

РЕЦЕНЗИЯ

от **акад. проф. Иван Георгиев Иванов**

на дисертационния труд на **Кирил Николов Чучков** *“Аналози на противовирусни препарати – синтез и биологична активност”*, представен за присъждане на образователната и научна степен **“Доктор”** в област на висшето образование 4. „Природни науки, математика и информатика”, професионално направление 4.2. „Химически науки”, научна специалност **„Органична химия”**

Кирил Николов Чучков е възпитаник на ЮЗУ „Неофит Рилски“, където през 2007 г. от Природонаучния факултет придобива ОКС „Бакалавър“ със специалност „Химия“, а през 2010 г. и ОКС „Магистър“ по „Биологичноактивни вещества и лекарствени средства“. От 2011 г. е редовен докторант при Катедра „Химия“, където под научното ръководство на доц. д-р Иванка Станкова разработва дисертационен труд на тема *“Аналози на противовирусни препарати – синтез и биологична активност”*.

Рецензията на дисертационен труд е с обем 148 страници и съдържа 122 литературни източници, от които половината са публикувани след 2000 г. Той е илюстриран с 54 фигури, 11 таблици и 22 схеми.

Ще започна рецензията си с доброто впечатление, което остави у мен дисертацията на К. Чучков, както с нейното оформление, така и с богатия експериментален материал. Тя е интердисциплинарна и за нейното изпълнение са необходими знания в различни области на науката като органична химия, структурна биология, биоинформатика, фармакология, вирусология и др., които докторантът безспорно притежава.

Изследванията в областта на антивирусната фармацевтична химия са трудни но благодатни. Докато фармацията и фармакологията познават хиляди вещества с антибактериално действие, броят на антивирусните лекарствени средства е сведен до няколко. Главните причини за това са две: а) Вирусите са вътреклетъчни паразити, които при своето възпроизводство използват синтетичния апарат на клетката, а това означава, че антивирусните вещества възпрепятстващи вирусната репликация, притежават повече или по-малко токсичен ефект и върху клетките-гостоприемници; б) Вирусите и особено РНК вирусите, са силно изменчиви. Техните РНК полимеразите (за разлика от ДНК полимеразите) са лишени от proof reading (поправяща) активност, което е причина за възникване на точкови мутации във вирусния геном при всеки репликативен цикъл, а това е предпоставка за появата на нови щамове с резистентност към антивирусните лекарства. От тази гледна точка търсенето на нови вещества с антивирусна активност е приоритетна задача за химиците-фармацевти и докторанта правилно се е посветил на тази интересна и благородна кауза.

Литературният обзор обхваща около 1/3 от обема на дисертацията (40 стр.) и е посветен на две групи антивирусни лекарствени средства – *противохерпесни* и *противогрипни*. В молекулярно-биологичен аспект те са принципино различни както по механизъм на действие, така и по молекулен строеж. Херпесните вируси (HSV-1 и HSV-2) са ДНК вируси и техните антивирусни вещества са модифицирани нуклеотиди имитиращи структурата на дезоксирибонуклеотидите. Те могат да бъдат включени в растящата ДНК верига еднократно поради това, че не съдържат дезоксирибоза, което води до терминация на ДНК синтеза. Към тази група се отнасят трите популярни лекарствени препарати *Ацикловир*, *Ганцикловир* и *Пенцикловир*. В своя обзор докторантът представя литературни данни за многобройните опити да се повиши тяхната активност чрез естерификация с природни α -аминокиселини и синтетични олигопептиди, като по този начин хвърля светлина и върху взаимовръзката структура-функция на получените деривати.

Значително повече място и внимание е отделено на противогрипните лекарствени средства, където вирусният геном е РНК. В този случай горният подход, т.е. използването на РНК-предшественици, за възпрепятстване на вирусната репликация е неприложим. Успешните противогрипни лекарствени средства се отнасят към две групи – *инхибитори на невраминидазата* (осигуряваща проникване на грипните вируси в междуклетъчното пространство и таргетните клетки) и *инхибитори на йонния канал M2* (необходим за репликацията на вирусите в инфектираните клетки). Към първата група спадат *Занамивир*, *Ланинамивир*, *Оселтамивир (Tamiflu®)* и *Перамивир*, а към втората – производните на аминоксадамантана, като *амантадин*, *римантадин* и др. Тук докторантът представя и новия, научно базиран подход за дизайн на противовирусни средства базиран на пространствената структура на таргетния протеин (в случая невраминидазата и M2 протеина на грипния вирус), който все повече измества старата практика на случайно откриване на противовирусни вещества чрез масов скрининг на голям набор от природни и синтетични органични съединения. Обърнато е внимание и на антивирусните предлекарства, които добиват биологична активност след попадане в организма. Литературният обзор завършва с кратък преглед на методологията на пептидният синтез, което намирам за излишно. Този раздел е неинформативен на фона на всички останали задълбочено разработени раздели и ако авторът държи той да остане, би могъл да го помести в методичната част на дисертацията.

Задълбоченият анализ на литературните данни е позволило на г-н Чучков да намери своята изследователска ниша и да определи насоките на своите изследвания формулирани в раздела Цели и задачи. Целта на дисертацията е: *„синтезиране на някои производни на ацикловир, пенцикловир, ганцикловир, амантадин, римантадин и оселтамивир с холеви киселини и аминокиселини, и изследване in vitro на биологичната им активност“*. По този начин докторантът цели както да получи нови предлекарства с потенциално противовирусно действие, така и да установи нови закономерности в зависимостта химичен строеж - биологична активност. На тази цел са подчинени осем добре дефинирани задачи.

Методичният раздел, озаглавен „Експериментална част“ е поместен в края на дисертацията, което не е типично за българските дисертационни трудове, но пък е практика за много научни списания в областта на химията и фармацията. Тук са описани в детайли методите за получаване на всичките 39 синтезирани от докторанта съединения, условията за тяхното хроматографско пречистване и физикохимичното им охарактеризиране (с NMR и ESI-MS). Подробното описание на препаративните и аналитични методи позволява експериментите да бъдат възпроизведени без необходимост от допълнителна методична литература, а дисертационния труд да послужи като методично пособие при обучението на други студенти и докторанти работещи в областта на фармацевтичната органична химия. От методичния раздел се вижда, че докторантът прилага с лекота широка гама от синтетични, биохимични, аналитични и физикохимични методи, с което е постигнал една от основните цели на неговата докторантура – придобиване на експериментални умения и сръчност.

Резултатите от проведените изследвания са представени на около 40 страници в раздел Резултати и обсъждане. От своя страна този раздел е съставен от два подраздела отнасящи се съответно до двата вида антивирусни средства – *противохерпесни* и *противогрипни*.

При създаването на нови противохерпесни средства К. Чучков избира модификацията в ацикличния остатък на вече утвърдени и проверени в практиката молекули, като ацикловир, пенцикловир и ганцикловир. Модификацията е осъществена чрез естерификация на ацикличните –ОН групи с неприродни аминокиселини

(дериватизиран фенилаланин), пептиди (Boc-Val-Pro-OH и Boc-Ile-Pro-OH) и жлъчни (холева, дезоксихолева и хенодезоксихолева) киселини. Изборът на модифициращите групи е добре аргументиран и базиран на опита от използването им при синтезата на други лекарствени вещества. По този начин са получени седем нови аналози на ацикловира - два с L и D Boc-Phe(4-F)-OH, два с дипептидите Boc-Val-Pro-OH и Boc-Ile-Pro-OH, и три с холева, дезоксихолева и хенодезоксихолева киселини. К. Чучков синтезира и четири нови производни на ганцикловира (два с L и D Boc-Phe(4-F)-OH и два с дезоксихолева и хенодезоксихолева киселини), пет на пенцикловира (три с холева, дезоксихолева и хенодезоксихолева киселини и два с L и D Boc-Phe(4-F)-OH) и седем на оселтамивира (два с амантадин и римантадин, три както и с холева, дезоксихолева и хенодезоксихолева киселини и два с L и D Boc-Phe(4-F)-OH).

Структурата на новосинтезираните вещества е потвърдена със спектрални методи, включително NMR и MS, след което са изследвани за антивирусна активност спрямо HSV-1, HSV-2 или Epstein Barr вирус. За целта е използвана клетъчната линия MDCK (култура от клетки на кучешки бъбрек), където виталността на клетките е оценявана по МТТ теста. Изследванията показват, че като цяло новите аналози имат по-ниска антивирусна активност в сравнение с изходните ACV и PCV, макар че активността на три от тях се доближава до тази на контролите. Най-ниска антивирусна активност е отчетена за производното на ACV с L-фенилаланин (23 пъти по-ниска от тази на ACV срещу HSV-1 и 14 пъти срещу HSV-2), а естерите на PCV с жлъчни киселини са 9-10 пъти по-малко активни спрямо контролата срещу същите вируси. Оттук може да се направи извода, че новосинтезираните аналози нямат предимство пред класическите противохерпесни вещества ACV и PCV.

Докторантът синтезира и десет нови аналози на амантадин и римантадин с 4-F-фенилаланин (D/L), дипептидни миметици съдържащи тиазолов и дитиазолов пръстен и неприродни аминокиселини. Амногруппата на адамантановите производни в този случай е дериватизирана с гуанидилова група въведена чрез Н-пиразол-1-карбоксамидин. И тук, както по-горе, структурите на новосинтезираните съединения са охарактеризирани с MS, ^1H и ^{13}C -NMR спектроскопия, след което са изследвани за антивирусна активност. *In vitro* изследванията спрямо грипния вирус щам A/Aichi/H3N2, показват, че само три от новите производни на оселтамивира проявяват инхибираща активност, което дава основание да бъдат насочени (в бъдеще) към *in vivo* изследвания. Спрямо същия вирусен щам са изследвани и гуанидираните аналози на амантадин и римантадин и е намерено, че гуанидирания римантадин се характеризира с висока инхибираща активност ($\text{SI} = 3\ 396$).

Противовирусната активност на адамантановите аналози е изследвана срещу грипния вирус A/Puerto Rico/8/34/H1N1. Резултатите показват, че докато Gly-Thz-Thz-римантадинът проявява висока, а Boc-L-Phe(4-F)-OH амантадинът има задоволителна инхибираща активност, то останалите адамантанови производни нямат антивирусна активност.

Опитвайки се да намери зависимост между химичния строеж и биологичната активност на получените съединения, докторантът достига до извода, че неприродните аминокиселини не оказват влияние върху противовирусната активност на ацикловир, ганцикловир, оселтамивир и адамантановите производни, докато гуанидирането на аминогруппата на римантадина и амантадина повишава тяхната антивирусна активност. Такъв ефект има и дериватизацията с жлъчни киселини, която повишава активността на антихерпесните вещества спрямо Epshtain Barr вируса.

Резултатите от дисертационния труд са отразени в 7 съобщения в сборници от научни конференции в страната и чужбина, в 3 от които докторантът е водещ автор. Те са докладвани и на 8 международни научни форуми, където К. Чучков е водещ автор.

Доколкото ми е известно, липсата на редовни публикации в периодични научни списания е свързано с подготовката на патентни заявки, които трябва да предшества публикациите.

Запознат съм с автореферата на дисертацията, който отразява адекватно съдържанието и приносите на дисертационния труд.

Заключение: Дисертационният труд на Кирил Чучков е пример за успешна научно-приложна разработка с подчертан интердисциплинарен характер. При нейната реализация са използвани знания и умения от различни сфери на фундаменталните природни науки, като органична химия, аналитична химия, физикохимия, биохимия, вирусология, фармакология и др. Изследванията, проведени със съвременна методология и модерна експериментална техника, в резултат на което са синтезирани 33 нови за литературата аналози на противовирусните препарати – ацикловир, ганцикловир, пенцикловир, оселтамивир, римантадин, амантадин. Със своите научни постижения и научна продукция докторантът се представя като квалифициран изследовател, който удовлетворява изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото прилагане и вътрешния Правилника на ЮЗУ за придобиване на образователната и научна степен „Доктор”. Въз основа на казаното, препоръчвам на уважаемото Научно жури определено да проведе защитата на дисертационния труд на Кирил Чучков да му присъди образователната и научна степен „Доктор” в област на висшето образование 4. „Природни науки, математика и информатика”, професионално направление 4.2. „Химически науки”, научна специалност „Органична химия”.

13.07.2016 г.

Подпис:

/Акад. Иван Иванов/