



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

ас. инж. Диляна Василева Димитрова

ТЕМА

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ НА АНАЛОЗИ НА
ТЕМПОРИН

За придобиване на образователна и научна степен „доктор“ в област на висше образование 5. Технически науки, научната специалност 5.11. Биотехнологии (Технология на биологично активните вещества)

Научни ръководител: проф. д-р инж. Данчо Даналев
проф. д-р Нели Георгиева

Научно жури: 1. проф. д-р инж. Петър Тодоров Тодоров – председател и рецензент
2. проф. д-р инж. Емилия Димитрова Найденова
3. проф. д-р Иванка Борисова Стойнева
4. доц. д-р Златка Милчева Алексиева - рецензент
5. доц. д-р Диляна Петрова Николова

София, 2026

Дисертационният труд е написан на 134 страници, съдържа 33 фигури, 2 графики и 27 таблици. Цитирани са 110 източника.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на научен съвет на научното звено на катедра „Биотехнология”, състояло се на 17.04.2026 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 25.06.2026 г. от 11 часа в зала 301, сграда „А” на ХТМУ.

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

УВОД

От въвеждането на антибиотиците до днес, те са едни от най-предписваните лекарства в медицинската практика и се произвеждат в огромни количества, като се използват за различни цели. Развитието на химичните и биотехнологичните методи за тяхното получаване прави тези съединения по-достъпни, което улеснява употребата им. Неоспоримо негативен резултат от дългогодишния селекционен натиск в следствие на приложението на антибиотици, е развитието на резистентни към съществуващите антибиотици щамове и тяхното широко разпространение в цялата биосфера. В допълнение към прекомерната и неправилната употреба от човека, един от основните фактори, допринасящи за развитието и напредъка на антимикробната резистентност, е приложението на антибиотиците в животновъдния сектор и земеделието.

Способността на микроорганизмите да издържат и да останат жизнеспособни, когато са изложени на антимикробни агенти, е известна като антимикробна резистентност. В момента тя представлява една от най-големите опасности за общественото здраве и заплашва да се превърне в пандемията на XXI век. Инфекциите с резистентни микроорганизми са не само трудни за лечение, но също така носят риск от последващи сериозни заболявания и дори смърт. Бързото разпространение на мултирезистентни бактерии, които причиняват такива заболявания е сериозна причина за безпокойство. Необходимо е търсене на алтернативни и нови средства за борба с тях. Като обещаваща алтернатива на съществуващите на пазара антибиотици и предизвикваща голям интерес са антимикробните пептиди (AMPs). Тези съединения имат потенциала да бъдат ефективни срещу инфекции, причинени от бактерии, както и други патогени, които са резистентни към различни налични медикаменти, като благодарение на ниската им молекулна маса са лесни за получаване чрез химични и биотехнологични подходи. Базирайки се на природни антимикробни пептиди, учените разработват модифицирани аналози с цел подобряване на тяхната фармакокинетика, фармакодинамика и запазване или засилване на биологичната им активност.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се синтезират нови структурни аналози на основата на антимикуробния пептид темпорин А с потенциална антибактериална активност и да се изследват техните биологични свойства.

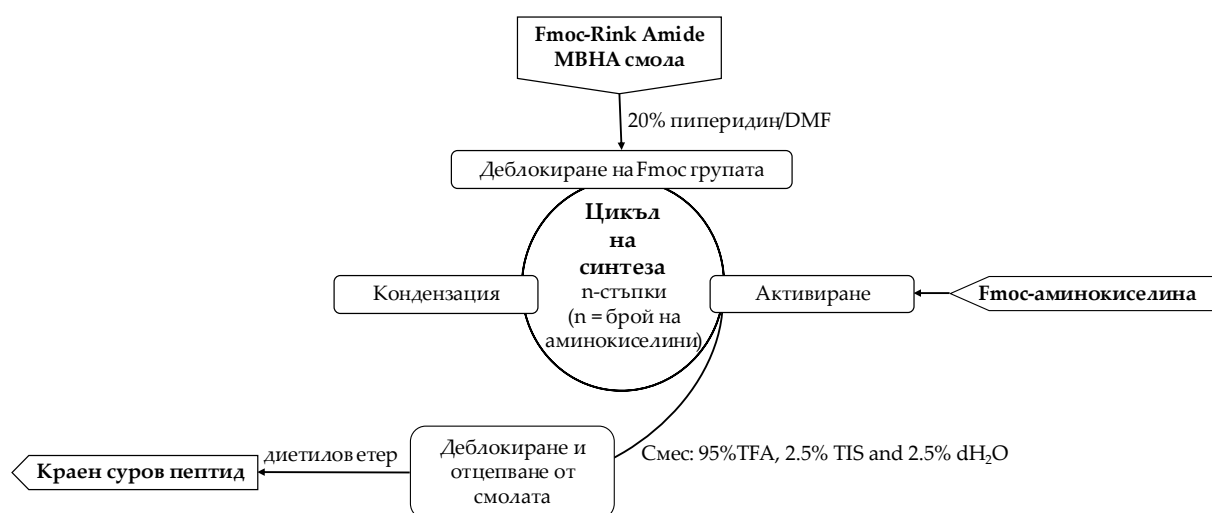
За постигане на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Дизайн, синтез и охарактеризиране на нови аналози на темпорин А.
2. Определяне на хидролитичната стабилност на новосинтезираните аналози на темпорин А.
3. Определяне на антибактериална активност на новосинтезираните аналози на антимикуробния пептид темпорин А.
4. Определяне на цитотоксичност и фототоксичност на новосинтезираните аналози на антимикуробния пептид темпорин А.
5. Определяне на антипролиферативната активност на новосинтезираните аналози на антимикуробния пептид темпорин А.
6. Извеждане на някои SAR зависимости на база получените резултати.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

1. Синтез и охарактеризиране

Таргетните пептиди бяха получени чрез твърдофазен пептиден синтез по Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)/Ot-Bu стратегия върху Fmoc-Rink-Amide-MBHA смола (Фигура 10). Отстраняването на Fmoc-групата се извърши с 20% разтвор на пиперидин в DMF. За наблюдение на реакциите на кондензация и деблокиране се прилагат и двата стандартни теста - Кайзер тест и Хлоранилов тест.



Фигура 1 Обща процедура на твърдофазен пептиден синтез (Dimitrova et al., 2024)

За свалянето на целевия пептид от полимерния носител и деблокирането на всички защитни групи на страничните вериги на аминокиселините, полученият краен целеви пептид-смола се третира със смес от 95%TFA:2.5%TIS:2.5%Н₂О в продължение на минимум 4 часа. Разтворът на пептида в TFA се изпарява до сухо под вакуум на ротационен вакуум изпарител. За пълно отстраняване на TFA, суровият продукт се преизпарява няколко пъти със смес от n-хексан и DCM в съотношения 1:1. Към полученото масло се добавя охладен в камерата на хладилник диетилов етер и той се кристализира. Остава се за една нощ в хладилник за пълно утаяване на кристалите. След това диетиловият етер се отфилтрува и полученият пептид се суши до постоянно тегло във вакуум сушилни без нагряване.

За определяне на чистотата на получените пептиди беше използван течен хроматограф Shimadzu LC MS/MS 8045. Специално за целта на настоящия дисертационен труд е разработена следната градиентна система с мобилна фаза А: Н₂О/10 % AcCN/0.1% НСООН и мобилна фаза В: AcCN/5 % Н₂О/0.1 % НСООН. За

доказване на структурите беше използвана електроспрей йонизационна масспектрометрия в SCAN/ESI+ режим.

Определени са точките на топене на полуавтоматичен апарат Krüss Optronic GmbH (M3000). Оптичната активност на новосинтезираните пептиди беше изследвана чрез определяне на ъгъла на оптично въртене на съединенията, измерен на автоматичен поляриметър Polamat A, Carl Zeiss, Jena при $c = 1$ в метанол. За изследване на вторичната структура на новосинтезираните пептиди е използван кръгов дихроизъм (CD). Спектрите са записани на спектрополяриметър Jasco J-1500 (JASCO Corporation, Токио, Япония). Пептидите са разтворени в разтвор от 10% етанол във вода, след това са разредени във вода до нужната концентрация от 1 μM . Измерванията са извършени в кварцова кювета с дължина на пътя 1 mm, обхващаща диапазон на дължината на вълната от 190–300 nm при 25°C.

За изследване на хидролитичната стабилност на новосинтезираните съединения бяха имитирани три моделни рН системи, отговарящи на условията в стомаха (рН=2), кръвната плазма (рН=7.4) и тънките черва (рН=9) на човешкия организъм. Всичките разтвори бяха приготвени в съответствие с европейската фармакопея, десето издание. Също бяха допълнително модифицирани със специфични ензими, способни да хидролизират пептиди. Хидролитичната стабилност се наблюдава при използване на Обратнофазова Perkin-Elmer серия 200 HPLC (Waltham, MA, USA) на Lichrospher RP-8 nonendcaped колона с дължина 150 mm, вътрешен диаметър 4,6 mm и размер на порите 5 μm (Alltech, Lexington, KY, USA) при 254 nm с детектор Perkin-Elmer серия 200 (Waltham, MA, USA).

2. Биологични изследвания

С всички синтезирани съединения са проведени биологични изследвания с цел определяне на тяхната антибактериална и антимикотична активност, цитотоксичност, фототоксичност и антипролиферативна активност.

2.1. Антибактериални/антимикотични изследвания

Антибактериалната и антимикотичната активност на получените аналози беше изследвана посредством два метода - диск-дифузионен (определя се инхибиторната зона в mm върху твърда агарова среда) и микроразреждане в бульон (определя се минималната инхибираща концентрация (MIC) в $\mu\text{g/mL}$). Антимикробните свойства ще се тестват спрямо моделни щамове *Escherichia coli* NBIMCC 8785, *Bacillus subtilis*

NBIMCC 3562, *Arthrobacter oxydans* NBIMCC 9333, *Pseudomonas aeruginosa* NBIMCC 3700 и *Candida albicans* NBIMCC 74.

2.2. Определяне на цитотоксичност, фототоксичност и антипролиферативна активност

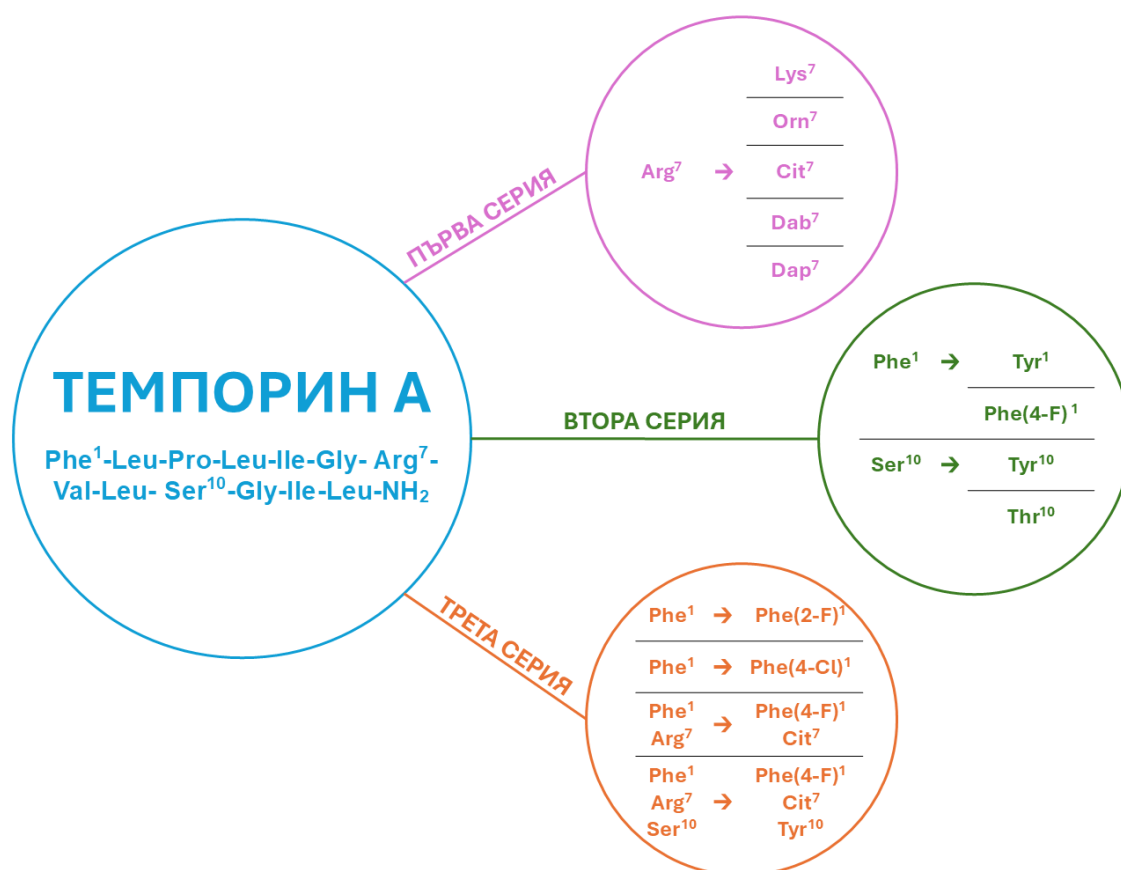
Клетъчните линии BALB 3Т3 (миши ембрионални фибробласти) и MCF-12F (човешки гръдни епителни клетки) бяха използвани като модели на здрава тъкан. Клетъчните линии MCF-7 и MDA-MB-231 бяха използвани като *in vitro* модели съответно за луминален А- и базален В-тип рак на гърдата.

Тестването за цитотоксичност/фототоксичност беше проведено, както е описано в ръководството на OECD за тестване на химикали, раздел 4, тест № 432: *in vitro* 3Т3 NRU тест за фототоксичност (OECD, 2019) с клетките BALB 3Т3, клон А31. При тестовете за фототоксичност, 96-ямкови плаки бяха облъчени (+Irr) с доза 2.4 J/cm² чрез симулатор на изкуствена слънчева светлина Helios-iO (Seric Ltd., Токио, Япония). Цитотоксичността/фототоксичността беше изразена като СС₅₀ стойности (концентрации, необходими за 50% цитотоксичност).

Изследването на антипролиферативна активност беше проведено върху клетъчни култури, използвайки MTT-dye reduction assay. В експериментите бяха използвани клетъчни линии MCF-12F, MCF-7 и MDA-MB-231. Антипролиферативната активност беше изразена като IC₅₀ стойности (концентрации, необходими за 50% инхибиране на клетъчния растеж).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

За настоящия дисертационния труд бяха синтезирани темпорин А и 13 негови аналози. Всички пептидни аналози бяха групирани в три серии. На фигура 19 е показана обобщена информация за направените модификации в структурата на темпорин А. Целта на въвеждането на различни протеиногенни и непротеиногенни аминокиселини е да се подобри фармакокинетиката, изразена в подобрена хидролитична стабилност, и фармакодинамиката, изразена в подобрена биологична активност на новосинтезираните пептиди, както и да се установи коя характеристика на страничната верига като базичност, заряд, дължина и ароматност, е от значение в избраните позиции за активността на пептида.



Фигура 2 Обобщение на направените модификации на темпорин А

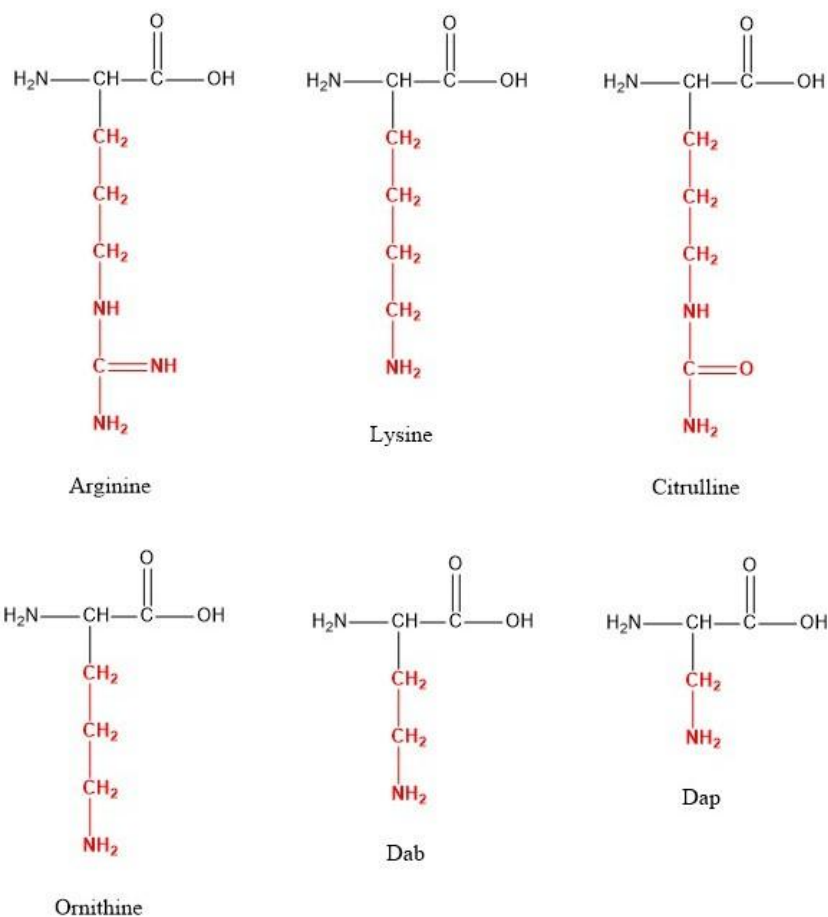
Първа серия включва майчиния пептид темпорин А, вече публикувания аналог със заместване в позиция 7 с Lys – темпорин F и 4 нови аналози със заместване в позиция 7 с непротеиногенни аминокиселини. Във втора серия са групирани аналози с модификации в 1 и 10 позиция. Създадените аналози в трета серия са на база получените

результати от първа и втора серия като се включват пептиди с две или повече модификации, както и халогенирани аналога.

I. Първа серия аналози

1. Дизайн

Първа серия от новосинтезираните аналози на темпорин А включва модификации на структурата му в седма позиция, т.е. заменен беше аргининовият остатък, намиращ се в тази позиция в природния пептид. Освен майчиния пептид, избрахме да синтезираме и вече публикувания от Wade et al. (2000) Темпорин F, при който е заменен аргининът с Lys (Wade et al., 2000), като двата пептида да ни служат като моделни съединения за сравняване на биологичната активност на останалите аналози спрямо тях. За останалите аналози от тази серия бяха използвани непротеиногенните аминокиселини орнитин (Orn), цитрулин (Cit), 2,4-диаминобутанова киселина (Dab) и 2,3-диаминопропионова киселина (Dap) (Фигура 20). Посредством тези промени в молекулата на темпорин А изследвахме влиянието на базичността и обема на страничната верига на аминокиселината в седма позиция върху хидролитичната стабилност, антибактериалната и антипролиферативната активност.



Фигура 3 Структури на използваните аминокиселини в позиция 7 на темпорин А (Dimitrova et al., 2024)

Положително заредените аминокиселини Arg и Lys играят важна роля в активността на пептидите поради способността им да генерират електростатично привличане с отрицателно заредената мембрана на микроорганизми като бактерии. Същевременно обаче склонността на AMPs към протеазно разграждане допринася за ниската стабилност на по-голямата част от пептидите в биологични течности, включително серум и стомашно-чревния тракт. Ензими като химотрипсин разпознават ароматните остатъци Trp, Phe и Tyr, а сериновите протеинази като трипсина са изключително специфични за базичните аминокиселини Arg и Lys. Други протеинази, специфични за хидрофобните остатъци като Val, Ala, Phe и Leu, включват еластаза и аспартат протеиназата пепсин (Arias et al., 2018).

В края на страничната си верига Arg има гуанидинова група, докато Lys има амино група, което придава на пептидите силни базични свойства, които влияят върху тяхната антимикробна активност. В повечето направени проучвания, въвеждането на Lys е свързано с намалена антимикробна активност. Wade et al. (2000) докладват също

намалена антимикуробна способност на Темпорин F. Тази тенденция може да се обясни с по-големия брой водородни връзки, които гуанидиновата група на Arg може да образува в сравнение с аминокислотната група на Lys, както и със значително по-слабите връзки от този тип, поради по-ниската базичност на ϵ -амино групата на Lys в сравнение с гуанидиновата групировка на Arg. Странични вериги на Orn, Dab и Dar са променени не само по отношение на природата им, т.е. тяхната базична сила, но и по отношение на дължината на страничната верига, спрямо тази при Arg и Lys (Arias et al., 2018; Wade et al., 2000). За разлика от всички тях в молекулата на Cit базичната групировка (гуанидинова или проста аминокислота група) в страничната верига е заместена от остатък от карбамид, който има неутрални свойства, т.е. при него имаме пълна липса на заряд в страничната верига.

При неутрално рН, Arg е базична аминокиселина с гуанидинова група в страничната си верига и положителен заряд. При нормални обстоятелства човешкото тяло произвежда достатъчно Arg, за да поддържа масата на мускулите и съединителната тъкан, което го прави полуесенциална аминокиселина. Ендогенният синтез на Arg обаче често е недостатъчен, за да се отговори на високите нужди по време на стрес. При тези обстоятелства Arg се превръща в ключова аминокиселина за поддържане на положителен азотен баланс и насърчаване на оптимален растеж. Обменът и метаболизмът на протеините осигуряват по-голямата част от плазмения Arg. Около 60% от тези запаси се произвеждат в бъбреците, които са основното място за нетния синтез на Arg. Основният субстрат е Cit, който се произвежда в тънките черва като страничен продукт от метаболизма на хранителни аминокиселини като Pro, Gln и Gly (Tong and Barbul, 2004). От химична гледна точка разликата между Cit и Arg е, че страничната верига на Cit има кетонна група ($C=O$) вместо иминова група ($=NH$) като по този начин се премахва базичността (Johnson et al., 2022).

Cit е неесенциална аминокиселина, която човешкото тяло произвежда и се открива също така в някои храни. Cit участва в синтеза на Arg в организма, който е от съществено значение за имунологичния отговор, производството на азотен оксид и синтеза на протеини. Цикълът на уреята, който отговаря за детоксикацията на амоняка в организма, зависи силно от Cit. Подобно на други аминокиселини, Cit има както положително заредена аминокислота група, така и отрицателно заредена карбоксилна група при физиологично рН, което му позволява да съществува като цвитерйон във водни разтвори (Baião et al., 2025).

2. Анализи за охарактеризиране

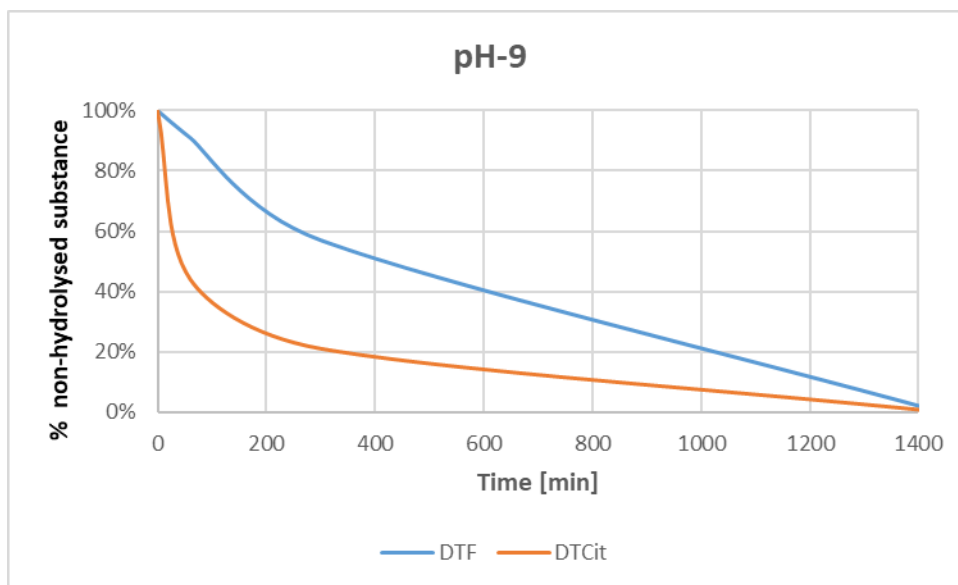
Синтезирани в първа серия са темпорини А и F, както и нови амидирани С-крайни аналози с обща структура FLPLIG-**X**⁷-VLSGIL-NH₂, където X = Arg, Lys, Cit, Orn, Dab и Dap. Всеки пептид е получен следвайки Fmoc/Ot-Bu стратегия за твърдофазен пептиден синтез. Физикохимичните свойства на новосинтезираните съединения са обобщени в таблица 7. В Приложение 1 са представени HPLC и MS профили на съединения от серия 1 на фигури 1.1 – 1.12. Хроматографската чистота на всички новосинтезирани пептиди е над 95%.

Таблица 1 Серия 1 - структура с еднобуквен аминокиселинен код, молекулна формула и аналитични данни от HPLC-MS анализ, определяне на оптичното въртене и определяне на точката на топене на новосинтезираните пептиди

Пептид	Структура	Молекулна формула	MM _{exact} [g/mol]	[M+H] ⁺ observed [g/mol]	[M+Na] ⁺ observed [g/mol]	RT [min]	α_d^{20} [°]*	Т.т. [°C]
DTA	FLPLIG- R -VLSGIL-NH ₂	C ₆₈ H ₁₁₇ N ₁₇ O ₁₄	1395.90	1397.00	1418.95	4.513	-38	158 ± 2
DTF	FLPLIG- K -VLSGIL-NH ₂	C ₆₈ H ₁₁₇ N ₁₅ O ₁₄	1367.89	1368.80	1390.75	4.501	-40	155 ± 3
DTCit	FLPLIG- Cit -VLSGIL-NH ₂	C ₆₈ H ₁₁₆ N ₁₆ O ₁₅	1396.88	1397.75	1419.75	5.793	-34	182 ± 2
DTOrn	FLPLIG- Orn -VLSGIL-NH ₂	C ₆₇ H ₁₁₅ N ₁₅ O ₁₄	1353.87	1354.70	1376.70	4.364	-42	123 ± 2
DTDab	FLPLIG- Dab -VLSGIL-NH ₂	C ₆₆ H ₁₁₂ N ₁₄ O ₁₅	1340.84	1340.75	1362.70	4.191	-52	138 ± 4
DTDap	FLPLIG- Dap -VLSGIL-NH ₂	C ₆₅ H ₁₁₀ N ₁₄ O ₁₅	1326.83	1326.65	1348.70	4.077	-48	140 ± 1

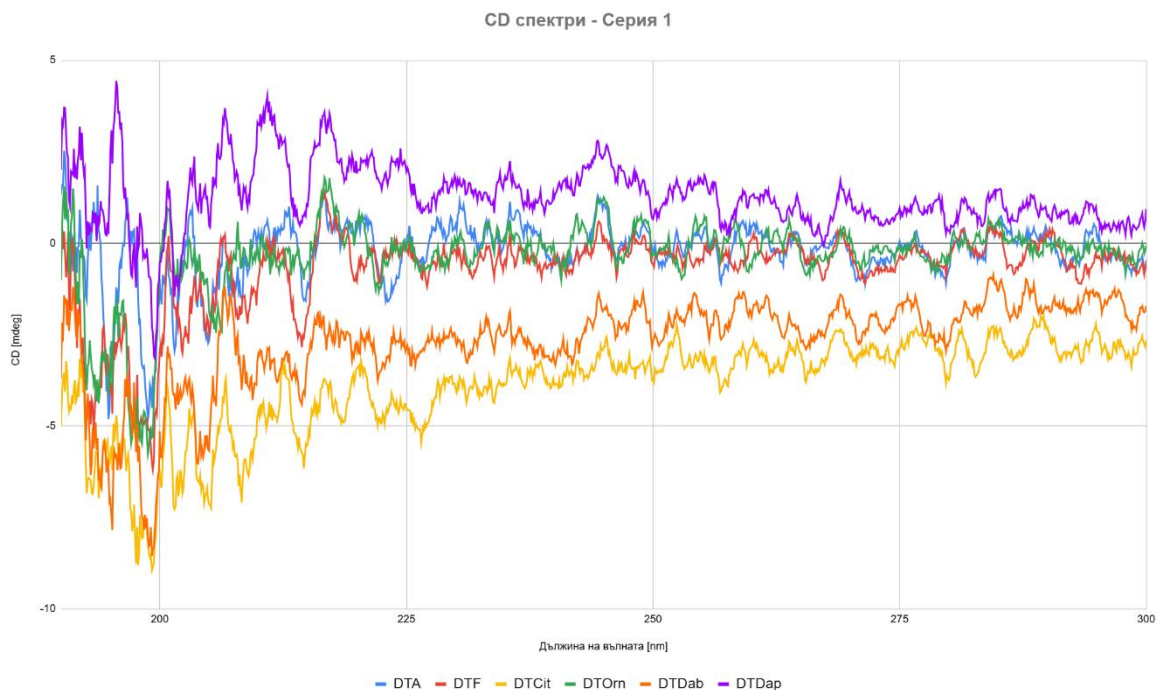
* метанол (c=1)

Хидролитичната стабилност е едно от най-важните свойства на всички новосинтезирани молекули за тяхното успешно приложение в медицинската практика. Ето защо стабилността на новосинтезираните пептиди беше изследвана в продължение на 24 часа в три моделни системи, които имитират различни части в човешкия организъм: pH 2 (стомаш), pH 7,4 (кръвна плазма) и pH 9 (тънко черво). Ензимите пепсин и трипсин бяха добавени в разработените моделни системи в концентрации съответно 0.5 mg/mL и 0.1 mg/mL, в съотношения пептид/пепсин 1:20 и 1:100 (Mistry et al., 2007). Тестваните съединения бяха с концентрация от 1.0 mg/mL. Майчиният пептид DTA показва стабилност и в трите pH системи за тествания 24-часов период. Всички тествани пептиди са стабилни при киселинно и неутрално pH. Аналозите DTF и DTCit се хидролизират напълно за 24 часа при алкално pH (Фигура 21).



Фигура 4 Серия 1 - хидролиза на аналозите DTF и DTCit за 24 часа при алкално рН.

Спектрите от кръговия дихроизъм на всички пептиди показват относително ниска елиптичност и липсват характерните елементи на добре дефинирани вторични структури (Фигура 22). По-специално, нито един от спектрите не показва двойните минимума при приблизително 208 и 222 nm, които са показателни за α -спирални конформации, нито се наблюдава ясно изразен отрицателен пик близо до 216–218 nm, което би предполагало образуване на β -лист (Woody, 1995). Вместо това, спектрите са доминирани от широки, слаби сигнали, съответстващи на предимно неподредени или произволни нагъвания в разтвор (Rodger and Marshall, 2021).



Фигура 5 CD спектри - серия 1

Полученият спектър на DTA е сравним с тези получени от Wade et al. (2000) и D'Abramo et al. (2006) като се вижда, че майчиният пептид показва минимум около 200 nm и обща форма, предполагаща конформация на произволно нагъване (D'Abramo et al., 2006; Wade et al., 2000). Пептидите DTA, DTF и DTOrn показват много сходни спектрални профили, със стойности на елиптичност, колебаещи се около нула над 205 nm и плитък отрицателен минимум близо до 195–200 nm. Тези характеристики са типични за силно гъвкави пептиди със слабо стабилна вторична структура. Незначителните разлики между тези спектри вероятно се дължат на специфичните ефекти на страничните вериги на аминокиселините, а не на съществени промени в конформацията на пептидната верига. За разлика от това, пептидите DTDab и DTCit показват по-изразена отрицателна елиптичност с по-дълбоки минимума около 195–200 nm., вероятно в следствие на засилени електростатични взаимодействия или свързване между страничната верига и основната верига, произхождащо от аминокиселините Dab и Cit. Значително по-различен спектър притежава пептидът DTDap, който се характеризира с предимно положителна елиптичност в голяма част от диапазона 205–250 nm. Това различно поведение показва значително променена електронна и конформационна среда спрямо другите пептиди. Въпреки, че този спектър не

съответства на класическа нагъната вторична структура, той предполага, че DTDар приема конформационна структура в разтвор зависима от последователността.

3. Биологични изследвания

3.1. Антибактериални/антимикотични изследвания

За да се установи чувствителността на тестваните щамове както към новосинтезираните аналози, така и към майчиния ДТА и вече публикувания DTF, бяха използвани два метода – дисково-дифузионен метод и микроразреждане в бульон, срещу два моделни Грам-положителни бактериални щамове, два моделни Грам-отрицателни бактериални щамове и един гъбичен щам. Избраните щамове са сред най-разпространените микроорганизми, които причиняват редица заболявания. Например, *P. aeruginosa* причинява инфекции на дихателните пътища (Sharma et al., 2014), *C. albicans* причинява инфекции на лигавиците (Kim and Sudbery, 2011), а *E. coli* причинява инфекции на кръвния поток и пикочните пътища (Muhldorfer et al., 2002). Въпреки, че *B. subtilis* обикновено се считат за непатогенни, има някои доклади за инфекции на централната нервна система, причинени от тези бактерии (Tsonis et al., 2018). Освен това, когато се комбинира с други щамове на *Bacillus*, тя става патогенна (La Jeon et al., 2012). Видовете *Arthrobacter*, както и *C. albicans* могат да действат като опортюнистични патогени, особено при имунокомпрометирани гостоприемници, според клинични доклади за тях при хора и животни (Gobbetti and Rizzello, 2014).

За целите на изследването по дисково-дифузионния метод, микробните култури бяха разпределени на тънък слой (100 μL с концентрация 0.5 McFarland) върху стерилни петрита с твърда хранителна среда. С 20 μL от пептидните разтвори с концентрации 1.4 mg/mL и 10 mg/mL бяха напоени стерилни хартиени дискове. За положителна контрола служеше щамово-специфичен антибиотик, а като отрицателна контрола - 10% разтвор на етанол във вода. За всяко ниво на концентрация, изследванията са проведени в три повторения, а диаметърът на зоните на инхибиране (IZ) измерен в милиметри е показателен като средна стойност от трите резултата. Освен това е изчислено и показано стандартното отклонение (SD). Получените стойности са показани в таблица 8 за Грам-положителните щамове *B. subtilis* 3562 и *A. oxydans* 9333 и таблица 9 за Грам-отрицателните щамове *E. coli* 8785 и *P. aeruginosa* 3700. Процентът на инхибиране за *B. subtilis* 3562, *A. oxydans* 9333 и *P. aeruginosa* 3700 и при двете нива на концентрация беше изчислен за всеки синтезиран аналог. Зоната на инхибиране на антибиотика беше взета

като 100% инхибиране и процентът за всеки пептиден аналог след това беше екстраполиран. В таблица 10 са показани обобщените стойности от експеримента. Всички получени зони могат да се видят на фигурите, представени в Приложение №2, таблица 1.1.

Таблица 2 Серия 1 - зони на инхибиране (средна стойност в mm със стандартно отклонение) на синтезирани пептиди и свързани антибиотици срещу Грам (+) щамове *B. subtilis* 3562 и *A. oxydans* 9333.

Пептид	Структура	<i>B. subtilis</i> 3562			<i>A. oxydans</i> 9333		
		1.4 mg/mL	10 mg/mL	Хлорамфеникол [30 µg/диск]	1.4 mg/mL	10 mg/mL	Гентамицин [10 µg/диск]
DTA	FLPLIG-R-VLSGIL-NH ₂	8.8 ± 0.3	8.8 ± 0.8	26.0	6.8 ± 0.3	9.7 ± 0.6	18.0
DTF	FLPLIG-K-VLSGIL-NH ₂	8.5 ± 0.5	12.7 ± 0.6	25.0	6.7 ± 0.3	11.5 ± 0.5	20.0
DTCit	FLPLIG-Cit-VLSGIL-NH ₂	0.0	0.0	25.0	0.0	0.0	19.0
DTOrn	FLPLIG-Orn-VLSGIL-NH ₂	0.0	8.2 ± 0.3	25.0	0.0	8.3 ± 0.6	19.0
DTDab	FLPLIG-Dab-VLSGIL-NH ₂	0.0	11.3 ± 0.6	25.0	8.2 ± 0.3	14.5 ± 0.5	19.0
DTDap	FLPLIG-Dap-VLSGIL-NH ₂	0.0	0.0	26.0	0.0	9.8 ± 0.3	18.5

Таблица 3 Серия 1 - зони на инхибиране (средна стойност в mm със стандартно отклонение) на синтезирани пептиди и свързани антибиотици срещу Грам (-) щамове *E. coli* 8785 и *P. aeruginosa* 3700.

Пептид	Структура	<i>E. coli</i> 8785			<i>P. aeruginosa</i> 3700		
		1.4 mg/mL	10 mg/mL	Гентамицин [10 µg/диск]	1.4 mg/mL	10 mg/mL	Гентамицин [10 µg/диск]
DTA	FLPLIG-R-VLSGIL-NH ₂	0.0	0.0	18.0	7.8 ± 0.3	9.3 ± 0.6	17.0
DTF	FLPLIG-K-VLSGIL-NH ₂	0.0	0.0	18.0	7.0 ± 0.5	10.3 ± 0.8	16.0
DTCit	FLPLIG-Cit-VLSGIL-NH ₂	0.0	0.0	18.0	0.0	0.0	16.0
DTOrn	FLPLIG-Orn-VLSGIL-NH ₂	0.0	0.0	18.0	0.0	11.3 ± 0.6	16.0
DTDab	FLPLIG-Dab-VLSGIL-NH ₂	0.0	0.0	18.0	7.7 ± 0.6	14.3 ± 0.6	16.0
DTDap	FLPLIG-Dap-VLSGIL-NH ₂	0.0	0.0	18.0	0.0	8.8 ± 0.8	17.0

Таблица 4 Серия 1 - процентно инхибиране на тестваните микроорганизми от пептидни аналози в сравнение с избраните антибиотици. Антибиотиците са взети като 100% инхибиране.

Щамове	<i>B. subtilis</i> 3562		<i>A. oxydans</i> 9333		<i>P. aeruginosa</i> 3700		
	Концентрации	1.4 mg/mL	10 mg/mL	1.4 mg/mL	10 mg/mL	1.4 mg/mL	10 mg/mL
Пептид	Инхибиране (%)						
DTA		33.8	33.8	37.8	53.9	45.9	54.7
DTF		34.0	50.8	33.5	57.5	43.8	64.4
DTCit		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
DTOrn		0.0	32.8	0.0	43.7	0.0	70.6
DTDab		0.0	45.2	43.2	76.3	48.1	89.4
DTDap		0.0	0.0	0.0	53.0	0.0	51.8

Новосинтезираните аналози проявиха същата тенденция в антибактериалната активност като тези, докладвани от Romero et al. (2020), а именно - те са по-активни спрямо Грам-положителни бактерии (Romero et al., 2020). Както майчиният пептид DTA,

така и аналогът с Lys (DTF) показаха едни и същи характеристики, а именно по-голяма активност срещу Грам (+) бактерии *A. oxydans* 9333 и *B. subtilis* 3562, а инхибиращият капацитет се увеличава с нарастване на концентрацията на пептида. По-големите зони на инхибиране обаче предполагат, че DTF има малко по-силна антибактериална активност при по-голямата концентрация от 10 mg/mL. Най-осезаема е разликата при *B. subtilis* 3562, където DTA при 10 mg/mL инхибира на 33.8%, а DTF на 50.8%. Също при *P. aeruginosa* 3700 има близо 10% разлика в инхибирането в полза на DTF. Следователно, антибактериалната активност се засилва при заместване на Arg с по-малко основен остатък - Lys.

Премахването на положителен заряд в страничната верига на Cit води до пълна загуба на активност срещу всички тествани щамове. Аналозите, съдържащи Orn, Dab и Dar, показаха сходна или по-голяма активност срещу Грам-положителни бактерии. DTOrn не е активен при ниската концентрация, но при високата показва процент инхибиране при *B. subtilis* 3562 от 32.8%. сходен на майчиния пептид - 33.8%. При *A. oxydans* 9333 DTOrn има по-слаб процент на инхибиране спрямо DTA, докато при *P. aeruginosa* 3700 показва с 15.9% по-високо инхибиране. Аналогът DTDab показва най-добър антибактериален ефект от новите аналози, а срещу *A. oxydans* 9333 и *P. aeruginosa* 3700 показва завидно по-висока активност от майчиния пептид DTA. DTDab формира зони с размер 14.3 ± 0.6 mm или 89.4% инхибиране, което е доста близо до получените стойности от антибиотика гентамицин. Последващото скъсяване на страничната верига при DTDar доведе до липса на антибактериалната активност срещу *B. subtilis* 3562, както и при по-ниската концентрация и при *A. oxydans* 9333 и *P. aeruginosa* 3700. При концентрацията от 10 mg/mL процентът инхибиране на DTDar е с близо 23.3% по-нисък срещу *A. oxydans* 9333 и с 37.6% по-нисък срещу *P. aeruginosa* 3700 спрямо DTDab.

Всички пептиди не образуваха зони на инхибиране срещу Грам-отрицателния щам *E. coli* 8785. Според Mangoni and Shai (2009) и Rosenfeld et al. (2006), при навлизане в контакт с външната мембрана на клетката, пептидът олигомеризира, което може да е причината за неактивността на темпорин А срещу Грам-отрицателни бактерии (Mangoni and Shai, 2009; Rosenfeld et al., 2006).

Вторият метод, по който аналозите бяха оценени въз основа на тяхната антимикробна активност беше определяне на MIC чрез микроразреждане в бульон. За целта в 96-ямковите плаки бяха накапани микробните култури, разредени до 0.5 McFarland, и към тях бяха добавени пептидните разтвори с концентрации в диапазона от 0 до 320 µg/mL. След 24-часов инкубационен период, абсорбцията на плаките беше

измерена при 630 nm. Изследването беше проведено в три повторения. В таблица 11 са показани обобщени получените стойности на MIC от експеримента.

Таблица 5 Серия 1 - MIC стойности на темпорин А и новите аналози [$\mu\text{g/mL}$]

Пептид	Структура	<i>B. subtilis</i> 3562	<i>E. coli</i> 8785	<i>A. oxydans</i> 9333	<i>P. aeruginosa</i> 3700	<i>C. albicans</i> 74
DTA	FLPLIG- R -VLSGIL-NH ₂	80 $\mu\text{g/mL}$	320 $\mu\text{g/mL}$	80 $\mu\text{g/mL}$	320 $\mu\text{g/mL}$	320 $\mu\text{g/mL}$
DTF	FLPLIG- K -VLSGIL-NH ₂	80 $\mu\text{g/mL}$	320 $\mu\text{g/mL}$	80 $\mu\text{g/mL}$	160 $\mu\text{g/mL}$	320 $\mu\text{g/mL}$
DTCit	FLPLIG- Cit -VLSGIL-NH ₂	NI	NI	160 $\mu\text{g/mL}$	NI	NI
DTOrn	FLPLIG- Orn -VLSGIL-NH ₂	160 $\mu\text{g/mL}$	NI	160 $\mu\text{g/mL}$	NI	NI
DTDab	FLPLIG- Dab -VLSGIL-NH ₂	160 $\mu\text{g/mL}$	320 $\mu\text{g/mL}$	320 $\mu\text{g/mL}$	320 $\mu\text{g/mL}$	NI
DTDap	FLPLIG- Dap -VLSGIL-NH ₂	320 $\mu\text{g/mL}$	NI	NI	NI	NI

*NI – no inhibition, няма инхибиране на щама.

От данните за MIC е видно, че най-ниската стойност за всички щамове е 80 $\mu\text{g/mL}$ и то срещу Грам-положителните бактерии *B. subtilis* 3562 и *A. oxydans* 9333. Тези резултати са напълно съвместими с тези, получени от Carrarelli et al. (2009), където по-ниските стойности на MIC на пептидите са също срещу Грам-положителните бактерии (Carrarelli et al., 2009). Въпреки това, според литературните данни, публикувани от Raduszynska et al. (2020), темпорин А демонстрира активност срещу Грам-отрицателните бактерии *P. aeruginosa*. Докато в проучването на Raduszynska et al. MIC за *P. aeruginosa* ATCC 9029 е установена на 512 mg/L, DTA демонстрира силна активност срещу избория в нашето изследване тестов щам *P. aeruginosa* 3700 при 320 $\mu\text{g/mL}$ (Raduszynska et al., 2020).

Установена беше минималната бактерицидна концентрация за щамовете *B. subtilis* 3562, *A. oxydans* 9333 и *P. aeruginosa* 3700. Стойностите на MBC на майчиния пептид за *P. aeruginosa* 3700 и *B. subtilis* 3562 са 320 $\mu\text{g/mL}$. Аналогът DTOrn демонстрира бактерициден ефект при 320 $\mu\text{g/mL}$ срещу *B. subtilis* 3562 и 160 $\mu\text{g/mL}$ срещу *A. oxydans* 9333. Също така при DTCit е отчетена MBC срещу *A. oxydans* 9333 е 160 $\mu\text{g/mL}$.

Всички новосинтезирани аналози не проявиха активност спрямо Грам-отрицателните бактерии *E. coli* 8785 по дисково-дифузионния метод. Въпреки това, стойностите на MIC за DTA, DTF и DTDab бяха установени. Това може да се обясни с разликите между двете техники за изследване на антибактериалната активност. Според Mercer et al. (2020), Kunin and Edmondson (1968), и Lehrer et al. (1991), дисково-дифузионният метод силно подценява активността или напълно прикрива реалната активност, когато положително зареденият AMPs взаимодейства с отрицателно заредените компоненти на агара. Същата тенденция се наблюдава при взаимодействието

на Грам (+) бактерии *A. oxydans* 9333 и аналогът DTCit (Kunin and Edmondson, 1968; Lehrer et al., 1991; Mercer et al., 2020). Начинът на взаимодействието на пептида със средата и бактериалните клетки при самите методи е различен. При микроразреждането в бульон, пептидите са в директен контакт с щама в дълбочина на хранителната среда, където взаимодействието е директно, като по този начин се получава по-лесно проникване през клетъчната мембрана. При диск-дифузионния метод, пептидът взаимодейства както с щама, който расте на повърхността на агара, така и със самия агар и неговите компоненти и се наблюдава по-слаба антибактериална активност (Mercer et al., 2020).

Според изследванията на Rollins-Smith et al. (2003), майчиният пептид DTA показва активност срещу *C. albicans* (Rollins-Smith et al., 2003). Проведените от нас изследвания показаха, че освен DTA, Lys-заместеният аналог DTF притежава антифунгицидна активност. Следователно резултатите, представени в настоящия дисертационен труд корелират с получените от тях като е установено, че антифунгицидният потенциал на аналозите на темпорина зависи от по-високата базичност на Arg и Lys.

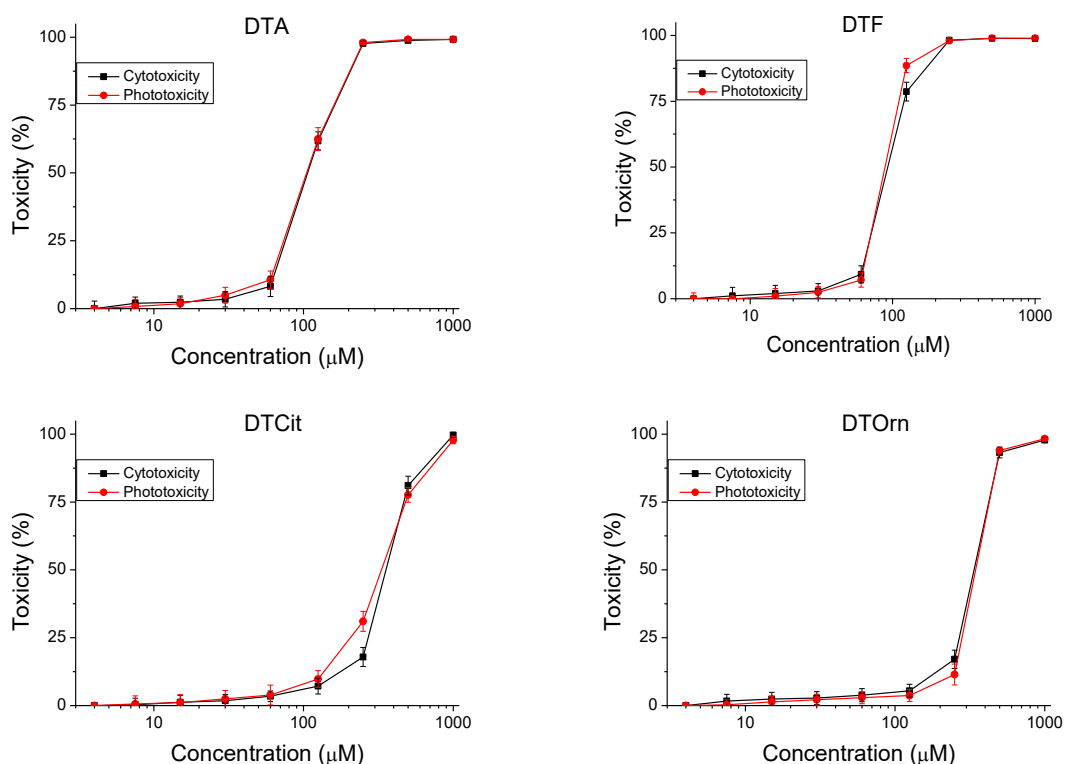
DTDab показва най-силната антимикуробна активност от новосинтезираните аналози. От събраните данни е видно, че антибактериалната активност е била положително повлияна от скъсяването на страничната верига до две метиленови групи в страничната верига. Допълнителното скъсяване на страничната верига на аналога DTDар доведе до намален антимикуробен ефект при ниски концентрации и не показва активност срещу *A. oxydans* 9333 и *P. aeruginosa* 3700, но при по-високи концентрации показва инхибиране. Интересно е обаче, че същият аналог не прояви активност при използване на дисково-дифузионния метод към другата Грам (+) бактерия *B. subtilis* 3562, въпреки че имаше MIC стойност от 320 µg/mL.

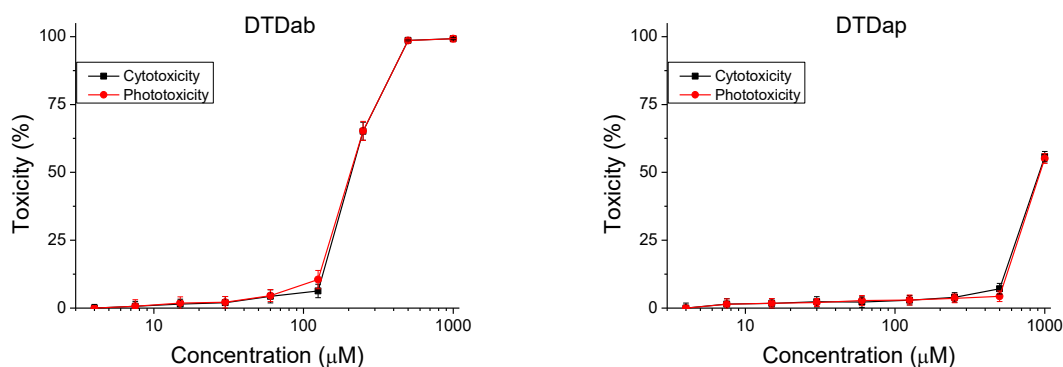
Възможно е да се направи заключението, че е необходима по-обемна, по-дълга и следователно по-базична странична верига в позиция 7, за да се получи по-ниска стойност на MIC, след като се изследват получените стойности на MIC и се отчитат вариациите между шестте аминокиселини. По-големи зони на инхибиране се осигуряват от аминокиселина, която е по-къса и по-малко базична, като Dab. Освен това, антибактериалните качества, наблюдавани при аналога DTCit, се губят, когато положителният заряд в страничната верига се премахне.

3.2. Определяне на цитотоксичност, фототоксичност и антипролиферативна активност

Няколко цвитерйонни структури, включително фосфатидилетаноламин и фосфатидилхолин, присъстват във фосфолипидния бислой на здрави клетки на бозайници. Всички те притежават неутрален общ заряд и намаляват привличането на катионните антимикуробни пептиди към тези клетки (Mai et al., 2001; Schweizer, 2009). От гледна точка на този факт, множество изследователски екипи са изследвали пептиди с доказани антимикуробни свойства за потенциални антипролиферативни ефекти (Deslouches and Di, 2017; Javadpour et al., 1996; Mader and Hoskin, 2006; Marqus et al., 2017; Mistry et al., 2007).

Според публикувани изследвания, темпорините са токсични за здрави клетки на бозайници при концентрации на IC_{50} между 50 и 100 μM (Mäntylä et al., 2005; Rinaldi et al., 2002). За да се подобри тяхната безопасност обаче, се изследват методи и възможности за промяна на темпорините. В сравнение с оригиналния пептид (DTA), четири от изследваните пептидни аналози на темпорин А (DTCit, DTOrn, DTDab и DTDap) демонстрират забележимо по-ниска цитотоксичност. Наблюдаваният ефект (цитотоксичност/фототоксичност) е от дозозависим тип (Фигура 23). Въз основа на получените сигмоидални криви са изчислени средните CC_{50} стойности за всеки изследван пептид (Таблица 12).





Фигура 6 Серия 1 - криви доза-отговор за цито- и фототоксичност на пептидните анализи, определени в клетъчна линия BALB 3Т3 клон А31. Стойностите са средни стойности \pm SD, $n = 6$.

Освен това, тестът за фототоксичност разкри, че изследваните пептидни анализи не са фототоксични. Тези резултати демонстрират потенциала за безопасно локално и системно приложение на посочените пептиди. С най-ниска цитотоксичност се открии пептидът DTDap със стойност на $CC_{50} = 923.84 \pm 21.56$.

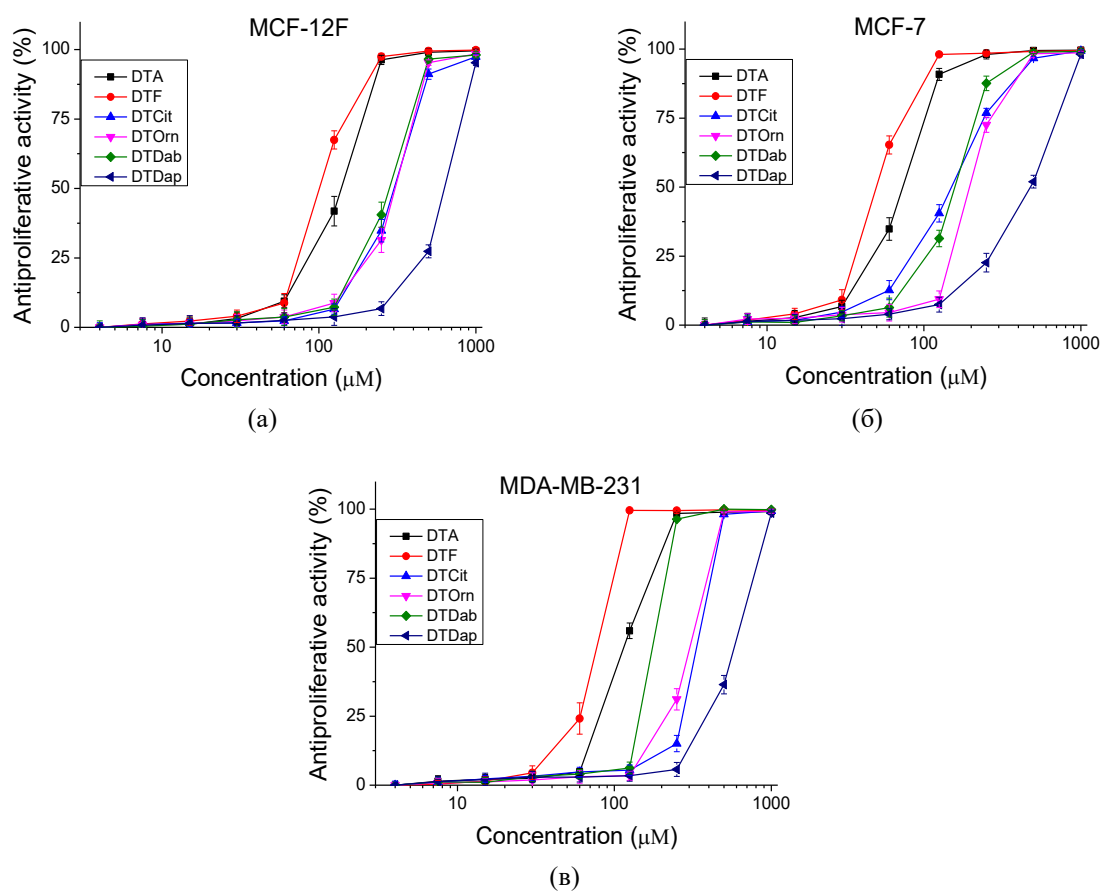
Таблица 6 Серия 1 - цитотоксичност/фототоксичност в клетъчна линия BALB 3Т3 клон А31, средни стойности на CC_{50} и PIF фактор.

Пептид	Средни $CC_{50} \pm SD$ (μM)		PIF**
	- Irr	+ Irr*	
DTA	106.32 \pm 4.18	105.40 \pm 4.88	1.01
DTF	92.40 \pm 2.82	88.35 \pm 1.48	1.05
DTCit	356.09 \pm 7.64	331.78 \pm 12.30	1.07
DTOrn	337.27 \pm 7.09	345.1 \pm 6.41	0.98
DTDab	209.57 \pm 6.69	206.53 \pm 7.41	1.01
DTDap	923.84 \pm 21.56	933.3 \pm 20.7	0.99

* Irr – облъчване; ** PIF- фактор на фотодразнене: PIF < 2 = не е фототоксичен, 2 < PIF < 5 = вероятна фототоксичност, PIF > 5 фототоксичен.

За теста за антипролиферативна активност са използвани човешки клетъчни линии, *in vitro* модел на здрава тъкан (MCF-12F) и две форми на рак на гърдата (MCF-7 и MDA-MB-321) (Фигура 24). В клетъчната линия MCF-7 (луминален рак на гърдата тип А), оригиналният пептид (DTA) и пептидът с Lys на позиция седем (DTF) са показали най-силен антипролиферативен ефект. Освен това, установихме, че Cit-заместеният пептид (DTCit) проявява селективност ($SI > 2$). От друга страна, изследваните пептидни анализи не проявиха селективност ($SI < 2$) срещу клетъчната линия MDA-MB-231, която е базален рак на гърдата тип В. Тези констатации потвърждават данни от литературата за противотуморната активност на положително заредените темпорини и техните

аналози (Swithenbank et al., 2020; Wang et al., 2013), където авторите са изследвали различни туморни клетъчни линии (A549, MCF-7, MDA-MB-231).



Фигура 7 Серия 1 - антипролиферативна активност на пептидни аналози, определена в (а) нетуморогенни MCF-12F клетки, (б) туморни клетъчни линии MCF-7 и (в) MDA-MB-231, $n = 6$.

Антипролиферативният ефект на изследваните пептидни аналози е по-нисък от този на DTA, с изключение на DTF, който има $IC_{50} = 100.48 \pm 3.30 \mu M$ за клетъчната линия MCF-12F (Таблица 13). Третирането с пептидният аналог DTDap, който има най-късата странична верига с най-ниска базичност, доведе до най-нисък антипролиферативен ефект срещу всички тествани клетъчни линии, заедно с най-ниската цитотоксичност и фототоксичност. В сравнение с MDA-MB-231, клетъчната линия MCF-7 показва значително по-висока чувствителност към изследваната серия пептидни аналози. Майчините пептиди DTF и DTA имаха най-силен антипролиферативен ефект в клетките MCF-7, със стойности на IC_{50} съответно $49.75 \pm 1.90 \mu M$ и $73.15 \pm 3.36 \mu M$. Пептидите DTF и аналогът, съдържащ неесенциалната аминокиселина Cit (DTCit), показаха значителна селективност ($SI > 2$) в клетъчната линия MCF-7. Същият аналог, който има небазична странична верига, не е фототоксичен и има сравнително ниска

цитотоксичност. Обратно, изследваните пептидни аналози не показаха адекватна селективност срещу тройно негативния базален рак на гърдата тип В (MDA-MB-231). Според клетъчната линия MCF-7, получените резултати показват, че по-значима селективност се постига чрез намаляване на базичността на страничната верига от DTA през DTF и DTCit. Въпреки това, антипролиферативният ефект на аналозите на темпорин А намалява в същата посока, когато базичността на тяхната странична верига намалява. Тези открития показват силна корелация с данните за AMPs дефензините, събрани от Zou et al. (2007) (Zou et al., 2007).

Таблица 7 Серия 1 - средни стойности на IC₅₀ и индекс на селективност

Пептид	Средни IC ₅₀ ± SD (µM)			Индекс на селективност (SI)*	
	MCF-12F	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-7	MDA-MB-231
DTA	138.65 ± 8.36	73.15 ± 3.36	115.13 ± 4.04	1.90	1.20
DTF	100.48 ± 3.30	49.75 ± 1.90	77.01 ± 2.92	2.02	1.30
DTCit	300.73 ± 10.49	149.69 ± 6.94	334.9 ± 4.37	2.01	0.90
DTOrn	305.59 ± 10.75	195.62 ± 3.63	302.87 ± 8.67	1.56	1.01
DTDab	280.25 ± 13.59	157.45 ± 4.97	174.91 ± 1.35	1.78	1.60
DTDap	630.44 ± 9.97	472.61 ± 16.21	580.97 ± 17.50	1.33	1.09

*индекс на селективност, SI = IC₅₀ (MCF-12F) / IC₅₀ (туморни клетки)

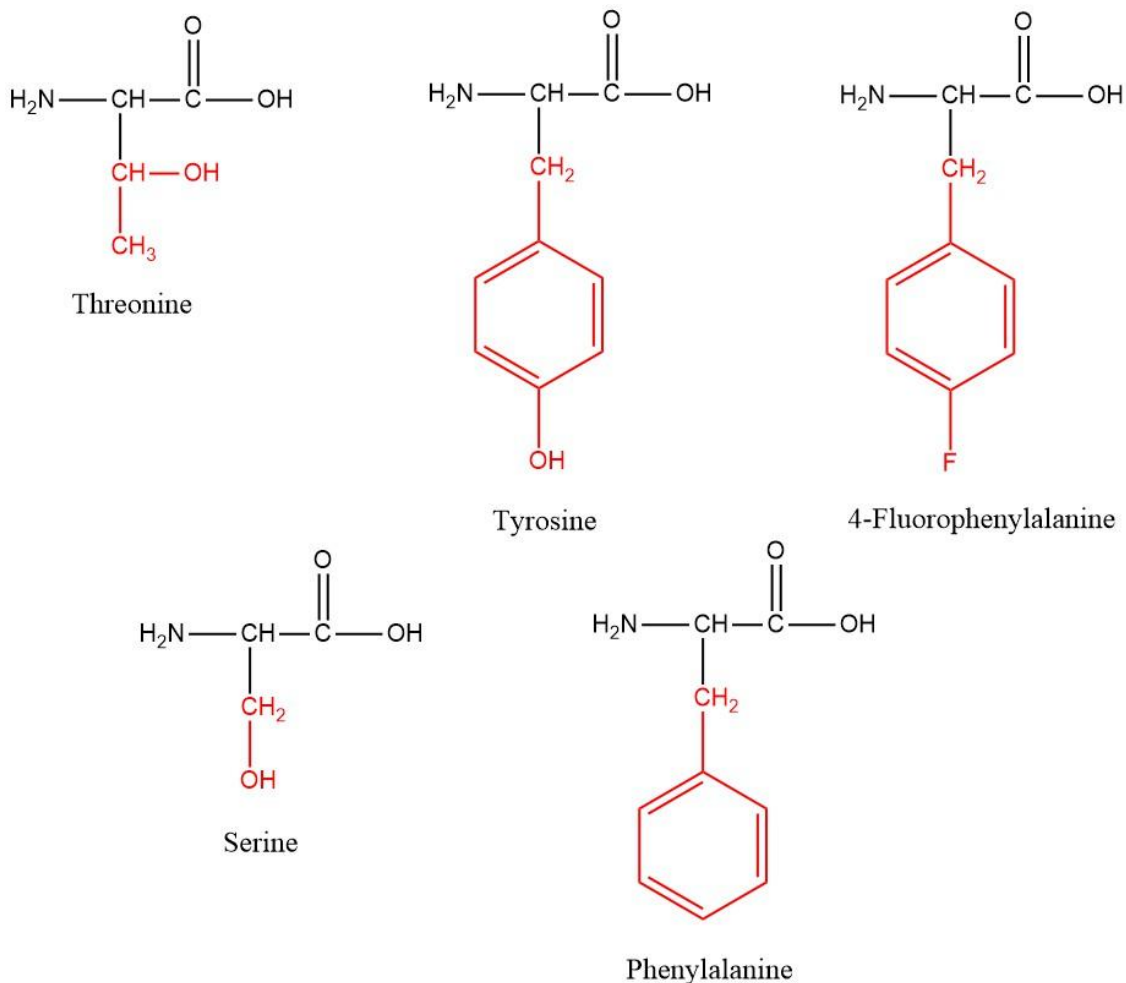
II. Втора серия аналози

1. Дизайн

Във втора серия бяха направени следните промени в молекулата на темпорин А:

- Ser¹⁰ беше заменен с Tyr и Thr, две други хидроксил-съдържащи естествени аминокиселини;
- Phe¹ беше заменен с Tyr - друга протеиногенна ароматна аминокиселина, или непротеиногенен флуориран Phe (Phe(4-F)).

За да се изследва тяхното значение за биологичната активност и стабилност, всички модификации бяха направени, за да се имитират естествено срещащите се аминокиселини в първичната структура на темпорин А, използвайки сравними естествени или непротеиногенни аминокиселини (Фигура 25). Тези конкретни аминокиселини бяха избрани, за да се проследи разликата във вида на хидроксилната група - първична, вторична или ароматна, както и добавянето на флуор върху нейните антимикробни и антипролиферативни свойства, както и върху хидролитичната стабилност.



Фигура 8 Структури на използваните аминокиселини в позиция 1 и 10 на темпорин А (Dimitrova et al., 2025)

Страничните вериги на четири от двадесетте естествено срещащи се α -аминокиселини (α -АК) имат ароматни пръстени. L-Тур е категоризиран като условно есенциална аминокиселина, докато L-Phe е есенциална α -АК и не може да бъде произведен от човешкото тяло. Тези аминокиселини имат ароматен пръстен, прикрепен към С атома в страничните им вериги, като обща структурна характеристика (Hernández et al., 2010). Страничната верига на Phe има фенилов пръстен, който поради хидрофобния характер на ароматната странична верига се класифицира като неутрална и неполярна аминокиселина (Das et al., 2018). Човешкият организъм използва чернодробния ензим фенилаланин хидроксилаза (РАН), който превръща фенил-феноловия пръстен на страничната верига, за да синтезира Тур от Phe. Натрупването на Phe от дефицита на РАН се трансформира във фенилкетон, което води до фенилкетонурия (РКУ), метаболитно разстройство. Тур се превръща в необходима аминокиселина в тази ситуация и трябва да се доставя на организма. Тур се счита за биохимичен прекурсор на множество други

молекули, важни за биологията, включително меланин, адреналин, допамин и дихидроксифенилаланин (DOPA). Хидроксилната група на Туг обаче позволява на киназния междинен продукт да фосфорилира тирозиновата странична верига, химическа промяна, необходима за ензимната регулация. Една от двойните спирали на ДНК се прерязва от топоизомераза I, ензим, който може да релаксира напрегната суперспирализирана ДНК чрез създаване на обратима фосфотирозинова връзка между тирозин хидроксилна група и ДНК фосфатна група (Hernández et al., 2010). Фенолна ^oОН група на Туг е способна на водородни връзки за разлика от Phe. В тази връзка, локален елемент, съдържащ тирозин, известен като „тирозинов ъгъл“, присъства в редица белтъци, включително имуноглобулин, фибронектин тип III и β -бареловия протеин с гръцки ключ. Тирозиновият ъгъл е конформация, при която Туг близо до началото или края на антипаралелна β -верига създава водородна връзка с амида на гръбнака на съседни тирозинови остатъци, което кара ядрото да се сгъва и стабилизира (Lee et al., 2019).

Аминокиселините с ароматни странични вериги в пептидната верига се смятат за места, които се разпознават от специфични ензими. Например, ензимът химотрипсин разцепва пептидната верига при връзка, в която участват остатъците Phe, Туг и Тгр в С-края (Hernández et al., 2010; Terra and Ferreira, 2012). Освен това, тези аминокиселини са от съществено значение за физичните характеристики на белтъците и пептидите. Тези аминокиселини спомагат за структурната стабилизация и самосглобяването на къси пептиди, разтворими белтъци и трансмембранни протеини. Техните странични верижни пръстени могат да се подреждат един върху друг, а пръстените на Туг и Тгр могат да участват във водородни връзки чрез техните ОН и NH групи. Флуоресцентният ефект на тези АК се използва през последните години за разработване на чувствителни методи, които позволяват събирането на данни за метаболизма на клетките и тъканите, както и за структурните и динамични характеристики на протеините и пептидите (Hernández et al., 2010).

Туг е универсална аминокиселина, която е от решаващо значение за контролиране на структурните конформационни промени на белтъците. Неговата редокс-активна характеристика също така улеснява транспортирането на протони и електрони заедно с метални йони в активните центрове на ензимите. Всички живи същества зависят от прецизно регулирани процеси на електронен трансфер, които се контролират от сложни протеинови/пептидни комплекси. Участието на тирозина в множество молекулярни взаимодействия и биосинтетични трансформации е възможно благодарение на неговата

фенолна странична верига и отчетлива химическа реактивност. Със способността си химически да присъединява фенолни групи, за да образува дитирозин и да пренася електрони, тази реактивност предлага ефективно средство за повлияване на протеиновата активност. Специални ензимни реакции, взаимодействия с редокс-активни метални комплекси, радиолиза или фотолиза могат лесно да осъществят такива реакции на омрежване. Способността на тирозиновите остатъци да се свързват с окислително вещество е жизненоважна за живите организми, но може да доведе и до вредно конюгиране на протеини. Такава патология обикновено възниква в резултат на оксидативен стрес, различни патологични състояния и естествения процес на стареене (Lee et al., 2019).

Халогенирането може да придаде на съединенията много полезни характеристики, като по-висока цитотоксичност спрямо ракови клетки, по-добър афинитет и селективност към целта, по-малко странични ефекти и по-лесно преминаване през клетъчните мембрани и кръвно-мозъчните бариери. Освен това, то има потенциала значително да промени функцията на протеина (Sana et al., 2022). Стабилността, специфичността и активността на AMPs са засегнати значително от халогенирането (Huan et al., 2020). Добре известно е, че добавянето на халогени към пептидните химични структури обикновено прави молекулите по-хидрофобни (Molchanova et al., 2020). Основата за успешното му приложение са отличителните стереоелектронни свойства на флуорните замествания, които произтичат от комбинация от много ниска поляризуемост, минимален размер и най-силния индуктивен ефект сред известните химични елементи (Salwiczek et al., 2012). Флуорното заместване може да подобри ефикасността и селективността към целта чрез промяна на pK_a , конформацията, хидрофобните взаимодействия, липофилността или комбинация от тези характеристики. Освен това, флуорът е бил използван за справяне с проблеми с лекарствения метаболизъм. Също така, флуорът може да промени липофилността и да ограничи конформацията, което може да подобри метаболитната стабилност (Gillis et al., 2015). Когато флуорът замести водорода в ароматния пръстен на Phe, електростатичният потенциал се пренарежда и хидрофобността на арилната странична верига се увеличава (Salwiczek et al., 2012).

Полярните аминокиселини лесно взаимодействат с вода, защото съдържат функционални групи, които могат да образуват водородни връзки. Тъй като имат полярна хидроксилна група, Ser, Thr и Tyr могат да участват във водородни връзки, което е от решаващо значение за протеиновата структура. В протеините хидроксилните групи

имат допълнителни приложения. ОН-групите на Ser и Thr служат като места за свързване на въглехидрати (McKee and McKee, 2017).

2. Анализи за охарактеризиране

Синтезираните във втора серия аналози на темпорин А са с обща структура FLPLIGRVL- X_1 -GIL-NH₂, където X_1 = Tyr или Thr, и X_2 -LPLIGRVLSGIL-NH₂, където X_2 означава Tyr или Phe(4-F). Всеки пептид е получен следвайки Fmoc/Ot-Bu стратегия за твърдофазен пептиден синтез. Физикохимичните свойства на новосинтезираните съединения са обобщени в таблица 14. В Приложение 1 са представени HPLC и MS профили на съединения от серия 2 на фигури 2.1 – 2.9. Всички новосинтезирани пептиди, подложени на тестове за биологична активност, са с над 95% хроматографска чистота.

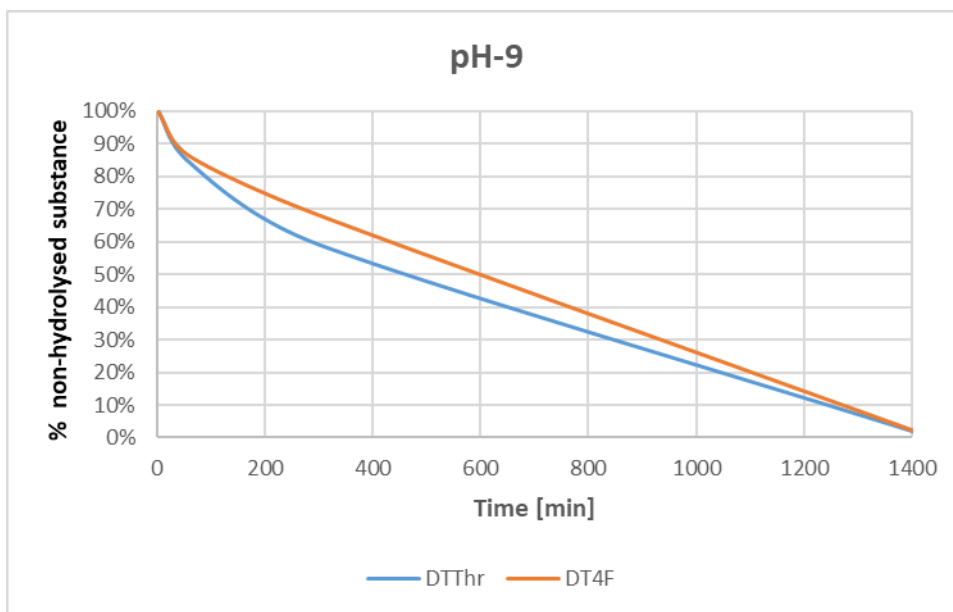
Таблица 8 Серия 2 - структура с еднобуквен аминокиселинен код, молекулна формула и аналитични данни от HPLC-MS анализ, определяне на оптичното въртене и определяне на точката на топене на новосинтезираните пептиди

Пептид	Структура	Молекулна формула	MM _{exact} [g/mol]	[M+H] ⁺ observed [g/mol]	[M+Na] ⁺ observed [g/mol]	RT [min]	α_d^{20} [°]**	Т.т. [°C]
DTA*	FLPLIGRVL-S-GIL-NH ₂	C ₆₈ H ₁₁₇ N ₁₇ O ₁₄	1395.90	1397.00	1418.95	4.513	-38	158 ± 2
DTThr	FLPLIGRVL-T-GIL-NH ₂	C ₆₉ H ₁₁₉ N ₁₇ O ₁₄	1409.91	1410.75	1432.70	4.486	-40	135 ± 1
DTTyr10	FLPLIGRVL-Y-GIL-NH ₂	C ₇₄ H ₁₂₁ N ₁₇ O ₁₄	1471.93	1472.70	1494.70	4.712	-38	145 ± 1
DTTyr1	Y-LPLIGRVLSGIL-NH ₂	C ₆₈ H ₁₁₇ N ₁₇ O ₁₅	1411.89	1412.60	-	4.177	-58	123 ± 2
DT4F	Phe(4F) -LPLIGRVLSGIL-NH ₂	C ₆₈ H ₁₁₆ FN ₁₇ O ₁₄	1413.89	1415.05	1437.10	4.177	-64	141 ± 1

*DTA е охарактеризиран в първа серия; **метанол (c=1)

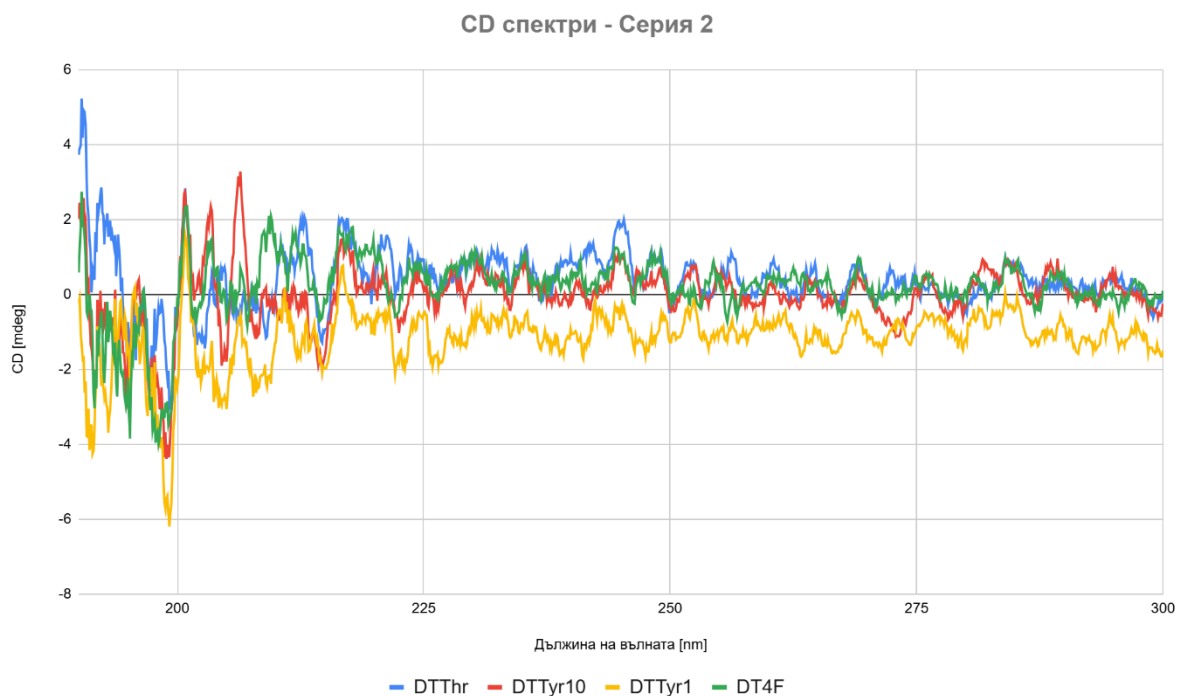
Хидролитичната стабилност на получените пептиди беше оценена в моделни системи, които възпроизвеждат условията на стомаха (pH 2.0), кръвната плазма (pH 7.4) и тънкото черво (pH 9.0) в човешкото тяло, аналогично на Серия 1.

Установено е, че всички пептиди са напълно стабилни при pH 2 и 7 по време на 24-часовия тестов период. Пептидите, които включват флуориран Phe в позиция 1 (DT4F) и Thr в позиция 10 (DTThr), се хидролизират напълно за 24 часа при pH 9. Получените данни са обобщени на фигура 26. Резултатите са в голяма степен съвместими с по-ранни открития, използващи различен клас противоракови пептиди, които са аналози на естествения соматостатин (Danalev et al., 2020). Според откритията, добавянето на халогенни атоми – т.е. флуор или хлор – намалява хидролитичната стабилност при базично pH. Този ефект е по-силен за хлорните атоми и по-слаб за флуорните атоми. Въпреки това, при трите тествани стойности на pH, аналозите с по-хидрофобна ароматна странична верига Tyr и Phe показват добра стабилност за 24 часа.



Фигура 9 Серия 2 - хидролиза на DTThr и DT4F за период от 24 часа при алкално рН.

Всички CD спектри в тази серия показват относително ниска елиптичност и са доминирани от слаби сигнали под приблизително 200 nm (Фигура 27). Над 200 nm спектрите се стабилизират и флукутират близо до нулевата елиптичност, което показва липсата на добре дефинирана вторична структура.



Фигура 10 CD спектри - серия 2

Нито един от пептидите не показва характерните CD характеристики на α -спиралните конформации. Вместо това, наблюдаваните профили са в съответствие с предимно неподредени или произволни нагъвания във воден разтвор. Сред пептидите DTThr и DTTyr10 показват много сходно спектрално поведение, като стойностите на елиптичността варират около нула в диапазона 210–300 nm. Тези профили предполагат силно гъвкави структури с минимално подреждане на пептидната верига. Пептидът DTTyr1 показва малко по-отрицателна елиптичност в голяма част от измерения диапазон, особено между 200 и 260 nm, което показва умерено увеличение на конформационното отклонение спрямо DTThr и DTTyr10, макар и все още недостатъчно, за да се посочи образуването на стабилна вторична структура. Спектърът на DT4F се припокрива до голяма степен с тези на DTThr и DTTyr10, което подкрепя заключението, че заместванията в тази пептидна серия не индуцират съществено сгъване при изследваните условия. Незначителните вариации между спектрите вероятно се дължат на специфични за страничната верига електронни ефекти, а не на промени в цялостната вторична структура. Като цяло, CD спектрите на втората серия показват, че всички пептиди остават до голяма степен неподредени в разтвор, без откриваемо съдържание на α -спирала или β -лист. Близкото сходство между спектрите показва, че въведените модификации на последователността имат само ограничено въздействие върху глобалните конформационни предпочитания на тези пептиди при използваните експериментални условия.

3. Биологични изследвания

3.1. Антибактериални/антимикотични изследвания

За да се установи чувствителността на тестваните шамове към новосинтезираните аналози от втората серия, бяха използвани два метода – дисково-дифузионен метод и микроразреждане в бульон. Като цяло, резултатите от двата метода показват, че новите пептиди не проявяват активност срещу *E. coli* 8785. Освен това, нито едно от изследваните съединения не прояви антифунгицидни свойства.

За целите на изследването посредством дисково-дифузионния метод, пептидите бяха изследвани по аналогичен начин като тези от Серия 1. Получените стойности са показани в таблица 15 за Грам-положителните шамове *B. subtilis* 3562 и *A. oxydans* 9333 и таблица 16 за Грам-отрицателните шамове *E. coli* 8785 и *P. aeruginosa* 3700. Процентът на инхибиране за *B. subtilis* 3562, *A. oxydans* 9333 и *P. aeruginosa* 3700 и при двете нива

на концентрация беше изчислен за всеки синтезиран аналог. Зоната на инхибиране на антибиотика беше взета като 100% инхибиране и процентът за всеки пептиден аналог след това беше екстраполиран. В таблица 17 са показани получените стойности от експеримента. Всички получени зони са представени в Приложение №2, таблица 2.1.

Таблица 9 Серия 2 - зони на инхибиране (средна стойност в mm със стандартно отклонение) на синтезирани пептиди и свързани антибиотици срещу Грам (+) щамове *B. subtilis* 3562 и *A. oxydans* 9333.

Пептид	Структура	<i>B. subtilis</i> 3562			<i>A. oxydans</i> 9333		
		1.4 mg/mL	10 mg/mL	Хлорамфеникол [30 µg/диск]	1.4 mg/mL	10 mg/mL	Гентамицин [10 µg/диск]
DTA*	FLPLIGRVL-S-GIL-NH ₂	8.8 ± 0.3	8.8 ± 0.8	26	6.8 ± 0.3	9.7 ± 0.6	18
DTThr	FLPLIGRVL-T-GIL-NH ₂	7.2 ± 0.3	0	24	8	10.5 ± 0.5	21
DTTyr10	FLPLIGRVL-Y-GIL-NH ₂	0	0	27	0	0	23
DTTyr1	Y-LPLIGRVL-S-GIL-NH ₂	0	0	28	10	10	22
DT4F	Phe(4F) -LPLIGRVL-S-GIL-NH ₂	8.2 ± 0.3	9.7 ± 0.3	24	10	12.8 ± 0.3	20

*DTA е охарактеризиран в първа серия;

Таблица 10 Серия 2 - зони на инхибиране (средна стойност в mm със стандартно отклонение) на синтезирани пептиди и свързани антибиотици срещу Грам (-) щамове *E. coli* 8785 и *P. aeruginosa* 3700.

Пептид	Структура	<i>E. coli</i> 8785			<i>P. aeruginosa</i> 3700		
		1.4 mg/mL	10 mg/mL	Гентамицин [10 µg/диск]	1.4 mg/mL	10 mg/mL	Гентамицин [10 µg/диск]
DTA*	FLPLIGRVL-S-GIL-NH ₂	0	0	18	7.8 ± 0.3	9.3 ± 0.6	17
DTThr	FLPLIGRVL-T-GIL-NH ₂	0	0	17.5	0	0	17
DTTyr10	FLPLIGRVL-Y-GIL-NH ₂	0	0	16.5	0	0	18
DTTyr1	Y-LPLIGRVL-S-GIL-NH ₂	0	0	17	0	0	16
DT4F	Phe(4F) -LPLIGRVL-S-GIL-NH ₂	0	0	17	9.2 ± 0.3	12.3 ± 0.6	18

*DTA е охарактеризиран в първа серия;

Таблица 11 Серия 2 - процентно инхибиране на тестваните микроорганизми от пептидни аналози в сравнение с избраните антибиотици. Антибиотиците са взети като 100% инхибиране.

Щамове	<i>B. subtilis</i> 3562		<i>A. oxydans</i> 9333		<i>P. aeruginosa</i> 3700		
	Концентрации	1.4 mg/mL	10 mg/mL	1.4 mg/mL	10 mg/mL	1.4 mg/mL	10 mg/mL
Пептид	Инхибиране (%)						
DTA*		33.8	33.8	37.8	53.9	45.9	54.7
DTThr		30.0	0.0	36.4	47.7	0.0	0.0
DTTyr10		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
DTTyr1		0.0	0.0	47.6	42.9	0.0	0.0
DT4F		32.8	48.5	50.0	64.0	51.1	68.3

*DTA е охарактеризиран в първа серия;

Резултатите от дисково-дифузионния тест показват, че флуорираният DT4F е най-активната молекула срещу двата Грам-положителни щамове, *B. subtilis* 3562 и *A. oxydans* 9333. С най-висок процент на инхибиране от 51% при по-ниска концентрация (1,4 mg/mL) и 68% при по-високата (10 mg/mL), DT4F е ефективен и срещу Грам-

отрицателната *P. aeruginosa* 3700. Следователно, флуорираният темпорин А (DT4F) показва по-висок инхибиращ потенциал, особено срещу *P. aeruginosa* 3700, в сравнение с инхибиторните зони на майчния пептид ДТА (Серия 1). Новите съединения отново са по-активни срещу Грам-положителните щамове, отколкото срещу Грам-отрицателните щамове, което е в съответствие с изследванията на Rosenfeld et al. (2006), Mangoni and Shai (2009), както и настоящите резултати от Серия 1 (Mangoni and Shai, 2009; Romero et al., 2020; Rosenfeld et al., 2006). В съответствие с предходната серия също така, нито един от новите изследвани пептиди не показва активност срещу *E. coli* 8785 (Dimitrova et al., 2024).

Зоните на инхибиране след третиране с DTThr показват, че алкилната странична верига на Thr има по-добър ефект от по-хидрофобната и ароматна странична верига на Tyr. Относно DTThr и активността му срещу *B. subtilis* 3562, може да се направи интригуващо заключение. При по-ниската тествана концентрация от 1,4 mg/mL, той образува зона на инхибиране, а при по-високата тествана концентрация от 10 mg/mL обаче, това не се случва. Този резултат е в голяма степен съвместим с констатацията на Zapadka et al. (2017), че по-високата концентрация на пептида може да повлияе отрицателно върху стабилността, правейки съединенията по-малко активни или напълно неактивни (Zapadka et al., 2017).

Добавянето на хидроксил съдържаща ароматна странична верига в десета позиция със замяна на Ser с Tyr (DTTyr10) води до пълна загуба на антибактериалната активност при дисково-дифузионния метод. Докато модифицирането на N-крайния Phe с Tyr (DTTyr1) води до частична загуба на антибактериалните свойства на пептида – DTTyr1 показва инхибиране от 47.6% при по-ниска концентрация (1,4 mg/mL) и 42.9% при по-високата (10 mg/mL).

Вторият метод, по който анализите бяха оценени въз основа на тяхната антимикробна активност беше определяне на МИС чрез микроразреждане в бульон. Изследването беше проведено аналогично на същото такова от Серия 1. Таблица 18 представя обобщени на получените стойности на МИС.

Таблица 12 Серия 2 - МИС стойности на темпорин А и новите аналози [$\mu\text{g/mL}$].

Пептид	Структура	<i>B. subtilis</i> 3562	<i>E. coli</i> 8785	<i>A. oxydans</i> 9333	<i>P. aeruginosa</i> 3700	<i>C. albicans</i> 74
DTA*	FLPLIGRVL-S-GIL-NH ₂	80 $\mu\text{g/mL}$	320 $\mu\text{g/mL}$	80 $\mu\text{g/mL}$	320 $\mu\text{g/mL}$	320 $\mu\text{g/mL}$
DTThr	FLPLIGRVL-T-GIL-NH ₂	160 $\mu\text{g/mL}$	NI	320 $\mu\text{g/mL}$	320 $\mu\text{g/mL}$	NI
DTTyr10	FLPLIGRVL-Y-GIL-NH ₂	320 $\mu\text{g/mL}$	NI	320 $\mu\text{g/mL}$	320 $\mu\text{g/mL}$	NI
DTTyr1	Y-LPLIGRVL-SGIL-NH ₂	160 $\mu\text{g/mL}$	NI	320 $\mu\text{g/mL}$	320 $\mu\text{g/mL}$	NI
DT4F	Phe(4F)-LPLIGRVL-SGIL-NH ₂	80 $\mu\text{g/mL}$	NI	160 $\mu\text{g/mL}$	80 $\mu\text{g/mL}$	NI

*DTA е охарактеризиран в първа серия; **NI – no inhibition, няма инхибиране на щама.

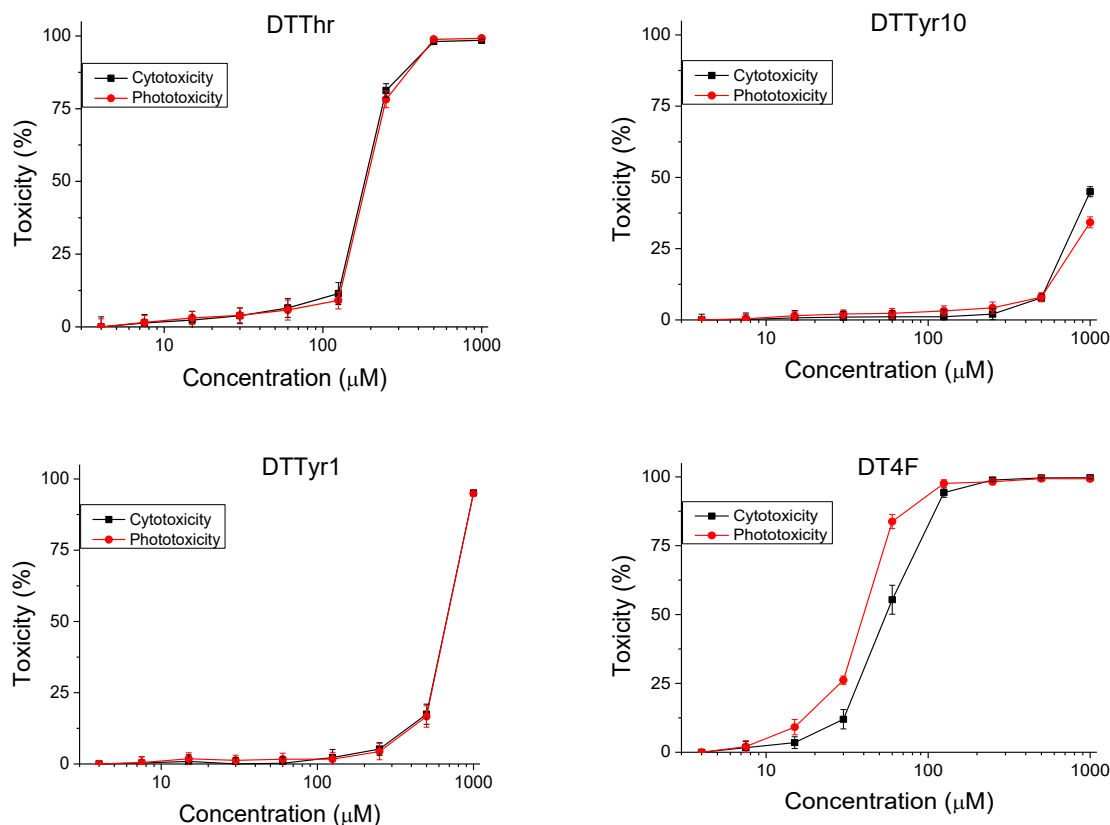
Всички целеви съединения демонстрират бактериостатични свойства срещу *B. subtilis* 3562, *A. oxydans* 9333 и *P. aeruginosa* 3700. Съгласно получените резултати от Серия 1 само майчиният пептид DTA проявява бактериостатични и фунгистатични ефекти съответно срещу щамове *E. coli* 8785 и *C. albicans* 74. Сред новите аналози срещу *B. subtilis* 3562, *A. oxydans* 9333 и *P. aeruginosa* 3700, аналогът DT4F и по този метод има най-ниските стойности на MIC. Флуорираният DT4F показва потенциал, сравним или дори по-висок от този на повечето съединения, в сравнение със стойностите на MIC на майчиния пептид DTA. Неговата MIC стойност срещу *P. aeruginosa* 3700 е четири пъти по-ниска от тази на DTA (320 µg/mL).

Аналогът DTTyr10 показва инхибираща способност и стойности за MIC от 320 µg/mL бяха установени при *B. subtilis* 3562, *A. oxydans* 9333 и *P. aeruginosa* 3700. Същият обаче нямаше зони на инхибиране срещу нито един от тестваните щамове. Както беше споменато по-горе разликите между двата метода по отношение на взаимодействието на пептида със средата и бактериалните клетки биха могли да бъдат една от причините за наблюдаваните резултати (Mercer et al., 2020).

Новият пептид с пространствено по-ограничен Thr (DTThr) остатък има по-добри антибактериални свойства срещу *B. subtilis* 3562 и същата активност срещу другия Грам-положителен щам, *A. oxydans* 9333, и Грам-отрицателните бактерии, *P. aeruginosa* 3700, в сравнение от ефектът на заместването на Ser остатъка в позиция 10 с Tyr.

3.2. Определяне на цитотоксичност, фототоксичност и антипролиферативна активност

Резултатите показаха значително намаляване на токсичността – съответно шест и повече от десет пъти – когато майчиният пептид DTA е модифициран в позиции 1 или 10 с Tyr (DTTyr1, DTTyr10). Следователно е възможно да се предположи, че майчината DTA молекула с ароматен пръстен и хидроксилна функция от фенолен тип е по-малко токсична от такава, която е алифатна (Ser¹⁰) или липсва ОН група (Phe¹). Следователно с най-ниска цитотоксичност са пептидите DTTyr10 със стойност на CC₅₀ > 1000 µM и DTTyr1 със стойност на CC₅₀ = 668.98 ± 13.39 µM. От друга страна, цитотоксичността се удвоява в сравнение с майчиния пептид, когато флуорът е добавен към първичната структура на пептида чрез заместване на протеиногенния Phe в позиция 1 с флуориран Phe(4-F) (DT4F) (Фигура 28 и Таблица 19). Въпреки това, нито един от новите аналози на Темпорин А не показва фототоксичност.



Фигура 11 Серия 2 - криви доза-отговор за цито- и фототоксичност на пептидни аналози, определени в клетъчна линия BALB 3T3 клон А31. Стойностите са средни стойности \pm SD, $n = 6$.

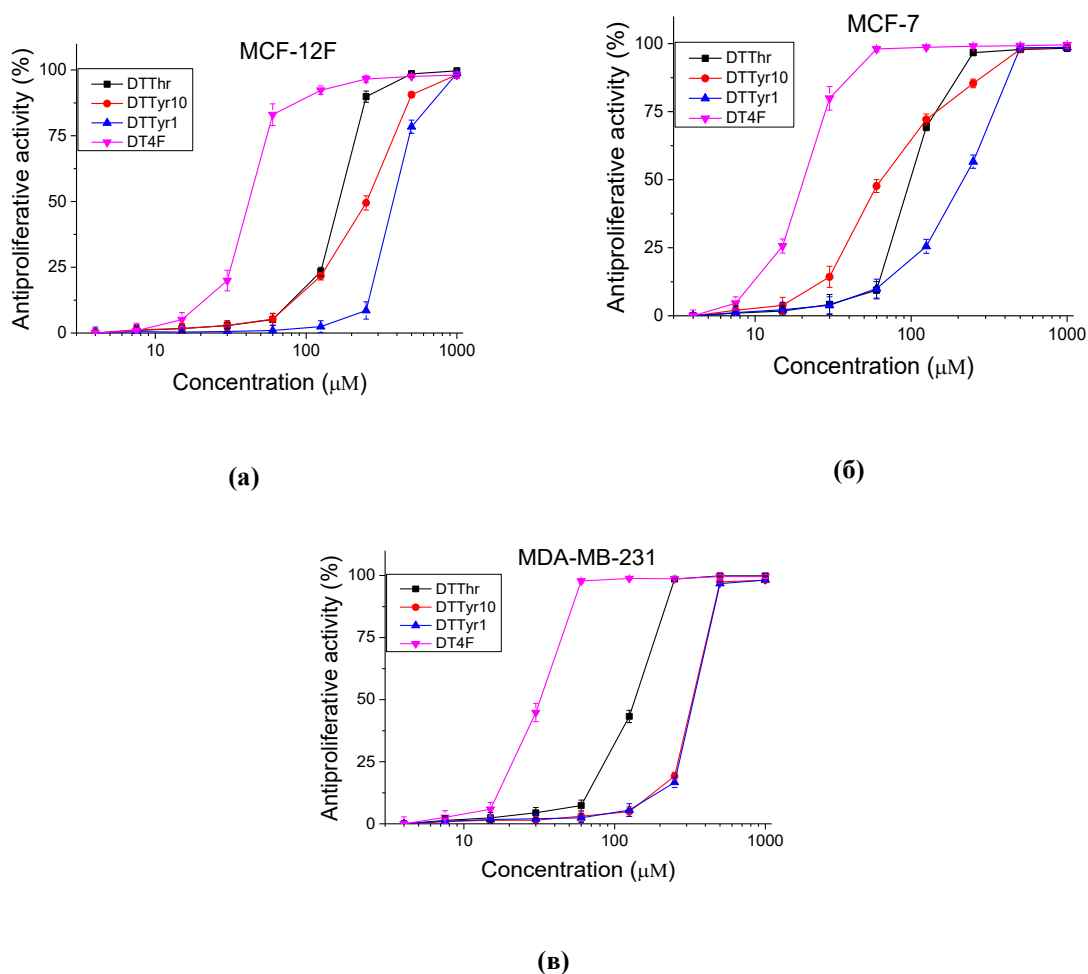
Таблица 13 Серия 2 - цитотоксичност/фототоксичност в клетъчна линия BALB 3T3 клон А31, средни стойности на CC_{50} и PIF фактор

Пептид	Средни $CC_{50} \pm SD$ (μM)		PIF**
	- Irr	+ Irr*	
DTA***	106.32 \pm 4.18	105.40 \pm 4.88	1.01
DTThr	183.36 \pm 2.91	188.42 \pm 3.55	1.0
DTTyr10	> 1000	> 1000	-
DTTyr1	668.98 \pm 13.39	670.76 \pm 12.2	1.0
DT4F	55.41 \pm 4.64	39.99 \pm 0.78	1.4

* Irr – облъчване; ** PIF - фактор на фотодразнене: $PIF < 2 =$ не е фототоксичен, $2 < PIF < 5 =$ вероятна фототоксичност, $PIF > 5$ фототоксичен; *** данните са от взети от Серия 1 за DTA

In vitro модел на базален В-тип (MDA-MB-231 клетки) и луминален тип А (MCF-7 клетки) рак на гърдата бяха използвани за изследване на антипролиферативната активност на аналозите в серия 2 (Фигура 29 и Таблица 20). Като модел на здрава тъкан беше избрана нетуморогенната клетъчна линия MCF-12F. За всеки пептид средните стойности на IC_{50} бяха сравними при базалния тип рак на гърдата и нетуморогенната клетъчна линия. Това показва, че по отношение на базалния тип рак на гърдата, тестваните пептиди не са имали селективност. От друга страна, много по-ниски

стойности на IC_{50} бяха открити при луминалния тип рак. Пептидът DTTyr10 показва най-висока селективност срещу MCF-7 клетки със селективен индекс от 3.9. Освен това, пролиферацията на MCF-7 клетките беше 50% инхибирана от съединението DTTyr10 при концентрация от 64.51 μ M, докато нетуморогенните клетки (MCF-12F) не показаха антипролиферативна активност при същата концентрация. Следователно, резултатите показват, че терапия с DTTyr10 може да бъде полезна при лечението на луминален рак на гърдата.



Фигура 12 Серия 2 - антипролиферативна активност на пептидни аналози, определена в (а) нетуморогенни MCF-12F клетки, (б) туморни клетъчни линии MCF-7 и (в) MDA-MB-231, $n = 6$.

Таблица 14 Серия 2 - средни стойности на IC_{50} и индекс на селективност

Пептид	Средни $IC_{50} \pm SD$ (μ M)			Индекс на селективност (SI)*	
	MCF-12F	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-7	MDA-MB-231
DTA**	138.65 \pm 8.36	73.15 \pm 3.36	115.13 \pm 4.04	1.90	1.20
DTTThr	165.09 \pm 2.21	98.57 \pm 1.19	136.12 \pm 3.61	1.67	1.21
DTTyr10	251.44 \pm 11.81	64.51 \pm 3.93	328.47 \pm 2.62	3.9	0.77
DTTyr1	317.74 \pm 9.79	216.37 \pm 10.3	333.55 \pm 3.72	1.75	1.13
DT4F	41.78 \pm 1.64	20.33 \pm 0.60	32.05 \pm 1.43	2.06	1.3

* индекс на селективност, $SI = IC_{50}(\text{MCF-12F}) / IC_{50}(\text{туморни клетки})$; ** ДТА е охарактеризиран в първа серия

Поради тяхната противотуморна активност, халогенираните аминокиселини – особено флуорираните – са привлекли голям интерес за използване в терапията на ракови заболявания (Giese et al., 2008). Резултатите, получени от флуорирания пептид DT4F, потвърждават благоприятното въздействие на флуорния атом върху антипролиферативната активност. С малко по-висок селективен индекс от майчината молекула, този аналог демонстрира значима селективност по отношение на луминален тип А (MCF-7 клетки) рак на гърдата.

III. Трета серия аналози

1. Дизайн

Модификациите в Серия 3 са направени след пълното охарактеризиране и изследване на предходните две серии, за да се изберат най-обещаващите замени и да се продължи работата в тази насока. За целта бяха избрани аналози от предходните две серии, които показват добра антимикуробна активност, ниска цитотоксичност спрямо здрави клетки и/или значителна антипролиферативна активност. Модификациите от избраните аналози след това бяха комбинирани, за да се получат пептиди с две или три модификации в структурата си.

Както е описано по-горе, халогенирането представлява интересен подход за обогатяване и/или подобряване на характеристиките на пептидите, затова и беше продължена тази линия с два нови халогенирани пептида. Беше избран Phe(2F), за да се изследва ефекта от позицията на флуорния атом в страничната верига на Phe. Също така беше използван и хлориран Phe (Phe(4Cl)), за да се оценят различните свойства на използвания халоген в пара позиция на фенилаланина.

2. Анализи за охарактеризиране

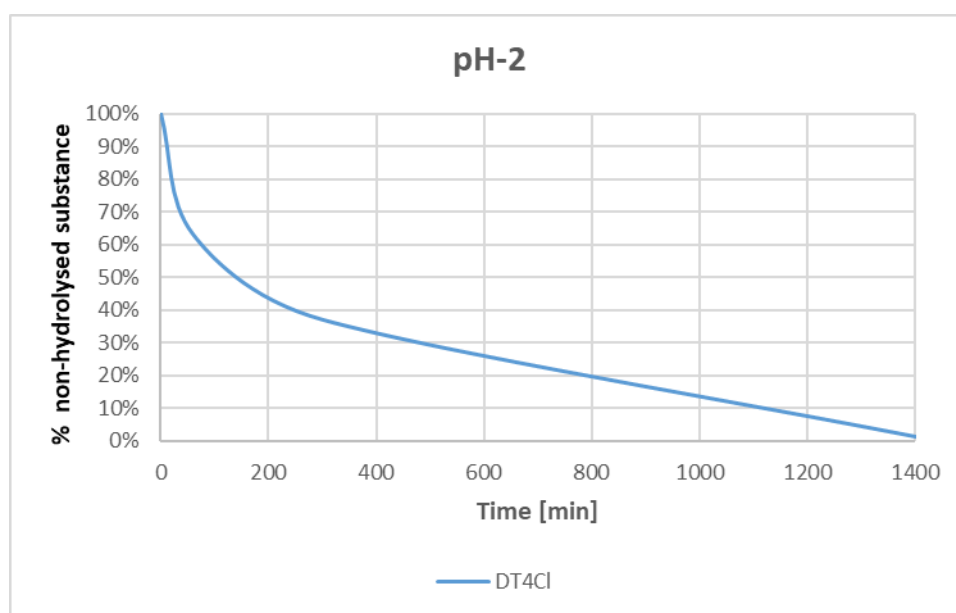
Всеки пептид е получен следвайки Fmoc/Ot-Bu стратегия за твърдофазен пептиден синтез. Физикохимичните свойства на новосинтезираните съединения са обобщени в таблица 21. В Приложение 1 са представени HPLC и MS профили на съединения от серия 3 на фигури 3.1 – 3.8. Всички новосинтезирани пептиди, подложени на тестове за биологична активност, са с над 95% хроматографска чистота.

Таблица 15 Серия 3 - структура с еднобуквен аминокиселинен код, молекулна формула и аналитични данни от HPLC-MS анализ, определяне на оптичното въртене и определяне на точката на топене на новосинтезираните пептиди

Пептид	Структура	Молекулна формула	MM exact [g/mol]	[M+H] ⁺ observed [g/mol]	[M+Na] ⁺ observed [g/mol]	RT [min]	α_d^{20} [°] ^{***}	Т.т. [°C]
DTA*	FLPLIGRVL-S-GIL-NH ₂	C ₆₈ H ₁₁₇ N ₁₇ O ₁₄	1395.90	1397.00	1418.95	4.513	-38	158 ± 2
DT4F**	Phe(4F) -LPLIGRVLSGIL-NH ₂	C ₆₈ H ₁₁₆ FN ₁₇ O ₁₄	1413.89	1415.05	1437.10	4.177	-64	141 ± 1
DT2F	Phe(2F) -LPLIGRVLSGIL-NH ₂	C ₆₈ H ₁₁₅ FN ₁₆ O ₁₅	1413.89	1415.10	1437.05	4.487	-96	142 ± 3
DT4Cl	Phe(4Cl) -LPLIGRVLSGIL-NH ₂	C ₆₈ H ₁₁₆ CLN ₁₇ O ₁₄	1429.86	1430.85	1452.85	6.535	-36	144 ± 2
DT4FCi	Phe(4F) -LPLIG-Cit-VLSGIL-NH ₂	C ₆₈ H ₁₁₅ FN ₁₆ O ₁₅	1414.87	1416.00	1437.95	7.396	-40	182 ± 2
DT4FCiY	Phe(4F) -LPLIG-Cit-VLYSGIL-NH ₂	C ₇₄ H ₁₁₉ FN ₁₆ O ₁₅	1490.90	1492.05	1514.00	7.761	-42	190 ± 2

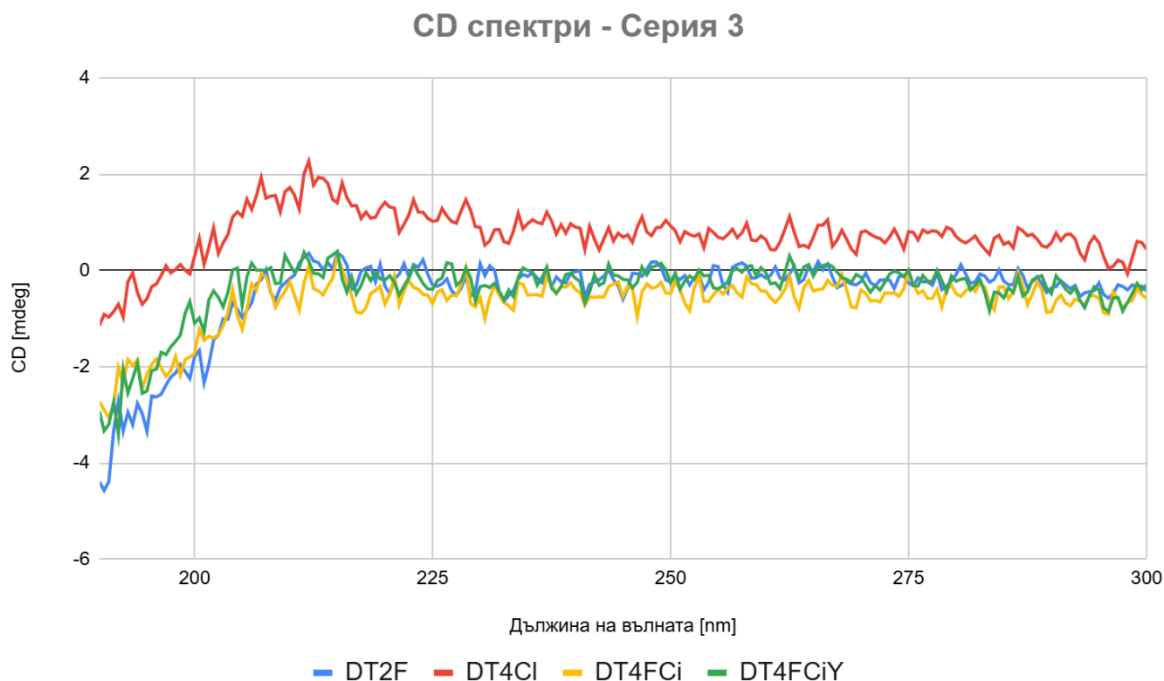
*DTA е охарактеризиран в първа серия; **DT4F е охарактеризиран във втора серия; ***метанол (c=1)

Хидролитичната стабилност на получените пептиди е оценена в моделни системи, които възпроизвеждат условията на стомаха (pH 2.0), кръвната плазма (pH 7.4) и тънкото черво (pH 9.0) в човешкото тяло. Получените данни са обобщени на фигура 30. Всички пептиди от Серия 3 са стабилни при неутрално и алкално pH. Интересно поведение проявява хлорираният пептид DT4Cl, който се хидролизира напълно при киселинно pH, а остава стабилен при алкално. Докато флуорираният аналог DT2F има напълно обратното поведение и остава стабилен при pH 2.0.



Фигура 13 Серия 3 - хидролиза на DT4Cl за период от 24 часа при киселинно pH.

CD спектрите в серия 3 имат подобрена стабилност на сигнала над 200 nm, докато в дълбоката далечна UV област под тази дължина на вълната се наблюдава повишен шум (Фигура 31). Нито един от пептидите не показва характерните CD маркери на добре дефинирани вторични структури.



Фигура 14 CD спектри - серия 3

Пептидите DT2F, DT4FCi и DT4FCiY показват подобни CD профили, характеризиращи се с умерено отрицателна елиптичност в областта 190–200 nm, последвана от почти нулева елиптичност в диапазона от 210 до 300 nm, съответстващо на предимно неподредени или произволни конформации. За разлика от това, пептидът DT4Cl показва отчетливо различен профил, с положителна елиптичност, простираща се в голяма част от областта 205–300 nm, и широк максимум близо до 210–220 nm. Въпреки, че този спектър не съответства на типичните за α -спирална или β -листова структури маркери, повишената положителна елиптичност, вероятно в следствие на засилени електростатични взаимодействия или свързване между страничната верига и гръбнака. Като цяло, данните от CD показват, че пептидите от Серия 3 остават до голяма степен неподредени при използваните експериментални условия.

3. Биологични изследвания

3.1. Антибактериални/антимикотични изследвания

За да се установи чувствителността на тестваните шамове към новосинтезираните аналози от серия 3, бяха използвани два метода – дисково-дифузионен метод и микроразреждане в бульон. Анализите от Серия 3 бяха изследвани по аналогичен начин като тези от Серия 1 и 2. Беше установено, че с изключение на двата халогенирани

аналога DT2F и DT4Cl, направените модификации при останалите два аналога са довели до пълна загуба на антимикробна активност и при двата използвани метода.

За целите на изследването посредством дисково-дифузионния метод, пептидите бяха изследвани по аналогичен начин като тези от Серия 1 и 2. Получените стойности са показани в таблица 22 за Грам-положителните щамове *B. subtilis* 3562 и *A. oxydans* 9333 и таблица 23 за Грам-отрицателните щамове *E. coli* 8785 и *P. aeruginosa* 3700. Процентът на инхибиране за *B. subtilis* 3562, *A. oxydans* 9333 и *P. aeruginosa* 3700 и при двете нива на концентрация беше изчислен за всеки синтезиран аналог. Зоната на инхибиране на антибиотика беше взета като 100% инхибиране и процентът за всеки пептиден аналог след това беше екстраполиран. Таблица 24 предоставя обобщение на стойностите. Всички получени зони са представени в Приложение №2, таблица 3.1.

Таблица 16 Серия 3 - зони на инхибиране (средна стойност в mm със стандартно отклонение) на синтезирани пептиди и свързани антибиотици срещу Грам (+) щамове *B. subtilis* 3562 и *A. oxydans* 9333.

Пептид	Структура	<i>B. subtilis</i> 3562			<i>A. oxydans</i> 9333		
		1.4 mg/mL	10 mg/mL	Хлорамфеникол [30 µg/диск]	1.4 mg/mL	10 mg/mL	Гентамицин [10 µg/диск]
DTA*	FLPLIGRVL-S-GIL-NH ₂	8.8 ± 0.3	8.8 ± 0.8	26	6.8 ± 0.3	9.7 ± 0.6	18
DT4F**	Phe(4F)-LPLIGRVLSGIL-NH ₂	8.2 ± 0.3	9.7 ± 0.3	24	10	12.8 ± 0.3	20
DT2F	Phe(2F)-LPLIGRVLSGIL-NH ₂	10.2 ± 0.2	13.9 ± 0.3	29	10.8 ± 0.3	13.1 ± 0.5	20
DT4Cl	Phe(4Cl)-LPLIGRVLSGIL-NH ₂	9.1 ± 0.2	9.7 ± 0.2	29	7.2 ± 0.3	8.3 ± 0.5	18

*DTA е охарактеризиран в първа серия; **DT4F е охарактеризиран във втора серия.

Таблица 17 Серия 3 - зони на инхибиране (средна стойност в mm със стандартно отклонение) на синтезирани пептиди и свързани антибиотици срещу Грам (-) щамове *E. coli* 8785 и *P. aeruginosa* 3700.

Пептид	Структура	<i>E. coli</i> 8785			<i>P. aeruginosa</i> 3700		
		1.4 mg/mL	10 mg/mL	Гентамицин [10 µg/диск]	1.4 mg/mL	10 mg/mL	Гентамицин [10 µg/диск]
DTA*	FLPLIGRVL-S-GIL-NH ₂	0	0	18	7.8 ± 0.3	9.3 ± 0.6	17
DT4F**	Phe(4F)-LPLIGRVLSGIL-NH ₂	0	0	17	9.2 ± 0.3	12.3 ± 0.6	18
DT2F	Phe(2F)-LPLIGRVLSGIL-NH ₂	0	0	22	8.2 ± 0.5	11.3 ± 0.3	17
DT4Cl	Phe(4Cl)-LPLIGRVLSGIL-NH ₂	0	0	22	8.7 ± 0.2	11.7 ± 0.4	17

*DTA е охарактеризиран в първа серия; **DT4F е охарактеризиран във втора серия.

Таблица 18 Серия 3 - процентно инхибиране на тестваните микроорганизми от пептидни аналози в сравнение с избраните антибиотици. Антибиотиците са взети като 100% инхибиране.

Щамове	<i>B. subtilis</i> 3562		<i>A. oxydans</i> 9333		<i>P. aeruginosa</i> 3700	
	Концентрации	1.4 mg/mL	10 mg/mL	1.4 mg/mL	10 mg/mL	1.4 mg/mL
Пептид	Инхибиране (%)					
DTA*	33.8	33.8	37.8	53.9	45.9	54.7
DT4F**	32.8	48.5	50.0	64.0	51.1	68.3
DT2F	33.8	33.8	37.8	53.9	48.2	66.5
DT4Cl	34.2	40.4	50.0	64.0	51.2	68.8

*DTA е охарактеризиран в първа серия; **DT4F е охарактеризиран във втора серия.

Резултатите от дисково-дифузионния метод показват, че позицията на халогена в страничната верига на Phe оказва върху антибактериалната активност на пептида. При аналога с флуор в орто позиция на бензеновия пръстен (DT2F) инхибира в по-малка степен в сравнение с аналога с флуор в пара позиция (DT4F). Разглеждайки размера на зоните между аналога с хлор (DT4Cl) и този с флуор (DT4F) в пара позиция, става ясно, че флуорът е по-подходящия халоген. Флуорът допринася с неговия по-малък размер, ниска маса, както и по-висока реактивност за постигане на по-добри резултати (Gillis et al., 2015; Swallow, 2015).

Вторият метод, по който аналозите бяха оценени въз основа на тяхната антимикробна активност, беше определяне на MIC чрез микроразреждане в бульон. Изследването беше проведено аналогично на същото такова от Серия 1 и 2. В таблица 25 са показани обобщените получените стойности на MIC от експеримента.

Таблица 19 Серия 3 - MIC стойности Темпорин А и новите аналози [$\mu\text{g/mL}$].

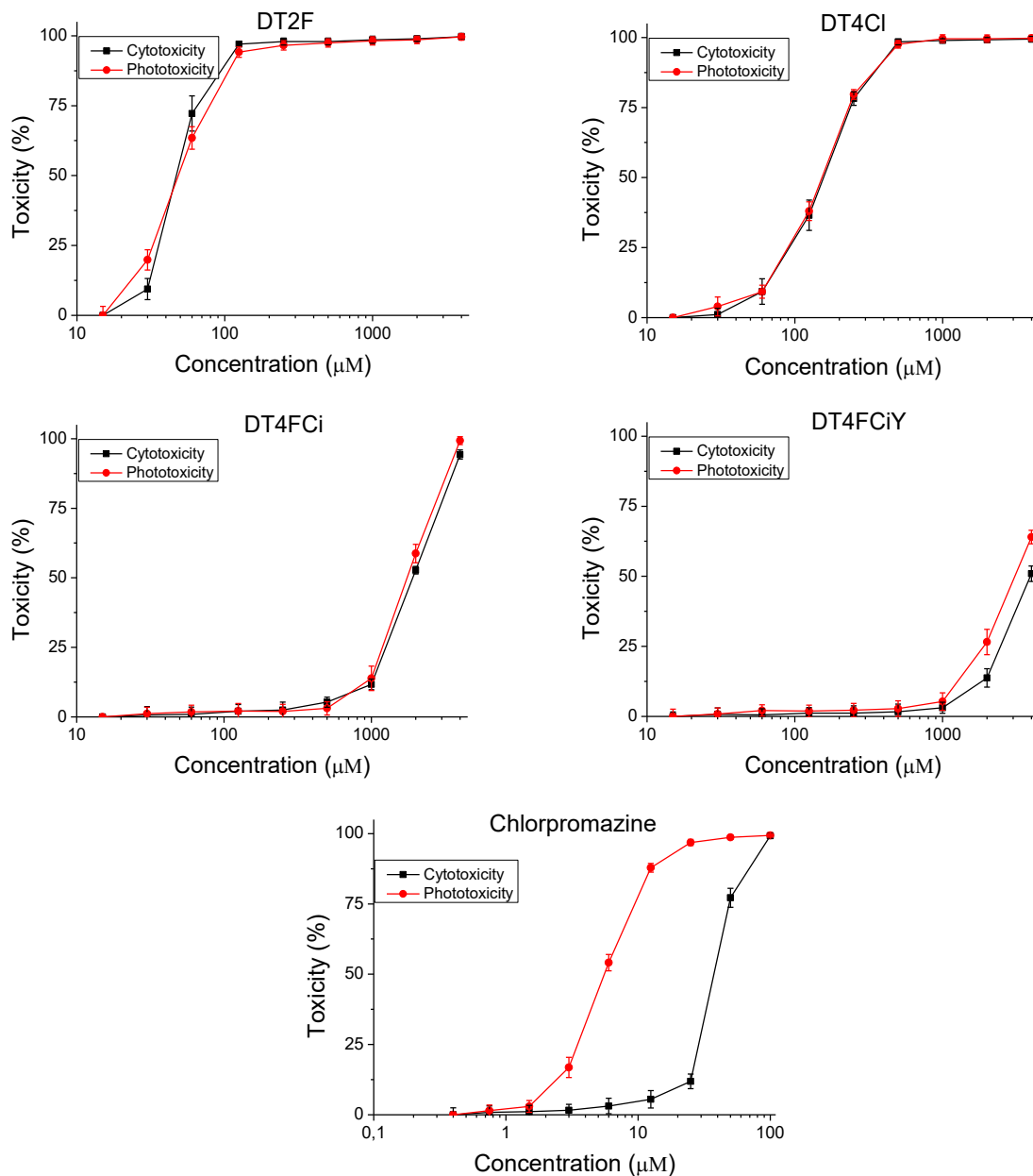
Пептид	Структура	<i>B. subtilis</i> 3562	<i>E. coli</i> 8785	<i>A. oxydans</i> 9333	<i>P. aeruginosa</i> 3700	<i>C. albicans</i> 74
DTA*	FLPLIGRVL-S-GIL-NH ₂	80 $\mu\text{g/mL}$	320 $\mu\text{g/mL}$	80 $\mu\text{g/mL}$	320 $\mu\text{g/mL}$	320 $\mu\text{g/mL}$
DT4F**	Phe(4F)-LPLIGRVLSGIL-NH ₂	80 $\mu\text{g/mL}$	NI	160 $\mu\text{g/mL}$	80 $\mu\text{g/mL}$	NI
DT2F	Phe(2F)-LPLIGRVLSGIL-NH ₂	160 $\mu\text{g/mL}$	NI	160 $\mu\text{g/mL}$	160 $\mu\text{g/mL}$	NI
DT4Cl	Phe(4Cl)-LPLIGRVLSGIL-NH ₂	160 $\mu\text{g/mL}$	NI	160 $\mu\text{g/mL}$	160 $\mu\text{g/mL}$	NI

*DTA е охарактеризиран в първа серия; **DT4F е охарактеризиран във втора серия; ***NI – no inhibition, няма инхибиране на щама.

MIC стойностите затвърждават изводите от определянето на процента инхибиране. Флуорът е по-подходящия халоген в сравнение с хлора и пара позицията му в страничната верига на Phe дава най-добри MIC стойности.

3.2. Определяне на цитотоксичност, фототоксичност и антипролиферативна активност

Наблюдаваният ефект (цитотоксичност / фототоксичност) е от дозозависим тип (Фигура 32). Въз основа на получените сигмоидални криви са изчислени средните CC_{50} стойности за всеки изследван пептид (Таблица 26). С най-ниска цитотоксичност е пептидът DT4FCiY със стойност на $CC_{50} = 3924.03 \pm 147.66$. Изследваните пептиди не проявяват фототоксичност – не се наблюдава статистически достоверна разлика в CC_{50} стойностите, при облъчените пептиди спрямо необлъчените.



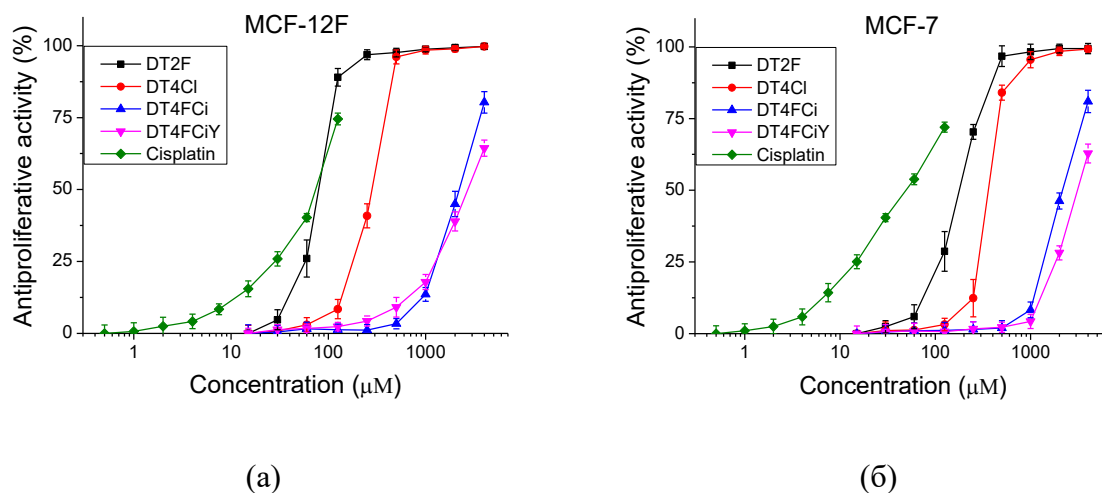
Фигура 15 Серия 3 - криви доза-отговор за цито- и фототоксичност на пептидни анализи, определени в клетъчна линия BALB 3T3 клон A31. Стойностите са средни стойности \pm SD, $n = 6$.

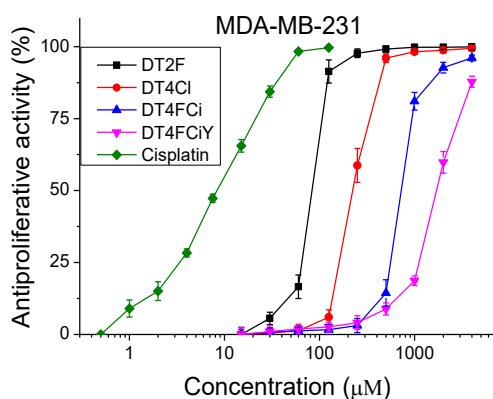
Таблица 20 Серия 3 - цитотоксичност/фототоксичност в клетъчна линия BALB 3T3 клон А31, средни стойности на CC_{50} и PIF фактор

Пептид	Средни $CC_{50} \pm SD$ (μM)		PIF**
	- Irr	+ Irr*	
DTA***	106.32 \pm 4.18	105.40 \pm 4.88	1.01
DT4F****	55.41 \pm 4.64	39.99 \pm 0.78	1.4
DT2F	47.16 \pm 2.49	48.66 \pm 2.58	0.97
DT4CI	155.87 \pm 10.33	152.43 \pm 5.65	1.02
DT4FCi	1909.78 \pm 37.90	1747.76 \pm 96.78	1.09
DT4FCiY	3924.03 \pm 147.66	3084.02 \pm 101.33	1.27
Chlorpromazine****	37.47 \pm 0.63	5.57 \pm 0.27	6.73

* Irr – облъчване; ** PIF - фактор на фотодразнене: PIF < 2 = не е фототоксичен, 2 < PIF < 5 = вероятна фототоксичност, PIF > 5 фототоксичен; *** данните са от взети от Серия 1 за DTA и съответно Серия 2 за DT4F; **** хлорпромазин – позитивна контрола

In vitro модел на базален В-тип (MDA-MB-231 клетки) и луминален тип А (MCF-7 клетки) рак на гърдата бяха използвани за изследване на антипролиферативната активност на аналозите в серия 3 (Фигура 33 и Таблица 27). Като модел на здрава тъкан беше използвана нетуморогенната клетъчна линия MCF-12F. Средните стойности IC_{50} за всеки пептид са сравними при луминалния рак на гърдата и нетуморогенната клетъчна линия. Като това показва, че не притежават селективност към този тип рак. Тестваните пептиди са показали по-висока селективност спрямо базалния тип рак на гърдата.





(в)

Фигура 16 Серия 3 - антипролиферативна активност на пептидни аналози, определена в (а) нетуморогенни MCF-12F клетки, (б) туморни клетъчни линии MCF-7 и (в) MDA-MB-231, $n = 6$.

Пептидът DT4FCi показва най-висока селективност срещу MDA-MB-231 клетки, със селективен индекс от 3.03. Също така този аналог има доста високи CC_{50} стойности и липса на фототоксичност, което разкрива потенциалът му за безопасно локално и системно приложение. Модификацията в позиция 10 на Ser с Tug води до понижена селективност на пептида DT4FCiY и към двете туморогенни линии. Това показва, че въвеждането на Tug с обемния си, неполярен ароматен бензенев пръстен, бидейки по-малко полярен и по-хидрофобен като цяло от хидроксиметилова странична верига на серина, води до намаляване на антипролиферативната активност.

Таблица 21 Серия 3 - средни стойности на IC_{50} и индекс на селективност

Пептид	Средни $IC_{50} \pm SD$ (μM)			Индекс на селективност (SI)**	
	MCF-12F	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-7	MDA-MB-231
DTA**	138.65 \pm 8.36	73.15 \pm 3.36	115.13 \pm 4.04	1.90	1.20
DT4F**	41.78 \pm 1.64	20.33 \pm 0.60	32.05 \pm 1.43	2.06	1.3
DT2F	79.19 \pm 4.22	177.43 \pm 13.95	83.25 \pm 3.09	0.44	0.95
DT4Cl	279.24 \pm 11.63	359.74 \pm 11.95	224.38 \pm 16.33	0.77	1.24
DT4FCi	2191.94 \pm 164.95	2151.25 \pm 105.47	723.73 \pm 18.02	1.02	3.03
DT4FCiY	2703.96 \pm 109.19	3102.74 \pm 168.33	1707.14 \pm 77.48	0.87	1.58
Cisplatin***	72.97 \pm 2.11	49.28 \pm 3.16	8.34 \pm 0.47	1.48	8.75

*индекс на селективност, $SI = IC_{50}(\text{MCF-12F}) / IC_{50}(\text{туморни клетки})$; ** данните са от взети от Серия 1 за DTA и съответно Серия 2 за DT4F; *** цисплатин – позитивна контрола;

Халогенираните аналози DT2F и DT4Cl имат сравнително ниски IC_{50} стойности, но не проявяват достатъчно значима селективност към двата типа рак. Сравнявайки ги с аналогът от Серия 2 DT4F се вижда, че той има почти 5 пъти по-висока селективност към луминалния тип рак спрямо DT2F, показвайки, че позицията на флуора в молекулата на фенилаланина е от съществено значение за антипролиферативната активност. Също така

и видът на халогена оказва влияние върху селективността. В заключение може да се каже, че аналогът DT4F, заместен в пара-позиция с флуориран фенилаланин показва най-голям потенциал от халогенираните аналози с една замяна в молекулата на темпорин А.

ОБОБЩЕНИЕ

В настоящия дисертационен труд успешно са получени три серии аналози на темпорин А с различните модификации в позиции 1, 7 и 10 с непротеиногенни и други природни аминокиселини. Темпорин А и неговите нови аналози бяха синтезирани чрез твърдофазен пептиден синтез по Fmoc/Ot-Bu стратегия. Всички създадени аналози, както и темпорин А, бяха охарактеризирани и подложени на биологични изследвания за определяне на тяхната антимикробна активност, безопасност и антипролиферативна активност. Охарактеризирането на пептидите беше извършено на база HPLC/MS анализи за доказване на структурата и чистота, изследване на хидролитичната им стабилност, температура на топене и изследване на оптичната им активност чрез кръгов дихроизъм и определяне на ъгъла на въртене. Биологичните изследвания включват определяне на антимикробната активност чрез два метода – дисково-дифузионен и микроразреждане в бульон, както и тестове за цитотоксичност, фототоксичност и противотуморна активност.

В Серия 1 се изследва базичността и обема на страничната верига в позиция 7. Получените съединения са с висока чистота и не образуват специфични вторични структури във воден разтвор. Най-добра антибактериална активност се получава при две метиленови групи в страничната верига (DTDab). Този пептид показва и пълна стабилност в трите рН стойности. DTF с Lys е най-добрият аналог за комбиниране на антибактериална и антипролиферативна активност, но с понижена стабилност при алкално рН. Елиминирането на положителния заряд с използване Cit (DTCit) води до липса на антибактериални свойства и загуба на стабилност при рН=9. Към клетъчната линия MCF-7 този аналог има най-висока селективност, сравнително ниска цитотоксичност, липса на фототоксичност и адекватна антипролиферативна активност.

Всички промени в Серия 2 са предназначени да имитират естествено присъстващите аминокиселини в първичната структура на Темпорин А с подобни протеиногенни или непротеиногенни аминокиселини, за да се проучи тяхното значение за биологичната активност и стабилност. Получените съединения са с висока чистота и не образуват специфични вторични структури във воден разтвор. Според резултатите от изследванията на връзката структура-активност, съдържащият флуорен атом аналог DT4F показва висока антипролиферативна активност и селективност срещу луминален тип А (MCF-7 клетки) рак на гърдата, както и обещаваща антибактериална активност, когато се вземат предвид резултатите от двата метода на тестване. Аналогът DT4F е

обещаващ кандидат за медицинско лекарство, което комбинира антимикробна и антипролиферативна активност, въпреки че има по-висока цитотоксичност в сравнение с майчиния пептид DTA и по-малка хидролитична стабилност при основно рН 9. Ароматната странична верига на позиция 10 усилва антипролиферативната активност, както и понижава цитотоксичността към здравите клетки. За антибактериалната активност Thr е по-добър вариант на позиция 10 от Ser.

За серия 3 бяха избрани най-обещаващите пептидни аналози от предходните серии и бяха комбинирани, така че да се получат аналози с повече от една замяна. Също така бяха направени допълнителни халогенирани аналози с цел по-обстойно проучване на влиянието от мястото, както и вида на използвания халоген. Резултатите от замените с различен халоген и позицията на флуора в бензеновия пръстен на Phe показаха, че флуорът в пара позиция в страничната верига на Phe (DT4F) дава най-силна антибактериална активност. Комбинацията от направени повече от една замени в Серия 3 доведе до пълна загуба на антибактериална активност при аналозите DT4FCi и DT4FCiY. За сметка на това получените двойно и тройно заместени аналози (DT4FCi и DT4FCiY) са напълно безопасни за употреба, както и с доста значима селективност към базалния тип рак на гърдата MDA-MB-231. Също така са стабилни и при трите рН системи.

При всички новосинтезирани пептиди от трите серии, както и майчиният пептид DTA, спектрите от кръговия дихроизъм показва липса на характерните елементи на добре дефинирани вторични структури.

ИЗВОДИ

Въз основа на проведените експерименти в настоящия дисертационен труд могат да бъдат изведените следните изводи:

1. Синтезирани и охарактеризирани са темпорини А и F, както и 4 нови аналози с обща структура FLPLIG- X^7 -VLSGIL-NH₂, където X^7 означава Arg, Lys, Cit, Orn, Dab и Dar.
2. Синтезирани и охарактеризирани са 2 нови аналози на темпорин А с обща структура FLPLIGRVL- X^{10} -GIL-NH₂, където X^{10} = Tyr или Thr.
3. Синтезирани и охарактеризирани са 4 нови аналози на темпорин А с обща X^1 -LPLIGRVLSGIL-NH₂, където X^1 е Tyr, Phe(4-F), Phe(2-F) или Phe(4-Cl).
4. Синтезирани и охарактеризирани са 2 нови аналози на темпорин А с две и три замени със следните структури **Phe(4F)-LPLIG-Cit-VLSGIL-NH₂** и **Phe(4F)-LPLIG-Cit-VL-Y-SGIL-NH₂**.
5. При аналозите с обща структура FLPLIG- X^7 -VLSGIL-NH₂ антимикуробните изследвания показват, че две метиленови групи в страничната верига са оптимални за антибактериалната активност (DTDab). При премахване на положителния заряд, антибактериалната активност и стабилността при алкално рН намалява в продължение на 24 часа, но се подобрява значително селективността при значителна антипролиферативната активност и ниска цитотоксичност (DTCit). Най-добра комбинирана антимикуробна и антипролиферативна активност се получава при по-дълга и с аминокиселинна странична верига (DTF), но с понижена стабилност при алкално рН.
6. При аналозите с обща структура FLPLIGRVL- X^{10} -GIL-NH₂ антимикуробните изследвания показаха, че наличието на вторична ОН група в страничната верига на аминокиселината води до подобрена антибактериална активност, но отслабена стабилност при базично рН (DTThr), докато ароматната странична верига, съчетана с ароматна ОН група усилва антипролиферативна активност при запазена антибактериална активност спрямо Грам-положителните бактерии и Грам-отрицателните *P. aeruginosa* 3700 (DTTyr10).
7. SAR изследванията на аналози с обща структура X^1 -LPLIGRVLSGIL-NH₂ показаха, че въвеждането на флуорирани аминокиселини в първичната структура на пептида усилва антибактериалния ефект, но наличието на флуор води до намалена стабилност при алкално рН и увеличена цитотоксичност

спрямо нормална клетъчна линия BALB 3T3 клон А31, съчетано с висок селективен индекс към луминалния тип рак на гърдата MCF-7.

8. От направените биологични изследвания върху новосинтезираните 2 нови аналога с две и три замени със следните структури **Phe(4F)-LPLIG-Cit-VLSGIL-NH₂** (DT4FCi) и **Phe(4F)-LPLIG-Cit-VL-Y-SGIL-NH₂** (DT4FCiY) се наблюдава загуба на антибактериалната активност, като аналогът DT4FCi има висок селективен индекс към базалния тип рак на гърдата MDA-MB-231 със запазена стабилност в трите моделни рН системи.
9. Получените спектри от кръговия дихроизъм на темпорин А и всички нови аналози не показват типични характеристики на вторични структури.

ПРИНОСИ

1. За първи път са синтезирани и охарактеризирани 9 аналози на антимикробния пептид темпорин А с непротеиногенни аминокиселини Dab, Dar, Cit, Orn, Phe(4-F), Phe(2-F) и Phe(4-Cl).
2. Направен е дизайн, синтез и характеристика на 3 аналога на антимикробния пептид темпорин А за първи път с въвеждане на природните аминокиселини Thr и Tug в избрани позиции 1 и 10.
3. Разкрити са важни корелации относно структурата и биологичната активност на всички новосинтезирани аналози на темпорин А относно антимикробните свойства, антипролиферативния ефект, цитотоксичността и хидролитичната стабилност.
4. Проведените изследвания показват следните по-съществени SAR зависимости:
 - въвеждането на Dab в позиция 7 води до повишаване на антибактериалната активност, докато въвеждането на Cit в същата позиция води до загуба на антибактериалната активност, намалена стабилност в алкално рН, но повишена селективност към луминалния тип рак на гърдата;
 - въвеждането на Tug в позиция 10 води до ниска цитотоксичност спрямо моделите на здрава тъкан, висока антипролиферативна активност и селективност спрямо луминалния тип рак на гърдата, което го представя като потенциален терапевтичен агент;
 - въвеждането на Phe(4-F) в позиция 1 води до значително по-висока антибактериална активност, както и висока антипролиферативна активност и селективност спрямо луминалния тип рак на гърдата, но с намалена стабилност при алкално рН.

ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Arias, M., Piga, K.B., Hyndman, M.E., Vogel, H.J., 2018. Improving the Activity of Trp-Rich Antimicrobial Peptides by Arg/Lys Substitutions and Changing the Length of Cationic Residues. *Biomolecules* 8, 19. <https://doi.org/10.3390/biom8020019>
2. Baião, D.D.S., Da Silva, D.V.T., Paschoalin, V.M.F., 2025. Watermelon Nutritional Composition with a Focus on L-Citrulline and Its Cardioprotective Health Effects—A Narrative Review. *Nutrients* 17, 3221. <https://doi.org/10.3390/nu17203221>
3. Capparelli, R., Romanelli, A., Iannaccone, M., Nocerino, N., Ripa, R., Pensato, S., Pedone, C., Iannelli, D., 2009. Synergistic Antibacterial and Anti-Inflammatory Activity of Temporin A and Modified Temporin B In Vivo. *PLoS ONE* 4, e7191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007191>
4. D'Abramo, M., Rinaldi, A.C., Bozzi, A., Amadei, A., Mignogna, G., Di Nola, A., Aschi, M., 2006. Conformational behavior of temporin A and temporin L in aqueous solution: A computational/experimental study. *Biopolymers* 81, 215–224. <https://doi.org/10.1002/bip.20404>
5. Danalev, D., Borisova, D., Yaneva, S., Georgieva, M., Balacheva, A., Dzimbova, T., Iliev, I., Pajpanova, T., Zaharieva, Z., Givechev, I., Naydenova, E., 2020. Synthesis, in vitro biological activity, hydrolytic stability and docking of new analogs of BIM-23052 containing halogenated amino acids. *Amino Acids* 52, 1581–1592. <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02915-3>
6. Das, T., Häring, M., Haldar, D., Díaz Díaz, D., 2018. Phenylalanine and derivatives as versatile low-molecular-weight gelators: design, structure and tailored function. *Biomater. Sci.* 6, 38–59. <https://doi.org/10.1039/C7BM00882A>
7. Deslouches, B., Di, Y.P., 2017. Antimicrobial peptides with selective antitumor mechanisms: prospect for anticancer applications. *Oncotarget* 8, 46635–46651. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16743>
8. Dimitrova, D., Nemaska, V., Foteva, T., Iliev, I., Georgieva, N., Danalev, D., 2024. Synthesis and Biological Studies of New Temporin A Analogs Containing Unnatural Amino Acids in Position 7. *Pharmaceutics* 16, 716. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16060716>
9. Dimitrova, D., Nemaska, V., Iliev, I., Petrin, S., Georgieva, N., Danalev, D., 2025. New Temporin A Analogues Modified in Positions 1 and 10—Synthesis and Biological Studies. *Pharmaceutics* 17, 396. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17040396>
10. Giese, C., Lepthien, S., Metzner, L., Brandsch, M., Budisa, N., Lilie, H., 2008. Intracellular uptake and inhibitory activity of aromatic fluorinated amino acids in human breast cancer cells. *ChemMedChem* 3, 1449–1456. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200800108>
11. Gillis, E.P., Eastman, K.J., Hill, M.D., Donnelly, D.J., Meanwell, N.A., 2015. Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* 58, 8315–8359. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00258>
12. Gobbetti, M., Rizzello, C.G., 2014. *Arthrobacter*, in: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier, pp. 69–76. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00009-4>
13. Hernández, B., Pflüger, F., Adenier, A., Kruglik, S.G., Ghomi, M., 2010. Vibrational Analysis of Amino Acids and Short Peptides in Hydrated Media. VIII. Amino Acids with Aromatic Side Chains: L -Phenylalanine, L -Tyrosine, and L -Tryptophan. *J. Phys. Chem. B* 114, 15319–15330. <https://doi.org/10.1021/jp106786j>

14. Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., Yi, H., 2020. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front. Microbiol.* 11, 582779. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>
15. Javadpour, M.M., Juban, M.M., Lo, W.-C.J., Bishop, S.M., Alberty, J.B., Cowell, S.M., Becker, C.L., McLaughlin, M.L., 1996. De Novo Antimicrobial Peptides with Low Mammalian Cell Toxicity. *J. Med. Chem.* 39, 3107–3113. <https://doi.org/10.1021/jm9509410>
16. Johnson, J.B., Ohri, B., Walsh, K.B., Naiker, M., 2022. A Simple Isocratic HPLC–UV Method for the Simultaneous Determination of Citrulline and Arginine in Australian Cucurbits and Other Fruits. *Food Anal. Methods* 15, 104–114. <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02110-4>
17. Kim, J., Sudbery, P., 2011. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol.* 49, 171–177. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-1064-7>
18. Kunin, C.M., Edmondson, W.P., 1968. Inhibitor of Antibiotics in Bacteriologic Agar. *Experimental Biology and Medicine* 129, 118–122. <https://doi.org/10.3181/00379727-129-33264>
19. La Jeon, Y., Yang, J.J., Kim, M.J., Lim, G., Cho, S.Y., Park, T.S., Suh, J.-T., Park, Y.H., Lee, M.S., Kim, S.C., Lee, H.J., 2012. Combined *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* infection in a patient with oesophageal perforation. *Journal of Medical Microbiology* 61, 1766–1769. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.042275-0>
20. Lee, J., Ju, M., Cho, O.H., Kim, Y., Nam, K.T., 2019. Tyrosine-Rich Peptides as a Platform for Assembly and Material Synthesis. *Advanced Science* 6, 1801255. <https://doi.org/10.1002/advs.201801255>
21. Lehrer, R.I., Rosenman, M., Harwig, S.S.S.L., Jackson, R., Eisenhauer, P., 1991. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *Journal of Immunological Methods* 137, 167–173. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90021-7](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90021-7)
22. Mader, J.S., Hoskin, D.W., 2006. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 15, 933–946. <https://doi.org/10.1517/13543784.15.8.933>
23. Mai, J.C., Mi, Z., Kim, S.H., Ng, B., Robbins, P.D., 2001. A proapoptotic peptide for the treatment of solid tumors. *Cancer Res* 61, 7709–7712.
24. Mangoni, M.L., Shai, Y., 2009. Temporins and their synergism against Gram-negative bacteria and in lipopolysaccharide detoxification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1788, 1610–1619. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.04.021>
25. Mäntylä, T., Sirola, H., Kansanen, E., Korjamo, T., Lankinen, H., Lappalainen, K., Välimaa, A.L., Harvima, I., Närvänen, A., 2005. Effect of temporin A modifications on its cytotoxicity and antimicrobial activity. *APMIS* 113, 497–505. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2005.apm_107.x
26. Marqus, S., Pirogova, E., Piva, T.J., 2017. Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. *J Biomed Sci* 24, 21. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0328-x>
27. McKee, T., McKee, J.R., 2017. *Biochemistry: the molecular basis of life*, 6th ed. ed. Oxford university press, New York Oxford (GB).
28. Mercer, D.K., Torres, M.D.T., Duay, S.S., Lovie, E., Simpson, L., Von Köckritz-Blickwede, M., De La Fuente-Nunez, C., O’Neil, D.A., Angeles-Boza, A.M., 2020. Antimicrobial Susceptibility Testing of Antimicrobial Peptides to Better Predict Efficacy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 326. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00326>

29. Mistry, N., Drobni, P., Näslund, J., Sunkari, V.G., Jenssen, H., Evander, M., 2007. The anti-papillomavirus activity of human and bovine lactoferricin. *Antiviral Research* 75, 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.03.012>
30. Molchanova, N., Nielsen, J.E., Sørensen, K.B., Prabhala, B.K., Hansen, P.R., Lund, R., Barron, A.E., Jenssen, H., 2020. Halogenation as a tool to tune antimicrobial activity of peptoids. *Sci Rep* 10, 14805. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71771-8>
31. Muhldorfer, I., Ziebuhr, W., Hacker, J., 2002. *Escherichia coli* in Urinary Tract Infections, in: *Molecular Medical Microbiology*. Elsevier, pp. 1515–1540. <https://doi.org/10.1016/B978-012677530-3/50291-9>
32. OECD, 2019. Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD. <https://doi.org/10.1787/9789264071162-en>
33. Padaszynska, M.A., Greber, K.E., Padaszynski, W., Sawicki, W., Kamysz, W., 2020. Activity of Temporin A and Short Lipopeptides Combined with Gentamicin against Biofilm Formed by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics* 9, 566. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090566>
34. Rinaldi, A.C., Mangoni, M.L., Rufo, A., Luzi, C., Barra, D., Zhao, H., Kinnunen, P.K.J., Bozzi, A., Giulio, A.D., Simmaco, M., 2002. Temporin L: antimicrobial, haemolytic and cytotoxic activities, and effects on membrane permeabilization in lipid vesicles. *Biochemical Journal* 368, 91–100. <https://doi.org/10.1042/bj20020806>
35. Rodger, A., Marshall, D., 2021. Beginners guide to circular dichroism. *The Biochemist* 43, 58–64. https://doi.org/10.1042/bio_2020_105
36. Rollins-Smith, L.A., Carey, C., Conlon, J.M., Reinert, L.K., Doersam, J.K., Bergman, T., Silberring, J., Lankinen, H., Wade, D., 2003. Activities of Temporin Family Peptides against the Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) Associated with Global Amphibian Declines. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 1157–1160. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.1157-1160.2003>
37. Romero, S.M., Cardillo, A.B., Martínez Ceron, M.C., Camperi, S.A., Giudicessi, S.L., 2020. Temporins: An Approach of Potential Pharmaceutical Candidates. *Surgical Infections* 21, 309–322. <https://doi.org/10.1089/sur.2019.266>
38. Rosenfeld, Y., Barra, D., Simmaco, M., Shai, Y., Mangoni, M.L., 2006. A Synergism between Temporins toward Gram-negative Bacteria Overcomes Resistance Imposed by the Lipopolysaccharide Protective Layer. *Journal of Biological Chemistry* 281, 28565–28574. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606031200>
39. Salwiczek, M., Nyakatura, E.K., Gerling, U.I.M., Ye, S., Kokscho, B., 2012. Fluorinated amino acids: compatibility with native protein structures and effects on protein–protein interactions. *Chem. Soc. Rev.* 41, 2135–2171. <https://doi.org/10.1039/C1CS15241F>
40. Sana, B., Ke, D., Li, E.H.Y., Ho, T., Seayad, J., Duong, H.A., Ghadessy, F.J., 2022. Halogenation of Peptides and Proteins Using Engineered Tryptophan Halogenase Enzymes. *Biomolecules* 12, 1841. <https://doi.org/10.3390/biom12121841>
41. Schweizer, F., 2009. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. *European Journal of Pharmacology* 625, 190–194. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.08.043>
42. Sharma, G., Rao, S., Bansal, A., Dang, S., Gupta, S., Gabrani, R., 2014. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. *Biologicals* 42, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.11.001>
43. Swallow, S., 2015. Fluorine in Medicinal Chemistry, in: *Progress in Medicinal Chemistry*. Elsevier, pp. 65–133. <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2014.11.001>
44. Swithenbank, L., Cox, P., Harris, L.G., Dudley, E., Sinclair, K., Lewis, P., Cappiello, F., Morgan, C., 2020. Temporin A and Bombinin H2 Antimicrobial Peptides Exhibit

- Selective Cytotoxicity to Lung Cancer Cells. *Scientifica* 2020, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2020/3526286>
45. Terra, W.R., Ferreira, C., 2012. Biochemistry and Molecular Biology of Digestion, in: *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Elsevier, pp. 365–418. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384747-8.10011-X>
 46. Tong, B., Barbul, A., 2004. Cellular and Physiological Effects of Arginine. *MRMC* 4, 823–832. <https://doi.org/10.2174/1389557043403305>
 47. Tsonis, I., Karamani, L., Xaplanteri, P., Kolonitsiou, F., Zampakis, P., Gatzounis, G., Marangos, M., Assimakopoulos, S.F., 2018. Spontaneous cerebral abscess due to *Bacillus subtilis* in an immunocompetent male patient: A case report and review of literature. *WJCC* 6, 1169–1174. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v6.i16.1169>
 48. Wade, D., Silberring, J., Soliymani, R., Heikkinen, S., Kilpeläinen, I., Lankinen, H., Kuusela, P., 2000. Antibacterial activities of temporin A analogs. *FEBS Letters* 479, 6–9. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01754-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01754-3)
 49. Wang, C., Tian, L.-L., Li, S., Li, H.-B., Zhou, Y., Wang, H., Yang, Q.-Z., Ma, L.-J., Shang, D.-J., 2013. Rapid Cytotoxicity of Antimicrobial Peptide Tempoprin-1CEa in Breast Cancer Cells through Membrane Destruction and Intracellular Calcium Mechanism. *PLoS ONE* 8, e60462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060462>
 50. Woody, R.W., 1995. [4] Circular dichroism, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 34–71. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)46006-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)46006-3)
 51. Zapadka, K.L., Becher, F.J., Gomes Dos Santos, A.L., Jackson, S.E., 2017. Factors affecting the physical stability (aggregation) of peptide therapeutics. *Interface Focus*. 7, 20170030. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2017.0030>
 52. Zou, G., De Leeuw, E., Li, Chong, Pazgier, M., Li, Changqing, Zeng, P., Lu, W.-Y., Lubkowski, J., Lu, W., 2007. Toward Understanding the Cationicity of Defensins. *Journal of Biological Chemistry* 282, 19653–19665. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611003200>

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ПО ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Dimitrova, D.;** Nemska, V.; Foteva, T.; Iliev, I.; Georgieva, N.; Danalev, D. Synthesis and Biological Studies of New Temporin A Analogs Containing Unnatural Amino Acids in Position 7. *Pharmaceutics*, 2024, 16, 716, DOI: 10.3390/pharmaceutics16060716. (Q1, IF 5.8; 6.67)
2. **Dimitrova, D.;** Nemska, V.; Iliev, I.; Petrin, S.; Georgieva, N.; Danalev, D. New Temporin A Analogues Modified in Positions 1 and 10—Synthesis and Biological Studies. *Pharmaceutics*, 2025, 17, 396, DOI: 10.3390/pharmaceutics17040396. (Q1, IF 5.8; 6.67)
3. **Dimitrova, D.;** Georgieva, N. Antimicrobial Peptides And Temporin Family In The Context Of Rising Resistance - View On Current Development. *Journal of Chemical technology and metallurgy*, 2026, 61, 391-401. DOI: 10.59957/jctm.v61.i3.2026.1. (Q3, IF 1.4; 20)

ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТАТИ

Цитирана статия:

Dilyana Dimitrova, Veronica Nemska, Ivan Iliev, Stoyko Petrin, Nelly Georgieva, Dancho Danalev, New Temporin A Analogues Modified in Positions 1 and 10 - Synthesis and Biological Studies, *Pharmaceutics* 2025, 17, 396, DOI: 10.3390/pharmaceutics17040396.

1. Ke Wan and Yucheng Su, Progress and biomedical applications of antimicrobial peptide-functionalized titanium surfaces, *Front. Mater.*, 2026, 13:1827598. doi: 10.3389/fmats.2026.1827598

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Участия в научни постерни сесии и конференции в страната:

1. **D. Dimitrova**, Tsv. Foteva, N. Georgieva, D. Danalev, Synthesis and characterization of new antibacterial peptides, XX Научна постерна сесия за млади учени, докторанти и студенти, 23.06.2023, ХТМУ-София
2. **D. Dimitrova**, Tsv. Foteva, N. Georgieva, D. Danalev, Synthesis and characterisation of new antimicrobial peptides, Workshop with international participation “Drug-molecule: stages in the discovery and development”, 17-21.07.2023, Hisarya, Bulgaria
3. **D. Dimitrova**, Tsv. Foteva, N. Georgieva, D. Danalev, Synthesis and characterization of new antibacterial peptides, 10-та Международна пептидна конференция - Българското Пептидно Дружество, 1-4.09.2023, Варна, България
4. **Д. Димитрова**, Ц. Фотева, Н. Георгиева, Д. Даналев. Синтез и охарактеризиране на аналози на темпорин А със субституция в седма позиция. X-та ePoster научна сесия за студенти, докторанти и млади учени, 2.11.2023, ХТМУ-София.
5. **Д. Димитрова**, В. Немска, Цв. Фотева, Н. Георгиева, Д. Даналев, Аналози на темпорин А с потенциална антимикуробна активност, Седемнадесети пролетен семинар “Интердисциплинарна химия“, 23-25.04.2024 г., София.
6. **D. Dimitrova**, Tsv. Foteva, V. Nemska, N. Georgieva, D. Danalev. Synthesis and study of new temporin analogs containing two unnatural amino acids with potential antibacterial properties. XXI^{ва} Научна постерна сесия за млади учени, 21.06.2024, ХТМУ-София.
7. **D. Dimitrova**, Tsv. Foteva, V. Nemska, N. Georgieva, D. Danalev. Synthesis and study of new temporin analogs containing two unnatural amino acids with potential antibacterial properties. 70 години катедра „Органичен синтез“, 28.06.2024, ХТМУ-София.
8. **D. Dimitrova**, Tsv. Foteva, V. Nemska, N. Georgieva, D. Danalev, Effect of the unnatural amino acids Dab and Dap in temporin a molecule on antibacterial activity, XI-та ePoster научна сесия за студенти, докторанти и млади учени, 8.11.2024, ХТМУ-София
9. **D. Dimitrova**, Tsv. Foteva, V. Nemska, N. Georgieva, D. Danalev, Effect Of Modification of Temporin A With Fluorinated Phenylalanine on Antibacterial Activity,

International Conference on Bioactive, Organic and Inorganic Advanced Materials and Clean Technologies, 24-28.03.2025, Sofia, Bulgaria

10. **D. Dimitrova**, V. Nemska, Tsv. Foteva, N. Georgieva, D. Danalev, Synthesis and antibacterial study on modified Temporin A analogues with tyrosine, XXII Научна постерна сесия за млади учени, докторанти и студенти, 20.06.2025, ХТМУ-София
11. G. Vasilev, B. Raychev, H. Mzik, **D. Dimitrova**, N. Georgieva, D. Danalev, Applications of antimicrobial peptides, XXII Научна постерна сесия за млади учени, докторанти и студенти, 20.06.2025, ХТМУ-София

Участия в научни постерни сесии и конференции извън страната:

1. N. Georgieva, **D. Dimitrova**, D. Dimov, Tsv. Foteva, D. Danalev. New analogs of temporin modified with unnatural aminoacids. European biotechnology congress, 3-6.10.2023, Ljubljana, Slovenia.
2. V. Nemska,, N. Georgieva, **D. Dimitrova**, D. Danalev, Temporin A And F New Analogues Modified With Unnatural Amino Acids Dap And Dab, European biotechnology congress, 3-6.10.2023, Ljubljana, Slovenia.
3. **D. Dimitrova**, Tsv. Foteva, V. Nemska, N. Georgieva, D. Danalev, Newly synthesized Temporin A analogs with potential antimicrobial activity, Biologies 2024, 13-16.03.2024, London, UK.
4. N. Georgieva, **D. Dimitrova**, I. Iliev, R. Hristova, D. Danalev, Modification of temporin a with unnatural amino acids and study the effects on photo- and cytotoxicity, Mediterranean Congress on Mass Spectrometry and Its Applications – SPECTROMED,21-25.04.2024, Tunisia
5. Tsv. Foteva, I. Iliev, R. Hristova, **D. Dimitrova**, V. Nemska, N. Georgieva, D. Danalev. Cytotoxicity and phototoxicity effects of modified temporin analogs with unnatural aminoacids. 37 th EPS, European Peptide Symposium, 25-29.08.2024 Florence, Italy.
6. N. Georgieva, **D. Dimitrova**, Tsv. Foteva, V. Nemska, D. Danalev. Synthesis and study of modified temporin analogs with unnatural amino acids citrulline and ornithine as potential antibacterial agents. 37 th EPS, European Peptide Symposium, 25-29.08.2024 Florence, Italy.
7. V. Nemska, **D. Dimitrova**, N. Georgieva, D. Danalev, Synthesis and antibacterial activity of new Temporin A and F analogues modified with unnatural amino acids Dap and Dab, 20th International Symposium on Novel Aromatic Compounds, 11-16.08.2024, Toronto, Canada.

8. N. Georgieva, **D. Dimitrova**, I. Iliev, D. Danalev, Effect Of Modification Of Temporin A With Dab And Dap On Photo- And Cytotoxicity And Antiproliferative Activity, European Biotechnology Congress 2024, 3-5.10.2024, Istanbul, Turkey.
9. Ts. Foteva, **D. Dimitrova**, I. Iliev, N. Georgieva, D. Danalev. Study of antitumor activity of temporine derivatives, containing citrulline and ornithine. European Biotechnology Congress 2024, 3-5.10.2024, Istanbul, Turkey.
10. V. Nemska, **D. Dimitrova**, Tsv. Foteva, N. Georgieva, D. Danalev, New Temporin A and F analogues modified with unnatural amino acids Dap and Dab and antibacterial activity against Bacillus subtilis. European Biotechnology Congress 2024, 3-5.10.2024, Istanbul, Turkey.
11. Ts. Foteva, **D. Dimitrova**, N. Georgieva, D. Danalev. Investigation of antibacterial activity of temporin derivatives, containing 2,4-diaminobutyric acid and 2,3-diaminopropionic acid, International Conference on Environment, Biotechnology and Bioengineering Applications (ICEBBA-25), 17-18.07.2025, Zurich, Switzerland.
12. **D. Dimitrova**, N. Georgieva, D. Danalev. Synthesis and antibacterial investigation of tyrosine-modified Temporin A analogues. The European Peptide Synthesis Conference. 25-27.08.2025, Porto, Portugal.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ

1. BG-RRP-2.004-0002-C01, „*BiOrgaMCT*“ (*Биоактивни органични и неорганични авангардни материали и чисти технологии*) по процедура: BG-RRP-2.004 – създаване на мрежа от изследователски висши училища в България по национален план за възстановяване и устойчивост, 2023-2026
2. НИС № 239-01 с ръководител проф. д-р Нели Георгиева на тема „Биологично активни продукти от отпадъчна растителна маса на лавандула“, 2024
3. НИС № 403-29 с ръководител проф. д-р Нели Георгиева на тема „Синтез и антибактериална активност на аналози на аноплин“, 2025