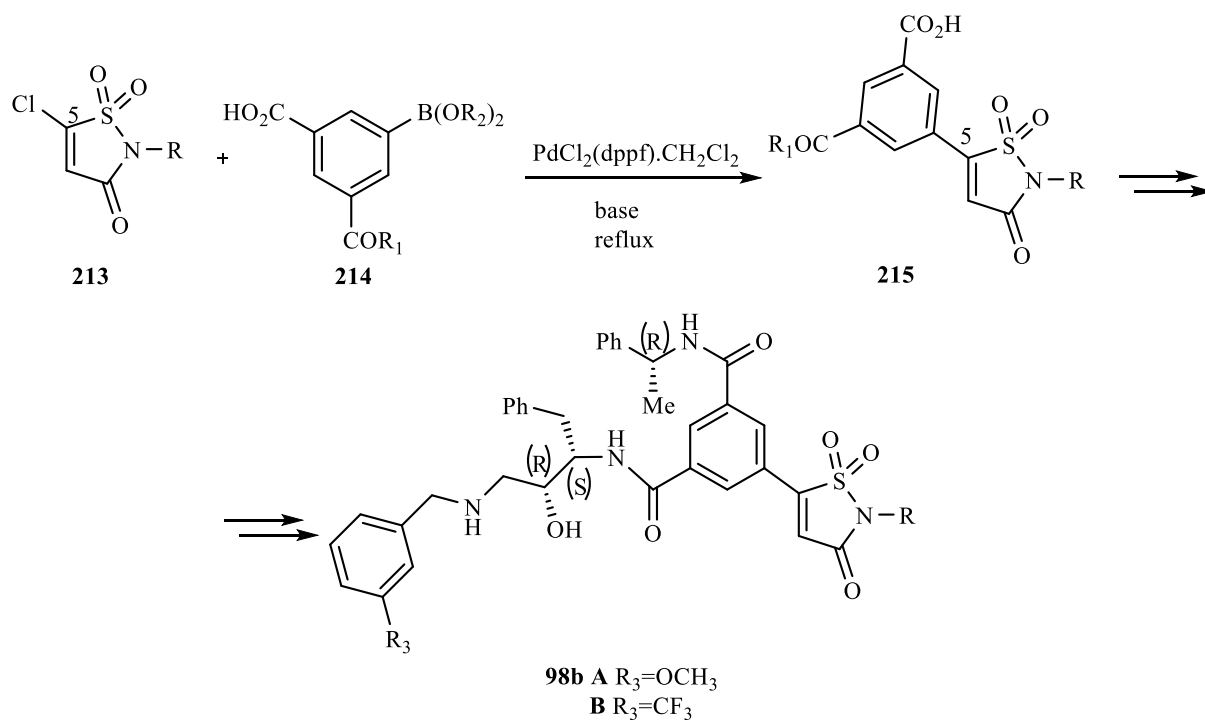


Схема 16. Синтетичен подход от ITZ **213** за получаване на съединенията **98bA** и **98bB** от екипа на Nie *et al.* [186–189]

Ще бъдат проведени реакции на Suzuki-Miyaura с участието на карбоксиарилборонова киселина, за да се получи свързваща точка за постигане на целта на този докторски проект за разработване на биоконюгат между хетероцикъл и пептид. Изхождайки от предишна разработка в лабораторията вещество **208c** е установено като по-реактивно от моноокислената му форма **208b** (Схема 17) [185].

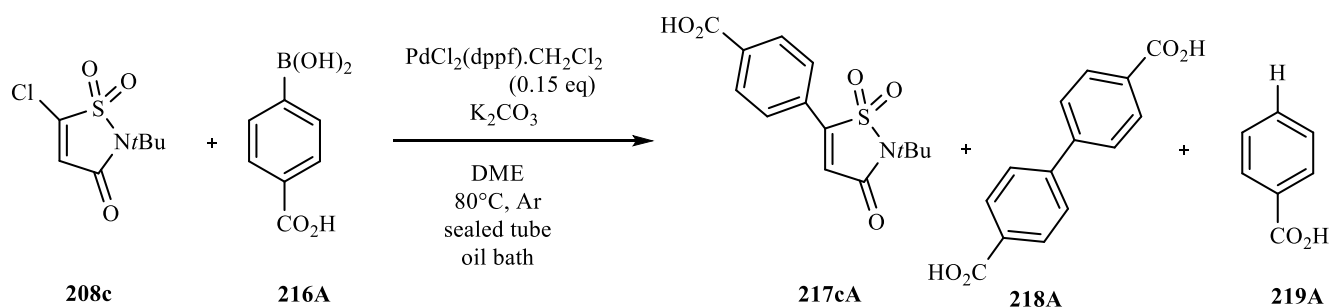


Схема 17. Реакция на кръстосано свързване по Suzuki-Miyaura, проведена върху съединение **208c**

Въз основа на резултатите от групата на Sapi *et al.*, в присъствието на $\text{PdCl}_2(\text{dppf}).\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (0.15 eq) и K_2CO_3 (3 eq), ITZ **208c** и боронова киселина **216A** (2 eq) са реагирали в DME при 80°C в инертна атмосфера от аргон (Таблица 10, ред 1) [185].

Поради наличието на киселинни функции, произхождащи от бороновата група и излишъка на K_2CO_3 , беше въведена допълнителна екстрактивна стъпка в кисела среда (1M воден

разтвор на HCl) преди пречистването чрез флаш колонна хроматография на силикагел за извличане на съединенията **217c** и страничните продукти **218** и **219**.

Таблица 10. Различни условия на реакцията на Suzuki-Miyaura, приложени за получаване на съединение **217c**

№	Условия				Превръщане %	Добив %		
	216A eq	K ₂ CO ₃ eq	DME	Време h		217c	218	219
1	2	Твърдо 3 eq	7 mL	11	100	79	2	16
2 [249,250]	1.5	2M воден разтвор (0.14 mL) 2 eq	7 mL	8.5	100	74	traces	traces
3	1.5	Твърдо 2 eq	7 mL Смес с 0.5 mL H ₂ O	3.5	98	35	6	2
4 [251]	1.5	Твърдо 2 eq	4,0 mL в смес с 3.5 mL H ₂ O	5	95	37	1	traces

Тези модифицирани условия в лабораторията позволиха успешното получаване на съединението **217cA** с много добър добив (79 %, Таблица 10, Ред 1). Степента на превръщане беше 100% и бяха изолирани също хомо-съединението **218A** и деборонираното производно **219A**.

Успоредно с това бяха опитани модифицирани условия (Таблица 10, реди 2-4) в съответствие с процедурите, описани в литературата относно реакциите на свързване Suzuki-Miyaura, включващи карбоксифенилна борна киселина [249–251]. Следователно количеството на боранат **216A** и K₂CO₃ беше леко намалено (от 2 eq на 1.5 eq и от 3 eq на 2 eq, съответно, Таблица 10 , Ред 2-4 vs Ред 1). K₂CO₃ беше въведен или от съответния 2M воден разтвор (Таблица 11 , ред 2), или като твърдо вещество, разрежено в различни обеми вода (Таблица 10, ред 3-4), за да се измери влиянието на водата. Другите реакционни параметри (като катализатор и разтворител) останаха непроменени.

Когато водата представляваше около 2 % от целия обем на разтворителя (Таблица 10 , ред 4), продуктът на съединяване **217cA** беше получен с малко по-добър добив, подобен на този

в ред 1 (Таблица 10, 74 % vs 79 %, ред 2 vs ред 1). Беше наблюдавана и 100% степен на превръщане, а страничните продукти **218A** и **219A** бяха възстановени като „traces“ (≤ 1 %).

При запазване на същото количество K_2CO_3 (2 eq) в присъствието на увеличен обем вода 7 % и 47 % от целия обем разтворител, съответно (Таблица 10, Ред 3 и 4) химичният добив на съединителния продукт **217cA** се понижи два пъти (35 % и 37 % vs 74 %). Бяха наблюдавани малки количества странични продукти (хомосъединение **218** и деборонирани **219** продукти). Това може да се обясни с хидролизата на IZT пръстена, която се основава на факта, че при ТСХ може да се наблюдава голямо интензивно петно в долната част, което показва наличието на много полярни продукти.

Исходният материал **208c** беше възстановен след колонна хроматография и в двете реакции.

Условията, приложени в ред 2 (Таблица 10) бяха приложени без успех към реакцията на свързване между **208c** и 2-карбоксифенилборонат **216c** (Схема 18).

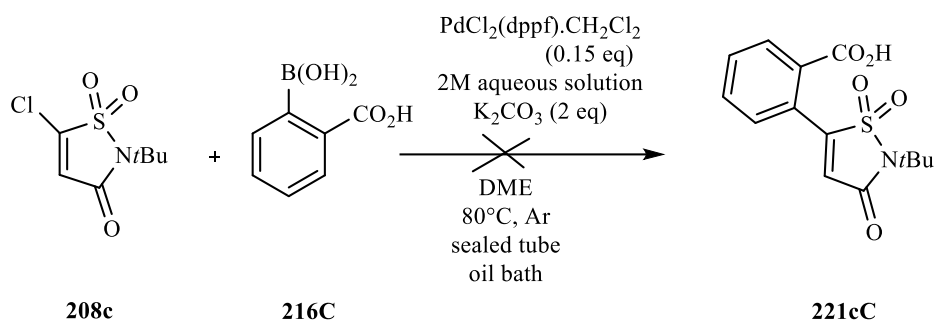


Схема 18 Реакция на Suzuki-Miyaura между ITZ **208c** и **216c**

Не е възможно да се получи съединение **217cC**. Стеричното препятствие между киселинната функция в ортопозиция и групата SO_2 може да е причина за липсата на резултати.

В допълнение към обнадеждаващите резултати, получени с поредицата 4-карбоксифенилборонова киселина, и в опит да се разшири обхватът на тази реакция на свързване до хетероциклични боронати, носещи карбоксилна киселинна функция, беше проведена моделна реакция с използване на търговски наличен 2-карбоксифенилборонат **216D** при условия от ред 1, Таблица 10 (Схема1).

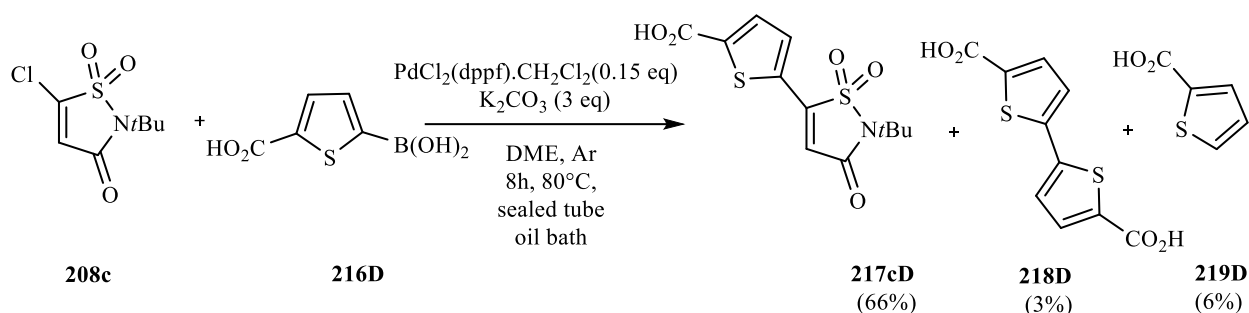


Схема 19. Реакция на Suzuki-Miyaura между ITZ **208c** и **216D**

Съединението **217cD** може да бъде получено, но с малко по-нисък добив в сравнение с фениловата серия **A** (66 % vs 79 %).

В заключение, описаните по-рано условия от Таблица 10 , Ред 1, осигуряват най-добър добив на съединението **217cA**. Въпреки това, модифицираните условия, особено тези, при които се въвежда разреждане на K_2CO_3 във вода и увеличаването на обема на водата (≥ 7 % от целия обем на разтворителя), доведоха до значително намаляване на добивът на **217cA** и образуването на странични продукти, вероятно поради хидролиза на изотиазолоновия пръстен при тези алкални водни условия. Тези резултати показват, че внимателният контрол на реакционните условия е от решаващо значение за максимизиране на добива и минимизиране на страничните реакции при синтеза на съединението **217cA**.

Предварителните резултати, свързани с ортозаместения 2-карбоксифенилборонат **216C**, подчертават ролята на стеричното възпрепятстване за успеха на тези реакции, включващи S-диоксидазириания ITZ **208c**.

Предварителни резултати бяха получени с боронат **216D**, имащ карбоксилна киселинна в структурата си, което позволява тази реакция да бъде разширена до по-широка гама от арилборонати.

2.2.1.2 Опити за реакция на Suzuki-Miyaura в серията 5-SO ITZ

Въз основа на успешните резултати от реакционния модел и получаването на желаното съединение **217c** с много добър добив (глава 2.2.1.1) бяха проучени различни арилборонати **216**, носещи карбоксилна киселинна функция (серии **A**, **B**, **C**, **D**) или производна такава (естери **F**, амид, **E**) (Схема 20). С цел да се потвърди потенциалната приложимост на тази реакция на Suzuki-Miyaura към други (ди)хлорни ITZ производни. Проектирането на широка гама от 5-заместени S-окислени ITZ и тестването на тези аналози vs PDE4 активност ще даде по-добра представа за ролята на различните арилни замествания.

Освен това, ще бъде проучена позицията на карбоксилната киселина или производната ѝ, за да се установи SAR на тези фармакомодулирани съединения **217b** върху PDE4.

За целите на тази докторска работа бяха избрани търговски налични и най-прости боронати **216** (фенил **A**, **B**, **C** и тиофенил **D**), носещи карбоксилна киселинна функция, които да бъдат използвани като анкерна точка за по-нататъшни свързвания с пептиден фармакофор.

За тази серия аналози, **217b** 2-(терт-бутил)-5-хлороизотиазол-3(2*H*)-он 1-оксид **203b** беше избран като изходно съединение за реакциите на кръстосано свързване по Suzuki-Miyaura. По този начин ще бъде подготвена нова група аналози **217b** като част от докторската дисертация (Схема 20), разширявайки библиотеката от продукти, синтезирани по-рано в лабораторията [185]. Благодарение на предишната изследователска работа в лабораторията беше налично достатъчно количество от съединение **208b**, което предостави солидна отправна точка за синтезиране на нови 5-арил заместени S-моноксидирани ITZ **217b** (Схема 20).

Реакцията беше проведена с три карбоксифенилборонови киселини **216A-C** (*орто*-, *мета*- и *пара*-заместени) и хетероарил 2-карбокситиофен боронова киселина **216D**. Както бе споменато по-рано, бяха изследвани също така амидното съединение **216E** на боронат **216B** и бензилестерното съединение **216F** на боронат **216A**.

Най-добрите условия, разработени в 5-заместената S-диоксидирана серия (Таблица 10, реди 1 и 2), бяха приложени в съответната S-моноксидирана серия.

Обобщена схема на извършените реакции е дадена по-долу (Схема 20), а резултатите са посочени в Таблица 11.

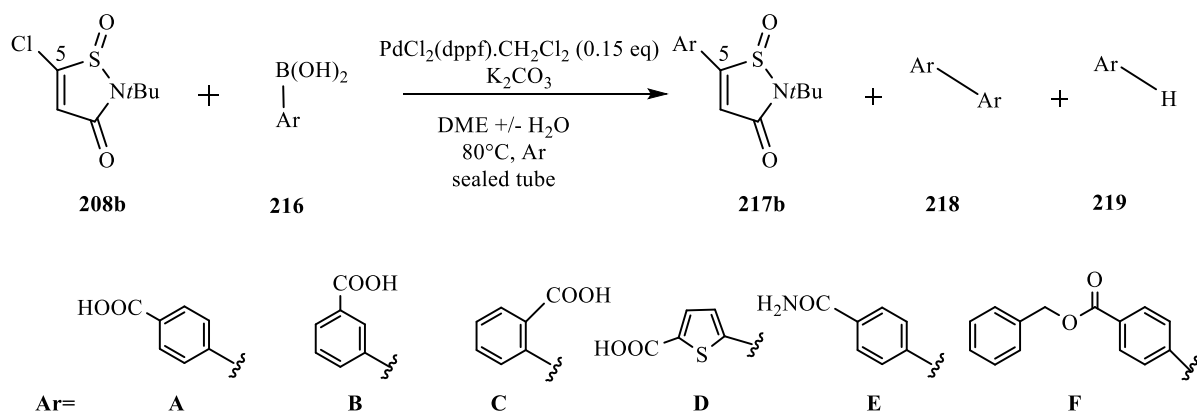
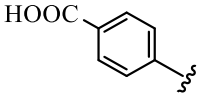
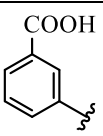
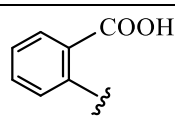
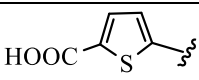
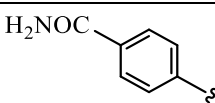
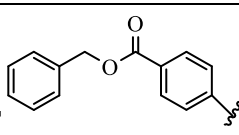


Схема 20. Обобщена реакция на Suzuki-Miyaura за серията 5-S-моноксидирани ITZ

Таблица 11. Резултати от реакцията на Suzuki-Miyaura в серията 5-S-моноксидирани ITZ

№	Борова киселина 216	Условия	Време ч	Преобразуване %	Добив %		
					217	218	219

1	A 	a	7	98	49	traces	traces
2	B 	б	6	100	62	traces	29
3	C 	б	11	100	traces	traces	10
4	D 	б	10	100	74	17	5
5	E 	б	10	100	70	traces	traces
6	F 	б	7	100	75	traces	traces

а: условия на Таблица10 , Използвани са: 2 eq на K_2CO_3 от 2М воден разтвор на K_2CO_3 и 1,5 eq на **216**

б: използвани са условията от Таблица10 , Ред 1: 3 eq K_2CO_3 без допълнителна вода и 2,0 eq **216**

Като цяло, повечето реакции на кръстосано свързване бяха пълни (98% до 100%). В фениловата серия въвеждането на карбоксилна киселинна функция върху фениловия пръстен доведе до най-ниски химически добиви на съответния куплинг продукт **217b** (Таблица 11, реди 1 и 2 в сравнение със реди 5 и 6) или до невъзможност за получаване на молекулата (Таблица 11, ред 3). Допълнителната алкална работна процедура и/или реактивността на боронатите може да са допринесли за тези наблюдавани резултати.

По-висок химичен добив е получен в серията 3-карбоксифенил **B**, отколкото в съответната серия 4-карбоксифенил **A** (Таблица11 , реди 2 vs ред 1). Тъй като са използвани две различни процедури за свързване (Таблица 11 , процедура **b** vs процедура **a**), реактивността на боронатите може да не е единствената причина за разликата в получените добиви.

В серията 2-карбоксифенил стеричното възпрепятстване, генерирано от позициите на групите CO_2H и SO_2 , може да е причина за малките количества получени продукти на свързване **217bC** (Таблица 11 , Ред 3). Наблюдаваната 100% степен на превръщане може да се дължи на алкалната хидролиза на ITZ пръстен, ускорена от два пъти по-дълго време на реакция (11 часа vs 6-7 часа, Таблица 11 , Ред 3 vs Реди 2 и 1). Освен това на дъното на TLC плаката бяха наблюдавани много полярни и оцветени продукти.

За разлика от наблюдаваното в 5-S-окислената серия (Таблица 10 и Схема 19), съединителната реакция, включваща 2-карбокситиофенил боронова киселина **216D**, даде по-добри резултати от тези, получени в карбоксифениловите серии **A** и **B**.

2.2.1.3 Заключение относно опитите за свързване по Suzuki-Miyaura в серията 5-S-окислени ITZ

Условията за кръстосано съединяване и обработка, съвместими с карбоксилната киселинна функция, закрепена върху арилната група, позволиха успешното изолиране на съединителния продукт **217** в повечето случаи. S-диоксидизираната серия изглежда по-реактивна от съответната S-монооксидизирана (Таблица10, ред 2 vs Таблица11, ред 1), но това трябва да бъде обективизирано въз основа на повече примери.

Окуражаващите резултати, получени с 2-карбоксилтиофенил боронат **216D**, независимо от 5-S-окислената серия, демонстрираха потенциала на тази куплираща реакция за синтеза на множество фармакомодулирани куплиращи молекули **217**, което позволява проучване на връзката между структурата и активността.

Местоположението на карбоксилната киселина върху фенилната група играе решаваща роля, когато се намира в *ortho* позиция, като бяха изолирани само traces от съединителния продукт (Таблица11, ред 3).

В тези полярни карбоксилни киселинни серии подобряването на условията и добивът на съединителния продукт може да бъде трудно. По този начин, както е показано в Таблица11, работата с естерна група като точка на закрепване вместо киселинната може да се разглежда като алтернативен подход (Таблица11, ред 6 vs ред 1). Това би спомогнало за по-проста реакция и изолиране на съединението **217b**. Въпреки това е необходима допълнителна стъпка на осапуняване. Тази стратегия може да доведе до получаване на съединението **217b** с по-висока чистота и/или по-добър добив.

2.2.2 4-серия ITZ аналози

В литературата не е описана реакция на свързване по Suzuki-Miyaura, включваща S-окислен 4-хлориран ITZ, 5-заместен или не. Реакцията, при която 4-бромо-S-диоксидиран ITZ **220c** е реагирал с боронат **221**, е единствената референция, описваща реакция на свързване Suzuki-Miyaura, базирана на използването на 4-халогениран S-окислен ITZ[194] (Схема21).

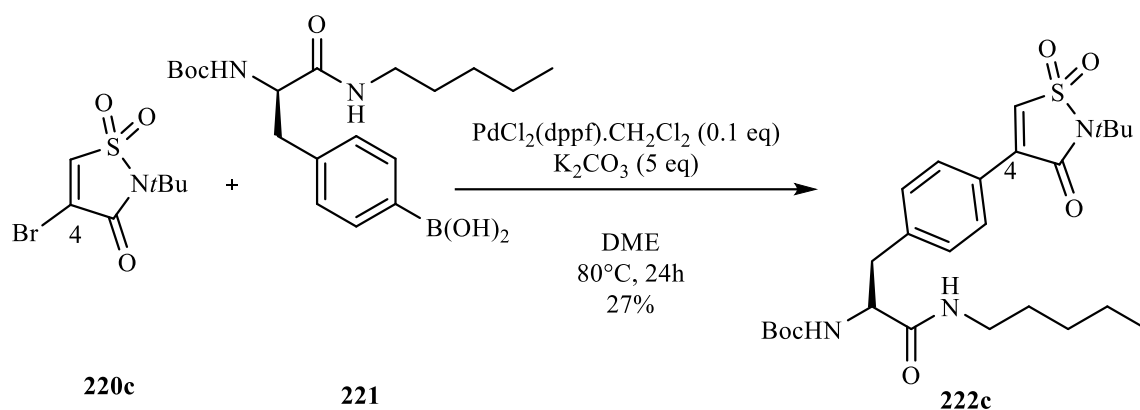


Схема 21. Реакция на куплиране Suzuki-Miyaura, включваща ITZ **220c**, описана в Yue *et al.* [194]

Както и в предишното проучване получените продукти **233** и **234** ще бъдат тествани върху различни възпалителни клетки, с цел да се установи SAR на тази библиотека от S-окислени 4- или 5-арил заместени ITZ производни.

Освен това, съединителните производни, носещи карбоксилна киселинна група на арилната си част, могат да бъдат конюгирани с пептид, за да се създадат целеви хибридни съединения, които ще бъдат допълнително оценени по отношение на ензима PDE4.

2.2.2.1 Опити за Suzuki-Miyaura реакции в S-моноксидизираната 4-серия

При липса на референции, условия **a** или **b**, описани в Таблица 11 (съответно реди 1 и 3), бяха приложени към S-моноксидаза ITZ **164b**. Повечето от търговски налични боронови киселини **216**, вече тествани в 5-заместената серия (**216A, B, C, D** и **F**), бяха тествани в 4-заместената серия (Схема 22 и Таблица 12).

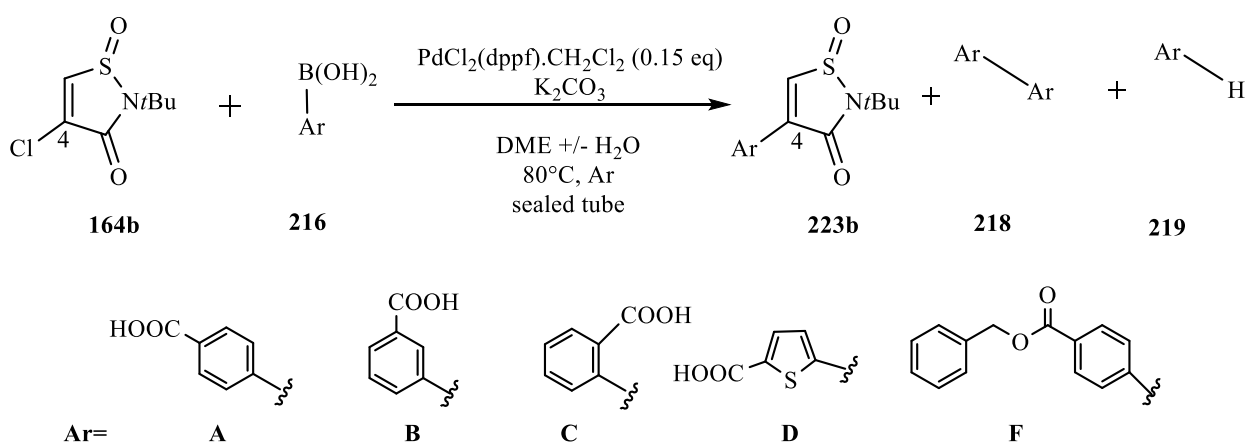
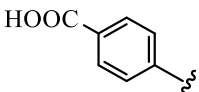
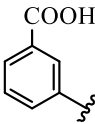
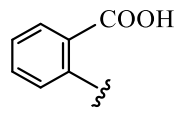
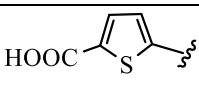
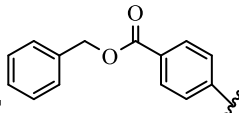


Схема 22. Реакции на кръстосано купелуване по Suzuki-Miyura, проведени върху съединение **164b**

Всички извършени реакции са цитирани в Таблица 12.

Таблица 12. Резултати от реакциите по Suzuki-Miyaura в серията 4-S-моноксидирани ITZ

№	Борова киселина 216	Условия	Време ч	Превръщане %	Доходност %		
					223b	218	219
1	A 	a	4	89	69	traces	traces
2	B 	a	8	94	43	traces	4
3	C 	б	9.5	97	-	-	-
4	D 	б	5	100	traces	traces	14
5	F 	б	7	100	81	traces	traces

а: условия на Таблица 10, Използвани са: 2 eq на K_2CO_3 от 2М воден разтвор на K_2CO_3 и 1,5 eq **216**

б: използвани са условията от Таблица 10, Ред 1: 3 eq K_2CO_3 без допълнителна вода и 2,0 eq **216**

Получените резултати бяха подобни на тези от серията с 5-арилни заместители ITZ.

Най-добри резултати бяха получени при използване на 4-бензилкарбокси фенил боранат **216F** (Таблица 12, ред 5) и продуктът на съединяване **223b** беше получен в почти десет процента повече отколкото в серията 5 (81 % vs 73 %) (Таблица 12, ред 5 vs Таблица 11, ред 6).

С изключение на 2-карбоксифенил боранат **225C**, серията карбоксифенил боранат (**216A-B**) се оказа по-реактивна от 2-карбокситиофенил **216D**.

В сериите с 4- и 3-карбоксифенил борати (**216A** и **B**) първата (**216A**) беше по-реактивна (69 % vs 43 %, Таблица 12, Ред 1 vs Ред 2), като се има предвид, че тази реакция е отнела два пъти по-малко време от втората (4 часа vs 8 часа) и че нито една от тях не е била пълна (съответно 89 % и 94 %). Въз основа на наблюдаваните резултати от Таблица 11 , Ред 1 и Таблица 12 , Ред 1, където са използвани условия а (2М воден разтвор на K_2CO_3) са били използвани, S-моноксидизираният 4-хлор ITZ **223B** изглежда по-реактивен от съответното му 5-S-моноксидизирано съединение **217B** в серия 5 (69 % vs 49 %, Таблица 12 , Ред 1 vs Таблица 11 , Ред 1).

При използване на 2-карбоксифенил боранат **218C** не е получен продукт на съединяване **223bC**, вероятно поради стеричното възпрепятстване, генерирано от карбоксилната

киселинна група и/или ниската реактивност на боранат **216C**. Използваните условия (алкална среда и удължено време на реакция (Таблица 12, Ред 3) може да са причина за хидролизата на ITZ пръстена.

В тиофенилната серия бяха изолирани само traces ($\leq 1\%$) от съединението **223bD**, докато в S-моноксидираната 5-заместена серия химичният добив беше с около 70 % по-висок (traces vs 74 %, Таблица 12 , Ред 4 vs Таблица 11 , Ред 4). Освен това след около 10 часа реакцията не беше завършила и 14% от деборонизирания продукт **219D** беше възстановен (Таблица 12, Ред 4). Използваните условия, в допълнение към ниската реактивност на бораната **216D**, може да са допринесли за ускоряване на K_2CO_3 медираната ITZ пръстенна хидролиза.

От обща гледна точка, някои от тези резултати биха могли да бъдат подобрени, тъй като превръщането не е пълно (Таблица 12, ред 1 и 2).

2.2.2.2 Опити за реакция на Suzuki-Miyaura в S-диоксидизираната серия

Както бе споменато по-горе, не е описана реакция на кръстосано купелуване по Suzuki-Miyaura, включваща S-диоксидирани 4-хлороизотиазолонови производни. Поради това известните реактивни 4-карбоксиметил и 3-карбоксиметилборонати (**216A** и **216B**) бяха избрани за първата серия от реакции на свързване. Основавайки се на предишни резултати се предполага, че продуктите на свързване **223cG-H**, съдържащи естерна функция, са по-реактивни и по-лесно изолирани от реакционната смес от съответните им киселини (съответно **223cA** и **223cB**) (Схема 22).

И двете реакции бяха проведени при условие **a**: 2 еквивалента **216** и 3 еквивалента K_2CO_3 (Таблица 13).

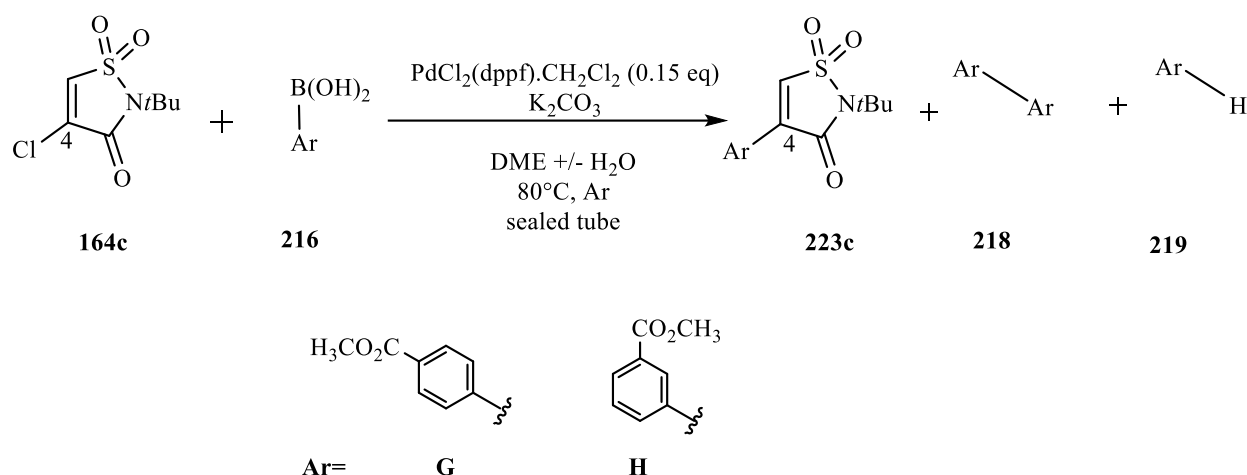
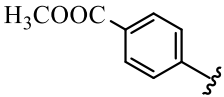
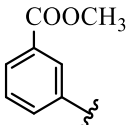


Схема 23. Реакции на Suzuki-Miyaura, проведени върху съединение **164c** с боронати **216G** и **216H**. Резултатите от реакцията ще бъдат споменати в Таблица 13.

Таблица 13. Резултати от реакциите на кръстосано свързване Suzuki-Miyaura на ITZ **164c** с боронати **216G** и **216H**

№	Борова киселина 216	Условия	Време ч	Превръща не %	Доходност %		
					223c	218	219
1	 G	6	10	100	39	12	-
2	 H	6	11	94	15	19	-

Докато боратите (**216G** и **216H**) и въпреки пълните реакции, продуктите на свързване **223cG** и **234cH** бяха получени в доста по-ниски добиви (съответно 39 % и 15 % Таблица 13, Ред 1 и 2) от бензиловите естерни съединения в *S*-моноксидизираните 4- и 5-серии (съответно 81 % vs 73 % Таблица 12 и Таблица 11). Както се наблюдава в *S*-моноксидизираните 4- и 3-карбоксифенил-4-заместени изотиазолон серии (Таблица 12, ред 1 и 2, съответно), най-добри резултати при свързване са получени с по-реактивния 4-фенил заместен боронат (в сравнение с 3-заместения). Като допълнително доказателство за най-ниската реактивност на *S*-диоксидизирания 4-хлороизотиазолон **164C**, бяха възстановени големи количества хомосъединителни производни **218C** (Таблица 13) и беше приложено „дълго“ време на реакция (10 часа).

Както се наблюдава в *S*-моноксидизирания 4-арилзаместена серия, въпреки пълната конверсия, не бяха получени други изотиазолонови видове, освен крайните продукти продукти **223cG** и **223cH** (съответно 39 % и 15 % Таблица 13), което предполага, че в *S*-диоксидизирания серия изотиазолоновият пръстен е по-чувствителен към алкална хидролиза. Това може да се дължи на наличието на SO₂ група, която води до по-поляризирана и разградима *N-S* връзка.

Въз основа на тези два предварителни резултата от съединяването и тези, получени в *S*-моноксидизирания серия, изглежда, че *S*-диоксидизираният 4-хлороизотиазолон **164c** може да е по-малко реактивен от *S*-моноксидизирания **164b**.

2.2.3 Заключение относно Suzuki-Miyaura в сериите 4 и 5

Модифицирането на условията, разработени от лабораторията за реакцията на кръстосано свързване на Suzuki-Miyaura, по-специално чрез въвеждането на повече от 7 % вода в средата,

води до намаляване на добивът на полученото съединение за свързване в нашата моделна реакция Таблица 10[185]. Въпреки това, използването на 2 еквивалента K_2CO_3 , получени от 2М воден разтвор на K_2CO_3 вместо от неговото твърдо състояние, доведе до намаляване на страничните продукти на реакцията и понякога даде добър химичен добив на съединенията, както в *S*-моноксидизираната 4-арилзаместена ITZ серия (Таблица 12 , реди 1 и 2).

Използването на условията, разработени от лабораторията, позволи получаването на съединения с карбоксилна киселинна функция върху арил групата (арил = тиафенил или фенил) с нисък до добър добив в зависимост от изследваната серия (4- или 5-заместени) и степента на окисление на сярата (моно- или диоксидирана)[185]. Беше добавена допълнителна стъпка на пречистване (екстракция при кисели условия), за да се възстановят колкото е възможно повече продуктите на съединяване, носещи карбоксилна киселинна функция.

При липса на референции, условията на реакцията на свързване Suzuki-Miyaura, публикувани от лабораторията, биха могли да бъдат успешно приложени към реакции на кръстосано свързване, включващи *S*-окислени 4-хлорзаместени изотиазолони [185].

Няколко съединения, в които различни арил заместители (фенил или тиафен) носят карбоксилна (производна) киселинна функция ($CO_2 H$, $CO_2 R$, $CONH_2$) в различни позиции, бяха синтезирани в 4- и 5-*S*-моноксидирани серии, което дава по-добри перспективи за откриването на PDE4 инхибитори.

Въпреки че съединяването в 4- и 5-заместените серии показва различни резултати, последните трябва да бъдат разширени към други (хетеро)арилни боронати, носещи карбоксилна киселинна група, за да се потвърди тяхната обща пригодност за получаване на нов хибриден фармакофор. Освен това, ITZ съединителните производни, притежаващи други функционални групи върху арилната част, могат да бъдат оценени vs PDE4, за да се разшири библиотеката от съединения и да се получат по-задълбочени познания от SAR проучването. Освен това, арилборонатите, носещи amino група, могат да допринесат за съединяване с C-края на пептида или неговата карбоксилна група на Glu остатъка.

Въз основа на резултатите, описани в глави 2.2.1.2, 2.2.2.1 и 2.2.2.2, продукти **217bF**, **223bF** и **223cF**, носещи естерна група, биха могли да бъдат получени с много добър добив. Това ги прави ключови прекурсори за получаване на карбоксилна киселина след хидролиза.

2.2.4 Получаване на 4,5-диарилзаместени *S*-окислени изотиазолони

2.2.4.1 Опит с 5-арилзаместени *S*-диоксидирани изотиазолони

Първият предвиден подход се основаваше на предварително получените 5-съединения от изследователската работа на Sapi *et al.*, където продукт **224c** (Ar=Ph) беше открит в достатъчни количества в нашата лаборатория [185].

Беше планирано халогениране в единствената възможна позиция 4 на ITZ скелета **224c** (Схема 24). След получаването му, 4-хлоризотиазолон **225** (Ar=Ph) щеше да се използва като изходен материал в реакция на свързване по Suzuki-Miyaura и да реагира с арил борат, носещ киселинна функция, служещ като свързващо група при присъединяване към пептид. Освен това, тази стратегия би позволила получаването на голям набор от продукти, съставени от ITZ фармакофор, заместен в позиции 4 и 5 от една и съща арил група (Ar₍₁₎=Ar₍₂₎) или от две различни (Ar₁ ≠ Ar₂).

Опитът за хлориране при същите условия, използвани за хлорирането в позиция 4 на ITZ, не доведе до никаква конверсия на изходния материал **224c** (Ar=Ph) (TLC мониторинг). Изотиазолон **224c** (Ar=Ph) се разбърква 4 часа при стайна температура в сух CH₂Cl₂ в присъствието на 1.2 eq NCS в аргонова атмосфера. Следователно, тъй като предишните условия не дадоха резултат, беше направен друг опит с по-силен хлориращ агент, SO₂Cl₂ (1.2 eq) [246]. Разбъркването през нощта в инертна атмосфера при стайна температура отново не доведе до превръщане на продукт **224c** (Ar=Ph), както беше установено чрез TLC.

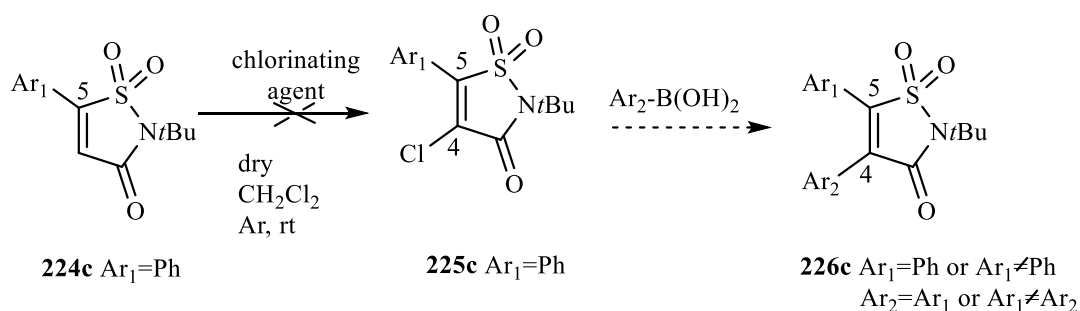


Схема 24. Опити за получаване в две стъпки на 4,5-диарилзаместено S-диоксидизирано изотиазолон **226c** от 5-арилзаместено S-диоксидизирано изотиазолон **224c**

Дали този резултат се дължи на халогениращия агент или на деактивирането на въглерода 4, предизвикано от окисленото състояние на атома на сярата и/или арила в позиция 5? Втори набор от реакции, започващи от 4-арилзаместените S-окислени изотиазолони, може да даде част от отговора.

2.2.4.2 Опити за реакции на кръстосано свързване Suzuki-Miyaura bis

След като разполагаме с 4,5-дихлоризотиазолон **209b-c**, получен след двустепенна последователност от халогениране/S-окисление от съединение **163a**, и от друга страна, условия, които да се приложат за извършване на моно-Suzuki-Miyaura кръстосана реакция

(виж глави 2.2.1 и 2.2.2), получаването на 4,5-диарилзаместено съединение изглеждаше осъществимо. Първите опити бяха проведени с най-простия наличен в търговската мрежа арилборонат с карбоксилна киселинна функция, който вече даде добри резултати в серията 4-заместени ITZ, 4-карбоксифениловите боронови киселини **216A** (Схема 25). Въвеждането на два пъти тази арилна група върху фармакофора ITZ би позволило закрепването на два (различни) пептида.

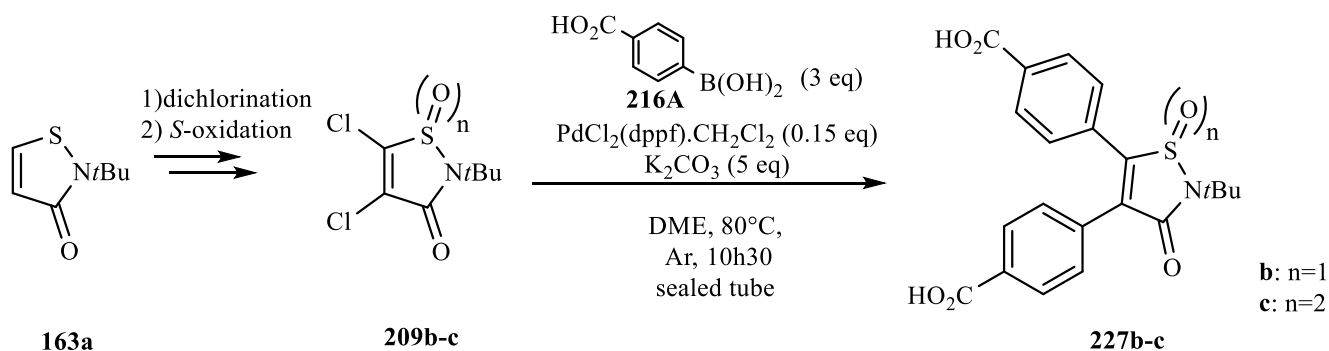


Схема 25. Синтез на целеви 4,5-диарилзаместени S-окислени изотиазолони **227b-c**, започвайки от **163a**

Бяха използвани леко увеличени количества боронат **216A** (3 eq vs 2 eq) и K_2CO_3 (5 eq vs 3 eq), докато обемът на DME, количеството на катализатора, температурата и атмосферата останаха непроменени. След 10 часа и 30 минути реакция, целият изотиазолон **209b** беше изразходван и бискуплираният продукт **227b** беше изолиран с 27% химичен добив и 16% от бискуплирания продукт беше получен. Този нисък химичен добив може да се дължи на високата полярност на съединение **227b**, което направи неговото извличане много трудно (екстракция и колонна хроматография) и/или на хидролиза на изотиазолоновия пръстен в приложените алкални (5 eq на K_2CO_3 вместо 3 eq) условия на свързване. Температурата и времето на реакцията (10h30) може да са ускорили този процес.

Този предварителен резултат остава обнадеждаващ, тъй като бискуплираният продукт **227a** е могъл да бъде изолиран. Условиата трябва да бъдат коригирани с цел увеличаване на химичния добив на целевото производно **227b**, например чрез използване на арил естер, заместен с борат.

Трябва да се подчертае, че това 4,5-диарилзаместено S-моноксидирано изотиазолоново производно **227b** е получено чрез Suzuki-Miyaura бис-съединителна реакция, включваща 4,5-дихалогенирано S-оксидирано изотиазолоново. В литературата не е описано получаване на 4,5-диарилзаместено S-окислено ITZ чрез Suzuki-Miyaura бис-куплинг реакция.

Въвеждането на малко повече от един еквивалент на първи борат и изчакването преди добавянето на същото количество втори различен борат би могло да позволи получаването

на нова серия S-оксидирани изотиазолони, 4,5-дизаместени с различни арил групи, които биха могли да бъдат интересни за тестване като мощни PDE4 инхибитори.

3 Пиридазионов фармакофор

3.1 Приготвяне на целевите пиридазинони

Подготовката на целевите съединения беше предвидена чрез последователност от пет стъпки, започваща от левулинова киселина **22**. Първите стъпки от синтеза са показани на Схема 7, където етил левулинат **23** беше получен чрез естерификация по Фишер с 96% добив. Следващата стъпка е поредица от две реакции в един съд. Кето-енолната таутомерия позволява селективно въвеждане на броминия атом в позиция 3 на **23** чрез строго провеждане на реакцията в хлороформ при 0 °C [19]. Този броман междинен продукт се подлага на елиминация от тип 2, катализирана от триетиламин, която напълно превръща съединението в съответния α, β -ненаситен етил левулинат **4**.

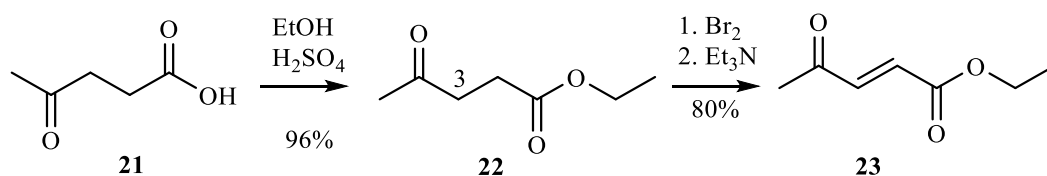


Схема 7. Получаване на α, β -ненаситено етил левулинат 3

Добавянето на различни индолни фрагменти **24** се извършва чрез реакция от тип Майкъл с използване на киселинен катализатор *p*-толуенсулфонова киселина (*p*Ts-OH), което води до съответните 2-заместени етил левулинати **25**. Въз основа на предишни проучвания [19,29] ние се фокусираме върху следните производни: незаместени индол **229a**, 5-броминдол **229b**, етил индол-5-карбоксилат **229c**, 5-метокси **229d** и 4-метокси **229e** индоли. Последващата кондензация до дихидропиридазионов пръстен **231** с хидразин и по-нататъшно окисляване до **232** позволи получаването на двете структури, съответно дихидро-(**231**) и пиридазинон (**232**) (Схема 27).

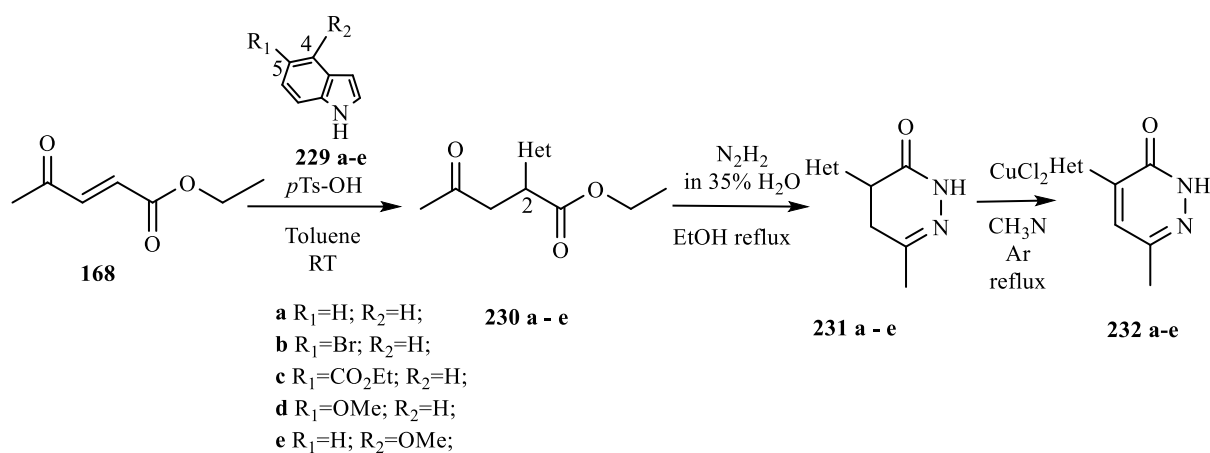
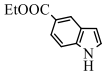


Схема 27 Синтез на (дихидро)пиридазинонови производни **231** и **232**

Таблица 7. Получен добив на целевите 2-заместени (дихидро)пиридазинонови производни **26** и **27**

№	Хетероцикъл	Добив, %	Добив, %	Добив, %
1	a 	42	89	28
2.	б 	41	90	34
3.	в 	48	72	34
4.	d 	44	54	31
5.	e 	73	51	traces

Всички съединения бяха успешно синтезирани и изолирани (Таблица 7), с изключение на **27e**, което беше получено в traces. По този начин това позволи по-нататъшна оценка на новите съединения **26d**, **e** и **27d** за инхибиторна активност vs PDE4B.

3.2 N-алкилиране към пиридазиноновата структура

Както бе посочено, бе предвидено добавяне на разделител на Н-атома на индола. N-алкилирането на индол е стратегическа модификация в медицинската химия, която може да доведе до значителни подобрения в биологичните, фармакокинетичните и физикохимичните свойства на бъдещи терапевтични лекарства. Тази модификация бе планирана преди синтезирането на пиридазиноновата структура, така че реакцията от типа на Михаел трябваше да се проведе със заместения индол. Всички опити бяха първо проведени върху индол **229a**, с намерението да се приложат същите реакционни условия към **229d**, ако се окаже успешно.

Бяха направени няколко опита за N-алкилиране на индол **229a**, като бяха използвани условията, описани в литературата [252,253], както и бяха предвидени промени в реакционния разтворител (Схема 28). Бяха проучени различни разтворители и реакционни условия, за да се оптимизира процеса. Един обещаващ подход включваше използването на калиев карбонат в 1-н-бутил-3-метилимидазолиум тетрафлуороборат ([bmim][BF₄]) като устойчива реакционна среда, заедно с ацетонитрил. Този метод обаче се оказа неуспешен (Таблица 15 , ред 4)[253].

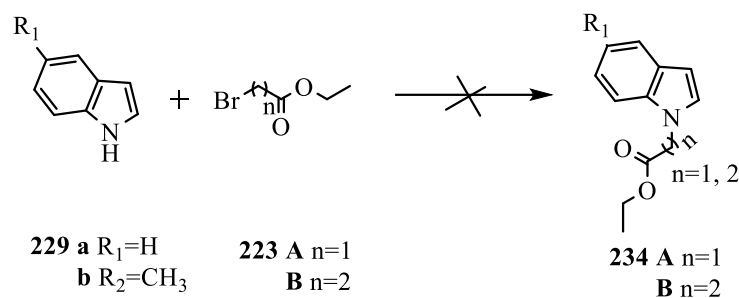


Схема 28. Реакционна стратегия за добавяне на разделител към индолната група

Таблица 16. Различни реакционни условия за N-алкилиране на пиридазиноновата структура **232d**

№	Основа	Време, ч	Добив, %	Преобразуване, %
1	K ₂ CO ₃	16	39	75
2	K ₂ CO ₃	32	22	85
3	CsCO ₃	1.5	31	80
4	CsCO ₃	4	40	93

Предвид липсата на успех с тези подходи, стратегията за N-алкилиране на индолната група беше изоставена. Тези резултати доведоха до промяна на фокуса към проучване на други фармакомодификации, по-конкретно добавяне на Н-атом от пиридазиноновата структура.

3.3 Добавяне на разделител към пиридазиноновата структура **232d**

Тази стратегия имаше за цел да се приложи като допълнителна стъпка след получаването на пиридазинон **232d** с намерението да се улесни свързването му с пептид, както е описано в раздела за стратегията. Този подход имаше за цел да въведе функционална група върху пиридазиноновата структура, която да действа като свързващо звено за прикрепване на пептида.

Поради ниския добив на пиридазинона **27d**, алкилиращата реакция беше проведена в малък мащаб (2.78 mmol). Етил 4-бромобутаноат **28** беше избран като свързващо звено с достатъчно дълга въглеродна верига и етил-естерна група, за да улесни потенциално последващо свързване с пептид (Схема 9). Бяха проведени няколко реакции, като се използваха 2 еквивалента CsCO₃ или K₂CO₃ като основа и MeCN като разтворител. Реакциите бяха проведени при обратно кипене и наблюдавани чрез ТСХ

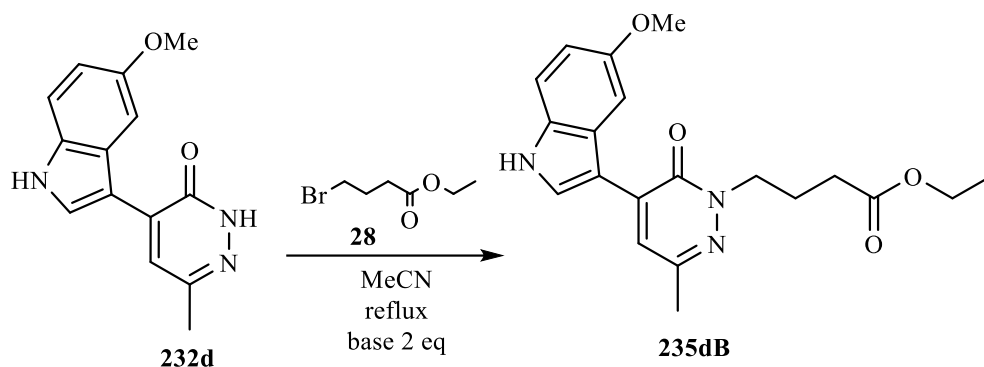


Схема 9. Синтетична схема за получаване на **29**

Тъй като първият опит за N-алкилиране на **233B** беше успешен, същите условия (Таблица 16, ред 1) бяха използвани за **232a**. Такива фармакомодуляции върху пиридазиноновата структура биха позволили свързване с пептидна верига и по-нататъшна оценка на биологичната цел на този докторски проект.

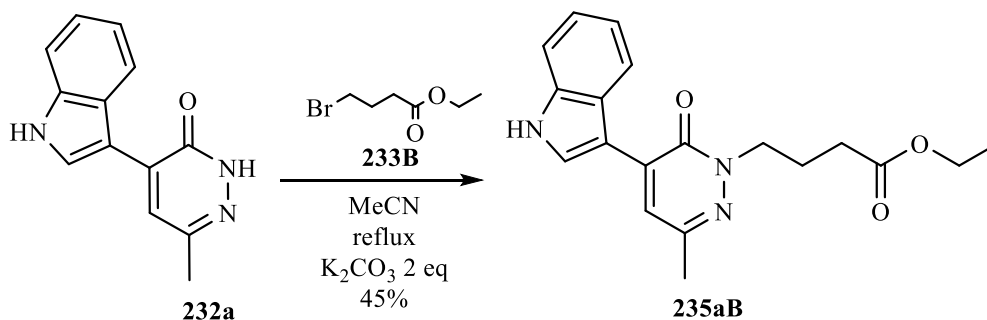


Схема 30. Опит за N-алкилиране на пиридазинон **232a**

В този опит пиридазинон **232a** показва по-добра реактивност към свързващото звено **233B**, което доведе до по-висок изолиран краен продукт (45 % за **235aB** и 39 % за **235dB**, Схема30).

3.4 Друга точка за пептидно свързване

Алтернативна стратегия за свързване на пептидната група с пиридазиноновата структура включва фармакомодификация в индолната част на молекулата. След синтеза на пиридазинон **27c**, естерната група се хидролизира при основни условия, за да се получи съответната карбоксилна киселина, която осигурява точка за закрепване за последваща пептидна конюгация (Схема 31). Бяха проведени няколко реакции, за да се получат достатъчни количества **27c** преди хидролизата.

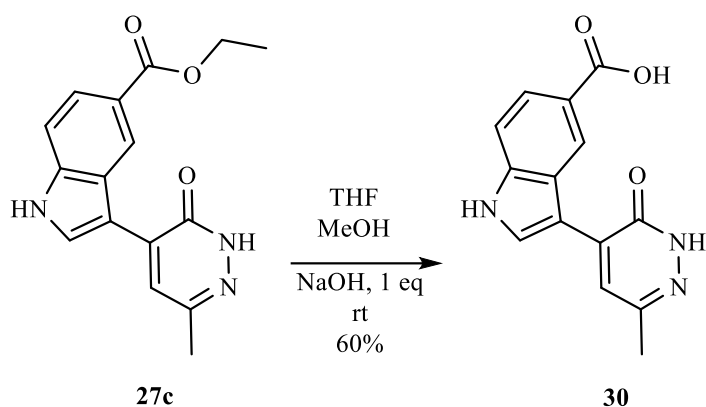
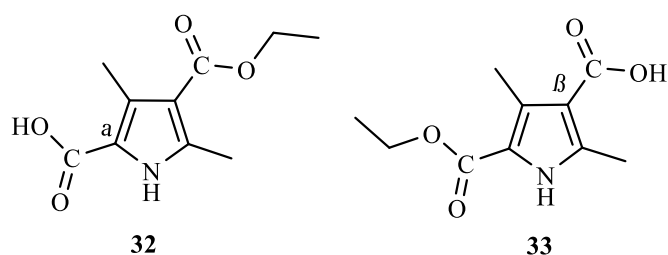


Схема 10. Хидролиза на естерната група на съединение 30

4. Пиролов фармакофор

С цел разширяване на потенциална на FELL пептидите беше предвидено свързване към пиролов хетероцикъл като част от задачите на настоящия дисертационен труд. Такива конюгации представляват интерес, като се има предвид многобройните доказателства, че пироловите производни притежават висока антиналгетична активност. Освен това, беше интересно да се проучи как такава пиролна конюгация може да повлияе на пептидната активност, стабилността и рецепторните взаимодействия. Тази част от работата послужи като доказване на концепцията, разширявайки областта на избраните FELL тетрапептиди отвъд първоначалния им дизайн като противовъзпалителни средства.

Това проучвателно изследване стана възможно благодарение на приноса на доц. Станислава Владимирова, доктор, от катедрата по „Органичен синтез“ към ХТМУ– София, която любезно синтезира и предостави два пиролни деривата за нашата цел 32 и 33 (Фигура 7).

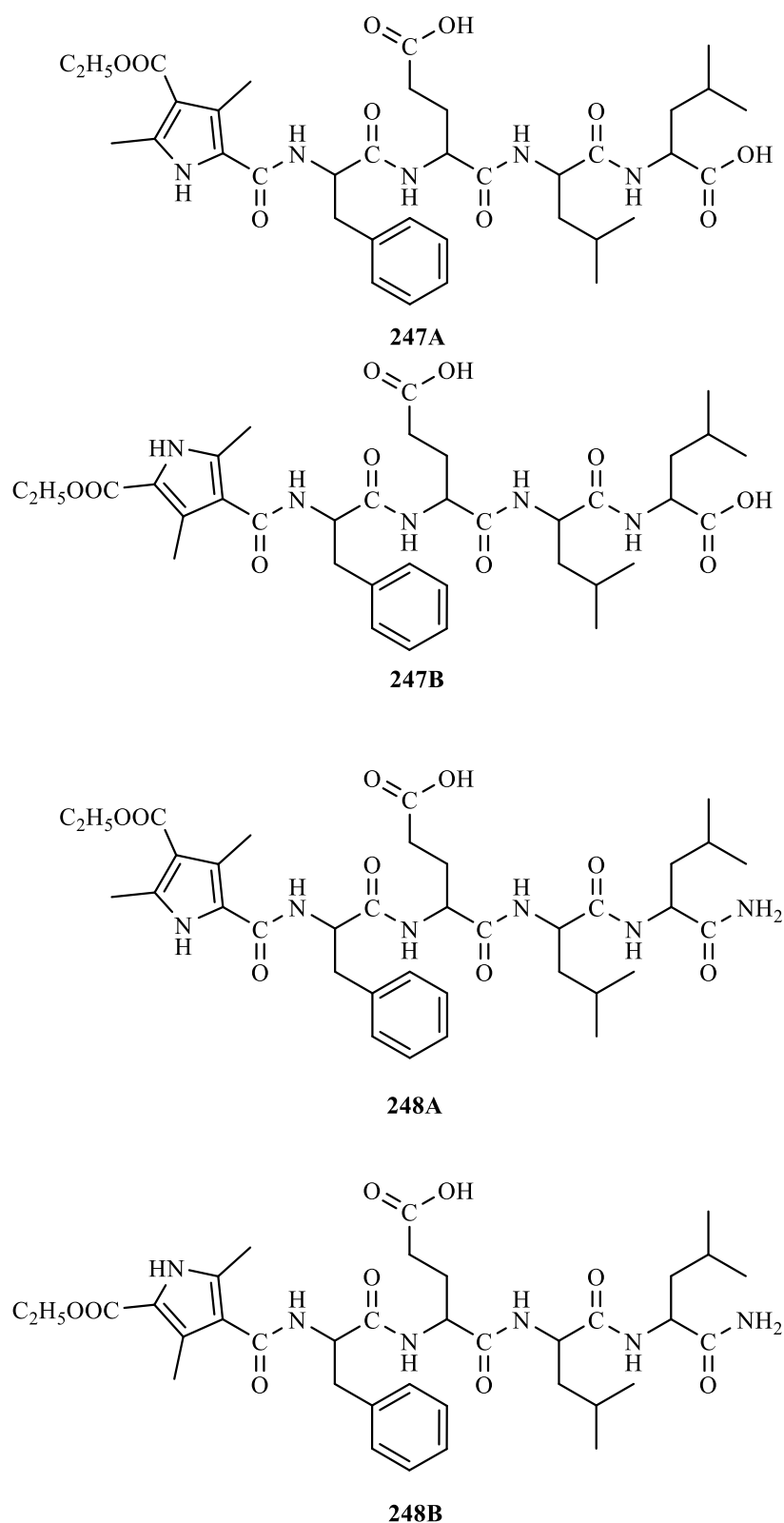


Фигура 7. Пиролови аналози, предоставени от доц. д-р Станислава Владимирова

За целта са избрани майчиния пептида, FELL-OH (188, **BB11**) и неговия C-краен амиден аналог FELL-NH₂ (179, **BB1**). Тези пептиди бяха особено подходящи като моделни системи, тъй като вече бяха демонстрирали аналгетична активност, потвърдена *in vivo* чрез тест за натиск върху лапата. Установените им биологични профили ни позволиха да интерпретираме по-добре модификациите, резултат от пиролното конюгиране, и да наблюдаваме дали

структурните разлики между свободната киселина и амидирания аналог влияят на резултата [260]. По този начин бяха получени четири нови аналога чрез конюгиране на пиролни фрагменти **245** и **246** с избраните тетрапептиди. Получените структури се различаваха по мястото на конюгация, което се намираше или в α -съединение **247A** и **248A**, или в β -позицията **247A** и **248B** на пироловия пръстен, в зависимост от местоположението на COOH групата (Фигура 97). Самите пептиди бяха синтезирани чрез SPPS, използвайки стратегията Fmoc/tBu, след което всеки пиролов дериват беше свързан с пептидната група.

Синтезирани са четири нови аналога чрез конюгиране на пироловите фрагменти **32** и **33** с избраните тетрапептиди. Получените структури се различават по мястото на конюгиране – или на α -позицията (съединения **34A** и **35A**), или на β -позицията (**34B** и **35B**) на пироловия пръстен, в зависимост от разположението на COOH групата. Самите пептиди бяха синтезирани чрез SPPS, използвайки стратегията Fmoc/tBu, след което всеки пиролов дериват беше свързан с пептидния фрагмент.



Фигура 97. Структура на биоконюгатите **247** и **248** между пиролов мотив и FELL пептиди

Аналгетичната активност на новосинтезираните биоконюгати **247–248**, както и на **245** и **246**, е била изследвана чрез теста за натиск върху лапа (тест на Randall–Selitto) при мъжки плъхове от щам *Wistar* [261]. Направените *in-vivo* проучванията показват, че

новосинтезираните хибридни конюгати **247** и **248** проявяват измерим аналгетичен ефект. Интересно е, че тяхната активност остава относително стабилна във времето, макар в повечето случаи да е по-ниска от тази на изходните съединения — α - и β -пироловите киселини, които показват по-краткотраен, но по-изразен ефект. Също така, α -киселината **245** е проявява аналгетична активност в интервала 10–20 минути, докато β -киселината **246** е била активна между 20–30 минути. Двете съединения имат обща продължителност на действие около 10 минути. За разлика от тях, биоконюгатите запазват ефекта си по-постоянно, макар и с по-ниска интензивност в сравнение със свободните киселини. Тестовите за хидролитична стабилност допълнително показват, че всички конюгати са стабилни при приложените условия, с изключение на двата пирол **245** и **246** при pH 2.0, както и **246** заедно с пептида **248B** при pH 7.4, където е наблюдавана частична деградация.

IV. Биологични изследвания

1. PDE4B *in-vivo* изследване

Активността на PDE4 беше наблюдавана с помощта на тестов комплект за PDE4 (Enzo), адаптиран към човешката рекомбинантна фосфодиестеразна изоформа PDE4, експресирана в *E. coli*. PDE4 произхожда от говежди мозък и се предлага в тестов комплект за PDE от Enzo. Основата на теста е разграждането на cAMP от цикличната нуклеотидна фосфодиестераза. Резултатите бяха изразени като процент инхибиране на PDE4B при концентрация от 50 mM.

Таблица 17. Процентно сравнение на резултатите от *in-vivo* тестовите vs PDE4B

№	Код за скрининг	Пептид	% инхибиране при 5 mM
1	BB1	FELL-NH ₂	49
2	BB2	FEnLnL-NH ₂	Без инхибиране
3	BB3	FEVV-NH ₂	26
4	BB4	FEII-NH ₂	50
5	BB5	fELLL-NH ₂	67
6	BB5A	fELL-NH ₂	62
7	BB6	fEnLnL-NH ₂	73
8	BB7	fEII-NH ₂	46
9	BB8	fEVV-NH ₂	43
10	BB9	YELL-NH ₂	54
11	BB10`	yELL-NH ₂	64
12	BB11	FELL-OH	58

Въз основа на проведените тестове, няколко модифицирани пептида показаха по-силна инхибиторна активност vs PDE4B в сравнение с родителския пептид **BB11** (FELL-OH). Този пептид показва по-висока инхибиторна активност vs PDE4B от своите амидирани аналози **BB1** (FELL-NH₂) (58% vs 49%). По този начин изглежда, че С-крайното амидиране може да има

роля в инхибирането на ензима, но не е единственият определящ фактор за активността. Пептидите, съдържащи D-Phe изомер на първа позиция, показаха последователно по-висока инхибиция от техните L-Phe аналози.

Увеличаването на дължината на аминокиселинната последователност **BB5** (fELLL-NH₂ , 67%) показва малко по-висока активност от своя по-къс аналог **BB5A** (fELL-NH₂ , 62%). И двата пептида показаха резултати, които са 2 пъти по-високи от тези на L-Phe аналога (**BB1**, 49%), което доказва ролята на D-изомера в инхибиращата активност. Освен това, сравнителният резултат на BB5 и BB5` показва, че увеличената пептидна последователност с още един Leu остатък допринася за леко повишена афинитет на свързване и по-висока инхибиция.

Сред всички тествани съединения, **BB6** (fEnLnL-NH₂) показва най-висока активност (73%), което показва, че заместването на естествените Leu остатъци с norLeu на 3^{та} и 4^{та} позиция е особено благоприятно. Резултатите също така показват, че Phe остатъкът може да участва директно в свързването с ензима PDE4B.

Въпреки че аналозите с по-късата хидрофобна аминокиселина Val запазват известна активност — като **BB3** (FEVV-NH₂ , 26%) и **BB8** (fEVV-NH₂ , 43%) — тяхното понижено инхибиране в сравнение с аналозите на Leu или norLeu показва, че по-дългите хидрофобни странични вериги в позиции 3 и 4 са важни за оптимална активност.

В заключение, включването на D-Phe в позиция 1 и по-дълги хидрофобни остатъци (norLeu вместо Leu) в позиции 3 и 4 значително подобрява инхибиторната активност vs PDE4B, като най-добрият резултат се наблюдава при **BB6**.

2. Противовъзпалителна активност *чрез* тест за карагенан-индуциран оток на лапата

Тестът беше проведен с 6-седмични мъжки плъхове от породата Wistar, с тегло приблизително 150-200 г. Животните бяха разпределени на случаен принцип в 25 паралелни експериментални групи, като всяка група се състоеше от 8 плъха. Плъховете бяха настанени при стандартни лабораторни условия, включително среда с контролирана температура, 12-часов цикъл на светлина/тъмнина и неограничен достъп до храна и вода. Статистическият анализ беше проведен с помощта на софтуера IBM SPSS 26.0.

Сред тестваните съединения пептид **BB1** демонстрира значително намаляване на отока на лапите във всички времеви точки, което предполага широкоспектърно противовъзпалително действие, вероятно свързано с инхибиране на ензима COX и модулиране на медиатори в ранна фаза, като брадикинин. **BB3** и **BB4** (FEVV и FEII) са оказали значителен ефект само на 3-тия час, което сочи специфичност към простагландин-медираното възпаление,

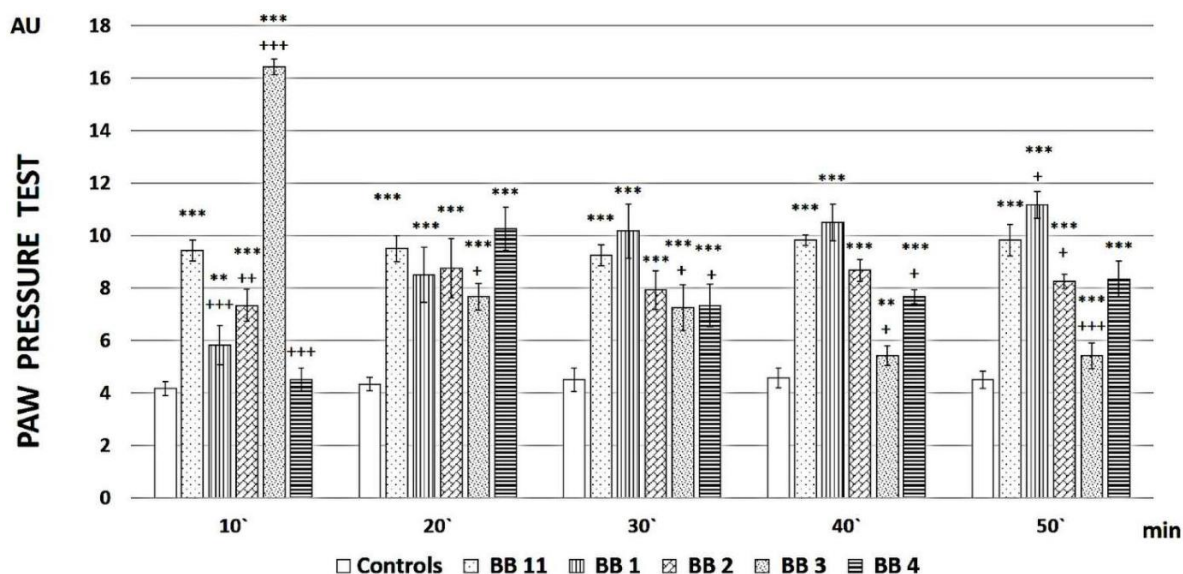
вероятно чрез селективно инхибиране на COX-2 или потискане на ензимите, синтезиращи простагландини. Родителният пептид **BB11** проявява значителен ефект на 3-тия час, което показва активност vs простагландин-медираното възпаление, вероятно чрез селективно инхибиране на COX-2 или модулиране на активността на простагландин-рецепторите.

V. Обобщение на публикуваните статии

1. Замяна на различни хидрофобни аминокиселини на позиции 3 и 4

ПОЗИЦИЯ

Аналгетичната активност на майчиния тетрапептид FELL Phe-Glu-Leu-Leu, както и на неговите аналози, е изследвана *in vivo* чрез тест за налягане на лапа, за да се проучи потенциалът им като нови средства за облекчаване на болката. На следващите страници те ще бъдат разделени на групи от 4 или 5, в зависимост от мястото на заместване в родителския пептид FELL-OH (**BB11**) (Фигура 98). Общата последователност на новите аналози е Phe-Glu-X³-X⁴-Z, където X=Leu, Nle, Ile или Val и Z=-OH или -NH₂.

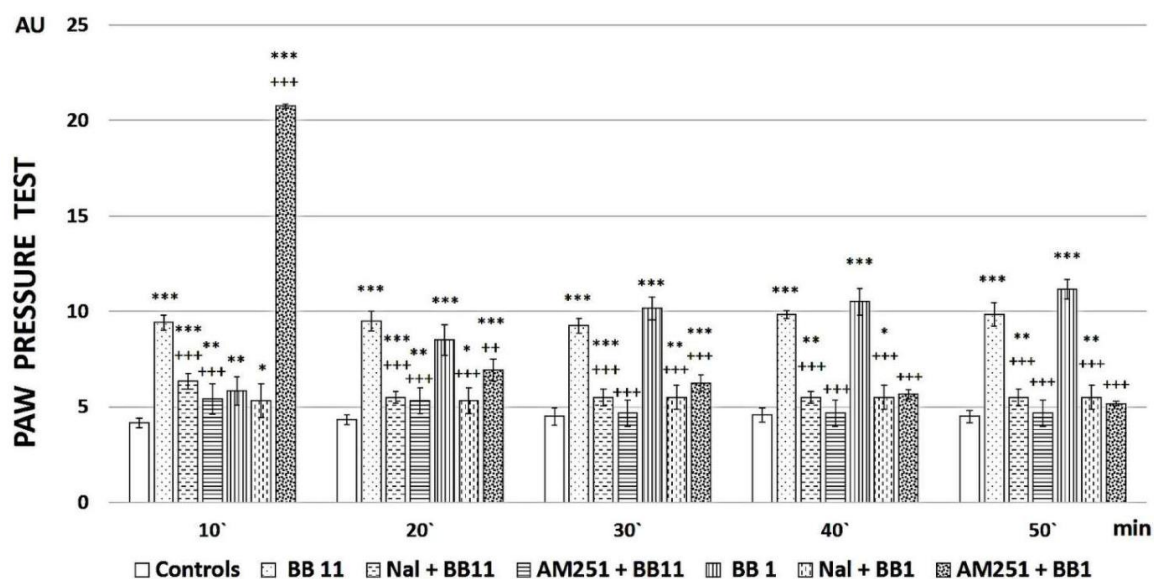


Фигура 98. PPT на пептидните аналози **BB1-4** и **11**. Измерванията са извършвани на всеки 10 минути, започвайки от 10-тата минута след прилагането на пептида до 50-тата минута. Резултатите са представени в произволни единици (AU) като средни стойности $\pm$ S.E.M. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ vs контролите; +++ $p < 0,001$, ++ $p < 0,01$, + $p < 0,05$ vs **BB11**.

Въз основа на резултатите от теста, **BB1** (FELL-NH₂) показва постепенно нарастваща аналгетична активност с течение на времето, която в края на отчетния период статистически надеждно ($F = 5,38217$, $p = 0,042776$) надвиши тази на изходното съединение **BB1**. **BB3** (FEVV-NH₂) имаше най-висока, но краткотрайна аналгетична активност, която на 10-тата минута надвиши тази на **BB11** ($F = 92,35602$, $p < 0,00001$), след което бързо намаля с

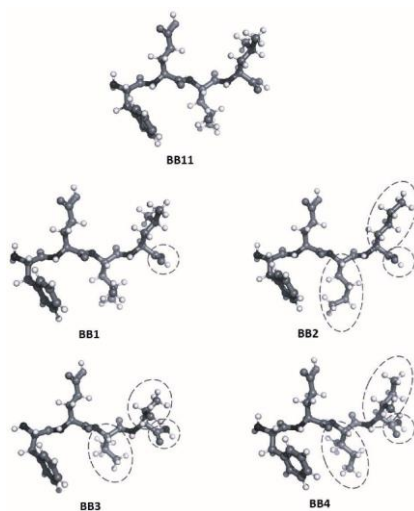
стойности, достигащи почти контролните на 30-тата и 40-тата минута. **BB2** (FEnLnL-NH₂) и **BB4** (FEII-NH₂) причиниха колебания в аналгезията, които не достигнаха стойностите на изходния съединение.

Получените резултати показват, че **BB1** е най-обещаващото новосинтезирано съединение, така че неговата аналгетична активност беше допълнително оценена (както и тази на **BB11**) след предварителна обработка с налоксон или AM251, за да се установи участието съответно на опиоидни или каннабиноидни рецептори. И двете вещества показаха ниска аналгетична активност след двата вида предварителна обработка, което показва, че и двата вида рецептори участват в аналгетичните ефекти (Фигура 99).



Фигура 99. PPT на новосинтезирани пептидни аналози след предварителна обработка с налоксон (Nal) или AM251. Измерванията са извършвани на всеки 10 минути, започвайки от 10-тата минута след прилагането на пептида до 50-тата минута. Резултатите са представени в произволни единици (AU) като средни стойности $\pm$ S.E.M. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ vs контролите; Nal+BB11 и AM251+BB11 са сравнени с BB11 (188) +++ $p < 0,001$; Nal+BB1 и AM251+BB1 са сравнени с BB1 +++ $p < 0,001$, ++ $p < 0,01$.

3D структурите на аналозите на FELL са показани на Фигура100 . Резултатите, показани в Таблица 19 представят родителския пептид **BB11** като най-липофилния ($\log p = 1,54$). Следва група от три аналога — **BB1**, **BB2** и **BB4**— всички запазват липофилната си природа, макар и в по-малка степен (стойности на $\log p$ между 0,67, 0,80 и 0,82 за **BB1**, **BB2** и **BB4** съответно). На последно място по амфифилна $\log p$ (близка до 0, което означава, че се разтваря еднакво във вода и н-октанол) е съединението **BB3**. От тестваните молекули **BB11** (изходното съединение) би имало най-добро разпределение в биологичните тъкани.



Фигура 100. Структури на естествения пептид **BB11** и неговите аналози. Разликите с изходната структура (**BB11**) са обградени с кръгче.

Таблица 10. Logp стойности, изчислени за FELL аналози

Код	BB1	BB2	BB3	BB4	BB11
Logp	0,67	0,80	0,02	0,82	1,54

В тази оценка аминокиселинната последователност е източникът на разликата в logp стойностите:

- Val е най-компактният и хидрофобен остатък,
- Nle и Ile имат по-дълги вериги с подобни характеристики, а
- Leu има дълга верига с разклонен край, което му дава най-голяма повърхност за хидрофобни взаимодействия

Замяната на хидроксилната група на С-края с аминогрупа осигурява два пъти повече водородни атоми за взаимодействия с водни молекули, което прави аналога **BB1** по-малко липофилен. По отношение на активността, най-хидрофилното съединение, **BB3**, показва най-висока начална активност, , която след това бързо намалява, тъй като пептидът може да бъде хидролизиран или отстранен от рецепторите. Съединенията **BB2 (180)** и **BB4**, с почти идентични logp стойности от 0,80 и 0,82, съответно, показват пик на 20 минути, преди да започнат да намаляват. Намаляването на липофилността на **BB1** в сравнение с **BB11** вероятно е затруднило достигането на пептида до целевите рецептори, но след като се установи, неговият ефект изглежда се увеличава с течение на времето.

2. Заместване на остатъка Phe с Tyr на първа позиция в последователността FELL

Модификациите представляват заместване при N-крайния L-Phe с L- или D-Tyr **BB10**, (tELL-OH) и **BB16**, (tELL-NH₂), и промяна на C-крайната карбоксилна група (-COOH) в амид (-CONH₂) **BB9**, (TELL- NH₂) и **BB15**, (TELL-OH).

Противовъзпалителната активност беше оценена чрез тест за оток на лапата, предизвикан от карагеноан. Диклофенак беше използван като контрола. Сред пептидите само изходното съединение **BB11** показва значителен ефект, като намали отока на 3-тия час ($43,54 \pm 6,91\%$; $p = 0,047$), но не и на 2-рия или 4-тия час. Другите аналози (**BB9**, **BB10**, **BB15**, **BB16**) показаха слаб или никакъв ефект; **BB10** дори прояви късна провъзпалителна тенденция. Като цяло, противовъзпалителната активност остана ограничена, като **BB11** показва само преходно подобрене в сравнение със силния и постоянен ефект на диклофенака.

Таблица 20. Сравнение на процента на оток в теста за оток на лапата, предизвикан от карагеноан

Група	Час	Средна стойност $\pm$ SEM	p
Контрола	2	$82,40 \pm 4,46$	-
	3	$80,39 \pm 3,40$	
	4	$72,61 \pm 3,95$	
Диклофенак	2	$13,90 \pm 2,33$	<0,001*
	3	$15,19 \pm 2,49$	<0,001*
	4	$13,04 \pm 3,46$	<0,001*
BB11	2	$51,95 \pm 6,25$	0,115
	3	$43,54 \pm 6,91$	0,047
	4	$47,78 \pm 5,41$	0,165
BB9	2	$55,63 \pm 13,61$	0,927
	3	$55,01 \pm 10,32$	0,753
	4	$51,64 \pm 11,73$	0,965
BB10	2	$61,45 \pm 13,51$	0,990
	3	$115,33 \pm 14,46$	0,744
	4	$120,14 \pm 10,70$	0
BB15	2	$90,48 \pm 11,93$	1,000
	3	$70,15 \pm 8,34$	1,000
	4	$65,50 \pm 12,41$	1,000
BB16	2	$106,21 \pm 14,69$	0,983
	3	$85,39 \pm 11,64$	1,000
	4	$86,84 \pm 10,21$	0,997

В контраст с това, не е наблюдавано подобрене в противовъзпалителната активност. Изходният пептид **BB1** е запазил умерено, краткотрайно противовъзпалително действие, но

новите аналози не са подобрили тази свойство и в някои случаи са произвели непостоянни ефекти. Диклофенакът е останал далеч по-ефективен в потискането на възпалението.

Аналгетичните свойства на всички 4 новосинтезирани аналога *в сравнение с* родителското съединение бяха оценени посредством теста Paw Pressure Thresholds (PPT). Като се вземат предвид проведените тестове, може да се направи следното обобщение:

- По отношение на зависимостта на аналгезията от опиоидните рецептори, CONH₂ - съдържащ L-Туг аналог **BB9** показва пълна зависимост от опиоидните рецептори още в 10-тата минута, докато неговият „напълно противоположен аналог“ **BB16** беше засегнат най-късно – след 20-тата минута. Останалите два аналога бяха засегнати след 10-тата минута.
- По отношение на зависимостта от каннабиноидните рецептори, **BB9** беше засегнат най-късно – след 20-ата минута, докато другият L-Туг аналог, свободната киселина в С-края **BB15**, беше засегнат най-рано и най-категорично (още в 10-ата минута), като дори показва тенденция към хипералгезия.

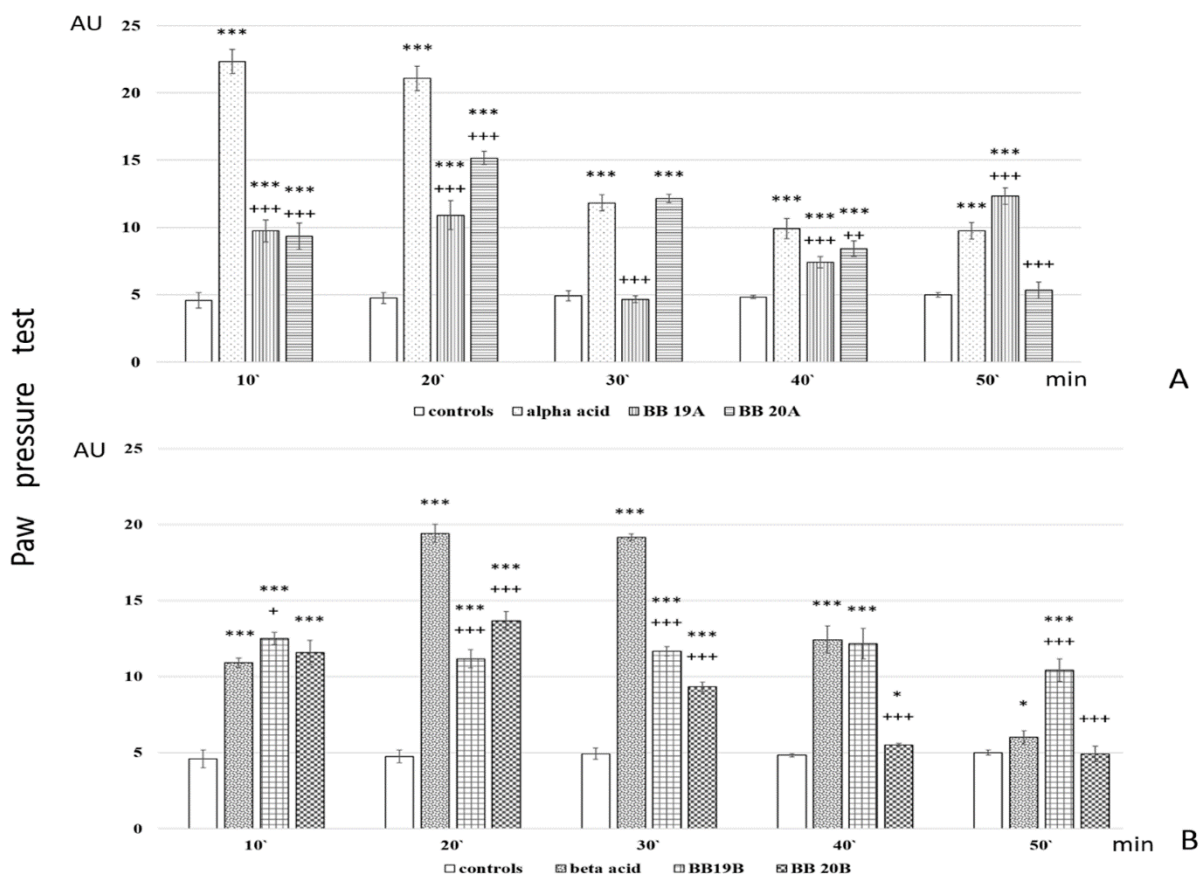
В механизмите на аналгезия на изследваните молекули вероятно участват различни медиаторни системи, които на различни етапи подпомагат развитието на антиноцицепцията, като по този начин допринасят за нейното поддържане/увеличаване чрез синергичния си ефект. Израз на това са наблюдаваните U-образни криви след **BB9 BB15**, както и постепенно нарастващата аналгезия след **BB16**.

Всички тези пептиди са тествани за хидролитична стабилност и всички се оказаха стабилни в продължение на 24 часа при различни рН (2, 7.4 и 9).

3. Конюгирана структура между пиролни фрагменти и FELL тетрапептид

Както бе споменато по-горе, 4 конюгирани структури Фигура 8 бяха синтезирани между пиролови фрагменти **245** и **246** (Фигура 7) и FELL тетрапептиди.

In vivo тестове, използващи модела на Randall–Selitto за налягане на лапите при плъхове, показаха, че всички конюгати проявяват аналгетична активност. Свободните пиролови киселини **247** и **248** (**A** и **B**) проявяват краткотраен ефект, като активността се наблюдава между 10–20 минути за киселина **A** и 20-30 минути за киселина **B**. Конюгатите като цяло проявяват по-ниска аналгетична сила от изходните киселини, но ефектът им е по-продължителен. Например, **247A** показва двуфазна реакция, като по-късната фаза надмина киселина **A**, докато **247B** поддържаше стабилно ниво на активност във времето. **248A** достигна до 87 % от активността на киселина **A**, а **248B** първоначално отразяваше киселина **B**, но след това намаля.



Фигура 103. Аналгетична активност на (А) пиролова киселина А и нейните производни 247А и 247А и В пиролова киселина В и нейните производни 248А и 248В, оценена чрез тест за налягане на лапа. Праговете на налягане на лапата са представени в произволни единици (AU) като средни стойности $\pm$ S.E.M. *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ vs контролите; (+++) $p < 0,001$, (++) $p < 0,01$, (+) $p < 0,05$ vs киселина А (А) или киселина В (В), съответно.

Механистични експерименти с рецепторни антагонисти разкриха, че както опиоидните, така и каннабиноидните рецептори допринасят за аналгетичните ефекти на конюгатите, особено за 248А и 248В. Интересно е, че блокирането понякога повишава активността в 247А и 247, което предполага, че други пътища, като участието на NOP рецептора, могат да играят роля.

Тестовите за хидролитична стабилност показаха още, че конюгатите са по-стабилни от свободните киселини при симулирани стомашни, кръвни и чревни условия. Изключенията бяха киселини 245 и 246(А и В), които се разграждаха при рН 2,0, и киселина В заедно с 248В, които бяха нестабилни при рН 7,4.

VI. Изводи

В резултат на разработката на настоящия дисертационен труд, могат да се направят следните изводи:

1. Осъществен е дизайн, синтез и охарактеризиране на 13 аналога на Phe-Glu-X₃-X₄, включително майчиния пептид Phe-Glu-Leu-Leu. Различни хидрофобни аминокиселинни остатъци бяха въведени в позиции 3 и 4. Сред тези пептиди девет притежаваха амидиран C-край, докато четири са като свободни киселини. Допълнително, един амидиран пептид, съдържащ допълнителен Leu остатък в C-края, беше синтезиран, за да се проучи ролята на увеличените хидрофобни остатъци върху активността.
2. Осъществен е дизайн, синтез и охарактеризиране на нови аналози на Phe-Glu-Leu-Leu, в които остатъкът Phe беше заменен с L- или D-Tyr. Тези аналози бяха използвани за изследване на влиянието на хидроксилната група (-OH) при първия аминокиселинен остатък (Phe vs Tyr) върху биологичната активност.
3. Синтезирани са природния пептид (Phe-Glu-Leu-Leu-OH) и неговият C-амидиран аналог като Phe в първа позиция е заменен с 4-флуорофенилаланинов (Phe(4-F)) остатък.
4. Изследвана е хидролитичната стабилност на новосинтезираните FELL аналози в продължение на 72 часа при три рН стойности (2.0, 7.4 и 9.0) имитиращи условията в човешкия организъм и е установено, че всички новосинтезирани пептиди са стабилни при тестваните условия.
5. *In vitro* биологични тестове на 12 Phe-Glu-X₃-X₄ пептида при концентрация 5 mM vs PDE4B показва, че fELL-NH₂ е най-активният аналог.
6. Всички пептиди са тествани за противовъзпалителна активност, като се използва тестът за карагенан-индуциран оток на лапата. Phe-Glu-Leu-Leu-NH₂ показва значително намаляване на отока на лапата във всички времеви точки, докато Phe-Glu-Leu-Leu-OH прояви силен ефект на 3-тия час. Phe-Glu-Val-Val-NH₂ и Phe-Glu-Ile-Ile-NH₂ показаха значителна активност само на 3-тия час.
7. Бяха проучени няколко синтетични routea, за да се определи най-ефективната стратегия за получаване на хлориран в 4-та позиция S-неоокислен ITZ. Благодарение на проведените реакция, хлорираният в 4-та позиция ITZ беше изолиран в достатъчно количество, което позволи експериментиране с последващите етапи на окисление и встъпване в присъединителни реакции. Чрез вариране на условията беше установено, че добавянето на SiO₂ в реакционната смес влияе върху окисляването на 4-S-моноксидиран ITZ.
8. Серия от S-окислителни реакции бяха проведени върху ITZ различни производни, за да се получат съответните им S-моноксидирани и S-диоксидирани аналози.

9. Първоначални опити за присъединяване по Suzuki–Miyaura бяха проведени с използване на 5-SO₂ ITZ като моделна реакция. Сред тестваните условия бяха открити две различни условия, които позволяват изолирането на крайния продукт 5-SO₂ ITZ, притежаващ –COOH функционална група, с много добри добиви (74% и 79%).
10. Синтезирани и характеризирани са пет нови аналога в серията 5-S-моноксидирани ITZ. Два от тях притежават –COOH групи в *p*- или *m*-позициите на фениловия пръстен, един съдържа *p*-бензамидна група, а друг имаше –COOH група в *p*-позицията на тиафеновия пръстен, както и един с фенилбензоатна група.
11. В серията 4-S-моноксидирани ITZ бяха синтезирани три производни чрез присъединителна реакция по Suzuki–Miyaura. Използвани са 4- и 3-карбоксифенилни боронати, както и *p*-карбоксифенилни реагенти, за да се изследва връзката структура-активност
12. Две нови производни от S-диоксидизираната ITZ серия са успешно синтезирани и изолирани. Съответните Suzuki–Miyaura реакции бяха извършени с използване на 2- и 3-карбоксифенил боронати.
13. Пет нови 2-заместени пиридазинови производни са синтезирани, използвайки различни индолни аналози. Сред тях бяха въведени два нови индола за получаване на съответните крайни пиридазинови продукти – етил индол-5-карбоксилат и 4-метокси индоли.
14. Успешно е включен свързващ сегмент, съдържащ естерна група към най-активните пиридазинови производни **27a** и **d**, за да се позволи по-нататъшна хидролиза и последваща конюгация с пептиден фрагмент.
15. Проведена е хидролиза на етил 3-(6-метил-3-оксо-2,3-дихидропиридазин-4-ил)-1H-индол-5-карбоксилат (съединение **27c**), за да се получи съответното карбоксилно производно.
16. Бяха синтезирани 4 нови биоконюгати на майчиният пептид Phe-Glu-Leu-Leu-OH и неговия C-амидиран аналог с α- или β-пиролови производни. *In vivo* анализ, използващ Paw pressure test, показва добри аналгетични ефекти на новите биоконюгати, макар и по-слаби от съответните свободни пиролови съединения. Изследванията за хидролитична стабилност показаха, че получените биоконюгати са стабилни при всички тествани условия, докато свободните пиролови производни се разграждат при pH 2,0.

VII. Приноси

1. Синтезирани и охарактеризирани са 19 нови аналога с обща формула Phe-Glu-X₃-X₄ и след направени биологични тестове за опиоидна и противовъзпалителна активност са изведени зависимости относно връзката структура - активност
2. Открити са нови реакционни условия за получаване на хлориран в 4-та позиция S-неокислен ITZ, който е прекурсор за синтез на ITZ, притежаващ киселинна функция
3. Подобрени са реакционните условия на присъединителната реакция по Suzuki–Miyaura за получаване на 5-SO₂ ITZ с -COOH функционалната група, което улеснява последващото им приложение при синтеза на серии 4- и 5-SO ITZ.
4. Синтезирани и охарактеризирани чрез ¹H NMR, C¹³ NMR, MS, IR и точка на топене са 11 нови ITZ аналога.
5. Синтезирани и охарактеризирани са 9 нови (дихидро)пиридазинонови производни, носещи индолни фрагменти в позиция 2
6. Синтезирани и охарактеризирани са 4 нови биоконюгати с пиролови производни.

СПИСЪК НА НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, ВЪРХУ РАЗРАБОТКАТА НА НАСТОЯЩАТА ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЯ

- Borisova B, Nocheva H, Gérard S, Laronze-Cochard M, Dobrev S, Angelova S, Petrin S, Danalev D. Synthesis, In Silico Logp Study, and In Vitro Analgesic Activity of Analogs of Tetrapeptide FELL. *Pharmaceuticals* , 16 (8), **2023**, 1183. doi: 10.3390/ph16081183 (Q1, IF 4.8/5)
- Borisova B, Vladimirova S, Nocheva H, Laronze-Cochard M, Gérard S, Petrin S, Danalev D. Synthesis, Hydrolytic Stability and In Vivo Biological Study of Bioconjugates of the Tetrapeptides FELL Containing Pyrrole Moiety, *Biomedicines*, 9 (11), **2023**, 3265. doi: 10.3390/biomedicines11123265 (Q1, IF 3.9/5.71)
- Boryana Borisova, Hristina Nocheva, Hristina Zlatanova-Tenisheva, Marie Laronze-Cochard, Stéphane Gérard, Dancho Danalev, Synthesis and biological study of novel FELL analogs containing L- or D-tyr instead of L-phe in the N-terminus, *Current Research in Biotechnology*, 10, **2025**, 100332 (Q2, IF 4.72/6.66)
- Boryana Borisova, Marie Laronze-Cochard, Stéphane Gérard, Pyridazinone – pyridazinone as versatile scaffold in drug discovery - view on current development, *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, **2025**, (Q3, IF 1.4/13.33)

УЧАСТИЕ В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ ПО ТЕМА НА ДОКТОРСКАТА ДИСЕРТАЦИЯ

Постерни презентации:

- Б. Борисова, М. Ларонз-Кошар, С. Жерар, Д. Даналев, Фосфодиестерази – ключови ензими в много патофизиологични процеси – поглед върху настоящото развитие, XVIII Постерна сесия за млади учени, докторанти и студенти, май 2021 г., София (България)
- Б. Борисова, М. Ларонз-Кошар, Ст. Жерар, Д. Даналев, Проектиране и синтез на къси пептиди с потенциална противовъзпалителна активност, НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ „ДНИ НА КЛИМЕНТ 2021“, 05 ноември 2021 г., София (България)
- Б. Борисова, М. Ларонз-Кошар, Ст. Жерар, Д. Даналев, Дизайн, синтез и характеристика на къси хидрофобни пептиди с потенциална противовъзпалителна активност, XIX Постерна сесия за млади учени, докторанти и студенти, май 2021 г., София (България)
- Б. Борисова, М. Ларонз-Кошар, Ст. Жерар, Д. Даналев, ПРОЕКТИРАНЕ И СИНТЕЗ НА АНАЛОГИ НА FELL, СЪДЪРЖАЩИ ХИДРОФОБНИ АМИНОКИСЕЛИНИ В С-КРАЯ С ПОТЕНЦИАЛНА АНТИВЪЗПАЛИТЕЛНА АКТИВНОСТ, 19–22 юли 2022 г., НАЦИОНАЛНА КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНО УЧАСТИЕ „ИНОВАЦИИ В МОЛЕКУЛИТЕ НА ЛЕКАРСТВАТА“, Хисаря (България)
- Б. Борисова, М. Ларонз-Кошар, С. Жерар, Д. Даналев, СИНТЕЗ И ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА НОВИ TDIFELLK ПЕПТИДИ С АНТИВЪЗПАЛИТЕЛНИ СВОЙСТВА КАТО ЧАСТ ОТ МОЛЕКУЛАРНА ХИБРИДИЗАЦИЯ, XX НАУЧНА ПОСТЕРНА СЕСИЯ ЗА МЛАДИ УЧЕНИ, ДОКТОРАНТИ И СТУДЕНТИ В УКТМ-София, юли 2023 г., София (България)
- Б. Борисова, М. Ларонз-Кошар, Ст. Жерар, Д. Даналев, СИНТЕЗ И ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА НОВИ TDIFELLK ПЕПТИДИ С АНТИВЪЗПАЛИТЕЛНИ СВОЙСТВА КАТО ЧАСТ ОТ МОЛЕКУЛАРНА ХИБРИДИЗАЦИЯ, XX НАУЧНА ПОСТЕРНА СЕСИЯ ЗА МЛАДИ УЧЕНИ, ДОКТОРАНТИ И СТУДЕНТИ В УКТМ-София, юли 2023 г., София (България)
- Боряна Борисова, Мари Кошар, Данчо Даналев, Стефан Жерар, 4- ИЛИ 5-АРИЛСУБСТИТУИРАНИ N-TBU-ИЗОТИАЗОЛ-3(2H)-ОН-1,(1)-(DI)OXIDE ФАРМАКОФОРИ КАТО ЧАСТ ОТ МОЛЕКУЛНИ ХИБРИДИЗАЦИОННИ АГЕНТИ

- VS PDE4, RICT 2023 57-та Международна конференция по медицинска химия, откриване и подбор на лекарства, 5-7 юли, Лил (Франция)
- Боряна Борисова, Мари Кошар, Данчо Даналев, Стефан Жерар, АРИЛ-ЗАМЕСТЕН ИЗОТИАЗОЛ-3(2H)-ОН ФАРМАКОФОР КАТО ЧАСТ ОТ МОЛЕКУЛНИ ХИБРИДИЗАЦИОННИ АГЕНТИ VS PDE4, 31-ва конференция GP2A Med Chem, 23-25 август 2023 г., Марсилия (Франция)
 - Б. Борисова, М. Ларонз-Кошар, Ст. Жерар, Д. Даналев, СИНТЕЗ, ИЗОЛИРАНЕ И ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА НОВИ ПЕПТИДНИ АНАЛОГИ НА ОКТАПЕПТИДА TDIFELLK, 10-та Международна пептидна конференция на Българското пептидно дружество, 1-4 септември 2023 г., Варна (България)
 - Боряна Борисова, Станислава Владимирова, Христина Ночева, Данчо Даналев, СИНТЕЗ, ИЗОЛИРАНЕ И ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА БИОКОНЮГАТИ НА FELL С ВТОРИ ФАРМАКОФОР, 10-та Международна пептидна конференция на Българското пептидно дружество, 1-4 септември 2023 г., Варна (България)
 - Боряна Борисова, Мари Ларонз-Кошар, Стефан Жерар, Данчо Даналев, Синтез и характеристика на нови аналози на тетрапептида FELL, съдържащ D-Phe в първата позиция, Biologics UK 2024, 13-15.03.2024, Лондон, Великобритания
 - Боряна Борисова, Мари Ларонз-Кошар, Стефан Жерар, Данчо Даналев, СТРАТЕГИЯ И СИНТЕЗ НА ИЗОТИАЗОЛОН ФАРМАКОФОР, СЪЧЕТАН С ПЕПТИД КАТО НОВО БИОКОНЮГАТНО СРЕДСТВО VS PDE4, XXI Научна постерна сесия за млади учени, докторанти и студенти на ХТМУ, 06.2024, София, България

Устни презентации:

- Боряна Борисова, Мари Кошар, Данчо Даналев, Стефан Жерар, 4- ИЛИ 5-АРИЛСУБСТИТУИРАНИ N-TBU-ИЗОТИАЗОЛ-3(2H)-ОН-1,(1)-(DI)OXIDE PHARMACOPHORES AS PART OF MOLECULAR HYBRIDIZATION AGENTS AGAINST PDE4, SCF 2023, 26-28 юни, Нант, Франция
- Боряна Борисова, Станислава Владимирова, Христина Ночева, Георги Богданов, Румен Николов, Стефан Жерар, Мари Кошар, Данчо Даналев, СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА НОВИ ПЕПТИДИ И БИОКОНЮГАТИ С АНАЛГЕЗИЧНА И АНТИВЪЗПАЛИТЕЛНА АКТИВНОСТ, 10-та Международна пептидна конференция на Българското пептидно дружество, 1-4 септември 2023 г., Варна, България

- Боряна Борисова, Синтез, изолиране и охарактеризиране на нови пептидни аналози на октапептида TDIFELLK, Ден на Металурга, 2 ноември **2023 г.**, София, България
- Боряна Борисова, Мари Ларонз-Кошар, Стефан Жерар, Данчо Даналев, СИНТЕЗ НА ИЗОТИАЗОЛОНОВИ ДЕРИВАТИ КАТО ЧАСТ ОТ БИОКОНЮГАТИ С ПОТЕНЦИАЛНИ PDE4 ИНХИБИТОРИ, XVII-ти Пролетен семинар на докторантите и младите учени „Интердисциплинарна химия”, 23-24 април **2024 г.**, София, България
- Боряна БОРИСОВА, Христина НОЧЕВА, Христина Златанова-ТЕНИШЕВА, Вероника Немска, Мари ЛАРОНЗ-КОШАР, Стефан ЖЕРАР, Данчо ДАНАЛЕВ, Проектиране и синтез на нови аналози на FELL, съдържащи Туг на първа позиция вместо Phe, Международна конференция за биоактивни, органични и неорганични съвременни материали и чисти технологии, 24 - 28 март **2025 г.**, София, България