

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

Бойка Миладинова Стойкова

Нови производни на антимикробни агенти

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор“

Научна специалност „Органична химия“

Научен ръководител: гл. ас. д-р Мая Георгиева Чочкова
Научен консултант: проф. дхн. Ценка Савова Милкова

Благоевград
2017 г.

Дисертационният труд е написан на 151 стр. формат А4. Съдържа 15 таблици, 10 схеми и 51 фигури. Номерацията им в автореферата съответства на тази в дисертацията. Цитирани са 173 литературни източника.

Синтетичните и хроматографските изследванията по дисертационния труд са извършени в катедра „Химия” към Природо-математически факултет на ЮЗУ „Неофит Рилски”, гр. Благоевград.

NMR- и MS- анализи са извършени в Universidade do Porto, Portugal и Charles University, Prague, Czech Republic.

Микробиологичните изследвания са проведени в Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 12. 09. 2017 г. в катедра „Химия”, Природо-математически факултет, Югозападен Университет „Неофит Рилски”, гр. Благоевград, ул. „Тодор Александров” № 56, ет.3, зала 2301.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

AA – аминокарбоксилна киселина
Ac – ацетил
AdA – 1-адамантан карбоксилна киселина
AdipA – адипинова киселина
Am – амантадин
Arg – аргинин
Asp – аспарагинова киселина
Boc – трет-бутилоксикарбонил
Boc-Os-OH – *N*- трет-бутилоксикарбонил оселтамовир 1-карбоксилна киселина
Bzl – бензилов остатък
CDI – *N*, *N'*-карбонилдиимидазол
Cit – цитрулин
Cys – цистеин
DCC – дициклохексилкарбодиимид
DMAP – *N*, *N*-диметиламинопиридин
DMF – диметилформамид
DMSO – диметилсулфоксид
DHLA – дихидролипоева киселина
DOPA – 3,4-дихидроксифенилаланин
DPPH• – 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил
EDC – 1-етил-3-(3'-диметиламинопропил) карбодиимид
Et3N – триетиламин
FA – ферулова киселина
GABA – γ -аминобутанова киселина
Glu – глутаминова киселина
HA – хемаглутинаин
His – хистидин
HIV – Човешки имунодефицитен вирус
HOBT – *N*-хидроксibenзотриазол
HSQC (Heteronuclear single quantum correlation) – определяне на двумерни директни ^1H - ^{13}C хетероядрени корелации ($^1J_{\text{C-H}}$)

HSV-1 – Херпес симплекс вирус тип 1
Hyp – хидроксипролин
Ile – изолевцин
IL – йонна течност
LipA – липоева киселина
Lys – лизин
Me – метилов остатък
Met – метионин
MDCK (Madine-Darby Canine Kidney) – клетъчна култура от кучешки бъбрек
MIC – минимална инхибираща концентрация
MTA – гъбична тирозиназна активност
NA – невраминидаза
NAI – невраминидазни инхибитори
NMM – *N*-метилморфолин
Orn – орнитин
Os – оселтамовир
PCC – пиридиниев хлорохромат
PEG – полиетиленгликол
Phe – фенилаланин
Pro – пролин
vRNPs – вирусни рибонуклеопротеини
RSA – антирадикалова активност
Rim – римантадин
SA – синапова киселина
Sar – *N*-метилглицин
Ser – серин
Tau – 2-аминоетансулфонова киселина
Thr – треонин
TrpA – (*E*)-3-(2'-тиенил)-пропенова киселина
Trp – триптофан
Tyr – тирозин
WHO – Световна здравна организация
Z – бензилоксикарбонил

УВОД

В последните години се забелязва особено тревожна тенденция към нарастване честотата на инфекциозните заболявания, причинени от вируси, бактерии, гъбички, протозои и други. По данни на Световната здравна организация (WHO) смъртността причинена от заразни заболявания (морбили, малария, туберкулоза, респираторни заболявания и други) в световен мащаб надхвърля 85 %, като най-висок е дялът на респираторните заболявания [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index2.html>].

В етиологията на острите заболявания на дихателната система се включва групата на грипните вируси. Тези патогени (и по-специално грипни вируси тип А) предизвикват грипни епидемични взривове, епидемии и пандемии и са едни от най-изменчивите. Несъмнено наред със здравните проблеми грипните вируси причиняват огромни щети от медико-социален и икономически характер. Ефективна стратегия за превенция на заболяване от грип е имунизацията, а за лечението на вече възникнала грипна инфекция – противовирусната терапия. Последната включва прилагането на два класа химиотерапевтици: блокери на М2 йонния канал и невраминидазни инхибитори. Установената резистентност към тези противогрипни лекарствени средства, както и проявените им странични ефекти, поставят въпроса за намиране на нови ефективни противогрипни агенти. Непрекъснато нарастващата резистентност не само към противогрипните, но и към антибактериални, и противогъбични средства е сериозна заплаха за общественото здраве и налага насърчаване на научно-изследователските дейности.

Обект на настоящия дисертационен труд е химична трансформация на противогрипни химиотерапевтици до модификации с потенциална антимикробиална активност.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация е да бъдат получени чрез химични трансформации и изследвани за биологична активност производни на противогрипни лекарствени средства - амантадин, римантадин и оселтамивир.

За постигане на целта бяха поставени следните задачи:

1. Синтез на амиди на аминокиселинни производни с противогрипни лекарствени средства (амантадин, римантадин и оселтамивир).
2. Модифициране на противогрипни агенти с хетероциклени съединения.
3. Свързване на антимикробиални агенти чрез подходящ линкер.
4. Синтез на халогенирани производни на антимикробиални агенти.
5. Свързване на стероиди с противогрипни агенти.
6. Изследване на противовирусна, антибактериална, противогъбична, антирадикалова и тирозиназно-инхибиторна активност на синтезираните съединения.

II. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

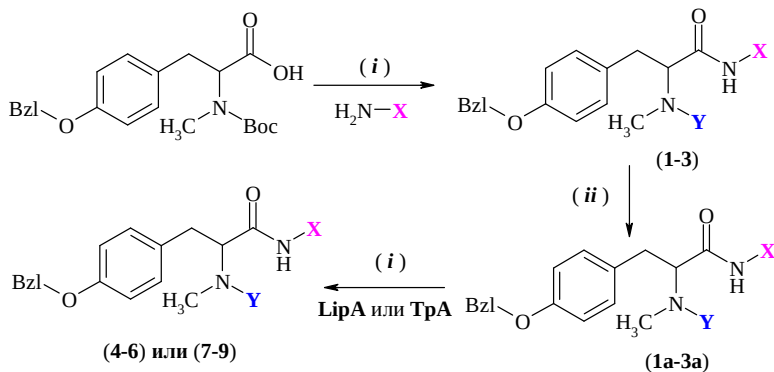
II.1. ХИМИЧНИ ТРАНСФОРМАЦИИ НА ПРОТИВОГРИПНИ АГЕНТИ С АМИНОКАРБОКСИЛНИ ПРОИЗВОДНИ

II.1.1. Създаване на амидна връзка чрез EDC/HOBt-метод

Установената значителна инхибираща активност на адамантанови производни, съдържащи аминокиселинни остатъци спрямо грипен вирус тип А (H3N2) и пандемичен щам А (H1N1) pdm [Shibnev V. A., et. al. (2012)], за които е известно, че са резистентни към римантадина, ни провокира да синтезираме и изследваме противовирусната активност на подобни производни. Тези обещаващи данни ни насочиха да синтезираме амиди на *N*-метилян тирозин с бензилна защита в страничната верига (Вос-*N*(CH₃)-Tyr(Bzl)-OH) с трите противогрипни агента [Shibnev V. A., et. al. (2012)] (**схема 1.**). Получените по **EDC/HOBt** метода [Sheehan J. C., et al. (1955)] аминокиселинни амиди (**1-3**) бяха пречистени чрез колонна хроматография, а структурата им бе охарактеризирана чрез **mp**, **UV**, **IR (ATR)**_{max}, **ESI-MS**, **¹H-** и **¹³C-NMR**. Добивите на новосинтезираните съединения варират от 46÷57 %.

Успешен подход при дизайн на агенти с променена/повишена биологична активност е свързването на два фармакофора в обща химична структура [Kogen H., et. al. (2002); Harnett J. J., et. al. (2002); Pillai A. D, et. al.,(2003)]. Този факт ни провокира допълнително да модифицираме структурата на новополучените съединения (**схема 1. (1a), (2a), (3a)**) с липоева киселина, притежаваща широк спектър биологични активности [Gruzman A., et. al. (2004); Chittiboyina A. G., et. al. (2006); Koufaki M. et. al. (2001); Koufaki M., et. al. (2004); Di Stefano A., et. al. (2006); Shi D. Y., et. al. (2008)], както и с (*E*)-3-(2'-тиенил)-пропенова киселина (TrA), за чиито аналози е установена умерена антиоксидантна и противовъзпалителна активност [Pontiki E., et. al. (2011)]. Последната бе получена чрез кондензация на *Knoevenagel-Doebner* в присъствие на тиофен-2-карбалдехид, малонова киселина, пиридин и пиперидин [Koružnjak D. J., et. al. (2002)] („Експериментална част“ **III. 6. 1. 2. 1.**). Структурата на продукта бе идентична по точка на топене и спектрални данни с описаните в литературата [Mihailović M. Lj., et. al. (1957); Koružnjak D. J., et. al. (2002)].

Схема 1:



(i) EDC/HOBt, CH_2Cl_2 ; (ii) 50 % TFA/ CH_2Cl_2

Съединение	X	Y
1)	-Rim	-Boc
2)	-Am	-Boc
3)	-Os	-Boc
1a)	-Rim	H
2a)	-Am	H
3a)	-Os	H
4)	-Rim	
5)	-Am	
6)	-Os	
7)	-Rim	
8)	-Am	
9)	-Os	

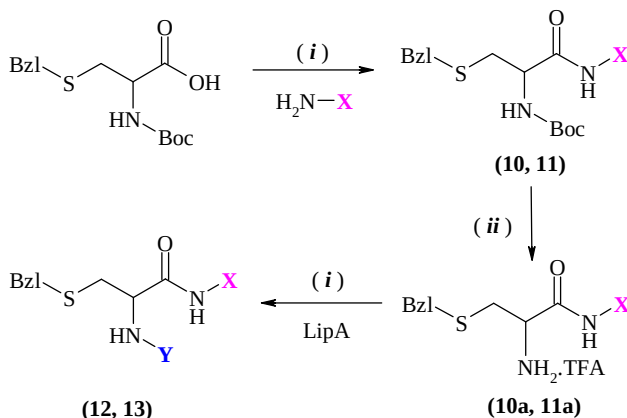
По-нататък (схема 1. (ii)) след TFA-ацидолиза [Bodanszky M. et. al. (1984)] на съединения **(1-3)**, деблокираните продукти (съединения **1a-3a**) бяха свързани с липоева и (*E*)-3-(2'-тиенил)-

пропенова киселина (TrA) по **EDC/HOBt** метода. Получените съединения (**схема 1. (4-9)**) бяха пречистени чрез колонна хроматография върху силикагел, а структурата им бе охарактеризирана чрез **mp**, **UV**, **IR (ATR)**_{u_{max}}, **ESI-MS**, **¹H-** и **¹³C-NMR**.

Известно е, че *N*-ацетил-*L*-цистеинът инхибира пролиферацията на грипните вируси в ранните стадии на инфекцията [Lin C., et. al. (2001); Geiler J., et. al. (2010); Ungheri D., et. al. (2000)] и проявява синергично действие в комбинация с противовирусните препарати рибавирин [Ghezzi, P., et. al. (2004)] и оселтамивир [Garozzo A., et. al. (2007)].

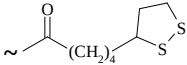
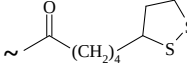
С цел преодоляване на противогрипната резистентност и засилване на противовирусния ефект, аминокарбоксилната киселина Boc-*L*-Cys(Bzl)-OH бе химически свързана чрез амидна връзка с противогрипните агенти (римантадин и оселтамивир) (**схема 2. (i)**).

Схема 2:



(i) EDC/HOBt, CH₂Cl₂; (ii) 50 % TFA/ CH₂Cl₂

Съединение	X	Y
10)	-Rim	-
11)	-Os	-
10a)	-Rim	-
11a)	-Os	-

12)	-Os	
13)	-Rim	

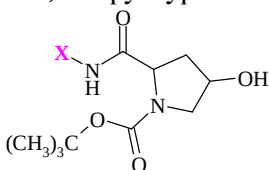
Получените амиди (**схема 2. (10) (11)**) бяха пречистени чрез колонна хроматография и охарактеризирани спектрално.

Съобщените в литературата данни за мощното тирозиназно-инхибиторно действие на производни на *N*-липоилцистеин [Ogata K., et. al. (2010)], ни насочи към допълнително модифициране структурата на съединения (**10a, 11a**) с липоева киселина. Както е посочено на **схема 2.**, получаването на съединения (**12, 13**) включва трансформации, аналогични на описаните по-горе в **схема 1**.

След пречистване чрез колонна хроматография, структурите на получените диамиди (**схема 2. (12), (13)**) бяха потвърдени чрез **mp, UV, IR (ATR)_{сmax}, ESI-MS, ¹H- и ¹³C-NMR**.

При дизайна на нови невраминидазни инхибитори обещаваща скелетна структура, се оказва непротеиногенната аминокарбоксилна киселина 4-хидрокси-*L*-пролин. Оказва се, че *N*-ацетилното ѝ производно проявява инхибиторна активност *in vitro* близка до тази на оселтамивира [Zhang J., et. al. (2007)]. Тези литературни данни ни насочиха към модифициране на 4-хидрокси-*L*-пролин с противогрипните агенти.

За провеждане на целенасочен амиден синтез, имино групата на 4-хидрокси-*L*-пролин бе предварително защитена. Сред *N*-защитните групи от уретанов тип ние избрахме трет.-бутилоксикарбонилната (Boc-) група, която е сред най-често използваните. За въвеждане на трет. бутилоксикарбонилна група бе използван ди-третичен-бутилдикарбонат (Boc₂O) [Позднев В. Ф., (1977)]. Получаването на целевите пептидомиметици бе осъществено по споменатия пептиден метод (**фиг. 38 (14-16)**). Получените производни бяха пречистени чрез колонна хроматография върху силикагел. Добивите на новосинтезираните производни варират от 26 ÷ 51 %, а структурата им бе потвърдена спектрално.



Фиг. 38.

	X
14)	-Rim
15)	-Am
16)	-Os

Модификациите на римантадин с аминокарбоксилните киселини аспарагинова/ глутаминова киселина (съединения **17, 18**;

схема 3.) бе осъществена по аналогичен начин чрез класически амиден синтез по **EDC/HOBt** метода.

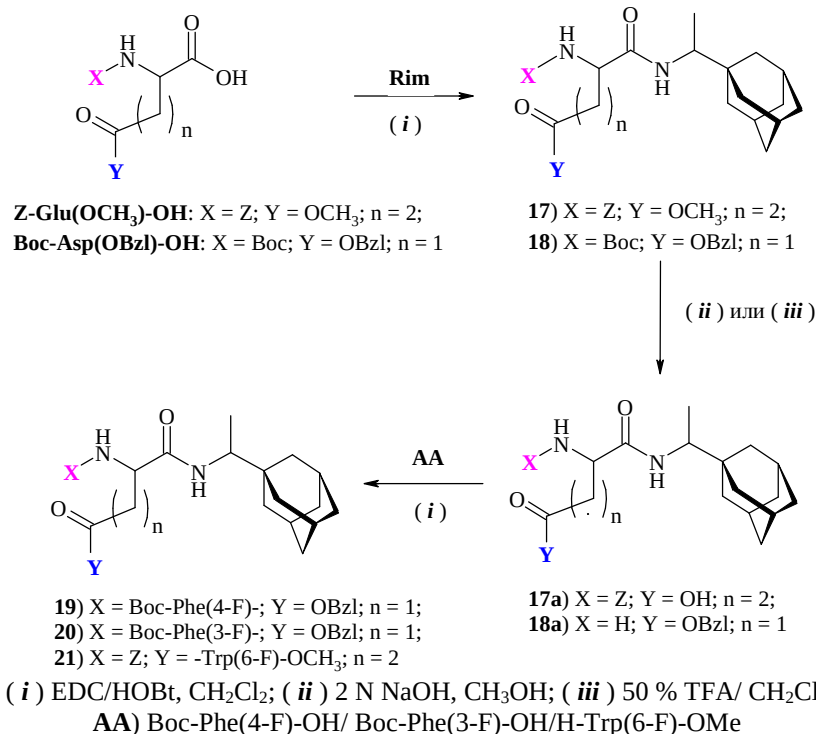


Схема 3.

Както е показано на **схема 3.** по-нататъшните трансформации на съединения (**17**, **18**) преминават през етапи на алкална - (**ii**) или киселинна (**iii**) [Гершкович А. А. и др. (1987)] хидролиза съответно до съединения (**17a**, **18a**). Кондензацията (**i**) на последните с флуориран аминокиселинен остатък (Boc-Phe(4-F)-OH/ Boc-Phe(3-F)-OH/ H-Trp(6-F)-OMe) бе провокирана от съобщените неотдавна литературни данни, че подобни модификации на оселтамовир с (H-Phe(4-F)-OH) инхибират *in vitro* грипната невраминидаза [Stankova I., et al. (2011)]. Новосинтезираните производни на римантадина (съединения **17-21**) от междинните и крайните етапи (**схема 3.**), бяха пречистени чрез колонна или препаративна тънкослойна хроматография върху силикагел.

В **UV** спектрите на всички синтезирани аминокиселинни производни на противогрипните агенти се наблюдават две области

на поглъщане - от 204 до 208 nm и от 225 до 315 nm. Абсорбцията в първата област е свързана с ароматното ядро, докато във втората област тя се дължи на amidната група.

Идентифицирането на всички синтезирани аминокиселинни амиди бе осъществено и чрез **IR** спектроскопия. Наблюдаваният абсорбционен максимум в интервала $3368-3254\text{ cm}^{-1}$ отговаря на *валентното трептене на NH-връзката*. Допълнителна информация за amidната група се получава от присъствието на ивица между $1695-1636\text{ cm}^{-1}$, свързана с *валентното C=O-трептене* на amidната група (амид I). По-ниско интензивната амид II- ивица при *транс*-вторичните амиди в интервала $1662-1519\text{ cm}^{-1}$, отговаря на описаното в литературата сложно трептене с деформация на N-H и разтягане, и свиване на C-N връзките. Доказването на амид-II ивицата е проблематично поради факта, че в същия интервал се идентифицират скелетните трептения на ароматния пръстен [Спасов Ст. и др. (1978)].

Абсорбционните максимуми в интервала $3100-2850\text{ cm}^{-1}$ съответстват на *валентното C-H трептене* на метиловите и метиленови групи. Допълнителното им охарактеризиране се осъществява от присъствието на характеристичен интервал при $1478-1407\text{ cm}^{-1}$, отговарящ на ножичните деформационни C-H трептения. Разцепването на абсорбционния максимум на третичната бутилова група в Вос- съдържащите съединения (**1- 3, 10, 11, 14- 16, 18- 20**) е изразено в две ивици със средна стойност 1390 cm^{-1} и 1365 cm^{-1} като нискофrequentният е около два пъти по-интензивен.

Скелетните трептения на ароматното ядро в съединения (**1- 13, 17- 21**) се характеризират с три ивици на поглъщане в интервала $1541-1509\text{ cm}^{-1}$. Вторият интервал $734-692\text{ cm}^{-1}$ е характерен за извънравнинни деформационни *C-H-арил-трептения*, по които може да се определи типа на заместване в ароматното ядро.

IR спектрите на съединенията съдържащи естерна група (**3, 6, 9, 11, 12, 16, 17, 21**) се характеризират с *C=O-валентни трептения* при $1730-1695\text{ cm}^{-1}$. Допълнително наблюдаваният абсорбционен максимум за *C-O-валентно трептене* в интервала $1252-1158\text{ cm}^{-1}$ е по-интензивен от съответната ивица за *C=O-валентни трептения*.

Освен това при последно посочените съединения се регистрира *антисиметричното валентно трептене на C-O-C-връзката* в интервала $1169-1051\text{ cm}^{-1}$.

В $^1\text{H-NMR}$ -спектрите на аминокадамантанови производни, модифицирани с аминокиселини (2, 5, 8, 15) се наблюдава както различие в аминокиселинния остатък, така и общи сигнали, характерни за остатъка от противогрипния агент. Сигналите за метиновите (3H, 3 x $>\text{CH-}$) и метиленови протони (12H, 6 x $-\text{CH}_2-$) от адамантановия скелет се регистрират в силно поле в интервалите $\square \sim 1.15\text{--}2.05$. Допълнителни сигнали се наблюдават при римантадин-съдържащите производни (1, 4, 7, 10, 13, 14, 17- 21) както следва: дублет, (3H) и мултиплет, (1H), съответно за метиловите (0.86-1.06 ppm) и метиновия протон (3.42-3.83 ppm) от страничната верига ($-\text{NHCHCH}_3$).

При аминокиселинните производни, съдържащи остатък от оселтамивир (3, 6, 9, 11, 12, 16) се явяват общи сигнали: интензивен триплет (6H) за метиловите протони и мултиплет за метиновия протон от остатъка $-\text{CH}(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$ съответно при $\delta \sim 0.77\text{--}0.94$ и $\delta \sim 3.40$. Метиленовите протони от същия остатък се наблюдават като мултиплет при $\delta \sim 1.20\text{--}1.49$, а тези от етоксилната група при $\delta \sim 3.70\text{--}4.14$. Циклохексеновият пръстен дава сигнали при 2.22-2.58 ppm (d, $-\text{CH}_2-$), 3.37-4.09 ppm (m, 3x $>\text{CH-}$) и синглет за олефиновия протон при 6.63-6.75 ppm. Интензивният синглет при 1.76-1.83 ppm отговаря на ацетиловите протони, а амидният протон от остатъка $-\text{NH}\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ се забелязва в слабо поле при 7.82-7.99 ppm.

Освен описаните по-горе сигнали в $^1\text{H-NMR}$ -спектрите на новополучените съединения, се явяват сигнали, присъщи за аминокиселинния остатък. При *N*-Вос- защитените производни (1- 3, 10, 11, 14-16, 18) трет. бутилова група се наблюдава като интензивен синглет (9H) в силно поле (1.20-1.50 ppm), а при $^{13}\text{C-NMR}$ се регистрира интензивен синглет при $\delta \sim 28.0$. Бензилната защита от страничната верига на аминокиселините при съединения (1-3, 17, 18) се явява в по-слабо поле при около 5.0 ppm и при около 50.0 ppm в $^{13}\text{C-NMR}$. При *N*-метиляни тирозинови аналози (1-3) се наблюдава синглет при $\delta \sim 2.63\text{--}2.73$ в $^1\text{H-NMR}$ и при $\delta \sim 30.3$ във $^{13}\text{C-NMR}$. Метиленовите протони от страничната верига на цистеина, аспарагиновата и глутаминовата киселина и от пирролидиновия пръстен на хидроксипролина се явяват в интервала $\delta \sim 1.70\text{--}3.90$.

В $^1\text{H-NMR}$ -спектрите метиновите протони при $\alpha\text{-C}$ на аминокиселинните аналози (10, 11, 14-18) се явяват при 3.2-3.5 ppm. Протонните и въглеродните сигналите за ароматния остатък са съответно при 6.9-7.5 ppm и около 120-130 ppm. При най-слабо поле

са сигналите за амидния протон ($\delta \sim 7.2-7.9$) и при около 170 ppm за амиден карбонилен C-атом.

За доказване на структурата на синтезираните съединения бе използвана маспектрометрия с електроспрей (ESI-MS) или химична (APCI-MS) йонизация. В режим на положителна йонизация в маспектрите на аминокиселинните амиди на противогрипните агенти се наблюдават следните йони: $([M]^+)$, $([M+H]^+)$, $([M+H-Boc+H]^+)$, $([M+H-56]^+)$, $([M+H-C(CH_3)_3+H]^+)$, $([M-Boc+H]^+)$, $([M-Bu^t+H]^+)$, $([M-Boc-Bzl+H]^+)$, $([M-H-Boc+H]^+)$, $([M+Na]^+)$, $([M+K]^+)$. В режим на отрицателна йонизация при маспектрометриране на синтезираните вещества се регистрира депротониран молекулен йон $([M-H]^-)$. Образуването му е характерно за органични молекули, носещи киселинни функционални групи като карбоксилни [Bruins A. P., et. al. (1987); Siu K. W. M., et. al. (1989); Loo J. A., et. al. (1992)] и др.

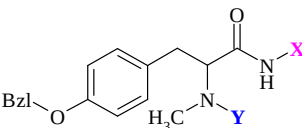
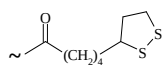
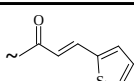
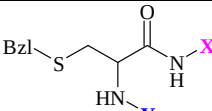
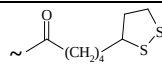
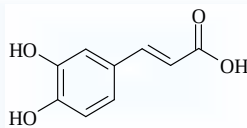
Прави впечатление, че при съединения (6, 9) в отрицателен режим на йонизация освен депротониран молекулен йон $([M-H]^-)$ се наблюдава и адукт с хлорен анион $([M+Cl]^-)$. По литературни данни молекулните йони на много органични съединения, в това число амиди, образуват адукти с йона на хлора при маспектрометриране в отрицателен режим [Tannenbaum H. P., et. al. (1975)]. Присъствието на монохалогенен адукт се доказва от регистрирания изотопен модел ($^{35}Cl/^{37}Cl$ в съотношение 3:1). За разлика от депротонираният молекулен йон, преимуществено образуване на $([M+Cl]^-)$ йон се наблюдава при аналити, които не притежават киселинни групи или подвижни водородни атоми [Zhu J., et. al. (2000)].

II.1.2. Изследване на антирадикаловата активност чрез 1, 1-дифенил-2-пикрилхидразилов (DPPH•) тест

За установяване на активността на тестваните съединения бе приложена модифицирана методика на Nenadis N., et al. [Nenadis N., et al. (2002)]. Методът се характеризира с висока възпроизводимост, лекота на изпълнение и други.

От посочените в таблица. 4 данни е видно, че сред тестваните синтетични производни *N*-Липоил-*N*-(CH₃)-Tyr(Bzl)-оселтамивирът (6) се откроява с най-висока активност при улавяне на DPPH• радикали. В сравнение с референтния антиоксидант (кафеена киселина) тестваните амиди са слаби радикалоулавящи агенти при приложения тест.

Таблица 4. Антирадикалова активност (% RSA) на противогрипни агенти модифицирани с аминокиселинни производни спрямо DPPH•

Съединение	X	Y	% RSA
	4) -Rim		4.2 ± 1.3
	5) -Am		1.8 ± 1.3
	6) -Os		15.0 ± 4.4
	7) -Rim		3.6 ± 0.7
	8) -Am		4.3 ± 0.6
	9) -Os		1.5 ± 0.7
	10) -Rim	-Boc	3.8 ± 1.3
	11) -Os		1.0 ± 0.7
	12) -Os		2.7 ± 0.7
	13) -Rim		2.5 ± 0.9
	*Кафеена киселина		93.5 ± 2.9

Стойностите в таблицата представляват средна стойност от три последователни измервания ± доверителен интервал, пресметнат при ниво на значимост 0.05

Тъй като от получените резултати не може да се направи цялостно заключение за антиоксидантния потенциал на веществата, планираме нашите по-нататъшни изследвания да бъдат насочени към прилагане и на други методики.

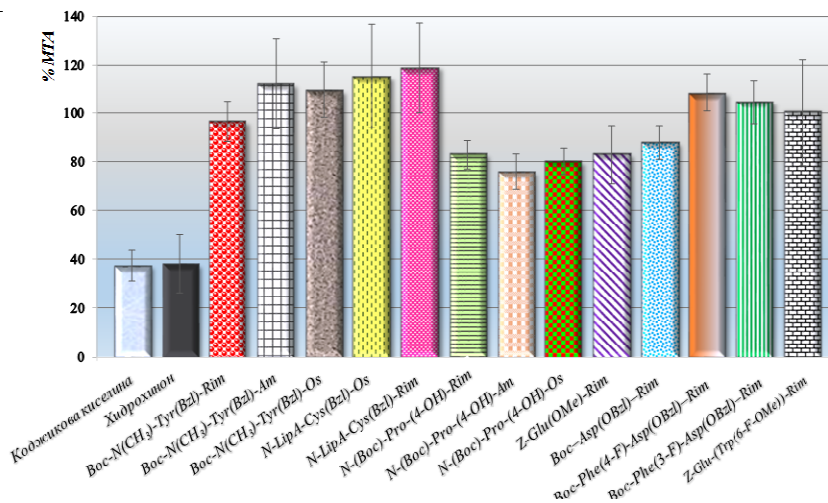
II.1.3. Определяне на тирозиназната активност (% МТА) чрез Доплахром - тест

Намерените литературни данни за тирозиназно инхибиране на амиди на противогрипни агенти [Baek H. S., et. al. (2008); Rho H. S., et. al. (2011); Kung-Cheng L., et. al. (2012); Chochkova M. G., et. al. (2014)] ни провокираха да изследваме съединенията за подобна активност.

Сред разнообразните варианти за определяне на тирозиназната активност ние се спряхме на *in vitro* определяне. Спектрофотометричното изследване бе проведено по модифицирана методика на Kwak *et. al.* чрез инхибиране на монофенолазната активност (*L*-тирозин) на тирозиназа изолирана от гъби при 475 nm [Kwak S. Y., et al. (2011)]. Като положителни контроли бяха използвани

коджикова киселина и хидрохинон. Колкото по-ниска е изчислената стойност на % МТА ($\% \text{ МТА} = \text{В/А} \times 100$), толкова инхибирането на ензима е по-ефективно.

Фиг. 39. Тирозиназна активност на противовогрипни агенти модифицирани с аминокиселинни производни



Стойностите във фигура представяват средна стойност от три последователни измервания $\pm$ доверителен интервал, пресметнат при ниво на значимост 0.05

Получените резултати (по формула $\% \text{ МТА} = \text{В/А} \times 100$) сочат, че тестваните съединения проявяват по-ниски стойности на инхибиране в сравнение с референтните инхибитори хидрохинон и коджикова киселина. Въпреки получените неудовлетворителни резултати на веществата като тирозиназни инхибитори, то е възможно да притежават потенциална депигментираща активност. За подобни случаи се споменава в литературата [Cho J. C., et. al. (2012)].

II.1.4. Изследване на противовогрипна активност *in vitro*

Синтезираните от нас амиди бяха изследвани за противовогрипно действие от колектив в Института по Микробиология „Стефан Ангелов” към БАН.

Изпитването за антивирусен ефект на синтезираните съединения (1-3, 17-21) е извършено *in vitro* по метода на инхибиране на вирусния цитопатичен ефект в монослойни клетъчни култури спрямо грипен вирус щам A/Aichi/H3N2. Като референтни инхибитори на репликацията на грипния вирус са използвани

амантадин, римантадин и оселтамивир карбоксилат. Резултатите от скрининга са представени в **таблица 5**.

Таблица 5. Ефект на противогрипни производни, модифицирани с аминокиселинни производни спрямо грипен вирус щам A/Aichi/H3N2

	Съединение	МТС (μM)	CC₅₀^a (μM)	IC₅₀^a (μM)	SI
1)	Boc-N(CH ₃)-Tyr(Bzl)-Rim	100	-	-	-
2)	Boc-N(CH ₃)-Tyr(Bzl)-Am	0.3	1.0 $\pm$ 0.6	-	-
3)	Boc-N(CH ₃)-Tyr(Bzl)-Os	>1000	-	-	-
17)	Z-Glu(OCH ₃)-Rim	3200	-	-	-
18)	Boc-Asp(OBzl)-Rim	32	10.1 $\pm$ 1.6	-	-
19)	Boc- Phe(4-F)-Asp(OBzl)-Rim	-	900 $\pm$ 12	-	-
20)	Boc- Phe(3-F)-Asp(OBzl)- Rim	-	155.1 $\pm$ 3.1	-	-
21)	Trp(6-F)-OCH ₃ Z-Glu –Rim	-	212.1 $\pm$ 3.6	-	-
	Римантадин	100	175	0.2	875
	Амантадин	100	330	1.6	206
	Оселтамивир карбоксилат	>100	80	>1.3	64

^a Средна стойност, получена от два независими опита с четири повторения във всеки един от тях $\pm$ стандартно отклонение; МТС: максимално поносима концентрация; CC₅₀: 50% цитотоксична концентрация; IC₅₀: 50% инхибираща концентрация SI (CC₅₀/IC₅₀): индекс на избирателност.

Изпитаните съединение не проявяват активност срещу репликацията на грипен вирус А (H3N2).

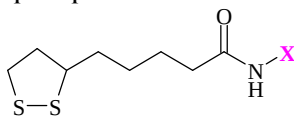
II.2. МОДИФИЦИРАНЕ НА ПРОТИВОГРИПНИ АГЕНТИ С ХЕТЕРОЦИКЛЕН ПРЪСТЕН

II.2.1. Производни, съдържащи тиолов и 1, 2-дитиолонов пръстен

II.2.1.1. Химични трансформации на противогрипни лекарства до N-липоиламиди чрез EDC/НОВt-метод

По литературни данни амидът на липоевата киселина с римантадин, потиска значително репликацията на A/Moscow/26/2009(H3N2), както и тази на пандемичен щам A/H1N1pdm [Shibnev V. A., et. al. (2012)]. Това ни иницира да свържем противогрипните агенти амантадин, римантадин и оселтамивир с антиоксидантната молекула на липоева

киселина. Кондензационната реакция бе осъществена чрез използване на **EDC/HOBt** метод. Получените амиди (съединения **(22-24)** **фиг. 40**) бяха изолирани хроматографски и спектрално охарактеризирани.



Фиг. 40.

	X
22)	-Am
23)	-Os
24)	-Rim

В $^1\text{H-NMR}$ -спектрите на съединения **22-24** освен описаните по-горе сигнали за остатъците от противогрипните агенти, се наблюдават и допълнителни сигнали, свързани с липоилния остатък. Метиленовите протони се регистрират като мултиплети (12H) в интервала $\delta \sim 1.25-3.15$, докато метиновият протон от 1,2-дителиановия пръстен се наблюдава като мултиплет при $\delta \sim 3.28-3.59$. Образуването на амидна връзка се потвърждава от присъствието на резонансни сигнали в $^1\text{H-NMR}$ при 7.19-7.79 ppm, а за амидни карбонилни C-атоми в $^{13}\text{C-NMR}$ спектъра при $\delta \sim 171.5$.

Корелацията на амидния протон в новосъздадената връзка на съединение **23** се наблюдава добре в двумерен $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY-спектр. От този спектр е видно, че амидният протон при 7.62 ppm се корелира с метиновия протон от циклохексеновия пръстен при 3.90 ppm. Подходът на хетероядрения $2\text{D}^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC NMR експеримент разкрива корелация между олефиновият протон (6.62 ppm) и въглеродният сигнал при 138.4 ppm.

Допълнителна информация за амидната връзка бе набавена и от IR спектралните данни, в които наблюдаваните абсорбционни максимуми в областта $3350-3200\text{ cm}^{-1}$ се дължат на валентното трептене на NH-връзката. Амид I ивицата се регистрира между $1680-1630\text{ cm}^{-1}$, а амид II- ивица се явява в интервала $1570-1515\text{ cm}^{-1}$. Структурите на N-липоиламидите бяха потвърдени и от ESI-MS. В техните спектри освен протониран молекулен йон, се забелязват още адукти с натрий $[\text{M}+\text{Na}]^+$ и калий $[\text{M}+\text{K}]^+$.

II.2.1.2. Получаване на амиди на (E)-3-(2'-тиенил)-пропенова киселина чрез конвенционален пептиден метод

Неотдавна е съобщено, че тиенилпропеново производно на римантадин е обещаващ M2 инхибитор спрямо резистентни грипни

щамове [Alhadeff R., et. al. (2014)]. Този факт ни насочи към получаване на подобни аналози на трите противогрипни агента (**схема 4.**).

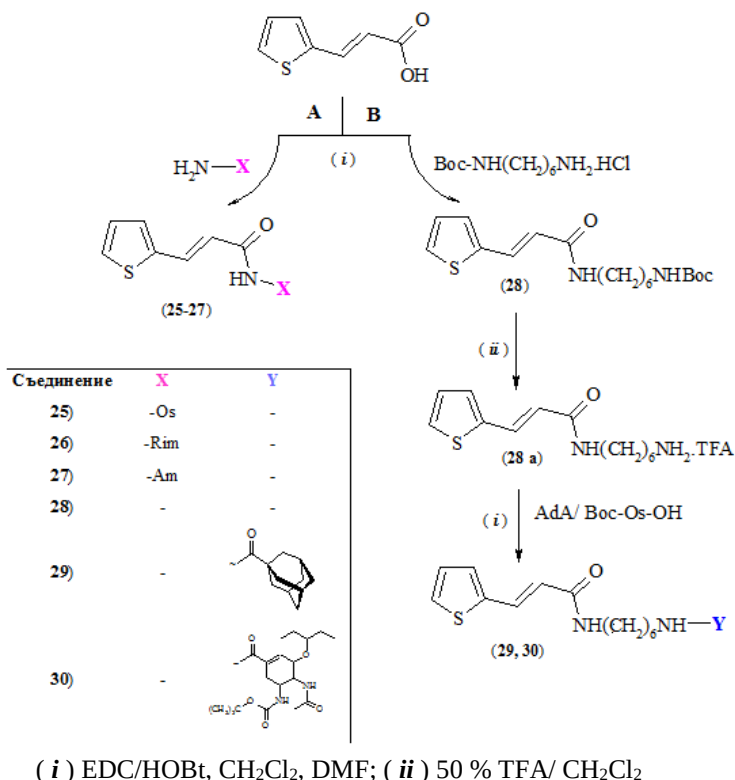


Схема 4.

Директното превръщане на (*E*)-3-(2'-тиенил)-пропенската киселина (ТрА) в амиди на трите противогрипни агента бе осъществено по **схема 4.А**

Установената от *Shibnev et. al.* противогрипна активност на амида на 1-адамантанкарбоксилна киселина с 1,6-диаминохексан провокираха интереса ни да получим комбинирани синергично действащи аналози чрез химично свързване [Shibnev V. A., et. al. (2012)]. За получаването на целевите съединения (**29**), (**30**) (**схема 4.В**) първоначално (*E*)-3-(2'-тиенил)-пропенската киселина (ТрА) бе свързана с Вос-1,6-диаминохексан хидрохлорид чрез **EDC/HOBt** метод. По-нататък киселинно лабилната Вос-група бе подложена на TFA-ацидолиза и полученото деблокирано производно **28a** бе

кондензирано с 1-адамантанкарбоксилна киселина и *N*-Вос-оселтамивир-1-карбоксилна киселина. Последната бе получена чрез химични трансформации на оселтамивир. За целта най-напред оселтамивир фосфат бе хидролизиран, след което аминокислотната група бе защитена с уретанов тип защита (Вос-).

За охарактеризиране на получените от нас производни бяха използвани твърде характеристичните $^1\text{H-NMR}$ спектри. Появата на двойка дублети (d) с еднакъв интензитет в областите при $\delta \sim 6.32-6.42$ и $\delta \sim 7.45-7.52$ се дължи на олефиновите протони от страничната верига на (*E*)-3-(2'-тиенил)-пропенската киселина. Ценна информация за геометричната изомерия на съединенията бе набавена от стойността на константата на спин-спиново взаимодействие ($^3J_{\text{H/H}}$) $\sim 15-16$ Hz. Съотношението $^3J_{\text{cis}} < ^3J_{\text{trans}}$ е винаги валидно за дадена двойка геометрични изомери [Спасов Ст., и др., (1978)], следователно високата стойност $\sim 15-16$ Hz определя *транс*-формата на получените аналози (*E*- π -диастереоизомерия). В $^{13}\text{C-NMR}$ образуването на амидна връзка се потвърждава от присъствието на резонансни сигнали в най-слабо поле ~ 164 ppm за амидни карбонилни C-атоми. Отсъствието на широка мултиплетна ивица между $2700-2300\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{O-H}}$ трептения от карбоксилната група) потвърждава получаването на амидна връзка. Абсорбционният максимум на амидната група в **IR** спектрите се наблюдава при около 3300 cm^{-1} .

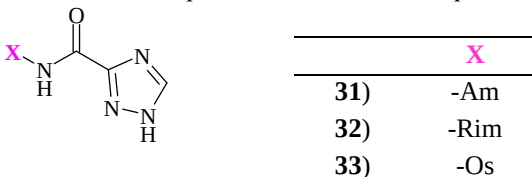
В пълно съответствие с останалите спектроскопски характеристики са маспектралните данни, показващи интензивни пикове с m/z , съответстващи на $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$.

II.2.2. Получаване на 1,2,4-триазол-3-карбоксамиди с противогрипни агенти

Намерените в литературата данни за тирозиназно-инхибиторната активност на подобни аналози са твърде оскъдни [Yu F., et. al. (2015); Rafiq M., et. al. (2016)]. С цел търсене на нови тирозиназни инхибитори трите противогрипни агента бяха трансформирани в амиди на 1,2,4-триазол-3-карбоксилна киселина.

За превръщането на противогрипните агенти (амантадин, римантадин, оселтамивир) в 1,2,4-триазол-3-карбоксамиди бе приложен **EDC/HOBt** метод. Въпреки че процесът бе проведен по упоменатия метод в продължение на 48 h, амидите **31-33** (**фиг. 41**)

бяха получени и изолирани чрез колонно-хроматографско и прапаративно-тънкослойно разделяне от сложни реакционни смеси.



Фиг. 41.

В **UV** (C_2H_5OH) спектрите на съединения **31-33** абсорбцията при 206 nm се наблюдава за триазолово ядро, а тази при 266 nm се свързва с абсорбция на амидната група.

Валентните честоти в **IR** спектрите на карбоксамидите при 3262-3213 cm^{-1} се отнасят за N-H трептенията. Абсорбционните ивици, обусловени от валентните въглерод-въглерод трептения на адамантановия и циклохексеновия скелет, се регистрират в областта 2965-2848 cm^{-1} . Наблюдаваните абсорбционни максимуми в интервала 1685-1650 cm^{-1} идентифицират валентните C=O трептения (Амид I ивица). Ивиците за Амид II и C=N се припокриват в областта 1640-1560 cm^{-1} .

Масспектрите на новосинтезираните съединения при електроспрей йонизация в отрицателен режим показват както депротониран молекулен йон, така и адукт с хлор $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$, а в положителен режим се забелязват не само мономолекулни натриеви и калиеви адукти, но и присъствие на димерни йони $[2M+Na]^+$.

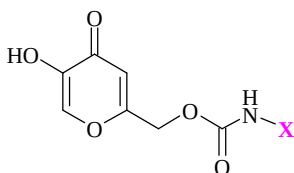
II.2.3. Селективно активиране на коджикова киселина с N,N' -карбонилимидазол и свързване с противогрипните агенти

Широкият спектър от биологични активности на коджиковата киселина ни подтикна да трансформираме последната до коджилкарбамати на противогрипните агенти.

В съответствие с методика, описана от *Kim H. et. al.*, коджиковата киселина бе активирана с N, N' -карбонилдиимидазол без предварителна защита на хидроксилната група на 5-^{то} място [*Kim H., et. al. (2004)*]. За да се подобри разтворимостта на коджиковата киселина в THF, бе добавено минимално количество DMF. Реакцията бе проведена при стайна температура в инертна атмосфера с цел да се избегнат странични реакции като окисление

на кожиковия остатък. Полученият имидазолкарбамат бе изолиран с висок добив (63 %) като бяло кристално вещество и спектралните му данни са в пълно съответствие с литературните.

По-нататък последният бе подложен на свързване чрез **EDC/HOBt** метод с трите противогрипни агента. Получените карбаматни производни (съединения **34-36** **фиг. 42**) бяха изолирани с ниски добиви чрез препаративна тънкослойна хроматография върху силикагел.



Фиг. 42.

	X
34)	-Am
35)	-Rim
36)	-Os

В **IR** спектрите на новополучените съединения се наблюдава допълнителна характеристична област на поглъщане $1716\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$ за вторични карбамати.

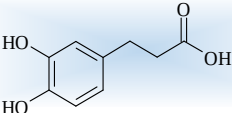
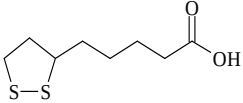
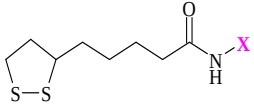
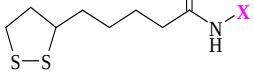
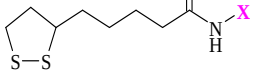
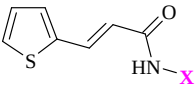
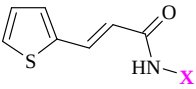
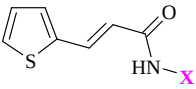
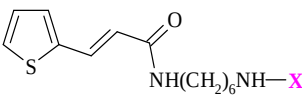
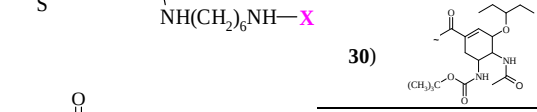
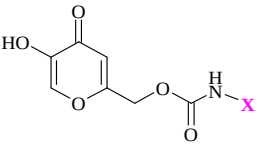
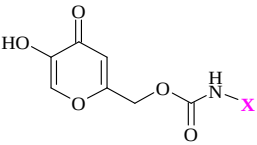
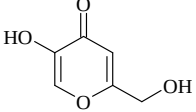
В **ESI-MS** спектрите на карбаматните аналози при положителен и отрицателен режим на йонизация се наблюдават следните адукти: $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M-H]^-$ и $[M+Cl]^-$.

II.2.4. Определяне на антирадикаловата способност на противогрипни производни, модифицирани с хетероциклен пръстен спрямо DPPH• радикал

Както бе споменато грипната инфекция се свързва с бързо развитие на оксидативен стрес в резултат на множество възпалителни процеси. Ефикасно средство при грипната химиотерапия се оказва комбинирането на противовирусни лекарства с антиоксидантни молекули [Uchide N., et. al. (2008); (2011)].

В тази връзка новополучените производни на противогрипните агенти с тиолов; 1,2-дителианов и γ -пиранонов пръстен бяха изследвани за антирадикалова активност (**таблица 6**).

Таблица 6. Антирадикалова активност (% RSA) на противогрипни агенти, модифицирани с хетероциклен пръстен

Съединение	X	% RSA
	*Кафеевна киселина	93.5 ± 2.5
	Липоева киселина	1.7 ± 0.7
	22) -Am	8.8 ± 1.9
	23) -Os	6.1 ± 1.6
	24) -Rim	8.1 ± 2.6
	25) -Os	8.0 ± 2.2
	26) -Rim	9.2 ± 2.6
	27) -Am	5.7 ± 1.6
	29)	6.2 ± 1.1
	30)	3.6 ± 1.0
	35) -Rim	3.2 ± 0.5
	36) -Os	4.8 ± 0.9
	Коджикова киселина	2.0 ± 0.6

*Кафеевата киселина бе използвана като стандартен антиоксидант.

Стойностите в таблицата представляват средна стойност от три последователни измервания ± доверителен интервал, пресметнат при ниво на значимост 0.05

Резултатите от анализа сочат, че тестваните съединения, сравнени със стандартния антиоксидант - кафеена киселина, не се открояват с „DPPH• погасяващи“ свойства. Въпреки че липоевата киселина е мощно действащ антиоксидант, в приложениия тест тя се проявява с по-ниска радикалоулавяща активност от тази на липоиламидите.

Наличието на антирадикалова активност е необходимо, но не и достатъчно условие за наличие на антиоксидантна активност.

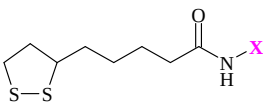
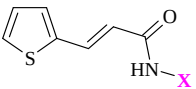
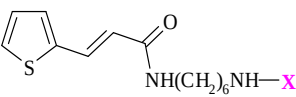
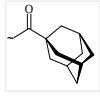
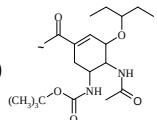
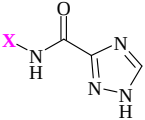
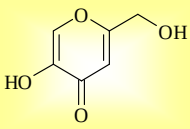
II.2.5. Определяне на тирозиназната активност (% МТА) чрез Допахром – тест

Атомите на азота и сярата изпълняват ключова роля при координиране на метали в металопротеините [Clare B. W., et. al. (2001)]. В тази връзка изследователската група на *Ghani U. et. al* изказва предположение, че едновременно с хидрофобността и монодентатното свързване на тиадiazолов, оксатиазолов и триазолови производни с активния център на тирозиназата (съдържащ два Cu^I йона тригонално координирани от имидазоловите пръстени на шест хистидинови остатъка) водят до повишено тирозиназно инхибиране [Ghani U., et. al. (2010)]. Освен това липоевата киселина е известна като депигментиращ агент [Baek H. S., et. al. (2008)]. Това ни даде основание да изследваме модифицираните с хетероциклен пръстен производни на противогрипните агенти. Считаме, че новополучените съединения биха могли да се проявят като потенциални тирозиназни инхибитори поради способността им да се координират с медните йони от активния център на тирозиназата.

Синтезираните от нас амиди на липоева, (*E*)-3-(2'-тиенил)-пропенова и 1,2,4-триазол-3-карбоксилна киселини с противогрипните агенти (съединения **22-27**, **29- 33**) бяха тествани за способността им да повлияват тирозиназната активност. Резултатите от тирозиназна активност са изчислени по формула $\% \text{ МТА} = \text{В}/\text{А} \times 100$ и са представени в **таблица 7**.

Данните показват, че въпреки очакваната ефективна тирозиназно-инхибиторна активност на тестваните производни, те проявяват слаба инхибиторна активност в сравнение с тази на използваните стандарти (коджикова киселина и хидрохинон).

Таблица 7. Тирозиназна активност (%MTA) на противогрипни агенти, модифицирани с хетероциклен пръстен

Съединение	X	% MTA
	22) -Am	110 ± 11
	23) -Os	103 ± 10
	24) -Rim	121 ± 12
	25) -Os	96 ± 7
	26) -Rim	108 ± 8
	27) -Am	117 ± 11
	29) 	135 ± 10
	30) 	103 ± 10
	31) -Am	81 ± 9
	32) -Rim	93 ± 10
	33) -Os	82 ± 8
	Коджикова киселина	37 ± 6
	Хидрохинон	38 ± 8

*Хидрохинонът и коджиковата киселина са използвани като стандартни тирозиназни инхибитори.

Стойностите в таблицата представляват средна стойност от три последователни измервания ± доверителен интервал, пресметнат при ниво на значимост 0.05

Независимо от липсата на тирозиназно инхибиране, в литературата съществуват данни за съединения с висока депигментираща активност, за които не е установено тирозиназно инхибиране [Cho J. C., et. al. (2012)].

II.2.6. Определяне на противовирусна активност на тиенилпропенови производни *in vitro*

Известно е, че производно на тиенилпропенова киселина с тиокарбамиден аналог на римантадина инхибира резистентни M2-S31N щамове на грипния вирус [Alhadeff R., et. al. (2014)]. Това ни инициира синтезираните от нас амиди **25-27** да бъдат предоставени за изследване на противогрипна активност. Резултатите от скрининга са представени в **таблица 8**.

Таблица 8. Ефект на тиенилпропенови производни спрямо грипен вирус щам A/Aichi/H3N2

Съединение	МТС (μM)	CC ₅₀ ^a (μM)	IC ₅₀ ^a (μM)	SI
25) TrA-Os	>1000	-	-	-
26) TrA-Rim	1000	-	-	-
27) TrA-Am	>1000	-	-	-
Римантадин	100	175	0.2	875
Амантадин	100	330	1.6	206
Оселтамивир карбоксилат	>100	80	>1.3	64

^a Средна стойност, получена от два независими опита с четири повторения във всеки един от тях; CC₅₀: 50% цитотоксична концентрация; МТС: максимално поносима концентрация; IC₅₀: 50% инхибираща концентрация; SI (CC₅₀/IC₅₀): индекс на избирателност.

Тестваните съединения се оказаха неактивни спрямо използвания грипен щам A/Aichi/H3N2.

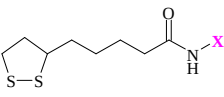
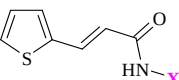
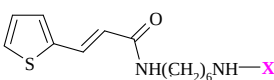
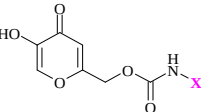
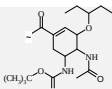
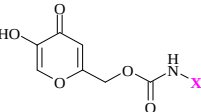
Успешното прилагане на триазолил-съдържащия рибавирин в борбата с вирусните респираторни заболявания ни насочи да проучим противогрипната активност на подобни съединения (**31-33** **фиг. 41**). *Предстои да бъде определена противогрипната им активност.*

II.2.7. Изследване на антимикробна активност на хетероциклени модификации на противогрипни агенти *in vitro*

Производните на липоева (**22-24**), (*E*)-3-(2'-тиенил)-пропенова (**25-30**) и коджикова (**34-36**) киселини са проучени за антибактериална и противогъбична активност в Институт по Микробиология „Стефан Ангелов” към БАН. Проведени бяха тестове спрямо *Грам-положителни* (*Staphylococcus aureus* 209 и *Bacillus subtilis* 1A95) и *Грам-отрицателни* бактерии (*Escherichia*

coli WF+ и *Pseudomonas aeruginosa* 5749), както и срещу патогенната гъба *Candida albicans* 562. Щамовете са от Българската национална колекция за микроорганизми и клетъчни култури (НБПМКК). Минималната инхибираща концентрация (MIC) на всяко съединение е определена по метода на серийното разреждане в течна хранителна среда. Като положителни контроли бяха използвани антибиотиците тобрамицин и гентамицин и противогъбичният препарат кетоконазол. Резултатите от анализите са представени в **таблица 9**.

Таблица 9. Антимикробна активност на противогрипни агенти модифицирани с хетероциклен пръстен *in vitro* (MIC (µg/ml))

Съединение	X	MIC (µg/ml)				
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aerug.</i>	<i>B. subt.</i>	<i>C. albicans</i>
	22) -Am	↗ 313	↘ 625	↘ 625	↗ 313	↗ 156
	23) -Os	↘ 1250	↗ 313	↘ 625	↘ 625	↗ 313
	24) -Rim	↘ 1250	↗ 313	↘ 625	↘ 625	↗ 313
	TrA	↘ 750	↗ 375	NT	NT	↘ 1500
	25) -Os	↗ 188	↗ 47	NT	NT	↗ 188
	26) -Rim	↗ 188	↗ 188	NT	NT	↗ 375
	27) -Am	↘ 750	↗ 47	NT	NT	↘ 750
	28) -Boc	↘ 750	↗ 47	NT	NT	↘ 1500
	29) 	↘ 750	↘ 750	NT	NT	↘ 1500
	30) 	↘ 750	↗ 375	NT	NT	↘ 1500
	34) -Am	↗ 250	↗ 250	↗ 125	↗ 125	↗ 250
	35) -Rim	↗ 31	↗ 125	↗ 125	↗ 31	↗ 125
	36) -Os	↘ 626	↘ 625	↗ 313	↗ 313	↘ 625
Тобрамицин		↗ 15,6	↗ 19,5	NT	↗ 1,0	NT
Гентамицин		NT	NT	↗ 0,3	NT	NT
Кетоконазол		NT	NT	NT	NT	↗ 7,8

Легенда: **Зелена стрелка**-активни (MIC <250 µg/ml); **Жълта стрелка** – умерена активност (MIC 250-500 µg/ml); **Червена стрелка** – слаба активност до неактивни (MIC >500 µg/ml); NT-не е тествано

Сред тестваните три групи хетероциклени производни се открояват тези на коджиковата киселина. Резултатите ясно демонстрираха, че коджилкарбаматът на римантадина **35** проявява най-висока антибактериална активност и то спрямо *Грам*-

положителните *Staphylococcus aureus* 209 и *Bacillus subtilis* 1495. Активността на съединението (**MIC** 31 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) е два пъти по-слаба от тази на използвания антибиотик тобрамицин (**MIC** 15.6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$). За новополученото производно **35** е установена около четири пъти по-слаба активност (**MIC** 125 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) спрямо двата тествани *Грам-отрицателни* бактериални щамове. Наблюдаваното различие в активността на съединение **35** спрямо *Грам-положителните* и *Грам-отрицателните* бактерии, най-вероятно се дължи на различието в морфологията на клетъчните им стени. Резултатите от проведения антибактериален скрининг разкриват, че съединения **25** и **26** (**MIC** 188 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) са активни спрямо *Staphylococcus aureus* 209, докато съединения **25**, **27** и **28** се открояват с подчертана антибактериална активност спрямо *Escherichia coli* WF+. Последните три амида притежават една и съща активност (**MIC** 47 $\mu\text{g.ml}^{-1}$), която е около 2.4 пъти по-ниска от тази на тобрамицина. Сред новосинтезираните съединения най-висока противогъбична активност е установена за съединения **22** (**MIC** 156 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) и **35** (**MIC** 125 $\mu\text{g.ml}^{-1}$). Коджилкарбаматът на римантадина (**35**) се откроява като най-активен антибактериален и антимикотичен агент. Съединението се очертава като най-перспективно както за хранителната, така и за козметичната индустрия.

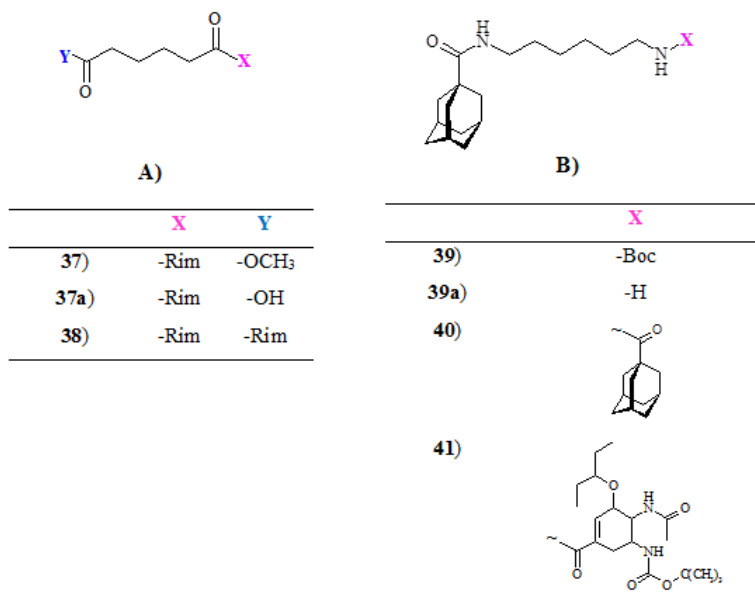
II.3. СВЪРЗВАНЕ НА АНТИМИКРОБИАЛНИ АГЕНТИ ЧРЕЗ ПОЛИАМИНЕН/ДИКАРБОКСИЛЕН ЛИНКЕР

Сред голямото разнообразие от литературни данни, касаещи механичното комбиниране на противогрипни агенти, сведения за химически свързани инхибитори са рядкост. Неотдавна екипът на *Stankova I. et. al.* съобщава за амид на оселтамивир с римантадин, който проявява значителна противогрипна активност спрямо щам A/Aichi/H3N2 [Stankova I., et. al. (2011)]. Тези резултати ни насочиха да получим подобни съединения, разделени помежду си чрез полиаминен (дикарбоксилен) линкер.

➤ Модификации на римантадин с адипинова киселина

Въвеждането на дикарбоксилен линкер между противогрипните агенти бе осъществено чрез използване на фирмен продукт (монометил адипат). Най-напред бе осъществена кондензационна реакция (**EDC/HOBt** метод) между метилов естер на хексан-1,6-дикарбоксилна киселина с противогрипния агент римантадин (съединение **37**, **фиг. 43A**). По-нататък след алкална

хидролиза получената структура (съединение **37a**) бе модифицирана с римантадин (съединение **38**, фиг. 43A).



Фиг. 43.

➡ **Получаване на диамиди на 1,6-диаминохексан с 1-адамантанкарбоксилна киселина/Вос-оселтамивир 1-карбоксилна киселина**

Свързването на два адамантанови остатъка чрез полиаминен линкер включва трансформация на Вос-1,6-диаминохексан до амид на 1-адамантан карбоксилна киселина (съединение **39**, фиг. 43B). Полученият *N*-адамантоил-*N'*-(*t*-бутилоксикарбонил)-1,6-диаминохексан (**39**) бе подложен на TFA-ацидолиза до деблокиран продукт **39a** (фиг. 43B). Последният бе кондензиран чрез **EDC/HOBt** метод както с 1-адамантанкарбоксилна киселина до производно **40**, така и с *N*-Вос-оселтамивир-1-карбоксилна киселина до продукт **41**. Новополучените производни (съединения **37**, **38**, **40**) бяха пречистени чрез прекристализация из EtOAc (PE:EtOAc), а съединения **39** и **41** - чрез колонна хроматография.

Наблюдаваните сигнали в ¹H-NMR-спектрите на съединения **37**, **38**, **41** в интервала 1.01-1.84 ppm се дължат на метиловите протоните от римантадиновия остатък (d, 3H, >CHCH₃) и ацетилната

група на оселтамивира (s, 3H, -C(O)CH₃). В същия интервал се регистрират два високо интензивни сигнала (s) на съединения **39** (1.31 ppm) и **41** (1.74 ppm), дължащи се на (9H, -C(CH₃)₃) от Восзащитната група. Последните предизвикват силно изразено разцепване на абсорбционния максимум в **IR** спектрите на двете съединения при около 1390 cm⁻¹ и 1366 cm⁻¹ за симетрично деформационно CH₃-трептене при геминално разположени метилови групи. Валентните CH₃-трептения се наблюдават като високо интензивен максимум при ~2950 cm⁻¹.

¹H-NMR-спектрите показват присъствие на метиленови протони като (m) в интервала 1.2-1.8 ppm както от адамантановия скелет, така и от линкерната част. В областта на валентните трептения (2900-2850 cm⁻¹) при **IR** спектрите се идентифицират метиленовите групи, чиито махални трептения се наблюдават като нискоинтензивната ивица при около 720 cm⁻¹.

Допълнителен сигнал в ¹H-NMR-спектъра на амида на монометиладипат с римантадин (съединение **37**) се наблюдава за метоксилните протони при δ~3.71 като остър синглет (s, 3H, -OCH₃). Въглеродният атом от метоксилната група във ¹³C-NMR-спектъра дава резонансен сигнал при 51.6 ppm.

Сигналът за амиден NH-протон при всички съединения е широк и се явява в слабо поле при δ~5.30-7.99, докато amidният въглероден атом във ¹³C-NMR-спектъра е при ~173.9 ppm.

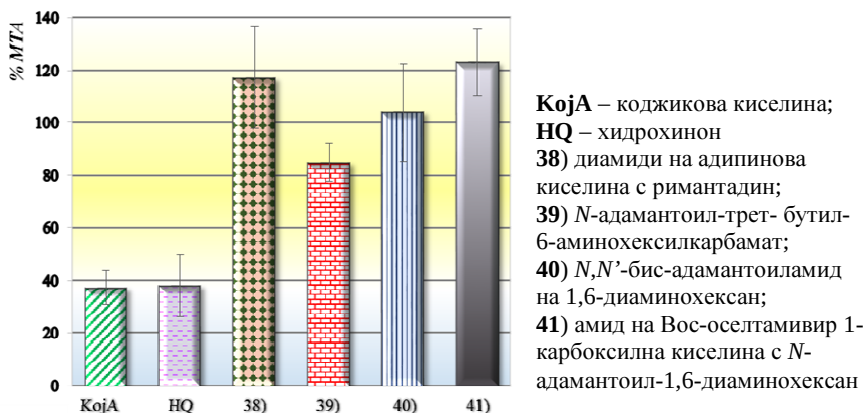
Потвърждение за новообразуваната amidна връзка бе набавена и от вибрационните спектри. Валентните трептения на NH- връзката предизвикват абсорбционни максимуми при 3320-3294 cm⁻¹. Амид I и Амид II ивиците обхващат интервалите съответно при 1710-1626 cm⁻¹ и 1630-1626 cm⁻¹.

В пълно съответствие с останалите спектроскопски характеристики са и масспектрните данни. В **ESI-MS** спектрите на съединенията се наблюдават пикове за [M+H]⁺ или [M+Na]⁺, или [M+K]⁺.

II.3.1. Определяне на тирозиназната активност (% МТА) чрез Допахром – тест [Kwak S. Y., et al. (2011)]

Изследвано е влиянието на производните, съдържащи полиаминен (дикарбоксилен) линкер върху дифенолазната активност на тирозиназа (*Agaricus bisporus*) при 480 nm (фиг. 44.).

Фиг. 44. Сравнение на тирозиназна активност на новосинтезирани производни със стандартни тирозиназни инхибитори (коджикова киселина и хидрохинон)



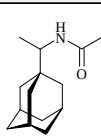
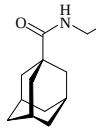
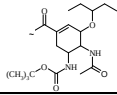
Стойностите във фигурата представляват средна стойност от три последователни измервания $\pm$ доверителен интервал, пресметнат при ниво на значимост 0.05

От фигурата се вижда, че изследваните производни проявяват по-висока тирозиназна активност в сравнение с използваните референтни инхибитори. Установените стойности за тирозиназна активност над 100 % показват, че тестваните съединения се явяват по-скоро като активатори на ензима, отколкото негови инхибитори.

II.3.2. Изследване на антимикробиялното действие на новополучените производни *in vitro*

За изследване на антимикробиялната активност бяха подбрани пет производни **38-41; 39a**. Резултатите от скрининга, посочени в **таблица 10**, разкриват, че най-висока антибактериална активност спрямо *S. aureus* 209 проявяват съединения **39a** (MIC 156 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) и **40** (MIC 125 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Важно е да се отбележи, че *N,N'*-бис-адамантоиламида на 1,6-диаминохексана (**40**) потиска микробиялния растеж (MIC 125 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) както на *Грам-положителните*, така и на *Грам-отрицателни* бактериални щамове. Прави впечатление, че единствено съединения **38** и **40** проявяват антимикотична активност. Римантадиновото производно **38** проявява висока активност (MIC 125 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), докато съединение **40** се откроява с подчертана противогъбична активност (MIC 63 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Таблица 10. Антимикробна активност на моно- и диамидни производни

Съединение	X	MIC (µg/ml)					
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aerug.</i>	<i>B. subt.</i>	<i>C. albicans</i>	
	38)	-Rim	↓ 500	→ 250	→ 250	→ 250	↑ 125
	39)	-Boc	↓ 625	↓ 625	→ 313	↓ 625	→ 313
	39a)	H	↑ 156	↓ 625	→ 313	↓ 625	→ 313
	40)	-	↑ 125	↑ 125	↑ 125	↑ 125	↑ 63
	41)		↓ 625	→ 313	↓ 625	↓ 625	→ 313
Тобрамицин			↑ 15,6	↑ 19,5	NT	↑ 1,0	NT
Гентамицин			NT	NT	↑ 0,3	NT	NT
Кетоконазол			NT	NT	NT	NT	↑ 7,8

Легенда: Зелена стрелка-активни (MIC <250 µg/ml); Жълта стрелка – умерена активност (MIC 250-500 µg/ml); Червена стрелка – слаба активност до неактивни (MIC >500 µg/ml); NT-не е тествано

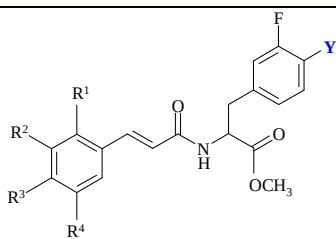
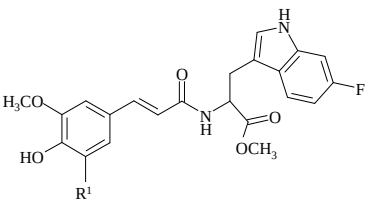
II.4. ХАЛОГЕНИРАНИ ПРОИЗВОДНИ НА АНТИМИКРОБИАЛНИ АГЕНТИ

II.4.1. Свързване на противогрипни агенти с *N*-цинамоил- и хидроксидинамоиламиди на монофлуорирани аминокарбоксилни киселини

При дизайна на занамивир (невраминидазен инхибитор) с противовъзпалителни агенти установяват значителна инхибиторна активност *in vivo* срещу репликацията на грипен вирус тип A/H1N1 [Liu K. C., et. al. (2012)].

В търсене на потенциални лекарствени агенти с две различни мишени ние свързахме чрез аминокиселинен линкер подобни производни, включващи противовирусен агент (оселтамивир или римантадин) и заместени канелени киселини, притежаващи противовъзпалително действие. За целта първоначално бяха получени чрез EDC/HOBt метод амиди на канелена и заместени канелени киселини (*o*-кумарова, *p*-кумарова, синапова и ферулова) с монофлуорирани аминокарбоксилни производни (HCl. H-Trp(6-F)-OMe; HCl. H-Phe(3-F)-OMe; HCl. H-Tyr(3-F)-OMe).

След хроматографско пречистване получените амиди (**фиг. 45, съединения (42-49)**) бяха охарактеризирани чрез ъгъл на въртене, UV, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^{19}\text{F-NMR}$, ESI-MS.

Съединение	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Y
	42)	ОН	Н	Н	Н
	43)	Н	Н	ОН	Н
	44)	Н	ОСН ₃	ОН	ОСН ₃
	45)	Н	Н	Н	Н
	46)	Н	ОСН ₃	ОН	ОСН ₃
	47)	Н	ОСН ₃	ОН	Н
Съединение	R ¹				
	48)	Н			
	49)	ОСН ₃			

Фиг. 45.

UV спектрите на синтезираните амиди разграничават две области на поглъщане от 201 до 230 nm и от 276 до 332 nm с регистриране на интензивни ивици на поглъщане при ~203, 230, 280 и 320 nm.

Допълнително за структурната оценка на флуорираните цинамоиламиди бе получена изчерпателна информация от **NMR**-изследванията на водородните (протоните), въглеродни и флуорни ядра.

Образуването на амидната връзка бе потвърдено от регистрираните сигнали в $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}$ спектри съответно при ~6.20 ppm и при ~166 ppm. За установяване конфигурацията на новополучените съединения по отношение на олефиновата система ($-\text{HC}=\text{CH}-$) бе използван $^1\text{H-NMR}$, където олефиновите протони се явяват като два дублета (d) при $\delta \sim 6.22-6.62$ и $\delta \sim 7.51-8.01$. От стойността на константата на спин-спиново взаимодействие ($^3J_{\text{H/H}} \sim 15.0-15.9$ Hz) бе определена (*E*)- π -диастереоизомерна форма при всички съединения. Въглеродните атоми от същата група се

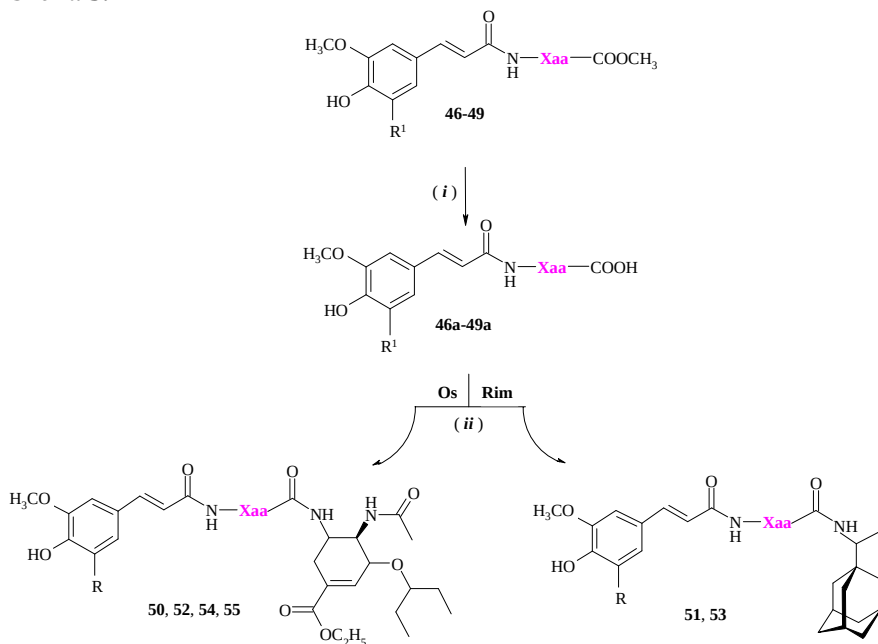
забелязват във $^{13}\text{C-NMR}$ спектрите при $\delta \sim 140$ и $\delta \sim 118$ съответно. При анализ на $^1\text{H-NMR}$ спектър се забелязват сигнали в интервалите $\delta \sim 3.8$ и $\delta \sim 5.0$ съответно интензивен синглет (s) за метоксилните протони ($-\text{OCH}_3$) и четворен дублет (dddd) за метиновия протон ($>\text{CH}-$). Освен това в интервала $\delta \sim 52-53$ на $^{13}\text{C-NMR}$ спектъра се регистрират сигнали, които потвърждават присъствие на метоксилния и α -C-атом ($>\text{CH}-$). Ароматните протони от хидроксидинамоилния остатък така и от страничната верига се забелязват в слабо поле $\sim 6.72-7.44$.

За по-обстойно изучаване структурата на амиди на заместени канелени киселини с монофлуорирани аминокарбоксилни киселини бе приложен $^{19}\text{F-NMR}$. При изследване на флуорния резонанс се регистрира сигнал $\delta \sim -110$, който идентифицира присъствие на F-ArC връзка.

Масспектралният анализ за всички синтезирани аналози разкрива наличие на протонирани молекулни йони, адукти с натрий, както и димерни молекулни йони $[2\text{M}+\text{H}]^+$ и $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

Сред получените амиди на заместени канелени киселини с монофлуорирани аминокарбоксилни киселини бяха подбрани синапоил- и ферулоиламидите (съединения **46**, **47**, **48**, **49**), които след алкална хидролиза (**схема 5** етап (i)) съединения **46a**, **47a**, **48a**, **49a**) бяха подложени на кондензация с противогрипните агенти римантадин и оселтамивир (**схема 5** етап (ii)). Новите диамидни производни бяха получени като хроматографски чисти продукти (**схема 5**. съединения (**50**, **51**, **52**, **53**, **54**, **55**)) и структурата им бе потвърдена спектрално.

Схема 5.



(i) 2 N NaOH, CH₃OH; (ii) EDC/HOBt, CH₂Cl₂

Съединение	R ¹	Xaa
50)	H	-Phe(3-F)-
51)	H	-Phe(3-F)-
52)	OCH ₃	-Phe(3-F)-
53)	OCH ₃	-Phe(3-F)-
54)	H	-Trp(6-F)-
55)	OCH ₃	-Trp(6-F)-

Съединенията, съдържащи римантадинов остатък (съединения **51**, **53**), бяха допълнително изследвани и чрез двумерационална ¹H,¹H COSY спектроскопия. От тези спектри е видно, че метиновият протон (δ~4.7) от аминокиселинния остатък се корелира както с протоните на съседната метиленова група от същия остатък (δ~2.9), така и с амидния протон (δ~8.1). Анализът на **2D** ¹H, ¹H-NMR в новообразуваната амидна връзка при разглежданите

съединения разкрива корелация между метиновия протон ($\delta \sim 3.5$) от римантадиновия остатък както с протоните на съседната метилова група ($\delta \sim 0.9$), така и с амидния протон ($\delta \sim 7.6$). В допълнение единият от олефиновите протони на (*E*)- π -диастереоизомерната двойка при $\delta \sim 6.5$ се корелира с другия при $\delta \sim 7.3$.

Идентифицирането на хидроксилната група в **IR** спектрите на съединения **50-55** по съответната ивица при $3533\text{-}3266\text{ cm}^{-1}$ е еднозначно. Двата интензивни сигнала в областта $1682\text{-}1545\text{ cm}^{-1}$ характеризират амид I и амид II ивиците, а допълнително наблюдавания абсорбционен максимум $\nu_{\text{C=O}}$ при $\sim 1710\text{ cm}^{-1}$ (съединения **50**, **52**, **54**, **55**) определя присъствието на естерната група от остатъка от неврамидазния инхибитор - оселтамивир.

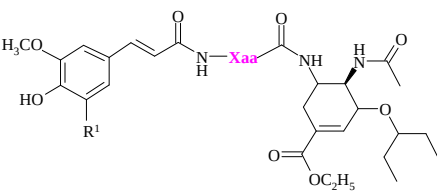
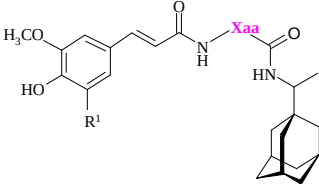
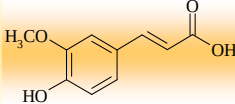
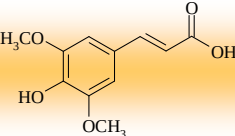
Допълнително охарактеризиране на синтезираните съединения чрез маспектрален анализ разкрива присъствие на йони $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$ в положителен режим на йонизация и наличие на $[\text{M}-\text{H}]^-$, $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ в отрицателен режим за съединения **54**, **55**. Регистрираните сигнали в **HRMS** спектрите на съединения **50-53** съответстват на теоретично изчислените за предложените структури. В положителния **HRMS-ESI** на съединения **50**, **52** и **53** е регистриран пик за $[\text{M}+\text{H}]^+$ при m/z 654.31871 (изчислено $\text{C}_{35}\text{H}_{45}\text{O}_8\text{N}_3\text{F}$: 654.31852), m/z 684.32960 (изчислено $\text{C}_{36}\text{H}_{47}\text{O}_9\text{N}_3\text{F}$: 684.32908) и m/z 551.29178 (изчислено $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{O}_5\text{N}_2\text{F}$: 551.29158), който съответства на молекулната маса. Докато при съединение **51** е забелязан пик за $[\text{M}+\text{Na}]^+$ при m/z 543.26303 (изчислено $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{O}_4\text{N}_2\text{FNa}$: 543.26296), което показва молекулна маса 520 съвместима с брутна формула $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{O}_4\text{N}_2\text{F}$.

II.4.1.1. Изследване на антирадикалова активност чрез DPPH• тест

Получените халогенирани хидроксиданамоилови производни на антимикробни агенти (съединения **50-55**) бяха тествани за способността им да улавят DPPH• радикал. Получените резултати (таблица 11.) сочат, че всички тествани съединения притежават изключителна способност да улавят органичния хидразилов радикал. Също така важно е да се отбележи, че модификациите на синапова и ферулова киселини водят до получаването на по-активни антиоксиданти от свободните фенолни киселини.

Установената висока антирадикалова активност на посочените съединения ги прави потенциални антиоксиданти и това ни дава основание да задълбочим изследванията в тази насока.

Таблица 11. Радикалоулавяща способност на хидроксицинамоиламиди

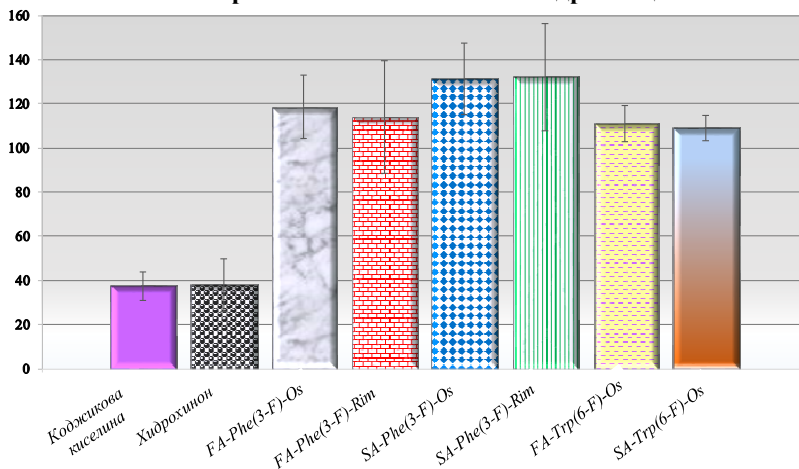
Съединение	Заместители		% RSA
	R ¹	Xaa	
	50) H	Phe(3-F)	78 ± 4
	52) OCH ₃	Phe(3-F)	91 ± 1
	54) H	Trp(6-F)	79 ± 5
	55) OCH ₃	Trp(6-F)	84 ± 7
	51) H	Phe(3-F)	73 ± 5
	53) OCH ₃	Phe(3-F)	89 ± 3
	*Ферулова киселина		57 ± 2
	*Синапова киселина		76 ± 2

Стойностите в таблицата представляват средна стойност от три последователни измервания ± доверителен интервал, пресметнат при ниво на значимост 0.05

II.4.1.2. Определяне на тирозиназната активност (% МТА) чрез Допакром – тест

Високата антирадикалова активност на новополучените съединения (50-55), както и обещаващите резултати на Baek *et. al.* [Baek H., *et. al.* (2008)] за ролята на *N*-хидроксицинамоиламиди с адамантан като мощни антиоксиданти и меланинови инхибитори (клинично установени върху доброволци) ни насочи към определяне на тирозиназната им активност. Получените резултати (фиг. 46) сочат, че тирозиназата не се инхибира *in vitro* спрямо приложения тест. При провеждане на подобно изследване върху тирозиназа (*Agaricus bisporus*) Chochkova M. *et. al* установяват висока инхибиторна активност на хидроксицинамоиламид на оселтамивир [Chochkova M. G., *et. al.* (2014)].

Фиг. 46. Гъбична тирозиназна активност на хидроксицинамоиламиди



Стойностите във фигурата представляват средна стойност от три последователни измервания $\pm$ доверителен интервал, пресметнат при ниво на значимост 0.05

II.4.1.3. Изследване на противовирусна активност *in vitro*

Резултатите от изпитването за противогрипна активност на съединения 50-55 (таблица 12.) показаха, че не се наблюдава инхибиране на вирусната репликация на тествания грипен щам.

Таблица 12. Ефект на противогрипни производни на *N*-хидроксицинамоил аминокиселинни амиди спрямо грипен вирус щам A/Aichi /H3N2

Съединение	MTC (μ M)	CC ₅₀ ^a (μ M)	IC ₅₀ ^a (μ M)	SI
50) FA-Phe(3-F)-Os	100	350	-	-
51) FA-Phe(3-F)-Rim	3.2	10	-	-
52) SA-Phe(3-F)-Os	100	530	-	-
53) SA-Phe(3-F)-Rim	10	5	-	-
54) FA-Trp(6-F)-Os	100	312	-	-
55) SA-Trp(6-F)-Os	100	280	-	-
Римантадин	100	175	0.2	875
Амантадин	100	330	1.6	206
Оселтамивир карбоксилат	>100	80	>1.3	64

^a Средна стойност, получена от два независими опита с четири повторения във всеки един от тях; CC₅₀: 50% цитотоксична концентрация; MTC: максимално поносима концентрация; IC₅₀: 50% инхибираща концентрация; SI (CC₅₀/IC₅₀): индекс на избирателност.

II.4.2. α , β -Дибромохидроцинамоиламинокиселинни производни на противогрипните агенти

II.4.2.1. Бромилане на амиди на канелена киселина с аминокиселинни производни

Известно е, че при бромилане в страничната верига на канелената киселина и нейните производни се получават вицинални 2,3-дибромопроизводни, които се отличават с висока антимикробна активност [Narasimhan B., et. al. (2004); Jitäreanu A., et. al. (2011); Bisogno F., et. al. (2007)]. При конвенционалното бромилане използваният молекулен бром оказва своя вреден ефект както върху хората, така и върху околната среда. Освен това реакцията се провежда в среда от хлоросъдържащи разтворители като тетрахлометан или дихлометан, които са потенциални канцерогени [McKenzie L. C., et. al. (2005)]. С цел да се намали отрицателното влияние на подобни реакции и техните съпътстващи странични продукти, през последните години силно нарастна интересът към „Зелената химия“ сред научноизследователската гилдия и индустриалната сфера. Следвайки „зелените“ принципи на тази перспективна област, нашите усилия бяха насочени към разработване на алтернативни методи за бромилане на (E)-N-цинамоиламинокиселинни амиди. За целта бромилането бе проведено и сравнено както по две алтернативни методики (таблица 13. (A), (B)), така и по конвенционален метод (таблица 13. (C)).

II.4.2.1.1. „Зелено“ бромилане с йонни течности по модифицирана методика на Primerano P., et al. [Primerano P., et al. (2013)]

Изходните N-цинамоиламиди (56-60) бяха подложени на бромилане чрез модифицирана сонохимична реакция [Primerano, P. et. al. (2013)] (таблица 13. (A)). Сред голямото разнообразие от йонни течности, ние се спряхме на 1-бутил-3-метилимидазолиев тетрафлуороборат. Поради намалената разтворимост на N-цинамоиламидите в стехиометричното съотношение йонна течност/вода (1:3), бе използван излишък на бром.

II.4.2.1.2. Окислително бромилане

Вторият „зелен“ подход, който бе използван при бромилане на N-цинамоиламиди (56-60), включва използването на $\text{HBr}/\text{H}_2\text{O}_2$ [Barhate N. B., et. al. (1999)]. Окислението на HBr от H_2O_2 е свързано с *in situ* образуване на бром, а водата е единствен страничен продукт [Yao H., et. al. (2000); Noyori R., et. al. (2003); Balagam B. et. al., (2008)]. За ускоряване на химичната реакция, както и добивите на

реакционните продукти, бромирането бе проведено при сонохимично активиране (таблица 13. (В)).

II.4.2.1.3. Конвенционален метод за бромиране

А_Е реакцията бе проведена в хлоросъдържащ разтворител по класическия метод съобразно добре известната процедура на *Физер М.* [Физер М. и др. (1971)] (таблица 13. (С)).

Таблица 13. Бромиране на *N*-цинамоиламиноокиселинни амиди

Съединение	R ¹	R	Метод	Реакционно време, h	Добив (%)	Е-фактор ^a на атомите ^{a,b}	„Икономия“ (%)
56a)	CH ₃	C(CH ₃) ₃	A		1	60	65.5
			B		0.5	65	52.6
			C		4	57	99.5
57a)	CH ₂ -C ₆ H ₅	C(CH ₃) ₃	A		1	40	69.1
			B		0.5	44	52.2
			C		4	40	99.6
58a)	CH ₂ -C ₆ H ₄ (3-F)	CH ₃	A		1	39	68.0
			B		0.5	42	52.3
			C		4	37	99.6
59a)	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	A		1	45	86.0
			B		0.5	48	52.7
			C		4	45	99.5
60a)	CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	CH ₃	A		1	39	65.8
			B		0.5	40	52.7
			C		4	39	99.8

A) Ултразвуково бромиране с използване на йонна течност (IL: 1-бутил-3-метилимидазолиев тетрафлуороборат)

B) Окислително сонохимично бромиране чрез HBr/H₂O₂

C) Конвенционално бромиране

Идеални условия: ^aЕ-фактор = 0; ^b„Икономия на атоми“ = 100 % [Sheldon R. A.: (1994)]

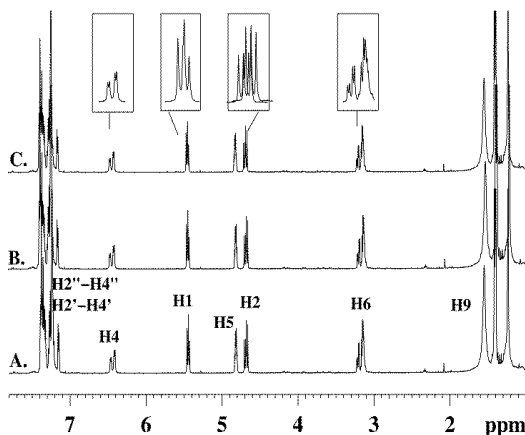
Получените бромирани производни (56a-60a) бяха пречистени чрез препаративна тънкослойна хроматография и прекристализирани из 96 % C₂H₅OH, а структурата им бе потвърдена чрез **mp**, **UV**, **IR (ATR)**_{u_{max}}, **¹H-NMR** и **ESI-MS**.

Успешното бромиране на двойната връзка в страничната верига на цинамоиловия остатък е потвърдено от вибрационните спектри. За разлика от *N*-цинамоил аминокиселинните амиди, в **IR**

спектрите на α,β -дихлорираните аналози (**56a-60a**) отсъства абсорбционен максимум при $\sim 1620\text{ cm}^{-1}$, породен от разтягане на $>\text{C}=\text{C}<$ групата. Важно е да се отбележи, че във вибрационните спектри на всички хлориранни производни, е регистриран остър пик при $\sim 695\text{ cm}^{-1}$, диагностично важен при идентифициране на дихлоропроизводни.

Допълнителна структурна информация може да се получи при сравняване стойностите на λ_{max} на хлорираните и нехлорираните *N*-цинамоиламиноокиселинни амиди. UV спектрите на α,β -дихлорохидроцинамоиламиди (**56a-60a**) разкриват само един абсорбционен максимум $\sim 205\text{ nm}$, породен от ароматния пръстен.

В $^1\text{H-NMR}$ спектрите също е налице разлика между хлорираните и нехлорирани съединения. Олефиновите протони при съединения (**56-60**), се явяват при $\delta \sim 6.40$ и $\delta \sim 7.50$ като двойка дублети с константа на спин-спиново взаимодействие ($^3J_{\text{H/H}} \sim 16\text{ Hz}$), която определя *E*-конфигурация на двойната връзка. В $^1\text{H-NMR}$ спектрите на всички хлориранни аналози (**56a-60a**) намалението на 3J ($^3J_{\text{H/H}} \sim 11\text{ Hz}$) и характеристичното отместване на сигналите на H1 ($\sim 5.5\text{ ppm}$) и H2 ($\sim 4.6\text{ ppm}$) в по-силно поле, се дължи на влиянието на електроотрицателните хлорни атоми. Резултатите от $^1\text{H-NMR}$ анализа потвърждават, че получените по трите метода хлорирани производни са структурно идентични. На **фиг. 47** е избран и представен сравнителен спектър на съединение **57a**, получено по трите метода.



Фиг. 47. 600 MHz $^1\text{H-NMR}$ спектър на съединение **57a**, получено по трите метода A-C

В ^1H NMR спектрите на съединения **56a-60a** се наблюдават удвоени сигнали ясно идентифициращи H1, H2, H4 и протоните от $-\text{OCH}_3$ и $-\text{OC}(\text{CH}_3)_2$ групи. Относителното количествено разпределение на наблюдаваните две изомерни форми (при съединения **56a-60a**) е определено чрез интегралния интензитет на резонансните сигнали за H4 и H2 и е съответно 1: 1.1; 1: 1.5; 1: 1.3; 1:1.2 и 1:1.1. ^1H -NMR експериментът е проведен в интервала 290 - 320 K и не показва спектрална промяна по отношение на количественото разпределение на двете изомерни форми. Данните предполагат присъствие на две изомерни форми на синтезираните съединения, което се дължи най-вероятно на различната конфигурация при C5 (C^α -атом).

В масспектрите на α,β -дибромираните аналози се забелязва изотопен модел в съотношение 1:2:1 на молекулните йони при m/z $[\text{M}]^+$, $[\text{M}+2]^+$ и $[\text{M}+4]^+$, идентифициращ присъствие на два бромни атома, докато тези йонни адукти липсват в масспектрите на *N*-хидроцинамоиламидите.

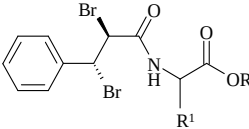
При сравняване на добивите, получени по трите метода (таблица 13.) е видно, че те не се различават значително. Сравнително по-краткото реакционно време на двата „зелени“ метода за бромране ги открояват от класическия.

II.4.2.2. Определяне на антимикробната активност на бромирани цинамоиламиди

При сравнителен анализ на получените резултати от проведеното антимикробно изследване (таблица 14.) е видно, че *N*-(α,β -дибромо- β -фенилпропаноил)-валин метилов естер (**59a**) се откроява като най-обещаващо съединение (MIC 156 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) спрямо двата бактериен щама. За разлика от съединение (**59a**), *N*-(α,β -дибромо- β -фенилпропаноил)-аланин трет. бутилов естер проявява същата активност (MIC 156 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), но единствено спрямо *Staphylococcus aureus* 209. Прави впечатление, че дибромпроизводното, съдържащо флуориран фенилаланин (**58a**) прояви около два пъти по-висока антибактериална активност от неговия нефлуориран аналог (**57a**). Установената активност за съединение (**58a**) (съдържащо непротеиногенна флуорирана аминокарбоксилна киселина) е в съответствие с факта, че флуорирането на ароматното ядро е свързано с повишаване на липофилността на молекулата [Smart B.: (2001)]. В резултат на това се постига промяна на биологичната активност.

При изследване на дибромирани цинамоиламиди за противогъбична активност бе установено, че съединенията са неактивни спрямо *C. albicans* 562.

Таблица 14. Антимикробна активност на α,β -дибромохидроцинамоиламиди (MIC $\mu\text{g/ml}$)

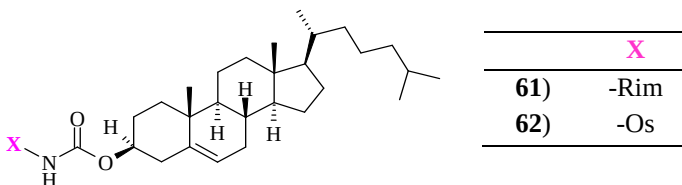
Съединение	R ¹	R	MIC (µg/ml)			
			<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	
	56a)	CH ₃	C(CH ₃) ₃	↑ 156	→ 313	↓ 625
	57a)	CH ₂ C ₆ H ₅	C(CH ₃) ₃	↓ 625	↓ 625	↓ 1250
	58a)	CH ₂ C ₆ H ₄ (3-F)	CH ₃	→ 375	→ 375	NT
	59a)	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	↑ 156	↑ 156	↓ 1250
	60a)	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃	NT	NT	NT
Тобрамицин			↑ 15,6	↑ 19,5	NT	
Кетоконазол			NT	NT	↑ 7,8	

Легенда: **Зелена стрелка** – активни (MIC <250 $\mu\text{g/ml}$); **Жълта стрелка** – умерена активност (MIC 250-500 $\mu\text{g/ml}$); **Червена стрелка** – слаба активност до неактивни (MIC >500 $\mu\text{g/ml}$); NT – не е тествано

II.5. МОДИФИКАЦИИ НА ПРОТИВОГРИПНИ АГЕНТИ ЧРЕЗ СВЪРЗВАНЕТО ИМ СЪС СТЕРОИДИ

II.5.1. Трансформации на противогрипни агенти до холестерил карбамати

Обещаваща стратегия за преодоляване на вирусната резистентност включва трансформации на холестероловата молекула. За свързването на последната с римантадин и оселтамивир бе използван готов синтон холестерилхлорформиат. Получаването на холестерил карбамати (съединения (61), (62)) бе осъществено при базични условия (Et₃N) под инертна атмосфера в безводен THF. Така получените съединения ((61-62) **фиг. 48**) бяха изолирани хроматографски, а структурата им бе потвърдена чрез **mp**, **IR (ATR)** u_{max} и **ESI-MS/HRMS**.

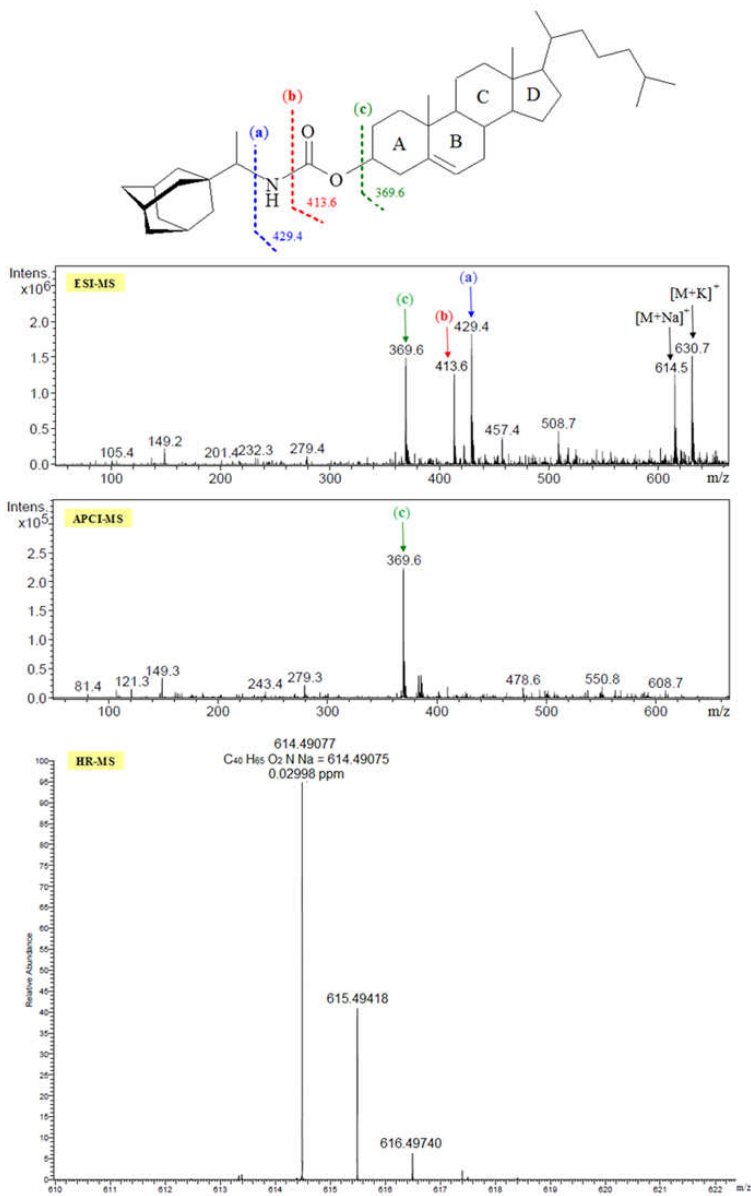


Фиг. 48.

За първоначалното охарактеризиране структурата на холестероловите производни бе приложена **IR**-спектроскопия. Наблюдаваният абсорбционен максимум при $\sim 1720\text{ cm}^{-1}$ отговаря на карбаматната група.

Както е известно в литературата идентифицирането на стероидните производни е нелека задача, ето защо за по-обстойно изучаване на холестерил карбамата на римантадина съединение (**61**) бяха използвани няколко техники за йонизация. При сравнителен анализ на използваните масспектрални изследвания (**фиг. 49**) богатата информация бе получена от **ESI-MS**. В неговия спектър се наблюдават интензивни пикове при $m/z = 630.7$ и $m/z = 614.5$ съответстващи на $[M+K]^+$ и $[M+Na]^+$. Интересно е, че при тази йонизационна техника се наблюдава образуване на фрагментни йони, които са изключително информативни за доказване структурата на стероидното производно. Така например йонът с $m/z = 429.4$ се дължи на фрагментация (**a**). Друга важна фрагментация (**b**) $m/z = 413.6$ е тази, при която се наблюдава разкъсване на връзката между въглеродния и азотния атом от новосъздадената карбаматна група. Йонният пик при $m/z = 369.6$ (фрагментация (**c**)) съответстващ на разцепване на връзката между C3 от холестероловото ядро и свързаният с него кислороден атом, се забелязва и при двете приложени техники (**ESI/APCI-MS**). В двата мас-спектъра на съединение (**61**) се открива диагностично важен за стероидните структури фрагментен йон с $m/z = 149$. Както е описано в литературата той се получава в резултат на разкъсване между циклите C и B и прескачане на водороден атом към неутралния фрагмент [Попов С. и сътр., (1977)].

Трябва да отбележим, че освен двете споменати по-горе йонизационни техники, съединение (**61**) бе потвърдено и чрез данните от **HRESIMS**. В този спектър се регистрира пик за $[M+Na]^+$ при $m/z = 614.49077$ (изчислено $C_{40}H_{65}O_2NNa$: 614.49075).

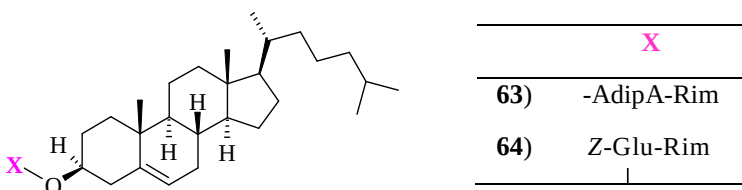


Фиг. 49.

Изменението в мас-спектъра (**ESI-MS**) на съединение (**62**) показва различие ($725.5 [M+H]^+$, $747.5 [M+Na]^+$), дължащо се на остатъка от оселтамивир. Фрагментирането на холестерил карбаматната част е аналогично на това, наблюдавано при холестерил карбамата на римантадина (съединение (**61**)).

II.5.2. Свързване на римантадин и холестерол чрез дикарбоксилен линкер [Neises B., et. al. (1978)]

Получените по-горе производни на римантадина: Z-Glu(OH)-римантадин (**17a**) (схема 3. стр. 10) и N-адипоил римантадин (**37a**) (фиг. 43A стр. 28) бяха естерифицирани с холестерол под инертна атмосфера в безводен THF с активатор DCC и базичен катализатор DMAP. Новополучените съединения (**63**) и (**64**) фиг. 50 бяха изолирани и спектрално охарактеризирани.

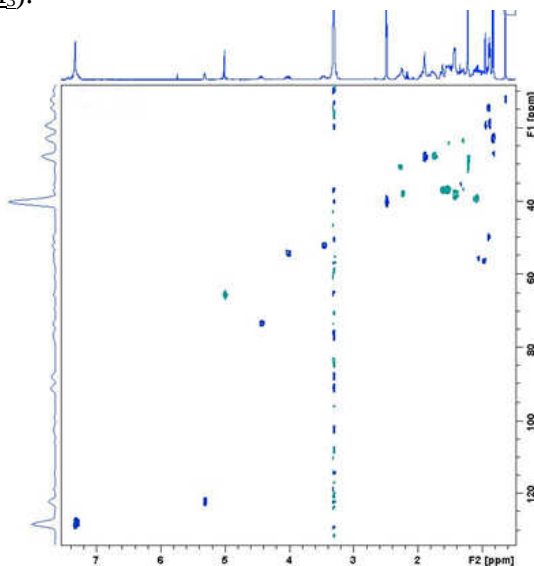


Фиг. 50.

В $^1\text{H-NMR}$ спектъра на двете съединения (**63**) и (**64**) мултиплетът в областта $\delta \sim 4.5$ е доказателство за α -конфигурация на $3\alpha\text{-H}$. Ангуларните метилови групи 18-CH_3 и 19-CH_3 се явяват като синглети (s) в силно поле съответно при ~ 0.65 ppm и ~ 0.95 ppm. Трите метилови групи от страничната верига на холестероловия остатък се наблюдават като дублети при $\delta \sim 0.87$ (6H, 26-CH_3 и 27-CH_3) и $\delta \sim 0.93$ (3H, 21-CH_3). От друга страна олефиновият протон **H-6** се забелязва в по-слабо поле при $\delta \sim 5.3$. Тези характеристични сигнали в $^1\text{H-NMR}$ спектрите на съединения (**63**) и (**64**) доказват присъствието на холестеролов остатък в анализираните структури.

На фиг. 51 е представен ^1H , ^{13}C HSQC-спектър на съединение (**64**). Анализът от двудименсионална спектроскопия показва, че ароматните протони при $\delta \sim 7.3$ (5H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-}$) се корелират съответно с ароматните въглеродни сигнали при $\delta \sim 128$. Олефиновият протон при 5.31 ppm от стероидното ядро се купелува с въглеродния сигнал при C6 (122.6 ppm). Метиленовите протони от

бензилоксикарбонилната защита при $\delta \sim 5$ си взаимодействат със сигнала на въглеродния атом от $\text{Ar}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ при $\delta \sim 66$, докато мултиплетът за $3\alpha\text{-H}$ (4.44 ppm) се корелира със сигнала на C3 от стероидното ядро (73.4 ppm). Чрез хетероядрения двумерен експеримент ясно се разкрива и корелацията между δ_{C} : 54.5; 52.5; 23.1; 12.0 и протонните сигнали при 4.02 (m, 1H, $-\text{HNCH}(\underline{\text{C}}\text{O})\text{CH}_2-$), 3.47 (m, 1H, $-\text{HNCH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)$), 0.83 (d, $J=6.6$ Hz, 6H, 27- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$; 26- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 0.64 (s, 3H, 18- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$).



Фиг. 51.

Допълнително структурите на съединения (63) и (64) бе проучена чрез мас-спектрални изследвания. Тъй като при приложената електронна йонизация на двете съединения не бе наблюдаван молекулен йон в спектъра, това наложи прилагането на друга техника на йонизация – химична (APCI). Забелязват се две основни групи йони-адукти на молекулни йони и фрагментни йони. В мас-спектъра на съединение (63) сигналът при $m/z = 715.5$ съответства на $[\text{M}+\text{K}]^+$. Както е известно в литературата молекулните йони на естерите могат да фрагментират чрез α -разкъсване до образуване ацилни йони. Най-вероятно аналогична фрагментация (схема 6.) търпи и съединение (63). Пикът при $m/z = 413.1$ отговаря на йон (a) (схема 6.).

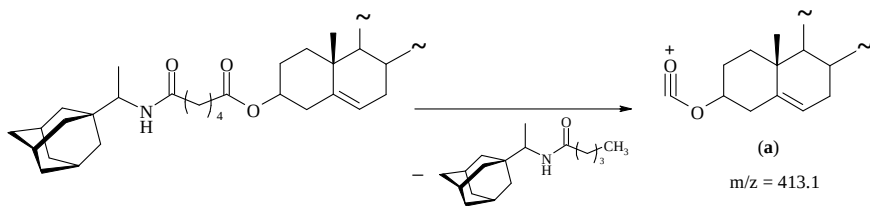


Схема 6.

В мас-спектъра (APCI-MS) на съединение (64) сигналът при $m/z = 811.6$ съответства на протониран молекулен йон. Наблюдаваният интензивен йонен пик (a) при $m/z = 443.3$ най-вероятно се дължи на двойна водородна прегрупировка (схема 7.).

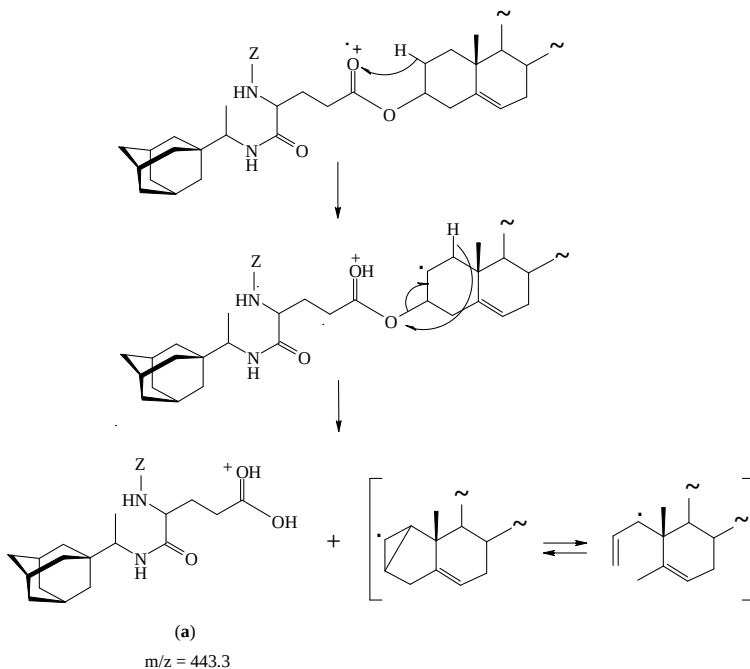


Схема 7.

Вторият по интензивност пик на съединение (64) при $m/z = 369.5$ най-вероятно е формиран при 1,2-елиминирание и може да се представи като прегрупировка на *McLafferty* със стабилизиране на заряд върху олефина (схема 8. (a)) [Попов С. и др. (1977)].

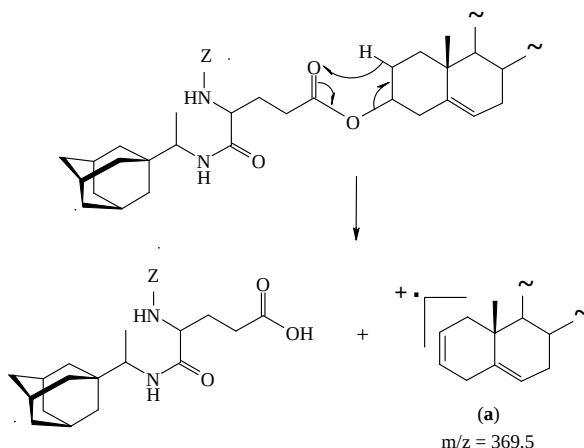


Схема 8.

II.5.3. Трансформации на противогрипни агенти до стероидни амини

Холестеролът е ключов компонент на всички животински мембрани и съставлява клетъчните мембрани около 30 %. Набогатените на холестерол структури се трансформират от течно-неподредени мембрани в течно-подредени (липидни рафтове) [Лалчев Здр., (2012); Simons K., et. al. (1988); Simons K., et. al. (1997)]. Предполага се, че в основата на редица заболявания (грип, Алцхаймер, Паркинсон, кардиоваскуларни, HIV и др.) стоят молекулни процеси, които се повлияват чрез модулиране на рафтовата фаза [Knölker H-J., et. al. (2009); Rajendran L., et. al. (2010); Knölker H-J., et. al. (2008)]. Ето защо стероидните амини могат успешно да се използват като рафтови модулатори и така да предпазят от развитие на инфекциозни заболявания [Agarwal S., et al. (2013)].

Първоначалната ни идея за получаване на нови стероидни амини бе да модифицираме молекулата на холестерола с противогрипните агенти. Тъй като хидроксилната група на холестерола не е подходяща функционална група за свързването ѝ с amino групата на противогрипните агенти, бе необходимо да се извършат известни предварителни стероидни трансформации. Първоначално поставената ни цел бе да се осъществи окисление на хидроксилната група на холестерола до оксо- група, която във втория етап на синтеза да бъде свързана с утвърдените противогрипни агенти под формата на азометиново производно.

От направената предварителна литературна справка стана ясно, че окислението на холестерола (**схема 9a**) до целевия кетон Δ^5 -холестен-3-он (**схема 9b**) е нелека задача, тъй като наличната двойна връзка при C5 води до получаване на сложна смес от окислителни продукти (**схема 9b-d**) [Fieser L. F.: (1953)].

Ето защо, за да се избегнат трудностите, свързани с образуването на сложни смеси, както и провеждането на поредица от реакции, включващи временно отстраняване на двойната връзка в молекулата на холестерола (чрез бромиране) и повторното ѝ образуване след завършване на окислението [Fieser L. F.: (1953)], използвахме готов фирмен продукт холестанол.

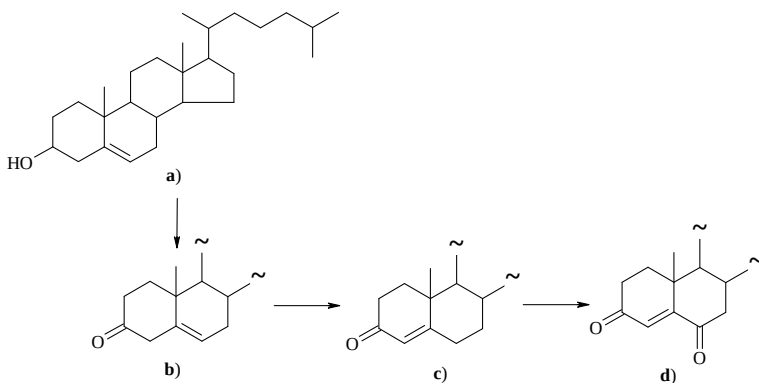
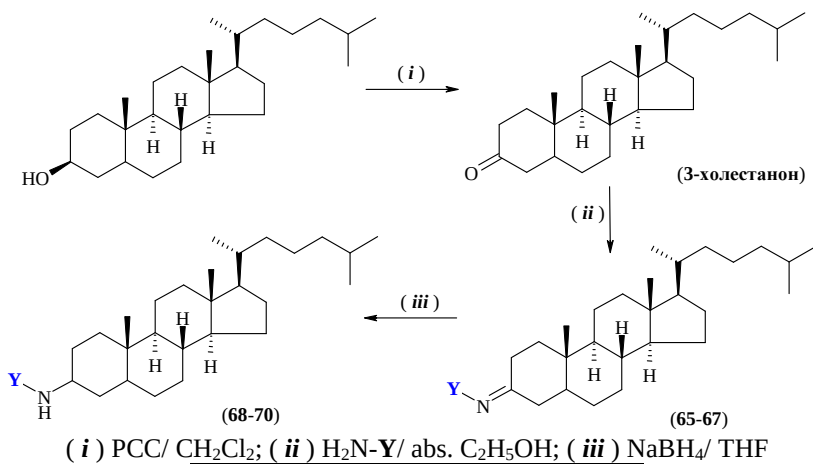


Схема 9. Продукти на окисление на холестерол

Окислението на холестанола до 3-холестанон бе проведено по методика на *Corey E. J. et. al.* с пиридиниев хлорохромат (PCC) [Corey E. J., et al. (1975)], както и чрез сонохимично активирана реакция (**схема 10. етап (i)**). Окислението чрез ултразвуково активиране бе проведено за сравнително кратко време (1 h) с висок добив (82 %), за разлика от конвенционалното - 4 h, с добив 65 %. Продуктът бе изолиран като бели иглести кристали чрез бързо филтруване върху силикагел и спектрално охарактеризиран.

3-Холестанонът бе охарактеризиран чрез **ESI-MS**, където се наблюдава пик при $m/z=386$. Тъй като холестанолът и 3-холестанонът са с еднакви молекулни маси, то молекулният пик е недостатъчно информативен. Отсъствието на фрагментен йон, дължащ се на загуба на вода ($m/z=368$), доказва присъствие на кето групата при C3 [Friedland S. S., et. al. (1959)].

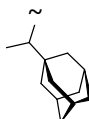
Схема 10:



Съединение

Y

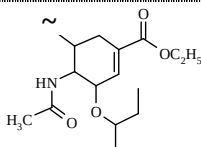
65)



68)

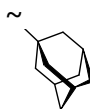
66)

69)



67)

70)



Допълнително потвърждение за структурата на 3-холестанон бе набавено от **IR** спектралните данни. Отсъствието на широка абсорбционна ивица при 3327 cm^{-1} (ν_{OH}) и наблюдаваният интензивен абсорбционен максимум при 1712 cm^{-1} (ν_{CO}) доказват присъствието на оксо група в целевия продукт.

Във втория етап на синтеза (**схема 10**, етап **(ii)**) холестеранонът бе свързан с трите противогрипни агента чрез сонохимична кондензационна реакция (A_N). Получените азометинови производни (съединения **65-67**) бяха пречистени чрез прекристализация из abs.

C₂H₅OH с добив 54-75 %. По-нататък новополучените шифови бази (65-67) бяха охарактеризирани спектрално.

В IR спектрите на новополучените имини не се наблюдава характерната за ν_{CO} ивица при 1712 cm⁻¹, а в интервала 1655-1641 cm⁻¹ се появява C=N –валентно трептене.

В мас-спектрите на съединенията (65-67) се наблюдава основен пик, отговарящ на молекулния йон.

В последния етап (схема 10. етап (iii)) получените шифови бази (65-67) бяха подложени на ултразвукова редукция с NaBH₄ до съответните стероидни амини (68-70). Последните хроматографски пречистени и охарактеризирани чрез ESI-MS. Съединение (68) бе допълнително анализирано чрез HRMS. В неговия спектър се наблюдава пик за [M+H]⁺ при m/z = 550.53435 (изчислено: 550.53463), съответстващ на молекулна формула C₃₉H₆₈N.

II.5.4. Определяне на противовирусна активност *in vitro*

Сред тестваните стероидни производни, шифовата база на римантадина с 3-холестанона (65) показва изразен антивирусен ефект срещу репликацията *in vitro* на грипен вирус A/H3N2 достигайки селективен индекс доближаващ 100 (таблица 15.).

Таблица 15. Противовирусен ефект *in vitro* на съединения 61, 64-68 спрямо репликацията на грипен вирус A/Aichi/H3N2

Съединение	MTC (μM)	CC ₅₀ ^a (μM)	IC ₅₀ ^a (μM)	SI
61)	1000	1440	-	-
64)	>1000	-	-	-
65)	100	179	1.9 ± 0.2	94.2
66)	100	-	-	-
67)	>3200	-	-	-
68)	1000	-	-	-
Римантадин	100	175	0.2	875
Амантадин	100	330	1.6	206
Оселтамивир карбоксилат	>100	80	>1.3	64

^a Средна стойност, получена от два независими опита с четири повторения във всеки един от тях ± стандартно отклонение; CC₅₀: 50% цитотоксична концентрация; MTC: максимално поносима концентрация; IC₅₀: 50% инхибираща концентрация; SI (CC₅₀/IC₅₀): индекс на избирателност.

Освен срещу този грипен щам същото съединение инхибира в по-слаба степен и репликацията на грипен вирус A/H1N1. Тъй като вирусният цитопатичен ефект е около 30 % при най-високата нетоксична концентрация, IC₅₀ и SI не могат да бъдат определени.

III. ОБОБЩЕНИЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

1. Синтезирани и спектрално охарактеризирани са общо **89** съединения, в това число:

- *двадесет и осем* нови аналози на противогрипни лекарствени средства (амантадин, римантадин и оселтамивир) с аминокиселинни производни;
- *четиринадесет* нови аналози на противогрипни агенти, модифицирани с хетероциклен пръстен;
- *пет* нови амиди на антимикробни агенти, съдържащи полиаминен/ дикарбоксилен линкер;
- *двадесет* нови флуорирани производни на антимикробни агенти;
- *пет* бромирани *N*-цинамоиламиди чрез прилагане на два „зелени“ ултразвуково-модифицирани метода;
- *десет* нови стероидни модификации на противогрипни агенти.

2. Изследвана е противовирусната активност *in vitro* на част от амидите на противогрипните агенти спрямо грипен вирус щам Aichi (A/H3N2; A/H1N1).

- Установено е, че шифовата база на римантадин с 3-холестанон (**65**) е с изразен антивирусен ефект срещу репликацията *in vitro* на грипен вирус A/H3N2 (**SI** $\approx$ 100);
- Съединение **65** инхибира в по-слаба степен пролиферацията на грипен вирус A/H1N1 с вирусен цитопатичен ефект $\approx$ 30 % при най-високата нетоксична концентрация.

3. Изследвана е антибактериалната и противогъбичната активност *in vitro* на част от новосинтезираните производни срещу *Staphylococcus aureus* 209, *Escherichia coli* WF+, *Pseudomonas aeruginosa* 5749, *Bacillus subtilis* 1A95 и *Candida albicans* 562.

- Сред тестваните новосинтезирани производни най-перспективен антимикробен агент е коджилкарбаматът на римантадин (**35**). Съединението проявява висока антибактериална активност както спрямо *Грам-положителните* (*Staphylococcus aureus* 209 и *Bacillus subtilis* 1A95) с **MIC** 31 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, така и спрямо *Грам-отрицателните* бактериални щамове

(*Escherichia coli* WF+ и *Pseudomonas aeruginosa* 5749) с **MIC** 125 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Най-активни съединения спрямо *Escherichia coli* WF+ са амидите на (E)-3-(2'-тиенил) пропеновата киселина (**25**, **27** и **28**). Те имат **MIC** 47 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, която е около 2.4 пъти по-висока от тази на тобрамицина (**MIC** 19.5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$).

4. Сред тестваните съединения като мощно действащ антимикотичен агент се откроява *N,N'*-бис-адамантоиламид на 1,6-диаминохексан (**40**) (**MIC** 63 $\mu\text{g.ml}^{-1}$). В сравнение с използвания референт - кетоконазол (**MIC** 7.8 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) активността на съединение (**40**) е около осем пъти по-слаба.

5. Изследвано е влиянието на част от новосинтезираните производни върху тирозиназа, изолирана от *Agaricus bisporus*. Установено бе, че в сравнение с използваните референтни тирозиназни инхибитори (хидрохинон и коджикова киселина), тестваните съединения се очертават по-скоро като активатори на ензима, отколкото негови инхибитори.

6. За хидроксидинамоиламида на противогрипни агенти (**50-55**) е установена висока радикалоулавяща активност спрямо 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил (**DPPH**[•]). Показано е, че активността на новосинтезираните амиди по отношение на използваните стандарти (синапова и ферулова киселини) е по-висока.

IV. ПРИНОСИ

1. Синтезирани и спектрално охарактеризирани са **73 нови** неописани в литературата съединения.
2. Разработени са ултразвуково активирани два „зелени“ метода за бромиране на амиди на канелена киселина с аминокиселинни производни.
3. Изследвана е антимикробна активност *in vitro* на серия от новосинтезирани производни на противогрипните агенти:
 - Азометиновото производно на римантадин с 3-холестанон (**65**) показва висока инхибираща активност *in vitro* върху пролиферацията на грипен вирус A/Aichi/H3N2 и умерена активност спрямо грипен вирус A/H1N1;
 - Като най-перспективен антибактериален агент се очертава коджилкарбаматът на римантадин (**35**), а *N,N'*-бис-адамантоиламидът на 1,6-диаминохексан (**40**) е най-мощно действащ антимикотичен агент.
4. Изследвано е влиянието на **тридесет и четири** новосинтезирани съединения върху тирозиназа изолирана от гъби *Agaricus bisporus*. Установено е, че тестваните съединения проявяват по-ниска тирозиназно-инхибиторна активност от използваните референти.
5. Установена е висока радикалоулавяща активност на флуорирани *N*-хидроксидинамоиламиди на противогрипните агенти (**50-55**) спрямо 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил (**DPRH[•]**).

ПРИЛОЖЕНИЯ

Част от резултатите, получени при разработване на дисертацията, са отразени в публикации и научни форуми.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

1. Chochkova M., **Stoykova B.**, Ivanova G., Ranz A., Guo X., Lankmayr E., Milkova Ts., *N*-Hydroxycinnamoyl amides of fluorinated amino acids: synthesis, antityrosinase and DPPH scavenging activities, *J. of Flour. Chem.* **156**, 203–208 (2013) DOI: 10.1016/j.jfluchem.2013.09.013
IF₍₂₀₁₃₎: 1.81;
2. Chochkova M., **Stoykova B.**, Nikolova N., Nikolaeva-Glomb L., Ivanova G., Milkova Ts., Biological activity of adamantane analogues, *Proceedings of the Fifth International Conference of FMNS* **4**, 17-24 (2013);
3. **Stoykova B.** Chochkova M., Apostolova R., Petrova P., Ivanova G., Nikolova N., Nikolaeva-Glomb L., Milkova Ts., (2015) Novel oseltamivir and aminoadamantane analogues containing non-proteinogenic amino acid, in: Peptides, *Proceedings of the 33rd European Peptide Symposium*, 31 August – 5 September, 2014, Sofia, Bulgaria (Emilia Naydenova, Tamara Pajpanova, Dancho Danalev (Editors)) pp. 53-54;
4. **Stoykova B.**, Chochkova M., Petrova P., Ivanova G., Milkova Ts., (2015) *N*-Lipoyl amino acid amides of anti-influenza drugs: synthesis and biological activity, in: Peptides, *Proceedings of the 33rd European Peptide Symposium*, 31 August – 5 September, 2014, Sofia, Bulgaria (Emilia Naydenova, Tamara Pajpanova, Dancho Danalev (Editors)), pp. 86-87;
5. **Stoykova B.**, Chochkova M., Ivanova G., Mukova L., Nikolova N., Nikolaeva-Glomb L., Vojtišek P., Milkova Ts., Štícha M., Havlíček D., Synthesis of fluorinated hydroxycinnamoyl derivatives of anti-influenza drugs and their biological activity, *Chemistry: Bulgarian Journal of Science Education*, **24**, 340-347 (2015)
SJR₍₂₀₁₅₎ = 0.190;
6. **Stoykova B.**, Chochkova M., Ivanova G., Markova N., Enchev V., Tsvetkova I., Najdenski Hr., Štícha M., Milkova Ts., Ultrasound-assisted green bromination of *N*-cinnamoyl amino acid amides - structural characterization and antimicrobial evaluation, *Journal of Molecular Structure*, **1135**, 144-152 (2017) DOI: 10.1016/j.molstruc.2017.01.056
IF₍₂₀₁₅₎: 1.780;

7. **Stoykova B.**, Chochkova M., Georgiev L., Ivanova G., Mukova L., Nikolova N., Nikolaeva-Glomb L., Milkova Ts., Štícha M., Amino acids amides of anti-influenza drugs: synthesis and biological activities, *Bulgarian Chemical Communication (in press)*

IF: 0.349;

8. **Stoykova B.**, Chochkova M., Nikolaeva-Glomb L., Ivanova G., Štícha M., Milkova Ts., Anti-influenza drug derivatives with potential biological activity, in: *Proceedings of the PhD Student Scientific Session of the FMNS - 2016*, South-West University “Neofit Rilski” Blagoevgrad, Bulgaria (Mario Mitov, Maria Shishmanova, Stefan Stefanov (Editors)) pp. 6-9 (2017); ISBN 978-954-00-0109-8

ПУБЛИКАЦИИ ИЗВЪН ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

Chochkova M., Petrova P., **Stoykova B.**, Gyoshkova N., Ivanova G., Štícha M., Milkova Ts., Synthesis and biological activity of cinnamic acid esters, *Bulgarian Chemical Communication (in press)*

IF: 0.349

ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТАТИ:

Chochkova M., Stoykova B., Ivanova G., Ranz A., Guo X., Lankmayr E., Milkova T. „N-Hydroxycinnamoyl amides of fluorinated amino acids: Synthesis, anti-tyrosinase and DPPH scavenging activities“, *J. Fluor. Chem.*, **156**, 203–208 (2013).

1. He F., Wang M., Gao M., Zhao M., Bai Y., Zhao C., Chemical composition and biological activities of gerbera anandria, *Molecules*, **19** (4), 4046-4057 (2014)
<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84899560693&partnerID=40&md5=2b8bb331dbc2c639fd17da9f68ed9814>
2. Mendes E., Perry M.D.J., Francisco A.P., Design and discovery of mushroom tyrosinase inhibitors and their therapeutic applications, *Expert Opinion on Drug Discovery*, **9** (5), 533-554 (2014)
<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84899116068&partnerID=40&md5=bf1c2e541de7ddf7103baf4c04eb7a00>
3. Rafiq M., Saleem M., Hanif M., Kang S.K., Seo S.-Y., Lee K.H., Synthesis, structural elucidation and bioevaluation of 4-amino-1,2,4-triazole-3-thione's Schiff base derivatives, *Arch. Pharm. Res.*, **39**, 161–171 (2016)
<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84959522949&doi=10.1007%2fs12272-015-0688-2&partnerID=40&md5=46857392dba8b4feb96a3031458af8fc>
4. MacDonald M.C., Arivalagan P., Barre D.E., MacInnis J.A., D'Cunha G.B., *Rhodotorula glutinis* phenylalanine/tyrosine ammonia lyase enzyme catalyzed synthesis of the methyl ester of para-hydroxycinnamic acid and its potential antibacterial activity, *Frontiers in Microbiology*, **7** (MAR), art. no. 281, (2016)

<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84964354524&partnerID=40&md5=c16fb5e35dd6b52017cb981d5101c9e8>

5. Taofiq O., González-Paramás A. M., Barreiro M. F., Ferreira I.C.F.R., McPhee D. J. Hydroxycinnamic acids and their derivatives: Cosmeceutical significance, challenges and future perspectives, a review, *Molecules*, **22** (2), art. no. 281, (2017)
<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85013175481&doi=10.3390%2fmolecules22020281&partnerID=40&md5=1dc a6d6c766705d4876a465d968f5f4f>
6. Krátký, M., Štěpánková, Š., Vorčáková, K., Navrátilová, L., Trejtnar, F., Stolaříková, J., Vinšová, J. Synthesis of readily available fluorophenylalanine derivatives and investigation of their biological activity, *Bioorganic Chemistry*, **71**, 244-256 (2017)
<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85013783884&doi=10.1016%2fj.bioorg.2017.02.010&partnerID=40&md5=840 2c1e301fd0736ddbaf98ea794c22>

РЕЗУЛТАТИ ОТ ДИСЕРТАЦИЯТА СА ДОКЛАДВАНИ НА СЛЕДНИТЕ НАУЧНИ ФОРУМИ:

1. Chochkova M., **Stoykova B.**, Nikolova N., Nikolaeva-Glomb L., Ivanova G., Milkova Ts., Biological activity of adamantane analogues, *Fifth International Scientific Conference – FMNS 2013 South-West University, Faculty of Mathematics and Natural Science* 12 – 16 June 2013;
2. Chochkova M., **Stoykova B.**, Mitova M., Ivanova G., Nikolaeva-Glomb L., Milkova Ts., Rimantadine conjugates with fluorine- containing oligopeptides: Synthesis and biological activity, *1st International Conference on Peptide Materials for Biomedicine and Nanotechnology (PepMat 2013) Conference* - 28-31 October 2013 - Sorrento, Italy;
3. **Стойкова Б.**, Чочкова М., Иванова Г., Милкова Ц., Зелен органичен синтез при бромиране на цинамоиламиди, *Студентска научна конференция „Предизвикателства в химията“*, Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ 22-23.11.2013 год.;
4. **Stoykova B.**, Chochkova M., Georgiev L., Petrova P., Ivanova G., Nikolova N., Nikolaeva -Glomb L., Milkova Ts., Synthesis of novel *N*-methyl-*L*-tyrosine amides of anti-influnza drugs and evaluation of their biological activities, *50th International Conference on medicinal chemistry* July 2-4, 2014, Rouen, Normandy, France;
5. **Stoykova B.**, Chochkova M., Apostolova R., Petrova P., Ivanova G., Nikolova N., Nikolaeva-Glomb L., Milkova Ts., Novel oseltamivir and aminoadamantane analogues containing non-proteinogenic amino acid, *33rd European Peptide Symposium*, 31 August – 5 September, 2014, Sofia, Bulgaria;
6. **Stoykova B.**, Chochkova M., Petrova P., Ivanova G., Milkova Ts., *N*-Lipoyl amino acid amides of anti-influnza drugs: synthesis and biological activity, *33rd European Peptide Symposium*, 31 August – 5 September, 2014, Sofia, Bulgaria;
7. **Stoykova B.**, Chochkova M., Petrova P., Ivanova G., Milkova Ts., Investigation of α -glucosidase inhibitory activity of *N*-hydroxycinnamoyl amino acid amides, *33rd European Peptide Symposium*, 31 August – 5 September, 2014, Sofia, Bulgaria;

8. **Stoykova B.**, Chochkova M., Ivanova G., Milkova Ts., Evaluation of DPPH scavenging activity of lipoyl amides of anti-influenza drugs, *Workshop on determining antioxidants as reactive species scavengers*, 27-28 October 2014, Istanbul, Turkey;
9. **Stoykova B.**, Chochkova M., Ivanova G., Vojtišek P., Milkova Ts., Novel *N*-hydroxycinnamoyl amides of oseltamivir with potent radical scavenging activities, *Workshop on determining antioxidants as reactive species scavengers*, 27-28 October 2014, Istanbul, Turkey;
10. **Stoykova B.**, Chochkova M., Ivanova G., Mukova L., Nikolova N., Nikolaeva-Glomb L., Vojtišek P., Milkova Ts., Štícha M., Havlíček D., Synthesis of fluorinated hydroxycinnamoyl derivatives of anti-influenza drugs and their biological activity, *Sixth International Conference of FMNS (FMNS-2015)* 10-14. 06. 2015, Blagoevgrad, Bulgaria;
11. **Stoykova B.**, Chochkova M., Milkova Ts., Štícha M., Synthesis and biological activity of 1,2,4-triazole-3-carboxamides of aminoadamantanes, *51st International Conference on medicinal chemistry*, July 1-3, 2015, Avignon, Provence, France;
12. Markova N., **Stoykova B.**, Chochkova M., Enchev V., Ivanova G., Milkova Ts., Štícha M., Synthesis, experimental and theoretical characterization of novel 3-phenyl-2,3-dobromopropanoic acid amides, *Conference with International Participation* 16. 10. -17. 10. 2015 The Hotel Central, Razgrad, Bulgaria;
13. Chochkova M., Petrova P., **Stoykova B.**, Milkova Ts., Structure–activity relationships of *N*-hydroxycinnamoyl amides on α -glucosidase inhibition, *7th Bulgarian Peptide Symposium*, June 10 – 12, 2016, Blagoevgrad, Bulgaria;
14. Chochkova M., Petrova P., **Stoykova B.**, Gyoshkova N., Ivanova G., Štícha M., Milkova Ts., Synthesis and biological activity of cinnamic acid esters, *7th Bulgarian Peptide Symposium*, June 10 – 12, 2016, Blagoevgrad, Bulgaria;
15. **Stoykova B.**, Chochkova M., Georgiev L., Ivanova G., Mukova L., Nikolova N., Nikolaeva-Glomb L., Milkova Ts., Štícha M., Amino acids amides of anti-influenza drugs: synthesis and biological activities, *7th Bulgarian Peptide Symposium*, June 10 – 12, 2016, Blagoevgrad, Bulgaria;
16. **Stoykova B.**, Chochkova M., Nikolaeva-Glomb L., Ivanova G., Štícha M., Milkova Ts., Anti-influenza drug derivatives with potential biological activity, *PhD Student Scientific Session of the FMNS - 2016*, 15.06.16 South-West University “Neofit Rilski” Blagoevgrad, Bulgaria;
17. Chochkova M., **Stoykova B.**, Petrova P., Ivanova G., Danalev D., Milkova Ts., Štícha M., *N*-Hydroxycinnamoyl peptides and evaluation of their biological activity, *6th International Meeting on Antimicrobial Peptides*, Leipzig University, August 31 - September 3, 2016.

УЧАСТИЕ В ПРОЕКТИ:

1. „Производни на противогрипни препарати –синтез и биологична активност“ МОН, DMU 03/2
2. „Химични модификации на аминокиселини и неврамидазни инхибитори“ SRP A11/14
3. „Гуанидино и азометинови производни на противогрипни агенти“ SRP-A19/15
4. „Дизайн на нови аминокиселини производни и техни метални комплекси с потенциална биологична активност“ RP-A9/16

5. „Аминокиселинни и пептидни аналози на адамантан и АСЕ-инхибитори: синтез и биологична активност“.
6. „Аналитични методи за *in vitro* определяне на биологична активност“.

ЛЕТНИ УЧИЛИЩА И СПЕЦИАЛИЗАЦИИ:

1. Erasmus student exchange program Charles University, Prague, Czech Republic 01. 03. 2016 год. – 31. 05. 2016 год.
2. Erasmus student exchange program Charles University, Prague, Czech Republic 23. 02. 2015 год. – 25. 05. 2015 год.
3. Участие в лятно училище „Active learning with information and communication technologies“, Kranjska Gora, Slovenia, 26. 07. 2014 год. - 08. 08. 2014 год.

НАГРАДИ:

1. Получена първа награда от конкурса за най-добра публикация на докторант - Maya Chochkova, **Boyka Stoykova**, Galya Ivanova, Andreas Ranz, Xinghua Guo, Ernst Lankmayr, Tsenka Milkova "N- Hydroxycinnamoyl amides of fluorinated amino acids: synthesis, antityrosinase and DPPH scavenging activities", *J. of Fluor. Chem.* **156**, 203–208 (2013), организиран от Съюз на учените в България – клон Благоевград, ЮЗУ „Неофит Рилски“ – Благоевград, ноември 2014 год.

СЪДЪРЖАНИЕ

УВОД.....	4
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	5
II. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ	6
II.1. ХИМИЧНИ ТРАНСФОРМАЦИИ НА ПРОТИВОГРИПНИ АГЕНТИ С АМИНОКАРБОКСИЛНИ ПРОИЗВОДНИ.....	6
II.2. МОДИФИЦИРАНЕ НА ПРОТИВОГРИПНИ АГЕНТИ С ХЕТЕРОЦИКЛЕН ПРЪСТЕН.....	17
II.3. СВЪРЗВАНЕ НА АНТИМИКРОБИАЛНИ АГЕНТИ ЧРЕЗ ПОЛИАМИНЕНИ/ДИКАРБОКСИЛЕН ЛИНКЕР.....	28
II.4. ХАЛОГЕНИРАНИ ПРОИЗВОДНИ НА АНТИМИКРОБИАЛНИ АГЕНТИ.....	32
II.5. МОДИФИКАЦИИ НА ПРОТИВОГРИПНИ АГЕНТИ ЧРЕЗ СВЪРЗВАНЕТО ИМ СЪС СТЕРОИДИ	43
III. ОБОБЩЕНИЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ	53
IV. ПРИНОСИ.....	55
ПРИЛОЖЕНИЯ	56