



ЮГОЗАПАДЕН УНИВЕРСИТЕТ
·НЕОФИТ РИЛСКИ·
БЛАГОЕВГРАД

**РЕЗЮМЕТА
НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ**

За участие в конкурс за заемане на академичната длъжност **доцент** по професионално направление 4.2. Химически науки /Органична химия/, обявен в ДВ бр. 37/ 07.05.2021г.

гл. ас. д-р Мая Георгиева Чочкова

Web of Science Researcher ID: E-1191-2017 или F-6812-2014

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9623-954X>

SCOPUS ID: 55256323500

Благоевград, 2021г.

1. Cinnamoyl- and hydroxycinnamoyl amides of glaucine and their antioxidative and antiviral activities

Spasova M., Philipov, S., Nikolaeva-Glomb, L., Galabov, A. S., Milkova, T. (2008).

Bioorganic and Medicinal Chemistry, **16**(15), 7457-7461. doi:10.1016/j.bmc.2008.06.010

Резюме: Апорфиновият алкалоид-глауцин е химически трансформиран в 3-аминометилглауцин и свободната му амино група е свързана с канелена, ферулова, синапова и *o*- и *p*-кумарови киселини. Антиоксидантните свойства на синтезираните амиди са изпитани чрез DPPH• тест. Всички тествани съединения показват по-висока активност в сравнение с глауцин и 3-аминометилглауцин, но по-слаб антиоксидантен ефект в сравнение със свободните хидроксиканелени киселини. Изпитана е антивирусната активност на новосинтезираните съединения срещу вируси от различни таксономични групи.

2. A novel one-pot synthesis and preliminary biological activity evaluation of cis-restricted polyhydroxy stilbenes incorporating protocatechuic acid and cinnamic acid fragments

Miliovsky M., Svinyarov I., Mitrev, Y., Evstatieva Y., Nikolova D., **Chochkova M.**, Bogdanov, M. G. (2013).

European Journal of Medicinal Chemistry, **66**, 185-192. doi:10.1016/j.ejmech.2013.05.040

Резюме: Новосинтезирана е серия от полихидроксизаместени *cis*-стилбени **4a–e**, **5** посредством нова едностъпкова Перкиноподобна реакция между 6,7-диметоксихомофталов анхидрид и ароматни алдехиди, и третирано по-нататък с BBr₃. Описаният метод позволява хибридни съединения, включващи два различни фармакофорни остатъци – структурни аналози на фенолни киселини (кафеена, галова, протокатехинова и др.) да бъдат получени за кратко време, с високи добиви и чистота. Структурата на целевите съединения е доказана чрез спектални методи ¹H NMR, ¹³C NMR, IR, HRMS, а конфигурацията на двойна връзка се потвърждава еднозначно с помощта на ¹³C NMR и 2D NOESY експерименти. Първоначално проведените биологични изпитвания на хибридните молекули показват, че те притежават тройно биологично действие - радикало-улавящи свойства, противогъбична активност и потенциал за инхибиране на монофенолазната активност на ензима тирозиназа при микромолярни концентрации. Установено е, че сред тестваните аналози най-обещаващо е съединение **4a**, действащо едновременно като отличен антирадикалов агент в DPPH• теста, като противогъбичен агент, потискащ растежа на *Fusarium graminearum* (89% инхибиране при 0.17 μmol/ mL) и като тирозиназен инхибитор с по-висока активност от стандарта-хидрохинон при концентрация 23 μM.

3. N-Hydroxycinnamoyl amides of fluorinated amino acids: Synthesis, anti-tyrosinase and DPPH• scavenging activities

Chochkova M., Stoykova, B., Ivanova, G., Ranz, A., Guo, X., Lankmayr, E., Milkova, T. (2013).

Journal of Fluorine Chemistry, **156**, 203-208. doi:10.1016/j.jfluchem.2013.09.013

Резюме: Синтезирана е серия от *N*-хидроксицинамоил амиди на флуорирани аминокарбоксилни киселини. Тяхната антиоксидантна активност е определена чрез бърз DPPH• тест и сравнена с тази на нефлуорираните им аналози, както и със стандартните антиоксиданти. Антирадикаловите свойства, получени по метода на *Nenadis* показват, че флуорният атом слабо повишава активността на три от изследваните амиди. Сред тестваните съединения, с най-висока антирадикалова активност е референтният антиоксидант - синапова киселина, последван от *N*-синапоил-3-флуоротирозин метиловия естер. Амидите, изследвани чрез DPPH•–HPLC метода показват подобна антирадикалова активност в сравнение с използваните стандарти - евгенол и изоевгенол. В допълнение е изследвано *in vitro* инхибиторното действие на *N*-хидроксицинамоил амидите на флуорираните аминокиселини спрямо гъбичната тирозиназа, използвайки *L*-тирозин като субстрат. Като стандартни тирозиназни инхибитори са използвани *p*-кумарова киселина и хидрохинон. Резултатите от изследването сочат, че сред тестваните амиди SA-Trp(6-F)-OMe (**4**) е най-ефективният инхибитор на ензима тирозиназа. Два от флуорираните амиди - SA-Trp(6-F)-OMe (**4**) и SA-Tyr(3-F)-OMe (**5**) не проявяват съществено различие в антитирозиназното действие при сравнение с *p*-кумаровата киселина, но се оказват с по-ниска активност от тази на стандарта - хидрохинон.

4. Amides of substituted cinnamic acids with aliphatic monoamines and their antioxidative potential

Spasova M., Ivanova G., Weber H., Ranz A., Lankmayr E., Milkova, T. (2007).

Oxidation Communications, **30**(4), 803-813

Резюме: Синтезирани са серия амиди на заместени канелени киселини с моноамини чрез конвенционални пептидни методи и чрез “зелени” методи за активиране (сонохимично/микровълново). Разработени са нови методи за получаване на тези амиди чрез прилагане на ултразвуково- или микровълново активирана *Wittig* реакция. Приложената оригинална модификация между ароматни алдехиди и съответните фосфониеви соли е проведена в хетерогенна течно-твърда система, без изолиране на получаващия се стабилизиран ирид. Структурите на получените съединения са потвърдени чрез UV, ¹H NMR, GC-MS или ESI-MS. Някои от хидроксицинамоил амидите са тествани за антирадикалова активност чрез DPPH• тест. Установено е, че ферулоил- и синапоил амидите са с по-ниска активност от съответните свободни хидроксиканелени киселини. Всички синапоиламиди проявяват по-висока антирадикалова активност от ферулоиламидите.

5. Synthesis and biological activity of hydroxycinnamoylcontaining antiviral drugs.

Chochkova M. G., Georgieva A. P., Ivanova G. I., Nikolova N., Mukova L., Nikolaeva-Glomb L., Milkova, T. S. (2014).

Journal of the Serbian Chemical Society, **79**(5), 517-526. doi:10.2298/JSC130222103C

Резюме: Синтезирани са седем аналози на противогрипни лекарствени средства (амантадин, римантадин и оселтамивир) със заместени канелени (*p*-кумарова-, ферулова-, синапова- и кафеена) киселини. Образоването на amidната връзка е проведено чрез EDC/ HOBt (1-[3-(диметиламино) пропил]-3-етилкарбодиимид/ 1-хидроксibenзотриазол) метод. Проведени са *in vitro* изследвания за DPPH• улавящо-действие и тирозиназно-инхибиторна активност. Сред синтезираните съединения *N*-[(*E*)-3-(3,4-дихидроксифенил)-2-пропеноил]-оселтамивир (1) и *N*-[(*E*)-3-(3,4-дихидроксифенил)-2-пропеноил]-римантадин (4), съдържащи катехолов остатък показват най-мощните DPPH• „погасяващи“ свойства. Оказва се, че amid (1) проявява също така и ~50% инхибиторен ефект спрямо гъбичната тирозиназа. Съединенията са тествани *in vitro* за противовирусна активност спрямо грипен вирус А (H3N2).

6. Synthesis of esters of substituted phenolic acids by microwave assisted Wittig reaction

Spasova M., Bankova V., Ivanova G., Rajpanova T., Milkova T. (2006)

Oxidation Communications, **29**(1), 172-175

Резюме: Получена е серия от неприродни и природно срещащи се естери на заместени канелени киселини чрез хетерогенна течно-твърда модифицирана реакция на *Wittig*. Микровълновото активиране е проведено в готварска мултимодна микровълнова пещ между (карбоалкоксиметил)-трифенилфосфониев халогениди и фенолни алдеhide, без изолиране на стабилизирани илиди, използвайки бази като KHCO₃ или K₂CO₃. Реакциите са проведени в среда DMSO при оптимални условия: мощност (P=150 W) и реакционно време до 10 min (при P>280 W пробата се овъглява). Получените чрез микровълнов синтез естери са охарактеризирани спектрално чрез UV, ¹H-NMR и MS. Установено е, че всички естери са получени в природно срещащата се *E*- π -диастереоизомерна форма (доказателство за това е присъствието в ¹H-NMR спектъра на два дублета с *J* ~ 16.00 Hz). Съдържанието на *Z*- π -диастереоизомерната форма е по-малко от 5 %.

7. Study on the antioxidant activity of *N*-hydroxycinnamoyl - amino acid conjugates in bulk lipid autoxidation

Kancheva V., **Spasova M.**, Totseva I., Milkova, T. (2006).

Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse, **83**(4), 162-169

Резюме: Изследвани са антиоксидантните свойства на *шест* синтетични ферулоил- и *три* синапоиламиди с природни/ неприродни аминокиселинните производни (*C*-защитени аминокиселини) върху автоокислението на кинетично чисти триацилглицероли на слънчогледово масло. Окислението е проведено при 80°C. Антиоксидантните ефекти на изследваните съединения са сравнени (при същата моларна концентрация) с тези на използваните стандарти - ферулова (FA) и синапова (SA) киселини, както и с антиоксиданти, които прекъсват окислителната верига бутилхидрокситолуен (BHT) и *DL* - α -токоферол (TOH). Установена е висока антиоксидантна ефективност за производните на синаповата киселина (съединения 7-9) и за съединение 4 от производните на феруловата киселина. За първи път е

доказано, че новосинтезираните амиди на синаповата киселина проявяват по-висок антиоксидантен капацитет (при 0.1 mM) от тази на съответните ферулоиламиди. Основните кинетични параметри са сравнени и разкриват, че относителна антиоксидантна ефективност (RAE) се понижава в следния ред: ТОН (4.5) > SA (2.5) > 9(2.0) > ВНТ(1.5) > 8 (1.4) > 4(1.3) > 7(1.2) > 3 = 1 (1.1) > 5 = 2 (0.8) > 6(0.7) > FA(0.5) и степента на инхибиране (ID) се понижава както следва: 3 (6.8) > 4 (6.6) > 6(6.4) > ТОН(6.0) = 9(6.0) > 1(4.6) > 7(4.4) > 2(3.5) > 8(3.2) > 5(3.1) > SA(2.6) > ВНТ(1.7) > FA(1.2). Установено е, че окислителната стабилност на липидите се повишава над 14 пъти в присъствие на *N-trans*-синапоил аминокиселинни амиди (7'-9').

8. Solid phase synthesis of sinapoyl-peptide amides

Spasova M., Pancheva S., Pajpanova T., Milkova Ts., Dibo G., Dzambazova E., Nocheva H., Bocheva A.

Proceedings of the Twenty-Ninth European Peptide Symposium September 3-8, 2006, Gdansk, Poland In: Peptides 2006. K. Rolka, P. Rekowski, J. Silberring (eds.), KENES International, Geneva, Switzerland p728-729. (ISBN 978-965-555-297-3)

Резюме: Докладван е синтез на серия от три- и тетрапептидни миметици, съдържащи непротеиногенни аминокиселини: канаванин (Cav) и sLys, и синапова киселина (SA), като аналози на ендогенните неuropeптиди MIF-1 и Tyr-MIF-1: SA-Pro-Leu-Gly-NH₂ (**1**); SA-Tyr-Pro-Leu-Gly-NH₂ (**2**); SA-Tyr-Pro-sLys-Gly-NH₂ (**3**); SA-Tyr-Pro-Cav-Gly-NH₂ (**4**); SA-Pro-Cav-Gly-NH₂ (**5**); Pro-Leu-Gly-Eda-SA (**6**); Pro-Leu-Gly-Pda-SA (**7**). Пептидите са синтезирани върху Rink-амидна смола, използвайки Fmoc-стратегия с прилагане на DIC/ HOBt активиране. Аналозите **6** и **7** са модифицирани в С-края с биоогенни амини и синапова киселина. Те са получени върху смола на Merrifield, използвайки Boc-стратегия с DCC/ HOBt активиране. Новосинтезираните синапоил - пептиди са изолирани чрез препаративна TLC и тяхната чистота е проверена чрез HPLC. Структурите на синапоил амидите са потвърдени чрез ESI-MS. Изследвани са аналгетичните ефекти на новосинтезирани аналози на MIF-1 и Tyr-MIF-1 по време на остра болка върху мъжки плъхове, порода Wistar чрез - raw pressure тест. Установено е, че самостоятелното инжектиране на SA довежда до значителен аналгетичен ефект в сравнение с Tyr-MIF-1 и MIF-1. Съединения **1**, **2**, **6** и **7** показват аналгетичен ефект, подобен на този на MIF-1. Сред тестванте аналози, **1** и **7** се оказват с най-изразени аналгетични ефекти, а съединения **3**, **4** и **5** проявяват аналгетичен ефект, сравним с контролната група. Синапоилпептидът **5** показва значителен аналгетичен ефект, по-висок от MIF-1, но по-слаб от SA. Пептиди **3** и **4** имат значителни аналгетични ефекти, но са по-ниски от Tyr-MIF-1 и SA. Зависимостта структура-активност в рамките на новите серии разкрива, че: а) заместването на SA и Cav в MIF-1 подобрява аналгетичната активност; б) заместването на SA и Cav и sLys в Tyr-MIF-1 понижава аналгетичната активност.

9. Synthesis and biological activity of cinnamic acids amides

Milkova Ts, **Spasova M.**, Ivanova G., Philipov S., Nikolaeva-Glomb L., Radeva G.

Proceedings of the Int. Scientific Conference, 2, 5-10 (2007) Faculty of mathematics and natural sciences, SWU "Neofit Rilski"-Blagoevgrad ISBN 978-954-680-537-9.

Резюме: Чрез стандартни пептидни методи са синтезирани 17 цинамоил-, ферулоил- и синапоил аминокиселинни амиди. Изпитана е антиоксидантната активност на шест ферулоил- и три синапоил амида. Някои от новосинтезираните съединения са тествани за антибактериална и антивирусна активност. Получени са двадесет и три *N*-алкилцинамоил амиди чрез стандартни пептидни методи в разтвор, чрез сонохимична и микровълново-активирана реакция на *Wittig*. Някои от синтезираните хидроксицинамоил амиди са тествани за антирадикалова активност чрез DPPH• тест. Установено е, че всички синапоил алкиламини са по-активни в сравнение с ферулоиламините. Получените резултати сочат, че amidите са с два пъти по-ниска активност от свободните хидроксиканелени киселини. Алкалоидът глауцин е модифициран с цинамоил- и хидроксицинамоилови остатъци. Получените производни са тествани за антирадикалова активност чрез DPPH• тест.

10. Amino acid Derivatives of Aporphinic Alkaloid Glaucine and their antioxidant activity.

Spasova M., Philipov S., Milkova T. (2009)

In: Valle S.D., Escher E., Lubell W.D. (eds)

Peptides for Youth. Book Series: Advances in Experimental Medicine and Biology, vol **611**, pp. 267-268. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-73657-0_120

Резюме: Докладван е синтез на серия от аминокиселинни амиди с глауцина. Липсата на функционална група в молекулата на глауцина налага той да бъде предварително модифициран чрез въвеждане на аминогрупа при C-3 място. Опитите да бъдат получени амиди на 3-аминоглауцин с различни защитени *N α* -аминокиселини чрез пептидни методите, се оказаха неуспешни (вероятно, поради ниската реактантност на аминогрупата в резултат на спрежението на неподделената електронна двойка при азотния атом с π -електроните на бензеновия пръстен). За преодоляване на този проблем, по известна методика е получен 3-аминометилглауцин. Новите аминокиселинни производни на 3-аминометилглауцин са получени с помощта на пептидния метод (EDC/ HOBT) и се охарактеризирани чрез UV, ¹H-NMR и ESI - MS. Синтезираните амиди (1-4), глауцинът и 3-аминометилглауцинът са тествани за антиоксидантна активност чрез DPPH• тест. Стойностите на антирадикаловата им активност са сравнени със стандартния антиоксидант - синапова киселина. Установено е, че голяма част от тестваните амиди на 3-аминометилглауцин са показали по-висока антирадикалова активност както от 3-аминометилглауцин, така и от глауцин. Получените резултати сочат по-ниска активност на amidите, в сравнение със синаповата киселина.

11. Antiviral effects of newly synthesized cinnmoyl amides of amino acids and aliphatic monoamines.

Nikolaeva-Glomb L., **Spasova M.**, Milkova Ts., Galabov, A. (2008)

Proceedings and Abstracts of Second Congress of Virology (Days of Virology in 58 Bulgaria) with International Participation, Sofia, May 28-31, (Eds. A. S. Galabov and L. Doumanova). The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, BAS, 59-66.

Резюме: Добре познати са антивирусният, антимикробният, антитуморният, противовъзпалителният и антиоксидантният ефект на фенолните фитосъединения, които привличат вниманието както на химици, така и на биолози. Естерите и амидите на канелените киселини не са изключение. Докато цинаматите изобилстват в растителното царство, то цинмоиламидите се срещат твърде рядко. Напоследък е налице засилен интерес към биомедицинските свойства както на природните, така и на синтетичните амиди, поради повишената стабилност на амидната група в тези съединения. Синтезът на нови цинамоилни производни, основан на присъствието на стабилна амидна група в тях, може да има за резултат нови съединения с антивирусни свойства.

В настоящото изследване са синтезирани две серии нови цинамоиламиди – 9 амида на аминокиселини и 9 амида на алифатни моноамини. Антивирусният ефект *in vitro* на новосинтезираните съединения е изпитан върху вируси от различни таксономични групи, в които има причинители на значими инфекциозни заболявания у човека и за които е необходима химиотерапия – полиовирус тип 1 (LSc-2ab) и коксакивирус В1 (CV-B1), представлящи род ентеровируси на сем. Пикорнавируси, човешкия респираторно-синцитиален вирус (RSV) и вирусът на диарията по говедата (BVDV), представлящи съответно сем. Парамиксовируси и сем. Флавивируси. Антивирусният ефект е изпитан чрез агар-дифузионния плако-инхибиращ тест и/или ЦПЕ-инхибиращия тест. Установен е антивирусен ефект на няколко от новосинтезираните съединения срещу репликацията на ентеровирусите. Четири от новосинтезираните амиди на аминокиселини са активни срещу репликацията на полиовирус тип 1 (LSc-2ab), а два от тях са активни и срещу репликацията на CVB1. Сред новосинтезираните амиди на алифатни моноамини две съединения са активни и срещу двата изпитвани ентеровируса. Необходимо е да се спомене, че полиовирус тип 1 (LSc-2ab) е по-чувствителен към ефекта на новите съединения в сравнение с CV-B1. Новосинтезираните амиди не притежават активност срещу репликацията на останалите изпитвани вируси.

В заключение може да се изтъкне, че няколко от новосинтезираните цинамоиламиди на аминокиселини и алифатни моноамини притежават умерен антивирусен ефект срещу репликацията на ентеровируси в клетъчна култура. Наблюдаваният антиентеровирусен ефект може да послужи като солидна основа за насочен синтез на нови, по-ефективни съединения.

12. Synthesis and Biological Activity of Cinnamic Acid Amides of Oxazole Containing Amino Acids

Stankova I., **Spasova M.**, Shishkov, Stoyan (2008)

Peptides 2008: Chemistry of Peptides in Life Science.

Proceedings of the Thirtieth European Peptide Symposium, p 50-51, Hilkka Lankinen(ed.)

Резюме: Представено е получаване на хидроксицинамоил амиди от съответните киселини (синапова, *p*-кумарова, ферулова киселини) и метилов естер на 2-аминометил-оксазол-4-

карбоксилна киселина. Оцена е DPPH• ефективността и антивирусната активност на новосинтезираните съединения. Установено е, че синтезираните хидроксицинамоил амиди са неефективни скавенджъри на радикали. Сред тях амидът на синаповата киселина на оксазол, съдържащ аминокиселина, показва най-висока антиоксидантна активност, но по-ниска от използваните стандарти: *алфа*-токоферол, ферулова- и синапова киселини. Освен това тестваните амиди не показват антивирусен ефект върху репликацията на HSV-1 и HSV-2.

13. Conjugation of glaucine to hydroxycinnamoyl amino acid amides

Spasova M., Philipov S., Avramov G., Milkova Ts. (2008)

Peptides 2008: Chemistry of Peptides in Life Science.

Proceedings of The Thirtieth European Peptide Symposium 48-49, Hilkka Lankinen (ed.)

Резюме: Синтезирани са два вида амидни производни *N*-хидроксицинамоил-фенилаланил-3-аминометилглауцин (**3** и **4**). Синапоил- и ферулоиламидът на 3-аминометилглауцин (съединения **1** и **2**) са съобщени по-рано, докато съединения **3** и **4** са неописани в литературата. Химичните структури на новосинтезираните амиди са потвърдени чрез UV, ¹H-NMR и ESI-MS спектри. Стойностите на константата на спин-спиново взаимодействие (³J_{H/H}) ~ 15,5 Hz на олефиновите протони определя *транс*-формата на получените аналози (*E*-*π*-диастереоизомерия).

Изследвани са ефектите на амидите на хидроксиканелените киселини и стандартния антиоксидант-токоферол срещу DPPH• радикал. Резултатите разкриват, че *N*-ферулоил- и синапоил-фенилаланил-3-аминометилглауцин са показали два пъти по-висока радикалоулавяща активност в сравнение със съответните амиди без фенилаланилов остатък (**1** и **2**). Сред всички тествани съединения, синапоил-фенилаланил-3-аминометилглауцинът притежава най-висока активност, дори и от стандартния антиоксидант - токоферол.

14. Sulfur-containing amino acid amides of phenolic acids

Spasova M., Paizs Cs., Stoykova B., Milkova Ts. , Irimie F. (2008), Peptides 2008: Chemistry of Peptides in Life Science.

Proceedings of The Thirtieth European Peptide Symposium 34-35, Hilkka Lankinen (ed.)

Резюме: Чрез тристепенна реакция са синтезирани два вида *N*-хидроксицинамоил-полиамин-аминокиселинни амиди **4** (**5**), които са изследвани за способностите им да улавят радикали. Антиоксидативният потенциал на целевите хидроксицинамоил амиди, съдържащи бензо [b] тиенилов остатък **4** (**5**), са изследвани спрямо DPPH•(1,1-дифенил-2-пикрилхидразилов радикал) в абс. EtOH. При сравняване на антирадикаловата активност на тестваните съединения е установен следният ред на нарастване: кверцетин > синапова киселина > токоферол > ферулова киселина > евгенол > съединение (**5**) > изоевгенол, съединение (**4**). Синтезираните амиди показват незначителна активност спрямо свободните радикали в сравнение с всички използвани стандарти. Установено е, че единствено синапоиламидът (**5**) е по-мощен от референта изоевгенол.

15. Hydroxycinnamic acid amides with oxazole-containing amino acid: Synthesis and antioxidant activity

Stankova I., **Spasova M.** (2009).

Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences, **64**(3-4), 176-178. doi:10.1515/znc-2009-3-404

Резюме: Синтезирани са три амидни производни на хидроксиканелени киселини с глицин-съдържащ оксазолов пръстен (2-аминометил-оксазол-4-метилкарбоксилат). Получените съединения са изследвани за антирадикалова активност с използването на 1,1-дифенил-2-пикрилхидразилов (DPPH•) тест. Сред изследваните производни, амидът на синаповата киселина показва най-висока активност спрямо DPPH• радикала.

16. Synthesis and antienteroviral activity of cinnamoyl and hydroxycinnamoyl amides

Nikolaeva-Glomb L., **Spasova M.**, Galabov A. S., Milkova Ts.

Proceedings of the Third International Scientific Conference – FMNS, 2009 3 – 7 June 2009 Faculty of Mathematics and Natural Science p. 43-48.

Резюме: Естерите и амидите на канелените киселини са потенциални антимикробни, антивирусни, антиоксидантни и противотуморни агенти. Докато естерите на канелените киселини са широко разпространени в растителното царство, то цинамоиламидите се срещат рядко. Напоследък интересът към фармакологичните свойства на природните или синтетичните амиди се повишава, поради по-високата стабилност на амидната група в сравнение с естерната.

Изследвана е серия от синтетични цинамоил- и хидроксицинамоиламиди срещу репликацията на някои ентеровируси. Новосинтезираните съединения са цинамоил- и хидроксицинамоил амиди на флуорирани ароматни аминокиселини, амиди на природни аминокиселини, амиди на заместени канелни киселини с алифатни моноамини, както и цинамоил- и хидроксицинамоил амиди на глауциновия аналог (3-аминометилглауцин).

Антивирусната активност на всички новосинтезирани съединения е тествана *in vitro* срещу репликацията на полиовирус тип 1 (Lsc-2ab) и коксаки вирус В1, които представляват многобройния ентеровирусен род от семейството на пикорнавирусите. Изпитването за антивирусен ефект на синтезираните от нас съединения е извършено *in vitro* чрез агар-дифузионен плако-инхибиращ тест и допълнително, по-прецизно определен чрез ЦПЕ-инхибиращ тест (ЦПЕ - цитопатичен ефект). Установено е, че някои от амидите като: синапоилфенилаланин, *N*-бутилцинамоиламид, цинамоил-Val-OMe и цинамоил-Тур-OMe, *p*- и *o*-кумароиламид на 3-аминометилглауцин показват умерени антиентеровирусни ефекти. Допълнително изследване е направено за цинамоил- и хидроксицинамоиламидите на глауцина спрямо други ентеровирусни модели, т.е. еховирус 13 и човешки риновирус 14. Наблюдавано е, че *p*-кумароиламидът проявява доста добра антивирусна активност срещу репликацията на еховирус 13 с индекс на селективност 5. Всички амиди на глауцин показват обещаващо антивирусно действие срещу репликацията на риновируса. В случая на *o*- и *p*-

кумароил амидите, селективният индекс надвишава 10. Тези изследвания могат да послужат като солидна основа за по-нататъшно развитие на антиентеровирусни агенти от този клас.

17. Free Radical Scavenging Activity of Hydroxycinnamoyl Amino Acid Amides

Spasova M., Dagon Dj., Ivanova G., Milkova Ts. (2009), Peptides: Breaking Away:

Proceedings of the Twenty-First American Peptide Symposium, June 7-12, 2009, Bloomington, IN, U.S.A., Michal Lebl (Ed.), American Peptide Society, p.84-85. ISBN 0-9715560-3-2

Резюме: Съединенията на хидроксиканелените киселини са важен източник на антиоксиданти, поради тяхното повсеместно разпространение в растителното царство. Те обикновено са под формата на естери, гликозиди или амиди, а само незначителен брой от тях се срещат в природата като свободни киселини. Тъй като концентрацията на хидроксицинамоил амидите в природата е изключително ниска и тяхната ензимна стабилност е по-висока от тази на естерите, това ни иницира да синтезираме серия от цинамоил-, ферулоил-, кофеоил- и синапоил-цистеин амиди, за да определи тяхната антиоксидантна активност. Четири хидроксицинамоил амида (1-4) са получени чрез EDC/ HOBt кондензация на съответните фенилпропенови киселини с H-Cys (Bzl) -OEt. Радикало-улавящата активност на *N*-хидроксицинамоил цистеин амиди (1-4) е сравнена със стандартните антиоксиданти като кверцетин, евгенол, изоевгенол, синапова киселина, ферулова киселина и *D, L* α -токоферол. Установено е, че ферулоил-, синапоил- и кафеоил-амидите проявяват по-висока антиоксидантна активност от стандартите евгенол и изоевгенол, но по-ниска от съответните свободни хидроксиканелени киселина, кверцетин и токоферол.

18. Antioxidant potential of phenolic acid amides of aromatic amines

Georgiev L., Totseva I., Seizova K., Marinova E., **Chochkova M.**, Milkova Ts. (2010), Peptides: Tales of Peptides

Proceedings of the Thirty-First European Peptide Symposium September, 5-9, 2010, Copenhagen, Denmark, Michal Lebl, Morten Meldal, Knud J. Jensen, Tomas Hoeg-Jensen (Eds.), European Peptide Society 2010, p.60-61. ISBN 0-9715560-5-9

Резюме: Настоящото изследване е посветено на изясняване на антиоксидантната активност на осем синтетични цинамоил- и хидроксицинамоил амиди на биогенни амини по време на окисление на чисти триацилглицероли на слънчогледово масло при 100°C, чийто механизъм е добре известен. Получените резултати са сравнени с инхибиращите ефекти на основните хидроксиканелени киселини. Канелената и *p*-кумаровата киселини са неактивни по време на тези условия на окисление. Всички останали съединения притежават отлична антиоксидантна ефективност, по-висока или сравнима с тази на кафеената киселина.

19. Radical scavenging activity of hydroxycinnamoylamides of amino acids - precursors of biogenic amines

Chochkova M. G., Nikova H. G., Ivanova G. I., Georgiev L. N., Milkova Ts. S. Peptides 2010: Tales of Peptides *Proceedings of the Thirty-First European Peptide Symposium September, 5-9, 2010*, Copenhagen, Denmark, Michal Lebl, Morten Meldal, Knud J. Jensen, Tomas Hoeg-Jensen (Eds.), European Peptide Society 2010, p.56-57. ISBN 0-9715560-5-9

Резюме: През последните години нараства интересът към разработване на различни видове антиоксиданти, които да блокират образуването или да неутрализират получените свободни радикали. Сред разнообразието от антиоксиданти нашето внимание се насочи към амидите на хидроксиканелените киселини, тъй като тези съединения се срещат в природата и имат стабилна структура след погасяването на свободните радикали. С цел да се определи влиянието на аминокиселинната компонента, включена в структурата на хидроксицинамоиламидите върху DPPH• радикала, са получени два вида хидроксицинамоиламиди (с ароматни амини или съответните им аминокиселинни прекурсори). Резултатите от радикало-улавящата активност (RSA) на амидите (1-11) и използваните стандарти (ферулова-, синапова-, кафеена киселини) разкриват, че видът на аминокиселинната компонента в 3-фенилпропеноиламидите не оказват съществено влияние върху изследваната активност. Всички амиди на хидроксиканелените киселини на фенилетиламин са най-мощните съединения, особено *N*-кафеилфенилетиламин. С изключение на кафеоиламидите, всички тествани хидроксицинамоиламиди показват по-слаба RSA от съответните свободни фенолни киселини.

20. Phenylpropanoids as naturally occurring and synthetical antioxidants: from plant defense to human health

Chochkova M., Georgiev L., Milkova Ts. (2011)

Proceedings of the Fourth International Scientific Conference – FMNS 2011, 8 – 11 June 2011, Faculty of Mathematics and Natural Science, 1, 325-332. ISSN 1314-0272

Резюме: Оксидативният стрес играе ключова роля в иницирането на редица дегенеративни процеси при хората, свързани със сърдечно-съдови заболявания, възпалителни заболявания, стареене на клетката и увреждане на ДНК, мутации и индуциране на рак. Опростената функционалност на хидроксиканелените киселини, включващи естери, амиди привлича вниманието ни, поради проявявания широк спектър от биологични активности като: антибактериална, противовирусна, противовъзпалителна, антиоксидантна, антипролиферативна, невропротективна и др. Разнообразието от фармакологичните свойства на подобни съединения е свързано с техните свойства да действат като антиоксиданти. Синтезирана е серия от амиди на хидроксиканелени киселини и е изследвана антиоксидантната им активност.

21. Antimicrobial and radical scavenging activities of *N*-hydroxycinnamoyl- *L*-cysteine and *L*-proline ethyl esters

Chochkova M. G., Chorbadzhiyska E. Y., Ivanova G. I., Najdenski H., Ninova M., Milkova S. T. (2012).

Natural Products Journal, 2(1), 50-54. doi:10.2174/2210315511202010050

Резюме: Хидроксиканелените киселини са широко разпространени като вторични метаболити в растителното царство. Те са изолирани също така и като прости производни- амиди, естери и гликозиди. Известно е, че тези киселини и техните производни притежават антибактериални, антивирусни, противовъзпалителни, антиоксидантни, антипролиферативни, имуностимулиращи и невропротективни свойства.

Целта на настоящата работа е получаване на нови хидроксицинамоиламиди на (L)- цистеин и (L) - пролин и определяне на тяхната радикало-улавящата и антимикробиална активност. Структурите на синтезираните аналози са охарактеризирани с UV, ¹H NMR, ¹³C NMR, ESI-MS. Съединенията бяха тествани за антибактериална (срещу *Staphylococcus aureus* 209, *Streptococcus pyogenes* 10535, *Bacillus subtilis* 1A95, *Listeria monocytogenes* C12) и противогъбична (срещу *Candida albicans* 62) активности. Всички амиди демонстрират най-мощна активност срещу *Streptococcus pyogenes*, дори по-висока в сравнение със свободните хидроксиканелени киселини. Оценена е способността на хидроксицинамоиламидите да взаимодействат с 1,1-дифенил-2-пикрил-хидразил (DPPH•) радикал *in vitro*. Получените резултати разкриват, че антирадикаловата активност на синапоил- и кафеоиламидите на L-цистеин превъзхождат тази на референтите ферулова киселина, евгенол и изоевгенол.

22. Radical scavenging and antimicrobial activities of cinnamoyl amides of biogenic monoamines

Georgiev L., **Chochkova M.**, Ivanova G., Najdenski H., Ninova M., Milkova T. (2012).

Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse, 89(2), 91-102

Резюме: Синтезирана и спектрално охарактеризирана (UV, IR, ¹H- и ¹³C-NMR) е серия от цинамоил- и хидроксицинамоил амиди на биогенните моноамини (тирамин, триптамин, допамин и 2-фенилетиламин). Антирадикаловата активност на получените съединения спрямо стабилния 1,1-дифенил-2-пикрилхидразилов (DPPH•) радикал е оценена и установена връзката: структура- активност. Резултатите от анализа разкриват, че кафеоилдопамин (15) и кафеоилфенилетиламин (16), притежаващи кафеоилен остатък са по-активни от свободната кафеена киселина, използвана като стандартен антиоксидант.

Антимикробиалната активност на голяма част от съединенията е определена спрямо Грам-положителни бактериални щамове: *Staphylococcus aureus* 209, *Streptococcus pyogenes* 10535, *Bacillus subtilis* 1A95, *Listeria monocytogenes* C12, както и срещу патогенната гъба *Candida albicans* 62. Установено е, че почти половината от синтетичните амиди са по-активни от свободните киселини срещу изследваните патогени.

23. Amides of antiviral drug oseltamivir with antioxidant active amino acids: synthesis and biological activities

Chochkova M., Ivanova G., Galabov A., Milkova Ts., Peptides: 2012.

Proceedings of the Thirty-Second European Peptide Symposium, September 2-7, 2012 – Athens, Greece Athens, Kokotos G, Constantinou-Kokotou V, Matsoukas J. (Eds.) European Peptide Society, p. 580-581. ISBN 978-960-466-121-3

Резюме: Различни изследователи предполагат, че окислителният стрес може да бъде замесен в патогенезата на белодробно увреждане по време на грипните инфекции. Следователно, антиоксидантите са един от възможните подходи за химиотерапия при грипна инфекция. Прилагането на комбинирана терапия на антиоксиданти с противовирусни лекарства може да намали усложненията и леталните ефекти, причинени от грипен вирус. В нашето проучване противогрипното лекарство средство - оселтамивир (Os) е химически свързано с антиоксидантни аминокарбоксилни киселини, производни на цистеин, хистидин и тирозин, за да се посочи евентуалното предимството на химичното свързване на двата агента по време на тежка грипна инфекция. Установено е, че превръщането на аминокиселинни производни в техните аналози на Os значително намалява способностите за улавяне на DPPH• радикала, в сравнение с положителната контрола като *N*-ацетил цистеин.

24. Anti-tyrosinase, antioxidant and antimicrobial activities of hydroxycinnamoylamides

Georgiev L., **Chochkova M.**, Totseva I., Seizova K., Marinova E., Ivanova G., Ninova M., Najdenski H., Milkova, T. (2013).

Medicinal Chemistry Research, **22**(9), 4173-4182. doi:10.1007/s00044-012-0419-x

Резюме: Определена е антиоксидантна активност *in vitro* на синтетични хидроксицинамоиламиди на аминокиселини (прекурсори на ароматни амини) чрез две антиоксидантни системи: спрямо 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил (DPPH•) радикал и чрез инхибиране на липидното перокисление (LPO). Освен това, тези съединения са тествани и сравнени със съответните им цинамоиламиди на ароматни амини. Сравнена е тирозиназно инхибиторната активност на двете групи синтетични амиди (цинамоиламидите на ароматни амини и на съответните им аминокиселинни предшественици). Освен това пет хидроксицинамоил амида на аминокиселини са изследвани за антимикробно действие.

Като се има предвид връзката структура-активност е установено, че и при двете групи амиди е очевидна съществена роля на катехоловия остатък от аминокиселинния или от цинамоилния остатък върху DPPH• радикал улавящата активност и инхибирането на LPO. Резултатите, получени от LPO ясно посочват положителното влияние на индолския пръстен върху инхибирането на липидното перокисление. Освен това, присъствието на хидроксилна група в *p*-позиция в остатъците на канелените киселини е от съществено значение за инхибирането на тирозиназата. Сред тестваните съединения, амидите на *p*-кумароилдопамина или тирамина и съответните им аминокиселинни прекурсори са сред най-мощните инхибитори на тирозиназата.

25. Biological activity of adamantane analogues

Chochkova M., Stoykova B., Nikolova N., Nikolaeva-Glomb L, Ivanova G., Milkova Ts. (2013)

Proceedings of the Fifth International Conference of FMNS 4, 17-25.

Резюме: След откриването на първото синтетично противогрипно съединение - амантадин (1-адамантиламин), се бележи ново начало в лекарствената химия на адамантановите производни. Тези съединения привличат вниманието на учените, тъй като притежават потенциал като химиотерапевтични средства (срещу грипни и ХИВ вируси, антибактериални, противогъбични, противовъзпалителни и др.). В продължение на нашата изследователска работа върху химичните и фармакологичните свойства на подобни молекули, в настоящата работа са докладвани резултати свързани със синтеза и биологичната активност на аминоадамтанови производни. Химическите модификации на молекулата на аминоадамтановия аналог-римантадин със стероли (холестерол, холестанон) водят до образуването на *Schiff*-база (с холестанон) или получаването на холестеролови производни на римантадин посредством използване на адипинова киселина като линкер. Новосинтезираните съединения са тествани *in vitro* за противогрипна активност срещу A/ H3N2 и A/ H1N1. Предварителните резултати от това изследване показват обещаваща противовирусна активност.

26. Investigation of α -glucosidase inhibitory activity of *N*-hydroxycinnamoyl amino acid amides

Stoykova B. M., **Chochkova M. G.**, Petrova P. P., Ivanova G. I., Milkova T. S.,

Peptides: 2015.

Proceedings of the 33rd European Peptide Symposium, 31 August – 5 September, 2014, Sofia, Bulgaria (Emilia Naydenova, Tamara Pajpanova, Dancho Danalev (Eds.), p. 51. Bulgarian Peptide Society. ISBN 978-619-90427-2-4

Резюме: Известно е, че *N*-хидроксиканелените производни притежават разнообразни биологични активности, по-специално антиоксидантни свойства. Допълнително подобен тип съединения са идентифицирани също като инхибитори на α -глюкозидазата. Имайки предвид факта, че оксидативният стрес участва в диабетните усложнения, ние предполагахме, че новосъздадените хидроксицинамоиламиди могат да проявят защитна роля срещу оксидативния стрес. Определени са инхибиторните ефекти на синтезираните по-рано от нас амиди на хидроксиканелените киселини върху гъбична α -глюкозидаза, използвайки модифициран метод. За да се сравнят инхибиторните активности са определени стойностите на IC_{50} на получените амиди и на акарбозата, използвана като положителен инхибитор. Резултатите от изследването разкриват, че сред тестваните съединения синапоил амидът (1) притежава най-мощната инхибираща α -глюкозидазна активност (IC_{50} 1.82 ± 0.17) в сравнение с акарбозата (IC_{50} 2.50 ± 0.21 $\mu\text{g/ml}$). Друго активно съединение е ферулоиламидът 2, проявяващо мощно инхибиране с IC_{50} стойност, подобна на акарбозата. Противоположни са резултатите за амидите на *транс*-канелената киселина (3 и 4), които не показват активност в

in vitro анализа. Хидроксицинамоил амидите (1 и 2) проявяват изключително мощно инхибиране върху гъбичната α -глюкозидаза *in vitro* и могат да се разглеждат като обещаващи инхибитори.

27. Novel oseltamivir and aminoadamantane analogues containing non-proteinogenic amino acid

Stoykova B., **Chochkova M.**, Apostolova R., Petrova P., Ivanova G., Nikolova N., Nikolaeva-Glomb L., Milkova Ts, Peptides: 2015.

Proceedings of the 33rd European Peptide Symposium, 31 August – 5 September, 2014, Sofia, Bulgaria (Emilia Naydenova, Tamara Pajpanova, Dancho Danalev (Eds.), 53-54. Bulgarian Peptide Society. ISBN 978-619-90427-2-4

Резюме: Представен е синтез на нови пирролидинови производни, съдържащи невраминидазния инхибитор – оселтамивир и блокери на йонните канали (амантадин и римантадин). Новосинтезираните амиди са тествани за противовирусна активност *in vitro* срещу грипен вирус A/Aichi /2/68 (H3N2). В сравнение с утвърдените противогрипни лекарства, модификациите им с 4-хидрокси-L-пролин не водят до потискане на репликацията на грипен вирус тип А H3N2.

В допълнение са изследвани инхибиторните ефекти на амидите на 4-хидрокси-L-пролин върху монофенолазната активност на гъбичната тирозиназа. Като положителна контрола е използвана коджиковата киселина, която е мощен инхибитор на тирозиназата. Установено е, че инхибиторната активност на тестваните съединения се повишава в следния ред: 2 (16.96 ± 0.38) < 3 (19.82 ± 0.02) < 1 (24.11 ± 0.07) < коджикова киселина (62.67 ± 0.06). Оказа се, че новосинтезираните амиди проявяват добра инхибиторна активност.

28. N-Lipoyl amino acid amides of anti-influenza drugs: synthesis and biological activity

Stoykova B., **Chochkova M.**, Petrova P., Ivanova G., Milkova Ts., Peptides: 2015.

Proceedings of the 33rd European Peptide Symposium, 31 August – 5 September, 2014, Sofia, Bulgaria (Emilia Naydenova, Tamara Pajpanova, Dancho Danalev (Eds.), 86-87. Bulgarian Peptide Society. ISBN 978-619-90427-2-4

Резюме: Липоевата киселина (LA) е природно съединение, което е добре известно като клетъчен многофункционален антиоксидант и се продуцира от бактериите до човека. Уникалните ѝ свойства са свързани с проява на антиоксидантен ефект и на двете ѝ форми: окислена (LA) и редуцирана (DHLA [дихидролипоева киселина]), както в мастно-, така и във водоразтворима среда. Антиоксидантните способности на тези молекули се свързват с четири различни активности: скавенджъри на свободни радикали, регенериране на ендогенни антиоксиданти, възстановяване на окислени протеини и хелатиране на метални йони. В допълнение, липоевата киселина инхибира експресията и активността на тирозиназата, както и активира избелващия ефект на кожата.

Като се има предвид нарастващия интерес към липоевата киселина и нейните аналози, в настоящата работа се разглежда синтезът на амиди, съдържащи липоева киселина и противогрипни лекарства (римантадин или оселтамивир), свързани чрез аминокиселинна част (H-Cys-OH). *L*-Цистеинът е избран като линкер, поради неговите антиоксидантни и антитирозилазни свойства. Структурата на двата нови аналога (1 и 2) е определена чрез IR, ¹H и ¹³C NMR спектроскопия. Предварителният скрининг от радикал-улавящата активност (спрямо DPPH*) на новосинтезираните съединения и на приложения стандартен антиоксидант - кафеена киселина са определени *in vitro* при концентрация от 48 μM. Като цяло липоиламидите показват по-ниски антирадикалови свойства от тази на кафеената киселина. По отношение на сяро-съдържащите органични съединения като липоева киселина и тиол-съдържащата аминокарбоксилна киселина-Cys, предложените аналози е възможно да хелатират медните йони от активния център на тирозиназата, като по този начин да повишат ензимното инхибиране. От предварителното спектрофотометрично определяне на инхибиторната активност на монофенолазата активност на тирозиназата (с използване на *L*-тирозин като субстрат) е установено, че тестваните амиди *N*-липоил-цистеинил амиди на оселтамивир (1) и римантадин (2) не показват инхибиране в сравнение с коджиковата киселина, използвана като положителна контрола. Въпреки, че тестваните съединения не са тирозинази инхибитори, то е възможно те да проявят депигментираща активност.

29. Synthesis of fluorinated hydroxycinnamoyl derivatives of anti-influenza drugs and their biological activity

Stoykova B., **Chochkova M.**, Ivanova G., Mukova L., Nikolova N., Nikolaeva-Glomb L., Vojtišek P., Milkova T. M., Havlíček D. (2015).

Chemistry, **24**(3), 340-347

Резюме: Появата на нов пандемичен щам на грипен вирус А (H1N1) през 2009 г. очертава нестихващия риск от респираторни вирусни заболявания. Грипните епидемии и развитието на заболяване могат да бъдат преодолени чрез използване на ваксини и противогрипни средства. Понастоящем клинично прилаганите грипни антивирусни средства са ограничени до M2 блокери на йонния канал (амантадин и римантадин) и инхибитори на невраминидаза (оселтамивир и занамивир). Развитието на резистентно вирусно потомство обаче е едно от основните предизвикателства за антивирусната химиотерапия като цяло. Доказани са резистентни вирусни мутанти и за двата класа противогрипни лекарствени средства. Следователно, разработването на нови антивирусни агенти за третиране на грипната инфекция е от изключително значение. Комбинирането на антивирусни лекарства с антиоксиданти при тежки грипни усложнения е от голямо терапевтично значение.

Въз основа на изявената антиоксидантна активност на хидроксиканелените киселини, в настоящата работа се разглежда биологичната активност на новосинтезирани амиди, получени чрез свързване на предварително синтезираните *N*-хидроксидинамоил амиди на флуорирани аминокиселини с фрагмент от оселтамивир. Антивирусният ефект на ковалентно свързаните хибридни структури са изследвани *in vitro* срещу грип А (H3N2). Доказано е, че изследваните съединения не предизвикват синергични противогрипни ефекти.

30. Ultrasound-assisted green bromination of *N*-cinnamoyl amino acid amides – structural characterization and antimicrobial evaluation

Stoykova B., **Chochkova M.**, Ivanova G., Markova N., Enchev V., Tsvetkova I., Najdenski H., Štícha M., Milkova T. (2017).

Journal of Molecular Structure, **1135**, 144-152. doi:10.1016/j.molstruc.2017.01.056

Резюме: Чрез използване на два алтернативни сонохимично активирани „зелени“ методи са бромирани *N*-фенилпропаноил аминокиселинни амиди. Първата синтетична процедура включва ултразвуково бромиране във водна среда с използване на йонна течност като катализатор на реакцията. Втората процедура - *in situ* образуване на Br₂ чрез окисление на HBr от H₂O₂, а за сравнение е използвано конвенционално бромиране. Получените добиви от „зелените“ сонохимично модифицирани методи А и В не се различават съществено от конвенционалното бромиране. Новосинтезираните бромираните съединения са доказани с подходящи аналитични техники. За определяне на стереохимията на продуктите е използван детайлен NMR спектроскопски анализ (1D (¹H и ¹³C) и 2D (COSY, HSQC, HMBC) NMR) и квантовохимични изчисления с помощта на Теорията на функционала на плътността (DFT). Резултатите от NMR потвърждават структурната идентичност на продуктите, получени чрез различните синтетични процедури. Подробният анализ на данните предполага наличието на две изомерни форми в новосинтезираните продукти. Според относителните стабилности на двата изомера за съединения 1-4, изомер *R* е по-стабилната структура за всички молекули. Определена е антибактериалната и противогъбичната активност на дибромираните амиди. Резултатите от антимикробиалните изследвания разкриват, че *N*-(α , β -дибромо- β -фенилпропаноил)-трет. бутил аланинат (1) и *N*-(α , β -дибромо- β -фенилпропаноил)-метил валинат (4) могат да се разглеждат като модел за по-нататъшно изследване на антибактериалната активност.

31. Anti-influenza drug derivatives with potential biological activity

Stoykova B., Chochkova M., Nikolaeva-Glomb L., Ivanova G., Štícha M., Milkova Ts. (2016)

In: *Proc. of the PhD Student Scientific Session of the FMNS – 2016*, M. Mitov, M. Shishmanova, St. Stefanov (eds.), 6-9; ISBN 978-954-00-0109-8.

Резюме: Грипът е вирусно инфекциозно заболяване с опустошителен характер. През XX век грипните инфекции са в основата на три пандемии, които са довели до загубата на милиони човешки животи. Понастоящем непрекъснатата поява на сезонни епидемии е широко разпространено и съществува потенциален риск от появата на грипни пандемии. Към днешна дата за повлияване на грипните инфекции се прилагат два класа утвърдени противогрипни химиотерапевтици- M2 блокери и инхибитори на невраминидазата. Ефективността на тези лекарства обаче може да бъде ограничена, когато под тяхно въздействие се осъществи селектиране на резистентни мутанти. Ограниченията на монотерапията налагат търсенето и спешното разработване на нови ефективни стратегии за вирусното третиране. Дизайнът на хибридни молекули, включващ две отделни групи лекарствени средства е обещаващ съвременен подход за повлияване на различни мишени. С оглед на по-нататъшно изследване на противогрипното действие са получени модификации на

противогрипните лекарства (римантадин, оселтамивир) с аминокиселинни амиди на дибромохидроканелена киселина.

За потвърждаване структурата на целевите съединения е използвана масспекрометрия с електроспрей йонизация (ESI-MS). В маспектрите на α,β -дибромо-*N*-хидроцинамоил-изовалинил-оселтамивир (6) и α,β -дибромо-*N*-хидроцинамоил-изовалинил-римантадин (7) се забелязва пикът на молекулните йони като основен пик при m/z 750.5 (съединение 6), съответстващ на $[M + H]^+$, докато за съединение 7 се наблюдава при m/z 655.5 (7), съответстващо на $[M + Na]^+$.

32. Amino acids amides of anti-influenza drugs: Synthesis and biological activities

Stoykova B., **Chochkova M.**, Georgiev L., Ivanova G., Mukova L., Nikolova N., Nikolaeva-Glomb L., Milkova Ts., Štícha M. (2017).

Bulgarian Chemical Communications, **49**, 16-22

Резюме: Грипните вируси тип А са сред най-вирулентните респираторни патогени, водещи до значителна заболяемост и смъртност. Високата честота на антигенни вариации на грипния вирус е причина за възникване на пандемични взривове. Ето защо създаването на нови противогрипни средства е изключително атрактивна изследователска област.

В настоящето изследване е разгледан синтезът и е изследвана противогрипната активност на аминокиселинни амиди на римантадин и оселтамивир. Изпитването за антивирусен ефект е проведено *in vitro* спрямо грипен вирус тип А (A/H3N2). Резултатите от скрининга показват, че амидното свързване на аминокиселинните аналози (тирозин, хистидин, аспарагинова и глутаминова киселини) с оселтамивир и римантадин не водят до повишаване противовирусната активност спрямо изпитвания щам.

33. Synthesis and radical scavenging activity of cinnamic acid esters

Chochkova M., Stoykova B., Petrova P., Gyoshkova N., Ivanova G., Štícha, M., Milkova, T. (2017).

Bulgarian Chemical Communications, **49**, 68-73.

Резюме: Канелената, хидроксиканелените киселини (ферулова, синапова, кафеена) и техните естери представляват вторични растителни метаболити, биосинтезирани от фенилпропаноидния метаболитен път. Природните хидроксицинаматите и техните синтетични аналози привличат вниманието на изследователите поради широкия спектър от биологични активности като: антиоксидантна, антимикробиална, противотуморна, противовъзпалителна, тирозиназно-инхибиторна и др.

В настоящето изследване е разгледана редукция на карбоксилната група на защитени аминокарбоксилни киселини (на *N* α -място и в страничната верига). След естерифициране на получените аминокалкохоли с хидроксиканелени (синапова и ферулова) киселини, новосинтезираните производни са подложени на изследване за радикало-улавяща активност спрямо 1,1-дифенил-2-пикрилхидразилов радикал (DPPH•). Резултатите от антирадикаловата активност на хидроксицинаматите са сравнени с тези на съответните хидроксицинамоиламиди с аминокарбоксилни киселини. Като стандартни антиоксиданти са използвани свободните

хидроксиканелени киселини. Установено е, че хидроксицинамоиламидите показват по-ниска антирадикалова активност от съответните свободни хидроксиканелени киселини, но по-висока от тази на хидроксицинаматите.

34. Structure-activity relationships of N-cinnamoyl and hydroxycinnamoyl amides on α -glucosidase inhibition

Chochkova M. G., Petrova P. P., Stoykova B. M., Ivanova G. I., Štícha M., Dibó G., Milkova T. S. (2017).

Journal of Chemistry, 2017 doi:10.1155/2017/6080129

Резюме: Понастоящем има засилен интерес към α -глюкозидазното инхибиране на различни заболявания, включващи захарен диабет тип 2, рак, ХИВ и вирусен хепатит от тип В и С. Доказано е, че производните на канелената киселина са потенциално ценни като нова група инхибитори на α -глюкозидазата. В настоящата работа е изследвана *in vitro* инхибиторната активност на *trans*-N-цинамоил- и хидроксицинамоил амиди върху α -глюкозидазата. Резултатите от изследването разкриват, че тестваните хидроксицинамоиламиди (1-16) инхибират α -глюкозидазата с IC_{50} , вариращи между 0.13 и 355.1 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Съединения 1, 2, 5, 6, 9, 14 и 15 показват значително инхибиране на α -глюкозидазата, които са дори по-мощни от използвания положителен инхибитор акарбоза ($IC_{50} = 2,50 \pm 0,21 \mu\text{g} / \text{ml}$).

35. Adamantane-1-carboxamides: Synthesis and antimicrobial activity

Stoykova B., **Chochkova M.**, Ivanova G., Tsvetkova I., Najdenski H., Štícha M., Milkova T. (2018).. *Bulgarian Chemical Communications*, **50** (Special Issue B), 49-54.

Резюме: Непрекъснато нарастващата бактериална резистентност налага търсенето на нови ефективни лекарствени средства. Подчертаната антимикубиална активност на редица адамантан- съдържащи съединения, привлича широкия научен интерес към тези аналози.

В настоящето изследване е описан синтез на N-адамантан-1-карбоксамиди с полиамини. Новополучените производни са проучени *in vitro* за антибактериална активност спрямо два Грам-положителни (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) и два Грам-отрицателни (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) щам, както и за антимикутична активност спрямо патогенната гъба *Candida albicans*. Резултатите разкриват, че сред синтетичните бисамиди: N,N'-бис-адамантан-1-карбоксамидът на 1,6-диаминохексан се откроява като най-активен. Съединението инхибира както тестваните Грам-положителни и Грам-отрицателните бактерии с една и съща MIC-стойност ($125 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), така и проявява най-висока антимикутична активност ($\text{MIC } 63 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) спрямо *Candida albicans*.

36. Synthesis of 3-aminomethylglucine derivatives and *in vitro* evaluation of their anti-tyrosinase, antiviral and radical scavenging activities

Chochkova M., Stoykova B., Nikolaeva-Glomb L., Philipov S., Milkova T. (2020).

Резюме: Синтезирана е серия от амиди чрез свързване на 3-аминометилгlauchин с различни аминокиселинни аналози. Реакцията е проведена при меки условия с използване на различни карбодиимиди и в присъствието на каталитично количество *N*-хидроксibenзотриазол. Пет от получените съединения са нови и техните спектрални данни са представени и обсъдени в настоящето изследване. Селектирани са амиди, които са тествани за определяне на способността им да улавят стабилния 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил (DPPH•) радикал. Най-активните съединения са *N*-синапоилфенилаланил-3-аминометилгlauchин амид и *N*-ферулоилфенилаланил-3-аминометилгlauchин амид и тяхната активност се дължи на наличието на хидроксинамоилен остатък в молекулите. Съединенията са допълнително тествани *in vitro* за антивирусна активност срещу вируси, принадлежащи към семейство *Picornaviridae*. Освен това е определена и анти-тирозилазната активност на съединенията *in vitro*. Получените резултати сочат, че най-обещаващият тирозилазен инхибитор е ферулоил-фенилаланил-3-аминометилгlauchинът.

37. Synthesis and antimicrobial activity of novel kojyl carbamates

Stoykova B., **Chochkova M.**, Tsvetkova I., Najdenski H., Štícha M., Ranchova K., Milkova, T. (2020). *Bulgarian Chemical Communications*, **52**, 23-29. doi:10.34049/bcc.52.A.299

Резюме: По синтетичен път са получени нови коджикови производни на амантадин, римантадин и оселтамивир. Коджилкарбаматите са синтезирани чрез EDC/HOBt метод след предварително активиране на коджиковата киселина. Структурите на новополучените карбаматни производни бяха охарактеризирани чрез *m*r, UV, IR (ATR)_umax, ESI-MS. Синтезираните съединения бяха подложени на тест за определяне на антимикробна активност *in vitro*. Резултатите ясно разкриват, че коджилкарбаматът на римантадина (**4**) проявява най-висока антибактериална активност (MIC 31 µg/ml) и то спрямо Грам-положителните - *Staphylococcus aureus* 209 и *Bacillus subtilis* 1A95. За новополученото производно на римантадина (**4**) е установена около четири пъти по-висока активност спрямо двата Грам-отрицателни бактериални щамове (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). Сред тестваните производни, коджилкарбаматът на римантадина се откроява също и като най-активен антимикотичен агент спрямо тестваната патогенна гъба (*Candida albicans*).

38. Cinnamoyl-memantine hybrids: Synthesis, X-ray crystallography and biological activities

Chochkova M., Jiang H., Kyoseva R., Stoykova B., Tsvetanova E., Alexandrova A., Liu R., Li Z., Mitrev Y., Dimitrova-Sbirkova H, Štícha M., Shivachev, B. (2021).

Journal of Molecular Structure, **1234**, 130147. doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130147

Резюме: Представени са скелетните структури на антиоксидантните заместени канелни киселини и мемантин (*N*-метил-*D*-аспартатен рецепторен антагонист), насочени към разработване на таргетна терапия за различни мишени. Образоването на амидната връзка в

мемантиновите хибриди (1–5) е осъществено чрез EDC/ HOBT метод. Структурите на новополучените съединения са доказани посредством точка на топене, UV, IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR и HRMS. Кристалната структура на мемантиновите хибриди (2–5) е допълнително потвърдена, използвайки монокристална рентгенова дифракция. Рентгеноструктурните изследвания разкриват, че съединенията 2, 5 кристализират по центросиметричен начин както в моноклинната пространствена група $P2_1/c$, (No 14), така и по нецентросиметричен начин за съединения 3 и 4, съответно $R3$, (No 146) и $P2_12_12_1$, (No 19).

Проведени са първоначални *in vitro* изследвания на новосинтезираните съединения за определяне на невропротективното им и радикало-улавящо действие. Изследвана е антирадикаловата активност на мемантиновите хибриди по отношение на 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил (DPPH•) радикали, хидроксилни (OH•) и супероксидни анион радикали ($\text{O}_2^{\bullet-}$) и сравнена със стандартните антиоксиданти (ферулова и синапова киселини). Проведеният *in vitro* скрининг показва, че сред тестваните хибриди, *N*-синапоиламидът на мемантин (3) е най-мощният антиоксидант при всички радикало-улавящи тестове.

Освен това, *in vitro* изследванията на ефектите на мемантиновите хибриди спрямо Алцхаймер показват, че получените хибриди проявяват умерено невропротективно действие. Като цяло, те показват малко по-слаба активност в сравнение с положителната контрола - мемантин.

Нашите първоначални изследвания разкриват, че *N*-синапоиламидът на мемантин (3) може да се разглежда едновременно като радикало-улавящ и обещаващ невропротективен агент при болестта на Алцхаймер.

ABSTRACTS

of the SCIENTIFIC PUBLICATIONS

presented for participation in the competition for the academic position “Associate Professor” in the professional field 4.2. Chemical Sciences (Organic Chemistry) announced by South-West University “Neofit Rilski”, published in the Bulgarian State Official Journal, № 37, May 07, 2021

Chief Assistant Professor Maya Georgieva Chochkova, PhD

Web of Science Researcher ID: E-1191-2017 or F-6812-2014

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9623-954X>

SCOPUS ID: 55256323500

1. Cinnamoyl- and hydroxycinnamoyl amides of glaucine and their antioxidative and antiviral activities

Spasova M., Philipov, S., Nikolaeva-Glomb, L., Galabov, A. S., Milkova, T. (2008).

Bioorganic and Medicinal Chemistry, **16**(15), 7457-7461. doi:10.1016/j.bmc.2008.06.010

Abstract: The aporphine alkaloid glaucine has been converted into 3-aminomethylglaucine and its free aminogroup has been linked to cinnamic, ferulic, sinapic, o-, and p-coumaric acids. The antioxidative potential of the synthesized amides was studied against DPPH• test. All of the tested compounds demonstrated higher radical scavenging activity than glaucine and 3-aminomethylglaucine, and lower antioxidative effect than the free hydroxycinnamic acids. The newly synthesized compounds were tested *in vitro* for antiviral activity against viruses belonging to different taxonomic groups.

2. A novel one-pot synthesis and preliminary biological activity evaluation of cis-restricted polyhydroxy stilbenes incorporating protocatechuic acid and cinnamic acid fragments

Miliovsky M., Svinyarov I., Mitrev, Y., Evstatieva Y., Nikolova D., **Chochkova M.**, Bogdanov, M. G. (2013).

European Journal of Medicinal Chemistry, **66**, 185-192. doi:10.1016/j.ejmech.2013.05.040

Abstract: A series of new stilbenes 4a–e, 5 were synthesized through a novel one-pot Perkin-like reaction between 6,7-dimethoxyhomophthalic anhydride and aromatic aldehydes, followed by treatment with BBr₃. This synthesis is straightforward and allows polyhydroxylated cis-stilbenes gathering two well-known pharmacophoric fragments to be obtained in good yields and for short reaction times. The structure of the newly synthesized compounds was established by spectroscopic

methods (^1H NMR, ^{13}C NMR, IR and HRMS) and the double bond configuration was unequivocally elucidated by means of gated decoupling ^{13}C NMR spectra and 2D NOESY experiments. Preliminary differentiating screening of their radical scavenging, antibacterial, anti-fungal and tyrosinase inhibitory activity was further performed. The results obtained suggest that the tested compounds possess a triple biological action as potent radical scavengers, antifungal agents and tyrosinase inhibitors in micromolar concentration. The most promising bioactive compound amongst the others was 4a, acting as excellent radical scavenger against DPPH• radical ($\text{IC}_{50} \leq 10 \mu\text{M}$), antifungal agent suppressing the growth of *Fusarium graminearum* (89% inhibition at $0.17 \mu\text{mol/mL}$), and tyrosinase inhibitor showing higher activity than hydroquinone at $23 \mu\text{M}$.

3. *N*-Hydroxycinnamoyl amides of fluorinated amino acids: Synthesis, anti-tyrosinase and DPPH• scavenging activities

Chochkova M., Stoykova, B., Ivanova, G., Ranz, A., Guo, X., Lankmayr, E., Milkova, T. (2013).

Journal of Fluorine Chemistry, **156**, 203-208. doi:10.1016/j.jfluchem.2013.09.013

Abstract: A series of *N*-hydroxycinnamoyl amides of fluorinated amino acids were synthesized. Their antioxidant activity was determined using the rapid DPPH• test and the activity was compared to that of non-fluorinated analogs and standard antioxidants. Results on the antiradical properties obtained by *Nenadis*' method, indicate that fluorine slightly increased the radical scavenging activity of three of the studied amides. Among the tested compounds, sinapic acid (the standard) was the most potent one according to the DPPH• radical scavenging assay, followed by *N*-sinapoyl-3-fluorotyrosine methyl ester. The amides tested by DPPH•–HPLC method possessed similar radical scavenging activity as compared to the used eugenol and isoeugenol standards.

Moreover, the inhibitory activities of *N*-hydroxycinnamoyl amides of fluorinated amino acids on mushroom tyrosinase using *L*-tyrosine as a substrate, were evaluated *in vitro*. The results showed that SA-Trp(6-F)-OMe (**4**) was the most effective tyrosinase inhibitor among the tested amides. Two of the fluorinated amides (SA-Trp(6-F)-OMe (**4**) and SA-Tyr(3-F)-OMe (**5**)) revealed no significant difference in their anti-tyrosinase activity in comparison to *p*-coumaric acid (control), but lower one than hydroquinone used as standard.

4. Amides of substituted cinnamic acids with aliphatic monoamines and their antioxidative potential

Spasova M., Ivanova G., Weber H., Ranz A., Lankmayr E., Milkova, T. (2007).

Oxidation Communications, **30**(4), 803-813

Abstract: A series of new amides of cinnamic acid derivatives with aliphatic monoamines have been synthesized by standard methods in peptide chemistry as well as by the direct sonochemical and microwave accelerated *Wittig* reaction between aromatic aldehydes and corresponding phosphonium salts without isolation of the phosphonium ylides. The structures of the compounds obtained have been confirmed by UV, ^1H NMR, GC-MS and ESI-MS. Some of the synthesised hydroxycinnamoyl amides have been tested for their antiradical activity by DPPH• tests. In the DPPH• quencher assay

the synthesised feruloyl- and sinapoyl amides have shown lower radical scavenging activity than the free hydroxycinnamic acids. All sinapoylamides have manifested higher antiradical activity than the feruloylamides.

5. Synthesis and biological activity of hydroxycinnamoylcontaining antiviral drugs.

Chochkova M. G., Georgieva A. P., Ivanova G. I., Nikolova N., Mukova L., Nikolaeva-Glomb L., Milkova, T. S. (2014).

Journal of the Serbian Chemical Society, **79**(5), 517-526. doi:10.2298/JSC130222103C

Abstract: Seven *N*-hydroxycinnamoyl amides were synthesized by 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide/1-hydroxybenzotriazole (EDC/HOBt) coupling of the corresponding substituted cinnamic acids (*p*-coumaric-, ferulic-, sinapic- and caffeic acids) with influenza antivirals (amantadine, rimantadine and oseltamivir). The DPPH• (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) scavenging abilities and the inhibitory effect on mushroom tyrosinase activity (using L-tyrosine as the substrate) were investigated *in vitro*. Amongst the synthesized compounds, *N*-[(*E*)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoyl]-oseltamivir (1) and *N*-[(*E*)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoyl]-rimantadine (4), containing a catechol moiety, exhibited the most potent DPPH• radical-scavenging activity. Amide (1) also displayed tyrosinase inhibitory effect toward L-tyrosine as the substrate (approximate to 50 %). The synthesized compounds were also investigated for their *in vitro* inhibitory activity against the replication of influenza virus A (H3N2).

6. Synthesis of esters of substituted phenolic acids by microwave assisted Wittig reaction

Spasova M., Bankova V., Ivanova G., Pajpanova T., Milkova T. (2006)

Oxidation Communications, **29**(1), 172-175

Abstract: A series of natural and unnatural esters of cinnamic acid derivatives were synthesized by the direct Wittig reaction between phenolic aldehydes and (carbalkoxymethyl)triphenylphosphonium halides in the presence of KHCO₃ or K₂CO₃ using multimode domestic oven without isolation of the phosphonium ylides. The reactions were accomplished in DMSO at potency of 150 W for 10 min, which were found to be the most appropriate conditions (over 280 W potency the samples were carbonized). The compounds were characterized by their UV, NMR and mass spectra. It was established that all of the synthesized esters were in a naturally occurred diastereoisomeric *E*-form (the presence of two doublets with *J* ~ 16.00 Hz in the ¹H-NMR spectra was observed). The content of the *Z*-isomer was less than 5 %.

7. Study on the antioxidant activity of *N*-hydroxycinnamoyl - amino acid conjugates in bulk lipid autoxidation

Kancheva V., **Spasova M.**, Totseva I., Milkova, T. (2006).

Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse, **83**(4), 162-169

Abstract: The effect of nine synthetic *N*-hydroxycinnamoyl - amino acid amides (six feruloyl and three sinapoyl) on the oxidation stability of a lipid system (kinetically pure triacylglycerols of sunflower oil (TGSO) during oxidation at 80°C in bulk phase was studied on the basis of comparable kinetic analysis. The antioxidant effects of the studied compounds were compared (at the same molar concentration as the active components) with those of ferulic (FA) and sinapic (SA) acids and with those of well known chain-breaking antioxidants butylated hydroxytoluene (BHT) and DL- α -tocopherol (TOH). The strong antioxidant efficiency was found for the sinapic acid derivatives (7-9) and for the compound 4 from the ferulic acid derivatives. All sinapoyl acid amides demonstrated a higher capacity as antioxidants at 0.1 mM concentration than the corresponding feruloyl acid amides. The main kinetic parameters were compared and showed that the relative antioxidant efficiency (RAE) decreases in the following sequence: TOH (4.5) > SA (2.5) > 9(2.0) > BHT(1.5) > 8 (1.4) > 4(1.3) > 7(1.2) > 3 = 1 (1.1) > 5 = 2 (0.8) > 6(0.7) > FA(0.5) and the inhibition degree (ID) decreases as follows: 3 (6.8) > 4 (6.6) > 6(6.4) > TOH(6.0) = 9(6.0) > 1(4.6) > 7(4.4) > 2(3.5) > 8(3.2) > 5(3.1) > SA(2.6) > BHT(1.7) > FA(1.2) It was demonstrated, that the lipid oxidation stability increased over 14 times in presence of 1 mM of all *N-trans*-sinapoyl amino acid amides (7'-9').

8. Solid phase synthesis of sinapoyl-peptide amides

Spasova M., Pancheva S., Pajpanova T., Milkova Ts., Dibo G., Dzambazova E., Nocheva H., Bocheva A.

Proceedings of the Twenty-Ninth European Peptide Symposium September 3-8, 2006, Gdansk, Poland In: Peptides 2006. K. Rolka, P. Rekowski, J. Silberring (eds.), KENES International, Geneva, Switzerland p728-729. (ISBN 978-965-555-297-3)

Abstract: Herein, we report the synthesis of a series of tri- and tetrapeptide mimetics containing non-protein amino acids: canavanine (Cav) and sLys and sinapic acid (SA), as analogues of analgesic peptides MIF-1 and Tyr-MIF-1: SA-Pro-Leu-Gly-NH₂ (**1**); SA-Tyr-Pro-Leu-Gly-NH₂ (**2**); SA-Tyr-Pro-sLys-Gly-NH₂ (**3**); SA-Tyr-Pro-Cav-Gly-NH₂ (**4**); SA-Pro-Cav-Gly-NH₂ (**5**); Pro-Leu-Gly-Eda-SA (**6**); Pro-Leu-Gly-Pda-SA (**7**). The peptides were synthesized on a Rink-amide resin using Fmoc-strategy with DIC/HOBt activation. Next, the analogues **6** and **7** modified at C-terminus with biogenic amines and sinapic acid were obtained on a Merrifield resin using Boc-strategy with DCC/ HOBt activation. The crude peptides were purified by preparative TLC and their purity was checked by analytical HPLC. The precise molecular mass was confirmed by ESI-MS. Antinociceptive effects were evaluated using the paw pressure (PP) test. The experiments were carried out on male Wistar rats (180 – 200 g). Moreover, the analgesic effects of newly synthesized analogues of MIF-1 and Tyr-MIF-1 during acute pain were investigated. SA injected alone exerted significant analgesic effect compared to Tyr-MIF-1 and MIF-1. Peptides **1**, **2**, **6**, and **7** showed analgesic effect similar to MIF-1. Among all analogues, **1** and **7** showed the most pronounced analgesic effects. The analogues **3**, **4** and **5** exerted analgesic effect comparable to the control group. The analogue **5** showed significant analgesic effect higher than MIF-1, but lower than SA. Peptides **3** and **4** had significant analgesic effects, which were lower than Tyr-MIF-1 and SA. The results suggest certain structure activity relationships within new series: a) substitution of SA and Cav in MIF-1 enhances analgesic activity; b) substitution of SA and Cav and sLys in Tyr-MIF-1 reduces analgesic activity.

9. Synthesis and biological activity of cinnamic acids amides

Milkova Ts, Spasova M., Ivanova G., Philipov S., Nikolaeva-Glomb L., Radeva G.

Proceedings of the Int. Scientific Conference, **2**, 5-10 (2007) Faculty of mathematics and natural sciences, SWU "Neofit Rilski"-Blagoevgrad ISBN 978-954-680-537-9.

Abstract: Seventeen cinnamoyl-, feruloyl- and sinapoyl- amino acids amides have been synthesized using the standard methods in peptide chemistry. The antioxidant activity of six feruloyl- and three sinapoyl- amino acid amides was studied on the oxidation stability of a lipid system. Some of the synthesized compounds have been tested for their antibacterial and antiviral activity. Twenty three *N*-alkylcinnamoyl amides have been prepared in solution and by sonochemical and microwave activated Wittig reaction. Some of the synthesized hydroxycinnamoyl amides were tested for their antiradical activity by DPPH• tests. All sinapoyl alkylamides were more active than the feruloyl amides. The results obtained demonstrated that the amides are twice less active than the free hydroxycinnamic acids. The alkaloid glaucine has been modified and connected with cinnamoyl- and hydroxycinnamoyl residue. The compounds obtained have been tested for their antiradical activity by DPPH• tests.

10. Amino acid Derivatives of Aporphinic Alkaloid Glaucine and their antioxidant activity.

Spasova M., Philipov S., Milkova T. (2009)

In: Valle S.D., Escher E., Lubell W.D. (eds)

Peptides for Youth. Book Series: Advances in Experimental Medicine and Biology, vol **611**, pp. 267-268. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-73657-0_120

Abstract: Herein we report the synthesis of a series of glaucine amides of aminoacids. The absence of the appropriate functional group in the glaucine nucleus has enforced us to modify it by introduction of amino group at C-3 in its molecule. Our attempts to prepare amides of 3-aminoglaucine with different protected *N*-amino acids by the methods used in the peptide chemistry failed (obviously owing to the low reactivity of the amino group as a result of conjugation of its nitrogen lone pair with π -electrons of the benzene ring). To solve this problem we obtained 3-aminomethylglaucine by known procedure. The new amino acid derivatives of 3-aminomethylglaucine have been synthesized using peptide method (EDC/HOBt) and characterized by UV, ¹H-NMR and ESI-MS.

The synthesized amides 1-4, glaucine and 3-aminomethylglaucine were tested for their antioxidant activity against DPPH• test. Radical scavenging activity values (RSA) were compared with sinapic acid, used as standard antioxidant. Most of the tested amides of 3-aminomethylglaucine have shown radical scavenging activity higher than both 3-aminomethylglaucine and glaucine. The results obtained demonstrated lower activity of the amides than the sinapic acid.

11. Antiviral effects of newly synthesized cinnamoyl amides of amino acids and aliphatic monoamines.

Nikolaeva-Glomb L., Spasova M., Milkova Ts., Galabov, A. (2008)

Proceedings and Abstracts of Second Congress of Virology (Days of Virology in 58 Bulgaria) with International Participation, Sofia, May 28-31, (Eds. A. S. Galabov and L. Doumanova). The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, BAS, 59-66.

Abstract: The antiviral, antimicrobial, antitumor, anti-inflammatory and antioxidant effects of phenolic phytochemicals are well-known and attract the attention of both chemists and biologists. The esters and amides of cinnamic acids are no exception. While cinnamoyl esters are abundant in the plant kingdom, cinnamoyl amides are rarely found. Nowadays, there is an increased interest to the biomedical properties of either natural or synthetic amides due to the greater stability of the amide group in this kind of compounds. The design of new cinnamoyl derivatives based on the presence of a stable amide group in them may be expected to result in compounds with antiviral properties. In this study two series of new cinnamoyl amides were synthesized – nine amides of amino acids and nine amides of aliphatic monoamines. The *in vitro* antiviral effect of the newly synthesized compounds was tested against viruses belonging to taxonomic groups with causative agents of important human infectious diseases to which chemotherapy is indicated, i.e. poliovirus type 1 (LSc-2ab) and coxsackievirus B1 (CV-B1) represented the genus of enteroviruses in the Picornaviridae family, the respiratory syncytial virus (RSV) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) represented the Paramyxoviridae and the Flaviviridae family, respectively. The antiviral effect was tested by the agar-diffusion plaque inhibition test and/or the CPE-inhibition test. An antiviral effect against the replication of enteroviruses was detected for several of the newly synthesized compounds. Four of the new cinnamoyl amides of amino acids were active against the replication of poliovirus type 1 (LSc-2ab) and two of them were also active against the replication of coxsackievirus B1. Among the newly synthesized aliphatic monoamine amides only two compounds with cinnamoyl residue were active against both enteroviruses. It should be mentioned that poliovirus type 1 (LSc-2ab) showed greater sensitivity to the effect of the new compounds in comparison to coxsackievirus B1. None of the newly synthesized amides showed effect against the replication of the representatives of the other two virus families tested. In conclusion, several of the newly synthesized cinnamoyl amides of amino acids and aliphatic monoamines revealed moderate antiviral effect against the replication of enteroviruses in cell culture. Although not significant, the observed antienteroviral effects could serve as a solid basis for the directed synthesis of new more efficient compounds of this chemical class.

12. Synthesis and Biological Activity of Cinnamic Acid Amides of Oxazole Containing Amino Acids

Stankova I., **Spasova M.**, Shishkov, Stoyan (2008)

Peptides 2008: Chemistry of Peptides in Life Science.

Proceedings of the Thirtieth European Peptide Symposium, p 50-51, Hilikka Lankinen(ed.)

Abstract: Herein, we describe the preparation of hydroxycinnamamides from the corresponding acids (sinapic, *p*-coumaric, ferulic acids) and 2-aminomethyl-oxazole-4-carboxylic acid methyl ester. Moreover, the DPPH• scavenging efficiency and antiviral activity were evaluated. The results revealed that the synthesized hydroxycinnamoyl amides were found to be inefficient as radical

scavengers. However, amongst the tested amides, the sinapoylamide of oxazole - containing amino acid showed the highest antioxidant activity, but lower to the used standards: *alpha*-tocopherol, ferulic and sinapic acids. Furthermore, the tested amides did not demonstrate antiviral effect on the replication of HSV-1 and HSV-2.

13. Conjugation of glaucine to hydroxycinnamoyl amino acid amides

Spasova M., Philipov S., Avramov G., Milkova Ts. (2008)

Peptides 2008: Chemistry of Peptides in Life Science.

Proceedings of The Thirtieth European Peptide Symposium 48-49, Hilikka Lankinen (ed.)

Abstract: Two kinds of *N*-hydroxycinnamoyl-phenylalanyl-3-aminomethylglaucine amides **3** and **4** were synthesized. The sinapoyl- and feruloylamide of 3-aminomethylglaucine (compounds **1** and **2**) have been previously reported, whereas the compounds **3** and **4** are unknown. The chemical structures of the newly synthesized amides were confirmed by UV, ¹H-NMR and ESI-MS spectra. The values of the proton-proton vicinal coupling constants (³J_{H/H} about 15.5 Hz) measured for the olefinic protons of feruloyl- and sinapoyl residues define *E*-configuration of the double bond of all studied compounds. The scavenging effects of hydroxycinnamic acid amides and standard antioxidant-tocopherol against DPPH• were studied. Results revealed that the *N*-feruloyl – and sinapoyl-phenylalanyl-3-aminomethyl amides, have shown two times higher radical scavenging activity compared to those amides without phenylalanine rest (**1** and **2**). Among all tested compounds, sinapoyl-phenylalanyl-3-aminomethyl amide possessed the highest activity even of the standard antioxidant –tocopherol.

14. Sulfur-containing amino acid amides of phenolic acids

Spasova M., Paizs Cs., Stoykova B., Milkova Ts. , Irimie F. (2008), Peptides 2008: Chemistry of

Peptides in Life Science.

Proceedings of The Thirtieth European Peptide Symposium 34-35, Hilikka Lankinen (ed.)

Abstract: Two kinds of *N*-hydroxycinnamoyl - polyamine-amino acid amides **4** (**5**) were synthesized by three-stage reaction and their abilities to scavenge radical were examined. The antioxidative potential of the desired hydroxycinnamoyl amides containing with benzo[b]thienyl moiety **4** (**5**) was studied against DPPH• (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical) in abs. EtOH. By comparison of the tested amides for DPPH• radical-scavenging activity with well-known antioxidants the next increasing order was found: quercetin> sinapic acid>tocopherol> ferulic acid> eugenol> compound (**5**)> isoeugenol, compound (**4**). The synthesized amides showed insignificant free radical scavenging activity in comparison with all used standards. Only sinapoylamide (**5**) was found to be more potent than isoeugenol.

15. Hydroxycinnamic acid amides with oxazole-containing amino acid: Synthesis and antioxidant activity

Stankova I., **Spasova M.** (2009).

Abstract: Three hydroxycinnamic acid derivatives conjugated with glycine-containing oxazole were synthesized. The prepared compounds were tested for their antioxidant activity using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) test. Among the tested hydroxycinnamic acid amides, the highest DPPH• scavenging activity has been found for the sinapic acid amide.

16. Synthesis and antienteroviral activity of cinnamoyl and hydroxycinnamoyl amides

Nikolaeva-Glomb L., **Spasova M.**, Galabov A. S., Milkova Ts.

Proceedings of the Third International Scientific Conference – FMNS, 2009 3 – 7 June 2009 Faculty of Mathematics and Natural Science p. 43-48.

Abstract: The esters and amides of cinnamic acids are potential antimicrobial, antiviral, antioxidant and antitumour agents. While cinnamoyl esters are abundant in the plant kingdom, cinnamoyl amides are rarely found. Recently, the interest to the bio-medical properties of either natural or synthetic amides has been raised due to the greater stability of the amide group.

A series of cinnamoyl- and hydroxycinnamoyl amides has been synthesized and the effect against the replication of some enteroviruses is tested. The newly synthesized compounds were cinnamoyl- and hydroxycinnamoyl amides of fluorinated aromatic amino acids, amides of natural amino acids, amides of substituted cinnamic acids with aliphatic monoamines, as well as cinnamoyl- and hydroxycinnamoyl amides of the alkaloid glaucine after its conversion into aminomethylglaucine.

The antiviral activity of all new compounds was tested against the replication *in vitro* of poliovirus type 1 (Lsc-2ab) and coxsackievirus B1, which represent the multitudinous enterovirus genus in the family of picornaviruses. The antiviral effect was assessed by the semi-quantitative agar-diffusion plaque-inhibition test and further more precisely determined by the CPE- inhibition test.

Several of the new compounds revealed moderate antienteroviral effects. These were the sinapoyl phenylalanine amide, *N*-buthylcinnamoylamide, cinnamoyl-Val-OMe and cinnamoyl-Tyr-OMe, *p*- and *o*-coumaroylamide of 3-aminomethylglaucine. Cinnamoyl- and hydroxycinnamoylamides of glaucine were additionally tested for their activity against another enterovirus models, i.e. echovirus 13 and human rhinovirus 14. *p*-Coumaroylamide revealed rather good antiviral activity against the replication of echovirus 13 with a selectivity index 5. All amides of glaucine revealed a promising antiviral activity against the replication of the rhinovirus. In the case of *o*- and *p*-coumaroyl amides the selectivity index exceeded 10. These findings could serve as a solid basis for further development of antienteroviral agents of this class.

17. Free Radical Scavenging Activity of Hydroxycinnamoyl Amino Acid Amides

Spasova M., Dagon Dj., Ivanova G., Milkova Ts. (2009), Peptides: Breaking Away:

Proceedings of the Twenty-First American Peptide Symposium, June 7-12, 2009, Bloomington, IN, U.S.A., Michal Lebl (Ed.), American Peptide Society , p.84-85. ISBN 0-9715560-3-2

Abstract: The hydroxycinnamic acid compounds are an important source of antioxidants due to their ubiquitous occurrence in the plant kingdom. They usually exist as esters of organic acid, glycosides, or amides. Only a small number of them exist as free acids in nature. As the quantity of hydroxycinnamoyl amides in the nature is very low and their enzyme stability is higher than esters, we decided to synthesize series of cinnamoyl-, feruloyl-, caffeoyl- and sinapoyl- cysteine amides in order to define their antioxidant activity. Four hydroxycinnamoyl amides (1-4) were prepared by EDC/HOBt condensation of the corresponding phenylpropenoic acids with H-Cys(Bzl)-OEt. The scavenging activities of *N*-hydroxycinnamoyl cysteine amides (1-4) were compared to the standard antioxidants as quercetin, eugenol, isoeugenol, sinapic acid, ferulic acid and *D,L* α -Tocopherol. It has been established that feruloyl, sinapoyl- and caffeoyl amides exert higher antioxidant activity than the standards eugenol and isoeugenol, but lower one than the free hydroxycinnamic acid and quercetin, tocopherol.

18. Antioxidant potential of phenolic acid amides of aromatic amines

Georgiev L., Totseva I., Seizova K., Marinova E., **Chochkova M.**, Milkova Ts. (2010), Peptides: Tales of Peptides

Proceedings of the Thirty-First European Peptide Symposium September, 5-9, 2010, Copenhagen, Denmark, Michal Lebl, Morten Meldal, Knud J. Jensen, Tomas Hoeg-Jensen (Eds.), European Peptide Society 2010, p.60-61. ISBN 0-9715560-5-9

Abstract: The current investigation is devoted to elucidating the antioxidative activity of eight synthesized cinnamoyl- and hydroxycinnamoyl amides of biogenic amines during oxidation of pure triacylglycerols of sunflower oil at 100°C whose oxidation mechanism is well known. The results obtained were compared with the inhibiting effects of the main hydroxycinnamic acids. Cinnamic and *p*-coumaric acids were inactive during these oxidation conditions. All other compounds possessed excellent antioxidant effectiveness, higher or comparable with this of the caffeic acid.

19. Radical scavenging activity of hydroxycinnamoylamides of amino acids - precursors of biogenic amines

Chochkova M. G., Nikova H. G., Ivanova G. I., Georgiev L. N., Milkova Ts. S. Peptides 2010: Tales of Peptides *Proceedings of the Thirty-First European Peptide Symposium September, 5-9, 2010, Copenhagen, Denmark*, Michal Lebl, Morten Meldal, Knud J. Jensen, Tomas Hoeg-Jensen (Eds.), European Peptide Society 2010, p.56-57. ISBN 0-9715560-5-9

Abstract: The development of different type antioxidants, which can block the production or scavenge the obtained free radicals, has attracted the attention in LPO the recent years. Amongst the various groups of antioxidants, our attention was focused on hydroxycinnamic acid amides, because more of these compounds are naturally occurring and have a stable structure after the free radicals are quenched. In order to estimate the influence of different incorporated amino components in

hydroxycinnamoylamides towards DPPH• radical, two types of hydroxycinnamoylamides (with aromatic amines or their corresponding amino acid precursors) were obtained.

The results of free radical scavenging activities (RSA) of amides (1-11) and standards used (ferulic, sinapic, caffeic acids) showed that the type of amino component in the 3-phenylpropenoylamides affected insignificantly the tested activity. All hydroxycinnamic acid amides of phenylethylamine were the most potent compounds, especially *N*-caffeoylphenylethylamine. With the exception of caffeoylamides, all tested hydroxycinnamoylamides have shown lower RSA than the corresponding free phenolic acid.

20. Phenylpropanoids as naturally occurring and synthetical antioxidants: from plant defense to human health

Chochkova M., Georgiev L., Milkova Ts. (2011)

Proceedings of the Fourth International Scientific Conference – FMNS 2011, 8 – 11 June 2011, Faculty of Mathematics and Natural Science, **1**, 325-332. ISSN 1314-0272

Abstract: Oxidative stress plays a key role in initiation of many degenerative processes in humans, related to cardiovascular disease, inflammatory disease, aging, and to DNA damage, mutation and promotion leading to cancer. The simplify functionality of hydroxycinnamic acids as esters, amides has gripped our attention, because of displaying a broad spectrum of properties as: antibacterial, antiviral, antiinflammatory, antioxidative, antiproliferative, neuroprotective and etc. The diversity of pharmacological properties of similar compounds are associated with either their properties to act as antioxidants. In order to study the radical scavenging activity, a series of hydroxycinnamic acid amides has been synthesized.

21. Antimicrobial and radical scavenging activities of N-hydroxycinnamoyl-L-cysteine and L-proline ethyl esters

Chochkova M. G., Chorbadzhiyska E. Y., Ivanova G. I., Najdenski H., Ninova M., Milkova S. T. (2012).

Natural Products Journal, **2**(1), 50-54. doi:10.2174/2210315511202010050 (IF2013: 0.433)

Abstract: Hydroxycinnamic acids are widely distributed in the plant kingdom secondary metabolites, found also as simple derivatives including amides, esters, and glycosides. These acids and their derivatives are known to possess antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, antioxidative, antiproliferative, immunostimulatory and neuroprotective properties.

The aim of the present work was the synthesis of new hydroxycinnamoyl amides of the (*L*)-cysteine and (*L*)-proline and evaluation of their radical scavenging and antimicrobial activity.

The structures of the synthesized analogues were characterized by UV, ¹H NMR, ¹³C NMR, ESI-MS. The compounds were screened for their antibacterial (against *Staphylococcus aureus* 209, *Streptococcus pyogenes* 10535, *Bacillus subtilis* 1A95, *Listeria monocytogenes* C12) and antifungal (against *Candida albicans* 62) activities. All amides demonstrated the most potent activity against *Streptococcus pyogenes*, even higher in comparison with the free hydroxycinnamic acids. The

ability of hydroxycinnamoyl amides to interact with 1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH•) stable free radical *in vitro* was also evaluated. The results obtained showed that the radical scavenging activity of the sinapoyl- and caffeoyl amides of *L*-cysteine is superior to the standards ferulic acid, eugenol and isoeugenol.

22. Radical scavenging and antimicrobial activities of cinnamoyl amides of biogenic monoamines

Georgiev L., **Chochkova M.**, Ivanova G., Najdenski H., Ninova M., Milkova T. (2012).

Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse, **89**(2), 91-102

Abstract: A series of plant occurring cinnamoyl and hydroxycinnamoyl amides of the biogenic monoamines (tyramine, tryptamine, dopamine and 2-phenylethylamine) were synthesized and characterized by spectral methods (UV, IR, ¹H- and ¹³C-NMR). The radical scavenging activity of the prepared compounds against stable free 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical was estimated and structure - activity relationships were discussed. The results reveal that caffeoyldopamine (15) and caffeoylphenylethylamine (16) possessing a caffeoyl moiety were found to be more active antioxidants than the free caffeic acid, used as referent. The antimicrobial activity of the most of the compounds was evaluated against the Gram-positive bacterial species: *Staphylococcus aureus* 209, *Streptococcus pyogenes* 10535, *Bacillus subtilis* 1A95, *Listeria monocytogenes* C12 as well as against the pathogenic fungus *Candida albicans* 62. It was found that nearly half of the synthesized amides were more active than the free acids against these pathogens.

23. Amides of antiviral drug oseltamivir with antioxidant active amino acids: synthesis and biological activities

Chochkova M., Ivanova G., Galabov A., Milkova Ts., Peptides: 2012.

Proceedings of the Thirty-Second European Peptide Symposium, September 2-7, 2012 – Athens, Greece Athens, Kokotos G, Constantinou-Kokotou V, Matsoukas J. (Eds.) European Peptide Society, p. 580-581. ISBN 978-960-466-121-3

Abstract: Various investigators have postulated that oxidative stress may be implicated in the pathogenesis of pulmonary damage during influenza virus infections. Therefore, antioxidants could be one potential approach for chemotherapy for human influenza infection. The application of combination therapy of antioxidants with antiviral drugs could reduce the complications and lethal effects, caused by an influenza virus. In our study, antiviral drug oseltamivir (Os) was conjugated to antioxidant active amino acid derivatives of cysteine, histidine and tyrosine, in order to indicate a possible advantage of chemically combinations of the two treatments during severe influenza infection. It was established that conversion of amino acid derivatives into their Os analogues significantly decreased the DPPH• scavenging abilities compared with positive control like *N*-Acetyl cysteine.

24. Anti-tyrosinase, antioxidant and antimicrobial activities of hydroxycinnamoylamides

Georgiev L., **Chochkova M.**, Totseva I., Seizova K., Marinova E., Ivanova G., Ninova M., Najdenski H., Milkova, T. (2013).

Medicinal Chemistry Research, **22**(9), 4173-4182. doi:10.1007/s00044-012-0419-x

Abstract: Synthetic hydroxycinnamoylamides of amino acids (precursors of aromatic amines) were studied for their antioxidant activity *in vitro* by two antioxidant assay systems, including 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) radical and inhibition of lipid peroxidation (LPO). Furthermore, these compounds were tested and compared with their corresponding cinnamoylamides of aromatic amines for their inhibitory activity using mushroom tyrosinase. In addition, five hydroxycinnamoyl amino acid amides were investigated for their antimicrobial effect. Structure–activity relationships analysis disclosed that the presence of catechol rest at amino acid or at benzene moieties of substituted cinnamic acid amides significantly scavenged DPPH• radical and inhibited LPO. The results obtained by LPO clearly expressed the positive influence of indole moiety on the activity. Moreover, the existence of *p*-hydroxy substituted cinnamic acid moiety leads to better tyrosinase inhibition. Amongst the tested compounds, amides of *p*-coumaroyldopamine or tyramine and their corresponding amino acid precursors are the most potent tyrosinase inhibitors.

25. Biological activity of adamantane analogues

Chochkova M., Stoykova B., Nikolova N., Nikolaeva-Glomb L, Ivanova G., Milkova Ts. (2013)

Proceedings of the Fifth International Conference of FMNS **4**, 17-25.

Abstract: After the discovery of the first synthetic anti-influenza compound – amantadine (1-adamantylamine), the “birth” of medicinal chemistry of adamantane analogues has been started. Adamantane derivatives attracted the attention of scientists, having the potential as chemotherapeutic agents (against influenza and HIV viruses, as well as antibacterial, antifungal, antiinflammatory, etc. activities). In continuation to our research work on the chemical and pharmacological properties of such molecules, herein we report our results on the synthesis and biological activity of the newly synthesized aminoadamantane derivatives. The chemical modifications of adamantane analogue (rimantadine) with sterols (cholesterol, cholestanone) lead to the formation of Schiff-base (with cholestanone) or the preparation of cholesterol conjugate of rimantadine through adipic acid as linker. The newly synthesized compounds were tested *in vitro* for their anti-influenza activity against A/H3N2 and A/H1N1. The preliminary results of this study showed a promising antiviral activity.

26. Investigation of α -glucosidase inhibitory activity of *N*-hydroxycinnamoyl amino acid amides

Stoykova B. M., **Chochkova M. G.**, Petrova P. P., Ivanova G. I., Milkova T. S.,

Peptides: 2015.

Proceedings of the 33rd European Peptide Symposium, 31 August – 5 September, 2014, Sofia, Bulgaria (Emilia Naydenova, Tamara Pajpanova, Dancho Danalev (Eds.), p. 51. Bulgarian Peptide Society. ISBN 978-619-90427-2-4

Abstract: *N*-Hydroxycinnamoyl derivatives have been known to possess a variety of biological activities, especially antioxidant properties. Additionally, such kind of compounds have been also identified as α -glucosidase inhibitors. In view of the fact that oxidative stress is considered to be involved in diabetic complications, therefore we presume that newly hydroxycinnamoyl amides might have a protective role against oxidative stress. Herein, the inhibitory effects of previously synthesized *N* - hydroxycinnamoylamino acid amides on fungal α -glucosidase were determined, according to a slightly modified known method. In order to compare the inhibitory potencies, the IC₅₀ values of the obtained amides and acarbose - used as the positive inhibitor were determined. The results revealed that amongst the tested compounds, sinapoyl amide **1** had the most potent α -glucosidase inhibiting activity (IC₅₀ 1.82±0.17) in comparison with acarbose (IC₅₀ 2.50 ± 0.21 ug/ml). Other active compound, feruloyl amide **2** exhibited a potent inhibition with IC₅₀ value similar to the acarbose. Contrasting results were obtained for *trans*-cinnamic acid amides (**3** and **4**), which showed no activity in this *in vitro* assay. In particular, hydroxycinnamoyl amides (**1** and **2**) exhibited a potent inhibition on yeast α -glucosidase *in vitro*, and could be considered as promising inhibitors.

27. Novel oseltamivir and aminoadamantane analogues containing non-proteinogenic amino acid

Stoykova B., **Chochkova M.**, Apostolova R., Petrova P., Ivanova G., Nikolova N., Nikolaeva-Glomb L., Milkova Ts, *Peptides*: 2015.

Proceedings of the 33rd European Peptide Symposium, 31 August – 5 September, 2014, Sofia, Bulgaria (Emilia Naydenova, Tamara Pajpanova, Dancho Danalev (Eds.), 53-54. Bulgarian Peptide Society. ISBN 978-619-90427-2-4

Abstract: This paper reports of a synthesis of new pyrrolidine derivatives containing the neuraminidase inhibitor- oseltamivir or the ion channel blockers (amantadine and rimantadine) The newly synthesized amides were evaluated for their antiviral activity *in vitro* against influenza virus A/Aichi/2/68 (H3N2). In comparison with the licensed anti-influenza drugs, our modification of influenza inhibitors with 4-hydroxy *-L*-proline did not reveal an inhibitory effect against the *in vitro* replication of influenza A virus H3N2. The inhibitory effects of 4-hydroxy *-L*-proline amides on monophenolase activity of mushroom tyrosinase were also evaluated. Kojic acid, well known as a strong tyrosinase inhibitor, was used as a positive control. Compared to the standard, the inhibitory activities of tested compounds increase in the following order: **2** (16.96 ± 0.38) < **3** (19.82 ± 0.02) < **1** (24.11 ± 0.07) < kojic acid (62.67±0.06). Hence, we may conclude that the newly synthesized amides exert well pronounced inhibitory effects on tyrosinase.

28. *N*-Lipoyl amino acid amides of anti-influenza drugs: synthesis and biological activity

Stoykova B., Chochkova M., Petrova P., Ivanova G., Milkova Ts., Peptides: 2015.

Proceedings of the 33rd European Peptide Symposium, 31 August – 5 September, 2014, Sofia, Bulgaria (Emilia Naydenova, Tamara Pajpanova, Dancho Danalev (Eds.), 86-87. Bulgarian Peptide Society. ISBN 978-619-90427-2-4

Abstract: Naturally occurring compound, lipoic acid (LA) is produced from bacteria to man and is well known as cellular multifunctional antioxidant. Its unique properties has been linked with possession of antioxidant effect in both forms: oxidized (LA) and reduced (DHLA [dihydrolipoic acid]), and in both fat- and water-soluble mediums. The antioxidant abilities of those molecules are associated with four distinct actions, they exert: scavenging of ROS, regeneration of endogenous antioxidants, repairing of oxidized proteins and metal-chelation. In addition, lipoic acid can inhibit tyrosinase expression and activity, as well as provoking skin lightening effect.

In light of the growing interest in lipoic acid and their analogues, herein we synthesized amides containing lipoic acid and anti-influenza drugs (rimantadine or oseltamivir) connected through amino acid moiety (H-Cys-OH). The choice of *L*-cysteine as a spacer was selected due to its antioxidant and anti-tyrosinase activities. The structure of both new products (1 and 2) was defined by IR, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. Preliminary screening of DPPH● scavenging activities of newly compounds and as well as the used standard caffeic acid were evaluated *in vitro* at a concentration of 48 μM. In general, the compounds show lower antiradical properties than caffeic acid.

Regarding organosulfur compounds such as lipoic acid and thiol-containing amino acid-Cys, herein we propose that those analogues might chelate copper tightly at the active sites of tyrosinase and thus to increase enzyme inhibition. From the preliminary spectrophotometric determination of monophenolase (using *L*-tyrosine as substrate) inhibitory activity it was found that the tested amides-*N*-lipoyl cysteinyl amides of oseltamivir (1) and rimantadine (2) did not show any inhibitory effect in comparison with kojic acid taken as a positive control. Although that evaluated compounds are without tyrosinase inhibitory activities, it is not obligatory to exert any depigmenting activity.

29. Synthesis of fluorinated hydroxycinnamoyl derivatives of anti-influenza drugs and their biological activity

Stoykova B., Chochkova M., Ivanova G., Mukova L., Nikolova N., Nikolaeva-Glomb L., Vojtišek P., Milkova T. M., Havlíček D. (2015).

Chemistry, **24**(3), 340-347

Abstract. The emergence of a novel pandemic influenza A (H1N1) strain in 2009 is an evident mark for the unremitting risk of respiratory viral diseases. Influenza outbreaks and development of disease and could be overcome by use of vaccines and antivirals. Currently, clinically applied influenza antivirals are limited to M2 ion channel blockers (amantadine and rimantadine) and neuraminidase inhibitors (oseltamivir and zanamivir). Development of resistant viral progeny though, is one of the major challenges to antiviral chemotherapy, in general. Resistant viral mutants are described to both classes of anti-influenza antivirals, as well. Therefore, the development of new antiviral agents for

influenza treatment is a hot topic and a never ending task. Combining antiviral drugs with antioxidants in severe influenza-associated complications is of great therapeutic significance. Based on the prominent antioxidant activity of hydroxycinnamic acids, herein, we report the biological activity of newly synthesized amides obtained by coupling previously synthesized *N*-hydroxycinnamoyl amides of fluorinated amino acids and a fragment of oseltamivir. The antiviral effect of the covalently bonded hybride structures against influenza A (H3N2) were evaluated *in vitro*. It has been shown that the examined compounds did not provoke synergistic anti-influenza effects.

30. Ultrasound-assisted green bromination of *N*-cinnamoyl amino acid amides – structural characterization and antimicrobial evaluation

Stoykova B., **Chochkova M.**, Ivanova G., Markova N., Enchev V., Tsvetkova I., Najdenski H., Štícha M., Milkova T. (2017).

Journal of Molecular Structure, **1135**, 144-152. doi:10.1016/j.molstruc.2017.01.056

Abstract: *N*-Phenylpropenoyl amino acid amides have been brominated using two alternative sonochemically activated green chemistry procedures. The first synthetic procedure has involved an ultrasound assisted bromination in an aqueous medium using ionic liquid as a catalyst of the reaction, whereas in the second one an in situ formation of Br₂ via oxidation of HBr by H₂O₂ has been used. For comparison, the conventional bromination procedure was also used. The yields obtained by the green sonochemically modified methods A and B did not differ significantly from the conventional brominating. The newly brominated compounds were characterized by appropriate analytical techniques. A detailed NMR spectroscopic analysis (1D (¹H и ¹³C) и 2D (COSY, HSQC, HMBC) NMR) and quantum chemical calculations using Density Functional Theory (DFT) methods have been used to define the stereochemistry of the products. The results confirmed the physicochemical identity and similar yields of the products obtained by the three synthetic procedures employed, and reveal the co-existence of two diastereoisomeric forms of the newly synthesized products. According to the relative stabilities of the two isomers of compounds 1-4 isomer R is the most stable structure in all molecules.

The antibacterial and antifungal activities of the dibrominated amides were evaluated. The antimicrobial activities of the compounds studied reveal that tert. butyl-*N*-(α , β -dibromo- \square -phenylpropanoyl)-alaninate (1) and methyl-*N*-(α , β -dibromo- \square -phenylpropanoyl)-valinate (4) could be candidates for further studies of antibacterial activity.

31. Anti-influenza drug derivatives with potential biological activity

Stoykova B., Chochkova M., Nikolaeva-Glomb L., Ivanova G., Štícha M., Milkova Ts. (2016)

In: *Proc. of the PhD Student Scientific Session of the FMNS – 2016*, M. Mitov, M. Shishmanova, St. Stefanov (eds.), 6-9; ISBN 978-954-00-0109-8.

Abstract: Influenza is one of the devastating viral infectious diseases. During the 20th century it has caused three pandemics, which had led to millions of human deaths. In present times the continuing

occurrence of seasonal epidemic outbreaks is a widespread concern regarding the eventual risk of influenza pandemics.

Currently in combating influenza viral infection, two classes of antiviral drugs are approved - M2 blockers and neuraminidase inhibitors. However, the effectiveness of those drugs might be inadequate when selection of resistant viral mutants has taken place. Limitations of monotherapy highlight the urgency for new and efficient strategies for viral treatment. Furthermore, the design of hybrid molecules comprising of two distinct drug moieties is a promising modern approach to reach various therapeutic goals. In this regard, herein we report our results on modification of anti-influenza drugs (rimantadine, oseltamivir) with dibrominated cinnamoyl amino acid amides.

The positive-ion ESI-MS spectrometry was applied in the structure elucidation of target compounds. The spectra of the newly α,β -dibromo-*N*-hydrocinnamoyl-isovalinyl-oseltamivir (**6**) and α,β -dibromo-*N*-hydrocinnamoyl-isovalinyl-rimantadine (**7**) indicate that the molecular ion peak was observed as a based peak at m/z 750.5 (compound **6**) corresponding to $[M+H]^+$, whereas compound **7** was observed at m/z 655.5 (**7**) corresponding to $[M+Na]^+$.

32. Amino acids amides of anti-influenza drugs: Synthesis and biological activities

Stoykova B., **Chochkova M.**, Georgiev L., Ivanova G., Mukova L., Nikolova N., Nikolaeva-Glomb L., Milkova Ts., Štícha M. (2017).

Bulgarian Chemical Communications, **49**, 16-22

Abstract: Influenza A viruses are amongst the most severe human pathogens leading to high morbidity and mortality worldwide. Due to the high mutation rate and the unpredictable potential for influenza pandemic outbreaks, the development of novel anti-influenza drugs is an undeniably attractive area of research.

In the present study amino acid amides of rimantadine and oseltamivir were synthesized and their *in vitro* antiviral activity against influenza A viruses (A/H3N2) was studied. Results revealed that amide modification of *N* α - and side chain protected tyrosine, histidine, aspartic- and glutamic acids did not exhibit significant enhancement of the *in vitro* effect against influenza A virus strain.

33. Synthesis and radical scavenging activity of cinnamic acid esters

Chochkova M., Stoykova B., Petrova P., Gyoshkova N., Ivanova G., Štícha, M., Milkova, T. (2017).

Bulgarian Chemical Communications, **49**, 68-73.

Abstract: Cinnamic and hydroxycinnamic acid esters (α , β -unsaturated esters), functional derivatives of cinnamic acids (cinnamic, ferulic, sinapic, caffeic) are secondary plant metabolites derived from phenylpropanoid pathway. Cinnamates, of both natural and synthetic origin, continue to elicit great interest due to diversity of biological activities they possess, such as: antioxidant, antimicrobial, anticancer, anti-inflammatory, anti-tyrosinase and etc. Herein, the reduction of *N*- and side chain protected amino acids to *N*-protected amino alcohols and the coupling of the latest with hydroxycinnamic (sinapic and ferulic) acids is described. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) scavenging activities of hydroxycinnamates were compared with their corresponding *N*-hydroxycinnamoyl amino acid amides. Free hydroxycinnamic acids were used as positive controls.

The results indicated that *N*-hydroxycinnamoyl amino acid amides exhibited lower scavenging ability than the corresponding free hydroxycinnamic acids, but higher one than hydroxycinnamates.

34. Structure-activity relationships of *N*-cinnamoyl and hydroxycinnamoyl amides on α -glucosidase inhibition

Chochkova M. G., Petrova P. P., Stoykova B. M., Ivanova G. I., Štícha M., Dlbó G., Milkova T. S. (2017).

Journal of Chemistry, 2017 doi:10.1155/2017/6080129

Abstract: Currently, there is an increasing interest towards α -glucosidase inhibition of various diseases including diabetes mellitus type 2, cancer, HIV, and B- and C-type viral hepatitis. Cinnamic acid derivatives have been shown to be potentially valuable as a new group of α -glucosidase inhibitors. Therefore, herein, the α -glucosidase inhibitory activity of *trans-N*-cinnamoyl and hydroxycinnamoyl amides was studied *in vitro*. Results revealed that the tested hydroxycinnamoyl amides (**1-16**) inhibited α -glucosidase with IC₅₀s ranging between 0.13 and 355.1 μ g/ml. Compounds 1, 2, 5, 6, 9, 14, and 15 showed significant inhibition of yeast α -glucosidase, being even more potent ones than the used positive inhibitor acarbose (IC₅₀=2.50 \pm 0.21 μ g/ml).

35. Adamantane-1-carboxamides: Synthesis and antimicrobial activity

Stoykova B., **Chochkova M.**, Ivanova G., Tsvetkova I., Najdenski H., Štícha M., Milkova T. (2018)..

Bulgarian Chemical Communications, **50** (Special Issue B), 49-54.

Abstract: The rapid emergence of resistant bacteria highlights the urgent demand for new effective drugs. In view of the importance of adamantane skeleton in various antimicrobial drugs, herein the synthesis of *N*-adamantane-1-carboxamides of polyamine derivatives is described. The *in vitro* antibacterial activity of the new synthesized compounds against two Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) and two Gram-negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria, as well as the antifungal activity against *Candida albicans* was assessed. The results revealed that amongst the new synthesized bisamides, *N,N'*-bis-adamantane-1-carboxamide of 1,6-diaminohexane was the most effective one and inhibited both Gram-negative and Gram-positive strains with MIC of 125 μ g.ml⁻¹. Moreover, the same amide showed the highest antifungal activity (MIC of 63 μ g.ml⁻¹) against *Candida albicans*.

36. Synthesis of 3-aminomethylglucine derivatives and *in vitro* evaluation of their anti-tyrosinase, antiviral and radical scavenging activities

Chochkova M., Stoykova B., Nikolaeva-Glomb L., Philipov S., Milkova T. (2020).

Journal of Chemical Technology and Metallurgy, **55**(2), 261-271.

Abstract: A series of amides was synthesized by coupling of 3-aminomethylglucine with various amino acid analogues. The reaction was carried out under mild conditions by using various

carbodiimides and in the presence of catalytic amount of *N*-hydroxybenzotriazole. Five of the compounds obtained were new, and their spectral data are presented and discussed here. Selected amides were tested for their ability to scavenge the stable free 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) radical. The most active compounds were *N*-sinapoylphenylalanyl-3-aminomethylglucine amide and *N*-feruloylphenylalanyl-3-aminomethylglucine amide and their activity was due to the presence of hydroxycinnamoyl moiety in their molecules. The compounds were further tested in vitro for antiviral activity against viruses belonging to the Picornaviridae family. Furthermore, anti-tyrosinase activity of the compounds was performed in vitro. The results obtained suggested that the most promising tyrosinase inhibitor was feruloylphenylalanyl-3-aminomethylglucine.

37. Synthesis and antimicrobial activity of novel kojyl carbamates

Stoykova B., **Chochkova M.**, Tsvetkova I., Najdenski H., Štícha M., Ranchova K., Milkova, T. (2020). *Bulgarian Chemical Communications*, **52**, 23-29. doi:10.34049/bcc.52.A.299

Abstract: Novel kojyl carbamates of amantadine, rimantadine and oseltamivir were synthesized and assayed to evaluate their antimicrobial activity. The newly compounds were prepared by using EDC/HOBt method at preliminary activation of kojic acid. The structures of the synthesized kojyl derivatives were confirmed by mp, UV, IR (ATR)_{u_{max}}, ESI-MS. According to the antimicrobial activity studies performed in vitro, kojyl carbamate of rimantadine (4) displayed the highest antibacterial activity (MIC: 31 µg/mL) against two Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) bacteria. Moreover, this compound (4) showed about 4-fold better activity against two Gram-negative bacteria tested (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). Amongst the examined kojyl carbamates, the rimantadine derivative of kojic acid (4) exhibited the highest antifungal activity (*Candida albicans*) as well.

38. Cinnamoyl-memantine hybrids: Synthesis, X-ray crystallography and biological activities

Chochkova M., Jiang H., Kyoseva R., Stoykova B., Tsvetanova E., Alexandrova A., Liu R., Li Z., Mitrev Y., Dimitrova-Sbirkova H, Štícha M., Shivachev, B. (2021).

Journal of Molecular Structure, **1234**, 130147.doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130147

Abstract: Herein, framework combinations of antioxidant substituted cinnamic acids and memantine (*N*-methyl-*D*-aspartate receptor antagonist) in a new multi-targeted chemical entity were described. The amide bond formation of the memantine hybrids **1–5** was performed by EDC/HOBt coupling reaction. The chemical structures of the synthesized compounds were confirmed by means of melting points, UV, IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, and HRMS. Additionally, the crystal structures of memantine hybrids (**2–5**) were also studied by single-crystal X-ray diffraction. The single-crystal X-ray analysis revealed that the compounds **2**, **5** crystallize in a centrosymmetric manner both in monoclinic space group (SG) P21/c, (No 14) and in a non-centrosymmetric manner for compounds **3** and **4**, SG R3, (No 146) and SG P212121, (No 19), respectively.

Furthermore, preliminary in vitro screenings of their neuroprotective and radical scavenging activities were performed. The radical scavenging activity of synthesized memantine hybrids was measured against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•), hydroxyl (OH•) and superoxide (O₂•⁻) radicals and

compared with the standard antioxidants (ferulic and sinapic acids). Radical scavenging activity studies show that amongst the tested hybrids, N-sinapoyl amide of memantine (3) emerges as the most potent antioxidant in all tests.

Moreover, in vitro evaluation of anti-Alzheimer effects showed that the obtained memantine hybrids displayed neuroprotection in the moderate levels. Generally, they possess a little weaker activity as compared to the positive control memantine.

Taken together, our findings reveal that the N-sinapoylamide of memantine (3) can be considered as a promising neuroprotective agent for Alzheimer's disease, acting as well as a potent radical scavenger.