

Р е ц е н з и я

От доц. д-р Живко Асенов Велков, кат. „Химия“ на ЮЗУ „Неофит Рилски“, Благоевград на материалите за участие в конкурс за заемане на академичната длъжност „професор“

В конкурса за академичната длъжност „професор“, обявен в Държавен вестник, бр. 97 на 13.11.2020 г, единственият кандидат е доц. д-р Иванка Георгиева Станкова от Югозападен университет „Неофит Рилски“ – Благоевград.

Представеният от доц. Станкова комплект материали е в съответствие с Правилника за прилагане на закона за развитие на академичния състав и Вътрешни правила за развитие на академичния състав в ЮЗУ "Неофит Рилски".

Кандидата е приложила общо 22 научни публикации извън използваните за придобиване на научната и образователна степен „доктор“ и академичната длъжност „доцент“, всички те са по тематиката на настоящия конкурс.

Висшето си образование Иванка Станкова завършва през 1982 г. в ВИБХП – Пловдив в специалността „Технология на микробиологичните и ферментационни продукти“. Работи в завод за безалкохолни напитки като началник на лаборатория и ОТКК до 1987 г. След това започва работа като специалист-химик в БАН, в лаборатория по биоорганична химия към Института по молекулярна биология. От 1992 г. е хоноруван преподавател в катедрата „Химия“ на Югозападен университет „Неофит Рилски“, където преминава през всички преподавателски степени: 1995 г – редовен асистент; 2000 г. – главен асистент; 2011 г. – доцент.

След хабилитирането си е чела лекции по „Биохимия“, „Биоорганична химия“, „Биологично-активни вещества като хранителни добавки, „Химия

на лекарствените средства“, „Биологично-активни вещества – спорт и здраве“ за различни химични и нехимични специалности.

Ръководила е 45 дипломанти и 2 успешно защитили докторанти. Разработила е върху 6 учебни програми по различни дисциплини. Доц. Станкова е участвала в разработването и на учебните планове на специалността – „Медицинска химия“, както и на останалите специалности, които се преподават в катедра „Химия“ на ЮЗУ „Неофит Рилски“.

През 2012 година е избрана за ръководител на катедра „Химия“ в един изключително тежък период – слаб интерес от страна на кандидат-студентите към предлаганите специалности, нискомотивиран академичен състав. В момента катедрата е в изключително добро състояние. Всяка година местата в основните специалности се запълват със студенти, катедрата е окомплектована с квалифицирани преподаватели, научната продукция на катедрата нараства всяка година, а оценките от НАОА за състоянието на катедрата са високи. През изминалата година ни беше дадена акредитация за 6 години и оценка 9.28.

През 2019 г доц. Станкова влезе в екипа на ректора на ЮЗУ като заместник-ректор по научно-изследователската работа и докторантското развитие.

В конкурса за професор доц. Станкова участва с 22 публикации в престижни научни списания, извън конкурса ѝ за доцент и 3 заявки за патент, което ѝ дава възможността да изпълни минималните изисквания по групи показатели за придобиване на академичната длъжност „професор“ в научното направление 4.2. Химически науки според Правилника за прилагане на ЗРАС.

Научната област на доц. д-р Иванка Станкова е синтез на нови, биологично-активни субстанции, целящи подобряване изявата на вече наложени в клиничната практика лекарствени форми: модифицира се молекулата на лекарства с цел подобряване на активността, увеличаване на

бионаличността им или намаляване на тяхната токсичност. Важна част от интересите ѝ е устойчивостта на хидролиза на получените вещества с потенциал да бъдат предлекарства.

Оценка на представените научни трудове

- Абакавирът е лекарство, използвано за профилактика и лечение на СПИН. Обикновено той се понася добре, но е възможно да се появят и тежките странични ефекти – увреждане на черния дроб и лактатна ацидоза, риск от сърдечно-съдови заболявания и др. Възможният начин за минимизиране на страничните ефекти може да се окаже свързването на абакавира с аминокиселини [В.1.]. Синтезирани са естери на абакавира с аминокиселината глицин, дипептида глицил-глицин и трипептида глицил-глицил-глицин и е оценена тяхната антивирусна активност. Един от новосинтезираните естери Gly-ABC - демонстрира ниска цитотоксичност и висока анти-HIV-1 активност в клетките MT-4, ниска митохондриална токсичност и висока генетична устойчивост.
- Друг начин за модифициране на антивирусни препарати е с жлъчни киселини. Предлекарствата, съдържащи жлъчните киселини имат по-добър фармакокинетичен профил от родителските лекарства, защото жлъчните киселини обикновено увеличават способността за преминаване през клетъчните мембрани. Синтезирани са поредица от естери, предлекарства на ацикловира (ACV), с жлъчните киселини – холиева, хенодеоксихолиева и дезоксихолиева киселина [В.2.] и са оценени заедно с валацикловир за *in vitro* антивирусна активност срещу вируси от херпес симплекс тип 1 и тип 2 (HSV-1, HSV-2). *In vitro* антивирусната активност на трите предлекарства на жлъчните киселини е оценена и срещу вируса на Epstein-Barr (EBV). Проведени са тестове за плазмена стабилност, използващи течна

хроматография, съчетана с маспектрометрия. Установен е биологичния профил на предлекарствата на ACV. Антивирусните анализи показват, че ACV-холатът има малко по-добра антивирусна активност от ACV срещу HSV-1 и осем пъти по-висока активност по отношение на ACV срещу HSV-2. ACV-хенодезоксихолатът представя шест пъти по-висока антивирусна активност срещу HSV-2 по отношение на ACV. Що се отнася до EBV, най-високият антивирусен ефект е демонстриран от ACV-хенодеоксихолат. Анализите на стабилност в човешка плазма разкриват, че ACV-дезоксихолатът е по-стабилен от другите две предлекарства. Тези резултати потвърждават хипотезата, че чрез изменението на основната структура на ACV с жлъчни киселини могат да се получат предлекарства с усилена антивирусна активност.

- Синтезирани са и мемантинови производни, съдържащи аминокиселини с антимикробна активност, предназначени за лечение на бактериални и гъбични инфекции при пациенти, страдащи от болестта на Алцхаймер [B.3.]. Синтезирани са серия от шест мемантинови хибридни молекули, охарактеризирани са ^1H NMR, ^{13}C NMR, MS, рентгено-структурен анализ и е тестван техният антимикробен потенциал, както и активността им като анти-Алцхаймер-агенти.
- Синтезирани са серия от деветнадесет аминокиселинни аналога на амантадин (Amt) и римантадин (Rim) и тяхната антивирусна активност е оценена спрямо грипния вирус А (H3N2). [B.4.] Сред тези аналози свързването на римантадин с глицин показва висока антивирусна активност, съчетана с ниска цитотоксичност. Нещо повече, това съединение показва висока стабилност след *in vitro* инкубация в човешка плазма в продължение на 24 часа. Термичната му стабилност е установена с помощта на диференциален и гравиметричен термичен анализ. Кристалната структура на глицил-римантадина разкрива, че той кристализира в орторомбичната структура. Установена е връзка структура-активност за този клас

съединения чрез CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) 3D-Quantitative Structure Activity Relations Relations (3D-QSAR) проучвания. Създаден е надежден прогностичен модел за бъдещи синтези. В допълнение са проведени докинг-проучвания, разкриващи пространствените изисквания за наличие на активност.

- Синтезирани и изследвани за цитотоксичност и противовирусна активност са 4 амантадинови и римантадинови производни с аминокиселини. [Г.5.]
- Синтезирани са три естера на ацикловира с киселините 4-F-фенилаланин, дезоксихолиева и хенодезосихолиева киселина и е изследвана тяхната устойчивост на хидролиза при условия близки до тези в стомаха на човек и в кръвта – при рН 1 и рН 7.4, и температура 37 °С. [Г.6.] Експериментът показва, че аминокиселинният естер е най-нестабилен от трите съединения, а естерите на жлъчните киселини са стабилни при същите условия. Всички изследвани съединения са по-стабилни от валацикловира – първото ефективно предлекарство на ацикловира.
- Серия от четири производни на адамантан с пептидомиметици, съдържащи един и два тиазолови пръстена са синтезирани и изследвани за антивирусна активност срещу грипния вирус H1N1. [Г.7.]. Аналозите на римантадин с тиазолов пръстен показват умерена активност срещу грипния вирус A/Hongkong. Останалите съединения са значително по-малко ефективни.
- Синтезирани са две съединения, амид на амантадина и 4-флуорфенилаланина. Съединенията са изпитани за цитотоксичност и антивирусна активност [Г.8.]. Едното съединение показва забележително висока активност.
- Синтезирани са нови амиди на амантадина и римантадина (аминоадамантин) с цистина и е изпитана тяхната активност спрямо инфлуенца вирус H1N1 [Г.9.]. Изследваните съединения не показват активност.

- Две нови производни на амантадина и римантадина с Arg са синтезирани и изпитани за цитотоксичност и антивирусна активност. Аналогът на амантадина показва гранична активност, а римантадин-аргинина не е активен [Г.10.]. Изпитана е химичната стабилност на получените съединенията при рН 1 и рН 7, и 37⁰С.
- Серия от нови римантадинови производни с аминокиселините аланин, валин и фенилаланин са синтезирани и е изучена тяхната антивирусна активност спрямо инфлуенца вирус А [Г.11.]. Аланилримантадинът показва умерена активност.
- Няколко производни на оселтамивир с жлъчни киселини (холинова, дезоксихолинова и хенодезоксихолинова киселини) са получени чрез DCC метода. Направените модификации са с цел увеличаване на бионаличността на активната субстанция и устойчивост на неврамидазния инхибитор – оселтамивир [Г.12.]. Получените съединения са тествани за антивирусна активност спрямо A/Aichi/2/68 (H3N2). Изследваните съединения не показват ефект спрямо вируса.
- В търсенето на нови предлекарства, ефективни срещу грипния вирус са синтезирани аналози на амантадин и римантадин (RS) -1 - (1-адамантил) етанамин), съдържащи тиазолов пръстен, и е проверена тяхната антивирусна активност [Г.13.]. Химичната им стабилност също е изследвана при рН 1 и 7,4 температура от 37 °С. Разработен е HPLC метод за количествено определяне на непромененото количество естер. Биологичната активност на производните на адамантана се дължи на пространствената им структура, на значителната липофилност и твърдата въглеродородна структура. Това улеснява проникването им през биологичните мембрани. Следователно модифицирането на органични съединения чрез адамантилов остатък може значително да промени биологичната им активност. Броят на резистентните грипни щамове спрямо адамантани се увеличава всяка година поради спонтанни мутации в генома

на вируса. Това налага разширени изследвания на причините за развитието на резистентност и начините за нейното преодоляване чрез създаване на нови антивирусни лекарства [Г.14.]

- Аминоацилните производни на аминоадамантианите амантадин и римантадин са изследвани за антивирусна активност, но в литературата са липсвали данни за пътя на мас-спектралната фрагментация на тези съединения, което е мотивирало екипа да направи следващото изследване [Г.15.]. Наблюдавани са два основни пътя на фрагментация. За производни на римантадин са описани загуби на римантадин и N-(1-адамантил) етилформаид. При производните на амантиана са намерени загуби на амантадин и N-(1-адамантил) формаид. Загубата на аминоацилната група е обща за всички изследвани съединения. Разбирането на механизма на фрагментация може да донесе нова представа за характеризирането на тези съединения.
- Публикувани са дизайн и синтез на серия от производни на адамантан–сдържащи модифицирани пептиди с тиазолов пръстен [Г.16.]. Описан е начина на получаването им. Изследвана е антивирусната активност на новосинтезирани съединения срещу грипния вирус H1N1. Изследвана е цитотоксичността (CC₅₀) и антивирусната активност (IC₅₀). Аналогът на римантадин с тиазолов пръстен Gly-Thz-римантадин показва добра активност срещу грипния вирус A/Hongkong /68 с IC₅₀ = 0,11 µg/ml и CC₅₀ = 50 µg/ml. В допълнение са изследвани антимикробна и противогъбична активност спрямо моделни щамове на грам-положителни (*Bacillus cereus*), грам-отрицателни (*Escherichia coli*) микроорганизми и гъби от щам *Yarrowia lipolytica* 3344. Съединенията Gly-Thz-римантадин е с добра антивирусна активност. а също така показва и много добра противогъбична активност в две различни концентрации.
- Синтезирани са амантианови производни с ароматните аминокиселини фенилаланин, 4-F-фенилаланин и тирозин [Г.17.]. Идеята на това изследване

е чрез въвеждане на аминокиселини да се повиши антиоксидантния потенциал на амантадина, което да засили анти-Паркинсонова активност.

Намерено е нещо много интересно. Фенилаланил-амантадина е по-активен, отколкото тирозил-амантадина спрямо DPPH. Спрямо супероксид-радикала тестваните съединения имат ниска активност. Активността на фенилаланиловото производно е по-висока при тестване спрямо супероксид-радикал и в присъствието на хелатор (ЕДТА) 16%, но иначе са слаби хелатори.

Тъй като оксидативният стрес е важна причина за появата на болестта на Алцхаймер (AD) може да се приеме, че конюгирането на наличните лекарства с вещества с антиоксидантни свойства ще доведе до благоприятен ефект. Целта на проучването е била да се изследва антиоксидантният капацитет на 7 аналога на мемантин (MEM) с Gly, Ala, β -Ala, Val, Phe, Phe (4-F) и Gly-Gly [Г.18.]. Антиоксидантният капацитет на MEM-аналозите е тестван в химични системи, генериращи супероксиден анион ($O_2^{\bullet-}$) и хидроксилни (HO^{\bullet}) радикали, и чрез прилагане на DPPH теста. Резултатите са показали незначителен ефект на веществата върху активността спрямо DPPH $^{\bullet}$. Phe-MEM, (4-F)-Phe-MEM и Gly-Gly-MEM демонстрират радикал-улавяща активност спрямо $O_2^{\bullet-}$. Съдържащите Phe производни оказват защитен ефект върху индуцираното от OH^{\bullet} разграждане на дезоксирибоза и имат способности да хелатират железни йони. В заключение, изследваните Phe-съдържащи MEM производни проявяват добра антиоксидантна активност и може да се очаква да са ефективни при лечение на AD.

- Синтезирани и оценени са естери на антихерпесните лекарства ганцикловир, пенцикловир с жлъчните киселини (холова, хенодеоксихолова и дезоксихолична) и аминокиселинни естери на ацикловир за *in vitro* антивирусна активност срещу вируси на херпес симплекс тип 1 и тип 2 (HSV-1, HSV-2) [Г.19.]. Антивирусните анализи показват, че модифицираните аналози на ACV и PCV са по-малко активни в сравнение с

първоначалните вещества срещу HSV-1 и HSV-2. CC_{50} за ганцикловир-дезоксихолат съответства на CC_{50} на останалите аналози и неговата активност е по-ниска от ганцикловир. Получените резултати показват, че тестваната модификация не подобрява антивирусната активност.

- Публикувано е системно NMR-изследване на 12 адамантанови амиди с потенциална биологична активност [Г.20.]. Химичните отмествания в ^1H и ^{13}C NMR показват сходни тенденции, заедно с някои специфични структурни промени в случаите на ароматни заместители. Наблюденията осигуряват добра основа за бъдещи изследвания, било като инструмент за подпомагане на базата данни за определяне на нови съединения или като отправна точка за анализ на конфигурацията и конформацията.
- В следващата статия е оценена хидролитичната стабилност на нови аналози на мемантина, модифицирани с аминокиселини, при различно рН, съответстващо на човешките биологични течности и органи [Г.21.]. Мемантин е неконкурентен антагонист на N-метил-D-аспаратния рецептор с нисък до умерен афинитет. В допълнение, той е първия представител на нов клас лекарства за болестта на Алцхаймер (AD), действащи върху глутаматергичната система чрез блокиране на N-метил-D-аспаратните рецептори. Изследваните серии от предлекарства включват модифициран мемантин със следните аминокиселини: аланин, β -аланин, глицин, фенилаланин и валин. Хидролитичната стабилност се определя при две различни стойности на рН 2,0 и 7,4 при 37 °C, подобни на тези в човешкия стомах и кръвна плазма. Специално разработен UV-VIS спектрофотометричен метод за количествено определяне на концентрациите на непроменени съединения е приложен в кинетичните изследвания. Val-MEM е най-стабилен в неутрална среда и при 37 °C има $t_{1/2} = 50,2$ часа. Съединението Phe-MEM има също много добра хидролитична стабилност – $t_{1/2} = 29,6$ h. Редът на стабилност на другите съединения е: Val-MEM \gg Phe-MEM \gg Ala-MEM \approx Val-MEM $>$ β -Ala-MEM. Ala-MEM и Gly-

MEM са най-стабилните съединения в кисела среда с почти идентични стойности за $t_{1/2} = 17,8$ h и $t_{1/2} = 16,3$ h, съответно. Стабилността на тестваните съединения в кисела среда е относително по-малка, отколкото в неутрална. Те са подредени, както следва: Ala-MEM \approx Gly-MEM > Val-MEM \approx Phe-MEM \approx β -Ala-MEM. Всички съединения имат относително добра хидролитична стабилност – повече от 10 часа както при неутрални, така и в кисела среда, което е напълно достатъчно, за да преминат в кръвообращението и да се използват като потенциален антимикуробен агент.

Приноси

Чисто синтетичните приноси на доц. Станкова са модифициране на вещества с доказана антивирусна активност – амантидин, римантадин (адамантанови производни), абакавир, ацикловир, оселтамивир, ганцикловир, пенцикловир както и на мемантин – лекарствено средство прилагано при лечение на болестта на Алцхаймер.

Модификациите са извършени с (i) различни протеиногенни и непротеиногенни аминокиселини и пептиди – глицин, глицил-глицин, глицил-глицил-глицин, аланин, β -аланин, тирозин, аргинин, серин, фенилаланин, 4-флуорфенилаланин, тиазол-съдържащи аминокиселини или с (ii) набор жлъчни киселини – холова, хенодезоксихолова и дезоксихолова киселини.

Проведени са серия изчерпателни структурни изследвания на получените съединения – рентгено-структурни изследвания, ^1H и ^{13}C NMR, мас-спектрални изследвания. Налице е и 3D QSAR – структурно изследване, в което е използван един съвременен теоретичен структурен метод (CoMFA) за корелиране на измененията на биологична активност и разликите в структурата на серия изследвани вещества от един и същи тип.

Сериозен научен принос са и изследванията на доц. Станкова свързани с хидролизната устойчивост на получените модифицирани вещества с цел да

се провери възможността да бъдат използвани като предлекарства на предшествениците си.

Всички синтезирани съединения са изпитани за антивирусна активност, цитотоксичност, а там където предшественикът го предполага, и други лекарствени активности.

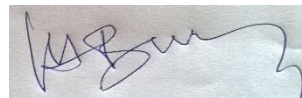
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представените от доц. Иванка Станкова научни трудове съдържат значими и оригинални научни и научно-приложни приноси в областта на медицинската химията, които отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България и правилника за прилагането му.

Обемът и високо качество на научните приноси, отразени в представените материали, както и цялостната дейност на кандидатката в областта на обявения конкурс, ми дават основание с дълбоко убеждение да дам своята положителна оценка и да препоръчам на почитаемото Научното жури да изготви доклад-предложение до Факултетния съвет на ПМФ, ЮЗУ „Неофит Рилски“ за избор на доц. д-р Иванка Георгиева Станкова на академичната длъжност „професор“ по професионално направление 4.2. Химически науки, научна специалност „Химия на природните и физиологично-активни вещества – химия на лекарствените средства“.

Благоевград, февруари 2021 г.

Рецензент:



(доц. д-р Живко Велков)

R E V I E W

By Assoc. Prof. Zhivko Velkov, Dept. of Chemistry at the SWU „Neofit Rilski“, Blagoevgrad on the materials for obtaining the academic position of "Professor"

In the contest for the academic position "Professor", announced in the State Gazette, issue 97/3.11.2020, the only candidate is Assoc. Prof. Dr. Ivanka Georgieva Stankova from Southwest University "Neofir Rilski" - Blagoevgrad.

The documents submitted by the Assoc. Prof. Stankova comply with the Regulations for the application of the Law for development of the academic staff and Internal regulations for the development of the academic staff in SWU "Neofit Rilski".

The candidate has submitted 22 scientific contributions published after the acquisition of the academic position "Associate Professor", all of which match the topic of this contest.

Ivanka Stankova graduated in 1982 from the University of Food Technologies - Plovdiv as a major in "Technology of microbiological and fermentation products ". She worked in a soft-drinks factory as head of a laboratory until 1987. After that she took a position as a chemist at the Bulgarian Academy of Sciences, in the Laboratory of bioorganic chemistry at the Institute of Molecular Biology. Since 1992 she has been a part-time lecturer in the Department of Chemistry at the Southwest University "Neofit Rilski", where she occupied all teaching positions in succession: 1995 - full-time Assist. Prof.; 2000 - Chief Assist. Prof; 2011 - Associate Professor.

She was appointed as lecturer of the courses "Biochemistry", "Bioorganic Chemistry", "Bio-active substances as food additives", "Chemistry of medicines", "Bio-active substances: sport and health" for various chemical and non-chemical specialties after her habilitation.

She has supervised 45 bachelor's and master's theses and 2 PhD theses. She co-authored six syllabi for different courses. Assoc. Prof. Stankova has participated in the preparation of the curriculum of the program - "Medical Chemistry", as well as of other programs taught at the Department of Chemistry of SWU "Neofit Rilski".

In 2012 she was elected Head of the Department of Chemistry in an extremely difficult period - low interest towards the offered programs, unmotivated academic staff. At the moment the department is in an extremely good condition. In the recent years, there is enhanced interest towards the programs of the Department, the faculties and staff members are highly qualified, the scientific production grows annually, and the assessment of the Department proficiency by Bulgarian National Evaluation and Accreditation Agency (NEAA) is high.

In 2019, Assoc. Prof. Stankova joined the administration of the Rector of the SWU as a Vice-Rector for Research and Doctoral training.

Assoc. Prof. Stankova participates in the competition for the professor position with 22 publications in prestigious scientific journals, not included in the documents for associate professorship, and 3 patent applications, which meets the requirements for Full Professor position in professional field 4.2. Chemical Sciences, according to the Rules for implementation of the Law for advancement of the academic staff.

The professional field of Assoc. Prof. Dr. Ivanka Stankova is the synthesis of new, bio-active substances aimed at improving the performance of already established in clinical practice drug forms: the drug molecules are modified in order to improve their activity, to increase their bioavailability or to reduce toxicity. An important direction of her research interests is the stability towards hydrolysis of the obtained substances with prodrug potential.

Review of the presented scientific papers

- Abacavir is a medicine used to prevent and treat AIDS. It is usually well tolerated, but some side effects may occur - liver damage and lactic acidosis, risk of cardiovascular disease and more. A possible way to minimize these side effects may be the linkage of abacavir to amino acids [B.1.]. Esters of abacavir with the amino acid glycine, the dipeptide glycyl-glycine and the tripeptide glycyl-glycyl-glycine were synthesized and their antiviral activity was assessed. One of the newly synthesized esters Gly-ABC - demonstrates low cytotoxicity and high anti-HIV-1 and MT-4 cells activity, low mitochondrial toxicity and high genetic resistance.
- Another way to modify antiviral drugs is the coupling to bile acids. Prodrugs containing bile acids have a better pharmacokinetic profile than parent drugs because bile acids tend to increase the ability to cross cell membranes. A series of esters, prodrugs of acyclovir (ACV), with bile acids - cholic, chenodeoxycholic and deoxycholic acid [B.2.] were synthesized and evaluated together with valaciclovir for *in vitro* antiviral activity against herpes simplex type 1 and type 2 viruses. (HSV-1, HSV-2). The *in vitro* antiviral activity of the three bile acid prodrugs was also assessed against Epstein-Barr virus (EBV). Plasma stability tests were performed using liquid chromatography combined with mass spectrometry. The biological profile of ACV prodrugs has been established. Antiviral analyzes showed that ACV-cholate had slightly better antiviral activity than ACV against HSV-1 and eight times higher activity against ACV against HSV-2. ACV chenodeoxycholate exhibits six times higher antiviral activity against HSV-2 against ACV. As for EBV, the highest antiviral effect was demonstrated by ACV-chenodeoxycholate. Stability analyzes in human plasma revealed that ACV deoxycholate was more stable than the other two prodrugs. These results confirm the hypothesis that by altering the basic structure of ACV with bile acids, prodrugs with enhanced antiviral activity can be obtained.

- Memantine derivatives containing amino acids with antimicrobial activity for the treatment of bacterial and fungal infections in patients with Alzheimer's disease have also been synthesized [B.3.]. A series of six memantine hybrid molecules were synthesized, ¹H NMR, ¹³C NMR, MS, X-ray structural analysis were characterized and their antimicrobial potential as well as their activity as anti-Alzheimer agents were tested.
- A series of nineteen amino acid analogues of amantadine (Amt) and rimantadine (Rim) have been synthesized and their antiviral activity has been assessed against influenza A (H3N2) virus. [B.4.] Among these analogs, the binding of rimantadine to glycine showed high antiviral activity and low cytotoxicity. Moreover, this compound showed high stability after *in vitro* incubation in human plasma for 24 hours. Its thermal stability was determined using differential and gravimetric thermal analysis. The crystal structure of glycyL-rimantadine reveals that it crystallizes in the orthorhombic structure. A structure-activity relationship was established for this class of compounds by CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) 3D-Quantitative Structure Activity Relations Relations (3D-QSAR) studies. A reliable prognostic model for future syntheses has been created. In addition, docking studies have been performed to reveal the spatial requirements for activity. Синтезирани и изследвани за цитотоксичност и противовирусна активност са 4 амантадинови и римантадинови производни с аминокиселини. [Г.5.].
- Three esters of acyclovir with 4-F-phenylalanine, deoxycholic and chenodesosicholic acid were synthesized and their resistance to hydrolysis was studied under conditions close to those in the human stomach and in the blood - at pH 1 and pH 7.4 at temperature 37 °C. [D.6.] The experiment shows that the amino acid ester is the most unstable of the three compounds, and the bile acid esters are stable under the same conditions. All compounds tested were more stable than valaciclovir, the first effective prodrug of acyclovir.

- A series of four adamantane derivatives with peptidomimetics containing one and two thiazole rings were synthesized and tested for antiviral activity against influenza H1N1 virus. [D.7.]. Rimantadine analogues with a thiazole ring show moderate activity against influenza A/Hongkong virus. The other compounds are significantly less effective.
- Two amides of amantadine amide and 4-fluorophenylalanine were synthesized. The compounds were tested for cytotoxicity and antiviral activity [D.8.]. One of the compounds showed remarkably high activity.
- New amides of amantadine and rimantidine (aminoadamantans) with cystine were synthesized and their activity against influenza virus H1N1 was tested [D.9.]. The test compounds show no activity.
- Two new derivatives of amantadine and rimantadine with Arg have been synthesized and tested for cytotoxicity and antiviral activity. The amantadine analogue shows borderline activity, but the rimantidine-arginine is not active [D.10.]. The chemical stability of the obtained compounds at pH 1 and pH 7 and 37 °C was tested.
- A series of new rimantidine derivatives with the amino acids alanine, valine and phenylalanine have been synthesized and their antiviral activity against influenza virus A has been studied [D.11.]. Alanylrimantidine shows moderate activity.
- Several derivatives of oseltamivir with bile acids (choline, deoxycholic and chenodeoxycholic acids) were prepared by the DCC method. The modifications are made to increase the bioavailability of the active substance and the stability of the neuramidase inhibitor oseltamivir [D.12.]. The resulting compounds were tested for antiviral activity against A/Aichi/2/68 (H3N2). The test compounds showed no effect on the virus.
- In the search for new prodrugs effective against influenza virus, analogues of amantadine and rimantadine (RS)-(-1-adamantyl)-ethanamine) containing a thiazole ring have been synthesized and their antiviral activity has been tested [D.13.]. Their chemical stability was also tested at pH 1 and 7.4 at 37 °C. An

HPLC method has been developed to quantify the unchanged amount of ester. The biological activity of adamantane derivatives is due to their spatial structure, significant lipophilicity and solid hydrocarbon structure. This facilitates their penetration through biological membranes. Therefore, modification of organic compounds by an adamantyl residue can significantly alter their biological activity. The number of resistant influenza strains to adamantanes is increasing every year due to spontaneous mutations in the virus genome. This requires extensive research into the causes of the development of resistance and ways to overcome it by creating new antiviral drugs [D.14.]

- There are no data in the literature on the path of mass-spectral fragmentation of acyl derivatives of aminoadamantanes and this motivated the group to perform the next study [D.15]. Two main pathways of fragmentation have been observed. Loss of rimantadine and N-(1-adamantyl)-ethylformamide have been reported for rimantadine derivatives. Loss of amantadine and N-(1-adamantyl) formamide has been found in amantadine derivatives. The loss of the aminoacyl group is common to all tested compounds. Understanding the mechanism of fragmentation may give a new idea of the characterization of these compounds.
- Design and synthesis of a series of derivatives of adamantane-containing modified peptides with a thiazole ring have been published [D.16.]. The method of preparation has been described. Antiviral activity of newly synthesized compounds against influenza H1N1 virus has been studied, also cytotoxicity (CC_{50}) and antiviral activity (IC_{50}) The rimantadine analogue with the thiazole ring (Gly-Thz-rimantadine) showed good activity against influenza A/Hongkong/68 virus with $IC_{50}= 0.11 \mu\text{g/ml}$ and $CC_{50}=50 \mu\text{g/ml}$. In addition, antimicrobial and antifungal activity against model strains of gram-positive (*Bacillus cereus*), gram-negative (*Escherichia coli*) microorganisms and fungi of the strain *Yarrowia lipolytica* 3344 were studied. The compounds Gly-Thz-rimantadine have good antiviral activity and also shows very good antifungal activity in two different concentrations.

- Amantadine derivatives with the aromatic amino acids phenylalanine, 4-F-phenylalanine and tyrosine have been synthesized [D.17]. The idea of this study is: to increase the antioxidant potential of the amantadine by coupling to appropriate amino acids, and by this way to enhance anti-Parkinson's activity.
- Something very interesting was found. Phenylalanyl-amantadine is more active than tyrosyl-amantadine against DPPH. Against superoxide radical the tested compounds have low activity, but the activity of the phenylalanyl derivative is higher when tested against superoxide radical in the presence of a chelator (EDTA) 16%. Otherwise they are weak chelators.
- Since the oxidative stress is an important reason of the Alzheimer's disease (AD), it can be assumed that conjugating available drugs with substances having antioxidant properties will lead to a beneficial effect. The aim of the study was to investigate the antioxidant capacity of 7 memantine analogues (MEM) with Gly, Ala, β -Ala, Val, Phe, Phe (4-F) and Gly-Gly [D.18]. The antioxidant capacity of MEM analogs was tested in chemical systems generating superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) and hydroxyl (HO^{\bullet}) radicals, and by applying the DPPH-test. The results showed a negligible effect of the substances on the activity against DPPH $^{\bullet}$. Phe-MEM, (4-F) -Phe-MEM and Gly-Gly-MEM. Phe-containing derivatives have a protective effect on OH-induced deoxyribose degradation and have the ability to chelate iron ions. In conclusion, the studied Phe-containing MEM derivatives show good antioxidant activity and can be expected to be effective in the treatment of AD.
- Esters of the antiherpes drugs ganciclovir, penciclovir with bile acids (cholic, chenodeoxycholic and deoxycholic) and amino acid esters of acyclovir for *in vitro* antiviral activity against herpes simplex HS 2 type 1 and type 1 viruses were synthesized and evaluated.) [D.19.]. Antiviral analyzes showed that the modified analogs of ACV and PCV were less active than the original substances against HSV-1 and HSV-2. The CC_{50} for ganciclovir deoxycholate corresponds to the CC_{50} of the other analogues and its activity is lower than that of ganciclovir. The

obtained results show that the tested modification does not improve the antiviral activity.

- A systematic NMR study of 12 adamantane amides with potential biological activity has been published [D.20.]. Chemical shifts in ^1H and ^{13}C NMR show similar trends, along with some specific structural changes in the case of aromatic substituents. Observations provide a good basis for future research, either as a tool to support the database for identifying new compounds or as a starting point for configuration and conformation analysis.
- The following article evaluates the hydrolytic stability of new amino acid-modified memantine analogues at different pHs corresponding to human biological fluids and organs [D.21.]. Memantine is a non-competitive antagonist of the N-methyl-D-aspartate receptor with low to moderate affinity. In addition, it is the first representative of a new class of drugs for Alzheimer's disease (AD) that act on the glutamatergic system by blocking N-methyl-D-aspartate receptors. The studied series of prodrugs includes modified memantine with the following amino acids: alanine, β -alanine, glycine, phenylalanine and valine. Hydrolytic stability was determined at two different pH values of 2.0 and 7.4 at 37 °C, similar to those in human stomach and blood plasma. A specially developed UV-VIS spectrophotometric method for quantifying the concentrations of unchanged compounds has been applied in kinetic studies. Val-MEM is the most stable in a neutral medium and at 37 °C has $t_{1/2}=50.2$ hours. The Phe-MEM has very good hydrolytic stability - $t_{1/2}=29.6$ h. The row of stability of the other compounds is: Val-MEM \gg Phe-MEM \gg Ala-MEM \approx Val-MEM $>$ β -Ala-MEM. Ala-MEM and Gly-MEM are the most stable compounds in acidic medium with almost identical values for $t_{1/2}=17.8$ h and $t_{1/2}=16.3$ h, respectively. The stability of the test compounds in an acidic medium is relatively less than in a neutral. They are arranged as follows: Ala-MEM \approx Gly-MEM $>$ Val-MEM \approx Phe-MEM \approx β -Ala-MEM. All compounds have relatively good hydrolytic stability - more than 10

hours in both neutral and acidic environments, which is quite enough to pass into the bloodstream and be used as a potential antimicrobial agent.

Contributions

The purely synthetic contributions of Assoc. Prof. Stankova are the modifications of substances with proven antiviral activity - amantidine, rimantidine (adamantane derivatives), abacavir, acyclovir, oseltamivir, ganciclovir, penciclovir, and memantine - a drug used in the treatment of Alzheimer disease.

The modifications were made with (i) various proteinogenic and non-proteinogenic amino acids and peptides - glycine, glycyl-glycine, glycyl-glycyl-glycine, alanine, N-alanine, tyrosine, arginine, serine, phenylalanine, 4-fluorosanilinyll or with (ii) a set of bile acids - cholic, chenodeoxycholic and deoxycholic acids.

A series of exhaustive structural studies of the obtained compounds were carried out - X-ray studies, ^1H and ^{13}C NMR, mass spectroscopy studies. There is also a 3D QSAR - structural study, which uses a modern theoretical structural method (CoMFA) to correlate the changes in bio-activity and the structural differences of the tested substances.

An important scientific contribution is the research of Assoc. Prof. Stankova on stability towards hydrolysis of the obtained substances in order to test their utilization as prodrugs.

All synthesized compounds were checked for antiviral activity, cytotoxicity, and other drug activities, pertaining to the precursor.

CONCLUSION

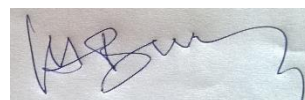
The scientific production presented by Assoc. Prof. Ivanka Stankova consists of significant and original fundamental and application-oriented scientific contributions in the field of medical chemistry, which match the requirements of

the Law for the advancement of the academic staff of the Republic of Bulgaria and the regulations for its implementation.

The extent and the quality of the scientific contributions reflected in the presented materials, as well as the overall activity of the candidate in the field of the announced competition, give me the reasons to recommend to the Honorable Scientific Jury to submit a report-proposal to the Faculty Council of the Faculty of Natural Sciences and Mathematics, at the SWU "Neofit Rilski" for the awarding to Assoc. Prof. Dr. Ivanka Georgieva Stankova the academic position "Professor" in the professional field 4.2 Chemical Sciences, scientific field "Chemistry of natural and physiologically active substances - chemistry of drugs".

Blagoevgrad, February 2021

Reviewer

A rectangular box containing a handwritten signature in black ink. The signature is cursive and appears to read 'Z. Velkov'.

Assoc. Prof. Zhivko Velkov