



PROSPERITAS VESTRA FINIS NOSTRA!

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ
СТОЯНОВ“- ВАРНА**

ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА

**КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И КЛИНИЧНА
ФАРМАКОЛОГИЯ И ТЕРАПИЯ**

МОМЧИЛ КОНСТАНТИНОВ ЛАМБЕВ

**НОВИ RGD/ПОЛИАМИНИ – СИНТЕЗ И ПРОУЧВАНЕ ЗА
ПРОТИВОТУМОРНА АКТИВНОСТ**

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за присъждане на образователна и научна степен

„Доктор“

по научна специалност „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“

Научни ръководители:

доц. Тамара Пайпанова, д.х.

проф. д-р Стефка Вълчева-Кузманова, д.м.н.

Варна

2022 г.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Използваните символи и съкращения са в съответствие с препоръките на IUPAC-IUB комисията за биохимична номенклатура (*J.Biol.Chem.* 264, 669, 1989). Всички използвани аминокиселини, без допълнително уточнение, са с L-конфигурация.

Използвани съкращения на латиница:

ABS	абсорбция
ACN	ацетонитрил
AcOH	оцетна киселина
AGAT	аргинин-глицин амидинотрансфераза
Antp	антенапедия
ASS	аргининосуцинат синтаза
BDDC	бис[4-(2,2-диметил-1,3-диоксолил)метил]карбодиимид
Boc	третична бутилоксикарбонилна група
BOP	1H-бензотриазол-1-ил-N-оксис-трис(диметил амино) фосфониев хексафлуорофосфат
bRo5	разширено правило на Липински
CE	капилярна електрофореза
CPP	клетъчно-преминаващ протеин или пептид
CTR	хлоротритилхлорид резин
DAE	етилендиамин
DAP	пропилендиамин
DCC	дициклохексил карбодиимид
DCE	дихлоретан
DCM	дихлорметан
DDM	аспартат-аспартат-метионин
DDS	лекарство-доставящи системи
DIC	диизопропилкарбодиимид
DIPEA	N, N-диизопропилетиламин

DMEM	хранителна среда тип Dulbecco Modified Eagle's
DMF	N-диметилформамид
DMSO	диметилсулфоксид
EC	ендоцитоза
ECM	екстрацелуларен матрикс
EDAC	N-(3-диметиламинопропил-N'-етилкарбодиимид
EDTA	етилендиамино тетраоцетна киселина
EGF	епидермален растежен фактор
eNOS	ендотелна азотен оксид синтетаза
ESI-MS	електроспрей-йонизационна масспектрометрия
EtOAc	етил ацетат
EtOH	етанол
Fab	антиген-свързващ фрагмент
FBS	фетален телешки серум
Fmoc	9-флуоренилметилоксикарбонилна група
FN	фибронектин
HBA	акцептор на водородни връзки
HBD	донор на водородни връзки
HBTU	1,1,3,3 – тетраметилурониев хексафлуорофосфат
HDAC	хистон деацетилаза
hEGF	човешки епидермален растежен фактор
HOBT	1-хидроксibenзотриазол
HPLC	високоэффективна течна хроматография
HPMA	N-(2-хидроксипропил)метакриламид
IC ₅₀	инхибираща концентрация, при 50% от случаите
IP	интраперитонеален
MAP	моделен амфипатичен пептид
MeOH	метанол

MTT	3-(4, 5-диметилтиазол-2-ил)-2, 5-дифенилтетразол бромид
NPs	наночастици
nRotB	брой въртящи се връзки
OD	оптична плътност
Pbf	пентаметил-2,3-дихидробензофуран-5-сулфонил
PBS	стерилен фосфатен буфер
PGA	полигликолова киселина
PLA	полимлечна киселина
PLGA	полилактид-ко-гликолид
PyBop	бензотриазол-1-ил-окси-трис-пирролидинофосфониев хексафлуорофосфат
RDD	рационален лекарствен дизайн
RGD	аргинил-глицил-аспарагинова киселина
Ro5	правилото на Липински
RP-HPLC	високоэффективна течна хроматография
SDS	натриев додецилсулфат
SPPS	твърдофазен пептиден синтез
SYBR Green	N',N'-диметил-N-[4-[(E)-(3-метил-1,3-бензотиазол-2-илиден)метил]-1-фенилхиолин-1-иум-2-ил]-N-пропилпропан-1,3-диамин
Tat	трансактивиращ транскрипционен активатор
TBTU	бензотриазолил-тетраметилурониев тетрафлуороборат
TCTU	O-(1H-6-хлоробензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурониев тетрафлуороборат
TDBTU	N,N,N',N'-тетраметил-O-(3,4-дихидро-4-оксо-1,2,3-бензотриазин-3-ил)урониев тетрафлуороборат

TFA	трифлуороцетна киселина
TGF	трансформиращ растежен фактор
THP	тумор-насочен пептид
TIPS	триизопропил силан
TLC	тънкослойна хроматография
TNF	тумор-некротизиращ фактор
TPSA	топологична полярна повърхност
UV-VIS	ултравиолетова спектрофотометрия
VEGF	съдов ендотелиален растежен фактор

Използвани съкращения на български:

АК	аминокиселина
БАН	Българска академия на науките
ГИТ	гастро-интестинален тракт
дАТФ	деоксиаденозинтрифосфат
ДНК	дезоксирибонуклеинова киселина
НСИ	Национален статистически институт
ПЕГ	полиетиленгликол
СПИН	синдром на придобитата имунна недостатъчност
СЗО	Световна здравна организация
ЦНС	централна нервна система

Изказвам огромната си благодарност към научните си ръководители доц. Тамара Пайпанова и проф. Стефка Кузманова за подкрепата, напътствията и търпението по време на подготвянето на настоящият дисертационен труд!

Благодаря на проф. Димитричка Близнакова и проф. Антоанета Цветкова, за доверието и безрезервната подкрепа!

Благодарен съм на гл. ас. Силвия Михайлова за помощта и напътствията по време на работа!

Изразявам искрената си благодарност към колегите си от

УС „Помощник-фармацевт“ за съдействието, търпението и подкрепата!

Изказвам благодарност на всички колеги от Секция „Молекулен дизайн и биохимична фармакология“ от Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ за подкрепата през годините на съвместна работа.

Изказвам благодарност на Prof. Dr. Eva Tesařova; Květa Kaliková, Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Prague, Czech Rep, както и на Prof. Martin Schmidt University of Graz, Institute of Pharmaceutical Science, Graz, Austria за проведените HPLC анализи. Благодаря на Prof. Dr. Václav Kašička; Dr. Petra Sázelová; Dr. Veronika Šolínova, Czech Academy of Sciences, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Prague, Czech Rep и на Prof. Martin Schmidt за проведените CE- анализи.

Благодаря на цялото ми семейство и приятелите ми за безусловната им подкрепа!

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	10
II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....	12
1. Ракови заболявания и възможност за лечение.....	12
1.1. Значимост на раковите заболявания.....	12
1.2. Механизми за възникване на туморни заболявания	13
1.3. Прицелни процеси за лечение на ракови заболявания	14
1.3.1. Ангиогенеза.....	14
1.3.2. Апоптоза.....	14
1.4. Химиотерапия на раковите заболявания.....	16
1.4.1. Конвенционални методи за лечение.....	16
1.4.2. Локализирано доставяне на лекарствени вещества	16
1.4.3. Молекулно насочена терапия. Лекарствени носители.....	17
1.4.3.1. Липозоми.....	17
1.4.3.2. Полимерни наночастици.....	17
1.4.3.3. Естествени полимери	17
1.4.3.4. Дендримери.....	18
1.4.3.5. Пептиди	18
1.4.4. Конюгиране на лекарствени вещества към макромолекули	18
1.4.4.1. Механизми за доставяне на конюгирани лекарствени вещества	18
1.4.4.2. Насочващ остатък.....	19
2. Пептидите като вещества с терапевтични свойства и като лекарствени носители	20
2.1. Пептидите като противотуморни агенти.....	20
2.2. Клетъчно-преминаващите пептиди (CPPs) като носители на лекарствени препарати	21
2.2.1. Механизми за преминаване на CPPs през клетъчната мембрана.....	23
2.2.2. Идентифициране на лекарствени мишени	23
2.2.3. Роля на късоверижните пептиди като транспортери за макромолекулни комплекси.....	24
2.2.4. Пептиди, инхибиращи протеинови взаимодействия и процеса на апоптоза	24
3. RGD-пептиди	24
3.1. Взаимодействия на RGD-пептидите с интегрини	26
3.2. Влияние на RGD-пептидите върху процесите на ангиогенеза и апоптоза	29
3.3. Антитуморна активност на RGD-пептидите.....	33
4. Полиамини	39
5. Пептиден синтез	41
5.1. Пептиден синтез в разтвор	41

5.1.1.	Кондензационни методи	42
5.1.1.1.	Азиден метод	43
5.1.1.2.	Метод на активираните естери.....	43
5.1.1.3.	Карбодимиден метод.....	43
5.1.1.4.	Метод на смесените анхидриди	45
5.1.1.5.	Активиране чрез използване на фосфониеви и урониеви реагенти	45
5.2.	Твърдофазен пептиден синтез (SPPS)	47
5.2.1.	Съвместимост на защитните групи – ортогоналност.....	49
6.	Основни изводи от литературния обзор.....	50
III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....		51
IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....		52
1.	Материали	52
1.1.	Реагенти.....	52
1.1.1.	Използвани аминокиселинни и амини	52
1.1.2.	Реагенти за пептиден синтез	52
1.1.3.	Реагенти, използвани при определяне на цитотоксичност.....	53
1.2.	Клетъчни линии	53
1.3.	Апаратура.....	54
1.3.1.	Апаратура пептиден синтез	54
1.3.2.	Апаратура за анализ	55
1.3.3.	Апаратура за определяне на цитотоксичност	55
2.	Методи.....	55
2.1.	Химични методи.....	55
2.1.1.	Методи за синтез	55
2.1.2.	Хроматографски методи за пречистване и оценка на продуктите	57
2.1.2.1.	Колонна гел-течна хроматография	57
2.1.2.2.	Тънкослойна хроматография (TLC).....	57
2.1.2.3.	Високоэффективна течна хроматография (HPLC) – с конвенционални носители58	
2.1.2.4.	Капилярна електрофореза.....	59
2.1.3.	Метод за структурен анализ на синтезираните пептиди и пептидни аналози... 59	
2.2.	Биологични методи	60
2.2.1.	<i>In vitro</i> методи за оценка на цитотоксичност.....	60
2.2.1.1.	Култивиране на клетките	60
2.2.1.2.	Тест за жизненост с трипаново синьо.....	60
2.2.1.3.	Оценка на виталността на клетките чрез използване на МТТ-тест	61
2.3.	Математически методи	64

2.3.1.	Статистическа обработка на данните	64
2.3.2.	<i>In silico</i> метод за изчисляване на молекулни дескриптори от “Правилото 5 на Липински” (Ro5).....	64
V.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ.....	65
1.	Моделиране на пептидни аналози/миметици на RGD.....	65
2.	Синтез на аналози на RGD.....	67
2.1.	Получаване на защитени, небелтъчни аминокиселини, необходими за пептидния синтез RGD аналози модифицирани в N-края.....	72
2.2.	Получаване на RGD и аналози, модифицирани в N-края или C-края.....	73
2.3.	Синтез на RGD, R(NO ₂)GD и RGD-OMe	75
2.4.	Синтез на CavGD.....	76
2.5.	Синтез на AgbGD и AgpGD.....	77
3.	Получаване на защитени биогенни диамини, модификанти за синтеза на пептидните конюгати.....	81
4.	Конюгиране на RGD и неговите аналози с полиамини	82
5.	Охарактеризиране на новосинтезираните аналози на RGD	86
6.	Изпитване за цитотоксичен ефект на новосинтезираните аналози на RGD и на техните конюгати с полиамини.....	88
7.	Оценка за преминаване на веществата през биологични мембрани чрез изчисляване на данни за молекулните дескриптори с помощта на софтуера Molinspiration Cheminformatics®	98
VI.	ИЗВОДИ.....	103
VII.	НАУЧНИ ПРИНОСИ.....	105
VIII.	ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	106
IX.	БИБЛИОГРАФИЯ.....	108
X.	НАУЧНИ ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	127

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Злокачествените новообразувания са на едно от първите места по честота на заболяванията, водещи до смърт и са основен проблем на общественото здравеопазване. В България наред с хипертонията и сърдечно-съдовите заболявания, онкологичните се определят като едни от най-рисковите. Дори и днес, различаването на злокачествените от доброкачествените форми е проблем и повечето случаи на рак се диагностицират едва след разрастване на туморна маса.

Що се отнася до химиотерапията при туморни заболявания, един от основните проблеми е свързан с това, че лекарствата не са селективни по отношение на раковите и на нормалните клетки. Получаващото се в резултат увреждане на нормалните клетки води до тежки нежелани лекарствени реакции. Това от своя страна ограничава приложението на противотуморните лекарства до най-високата поносима доза. Освен това, някои от химиотерапевтиците не са разтворими и е много трудно да бъдат въведени в клетката.

Известно е също така, че ако определена монотерапия не показва желан терапевтичен ефект, то комбинирането на две или повече лекарства може да се приложи успешно при лечението на инфекции, хипертония, СПИН или рак. Този подход има някои недостатъци, свързани с фармакокинетиката на прилаганите вещества, възможните нежелани лекарствени реакции и евентуалните междумолекулни взаимодействия.

През последните години се използва нов подход за лекарствен дизайн - комбиниране на два или повече фармакологични ефекта в един лиганд. Бивалентната молекула запазва ефикасността на терапията на отделните лекарствени вещества (синергичен ефект, по-ниски дози и малък брой странични ефекти). Също така се преодоляват някои ограничения, които се наблюдават при едновременното им прилагане.

Повечето от прилаганите агенти проявяват своя цитотоксичен ефект чрез индукция на апоптоза. Един от механизмите, на които се основава бързото и неконтролируемо нарастване и метастазирание на солидните тумори е способността им да предизвикват ангиогенеза. По този начин се осигурява доставката на кислород и хранителни вещества, необходими за по-нататъшната им пролиферация и растеж. Инхибирането на процеса на ангиогенеза е важна стратегия за селективно ограничаване на туморния растеж. Много усилия са насочени към дизайн на инхибитори на ангиогенезата като антинеопластични

агенти. В последните години направлението за създаване на антиангиогенни лекарства придобива особена актуалност, във връзка с първите терапевтични успехи на препаратите *Herceptin*[®] и *Pentosan*[®], при лечение на метастазирани карциноми.

Известно е, че някои туморни клетки могат да експресират на повърхността си интегрини $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_v\beta_5$, които разпознават и се свързват специфично с пептидната последователност Arg-Gly-Asp (RGD). За лекарствения дизайн особено атрактивни са рецепторите, към които се свързва RGD, тъй като те участват в различни физиологични процеси, например тромбоцитна агрегация и ангиогенеза, а също и в патологични като кардиоваскуларни нарушения. Конюгирането на RGD-пептиди с подходящи цитостатици води до активното им насочване към туморните клетки. Този подход представлява перспективна стратегия за оптимизиране на противотуморната терапия.

Използването на пептиди, които могат директно да бъдат насочени към туморните клетки, без да се засягат нормалните клетки - т.нар. „прицелна” терапия, се развива като алтернативна стратегия на конвенционалната химиотерапия. По-ниската им молекулна маса, по-лесното придвижване и по-добрата проникваща способност са предимства, които определят олигопептидите и техните миметици като по-перспективни агенти в сравнение със съответните високо-молекулни съединения.

Цел на настоящия дисертационен труд е получаване на нови хибридни структури – RGD\полиамини и последващ биологичен скрининг за потенциалната им цитотоксичност.

В хода на експериментите бяха синтезирани и охарактеризирани линейни пептидни миметици на RGD, както и техни конюгати с природни и синтетични полиамини. Получените от нас пептидни миметици ни позволиха да бъде проведено *in vitro* изследване за потенциален цитотоксичен ефект.

Представените в дисертационния труд резултати биха могли да послужат за основа на бъдещи насочени синтези - един от съвременните стратегически подходи при създаването на нови лекарствени средства.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Ракови заболявания и възможност за лечение

1.1. Значимост на раковите заболявания

По данни на СЗО, през 2020 година, в световен мащаб са диагностицирани над 19 млн. нови случая на ракови заболявания. Броят на починалите вследствие на злокачествени новообразувания е почти 10 млн. души.

Според Националният статистически институт (НСИ), през 2020 година в България, броят на смъртните случаи причинени от новообразувания (от които 99% са злокачествени) е на второ място, след сърдечно-съдовите заболявания (Фиг. 1). Нарастващият процент на заболелите и високата смъртност, свързана с раковите заболявания, са основни проблеми на общественото здравеопазване.



Фигура 1. Процентно съотношение на заболявания, причиняващи смъртност в България за 2020 г. (НСИ)

Ракът на простата е най-често диагностицираният рак при мъжете. Той се нарежда на второ място по смъртност при пациенти с туморни заболявания от мъжки пол.

Ракът на пикочния мехур е петият по честота рак в Европа. Всяка година биват диагностицирани приблизително 100 000 нови случая. Въпреки радикалните подходи в терапия, например цистектомия, пациентите с продължителна преживяемост са под 65%. Откриването на алтернативни терапевтични подходи, които осигуряват по-добра преживяемост представлява особен интерес за съвременната наука и практика (*Rosik et al. 2014*).

Сред най-трудните за лечение туморни заболявания са тези на мозъка. Те често се разрастват на 2-3 см. от инициалното място. Това се дължи на високо инвазивните ракови клетки (*Mangiola et al. 2008*). За да се повиши ефектът от терапията трябва да се постигне висока концентрация на химиотерапевтиците в тъканта около мястото на изрязване на тумора (*Cima et al. 2014*). По-голяма част от методите за доставяне на лекарства в мозъка са инвазивни и изискват краниотомиа. Лекарство-доставящите техники, които са неинвазивни, биха били полезни за заболявания на централната нервна система (ЦНС), при които не е нужна хирургична намеса. Доставянето на лекарства транс-краниално през черепа може да бъде такава опция, когато целта е тъкан, намираща се по повърхността на мозъка (*Sirianni et al. 2013; Roth et al. 2014*).

1.2.Механизми за възникване на туморни заболявания

Ракът е генетично и епигенетично заболяване (*Baylin and Jones 2011*). Епигенетиката се дефинира като наследствени промени в генната експресия, които не са резултат от промени в ДНК последователността (*Verma 2006; Feinberg 2010; Jones 2011*). Чрез своите ефекти върху геномната стабилност и генната експресия, епигенетичните промени повлияват карциногенезата от започването, през прогресията, по време на живота на човека, а в някои случаи и през поколението (*Brasnet and Chambeyron 2013*). Епигенетичните маркери се отразяват върху индивидуалния генетичен фонд и излагането на различни фактори на околната среда (*Wild et al. 2013*). Когато епигенетичните промени се проявят преди или по време на ранното туморно развитие, те могат да бъдат променени от диета, лекарства и други външни фактори (*Costa 2010; Hou et al. 2012; Verma 2013*).

В началото на новото хилядолетие епигенетичните регулаторни протеини придобиват значение като нови мишени за лекарствена терапия. В широкия диапазон от

ракови заболявания, включително уротелиален карцином, са открити мутации и алтерации в експресията на ензими, модифициращи хистони и ДНК. Хистон деацетилазите (HDAC) излизат на преден план, поради тяхната функционална роля в развитието на тумори. Разработват се голям брой инхибитори, които се прицелват в един или няколко от тези ензими (*Rosik et al. 2014*).

Епигенетичните промени в сравнение с генетичните са обратими и се придобиват постепенно, като това е от голямо значение при разработване на стратегии за ракова превенция и лечение (*Verma et al. 2014*).

1.3. Прицелни процеси за лечение на ракови заболявания

1.3.1. Ангиогенеза

Един от прицелните процеси при създаването на противотуморни агенти е ангиогенезата. Тя е важен фактор, който контролира растежа на туморите (*Qiu et al. 2013*).

Ангиогенезата е процес на образуване на нови кръвоносни съдове от вече съществуващи. Той протича с умерена интензивност в живите организми и се активира при нужда от регенерация на увредени тъкани, възстановяване на кръвообръщението през тъканите при травми, инсулт, както и при растежа и развитието на организма. Този процес е от съществено значение за нарастването на първичните тумори и тяхното последващо метастазиране. Туморите могат да абсорбират хранителни вещества и кислород чрез проста дифузия до размер 1-2 mm, но по-нататъшният им растеж изисква изграждане на собствено кръвоснабдяване (*Kerbel 2000*). Механизмът на действие на повечето инхибитори на ангиогенезата е да блокират VEGF-протеините (съдов ендотелен растежен фактор) или VEGF-рецепторите в клетките. По този начин се предотвратява образуването на нови кръвоносни съдове и значително се ограничава туморният растеж. Примери за инхибитори на ангиогенезата са Bevacizumab и Ramucirumab (*Charlton and Spicer 2016*). RGD също притежава свойството да инхибира проангиогенната роля на VEGF, дори и в ниски дози (*Chavakis et al. 2002; Wang et al. 2013a*).

1.3.2. Апоптоза

Всяка клетка в човешкия организъм е с генетично програмирана продължителност на живот. Това осигурява нормалното съществуване на организмите, като ги освобождава от увредени, завършили жизнения си цикъл или появили се в резултат на мутации потенциално опасни клетки. Клетъчната смърт настъпва по няколко пътя –

апоптоза, некроза, автофагия, ентоза, онкоза, пироптоза и пр. Най-добре проучена и най-често срещана форма на програмирана клетъчна смърт е апоптозата (*Elmore 2007*). Тя е един от главните механизми за унищожаване на клетките в отговор на ракова терапия (*Reed 2000*). Апоптозата играе съществена роля и е фундаментален процес в развитието, физиологията и хомеостазата (*Rowinsky 2005; Call et al. 2008; Iannolo et al. 2008; Zheng et al. 2011*). В туморните клетки нейният механизъм е „повреден”, тъй като протеолитичните ензими разграждат протеините, участващи в процесите на програмирана клетъчна смърт. Вследствие на това увреждане се стига до неконтролирано клетъчно делене. Изследванията върху апоптозата са обект на особен интерес, тъй като могат да допринесат за ефективно лечение на редица заболявания при човека. Модулацията на апоптотични пътища и селективната индукция на апоптоза от химични агенти е обещаващ подход за противоракова терапия (*Call et al. 2008; Ziegler and Kung 2008; Cheng et al. 2009; Lin et al. 2010; Zheng et al. 2011; von Schwarzenberg and Vollmar 2013*).

Голяма част от прилаганите лекарствени продукти проявяват своя цитотоксичен ефект чрез предизвикване на апоптоза. Отличителен белег на неопластичните клетки е тяхната резистентност към този процес. С цел понижаване на апоптотичния праг и/или активиране на процеса на програмирана клетъчна смърт, вниманието на учените през последните години се фокусира върху разработването на вещества, повлияващи основни апоптотични регулатори (*Mihaylova 2019*). Индуциране на апоптоза чрез използване на лекарства, наречени протеазомни инхибитори (*Bortezomib, Carfilzomib*), може да окаже решаваща роля в терапията на неопластичните заболявания.

RGD-съдържащите пептиди предизвикват апоптоза в клетките. Например при специфична кучешка клетъчна линия (MDCK), гломерулни мезангиални клетки, HL-60 клетъчна линия и лимфоцити. RGD подпомага активирането на интегрините и адхезията, а също има и важна функция в протичането на апоптоза. Някои ключови регулаторни белтъци, които участват в иницирането на процеса, притежават потенциал за свързване с RGD (*Anuradha 2000*).

RGD-съдържащите пептиди навлизат в клетки и индуцират производство и ензимна активност на прокаспаза-3. Тя представлява проапоптотичен белтък. Друг важен факт е, че прокаспаза-3 съдържа мотив с потенциал за свързване с RGD - аспартат-аспартат-метионин (DDM). Въз основа на способността на RGD-DDX взаимодействията да предизвикат интегринова активация се предполага, че RGD пептидите иницират

апоптоза чрез предизвикване на конформационни промени. Те са причина за самопроизводство на прокаспаза-3 и активиране на процеса на апоптоза (*Buckley et al. 1999*).

Представените дотук проучвания разкриват нов и специфичен начин за активиране на апоптотичната каскада. За първи път е описан пептид, който има възможността да предизвика директно активиране на каспаза-3. RGD води до интегриново активиране и адхезия. Освен това има централна функция в апоптозата, аналогично на други белтъци. Фактът, че тези пептиди директно активират програмираната клетъчна смърт, ги прави изключително полезни в ситуации, при които натрупването на левкоцити и резистентността към апоптоза водят до патологични състояния (*Buckley et al. 1999*).

1.4. Химиотерапия на раковите заболявания

1.4.1. Конвенционални методи за лечение

Наред с хирургичната намеса и лъчетерапията, химиотерапията остава основния подход за третиране на туморни клетки. Основен недостатък на конвенционалните химиотерапевтици е липсата на селективност спрямо нормални и туморни клетки. В резултат настъпват множество странични ефекти и ниска ефективност на терапията. Лекарствената резистентност, трудното навлизане на веществата в клетките, тяхната биотрансформация и лекарствен клирънс също създават редица проблеми при лечението. Тези факти стимулират разработването и създаването на нов подход и вид терапия - т. нар. насочена терапия.

Понастоящем науката е фокусирана върху синтеза на качествено нов клас агенти, които да атакуват само туморните клетки и строго определени целеви молекули в тях. В основата на избирателната активност на разработваните терапевтици стои способността им да свързват специфично белтъчни молекули, свръхекспресирани по повърхността на мембраната на туморните клетки.

1.4.2. Локализирано доставяне на лекарствени вещества

Локализираното лекарствено доставяне в перитонеалната кухина има потенциал да промени стандартното лечение при рак на яйчниците. Развитието на такъв вид системи дава възможност да се преодолеят настоящите ограничения на клиничната интраперитонеална (IP) терапия (*Cima et al. 2014*).

1.4.3. Молекулно насочена терапия. Лекарствени носители

Преходът от цитотоксична химиотерапия към откриване и развитие на молекулно насочени противотуморни лекарства дава резултат в повишаващия се брой от успешни терапевтици, които повлияват благоприятно живота на множество пациенти с туморни заболявания (*O'Brien et al. 2003; Druker et al. 2006; Panczyk 2014*).

1.4.3.1. Липозоми

Липозомите са сред най-популярните и добре изучени лекарствени носители. Представяват изкуствени фосфолипидни везикули, с размер между 50 и 1000 nm. Те са биологично инертни и биосъвместими, а също така не причиняват токсични и антигенни реакции (*Nirmal et al. 2013*).

Изследван е нов подход за насочване на лекарствени средства към солидни тумори. В основата му стоят липозомни модификации с пептид от три аминокиселини - аргинил-глицил-аспарагинова киселина (RGD) или със сходни лиганди селективно свързващи се с $\alpha_v\beta_3$ интегринови рецептори, свръхекспресирани при някои туморни клетки и в туморни съдове (*Momekova et al. 2015*).

1.4.3.2. Полимерни наночастици

Иновациите в областта на синтетичната химия подпомагат разработването на лекарство-доставящи системи (DDS, Drug Delivery systems), които са биоразградими и биосъвместими. Размерът и формата на наночастиците (NPs) могат да подпомогнат насочването на биологичните носители. Това откритие насърчава приложението на нанопроизводствените техники за развитието на по-ефективни DDS частици (*Carrstensen et al. 1992; Schipper et al. 2009*).

1.4.3.3. Естествени полимери

Потенциалът на естествените полимери като лекарствени носители е все още рядко прилаган (*Bagalkot et al. 2006; Huang et al. 2009; Li et al. 2011*). Например полимлечната киселина (PLA, polylactic acid), полигликоловата киселина (PGA, polyglycol acid) и техните кополимери, полилактид-ко-гликолид (PLGA, polylactide-co-glycolide), са най-широко използвани в разработването на DDS (*Panyam et al. 2002; Prabha and Labhassetwar 2004; Shirahama et al. 2005*).

1.4.3.4. Дендримери

Дендримерите имат добре дефинирана разклонена структура, много ниска полидисперсност и позволяват разположението на множество функционални групи по тяхната външната повърхност и във вътрешността (*Tomalia 2005; Goyal 2008*).

Сравнение в характеристиката на дендримерите и линейните полимери показва, че дендримерната структура се отличава с редица предимства при приложение като DDS. Контролираната мултивалентност на дендримерите може да се използва за прикачване на няколко лекарствени молекули, а ниската им полидисперсност осигурява възпроизводимо фармакокинетично поведение (*Gillies and Frechet 2005; Duncan 2011*).

1.4.3.5. Пептиди

Значителен интерес предизвикват лекарствени носители с белтъчна природа, тъй като те са естествено разградими в тялото до аминокиселини и се екскретират с ниска имуногенност (*Bessa et al. 2010; Rajangam et al. 2011*).

1.4.4. Конюгиране на лекарствени вещества към макромолекули

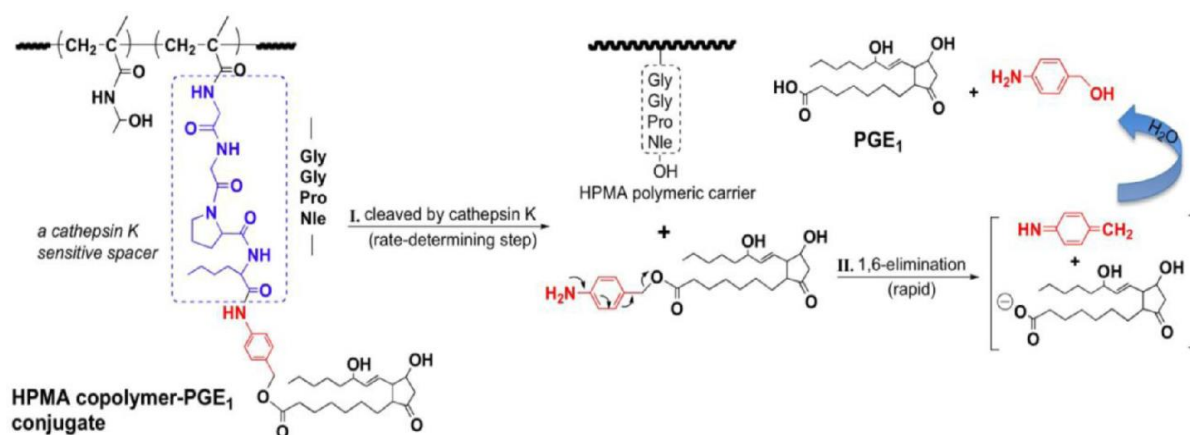
Конюгирането на лекарства към синтетични и естествени макромолекули започва в началото на XX век (*Kopeček 1982*). Пример за приложението на дипептида (GL) е възможността му да се използва като спейсър за прикачване на лекарственото вещество Mescaline към поливинилпиролidon. Екипът на Ushakov синтезира конюгати от поливинилпиролidon с различни антибиотици през шестдесетте и седемдесетте години (*Givental' et al. 1965; Shumikhina et al. 1966*). De Duve открива, че много ензими са локализирани в лизозомния компартмент на клетката и лизозомотропизма на макромолекулите (*de Duve et al. 1974*) е важен феномен за дизайна на полимерни лекарствени конюгати (*Yang and Kopeček 2014*).

1.4.4.1. Механизми за доставяне на конюгирани лекарствени вещества

За конюгиране на лекарство към носител се използва т. нар. „спейсър“. Той е стабилен в кръвния ток (*Rejmanová et al. 1985*) и интерстициалното пространство. Един от начините за освобождаване на лекарственото вещество от носителя в лизозомния компартмент на клетката, е чрез ензимно или химично взаимодействие. При друг приложим метод се използва разликата в рН на кръвта и лизозомите, когато лекарственото вещество е конюгирано чрез рН-чувствителни връзки (*Ulbrich and Subr 2004; Nakamura et al. 2014*), използвайки хидразо (*Etrych et al. 2001*), цис-аконитил (*Shen and Ryser 1981*) или малеинови (*Rozema et al. 2003*) спейсъри. Съществува и вариант за

създаване на спейсър, който отговаря на специфичността на лизозомните ензими (Koreček 1982). Широко използвана е лизозомно разградимата последователност валинил-цитрулин (Doronina et al. 2008; Burke et al. 2009).

Елонгираните спейсъри се състоят от няколко групи. При тях ензимно-разрушимата връзка е отделена от лекарството чрез самоелиминираща група (Carl et al. 1981; de Groot et al. 2001). Подобен подход е използван за проектиране на системи за перорално лекарствено доставяне, основани на HPMA кополимери – 9-аминокампотецин конюгати (Gao et al. 2006). Друг пример е използването им за свързване на простагландин с HPMA кополимер чрез катепсин К-чувствителен тетрапептид (GGPNle) и самоелиминираща 4-аминобензалкохолна структура (Pan et al. 2006) (Фиг.2).



Фигура 2. Схема на освобождаването на немодифициран PGE1 от HPMA-кополимер-PGE1 конюгат, чрез двуетапен процес – с контролирана скорост на ензимното делене, последвана от бързо 1,6-елиминиране (Pan et al. 2006)

1.4.4.2. Насочващ остатък

Насочващият остатък се използва, за да се улесни достигането и навлизането на конюгатите в таргетните клетки. Активното насочване на полимерни лекарствени конюгати може да се постигне чрез обединяване на специфични за прицелните клетки лиганди, като пептиди, въглехидрати, лектини, антитела и части от антитела. Специфичното прицелно взаимодействие дава резултат в биоразпознаване на клетъчната повърхност и подобрява навлизането на конюгати в туморните клетки чрез рецептор-медирана ендоцитоза. По този начин се подобрява и терапевтичната ефикасност (Shiah et al. 2001; Koreček and Korečková 2010). Прикачването на няколко насочващи остатъка към една макромолекула осигурява многовалентен ефект, който дава резултат в повишен

излишък на конюгати (*Mammen et al. 1998*). Мултивалентният ефект води до повишена биологична активност на изследваните вещества.

Прицелването на полимерни лекарствени конюгати е свързано в най-голяма степен с повишеното биоразпознаване на повърхността на таргетната клетка. То бива медирано от прицелната част на клетъчната повърхност комплементарно - антиген/рецептор. Ефикасността на този подход се повлиява от типа на тумора и структурата на макромолекулните терапевтици (*Кореček 2013*).

Възможността за прицелване може да включва избор на лекарствено вещество, ефективно само за определен подтип клетки. Включването на специфични прицелни части, характерни за определен вид клетки, би подобрило ефикасността (*Yang and Кореček 2014*).

2. Пептидите като вещества с терапевтични свойства и като лекарствени носители

2.1. Пептидите като противотуморни агенти

Пептидите са съединения, които се състоят от две или повече α -аминокиселини, свързани чрез пептидна връзка. Те участват в почти всички клетъчни процеси и са тясно свързани с регулацията на имунитета (*Bray et al. 2018; Cai et al. 2018*), неврохормоналните трансмитери (*Aljabery et al. 2018; Yu et al. 2019*) и туморните лезии (*Monneur et al. 2018; Luo et al. 2019*). Освен това пептидите могат да убиват бактерии, гъби и туморни клетки (*Xie et al. 2020*). От гледна точка на клиничните индикации, пептидите са свързани с ендокринни и туморни заболявания (*Qin et al. 2019; Pan et al. 2020*).

Те притежават отлична клинична безопасност, защото техният профил за биосъвместимост е по-добър в сравнение с този на химичните съединения. Продуктите на тяхното разграждане са аминокиселини, които са с естествен произход и се използват като хранителни вещества или за изграждане на клетките. Други основни предимства на пептидите са начинът на получаване, слабата антигенност, лесното насочване, удобният и евтин синтез, лесното модифициране, ниската имуногенност, добрата биосъвместимост. Те позволяват широкото им приложение като обещаващи противотуморни средства (*Hu et al. 2016; Pan et al. 2020*).

Противотуморните пептиди са положително заредени, притежават хидрофобен характер и висока степен на пенетрация. В сравнение с някои от прилаганите

химиотерапевтични лекарства, те проявяват специфичност спрямо туморните клетки. Ниското им молекулно тегло им позволява ефективно да достигнат тъканите и лесно да преминават биологични бариери, което е невъзможно за макромолекулни продукти като моноклоналните антитела (*Pan et al. 2020*).

Пептиди с противотуморна активност са широко разпространени в природата. Типичен пример е пчелната отрова. Пептидът, съдържащ се в нея, притежава терапевтичен ефект при различни видове рак включително на гърдата, на яйчниците, на простатата и меланома (*Rady et al. 2017; Pan et al. 2020*).

Първоначално катионни пептиди биват изследвани за тяхната антимикробна активност, след което през 1985 се открива техният противотуморен потенциал (*Sheu et al. 1985*). Уникалният механизъм на действие на пептидите им осигурява множество предимства пред конвенционалната химиотерапия. Те инхибират в по-висока степен пролиферацията, миграцията и ангиогенезата на туморните клетки (*Hilchie et al. 2019*). С развитието на технологията за твърдофазен синтез, производството и модифицирането им стават евтини и лесни. Като се имат предвид и относително високата тъканна пенетрация и ниска възможност за развитие на резистентност, пептидите са обещаващи за приложение в практиката (*Xie et al. 2020*).

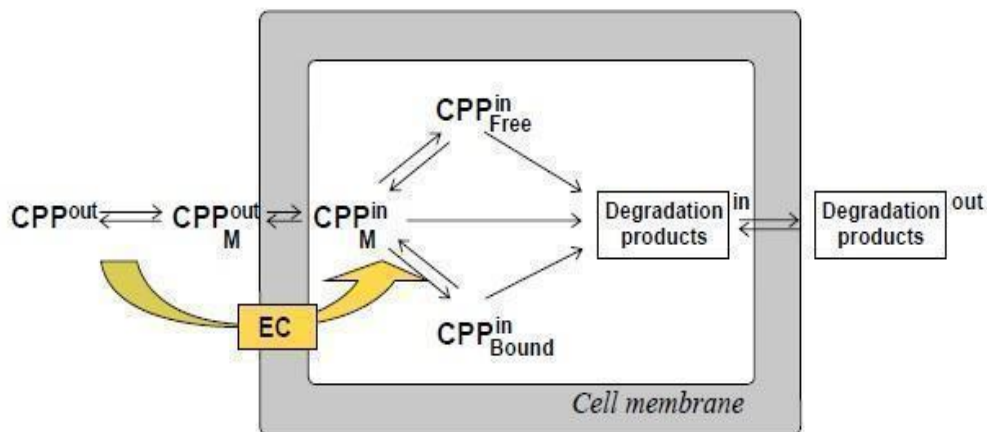
Противотуморните пептиди инхибират туморогенезата и развитието на раковите клетки чрез предотвратяване на протеиновите взаимодействия, регулират конформацията на биомолекулите, конкурират се за свързващи рецептори и унищожават клетъчните мембрани. Предполага се, че противотуморното действие на пептидите може да се постигне посредством други механизми, например чрез предотвратяване на транслацията на генетична информация, повлияване на енергийния метаболизъм, регулиране на имунитета и инхибиране на туморната ангиогенеза (*Pan et al. 2020*).

2.2. Клетъчно-преминаващите пептиди (CPPs) като носители на лекарствени препарати

Конюгирането на лекарствени молекули с клетъчно-преминаващи протеини или пептиди (cell-penetrating proteins/peptides, CPPs) представлява подход, който осигурява тяхното доставяне и дава възможност за увеличаване на концентрацията им в клетката (*Frankel and Pabo 1988; Green and Loewenstein 1988*). Свойството на преминаване е открито за първи път при Антенапедия (Antp) - транскрипционен фактор на *Drosophila* (*Joliot and Prochiantz 2004*) и VP22 - белтък на херпесния вирус. Установено е, че пенетрацията през плазмените мембрани е ограничена само при късоверижните

последователности - до 20 аминокиселини. Такива пептиди са използвани за вътреклетъчно доставяне на вещества с молекулно тегло няколко пъти по-голямо от тяхното (Schwarze *et al.* 1999). Предимствата на CPPs като носители на лекарствени молекули, пред стандартните техники използвани за тяхното доставяне, се базират на ефикасността им спрямо разнообразни типове клетки и потенциала за терапевтично приложение.

CPPs са разделени в два класа: (1) първият клас се състои от амфипатични спирални пептиди, като транспортан и моделния амфипатичен пептид (MAP), където лизина (Lys) е главният носител на позитивния заряд; (2) вторият клас включва богати на аргинин (Arg) пептиди като трансактивиращия транскрипционен активатор (Tat) и Antr или Penetratin (Zorko and Langel 2005).



Фигура 3. Кинетична схема на интернализацията на CPP. “In” и “out” представя количеството на CPP или неговите разпадни продукти във и извън клетката; индексът М представя мембранно свързаните CPP; “free” означава интернализирани, но несвързани CPP (например в цитозола); “bound” означава фракцията от CPP, която взаимодейства с вътреклетъчните структури (вътреклетъчни мембрани, протеини и т.н.); “degradation products” са резултат от протеолитичното делене на CPP в клетката; с “EC” е означена ендоцитозата (Zorko and Langel 2005)

CPP-медираното доставяне се използва успешно при приложение на различни терапевтично свързани протеини и има потенциал за лечение на туморни заболявания (Nakase *et al.* 2007). Tat е използван за доставяне на антитела за приложение на радиотерапевтици (Cornelissen *et al.* 2007) и за чувствителни към цитотоксична терапия клетки (anti-p21) (Hu *et al.* 2006). Олигопептидът Penetratin улеснява доставката *in vivo* в

тумори при мишки (Jain 1998). Фактът, че CPPs осигуряват доставката на антитела доказва, че те са широко приложими транспортери.

Лекарствените препарати с пептиден произход проявяват повишена активност, когато за доставянето им се използват CPPs. Сходната структура на лекарството и носителя опростява синтеза и приложението им. Навлизането в клетката и ефектите на CPPs се определят от дължината на пептидите, химичните им свойства и техния размер.

Със знанията относно това как физикохимичните свойства улесняват един механизъм на преминаване пред друг, ще бъде възможно създаването на нови пептиди с желан механизъм на поемане (Fischer et al. 2005; Duchardt et al. 2007).

2.2.1. Механизми за преминаване на CPPs през клетъчната мембрана

Предполага се, че механизмът на навлизане чрез ендоцитоза за CPP е зависим до голяма степен от конюгираната молекула (Maiolo et al. 2005). Установено е, че Tat използва липидна raft-медирана ендоцитоза, когато е конюгиран с протеин (Fittipaldi et al. 2003) и clathrin-зависима ендоцитоза (Richard et al. 2005), когато е конюгиран с флуорофор. Макропиноцитоза е използвана в поемането на различни CPP-натоварени конюгати (Wadia et al. 2004; Jones 2007; Nakase et al. 2007).

Друг начин за преминаване на CPPs през двойния мембранен слой е чрез енергозависим процес (Pooga et al. 1998; Christiaens et al. 2004). Смята се, че неендоцитозното преминаване през мембраната протича, когато пептидът е съвместим с двойния слой или притежава свойството да нарушава структурния интегритет на мембраната (Thorén et al. 2000; Henriques et al. 2005). Директният механизъм на преминаване, използван от някои пептиди, е чувствителен на промени в мембранните свойства, например мембранен потенциал (Herbig et al. 2005; Yandek et al. 2007).

2.2.2. Идентифициране на лекарствени мишени

Доставянето до клетката на терапевтици, проявяващи своята активност чрез преминаване на плазмената мембрана, е предизвикателство пред учените. При *in vitro* изследвания те не проявяват необходимата липофилност, която позволява мембранно разделяне, но от друга страна те са водоразтворими (Lipinski and Hopkins 2004). Тези несъвместими изисквания ограничават използването на определени съединения. Следователно оптимизиране на доставянето на терапевтици до клетката е важен приоритет. CPPs доказано повишават ефикасността на някои лекарствени вещества чрез улесняване процеса на навлизане в клетката. Използването на CPPs като молекулни

носители предлага предимства пред други пътища на доставяне, например ниска токсичност и възможност за приложение с повишена специфичност (*Zelphati et al. 1998; Moghimi et al. 2005; Veldhoen et al. 2006*). Голям брой изследвания показват успешен CPP-улеснен вътреклетъчен транспорт на терапевтици.

2.2.3. Роля на късоверижните пептиди като транспортери за макромолекулни комплекси

Прилагането на екзогенни протеини представлява възможност за лечение на много заболявания, но доставянето на тези големи макромолекули в клетките е силно затруднено. При *in vivo* изследвания на Fab (Fragment antigen-binding) фрагментни разклонени с Tat, Penetratin и други CPPs показват разпространение и увеличено време на престой в различни органи. Предполага се, че пептидът може да играе роля в тъканното локализиране (*Kameyama et al. 2006*).

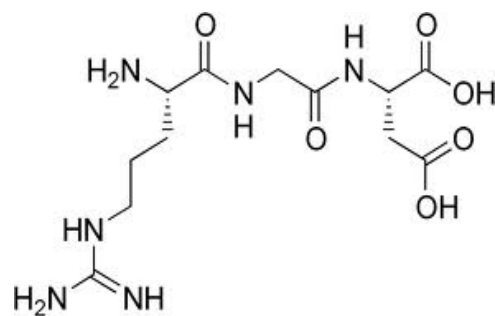
2.2.4. Пептиди, инхибиращи протеинови взаимодействия и процеса на апоптоза

Известно е, че инхибиторите на основата на пептиди блокират взаимодействията между жизнено важни протеини. Съществуват доказателства за последователности, които предизвикват разпадане на биомолекулния интерфейс *in vitro*, но не постигат необходимото вътреклетъчно натрупване (*Privé and Melnick 2006*). Конюгирането на такива лекарствени вещества с CPPs подпомага тяхното доставяне. Пример за това представляват Penetratin и Tat, които повишават поемането и активността на определен пептиден инхибитор на апоптоза (*Orzáez et al. 2007*).

3. RGD-пептиди

Тумор насочените пептиди (ТНП) разпознават по няколко вида ракови клетки. Пониският им афинитет към нормалните клетки прави възможно използването им за доставяне на химични агенти до засегнати тъкани (*Deutscher 2010*). Типичен представител на тази група е RGD (*Hu et al. 2016*).

L-аргининил-глицил-L-аспаргинова киселина (L-argininyl-glycyl-L-aspartic acid) - RGD пептидът (Фиг. 4), е присъщ за много екстрацелуларни и вътреклетъчни белтъци, пример за които са каспазите.



Фигура 4. Химична структура на RGD (L-argininyl-glycyl-L-aspartic acid) (*Ruoslahti 1996*)

Той служи за клетъчно разпознаване и прикрепване на голям брой белтъци от екстрацелуларния матрикс, както и протеини от клетъчната повърхност. Освен това има важни регулаторни функции в много биологични процеси. RGD участва в клетъчното прикрепване, разпространението, образуването на актиновия скелет и адхезията към протеините. Тези четири реакции са важни за предаването на сигнали, които са свързани с клетъчното поведение и клетъчния цикъл (*Hwang et al. 2007; Wang et al. 2013*)

Олигопептидът RGD привлича вниманието на изследователите, след като е идентифициран през 1984г. от *Ruoslahti*. Установено е, че той има основна роля при свързването на фибронектин (FN), ламинин, витронектин, фибриноген, фактор на фон Вилебранд, остеопонтин, тромбоспондин и др., с клетки от ЕСМ или други клетки (*Pierschbacher and Ruoslahti 1984; Kim et al. 2011*). Процесът се осъществява посредством взаимодействие с интегрини, които представляват клетъчни адхезивни молекули. По-късно RGD бива открит и в други белтъци, при които отново осигурява свързването чрез специфично взаимодействие с рецептори. След откриването на пептида става ясно, че той притежава минимална биологична активност, но е основен компонент при клетъчната адхезия (*Ruoslahti 1996*) и клетъчното разпознаване и може да бъде използван в туморната терапия и тъканното инженерство (*Wang et al. 2013a*).

До момента съществуват три подхода, при които се използва RGD като противотуморен агент:

- i) създаване на RGD пептиди или пептидомиметици, антагонисти на $\alpha_v\beta_3$ интегрини;
- ii) създаване на конюгати на RGD пептиди или пептидомиметици, с подходящи противотуморни препарати или радионуклиди;

- iii) използване на наноносители или липозоми, по чиято повърхност са разположени RGD молекули (*Danhier et al. 2012*).

Предимствата на RGD пептидите пред химиотерапевтици, използвани до момента са следните: а) по-малки размери в сравнение с моноклоналните антитела, което води до по-лесно достигане до туморната тъкан; б) по-малка вероятност за проява на имунен отговор; в) сравнително лесен и евтин синтез; г) прицелване директно към туморните клетки, което се дължи на високия афинитет към $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_v\beta_5$ интегрините, свръхекспресирани по повърхността на туморните клетки и с ниска експресия при нормални клетки (*Le Joncour and Laakkonen 2018*); д) приложение също така в тъканното инженерство, чрез имобилизирането им върху биоматериали (*Wang et al. 2013b*).

3.1. Взаимодействия на RGD-пептидите с интегрини

Интегрините са хетеродимерни клетъчно-повърхностни рецептори, които преминават през двойния фосфолипиден слой на клетката и подобряват вътреклетъчната сигнализация. Те са от особено значение за адхезията между клетките, а също и между клетката и молекули от ЕСМ. Интегрините са изградени от две субединици (α и β) (*Hynes 2002; Niu and Chen 2011*). При гръбначните семейството е съставено от 18 α и 8 β субединици, които могат да се свържат в 24 различни хетеродимери (*Takada et al. 2007; Barczyk et al. 2010; Desgrosellier and Cheresh 2010*).

Интегрините са широко разпространени в тялото. Регулацията им е динамична и се променя бързо при напускане на комфортната среда на клетките (*Barczyk et al. 2010*).

Композицията на интегриновите субединици определя тяхната специфичност спрямо лигандите от ЕСМ (*Paolillo et al. 2009; Niu and Chen 2011; Russo et al. 2013*). RGD разпознава специфично осем от тях: $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$ и $\alpha_{II}\beta_3$ (*Nieberler et al. 2017*).

Интегриновата експресия се стимулира от растежни фактори и може да варира в нормална и туморна тъкан (*Desgrosellier and Cheresh 2010; Russo et al. 2013*). $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ и $\alpha_v\beta_6$ често могат да бъдат експресирани в ниска нива при нормалните клетки, но да са свръхекспресирани някои туморни и ангиогенни ендотелни клетки (*Desgrosellier and Cheresh 2010; Russo et al. 2013*). По този начин вземат участие в ангиогенезата и образуването на метастази (*Mas-Moruno et al. 2010*). Повишената експресия на интегрини при туморните клетки се дължи на нуждите на клетката за миграция, инвазия, метастазиране (*Liu et al. 2008; Russo et al. 2013*).

Протичането на разгледаните процеси зависи от взаимодействието на интегрините с рецептори на растежни фактори или онкогени, както в туморните, така и в тумор-асоциираните клетки (*Desgrosellier and Cheresh 2010*). Подробното изучаване на механизмите на протичане на процесите, които са свързани с развитието на туморните заболявания, води до разработването на нови продукти за лечение на рак, които се основават на взаимодействие с интегрините (*Jin and Varner 2004*).



Фигура 5. Роля на интегрините в развитието на туморните клетки (*Weis et al. 2009; Desgrosellier and Cheresh 2010*)

Други фактори, които привличат вниманието към възможността за използване на интегрините като мишена, са експресията им в различни видове клетки, които участват в развитието на тумори, както и способността им да взаимодействат с рецептори на растежни фактори (*Desgrosellier and Cheresh 2010*).

Инхибиране на интегрините може да се постигне посредством няколко подхода. За най-подходящ се приема този, при който се предотвратява активирането на рецептора или се блокира мястото за свързване с него (*Cox et al. 2010; Miller et al. 2017*). Предклинични изследвания показват, че интегринови антагонисти инхибират туморния растеж (*Avraamides et al. 2008; Desgrosellier and Cheresh 2010*). Установено е че, $\alpha_v\beta_3$ интегринът е от важно значение за ранния етап от развитието на процеса ангиогенеза (*Liu et al. 2008*). Открити са негови антагонисти предизвикващи инхибиране на ангиогенезата при опитни животни (*Niu and Chen 2011; Yu et al. 2014*).

Природните и синтетичните RGD пептиди притежават голям афинитет за свързване към две групи интегрини, които са свръхекспресирани при туморни и ангиогенни ендотелни клетки - $\alpha_v\beta_3$ (свръхекспресирани в туморни клетки и ангиогенни ендотелни клетки (*Desgrosellier and Cheresh 2010*) и $\alpha_v\beta_5$. По този начин те повлияват процесите на адхезия, на метастазирание или предизвикват апоптоза чрез активиране на специфични каспази (*Gilad et al. 2016*). Прицелването на пептидомиметици и конюгати на RGD към

туморните клетки е перспективен подход, чрез който могат да се прилагат препарати за лечение и диагностика на ракови заболявания.

Редица изследвания показват, че интегрините регулират жизнеността при различни видове клетки. Антиинтегриновите моноклонални антитела или RGD пептидите намаляват клетъчния растеж чрез инхибиране на интегриновото свързване и индуциране на апоптоза. Интегрин медираната апоптоза е в основата на анти-адхезивния ефект. Всъщност загубата на връзка на прикрепените клетки е описана като причина за различни про-апоптотични сигнали. Други причини могат да бъдат интегриновата експресия, блокиране на интегриновата сигнализация или индуциране на интегриново разграждане (*Aguzzi et al. 2004*).

Освен анти адхезивно-зависимия апоптотичен ефект, RGD-съдържащите пептиди проявяват ефект и при лимфоцити и кардиомиоцити. При тези клетки се проявява способността на пептида за пенетрация и вътреклетъчно действие. Доказателство е активирането на каспаза-3 чрез директно взаимодействие с пептида (*Aguzzi et al. 2004*).

RGD отговаря за свързването с интегрини при много лиганди. Синтетични пептиди, съдържащи RGD, често биват използвани като инхибитори на интегрин-лиганд взаимодействия при изследване на клетъчната адхезия, миграция, растеж и диференциация. Друго тяхно свойство е способността им да предизвикват апоптоза директно без да се изисква натрупване на интегрин-медираните клетки или сигнали (*Buckley et al. 1999*).

Високият афинитет на RGD към $\alpha_v\beta_3$ позволява използване на пептида и негови пептидомиметици за прицелна терапия (*Mas-Moruno et al. 2010; Marelli et al. 2013*). Към групата на миметиците спадат линейни и циклични пептиди, в чиито молекули е включен трипептидният мотив RGD. Подобна структура осигурява достигането на нискомолекулни лекарствени средства, други пептиди и белтъци до туморния ендотел (*Chatzisideri et al. 2018*). Тази характерна особеност на пептида позволява изследването на негови циклични миметици като радиотрасери за откриване на интегрини върху туморни клетки при емисионна компютърна томография или позитронна емисионна томография (*Haubner et al. 2014*). Клинични проучвания демонстрират значително предимство на RGD маркерите поради тяхната безопасност и възможността за приложение при първични метастази, при рак на гърдата, черния дроб и костите (*Beer et al. 2006; Haubner et al. 2014*).

Взаимодействието между RGD и интегрините се използва за насочване, клетъчно разпознаване и интернализация. То позволява изучаването на много аспекти за

приложение (диагностика, лекарствени продукти и регенериране на трансплантирана тъкан). RGD модифицираните лекарства се получават чрез конюгация на пептида с носител, който е натоварен с лекарство или молекула за изследване. RGD пептиди и миметици се включват в липозоми, полимери и други пептиди. Целта е да се подобрят биологичните ефекти на терапевтичните агенти (*Temming et al. 2005*). Технологиите за повърхностна модификация с включени RGD пептиди увеличават използването на интегрин-медираната клетъчна адхезия за развитие на тъканното инженерство (*Wang et al. 2013b*).

Следващи проучвания показват, че много инхибитори на $\alpha_v\beta_3$ интегрина са също потенциални инхибитори на друг витронектинов рецептор, известен като $\alpha_v\beta_5$ интегрин. Ролята на този интегрин е свързана с неоваскуларизацията, в частност индуцираната от съдовия ендотелиален растежен фактор (VEGF), трансформиращия растежен фактор (TGF) и епидермалния растежен фактор (EGF).

3.2. Влияние на RGD-пептидите върху процесите на ангиогенеза и апоптоза

Изучаването на програмираната клетъчна смърт позволи разработване на нови подходи за лечение на туморни заболявания. Този физиологичен процес е характерен за многоклетъчните организми и осигурява тяхното нормално развитие (*Elmore 2007*). Апоптозата може да бъде предизвикана от външни или вътрешни фактори. Към първата група спадат хормони, цитокини, токсини, азотен оксид. Във втората група се включват увреждания на ДНК под действие на рентгенови лъчи, цитотоксични лекарствени продукти, вирусни инфекции, мутации, гладуване и свободни радикали (*Kalimuthu and Se-Kwon 2013*). Най-често апоптозата протича с активиране на специфични ензими, наречени каспази (*Elmore 2007*). Иницирането на процеса на апоптоза изисква въздействието на някои от описаните фактори – външен или вътрешен. Това от своя страна води до преход на неактивната прокаспаза до активен ензим (*Kalimuthu and Se-Kwon 2013*).

Каспазите предизвикват бърза клетъчна смърт чрез увеличаване на апоптотичните сигнали. Те се разделят на две групи: инициаторни (каспаза-2, -8, -9, -10) и ефекторни (каспаза-3, -6, -7). Представителите на първата група осигуряват началото на апоптозата, а втората група ензими участват в разрушаването на клетъчните структури.

Външните сигнали, които предизвикват клетъчна смърт навлизат в клетката чрез трансмембранни белтъци, като Fas и TNF (*Elmore 2007*). При проява на някои от

вътрешните стимули апоптозата се активира от митохондриите. Процесът протича с взаимодействието на тумор супресорния ген p53 с митохондриалния белтък Bcl 2 (*Kalimuthu and Se-Kwon 2013*). Характерен белег на раковите клетки е високото съдържание на Bcl 2 (*Aubrey et al. 2018*). В допълнение мутациите в p53 белтъка са във висок процент. Големите количества от него имат проапоптотично действие, а в ниските съответно антиапоптотично (*Ozaki and Nakagawara 2011*).

Bcl 2 модулира пропускливостта на вътрешната митохондриална мембрана, вследствие на което се отделя специфичен белтък - SMAC, който е митохондриален активатор на програмираната клетъчна смърт. След това към него се свързват и IAPs белтъци. Като резултат от този процес се прекратява ефекта на инхибиране върху каспаза-9 и каспаза-3. Освен това Bcl 2 активира проапоптотични молекули и така се увеличава пропускливостта на митохондриалната мембрана (*Wang et al. 2009*). Този белтък се конюгира с Araf-1 (фактор 1, активиращ апоптотичната протеаза) и деоксиаденозинтрифосфат (дАТФ). Той от своя страна се свързва с прокаспаза-9 и се формира белтъчен комплекс наречен апоптозома (*Jiang and Wang 2000*). Така полученият комплекс води до активиране на каспаза-9, която от своя страна активира каспази-7 и -3. Те предизвикват разрушаване на структурни белтъци, хроматинът кондензира и се разпада. В резултат настъпва клетъчна смърт (*Kalimuthu and Se-Kwon 2013*).

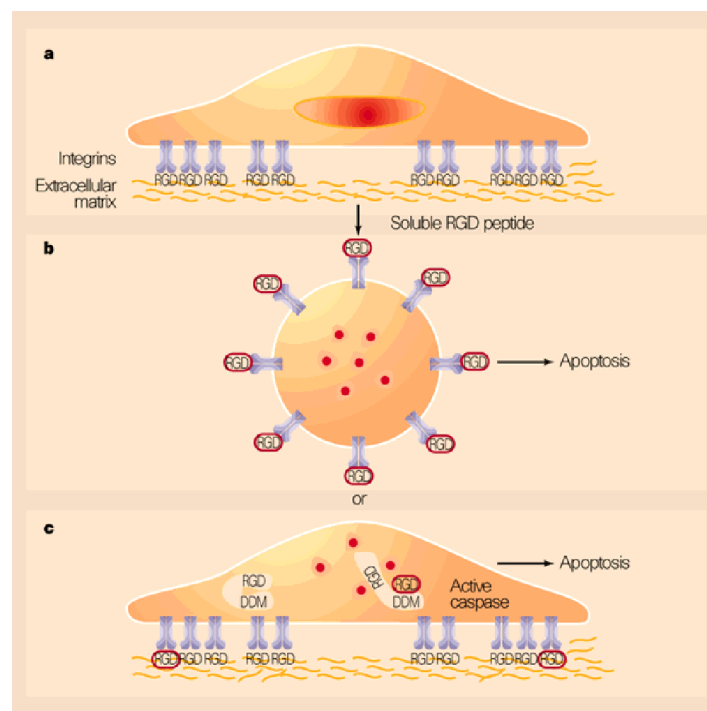
Процесът на апоптоза е съпроводен с кондензиране на хроматина, свиване на клетката и разпадане на ядрената и хромозомната ДНК. Разделянето на молекулата на ДНК протича под действието на специфични ензими наречени дезоксирибонуклеази. Следва фрагментация на клетката на отделни апоптотични телца, които се премахват с помощта на макрофаги (*Portt et al. 2011*).

Промените в процеса на програмирана клетъчна смърт водят до патологични процеси, в това число и рак. Умишленото предизвикване на апоптоза, с помощта на цитостатици и постигането на избирателност към туморните клетки представляват възможност за понижаване на токсичността, мутациите и лекарствената резистентност (*Johnstone et al. 2002*).

Моноклонални антитела, циклични RGD пептидни-антагонисти и пептидомиметици, които са инхибитори на $\alpha_v\beta_3$ интегрин, предизвикват ендотелна клетъчна апоптоза. Те инхибират ангиогенезата, като блокират взаимодействието на интегрините с техните извънклетъчни лиганди. Антагонисти на $\alpha_v\beta_3$ интегрини

индуцират апоптоза и блокират туморната ангиогенеза (*Niu and Chen 2011; Marelli et al. 2013; Yu et al. 2014*). Пептидните RGD аналози повлияват клетъчната адхезия, миграция, метастази на тумора, ангиогенеза или директно предизвикват апоптоза (*Paolillo et al. 2018*).

RGD има способността да предизвиква апоптоза чрез повлияване на процесите на клетъчно сцепление и интегринова сигнализация (*Ruoslahti and Reed 1999*). На Фигура 6 са представени двата механизма, по които пептида блокира връзката между интегрините и предизвиква апоптоза.



Фигура 6. Механизми на RGD пептиди (*Ruoslahti and Reed 1999*)

За да оцелеят клетките се свързват със субстрати, с помощта на интегрините (Фиг. 6а). Добавянето на разтворими RGD пептиди предизвиква апоптоза чрез блокиране на сигналите между интегрините и ECM (Фиг. 6б)

Buckley и сътр. предлагат друго обяснение на процеса представен на (Фиг. 6с). Според тези автори, разтворимият RGD предизвиква апоптоза чрез активирането на прокаспаза-3. Синтетичният пептид се свързва конкурентно на мястото на естествения

RGD мотив в прокаспазата. По този начин блокира вътремолекулярното взаимодействие с DDM и причинява апоптоза (*Buckley et al. 1999; Ruoslahti and Reed 1999*).

Aguzzi и сътр., през 2004 стигат до заключението, че RGD има свойството да се свързва директно с каспази-8 и -9 и да ги активира. Проведено е изследване с човешки ендотелни клетки от пъпна вена (HUVECs), при които пептида инициира апоптоза по независим от интегрините път. Предизвикването на клетъчна смърт по този механизъм е обещаващ подход за използването на RGD в прицелната терапия (*Aguzzi et al. 2004*).

Инхибиторите на ангиогенезата предотвратяват образуването на нови кръвоносни съдове. По този начин те спират или забавят растежа и разпространението на тумори и се избягва токсичността върху клетката (*Prager et al. 2012*).

Идеята за създаването на лекарствени продукти, които се насочват към повлияване на процеса на ангиогенеза при туморните клетки се появява за пръв път преди около 30 години. През последното десетилетие лекарствени молекули от тази група са одобрени за използване в терапията или са в процес на предклинични и клинични изпитвания (*Maj et al. 2016*).

В сравнение с конвенционалните терапии, антиангиогенната стратегия има много предимства. За разлика от химиотерапията и лъчетерапията, тя е насочена не само срещу туморните клетки, но и срещу ендотелни клетки на туморните кръвоносни съдове, които имат добра генетична стабилност и рядко развиват лекарствена резистентност (*Li et al. 2012*). Туморните ендотелни клетки също така имат повишена експресия на специфични протеини, което ги отличава от нормалните клетки. Фенотипните различия ги определят като подходящи мишени при антиангиогенни подходи за лечение.

Ангиогенните инхибитори могат да забавят туморната прогресия или да доведат до регресия на тумора. Въпреки тези си предимства, те могат да причинят тежки странични реакции. Това е причината поради която при дизайна на нови антиангиогенни средства да се използва подход за включване на цитостатични агенти в липозоми, полимери, наноразмерни носители, които са средства за селективното им доставяне до раковите клетки (*Danhier et al. 2012*).

Ангиогенните инхибитори осъществяват своето действие по различни механизми. Въз основа на това Gasparini et al., 2005 и Sudhakar et al., 2003 предлагат следната им класификация (*Sudhakar et al. 2003; Gasparini et al. 2005*):

- инхибитори, които директно взаимодействат с активирани ендотелни клетки, чрез инхибиране на процесите на пролиферация и миграция;
- инхибитори, които взаимодействат непряко, като блокират синтеза на ендотелни растежни фактори;
- инхибитори, които повлияват различни етапи от процеса на туморна ангиогенеза;
- инхибитори на VEGF.

3.3. Антитуморна активност на RGD-пептидите

През последните години RGD и негови аналози са включени в предклинични и клинични изследвания за определяне на потенциала им като терапевтици при противотуморно лечение, а също и употребата им като агенти при диагностика.

Разработени са множество линейни и циклични пептиди, които съдържат RGD мотива и проявяват значителна цитотоксична активност при *in vitro* и *in vivo* изследвания. Друга отличителна характеристика на RGD пептидите е, че по време на предклинични проучвания показват висока антиметастатична активност (*Ruoslahti and Reed 1999*). Трипептидът може да се използва в противотуморната терапия самостоятелно като: цитотоксичен агент с висока избирателност спрямо туморните клетки; инхибитор на ангиогенезата; терапия, която е специфично насочена към интегриновите рецептори; инициатор на апоптоза при туморни и ендотелни клетки.

Освен това RGD може да се конюгира с противотуморни препарати и маркери, използвани за диагностика, дори и в ранни етапи на заболяване (*Battistini et al. 2021*). По този начин може да се постигне доставяне на лекарственото вещество до туморните клетки и повишаване ефикасността на терапията (*Temming et al. 2005; Wang et al. 2013b; Hou et al. 2016*). Предимствата на този метод е, че новополучените молекули притежават по-добри фармакокинетични свойства, в сравнение с големите белтъчни лекарствени молекули, бързо се натрупват в туморната маса, повишава се на пермеабилитета на клетъчната мембрана и се постига висок афинитет към прицелната молекула (*Battistini et al. 2021*). В практиката вече са навлезли визуализиращи средства - радиотрасери, с включени в тях RGD, които се свързват специфично с $\alpha_v\beta_3$ интегрините. Те подпомагат за ранното откриване на туморни клетки. Освен това са направени проучвания с терапевтични средства, които съдържат RGD. Те показват много добри резултати както

при *in vitro*, така и при *in vivo* изследванията (Saiki et al. 1990; Tabatabai et al. 2010). Друго предимство на пептидните конюгати е, че те са по-малко токсични в сравнение със самостоятелно прилаганите химиотерапевтици.

Недостатъците при използване на пептиди като лекарствени вещества са ниската им метаболитна стабилност спрямо протеолиза в ГИТ, ниски нива на абсорбция след перорален прием, намалена пенетрация, бързо екскретиране през черен дроб и бъбреци. Освен това е възможно и проява на нежелани взаимодействия между някои гъвкави пептиди и рецепторите (Bruno et al. 2013).

За да се постигне повишена ефективност, бионаличност, селективност и стабилност на прилаганите пептиди, се използва пептидомиметичен подход.

Пептидомиметиците представляват молекули, които се различават по химичен строеж от природните съединения (Danhier et al. 2012), но проявените биологични ефекти са съизмерими (Schaffner and Dard 2003) или дори могат да бъдат по-големи (Qvit et al. 2017). Важно е да се отбележи, че пептидомиметиците се характеризират с конформационна устойчивост, което им осигурява значително предимство при взаимодействие с рецептора. Тези характеристики ги определят като антагонисти с добри свойства, които са подходящи заместители на природните биологичноактивни вещества. Това се дължи на възможността им да взаимодействат с определен рецептор или ензим, подобно на нативната молекула, но разликата в структурата не позволява изпълнението на тяхната роля в биологичните процеси. Пептидомиметичният подход е концентриран върху превъзможването на тези недостатъци (Lenci and Trabocchi 2020).

Съществуват голям брой пептиди, които съдържат RGD в молекулата си и се използват за изследване и в клиничната практика. В зависимост от своята структура и особености те могат да бъдат класифицирани в следните групи:

а) RGD миметици с линейна структура:

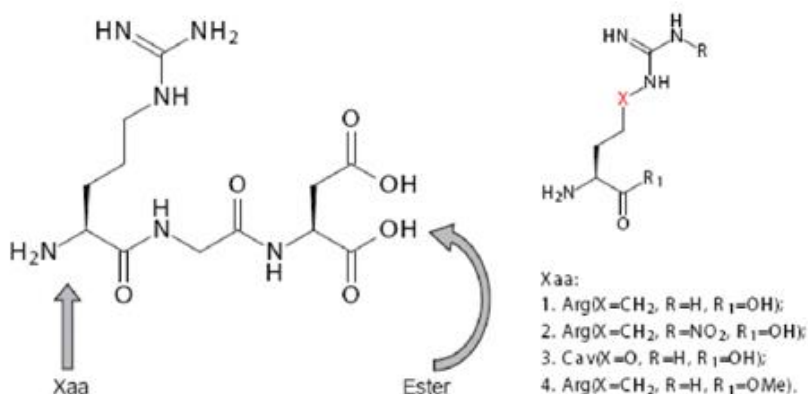
Към тази група спадат Arg-Gly-Asp-Val (RGDV), Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) и Arg-Gly-Asp-Phe (RGDF). Те представляват антиадхезивни тетрапептиди, предизвикващо намалено клетъчно делене на клетки от туморния ендотел (Jiang et al. 2016).

Линейните пептиди, които съдържат 2-10 аминокиселини, притежават известна конформационна гъвкавост, която води до ниска селективност. Смята се, че аспарагиновата киселина в С-края на пептида обуславя по-голямата им податливост на

разграждане от пептидази (*Mas-Moruno et al. 2010*). Този съществен недостатък може да се преодолее чрез включване в структурата на D-аминокиселини, небелтъчни аминокиселини, както и промяна в дължината на веригата, циклизация и др. (*Yamamoto et al. 2002*).

През 1987г., Pierschbacher и Ruoslahti установяват, че специфичното свързване на пептида към рецептора може да се повлияе от четвъртата и петата аминокиселина след Asp. Изменението в химичните групи може да окаже въздействие върху конфигурацията на RGD и селективността спрямо интегрините. Предполага се, че това е вследствие на прецизността в разположението на молекулата между α - и β -субединиците (*Ruoslahti and Pierschbacher 1987*).

Пайпанова и колектив (2012 г.) постигат повишаване на цитотоксичния ефект върху туморни клетъчни линии HepG2 (хепатоцелуларен карцином на черен дроб) и MCF-7 (рак на гърдата) чрез получаване на метилов естер при карбоксилната група на аспаргиновата киселина в С края на RGD пептид (Фиг. 7) (*Balacheva et al. 2012*).



Фигура 7. Структура на RGD и негови миметици: Arg-Gly-Asp (RGD), **1**); Arg(NO₂)-Gly-Asp (R(NO₂)GD), **2**); Cav-Gly-Asp (CavGD), **3**); Arg-Gly-Asp-метилов естер (RGD-OMe), **4**) (*Balacheva et al. 2012*)

б) RGD миметици с циклична структура:

Циклизирането на пептидите е доказан подход, използването на който позволява да се подобри свързването на RGD към интегриновите рецептори. В следствие на това, чрез намаляване структурната им гъвкавост се повишава тяхната химична и ензимна стабилност. При проведено сравнително проучване е установено, че цикличните аналози на пептида се свързват с по-висок афинитет спрямо линейните (*Ruoslahti 1996*). Освен това те проявяват повишена стабилност в разтвор, а също така и към действието на протеазите. При тези аналози се наблюдава също така и повишена биологична активност (*Roxin and Zheng 2012*).

Към тази група пептиди спада Cilengitide (cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) или c(RGDf(NMe)V)). Това е първият синтезиран RGD пептид с циклична структура. В момента Cilengitide е подложен на последна фаза клинични проучвания за терапия на глиобластом (*Reardon et al. 2011*).

Характерно за него е, че проявява специфичност и във висока степен подтиска процеса на активиране на $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_v\beta_5$ интегрините. Cilengitide демонстрира обещаващи свойства, като инхибира пролиферацията на клетки от меланом, глиобластом, рак на белия дроб и панкреаса (*Reardon et al. 2011*). Той блокира деленето на стволови клетки за васкулогенезата. Освен това има способността да инхибира свързването на алфа интегрини с молекули от ECM, ангиогенезата, адхезията и довежда до активиране на програмираната клетъчна смърт при ендотелните клетки (*Tabatabai et al. 2010*). Важно предимство, което притежава Cilengitide, е високият му афинитет към $\alpha_v\beta_3$ интегрин (*Marelli et al. 2013*).

Цикличният аналог на RGD - RGD4C притежава около 200 пъти по-висок афинитет към $\alpha_v\beta_3$ интегрин в сравнение с линейните представители (*Temming et al. 2005*). Той подтиска туморния растеж и метастазирането при MDA-MB-435 туморна клетъчна линия от рак на гърдата чрез инхибиране на $\alpha_v\beta_3$ интегрините, разположени в ендотелните клетки на ангиогенните кръвоносни съдове. Освен високата противотуморната активност RGD4C демонстрира и ниска токсичност (*Xiong et al. 2010*).

Въпреки представените предимства съществуват и линейни аналози с по-добри свойства в сравнение с цикличните (*Tabatabai et al. 2010*). Например Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) и Arg-Gly-Asp-Val (RGDV) демонстрират по-добра цитотоксичност в сравнение

с нативния RGD, като намаляват пролиферация при аденокарцином на простата и индуцират апоптотичния път (*Schaffner and Dard 2003; Aguzzi et al. 2004*).

в) конюгати на RGD:

С цел да се избегнат нежеланите ефекти и да се подобри химиотерапията се разработват нови подходи за лечение. Пример за подобен подход е използването на т. нар. линкери, които имат свойството да разпознават специфично туморните клетки. RGD пептидите могат да бъдат използвани като линкери, които се свързват с висок афинитет към интегрините (*Colombo and Bianchi 2010*) и навлизат в клетката чрез рецептор-медирана ендоцитоза. Този механизъм може да се използва за доставяне и освобождаване на цитотоксичните препарати в туморните клетки (*Chatzisideri et al. 2018*).

Изследвани са различни лекарство-доставящи системи, които използват RGD: липозоми, полимерни наночастици (мицели, дендримери), пептидни лекарствени конюгати и пептидни prodrug конюгати (*Kotamraj et al. 2011*). При наноразмерните лекарствени носители активното вещество или диагностичният агент се включват в ядрото им, а RGD е разположен по повърхността. Основно тяхно предимство е техният размер (10-500 nm), който подпомага навлизането им в туморните тъкани (*Colombo and Bianchi 2010; Javali et al. 2012; Raj et al. 2014; Saraf et al. 2015a, 2015b*).

Едновременното прилагане на пептидни аналози на RGD с противоракови лекарства има по-голяма ефективност срещу някои тумори и понижена токсичност върху нормалните тъкани. RGD конюгирани с противоракови средства проявяват по-добра антитуморна активност, имат по-продължителен ефект и минимална цитотоксичност спрямо здрави клетки. Пептидът може да бъде конюгиран с цитотоксично лекарство и да го пренесе в клетката чрез съответен пептиден рецептор (например интегрин). Такива пептиди са известни като клетъчно насочващи, тъй като те могат специфично да бъдат свързани със съответния рецептор на клетката (*Thundimadathil 2012*).

Например RGD и NGR се конюгират с Cisplatin, която се използва при лечение на редица туморни заболявания. Основен недостатък на терапията с Cisplatin е отчетената ѝ ниска селективност спрямо ракови и нормални клетки (*Cirillo and Giacomini 2021*). Пептидите осигуряват селективното насочване на цитостатика към $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_v\beta_5$ интегрините, разположени по повърхността на ангиогенните ендотелни туморни клетки.

При *in vitro* изследвания новообразуваните комплекси предизвикват потискане на клетъчното размножаване на ендотелни ракови клетки (*Mukhopadhyay et al. 2008*).

Hosseini и сътр. свързват цикличният RGD4C с интерлевкин-24. Новополучената молекула показва висок афинитет към туморните клетки и повишени антитуморен и антиангиогенен ефект в меланомни клетки (*Hosseini et al. 2017*). RGD4C разпознава специфично $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_v\beta_5$ интегрините и активира апоптоза в туморните клетки, с помощта на каспаза-3 и -8 (*Xiao et al. 2009*).

Цикличният RGD4C е използван също така и като конюгат с Doxorubicin, който се включва в молекулата на ДНК и инхибира репликацията ѝ (*Chen and Chen 2011; Sun et al. 2017*). Конюгираният към RGD Doxorubicin успява да проникне в клетката и да достигне до ядрото и митохондриите, където проявява своето действие. Друго предимство на новополученият конюгат е, че той е с по-ниска токсичност към черния дроб и сърцето, в сравнение със самостоятелното използване на лекарствения продукт (*Xiao et al. 2009*).

Проведено е изследване на конюгат на RGD с Pt(IV). Той демонстрира по-висока цитотоксична активност спрямо Pt(II) при меланомна клетъчна линия (SK-MEL-23), за която е характерна експресия на $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_v\beta_5$ интегрини. По този начин пептидът осигурява натрупване и последваща по-висока цитотоксичност на Pt(IV). Освен това новополучената молекула проявява ниска цитотоксичност при човешки аденокарцином на панкреаса (CAPAN-1), при който липсва експресия на интегрини (*Massaguer et al. 2015*).

RGD е конюгиран също така и с противотуморния пептид соматостатин, при което се наблюдава повишена активност на каспаза-3 в панкреатична туморна клетъчна линия - CA20948 (*Capello et al. 2006*).

г) Мултимерни форми на RGD пептиди:

Описано е получаването на нов цикличен аналог на RGD – iRGD (CRGDKGPDC). Получаването на подобен тип аналози позволява достигане на лекарствени препарати до туморната тъкан, без да са свързани по химичен начин (*Alberici et al. 2013*). iRGD осигурява повишаване на количеството на противотуморните лекарствени вещества и липса на странични ефекти. Например цикличният пептид може да се приложи заедно с

Doxorubicin, при което увеличава пропускливостта на съдовете за лекарственото вещество (*Sugahara et al. 2010*).

4. Полиамини

Семейството на полиамините има важна роля в голям брой биохимични процеси. През 1678 холандският търговец и учен Антони ван Льовенхук изолира няколко „тристранни“ кристала от семенна течност (*Yatin 2002; Wallace et al. 2003; Bachrach 2010*). Много по-късно те били идентифицирани като Spermine phosphate от Ладенбург и Абел. А Spermidine и Putrescine са открити в тъкани по-късно (*Yatin 2002; Wallace et al. 2003; Gugliucci 2004; Silva 2013*).

Полиамините putrescine (1,4-диаминобутан), spermidine (1,8-диамино-4-азаоктан) (*Fulda and Debatin 2004*) и spermine (1,12-диамино-4,9-дiazододекан) (*Cohen 1998*) са поликатионни съединения (*Seiler and Raul 2005*) широко разпространени при значителната част от прокариотните и при всички еукариотни клетки (*Gerner and Meyskens 2004; Bachrach 2010; Park and Igarashi 2013*). Притежават ниско молекулно тегло и гъвкав строеж (*Yatin 2002; Wallace et al. 2003; Gerner and Meyskens 2004; Silva 2013*). Spermidine и spermine съществуват във водни разтвори при рН 7,4 като напълно протонирани поликатиони. Високите нива на положителен заряд са важен фактор за биологичните функции на тези молекули, а промените в стойностите на рКа на полиаминовия азот могат да повлияят и нарушат тяхната клетъчна функция. Катионната им природа обуславя електростатично взаимодействие с отрицателно заредени молекули, каквито са нуклеиновите киселини, белтъците и фосфолипидите (*Park and Igarashi 2013*). Полиамините са широко разпространени в природата и е известно, че са необходими в микро- до милимоларни концентрации за протичането на голям брой клетъчни функции. Въпреки това липсват достатъчно данни за тяхната роля в клетъчните процеси. Изучаването и идентифицирането на функциите на полиамините представлява значителен интерес и може да разкрие нови области за приложението им (*Seiler and Raul 2005*).

Клетките се нуждаят от полиамини в процеса на растеж. Те могат да ги синтезират самостоятелно или да си ги набавят от външни източници (например храна или интестинални бактерии) (*Gerner and Meyskens 2004; Gugliucci 2004; Uemura and Gerner 2011*). Екзогенните полиамини навлизат в клетките чрез активен транспорт през клетъчната мембрана. След това те лесно могат да се разпределят във всички части на

клетката, поради високата си разтворимост (*Silva 2013*). По-голямата част от живите организми имат способността да синтезират вътреклетъчни полиамини от аминокиселини (*Wallace and Fraser 2003*).

Полиамините са важни за протичането на пролиферация, диференциация и апоптоза (*Wallace et al. 2003; Igarashi and Kashiwagi 2010*). Предполага се, че ефектите им върху тези процеси се причиняват от различни специфични молекулни взаимодействия. Освен това те участват в регулация на йонните канали, промени в мембранния поляритет, ДНК репликация, транскрипция и др. (*Silva 2013*).

Известно е, че нивата на полиамините са повишени при пролифериращи клетки. При еукариотни клетки, заради важната им роля в клетъчните функции, съществува стриктен контрол върху вътреклетъчните им нива чрез множество механизми, които включват биосинтез, катаболизъм, поемане и екскреция (*Takao et al. 2006; Persson 2009; Igarashi and Kashiwagi 2010*). С помощта на тези механизми се осигурява поддържането на полиаминна хомеостаза в клетката. Процесите на усвояване и биосинтез се повишават като отговор на клетката при пролиферативни стимули. От друга страна, при повишено съдържание на полиамини се индуцират процеси на разграждане и екскреция едновременно с инхибирането на синтеза и усвояването им (*Silva 2013*).

Съществуват данни за силната връзка между нивото на растеж на раковите клетки и наличието на полиамини. Зависимостта се изразява в това, че раковите клетки при човека изискват повече полиамини отколкото нормалните (*Silva 2013*). Намаляването на нивата на естествените полиамини при раковите клетки може да предизвика нарушаване на някои клетъчни функции и цитотоксичност, което прави метаболитния път на полиамините важна мишена при ракова терапия (*Wallace and Fraser 2003*).

Потенциалните стратегии за лечение на рак включват процесите на инхибиране на полиаминовия синтез или индукцията на техния катаболизъм (*Silva 2013*). Полиаминовият път представлява важна мишена за химиотерапевтична намеса, като намаляването на нивото на полиамините води до нарушаване на редица клетъчни функции, а в някои случаи има цитотоксичен ефект (*Cohen 1998; Seiler and Raul 2005*). След като биосинтеза на полиамини придобива значение като мишена за химиотерапията, могат да се използват два подхода за намаляване на вътреклетъчните нива на полиамините: използването на инхибитори на биосинтетичните ензими или използването на аналози на полиамините. Агенти, които причиняват промени в

метаболизма или функцията на полиамините, могат да бъдат използвани като потенциални вещества за лечение на рак както самостоятелно, така и в комбинация (*Silva 2013*).

Първоначално са синтезирани инхибитори на почти всички биосинтетични ензими на полиамините, след което е определена тяхната антинеопластична активност. При опити *in vitro* и *in vivo* тези инхибитори прекъсват полиаминовия метаболизъм. Това от своя страна води до спиране на туморния растеж. За жалост окуражаващите предклинични резултати не се потвърждават при предклинични изследвания. В момента най-активно изследваният подход е създаването и използването на аналози на полиамините като инхибитори на туморния растеж. В основата на този подход са механизмите на обратна връзка на полиамините. Тези механизми регулират полиаминовия синтез чрез намаляване на транспорта и повишаване на разграждането и експорта. Някои аналози на полиамините могат да имитират тези регулаторни свойства на естествените полиамини и да индуцират катаболитни процеси, инхибиране на синтеза им и намаляване на количеството им, което води до спиране на туморния растеж (*Wallace and Fraser 2003*).

Описани са взаимодействия на полиамини с аминокиселини, в резултат на които се образуват амиди, инхибиращи растежа на ракови клетки. Доказано е, че аналозите на Lys-Spm притежават потенциал да инхибират растежа на различни ракови клетки. Фактът, че аминокиселината Canavanine може успешно да бъде прилагана като антитуморен агент ни насочва към способността ѝ да се свързва с различни полиамини. Полиамините също така могат да бъдат функционализирани със сулфонамидни аналози инхибитори на L-аспарагин синтетазата и потенциални антитуморни агенти. Това може да доведе до синергизъм в действието им (*Moinard et al. 2005*).

5. Пептиден синтез

5.1. Пептиден синтез в разтвор

Пептидният синтез в разтвор е най-старият метод за получаване на пептиди. При него образуването на дипептид се извършва чрез контролирано свързване на две аминокиселини, при което едната е защитена от към своя N-край, а другата от към своя C-край. След образуването на амидната връзка защитения дипептид се изолира, пречиства и охарактеризира.

Съществуват два широко прилагани подхода за синтез на пептидна верига. Първият се състои в последователно деблокиране на N α -защитната група на първата C-защитена аминокиселина и последващата ѝ кондензация с друга аминокиселина, защитена от своя N α -край. Ако описаният процес се повтори няколко пъти, то накрая ще се получи олиго/полипептид, синтезиран чрез т. нар. метод на „последователното свързване“ (Схема 1). От друга страна, ако в процеса на свързване участват защитени пептидни фрагменти, то стратегията, по която се осъществява синтеза се нарича „фрагментно свързване“.

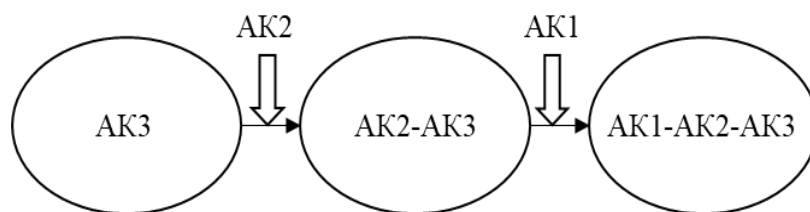


Схема 1. Последователно свързване при пептиден синтез в разтвор

Синтезът в разтвор позволява междинните продукти да бъдат изолирани и охарактеризирани на всяка стъпка. Лесно се определят нереагиралите напълно реагенти при реакциите на кондензация и деблокиране. Друго предимство при този подход е възможността преди започване на следващия етап на кондензация, всички странични продукти да бъдат отстранени.

Двата подхода на фрагментно и последователно свързване имат своите предимства и недостатъци. Фрагментната кондензация се използва при синтезиране на дълги пептиди. От друга страна при метода на последователното свързване добавянето на единични аминокиселини води до малки разлики в молекулните тегла на изходните и крайните продукти. Най-често за синтез на по-къси линейни пептиди, представляващи фрагменти от по-голяма структура, се използва последователно свързване, като след това те се кондензират един с друг посредством фрагментна кондензация.

5.1.1. Кондензационни методи

В зависимост от избраната схема за синтез и защитата на аминокиселините се подбира и подходящ кондензационен метод за всеки етап от синтеза на целевия пептид.

Основните методи за образуване на пептидна връзка са следните:

5.1.1.1. Азиден метод

Един от основните методи за пептиден синтез – азиден метод, е въведен от Theodor Curtius през 1902 година (*Curtius 1902*). Характерно при този подход са ниските нива на рацемизация. Днес азидният метод се използва най-често при кондензацията на защитени пептидни сегменти при фрагментна схема за синтез, благодарение на достъпността на изходните реагенти, простотата на провеждане на кондензацията и ниската рацемизация.

5.1.1.2. Метод на активираните естери

Обикновените алкилови естери могат да бъдат подложени на аминолиза, но скоростта на протичане на реакциите е много ниска. По тази причина приложението са намерили естерите, притежаващи лесно отцепваща се група като тяхна алкохолна компонента, наречени активирани естери. Скоростта на аминолизата в този случай е доста по-висока и позволява образуване на амидна връзка при стайна или по-ниска температура (*Gordon et al. 1948, 1949; Wieland 1959; Bodanszky 1979*).

Активираните естери се получават чрез кондензация на $N\alpha$ -защитена аминокиселина със съответния фенол или хидроксисукцинимид в присъствие на кондензиращи агенти. Като такива могат да бъдат използвани DCC, TBTU, TCTU, HBTU и др.

5.1.1.3. Карбодимиден метод

Дициклохексилкарбодимида (DCC) е въведен в пептидната химия през 1955 година и продължава да е един от най-използваните реагенти (*Sheehan and Hess 1955*).

Приложение намират и други карбодимиди, като диизопропилкарбодимида (DIC), който е с почти същата реакционна способност като DCC (*Sheehan and Hlavka 1956*). В общия случай реакцията на кондензация има следния механизъм: при взаимодействието на карбоксилната група на $N\alpha$ -защитена аминокиселина с една от $N=C$ връзките на карбодимида се образува O-ацилкарбамид, който е първият активен интермедиат, образуващ се в процеса на кондензационната реакция. След това, така полученото силно реакционноспособно междинно съединение, търпи аминолиза от аминокиселинната компонента, при което се образува целевия амид и диалкил карбамид (Схема 2)

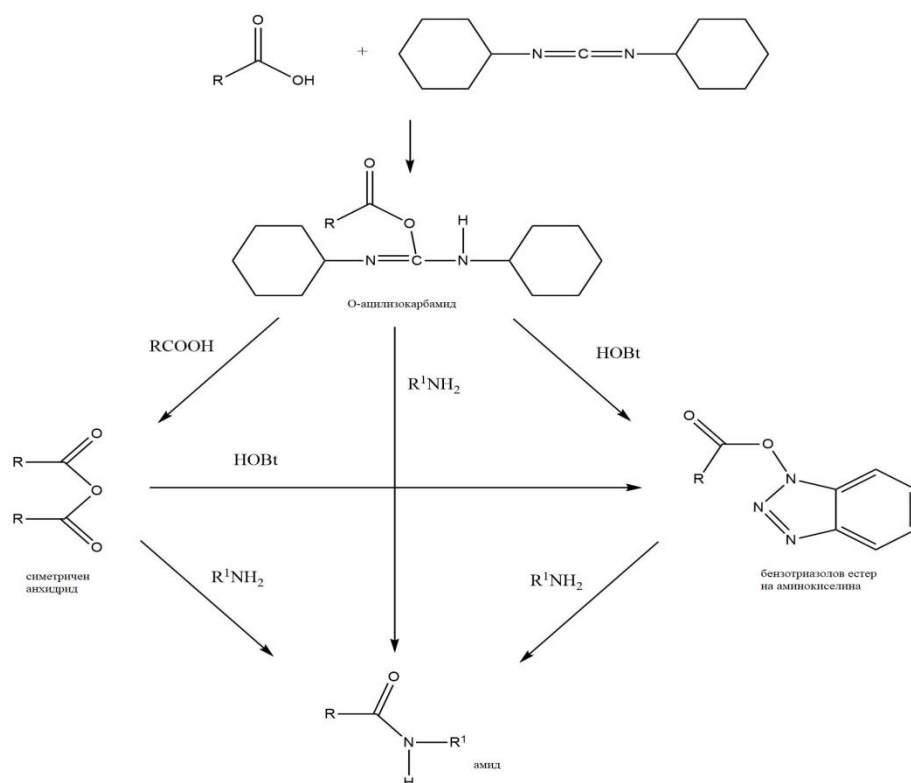


Схема 2. Протичане на кондензация при карбодиимидния метод

Като недостатък на DCC метода може да се отбележи възможността в процеса на активиране да се образува нереакционноспособният N-алкилкарбамид, с което реакцията се прекратява. Друг недостатък на метода е почти невъзможното пълно отстраняване на получените DC-карбамид. Той би могъл да затрудни последващите реакции или да остане като онечистване в крайния продукт. Ето защо в някои случаи се предпочита да се работи с водоразтворими карбодиимида, при които образуваните се в процеса на синтез производни на карбамида се отстраняват лесно чрез промиване с вода или разреждана киселина. Един от най-използваните и популярните разтворими карбодиимида е N,N'-диизопропилкарбодиимида, който е широко използван в твърдофазния пептиден синтез.

Други използвани разтворими карбодиимида са BDDC (бис[4-(2,2-диметил-1,3-диоксолил)метил]карбодиимид) и EDAC (1-етил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид).

Един от основните проблеми в хода на пептидния синтез е рацемизацията, която успешно може да бъде намалена при използването на предложения от Koenig и Geiger

хидроксibenзотриазол и производни (König and Geiger 1970). Така степента на рацемизация може да бъде намалена до 10 пъти.

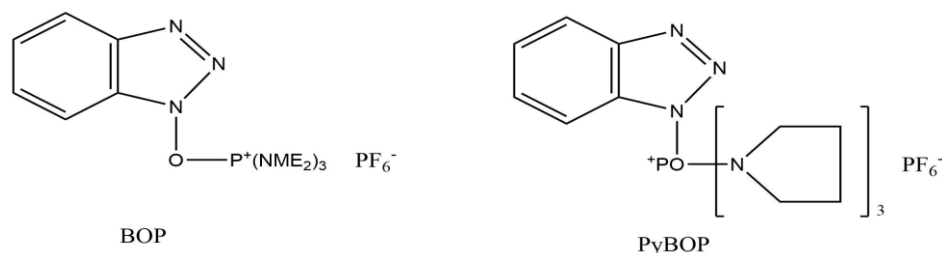
Въпреки тези неудобства карбодимидния метод остава един от използваните методи за пептиден синтез в разтвор.

5.1.1.4.Метод на смесените анхидриди

Този метод се основава на използването на различни анхидриди като активирани посредници. Смесен анхидрид може да се получи при взаимодействието на алкилхлорокарбонат с разтвор на $N\alpha$ -защитена аминокиселина в присъствието на третична база (Boissonnas 1951; Vaughan 1951). След получаването на смесения анхидрид той реагира с аминокомпонентата, при което се образуват чисти продукти, с висок добив (Wieland and Bernhard 1951).

5.1.1.5.Активиране чрез използване на фосфониеви и урониеви реагенти

Използването на ацилфосфониева сол като активиращ агент при образуването на amidна връзка е предложено за първи път от Kenner през 1969 г. По-късно с въвеждането на 1H-бензотриазол-1-ил-N-окси-трис(диметил amino) фосфониев хексафлуорофосфат (BOP) от Castro, използването на този вид активиращи реагенти намира все по-широко приложение (Фиг. 8)



Фигура 8. Структура на BOP и PyBOP

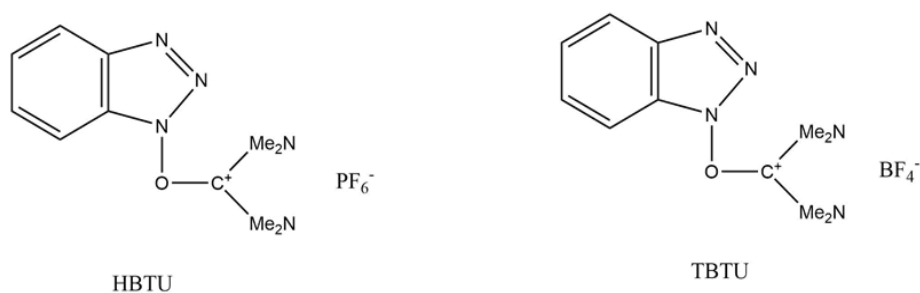
През последните години са разработени множество фосфониеви соли, повечето от които се използват активно в пептидния синтез. Един от продуктите, който притежава всички предимства на BOP реагента е PyBOP.

Негово основно предимство е, че при кондензационни реакции с участие на N-метилирани аминокиселини, които обикновено могат да бъдат бавен и труден процес,

PyBOP позволява ефикасно и бързо протичане и избягване на образуването на енантиомери.

Като недостатък на PyBOP може да се отбележи, че неговите разтвори са стабилни за не повече от 24 часа. Основен недостатък на BOP реагента е образуването на силно канцерогенни странични продукти по време на активирането му.

През последните години най-голямо приложение за създаване на пептидна връзка от този клас съединения намират: O-(бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилкарбамид хексафлуорофосфат (HBTU); O-(бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилкарбамид тетрафлуороборат (TBTU); N,N,N',N'-тетраметил-O-(3,4-дихидро-4-оксо-1,2,3-бензотриазин-3-ил)уруниев тетрафлуороборат (TDBTU) и др. (Фиг. 9)



Фигура 9. Структура на TBTU и HBTU

На Схема 3 е представен механизма на активирането на изходните продукти с помощта на TBTU

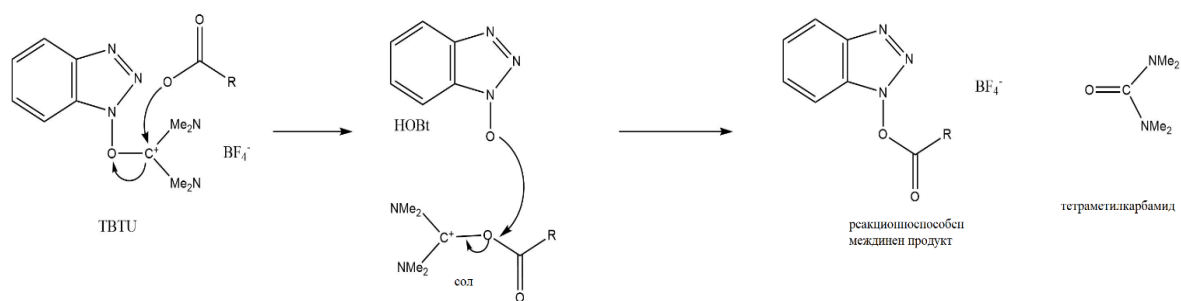


Схема 3. Активиране на карбоксилната компонента посредством TBTU

ТВТУ и НВТУ са много добри активиращи агенти, както за твърдофазния пептиден синтез, така и за синтеза в разтвор. Поради ниската степен на рацемизация, която се наблюдава при тяхното използване и високата скорост на кондензационната реакция, тези два реагента намират широко приложение.

5.2. Твърдофазен пептиден синтез (SPPS)

След въвеждането на твърд носител за пептиден синтез от Merrifield през 1963г., твърдофазният пептиден синтез доказва своето голямо предимство пред класическия метод за синтез в разтвор по отношение на скоростта и ефективността на работа с него (*Aleksiev and Stoev 1971*).

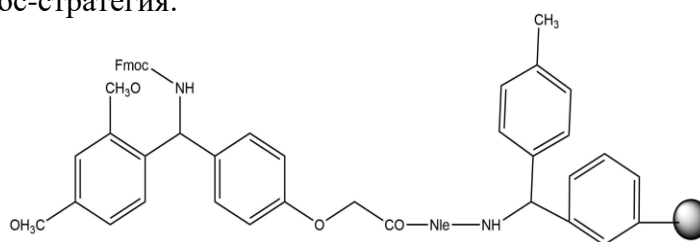
В основата на твърдофазния синтез е изграждането на пептидна верига върху твърд носител – специално обработена полимерна неразтворима смола. Към нея при определени условия се свързва първата аминокиселина и също при определени условия готовата пептидна верига се отцепва от смолата в края на синтеза.

В зависимост от типа на използваната смола в практиката са се наложили два типа защитни групи за $N\alpha$ -амино функцията на аминокиселината – киселинно лабилната *t*-бутилоксикарбонилна група (Вос), Вос – стратегията (Мерифилдов синтез) и базично лабилната 9-флуорофенилметилоксикарбонилна (Fmoc) група, която днес е в основата на Fmoc – стратегията (синтез на Шепард).

От особено важно значение за твърдофазния пептиден синтез е получаването на голям брой дериватизирани смоли, чиито свързващи групи (линкери) са лабилни в кисела среда.

Най-широко използвани са няколко вида смоли, чрез които се получават различаващи се по своя С-край пептиди:

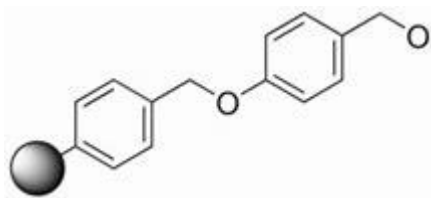
- Rink Amide MBHA смола – предназначена за получаване на С-крайни амиди по Fmoc-стратегия:



Фигура 10. Rink амидна MBHA смола

Fmoc-Rink-амидна (4-(2',4'-диметоксифенил-Fmoc-аминометил)-фенокси)-функционална група, прикачена към полистирена с 1% DVB, е изключително чувствителна спрямо действието на киселини. По тази причина крайният пептид се отделя много лесно от тези смоли в присъствието на силно разрежена киселина, например 1% TFA/DCM или 10% AcOH/DCM;

- Wang-смоли – линкерът, на които представлява остатък от 4-хидроксиметилфеноксиоцетна киселина, прикачена посредством полиетиленгликол (ПЕГ) върху полистирен, силикагел или други носители, позволяващи синтези на дълги пептиди.



Фигура 11. Wang смола

В повечето случаи при използването на фрагментна кондензация върху полимерен носител се предпочитат за работа различно дериватизирани Wang-смоли, поради съвместимостта на линкерите с ортогоналната схема на защита на фрагментите.

Един от основните моменти при SPPS е определянето на края на реакциите на деблокиране и кондензация. Това става главно посредством т. нар. Кайзер тест, показан на Схема 4.

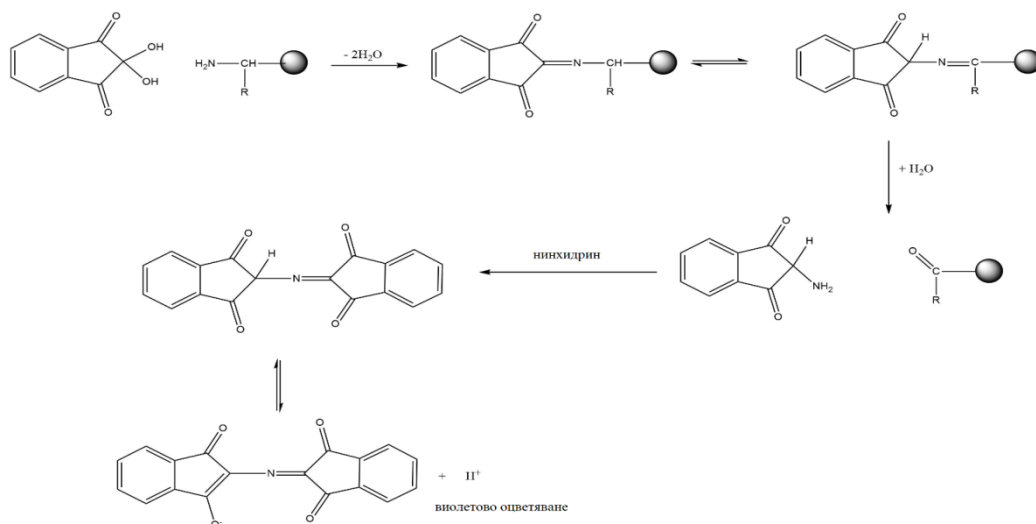


Схема 4. Химични реакции в процеса на детекция посредством Кайзер тест (Kaiser et al. 1970)

5.2.1. Съвместимост на защитните групи – ортогоналност

Основните защитни групи използвани в SPPS за защита на α NH₂-функцията на аминокиселините са Boc и Fmoc.

В съвременния SPPS Boc-стратегията намира ограничено практическо приложение. Ето защо повечето новоразработени смоли и защитни групи са свързани със синтеза на пептиди по Fmoc-стратегия.

С развитието на твърдофазния пептиден синтез става все по-важно използването на различни типове защитни групи с висока степен на съвместимост помежду си. Това позволява всяка от тях да може да бъде отстранявана в присъствието на останалите. Ортогоналната защитна схема се дефинира като пълна селективност на един клас защитни групи спрямо всички останали и обратното (Barany and Merrifield 1977; Barany and Albericio 1985).

Например при използването на Boc-група като N α -защитна група в комбинация с бензилна защита на страничната верига, то за защита на C-края може да бъдат използвани групи, които са киселинно лабилни. Ако бъде използвана tBu/OBzl защита на страничната верига, очевидно Boc-групата няма да бъде подходяща за защита на N α -края, за разлика от Fmoc-групата (Georgieva 2022).

На базата на този подход в пептидния синтез се избират подходящи защитни групи, които най-пълно да изпълняват изискванията, наложени от избраната схема за синтез.

6. Основни изводи от литературния обзор

- Съвременните подходи за лечение на раковите заболявания са: чрез химиотерапевтици или радикални инвазивни методи. Проблемът с откриването на терапия с ниски нива на токсичност и стрес при пациента е все още на лице;
- Подход, оказващ благоприятно влияние върху лечението на ракови заболявания, е локализирането и насочено доставяне на лекарственото вещество в тъканта, в която се развива заболяването;
- RGD-пептидите притежават свойството да се свързват специфично с интегринови рецептори, които са свръхекспресирани по повърхността на туморните клетки. Освен това RGD предизвиква апоптоза в раковите клетки и инхибира процеса на туморна ангиогенеза;
- Синтетичните полиамини представляват молекули, които успешно могат да се свържат на мястото на естествените. Невъзможността на синтетичните аналози да изпълняват функцията на нативните полиамини в клетъчните процеси води до нарушения в тях и последваща клетъчна смърт;
- Конюгирането на противотуморното действие на RGD и полиамините е подход, който може да осигури синергичен ефект срещу туморните клетки.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Въз основа на изложените по-горе основни изводи от литературния обзор е формулирана целта на настоящия дисертационен труд, а именно:

ЦЕЛ

Получаване на нови хибридни структури – RGD\полиамини и биологичен скрининг за потенциално цитотоксично действие.

Във връзка с изпълнението на така формулираната цел си поставихме следните задачи:

ЗАДАЧИ

1. Получаване на защитени небелтъчни аминокиселини, модификанти за синтеза на RGD пептидни аналози;
2. Синтез на RGD пептидни аналози;
3. Синтез на аналози на биологични диамини;
4. Синтез на RGD\полиаминови конюгати;
5. Охарактеризиране на новосинтезираните пептидни аналози;
6. Прогнозиране на фармакологична или биологична активност след перорален прием на новосинтезираните съединения;
7. *In vitro* изследване за потенциален цитотоксичен ефект на новосинтезираните пептидни аналози и RGD\полиаминови конюгати.

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

1.1. Реагенти

Всички разтворители и реагенти, използвани в настоящата дисертация са с висока степен на чистота „ч.з.а.“ („Analytical grade” или „HPLC-grade”).

1.1.1. Използвани аминокиселинни и амини

Амини: 1,2-ethylenediamine, 1,3-diaminopropane, (Iris Biotech GmbH, Germany).

Незащитени АК: L-Cav-OH (Reatec, Germany);

Na-Fmoc-защитени АК: Fmoc-L-Arg(NO₂)-OH; Fmoc-L-Cav(Boc)-OH, Boc-L-Cav(Boc)-OH са синтезирани в Институт по молекулярна биология, „Акад. Румен Цанев” - БАН, секция: „Молекулен дизайн и биохимична фармакология”. Fmoc-L-Gly-OH; Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-L-Asp(tBu)-OH Fmoc-L-Agb(Boc₂)-OH; Fmoc-L-Agp(Boc₂)-OH са закупени от Iris Biotech GMBH (Germany) и Merck (Germany).

1.1.2. Реагенти за пептиден синтез

Защитни реагенти: N-(9-Fluoronylmethoxycarbonyloxy)succinimide (Fmoc-OSu) (Iris Biotech GmbH, Germany) и Di-*tert*-butyl decarbonate (Boc)₂O (Fluka).

Кондензиращи реагенти: O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl carbamide-tetrafluoroborate (TBTU), O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) (Iris Biotech GmbH, Germany), hydroxybenzotriazole (HOBT), Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) (Iris Biotech GmbH, Germany), N-(3-Dimethylammonopropyl-N'-ethylcarbodiimide (EDAC) (Merck).

Бази: Диизопропилетиламин (DIPEA) (Fluka), Et₃N (Ferak), Na₂CO₃ .

Органични разтворители: дихлоретан (етилен хлорид, DCE) (Merck); дихлорметан (метилен хлорид, DCM)(Merck); метанол (MeOH) (Merck); етанол (EtOH) (Merck); етил ацетат EtOAc (Merck); 2-пропанол 2-PrOH (Merck); диетилов етер (C₂H₅)₂O (Merck); димелтилформамид (DMF) (Merck); 20% пиперидин (Merck); 20% Piperidin/DMF (20 mL Piperidin в 80 mL DMF); трифлуороцетна киселина (TFA) (Merck); 1,0 % TFA/DCM (0,66 mL 99% TFA в 99,34 mL DCM).

Смоли: 2-Chlorotriylchloride resin (Iris Biotech GmbH, Germany); H-L-Asp(^tBu)-Chlorotriylchloride resin; 1,2-ethylenediamine-CTR; 1,3-diaminopropane-CTR (Iris Biotech GmbH, Germany).

Хроматографски реагенти: За TLC използвахме алуминиеви плаки Kieselgel 60 F₂₅₄ (Мегск, 64271, Darmstadt, Germany) и следните подвижни фази: 1) CH₃CN:H₂O (4:1); 2) EtOAc:n-BuOH:AcOH:H₂O (2:1:1:1); 3) CHCl₃:MeOH:H₂O (80:30:5); 4) C₆H₆:CH₃COCH₃:AcOH (100:50:2); 5) EtOH:NH₃ (6:4); 6) CHCl₃:MeOH:AcOH (95:5:5). За течната колонна хроматография използвахме Sephadex G-25f (Pharmacia Fine Chemicals AB, Sweden);

Нинхидринов разтвор: 5g нинхидрин е разтворен в 50 ml 2N CH₃COOH и 950 ml n-BuOH;

Хлорна среда: к. HCl и KMnO₄;

Реактив на Райндал: 10g N,N,N',N'-тетраметил- 4,4'-диамино-дифенилметан се разтваря в 30 ml CH₃COOH, разрежда се с 600 ml вода и се прибавят 5g KI;

1.1.3. Реагенти, използвани при определяне на цитотоксичност

Dulbecco Modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Austria) с добавен 10% фетален телешки серум (Gibco, Austria), 100 U/ml пеницилин (Lonza, Belgium) и 0,1 mg/ml стрептомицин (Lonza, Belgium); пластмасови фласки (Greiner, Germany); трипсин/EDTA (FlowLab, Australia); МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2, 5-дифенилтетразол бромид) (Sigma Chemical Co.); L-глутамин, стерилен фосфатен буфер (PBS), мравчена киселина, етилов алкохол – 96%, метанол, изопропанол (Merck, Germany); диметилсулфоксид (DMSO) (Sigma Chemical Co.); S-буфер (1M сорбитол, 25 mM NaH₂PO₄, pH 6,5) (Sigma Chemical Co.); лизис разтвор (146 mM NaCl, 30 mM EDTA, pH 8,1 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1% N-lauroylsarcosine; pH 9) (Sigma Chemical Co.); SYBR green (Molecular Probes Inc.); Tris-borate-EDTA (ТВЕ) буфер за 5x концентриран р-р (54 g Tris base, 27.5 g boric acid, 20 mL от 0.5 M EDTA (pH 8.0), дейонизирана вода до 1L) (Sigma Chemical Co.).

1.2. Клетъчни линии

Описаното скринингово токсикологично проучване е проведено върху панел от трансформирани клетъчни линии от различни тъкани:

1. MDA-MB-231 (монослойна, инвазивна човешка клетъчна линия от аденокарцином на гърдата);

2. HepG2 (монослойна клетъчна линия от човешки хепатоцелуларен карцином);
3. MCF-7 (човешка монослойна неинвазивна клетъчна линия от аденокарцином на млечната жлеза);
4. PC-3 (монослойна клетъчна линия от човешки аденокарцином на простата);
5. HT-29 (монослойна клетъчна линия от човешки карцином на дебелото черво);
6. A-549 (аденокарциномни човешки алвеоларни базални епителни клетки);
7. MCF-10A (човешка, нетуморогенна клетъчна линия от епител на млечна жлеза);
8. 3T3 – миша, ембрионална, фибробласна клетъчна линия.

Всички използвани клетъчни линии са от клетъчната библиотека, с която разполага Институтът по молекулярна биология.

В работата са използвани консумативи (епруветки, връхчета за пипети, пипети, петрита, микроплаки, матраци и др.) за еднократна употреба, както и реактиви (клетъчни среди, буфери, дестилирана вода и др.), които са автоклавираны.

1.3.Апаратура

1.3.1. Апаратура пептиден синтез

- Автоматичен пептиден синтезатор Activo P14 (Activotec, Cambridge, UK);



Фигура 12. Автоматичен пептиден синтезатор Activo P14

- Мануален пептиден синтезатор RWTH (Aachen, Germany) за химичен синтез;

- Капилярки Micro-Haematocrit-tubes: Length $75 \pm 0,5$ mm; Inner $\varnothing 1,15 \pm 0,05$ mm; Outer $\varnothing 1,55 \pm 0,05$ mm (Assistant);

- Кювети: оптичен път 1,8 mm;

- За определяне на оптичния ъгъл на въртене използвахме Polarimeter 141 (Perkin Elmer, USA);

- Използвани лиофилизатори – Telstar Cryodos (Telstar Industrial S.L., Spain) и LyovacGT2 (Leybold-Heraeus GmbH, Germany).

1.3.2. Апаратура за анализ

- Апарат UV-VIS (Cole Parmer, USA) при 254 nm; UV-Cabinet II (CAMAG); за UV-детекциите на тънкослойните хроматограми;

- HPLC анализите извършихме на апарати Shimadzu CLASS-VP V5.032 и Agilent Technologies HP 1100 и Dionex, UltiMateR 3000 LC система;

- Използвани колони и мобилни фази: ZIC® - HILIC (100 x 4,6 mm) с мобилна фаза: 0.005 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ /ацетонитрил; Beckman Ultrasphere® RP C18 (250 x 4,6 mm) с мобилна фаза: 0.01M K_2HPO_4 /ацетонитрил; Atlantis® dC18, 4.6 x 150 mm с мобилна фаза: ацетонитрил/0.1% мравчена киселина;

- Течна хроматографска система за средно налягане Duramat (CfB Prominent, Germany) за пречистване на съединенията;

- Капилярната електрофореза извършихме на апарат BeckmanP/ACE (Beckman Coulter Inc., Pasadena, CA, USA).

1.3.3. Апаратура за определяне на цитотоксичност

- ELISA четец (TECAN, Sunrise®, Grodig/Salzburg, Austria).

2. Методи

2.1. Химични методи

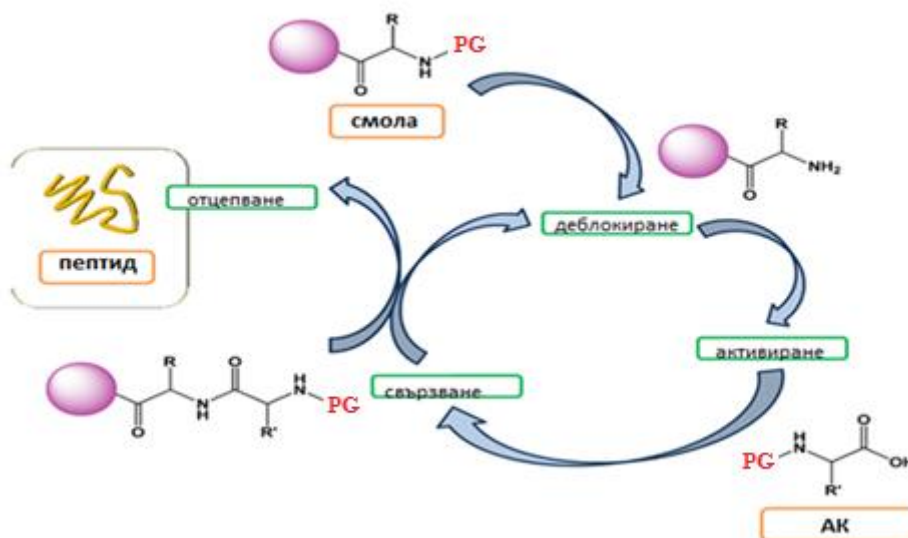
2.1.1. Методи за синтез

Изследваните пептиди, аминокиселинни аналози, техните производни и защитените диамини са синтезирани по два метода: в разтвор и чрез твърдофазен пептиден синтез върху полимерен носител.

За провеждане на твърдофазния пептиден синтез е подбрана Fmoc/^tBu стратегията върху полимерни носители Wang resin (Wang 1973) и 2-Chlorotriyl chloride resin (Barlos *et al.* 1989), с прилагане на различни кондензационни реагенти за активиране в присъствие на DIPEA или DIPEA/HBTU (диизопропилетиламин/1,1,3,3-тетраметилуруониев хексафлуорофосфат) (Chan and White 2000). Синтезът включва следните етапи от валидизиран стандартен протокол:

Стандартен протокол за SPPS по Fmoc-стратегия

- 1) Подготовка на смолата чрез набъбване в DMF или DCM;
- 2) Свързване на първата активирана аминокиселина (защитена α -аминогрупа, както и подходящо защитена странична функционална група), разтворена в минимално количество DCM или DMF (ако изходната АК е добре разтворима в DCM) в присъствие на DIPEA. Реакцията се провежда при стайна температура в продължение на около 3 часа;
- 3) Деблокиране на Fmoc-групата с 25% пиперидин в DMF;
- 4) Стъпка (i): Кондензация на втората по ред АК при използване на трикратен излишък от Fmoc-AA-OH, DIC (N,N-диизопропилкарбодиимид), база DIPEA, HOBt и разтворител DMF. Реакцията се провежда при стайна температура до пълно превръщане на изходните съединения;
- 5) Стъпка (ii): След кондензация на втората АК следва промиване на дипептид-смолата и деблокиране Fmoc-защитена аминокиселина с 25% пиперидин в DMF и чрез промиване с DMF на получения дипептид-смола;
- 6) Стъпка (i): Кондензация на третата по ред АК, както е описано в точка 4, до получаване на желания пептид;
- 7) Стъпка (ii): Отцепването на пептида от смолата и едновременното деблокиране на страничните вериги (отстраняване на Boc и ^tBu защитните групи) става чрез промиване посредством трикратно добавяне на воден разтвор на трифлуороцетна киселина (TFA) и триизопропил силан (TIPS). Реакцията се провежда при стайна температура, TFA се изпарява под вакуум до минимум разтворител, и се преципитира със студен диетилов етер. Получените пептиди се пречистват чрез гел-филтрация с 10% CH₃COOH и се лиофилизират;
- 8) Пълното протичане на реакциите на отстраняването на Fmoc групата и на реакциите на образуване на пептидната връзка се съблюдава чрез стандартен Кайзер-тест



Фигура 13. Схема на твърдофазен пептиден синтез по Wang

2.1.2. Хроматографски методи за пречистване и оценка на продуктите

2.1.2.1. Колонна гел-течна хроматография

Колонна гел-хроматография се използва за обезсоляване на пептидите чрез гел-филтрация върху Sephadex G-25 (колони 110*2.7 cm) с елуент 10% CH_3COOH и скорост на потока 10 mL/min. В отделни епруветки се събират по 5ml. Чистите пептидни фракции се определят чрез нанасяне на проби върху хроматографска плака. Събраните чисти пептидни фракции се лиофилизират до сухо с апарат Telstar Cryodos-80 при температура -50°C и се съхраняват при -20°C .

При необходимост пептидите се пречистват чрез течна колонна хроматография върху силикагел и елуент $\text{MeOH}:\text{EtOAc}:\text{H}_2\text{O}$ (30:80:5).

2.1.2.2. Тънкослойна хроматография (TLC)

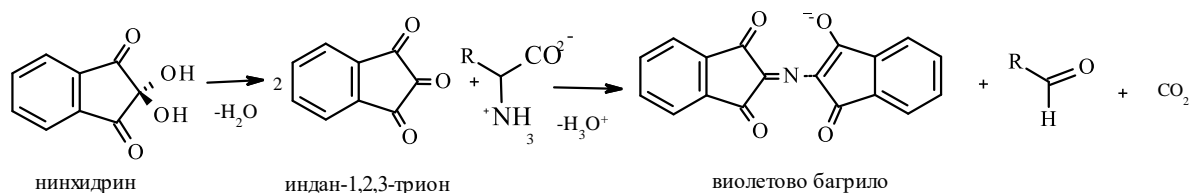
Тънкослойната хроматография е използвана с цел качествено доказване на пречистените пептиди. За наблюдение на тънкослойните хроматограми е използван UV-VIS (Cole Parmer, USA), хроматографска плака DC-Kieselgel 60 F_{254} (Merck). Количеството на нанесената проба е 10 μl , разстояние за развиване на хроматограмата – 10-12 cm. Използваните подвижни фази са: система CT1 - $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (80:30:5); система BAO - $\text{C}_6\text{H}_6:\text{AcOH}:\text{CH}_3\text{COOH}$ (100:50:2); система BAW – $n\text{-BuOH}:\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O}$ (4:1:5). Анализът е проведен при дължина на вълната 220 nm.

Начин на работа:

1/ На алуминиева плака с помощта на капилярка се нанася анализираното вещество. След това плаката се поставя в съответната хроматографска система;

2/ След изваждане на хроматограмата, плаката се изсушава и се детектира разделянето на анализирани вещества с помощта на UV- лампа, при $\lambda=220$ nm;

3/ Детектираната хроматограма се проявява, като се напръсква с нинхидринов разтвор и се нагрява 5 min, при 110°C. Реакцията с нинхидрин (хидрат на индан-1,2,3-трион) се използва в качествения анализ за доказване на първични амини. В TLC се прилага за визуализация на зоните. При обработка на $N\alpha$ -аминокиселини с нинхидрин се получава интензивно пурпурно-виолетово багрило:



Фигура 14. Реакция за доказване на първични амини (*Moore and Stein 1954*)

4/ Оцветената (след напръскване с нинхидрин) плака се поставя в хлорна среда. Хроматограмата се обезцветява и изважда от средата;

5/ Обезцветената плака се напръсква с реактив на Райндел. Наблюдава се синьо оцветяване, което определя защитената АК.

2.1.2.3. Високоэффективна течна хроматография (HPLC) – с конвенционални носители

Високоэффективна течна хроматография (RP-HPLC) е използвана за оценка на химическата чистота на синтезираните аминокиселини и пептиди. Анализите са извършени с помощта на течни хроматографски системи - LKB Bromma (Sweden) и Waters Alliance (Waters Corporation, USA), снабдени с фотодиоден детектор. Използвана е хроматографска колона XTerra® MS C18 с обърнати фази, размер на частиците 3,5 μ m, вътрешен диаметър 3.0 mm и дължина 150 mm.

Анализът е проведен при следните хроматографски условия: система за изократно елуиране, съставена от ACN/0.05%TFA 5/95 (v/v) при температура 25°C, скорост на потока 0.4 ml/min. Обем на инжектираните проби - 20 µL. UV-детекцията е осъществена при аналитична дължина на вълната 240 nm.

2.1.2.4. Капилярна електрофореза

СЕ е използвана за определяне чистотата на синтезираните небелтъчни аминокиселини и на избрани олигопептиди.

Хроматографските условия, при които беше извършен анализа са следните: работен буфер: 20 mM Tris, 5mM H₃PO₄, 50 mM SDS (натриев додецилсулфат), pH=7; ефективна капилярна дължина: 290/400 mm; вътрешен диаметър: 50 µm; електрическо поле: + 15 kV, 25 µA; температура: 25°C; UV детекция при λ=206 nm.

2.1.3. Метод за структурен анализ на синтезираните пептиди и пептидни аналози

Електроспрей-йонизационна маспектрометрия (ESI-MS)

За структурен анализ на новосинтезираните АК и целеви олигопептиди, обект на изследванията в настоящата дисертация, е използвана електроспрей-йонизационна маспектрометрия (ESI-MS). Определена е молекулната маса на новополучените съединения, отговаряща на тяхната йонизирана (протонирана или депротонирана) форма, съобразно броя на свободните amino- и карбоксилни групи като съставна част от тяхната структура. Анализите са осъществени в Institute of Bioanalysis, University of Pecz, Hungary. Мас-спектрите са снети с електроспрей маспектрометър Agilent 6530 Series Q-TOF LC/MS System (Santa Clara, CA, USA). Използвана е хроматографска колона Aeris® 2,6 µm PEPTIDE XB-C18 с вътрешен диаметър 2.1 mm и дължина от 100 mm. *Хроматографски условия:* система за градиентно елуиране, съставена от елуент А: H₂O + 0.1% HCOOH, елуент В: ACN/0.1% HCO₂H при температура 24°C, скорост на потока 0.4 mL/min. Обемът на инжектираните проби е 5.0 µL. UV-детекцията е проведена при аналитична дължина на вълната 240 nm.

2.2. Биологични методи

2.2.1. *In vitro* методи за оценка на цитотоксичност

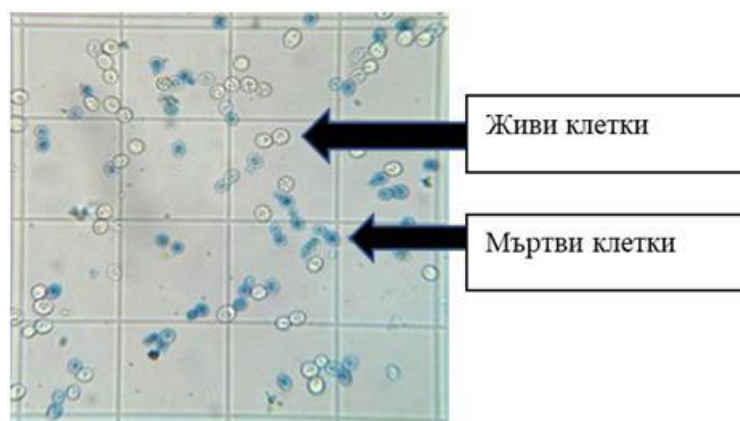
2.2.1.1. Култивиране на клетките

Монослойните клетъчни линии се инкубират при 37°C, във влажна атмосфера, със съдържание на 5% CO₂. Клетките се култивират в модифицирана среда - DMEM, съдържаща 10% FBS, 100 µg/mL стрептомицин и 100 U/mL пеницилин. Хранителната среда за MCF-10A е допълнена с 10 µg/ml инсулин, хидрокортизон и EGF (20 ng/ml човешки епидермален растежен фактор (hEGF) и 0.05 mM хидрокортизон.

Суспензионните клетки се поддържат в инкубатор на 37° C при влажна атмосфера в присъствие на 5% CO₂. Те се култивират в хранителна среда MEM (модификация на Dulbecco, Gibco). Към средата се добавя 10% телешки серум, L-глутамин- 1% и антибиотици (0,05% канамицин). Клетките се пасажират през ден в концентрация 5x10⁵ клетки/мл.

2.2.1.2. Тест за жизненост с трипаново синьо

Тестът за жизненост чрез оцветяване с трипаново синьо (Trypan Blue) представлява количествено определяне на виталността на клетките. Използва се способността на органичното багрило да навлиза единствено в мъртвите клетки (клетки с нарушени клетъчни мембрани). След проникване в мъртвата клетка, трипановото синьо се свързва с вътреклетъчни протеини и я оцветява в синьо. Живите клетки остават неочетени.



Фигура 15. Микроскопски анализ с трипаново синьо (*Balacheva et al. 2012*)

Оцветяването се осъществява при смесване на клетъчна суспензия с равно количество 0,4% трипаново синьо, разтворено в PBS, след което се инкубира за 3 мин.

Броят на живите и мъртвите клетки се определя с камера на Бюркер под светлинен микроскоп с помощта на стандартна мрежа. Изброяват се клетките в три големи квадрата по диагонал (един голям квадрат се състои от 16 малки квадрата)+2 малки квадрата, или общо 50 малки квадрата. Изчислява се средната стойност от три независими експеримента и се определя инхибиторната доза - IC₅₀. Това е концентрацията, при която 50% от клетките са мъртви.

Протокол за култивиране на суспензионни клетъчни линии:

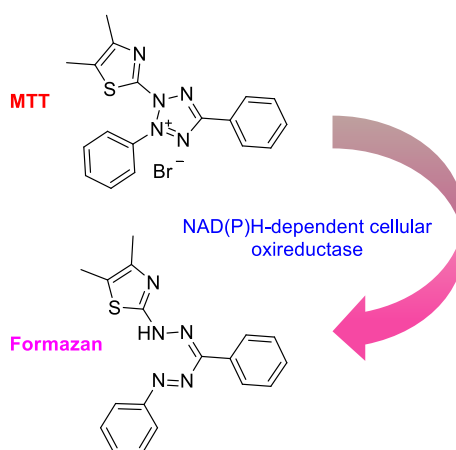
1. Суспензионната клетъчна линия се съхранява в течен азот. При размразяване на клетките, крио-епруветката се поставя на водна баня при 37° C за 1-2 минути, след което клетъчната суспензия се прехвърля в 5-10 ml темперирана среда;
2. Центрофугира се за 3 мин. на 1000-2000 обор./мин., за да се отстрани криопротектанта;
3. Супернатантата се отстранява и към утаените клетки се прибавя 5 ml хранителна среда с 20% серум;
4. Клетъчната суспензия се прехвърля в матрак и се поставя в термостат за 24 часа;
5. Клетките се разсяват в нови матрачета в концентрации (3×10^5 кл/мл) в модифицирана среда Dulbecco (MEM) (Gibco, Австрия), допълнена с 2 mM глутамин + 10% фетален телешки серум (FBS) и антибиотици (0,05% канамицин);
6. Клетъчната култура се поддържа в експоненциална фаза на растеж, като се разрежда със свежа среда с 10% серум (1:3);
7. При провеждане на теста клетките се разреждат до нужната концентрация. Броенето се извършва с камера на Бюркер под светлинен микроскоп.

2.2.1.3. Оценка на виталността на клетките чрез използване на МТТ-тест

МТТ – тестът е най-често използваният метод за оценка на клетъчна жизнеспособност и цитотоксичност, както и за скрининг на потенциални лекарства. Той установява линейна зависимост между метаболитно активните клетки и получения цвят.

Това позволява точно количествено определяне на промените в скоростта на клетъчна смърт или пролиферация (*van de Loosdrecht et al. 1994*).

МТТ анализът е описан за първи път от Mossman (1983) (*Mosmann 1983*) като колориметричен метод, основан на редукцията на жълтата тетразолиева сол - (4,5-диметилтиазол-2-)-2,5-дифенил тетразолиев бромид (МТТ) под действие на митохондриалните сукцинатдеhidрогенази в живите клетки до водонерастворими виолетови формазанови кристали. Образуването на виолетови кристали е правопрпорционално на активността на митохондриалните ензими и съответства на броя на жизнеспособните клетки.



Фигура 16. Превръщане на МТТ във формазанови кристали под действието на митохондриалните дехидрогенази (*Bahuguna et al. 2017*)

Намаляването на интензивността на пурпурния цвят означава намален брой клетки или цитотоксичност на даденото вещество.

Провежда се изпитване за определяне на оптичната плътност (OD) на формазана, получен от биологичната проба след редукция на МТТ. За целта се използва ELISA четец за микроплаки (BioTek) при дължина на вълната $\lambda=550$ nm с референтна дължина на вълната $\lambda=630$ nm. Отчетената абсорбция на пробите при $\lambda=550$ nm е мярка за концентрацията на формазана и количеството жизнеспособни клетки. Абсорбцията на пробите се представя като процент от контролата.

Цитотоксичността на тестваните съединения, определена чрез МТТ анализ, се изразява като процент жизнеспособност на клетките, съгласно следното уравнение:

$$\% \text{ виталност} = \frac{OD \text{ проба} - OD \text{ празна контрола}}{OD \text{ контрола} - OD \text{ празна контрола}} \times 100$$

Протокол за култивиране на монослойни клетки:

1. Монослойните клетъчни линии се култивират в Dulbессо модифицирана среда (DMEM) (Gibco, Австрия), допълнена с 10% фетален телешки серум (Gibco, Австрия), 100 U/ml пеницилин и 0.1 mg/ml стрептомицин (Gibco, USA) в матраци;
2. Клетките в експоненциална фаза на растеж, след третиране с Trypsin-EDTA, се посяват в 96-ямкови плаки (Greiner, Германия) в избрани концентрации (например- 2×10^4 клетки/ямка) в обем 100 μ l. Остава се една свободна ямка за празна проба за определяне екстинкцията на чистия разтвор при спектрофотометричното измерване след обработка с МТТ;
3. Остава се ямки за контроли с хранителна среда и контроли със съответните разтворители (DMSO и H₂O);
4. Култивираните клетки се третират с аминокиселинни аналози в широк концентрационен диапазон (2 mM - 1 mM - 0,5 mM - 0,25 mM - 0,125 mM - 0,62 mM - 0,03 mM). Аминокиселинните аналози са разтворени в диметил сулфоксид (DMSO). Пептидите и техните аналози са разтворени във вода;
5. Клетките се оставят да се прикрепят за дъното на плаката в продължение на 24 часа в инкубатор на 37°C и 5% CO₂;
6. След инкубиране на третираните клетки се извършва колориметричен анализ с МТТ тест (Sigma Chemical Co.). Той се провежда 24 и 72 часа след третиране. Работният разтвор на МТТ се приготвя в стерилен фосфатен буфер в концентрация 5 mg/ml и се филтрува през 0,2 μ m филтър. Така приготвеният разтвор може да се съхранява при 4°C и е стабилен в рамките на 30 дни. За тази цел към получения разтвор на МТТ (5 mg/ml в PBS) се прибавя 1 ml МТТ в 15 ml среда (DMEM). Във всяка ямка се добавят по 100 μ l от този разтвор. След добавянето на МТТ разтвора, плаките с клетки се инкубират в продължение на 3.5 часа. Това позволява метаболизирането на МТТ. След приключване на инкубацията средата се отстранява;

7. За разтварянето на формазаановите кристали се използва лизис буфер - DMSO в етанол (съотношение 1:1) и към всяка ямка се добавя 100 μ l от лизиращия разтвор;
8. Плаките се поставят на клатчка за 15-30 мин. до разтваряне на формазаановите кристали;
9. След разтваряне на кристалите в плаките, се отчита абсорбцията (OD) на микро ELIZA plate reader (Bio-Tek), $\lambda=550$ nm, при референтна стойност 630 nm.

2.3. Математически методи

2.3.1. Статистическа обработка на данните

Статистическият анализ на данните беше извършен чрез компютърна програма GraphPad 6.0 и използване на one-way ANOVA. Статистическата достоверност е отбелязана както следва: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $P < 0,0001$.

2.3.2. *In silico* метод за изчисляване на молекулни дескриптори от “Правилото 5 на Липински” (Ro5)

За определяне параметрите на Ro5, топологичната полярна повърхност (TPSA) и процента на абсорбция (%ABS) беше използван *in silico* метод – софтуер Molinspiration Cheminformatics 2019 (<https://www.molinspiration.com/>) (Mihaylova 2019). %ABS е изчислен по следната формула (Zhao et al. 2002):

$$\%ABS = 109 - [0.345 \times TPSA]$$

V. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Моделиране на пептидни аналози/миметици на RGD

Употребата на пептиди и протеини в терапията на неопластични заболявания е доказала своя положителен ефект. Наред с него обаче, използването им е съпроводено с проява на някои нежелани ефекти и непредвидимо фармакокинетично поведение.

За създаването на пептиди с потенциално фармакологично значение и терапевтично приложение се използва метода на синтез на серия от вещества със сходна структура. Изследва се зависимостта между промяната в строежа и терапевтичния ефект, който тя предизвиква. Това от своя страна позволява адекватно прогнозиране на терапевтичната им ефикасност.

Характерна особеност на модифицираните пептиди е тяхната изменена структура, осигуряваща им значителна устойчивост. Тя също така възпрепятства специфичното взаимодействие ензим-субстрат, поради нарушаване на комплементарността. Присъщата устойчивост на получените пептиди ги определя като отлични антагонисти, поради запазване на конфигурацията им. Именно тези свойства обуславят все по-широкото приложение на пептидите в терапията.

Въпреки посочените предимства редица са факторите, ограничаващи пептидната употреба. Сред тях с особено значение трябва да се посочат ниската метаболитна стабилност в ГИТ, а също и ограничената им абсорбция след орален прием, бързата екскреция и възможността за взаимодействие с различни рецептори, което води до проява на нежелани ефекти.

Изследванията в областта на лекарствения дизайн са насочени именно към преодоляване на описаните дотук недостатъци на пептидния клас съединения. Значителна част от тях могат да бъдат преодолені чрез въвеждане на структурни промени, които да подобрят фармакокинетичните им параметри. Това води до разработването на пептидомиметици, отличаващи се с повишена специфичност, поради въвеждане на D-аминокиселини, както и непротеиногенни аминокиселини.

За постигане целта на настоящия дисертационен труд използвахме т. нар. рационален лекарствен дизайн (rational drug design, RDD). При този подход се вземат предвид съществуващите данни за биологичната мишена, към която е насочено действието на новополучените молекули (RGD и/или модифицирана аминокиселина).

Подходите за получаване на пептидни миметици – агонисти или антагонисти включват следните етапи:

- ✓ Определяне на активни фрагменти от пептиди, носещи информация за пептидната структура на изходната молекула;
- ✓ Повишаване на стабилността – Първоначално се определя мястото на деградация, а в последствие местата за отцепване на пептида се заместват, например с аминокиселини (*Hu et al. 2016*). Освен че повлиява стабилността, внасянето на АК-и оказва положителен ефект и върху силата на действие, пропускливостта и бионаличността на модифицираните пептидни аналози. Включването в структурата на неприродни остатъци може да се постигне посредством процеси на метилиране, гликозилиране, амидиране, внасяне на водородни връзки, промени на крайните аминокиселинни остатъци, хидрофобни остатъци и др. Освен това отделните пептидни структури, които участват в изграждането, могат да се подложат на допълнителна модификация чрез различни посттранслационни реакции (фосфорилиране, естерифициране, гликозилиране и др.);
- ✓ Повишаване на потентността – осигурява се чрез добавянето на различни функционални групи в страничната верига, които да улеснят свързването на лиганда с рецептора. Това може да бъде постигнато и чрез промяна в конформацията на пептида (*Hu et al. 2016*);
- ✓ Създаване на конформационно затруднени аналози – възможността на пептида да променя своя строеж, определя способността му да взаимодейства с различни рецепторни подтипове. Това дава отражение в по-широкото приложение на пептидните модификации. Конформационно затруднените аналози се отличават с наличието на вътрешномолекулен мост с α -спираловидна структура. Създаването на структурно ограничени пептиди представлява значителен интерес в областта на пептидната химия. Това се дължи до голяма степен на възможността да се подобри селективното свързване, поглъщане, мощност и стабилност на линейните прекурсори. За съжаление обаче не всички подходи водят до подобряване на изброените параметри. Често линейните аналози показват по-добри свойства в сравнение с техните циклични еквиваленти.

Множество новосинтезирани пептиди не могат или преминават частично през клетъчната мембрана. Това е причина за тяхната ниска или липсваща активност (*Yang and Hinner 2015*). Поради този факт голяма част от изследванията на нови пептиди се фокусират върху техните свойства като насочващи молекули при противотуморна терапия.

Освен като насочващи молекули те могат да изпълняват функцията на лекарство-доставящи системи, а също и да улесняват преминаването през клетъчната мембрана. Не на последно място те могат да бъдат използвани и като самостоятелни противотуморни агенти (*Chatzisideri et al. 2018*).

Проведените при разработването на настоящия дисертационен труд изследвания бяха насочени към синтезиране на RGD пептидни молекули и техни конюгати с полиамини, с цитотоксичен и антипролиферативен ефект.

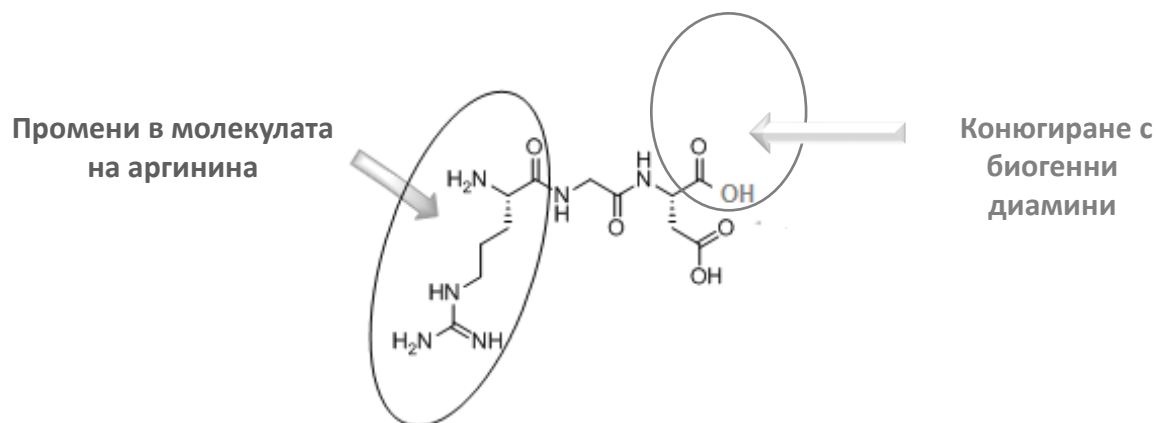
2. Синтез на аналози на RGD

Един от основните подходи при създаване на лекарствени средства с пептидна структура, е търсенето на такава синтетична модификация в страничните вериги на природните аминокиселини, при която след включването им в пептидната верига да се получат биологично-активни аналози с подобрен фармакокинетичен потенциал.

До момента са синтезирани множество линейни и циклични аналози на RGD. Причините за повишения интерес към този пептид са неговите разнообразни терапевтични ефекти. Редица негови аналози се отличават с противотуморно действие и се използват при диагностика и лечение на хормон-зависими тумори и техните симптоми. Въпреки постигнатите успехи, продължава стремежът към получаването на молекули с подобрени биологична активност, специфичност на действие и устойчивост в плазмата.

При проведени предишни изследвания са получени и определени цитотоксичен и генотоксичен ефект на модифицирани с небелтъчни аминокиселини RGD пептидни аналози (*Balacheva et al. 2012; Georgiev et al. 2012*). След установяване на някои зависимости между структурата и действието на тези пептиди и следвайки установената тенденция за получаване на аналози с подобрени фармакокинетика и фармакодинамика ние синтезирахме поредица от нови RGD аналози. За получаването им използвахме следните три подхода (Фиг. 17):

- 1/ Включване в молекулата на пептида на небелтъчни аминокиселини;
- 2/ Свързване на получените RGD аналози с други молекули, които притежават доказано противотуморно действие (биогенни диамини);
- 3/ Получаване на аналози на RGD, модифицирани в N- или C-края.



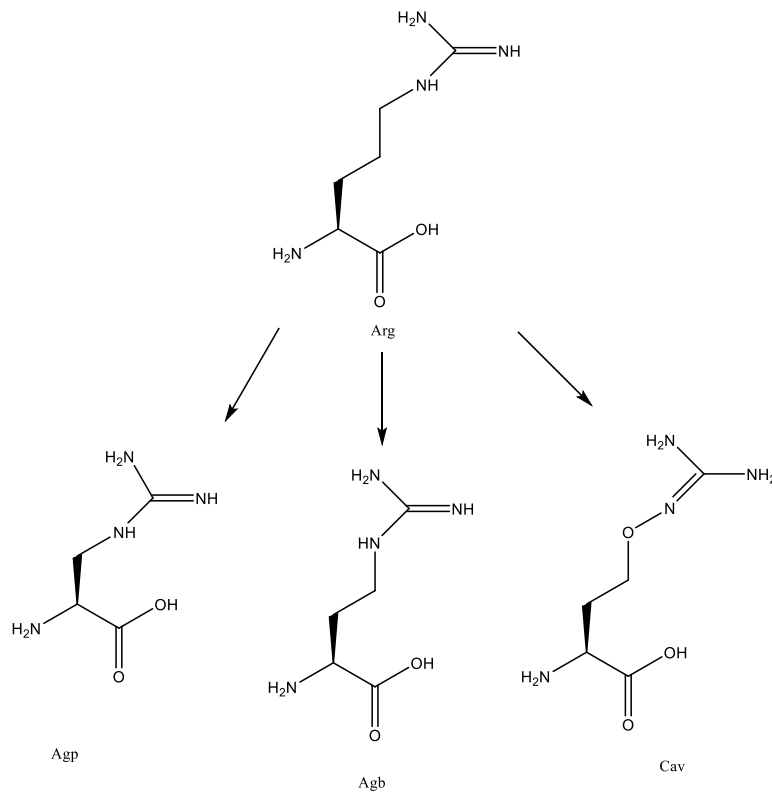
Фигура 17. Предприети промени в молекулата на RGD

При *първия подход* бяха създадени пептидни миметици на RGD, модифицирани с непротеиногенни аминокиселини. За промените в N-края на нативната молекула, избрахме замяната на аргининовия остатък в 1-ва позиция с неговите синтетични аналози Agb (*L*-2-амино-4-гуанидино маслена киселина) и Agr (*L*-2-амино-3-гуанидоно пропионова киселина), както и с неговия природен антиметаболит – канаванин (Cav, *L*-2-амино-4-гуанидиноокси маслена киселина) (Фиг. 18). По този начин бяха синтезирани 3 аналога на RGD – AgbGD, AgrGD и CavGD.

Аргининът (Arg или R) е предпочитан за модифициране катионен остатък в редица синтетични пептиди. Това се дължи на факта, че неговата странична верига може лесно да взема участие, както в електростатични взаимодействия, така и във водородни свързвания.

От друга страна, често липсата или ниската биологична активност на редица ново синтезирани пептиди се дължи на тяхното затруднено преминаване през клетъчната мембрана (*Yang and Hinner 2015*). Въз основа на това очаквахме, че синтетичните аргининови миметици със скъсена странична верига (например Agr и Agb), както и на такива съдържащи гуанидинова група с висок поляритет или с намалени основни свойства (например съдържащият кислороден атом вместо една метиленова група в

структурата си канаванин), ще доведат до повишаване стабилността, по-лесното преминаване през клетъчната мембрана, а с това и потентността на съответните модифицирани пептидни аналози (Фиг. 18).



Фигура 18. Модификации в молекулата на аргинин

Аргининовите миметици са обект за дизайн на биологично-активни пептиди с цел повишаване на тяхната селективност и бионаличност. Опити върху животни показват, че аминокиселината притежава модулиращ ефект върху процесите на развитие на тумори. Например, мишки с трансплантирани тумори, които приемат аргинин, показват засилен растеж на тумора, докато изчерпването му инхибира развитието на чернодробни метастази (*Delage et al. 2010*).

Гуанидиновата група в молекулата на Arg има значение за регулиране на структурата и функцията на протеините. Някои производни на аргинин и канаванин влияят върху патологичната ангиогенеза. Аргининът инхибира ендотелната азотен оксид

синтетаза (eNOS) и с това повлиява VEGF каскадата, чийто биомолекули са отговорни за ангиогенезата (Vallance P., et al., 2000).

Дзимбова и др., 2019 г. (Dzimbova et al. 2019) установяват, че аналозите на аргинин със скъсена верига Agb и Agr могат да инхибират три основни ензима в метаболизма му: азотен оксид синтаза (eNOS), аргинин-глицин амидинотрансфераза (AGAT) и аргининосукцинат синтаза (ASS). Освен това, P. Henklein и Th. Bruckdorfer, 2008 г. (Henklein and Bruckdorfer 2008) докладват, че стабилността на пептидите се увеличава, ако аргининът е заменен с хомолог, съдържащ една или две метиленови групи по-малко (Agb или Agr). Установено е също, че аминокиселинният аналог, при който веригата е скъсена с две метиленови групи, проявява стабилност към ензимно разграждане от трипсин в рамките на 24 часа.

Канаванинът представлява естествена непротеиногенна аминокиселина, която притежава изразена токсичност към редица организми, например: гъби, дрожди, бактерии, водорасли, насекоми, растения и бозайници (Staszek et al. 2017). Посочената токсичност се обуславя от близкото структурно сходство с аргинина. То определя способността му да се свързва с аргинил-тРНК синтетазата и да предизвиква клетъчна смърт. Заместването на аргинина от канаванина по време на транслацията на нови протеини дава резултат в получаването на белтъци с нарушена функция. По този начин се нарушава по-нататъшната им роля в клетъчните процеси (Rosenthal 1977).

Канаванинът е обещаващ противотуморен агент, поради способността си да инхибира един от основните процеси при развитието на туморните клетки. По-конкретно той подтиска техния растеж *in vitro* и *in vivo* чрез включването си в новосинтезиращи се пептиди (Rosenthal 1998; Bence and Crooks 2003). Характерно за канаванина е проявата на избирателно токсично действие спрямо пролифериращите клетки (Naha et al. 1980). Съществуват данни, според които той причинява смърт при човешки левкемични клетки, като активира каспаза-3 (Ho Jang et al. 2002). Проучвания в последните години съобщават, че канаванинът проявява цитотоксичност *in vitro* и спрямо други туморни клетъчни линии като аденокарцином на белия дроб, рак на пикочния мехур и на маточната шийка.

В подкрепа на твърдението, че Cav може да се използва успешно в противотуморната терапия, са данните относно неговия синергизъм с цитостатични лекарства (5-fluorouracil, Doxorubicin, Cisplatin) и гама-радиация. Предполага се, че той

сенсibiliзира раковите клетки към прилаганата терапевтична схема (Nurcahyanti and Wink 2016; D.R. Nurcahyanti and Wink 2017).

Друга причина, поради която избрахме да включим Cav в нашето изследване е близката му структура до аргинина. Вследствие на високото си структурно сходство канаванинът не се разпознава от транспортните и метаболитните системи като чужда молекула и не се формира лекарствена резистентност (Bence and Crooks 2003).

Вторият подход, който предприехме с цел увеличаване устойчивостта на пептидите срещу ензимно разграждане, включваше както модификация в първа позиция, така и свързване с биогенни диамини (етилендиамин и пропилендиамин) чрез амидиране на карбоксилната група на аспарагиновата киселина (Asp, D) в С-края. Получени бяха също така и осем пептидни конюгата – ArgGDNH(CH₂)₂NH₂ (RGDDAE), AgpGDNH(CH₂)₂NH₂ (AgpGDDAE), AgbGDNH(CH₂)₂NH₂ (AgbGDDAE), CavGDNH(CH₂)₂NH₂ (CavGDDAE), ArgGDNH(CH₂)₃NH₂ (RGDDAP), AgpGDNH(CH₂)₃NH₂ (AgpGDDAP), AgbGDNH(CH₂)₃NH₂ (AgbGDDAP), CavGDNH(CH₂)₃NH₂ (CavGDDAP) чрез амидиране на RGD и неговите структурни аналози с биогенните диамини етилендиамин (DAE) и пропилендиамин (DAP).

С-крайното амидиране се асоциира с биоактивната конформация на пептидите и тяхното взаимодействие и селективност към целевите рецептори. Премахването на амидната група при тези пептиди често води до загуба на активност. Предприетата модификация в С-края на RGD чрез конюгиране с биогенни диамини представлява възможен подход за определяне на биологичното и структурното участие на С-крайното амидиране.

При **третия подход** бяха синтезирани структурни аналози на RGD. Целта на предприетите модификации в структурата на изходния пептид е получаване на молекули с повишен инхибиторен ефект и устойчивост на действието на ензими, отговарящи за разрушаването на пептидната структура. Предприетите промени включват замяна на една от метиловите групи в страничната верига на аргинина с нитрогрупа. Освен това беше проведена и естерификация на карбоксилната група на Asp, в резултат на която се получава метилов естер на нативния RGD пептид. Друга модификация, която предприехме при този подход, беше замяната на Arg, с неговия непротеиногенен аналог Cav.

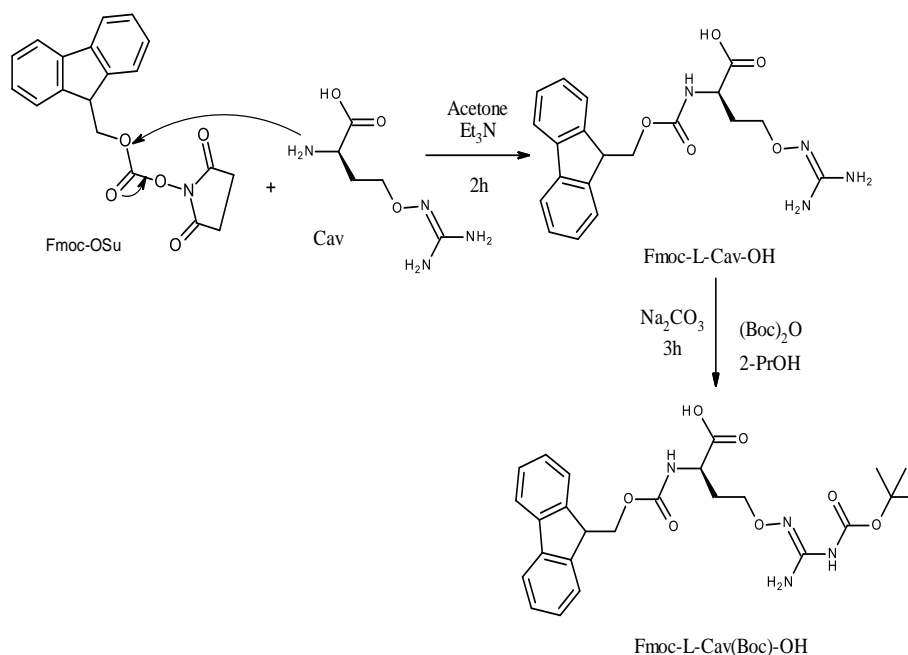
Пептидният синтез на RGD-аналозите и конюгатите е осъществен както по класическия метод „в разтвор“, така и по SPPS, използвайки Fmoc-стратегията за изграждането на пептидната верига. Приложена е фрагментна кондензация, която да започне с образуването на дипептид както от C-края, така и от N-края на трипептида.

2.1.Получаване на защитени, небелтъчни аминокиселини, необходими за пептидният синтез RGD аналози модифицирани в N-края

С цел по-лесното протичане на процесите на синтез на новите аналози и конюгати на RGD, както и избягване на свързване към гуанидиновата група на канаванина се наложи получаване на негови защитени производни: $N\alpha$ -9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-canavanine (Fmoc-*L*-Cav-OH), $N\alpha$ -9-Fluorenylmethyloxycarbonyl, N^G -ter-butylloxycarbonyl-canavanine (Fmoc-*L*-Cav(Boc)-OH), $N\alpha$ -ter-Butylloxycarbonyl, N^G -ter-butylloxycarbonyl-canavanine (Boc-*L*-Cav(Boc)-OH), както и $N\alpha$ -ter-Butylloxycarbonyl, N^G -ter-butylloxycarbonyl-canavanine succinimide ester (Boc-*L*-Cav(Boc)-OSu).

Получаването на Fmoc-*L*-Cav(Boc)-OH се извършва на два етапа, по метод описан от Rajanova et al., 1997. В първия етап от синтеза се защитава $N\alpha$ -аминогрупата с базично лабилната Fmoc-група до получаване на $N\alpha$ -9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-canavanine. При втория етап от синтеза се защитава страничната аминогрупа в гуанидиновата функционална група до получаване на $N\alpha$ -9-Fluorenylmethyloxycarbonyl, N^G -ter-butylloxycarbonyl-canavanine (Фиг.19).

След изтичане на реакционното време, количеството на получена $N\alpha$ -защитена аминокиселина Fmoc-*L*-Cav-OH е 3,70 гр. (93%). При втория етап от синтеза се получава Fmoc-*L*-Cav(Boc)-OH, с добив 0,82 гр. (91%) и висока химическа чистота доказани чрез TLC и HPLC (Rajanova et al. 1997).



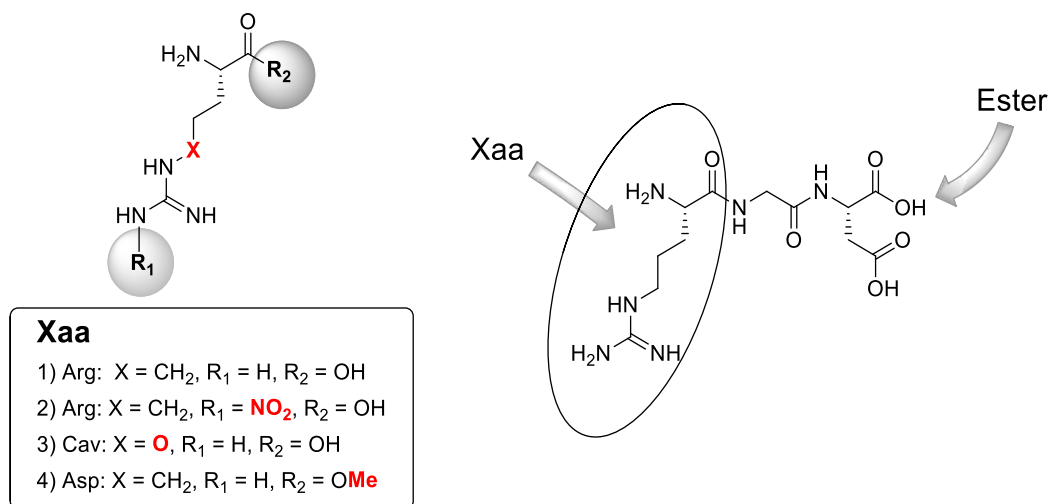
Фигура 19. Схема за синтез на Fmoc-L-Cav(Boc)-OH

Получаването на Вос-L-Cav(Boc)-OH се извършва в един етап, по метод описан от Рајранова et al., 1997, като N α -амино- и N^G-гуанидиногрупите се защитават едновременно с киселинно лабилната Вос-защитна група (Рајранова et al. 1997).

След предварително получаване на ди-Вос-защитения канаванин – Вос-Cav(Boc)-OH, се получава активираният естер Вос-L-Cav(Boc)-OSu чрез HNOSu/DCC в среда от THF с 75% добив.

2.2.Получаване на RGD и аналози, модифицирани в N-края или C-края

С цел търсене на аналози на RGD с по-голяма устойчивост към действието на ензими и респективно удължен ефект, са синтезирани субституирани аналози (Фиг. 20) CavGD, R(NO₂)GD и RGD-OMe.



Фигура 20. Структура на RGD, R(NO₂)GD, CavGD и RGD-OMe

Биологични изследвания на тези нови аналози, проведени от Balacheva и сътр. и Georgiev и сътр., показват, че те имат способността да инхибират клетъчния растеж *in vitro*. Нещо повече, естерифицирането на карбоксилната функция на Asp води до чувствително увеличение на инхибиторната активност спрямо нативния RGD. Освен това се наблюдава по-ясно изразен цитотоксичен и генотоксичен ефект (*Balacheva et al. 2012; Georgiev et al. 2012*).

Необходимостта от по-нататъшно изясняване на механизма на действие на RGD, CavGD, R(NO₂)GD и RGD-OMe, ни провокира да продължим нашите изследвания в две насоки:

- Търсене на нови схеми за синтез на CavGD, R(NO₂)GD и RGD-OMe;
- Разширяване на гамата структурни аналози, включвайки в първа позиция отново непротеиногенни АК-и (Agb и Agr), както и на протеиногенния аргинин (Arg), в ролята на референтно вещество (*Georgiev et al. 2012*).

Пептидният синтез на RGD аналозите може да бъде осъществен както по класическия метод „в разтвор“, така и по SPPS, използвайки Fmoc-стратегията за изграждането на пептидната верига. Фрагментната кондензация може да започне с образуване на дипептид както от C-, така и от N-края на трипептида. Използваните методи за активиране, както и защитните групи за страничните функционални групи на АК трябва да удовлетворяват техните индивидуални особености. За образуване на пептидната връзка са използвани широка гама от съвременни активиращи реагенти – DCC, HONSu, HOBT, TBTU, DIC, HBTU, BOP и PyBOP (Литературен обзор, стр. 43).

Това разнообразие от реагенти и методи за синтез е наложено от наличието на полярна странична функционална група в молекулата на използваните аминокиселини, която в повечето случаи е силно реакционно способна.

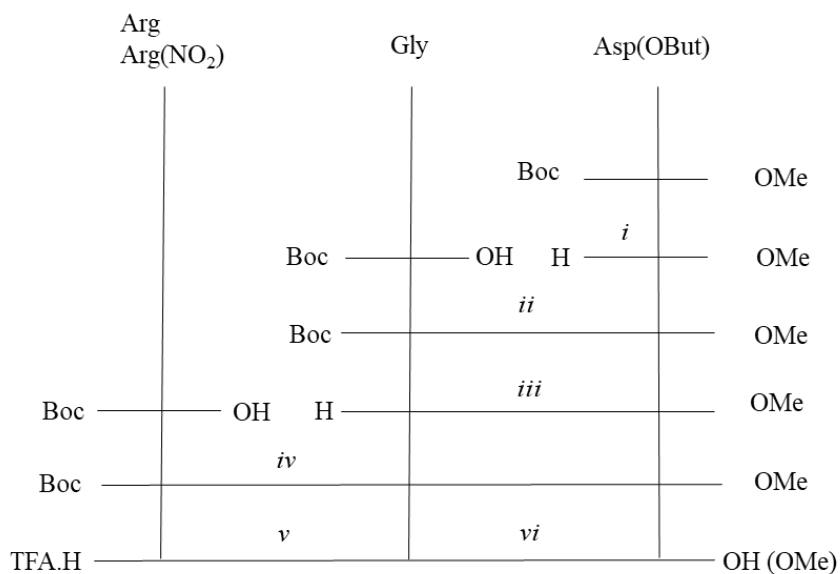
Изборът на комбинации от защитни групи за N α -аминофункцията и N ϵ -аминофункцията в страничната верига на Arg и Cav, наложи използването на различни схеми за пептиден синтез. Подбраните подходи са специфични за всеки един трипептид и осигуряват неговото получаване с по-висока чистота и по възможност – с по-висок добив.

2.3. Синтез на RGD, R(NO₂)GD и RGD-OMe

Получаването на RGD (**1**) и аналозите (**2** и **3**) е осъществено по класическия метод за синтез в разтвор следвайки стандартен протокол който протича по следните етапи:

- 1) Деблокиране на защитената аминогрупа на първата аминокиселина с 1N HCl и трикратна екстракция с етил ацетат (EtOAc), промиване, изпаряване под вакуум;
- 2) Първо кондензиране (реакция на образуване на първата амидна връзка) посредством използването на 1,1-кратен излишък от кондензационните реагенти TBTU (2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylammonium tetrafluoroborate), HOBT (1H-benzotriazol-1-ol) в присъствието на базата DIPEA (*N,N*-diisopropylamine) в разтворител DMF (*N,N*-dimethylformamide). Реакцията се провежда при стайна температура до пълното изразходване на изходните съединения;
- 3) Деблокиране и кондензация до получаването на желания пептид;
- 4) Реакция на осапунване (деестерификация) на получения пептид след третирането му със смес от 1N NaOH в метанол (MeOH);
- 5) Ацидолитично деблокиране на получения пептид посредством прибавянето на излишък от TFA (трифлуорооцетна киселина) и разбъркване на получената смес при стайна температура;
- 6) Пълното протичане на реакциите на отстраняване на Boc- и tBu- защитните групи и на реакциите на образуване на пептидната връзка се съблюдава чрез стандартен Райндел и нинхидринов тест.

За получаването на трите пептида използвахме тактиката на свързване **1+2**, както е показано на Фигура 21.



Фигура 21. Обща схема за пептиден синтез на RGD аналози в разтвор: (i) 1.0 N HCl, 3 x EtOAc; (ii) 1,1 equiv. TBTU/HOBt/DIPEA, DMF; (iii) 1.0 N HCl, 3 x EtOAc; (iv) 1,1 equiv TBTU/HOBt/DIPEA, DMF; (v) 1.0 N HCl NaOH, MeOH; (vi) TFA, r.t., 2h

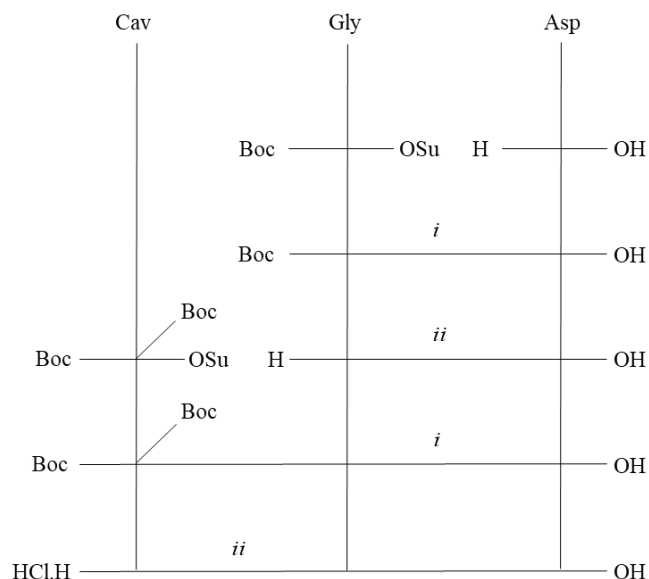
За С-края от молекулата на RGD при синтезата на всички трипептиди е използван Boc-Asp(tBu)-OMe. След ацидолитично деблокиране на Boc-защитната група с 1.0 N HCl, изолираният хидрохлорид HCl.H-Asp(tBu)-OMe се свързва с Boc-Gly-OH чрез кондензационния реагент TBTU. Последва отново ацидолитично деблокиране на Boc-защитната група с 1.0 N HCl, при което полученият дипептид се изолира отново като хидрохлорид и се свързва чрез TBTU съответно с Boc-Arg-OH или с Boc-Arg(NO₂)-OH. Получават се два защитени трипептид Boc-Arg-Asp(tBu)-OMe и Boc-Arg(NO₂)-Asp(tBu)-OMe.

Деестерифицирането на пептидите се извършва количествено с висока чистота и добив чрез хидролиза на съответния естер с 1.0 N NaOH в среда на MeOH. На всеки етап от синтетичния процес междинните продукти се изолират и пречистват. Крайното деблокиране на трипептидите се осъществява чрез ацидолиза с TFA до получаване на трипептидите **1-3** във вид на TFA сол.

2.4. Синтез на CavGD

След направените първоначални сравнителни синтези, най-подходящ за получаването на аналога CavGD (**6**), се оказа методът на активираните естери. Получаването на CavGD се извършва по оригинална схема за синтез, тактика 1+2 (Фиг. 22). Образуването на дипептида Boc-Gly-Asp-OH и последващата трипептидна

секвенция Boc-Cav(Boc)-Gly-Asp-OH бе осъществено по метода на активираните естери чрез предварително получаване на защитен, активиран естер на канаванина – Boc-Cav(Boc)-OSu. Предимство на този метод е, че в хода на нарастване на пептидната верига се използват незащитен в карбоксилната и страничната група Asp и лесно достъпните кондензационни агенти HNOSu и DCC.



Фигура 22. Схема за синтез на CavGD в разтвор: i) THF, Et₃N, 24h; ii) 3N HCl/EtAc, 2h

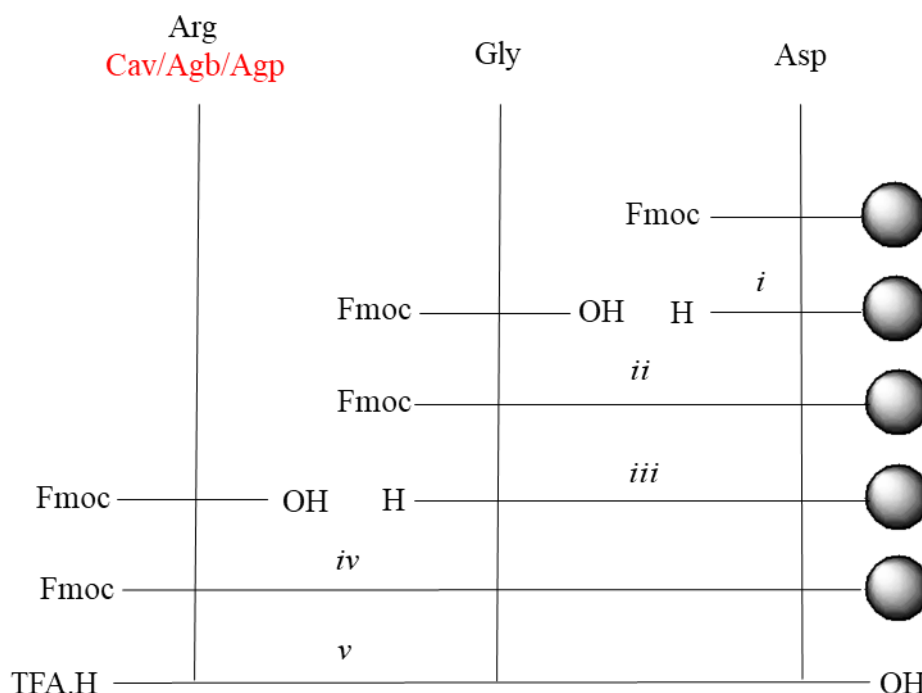
Получените резултати за добив и чистота, при използването на описания подход показват, че така подбраната синтетична схема е оптимална за синтез на посочения трипептид.

2.5. Синтез на AgbGD и AgpGD

Синтезът на пептиди **1**, **4-6** е реализиран чрез SPPS с използване на стандартна Fmoc/tBu стратегия.

При първата синтетична схема, която приложихме за получаване на трипептидите RGD, AgbGD и AgpGD (Фиг. 23), използвахме 2-хлоротритил хлоридна смола, върху която е закачена първата аминокиселина Fmoc-Asp(tBu) и специфични защитни групи за страничните групи на Arg, Agb и Agp. За Arg използвахме Pbf-защита за страничната гуанидиногрупа, а Pbf- и Boc-защита за гуанидино-функцията на Agb и Agp. Куплунг реакциите се осъществиха чрез активиране с DIC/NOBt/DIPEA (Фиг. 23).

Приключването на всеки един етап от присъединяване на аминокиселината се следи с помощта на Кайзер-тест. Fmoc-групата на получените пептид-смола Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-Asp(tBu)-Resin, Fmoc-Agb(Pbf, Boc)-Gly-Asp(tBu)-Resin и Fmoc-Agp(Pbf, Boc)-Gly-Asp(tBu)-Resin се деблокира чрез добавяне на 25% пиперидин в DMF. Отцепването на пептида от смолата с едновременното деблокиране на всички защитни групи, се извършва чрез ацидолиза с разтвор на TFA (~95%), със следния състав – TFA (16.5 ml) : фенол (1 g) : H₂O (1 ml) : тиоанизол (1 ml) : етандитиол (0.5 ml).

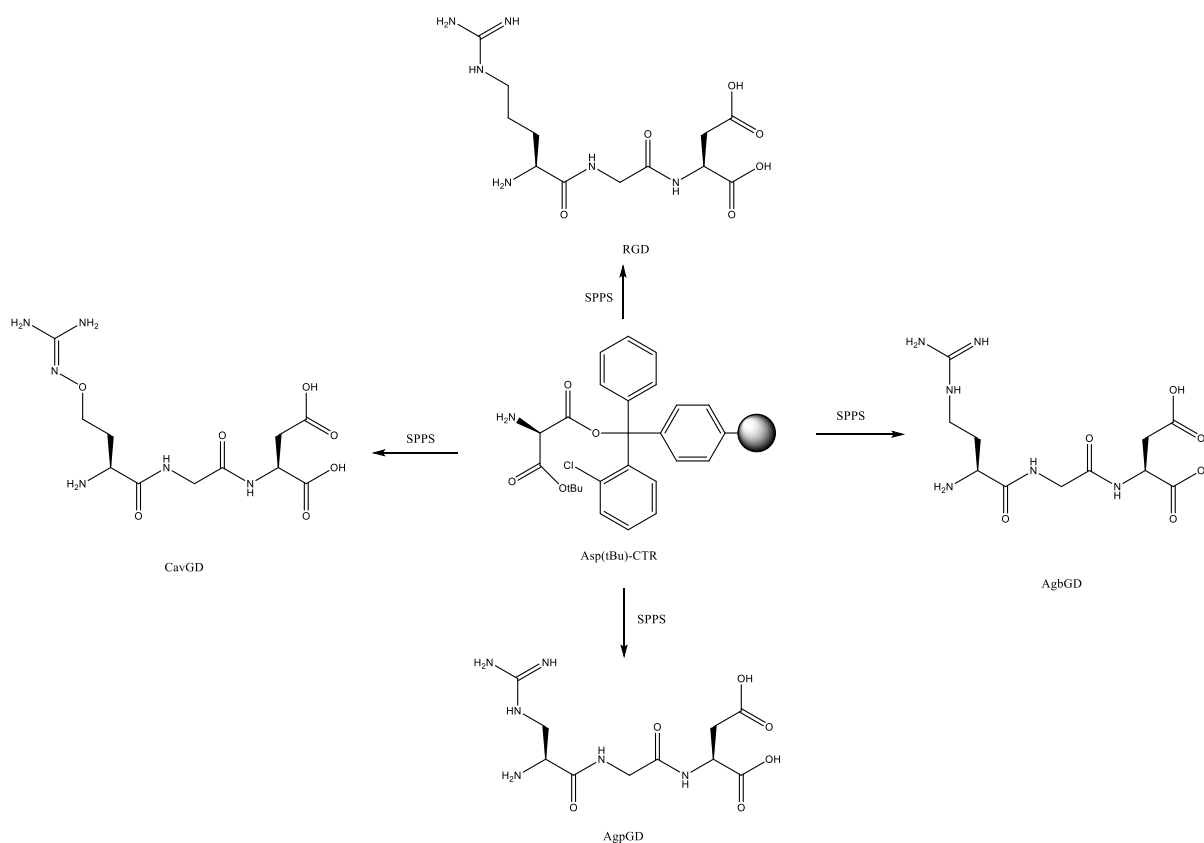


Фигура 23. Схема за синтез на RGD, CavGD, AgbGD и AgpGD: i) 20% пиперидин/DMF 20 min; ii) 3 eq. DIC/HOBt/DIPEA, 1h или 1 eq. PyBOP/1 eq. HOBt/2.75 eq. DIPEA, 15 min; iii) 20% пиперидин/DMF 20 min; iv) 3 eq. DIC/HOBt/DIPEA (3 eq. HBTU/HOBt/DIPEA) 1h или 1 eq. PyBOP/1 eq. HOBt/2.75 eq. DIPEA, 15 min; v) а) 20% пиперидин/DMF 20 min; б) TFA (~95%) 75 min или TFA (~95%), скевинджъри, 45 min

Получените незадоволителни резултати поради отчетения нисък добив по време на пептидният синтез, наложи повторение на куплунга с двукратен излишък от Fmoc-Agb(Pbf, Boc)-OH и Fmoc-Agp(Pbf, Boc)-OH. Получените от нас резултати потвърждават и данните представени от други автори (*Dzimbova et al. 2019*).

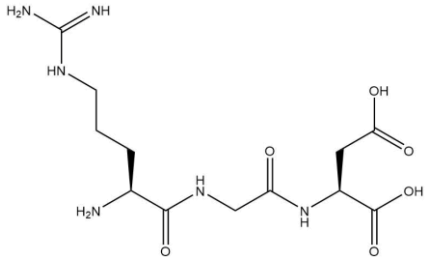
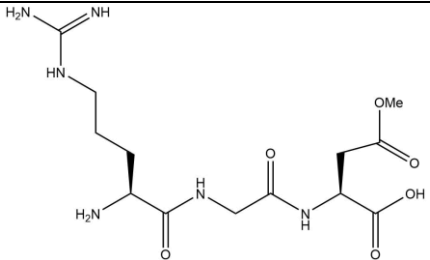
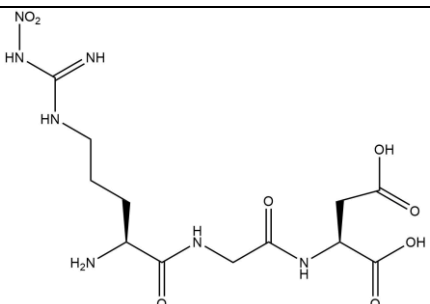
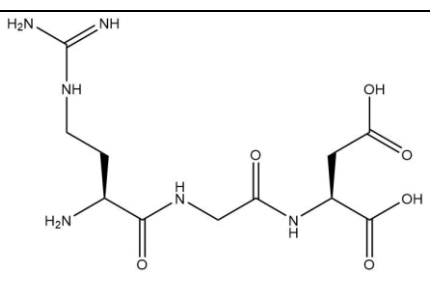
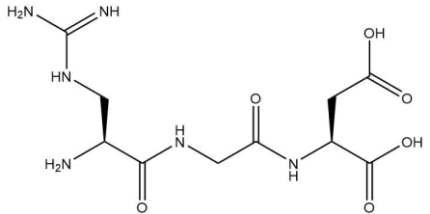
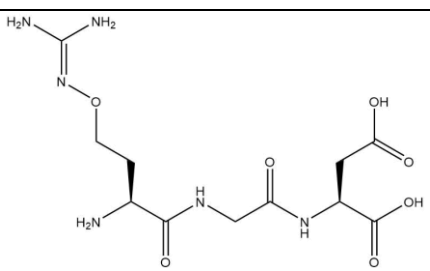
Въпреки предприетите промени, отчетените добиви и на трите пептида останаха незадоволителни. Това ни накара да направим смяна на реагента за кондензация от DIC с PyBOP.

За да се изследва влиянието на кондезиращите реагенти върху скоростта на образуване на пептидната връзка, ние приложихме трета синтетична схема (Фиг. 24). За получаване на AgbGD, AgrGD и CavGD пептидите променихме също така и защитните групи за гуанидино функциите на Agb и Agr. За Cav използвахме Boc-защита за странична гуанидиногрупа и (Pbf, Boc) и (Boc)₂-защита за гуанидино-функцията на Agb и Agr. За куплунг реакциите използвахме силно реактивоспособния кондензационен реагент PyBOP. Процесът се проведе в съотношение на реактантите – 1 еквивалент Fmoc-Agb(Boc₂)-OH или Fmoc-Agr(Boc₂)-OH или Fmoc-Cav(Boc)-OH, 1 еквивалент PyBOP, 1 еквивалент HOBT и 2,75 еквивалента DIPEA. Реакцията протича в продължение на 15 минути. Установихме също така, че Agb защитен с (Pbf, Boc) води до получаването на суров пептид с висока чистота от (80%), докато защитеният Agr(Boc₂) води до суров пептид с чистота (66%). Предимството на описаната синтетична схема спрямо първите две е високата скорост на протичане на процеса, а също и намаляване на количеството на реактантите, повишаване на добивите и чистотата на крайните новосинтезирани пептидни аналози (Фиг. 24).



Фигура 24. Новосинтезирани RGD, CavGD, AgbGD и AgrGD

Таблица 1. Аналитични данни на синтезираните пептиди

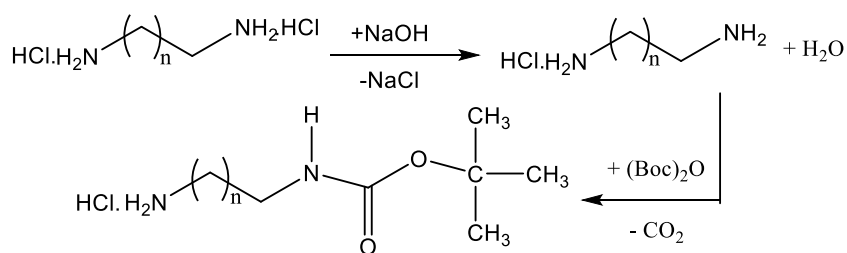
<i>Пептиди</i>	<i>Химична структура</i>	<i>Молекулна формула</i>	<i>Молна маса (g/mol)</i>	<i>Добив (%)</i>	<i>HPLC чистота (% RT)</i>	<i>СЕ чистота (% RT)</i>
RGD		$C_{12}H_{22}N_6O_6$	346.344	81	99	99
RGD-OMe		$C_{13}H_{24}N_6O_6$	360.371	86	95	95
R(NO ₂)GD		$C_{12}H_{21}N_7O_8$	391.341	85	98	96
AgbGD		$C_{11}H_{20}N_6O_6$	332.317	89	100	100
AgpGD		$C_{10}H_{18}N_6O_6$	318.290	84	99	96
CavGD		$C_{11}H_{20}N_6O_7$	348.316	87	99	97

3. Получаване на защитени биогенни диамини, модификанти за синтеза на пептидните конюгати

При голяма част от пептидите наблюдаваната активност, която проявяват се дължи на С-крайното амидиране. Елиминирането на амидната група, в повечето случаи води до липса на активност. В резултат на това може да се заключи, че амидната група оказва влияние върху биоактивността на пептида. От друга страна се смята, че тази модификация е свързана с взаимодействия и избирателност към рецепторните молекули. Поради възможността за разбиране на влиянието на С-крайното амидиране синтезът беше насочен към конюгиране на RGD в С-края с биогенните диамини: етилендиамин и пропилендиамин.

Характерно свойство на някои аналози на полиамините е способността им да имитират регулаторните функции на естествените полиамини. Те индуцират катаболитни процеси, инхибират синтеза и намаляват количеството на естествените полиамини, което води до спиране на туморния растеж. Конюгирането на полиамини с RGD може да подобри доставянето на полиамини до туморните клетки, поради афинитета на пептида за свързване с интегринови рецептори, свръхекспресирани по повърхността им. Освен това и двете групи молекули притежават цитотоксични свойства, което може да повиши ефективността на терапията.

Необходимите за получаването на конюгати с RGD биогенни диамини защитихме с киселинно - лабилната защитна N-третична бутилоксикарбонилна група (Boc). За целта беше използван метод описан от Виденов (*Videnov et al. 1993*) (Фиг. 25)



Фигура 25. Реакционна схема на защита на аминната група на етилендиамин и пропилендиамин чрез използването на (Boc)₂O.

На Таблица 2 са представени химичните формули на получените полиамини и техния добив.

Таблица 2. Наименования, молна маса, добив, молекулни и структурни формули на използваните в пептидния синтез защитени диамини

Диамини	Химична формула	Структурна формула	Молна маса	Добив
Boc-NH-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂ .HCl	C ₈ H ₁₉ N ₂ O ₂ Cl		174.24	61 %
Boc-NH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂ .HCl	C ₉ H ₂₁ N ₂ O ₂ Cl		188.27	63 %

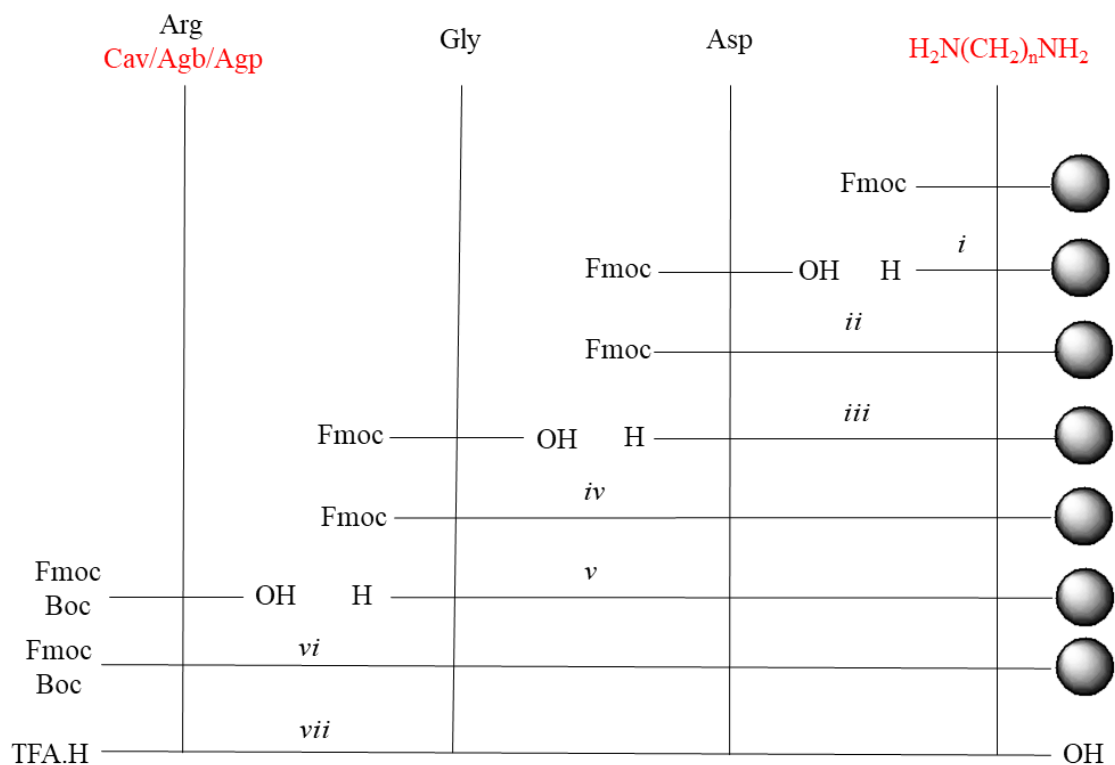
4. Конюгиране на RGD и неговите аналози с полиамини

Съвременните изследвания са фокусирани върху разработването на различни по функция пептиди, играещи ролята на специфични тумор-насочващи вектори, спомагащи преминаването през клетъчната мембрана. Често тези пептиди се използват в лекарствения дизайн като „Троянски кон“, който способства навлизането на даден препарат, конюгиран към тях (*Chatzisideri et al. 2018*). Нашите усилия се насочиха към създаването на нови RGD аналози, които действат като тумор-насочващи пептиди и към подобряване на тяхната цитотоксична активност чрез конюгирането им с други тумор-специфични молекули. Като възможен начин за разгадаване на биологичното и структурно участие на такива молекули се спряхме на биогенните диамини етилендиамин и пропилендиамин.

Интересът ни към подобни конюгирани структури бе привлечен и поради възможността им да бъдат използвани като „градивни единици“ в лекарствения дизайн.

Синтезът на пептидните конюгати е извършен след първоначален скрининг за цитотоксична и антипролиферативна активност на използваните RGD аналози.

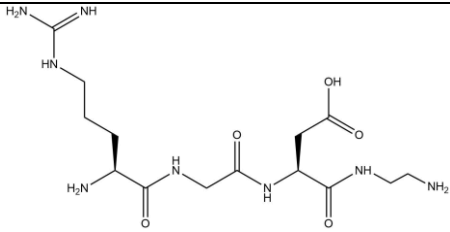
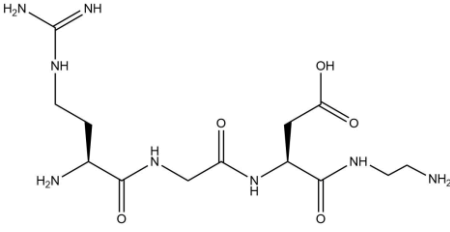
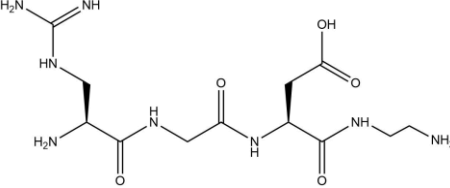
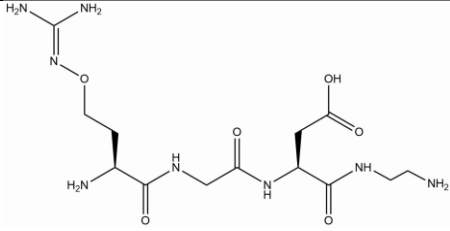
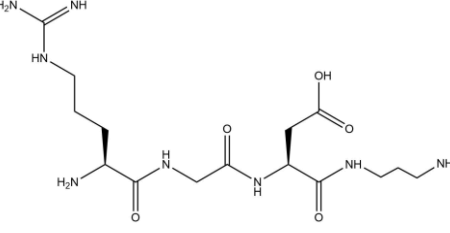
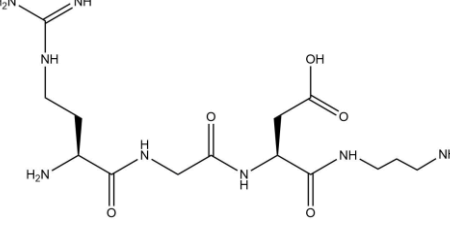
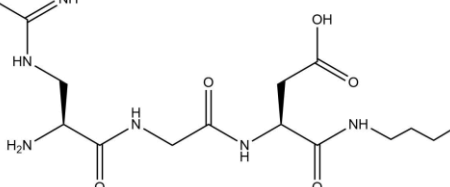
Успешни опити за получаване на пептидните конюгати ArgGDNH(CH₂)₂NH₂ (RGDDAE), AgpGDNH(CH₂)₂NH₂ (AgpGDDEAE), AgbGDNH(CH₂)₂NH₂ (AgbGDDEAE), CavGDNH(CH₂)₂NH₂ (CavGDDEAE), ArgGDNH(CH₂)₃NH₂ (RGDDAP), AgpGDNH(CH₂)₃NH₂ (AgpGDDAP), AgbGDNH(CH₂)₃NH₂ (AgbGDDAP), CavGDNH(CH₂)₃NH₂ (CavGDDAP) бяха проведени в разтвор чрез директна кондензация на защитените трипептиди Boc-Arg-Gly-Asp-OH и Boc-Cav(Boc)-OH със защитения Boc-

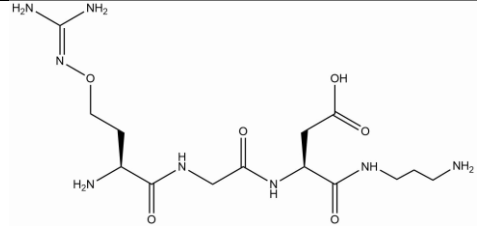


Фигура 27. Схема за синтез на RGD и неговите аналози с полиамини: i) 20% пиперидин/DMF 20 min; ii) HBTU/DIPEA 1h; iii) 20% пиперидин/DMF 20 min; iv) HBTU/DIPEA 1h; v) 20% пиперидин/DMF 20 min; vi) HBTU/DIPEA 1h; vii) a) 20% пиперидин/DMF 20 min; b) TFA/DCM 75 min

На Таблица 3 са представени химичните формули, молекулните маси, чистотата и добива на новополучените RGD\полиаминови конюгати.

Таблица 3. Наименования, химична структура и молна маса на синтезираните пептидни конюгати

<i>Пептидни конюгати</i>	<i>Химична структура</i>	<i>Молна маса</i>
RGDDAE	 <p>The structure shows a peptide backbone with a D-arginine residue (side chain: -(CH2)3-NH-C(=NH)-NH2) and a D-glutamic acid residue (side chain: -CH2-CH2-COOH) linked by a peptide bond. The N-terminus is a primary amine (H2N-), and the C-terminus is a carboxylic acid (-COOH).</p>	388.42
AgbGDDAE	 <p>The structure is identical to RGDDAE, showing a peptide backbone with a D-arginine residue and a D-glutamic acid residue.</p>	374.40
AgpGDDAE	 <p>The structure is identical to RGDDAE, showing a peptide backbone with a D-arginine residue and a D-glutamic acid residue.</p>	360.37
CavGDDAE	 <p>The structure is identical to RGDDAE, showing a peptide backbone with a D-arginine residue and a D-glutamic acid residue.</p>	390.39
RGDDAP	 <p>The structure is identical to RGDDAE, showing a peptide backbone with a D-arginine residue and a D-glutamic acid residue.</p>	402.46
AgbGDDAP	 <p>The structure is identical to RGDDAE, showing a peptide backbone with a D-arginine residue and a D-glutamic acid residue.</p>	388.43
AgpGDDAP	 <p>The structure is identical to RGDDAE, showing a peptide backbone with a D-arginine residue and a D-glutamic acid residue.</p>	374.40

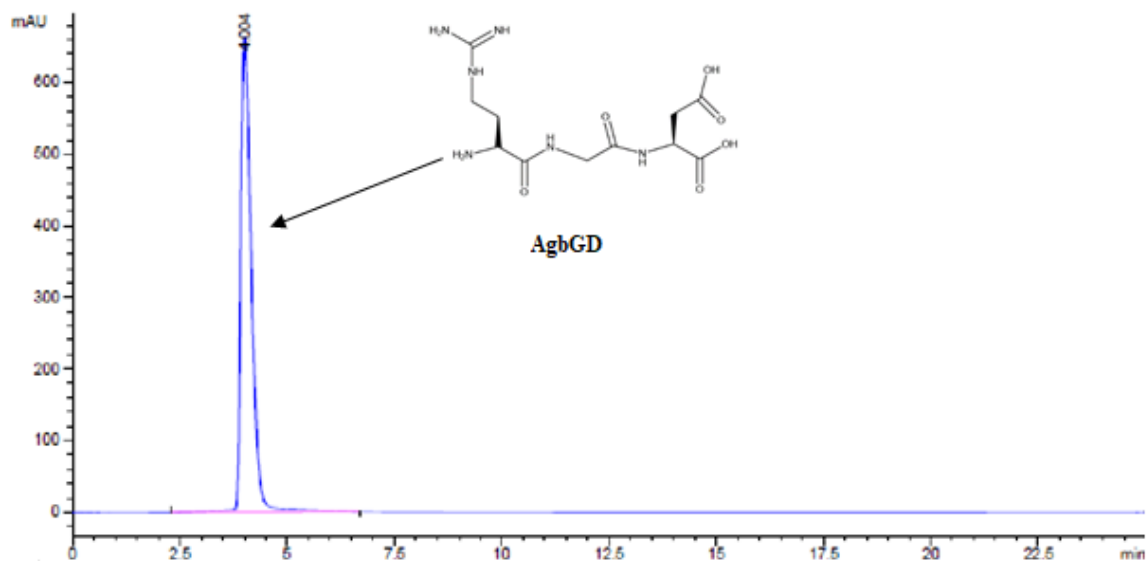
CavGDDAP		404.42
----------	--	---------------

5. Охарактеризиране на новосинтезираните аналози на RGD

Новосинтезираните пептиди бяха пречистени чрез колонна гел - филтрационна хроматография върху Sephadex G-25 с 10% оцетна киселина. Чистите пептидни фракции бяха лиофилизирани.

Степента на химичната им чистота бе определена чрез RP-HPLC и CE. Разделянето в обратно-фазова течна хроматография се основава на хидрофобни взаимодействия между анализа и стационарната фаза. Колкото по-хидрофобен е даден анализ, толкова по-силно се задържа върху стационарната фаза в RP-HPLC и обратно, хидрофилните анализи са значително солватирани от водните молекули, имат много нисък обем на задържане и бързо се елуират.

Степента на химическа чистота на AgbGD, определена чрез RP-HPLC и времето на задържане при изократно елуиране, е показано на Фигура 28.



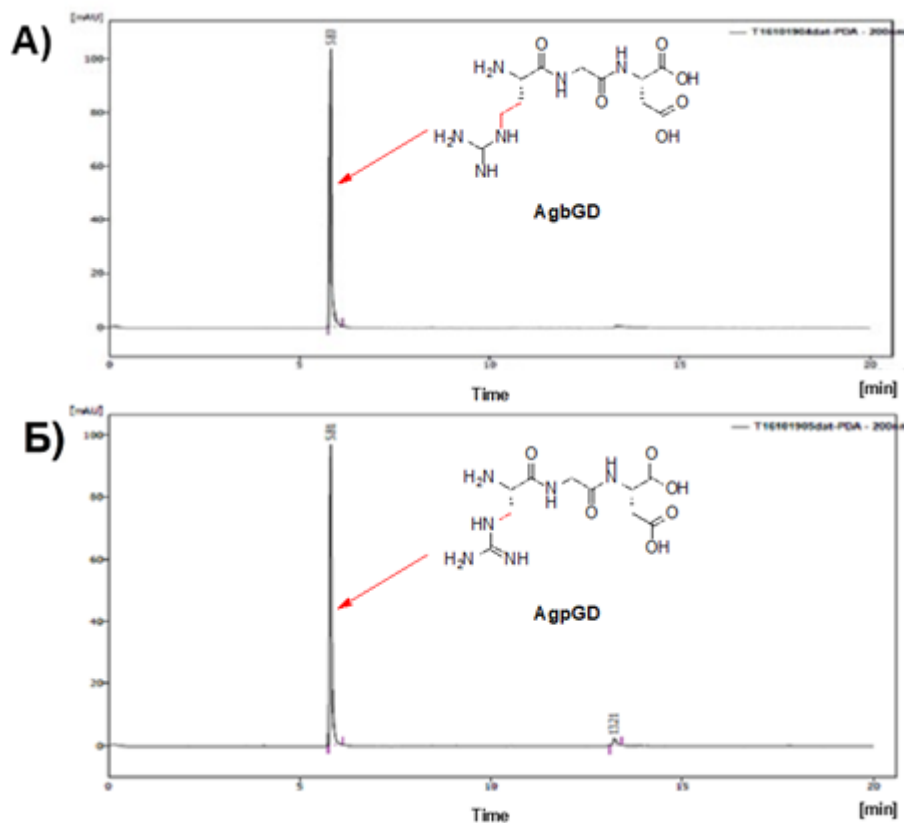
Пептид	Време на задържане (min)	Височина на пика (AU)	Площ (%)
AgbGD	4.004	0.663	100

Фигура 28. Определяне на химическа чистота на пептид AgbGD Колона: ZIC[®] - HILIC (100 x 4,6 mm); мобилна фаза: 0.005 M CH₃COONH₄ (pH=6,8)/ацетонитрил, 50:50. UV детекция – при 206 nm

При провеждане на капиларна електрофореза е важно да се подбере подходящ буфер. Причината е, че той определя заряда на молекулата на анализа и съответно скоростта на миграция. Буферният разтвор трябва да се характеризира с добър буферен капацитет (контрол на pH), ниска проводимост и добра UV прозрачност (особено в ниската UV област). Добавянето в буфера на реагенти, образуващи мицели, е ефективен подход за постигане на по-висока селективност (особено за неутрални разтвори).

За определяне химичната чистота на част от синтезираните пептиди, в буферния разтвор добавихме анионно повърхностно активно вещество – SDS (натриев додецилсулфат). При електрофореза се определя миграцията на мицела към положителния електрод. Скоростта на миграция на анализа зависи от коефициента на разпределение между мицеларната и не-мицеларната (водна) фаза. Колкото по-голям анализ е включен в мицели, толкова скоростта на миграция е по-ниска. Времевият прозорец на миграция на анализа (t_R) е ограничен между времето на преминаване на основния разтвор (t_0) и този на мицела (t_{mc}).

На Фигура 29 са представени електроферограмите на новополучените AgbGD и AgpGD. Чистотата на синтезираните пептиди е висока, добивите са в границите 96 – 100%.



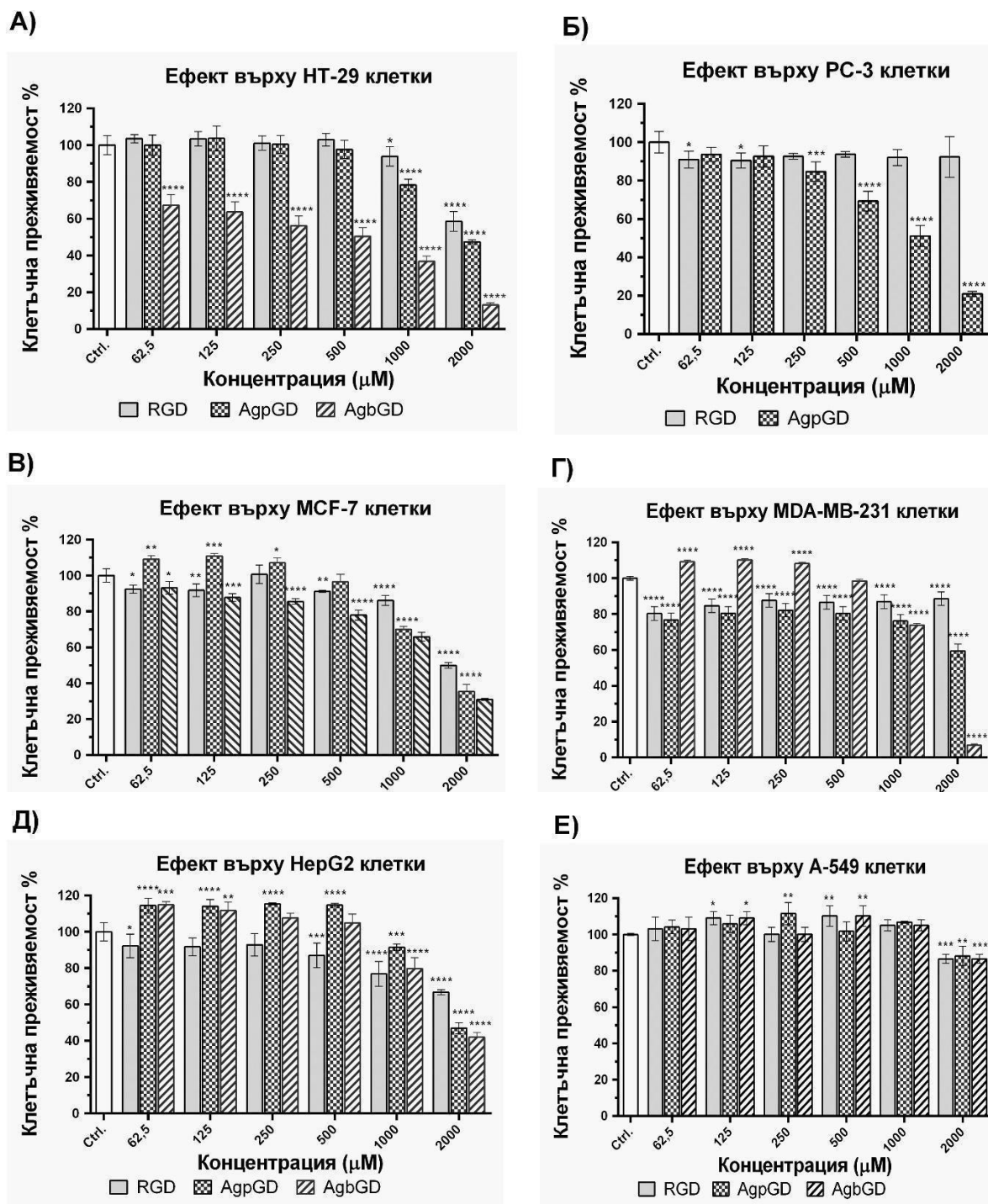
Пептид	Време на задържане (min)	Височина на пика (AU)	Площ (%)
AgbGD	5.825	0.104	100
AgpGD	5.813	0.097	96

Фигура 29. Електроферограма на AgbGD (А) и AgpGD (Б), подвижен буфер: 20 mM Tris, 5mM H₃PO₄, 50 mM SDS, pH 7; с капиляра: 290/400 μm, U = 15 kV, I = 38 μA, T = 23°C, 200 nm

6. Изпитване за цитотоксичен ефект на новосинтезираните аналози на RGD и на техните конюгати с полиамини

За да бъде определена активността на RGD и неговите новосинтезирани структурни аналози и конюгати с биогенни диамини, приложихме *in vitro* изследване за цитотоксичен и антипролиферативен ефект с помощта на МТТ тест. При проведения тест бяха отчетени резултати на 24 часа, даващи информация относно цитотоксичния потенциал на изследваните пептиди. Антипролиферативният ефект бе оценен при отчитане на процента живи клетки на 72 часа от началото на изследването.

Антипролиферативната активност на миметиците AgbGD и AgrGD, както и на изходния RGD беше изследвана *in vitro* върху шест туморни клетъчни линии: HT-29, PC-3, MCF-7, MDA-MB-231, HepG2, A-549 и една нетуморогенна – MCF-10A.



Фигура 30. Ефект на RGD и неговите аналози (AgrGD и AgbGD) върху клетъчната преживяемост, след 72 часа третиране на следните клетъчни линии: А) HT-29, Б) PC-3, В) MCF-7, Г) MDA-MB-231, Д) HepG2, Е) A-549. ****P<0,0001, ***P<0.001, **P< 0.01 и *P<0.05

Клетките бяха инкубирани в среда DMEM (Dulbecco Modified Eagle's medium) с 10% фетален телешки серум и антибиотици в инкубатор, поддържащ влажна атмосфера с 5% CO₂ и 37°C за 72 часа.

При провеждане на теста пептидите бяха приложени в концентрация от 2000 до 62.5 μM по метода на двойно разреждане. След това бе определена тяхната оптична плътност при λ=550 nm, при референтна стойност λ=630 nm.

Клетъчната линия HT-29 е изолирана от аденокарцином на дебелото черво. Според СЗО през 2018 колоректалният рак е на второ място по брой новозаболенели и починали (*Martínez-Maqueda et al. 2015*).

На Фигура 30 са представени обобщени резултати от изследването за цитотоксичност на RGD и неговите новосинтезирани аналози, спрямо HT-29 клетки. Най-изразен доза-зависим цитотоксичен ефект проявява AgbGD. Неговият цитотоксичен ефект е статистически значим при всички концентрации. RGD и AgpGD проявяват антипролиферативна активност само в концентрации 1000 и 2000 μM.

Ракът на простатата е най-често срещаното злокачествено заболяване при мъжете. То е на второ място по смъртност сред останалите видове туморни заболявания (*Tai et al. 2011*). Поради това клетъчна линия PC-3 попада във фокуса на проведените от нас изследвания. AgpGD проявява ефект върху клетъчната преживяемост, при концентрации – 250 – 2000 μM, докато нативният RGD пептид не демонстрира статистически значима активност върху PC-3 клетъчната линия (Фиг. 30Б).

Изследване за цитотоксичност на трите пептида беше проведено и върху MCF-7 клетъчна линия (Фиг. 30В). Нативният пептид проявява статистически значима антипролиферативна активност в най-високата приложена концентрация. Новосинтезираните аналози проявяват ефект при концентрации между 250 и 2000 μM, за AgbGD и между 1000 и 2000 μM, за AgpGD. При ниските приложени концентрации изходният трипептид и новосинтезираните аналози не проявяват изразен ефект върху клетъчната преживяемост.

Антипролиферативната активност на RGD и неговите аналози беше изследвана и върху MDA-MB-231 клетъчна линия от рак на гърдата, която се характеризира с резистентност към значителен брой противотуморни агенти (*Razak et al. 2019*). AgbGD проявява най-значителен ефект от трите приложени пептида при максимално

приложената концентрация. RGD също показва статистически значима активност при най-високите приложени дози, но в по-ниска степен спрямо AgbGD. Ефектът, който демонстрира AgrGD е сравним с този на нативния RGD пептид, но за разлика от него проявяват по-изразена активност в най-високата приложена концентрация – 2000 μM .

Известно е, че хепатоцелуларният карцином е петото по честота злокачествено заболяване в световен мащаб и третото по смъртност след карцинома на белия дроб и на стомаха (*Sherman 2010*). Продължителността на живота при пациенти с хепатоцелуларен карцином остава незадоволителна. Поради това, за изследване бе подбрана HepG2 клетъчна линия, получена от човешки хепатоцелуларен карцином.

Подобно на представените дотук резултати при HepG2 се запазва тенденцията, новосинтезираните аналози да проявяват по-изразен антипролиферативен ефект. RGD проявява своята антипролиферативна активност в ниска степен, при по-голяма част от приложените концентрации. Тя е статистически значима между 500 и 2000 μM . За разлика от изходният пептид, новосинтезираните аналози показват изразен ефект само в най-високите приложени концентрации. Като дори при 2000 μM AgrGD и AgbGD имат по-изразена активност, в сравнение с RGD.

Цитотоксичният ефект на RGD и неговите аналози беше изследван и при A-549 клетъчна линия, която е широко използвана в белодробната клетъчна биология (*Swain et al. 2010*). Резултатите показват, че A-549 клетките са нечувствителни към действието на AgbGD, AgrGD и RGD. Вероятно това се дължи на факта, че при клетъчна линия A-549 експресията на $\alpha_v\beta_3$ интегрин е ниска или дори липсва (*Hou et al. 2016*).

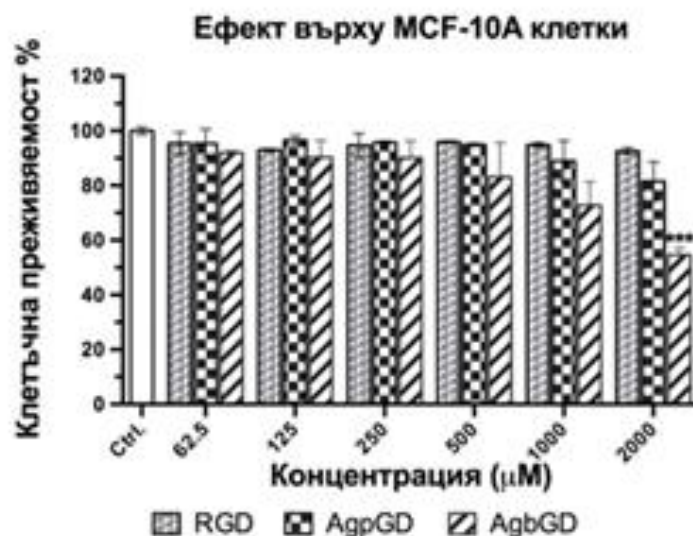
Според Barczyk и сътр. RGD-пептидът е молекулата, която най-често се свързва специфично с интегриновите рецептори (например $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_{II}\beta_3$) (*Barczyk et al. 2010*).

Интегрините са основни клетъчно-адхезивни рецептори. Отделните видове интегрини са специализирани в изпълнението на определени функции (*Aszodi 2003*; *Schwander et al. 2003*; *Barczyk et al. 2010*). Например те участват в преобразуването на вътреклетъчните сигнали, които предизвикват клетъчна миграция (*Aplin et al. 1998*; *Schwartz and Shattil 2000*), в клетъчната пролиферация и осигуряват преживяемостта, както и в клетъчната адхезия към протеини от ЕСМ. Инхибирането на интегриновите рецептори води до подтискане на клетъчната миграция, апоптоза и блокиране на туморната ангиогенеза и метастазирание (*Jin and Varner 2004*). Използването на интегринови антагонисти, специфично насочени към туморната микросреда, могат

значително да повлияят развитието на тумора (*Desgrosellier and Cheresh 2010*) и прогресията на заболяването.

Установено е, че част от интегрините имат афинитет само към един протеинов лиганд от ЕСМ (например $\alpha_5\beta_1$ разпознава фибронектин), други могат да се свързват с няколко вида лиганди - $\alpha_v\beta_3$ взаимодейства с витронектин, фибронектин и фибриноген, които участват в процесите на туморна ангиогенеза (*Jin and Varner 2004*).

При изследването на антипролиферативната активност на трите пептида не се наблюдава ефект спрямо нетуморогенната клетъчна линия MCF-10A (Фиг. 31). Изключение прави аналогът AgbGD, който проявява статистически значим ефект върху преживяемостта на клетките, в най-високите приложени концентрации – 1000 и 2000 μM . Този резултат показва, че тестваните молекули не проявяват ефект върху здрави клетки, което определя тяхната специфичност към туморните клетки и е предпоставка за по-малък брой нежелани странични ефекти.



Фигура 31. Антипролиферативна активност на RGD, AgpGD и AgbGD върху клетъчната преживяемост след 72 часа третиране на MCF-10A клетъчна линия. Еднопосочен ANOVA със сравнителен пост тест на Dunnett, като адаптираната *P*-стойност е отбелязана както следва:

**** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$ и ** $P < 0.01$

Резултатите представени в Таблица 4 обобщават данните, получени при изследване на антипролиферативната активност на RGD, AgbGD и AgpGD, върху изследваните

клетъчни линии. Най-изразен инхибиторен ефект проявява AgbGD върху HT-29 клетъчна линия ($IC_{50} = 300 \pm 10 \mu M$), докато RGD и AgpGD не демонстрират активност в приложените концентрации. AgpGD демонстрира повишена активност ($IC_{50} = 1100 \pm 10 \mu M$) върху PC-3 клетки, в сравнение с нативния пептид ($IC_{50} > 2000 \mu M$). Обобщените резултати от изследването за антипролиферативен ефект на RGD и неговите новосинтезирани аналози върху клетъчните линии MCF-7 и MDA-MB-231, показват, че RGD и AgpGD не демонстрират активност в приложените концентрации. За разлика от тях AgbGD показва инхибиторен ефект при двете клетъчни линии, съответно при концентрации $1400 \pm 10 \mu M$, за MCF-7 клетъчна линия и $1700 \pm 20 \mu M$, при MDA-MB-231. При изследването стана ясно, че A-549 клетъчна линия не е чувствителна към действието на RGD и неговите аналози. Спрямо клетките от HepG2 клетъчната линия и трите пептида не показаха инхибиторна активност, както и при нетуморогенната клетъчна линия MCF-10A.

Таблица 4. IC_{50} стойности на RGD и неговите производни AgbGD и AgpGD след 72 часа третиране (тествана концентрация 60 – 2000 μM)

Пептид	$IC_{50} \pm SD (\mu M)^1$						
	HT-29	PC-3	MCF-7	MDA-MB-231	HepG2	A-549	MCF-10A
RGD	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.
AgbGD	300 ± 10	н.а.	1400 ± 10	1700 ± 20	н.а.	н.а.	н.а.
AgpGD	н.а.	1100 ± 10	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.
Cisplatin	10	2					
5-FU	60						

¹Стойности на IC_{50} със стандартно отклонение SD; н.а. = няма активност при концентрации от 2000 μM .

Базирайки се на получените данни може да се направи заключение, че скъсяването на дължината на страничната верига при Arg с една метиленова група (AgbGD), повишава цитотоксичния ефект в сравнение с изходния RGD пептид. Активността на изследваните пептиди е дозозависима и клетъчно-специфична.

Сравнихме получените от нас резултати с описани в литературата данни относно антипролиферативния ефект на две лекарствени вещества, използвани като стандарт в

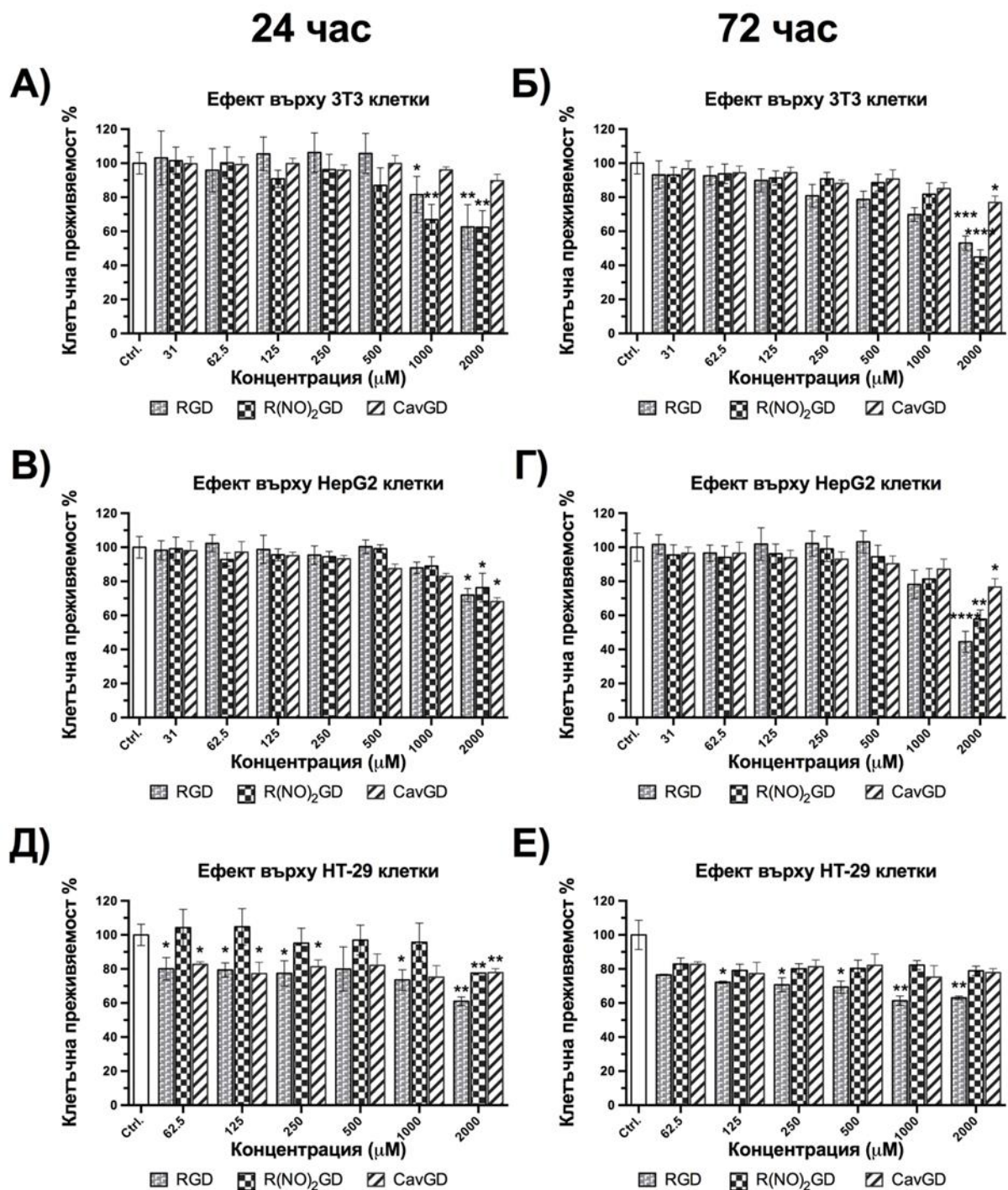
лечението на злокачествени образувания – Cisplatin и 5-fluorouracil (5-FU). Yildirim и Aydemir изследват цитотоксичния ефект на двете вещества върху HT-29 и PC-3 клетъчни линии. Техните резултати показват IC₅₀ на Cisplatin съответно 10μM, при HT-29 клетките и 2μM, при PC-3 клетъчна линия. 5-FU показва IC₅₀ при HT-29 клетъчна линия, която е в концентрация 60μM (*Yildirim and Aydemir 2020*).

От проведения сравнителен анализ (Таблица 4) можем да заключим, че стандартните химиотерапевтици демонстрират по-висока IC₅₀, в сравнение с новосинтезираните от нас пептидни аналози. Въпреки това може да отбележим някои основни предимства на ArgGD и ArgbGD пред Cisplatin и 5-FU. Аналозите на RGD се насочват специфично към туморните клетки, като по този начин става възможно избягването на съществен недостатък на Cisplatin и 5-FU, а именно цитотоксичния им ефект и върху клетки от здрави тъкани. Други странични ефекти, които могат да се проявят след терапия със стандартните химиотерапевтици са нефро-, ото-, невро- и хепатотоксичност (*Bademci et al. 2021*). Освен това, както беше отбелязано в литературния обзор, природната структура на пептидите позволява да се метаболизират до аминокиселини, които могат да се екскретират от организма с ниска имуногенност.

След като бе проведено проучване на цитотоксичната активност на аналози на RGD, при които Arg е заместен с негови структурни аналози, изследвахме и пептиди, модифицирани по два начина отново в N-края.

При първия подход Arg беше заместен с Cav, в резултат се получава CavGD. Другата промяна, която предприехме, е включването на NO₂-група в молекулата на аргинина до получаване на R(NO₂)GD. Целта бе да се определи дали тези промени ще доведат до повишаване на антипролиферативния и цитотоксичен ефекти на новосинтезираните аналози. Активността на пептидите бе изследвана посредством провеждане на МТТ тест върху следните клетъчни линии: 3T3, HepG2 и HT-29, за период от 24 (цитотоксичен ефект) и 72 (антипролиферативен ефект) часа.

Приложените концентрации на пептидите бяха между 2000 и 30 μM, по метода на двойното разреждане. Резултатите са представени на Фигура 32.



Фигура 32. Цитотоксичен и антипролиферативен ефект на RGD и неговите аналози CavGD и R(NO₂)GD върху клетъчната преживяемост на 3Т3, HepG2 и HT-29 клетъчни линии, след 24 (А, В и Д) и 72 часа (Б, Г и Е) третиране. Еднопосочен ANOVAsъс сравнителен пост тест на Dunnett, като адаптираната *P*-стойност е отбелязана както следва: *****P*<0.0001, ****P*<0.01 и **P*<0.05

3Т3 е миша ембрионална фибробластна клетъчна линия с нетуморен характер. Причината за включването ѝ в изследването е проследяване на ефекта върху здрави

клетки, тъй като по-голямата част от туморните терапевтици повлияват и нормалните клетки. Данните, получени от провеждането на МТТ тест върху 3Т3, отразяват специфичността на пептидите към туморните клетки.

При 3Т3 клетъчната линия RGD, R(NO₂)GD и CavGD проявяват ниска инхибираща активност. Нативният пептид и неговият аналог, с добавена нитрогрупа в гуанидиновата група на Arg, демонстрират статистически значим цитотоксичен ефект след 24 часа третиране при 1000 и 2000 μМ. В максимално приложената концентрация клетъчна преживяемост на клетките третирани с R(NO₂)GD е сравнима с тази на клетките, върху които е приложен изходния RGD (Фиг. 32А). Изследването на антипролиферативната активност на трите пептида върху 3Т3 клетъчната линия, показва, че и трите молекули проявяват ефект при 2000 μМ. Най-изразено действие върху пролиферацията на клетките проявява R(NO₂)GD, последван от RGD и CavGD.

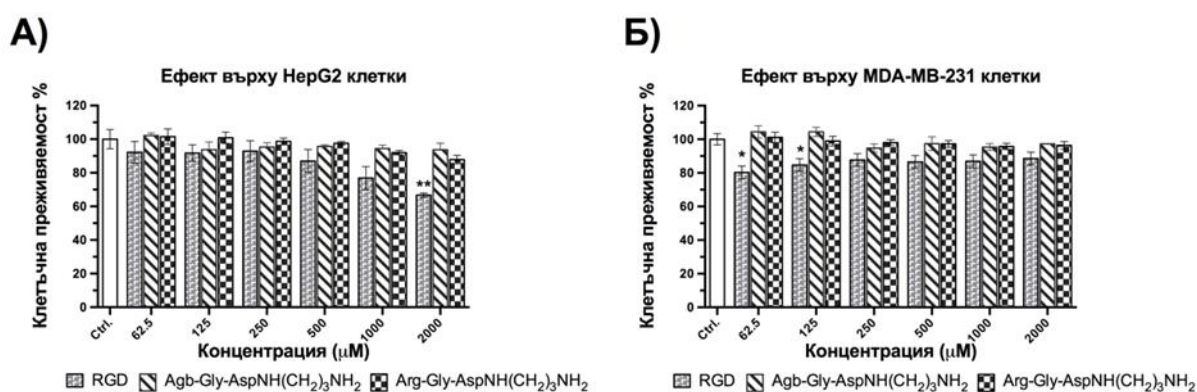
Трите пептида показват сравними резултати и при третирането на HerG2 клетките. Цитотоксичният (Фиг. 32В) и антипролиферативният (Фиг. 32Г) ефекти са най-изразени при нативния RGD пептид при максимална концентрация – 2000 μМ. При изследването на клетъчната преживяемост след 24 часа третиране с аналозите на изходния трипептид, техният ефект е по-слаб (R(NO₂)GD) или сравним с този на RGD – CavGD. Аналозите на RGD демонстрират и по-слаба активност при повлияване на пролиферацията на клетките от HerG2 клетъчната линия, като в този случай аналога с включена допълнителна нитрогрупа в молекулата на аргинина проявява по-изразен ефект, в сравнение с CavGD.

Проведохме изпитване за цитотоксичен и антипролиферативен ефект на RGD и аналозите му и върху HT-29 клетъчната линия. След 24 часа третиране с проучваните молекули статистически значим ефект върху преживяемостта на клетките показват и трите пептида. Той е най-изразен при нативния RGD пептид (Фиг. 32Д). Освен това той демонстрира и статистически значим антипролиферативен ефект след 72 часа третиране върху HT-29 (IC₅₀ = 1500 ± 20 μМ), докато аналозите му не проявяват ефективност (Фиг. 32Е).

От получените резултати можем да заключим, че замяната на Arg с Cav или добавянето на нитрогрупа в гуанидиновата, не водят до повишаване на цитотоксичния и антипролиферативния ефекти върху трите изследвани клетъчни линии.

Предприета бе и структурна модификация на RGD и в неговия C-край, а именно конюгирахме него и AgbGD с биогенния диамин – пропилендиамин.

Проведохме сравнителен анализ относно цитотоксичния ефект на двата новополучени конюгата, единият с модификация само в С-края: RGDDAP, а другият с предприети промени в N- и С-края на молекулата на нативния пептид: AgbGDDAP. Изследвахме тяхната цитотоксичност върху две туморни клетъчни линии – НерG2 и MDA-MB-231. Резултатите от МТТ теста, след 72 часово третиране са представени на Фигура 33. Те показват, че RGD проявява статистически значим ефект в концентрации 1000 и 2000 μM . Новополучените конюгати не показват активност, в никоя от приложените концентрации върху клетки от същата клетъчна линия. Цитотоксичният ефект върху MDA-MB-231 е най-изразен при изходния RGD пептид, в концентрации 62.5 и 125 μM . При тестваните конюгати не е отчетена активност, в нито една от приложените концентрации.



Фигура 33. Изследване на антипролиферативния ефект на RGD, AgbGDDAP и RGDDAP след 72 часа третиране на клетъчни линии НерG2 (А) и MDA-MB-231 (Б). Еднопосочен ANOVA със сравнителен пост тест на Dunnett, като адаптираната *P*-стойност е отбелязана както следва: ** $P < 0.01$ и * $P < 0.05$

При изследваните пептидни конюгати не се наблюдава антипролиферативен ефект върху използваните клетъчни линии. Отчетено е, че единствено AgbGD проявява IC_{50} стойност от $1730 \mu\text{M} \pm 200$, при MDA-MB-231 клетъчна линия.

Таблица 5. IC₅₀ стойности на RGD и неговите производни AgbGD, AgbGDDAP и RGDDAP измерени след 72 часа (тествана конц. 62 - 2000 μM).

Пептид	IC ₅₀ ± SD (μM) ¹	
	HerG2	MDA-MB-231
RGD	н.а.	н.а.
AgbGD	н.а.	1730 ± 200
AgbGDDAP	н.а.	н.а.
RGDDAP	н.а.	н.а.

¹Стойност на IC₅₀ със стандартно отклонение (SD); н.а. = няма активност при концентрации от 2000 μM.

В заключение конюгирането на диамин в С-края на молекулата на RGD и AgbGD не води до повишаване на антипролиферативната им активност.

Получените резултати сравнихме с предишни наши данни. От проведения сравнителен анализ може да се направи заключение, че въвеждането на по-липофилен заместител на същата позиция посредством метоксилиране на С-края на RGD – RGD-OMe, е преимуществено по-благоприятно както за увеличаване на цитотоксичните и антипролиферативни ефекти, така и за повишаване на селективността (Balacheva et al. 2012).

7. Оценка за преминаване на веществата през биологични мембрани чрез изчисляване на данни за молекулните дескриптори с помощта на софтуера Molinspiration Cheminformatics®

Получените *in vitro* резултати за цитотоксичния ефект и антипролиферативна активност на новосинтезираните пептиди не са достатъчни, за да бъдат разглеждани като потенциален лекарствен продукт. Причината за това е, че резултатите получени при проведените дотук изследвания не носят информация за фармакокинетичното поведение на новосинтезираните молекули. За пълно описване на фармакокинетичните параметри – определяне на възможността на новосинтезираните пептиди да достигат до мястото на действие, осигуряване на подходяща бионаличност, преминаване през клетъчните мембрани, протичане на процеса на биотрансформация и екскреция от човешкия организъм, проведохме *in silico* изследване на синтезираните пептиди, с помощта на софтуера Molinspiration Cheminformatics®. Основният алгоритъм, по който работи той, включва изчисляване на молекулните дескриптори по Правилото на Липински. То дава

възможност за оценка на лекарственото подобие и позволява предсказване дали дадено химично съединение притежава фармакологична или биологична активност при перорално приложение.

Правилото на Липински или „Правилото 5“ (Ro5) е формулирано от Christopher Lipinski през 1997г (*Lipinski et al. 2001*). То се използва, за да даде насоки дали нови молекули са подходящи да бъдат лекарства. Според него лошата абсорбция и инфилтрация са по-вероятни, когато донорите на водородните връзки - nOH, nNH (HBD) са над 5, акцепторите на водородни връзки - nO, nN (HBA) са над 10, молекулното тегло (M_w) е над 500 и изчисленият LogP (CLogP) е по-голям от 5 и по-малък от 0. Допуска се нарушението само на един от посочените параметри. С негова помощ също може да се опишат и свойствата на молекулата: абсорбция, разпределение, метаболизъм и екскреция (ADME) (*Mihaylova 2019*).

През 2014 (*Doak B. et al.; 2014*) са дефинирани стойностите на разширените граници на правилото на Липински (bRo5), които се отнасят за молекули с пептидна структура: $M_w \leq 1000$ Da, $-2 \leq cLogP \leq 10$, $HBD \leq 6$, $HBA \leq 15$, топологична полярна повърхност (TPSA) $\leq 250 \text{ \AA}^2$ и брой въртящи се връзки (nRotB) ≤ 20 .

С помощта на тези данни може да се предвиди способността на получените пептиди да преминават през клетъчната мембрана на таргетните клетки. Друг показател, който може да бъде прогнозиран, е обемът на разпределение на веществата в кръвта. Тези данни позволяват да бъде определен вида на лекарствената форма, в която да бъдат включени получените пептиди и да се постигне максимална бионаличност (*Mihaylova 2019*).

Включването на *in silico* методи при разработването на нови терапевтични молекули води до намален брой експериментални проучвания и скъсява времето за достигане до фазата на предклинични и клинични изследвания. За целта на нашето изследване бяха изчислени параметрите на Ro5, TPSA и процента на абсорбция (%ABS). Резултатите са представени в Таблица 6.

Процентът на абсорбция се изчислява по следната формула (*Zhao et al. 2002*):

$$\%ABS = 109 - [0.345 \times TPSA]$$

Коефициентът на разпределение в системата n-octanol-вода се използва като количествена мярка за липофилността на съединенията, която характеризира способността им за преминаване през клетъчната мембрана.

Стойностите на молекулните дескриптори на новосинтезираните пептиди, техните аналози и конюгати, са извън границите на bRo5. Следователно молекулите не са подходящи за перорален прием. Това налага търсенето на други подходящи пътища на въвеждане в организма. Причините, поради които новополучените съединения не отговарят на изискваните резултати са големият брой протонни донори – nOH, nNH = 9 ÷ 12, както и изявените им хидрофилни свойства – miLogP = -5.08 ÷ -4.71. Друг фактор, който показва, че приложението *per os* при новосинтезираните молекули няма да доведе до ефективна бионаличност, е ниският процент абсорбция, между 24.48% до 32.85%.

Резултатите от *in silico* изследването на веществата показват, че ако те бъдат приложени като самостоятелна лекарствена форма, ще трябва да се използва парентерален път на въвеждане. Подходящи начини за приложение са интравенозната инфузия или инжектиране, при които пептидите, аналозите им или новополучените им конюгати директно ще бъдат включени в кръвообръщението. След това посредством своята избирателност ще достигнат до туморната тъкан, където да проявят своето цитотоксично действие. Тези начини на въвеждане имат своите недостатъци, сред които са стресът, травмирането на тъканта в мястото на инжектиране или инфузиране, нуждата да се прилага от специализиран персонал и др.

Поради това търсенето на подходяща лекарствена форма, която може да се прилага перорално, е от особено значение. Така ще се увеличи комплайънсът от страна на пациента, което ще доведе и до повишени резултати от прилаганата терапия.

Таблица 6. Физикохимични характеристики на новосинтезираните съединения, определени с програмата Molinspiration Cheminformatics®

Съединение	miLogP ^a	TPSA ^b	nON ^c	nOHNH ^d	n-RotB ^e	Mol Vol ^f	Mw ^g	%ABS ^h	nviolation ⁱ
1 RGD	-4.88	220.72	12	10	12	304.35	346.34	32.85	2
2 AgbGD	-4.99	220.72	12	10	11	287.55	332.21	32.85	2
3 AgpGD	-5.08	220.72	12	10	10	270.75	318.29	32.85	2
4 CavGD	-4.91	227.16	13	9	13	293.12	349.30	30.63	2
5 RGDDAE	-4.83	238.54	13	12	14	353.63	388.43	26.70	2
6 RGDDAP	-4.71	238.54	13	12	15	370.43	402.46	26.70	2
7 AgbGDDAE	-4.94	238.54	13	12	13	336.83	374.40	26.70	2
8 AgbGDDAP	-4.83	238.54	13	12	14	353.63	388.43	26.70	2
9 AgpGDDAE	-5.04	238.54	13	12	12	320.02	360.38	26.70	2
10 AgpGDDAP	-4.94	238.54	13	12	13	336.83	374.40	26.70	2
11 CavGDDAE	-4.86	244.98	14	11	15	342.39	391.38	24.48	2
12 CavGDDAP	-4.73	244.98	14	11	16	359.19	405.41	24.48	2

^aКоефициент на разпределение в система n-octanol-вода (miLogP); ^bТопологична полярна повърхност;

^cБрой акцептори на протони; ^dБрой донори на протони; ^eБрой (rotatable) въртящи се връзки;

^fМолекулен обем; ^gМолекулно тегло; ^hПроцент абсорбция (%ABS); ⁱброй нарушения на Ro5 и bRo5

Напредъкът в изучаването на туморните тъкани и по-лесната достъпност до материали като липиди, полимери, неорганични и биомакромолекулни носители и полимерни хидрогели водят до повишаване на използването им за получаване на лекарствени форми, с включени в тях противотуморни средства. До момента в противотуморната терапия се използват: мезопорести системи, липозоми, полимерни наночастици (мицели, дендримери), хидрогели и др. Малките размери и голямата специфична повърхност на наночастиците позволяват използването им за високоефективно доставяне на вещества с белтъчна структура, лекарства и средства за образна диагностика до туморните клетки след перорален прием (*Senapati et al. 2018*).

Липозомите могат да се използват като носители, както на хидрофилни, така и на липофилни вещества (*Senapati et al. 2018*). До момента противотуморни лекарствени вещества, които са включени в липозоми се намират в различни етапи от клинични изпитвания. Основно тяхно предимство е намаленото елиминиране и защитата на активното вещество от заобикалящата го среда (*Olusanya et al. 2018*).

Друг вид лекарствена форма с изменено освобождаване, която може да се използва за прицелно доставяне на лекарствени вещества, е т.нар. електронна капсула. Тя предоставя възможност за доставяне на вещества с пептидна структура до определен участък в ГИТ, което позволява да се избегне действието на солната киселина и ензими върху молекулата (*Fassih 2017*).

В различни етапи от клинични проучвания се изследват мицели, които се използват като носители на противотуморни агенти при рак на гърдата (*Oprita and Sevastre 2021*).

В мезопорести наночастици със силициев диоксид могат да се включат хидрофобни лекарствени вещества с нисък клетъчен пермеабилитет. Полимерни наночастици са използвани като носители на Doxorubicin и Tamoxifen (*Senapati et al. 2018*).

VI. ИЗВОДИ

Проведен е насочен синтез и систематично изследване на цитотоксичното и антипролиферативно действие на набор от RGD пептидни аналози модифицирани с небелтъчни аминокиселини, като е направен сравнителен анализ на ефектите им върху ракови и неракови клетки. Изследването включва 3 небелтъчни аминокиселини и техни производни, 2 биогенни диамина и 13 пептидни аналога на RGD.

1. Получени са 4 подходящо защитени производни на небелтъчната аминокиселина канаванин: N α -9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-canavanine (Fmoc-L-Cav-OH), N α -9-Fluorenylmethyloxycarbonyl, N^G-ter-butyloxycarbonyl-canavanine (Fmoc-L-Cav(Boc)-OH), N α -ter-Butyloxycarbonyl, N^G-ter-butyloxycarbonyl-canavanine (Boc-L-Cav(Boc)-OH), N α -ter-Butyloxycarbonyl, N^G-ter-butyloxycarbonyl-canavanine succinimide ester (Boc-L-Cav(Boc)-OSu), целеви модификанти за синтеза на аналози и конюгати на RGD.

2. Получени са защитени производни на биогенните диамини (1,2-етилендиамин и 1,3-пропилендиамин) с N-третична бутилоксикарбонилна група (Boc) с подобрени добиви, които са използвани за получаване на целеви конюгати с RGD.

3. Получени са посредством нови синтетични схеми, с повишен добив и чистота необходимите референтни пептиди: RGD, R(NO₂)GD, RGD-OMe и CavGD.

4. Синтезирани са чрез твърдофазен пептиден синтез с висок добив (81-89%) два нови RGD аналога (AgpGD, AgbGD), модифицирани с аргининови миметици. Получените пептиди са с висока химическа чистота от 95-100%, доказана чрез RP-HPLC и CE. Това показва, че в хода на синтеза са подбрани най-подходящите защитни групи и кондензиращи реагенти.

5. Синтезирани са 8 нови неописани в литературата конюгати на RGD и негови миметици с биогенни диамини: RGDDAE, AgpGDDAE, AgbGDDAE, CavGDDAE, RGDDAP, AgpGDDAP, AgbGDDAP, CavGDDAP. Разработени са два метода за техния синтез – в разтвор и върху полимерен носител. Прилагането на класическия метод в разтвор позволява разширяване на набора от биогенни диамини за следващ избор. При твърдофазния пептиден синтез има възможност за използване на диамини, които предварително са прикачени за смолата.

6. Определено е цитотоксичното и антипролиферативно действие *in vitro* на новосинтезирани пептидни аналози на RGD и на конюгати на RGD с биогенни диамини (RGD, AgbGD, AgpGD, CavGD, R(NO₂)GD, RGDDAP и AgbGDDAP). Проведените експериментални изследвания показват:

- Активността на новосинтезираните пептиди е доза-зависима и клетъчно-специфична.
- При изследване на цитотоксичната активност *in vitro* на RGD и неговите аналози върху шест човешки туморни клетъчни линии (MCF-7, MDA-MB-231, HT-29, HepG2, PC-3 и A-549), както и върху три нетуморогенни клетъчни линии (3T3, MCF-10A), най-висок инхибиторен ефект показва пептидът AgpGD върху PC-3 клетки. Тестваните пептиди не показват значим ефект върху нетуморогенните MCF-10A клетки.
- При *in vitro* определяне на цитотоксичната активност на избрани конюгати на RGD и AgbGD с пропилендиамин, върху HepG2 и MDA-MB-231 клетъчни линии, новополучените молекули не показват антипролиферативни ефекти.

7. С помощта на *in silico* метод са получени стойностите на молекулните дескриптори на новосинтезираните пептидни аналози и техните конюгати. Данните показват, че всички новосинтезирани молекули нямат абсорбция след перорален прием. Следователно бионаличността ще бъде ниска, което ще доведе до слаб терапевтичен ефект.

8. При опита за извеждане на зависимостта химична структура – биологично действие за новосинтезираните RGD аналози е установено:

- Скъсяването на дължината на страничната верига на аминокиселината Arg в RGD пептида променя активността, като повишава цитотоксичния ефект на новополучените пептиди;
- Резултатите от изследването за антипролиферативен ефект на RGD аналозите, модифицирани в първа позиция на RGD като CavGD и R(NO₂)GD, показват, че двата аналога не проявяват повишен цитотоксичен ефект върху тестваните клетъчни линии. Активността на новосинтезираните пептиди е доза-зависима и клетъчно-специфична;
- Резултатите от изследването на антипролиферативния ефект на RGD пептиди, модифицирани в С-края с пропилендиамин, не показват повишаване на инхибиторните ефекти в сравнение с изходните пептиди. Така получените резултати предоставят възможност за бъдещи изследвания, насочени към установяване на антипролиферативната и цитотоксична активност на останалите новополучени конюгати.

VII. НАУЧНИ ПРИНОСИ

Представеното научно изследване в настоящата дисертация е в основата си с фундаментален характер. Научната му значимост се състои в обогатяване на съществуващите знания в областта на целенасочения синтез на биологично активни пептиди и установяване на връзката структура – действие/активност.

1. Синтезирани са аналози на нативния RGD пептид, при които са предприети структурни промени, като замяна на Arg с негови структурни непротеиногенни аналози, включване на нитро група в гуанидиновата функция на Arg, както и естерифициране на карбоксилната група на Asp:
 - синтезирани са аналозите R(NO₂)GD и CavGD, при които Arg е заменен с небелтъчната аминокиселина канаванин по нови високоефективни схеми;
 - за първи път са синтезирани RGD аналозите AgpGD и AgbGD чрез замяна на Arg с неговите нор-аргигинови миметици.
2. Синтезиран е структурен аналог на RGD, при който Arg е заменен с Cav.
3. За първи път са синтезирани нови хибридни структури, които не са описани в литературата – RGD\полиаминови конюгати (RGDDAE, AgbGDDAE, AgpGDDAE, CavGDDAE, RGDDAP, AgbGDDAP, AgpGDDAP, CavGDDAP).
4. За първи път са получени данни за значима антипролиферативна активност на новосинтезираните аналози на RGD – AgpGD и AgbGD, които могат да послужат като основа за последваща оптимизация за разработването на противотуморни лекарства.
5. За първи път е изследван антипролиферативен ефект на конюгати на RGD със синтетични биогенни диамини.
6. Получените резултати за молекулните дескриптори на новополучени молекули, показващи ниска перорална бионаличност, могат да послужат за последващи надграждащи проучвания с цел разработване на подходяща лекарствена форма за перорален прием.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации

1. Balacheva AA, **Lambev MK**, Pashov I, Detcheva RL, Sázelova P, Momekov GTs, Kašička V, Pajpanova TI, Golovinsky EV (2017) Synthesis, analysis and biological evaluation of new RGD mimetics. *Bulgarian Chemical Communications Special Issue E*: 07 – 10. (IF 0.238)
2. Hristova A, Dimitrova D, **Lambev M**, Mihaylova S (2018) Комплементарна и алтернативна медицина в лечението на ракови заболявания. *Варненски медицински форум* 7(3): 183-188.
3. **Lambev M**, Hristova A, Dimitrova D, Mihaylova S, Valcheva-Kuzmanova S, Pajpanova T (2018) Аспекти на приложение на RGD-пептидите. *Варненски медицински форум* 7(3): 189-194.
4. Balacheva A, **Lambev M**, Detcheva R, Bruckdorfer T, Pajpanova T (2020) Synthesis and biological evaluation of novel RGD analogues. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy* 55(4): 698-701.
5. **Ламбев М**, Балачева А, Димитрова Д, Христова А, Пайпанова Т, Вълчева-Кузманова Ст (2020) Съвременна терапия на рака и потенциална роля на RGD пептидите и полиамините като противотуморни агенти. *Наука фармакология* 11(2): 42-48.

Участия в научни форуми

1. **Ламбев М**, Балачева А, Дечева Р, Пайпанова Т Синтез и анализ на нови хибридни структури – RGD\полиамини. Втори докторантски симпозиум „Молекулярната биология – нови хоризонти“ на Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“, БАН, 06-07 април 2017 г.
2. **Lambev M**, Hristova A, Dimitrova D, Pajpanova T, Valcheva-Kuzmanova S Methods for proving cytotoxicity. Национална научна конференция „15 години фармация в Медицински университет – Пловдив“, Девин, 01-03 юни 2018 г.
3. Balacheva A, **Lambev M**, Detcheva R, Bruckdorfer T, Pajpanova T *In vitro* assessment of the cytotoxic effects of novel RGD analogues and conjugates. Осми български пептиден симпозиум с международно участие, Стара Загора, 08-10 юни 2018 г.

4. Hristova A, Dimitrova D, **Lambev M**, Mihaylova S Комплементарна и алтернативна медицина в лечението на ракови заболявания. Седма научна сесия за преподаватели и студенти на Медицински колеж – Варна, 05-06 октомври 2018 г.
5. **Lambev M**, Hristova A, Dimitrova D, Mihaylova S, Valcheva-Kuzmanova S, Райранова Т Аспекти на приложение на RGD-пептидите. Седма научна сесия за преподаватели и студенти на Медицински колеж – Варна, 05-06 октомври 2018 г.
6. Balacheva A, **Lambev M**, Detcheva R, Bruckdorfer T, Райранова Т Synthesis and *in vitro* Assessment of the cytotoxic effects of novel RGD analogues and conjugates. 35 European peptide symposium, Dublin City University, Ireland, 26th – 31th August 2018.

IX. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Aguzzi MS, Giampietri C, De Marchis F, Padula F, Gaeta R, Ragone G, et al. RGD peptide induces caspase 8 and caspase 9 activation in human endothelial cells. *Blood*. 2004 Jun 1;103(11):4180–7.
2. Alberici L, Roth L, Sugahara KN, Agemy L, Kotamraju VR, Teesalu T, et al. De Novo Design of a Tumor-Penetrating Peptide. *Cancer Res*. 2013 Jan 15;73(2):804–12.
3. Aleksiev B, Stoev S. [Substitution of sulfur-containing amino carbonic acids, peptides and protein corpuscles with chlorine. 6. Synthesis of substituted 2-amino-2-carboxyethanolsulfonamides]. *Pharmazie*. 1971 Aug;26(8):469–73.
4. Aljabery F, Shabo I, Gimm O, Jahson S, Olsson H. The expression profile of p14, p53 and p21 in tumour cells is associated with disease-specific survival and the outcome of postoperative chemotherapy treatment in muscle-invasive bladder cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2018 Dec;36(12):530.e7-530.e18.
5. Anuradha CD. RGD peptide-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells requires caspase-3 activation. *Cell Biology and Toxicology*. 2000;16(5):275–83.
6. Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev*. 1998 Jun;50(2):197–263.
7. Aszodi A. Beta 1 integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis. *Genes & Development*. 2003 Oct 1;17(19):2465–79.
8. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ*. 2018 Jan;25(1):104–13.
9. Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varnier JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008 Aug;8(8):604–17.
10. Bachrach U. The early history of polyamine research. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010 Jul;48(7):490–5.
11. Bademci R, Erdoğan M, Eroğlu E, Meral A, Erdoğan A, Atasoy Ö, et al. Demonstration of the protective effect of ghrelin in the livers of rats with cisplatin toxicity. *Hum Exp Toxicol*. 2021 Jun 21;096032712110267.
12. Bagalkot V, Farokhzad OC, Langer R, Jon S. An Aptamer–Doxorubicin Physical Conjugate as a Novel Targeted Drug-Delivery Platform. *Angew Chem Int Ed*. 2006 Dec 11;45(48):8149–52.
13. Bahuguna A, Khan I, Bajpai VK, Kang SC. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh J Pharmacol*. 2017 Apr 8;12(2):8.
14. Balacheva A, Iliev I, Detcheva R, Dzimbova T, Pajpanova T, Golovinsky E. In vitro assessment of the cytotoxic effects of novel RGD analogues. *Biodiscovery* [Internet]. 2012 Oct [cited 2021 Jun 18]; Available from: <https://biodiscovery.pensoft.net/article/8931/>

15. Barany G, Albericio F. Three-dimensional orthogonal protection scheme for solid-phase peptide synthesis under mild conditions. *J Am Chem Soc.* 1985 Aug;107(17):4936–42.
16. Barany G, Merrifield RB. A new amino protecting group removable by reduction. Chemistry of the dithiasuccinoyl (Dts) function. *J Am Chem Soc.* 1977 Oct;99(22):7363–5.
17. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res.* 2010 Jan;339(1):269–80.
18. Barlos K, Gatos D, Kallitsis J, Papaphotiu G, Sotiriou P, Wenqing Y, et al. Darstellung geschützter peptid-fragmente unter einatz substituierter triphenylmethyl-harze. *Tetrahedron Letters.* 1989 Jan;30(30):3943–6.
19. Battistini L, Bugatti K, Sartori A, Curti C, Zanardi F. RGD Peptide-Drug Conjugates as Effective Dual Targeting Platforms: Recent Advances. *Eur J Org Chem.* 2021 May 7;2021(17):2506–28.
20. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. *Nat Rev Cancer.* 2011 Oct;11(10):726–34.
21. Beer AJ, Haubner R, Wolf I, Goebel M, Luderschmidt S, Niemeyer M, et al. PET-based human dosimetry of ¹⁸F-galacto-RGD, a new radiotracer for imaging alpha v beta3 expression. *J Nucl Med.* 2006 May;47(5):763–9.
22. Bence AK, Crooks PA. The Mechanism of l-Canavanine Cytotoxicity: Arginyl tRNA Synthetase as a Novel Target for Anticancer Drug Discovery. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* 2003 Oct;18(5):383–94.
23. Bessa PC, Machado R, Nürnberger S, Dopler D, Banerjee A, Cunha AM, et al. Thermoresponsive self-assembled elastin-based nanoparticles for delivery of BMPs. *Journal of Controlled Release.* 2010 Mar;142(3):312–8.
24. Bodanszky M. Active Esters in Peptide Synthesis. In: *Major Methods of Peptide Bond Formation* [Internet]. Elsevier; 1979 [cited 2021 Oct 29]. p. 105–96. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123042019500096>
25. Boissonnas RA. Une nouvelle méthode de synthèse peptidique. *HCA.* 1951;34(3):874–9.
26. Brassat E, Chambeyron S. Epigenetics and transgenerational inheritance. *Genome Biol.* 2013 May 24;14(5):306.
27. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 2018 Nov;68(6):394–424.
28. Bruno BJ, Miller GD, Lim CS. Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery. *Therapeutic Delivery.* 2013 Nov;4(11):1443–67.

29. Buckley CD, Pilling D, Henriquez NV, Parsonage G, Threlfall K, Scheel-Toellner D, et al. RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. *Nature*. 1999 Feb;397(6719):534–9.
30. Burke PJ, Senter PD, Meyer DW, Miyamoto JB, Anderson M, Toki BE, et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Antibody–Drug Conjugates Comprised of Potent Camptothecin Analogues. *Bioconjugate Chem*. 2009 Jun 17;20(6):1242–50.
31. Cai Z, Yin Y, Shen C, Wang J, Yin X, Chen Z, et al. Comparative effectiveness of preoperative, postoperative and perioperative treatments for resectable gastric cancer: A network meta-analysis of the literature from the past 20 years. *Surgical Oncology*. 2018 Sep;27(3):563–74.
32. Call JA, Eckhardt SG, Camidge DR. Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. *The Lancet Oncology*. 2008 Oct;9(10):1002–11.
33. Capello A, Krenning EP, Bernard BF, Breeman WAP, Erion JL, de Jong M. Anticancer Activity of Targeted Proapoptotic Peptides. 2006;8.
34. Carl PL, Chakravarty PK, Katzenellenbogen JA. A novel connector linkage applicable in prodrug design. *J Med Chem*. 1981 May;24(5):479–80.
35. Carrstensen H, Müller RH, Müller BW. Particle size, surface hydrophobicity and interaction with serum of parenteral fat emulsions and model drug carriers as parameters related to RES uptake. *Clin Nutr*. 1992 Oct;11(5):289–97.
36. Chan WC, White PD. Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach. New York: Oxford University Press; 2000. (The practical approach series).
37. Charlton P, Spicer J. Targeted therapy in cancer. *Medicine*. 2016 Jan;44(1):34–8.
38. Chatzisideri T, Leonidis G, Sarli V. Cancer-targeted delivery systems based on peptides. *Future Medicinal Chemistry*. 2018 Sep 1;10(18):2201–26.
39. Chavakis E, Riecke B, Lin J, Linn T, Bretzel RG, Preissner KT, et al. Kinetics of integrin expression in the mouse model of proliferative retinopathy and success of secondary intervention with cyclic RGD peptides. *Diabetologia*. 2002 Feb;45(2):262–7.
40. Chen K, Chen X. Integrin Targeted Delivery of Chemotherapeutics. *Theranostics*. 2011;1:189–200.
41. Cheng L, Wang X, Zhang J, Zhang S bo, Zheng S qin, Zheng J. [Targeting apoptosis signaling pathways in cancer therapy]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2009 Sep;38(9):639–42.
42. Christiaens B, Grooten J, Reusens M, Joliot A, Goethals M, Vandekerckhove J, et al. Membrane interaction and cellular internalization of penetratin peptides: Penetratin interaction with biological membranes. *European Journal of Biochemistry*. 2004 Mar;271(6):1187–97.
43. Cima MJ, Lee H, Daniel K, Tanenbaum LM, Mantzavinou A, Spencer KC, et al. Single compartment drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2014 Sep;190:157–71.

44. Cirillo M, Giacomini D. Molecular Delivery of Cytotoxic Agents via Integrin Activation. *Cancers*. 2021 Jan 15;13(2):299.
45. Cohen SS. A guide to the polyamines. New York: Oxford University Press; 1998.
46. Colombo M, Bianchi A. Click Chemistry for the Synthesis of RGD-Containing Integrin Ligands. *Molecules*. 2010 Jan 6;15(1):178–97.
47. Cornelissen B, Hu M, McLarty K, Costantini D, Reilly RM. Cellular penetration and nuclear importation properties of ¹¹¹In-labeled and ¹²³I-labeled HIV-1 tat peptide immunoconjugates in BT-474 human breast cancer cells. *Nuclear Medicine and Biology*. 2007 Jan;34(1):37–46.
48. Costa FF. Epigenomics in cancer management. *Cancer Manag Res*. 2010 Oct 27;2:255–65.
49. Cox D, Brennan M, Moran N. Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Oct;9(10):804–20.
50. Curtius Th. Synthetische Versuche mit Hippurazid. *Ber Dtsch Chem Ges*. 1902 Jul;35(3):3226–8.
51. Danhier F, Le Breton A, Pr at V. RGD-Based Strategies To Target Alpha(v) Beta(3) Integrin in Cancer Therapy and Diagnosis. *Mol Pharmaceutics*. 2012 Nov 5;9(11):2961–73.
52. Delage B, Fennell DA, Nicholson L, McNeish I, Lemoine NR, Crook T, et al. Arginine deprivation and argininosuccinate synthetase expression in the treatment of cancer. *Int J Cancer*. 2010;NA-NA.
53. Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2010 Jan;10(1):9–22.
54. Deutscher SL. Phage Display in Molecular Imaging and Diagnosis of Cancer. *Chem Rev*. 2010 May 12;110(5):3196–211.
55. Doronina SO, Bovee TD, Meyer DW, Miyamoto JB, Anderson ME, Morris-Tilden CA, et al. Novel Peptide Linkers for Highly Potent Antibody–Auristatin Conjugate. *Bioconjugate Chem*. 2008 Oct 15;19(10):1960–3.
56. D.R. Nurcahyanti A, Wink M. L-Canavanine Potentiates Cytotoxicity of Chemotherapeutic Drugs in Human Breast Cancer Cells. *ACAMC*. 2017 Jan 12;17(2):206–11.
57. Druker BJ, Guilhot F, O’Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-Year Follow-up of Patients Receiving Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2006 Dec 7;355(23):2408–17.
58. Duchardt F, Fotin-Mleczek M, Schwarz H, Fischer R, Brock R. A Comprehensive Model for the Cellular Uptake of Cationic Cell-penetrating Peptides. *Traffic*. 2007 Jul;8(7):848–66.

59. Duncan R. Polymer therapeutics as nanomedicines: new perspectives. *Curr Opin Biotechnol.* 2011 Aug;22(4):492–501.
60. de Duve C, de Barse T, Poole B, Trouet A, Tulkens P, Van Hoof F. Commentary. Lysosomotropic agents. *Biochem Pharmacol.* 1974 Sep 15;23(18):2495–531.
61. Dzimbova TA, Henklein P, Bruckdorfer T, Maier RM, Weishaupt MW, Pajpanova TI. OLIGONUCLEOTIDES & PEPTIDES Industry perspective. *Chimica Oggi.* 2019;37:6.
62. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun;35(4):495–516.
63. Etrych T, Jelínková M, Ríhová B, Ulbrich K. New HPMA copolymers containing doxorubicin bound via pH-sensitive linkage: synthesis and preliminary in vitro and in vivo biological properties. *J Control Release.* 2001 May 18;73(1):89–102.
64. Fassihi R. Modified-Release Delivery Systems. *Pharmaceutical Dosage Forms.* 2017;28.
65. Feinberg AP. Genome-scale approaches to the epigenetics of common human disease. *Virchows Arch.* 2010 Jan;456(1):13–21.
66. Fischer R, Fotin-Mleczek M, Hufnagel H, Brock R. Break on through to the Other Side-Biophysics and Cell Biology Shed Light on Cell-Penetrating Peptides. *ChemBioChem.* 2005 Dec 2;6(12):2126–42.
67. Fittipaldi A, Ferrari A, Zoppé M, Arcangeli C, Pellegrini V, Beltram F, et al. Cell Membrane Lipid Rafts Mediate Caveolar Endocytosis of HIV-1 Tat Fusion Proteins. *Journal of Biological Chemistry.* 2003 Sep;278(36):34141–9.
68. Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell.* 1988 Dec;55(6):1189–93.
69. Fulda S, Debatin KM. Exploiting death receptor signaling pathways for tumor therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer.* 2004 Dec;1705(1):27–41.
70. Gao SQ, Lu ZR, Petri B, Kopečková P, Kopeček J. Colon-specific 9-aminocamptothecin-HPMA copolymer conjugates containing a 1,6-elimination spacer. *J Control Release.* 2006 Jan 10;110(2):323–31.
71. Gasparini G, Longo R, Toi M, Ferrara N. Angiogenic inhibitors: a new therapeutic strategy in oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* 2005 Nov;2(11):562–77.
72. Georgiev K, Balacheva A, Peycheva E, Georgieva M, Dzimbova T, Georgiev L, et al. In vitro assessment of the cytotoxic effects of novel RGD-mimetics. 32nd European Peptide Symposium. 2012;
73. Georgieva DD. Short peptide analogs of LfcinB synthesized by Solid Phase Peptide Synthesis as an alternative to global microbial resistance. *Acta Scientifica Naturalis.* 2022 Mar 1;9(1):56–64.

74. Gerner EW, Meyskens FL. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer*. 2004 Oct;4(10):781–92.
75. Gilad Y, Firer M, Gellerman G. Recent Innovations in Peptide Based Targeted Drug Delivery to Cancer Cells. *Biomedicines*. 2016 May 26;4(2):11.
76. Gillies E, Frechet J. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discovery Today*. 2005 Jan 1;10(1):35–43.
77. Givental' NI, Ushakov SN, Panarin EF, Popova GO. Experimental studies on penicillin polymer derivatives. *Antibiotiki*. 1965 Aug;10(8):701–6.
78. Gordon M, Miller JG, Day AR. Effect of Structure on Reactivity. ¹ I. Ammonolysis of Esters with Special Reference to the Electron Release Effects of Alkyl and Aryl Groups. *J Am Chem Soc*. 1948 May;70(5):1946–53.
79. Gordon Maxwell, Miller JG, Day AR. Effect of Structure on Reactivity. ¹ II. Influence of Solvents on Ammonolysis of Esters. *J Am Chem Soc*. 1949 Apr;71(4):1245–50.
80. Goyal P. DEVELOPMENT OF DENDRITIC AND POLYMERIC SCAFFOLDS FOR BIOLOGICAL AND CATALYSIS APPLICATIONS. [Georgia Institute of Technology]; 2008.
81. Green M, Loewenstein PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*. 1988 Dec;55(6):1179–88.
82. de Groot FM, Loos WJ, Koekkoek R, van Berkom LW, Busscher GF, Seelen AE, et al. Elongated multiple electronic cascade and cyclization spacer systems in activatable anticancer prodrugs for enhanced drug release. *J Org Chem*. 2001 Dec 28;66(26):8815–30.
83. Gugliucci A. Polyamines as clinical laboratory tools. *Clinica Chimica Acta*. 2004 Jun;344(1–2):23–35.
84. Haubner R, Maschauer S, Prante O. PET Radiopharmaceuticals for Imaging Integrin Expression: Tracers in Clinical Studies and Recent Developments. *BioMed Research International*. 2014;2014:1–17.
85. Henklein P, Bruckdorfer T. Shorter Arginine homologues to stabilize peptides towards tryptic digestion. *Chimica oggi-chemistry today*. 2008;26:12–5.
86. Henriques ST, Costa J, Castanho MARB. Translocation of β -Galactosidase Mediated by the Cell-Penetrating Peptide Pep-1 into Lipid Vesicles and Human HeLa Cells Is Driven by Membrane Electrostatic Potential. *Biochemistry*. 2005 Aug 1;44(30):10189–98.
87. Herbig ME, Weller K, Krauss U, Beck-Sickinger AG, Merkle HP, Zerbe O. Membrane Surface-Associated Helices Promote Lipid Interactions and Cellular Uptake of Human Calcitonin-Derived Cell Penetrating Peptides. *Biophysical Journal*. 2005 Dec;89(6):4056–66.

88. Hilchie AL, Hoskin DW, Power Coombs MR. Anticancer Activities of Natural and Synthetic Peptides. In: Matsuzaki K, editor. Antimicrobial Peptides [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2019 [cited 2021 Oct 25]. p. 131–47. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1117). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-3588-4_9
89. Ho Jang M, Youn Jun D, Woo Rue S, Hyun Han K, Park W, Ho Kim Y. Arginine antimetabolite l-canavanine induces apoptotic cell death in human Jurkat T cells via caspase-3 activation regulated by Bcl-2 or Bcl-xL. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002 Jul;295(2):283–8.
90. Hosseini E, Hosseini SY, Hashempour T, Fattahi MR, Sadeghizadeh M. Effect of RGD coupled MDA-7/IL-24 on apoptosis induction in a hepatocellular carcinoma cell line. *Molecular Medicine Reports*. 2017 Jan;15(1):495–501.
91. Hou J, Diao Y, Li W, Yang Z, Zhang L, Chen Z, et al. RGD peptide conjugation results in enhanced antitumor activity of PD0325901 against glioblastoma by both tumor-targeting delivery and combination therapy. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016 May;505(1–2):329–40.
92. Hou L, Zhang X, Wang D, Baccarelli A. Environmental chemical exposures and human epigenetics. *Int J Epidemiol*. 2012 Feb;41(1):79–105.
93. Hu C, Chen X, Zhao W. Design and Modification of Anticancer Peptides. *Drug Des* [Internet]. 2016 [cited 2021 Oct 25];05(03). Available from: <https://www.omicsgroup.org/journals/design-and-modification-of-anticancer-peptides-2169-0138-1000138.php?aid=84450>
94. Hu M, Wang J, Chen P, Reilly RM. HIV-1 Tat Peptide Immunoconjugates Differentially Sensitize Breast Cancer Cells to Selected Antiproliferative Agents That Induce the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21^{WAF-1/CIP-1}. *Bioconjugate Chem*. 2006 Sep 1;17(5):1280–7.
95. Huang YF, Shangguan D, Liu H, Phillips JA, Zhang X, Chen Y, et al. Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells. *Chembiochem*. 2009 Mar 23;10(5):862–8.
96. Hwang DS, Sim SB, Cha HJ. Cell adhesion biomaterial based on mussel adhesive protein fused with RGD peptide. *Biomaterials*. 2007 Oct;28(28):4039–46.
97. Hynes RO. Integrins. *Cell*. 2002 Sep;110(6):673–87.
98. Iannolo G, Conticello C, Memeo L, De Maria R. Apoptosis in normal and cancer stem cells. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2008 Apr;66(1):42–51.
99. Igarashi K, Kashiwagi K. Modulation of cellular function by polyamines. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2010 Jan;42(1):39–51.
100. Jain RK. The next frontier of molecular medicine: Delivery of therapeutics. *Nat Med*. 1998 Jun;4(6):655–7.

101. Javali NM, Raj A, Saraf P, Li X, Jasti B. Fatty Acid–RGD Peptide Amphiphile Micelles as Potential Paclitaxel Delivery Carriers to $\alpha\beta 3$ Integrin Overexpressing Tumors. *Pharm Res.* 2012 Dec;29(12):3347–61.
102. Jiang X, Wang X. Cytochrome c Promotes Caspase-9 Activation by Inducing Nucleotide Binding to Apaf-1. *Journal of Biological Chemistry.* 2000 Oct;275(40):31199–203.
103. Jiang X, Zhao M, Wang Y, Zhu H, Zhao S, Wu J, et al. RGD(F/S/V)-Dex: towards the development of novel, effective, and safe glucocorticoids. *DDDT.* 2016 Mar;1059.
104. Jin H, Varner J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br J Cancer.* 2004 Feb;90(3):561–5.
105. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy. *Cell.* 2002 Jan;108(2):153–64.
106. Joliot A, Prochiantz A. Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat Cell Biol.* 2004 Mar;6(3):189–96.
107. Jones AT. Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J Cellular Mol Med.* 2007 Jul;11(4):670–84.
108. Jones P. Out of Africa and into epigenetics: discovering reprogramming drugs. *Nat Cell Biol.* 2011 Jan;13(1):2–2.
109. Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD, Cook PI. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry.* 1970 Apr;34(2):595–8.
110. Kalimuthu S, Se-Kwon K. Cell Survival and Apoptosis Signaling as Therapeutic Target for Cancer: Marine Bioactive Compounds. *IJMS.* 2013 Jan 24;14(2):2334–54.
111. Kameyama S, Horie M, Kikuchi T, Omura T, Takeuchi T, Nakase I, et al. Effects of Cell-Permeating Peptide Binding on the Distribution of 125 I-Labeled Fab Fragment in Rats. *Bioconjugate Chem.* 2006 May 1;17(3):597–602.
112. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis.* 2000 Mar;21(3):505–15.
113. Kim J, Nam HY, Kim T il, Kim PH, Ryu J, Yun CO, et al. Active targeting of RGD-conjugated bioreducible polymer for delivery of oncolytic adenovirus expressing shRNA against IL-8 mRNA. *Biomaterials.* 2011 Aug;32(22):5158–66.
114. König W, Geiger R. Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazolen. *Chem Ber.* 1970 Mar;103(3):788–98.
115. Kopeček J. BIODEGRADATION OF POLYMERS FOR BIOMEDICAL USE. In: *Macromolecules* [Internet]. Elsevier; 1982 [cited 2021 Jun 22]. p. 305–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080262260500269>

116. Kopeček J. Polymer-drug conjugates: origins, progress to date and future directions. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 Jan;65(1):49–59.
117. Kopecek J, Kopecková P. HEMA copolymers: origins, early developments, present, and future. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010 Feb 17;62(2):122–49.
118. Kotamraj P, Russu WA, Jasti B, Wu J, Li X. Novel Integrin-Targeted Binding-Triggered Drug Delivery System for Methotrexate. *Pharm Res.* 2011 Dec;28(12):3208–19.
119. Le Joncour V, Laakkonen P. Seek & Destroy, use of targeting peptides for cancer detection and drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2018 Jun;26(10):2797–806.
120. Lenci E, Trabocchi A. Peptidomimetic toolbox for drug discovery. *Chem Soc Rev.* 2020;49(11):3262–77.
121. Li H, Labean TH, Leong KW. Nucleic acid-based nanoengineering: novel structures for biomedical applications. *Interface Focus.* 2011 Oct 6;1(5):702–24.
122. Li WW, Li VW, Hutnik M, Chiou AS. Tumor Angiogenesis as a Target for Dietary Cancer Prevention. *Journal of Oncology.* 2012;2012:1–23.
123. Lin X, Liu M, Hu C, Joshua Liao D. Targeting Cellular Proapoptotic Molecules for Developing Anticancer Agents from Marine Sources. *CDT.* 2010 Jun 1;11(6):708–15.
124. Lipinski C, Hopkins A. Navigating chemical space for biology and medicine. *Nature.* 2004 Dec;432(7019):855–61.
125. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 Mar 1;46(1–3):3–26.
126. Liu Y, Sweet DT, Irani-Tehrani M, Maeda N, Tzima E. Shc coordinates signals from intercellular junctions and integrins to regulate flow-induced inflammation. *Journal of Cell Biology.* 2008 Jul 14;182(1):185–96.
127. van de Loosdrecht AA, Beelen RHJ, Ossenkoppele GJ, Broekhoven MG, Langenhuijsen MMAC. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *Journal of Immunological Methods.* 1994 Sep;174(1–2):311–20.
128. Luo Q, Zhang L, Luo C, Jiang M. Emerging strategies in cancer therapy combining chemotherapy with immunotherapy. *Cancer Letters.* 2019 Jul;454:191–203.
129. Maiolo JR, Ferrer M, Ottinger EA. Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 2005 Jul;1712(2):161–72.

130. Maj E, Papiernik D, Wietrzyk J. Antiangiogenic cancer treatment: The great discovery and greater complexity (Review). *International Journal of Oncology*. 2016 Nov;49(5):1773–84.
131. Mammen M, Choi SK, Whitesides GM. Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1998 Nov 2;37(20):2754–94.
132. Mangiola A, de Bonis P, Maira G, Balducci M, Sica G, Lama G, et al. Invasive tumor cells and prognosis in a selected population of patients with glioblastoma multiforme. *Cancer*. 2008 Aug 15;113(4):841–6.
133. Marelli UK, Rechenmacher F, Sobahi TRA, Mas-Moruno C, Kessler H. Tumor Targeting via Integrin Ligands. *Front Oncol* [Internet]. 2013 [cited 2021 Jun 22];3. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2013.00222/abstract>
134. Martínez-Maqueda D, Miralles B, Recio I. HT29 Cell Line. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editors. *The Impact of Food Bioactives on Health* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [cited 2021 Nov 1]. p. 113–24. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-16104-4_11
135. Mas-Moruno C, Rechenmacher F, Kessler H. Cilengitide: The First Anti-Angiogenic Small Molecule Drug Candidate. Design, Synthesis and Clinical Evaluation. *ACAMC*. 2010 Dec 1;10(10):753–68.
136. Massaguer A, González-Cantó A, Escribano E, Barrabés S, Artigas G, Moreno V, et al. Integrin-targeted delivery into cancer cells of a Pt(IV) pro-drug through conjugation to RGD-containing peptides. *Dalton Trans*. 2015;44(1):202–12.
137. Mihaylova S. Synthesis and Biological Evaluation of SMAC-NT Peptide Conjugates with Combined Antineoplastic and Analgesic Effect. Medical university “Prof. dr. Paraskev Stoyanov”, Varna, Bulgaria; 2019.
138. Miller LM, Pritchard JM, Macdonald SJF, Jamieson C, Watson AJB. Emergence of Small-Molecule Non-RGD-Mimetic Inhibitors for RGD Integrins: Miniperspective. *J Med Chem*. 2017 Apr 27;60(8):3241–51.
139. Moghimi SM, Symonds P, Murray JC, Hunter AC, Debska G, Szewczyk A. A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Molecular Therapy*. 2005 Jun;11(6):990–5.
140. Moinard C, Cynober L, Debandt J. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*. 2005 Apr;24(2):184–97.
141. Momekova D, Momekov G, Lambov N. NANO-SIZED DRUG DELIVERY PLATFORMS FOR TAXANE ANTINEOPLASTIC AGENTS D. Momekova, G. Momekov, N. Lambov. 2015;62(1):13.
142. Monneur A, Gonçalves A, Bertucci F. Expression de PD-L1 et inhibiteurs de la voie PD-1/PD-L1 dans le cancer du sein. *Bulletin du Cancer*. 2018 Mar;105(3):263–74.

143. Moore S, Stein WH. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J Biol Chem.* 1954 Dec;211(2):907–13.
144. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods.* 1983 Dec;65(1–2):55–63.
145. Mukhopadhyay S, Barnés CM, Haskel A, Short SM, Barnes KR, Lippard SJ. Conjugated Platinum(IV)–Peptide Complexes for Targeting Angiogenic Tumor Vasculature. *Bioconjugate Chem.* 2008 Jan 1;19(1):39–49.
146. Naha P, Silcock J, Fellows L. Reappraisal of L-canavanine as an anti-tumour agent. *Cell Biology International Reports.* 1980 Feb;4(2):155–66.
147. Nakamura H, Etrych T, Chytil P, Ohkubo M, Fang J, Ulbrich K, et al. Two step mechanisms of tumor selective delivery of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer conjugated with pirarubicin via an acid-cleavable linkage. *J Control Release.* 2014 Jan 28;174:81–7.
148. Nakase I, Tadokoro A, Kawabata N, Takeuchi T, Katoh H, Hiramoto K, et al. Interaction of Arginine-Rich Peptides with Membrane-Associated Proteoglycans Is Crucial for Induction of Actin Organization and Macropinocytosis [†]. *Biochemistry.* 2007 Jan;46(2):492–501.
149. Nieberler M, Reuning U, Reichart F, Notni J, Wester HJ, Schwaiger M, et al. Exploring the Role of RGD-Recognizing Integrins in Cancer. *Cancers.* 2017 Sep 4;9(12):116.
150. Nirmal J, Tyagi P, Chancellor MB, Kaufman J, Anthony M, Chancellor DD, et al. Development of potential orphan drug therapy of intravesical liposomal tacrolimus for hemorrhagic cystitis due to increased local drug exposure. *J Urol.* 2013 Apr;189(4):1553–8.
151. Niu G, Chen X. Why Integrin as a Primary Target for Imaging and Therapy. *Theranostics.* 2011;1:30–47.
152. Nurcahyanti AD, Wink M. L-Canavanine potentiates the cytotoxicity of doxorubicin and cisplatin in arginine deprived human cancer cells. *PeerJ.* 2016;4:e1542.
153. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, et al. Imatinib Compared with Interferon and Low-Dose Cytarabine for Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2003 Mar 13;348(11):994–1004.
154. Olusanya T, Haj Ahmad R, Ibegbu D, Smith J, Elkordy A. Liposomal Drug Delivery Systems and Anticancer Drugs. *Molecules.* 2018 Apr 14;23(4):907.
155. Oprita A, Sevastre AS. NEW PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS USED IN THE TREATMENT OF BREAST CANCER. POLYMERIC MICELLES. *MONC.* 2021 May 18;1(1):38–52.

156. Orzáez M, Mondragón L, Marzo I, Sanclimens G, Messeguer À, Pérez-Payá E, et al. Conjugation of a novel Apaf-1 inhibitor to peptide-based cell-membrane transporters: Peptides. 2007 May;28(5):958–68.
157. Ozaki T, Nakagawara A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers*. 2011 Mar 3;3(1):994–1013.
158. Pajpanova T, Stoev S, Golovinsky E, Krauss GJ, Miersch J. Canavanine derivatives useful in peptide synthesis. *Amino Acids*. 1997 Jun;12(2):191–204.
159. Pan H, Kopecková P, Wang D, Yang J, Miller S, Kopecek J. Water-soluble HEMA copolymer--prostaglandin E1 conjugates containing a cathepsin K sensitive spacer. *J Drug Target*. 2006 Jul;14(6):425–35.
160. Pan X, Xu J, Jia X. Research Progress Evaluating the Function and Mechanism of Anti-Tumor Peptides. *CMAR*. 2020 Jan;Volume 12:397–409.
161. Panczyk M. Pharmacogenetics research on chemotherapy resistance in colorectal cancer over the last 20 years. *WJG*. 2014;20(29):9775.
162. Panyam J, Zhou WZ, Prabha S, Sahoo SK, Labhasetwar V. Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *FASEB J*. 2002 Aug;16(10):1217–26.
163. Paolillo M, Boselli C, Schinelli S. Glioblastoma under Siege: An Overview of Current Therapeutic Strategies. *Brain Sciences*. 2018 Jan 16;8(1):15.
164. Paolillo M, Russo M, Serra M, Colombo L, Schinelli S. Small Molecule Integrin Antagonists in Cancer Therapy. *MRMC*. 2009 Oct 1;9(12):1439–46.
165. Park MH, Igarashi K. Polyamines and Their Metabolites as Diagnostic Markers of Human Diseases. *Biomolecules and Therapeutics*. 2013 Jan 31;21(1):1–9.
166. Persson L. Polyamine homeostasis. Wallace HM, editor. *Essays in Biochemistry*. 2009 Oct 30;46:11–24.
167. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*. 1984 May;309(5963):30–3.
168. Pooga M, Hällbrink M, Zorko M, Langel Ü. Cell penetration by transportan. *FASEB j*. 1998 Jan;12(1):67–77.
169. Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT. Anti-apoptosis and cell survival: A review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2011 Jan;1813(1):238–59.
170. Prabha S, Labhasetwar V. Critical determinants in PLGA/PLA nanoparticle-mediated gene expression. *Pharm Res*. 2004 Feb;21(2):354–64.
171. Prager GW, Poettler M, Unseld M, Zielinski CC. Angiogenesis in cancer: Anti-VEGF escape mechanisms. *Transl Lung Cancer Res*. 2012 Mar;1(1):14–25.

172. Privé GG, Melnick A. Specific peptides for the therapeutic targeting of oncogenes. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2006 Feb;16(1):71–7.
173. Qin Y, Qin ZD, Chen J, Cai CG, Li L, Feng LY, et al. From Antimicrobial to Anticancer Peptides: The Transformation of Peptides. *PRA*. 2019 Mar 13;14(1):70–84.
174. Qiu Z, Hu J, Xu H, Wang W, Nie C, Wang X. Generation of antitumor peptides by connection of matrix metalloproteinase-9 peptide inhibitor to an endostatin fragment: *Anti-Cancer Drugs*. 2013 Aug;24(7):677–89.
175. Qvit N, Rubin SJS, Urban TJ, Mochly-Rosen D, Gross ER. Peptidomimetic therapeutics: scientific approaches and opportunities. *Drug Discovery Today*. 2017 Feb;22(2):454–62.
176. Rady I, Siddiqui IA, Rady M, Mukhtar H. Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Letters*. 2017 Aug;402:16–31.
177. Raj A, Saraf P, Javali NM, Li X, Jasti B. Binding and uptake of novel RGD micelles to the $\alpha_v \beta_3$ integrin receptor for targeted drug delivery. *Journal of Drug Targeting*. 2014 Jul;22(6):518–27.
178. Rajangam T, Paik H jong, An SSA. Development of fibrinogen microspheres as a biodegradable carrier for tissue engineering. *BioChip J*. 2011 Jun;5(2):175–83.
179. Razak NA, Abu N, Ho WY, Zamberi NR, Tan SW, Alitheen NB, et al. Cytotoxicity of eupatorin in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells via cell cycle arrest, anti-angiogenesis and induction of apoptosis. *Sci Rep*. 2019 Dec;9(1):1514.
180. Reardon DA, Neyns B, Weller M, Tonn JC, Nabors LB, Stupp R. Cilengitide: an RGD pentapeptide $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ integrin inhibitor in development for glioblastoma and other malignancies. *Future Oncology*. 2011 Mar;7(3):339–54.
181. Reed JC. Mechanisms of Apoptosis. *The American Journal of Pathology*. 2000 Nov;157(5):1415–30.
182. Rejmanová P, Kopecek J, Duncan R, Lloyd JB. Stability in rat plasma and serum of lysosomally degradable oligopeptide sequences in N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers. *Biomaterials*. 1985 Jan;6(1):45–8.
183. Richard JP, Melikov K, Brooks H, Prevot P, Lebleu B, Chernomordik LV. Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J Biol Chem*. 2005 Apr 15;280(15):15300–6.
184. Rosenthal GA. The Biological Effects and Mode of Action of L-Canavanine, a Structural Analogue of L-Arginine. *The Quarterly Review of Biology*. 1977 Jun;52(2):155–78.
185. Rosenthal GA. L-Canavanine: A Potential Chemotherapeutic Agent for Human Pancreatic Cancer. *Pharmaceutical Biology*. 1998 Jan;36(3):194–201.

186. Rosik L, Niegisch G, Fischer U, Jung M, Schulz WA, Hoffmann MJ. Limited efficacy of specific HDAC6 inhibition in urothelial cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*. 2014 Jun;15(6):742–57.
187. Roth TL, Nayak D, Atanasijevic T, Koretsky AP, Latour LL, McGavern DB. Transcranial amelioration of inflammation and cell death after brain injury. *Nature*. 2014 Jan 9;505(7482):223–8.
188. Rowinsky EK. Targeted Induction of Apoptosis in Cancer Management: The Emerging Role of Tumor Necrosis Factor–Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor Activating Agents. *JCO*. 2005 Dec 20;23(36):9394–407.
189. Roxin Á, Zheng G. Flexible or fixed: a comparative review of linear and cyclic cancer-targeting peptides. *Future Medicinal Chemistry*. 2012 Aug;4(12):1601–18.
190. Rozema DB, Ekena K, Lewis DL, Loomis AG, Wolff JA. Endosomolysis by Masking of a Membrane-Active Agent (EMMA) for Cytoplasmic Release of Macromolecules. *Bioconjugate Chem*. 2003 Jan;14(1):51–7.
191. Ruoslahti E. RGD AND OTHER RECOGNITION SEQUENCES FOR INTEGRINS. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1996 Nov;12(1):697–715.
192. Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New Perspectives in Cell Adhesion: RGD and Integrins. *Science*. 1987 Oct 23;238(4826):491–7.
193. Ruoslahti E, Reed J. New way to activate caspases. *Nature*. 1999 Feb;397(6719):479–80.
194. Russo MA, Paolillo M, Sanchez-Hernandez Y, Curti D, Ciusani E, Serra M, et al. A small-molecule RGD-integrin antagonist inhibits cell adhesion, cell migration and induces anoikis in glioblastoma cells. *International Journal of Oncology*. 2013 Jan;42(1):83–92.
195. Saiki I, Murata J, Matsuno K, Ogawa R, Nishi N, Tokura S, et al. Anti-metastatic and anti-invasive effects of polymeric Arg-Gly-Asp (RGD) peptide, poly(RGD), and its analogues. *Jpn J Cancer Res*. 1990 Jul;81(6–7):660–7.
196. Saraf P, Li X, Jasti B. Integrin Targeting Using RGD-Based Peptide Amphiphiles. In: Patsenker E, editor. *Integrin Targeting Systems for Tumor Diagnosis and Therapy* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2015a [cited 2021 Oct 28]. p. 135–55. (Methods in Pharmacology and Toxicology). Available from: http://link.springer.com/10.1007/7653_2015_61
197. Saraf P, Li X, Wrischnik L, Jasti B. In Vitro and In Vivo Efficacy of Self-Assembling RGD Peptide Amphiphiles for Targeted Delivery of Paclitaxel. *Pharm Res*. 2015b Sep;32(9):3087–101.
198. Schaffner P, Dard MM. Structure and function of RGD peptides involved in bone biology. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 2003 Jan 1;60(1):119–32.

199. Schipper ML, Iyer G, Koh AL, Cheng Z, Ebenstein Y, Aharoni A, et al. Particle size, surface coating, and PEGylation influence the biodistribution of quantum dots in living mice. *Small*. 2009 Jan;5(1):126–34.
200. Schwander M, Leu M, Stumm M, Dorchies OM, Ruegg UT, Schittny J, et al. β 1 Integrins Regulate Myoblast Fusion and Sarcomere Assembly. *Developmental Cell*. 2003 May;4(5):673–85.
201. Schwartz MA, Shattil SJ. Signaling networks linking integrins and rho family GTPases. *Trends Biochem Sci*. 2000 Aug;25(8):388–91.
202. Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*. 1999 Sep 3;285(5433):1569–72.
203. von Schwarzenberg K, Vollmar AM. Targeting apoptosis pathways by natural compounds in cancer: Marine compounds as lead structures and chemical tools for cancer therapy. *Cancer Letters*. 2013 May;332(2):295–303.
204. Seiler N, Raul F. Polyamines and apoptosis. *J Cellular Mol Med*. 2005 Jul;9(3):623–42.
205. Senapati S, Mahanta AK, Kumar S, Maiti P. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Sig Transduct Target Ther*. 2018 Dec;3(1):7.
206. Sheehan JC, Hess GP. A New Method of Forming Peptide Bonds. *J Am Chem Soc*. 1955 Feb;77(4):1067–8.
207. Sheehan JC, Hlavka JJ. The Use of Water-Soluble and Basic Carbodiimides in Peptide Synthesis. *J Org Chem*. 1956 Apr;21(4):439–41.
208. Shen WC, Ryser HJ. cis-Aconityl spacer between daunomycin and macromolecular carriers: a model of pH-sensitive linkage releasing drug from a lysosomotropic conjugate. *Biochem Biophys Res Commun*. 1981 Oct 15;102(3):1048–54.
209. Sherman M. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology, Surveillance, and Diagnosis. *Semin Liver Dis*. 2010 Feb;30(01):003–16.
210. Sheu MJ, Baldwin WW, Brunson KW. Cytotoxicity of rabbit macrophage peptides MCP-1 and MCP-2 for mouse tumor cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985 Nov;28(5):626–9.
211. Shiah JG, Sun Y, Kopecková P, Peterson CM, Straight RC, Kopecek J. Combination chemotherapy and photodynamic therapy of targetable N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer-doxorubicin/mesochlorin e(6)-OV-TL 16 antibody immunoconjugates. *J Control Release*. 2001 Jul 6;74(1–3):249–53.
212. Shirahama H, Ichimaru A, Tsutsumi C, Nakayama Y, Yasuda H. Characteristics of the biodegradability and physical properties of stereocomplexes between poly(L-

- lactide) and poly(D-lactide) copolymers. *J Polym Sci A Polym Chem*. 2005 Jan 15;43(2):438–54.
213. Shumikhina KI, Panarin EF, Ushakov SN. Experimental study of polymer salts of penicillins. *Antibiotiki*. 1966 Sep;11(9):767–70.
214. Silva TR de M. Polyamine-Based Anticancer Strategies. The Role of Modified Polyamines. [Departamento de Ciências da Vida – Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade de Coimbra]: Departamento de Ciências da Vida – Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade de Coimbra; 2013.
215. Sirianni RW, Zheng MQ, Saltzman WM, Huang Y, Carson RE. Direct, quantitative, and noninvasive imaging of the transport of active agents through intact brain with positron emission tomography. *Mol Imaging Biol*. 2013 Oct;15(5):596–605.
216. Staszek P, Weston LA, Ciacka K, Krasuska U, Gniazdowska A. l-Canavanine: How does a simple non-protein amino acid inhibit cellular function in a diverse living system? *Phytochem Rev*. 2017 Dec;16(6):1269–82.
217. Sudhakar A, Sugimoto H, Yang C, Lively J, Zeisberg M, Kalluri R. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by α 3 and α 5 β 1 integrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003 Apr 15;100(8):4766–71.
218. Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, Kotamraju VR, Agemy L, Greenwald DR, et al. Coadministration of a Tumor-Penetrating Peptide Enhances the Efficacy of Cancer Drugs. *Science*. 2010 May 21;328(5981):1031–5.
219. Sun Y, Kang C, Liu F, Zhou Y, Luo L, Qiao H. RGD Peptide-Based Target Drug Delivery of Doxorubicin Nanomedicine: RGD PEPTIDE-BASED TARGET DRUG DELIVERY. *Drug Dev Res*. 2017 Sep;78(6):283–91.
220. Swain RJ, Kemp SJ, Goldstraw P, Tetley TD, Stevens MM. Assessment of Cell Line Models of Primary Human Cells by Raman Spectral Phenotyping. *Biophysical Journal*. 2010 Apr;98(8):1703–11.
221. Tabatabai G, Weller M, Nabors B, Picard M, Reardon D, Mikkelsen T, et al. Targeting integrins in malignant glioma. *Targ Oncol*. 2010 Sep;5(3):175–81.
222. Tai S, Sun Y, Squires JM, Zhang H, Oh WK, Liang CZ, et al. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate*. 2011 Nov;71(15):1668–79.
223. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol*. 2007;8(5):215.
224. Takao K, Rickhag M, Hegardt C, Oredsson S, Persson L. Induction of apoptotic cell death by putrescine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2006;38(4):621–8.
225. Temming K, Schiffelers RM, Molema G, Kok RJ. RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumour vasculature. *Drug Resist Updat*. 2005 Dec;8(6):381–402.

226. Thorén PE, Persson D, Karlsson M, Nordén B. The antennapedia peptide penetratin translocates across lipid bilayers - the first direct observation. *FEBS Lett.* 2000 Oct 6;482(3):265–8.
227. Thundimadathil J. Cancer treatment using peptides: current therapies and future prospects. *J Amino Acids.* 2012;2012:967347.
228. Tomalia DA. Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry. *Progress in Polymer Science.* 2005 Mar;30(3–4):294–324.
229. Uemura T, Gerner EW. Polyamine Transport Systems in Mammalian Cells and Tissues. In: Pegg AE, Casero, RA, editors. *Polyamines* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2011 [cited 2021 Oct 29]. p. 339–48. (*Methods in Molecular Biology*; vol. 720). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-034-8_21
230. Ulbrich K, Subr V. Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004 Apr 23;56(7):1023–50.
231. Vaughan JR. ACYLALKYL CARBONATES AS ACYLATING AGENTS FOR THE SYNTHESIS OF PEPTIDES. *J Am Chem Soc.* 1951 Jul;73(7):3547–3547.
232. Veldhoen S, Laufer SD, Trampe A, Restle T. Cellular delivery of small interfering RNA by a non-covalently attached cell-penetrating peptide: quantitative analysis of uptake and biological effect. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(22):6561–73.
233. Verma AK. Polyamines and Cancer. In: Wang JY, Casero RA, editors. *Polyamine Cell Signaling* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2006 [cited 2020 May 11]. p. 313–28. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-145-1_18
234. Verma M. Cancer control and prevention: nutrition and epigenetics. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2013 Jul;16(4):376–84.
235. Verma M, Rogers S, Divi RL, Schully SD, Nelson S, Joseph Su L, et al. Epigenetic Research in Cancer Epidemiology: Trends, Opportunities, and Challenges. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014 Feb;23(2):223–33.
236. Videnov G, Aleksiev B, Stoev M, Paipanova T, Jung G. Tmob Side Chain-protected S-Cysteine- and homo-S-Cysteine sulfonamides, their N α -Protected and N ω -Aminoethylated Derivatives. *Liebigs Ann Chem.* 1993 Sep 13;1993(9):941–5.
237. Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med.* 2004 Mar;10(3):310–5.
238. Wallace HM, Fraser AV. Polyamine analogues as anticancer drugs. *Biochemical Society Transactions.* 2003 Apr 1;31(2):393–6.
239. Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochemical Journal.* 2003 Nov 15;376(1):1–14.

240. Wang F, Li Y, Shen Y, Wang A, Wang S, Xie T. The Functions and Applications of RGD in Tumor Therapy and Tissue Engineering. *IJMS*. 2013a Jun 27;14(7):13447–62.
241. Wang F, Li Y, Shen Y, Wang A, Wang S, Xie T. The Functions and Applications of RGD in Tumor Therapy and Tissue Engineering. *IJMS*. 2013b Jun 27;14(7):13447–62.
242. Wang SSun. p-Alkoxybenzyl Alcohol Resin and p-Alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide Resin for Solid Phase Synthesis of Protected Peptide Fragments. *J Am Chem Soc*. 1973 Feb;95(4):1328–33.
243. Wang Z, Azmi AS, Ahmad A, Banerjee S, Wang S, Sarkar FH, et al. TW-37, a Small-Molecule Inhibitor of Bcl-2, Inhibits Cell Growth and Induces Apoptosis in Pancreatic Cancer: Involvement of Notch-1 Signaling Pathway. *Cancer Res*. 2009 Apr 1;69(7):2757–65.
244. Weis SM, Stupack DG, Cheresch DA. Agonizing Integrin Antagonists? *Cancer Cell*. 2009 May;15(5):359–61.
245. Wieland T. Aus der Chemie der Polypeptide Peptid-Synthesen IV. *Angew Chem*. 1959 Jun 7;71(13):417–25.
246. Wieland T, Bernhard H. Über Peptid-Synthesen. 3. Mitteilung. Die Verwendung von Anhydriden aus N-acylierten Aminosäuren und Derivaten anorganischer Säuren. *Justus Liebigs Ann Chem*. 1951 Mar 13;572(1):190–4.
247. Wild CP, Scalbert A, Herceg Z. Measuring the exposome: a powerful basis for evaluating environmental exposures and cancer risk. *Environ Mol Mutagen*. 2013 Aug;54(7):480–99.
248. Xiao B, Li W, Yang J, Guo G, Mao XH, Zou QM. RGD-IL-24, A Novel Tumor-Targeted Fusion Cytokine: Expression, Purification and Functional Evaluation. *Mol Biotechnol*. 2009 Feb;41(2):138–44.
249. Xie M, Liu D, Yang Y. Anti-cancer peptides: classification, mechanism of action, reconstruction and modification. *Open Biol*. 2020 Jul;10(7):200004.
250. Xiong XB, Ma Z, Lai R, Lavasanifar A. The therapeutic response to multifunctional polymeric nano-conjugates in the targeted cellular and subcellular delivery of doxorubicin. *Biomaterials*. 2010 Feb;31(4):757–68.
251. Yamamoto Y, Tsutsumi Y, Mayumi T. Molecular Design of Bioconjugated Cell Adhesion Peptide with a Water-Soluble Polymeric Modifier for Enhancement of Antimetastatic Effect. *CDT*. 2002 Apr 1;3(2):123–30.
252. Yandek LE, Pokorny A, Florén A, Knoelke K, Langel U, Almeida PFF. Mechanism of the cell-penetrating peptide transportan 10 permeation of lipid bilayers. *Biophys J*. 2007 Apr 1;92(7):2434–44.
253. Yang J, Kopeček J. Macromolecular therapeutics. *Journal of Controlled Release*. 2014 Sep;190:288–303.

254. Yang NJ, Hinner MJ. Getting Across the Cell Membrane: An Overview for Small Molecules, Peptides, and Proteins. In: Gautier A, Hinner MJ, editors. Site-Specific Protein Labeling [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2015 [cited 2021 Nov 3]. p. 29–53. (Methods in Molecular Biology; vol. 1266). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2272-7_3
255. Yatin M. Polyamines in living organisms. 2002;Journal of Cell and Molecular Biology 1: 57-67:11.
256. Yildirim H, Aydemir AT. Multidrug resistance gene expression response to cisplatin and 5FU treatment in hepatoma, prostate and colon cancer cells. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 2020 Jun 24;698–708.
257. Yu WD, Sun G, Li J, Xu J, Wang X. Mechanisms and therapeutic potentials of cancer immunotherapy in combination with radiotherapy and/or chemotherapy. Cancer Letters. 2019 Jun;452:66–70.
258. Yu YP, Wang Q, Liu YC, Xie Y. Molecular basis for the targeted binding of RGD-containing peptide to integrin $\alpha V\beta 3$. Biomaterials. 2014 Feb;35(5):1667–75.
259. Zelphati O, Uyechi LS, Barron LG, Szoka FC. Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells. Biochim Biophys Acta. 1998 Feb 16;1390(2):119–33.
260. Zhao YH, Abraham MH, Le J, Hersey A, Luscombe CN, Beck G, et al. Rate-limited steps of human oral absorption and QSAR studies. Pharmaceutical Research. 2002;19(10):1446–57.
261. Zheng LH, Wang YJ, Sheng J, Wang F, Zheng Y, Lin XK, et al. Antitumor Peptides from Marine Organisms. Marine Drugs. 2011 Oct 10;9(10):1840–59.
262. Ziegler DS, Kung AL. Therapeutic targeting of apoptosis pathways in cancer. Current Opinion in Oncology. 2008 Jan;20(1):97–103.
263. Zorko M, Langel U. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. Advanced Drug Delivery Reviews. 2005 Feb 28;57(4):529–45.

X. НАУЧНИ ПРОЕКТИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Проект на тема: **„Нови RGD\полиамини – синтез и проучване за противотуморна активност“**, проект № 17010/2017 г. на фонд „Наука“, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна. Ръководител на проекта: проф. д-р Стефка Вълчева-Кузманова, д.м.н., базова организация: Факултет „Медицина“, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна.
2. Проект на тема: **„Холистичен подход при прицелна терапия на рака“**, проект ДН 19-17/2017 г. на фонд „Научни изследвания“, Министерство на образованието и науката. Ръководител на проекта: доц. Тамара Иванова Пайпанова, дх., базова организация: Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“, гр. София.