

ЮГОЗАПАДЕН УНИВЕРСИТЕТ „НЕОФИТ РИЛСКИ”
Природо-математически факултет
Катедра „Химия”

Кирил Николов Чучков

“Аналози на противовирусни препарати – синтез и
биологична активност”

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователна и научна
степен „ДОКТОР”

Научна специалност „Органична химия“

Научен ръководител: доц. д-р Иванка Станкова

Благоевград
2016 г.

Дисертационният труд е написан на 155 стр. формат А4. Съдържа 11 таблици, 22 схеми и 56 фигури. Номерацията им в автореферата съответства на тази в дисертацията. Цитирани са 122 литературни източника.

Дисертационният труд е изработен в катедра „Химия” към Природо-математически факултет на ЮЗУ „Неофит Рилски”, гр.Благоевград.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 27.09.2016 г. в катедра „Химия” към Природо-математически факултет на ЮЗУ „Неофит Рилски”, гр.Благоевград, ул. „Тодор Александров” № 56, ет.3, зала 2301.

Най-често използвани съкращения:

- *на Английски език*

ACV - Ацикловир
CMV - Цитомегало вирус
DCC - N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide
DMAP - 4-Dimethylaminopyridine
DMF – Диметилформамид
EDC - 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
FCV - Фамцикловир
GCV - Ганцикловир
HPLC – High-performance liquid chromatography
HA - Хемаглутинаин
HSV-1 – Херпес симплекс вирус тип 1
HSV-2 – Херпес симплекс вирус тип 2
NA - Невраминидаза
PCV – Пенцикловир
THF - Тетрахидрофуран
VACV - Валацикловир
VGCV - Валганцикловир
VZV – Варицела зостер вирус

- *на Български език*

Ам - Амантадин
ДНК - Дезоксирибонуклеинова киселина
МС - Мас спектър
Ос - Оселтамивир
Рим - Римантадин
РНК - Рибонуклеинова киселина
СЗО - Световна здравна организация
СПИН - Синдром на придобитата имунна недостатъчност
ТСХ - Тънкослойна хроматография
ЯМР - Ядрено магнитен резонанс

УВОД

Обект на настоящия дисертационен труд са производни на противохерпесните препарати (ацикловир, ганцикловир и пенцикловир) и на противогрипните препарати (оселтамивир, амантадин и римантадин).

Въпреки значителните успехи на химиотерапията не може да се счита, че на сегашния етап в лечението на вирусни заболявания са постигнати окончателни резултати. Ниска селективност, значителна токсичност и развитие на резистентност, характерна за утвърдените в клиничната практика препарати са основните причини за търсене на нови противовирусни средства. Съществена роля в създаването на такива препарати играят химията и биохимията на нуклеиновите киселини и техните предшественици, които са най-важните и перспективни раздели на съвременната биоорганична химия.

Лечението с противовирусни лекарствени средства започва с откриването на нуклеозидния аналог на тимидина (5-J-2'-дезеоксиуридин Prusoff, 1959). Понастоящем се прилагат около 50 противовирусни препарата, като голяма част от тях се използват за лечение и превенция на заболявания причинени от херпесни и на грипни вируси.

Насочване на действието към вирусната, целева (таргетна) клетка са в основата за създаване на ефективни противовирусни агенти, както и профилактиката и ранно лечение на някои инфекции.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на дисертационната работа е синтезирането на някои производни на ацикловир, пенцикловир, ганцикловир, амантадин, римантадин и оселтамивир с холеви киселини и аминокиселини, изследване *in vitro* на билогичната им активност, с оглед установяване на някои закономерности "химичен строеж-биологична активност" и получаване на предлекарства с потенциално противовирусно действие, които евентуално да показват определени предимства пред досега познатите.

За постигане на тази **цел** си поставихме следните **задачи**:

1. Синтезиране на производни на ацикловир, пенцикловир, ганцикловир с жлъчни киселини - холева, дезоксихолева и хенодезоксихолева киселина;
2. Синтезиране на производни на ацикловир, пенцикловир, ганцикловир с 4-F-фенилаланин (D и L) и с моделни пептиди;
3. Синтезиране на жлъчни киселини с оселтамивир;
4. Синтезиране на модифицирани аминокарбоксилни киселини и техни енантиомери с оселтамивир, римантадин и амантадин и доказване на химичния им строеж;
5. Синтезиране на оселтамивир с адамантанови производни и доказване на химичния им строеж;
6. Модифициране на аминогрупата на адамантановите производни;
7. Изследване *in vitro* противовирусната активност (спрямо грипен и херпесен вирус) производните на ацикловир, пенцикловир, ганцикловир, оселтамивир, римантадин и амантадин.
8. Изследване химичната стабилност на някои от новополучените производни на ацикловир, оселтамивир, римантадин и амантадин с оглед изясняване възможността те да бъдат използвани като предлекарства.

III. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

При създаването на нови аналози-антагонисти на нуклеозиди се прилагат три основни пътя за модифициране на химичния им строеж:

- структурни промени в пуриновата или пиримидинова база;
- модификация в монозахаридния остатък;
- структурни промени в хетеропръстена и в монозахаридния остатък.

Ние се спряхме на модифициране на ОН- групите в ацикличния остатък на избраните от нас съединения – ацикловир, пенцикловир, ганцикловир с неприродни аминокиселини, пептиди и техни миметици и жлъчни киселини, защото считаме, че тази възможност не е добре изучена.

Друго съображение, което ни стимулира да изберем тази област на изследване е факта, че при създаване на нуклеозидни аналози при общ скрининг от 5000 съединения, на ниво клетъчни култури активност са показали 50-100 производни, от които 10-20 са достигнали до клинични изпитания и едно се е превърнало в лекарствен препарат, т.е. достигната е висока резултатност при този подход на изследване.

От друга страна съществуват вече значителен брой аналози на нуклеозиди, които се прилагат понастоящем при лечение на вирусни инфекции: вал-ацикловир, вал-ганцикловир, 3'-азидо-2',3'-дидезокситимидин, 3'-азидо-2',3'-дидезоксиуридин, 9-(2-хидроксиетокси- метил)-гуанин, абакавир, хлорхидрат-1-адамантил-амин, което говори че биха могли да бъдат намерени и други нуклеозидни производни с антивирусно действие, дори и с подобрени свойства.

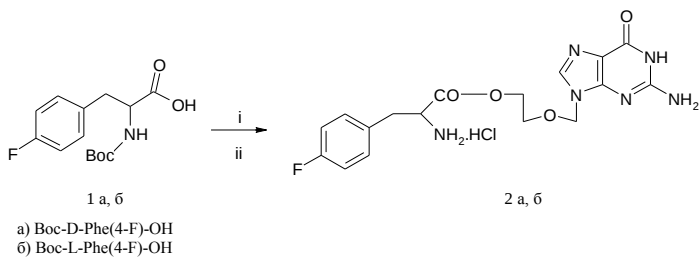
В клиничната практика при лечение на онкологичните заболявания ефективно се използват препарати, които също са нуклеозидни аналози: метотрексат, 6-меркаптопурин, тиогуанин, 5-флуороурацил, фторафур, 6- азагуанин и др.

III. 1. Синтез на производни на ацикловира с Вос-Phe(4-F)-ОН (D и L) чрез заместване в хидроксилната му група

Доказаната противовирусна активност на определени аминокиселини и техните производни ни даде основание да синтезираме Вос-Phe(4-F)-ОН (неговите D и L изомери) и да го използваме за модифициране на ацикловира. Считаме, че със резултатите от биологичните изследвания ще се разширят познанията върху зависимостта структура-действие на новосинтезираните нуклеозидни аналози.

Основавайки се на досега известните данни в литературата за синтеза на аминокиселинни естери на биологично-активни вещества ние се спряхме на DCC/HOBt метода за пептиден синтез за получаването на модифицирани с аминокиселини и пептиди нуклеозиди.

Ацилирането на ацикловира бе извършено в хидроксилната група с Вос- защитените аминокиселини с DCC в диметилформамид (DMF) при 0°C, а за катализатор на реакцията бе използван диметиламинопиридин (DMAP) (Схема 1). Ходът на реакцията бе следен чрез ТСХ в хроматографска система СТ₁. След приключване на реакцията, реакционната смес обработихме по стандартна методика и хроматографирахме на колона със SiO₂, за елуираща система използвахме CHCl₃/CH₃OH= 4:1. Изолирахме съединенията **2a** и **2b**, които бяха доказани с МС и ЯМР анализ.



(i) ацикловир/DCC/DMAP/DMF, 24h rt (ii) TFA/CH₂Cl₂/HCl

Схема 1. Модифициране на ацикловир с Boc-Phe(4-F)-OH (D/L)

III. 2. Синтез на ацикловир с дипептидите Boc-Val-Pro-OH и Boc-Ile-Pro-OH

Предишни биологични изследвания върху определени аминокиселини и пептидни производни на някои нуклеозиди ни дадоха основание да се спрем на дипептиди, съдържащи аминокиселини, които вече са били използвани като заместители и са подобрили качествата на съответния нуклеозид (валиловия естер на ацикловир, фенилаланиновия и изолевциновия естер на AZT). Затова счетохме, че модифицирането на ацикловир с дипептидите Boc-Val-Pro-OH и Boc-Ile-Pro-OH биха подобрили неговата биологична активност и увеличили бионаличността му.

Ацилирането на ACV със защитените дипептиди 3a-б бе извършено с DCC в разтвор на диметилформаид (DMF) (Схема 2). Реакцията бе катализирана с 4-N, N-(диметиламино)-пиридин (DMAP). Реакцията протече за 24 часа, като първоначално реакционната смес се разбърква за 1h при 0°C. След приключване на реакцията разтворителят се изпарява на ротационен вакуум изпарител и остатъка се хроматографира върху колона със SiO₂, за елуент е използван MeOH:CH₂CH₂ в съотношение 1:4. Структурите на получените дипептидни естери на ацикловир с Boc-Val-Pro 4a

(VPACV) и Boc-Ile-Pro 46 (IPACV) са доказани с ^1H , ^{13}C NMR и МС спектри.

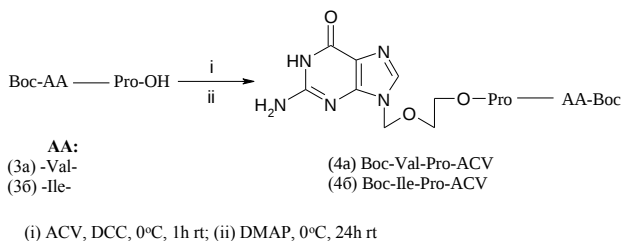
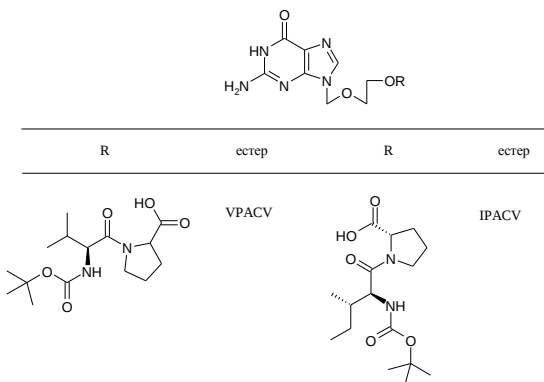


Схема 2. Синтез на дипептидни естери на ацикловир

При интерпретация на ^1H -NMR спектрите на дипептидните естери се наблюдава пик в областта на $\delta = 4.51$, която означава, че хидроксилната група на ацикловира е естерно свързана, докато в ацикловира със свободна ОН-група този пик е при $\delta = 3.47$. В областта на $\delta = 1.51$ се наблюдава синглет, 9H за $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ -от трет. бутилова група. При MS спектрите се наблюдава пик при 551.51, съответстващо на масата на естера, както и пикове на масата на ацикловира и дипептида Boc-Ile-Pro-OH (Фиг43).



Фиг. 43. Структура на дипептидните производни на ацикловира

III. 3. Модифициране на пуринови аналози с жлъчни киселини (холева киселина, дезоксихолева киселина и хенодезоксихолева киселина)

Съществуват много публикации и данни в литературата за ниската орална бионаличност на ацикловир, ганцикловир и пенцикловир, което е основен проблем при борбата с херпесните вируси. Поради тази причина се правят опити за повишаването и, като насоките за това са различни. Един от огромните проблеми за медицината се оказва преминаването на потенциалното лекарство през клетъчната мембрана и преносът му до целевата (таргентна) клетка. Възможност за улесняване на преминаването на биологично активни вещества през клетъчната мембрана е свързването им с амфифилни транспортни молекули. Добър подход за разрешаването на този проблем е изграждане на структурата на “молекулния чадър”. Последният съдържа две молекули жлъчна киселина (амфифил), които обвиват биологично активното вещество и улесняват преминаването му през клетъчната мембрана. Жлъчните киселини са безвредни молекули, тъй като изграждат клетъчните мембрани на живите организми (Фиг. 44).

Смятаме, че модификации на противоверпесните препарати ацикловир, ганцикловир и пенцикловир с жлъчни киселини биха представлявали интерес. Считаме, че модифицирани по този начин пуриновите аналози (ACV, GCV и PCV) биха подобрили преминаването през клетъчните мембрани, като по този начин е възможно да се повиши оралната им бионаличност. За тази цел ние синтезирахме пуриновите аналози с холева, дезоксихолева и хенодезоксихолева киселини и изследвахме тяхната активност спрямо херпес симплекс вирус-1 и херпес симплекс вирус-2 и Epstein-Barr virus.

III.3. 1. Модифициране на ацикловир с холеви киселини (холева киселина, дезоксихолева киселина и хенодезоксихолева киселина)

Ацилирането на хидроксилната група на ацикловир с холева, хенодезоксихолева и дезоксихолева киселини бе проведено с 1-етил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид хидрохлорид (EDC) в диметилформамид при 0°C, а за катализатор на реакцията бе използван диметиламинопиридин (DMAP) (Схема 3). Ходът на реакцията бе следен чрез ТСХ в системата СТ₁. След приключване на реакцията (след 24h) прекристализирахме крайните продукти из етилацетат/хексан и получените съединения бяха изолирани с добив 50%-73%. Получените съединения на ацикловирхолат 6а, ацикловирдезоксихолат 6б и ацикловирхенодезоксихолат 6в бяха доказани с МС и ¹H-ЯМР спектри.

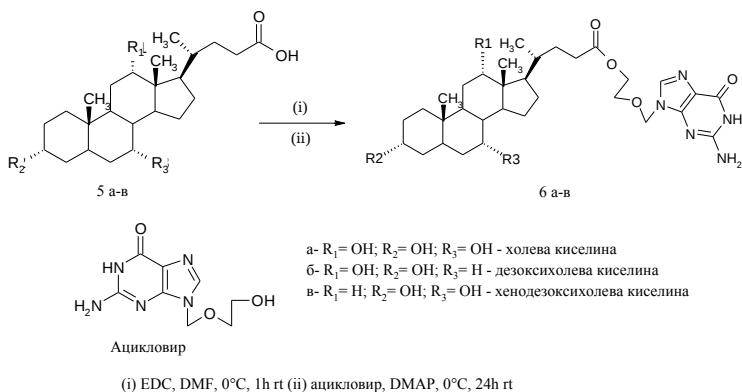


Схема 3. Получаване на амиди на ацикловир с холеви киселини (холева, дезоксихолева и хенодезоксихолева киселини)

Получените аналози с холева, дезоксихолева и хенодезоксихолева киселини са изследвани спрямо херпес симплекс вирус-1 и херпес симплекс вирус-2 и Epstein-Barr virus.

III.3. 2. Получаване на производни на ганцикловир с дезоксихолева и хенодезоксихолева киселини

По аналогичен на чин са синтезирани производни на ганцикловир с дезоксихолева и хенодезоксихолева киселини по DCC метода и DMAP като активатор. Получените съединения на GCV с дезоксихолева **7б** и хенодезоксихолева **7в** киселина са охарактеризирани спектрално (Схема 4).

Модифицирания ганцикловир с дезоксихолева и хенодезоксихолева киселини е изследван *in vitro* за противоверпесна активност спрямо HSV-1 и HSV-2.

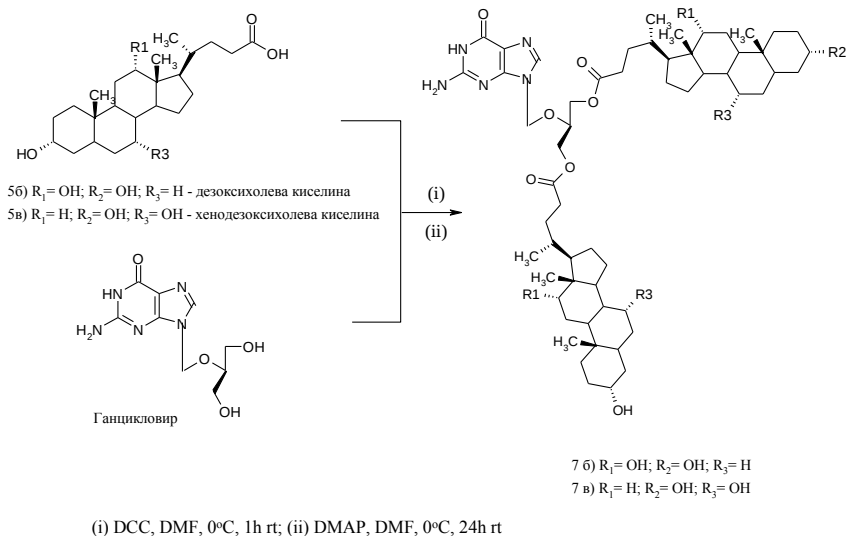


Схема 4. Получаване на производни на GCV с дезоксихолева и хенодезоксихолева киселини

III. 3. Получаване на производни на пенцикловир с холева, дезоксиколева и хенодезоксиолева киселини

Синтеза на естери на пенцикловир и ганцикловир с холеви киселини бе извършен по аналогичен начин както на ацикловира (DCC/DMAP). Като изходни холеви киселини бяха избрани холева, дезоксиколева и хенодезоксиолева киселини (Схема 5). Реакционните продукти бяха изолирани чрез колонна хроматография. Всички синтезирани естери бяха доказани с МС, $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}$.

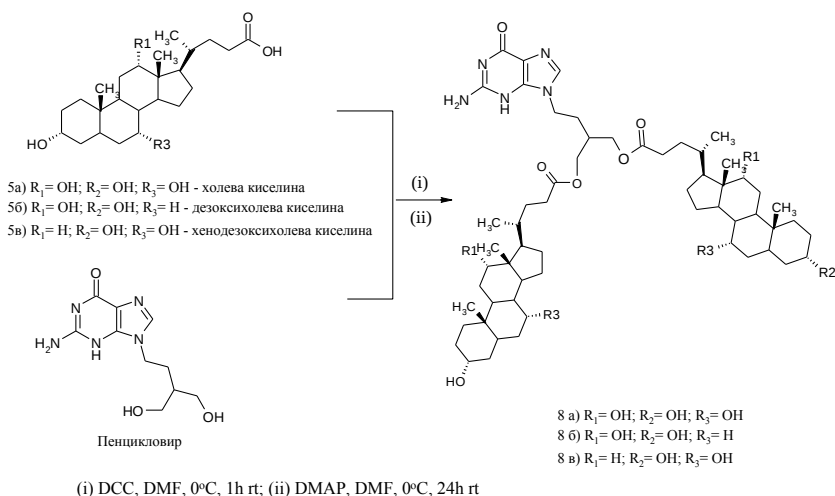
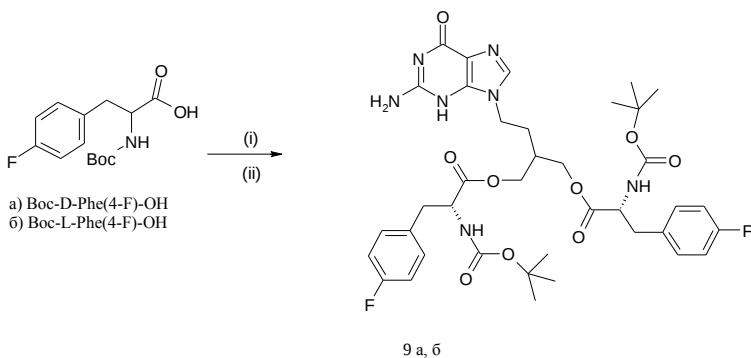


Схема 5. Получаване на производни на PCV с жлъчни киселини

III. 4. Модифициране на пенцикловир с Вос-Phe(4-F)-ОН (D и L)

Синтезът на естерите на пенцикловир с Вос-Phe(4-F)-ОН D/L бе извършен по аналогичен начин, както при ацикловир с Вос-Phe(4-F)-ОН D/L, с тази разлика, че аминокиселината остана защитена с Вос-групата (Схема 6). Получените съединения бяха доказани с МС, ^1H , ^{13}C -ЯМР.



(i) THF, DCC, 0°C, 1h rt; (ii) THF, пенцикловир, DMAP, 0°C, 72h rt

Схема 6. Синтез на пенцикловир с Boc-4-F-Phe (R,S) -OH

Новополучените аналози на пенцикловир с Boc-Phe(4-F)-OH D/L съединения **9a** и **9b** са изследвани за антихерпесна активност спрямо HSV-2.

III.5. Модифициране на оселтамивир с адамантанови производни

Синтезът на оселтамивир с амантадин и римантадин бе извършен, като предварително оселтамивир етилат **10** бе осапунен чрез алкална хидролиза за получаване на оселтамивир карбоксилат **11** (Схема 7). Амантадин или римантадин и DCC бяха разтворени в THF, реакционната смес бе охладана до 0°C на ледена баня за 1h, съвременно в друга колба разтваряме оселтамивир в THF и добавяме Et₃N при 0°C, на ледена баня за 1h. След като е изминал 1 час обединяваме двете смеси като добавяме DMAP, хода на реакцията е следен на ТСХ в хроматографска система БАО и ЕТ₁. След 24 часа установяваме че има нереагирани изходни вещества и продължаваме реакцията като добавяме допълнително DCC и DMAP при 0°C и оставяме за още 24 часа. След като са изминали 48 часа от зареждане на опита, филтруваме DCC и хроматографираме на колона SiO₂ за получаване на чистите нови

аналози на оселтамовир-амантадин **15** и оселтамовир-римантадин **16**, за елуент използваме MeOH:EtOAc (3:1) (Схема 11).

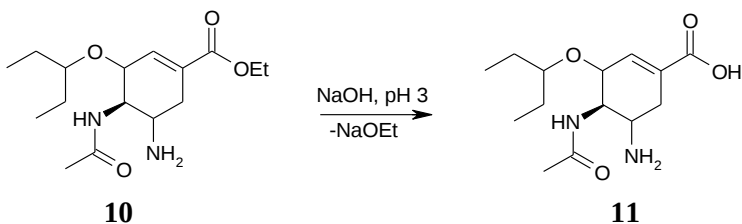
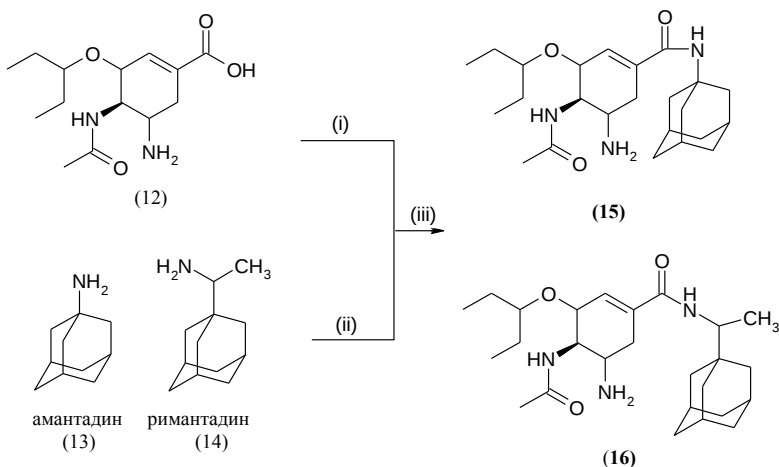


Схема. 7. Осапунване на оселтамовир



(i) DCC, THF, 0°C, 1h, rt (ii) Et₃N, 0°C, 1h, rt (iii) DMAP, 0°C, 24h, rt

Схема 8. Синтез на оселтамовир с римантадин и амантадин

Новите аналози оселтамовир-амантадин **15** и оселтамовир-римантадин **16**, бяха изследвани спрямо грипен вирус.

III. 6. Модифициране на оселтамовир с жлъчни киселини

Синтезът на оселтамовир с жлъчни киселини извършихме по познатия вече DCC метод и DMAP, като катализатор на

реакцията, за органичен разтворител използвахме THF. Реакцията протича при 0°C на два етапа, като зареждаме в THF оселтамивир и добавяме на капки триетил амин, съевременно в друга колба зареждаме холова, дезоксихолова или хенодезоксихолова киселина в THF, охлаждаме до 0°C и добавяме DCC. След 1 час обединяваме двете смеси и добавяме DMAP и оставяме да се бърка на магнитна бъркалка за 24 часа при 0°C (Схема 9). Хода на реакцията следим на тънкослойна хроматография в системи СТ₁, ЕТ₁ и СМА.

След края на реакцията, филтруваме реакционната смес от ДСКи разделяме крайното съединение от замърсяванията чрез колонна хроматография SiO₂, за елуенти използвахме хлороформ:метанол (8:4). Получените нови аналози на оселтамивир-холат **17a**, оселтамивир-дезоксихолат **17b** и оселтамивир-хенодезоксихолат **17в** охарактеризирахме с МС, ¹H, ¹³C-ЯМР спектри.

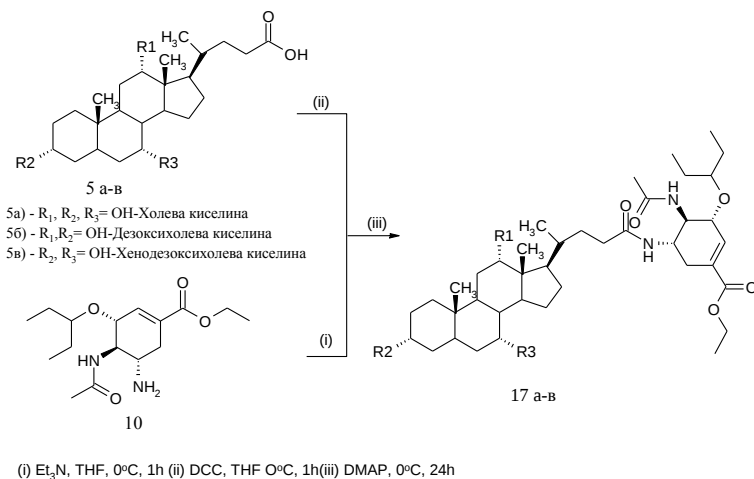


Схема 9. Получаване на амиди на оселтамивир с жлъчни киселини (холева, дезоксихолева и хенодезоксихолева киселини)

III. 7. Модифициране на оселтамивир с 4-F-фенилаланин (S, R)

От известните подходи за създаване на противовирусни препарати ние се спряхме на създаването на нови аналози на противогрипните препарати оселтамивир, римантадин и амантадин, които да действат в синергизъм, освен това да инхибират по различен начин вирусната репликация. По този начин създаваме: от една страна противовирусния агент, а от друга (4-F)-фенилаланин, антиметаболита на природната аминокиселина фенилаланин, притежаващ широк противовирусен спектър (включително и срещу грипен вирус).

Модифицирането на оселтамивир с 4-F-фенилаланин (D/L) беше извършено по методика използвана при модифицирането на оселтамивир с холеви киселини, съответно DCC-метода. Новополучените съединения на оселтамивир-4-F-фенилаланин (D) **18a** и оселтамивир-4-F-фенилаланин (L) **18b** бяха охарактеризирани с МС, ^1H , ^{13}C -ЯМР спектри (Схема 10).

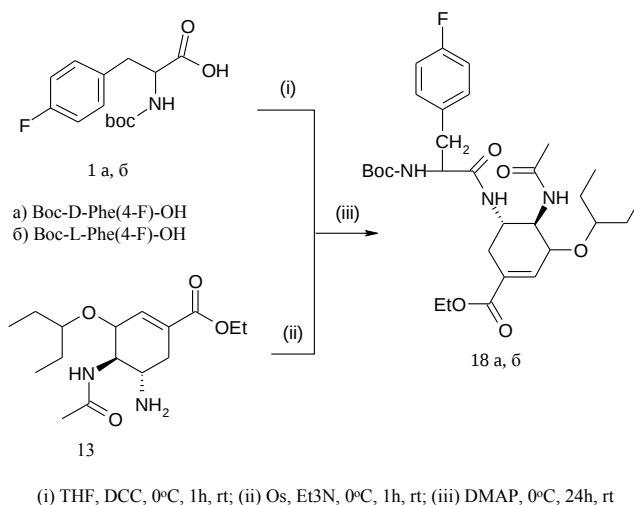


Схема 10. Модифициране на оселтамивир с Boc-Phe(4-F)-OH (D/L)

III. 8. Модифициране на адамантанови производни с 4-F-фенилаланин (D/L)

III. 8. 1. Синтез на амантадин с *Woc-Phe(4-F)-OH* (D/L)

Синтезът на производните на амантадин със защитените аминокиселини бе извършен с DCC в тетраhydroфуран (THF) при 0°C, а за катализатор на реакцията бе използван диметиламинопиридин (DMAP) (Схема 11). Ходът на реакцията бе следен чрез ТСХ. След приключване на реакцията, реакционната смес обработихме по стандартна методика и хроматографирахме на колона със SiO₂. Изолирахме продукт който беше доказан с ЯМР анализ. Получени съединения бяха доказани с МС, ¹H, ¹³C-ЯМР.

Следващият етап от синтеза бе деблокиране на защитните групи на получените аналози на амантадина. Woc- защитната група бе свалена с трифлуорооцетна киселина за 10 мин., с последващо неутрализиране с амоняк и добавяне на HCl за получаване на хидрохлорид. (Схема 11). Ходът на реакцията бе следен чрез ТСХ в система СТ₁. След приключване на реакцията, реакционната смес обработихме по стандартна методика и хроматографирахме на колона със SiO₂, за елуент беше използвана система He:EtOAc/2:7. Изолирахме продукт, който беше доказан с ЯМР анализ. Получените аналози на (R)-Phe(4-F)-амантадин **20a** и (S)-Phe(4-F)-амантадин **20b** бяха доказани с МС, ¹H, ¹³C-ЯМР.

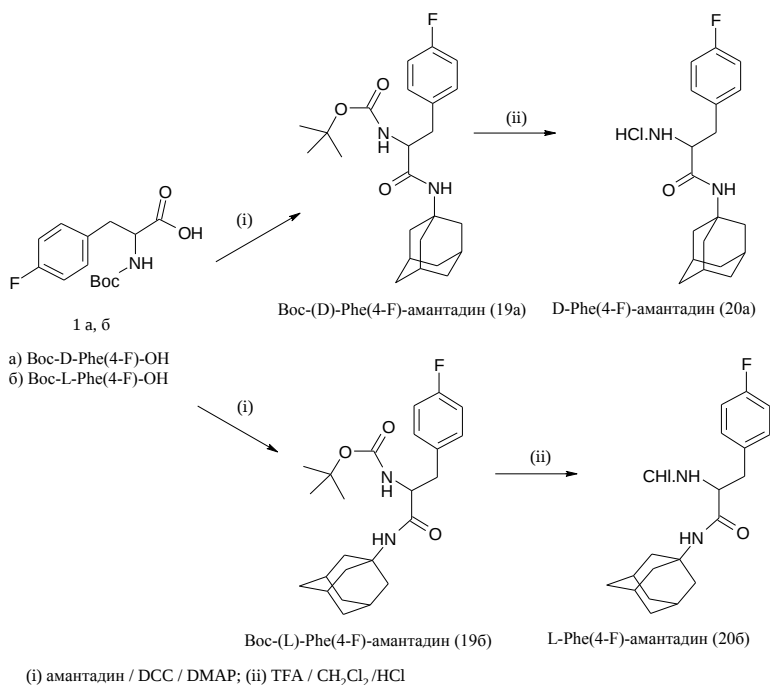


Схема 11. Получаване на адамантанови производни с Boc-Phe(4-F)-OH (D/L)

III. 8. 2. Синтез на римантадин с Boc-Phe(4-F)-OH (D и L)

Синтеза на римантадин с Boc-Phe(4-F)-OH (D и L) бе извършен по аналогичен начин като при амантадин, като новите аналози на D-Phe(4-F)-римантадин **22a** и L-Phe(4-F)-римантадин **22b** бяха охарактеризирани спектрално чрез МС, ¹H, ¹³C-ЯМР спектри (Схема 12).

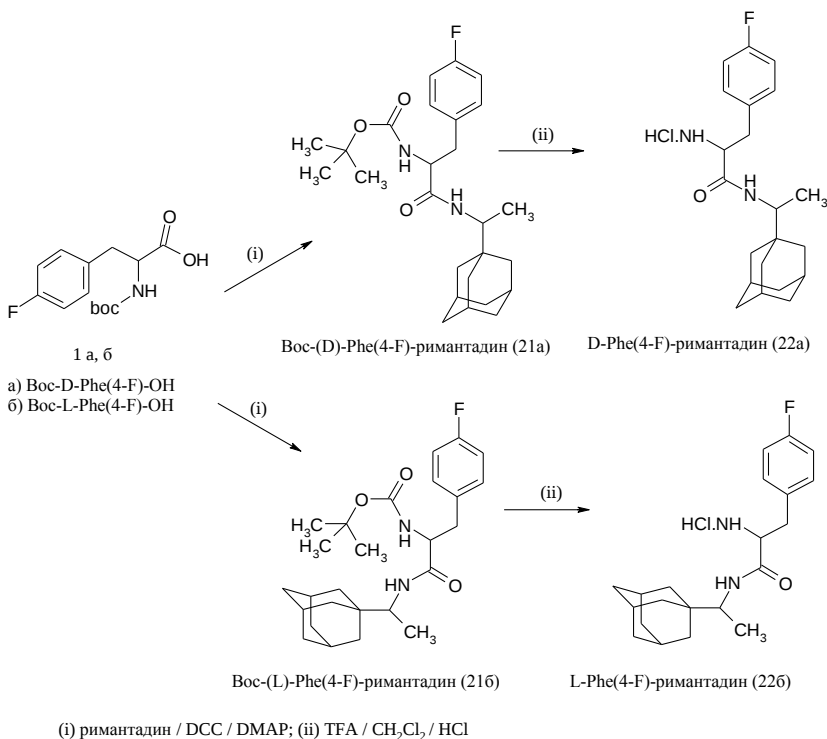


Схема 12. Получаване на амиди на римантадин с Вос-Phe(4-F)-OH (D/L)

Получените нови аналози: D-Phe(4-F)-амантадин **20a**, L-Phe(4-F)-амантадин **20б**, (R)-Phe(4-F)-римантадин **22a** и (S)-Phe(4-F)-римантадин **22б** изследвахме *in vitro* за противовирусна активност.

III. 9. Модифициране на адамантанови производни с пептидни миметици, съдържащи тиазолов и дитиазолов пръстен

Няма много данни в литературата за пептидни и дипептидни адамантанови производни, *Zarubaeв* и сътр.

публикуват серия от ди-, три- и тетразол производни на амантадин. Интересно е, че много от тези съединения са активни срещу резистентния към амантадин щам на грип тип A/Puerto Rico/8/34, който е носител на S31N мутация в неговия M2 канал. Някой от тези тетразоли показват ниски стойности на EC₅₀ и по- висок индекс на селективност (SI) отколкото римантадина.

Произхождайки от тези факти и това, че пептидни миметици съдържащи тиазолови и дитиазолови пръстени, проявяват биологична и фармацевтична активности, смятаме, че модифицирането на адамантановите производни амантадин и римантадин с тиазолови и дитиазолови пептидни миметици би спомогнало в битката с проявяващата се резистентност към амантадин и римантадин и би повишило активността им.

III. 9. 1. Синтез на аналози на амантадин с Boc-Gly-Thz-OH и Fmoc-Gly-Thz-Thz-OH

За синтеза на производни, съдържащи модифицирани аминокиселини обикновено се използват класическите методи за синтез в разтвор. Ние използвахме като реагент за образуване на амидна връзка, N,N-дициклохексилкарбодиимид (DCC).

Синтезът на амантадина със защитените тиазол и дитиазол съдържащи аминокиселини бе извършено със DCC в тетраhydroфуран (THF), а за катализатор на реакцията бе използван диметиламинопиридин (DMAP) (Схема 13). Ходът на реакцията бе следен чрез ТСХ в хроматографска ситема СТ1 и СМА. След приключване на реакцията, реакционната смес обработихме по стандартна методика и хроматографирахме на колона със SiO₂ за подвижна фаза използвахме система хексан:етилацетат(4:5). Изолирахме продукт който беше доказан с ЯМР анализ. Получените съединения на амантадин с пептидни **23** и дипептидни **24** миметици бяха доказани с МС, ¹H, ¹³C-ЯМР

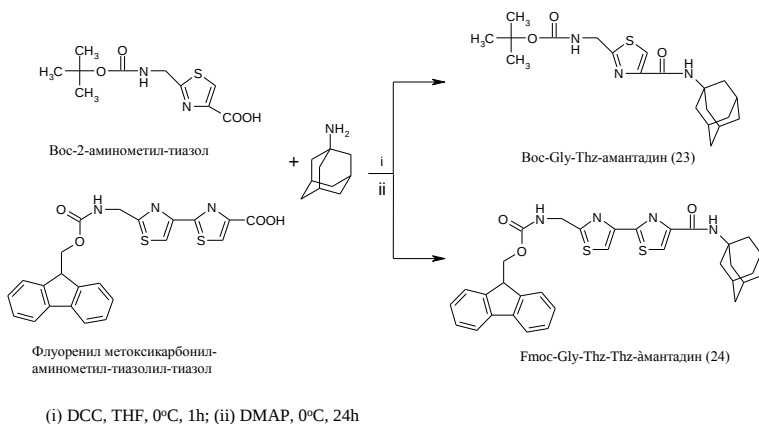


Схема 13. Синтез на производни на амантадин с пептидни миметици

Следващият етап от синтеза бе деблокиране на защитните групи на получените аналози на амантадина. Вос- защитната група на съединение **23** бе свалена с трифлуорооцетна киселина за 10 мин., с последващо неутрализиране с амоняк и добавяне на HCl за получаване на хидрохлорид до получаване на Gly-Thz-амантадин хидрохлорид **25**. Fmoc- аналога съединение **24** бе деблокирано с пиперидин/DMF до получаването на крайния продукт Gly-Thz-Thz-амантадин **26** (Схема 14).

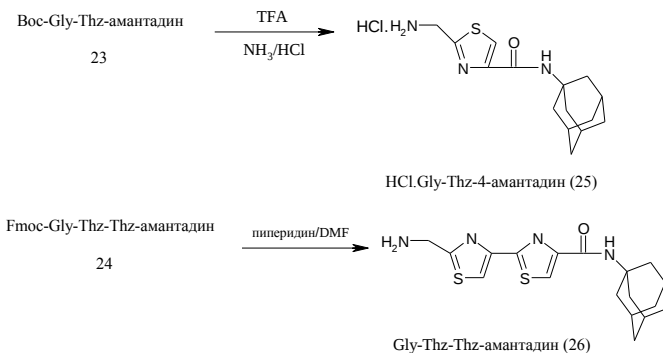


Схема 14. Деблокиране на защитните групи на съединения 23-24

III. 9. 2. Синтез на аналози на римантадин с *Boc-Gly-Thz-OH* и *Fmoc-Gly-Thz-Thz-OH*

За синтеза на римантадиновите аналози с тиазолови и дитизалови пептидни миметици използвахме същите методи и условия, както при амантадина, а именно DCC метода за образуване на амидна връзка (Схема 15).

Получените съединения на римантадин с пептидни **27** и дипептидни **28** миметици бяха доказани с МС, ^1H , ^{13}C -ЯМР и мас-спектри.

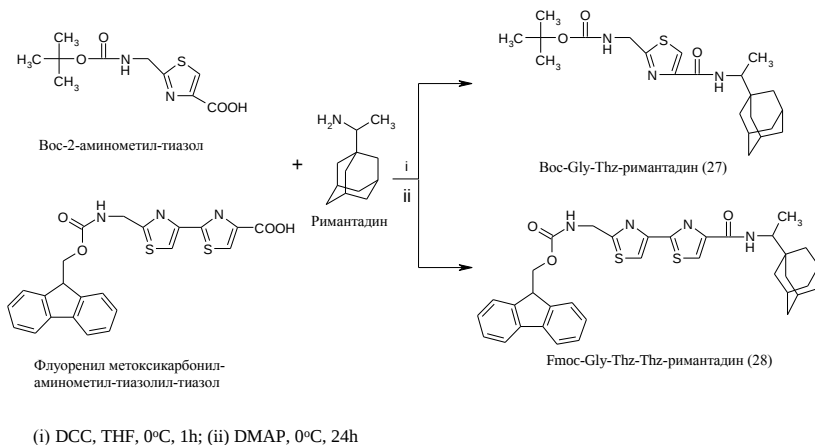


Схема 15. Синтез на производни на римантадин с пептидни миметици

Следващият етап от синтеза и тук бе деблокиране на защитните групи на получените аналози на римантадина. Вос-защитната група бе свалена с трифлуорооцетна киселина за 10 мин., с последващо неутрализиране с амоняк и добавяне на HCl за получаване на хидрохлорид до получаване на **29**. Fmoc-аналогът съединение **28** бе деблокиран с пиперидин/DMF до получаване на **30** (Схема 16.)

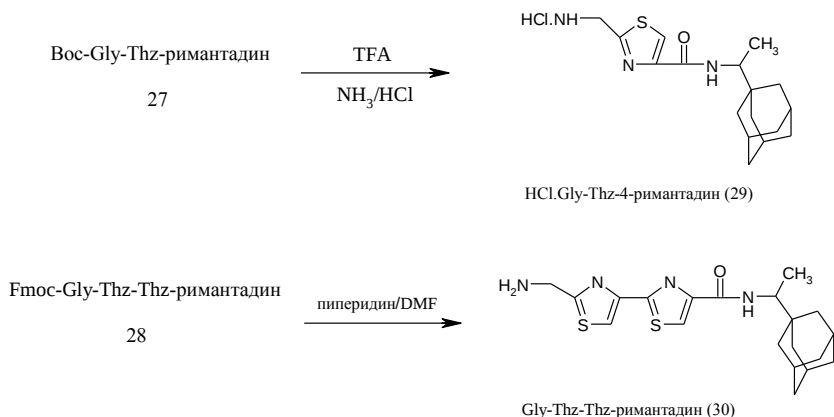


Схема 16. Деблокиране на защитните групи на съединения 29-30

Резултатите, които получихме от направените изследвания за противовирусна активност *in vitro*, показаха, че пептидомиметици съдържащи тиазолов и дитиазолов пръстен, не повлияват върху активността на адамантановите производни римантадин и амантадин, с изключение на производното **29**, който показва задоволителна инхибираща активност.

III.9. 3. Модифициране на адамантанови производни с Fmoc-Cys(Acm)-OH

Синтезът на римантадин и амантадин с Fmoc-Cys(Acm)-OH бе извършен с DCC в тетраhydroфуран (THF), а за катализатор на реакцията бе използван диметиламинопиридин (DMAP) до получаване на Fmoc-Cys(Acm)-амантадин **31** и Fmoc-Cys(Acm)-римантадин **32** (Схема 17). Съединенията са охарактеризирани с чрез MS, ^1H , ^{13}C -ЯМР спектри.

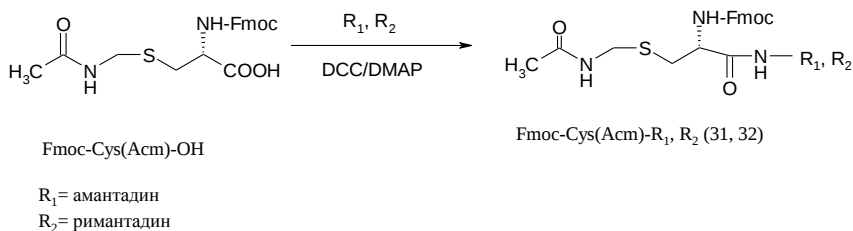


Схема 17. Синтез на адамантанови производни с аминокиселината Fmoc-Cys(Acm)-OH

Модифицираните адамантанови аналози бяха изследвани за противогрипна активност спрямо грипен вирус H1N1, като получените резултати показаха че модифицирането на амантадин и римантадин с Fmoc-Cys(Acm)-OH не подобрява биологичната им активност.

III. 10. Гуанидиране на адамантанови производни (амантадин и римантадин)

Гуанидирането на адамантановите производни е направено по метод, описан в литературата [110], като за гуанидиращ агент използвахме 1H-пиразол-1-карбоксамидин и диетиламин (DIEA) като база (Схема 18). Реакцията протича при меки условия на стайна температура в разтвор на тетраhydroфуран и отсъствието на кислород за 24 часа. Ходът на реакцията е следена на тънкослойна хроматография в система ET₁, хроматограмите са проявявани с реактив на Сакагучи; след края на реакцията, реакционната смес е филтрувана и промита с етер, суровият продукт е прекристализиран с CH₃CH₂OH/етер, добива е около 65%. Съединенията амантадин-гуанидил **33** и римантадин-гуанидил **34** са охарактеризирани с МС, ¹H, ¹³C-ЯМР спектри. Хроматографски установихме, че има замърсявания в гуанидираните производни и ги хроматографирахме на колонна хроматография SiO₂, като за елуент използвахме система MeOH:EtOAc/1:2.

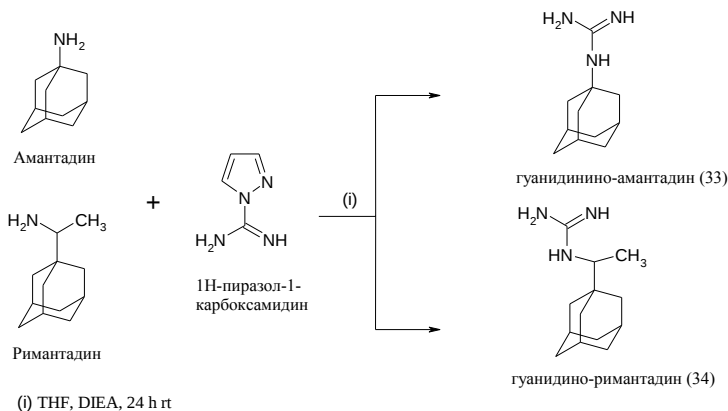


Схема 18. Гуанидиране на адамантанови производни

III.11. Биологична активност на новосинтезираните анализи

С оглед изясняване на зависимостите между химичния строеж и биологичната активност ние изследвахме противовирусната активност на новосинтезираните аминокиселинни и пептидни производни на 5-бромо-2-дезоксуридин и на тимидина.

III.11. 1. Изследване на новосинтезираните анализи срещу HSV-1 и HSV-2 и Epstein Barr вирус

Производните **2a**, **б**; **4a**, **б**, ; **6a-в**; **7б**, **в**; **8a-в** бяха изследвани срещу HSV-1 и HSV-2, а производните на ацикловира (**6a-в**) бяха изследвани и срещу Epstein Barr вирус. За експериментите са използвани MDCK клетъчни култури (Madin–Darby canine kidney).

Вирус:

- Грипен вирус щам A/Aichi/ H3N2
- Грипен вирус щам A/Puerto Rico/8/34(H1N1)

Вирусната суспензия е от колекцията на секция „Вирусология“ на Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ при Българската академия на науките.

Цитотоксичност

Цитотоксичността е изпитана върху монослойни клетъчни култури в 96-ямкови плаки.

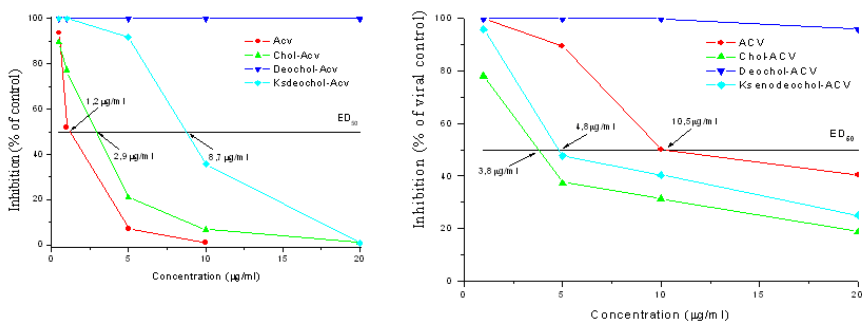
Табл. 2. Противохерпесна активност *in vitro* на модифицирани аналози на ACV, PCV и GCV изследвана с МТТ метод в MDCK клетъчни култури

Съединение	HSV-1 (F)		HSV-2 (BA)	
	% на запазване на клетките при МНК	IC ₅₀ (µg/ml)	% на запазване на клетките при МНК	IC ₅₀ (µg/ml)
2a	17.9	-	3,1	-
2б	71,99	4,83	79,63	4,57
4a	12.5	-	2.3	-
4б	17.2	-	4.5	-
7б	91,56	7,14	91,29	7,57
7в	19.2	-	3.8	-
8a	82,67	7,88	91,44	7,16
8б	16.3	-	2.9	-
8в	11.5	-	1.98	-
PCV	96,1	0,86	100	0,71
ACV	97,01	0,215	95,7	0,329

Веществата са разтворени изцяло в DMSO защото химическа модификация на ACV, PCV и GCV води до намаляване на разтворимостта във вода. Концентрацията, която използваме в експериментите (20 $\mu\text{g/ml}$ за всички модифицирани нуклеозидни аналози) количеството на DMSO е по-ниска от 1%. Тази концентрация е минималната нетоксична (MNC).

III. 11. 2. Изследване на аналозите на ацикловир с жлъчни киселини срещу HSV-1 и HSV-2 и Epstein Barr вирус

Аналозите на ACV с холева **6a** и хенодезоксихолева **6b** запазват активността на ацикловира. И двете вещества имат подчертано сходен противоверпесен ефект с този на референтния препарат. Показател за това са сходните стойности на ED_{50} . ED_{50} на Acv е 1, 2 $\mu\text{g/ml}$, на вещества **6a** и **6b** - 2,9 $\mu\text{g/ml}$ и 8,7 $\mu\text{g/ml}$. Вещество **6b** не проявява противовирусна активност. Приложени в концентрация 20 $\mu\text{g/ml}$ активните вещества инхибират вируса почти 100%. Този резултат е сравним с прилагането на 10 $\mu\text{g/ml}$ ACV.



Фиг. 46. а) Ефект на съединенията **6a-b** върху репликацията на HSV-1; б) а) Ефект на съединенията **6a-b** върху репликацията на HSV-2

■ Антивирусна активност спрямо HSV-2 *in vitro*.

Изследваните вещества са приложени в концентрации: 100, 80, 60, 40, 20, 10, 5 и 1 $\mu\text{g/ml}$. Получените резултати показват липса на цитотоксичен ефект на изследваните концентрации от съединенията на ацикловир с жлъчните киселини. Липсата на цитотоксичност при изследваните концентрации корелират с публикуваните данни за влиянието на ацикловир спрямо различни клетъчни култури. Вероятно модификациите на херпесния инхибитор притежава подобна ниска цитотоксичност.

Антивирусна активност. Веществата са приложени в концентрации, отговарящи на ефективните концентрации на ацикловира. Стойностите на ЕД50 на съединенията с инхибиторна активност са сходни: 10,5 $\mu\text{g/ml}$ на ацикловирхенодезоксифолат-Асv, 3,8 $\mu\text{g/ml}$ на ацикловир-холат и 4,8 $\mu\text{g/ml}$ на ацикловирхенодезисихолат. Тези стойности са сходни с ЕД50 на ацикловира.

Изследване на аналозите на ацикловир с жлъчни киселини срещу Epshtain Barr вирус

Максимална нетоксична концентрация

Резултатите от максималната нетоксична концентрация (МНК) на съединенията показват, че ацикловирдезоксихолат 6б и ацикловирхенодезоксихолат acyclovirchenodeoxycholat 6с са нетоксични за В95.8 клетки в обхвата на концентрацията тествано: $1 \div 100 \mu\text{g/ml}$. Съединение 6а (ацикловирхолат) показва силна токсичност, когато се прилага при 100 и 40 $\mu\text{g/ml}$.

Табл. 2. МНК на съединенияба-с

Съединение	МНК, µg/ml
6 а	20
6 б	100
6 в	100
ACV	10

Табл.3. Ефект на съединенията спрямо репликацията на EBV

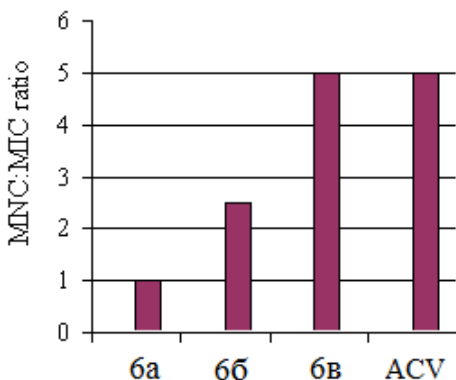
Концентрация (µg/ml)	Ефект/процент gp350/220-positive*		
	6а	6б	6в
100	токсично	силен/1%	силен/1%
40	токсично	силен/1%	силен/1%
20	силен/3%	няма ефект /9%	силен/4%
10	силен/4%	няма ефект 10%	силен/4%
5	няма ефект/13%	няма ефект /13%	няма ефект /13%
1	няма ефект /11%	няма ефект /17%	няма ефект /13%

* по-нисък процент по-силен инхибиторен ефект

Табл 4. (МИК) на съединеният:

Съединения:	МИК, $\mu\text{g/ml}$
6a	10
6б	40
6в	10

Както се вижда от Табл. 3 и Табл. 4 най-обещаващо като за EBV активност е съединения е ацикловир-хенодезоксихолат (**6в**), за който съотношението токсичност:активност е по-висока от тази на ацикловир (Фиг.67).



Фиг. 67

Проведените изследвания *in vitro* показват, че производните на ацикловир с холеви киселини имат *HSV-1u HSV-2* активност, която е практически сравнима с тази на ацикловира. Следователно превръщането на *ACV* в предлекарство:

■ не води до промяна на активността.

По отношение на активност спрямо *Epstein Barr вирус* ацикловир-хенодезоксихолат **6в**, притежава най-благоприятно за целите на химиотерапията съотношение токсичност:активност. Това дава основание да бъдат продължени изследванията в следните насоки:

■ изследване *in vivo* токсичността и активността на ацикловирхенодезоксихолат;

III. 11. 3. Биологична активност in vitro на новите аналози на оселтамивир

За *in vitro* изпитване на инхибиращата активност и цитотоксичност на вещества **15-186**, беше избран грипен вирус A/Aich/H3N2 (Таблица 5).

Таблица 5. Противовирусна активност *in vitro* на аналози на оселтамивир **15-186** срещу грипен вирус A/Aich/H3N2

Оселтамаивир-амантадин (15)	1683,4	Без ефект	-
Оселтамивир-римантадин (16)	254.76	7.27	35
Оселтамивир-холат (17а)	1605,1	Без ефект	-
Оселтамивир-дезоксихолат (176)	62,01	Без ефект	-
Оселтамивир-хенодезоксихолат	382,34	Без ефект	-

(17в)			
D-Phe(4-F)- Оселтамивир (18а)	23.7	3.6	-
L-Phe(4-F)- Оселтамивир (18б)	50.0	0.11	455
Оселтамивир карбоксилат	>100	80	>1.25

^a CC₅₀ – 50% цитотоксична концентрация – концентрацията, при която 50% от клетъчния монослой е със запазена жизненост

^b IC₅₀ – 50% инхибираща концентрация – концентрацията, при която 50% от вирусния цитопатичен ефект е инхибиран (т.е. при която съединението защитава 50% от клетъчния монослой)

^b SI – селективен индекс – CC₅₀/IC₅₀

Получените резултати от противовирусната активност показват, че аналога на оселтамивир с римантадин **16** проявява значителна противогрипна активност – SI=35 (за активно се счита съединение, което проявява SI=10). Активност проявява и производното на оселтамивир с фенилаланин **18б**. Останалите нови аналози на оселтамивир; с амантадин **15**, с холеви киселини **17а-в** и с 4-F-фенилаланин **18а** не проявяват активност срещу тествания грипен щам - A/Aichi/H3N2.

III. 11. 4. Биологична активност in vitro на новосинтезираните адамантанови аналози амантадин и римантадин

Модифицирането на адамантановите аналози е един от подходите в борбата с резистентността, както и бионаличността и за тази цел ние синтезирахме серия аналози на амантадин и

римантадин с неприродни АК, пептиди и дипептиди, както и гуанидиране на съответните аминокиселини. Новополучените аналози на амантадин и римантадин – **20a**, **206**, **22a**, **226**, **25**, **26**, **29**, **30**, **31**, **32**, **33** и **34** бяха дадени за изследване на биологичната им активност *in vitro*, срещу грипни вируси A/Aichi/H3N2 и A/PuertoRico/H1N1 като резултатите са показани в таблица 6.

Таблица 6. Противовирусна активност и цитотоксичност *in vitro* на новосинтезираните аналози на амантадин и римантадин срещу грипен вирус A/Aichi/H1N1

Съединение	CC ₅₀ ^a (μM)	IC ₅₀ ^b (μM)	SI ^b	MTD
HCl.Gly-Thz-амантадин (25)	23.7	Без ефект	-	8.8
Gly-Thz-Thz-амантадин (26)	36.6	Без ефект	-	13.6
D-Phe(4-F)-амантадин (22a)	>1000	20.67	>49	
L-Phe(4-F)-амантадин (226)	551.78	49.30	11.2	
D-Phe(4-F)-римантадин(24a)	-	Без ефект	-	
L-Phe(4-F)-римантадин(246)	-	Без ефект	-	
HCl.Gly-Thz-	50	Без ефект	-	3.6

римантадин(29)				
Gly-Thz-Thz- римантадин(30)	50	0.11	455	9.7
Fmoc-Cys(Acm)- амантадин (31)	528.98	Без ефект	-	-
Fmoc-Cys(Acm)- римантадин (32)	613.9	Без ефект	-	-
Амантадин	>500	3.35	>150	
Римантадин	218	0.4	545	

Резултатите в нашите изследвания показват, че адамантановото производно на римантадин с дитиазол съдържаща аминокиселина **30** инхибира умерено грипния вирус, предизвиква цитопатичен ефект при не токсични концентрации (индекс на селективност = 455). Останалите аналози на амантадин с тиазол и дитиазол съдържащи аминокиселини **25** и **26**, както и на римантадин с тиазол съдържаща аминокиселина **29**, не проявяват активност. Адамантановите аналози на амантадин **31** и римантади **32** с неприродната аминокиселина Fmoc-Cys(Acm)-OH не проявяват активност срещу грипен вирус щам H1N1.

Адамантановите аналози на амантадин Boc-Phe-(4-F)-OH (D и L) **20a** и **20b** и на римантадин с Boc-Phe-(4-F)-OH (D и L) **22a** и **22b** се характеризират с ниска цитотоксичност, като противовирусната активност на аналог **22b** е значителна спрямо останалите модифицирани с неприродната АК Boc-Phe-(4-F)-OH (D и L). От получените резултати стигаме до извода, че

модифицирането на амантадин с Boc-Phe-(4-F)-OH (D и L) увеличава активността им.

Цитотоксичност

Изпитваните съединения се характеризират с изключително ниска токсичност - при концентрация до 320 µg/ml. Веществата не са токсични за клетъчния монослой при посочените концентрации.

Гуанидираните адамантанови аналози

Гуанидираните адамантанови аналози **33** и **34** са изследвани *in vitro* срещу сезонния грипен вирус щам A/Aichi/H3N2, резултатите са показани на таблица 7.

Таблица 7. Противовирусна активност и цитотоксичност *in vitro* на гуанидираните аналози на амантадин и римантадин срещу грипен вирус A/Aichi/H3N2

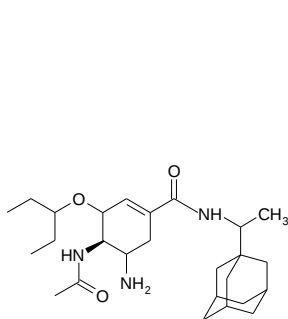
Съединение	CC ₅₀ ^a (µM)	IC ₅₀ ^b (µM)	SI ^b
гуанидино-римантадин (33)	1800	0.53	3396
гуанидино-амантадин (34)	>3200	59.7	>53.6

Гуанидираните адамантанови аналози на амантадин - съединение **33** и римантадин - съединение **34**, бяха изследвани *in vitro* срещу грипен вирус щам A/Aichi/H3N2 и установихме, че съединенията проявяват особено висока активност, която е силно изразена при гуанидиновото производно на римантадин **34** - SI=3 396. Това дава основание да бъдат продължени изследванията в следните насоки:

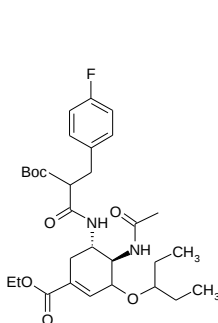
■ изследване *in vivo* токсичността и активността както и възможността за евентуални клинични изследвания;

III.12. Химична стабилност на аналози на оселтамивир, амантадин, римантадин и ацикловир

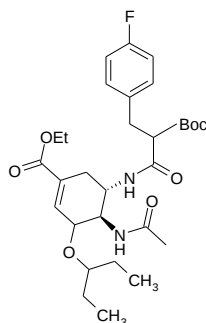
Изследвахме кинетиката на хидролиза на някои производни на оселтамивир с римантадин и Boc-Phe-(4-F)-OH (D и L), тиазолови производни на амантадин и римантадин, на римантадин с Boc-L-Phe-(4-F)-OH, на гуанидиран амантадин и на ацикловир с хенодезоксиколева и дезоксиколева киселини и с Boc-L-Phe-(4-F)-OH (Фиг. 47).



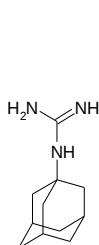
оселтамивир-римантадин



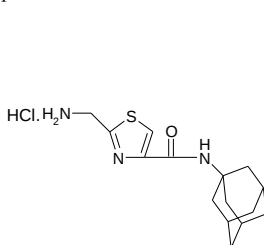
оселтамивир-4-F-Phe(S)



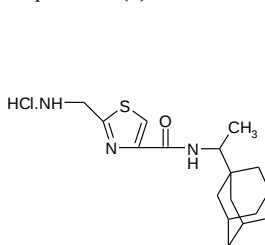
оселтамивир-4 F-Phe(R)



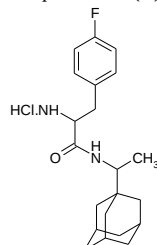
гуанидиноамантадин



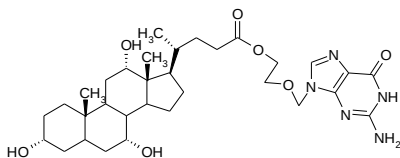
тиазолил-амантадин



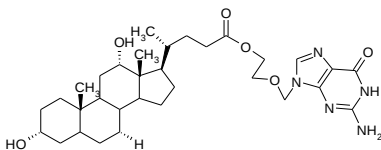
тиазолил-римантадин



римантадин-4-F-Phe(S)



цикловир холат



ацикловир дезоксихолат

Фиг. 47. Структурни формули на съединенията, тествани за химична стабилност

Новосинтезираните естери на оселтамивир, римантадин и ацикловир поглъщат в UV-спектъра. Дължината на вълната, при която наблюдаваме абсорбцията е 220nm, тъй като при тази дължина пикът е добре изразен.

От времената на задържане е изчислен факторът на разделяне между оселтамивир, римантадин, ацикловир и всяко едно от изследваните съединения. Всички стойности са по-големи от 2.5, което удовлетворява критерия за добро разделяне.

Определяне химичната стабилност на аналози на оселтамивир при $pH=1.0$ и $pH=7.4$ и $T=37^{\circ}C$

Поради твърде малката разтворимост на изучаваните вещества във вода изходните разтвори бяха приготвяни в концентрация 1 $\mu M/ml$ в DMSO и впоследствие бяха разредени до $\mu M/ml$ със съответния буфер. Пробите бяха инкубирани при $37^{\circ}C$ в продължение на 5 часа. В различни моменти са взимани проби и концентрацията на изходното вещество е определяна чрез високо ефективна течна хроматография по предварително установени стандартни прави. Анализ на пробите е извършван след инкубиране в продължение на 24 часа при $20^{\circ}C$.

Установено е разпадане чрез хидролиза при изследваните експериментални условия. Хидролизният процес протича като процес от първи порядък. Скоростната константа на хидролиза - K

се пресмята от наклона на правата, илюстрираща промяната на логаритъма от концентрацията на изходното вещество с времето ($\ln C = \ln C_0 - kt$). Презположителното време се изчислява като $t_{1/2} = \ln 2/k$ (Фиг. 51).

За да се определи времето на полуразпадане на съединението са построени полулогаритмичните зависимости на относителното изменение концентрацията на изследваното вещество с времето.

В Таблица 9 са поместени стойностите на времената на полуразпадане. Както може да се види, изследваните съединения са изключително нестабилни в кисела среда. При всички вещества концентрацията намалява наполовина за по-малко или около час. Единствено L-Phe(4-F)-оселтамивир се отличава с по-висока стабилност от останалите изследвани вещества с време на полуразпадане от около час и половина.

Таблица 9. Кинетични данни за хидролиза на производните на оселтамивир

Съединение	pH= 1.0 ^a , 37°C	pH=7.4 ^b , 37°C
Оселтамивир-римантадин	$t_{1/2}$, = 0.05 h	$t_{1/2}$, = 1.05 h
L-Phe(4-F)-оселтамивир	$t_{1/2}$, = 1.29 h	$t_{1/2}$, = 6.30 h
D-Phe(4-F)-оселтамивир	$t_{1/2}$, = 0.55 h	$t_{1/2}$, = 1.38 h

^aHCl (0.1M); ^bH₃PO₄ (0.1M)

Изчислените кинетични параметри са представени в таблица 9. Пресметнатите стойности за около 1.05 h и 1.38 h са указание че Оселтамивир-римантадин и съответно Оселтамивир-4-F-Phe(R) за нестабилни и при неутрално pH 7.4. Оселтамивир-4-F-

Phe(S) е стабилен при неутрално рН, като неговата стабилност се приближава до тази на лекарствения препарат оселтамивир карбоксилат (7 h).

Определяне химичната стабилност на някои от новите аналози на амантадин и римантадин при рН =1.0 и рН=7.4 и T=37°C

В Таблица 10 са поместени стойностите на времената на полуразпадане. Резултатите показват, че дипептидните аналози на амантадин и римантадин са сравнително стабилни в кисела среда – 6.27 h за HCl.Gly-Thz-амантадин и 9.38 h за HCl.Gly-Thz-4-римантадин за разлика от L-Phe(4-F)-римантадин, при който концентрацията намалява наполовина за по-малко от 60 минути, най-нестабилен се оказва гуанидиновия аналог на амантадина с $t_{1/2}$, = 0.42 h. Тиазоловите производни на римантадина и гуанидина се оказват стабилни и при рН 7.4, 37°C. Като се има предвид краткият престой на лекарствените препарати в стомаха около (0.5-4 часа), може да се счита, че двата тиазолови аналога на римантадин и римантадин могат да бъдат потенциални кандидати предлекарства.

Таблица 10. Кинетични данни за хидролиза на производните на адамантановите аналози

Съединение	рН 1.0 ^a , 37°C	рН 7.4 ^b , 37°C
HCl.Gly-Thz-амантадин	$t_{1/2}$, = 6.27 h	$t_{1/2}$, = 7.44 h
HCl.Gly-Thz-4-римантадин	$t_{1/2}$, = 9.38 h	$t_{1/2}$, = 10.30 h
L-Phe(4-F)-римантадин	$t_{1/2}$, = 0.55 h	$t_{1/2}$, = 1.38 h
Гуанидино- амантадин	$t_{1/2}$, = 0.42 h	$t_{1/2}$, = 1.38 h

^aHCl (0.1M); ^bH₃PO₄ (0.1M)

Определяне химичната стабилност на някои производни на ацикловир при pH=1.0 , pH= 7.4 и T=37°C

Изследвана е химичната стабилност на ацикловир-дезоксихолат, ацикловир-хенодезоксихолат и Вос-L-Phe(4-F)-ацикловир

Резултатите (табл. 11) показват, че изследваните съединения са по-стабилни в неутрална среда, отколкото в кисела среда.

Трябва да се отбележи, че в кисела среда стабилни са ацикловир-хенодезоксихолат - 36.28 h , а ацикловир-дезоксихолат - 40.65 h. В неутрална среда всички аналози на ацикловира са много стабилни.

Таблица 11. Кинетични данни за хидролиза на производните на ацикловир

Съединение	pH 1.0 ^a , 37°C	pH 7.4 ^b , 37°C
Вос-L-Phe(4-F)-ацикловир	t _{1/2} = 1.38 h	t _{1/2} = 52.9 h
Ацикловир-дезоксихолат	t _{1/2} = 36.28 h	t _{1/2} = 123.6 h
Ацикловир-хенодезоксихолат	t _{1/2} = 40.65 h	t _{1/2} = 77.7 h

^aHCl (0.1M); ^bH₃PO₄ (0.1M)

Обобщавайки резултатите от кинетичните данни и биологична активност на синтезираните от нас производни, се оказва, че производните които показаха най-висока противовирусна активност са и най-стабилни при pH 7,4 и pH 1.0 и 37°C.

Проведените изследвания *in vitro* за EBV активност на аналозите на ацикловира показаха, че притежават активност, която

е по-висока от тази на ацикловира. От направените кинетични изследвания се вижда, че ацикловир-дезоксихолат и ацикловир-хенодезоксихолат притежават и много висока стабилност при рН 7,4 и рН 1.0 и 37°C. За сравнение най-успешното прелекарство на ацикловира – валацикловира има време на полуразпадане 13 часа. Ако следващите *in vivo* изследвания потвърдят тези резултати то тези предположения могат да поставят основата на една успешна стратегия за създаване предлекарства.

Малката скорост на хидролиза на изследваните групи естери ги прави подходящи, потенциални кандидати за предлекарства: с високата липофилност необходима за орално приемане и възможността да бъдат хидролизирани до активната част след ензимна хидролиза.

IV. ИЗВОДИ

1. Синтезирани са **7** нови аналози на **ацикловир**, от които два с неприродната аминокиселина **Boc-Phe(4-F)-OH (D и L)**, два с дипептидите **Boc-Val-Pro-OH** и **Boc-Ile-Pro-OH** и три с жлъчните киселини - **холева, дезоксихолева и хенодезоксихолева киселини**.
2. Изследвана е *in vitro* анти-херпесната активност срещу **HSV-1** и **HSV-2** на новите нуклеозидни аналози на **ACV** и е установено:
 - Аналозите на **ACV** с **холева 6a** и **хенодезоксихолева 6b** запазват активността на ацикловира. И двете вещества имат подчертано сходен противохерпесен ефект с този на референтния препарат.
 - изследванията *спрямо Epshtain Barr вирус* на аналозите на ацикловир показва, че ацикловирхенодезоксихолат **6b**, проявява съотношението *токсичност:активност* по-висока от тази на ацикловира
3. Синтезирани са **4** нови аналози на **ганцикловир**, два, от които с неприродната аминокиселина **Boc-Phe(4-F)-OH (D и L)** и два с жлъчните киселини - **дезоксихолева и хенодезоксихолева киселини**.
4. Синтезирани са **5** нови аналози на **пенцикловир** с жлъчните киселини - **дезоксихолева и хенодезоксихолева киселини** и два с неприродната аминокиселина **Boc-Phe(4-F)-OH (D и L)**.
5. Спрямо **HSV-1**, новосинтезираният **пенцикловир-холат (8a)**, проявява висока активност спрямо **MDBK** клетъчни култури, подобна е активността на **ганцикловир-**

дезоксихолат (7a) и **Boc-L-Phe(4-F)-ацикловир (26)**, останалите аналози са активни но при високи концентрации;

6. Спрямо **HSV-2**, получените резултати са аналогични, **ганцикловир-дезоксихолат (7)** и **Boc-L-Phe(4-F)-ацикловир (26)** проявяват задоволителна активност, но тя е по-ниска от референтите-ACV и PCV.
7. Синтезирани са 5 нови аналози на **пенцикловир** с жлъчните киселини - **дезоксихолева** и **хенодезоксихолева киселини** и два с неприродната аминокиселина **Boc-Phe(4-F)-OH (D и L)**.
8. Синтезирани са 7 нови неописани аналози на **оселтамивир** с адамантановите производни- **амантадин** и **римантадин**, с жлъчните киселини - **холева**, **дезоксихолева** и **хенодезоксихолева киселини** и с неприродната аминокиселина - **Boc-Phe(4-F)-OH (D и L)**.
9. Изследвана е *in vitro* противовирусната активност на новите аналози на **оселтамивир** срещу грипен вирус щам **A/Aichi/H3N2** и е установено че: три от новите производни на оселтамивир проявяват инхибираща активност, която дава основание за бъдещи изследвания *in vivo*, а именно **Оселтамивир-римантадин (16)**, както и **L-Phe(4-F)-оселтамивир (186)**, **Оселтамивир-4-F-Phe(R) (7a)**, останалите аналози не проявяват активност.
10. Синтезирани са 10 нови аналози на **амантадин** и **римантадин** с пептидни миметици, съдържащи тиазолов (**Boc-Gly-Thz-OH**) и дитиазолов пръстен (**Fmoc-Gly-Thz-Thz-OH**), с неприродни аминокиселини проявяващи различни биологични активности - **Boc-Phe(4-F)-OH (D и L)** и **Fmoc-Cys(Acm)-OH**.

11. Изследвана е *in vitro* противовирусната активност на новите адамантанови аналози срещу грипен вирус A/Puerto Rico/8/34/H1N1 и е установено че: HCl.Gly-Thz-Thz-римантадин (**30**) проявява висока инхибираща активност, съединение (**206**) амантадин с **Вос-L-Phe(4-F)-OH** проявява задоволителна активност, останалите адамантанови аналози имат ниска цитотоксична концентрация, но не проявяват активност.

12. Модифицирана е амногрупата на адамантановите производни - **амантадин** и **римантадин** с **гуанидино група**. За гуанидиращ агент е използван, **1H-Пиразол-1-карбоксамидин**.

13. Изследвана е *in vitro* противовирусната активност на **гуанидираните** адамантанови аналози срещу сезонния щам на грипен вирус **A/Aichi /H3N2** и е установено:

■ модифицираните адамантанови аналози на амантадин и римантадин с гуанидино група проявяват висока инхибираща активност, особено гуанидирания римантадин - **34** (SI= 3 396).

12. Изследвана е химичната стабилност на част от новите аналози на оселтамивир, на римантадин, амантадин и на ацикловир. Резултатите показват, че съединенията са по-стабилни при неутрално pH.

Направен е опит за установяване зависимости "химичен строеж-биологична активност" при което се оказа, че:

■ Използването на неприродни аминокиселини като заместители не оказва влияние върху противовирусната активност на ацикловир, ганцикловир, оселтамивир и адамантановите производни.

- Заместването с жлъчни киселини при ацикловир води до по-висока противовирусна активност (*Epshtain Barr вирус*).
- гуанидиране на аминогрупата на римантадин и амантадин води до много висока противовирусна активност.
- Производните проявяващи най-висока противовирусна активност се оказват и най-стабилни при рН съответстващо на това в гастроинтестиналния тракт. Това позволява да се предположи възможността те да действат като **ПРЕДЛЕКАРСТВА**.

V. ПРИНОСИ

1. Синтезирани са **33 нови, неописани** в литературата аналози на противовирусните препарати – ацикловир, ганцикловир, пенцикловир, оселтамивир, римантадин, амантадин.
2. Синтезирани са производни на ацикловир с жлъчни киселини, които *спрямо Epshtain Barr вирус* показват съотношение *токсичност:активност* по-висока от тази на ацикловира
3. Синтезирани аналози на **оселтамивир** с адамантановите производни- **амантадин** и **римантадин**. До този момент в практиката тези препарати се предписват самостоятелно.
4. Синтезирани са два нови гуанидинови аналога на амантадин и римантадин. Съединенията показаха висока инхибираща активност и висок индекс за селективност.

Всички гореизброени приноси предстои да бъдат патентовани.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Публикации, свързани с дисертацията:

1. Ivanka G. Stankova, **Kiril N. Chuchkov**, Michaela Schmidtke. Synthesis and In Vitro Anti-influenza Activity of New Amino Acids and Peptidomimetics Derivatives of Oseltamivir and Rimantadine. *Antiviral Research*, **2011**, Vol. 90, 2 Pages: A76;
2. Ivanka G. Stankova, **Kiril Chuchkov**, Rumen Georgiev, Angel S. Galabov. Amantadine and rimantadine analogues with peptidomimetics. *Proceedings of the 32nd EPS*, George Kokotos, Violetta Constantinou-Kokotou, Jhon Matsoukas, (eds.), Athena, Greece; **Peptides**, **2012**, pp, 488-489;
3. Ivanka G. Stankova, **Kiril Chuchkov**, Radoslav Chayov. Chemical stability of esters of acyclovir with amino acid and cholic acids. *Proceedings of the 32nd EPS*, George Kokotos, Violetta Constantinou-Kokotou, Jhon Matsoukas, (eds.), Athena, Greece; **Peptides**, **2012**, pp, 490-491;
4. Ivanka G. Stankova, **Kiril N. Chuchkov**, Rumen K. Georgiev, Galya Ivanova, Angel S. Galabov. New Adamantane Analogues - Synthesis And Antiviral Activity. *5th International Scientific Conference FMNS-2013*, Blagoevgrad, vol 4, pp, 3-9;
5. **Kiril Chuchkov**, Valeria Ivanova, Angel Galabov and Ivanka Stankova, Design of Amino Acid Esters of Amantadine, *Proceeding of the 33rd EPS*, Emilia Naydenova, Tamara Pajpanova, Dancho Danalev (eds), Sofia, Bulgaria, **Peptides**, 2014, ISBN 978-609-90427-2-4, pp,106-107.
6. **Kiril Chuchkov**, Ventzislav Zahariev, Angleg Galabov, Ivanka Stankova, Chemical Modifications of Inhibitors of M2 Ion Channel of Influenza Virus, *Proceeding of the 33rd EPS*, Emilia Naydenova,

Tamara Pajpanova, Dancho Danalev (eds), Sofia, Bulgaria, **Peptides**, 2014, ISBN 978-609-90427-2-4, pp,108-109.

7. Kiril Chuchkov, Silvia Nakova, Lucia Mukova, Angel Galabov and Ivanka Stankova - New derivatives of oseltamivir with bile acids. *Chemistry: Bulgarian Journal of Science Education*, **2015**, Vol. 24, #3, pp, 355-362.

Участие в научни форуми

1. Amino acids analogues of inhibitors of the M2 channel of influenza A virus, **K. Chuchkov**, V. Ivanova, A. Galabov and I. Stankova.

21st National Meeting on Medicinal Chemistry NMMC 2012, July 17-20, 2012 Palermo, Italy;

2. Chemical stability of esters of acyclovir with amino acid and cholic acids, **Kiril Chuchkov**, Radoslav Chayov and Ivanka G. Stankova;

Amantadine and rimantadine analogues with peptidomimetics, **Kiril Chuchkov**, Rumen Georgiev, Angel S.Galabov and Ivanka G. Stankova.

32nd European Peptide Symposium, September 2-7. 2012 - Athena, Greece;

3. New Adamantane Analogues - Synthesis And Antiviral Activity, **Kiril N. Chuchkov**, Rumen K. Georgiev, Galya Ivanova, Angel S. Galabov and Ivanka G. Stankova.

5th International Scientific Conference – FMNS2013, June 12 – 16, 2013, Blagoevgrad, Bulgaria;

4. Amino acids analogues of inhibitors of the M2 channel of influenza A virus, **K. Chuchkov**, V. Ivanova, A. Galabov and I. Stankova.

1st International Conference on Peptide Materials for Biomedicine and Nanotechnology (PepMat2013), October 28-31, 2013, Sorrento, Italy;

5. Chemical Stability of Amino Acid Esters of Oseltamivir and Rimantadine, **Kiril Chuchkov**, Mariya Vakarelska-Popovska and Ivanka Stankova.

50th International Conference on Medicinal Chemistry RICT 2014 - July 2nd - 4th, Rouen, Normandy, France;

6. Design of Amino Acid Esters of Amantadine, **Kiril Chuchkov**, Valeriya Ivanova, Angel Galabov and Ivanka Stankova;

Chemical Modifications of Inhibitors of M2 Ion Channel of Influenza Virus, **Kiril Chuchkov**, Vencislav Zahariev, Angel Galabov and Ivanka Stankova.

33rd European Peptide Symposium, 31 August - 05 September 2014 - Bulgaria, Sofia;

7. Antioxidant Activity of Aminoadamantane Analogues with Amino Acid Cystein, **Kiril Chuchkov**, Vencislav Zahariev, Boyka Stoykova, Angel Galabov and Ivanka Stankova.

International Workshop on Determining Antioxidants as Reactive Species Scavengers, October 27 - 28. 2014- Istanbul, Turkey;

8. New Derivatives Of Oseltamivir With Bile Acids, **Kiril Chuchkov**, Silvia Nakova, Lucia Mukova, Angel Galabov and Ivanka Stankova

6th International Conference of FMNS (FMNS-2015), June 10-14. 2015, Blagoevgrad, Bulgaria.

Публикации извън дисертацията:

1. I. Stankova and **Kiril Chuchkov**. Hydroxycinnamides with unnatural amino acids and their antioxidant activity. *Oxidation communication*, **2008**, 4, 31, 283-287;
2. Stankova I., **Chuchkov K.**, Shishkov St., Kostova K., Mukova L. and Angel Galabov. Synthesis, antioxidative and antiviral activity of hydroxycinnamic acid amides of thiazole containing amino acid. *Amino acid*, **2009**, vol. 37, 2, pp, 383-388;
3. Ivanka G.Stankova, **Kiril N. Chuchkov**, Peter Wutzler and Michaela Schmidtke. Cinnamic esters of acyclovir-synthesis and biological activity, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **2010**, vol. 29, 10, pp, 760-767.

Списък със забелязани цитати:

- **Synthesis, antioxidative and antiviral activity of hydroxycinnamic acid amides of thiazole containing amino acid**

Ivanka Stankova, Kiril Chuchkov, Stoyan Shishkov, Kalina Kostova, Luchia Mukova, Angel S. Galabov, *Amino Acids*, July **2009**, Volume 37, Issue 2, pp 383-388

Цитати: 18 бр.

1. **Amino acids – A life between metabolism and signaling**, Rainer E. Häusler, Frank Ludewig, Stephan Krueger, *Plant Science*, Vol. **229**, December 2014, Pages 225–237,;
2. **Plant Adaptation to Environmental Change: Significance of Amino Acids and their Derivatives**, CABI, 10.01.2014 г., Naser A. Anjum, Sarvajeet Singh Gill, Ritu Gill;

3. **Lipase-Catalyzed Solvent-Free Amidation of Phenolic Acids**, Parshant Kaushika, Najam Akhtar Shakila*, Jitendra Kumara & Braj Bhushan Singha *Synthetic Communications*, DOI:10.1080/00397911.2014.974611, Published online: 31 Dec 2014,;
4. **Novel anti-HIV-1 NNRTIs based on a pyrazolo[4,3-d]isoxazole backbone scaffold: design, synthesis and insights into the molecular basis of action**, Sobhi M. Gomha, Mohamed G. Badrey, Mohamed M. Abdallac and Reem K. Arafa *Med. Chem. Commun.*, 2014,5, 1685-1692,;
5. **Synthesis, antimicrobial evaluation and QSAR studies of p-coumaric acid derivatives**, Anurag Khatkar, Arun Nanda, Pradeep Kumar, Balasubramanian Narasimhan, *Arabian Journal of Chemistry*, Available online 18 June 2014, In Press;
6. **Chemical modulation of bioactive compounds via oligopeptide or amino acid conjugation**, Seon-Yeong Kwak^{1,2}, Jin-Kyoung Yang¹, Jong-Ho Kim^{2,*}, Yoon-Sik Lee^{1,*} *Peptide Science Special Issue: Peptide Engineering Meeting 6*, Volume **100**, Issue 6, pages 584–591, **November 2013**;
7. **Antioxidant Properties of Hydroxycinnamic Acids: A Review of Structure- Activity Relationships** Razzaghi-Asl, N.; Garrido, J.; Khazraei, H.; Borges, F.; Firuzi, O. *Current Medicinal Chemistry*, Volume **20**, Number 36, December 2013 , pp. 4436-4450(15);
8. **Synthesis and dual biological effects of hydroxycinnamoyl phenylalanyl/prolyl hydroxamic acid derivatives as tyrosinase inhibitor and antioxidant**, Seon-Yeong Kwaka, Jin-Kyoung Yanga, Hye-Ryung Choib, Kyung-Chan Parkb, Young-Bu Kimc, Yoon-Sik, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*

Letters, Volume 23, Issue 4, 15 February 2013, Pages 1136–1142;

9. **Recent Developments in Azole Compounds as Antibacterial and Antifungal Agents**, Peng, Xin-Mei; Cai, Gui-Xin; Zhou, Cheng-He, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, Volume 13, Number 16, August 2013 , pp. 1963-2010(48);
10. **Synthesis and antimicrobial evaluation of ferulic acid derivatives**, Anurag Khatkar, Arun Nanda, Pradeep Kumar, Balasubramanian Narasimhan, *Research on Chemical Intermediates*, **April 2013**;
11. **Development and evaluation of novel preservatives from simple organic acids**, Khatkar, Anurag, *Maharshi Dayanand University*, **3-Jul-2013**;
12. **Synthesis, characterization and Antimicrobial screening of some Bio-active heterocyclic compounds**, Harsora, Jalpa Prafulbhai, Desai, N C, *Maharaja Krishnakumarsinhji Bhavnagar University*, **26-Apr-2013**;
13. **N-Hydroxycinnamoyl amides of fluorinated amino acids: Synthesis, anti-tyrosinase and DPPH scavenging activities**, Chochkova, M., Stoykova, B., Ivanova, G., Ranz, A., Guo, X., Lankmayr, E., Milkova, T., **2013**, *Journal of Fluorine Chemistry* 156 , pp. 203-208;
14. **Development of novel type II FAS-Inhibitors targeting apicomplexan-borne diseases and development of potential Bid-Inhibitors as neuroprotectants**, Schrader, Florian Christoph, *Dissertation*, **2012-07-11**;

15. **Antioxidative activities of caffeoyl-proline dipeptides** Kwak, S.-Y., Lee, S., Yang, J.-K., Lee, Y.-S., **2012**, *Food Chemistry* 130 (4) , pp. 847-852;
16. **Design, Synthesis and Antimicrobial Screening of amino acids conjugated 2-Amino-4-Arylthiazole Derivatives**, K. C. Prakasha, G. M. Raghavendra, R. Harisha & D. Channe Gowd, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* , ISSN- 0975-1491 **Vol 3**, Suppl 3, 2011.
17. **Entwicklung strukturell neuartiger Typ II FAS-Inhibitoren als Wirkstoffe gegen multiple Entwicklungsstadien von Apicomplexa und Entwicklung potenzieller Bid-Inhibitoren als Wirkstoffe gegen neuronalen Zelltod**, Schrader, F. C. (2012). (<http://dx.doi.org/10.17192/z2012.0378>). Philipps-Universität Marburg.
18. **Synthesis and characterization of novel heterocyclic compounds bearing sydnone moiety as potential antimicrobial agents**, Asundaria, Shahrukh T, Veer Narmad South Gujarat University, 21-Oct-2011,.

- **Cinnamic Esters of Acyclovir-Synthesis and Biological Activity,**

Ivanka Stankova, Kiril Chuchkov, Peter Wutzel & Michaela Schmidtke , *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, Volume 29, Issue 10, **2010**, pages 760-767

1. **New Green Synthesis and Formulations of Acyclovir Prodrugs**, Rubén de Regil-Hernández¹), Fernando Martínez-Lagos¹), Amalia Rodríguez-Bayón²), José-Vicente Sinisterra¹), *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Vol. **59** (2011) No. 9 P 1089-1093.

СЪДЪРЖАНИЕ

I. УВОД.....	4
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	5
III. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	6
III. 1. Синтез на производни на ацикловира с 4-F-фенилаланин (D и L) чрез заместване в хидроксилната му група.....	7
III. 2. Синтез на ацикловир с дипептидите Boc-Val-Pro-OH и Boc-Ile-Pro-OH.....	8
III. 3. Модифициране на пуринови аналози с жлъчни киселини (холева киселина, дезоксихолева киселина и хенодезоксихолева киселина).....	10
III. 3. 1. Модифициране на ацикловир с холеви киселини (холева киселина, дезоксихолева киселина и хенодезоксихолева киселина).....	11
III. 3. 2. Синтез на аналози на ганцикловир с дезоксихолева и хенодезоксихолева киселини.....	12
III. 3. 3. Синтез на пенцикловир с холева, дезоксихолева и хенодезоксихолева киселини.....	13
III. 4. Модифициране на пенцикловир с 4-F-Phe(R,S)-OH....	13
III. 5. Модифициране на оселтамивир с адамантанови производни.....	14
III. 6. Модифициране на оселтамивир с жлъчни киселини.....	15
III. 7. Модифициране на оселтамивир с 4-F-фенилаланин (S, R).....	17
III. 8. Модифициране на адамантанови производни с 4-F-фенилаланин (S, R).....	18
III. 8. 1. Синтез на амантадин с 4-F-Phe(R, S)-OH.....	18
III. 8. 2. Синтез на римантадин с 4-F-Phe(R, S)-OH.....	19

III. 9. Модифициране на адамантанови производни с пептидни миметици, съдържащи тиазолов и дитиазолов пръстен.....	20
III. 9. 1. Синтез на аналози на амантадин с Boc-Gly-Thz-OH и Fmoc-Gly-Thz-Thz-OH.....	21
III. 9. 2. Синтез на аналози на римантадин с Boc-Gly-Thz-OH и Fmoc-Gly-Thz-Thz-OH.....	23
III. 9. 3. Модифициране на адамантанови производни с Fmoc-Cys(Act)-OH.....	24
III. 10. Гуанидиране на адамантанови производни амантадин и римантадин.....	25
III. 11. Биологична активност на новосинтезираните аналози.....	26
III. 11. 1. Изследване на новосинтезираните аналози.....	26
III. 11. 2. Изследване на аналозите на ацикловир с жлъчни киселини срещу HSV-1 и HSV-2 и Epstein Barr вирус.....	28
III. 11. 3. Биологична активност in vitro на новите аналози на оселтамивир.....	32
III. 11. 4. Биологична активност in vitro на новосинтезираните адамантанови аналози амантадин и римантадин.....	32
III. 12. Химична стабилност на аналози на оселтамивир, амантадин, римантадин и ацикловир.....	37
IV. ИЗВОДИ.....	43
V. ПРИНОСИ.....	47
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	48