



БЪЛГАРСКА
АКАДЕМИЯ
на НАУКИТЕ

1869

ИНСТИТУТ ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ
С ЦЕНТЪР ПО ФИТОХИМИЯ

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ



Георги Милчев Добриков

**НОВИ СЪЕДИНЕНИЯ С ОБЕЩАВАЩА
АНТИТУБЕРКУЛОЗНА И АНТИВИРУСНА
АКТИВНОСТ**

АВТОРЕФЕРАТ

**към дисертация за придобиване на
научната степен „доктор на науките“**

Професионално направление: 4.2. Химически науки

Научна специалност: Органична химия

София, май 2023

ЗАБЕЛЕЖКИ:

Представените научни резултати в тази дисертация са получени в периода от 2009 до 2022 г. и са част от научните ми публикации за този период (над 17 на брой). Включени са две основни изследователски области: разработване на нови съединения с противотуберкулозна активност и разработване на нови съединения с антивирусна активност. Споменати са и други изследвани свойства на съединенията (напр. цитотоксичност, QSAR-анализ, генетика). Дисертацията е написана на 175 страници и съдържа 34 фигури, 28 таблици, 29 схеми и 340 литературни източници. За целите на конкурса са подбрани 8 научни статии (4 в Q1 и 4 в Q2). В 5 от тях Георги Добриков е кореспондиращ/първи автор. Резултатите са представени в 26 устни или постерни доклади на научни конференции в България и чужбина.

Резултатите, включени в настоящата дисертация, са получени при изпълнението на научни проекти, финансирани от Фонд „Научни изследвания“: Б02-11 (2014-2019); ДКОСТ-01/4 (2017-2019); КП-06-Н31/7 (2019-до сега); КП-06-Н39/7 (2019-до сега); КП-06-М59/8 (2021-до сега).

Изявявам благодарност за финансовата подкрепа на Фонд „Научни изследвания“ за закупуването на ЯМР спектрометър Bruker Avance II+ 600 в рамките на проект UNA-17/2005. Изявявам и признанието за финансовата подкрепа на Оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж“ 2014-2020, съфинансирана от Европейския съюз чрез Европейските структурни и инвестиционни фондове, проект BG05M2OP001-1.002-0012. В рамките на този проект бяха закупени два нови ЯМР спектрометра (използвани в тази дисертация) - Bruker Avance Neo 400 и Bruker Neo 600.

Някои търговски реагенти се използват в множество реакции в този автореферат. Поради тази причина те имат повече от един номер в реакционните схемите, за да улеснят четенето и разбирането на съдържанието.

Номерацията на съединенията в този автореферат е запазена същата, каквато е в дисертацията.

Научно жури:

чл.-кор. проф. дн Вася Банкова, (ИОХЦФ-БАН) вътрешен
проф. д-р Антоанета Трендафилова, (ИОХЦФ-БАН) вътрешен
проф. д-р Петко Денев, (ИОХЦФ-БАН) вътрешен
доц. д-р Юлиян Загранярски, (ФХФ-СУ) външен
чл.-кор. проф. дн Владимир Божинов, (ХТМУ) външен
проф. д-р Росица Николова, (ФХФ-СУ) външен
доц. д-р инж. Николай Георгиев, (ХТМУ) външен

Резервни членове на журито:

проф. д-р Милен Богданов (ФХФ-СУ) външен
проф. д-р Ваня Куртева (ИОХЦФ-БАН) вътрешен

СЪДЪРЖАНИЕ

1.	УВОД	1
1.1.	Туберкулозата – разпространение и значение	1
1.2.	Съвременни тенденции в разработването на противотуберкулозни лекарства	1
1.3.	Съвременни тенденции в разработването на анти-ентеровирусни лекарства	4
2.	ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	6
3.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ	7
3.1.	Разработване на нови съединения с мощна <i>in vitro</i> антитуберкулозна и антибактериална активност	7
3.1.1.	Нови аналози на етамбутола като обещаващи противотуберкулозни агенти	7
3.1.2.	Нови производни на (-)-фенхона като обещаващи противотуберкулозни агенти	19
3.1.3.	Антибактериална и противотуберкулозна активност на нови арилметилиден кетони и пиримидини с камфанов скелет	26
3.1.4.	Резистентност на <i>Mycobacterium tuberculosis</i> към нови нитрофуранил амиди – поглед на молекулярно ниво	37
3.2.	Разработване на нови диарил етери и техни аналози с анти-ентеровирусна активност	40
4.	ЛИТЕРАТУРА	57
5.	ЗАКЛЮЧЕНИЯ И ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИЯТА	72
5.1.	Заключения	72
5.2.	Приноси	73
6.	ПРИЛОЖЕНИЯ	74
6.1.	Списък на публикациите, включени в конкурса	74
6.2.	Участия в конференции	75
6.3.	Проекти, свързани с тематиката на дисертацията	77

1. УВОД

1.1. Туберкулозата – разпространение и значение

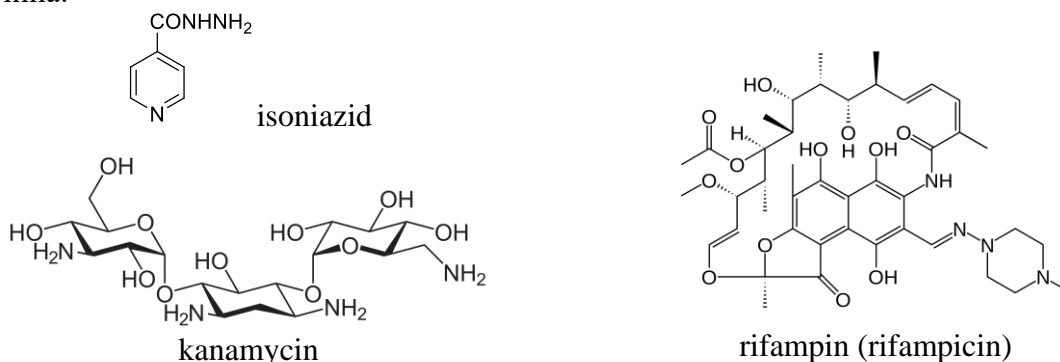
Туберкулозата (ТБ) е една от най-старите известни смъртоносни болести, която засяга целия свят и до днес. Тя е убила повече хора по света през последните две хилядолетия, отколкото всяка друга инфекция. Причинителите на туберкулозата са бактерии, членове на комплекс, представен главно от *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Най-вероятно общият прародител на тези видове е съществувал на Земята преди около 15000 години. Хейман обаче спекулира и твърди за юрски произход на ТБ преди повече от 150 милиона години.¹ Най-ранните ясни доказателства за човешка туберкулоза идват от скелетни останки, намиращи се в неолитно селище в Източното Средиземноморие, датирано от преди около 9000 години.²

Характеристиките, които биха направили едно лекарство идеално за лечение на туберкулоза, са: (i) то трябва да бъде ефективно срещу MDR/XDR-ТБ, (ii) трябва да съкрати времето за лечение както на чувствителната, така и на резистентната на лекарства туберкулоза, (iii) то трябва да е насочено и към нереплициращо се състояние на бактерията, (iv) трябва да е съвместимо с настоящите противотуберкулозни и ХИВ лекарства (тъй като *Mtb*/HIV ко-инфекцията е често срещана). За съжаление, дори и при най-новите и обещаващи химически структури, все още се наблюдава развитие на резистентност и много странични ефекти. От огромно значение е да продължи скринингът на множество химични библиотеки, включително синтетични, полусинтетични и природни съединения.³

1.2. Съвременни тенденции в разработването на противотуберкулозни лекарства

Класическото лечение на туберкулозата е установено от 60-те години на миналия век и включва две основни групи лекарства (техните структури са представени на Фигури 1 и 2). Изониазид, рифампин, етамбутол (EMB), пиразинамид и стрептомицин са основните противотуберкулозни лекарства от първа линия. Аминогликозидите (канамицин, амикацин), хинолоните (левофлоксацин), етионамид или протионамид, циклосерин, пара-аминосалицилова киселина (PAS) и полипептида капуреомицин са противотуберкулозните лекарства от втора линия.⁴ Този списък беше повече или по-малко постоянен до миналото десетилетие, когато MDR/XDR-ТБ се повиши изключително много в световен мащаб.

През 2019 г. СЗО публикува нови насоки, които доведоха до основна ревизия и нова класификация на лекарствата, препоръчани за употреба в по-дълги схеми на лечение на MDR-ТБ (обобщени на Фигура 2). Това лечение включва комбинация от трите лекарства от група А (левофлоксацин или моксифлоксацин, бедаквилин и линезолид), с едно или две лекарства от група В. Лекарствата от група С могат да се използват, когато лекарствата от групи А и Б са недостатъчни за успешно излекуване или не са приложими по някаква причина.



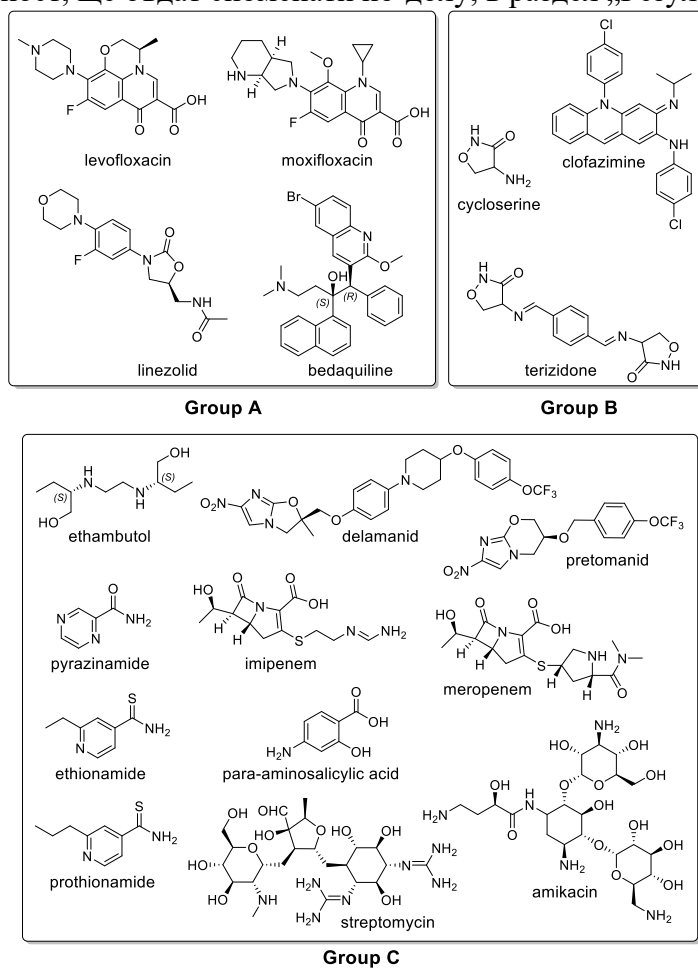
Фигура 1. Някои лекарства, използвани в класическото лечение на туберкулоза от 60-те години на миналия век.

Последните насоки на СЗО (от 2020 г.)⁵ също изясняват, че новият 6 до 9 месечен режим на лечение с претоманид, бедаквилин и линезолид вече може да се използва при пациенти с MDR-ТБ с допълнителна резистентност към флуорохинолонови антибиотици. В

допълнение, повечето лекарства от втора линия са по-токсични, скъпи и по-малко ефективни от лекарствата от първа линия.² Например неоправдани надежди се възложиха на бедаквила. След въвеждането му в клиничната практика, той се оказа не особено ефективен, с нежелани странични ефекти (напр. компрометирана сърдечна безопасност).^{6,7}

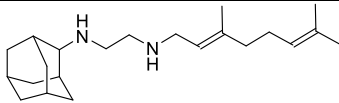
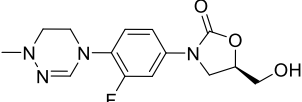
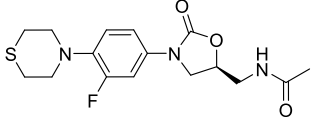
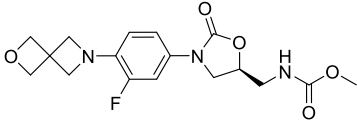
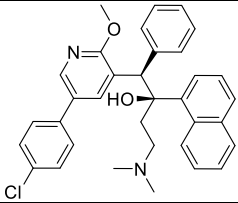
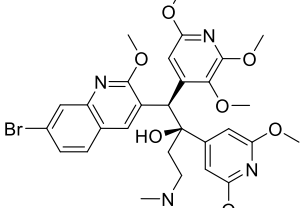
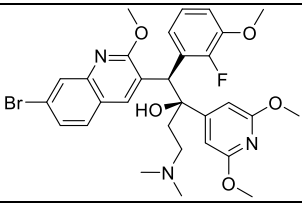
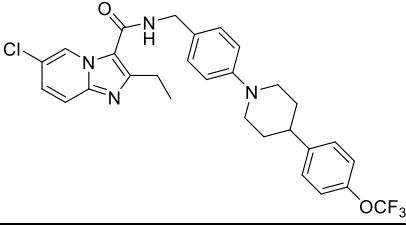
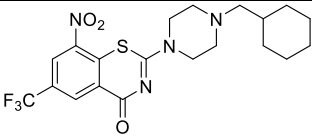
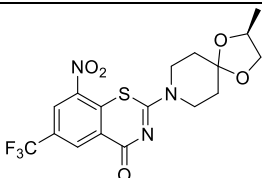
Всички гореспоменати лекарства имат известен механизъм на действие, както и таргетни гени и протеини (заедно със свързаните с тях мутации), причиняващи резистентност към тези лекарства.³ Много съединения в момента са в клинична тестове (фази I, II или III). Най-важните кандидати могат да бъдат обобщени в Таблица 1.² Съвременното откриване на лекарства за туберкулоза се основава предимно както на целеви, така и на фенотипни/клетъчни методи, което води до напълно нови класове активни съединения.⁸ Възможна е обаче и друга класификация при откриването на лекарства. Скорошен анализ разкрива, че 43% от публикуваните клинични кандидати от *Journal of Medicinal Chemistry* са производни на известни съединения (DKC), а други 29% са получени в резултат на случаен скрининг (RS).⁹

Изглежда, че RS все още остава подходящ и ефективен метод за откриване на биоактивни съединения, особено подходящ за академични институции с ограничено финансиране. Ето защо използвахме този метод в нашите изследвания на противотуберкулозни лекарства. В допълнение, в някои молекули включихме фрагменти, за които преди това е известно от литературата, че са фармакофорни. В заключение, огромно количество *in vitro* активни съединения (във всички предклинични фази) са описани в научната литература. Те са разделени на много различни класове, въз основа на тяхната химична структура или механизъм на действие.^{8,10-16} Въпреки това, тяхното подробно описание не е цел на тази дисертация и само единични примери, свързани с нашата публикационна дейност, ще бъдат споменати по-долу, в раздел „Резултати и дискусия“.



Фигура 2. Лекарства, препоръчани от СЗО през 2019 г. за по-продължително лечение на MDR-ТБ.

Таблица 1. Лекарствени кандидати с антитуберкулозна активност в състояние на клинични изпитания (фази I, II или III през 2022 г.).

Име	Структура	Клас	Фаза
SQ109		Ethylenediamine	II/III
Delpazolid		Oxazolidinone	II
Sutezolid		Oxazolidinone	II
TBI-223		Oxazolidinone	I
Sudapyridine (WX-081)		Triarylpyridine	II
TBAJ-876		Diarylquinoline	I
TBAJ-587		Diarylquinoline	
Telacebec		Imidazopyridine amide	II
Macozinone		Benzothiazinone	II
BTZ043		Benzothiazinone	I/II

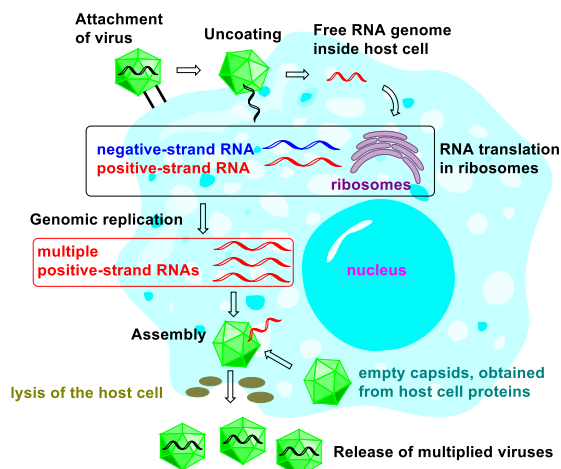
GSK3036656		Benzoxaborole	II
TBA-7371		1,4-Azaindole	II
Pyrifazimine (TBI-166)		Iminophenazine	II
OPC-167832		Carbostyryl	I/II
SPR720		Benzimidazole urea	I
GSK2556286		Pyrimidine-2,4-dione	I
BVL-GSK098		Amido-piperidine	I

1.3. Съвременни тенденции в разработването на анти-ентеровирусни лекарства

Ентеровирусите (EV) са необвити, едноверижни (+) РНК вируси, принадлежащи към семейство *Picornaviridae*. Това голямо семейство включва няколко патогена, които са замесени в широк спектър от клинични прояви, засягащи хора и животни. EV може също да бъдат свързани с още по-сериозни заболявания, които впоследствие могат да са животозастрашаващи. Такива са например менингит, енцефалит, миокардит, полиомиелит, инсулинозависим диабет и др.^{17,18} Коксаки вирусите (клас EV), и по-специално *Coxsackie B* група, често се свързват с развитието на миокардит, който може да доведе до внезапна смърт при млади хора или прогресия до дилатативна кардиомиопатия, ако не се лекува. Жизненият цикъл на ентеровируса е описан накратко във Фигура 3.^{19,20}

Съвременната антивирусна химиотерапия все още не е постигнала същите успехи като антибактериалната химиотерапия. Съществуващите антивирусни средства на химическа основа са доста ограничени. Това важи не само за приложимите в клиничната практика, но и за тези, показващи обещаваща активност в предклиничните фази. Това се дължи основно на две причини – първата е изключително честата мутация на вирусите, водеща до бързо развитие на резистентност към антивирусни лекарства. Втората причина е ограниченият брой биохимични процеси във вирусите, които могат да бъдат повлияни от антивирусните средства. Вирусите нямат собствен метаболизъм, те разчитат на метаболизма на

гостоприемника, за да осъществят гореспоменатия жизнен цикъл. Следователно, антивирусните химиотерапевтици прекъсват или нарушават този цикъл не директно, а само чрез избирателно въздействие върху нормалните биохимични процеси в клетките гостоприемници.



Фигура 3. Ключови етапи от жизнения цикъл на ентеровирусите.

През последните десетилетия става известно, че няколко класа непептидни съединения са селективни *in vitro* инхибитори на ентеровирусната репликация. Съществува обаче рязко несъответствие между антивирусната активност, установена *in vitro* и *in vivo* (експерименти с лабораторни животни). За разлика от стотици инхибитори на вирусна репликация, показващи *in vitro* ефекти, по-малко от двадесет проявяват известна *in vivo* активност. За съжаление все още не е установена ефективна анти-EV химиотерапия за клинична употреба. Развитието на лекарствена резистентност е основната причина за липсата на антивирусни средства в клинична употреба при ентеровирусни инфекции.

Доказано е, че ограничен брой синтетични органични съединения селективно инхибират точно един от процесите, споменати по-горе – репликацията на вирусна РНК. Повлияването на този процес е ключов момент в борбата с вирусите, поради което търсенето на нови съединения с такъв механизъм на действие продължава и днес.

2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация е да представи синтез на нови съединения, перспективни като мощни *in vitro/in vivo* противотуберкулозни и антивирусни средства с понижена цитотоксичност и подобрени фармакологични свойства. В някои случаи са извършени QSAR анализи, за да се изяснят възможностите за по-нататъшно разработване на подобрени биоактивни съединения. Специален акцент беше поставен върху синтетичната част от нашата работа и характеризирането на получените нови съединения, без подробности за използваните биологични и спектроскопски методи.

За реализацията на поставената цел са поставени следните задачи:

- **Разработване на нови производни на R-2-аминобутан-1-ол като противотуберкулозни средства:**
 - N-ацилни производни;
 - N-алкил/арил производни;
 - хетероциклични производни;
 - уреи, тиоуреи и ацилтиоуреи.

- **Разработване на нови производни на (+)-камфора като противотуберкулозни средства:**
 - амидоалкохоли с камфанови скелети;
 - други производни на аминокалкохоли с камфанов скелет.

- **Разработване на нови мощни аналози на известния антивирусен агент MDL-860:**
 - нови диарилетери, притежаващи циано и нитро групи;
 - нови диариламини и диарилтиоетери, притежаващи циано и нитро групи;
 - други диарилетери и техните хетероциклени аналози.

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Публикациите, представени тук, засягат две специфични области на медицинската химия – синтез на нови антибактериални и антивирусни средства. Специален акцент е поставен върху противотуберкулозните средства. Освен кратко описание на синтетичните методи, този раздел също така включва резултати за *in vitro/in vivo* активност на синтезирани съединения. Подробни синтетични процедури и аналитични данни са представени в раздела „Експериментална част“ към дисертацията, но са изключени в автореферата.

3.1. Разработване на нови съединения с мощна *in vitro* антитуберкуозна и антибактериална активност

3.1.1. Нови аналози на етамбутола като обещаващи противотуберкуозни агенти

Простият диамин етамбутол (ЕМВ, Фигура 2) се синтезира чрез взаимодействие на 1,2-дихалогеноетан с (*S*)-2-амино-1-бутанол.^{21,22} Описан е също алтернативен синтетичен метод.²³ ЕМВ е предимно бактериостатичен анти-туберкуозен агент с не напълно изяснен механизъм на действие. Той е насочен към ензимите арабинозил трансферази, отговорни за биосинтеза на арабиногалактан (ключов компонент от уникалната микобактериална клетъчна стена).²⁴⁻²⁶ Въпреки умерената си активност, поради синергията си с други лекарства и по-ниската токсичност, ЕМВ се използва в комбинация с по-мощни антимикубактериални агенти от първа линия. Ранните изследвания на връзката структура-активност (SAR) показват, че разстоянието между двата азота, наличието на две хидроксигрупи и малките странични вериги в молекулата са ключови фармакофорни елементи. Конфигурацията на молекулата е от решаващо значение за дейността, тъй като ЕМВ (с *S,S*-конфигурация) е приблизително 200-500 пъти по-мощен от неговия (*R,R*)-енантиомер.²⁷

През последните години различни производни на (*S*)-2-амино-1-бутанол и 1,2-етилендиамин са синтезирани и оценени за тяхната антимикубактериална активност и механизми на действие.²⁸⁻³² Като цяло повечето от съединенията, съдържащи (*S*)-2-амино-1-бутанолов фрагмент показват подобна, но не и значително по-висока активност от тази на ЕМВ. Важно е да се отбележи, че използването на (*R*)-2-амино-1-бутанолов скелет за синтеза на кандидати за антитуберкуозни лекарства е пренебрегнато. Има само отделни примери за такива производни, показали не особено обещаващи резултати по отношение на антимикубактериалната активност,³³ но притежаващи обещаваща противогъбична активност.³⁴

Тук докладваме синтеза на малки библиотеки от структурно различни съединения, включващи (*R*)- и (*S*)-2-амино-1-бутанолов остатък и оценката на техните *in vitro* антимикубактериални, антибактериални и противогъбични активности.^{35,36} Всички съединения бяха получени с отлична чистота (>99%) след колонна хроматография и/или кристализация. Те бяха напълно характеризирани с ЯМР, мас спектри, точки на топене и елементен анализ.

Синтез на нови *N*-ацилирани, -алкилирани и -арилирани производни (74-81, 85-87, 95-101, 108-113, 116-118, 125-130, 144-156 и 158-163) на търговски енантиомерно чист (*R*)-2-амино-1-бутанол. Оценка на тяхната антимикубактериална, антибактериална и противогъбична активност³⁵

Синтезирана е серия от *N*-моноацилирани съединения **74-81**³⁵ и са постигнати добри до отлични добиви при използване на стандартни условия за ацилиране на (*R*)-2-амино-1-бутанол (**65**) - 0°C и Et₃N в сух дихлорометан (DCM) с киселинни хлориди **66-73** (Схема 1). Синтезът на **77-79** и **81** е публикуван по-рано, без данни за чистотата.³⁷⁻⁴¹ В случая на **75**, (*S*)-енантиомерът е получаван от други учени в енантиомерно обогатена форма (75-97 % ee), чрез използване на доста сложна процедура.³⁷ Амидните производни **85-87** са синтезирани чрез аминолиза без разтворители на естерите **82-84** с **65** чрез нагряване при 90-100°C (Схема 2).³⁵

Синтезът на съединения **95-101** (Схема 3)³⁵ се извършва чрез прилагане на стандартни процедури, описани в литературата⁴²⁻⁴⁸ – нагряване на **65** с **88-94** без разтворител, или в

присъствие на различни разтворители (напр. диетилетер, тетраhydroфуран, етанол и т.н.). Съединения **95**, **96** и **99** са известни в литературата,^{42-44, 48} но публикуваните данни са недостатъчни по отношение на чистотата и свойствата им. Интересно е да се отбележи, че реакцията на **65** с **90** при тези специфични условия води до естер **97**. Съединение **98** се получава от **65** и **91** в резултат на миграция на двойната връзка. Подобна реакция на прегрупировка е описана и по-рано.⁴⁹

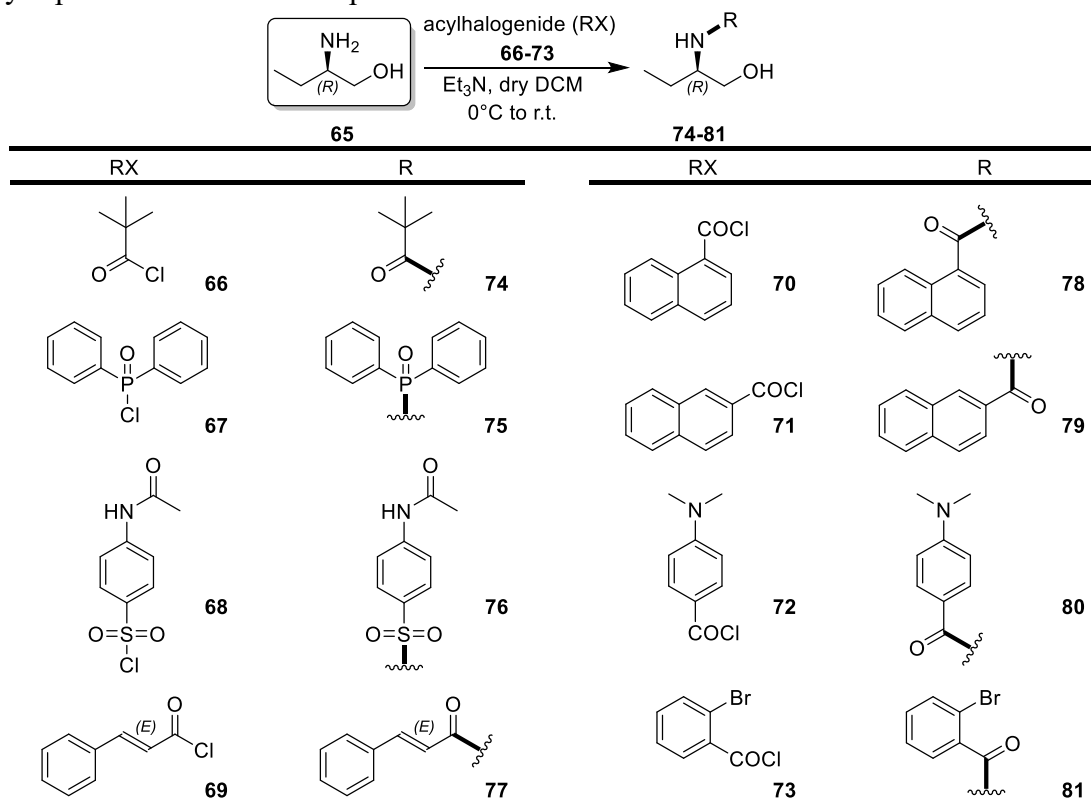


Схема 1. Синтез на съединения **74-81**.

Известно е, че някои уреи и тиоуреи са ефективни лекарства срещу редица MDR щамове на *M. tuberculosis*.⁵⁰⁻⁵⁴ Поради това си струва да се оцени активността на подобни структури, включващи (*R*)-2-аминобутанолов остатък. Синтезът на съединения **108-110** (Схема 4) се извършва чрез смесване на **65** с изотиоцианат **102** и изотиоцианати **103-104** съответно, в тетраhydroфуран като разтворител.³⁵ Образуването на **108**⁵⁵⁻⁵⁷ и **110**⁵⁸ е описано в литературата във връзка с различни изследвания, които не са свързани с настоящата дисертация.

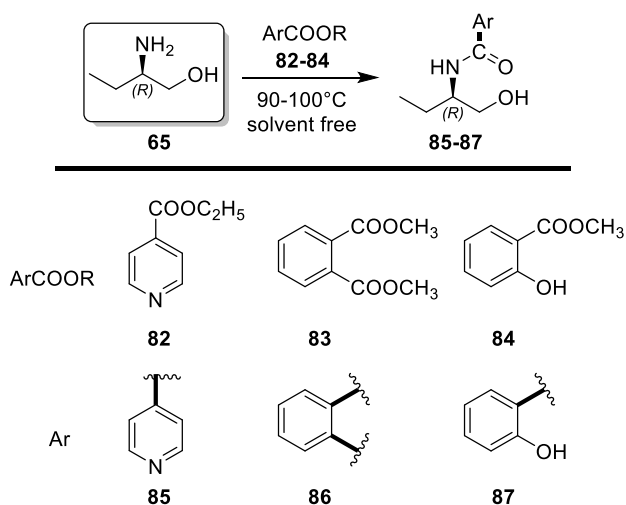


Схема 2. Синтез на съединения **85-87**.

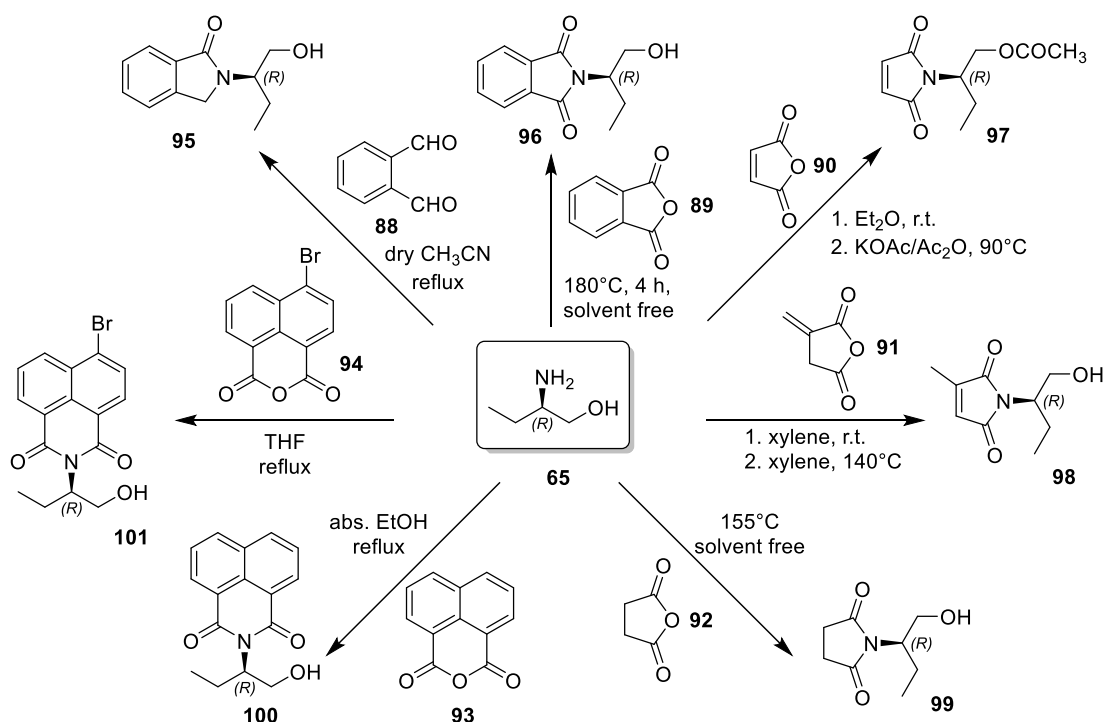


Схема 3. Синтез на съединения 95-101.

Хетероцикълът **111** се синтезира в два етапа (Схема 4). В първия етап се образува солта на **65**. Тя се изолира като утайка след смесване на **65** с хомофталова киселина (**105**) в тетраhydroфуран (THF). Този междинен продукт след това се нагрява без разтворител в продължение на 5 часа, за да се образува **111** с добри добиви. Структури, подобни на **111**, показват противовъзпалителна и аналгетична активност.⁵⁹ Производното на хиназолинона **112** (Схема 4) се получава в приемлив добив в кипящ толуен след смесване на **65**, антранилова киселина (**106**) и триетил ортоформиат в присъствието на каталитични количества от пара-толуенсулфонова киселина (PTSA). В нашия случай публикуваната процедура за синтез на подобни хиназолинони без разтворител не беше успешна.⁶⁰ Някои 4(3*H*)-хиназолинони са показали противотуберкулозна⁶¹ и антибактериална⁶² активност. Съединение **113** (Схема 4) беше интересно да се синтезира поради очакваната липофилност и хидролитична стабилност, причинени от пространственото запречване на камфановия скелет. Реакцията се провежда чрез кондензация на (+)-камфор (**107**) и **65** в присъствието на каталитично количество безводен $ZnCl_2$, съгласно публикуваната процедура.⁶³

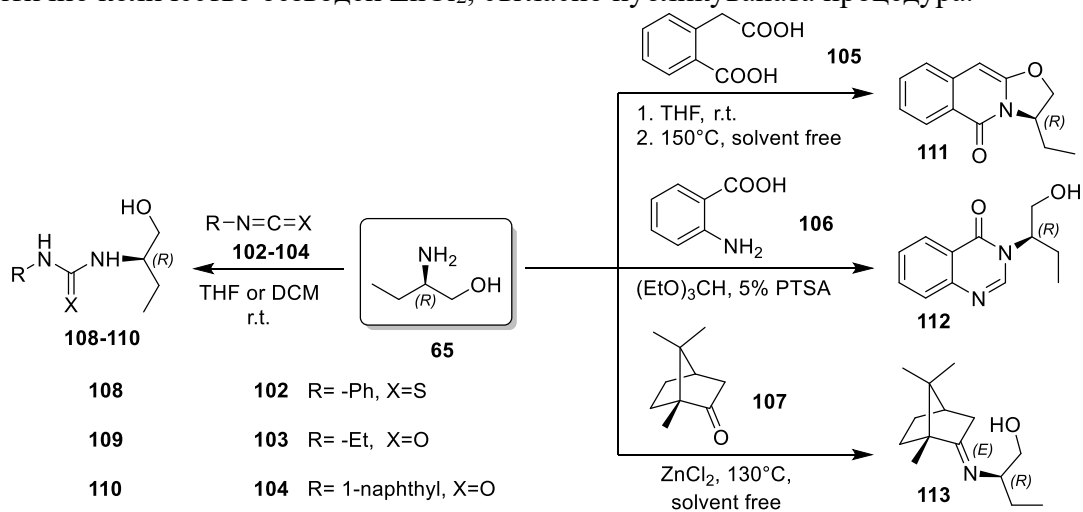


Схема 4. Синтез на съединения 108-113.

Сериите от *N*-заместени aminoalkoholi са синтезирани чрез използване на (*R*)-2-амино-1-бутанол (**65**) като централно хирален фрагмент, в реакция с арил- и алкил-халогениди.³⁵ Аminoalkohолът **65** реагира без присъствие на разтворител с хетероарил

бромидите **101** и **114**, водещо до съединения **116-117** (Схема 5). Интересно е да се отбележи, че вторият бромов атом в **114** не е заменен с (*R*)-2-амино-1-бутанолов фрагмент. Съединението **118** се синтезира лесно от **65** и **115** в кипящ под обратен хладник етанол (EtOH) (Схема 5).

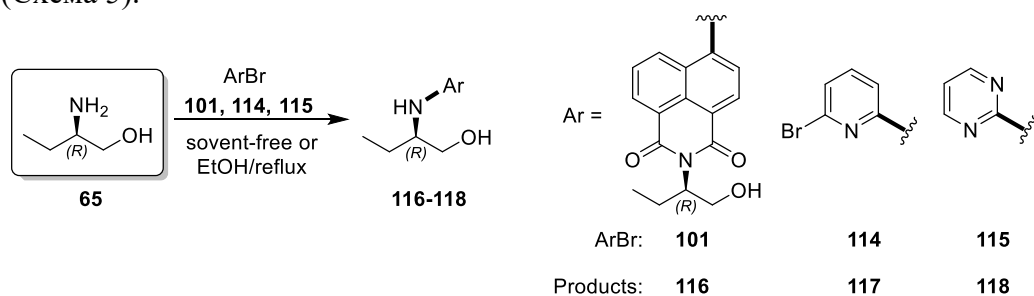


Схема 5. Синтез на съединения **116-118**.

N,N-дизаместените аминокалкохоли **127-130** (Схема 6)³⁵ се получават с добри добиви, при стандартни условия, чрез използване на излишък от K_2CO_3 в кипящ ацетонитрил. Поради пространствено запречване, в случая на продукти **125** и **126** (Схема 6) се постига само моно-заместване на аминокалкохолната група. Реакциите обаче протичат гладко и в двата случая - Et_3N в дихлорометан (DCM) за **125** и K_2CO_3 /18-краун-6 в ацетонитрил (MeCN) за **126**. Опитите за *N*-ацелиране на **125** (с ацетил хлорид/ Et_3N) предоставиха само *O*-ацелиран продукт **125a**. Синтезът на съединения **127**,⁶⁴⁻⁶⁹ **128**,^{70,71} и **125** е описан по-рано. Последните две производни са използвани за получаване на противотуморни агенти.^{72,73}

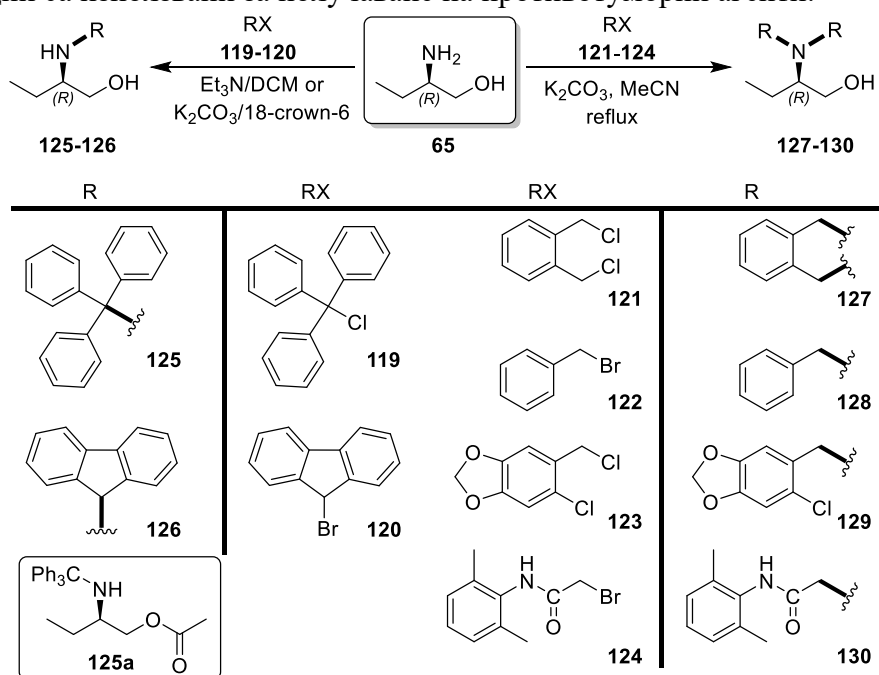


Схема 6. Синтез на съединения **125-130**.

Серия от заместени аминокалкохоли **144-156** от бензилов тип беше синтезирана (Схема 7)³⁵ чрез прилагане на ефективно редуцивно аминироване на алдехиди **131-143** с аминокалкохол **65**. Вместо да се използва често прилаганият (и по-скъп) редуциращ агент $NaBH(OAc)_3$,⁷⁴⁻⁷⁶ използвахме по-евтиния $NaCNBH_3$ в метанол/оцетна киселина (MeOH/AcOH) и постигнахме добри резултати.⁷⁷ Някои от изолираните продукти са споменати по-рано в литературата. *S*-енантиомерът на **144** е описан в патенти като катализатор.^{78,79} Бис-заместеният продукт **146** е бил част от проучване относно предотвратяването на индуцирана от лекарството цитотоксичност.⁸⁰ Аминокалкохолът **147** и неговият *S*-енантиомер са използвани като лиганди за стереоселективна редукция на кетони.⁸¹ Рацематът на **149** е споменат като междинен продукт за получаване на фероценилметиламинокалкокси силиани.⁸² *S*-енантиомерите на **150** и **151** са получавани чрез редуцивно аминироване на алдехиди **137** и **138** съответно, чрез използване на циано

борохидрид, имобилизиран върху смола.⁸³ Образуването на **153** чрез редуktivно аминиране е отбелязано в изследване относно цитотоксичността на пирен-съдържащи аминокалкохоли.⁸⁴

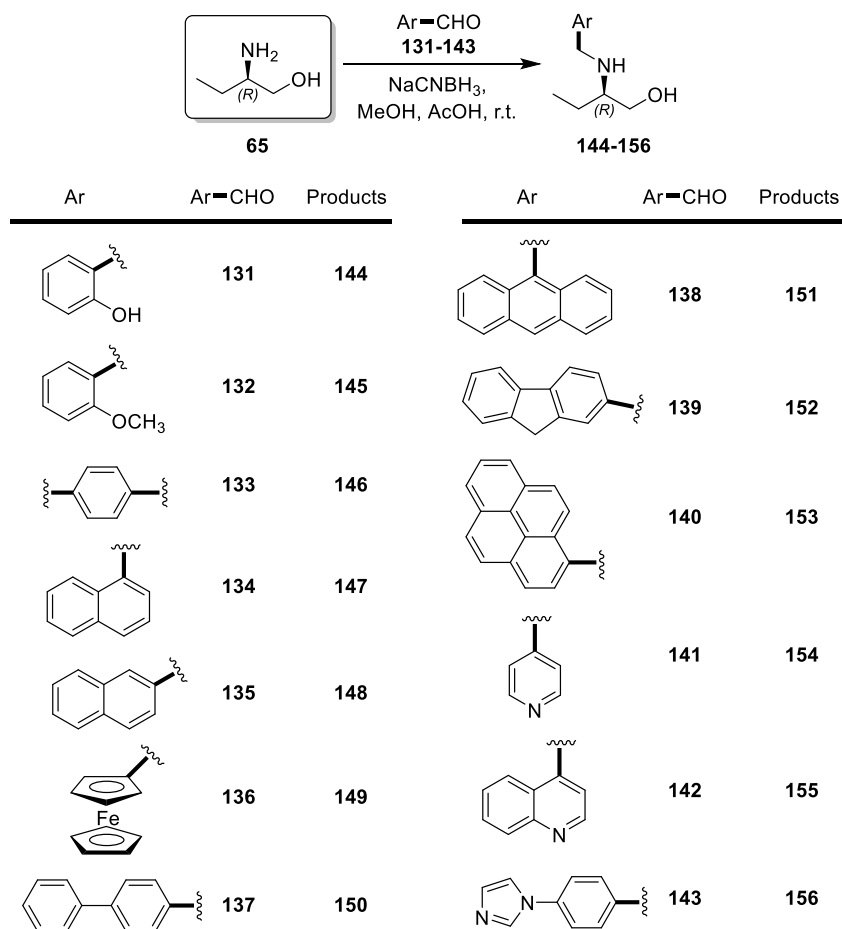


Схема 7. Синтез на съединения **144-156**.

Оценката на антимикубактериалната активност на съединенията, получени от (*R*)-2-амино-1-бутанол, дава много обещаващи резултати (виж по-долу, Таблица 2). Следователно е необходимо изследване на *S*-енантиомерите на най-активните съединения, за да се сравнят активностите за всяка двойка енантиомери. Така, синтезът на съединения **158-163** (Схема 8)³⁵ от търговски (*S*)-2-амино-1-бутанол (**157**) беше постигнат чрез прилагане на същите процедури, вече описани по-горе за техните *R*-аналози **75, 77, 86, 87, 95** и **109**, съответно.

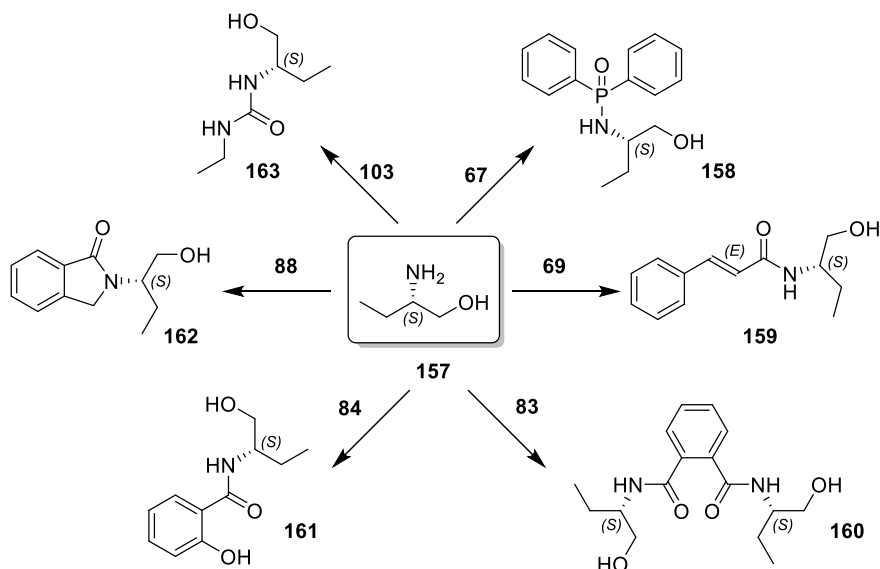


Схема 8. Синтез на съединения **158-163**.

Синтезираните съединения (**74-81, 85-87, 95-101, 108-113, 116-118, 125-130, 144-156** и **158-163**) бяха тествани за тяхната *in vitro* активност срещу референтен щам *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Таблица 2), използвайки метода на *Canetti*.^{85,86} Пет от съединенията, а именно **75, 86, 87, 95** и **109**, са показали забележително висока активност, която е между 5 и 11 пъти по-добра от ЕМВ (използван като еталон). За сравнение, най-активният аналог на ЕМВ, 1,2-диамина SQ 109 (Таблица 1), е 35 пъти по-мошен от ЕМВ.²⁹ Интересно е да се отбележи, че в литературата не бяха намерени аналози на **75, 87, 95** и **109** с антимикубактериална активност. Известната от литературата антимикубактериална активност на салициланилидни фенолни естери показва,^{87,88} че салициламидният фрагмент е важен за активността на **87**. Съединения **77, 80, 125a, 127** и **116** са показали 50-80% активност в сравнение с ЕМВ. Цинамамидната група при **77** е включена в различни структури, притежаващи антимикубактериална активност.^{89,90} Останалите синтезирани от нас производни на (*R*)-2-аминобутанола, нямат осезаема активност. Всички споменати по-горе съединения (с изключение на **125a**) са в съгласие с правилото на *Литински* (Таблица 2).

Оценката на антимикубактериалната активност на *S*-енантиомерите **158-163** показва липса на активност (100% растеж) при концентрации приблизително 2-3 пъти по-висока от минималната инхибираща концентрация (МИК) на ЕМВ. Тези резултати са в контраст с високата активност, наблюдавана за *R*-енантиомерите (**75, 77, 86, 87, 95** и **109**, съответно). Това е обратното на факта, че (*S,S*)-ЕМВ е приблизително 500 пъти по-активен от (*R,R*)-ЕМВ.²⁷ Следователно, директното сравнение на структурите, представени в това проучване с ЕМВ, трябва да се интерпретира внимателно. Тъй като **158-163** не са интересни като антимикубактериални средства, тяхната цитотоксичност и друга антибактериална активност не бе изследвана. Няма корелация между антимикубактериалната активност и активността срещу други микроорганизми за съединенията в това изследване (Таблицы 2 и 3). Това показва специфичната активност на всички мощни производни на (*R*)-2-аминобутанол само към *Mycobacterium tuberculosis*, както е установено за повечето антимикубактериални средства от първа линия (включително ЕМВ) при клинична употреба. Освен това, тъй като всички получени от нас съединения са частични структурни аналози на ЕМВ, може да се предположи, че те споделят подобен механизъм на антимикубактериално действие,²⁴⁻²⁶ въпреки че това се нуждае от изясняване.⁹¹ Следователно, изследването на механизма на действие и ролята на хиралността на тези съединения би подпомогнало откриването на още по-мощни аналози.

За да се изследва селективността на антипролиферативните ефекти, *in vitro* цитотоксичността на избрани съединения (проявяващи антимикубактериална активност), беше оценена спрямо нетуморна клетъчна линия 293Т от ембрионален човешки бъбрек (НЕК 293Т).³⁵ Очевидно от стойностите на концентрациите, убиващи 50% от тестваните клетки (IC₅₀), обобщени в Таблица 2, съединенията като цяло са с ниска до умерена цитотоксичност срещу човешки клетки. С малки изключения, съединенията предизвикват 50% инхибиране на клетъчната пролиферация и жизнеспособност при концентрации, значително надвишаващи 100 µM. Може да се обобщи, че структурите, осигуряващи най-високата антимикубактериална активност в рамките на серията ни, като цяло проявяват много ниски антипролиферативни/цитотоксични ефекти срещу човешки клетки (индекси на селективност, вариращи от 91.2 до 375.4).

Таблица 2. *In vitro* скринингови данни за антимикобактериална активност и цитотоксичност на съединения **74-81, 85-87, 95-101, 108-113, 116-118, 125-130, 144-156** и **158-163**.

Съед.	Activity <i>M. tb.</i> H37Rv, МИК (µM)	<i>In vitro</i> цитотоксичност – НЕК 293Т, IC ₅₀ (µM) ^a	Индекс на селективност, SI ^{b,c}	LogP ^d	Разтворимост във вода при 20°C (mg/ml) ^b
74	28.86	NT	NT	0.48 +/-0.31	NT
75	0.69	155	224.6	1.82 +/-0.57	<1
76	>17.46	NT	NT	0.79 +/-0.37	NT
77	9.12	211	23.1	1.70 +/-0.35	<1
78	>20.55	NT	NT	2.48 +/-0.36	NT
79	>20.55	NT	NT	2.48 +/-0.36	NT
80	8.46	173	20.5	1.67 +/-0.39	1.5
81	>18.37	NT	NT	1.60 +/-0.46	NT
85	>25.74	NT	NT	-0.01 +/-0.37	NT
86	0.65	244	375.4	-0.27 +/-0.52	46
87	0.96	257	267.7	1.59 +/-0.45	2
95	0.97	89	91.8	0.49 +/-0.36	1
96	>22.81	NT	NT	1.81 +/-0.28	NT
97	23.67	NT	NT	0.07 +/-0.33	NT
98	27.29	NT	NT	0.66 +/-0.33	NT
99	>29.21	NT	NT	-0.70 +/-0.39	NT
100	>18.57	NT	NT	1.44 +/-0.62	NT
101	>14.36	NT	NT	2.21 +/-0.65	NT
108	>22.29	NT	NT	1.14 +/-0.33	NT
109	1.25	114	91.2	-0.23 +/-0.35	215
110	>19.36	NT	NT	2.74 +/-0.40	NT
111	23.23	NT	NT	2.28 +/-0.75	NT
112	22.91	NT	NT	0.94 +/-0.29	NT
113	>22.39	NT	NT	4.62 +/-0.47	NT
116	14.03	47	3.4	0.92 +/-0.98	<1
117	20.40	NT	NT	2.41 +/-0.62	NT
118	>29.90	NT	NT	0.47 +/-0.57	NT
125	>15.09	NT	NT	6.22 +/-0.53	NT
125a	13.39	114	8.5	6.90 +/-0.40	<1
126	19.74	NT	NT	3.36 +/-0.56	NT
127	10.46	122	11.7	2.20 +/-0.38	<1
128	>18.56	NT	NT	4.61 +/-0.42	NT
129	>11.73	NT	NT	5.79 +/-0.55	NT
130	>12.15	NT	NT	4.16 +/-0.38	NT
144	25.61	NT	NT	1.26 +/-0.35	NT
145	>23.89	NT	NT	1.91 +/-0.36	NT
146	17.83	NT	NT	1.78 +/-0.48	NT
147	21.80	NT	NT	3.23 +/-0.34	NT
148	>21.80	NT	NT	3.23 +/-0.34	NT
149	17.41	NT	NT	- ^e	NT
150	>19.58	NT	NT	3.76 +/-0.39	NT
151	17.90	NT	NT	4.46 +/-0.34	NT
152	18.72	NT	NT	3.94 +/-0.40	NT
153	16.48	NT	NT	4.95 +/-0.34	NT
154	27.74	NT	NT	0.51 +/-0.35	NT
155	21.71	NT	NT	1.86 +/-0.35	NT
156	20.38	NT	NT	1.76 +/-0.62	NT
158	>17.28	NT	NT	1.82 +/-0.57	NT
159	>22.80	NT	NT	1.70 +/-0.35	NT
160	>16.21	NT	NT	-0.27 +/-0.52	NT
161	>23.90	NT	NT	1.59 +/-0.45	NT
162	>31.21	NT	NT	-0.23 +/-0.35	NT
163	>24.36	NT	NT	0.49 +/-0.36	NT
EMB.2HCl^f	7.22	NT	NT	0.06 ^g	100 ^f

^a НЕК – човешки ембрионални бъбречни клетки 293Т. ^b NT – не е тествано; цитотоксичността, индекса на селективност (SI) и водоразтворимостта са тествани/измерени/изчислени само за избрани активни съединения. ^c SI = IC₅₀/МИК. ^d LogP, разпределителния коефициент октанол-вода, е изчислен чрез програмата ACDLabs/ChemSketch 12.01 (www.acdlabs.com). ^e LogP не е изчисляван за това съединение поради софтуерни ограничения. ^f EMB.2HCl – етамбутол дихидрохлорид (референтно съединение).

^g LogP и водоразтворимостта на EMB.2HCl са известни в литературата: N.R. Budha, R.E. Lee and B. Meibohm, *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 809.

За синтезираните производни на (*R*)-2-амино-1-бутанол (с изключение на **158-163**) е извършена качествена оценка на техните *in vitro* антибактериални и противогъбични активности (Таблица 3) срещу т. нар. условно патогенни микроорганизми,³⁵ чрез използване на агар дифузионен тест.⁹² По-конкретно, активностите са изследвани срещу Gram (+) щамове: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus idosus* В 241, *Bacillus megaterium* NRRL 1353895, *Bacillus mycooides* DSMZ 274, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Acinetobacter johnsonii* ATCC 17909, *Staphylococcus RL Sarcinate1* NR 33 ATCC 9341, *Micrococcus luteus* ATCC 9631 и Gram (-) щам *Escherichia coli* ATCC 8739. Като референтни съединения са използвани антибиотиците стрептомицин и гентамицин сулфат. Противогъбичните активности са изследвани срещу дрождениите щамове *Candida tropicalis* ATCC 20336 и *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 и гъбичния щам *Penicillium chrysogenum* СЕСТ 2802. Флуконазол и итраконазол са използвани като противогъбични референтни съединения.

Повечето от тестваните съединения не са активни дори при концентрации 50 mg/ml и следователно не са подходящи за антимикубни средства (Таблица 3). Някои от съединенията (**75, 97-98, 111, 126, 127, 147-148, 150-152**) демонстрират широк спектър от ниска до умерена активност при по-ниски концентрации – 25, 10, 5, 2, 1.25 или 1 mg/ml. Данните в Таблица 3 (втори стойности) показват, че почти всички съединения не са активни при концентрации 2 mg/ml или по-ниски. Само съединения **97, 151** и **152** са активни срещу всички микроорганизми (с изключение на *Escherichia coli*) в значително по-ниски концентрации. Най-мощното съединение **97** проявява подчертана активност срещу гъбичките *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Penicillium chrysogenum* дори при концентрации съответно 6, 6 и 12.5 µg/ml. Малеимидния пръстен на **97** вероятно е отговорен за наблюдаваната активност. Заместеният малеимид **98** и дихидро аналогът **99** показват съответно значително по-ниска активност и липса на активност. Подобна тенденция се наблюдава в публикуваните данни относно противогъбичната активност на аналогични *N*-алкил-арил заместени малеимидни производни.⁹³

Списък на микроорганизмите (Таблица 3, колони 1-13): 1. *Bacillus subtilis*, 2. *Bacillus idosus*, 3. *Bacillus megaterium*, 4. *Bacillus mycooides*, 5. *Bacillus cereus*, 6. *Acinetobacter johnstonii*, 7. *Staphylococcus aureus*, 8. *Sarcina lutea*, 9. *Micrococcus luteus*, 10. *Escherichia coli*, 11. *Candida tropicalis*, 12. *Saccharomyces cerevisiae*, 13. *Penicillium chrysogenum*.

Таблица 3. Оценка на *in vitro* антибактериалната и противогъбичната активност на съединения **74-81, 85-87, 95-101, 108-113, 116-118, 125-130 и 144-156** срещу условно патогенни микроорганизми.

Съед.	Микроорганизъм												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
74	15	11	NA	11	16	NA	15	NA	NA	NA	NA	NA	NA
75	18	15	16	15	15	17	18	18	15	NA	22	16	NT
76	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NT
77	NA	NA	12	12	12	NA	12	15	NA	NA	11	13	NT
78	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
79	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
80	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
81	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NT	NA	NA	NA
85	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
86	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
87	NA	11	13	12	11	13	11	13	11	NA	13	15	NA
95	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
96	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	11	NA	NA	NA
97	40 0.06	35 0.06	40 0.06	38 0.06	40 0.013	39 0.06	>40 0.06	38 0.06	38 0.3	29 1.25	>40 0.006	>40 0.006	>40 0.013
98	21	23	20	24	28	21	20	21	22	32	20	21	25
99	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	10
101	NA	NA	NA	NA	NT	NA	NA	NT	NA	NT	NA	NA	NA
108	NA	NA	13	12	14	12	NA	12	12	16	16	15	NT
109	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
110	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
111	NA	15	13	15	18	10	12	13	15	0	20	11	35
112	NA	14	NA	NA	NA	14	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
113	NA	NA	10	11	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
116	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NT	NT	NT	NA	NA
117	13	17	15	13	19	14	14	17	18	17	25	10	17
118	NA	NA	NA	NA	12	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
125	12	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
125a	13	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
126	NA	15	22	17	NA	16	12	17	17	12	17	22	20
127	11	20	NT	23	25	NT	25	NT	NT	25	21	16	10
128	NA	11	NA	NA	11	11	11	12	12	NA	10	NA	NA
129	NA	NA	10	NA	NA	NA	NA	10	NT	NA	NA	NA	NA
130	NA	10	NA	12	11	NA	15	NA	12	NA	NA	NA	NA
144	17	11	12	14	14	13	12	12	11	NA	NA	NA	12
145	10	15	11	11	13	10	10	NT	11	NA	NA	16	NA
146	10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
147	17	18	10	18	15	20	16	13	17	28	30	32	22
148	19	19	17	17	14	17	19	17	19	22	10	10	35
149	15	16	16	20	15	15	18	17	17	16	12	14	12
150	18	18	19	18	15	20	20	17	17	28	18	18	40
151	18 0.3	19 1.25	20 0.6	20 0.6	19 0.3	17 0.6	19 0.03	18 0.3	19 0.3	12	31 0.013	32 0.013	16 0.06
152	18 1.25	17 0.6	16 1.25	20 1.25	16 1.25	17 1.25	17 1.25	18	16	16 1.25	21 0.06	20 1.25	30
153	14	30	13	15	14	14	13	13	14	NA	40	35	14
154	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
155	10	12	11	16	13	13	14	13	10	20	NT	NT	20
156	12	16	NA	18	13	18	16	18	16	NA	NA	NA	12
S ^a	35 30 25	30 27 21	30 25 20	35 30 25	30 28 23	30 24 20	32 26 20	27 22 19	30 25 20	35 26 23	NT	NT	NT
G ^b	30 27	35 29	36 30	32 28	29 26	39 31	35 27	34 28	38 28	31 25	NT	NT	NT
F ^c	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	35	-	-
I ^d	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-	30	-

Диаметъра на зоната на инхибиране е дадена в милиметри. Втората стойност е най-ниската концентрация (в mg/ml), предизвикваща зони на инхибиране >11 mm. Вторите стойности са дадени само за съединения, демонстриращи активност при концентрация 1.25 mg/ml или по-малко.

NA – неактивно спрямо първия тест за зона на инхибиране (при концентрация 50 mg/ml); по-нататъшни тестове не са правени;

NT – не са тествани изобщо.

^a Зоните на инхибиране за стрептомицина (S) са получени за 3 концентрации – 25, 5 and 1 mg/ml.

^b Зоните на инхибиране за гентамицин сулфат (G) са получени за концентрации 20 и 4 mg/ml.

^c Зоните на инхибиране за флуконазол (F) са получени за концентрация 25 mg/ml.

^d Зоните на инхибиране за итраконазол (I) са получени за концентрация 12.5 mg/ml, но съединението не е напълно разтворимо в диметилсулфоксид при тази концентрация.

Синтез и противотуберкуозна активност на нови уреи, тиоуреи и ацилтиоуреи, съдържащи остатък на (*R*)-2-амино-1-бутанола (**177-189**, **194-197** и **203-207**)³⁶

Разнообразие от структурно свързани тиоуреи (*N*-арил-*N*-алкил и *N,N*-диарил заместени) са широко тествани срещу различни щамове на *Mtb*, показващи активности,^{54,94-98} понякога значително надвишаващи тази на ЕМВ. Един представителен пример е isoxyl (тиокарлид; 4,4-диизоамилоксидифенилтиоурея) - ефективно клинично използвано лекарство още от 60-те години на миналия век.^{51,52} Напоследък подкласът на ацилтиоуреите също е обект на интерес, показващ обещаваща анти-туберкуозна активност, както е обобщено от *S. Ananthan et al.*^{50,99}

Като се вземат предвид представените по-горе резултати, ние бяхме насърчени да извършим синтеза на нови серии от уреи, тиоуреи и ацилтиоуреи, включващи (*R*)-2-амино-1-бутанолов фрагмент (Схеми 9-11) и да оценим тяхната *in vitro* антимикуобактериална активност.

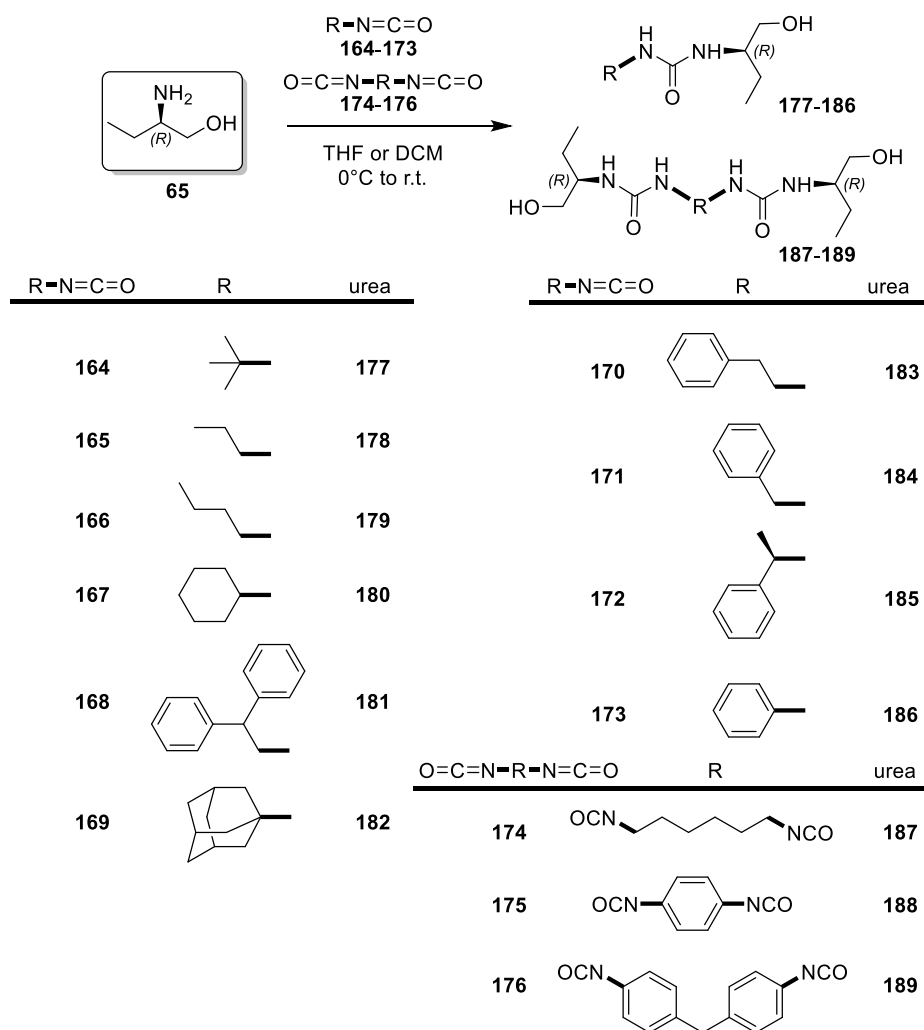


Схема 9. Синтез на съединения **177-189**.

Синтезът на съединения **177-189** се извършва чрез смесване на **65** със съответните моно- (**164-173**) и бис- (**174-176**) изоцианати в сух тетраhydroфуран (THF) или DCM като разтворител (Схема 9). Целевите уреи бяха получени с много високи добиви и отлична чистота. Получаването на **183-184**,⁵⁸ и **186**^{100,101} е описано в литературата, но като рацемични смеси и без данни за тяхната биоактивност.

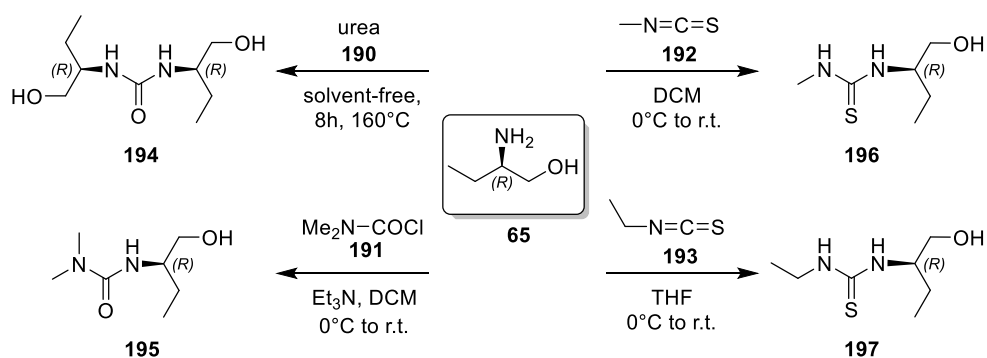


Схема 10. Синтез на съединения 194-197.

Съединението **194** се синтезира от **65** и карбамид (Схема 10), като се използва публикувана процедура без разтворители.¹⁰² Съединение **195** се получава чрез взаимодействие на **65** с **191** при стандартни условия на ацилиране (0°C и Et₃N в сух DCM). Тиоуреите **196** и **197** се получават с високи добиви по същия начин като уреите **177-189**, чрез смесване на **65** с изотиоцианати **192** и **193**, съответно (Схема 10). Синтезът на **196** е спомената по-рано в литературата.¹⁰³

Съединенията **203-207** (Схема 11) са получени чрез прилагане на наскоро публикувана процедура¹⁰⁴ - реакция на ацилхлориди **198-202** с NH₄SCN в присъствието на каталитични количества полиетиленгликол 400 (PEG-400), последвано от добавяне на **65** към реакционната смес. Добивите са умерени, но прилагането на този метод е лесно за изпълнение и удобно по отношение на пречистването на желаните продукти (просто филтриране през слой от силикагел осигурява чисти продукти).

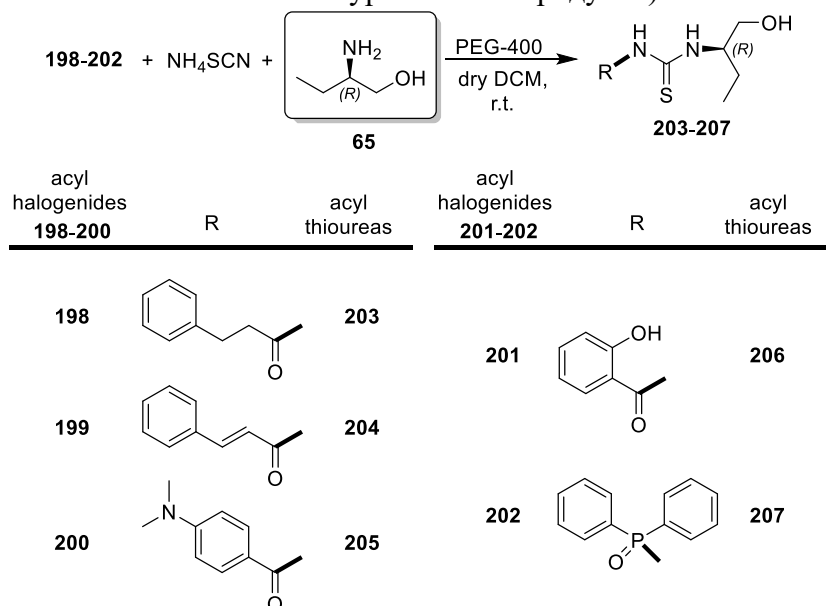


Схема 11. Синтез на съединения 203-207.

Синтезираните съединения бяха тествани за тяхната *in vitro* активност срещу *M. tuberculosis* H37Rv и MDR щам 43 (Таблица 4), използвайки метода на *Canetti*.^{85,86} Всички синтезирани съединения са в съгласие с официалното правило на *Липински*. Първите 17 производни на (*R*)-2-амино-1-бутанола - уреите **177-189**, **194-195** и тиоуреите **196-197** (Схеми 9 и 10) са неактивни дори при концентрации от 5 µg/ml (наблюдава се 100% растеж на бактериите). Единственото изключение беше съединение **181**, показващо активност, близка до тази на ЕМВ. Интересно е да се отбележи, че дори малка структурна промяна в молекулата на **109** (Схема 4)³⁵ води до липса на активност. Например, неактивните близки хомолози притежават пропил (**178**), *n*-бутил (**179**) и *t*-бутил (**177**) групи. Заместването на карбонилната група с тиокарбонил (тиокарбамиди **196-197**) води до същите последствия. Подобна негативна тенденция е наблюдавана и преди за много производни на ЕМВ.^{27,85}

Таблица 4. *In vitro* скринингови данни за антимикобактериална активност и цитотоксичност на съединения **177-189, 194-197** и **203-207**.

Съединение	Активност спрямо <i>M. tb.</i> H37Rv, МИК (µM)	Активност спрямо <i>M. tb.</i> щам 43 МИК (µM) ^a	<i>In vitro</i> цитотоксичност спрямо НЕК 293Т, IC ₅₀ (µM) ^a	Индекс на селективност, SI ^b	LogP ^c
177	>26.56	NT	NT	NT	0.46 +/-0.36
178	>28.71	NT	NT	NT	0.30 +/-0.35
179	>26.56	NT	NT	NT	0.83 +/-0.35
180	>23.33	NT	NT	NT	1.30 +/-0.35
181	4.80	NT	NT	NT	3.04 +/-0.38
182	>18.77	NT	NT	NT	2.12 +/-0.39
183	>21.16	NT	NT	NT	1.43 +/-0.36
184	>22.49	NT	NT	NT	1.01 +/-0.37
185	>21.16	NT	NT	NT	1.36 +/-0.38
186	>24.01	NT	NT	NT	1.51 +/-0.40
187	>14.43	NT	NT	NT	-0.16 +/-0.49
188	>14.76	NT	NT	NT	0.41 +/-0.56
189	>11.67	NT	NT	NT	2.80 +/-0.56
194	>24.48	NT	NT	NT	-0.51 +/-0.39
195	>31.21	NT	NT	NT	0.05 +/-0.39
196	>30.82	NT	NT	NT	-0.09 +/-0.27
197	>28.36	NT	NT	NT	0.44 +/-0.27
203	7.13	>17.83	66.2	9.3	1.75 +/-0.60
204	0.36	>17.96	42.9	119.2	2.29 +/-0.61
205	3.39	>16.92	12.8	3.8	1.73 +/-0.61
206	7.46	7.46	104.4	14.0	1.58 +/-0.62
207	5.74	11.49	179.6	31.3	1.86 +/-0.62
EMB.2HCl^d	7.22	NT	NT	NT	0.06 ^e

^a NT – не е тествано за съединения, показали слаба активност спрямо щам H37Rv; цитотоксичността и SI са тествани/пресметнати само за избрани активни съединения. ^b Индекс на селективност: SI = IC₅₀/МИК (H37Rv). ^c LogP, коефициентът на разпределение октанол-вода е пресметнат чрез програмата ACDLabs/ChemSketch 12 (www.acdlabs.com). ^d EMB.2HCl – етамбутол дихидрохлорид (референтно съединение). ^e LogP и водоразтворимостта на EMB.2HCl са познати в литературата: N.R. Budha, R.E. Lee and B. Meibohm, *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 809.

Друга серия от пет нови ацилтиоуреи **203-207** (Схема 11) е проектирана да съдържа важни фармакофорни групи (открити в нашето предишно изследване),³⁵ прикрепени към ацилтиоуреи, съдържащи (*R*)-2-амино-1-бутанол част. Съединения **203** и **205-207** показват активност срещу *M. tuberculosis* H37Rv, сравнима с тази на EMB. Производното **204** е най-активното съединение в това изследване с МИК 0.36 µM. Освен това относително ниската цитотоксичност и отличният индекс на селективност (119.2) на **204** предполагат, че то е подходяща водеща структура за по-нататъшни изследвания. Горните резултати ни окуражиха да тестваме **203-207** срещу MDR щам 43 (резистентен на рифампин и изониазид). В този случай съединения **203-205** губят своята активност (100% растеж на бактерии при концентрации 5 µM). От друга страна, **206** запазва активността си, а **207** е само 2 пъти по-малко активен.

Констатациите, че ацилтиоуреите **203-207** проявяват добра антимикобактериална активност, ни дадоха повод за по-нататъшна оценка на цитотоксичния ефект на тези съединения. Цитотоксичността беше изследвана върху НЕК 293Т клетъчна линия, използвайки МТТ-метод.¹⁰⁵ Съответните IC₅₀ стойности на тестваните съединения бяха изчислени с помощта на нелинеен регресионен анализ и обобщени в Таблица 4. Както може да се види, тестваните съединения демонстрират широк диапазон на цитотоксичност (IC₅₀ между 12.8 и 179.6 µM). Осезаема, но слаба цитотоксичност проявяват веществата **203-204**, докато съединение **205** показва засилен цитотоксичен ефект. Трябва да се отбележи, че съединението с най-мощна антитуберкуозна активност в тази серия (**204**) показва и отличен SI (119.2). Следователно съединение **204** е от особен интерес поради изключително благоприятните си характеристики – ниска цитотоксичност и значителна антимикобактериална активност, което го прави подходящо за евентуален ефикасен терапевтичен кандидат.

3.1.2. Нови производни на (-)-фенхона като обещаващи противотуберкулозни агенти

Енантиомерно чисти производни на (-)-фенхона като противотуберкулозни кандидати (съединения 218-226, 230-232, 236-238 и 241-242)¹⁰⁶

Все още очевидна е спешната нужда от мощни и ефективни противотуберкулозни лекарства с по-малко или никакви странични ефекти и по-кратки периоди на лечение. Потенциалните противотуберкулозни лекарства като диарилхинолони (бедаквилин), нитроимидазоли (деламанид, претоманид), пироли (судотерб) и диамини¹⁰⁷ са в различни етапи на клинични изпитвания или вече са одобрени.^{99,108} Включването на липофилни полициклични алифатни съединения в лекарствени структури с обещаващо противотуберкулозно приложение се радват на голямо внимание от страна на изследователите в продължение на няколко години, започвайки с откриването на полицикличен диамин SQ 109.²⁹ Проучванията на *Onajole et al.* потвърждават^{32,107} важноста на по-нататъшните изследвания на полицикличните съединения като мощни противотуберкулозни средства.

В хода на нашето изследване за нови противотуберкулозни съединения, ние демонстрирахме ролята на хиралността и разнообразието от ацилни групи, свързани с азотния атом на (*R*)-2-аминобутанола.^{35,36} Настоящото проучване¹⁰⁶ има за цел да изследва нов подклас диастереомерно чисти бициклични *N*-заместени съединения с фенханов скелет и възможността за допълнително засилване/подобряване на тяхната противотуберкулозна активност. Въз основа на това бяха синтезирани и тествани серии нови амидоалкохоли и други *N*-карбонилни производни, носещи липофилния фенханов скелет.

Исходният енантиомерно чист аминокиселина **208** (Схема 12) се получава в две стъпки от естествен (-)-фенхон, както е описано в наша по-ранна публикация.¹⁰⁹ Серия от *N*-ацилни производни (**218-226**) бе получена в добри до отлични добиви, при използване на стандартни условия за ацилиране на **208** (0°C и Et₃N в сух DCM) с търговски киселинни хлориди **209-216**. Междинно съединение **217** се получава от канелена киселина, както е описано.¹¹⁰

Амидоалкохолите **230-232** се синтезират като се използва проста аминолиза на естерите **227-229** с **208** при 90-100°C и без разтворители (Схема 13). Съединения **236-238** се получават чрез реакция на амидно свързване между **208** и киселините **233-235**, съответно, в присъствието на *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-тетраметилурониев тетрафлуороборат (ТВТУ) като активиращ агент.¹¹¹ В случая на антранилова киселина (**234**) не е необходима предварителна защита на ароматната аминокиселина, поради нейната ниска реактивност в сравнение с нуклеофилната аминокиселина на **208**. Доколкото ни е известно, няма публикувани данни относно междинното съединение **235**. То беше синтезирано в една стъпка от търговски химикали (**234** и Me₂N-SO₂Cl). Уреята **242** бе синтезирана чрез реакция между **208** и етил изоцианат (**240**) при 0°C (Схема 13). *N*-карбобензилокси (Cbz) защитеното гуанидиново производно **241** се получава в количествен добив от **208** и търговски 1,3-бис(бензилоксикарбонил)-2-метил-изотиокарбамид (**239**) съгласно аналогична процедура, описана в литературата.¹¹²

Гореспоменатите съединения бяха тествани за тяхната *in vitro* активност срещу *M. tuberculosis* H37Rv (Таблица 5), използвайки метода на *Canetti*.^{85,86} Повечето съединения са в съгласие с правилото на *Литински*, а като референти са използвани ЕМВ и аминокиселина **208**. Повечето от получените амиди (**220, 222, 224, 230-232** и **242**) съдържат фармакофорни групи, известни от нашите предишни изследвания.^{35,36} Интересно е да се отбележи, че въвеждането на различни заместители при азотния атом на **208** не влияе драматично върху активността на производните. Като цяло, съединенията в тази серия (включително **208**) показват умерено, но стабилно ниво на антимикулобактериална активност (в повечето случаи 30-70% от активността на референтния ЕМВ). Съединения **225-226** и **232** показват МИК близо до ЕМВ. Активността на сулфонамид **225** е очаквана, след като изследванията на *Malwal et al.* разкриват^{113,114} значението на 2,4-динитросулфонамидната група като *in vivo* източник на радикален серен диоксид, който е ключов агент за селективно увреждане на

бактериални биомакролекули. В този контекст е интересно да се отбележи, че активността на канеления сулфонамид **226** (МИК 6.14 μM) е сравнима с тази на **225**, въпреки че структурите са доста различни по отношение на ароматните им фрагменти. Съединение **241** е рядък пример за синтетичен противотуберкулозен агент, притежаващ в своята структура гуанидинов остатък. Този фрагмент е често срещан в антибиотици като стрептомицин, капреомицин, виомицин^{108,115} и някои синтетични полиамини.¹¹⁶

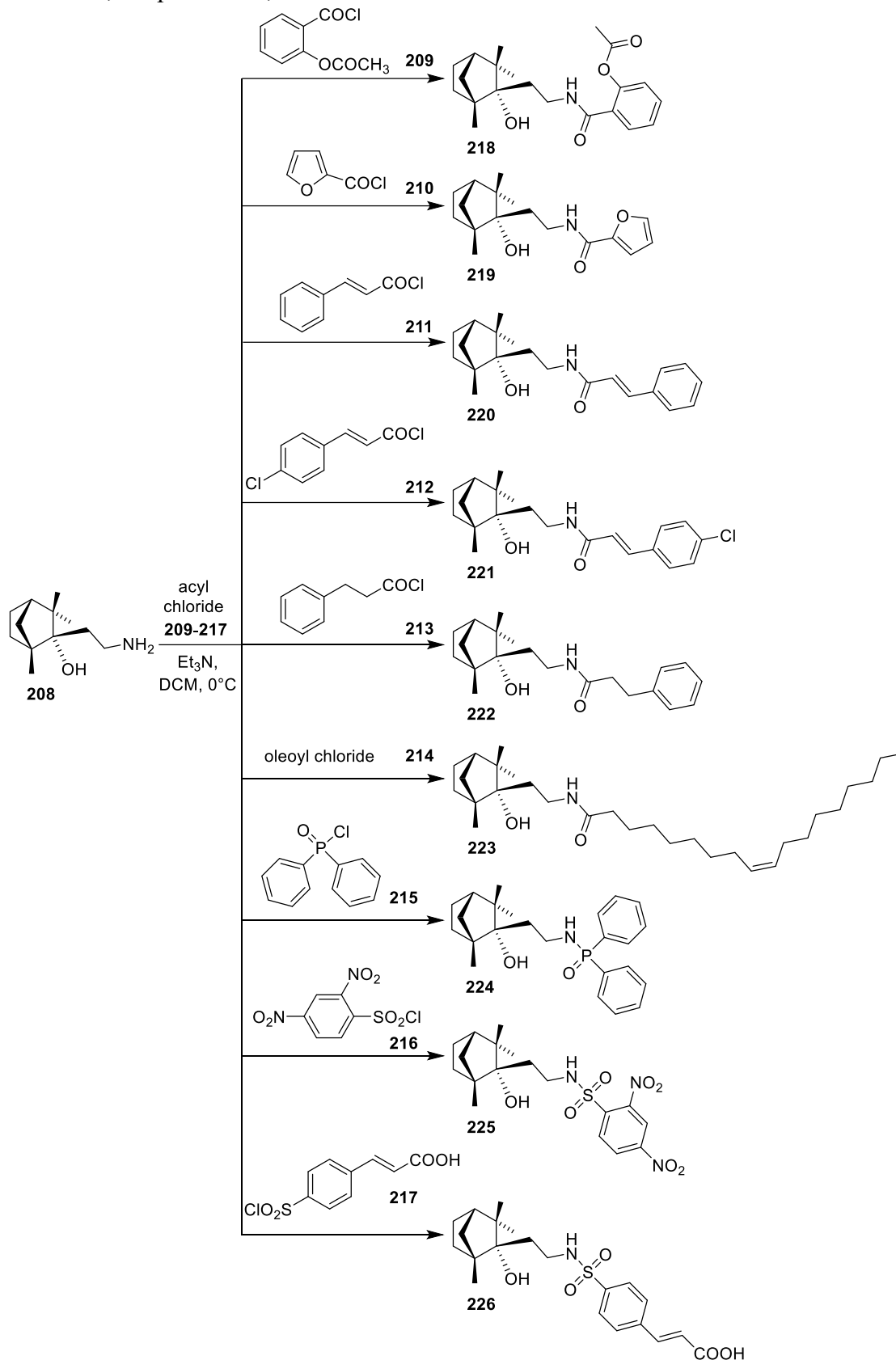


Схема 12. Синтез на съединения **218-226**.

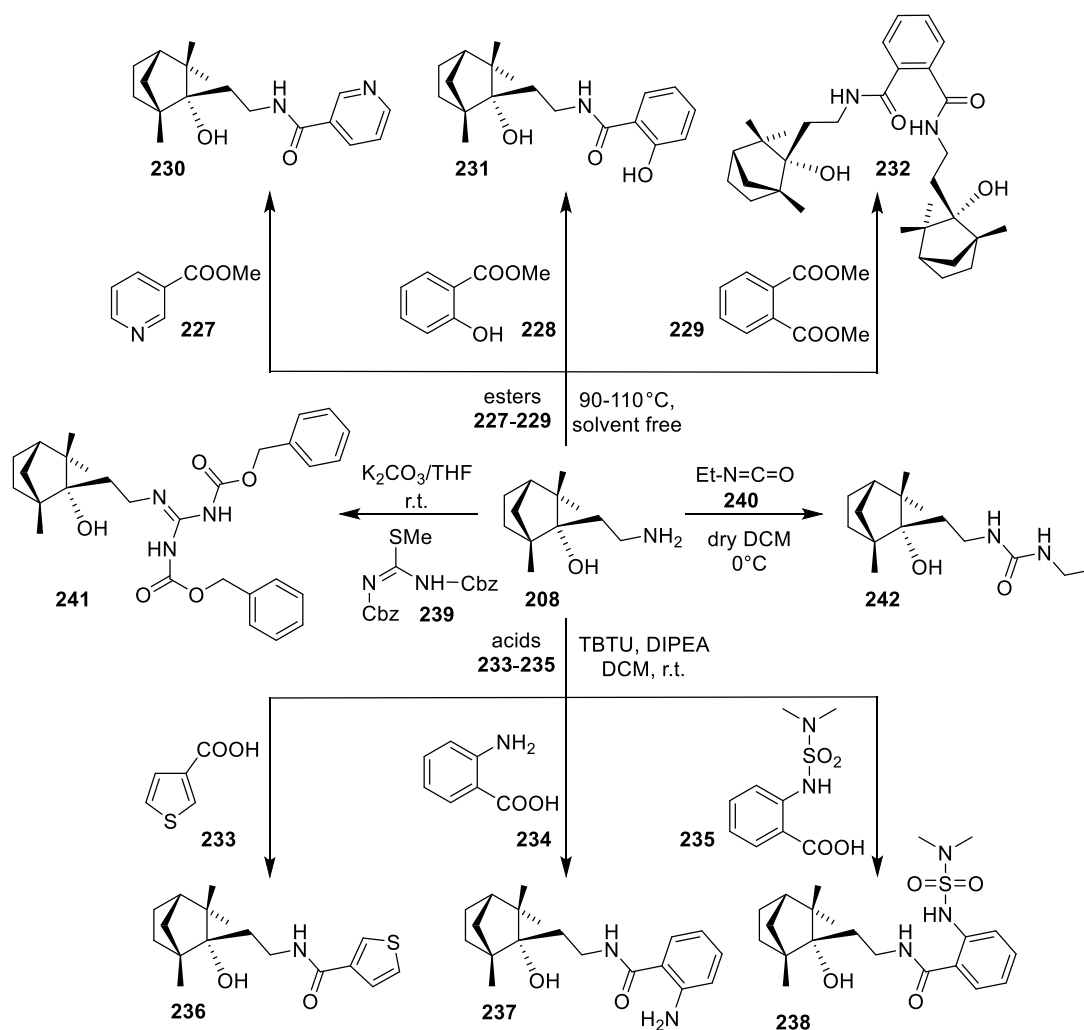


Схема 13. Синтез на съединения **230-232**, **236-238** и **241-242**.

Стабилното ниво на антимикобактериална активност ни даде повод за по-нататъшна оценка на цитотоксичния ефект на тези съединения и изчисляване на SI. Цитотоксичността на тестваните съединения беше изследвана срещу човешки ембрионални бъбречни клетъчни линии (HEK 293T) с помощта на метода МТТ.¹⁰⁵ Съответните стойности на IC₅₀ (в μM) на тестваните съединения бяха изчислени с помощта на нелинеен регресионен анализ и обобщени в Таблица 5. Както може да се види, съединенията демонстрират широк диапазон на цитотоксичност (IC₅₀ между 18.8 и 335.6). Почти всички вещества са показали приемлива ниска до умерена цитотоксичност само с четири изключения (**218**, **220**, **223** и **230**), които са показали висока цитотоксичност. Съединения **225-226** и **241** демонстрират МИК близо до ЕМВ и нисък цитотоксичен ефект. Важно е да се отбележи, че най-мощният антимикобактериален агент от тази серия - канеленият сулфонамид **226** показва добър SI (54.7) и следователно е от особен интерес като добър кандидат за ефективен терапевтичен агент.

Таблица 5. *In vitro* скринингови данни за антимикобактериална активност и цитотоксичност на съединения **218-226**, **230-232**, **236-238** и **241-242**.

Съединение	Активност спрямо <i>M. tb.</i> H ₃₇ Rv, МИК (µM)	Цитотоксичност към НЕК 293Т, IC ₅₀ (µM)	SI ^a	LogP ^b
208	15.20	42.3	2.8	2.13 +/- 0.28
218	13.92	18.9	1.4	2.80 +/- 0.40
219	10.30	62.3	6.0	2.91 +/- 0.42
220	15.27	23.8	1.6	4.24 +/- 0.38
221	22.15	72.5	3.3	4.76 +/- 0.40
222	18.22	178.6	9.8	3.86 +/- 0.42
223	13.00	21.6	1.7	9.72 +/- 0.39
224	17.62	64.8	3.7	4.36 +/- 0.60
225	7.02	97.9	13.9	3.91 +/- 0.44
226	6.14	335.6	54.7	3.96 +/- 0.45
230	19.87	18.8	0.9	2.79 +/- 0.40
231	18.92	83.9	4.4	3.99 +/- 0.46
232	11.44	106.7	9.3	4.53 +/- 0.55
236	19.52	70.3	3.6	3.42 +/- 0.49
237	18.96	81.5	4.3	3.41 +/- 0.43
238	14.17	62.1	4.4	3.14 +/- 0.68
241	14.91	121.2	8.1	2.31 +/- 0.40
242	9.85	82.4	8.4	6.16 +/- 0.65
EMB.2HCl^c	7.22	not tested	-	0.06 ^d

^a Индекс на селективност: SI = IC₅₀/МИК.

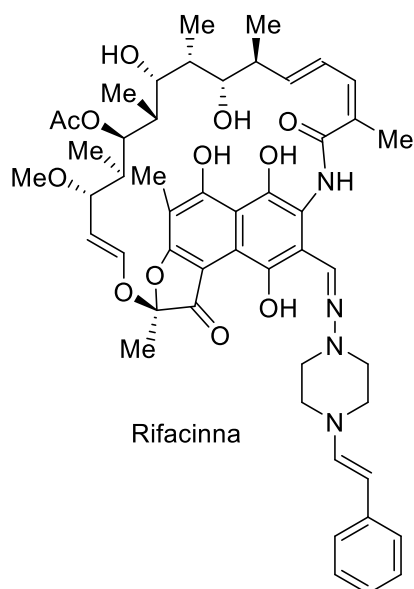
^b LogP, коефициентът на разпределение октанол-вода е пресметнат чрез програмата ACDLabs/ChemSketch 12

^c EMB.2HCl – етамбутол дихидрохлорид (референтно съединение).

^d LogP на EMB.2HCl е познат в литературата: N.R. Budha, R.E. Lee and B. Meibohm, *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 809.

Цинамамиди, производни на (-)-фенхона като противотуберкулозни средства (съединения **245-246** и **276-304**)¹¹⁷

Канелената киселина и нейните производни са били използвани в най-ранните опити за лечение на туберкулоза, още в края на 19 век.¹¹⁸⁻¹²¹ Потенциалът на тези съединения е обстойно изследван през последните 30 години. Тяхната синергична активност в комбинация с класически противотуберкулозни лекарства е добре установена.¹²² Освен това, свързването на цинамов остатък към антибиотика рифамицин води до продукт Rifacinna® (Фигура 4), който е по-активен от рифамицин срещу чувствителни *M. tuberculosis* щамове и също така показва способност за преодоляване на резистентност.¹²³ Много други естествени¹²⁴⁻¹²⁷ и синтетични^{89,90,126} продукти, съдържащи цинамоилов остатък също са доказали своята ефективност срещу *M. tuberculosis*.



Фигура 4.

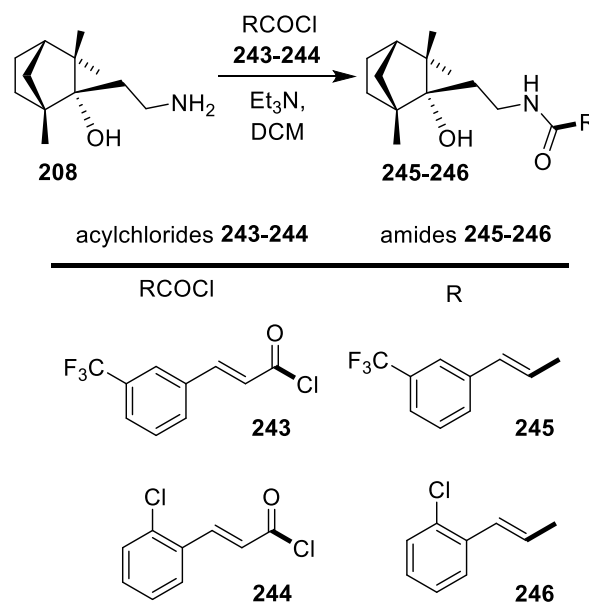


Схема 14. Синтез на съединения **245-246**.

Като цяло, въвеждането на големи липофилни фрагменти в рамките на вече доказано активна структура подобрява противотуберкулозното действие. Особено обещаващи резултати демонстрират съединения, съдържащи геранилов остатък.^{29,90,128} В някои работи^{129,130} е доказано, че съединения, включващи бицикличен монотерпенов фрагмент, също притежават значителна антимикуобактериална активност. В нашето предишно изследване¹⁰⁶ серия, базирана на незаместени цинамамиди с фенханов скелет (Схема 12 и Таблица 5), показва умерена способност да инхибира растежа на *M. tuberculosis* и някои отделни съединения дори притежават активността на класическия противотуберкулозен агент етамбутол. Изследването на нови съединения, носещи обемни липофилни полициклични фрагменти, става все по-популярно след откриването на SQ109, което показва обещаващи резултати.

Като част от нашата дейност за разработване на нови противотуберкулозни агенти, ние проектирахме серия от нови хибридни структури. Те се състоят от аналози на цинамамидите (съдържащи кондензирани, заместени арилови и хетероарилови части), свързани чрез амидна връзка към функционализирана фенханова бициклична система. Въз основа на резултатите и аргументацията, представени по-горе,¹⁰⁶ очаквахме от тези молекулярни хибриди повишена анти-туберкуозна активност. Тук докладваме синтеза на 31 нови амидоалкохоли и техния скрининг за активност срещу чувствителен към лекарства (H37Rv) щам на *M. tuberculosis*. Химията беше насочена към синтеза на структурно разнообразни съединения, състоящи се от фенханов аминокалколен остатък, свързан амидно с разнообразни заместени цинамоилови остатъци. Доколкото ни е известно, има само ограничен брой проучвания относно изследването на противотуберкулозната активност на различно заместени цинамоилови производни.^{89,90,124-127} Планираните структури са проектирани така, че да се намерят по-активни цинамамиди чрез промяна на типа и позициите на заместителите в ароматния пръстен, както и за установяване на възможни връзки структура-активност (SAR). В допълнение, фармакофорният принос на самия цинамоилов фрагмент беше оценен чрез заместване с различни групи, притежаващи структурно сходство. Във всички случаи фенхановият остатък в молекулите е постоянен и е въведен през аминокалкохол **208**, чрез използване на относително проста, но ефективна синтетична стратегия.^{106,109}

Чрез реакцията на аминокалкохол **208** с киселинните хлориди **243** и **244** са получени два целеви амидоалкохола (**245** и **246**) с много добри добиви. Приложени са стандартни условия за ацилиране на **208** (0°C и Et₃N в сух DCM, Схема 14). Синтезираните съединения се изолират в чист вид чрез колонна хроматография.

Реакцията на аминокалкохол **208** с лесно достъпни канелени киселини предлага повече възможности за получаване на структурно разнообразни серии от съединения (Схема 15). Амидоалкохолите **276-304** са получени чрез реакция на амидно свързване между **208** и канелени киселини (или техни аналози) **247-275** в присъствието на TBUTU като активиращ агент и база *N,N*-диизопропилетиламин (DIPEA). Достъпният в търговската мрежа TBUTU беше избран като един от най-ефективните и селективни свързващи реагенти в пептидния синтез.¹¹¹ Някои от киселините са получени лабораторно от нас по известни процедури (**262**,¹³¹ **268**¹³² и **272**¹³³), като добива на **262** (70%) бе значително подобрен спрямо литературния. В случая на хидрокси заместените канелени киселини **255-257** не е извършена предварителна защита на хидроксилните групи, което е причината за умерените добиви на продуктите **284-286** (34, 57 и 23 %, съответно). Другите целеви продукти бяха изолирани с високи добиви (68-96%) и в чист вид след колонна хроматография.

Повечето от синтезираните съединения (с изключение на **295-297** и **303**) са в съгласие с правилото на Липински (Таблица 6), но са практически неразтворими в дейонизирана вода при 20°C (значително по-малко от 1 mg/ml). Те бяха оценени за *in vitro* активност срещу *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Таблица 6) чрез използване на метода на Canetti.^{85,86} Като цяло, съединенията в това изследване¹¹⁷ показват умерено ниво на антимикуобактериална активност, която за повечето от тях тя варира между 30 и 70 % от тази на ЕМВ (и 80-140 %

от тази на **208**, съответно). Ароматните пръстени на цинамоиловите остатъци не оказват значително влияние върху активността. По-сериозна модификация на цинамоиловата част (тройна вместо двойна връзка; наситен вместо ароматен пръстен; допълнителен фенилов пръстен на β -позиция и т.н.) причиняват същия слаб ефект.

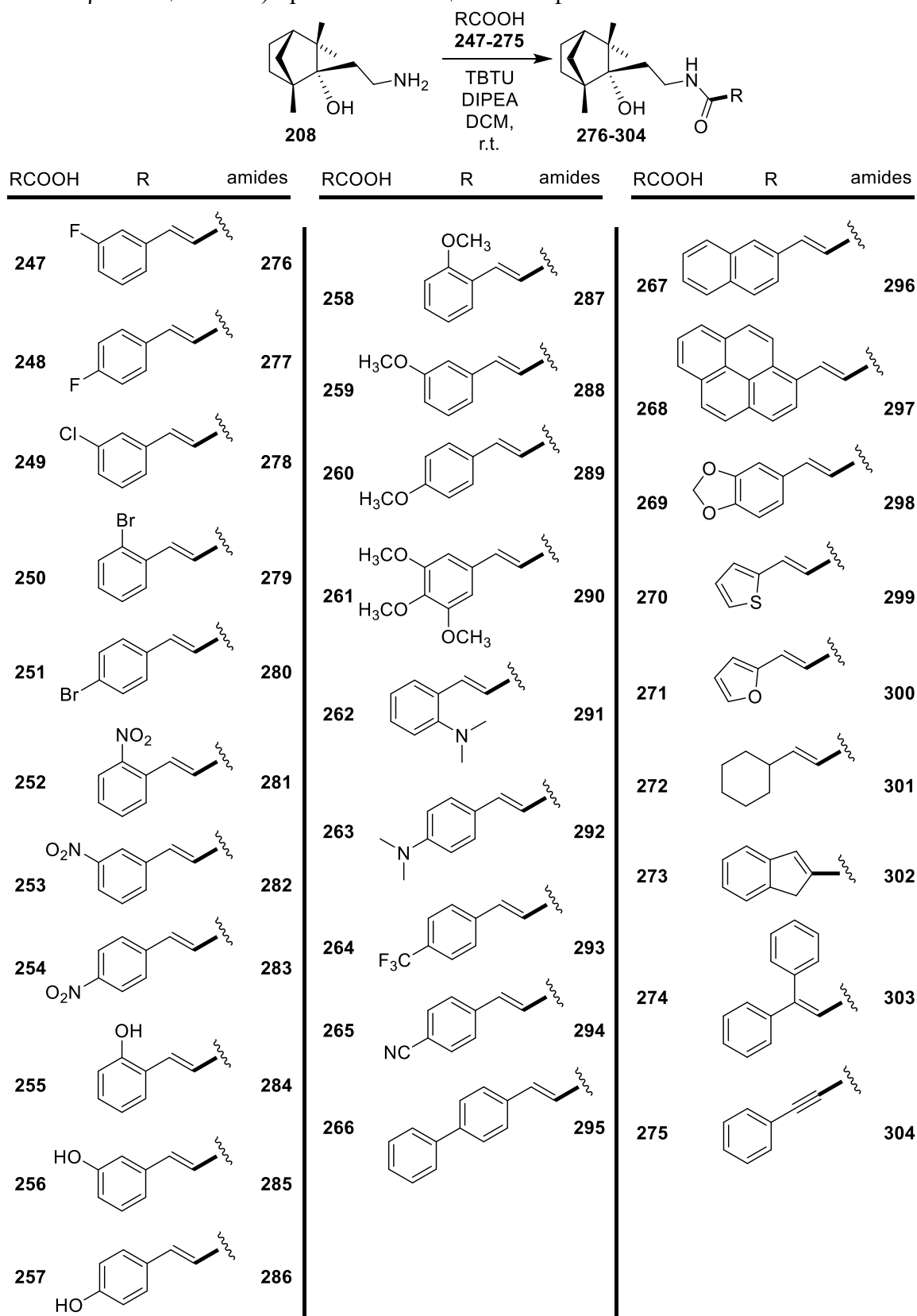


Схема 15. Синтез на съединения 276-304.

Съединенията **281**, **290**, **292** и **297-298** могат да бъдат подчертани като най-активни (до 10 пъти активността на ЕМВ). Интересното е, че най-активното от тях (**292**, МИК 0.2 µg/ml) е много по-активно от неговия орто-изомер **291** (МИК 5.0 µg/ml). Активността на три- и диалкокси производните **290** и **298**, съответно, е по-висока в сравнение със съответните монометокси аналози **287-289**. Донякъде по-добрите резултати за **297** може да се дължат на по-високата му липофилност. Според получените резултати могат да се направят някои изводи относно SAR. Модифицираният фенханов скелет (наследена от **208**) е отговорен основно за антимикубактериалната активност, докато самите цинамоилови остатъци изглежда допринасят в по-малка степен. Някои *N*- и *O*-съдържащи заместители в ароматния пръстен могат да повишат активностите (**281**, **290**, **292** и **298**). Наличието на халоген или CF₃ заместители (съединения **276-280** и **293**) не оказват забележим ефект върху активността. Аналозите на цинамамида, носещи кондензирани ароматни пръстени (**296-297**) се нуждаят от допълнително изследване.

Таблица 6. *In vitro* скринингови данни за антимикубактериална активност и цитотоксичност на синтезирани съединения **245-246** и **276-304**.

Съед.	Добив (%)	Активност към <i>M. tb.</i> H ₃₇ Rv, МИК (µg/ml)	Цитотоксичност към		LogP ^b
			НЕК 293Т, IC ₅₀ (µg/ml)	SI ^a	
245	82	7.0	NT	NT	5.10 +/- 0.59
246	71	5.0	NT	NT	4.62 +/- 0.40
276	81	5.0	NT	NT	4.36 +/- 0.49
277	84	4.5	NT	NT	4.25 +/- 0.50
278	78	5.0	NT	NT	4.85 +/- 0.40
279	80	6.0	NT	NT	5.01 +/- 0.44
280	87	>6.0	NT	NT	5.13 +/- 0.53
281	80	2.5	94.2	37.7	3.79 +/- 0.47
282	83	4.0	NT	NT	4.14 +/- 0.40
283	73	6.0	NT	NT	4.02 +/- 0.42
284	34	4.0	NT	NT	4.26 +/- 0.55
285	57	6.0	NT	NT	3.65 +/- 0.40
286	23	4.0	NT	NT	3.70 +/- 0.40
287	87	6.5	NT	NT	4.25 +/- 0.39
288	92	4.5	NT	NT	4.22 +/- 0.39
289	86	3.5	NT	NT	4.19 +/- 0.39
290	68	1.0	10.9	10.9	3.83 +/- 0.41
291	89	5.0	NT	NT	4.35 +/- 0.40
292	80	0.2	13.4	67.0	4.75 +/- 0.48
293	76	6.0	NT	NT	5.20 +/- 0.59
294	85	4.5	NT	NT	3.81 +/- 0.50
295	80	4.5	NT	NT	6.00 +/- 0.41
296	88	5.0	NT	NT	5.47 +/- 0.39
297	73	4.0	NT	NT	7.19 +/- 0.39
298	80	2.5	11.5	4.6	4.36 +/- 0.48
299	78	5.0	NT	NT	4.06 +/- 0.57
300	96	4.0	NT	NT	3.86 +/- 0.40
301	90	6.0	NT	NT	4.69 +/- 0.34
302	74	5.0	NT	NT	4.67 +/- 0.39
303	82	5.0	NT	NT	6.40 +/- 0.75
304	51	5.0	NT	NT	5.35 +/- 0.60
ЕМВ.2HCl	-	2.0	NT	NT	0.06 ^d

^a Индекс на селективност: SI = IC₅₀/МИК; NT – не е тествано/пресметнато

^b LogP, коефициентът на разпределение октанол-вода е пресметнат чрез програмата ACDLabs/ChemSketch 12.

^d LogP на ЕМВ.2HCl е познат в литературата: N.R. Budha, R.E. Lee and B. Meibohm, *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 809.

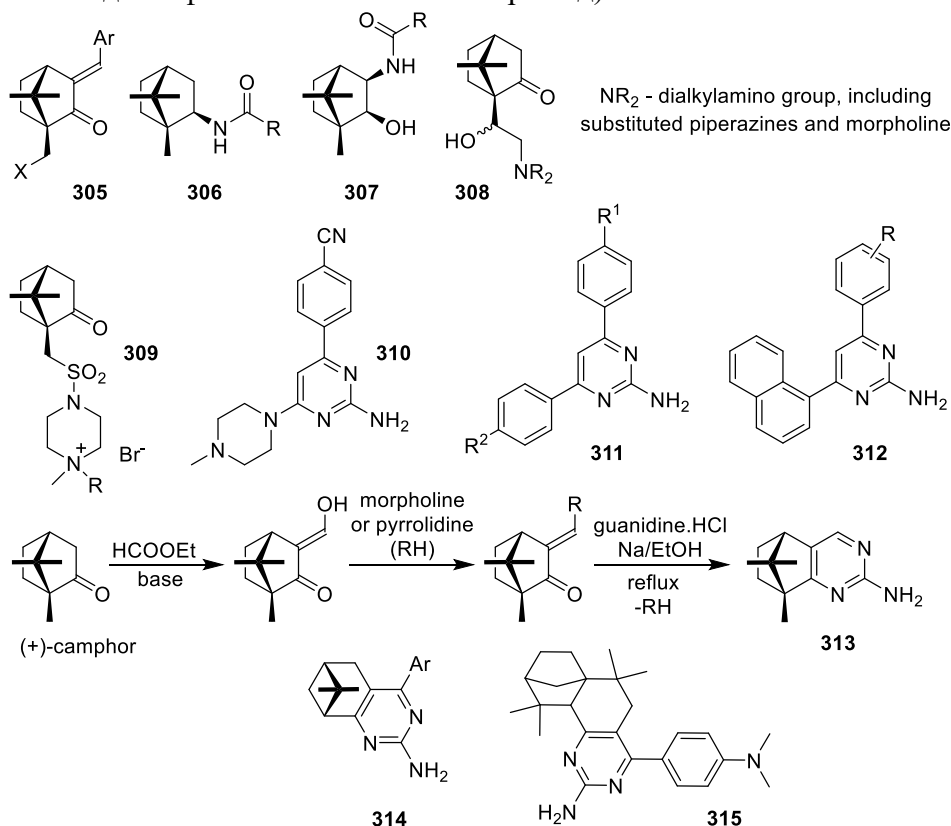
Четири от синтезираните съединения, които показват активност, по-висока от тази на ЕМВ бяха избрани за по-нататъшни изследвания. Цитотоксичната им активност бе установена върху две различни човешки ембрионални клетъчни линии от бъбрек (НЕК 293Т) и от пъпна вена/съдов ендотел (HUVЕC) (данните не са показани) чрез използване на МТТ метода.¹⁰⁵ Съответните IC₅₀ стойности от тестваните съединения са изчислени чрез нелинеен регресионен анализ. Тъй като стойностите за двете тествани клетъчни линии са

доста сходни, само тези за НЕК 293Т са обобщени в Таблица 6. Може да се види, че три (**290**, **292** и **298**) от четирите тествани съединения са показали относително висока цитотоксичност с IC_{50} в диапазон 10.9-13.4 $\mu\text{g/ml}$. Едно от тях (**292**) обаче показва висок индекс на селективност (SI 67) поради стойността на МИК (10 пъти по-висока активност от тази на ЕМВ), което го прави обещаваща водеща структура за по-нататъшно оптимизиране. Последното от тестваните съединения (**281**) демонстрира МИК, подобен на ЕМВ и много нисък цитотоксичен ефект от 94.2 $\mu\text{g/ml}$, което също води до умерен индекс на селективност (SI 37.7). Следователно и тази структура може да се използва за по-нататъшна оптимизация чрез синтетични вариации.

3.1.3. Антибактериална и противотуберкулозна активност на нови арилметилен кетони и пиримидини с камфанов скелет¹³⁴

Аналозите на камфора (подобно на други монотерпени като цяло) демонстрират различни биологични активности, включително антивирусни, антимикробни и антиконвулсивни свойства. Известно е, че въвеждането на такъв тип скелети в различни съединения чрез структурни модификации значително влияе върху тяхната биологична активност. Някои изследвания прилагат тази стратегия, за да подобрят ефективността на техните биоактивни съединения.¹³⁵

Напоследък няколко изследвания разкриват антибактериална и противотуберкулозна активност на производни на камфора.^{129,130,136,137} Синтезирани са серии ацилирани амини с камфанов скелет (Фигура 5, съединения от типа на **306** и **307**). В зависимост от ацилните заместители, тези съединения демонстрират умерена до висока *in vitro* антитуберкулозна активност. Активността на диастереомерно чистите камфорови аминокалкохоли (съединения **308**) силно зависи от наличието на шестчленни хетероциклични заместители в техните молекули.¹³⁶ Някои кватернерни соли на камфор сулфонамиди (съединения **309**) показват значителна антибактериална и противогъбична активност (до 100 пъти по-висока от конвенционалния дезинфектант бензалкониев бромид).¹³⁸



Фигура 5. Производни на камфора и 2-аминопиримидина с изразена биоактивност.

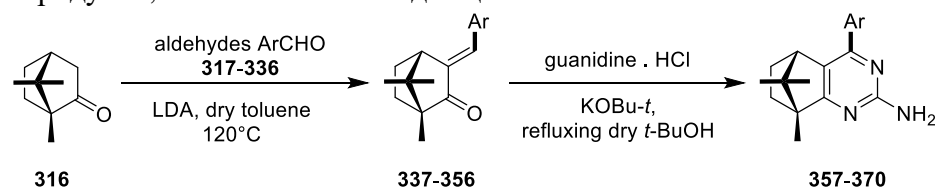
Сред всички хетероциклични съединения, пиримидините са от първостепенно значение. Те проявяват широк спектър от биологични активности, главно поради присъствието си в базите на дезоксирибонуклеиновата киселина. Пиримидиновия остатък има широк терапевтичен профил, тъй като е жизненоважен компонент на много природни съединения и химиотерапевтични лекарства.^{139,140} По-специално, различни заместени 2-аминопиримидини са синтезирани и изглежда, че са биоактивни по няколко различни начина.¹⁴¹ Например, някои арил заместени 2-аминопиримидините (Фигура 5, съединение **310**) са идентифицирани като обещаващи хистамин H₄ антагонисти.¹⁴² Показано е, че H₄ рецепторът (H₄R) присъства в клетките на хематопоетичната линия. Има все повече доказателства, базирани на животински модели, в които H₄R играе роля в имунните и възпалителните реакции¹⁴³ и също така модулира реакциите на сърбеж. По този начин се предполага, че агенти, които взаимодействат с H₄R, са полезни при лечението на състояния като астма, ревматоиден артрит и пруритус.¹⁴⁴

Някои 2-аминопиримидинови производни са изследвани за антагонистична активност на аденозин А₃. Няколко проучвания показват, че рецепторите на аденозин А₃ играят важна роля при патологии, като астматични и възпалителни синдроми. Установено е, че агонистите на аденозин А₃ рецептор причиняват бронхоконстрикция и насърчават освобождаването на възпалителни медиатори от мастоцитите, докато селективните антагонисти на човешкия А₃ рецептор могат да служат като антиастматични и противовъзпалителни средства.¹⁴⁶

Арил-заместените 2-аминопиримидини проявяват значителна антиоксидантна активност. Установено е, че тези съединения са активни при улавяне на водороден пероксид, азотно-оксиден радикал, и инхибиране на липидната пероксидация (съединения от тип **311**).¹⁴⁷ Както антимикуробната, така и противогъбичната активност са доказани за 2-аминопиримидинови производни (съединения от тип **312**).¹⁴⁸ Много други изследвания разкриват антимикуробните свойства на 2-аминопиримидините.¹⁴⁹⁻¹⁵² Доколкото ни е известно, съществуват няколко примера за биоактивни съединения, които комбинират монотерпенови и 2-аминопиримидинови фрагменти. Серия от подобни хетероциклични съединения, получени от камфор (напр. съединение **313**), демонстрира силно стимулиране на централната нервна система.¹⁵³ Серия от пинанил-2-амино пиримидини (съединения **314**) са тествани за антибактериална и противогъбична активност,¹⁵⁴ обаче получените резултати не са били особено обещаващи. Съединение **315** е синтезирано от изолонгифоланон в два етапа и са изследвани неговите флуоресцентни свойства.¹⁵⁵

В светлината на гореспоменатото, в нашето изследване¹³⁴ се фокусирахме върху синтеза на нови камфорови производни, притежаващи пиримидинови и арилиденови фрагменти. Проектирахме молекулите, носещи такава комбинация от фрагменти в две серии, в очакване да проявят антибактериална (и по-специално, противотуберкулозна) активност. Първият етап от нашата синтетична стратегия се основава на трансформацията на леснодостъпен енантиомерно чист (+)-камфор (**316**) в серия от спрегнати кетони **337-356** (Схема 16). Реакциите се провеждат чрез нагриване на обратен хладник в сух толуен (в инертна атмосфера), като се използва литиев диизопрпиламид (LDA) като база (Схема 1) и алдехидите **317-336** като реагенти. Някои от алдехидите не са търговски продукти, поради което бяха синтезирани лабораторно. По този начин, диалдехид **322** беше синтезиран от фероцен.¹⁵⁶ Алдехидите **323**,¹⁵⁷ **324**,¹⁵⁸ **325**,¹⁵⁹ **326**,¹⁶⁰ **327**,¹⁶¹ **328**,¹⁶² **330**,¹⁶³ и **324**¹⁶⁴ бяха лесно получени от 4-хидроксibenзалдехид, съгласно цитираните синтетични протоколи. В литературата липсва информация за получаването на алдехиди **329** и **335**, и за тях ние разработихме наши собствени методи. Останалите алдехиди (**317-321** и **331-333**) са използвани като търговски продукти. Образуването и характеризирането на някои целеви кетони (**337-338**, **341-342**) е описано в литературата, в различни изследвания, които не са свързани директно с настоящата тематика: *Grošelj et al.*¹⁶⁵ (за **337**), *Nevalainen et al.*¹⁶⁶ (за **338**), *Salisova et al.*¹⁶⁷ (за **341**), *Kamenova-Nacheva et al.*¹⁶⁸ (за **342**). Кетоните **339** и **343** са споменати в някои ранни патенти или публикации преди 50-те години на миналия век.

Въпреки това надеждни данни за тяхното получаване и характеризиране не са достъпни. Затова, в рамките на това изследване¹³⁴ ние разглеждаме тези съединения като нови и ги описваме подробно. Кетоните **337-356** бяха изолирани само като чисти *E*-изомери след пречистване. *Z*-изомерите не са наблюдавани дори чрез тънкослойна хроматография (TLC) на суровите продукти, и това не е изненадващо.¹⁶⁸



Ar	aldehydes 317-336	ketones 337-356	pyrimidines 357-370	Ar	aldehydes 317-336	ketones 337-356	pyrimidines 357-370
	317	337	357		328	348	-
	318	338	358		329	349	-
	319	339	359		330	350	365
	320	340	360		331	351	366
	321	341	361		332	352	-
	322	342	-		333	353	367
	323	343	362		334	354	368
	324	344	363		335	355	369
	325	345	364		336	356	370
	326	346	-				
	327	347	-				

Схема 16. Синтез на съединения **337-370**.

След това, повечето от кетоните **337-356** бяха превърнати в един следващ етап до съответните арил заместени 2-аминопиримидини **357-370**, чрез кондензация с излишък от гуанидин хидрохлорид и калиев *tert*-бутоксид (*t*-BuOK) при кипене на въздуха под обратен хладник в *tert*-бутанол (*t*-BuOH). Всъщност ние подобрихме прилагането на методологията, разработена от *Nagai et al.*¹⁵³ (Фигура 5, съединение **313**), чрез използване на по-силна база. В нашия случай процесът на циклизация и ароматизация се осъществява без напускащи групи от страна на арилиден кетоните (Схема 16). Това не е изненадващо, тъй като ароматните заместители в арилиден кетоните нямат свойствата на напускащи групи (за разлика от пиридина и морфолина в процедурата за синтез на съединение **313**). Освен това, оригиналната процедура изисква три стъпки (започвайки от (+)-камфор), но само един незаместен камфор 2-аминопиримидин (**313**) е възможният продукт. Други примери на заместени 2-аминопиримидини също са синтезирани по подобна методология от *Wu et al.* и *Wang et al.*,^{154,155} обаче те са далеч по-малко пространствено запречени (Фигура 5, съединения **314** и **315**). Така, открихме прост двуетапен метод за получаване на силно пространствено запречени 2-аминопиримидини с камфорови скелети, притежаващи различни заместители в пиримидиновия пръстен.

Всички съединения **337-356** и **357-370** бяха получени с добри до отлични добиви след пречистване чрез колонна хроматография и характеризирани с помощта на 1D/2D ЯМР, мас-спектрометрия, температури на топене и елементарен анализ. В допълнение, беше извършен рентгено-структурен анализ на единични кристали за съединения **349**, **355** и **368** (Фигура 6). Нашите опити да преобразуваме кетони **342**, **346**, **347-349** и **352** в съответните им 2-аминопиримидини бяха неуспешни. Във всички случаи е наблюдавана сложна и неразделима смес от продукти. За да се докаже синтетичната концепция за по-нататъшно възможно превръщане на съединения **357-370** в техните *N*-ацилни производни, ацилираният аминокетон **371** беше успешно получен от **358** (Схема 17). Важно е да се отбележи, че във всички реакции конфигурацията на камфановия скелет е непроменена. По този начин се осигурява енантиомерната чистота на целевите съединения (потвърдено с рентгено-структурния анализ).

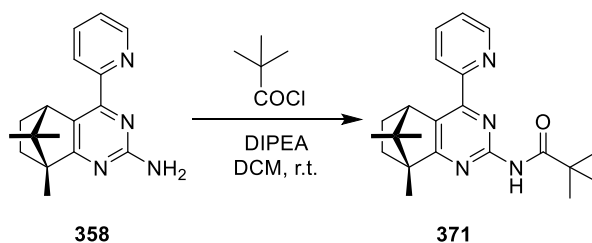


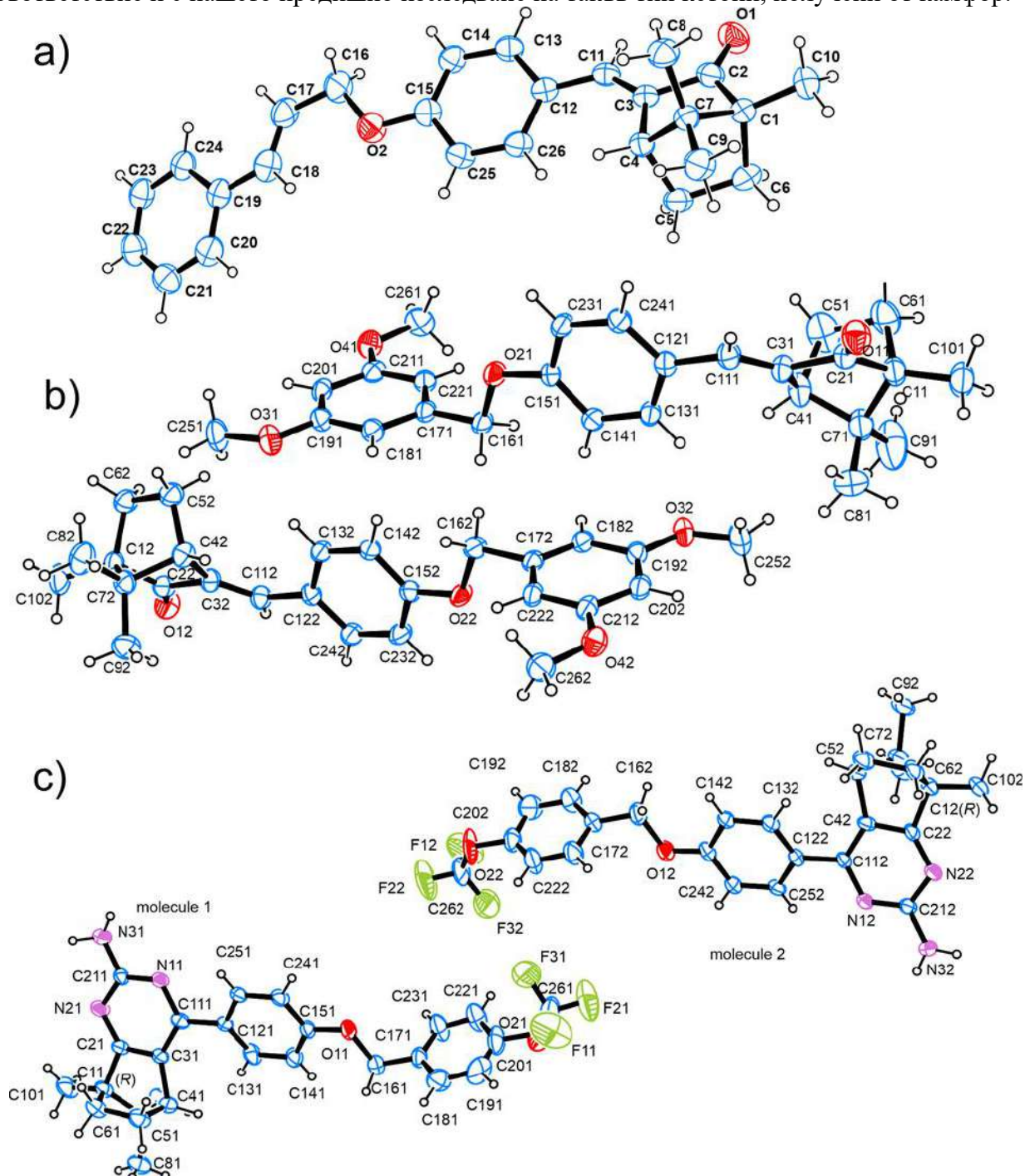
Схема 17. Синтез на съединения **371**.

Съединения **349**, **355** и **368** бяха избрани като представителни и подходящи за рентгеноструктурен анализ. Подходящи монокристали от **349**, **355** и **368** бяха разположени върху найлонови примки. Координатите и интензитетите на дифракционните пикове бяха измерени при стайна температура на дифрактометър Agilent SupernovaDual, оборудван с Atlas CCD детектор, използвайки микрофокусно MoK α лъчение ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). Събирането и обработката на данни за всички съединения беше извършено с помощта на CrysAlisPro,¹⁶⁹ беше приложен метод за корекция на абсорбцията с многократно сканиране. Структурите бяха решени чрез присъщо фазиране и прецизирани чрез метода на най-малките квадрати с пълна матрица на F2 с програми ShelxT и ShelxL,¹⁷⁰ използващи Olex2 GUI.¹⁷¹ Неводородните атоми бяха локализирани успешно от картата на Фурие и бяха прецизирани анизотропно. Водородните атоми, свързани с азот бяха локализирани от разликата в картата на Фурие, докато всички останали водородни атоми бяха поставени на изчислени позиции и модел на езда $U_{iso}(H) = 1.2U_{eq}$ (C или N). Изображения на молекулите, изградени чрез програмата ORTEP¹⁷² на съединения **349**, **355** и **368**, са показани на Фигура 6.

Съединения **349**, **355** и **368** кристализират по нецентросиметричен начин съответно в моноклинните пространствени групи P2₁, P2 и триклинните P1 (Фигура 6). Усъвършенстването на структурите показва очакваната конфигурация на камфановия скелет

(5*S*,8*R*), тъй като този скелет остава непроменен в хода на реакциите. Наистина, от структурна гледна точка наслагването на молекулите, базирани на камфановия фрагмент, разкрива запазена геометрия. Въпреки че дължините на връзката и ъглите на връзката на молекулите са сравними, някои вариации се откриват дори между химически идентични молекули, образуващи асиметричната единица (съединения **355** и **368**). Вариациите са свързани главно с въртенето на ароматните пръстени, напр. идентифицира се наличието на ротамери.

Рентгено-структурния анализ за **349** и **355** недвусмислено потвърждава, че конфигурацията на кетоните **337-356** по отношение на двойните връзки винаги е *E*. Това е в съответствие и с нашето предишно изследване на такъв тип кетони, получени от камфор.¹⁶⁸



Фигура 6. Изглед на молекулярната структура, получен чрез монокристален рентгенов анализ и схема за номериране на атоми на съединения **a) 349**, **b) 355** and **c) 368**; елипсоидите на изместване са изобразени с ниво на вероятност от 50% (водородните атоми са представени с кръгове с произволни радиуси).

Оценка на антибактериалната активност и цитотоксичността на съединения 337-371

Антибактериалната активност и цитотоксичността на синтезираните съединения 337-371 са тествани *in vitro* (Таблица 7). Използван е референтен щам *M. tuberculosis* H37Rv чрез микроразреждане на бульон в Middlebrook 7H9 (микобактериална културална среда) съгласно указанията на EUCAST.¹⁷³ Четири съединения измежду тестваните могат да се считат за *in vitro* активни, а именно 344, 349, 350 и 354. Те проявяват активност подобна на изониазида, като 354 дори го превъзхожда. Доколкото ни е известно, в литературата няма докладвани аналози на тези съединения с противотуберкуозна активност. Затова всякакви предположения за възможен механизъм на действие са доста спекулативни. Интересно е, че съединение 354 притежава 4-трифлуорометоксибензилов остатък, точно както добре известното противотуберкуозно лекарство претоманид (понастоящем в клинична употреба).¹⁷⁴ Всички 2-аминопиримидинови производни (357-371) са напълно неактивни срещу туберкулоза (включително 368, който съдържа същия остатък). Може да се заключи, че този тип 2-аминопиримидини не са подходящи за противотуберкуозни средства.

Таблица 7. МИК стойности за съед. 337-371 срещу *M. tb.* H37Rv.

№	Съед.	<i>In vitro</i> активност към <i>M. tb.</i> H37Rv, МИК (µM)	Изчислено LogP
1	337	>200	4.19
2	338	>200	3.28
3	339	>88	3.97
4	340	76	3.81
5	341	144	- ^c
6	342	>100	- ^c
7	343	>160	5.31
8	344	9.18	6.14
9	345	>120	8.65
10	346	76	4.06
11	347	71	4.38
12	348	68	3.67
13	349	4.19	6.31
14	350	8.23	5.73
15	351	>145	4.88
16	352	72	4.46
17	353	16.60	5.67
18	354	0.91	7.32
19	355	>120	5.54
20	356	>100	7.64
21	357	89	4.65
22	358	>90	3.74
23	359	>75	4.43
24	360	135	4.28
25	361	65	- ^c
26	362	71	5.77
27	363	66	6.60
28	364	>100	9.11
29	365	>120	6.19
30	366	NT ^b	5.35
31	367	30	6.13
32	368	>50	7.79
33	369	14	6.01
34	370	96	8.10
35	371	>70	5.38
36	INH ^a	1.47	0.69

^a INH – изониазид.

^b NT – не е тествано.

^c logP не е изчисляван за съединения 341, 342 и 361 заради софтуерни ограничения.

Таблица 8. МИК стойности за съединение 350 срещу резистентен щам *M. tb.* (изолат от Русия)^a

Щам ID	Подтип <i>M. tb.</i> Beijing genotype	Произх. на щам	Тип ^b	Профил на резист. ^c	МИК (µM)
20	Central Asian Russian clade	Мурманск	PR	HE	>260
98	Ancient sublineage, 1071-32-cluster	Коми	XDR	SHEKROfl	8.23
228	B0/W148-cluster	Коми	MDR	HR	8.23
336	CAO-cluster	Коми	PR	SH	>260
575	Central Asian Russian clade	Вологда	MDR	SHREPR	>260
1702	CAO-cluster	Вологда	PR	SH	>260
2321M	Central Asian Russian clade	Мурманск	MDR	HRE	>260
3135	B0/W148-cluster	Вологда	PR	SHE	>260
4179	B0/W148-cluster	Вологда	MDR	HRE	>260
6665	B0/W148-cluster	Мурманск	MDR	HRE	8.23
7069	B0/W148-cluster	Мурманск	MDR	HRE	8.23

^a МИК за референта INH е >15 µM за всички щамове и не е даден в таблицата.

^b Тип на резистентност: PR – полирезистентен; XDR – крътосано резистентен; MDR – резистентност към множество лекарства.

^c Стрептомицин (S), изониазид (H), рифампин (R), офлоксацин (OfI), канамицин (K), етамбутол (E) и пиразинамид (P).

МИК за гореспоменатите активни съединения също беше определена за 11 клинични изолати на *M. tuberculosis* чрез използване на REMA метод за анализ¹⁷⁵ в референтната лаборатория в Изследователския институт по фтизиопулмология в Санкт Петербург (Таблица 8). По-скоро умерена, но устойчива активност показва само съединение **350** - то запазва своята активност (8.23 µM) спрямо четири от щамовете. Клиничните изолати са с различни генотипове от пациенти с туберкулоза в Северозападна Русия. Клиничните изолати представляват различни клъстери в рамките на клинично/епидемиологично значимия генотип Beijing (B0/W148, централноазиатски руски, централноазиатско огнище, древна подлиния).¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ Изолатите се различават по фенотипна лекарствена резистентност (един екстензивно лекарствено резистентен, шест мултилекарствено устойчиви, четири полирезистентни). По този начин, съединение **350** показва широк диапазон на МИК, който варира от 8.23 µM до >260 µM. Това подчертава ключовото значение на тестването на нови противотуберкулозни съединения не само с референтен лабораторен щам H37Rv, който принадлежи към филогенетично маргиналният клон на *M. tuberculosis*, но и върху панели от различни клинични резистентни изолати, циркулиращи в страните с високо разпространение на MDR-TB, каквато е Русия.

Таблица 9. *In vitro* стойности на МИК за съединения **337-371** срещу избрани бактериални и гъбични щамове.

Съед.	МИК (µM)				
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>MRSA</i>	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i> 562
337	133	266	133	266	266
338	133	265	66	133	133
339	28	56	28	16	225
340	12	24	6	12	48
341	46	92	92	92	184
342	7.8	31	31	63	63
343	102	102	51	102	205
344	94	94	188	94	188
345	2.35	9.42	4.71	18.80	38
346	6.11	12.21	12.21	6.11	49
347	1.41	5.66	2.83	22.63	91
348	1.35	5.41	5.41	21.65	43
349	21	42	21	86	42
350	10.60	21.30	21.30	43	85
351	11.51	23	23	46	5.76
352	2.88	5.76	2.88	11.52	46
353	42	85	42	85	85
354	19	37	19	19	74
355	4.92	9.84	9.84	20	20
356	8.29	33	16.58	16.58	1.04
357	7.16	14.32	14.32	7.16	1.79
358	3.57	7.13	14.27	14.27	28
359	0.77	1.55	1.55	12.37	25
360	2.71	2.71	1.35	5.42	2.71
361	21	84	84	42	2.58
362	46	92	46	92	92
363	0.66	2.63	5.27	10.54	42
364	8.63	17.25	17.25	35	4.31
365	0.60	2.40	2.40	9.60	38
366	21	42	42	84	42
367	4.81	9.62	9.62	38	4.81
368	34	68	68	34	68
369	18	36	18	72	4.49
370	7.67	15.34	15.34	7.67	31
371	5.49	11	11	22	44
G^a	0.52	1.04	1.04	2.08	NT ^c
AB^b	NT ^c	NT ^c	NT ^c	NT ^c	0.54

^a G – гентамицин (референт). ^b AB - амфотерицин В (референт). ^c NT – не е тествано.

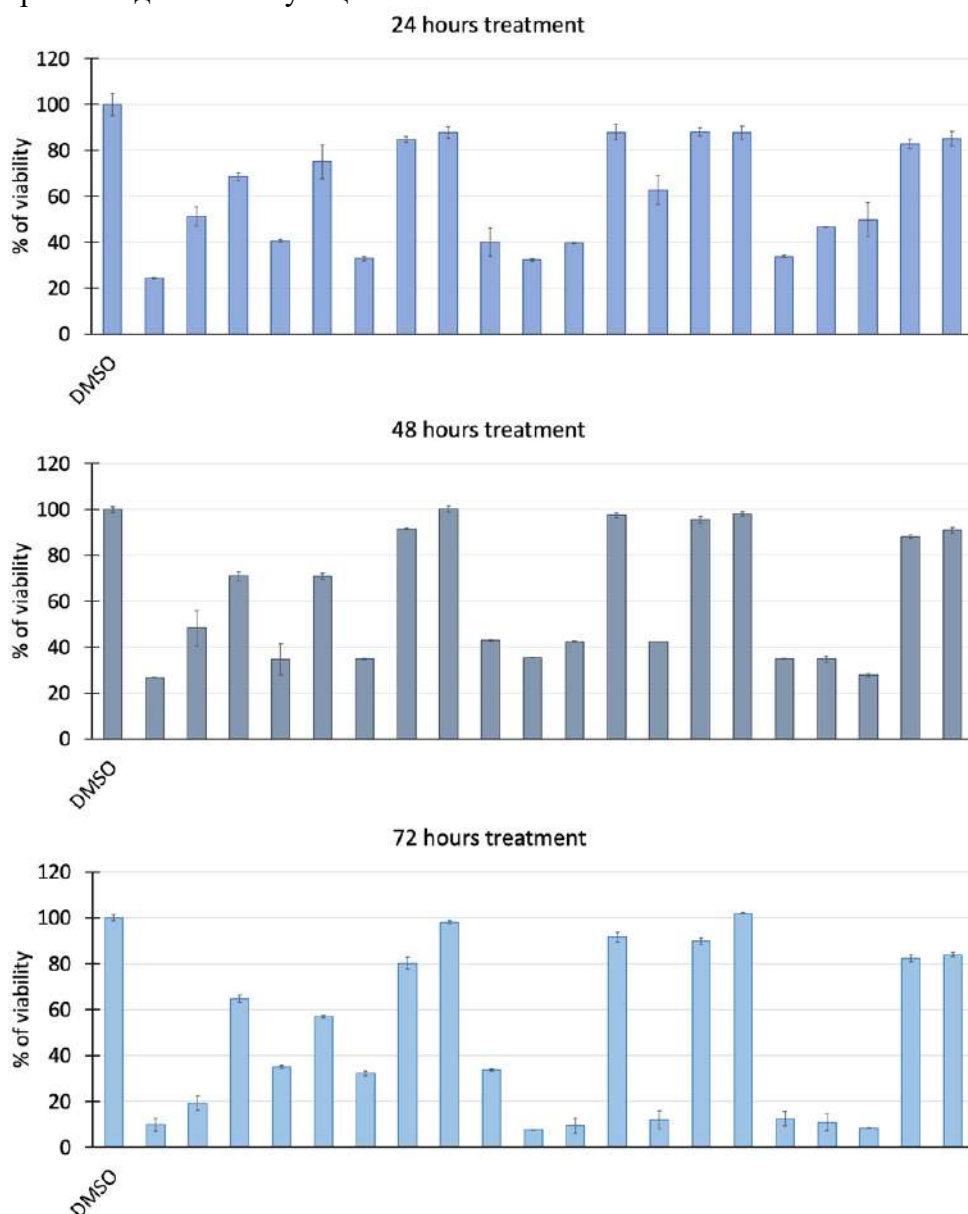
In vitro антимикуробната активност на всички синтезирани съединения от тази серия е тествана срещу *Staphylococcus aureus*, метицилин-резистентен *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*, чрез определяне на тяхната МИК (Таблица 9). Получените резултати са доста обещаващи. Много от съединенията (особено сред 2-аминопиридините **357-371**) показват добра активност срещу различни шамове бактерии и гъбички в сравнение с референтните антибиотици (гентамицин и амфотерицин В). Съединение **360** може да се очертае като широкоспектърен антибиотик, активен срещу всички изследвани бактерии и гъбички, със стойности на МИК, сравними с тези на гентамицина. Други съединения от серията демонстрират различна селективност срещу отделни бактерии. Съединенията **345, 347, 348, 352, 355, 363** и **365** са подчертано активни срещу *Staphylococcus aureus*, но 2-3 пъти по-малко активни срещу MRSA. Въпреки това, **359** е най-активният срещу MRSA в тази серия (подобно на гентамицин). Забележителна противогъбична активност демонстрират **356, 357** и **361**. Само съединения **347** и **365** притежават подчертана активност срещу *Escherichia coli*. Нелоша активност срещу *Pseudomonas aeruginosa* показват **346, 357, 360** и **370** (2-4 пъти по-слаба активност от гентамицин).

За да проучим терапевтичния прозорец за бъдещи приложения на тези съединения като антимикуробни/противотуберкулозни терапевтици, първоначално анализирахме възможния цитотоксичен ефект за повечето от синтезираните съединения върху жизнеспособността на човешки първични фибробластни клетки при различни периоди на третиране (24, 48 и 72 h). Съединения **337, 338, 340, 342, 346, 347, 348, 361, 364** и **365** показват значителна цитотоксична активност при 24-часово лечение, която се увеличава още при по-дълъг период на третиране (Фигура 7). Това вероятно се дължи на по-високата тествана концентрация (100 µM). Същото заключение може да се направи за **352, 361** и **365**, тъй като те демонстрират висока цитотоксичност при 72-часово лечение. Като цяло 2-аминопиридините с камфанови скелети (**357-371**) могат да бъдат очертани като по-малко токсични в сравнение с кетоните **337-356**. Имайки предвид нашите предишни изследвания, заслужава да се отбележи, че арилиден камфаните са склонни да проявяват повишена цитотоксичност, но това много зависи от естеството на арилиденовия остатък.¹⁶⁸ Следователно, само съединения **355** и **370** от това изследване могат да се считат за достатъчно безопасни за по-нататъшно приложение като антимикуробни агенти (Таблица 9), тъй като запазват ниската си цитотоксичност дори при продължително третиране (72 часа). Други активни съединения в Таблица 9 се нуждаят от допълнително изясняване на тяхната цитотоксичност и терапевтични прозорци.

Освен това, ние определихме *in vitro* клетъчната жизнеспособност на други видове ракови и нетрансформирани клетки към избрани 3 най-активни съединения срещу *M. tuberculosis* H37Rv, а именно съединения **344, 349** и **354** (Фигура 8). Измерихме клетъчната жизнеспособност с помощта на колориметричен МТТ-тест.¹⁷⁹ Съединението 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид (известно като МТТ) показва активността на клетъчните ензими, които редуцират МТТ до формазан (който е с лилав цвят). МТТ анализът всъщност измерва митохондриалната метаболитна активност чрез NAD(P)H-зависими клетъчни оксидоредуктазни ензими и пропорционално отразява броя на жизнеспособните клетки. Използвахме седем различни човешки клетъчни линии, включително ракови и неракови. Клетките HeLa са получени от рак на маточната шийка, HepG2 (ATCC® HB-8065™) са клетки, получени от рак на черния дроб, MIA PaCa-2 (ATCC® CRL-1420™) е клетъчна линия от човешки рак на панкреаса, KMST е нетуморогенен обезсмъртен човешки фибробласт, WA13 са човешки ембрионални Wisconsin-Madison стволони клетки, HEK293 са човешки ембрионални бъбречни клетки и WI-38 са диплоидни човешки фибробласти, получени от белодробна тъкан на женски плод. Клетките се посяват в 96-ямкови плаки и се излагат на четири различни концентрации на три различни съединения за 72 часа. Както е показано на Фигура 7, изследваните съединения не показват никаква или само много лека цитотоксичност, независимо от раковите свойства

на анализираниите човешки клетъчни линии, което показва, че цитотоксичността на тези съединения е ниска и използването им като противотуберкулозни лекарства може да осигури значителен терапевтичен прозорец.

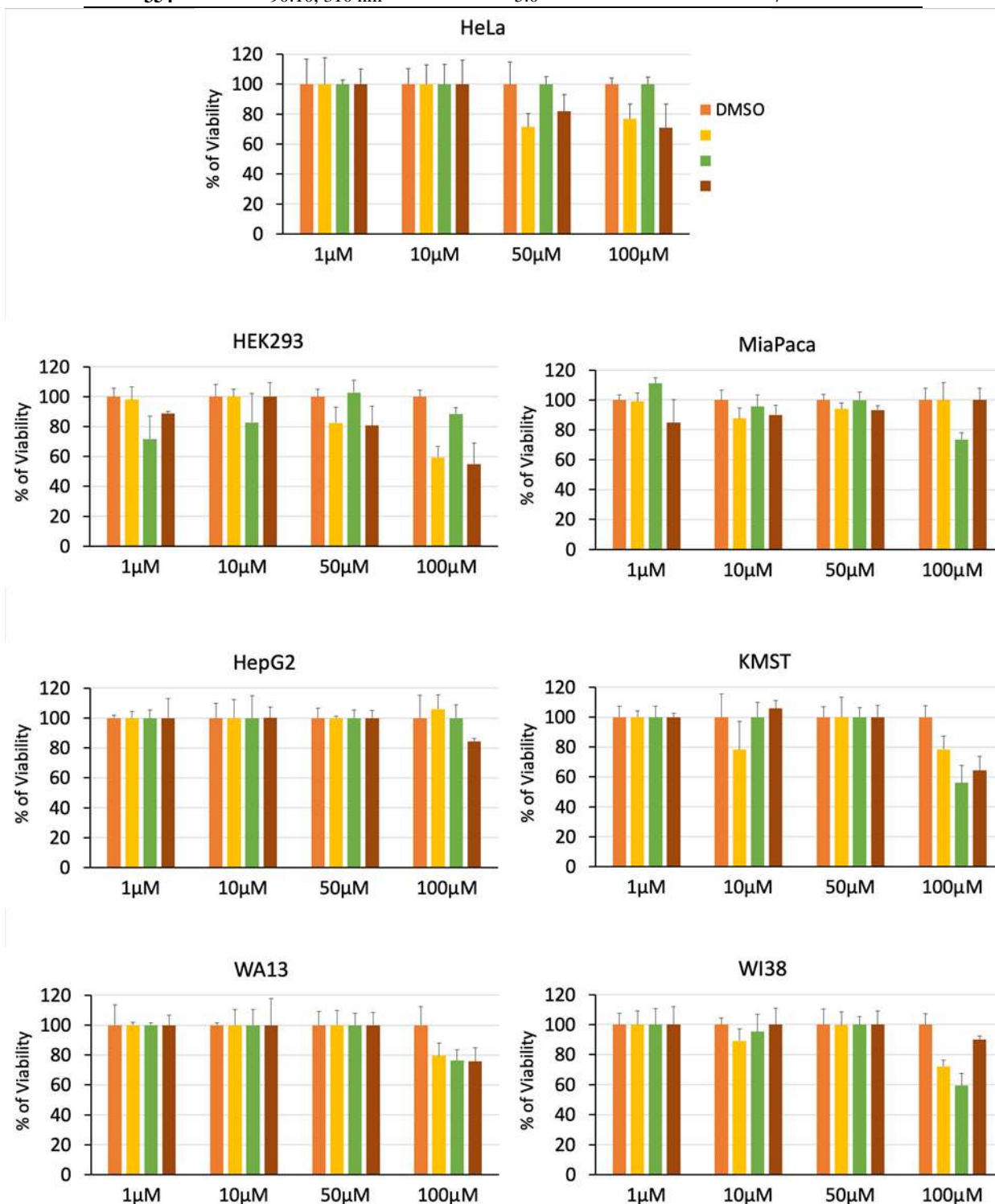
За да се получи представа за метаболитната стабилност, най-мощните срещу *M. tuberculosis* H37Rv съединения (**349** и **354**) бяха инкубирани в миши чернодробни микрозоми при 37°C. Пробите се анализират чрез HPLC, за да се определи процента на съединенията, оставащи след 60 минути инкубация. Проверка на резултатите, представени в Таблица 10, разкрива, че тези съединения са метаболитно стабилни, с едва 7-12% метаболизиране след 1 час инкубация.



Фигура 7. Оценка на цитотоксичността за съединения **357-371** към човешки фибробластни клетки CC-2509 при 72 часово третиране с концентрации 100 µM за всяко от тестваните вещества. Сините стълбове показват процента на активност на клетките и стандартното отклонение спрямо третиране с ДМСО (стълбовете след ДМСО не са номерирани, но представляват последователно веществата **357-371**).

Таблица 10. Аналитични условия и метаболитна стабилност за съединения **349** and **354**, инкубирани в миши чернодробни микросоми.

Съединение	Елуент (MeOH:H ₂ O), λ (nm)	Време на разделяне, RT (min)	% на метаболизация след 60 минути инкубация
349	90:10, 310 nm	5.9	12
354	90:10, 310 nm	5.0	7



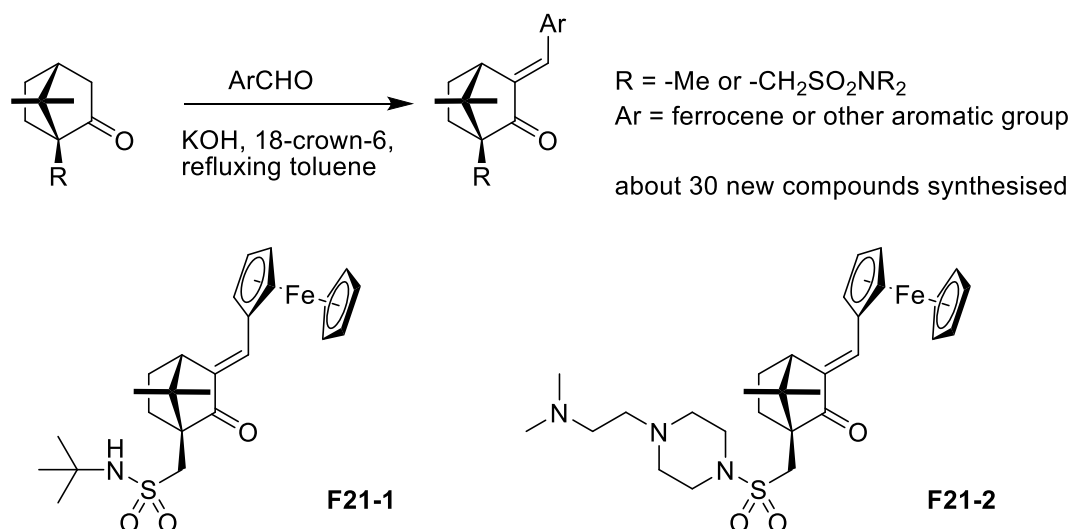
Фигура 8. Клетъчна жизнеспособност при 72-часово третиране с избрани съединения на човешки клетъчни линии: HeLa, MIA PaCa, HepG2, HEK293, WA13, KMST и WI-38. Клетките са изложени на 1, 10, 50 или 100 μM от всяко тествано съединение: **344** (зелени стълбове), **349** (жълти стълбове) и **354** (кафяви стълбове). Стълбовете показват процента на активност на клетките и стандартното отклонение спрямо 72-часово третиране с ДМСО (оранжевите стълбове).

Предистория на изследванията ни за биоактивност на (+)- камфорови и (-)-фенхонови производни (кратко описание)

Най-ранните ни изследвания по отношение на синтеза на нови арилиден камфор кетони и (-)-фенхонови производни започнаха през 2001 г. По това време такива производни бяха използвани от нас само като катализатори за асиметричен синтез или междинни продукти за тяхното получаване. Някои от тези продукти бяха включени в част от моята докторска дисертация (2001-2006), но всъщност бяха публикувани години по-късно.¹⁸⁰⁻¹⁸² След 2011 г. започнахме скрининг на тези съединения за биологична активност и разширихме броя им.

През годините извършвахме успоредно по-задълбочени проучвания върху цитотоксичността на малки серии арилметиленден кетони с камфорови скелети. Тъй като тази тематика е косвено свързана с настоящата дисертация, тук представяме само нейно кратко описание. Синтетичният подход към всички съединения в тези серии (Фигура 9) се основаваше на процедура, подобна на представената по-горе в Схема 16. През 2017 г. ние описахме¹⁶⁸ синтеза на (+)-камфорни производни, съдържащи сулфонамидни групи в комбинация с фероценилметиленденови или арилидененови остатъци. Получените производни бяха тествани *in vitro* срещу седем човешки ракови клетъчни линии, а именно BV-173 (левкемия), K-256a (левкемия), NB-4 (левкемия), A549 (белодробен аденокарцином), H1299 (белодробен аденокарцином), MCF-7 (аденокарцином на гърдата) и MDA-MB231 (аденокарцином на гърдата) и две нормални човешки клетъчни линии (HEK293 и HUVEC). Съединение **F21-1** може да бъде очертано в тази серия като най-мощното противораково средство с добър индекс на селективност (SI до 11.5) спрямо нормалните човешки клетки. По-късно това съединение беше изследвано още по-задълбочено по отношение на неговата цитотоксичност.¹⁸³ Последната ни публикация¹⁸⁴ беше посветена на откриването на активни водоразтворими аналози на **F21-1**. Така ние синтезирахме **F21-2**, който притежава отлична разтворимост и запазена висока противоракова активност.

Може да се заключи, че наличието на фероценил метилиденова група в представените кетони с камфорови скелети е от съществено значение за тяхната цитотоксичност. Въпреки това, сулфонамидния остатък може значително да промени тяхната активност и фармакологични свойства. Очевидно е, че кетони съдържащи фероцен, демонстрират по-висока цитотоксичност и са подходящи за противоракови агенти, но не и за антибактериални средства. Камфоровите кетони, притежаващи други арилови остатъци могат да проявяват повишена антибактериална активност за сметка на понижена цитотоксичност.



Фигура 9. Синтез и цитотоксичност на арилметиленден кетони с камфорови скелети.

3.1.4. Резистентност на *Mycobacterium tuberculosis* към нови нитрофуранил амиди – поглед на молекулярно ниво¹⁸⁵

M. tuberculosis има сложна и химически устойчива клетъчна стена. Затова противотуберкулозните лекарства са специфични и не действат на други патогенни бактерии и обратното - повечето от наличните антибиотици не действат (с малки изключения) върху микобактериите. Много противотуберкулозни антибиотици са функционално уникални за *M. tuberculosis*, тъй като са насочени към клетъчната стена, която е структурно различна от тази на другите бактерии. Напоследък най-активните синтезирани противотуберкулозни агенти са класифицирани по техните химични структури - амини, аминокислотни алкохоли, хидразици, уреци, тиауреци, хетероцикли и др.^{174,186} Природните продукти или техните полусинтетични производни също предоставят интересна възможност в търсенето на нови противотуберкулозни лекарства.^{187,188} През последните десетилетия обаче само няколко нови лекарства (бедаквилин, деламаид, линезолид и клофазимин) са одобрени за клинична употреба срещу MDR-TB. Въпреки че тези постижения може да изглеждат страхотно, се оказва че на новите лекарства се възлагат прекалено много надежди. Например, след въвеждането на бедаквилин, той се оказа не особено ефективен и с нежелани странични ефекти (съмнителна сърдечна безопасност).^{6,7}

Нитроимидазолите (напр. деламаид) и нитрофураните са лекарства, чието действие се основава на редуцирането на нитрогрупите им от редуктазните ензими в клетките. Като алтернатива на нитроимидазолите, нитрофураните (нитрофураниламиди, нитрофуранилпиперазини, нитрофуранилизоксазолини) също демонстрират *in vitro* и *in vivo* анти-туберкуозна активност.¹⁸⁹ Някои нови нитрофурани са ефективни срещу активно растящи и латентни микобактерии с уникални механизми на действие.¹⁹⁰ QSAR проучванията показват, че нитро групата е от съществено значение за активността. Замяната на фурановия с друг пръстен води до намаляване или липса на активност, докато нитроароматните системи като цяло значително повишават активността срещу латентни или аноксични бактерии.¹⁹⁰⁻¹⁹²

Основният известен механизъм на действие на нитрофураните (изследван при *E. coli*) се основава на редукцията на нитрофураните (пролекарства) от нитроредуктази, което води до оксидативен стрес, дължащ се на бактерицидни реактивни кислородни и азотни видове.¹⁹³ В *E. coli* тип I нитроредуктазите NsfA и NsfB са нечувствителни към кислород и катализират редукцията на нитро групите в реактивни нитрозо и хидроксиламино производни. Възможно е да съществуват и други неизвестни ензими, но с по-слабо изразен ефект поради ниска протеинова експресия или нисък афинитет към нитрофураните.¹⁹³ *De novo* избран резистентен на нитрофурантоин щам *E. coli* с див тип nfsA и nfsB съдържа делеция в рамката на gibE, която кодира ензим в биосинтеза на флавин мононуклеотид, основен NfsA/NfsB кофактор.¹⁹⁴ Информацията за механизма на действие и предизвикване на резистентност на нитрофураните спрямо микобактериите, е ограничена. *M. tuberculosis* няма плазмиди и хоризонтален генен трансфер, и по-голямата част от генетичното й разнообразие се дължи на хромозомни точкови мутации или къси индели, включително развитието на лекарствена резистентност. Различни спонтанни мутации се появяват в популацията на *M. tuberculosis* и те могат да бъдат точно установени, ако са достатъчно полезни за бактериалното оцеляване и адаптация. В този смисъл, култивирането на бактериите върху среда, съдържаща активно съединение при повишени концентрации, може да позволи идентифицирането на мутации свързани с резистентност и така да се придобие индиректна представа за механизма на действие на съответното съединение.

В това изследване¹⁸⁵ ние описваме синтеза на нови нитрофуранил амиди и изследваме тяхната анти-туберкуозна активност и възможен механизъм на действие/резистентност чрез секвениране на целия геном на спонтанни мутанти на *M. tuberculosis*. Фокусирахме се върху нитрофуранил амидите, тъй като те притежават силна противотуберкуозна и антибактериална активност. Техният механизъм на анти-туберкуозно действие все още е до голяма степен неизвестен. Класическия дизайн на този вид изследване на мутагенеза се

основава на индивидуални резистентни клонове, които допълнително се рекултивират върху среда, съдържаща активното вещество, и всеки отделен клон се подлага на самостоятелна екстракция на ДНК и секвениране на целия геном. Тук обаче ние целенасочено преследвахме друг подход, който може да се разглежда като „подобен на метагеномика“. Извършихме секвенирането на целия геном (WGS) на първоначално отгледаните обединени колонии, а не на единични колонии. По този начин очаквахме да установим първичния генетичен отговор на микобактериите към инхибиращото действие на съединението.

Поредица от шест нови нитрофурилиаида (**379-384**) беше синтезирана (Схема 18)¹⁸⁵ чрез прилагане на класическа методология за получаване на амиди - реакцията на 5-нитрофуран-2-карбонилхлорид (**372**) с различни амини (**373-378**) в сух дихлорометан (DCM) и присъствие на база (излишък на триетиламин). Амините **373-378** (с изключение на аминоканол **374**)¹⁰⁶ са търговски продукти. Всички целеви съединения **379-384** бяха изолирани с висока чистота след колонна хроматография при умерени до високи добиви. Изборът на амидните остатъци като фармакофорни групи не е случаен. Известно е, че различни нитрофурилиаиди са активни *in vitro* срещу *M. tuberculosis*, но тяхната активност може да бъде значително повлияна от други части на техните молекули. Синтезът на **379** е вдъхновен от други активни нитрофуранил анилиди.¹⁹⁵ Дизайнът на **380** е предложен от нашите предишни проучвания,^{106,117} разкриващи, че някои производни на фенхона притежават антитуберкулозна активност. Съединение **381** съчетава нитрофуран и нитроимидазол в една молекула. Известно е, че бицикличният нитроимидазол претоманид (виж Фигура 2) е пролекарство с много сложен механизъм на действие, активно както срещу репликиращи се, така и срещу хипоксични, нерепликиращи се *Mycobacterium tuberculosis*.¹⁹⁶ Другите три съединения (**382-384**) съдържат арилпиперазинови части, които също могат да допринесат значително за тяхната антитуберкулозна активност.¹⁹⁷

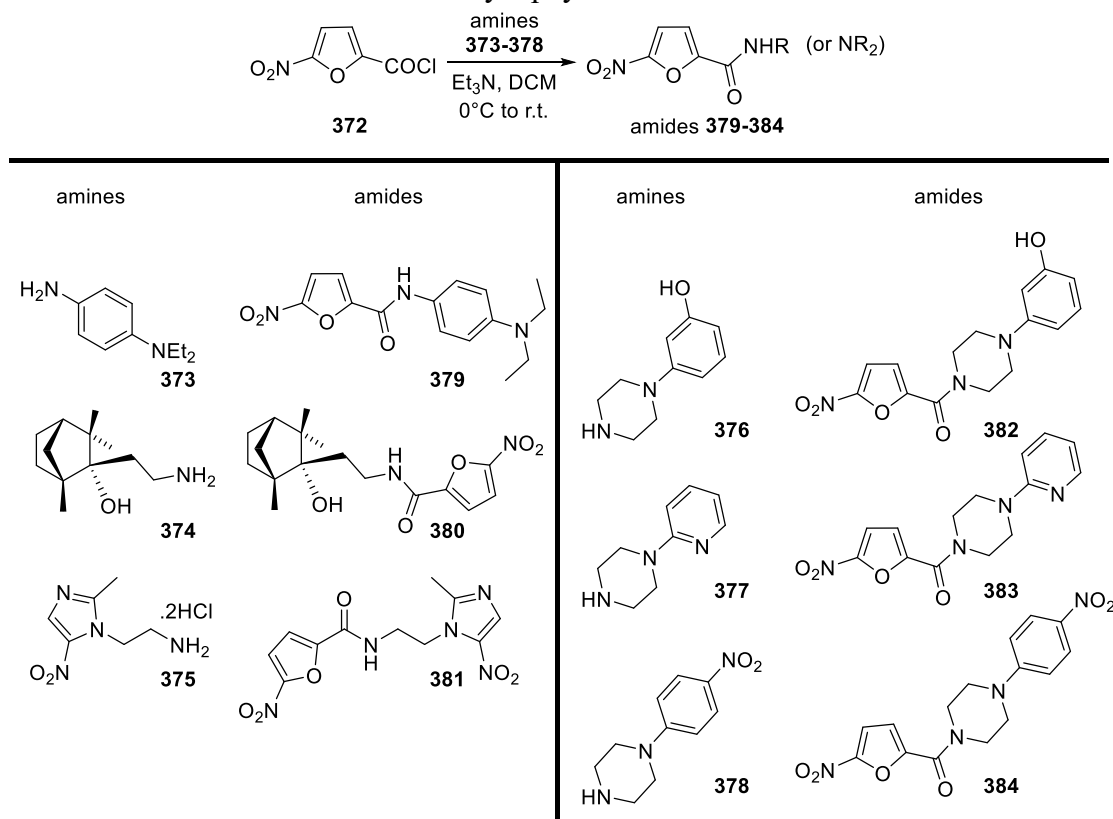


Схема 18. Синтез на съединения **379-384**.

МИК стойностите на синтезираните съединения бяха определени за референтен щам H37Rv. Използвани са 2 метода - за микроразреждане на цели клетки (WCMD)¹⁹⁸ и за микротитърен анализ на Resazurin (REMA)¹⁷⁵ (Таблица 11). Трите най-ефикасни вещества с ниска МИК бяха допълнително тествани и по метода REMA в повторени експерименти при

различни диапазони на концентрации (Таблица 12). Репликацията на експериментите беше използвана за отстраняване на евентуални грешки в резултатите. За сравняване на съединения **379-384** (които притежават различни молекулни тегла), всички резултати за МИК са представени и коментирани само в μM . Съединения **383** и **384** показват много голяма хетерогенност в резултатите за МИК. Това може да се дължи на ниска разтворимост или нестабилност на съединения **383** и **383** в тестовата среда. Нашите експерименти бяха ориентирани само към намиране на подходящо съединение в тази серия с ниска и възпроизводима МИК стойност, независимо от причините за такава хетерогенност. Съединение **382** се оказа единственото, което отговори на тези изисквания, поради което беше избрано като моделно за по-нататъшни генетични експерименти. Определянето на МИК по REMA метода беше извършено и за известния антибиотик изониазид (МИК 0.062 $\mu\text{g}/\text{mL}$) с което се потвърди надеждността на добрите резултати, постигнати при **382**.

Таблица 11. МИК на тестваните съединения, определени по два различни метода, WCMD и REMA.

Съединение	МИК (WCMD), μM	МИК (REMA), μM
379	0.66	16.48
380	4.64	29.73
381	>80	162
382	0.19	0.50
383	0.026	0.20
384	<0.012	0.36

Таблица 12. МИК на тестваните съединения, определени по метода REMA в повторени експерименти.

Съединение	МИК (REMA), μM
382	<1.26; 0.50; 0.50
383	<1.32; <0.13; 0.33
384	<1.16; <0.12; >0.58; 1.44

Мутагенезата *in vitro* беше извършена върху *M. tuberculosis* референтен щам H37Rv субкултури, отглеждани при нарастващи концентрации на **382** (МИК 0.50 μM , Таблица 12). Секвенирането на целия геном (WGS) на резистентните мутанти идентифицира мутации в шест гена (Таблица 13). Известно е, че щамът H37Rv претърпява лабораторна еволюция и неговите субкултури не са геномно идентични в различни лаборатории по света. Откакто първата последователност на целия геном на този щам е публикувана през 1987 г., още 199 щамата H37Rv от различни лаборатории са секвенирани и депозирани в GenBank. Поради тази причина, за да избегнем фалшива поява на единичен нуклеотиден полиморфизъм (SNP), ние извършихме WGS и SNP картографиране, не само на третираните с **382** бактериални субкултури, но и на техния родителски субщам H37Rv. Нито една от шестте мутации не присъства в използвания от нас родителски щам, т.е. тези мутации се появяват изцяло в отговор на действието на **382**. Достатъчно задълбоченото секвениране ни позволи да оценим количествено и статистически съвместното съществуване на дивия тип и мутантните алели в една и съща позиция на генома. Във всички случаи имаше ясно увеличение на дела на мутантните четения с увеличаване на концентрацията на съединението (в някои случаи двукратно увеличение). В четири случая по-високият процент на четения на мутанти е значителен (Таблица 13).

Таблица 13. Характеристики на мутантните позиции в субкултури на *M. tuberculosis* H37Rv, отглеждани при различни концентрации на **382**.

Position in Genome	Ref	Mut	Gene	Amino acid change	PAM1 ^a	SIFT p ^b	% of Mutant reads in H37Rv cultured with 382 (1.00 μM)	% of Mutant reads in H37Rv cultured with 382 (2.00 μM)	% of Mutant reads in H37Rv cultured with 382 (4.00 μM)	p Value for the most contrasting pairs
268,560	A	T	<i>Rv0224c</i>	Phe23Tyr	21	0.01	9.6 (13/136)	15.8 (29/183)	20.0 (25/125)	0.02
411,895	A	T	<i>Rv0342 (iniA)</i>	Gln353Leu	6	0.02	12.7 (21/165)	8.9 (16/180)	23.8 (35/147)	0.0004
1,305,250	C	G	<i>Rv1173 (fbiC)</i>	Arg774Gly	1	0.00	14.0 (18/129)	12.8 (21/164)	17.2 (22/128)	0.3
1,783,849	G	C	<i>Rv1580c</i>	Ala15Gly	21	0.00 ^c	22.2 (43/193)	16.7 (32/192)	26.0 (44/169)	0.03
1,793,445	T	G	<i>Rv1592c</i>	Glu99Ala	17	0.32	6.2 (7/112)	6.0 (7/117)	20.0 (23/115)	0.002
1,847,247	G	C	<i>Rv1639c</i>	silent Thr404	9871	-	13.3 (15/113)	17.2 (25/145)	19.8 (23/116)	0.2

^a PAM1 (Point Accepted Mutation 1) gives the probability (multiplied with 10,000) for the particular aa exchange to occur, given that 1% of the amino acids are changed. ^b Amino acid changes with SIFT p probabilities < 0.05 are predicted to affect protein function, based on search in Uni-Prot-SwissProt + TrEMBL 2010_09 databases. ^c low confidence prediction.

3.2. Разработване на нови диарил етери и техни аналози с анти-ентеровирусна активност

През последните десетилетия са открити няколко класа непептидни съединения като селективни инхибитори на репликацията на ентеровирус след *in vitro* тестване (експерименти с клетъчни култури). Съществува обаче рязко несъответствие между антивирусната активност, установена *in vitro* и *in vivo* (експерименти с лабораторни животни). От стотиците *in vitro* инхибитори на вирусна репликация, по-малко от двадесет проявяват известна *in vivo* активност. За съжаление, ефективна анти-ентеровирусна химиотерапия в клинична употреба така и не е установена. Развитието на лекарствена резистентност е основната причина за липсата на антивирусни средства. Въпреки това, някои анти-ентеровирусни съединения са влезли в клинични изпитвания – изоксазоли („WIN съединения“ – дизоксарил, плеконарил), пиродавир и неговите аналози, имидазолидинони, халкони, флавани, диарил етери и т.н.²⁰⁰

Диарил етерът MDL-860 (2-(3,4-дихлорофенокси)-5-нитробензонитрил, известен още като DNB), е докладван за първи път през 80-те години на миналия век. Действително MDL-860 притежава широк спектър от *in vitro* активност срещу пикорнавируси, чрез инхибиране на ранно събитие в репликацията на вируса след етапа на първоначално разсъбличане.^{201,202} Механизмът на действие на MDL-860 беше изяснен - негова мишена е ензимът фосфатидилинозитол-4 киназа III бета (PI4KB) на гостоприемника.²⁰³ MDL-860 демонстрира и известна *in vivo* ефикасност в модел на миокардит, индуциран от коксакивирус В3 (CVB3).²⁰⁴ Обещаващите резултати вдъхновиха разработването на много аналози на MDL-860 през последните десетилетия. Например *Markley et al.* синтезират и тестват²⁰⁵ над 70 диарил етера (и техните изостерични аналози) срещу няколко пикорнавируса. Последната работа на *Pürstinger et al.* докладва за синтеза на 60 нови диарил етери и тяхната активност срещу CVB3.²⁰⁶ Всички получени резултати ясно показват, че 2-циано-4-нитрофенокси групата е основен градивен елемент за съществуването на антивирусна активност на този клас съединения. Промяната на заместителите в другия ароматен пръстен обаче може да има значително влияние както върху антивирусната активност, така и върху цитотоксичността. Идентифицираните активни съединения обикновено съдържат два до три халогенни атома във втория ароматен пръстен.

Синтез и анти-ентеровирусна активност на съединения 398-409

Въпреки докладваните обещаващи резултати, напоследък този клас съединения беше изоставен от гледна точка на по-нататъшно изследване на тяхната антивирусна активност. По този начин нашето първо проучване върху антивирусните средства беше фокусирано върху синтеза и оценката на антивирусната активност и цитотоксичността на серия от нови съединения, носещи 2-циано-4-нитрофенилов остатък, свързан с различни ароматни или алифатни групи чрез O, N и S атоми.¹⁸

Целевите съединения (398-409) са получени с високи добиви чрез едноетапен синтез, както е показано на Схема 19, чрез използване на синтетични процедури, подобни на тези на *Markley et al.*²⁰⁵ и *Pürstinger et al.*²⁰⁶ Диарил етери 398-404, 408-409 и тиоетер 405 се синтезират в сух диметилсулфоксид (DMSO) чрез нагряване на съответните феноли 386-392, 386-397 и 2-хлоротиофенол (405) с 2-хлоро-5-нитробензонитрил (385) в присъствието на NaOH. Ариламины 406 и 407 се получават чрез реакция на 385 с 2.2 еквивалента от амините 394 и 395, съответно, в излишък от *N*-метилморфолин, използван като база. Всички изходни съединения (с изключение на феноли 391 и 392) са налични в търговската мрежа. Синтезът на междинни съединения 391²⁰⁷ и 392²⁰⁸ е описан в литературата. Всички целеви съединения бяха изолирани и пречистени чрез колонна хроматография. Изясняването на химическата структура е постигнато чрез ЯМР и мас-спектроскопия. В допълнение, структурата на съединение 398 беше потвърдена чрез рентгено-структурен анализ. Получената информация може да бъде полезна за по-нататъшни молекулярни докинг изследвания на този клас съединения.

Съединения **398-409** бяха тествани за тяхната *in vitro* цитотоксичност и антивирусна активност в експерименти с клетъчни култури срещу три ентеровируса, а именно полиомиелит вирус 1 (PV1), коксакивирус В1 (CVB1) и коксакивирус В3 (CVB3). Съединението MDL-860 бе използвано като еталон (Таблица 14). Диарил етер **398** проявява силна активност срещу PV1 и CVB1 (стойности на SI съответно 118 и 405), но е неактивен срещу CVB3. Съединения **399** и **400** показват умерен ефект (SI 20.5 и 19.6, съответно) срещу CVB3. Гранична активност към CVB1 беше установена за **399** (SI 10.9). Съединения **400-407** могат да се считат за неактивни срещу трите вируса, включени в скрининга (с изключение на ниската активност на **400** срещу CVB3). Забележителна активност на **408** и особено на **409** беше демонстрирана срещу PV1 и CVB1 вируси. Нито едно от тестваните съединения не репликира антивирусния спектър на MDL-860 – ефектите му обхващат и трите ентеровируса (стойности на SI 72.5, 586.9 и 182 спрямо PV1, CVB1 и CVB3, съответно). Трябва да се подчертае забележителната нечувствителност на CVB3 към активните съединения. Освен това, съединение **398** (с най-близка структурна прилика с MDL-860) демонстрира една от най-високите активности спрямо два други вируса.

По отношение на цитотоксичността (срещу HEp-2 клетки) на изследваните съединения, всички са нетоксични като цяло (с изключение на **401**). Някои от тях (**400**, **403**, **404**, **405** и **407**) показват дори по-ниска токсичност от MDL-860.

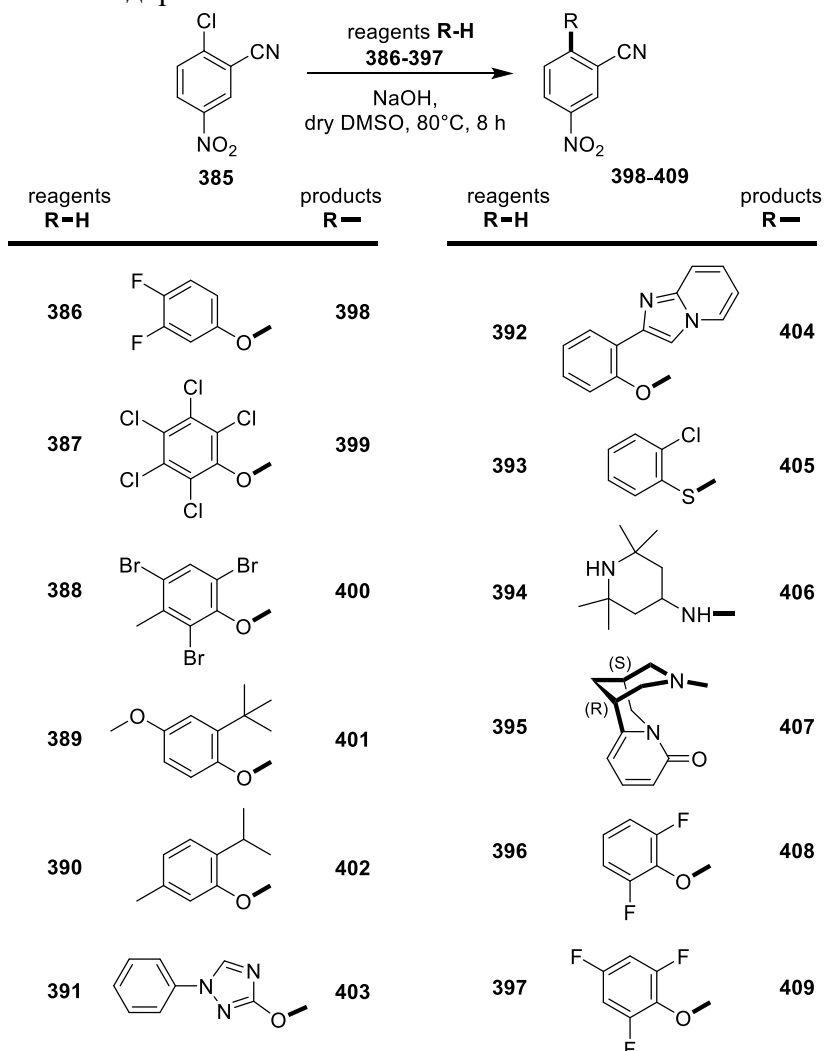


Схема 19. Синтез на съединения **398-409**.

За съжаление, броят на съединенията в това изследване не е достатъчен, за да осигури адекватен QSAR анализ, но някои връзки структура-активност могат да бъдат коментирани. Първоначалният анализ на структурата и активността показва, че подчертана ефективност обикновено се демонстрира от ди- или трихалоген заместени диарил етерни аналози на MDL-860.^{205,206} Резултатите от съединения **398**, **408** и **409** потвърждават това заключение.

Други заместители (ароматни хетероцикли в **403** и **404**) или замествания на свързан с мост кислороден атом с друг хетероатом (**405-407**) водят до загуба на активност. Подобен ефект се наблюдава, когато халогенните заместители се заменят с други (**401-402**). Интересно е да се отбележи, че съединение **398** (структурно най-близкият дифлуоро аналог на MDL-860) няма активност само срещу CVB3. От друга страна, не са известни аналози на MDL-860, съдържащи повече от три халогенни атома във втория пръстен. В това проучване предоставихме само едно пентахлоро заместено съединение (**399**), което демонстрира умерен антивирусен ефект. Разбира се, този единичен пример не е представителен, но така или иначе това може да бъде една от посоките за по-нататъшни изследвания.

Може да се заключи, че бъдещият синтез на нови активни диарил етери може да бъде обещаващ и трябва да бъде насочен към други халоген-заместени аналози на MDL-860. В допълнение, QSAR и някои други проблеми (например неразтворимостта на MDL-860 и неговите аналози във вода) трябва да бъдат разрешени.

Таблица 14. *In vitro* анти-ентеровирусна активност и цитотоксичност на съединения **398-409**.

Съединение	Цитотоксичност, CC ₅₀ (µM)	PV1		CVB1		CVB3	
		IC ₅₀ (µM)*	SI	IC ₅₀ (µM)*	SI	IC ₅₀ (µM)*	SI
398	320.0	2.7	118.0	0.8	405.0	NA	-
399	119.1	NA	-	10.9	10.9	5.8	20.5
400	570.3	NA	-	256.1	2.2	29.6	19.6
401	22.0	NA	-	NA	-	NA	-
402	94.3	NA	-	16.2	5.8	NA	-
403	570.8	NA	-	190.1	3.0	NA	-
404	718.0	NA	-	NA	-	NA	-
405	53.8	NA	-	NA	-	9.9	5.4
406	675.0	NA	-	NA	-	426.0	1.5
407	492.2	234.0	2.1	152.2	3.2	NA	-
408	355.0	6.8	52.2	0.7	507.1	NA	-
409	517.5	2.7	191.6	0.75	690	NA	-
MDL-860	493.0	6.8	72.5	0.8	586.9	2.7	182.0

*NA-не е активно

Избраните при *in vitro* скрининг съединения **398**, **408** и **409** бяха тествани при експериментална CVB1 невроинфекция в новородени мишки от произволно отгледана ICR линия, заразени с масивен вирусен инокулум (20 LD₅₀). Прилаган е 12-дневен курс на лечение, започващ в деня на инокулацията на вируса. Подкожната дневна доза на съединенията е следната: съединения **398** и **408** - 50 mg/kg, съединение **409** - 25 mg/kg и MDL-860 - 75 mg/kg. Получените резултати са представени в Таблица 15 и Фигура 10.

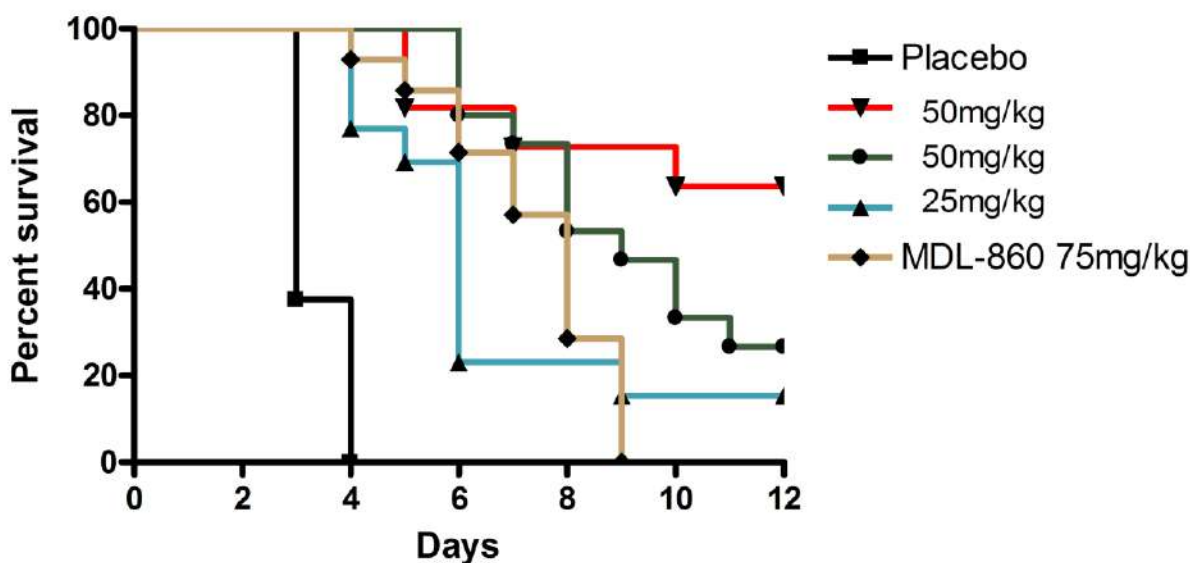
Таблица 15. Активност на съединения **398**, **408** и **409** при експериментална CVB1 невроинфекция на новородени мишки.

Съединение	Оцелели/ Общо	MST±SD days ^a	Δ days	Смъртност, %	PI, %
398	22/24	8.1±1.0***	+5.0	50.0	50.0
408	9/27	8.5±1.0***	+5.4	66.7	33.3
409	3/26	5.7±1.2*	+2.6	88.4	11.6
MDL-860	0/27	6.1±1.6**	+3.0	100	0
Placebo	0/17	3.1±0.3	-	100	0

Данни от 3 независими експеримента (усреднени). ^a One-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparison post-test); MST – средно време на оцеляване; PI – индекс на защита; SD – стандартно отклонение; *** $p < 0,0001$ спрямо плацебо групата; ** $p < 0,05$ спрямо плацебо групата; * $p < 0,05$ спрямо плацебо групата.

Както се вижда, съединение **398** демонстрира най-висока активност, постигайки защитен ефект от 50% и много ясно изразено удължаване на MST с 5 дни. Установена е

подчертана активност при курса със съединение **408** (PI=33.3 % и MST удължен с 5.4 дни). Съединение **409** показва слаб защитен ефект (PI=11.6 % и 2.6 Δ дни). Обратно, с MDL-860 е забелязано само удължаване на MST с 3 дни. *Markley et al.* са тествали *in vivo* MDL-860 и пет други негови аналози срещу Coxsackievirus A21 при мишки.²⁰⁵ Не е правилно обаче да се сравняват резултатите, получени в нашето проучване (чрез използване на подкожно приложение), с тези на *Markley et al.* (чрез перорално приложение срещу други вируси). Очевидно съединения **398** и **408** могат да бъдат характеризирани като перспективни анти-CVB агенти, които се нуждаят от допълнително проучване. В друга наша работа установихме много висока активност при експериментална невроинфекция с Coxsackievirus B1 при мишки, и курс на лечение с последователно редуващо се приложение (CAA) на тройна комбинация от ентеровирусни инхибитори, включително MDL-860 като един от компонентите.²⁰⁹ Би било от голям интерес бъдещо тестване на ефекта от CAA курса чрез тройна комбинация, в която MDL-860 е заменен със съединение **398**.



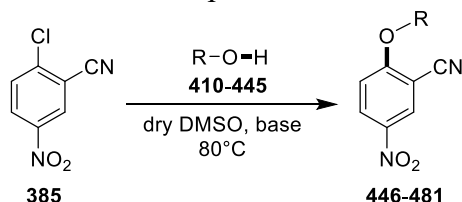
Фигура 10. Индивидуални ефекти от съединения **398** (в червено), **408** (в тъмно зелено), **409** (в синьо) и MDL-860 в експериментална невроинфекция с Coxsackievirus B1 при новородени мишки.

В светлината на настоящите изследвания е ясно, че най-обещаващо е разработването на нови аналози на MDL-860, носещи непроменен 2-циано-4-нитро пръстен. В заключение, първоначалният скрининг на дванадесетте MDL-860 аналози (Схема 19) доведе до три съединения (**398**, **408** и **409**) с висока активност срещу PV1 и CVB1 и само две съединения (**399** и **400**) с умерена активност спрямо CVB3. В допълнение, **398**, **408** и **409** показват активност спрямо експериментална CVB1 невроинфекция при новородени мишки.

Синтез и анти-ентеровирусна активност на съединения **446-481**, **491-500**, **512-522**, **526-528** и **531**

Целта на нашите по-нататъшни изследвания²¹⁰ е синтезът на нови аналози на MDL-860, притежаващи непроменен 2-циано-5-нитро заместен бензен пръстен като общ фрагмент, за да се докажат границите на възможните вариации в другия пръстен на MDL-860, водещи за подобрена антивирусна активност. Така бяха синтезирани четири серии от аналози на MDL-860 и оценени за антивирусна активност. Всички целеви съединения са получени чрез прости едноетапни реакции на нуклеофилно ароматно заместване на серии от феноли (**410-445**), тиоли (**482-490**), амини (**501-511**) и *N*-хетероцикли (**523-525**) с 2-хлоро-5-нитробензонитрил (**385**) в присъствието на основа. Поради естеството на **385** (с дефицит на електрони), заместването на хлора беше извършено при относително меки условия без необходимост от катализатор.²¹¹ Всички съединения бяха пречистени чрез колонна хроматография и/или прекристализация.

Синтезът на арил етери **446-481** (Схема 20) и арил тиоетери **491-500** (Схема 21) от **385** и съответните феноли (**410-445**) и тиофеноли (**482-490**), се извършва при 80°C в сух DMSO като цяло използвайки KOH на прах като база. В някои случаи като бази са използвани NaOH или K₂CO₃ (**460**, **465**, **466**, **481**, **495** и **498**). Ходът на реакциите се наблюдава чрез TLC. Съединение **456** се получава от **385** и *in situ* получен CF₃CH₂ONa (от излишък на сух CF₃CH₂OH и NaH) при кипене на обратен хладник. Подобна процедура се прилага за получаването на бензиловия етер **457**. Съединение **500** се получава чрез спонтанна циклизация по време на реакцията между **385** и меркаптобензимидазол (**490**).²¹² Съответно, очакваният арил тиоетер **499** не беше изолиран.

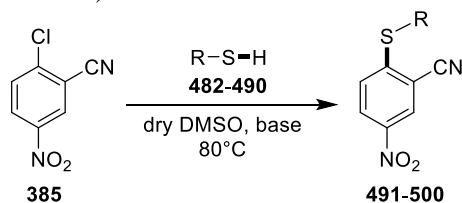


ROH	RO—	Ether	ROH	RO—	Ether	ROH	RO—	Ether
410		446	422		458	434		470
411		447	423		459	435		471
412		448	424		460	436		472
413		449	425		461	437		473
414		450	426		462	438		474
415		451	427		463	439		475
416		452	428		464	440		476
417		453	429		465	441		477
418		454	430		466	442		478
419		455	431		467	443		479
420		456	432		468	444		480
421		457	433		469	445		481*

*Съединение **481** съдържа около 5% примес от 3,4-дийодо изомера.

Схема 20. Синтез на диарилетери **446-481**.

Трябва да се спомене, че получаването на съединение **481** (2-(2,5-дийодофенокси)-5-нитробензонитрил) първоначално не беше планирано. Вместо това целта ни бе да получим 3,4-дийодо-аналог на MDL-860. За съжаление, синтезът на това производно от 3-йодофенол се оказа доста предизвикателен. Всички опити доведоха до изолиране на интермедиата 2,5-дийодофенол (**445**) с ок. 95% чистота. Не беше възможно повече да се подобри чистотата на **445**, поради което той беше използван директно в този си вид за синтеза на **481**. Пречишването на **481** също беше трудно – след колонна хроматография и няколко последователни прекристализации, бе постигната около 95% чистота. Според рентгено-структурни данни, получени върху кристал, израснал от така получения **481**, е установено, че в него се съдържат 5% от неговия 3,4-дийодо заместен аналог (което индиректно показва наличието на 3,4-дийодфенол в **445**).



RSH	RS—	Thio-ether	RSH	RS—	Thio-ether	RSH	RS—	Thio-ether
482		491	485		494	488		497
483		492	486		495	489		498
484		493	487		496	490		499*
								500

* не е изолирано

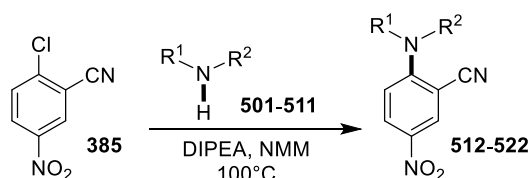
Схема 21. Синтез на тиоетери **491-500**.

Серия от арилимини **512-522** (Схема 22) бяха синтезирани чрез реакция на **385** с амините **501-511** при 100°C в смес от сух DIPEA и *N*-метилморфолин (NMM). Амин **512** се синтезира от **385** и сух диметилформаид (DMF) (като удобен *in situ* източник на диметиламин) при 130°C съгласно описаната процедура.²¹³ В някои случаи (**517-519**) продукти на разлагане и нереагирал **385** бяха наблюдавани.

N-арилиране на хетероцикли **523-525** при прилагане на общи условия (NaN/сух DMSO) дава съответните съединения **526-528** с добри до отлични добиви (Схема 23).

Трифлуорометил заместения аналог (**531**) на MDL-860 се получава от 1-флуоро-4-нитро-2-(трифлуорометил)бензен (**529**) и 3,4-дихлорфенол (**530**) в DMSO (Схема 24).

Рентгено-структурен анализ бе използван, за да се потвърди структурата на **481**. Получените резултати бяха полезни и за изясняване на структурата на примеса в **481**. Така кристалната структура на **481** беше изяснена чрез рентгенова дифракция на единичен кристал (Фигура 11), получен чрез бавно изпаряване на концентриран разтвор на **481** в изопропанол. Най-важните кристалографски данни и параметри за **481** са показани в Таблица 16. Кристалната структура разкрива наличието на примеси (около 5%) от 2-(3,4-дийодофенокси)-5-нитробензонитрил. Интересно е да се отбележи, че I4 се измества от своята „оригинална“ I2 позиция и разстоянието между йодните атоми I3 и I4 от второстепенния компонент е 3.918 Å. Хипотетичното разстояние I2...I3 е 3,232 Å. Двата ароматни пръстена по същество са равнинни (rmsd от 0.01 Å и за двете), въпреки че ъгълът между техните средни равнини е 81.5°, напр. мостовият O1 позволява въртене на пръстенните системи по връзката C–O1.



Amine	R ¹ R ² N—	Aryl-amine	Amine	R ¹ R ² N—	Aryl-amine	Amine	R ¹ R ² N—	Aryl-amine
501		512	505		516	509		520
502		513	506		517	510		521
503		514	507		518	511		522
504		515	508		519			

Схема 22. Синтез на ариламини 512-522.

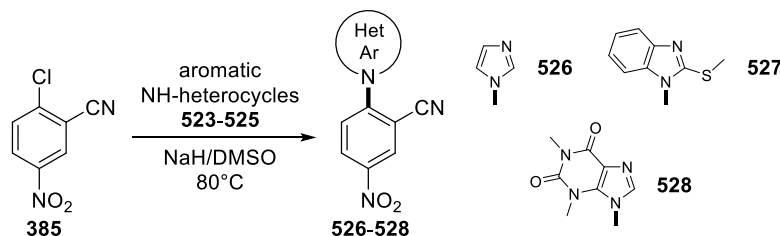


Схема 23. Синтез на хетероциклите 512-522.

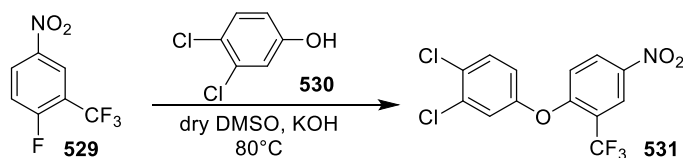
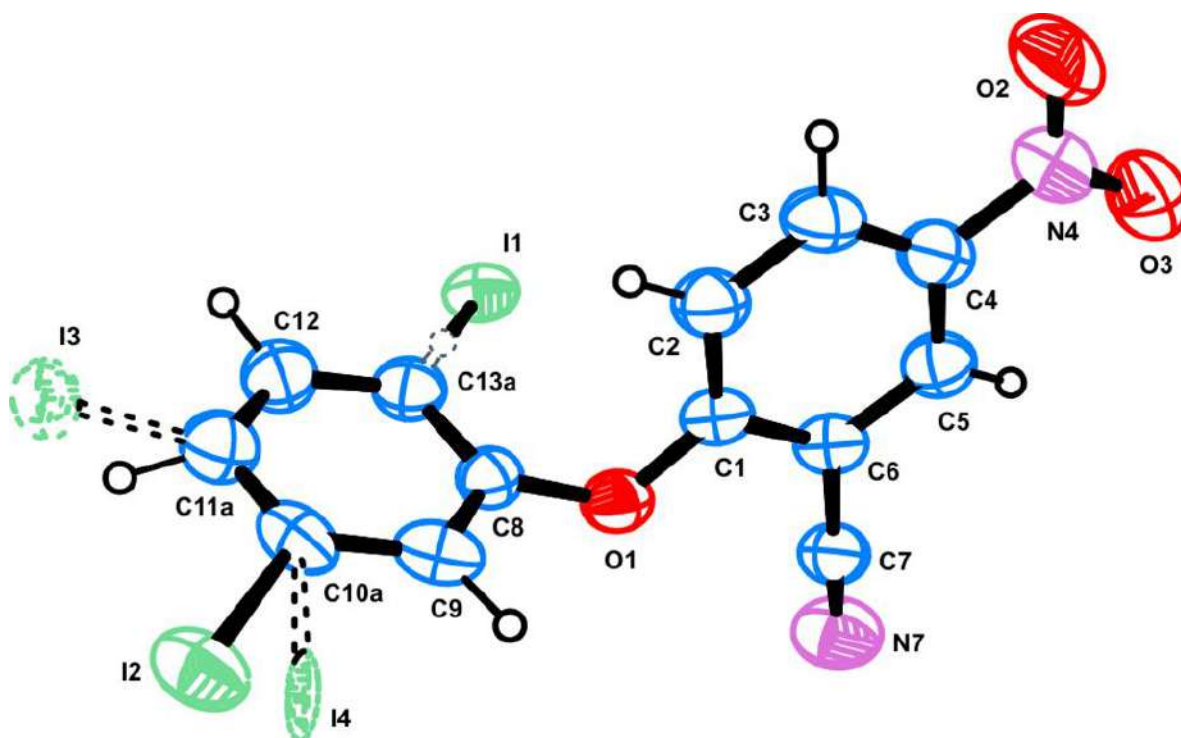


Схема 24. Синтез на съединение 531.

Таблица 16. Най-важните кристалографски данни и параметри за съединение 481.

Empirical formula	C ₁₃ H ₆ I ₂ N ₂ O ₃	<i>F</i> (000)	912.0
Formula weight	492.00	Crystal size/mm ³	0.3 × 0.25 × 0.12
Temperature/K	290	Radiation	CuKα (λ = 1.54184)
Crystal system	Monoclinic	2θ range for data collection/°	8.684 to 148.524
Space group	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>	Index ranges	-22 ≤ <i>h</i> ≤ 26, -6 ≤ <i>k</i> ≤ 6, -15 ≤ <i>l</i> ≤ 16
<i>a</i> /Å	21.1900(7)	Reflections collected	9013
<i>b</i> /Å	5.60500(10)	Independent reflections	3015 [<i>R</i> _{int} = 0.0544, <i>R</i> _{sigma} = 0.0431]
<i>c</i> /Å	13.2171(4)	Data/restraints/parameters	3015/0/202
α/°	90	Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	1.026
β/°	106.026(4)	Final <i>R</i> indexes [<i>I</i> ≥ 2σ (<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ = 0.0511, <i>wR</i> ₂ = 0.1304
γ/°	90	Final <i>R</i> indexes [all data]	<i>R</i> ₁ = 0.0706, <i>wR</i> ₂ = 0.1456
Volume/Å ³	1508.79(8)	Largest diff. peak/hole / e Å ⁻³	1.11/-1.32
<i>Z</i>	4	CCDC number	1876618
ρ _{calc} g/cm ³	2.166		
μ/mm ⁻¹	32.829		



Фигура 11. ORTEP изображение на съединение **481** с номерация на атомите и показана структура на примеса (5.58%).

Новосинтезираните производни на MDL-860 (**446-481**, **491-500**, **512-522**, **526-528** и **531**) бяха подложени на *in vitro* скринингово изследване за активност спрямо PV1, CVB1 и CVB3 (Таблица 17). Използван е тестът за инхибиране на цитопатичния ефект (CPE), следвайки процедурата на *Borenfreund u Puerner*.²¹⁴ Публикуваните преди това данни за съединения **398-409** (Таблица 16) са коментирани за сравнение.¹⁸ Беше демонстрирано, че съединение **472** (по аналогия с MDL-860) притежава най-широките спектъра на действие в това проучване (срещу PV1, CVB1 и CVB3). Съединение **480** е активно срещу CVB1 и CVB3. Значителна активност спрямо PV1 и CVB1 е демонстрирана от **473**. Съединения **465** и **474** са ефективни само срещу CVB1, а **467**, **475** и **478** – само срещу PV1. Умерена активност срещу PV1 и CVB1 е демонстрирана от съединение **449**; срещу PV1 – само с **462**, **463**, **469** и **477**; съединение **458** е активно срещу CVB1, а **459** – срещу CVB3. Трябва да се спомене, че антивирусната активност на **462**, **463**, **468** и **491** е изследвана в началото на 80-те години срещу риновируси и Coxsackie A21 вирус.²⁰⁵ Тяхната активност като цяло е по-висока в сравнение с наблюдаваната срещу PV1, CVB1 и CVB3 в това проучване (Таблица 17). Само MDL-860 може да се счита, че притежава широк спектъра на действие – той демонстрира висока *in vitro* активност срещу всички тествани риновируси и коксакивируси.

Сред тиоестерите, **493** и **498** демонстрират слаба активност срещу CVB1. Основният недостатък на **498** е неговата висока цитотоксичност ($CC_{50} = 18.7 \mu M$). Тъй като тиоестерите могат лесно да се окисляват в биологична среда, не е ясно дали **493** и **498** са активните съединения или техни окислени производни. Следователно е необходимо допълнително изследване на сулфонови аналози на **493** и **498**.

Данните, представени в Таблица 17, недвусмислено показват, че дори малки промени в молекулата на MDL-860 драматично влияят върху *in vitro* активността. Интересното е, че нови активни съединения се проявяват изключително сред диарилловите етери. Изследвайки по-подробно групата от 2-циано-5-нитро заместени етери (съединения **398-402**, **404**, **405**, **407**, **408** и **446-481**), става ясно, че присъствието на два и три халогенни заместителя на различни позиции във вторичния бензен пръстен е оптимален за висока активност. От друга страна, полихалогенираните етери (**399**, **448-450**) са неактивни. Повечето диариллови етери (с няколко изключения: **457**, **460**, **463**, **469**, **477**) показват много ниска токсичност. В светлината на наскоро открития механизъм на действие на MDL-860,²⁰³ може да се твърди,

че всички активни диарил етери имат подобен механизъм на действие, а именно необратима ковалентна модификация на фосфатидилинозитол-4 киназа III бета (PI4KB).

PI4KB е един от най-важните ензими при бозайниците, отговорен за репликацията на ентеровирусите в клетките гостоприемници.²¹⁵ Може да се предположи, че промяната на халогенните заместители в диариловите етери е важна. Това може да причини малки промени във формата и геометрията на молекулите, но може да повлияе значително на модификацията на PI4KB и съответно *in vitro* активността.

Друг тип заместители (напр. при **401**, **402**, **446-448**, **450**, **451**, **458**, **459**) или присъствието на хетероциклени остатъци (**407**, **408**, **449**, **452-455**) вместо бензенов пръстен, обикновено водят до липса на активност. Други серии от съединения (**491-500**, **512-522**, **526-528** и **531**, съдържащи различни мостови хетероатоми, т.е. S, N) също са напълно неактивни (с изключение на **498**). Трябва да се отбележи, че дори много близки изостерични аналози на MDL-860 (като тиоестер **491** или етер **531**) са неактивни. Вероятно тези съединения не са в състояние да модифицират PI4KB или претърпяват биохимични трансформации преди да достигнат до ензима.

Съединение **531** е единственият аналог на MDL-860 в това изследване, притежаващ различен заместител в първичния ароматен пръстен (-CF₃ вместо -CN). Ролята на заместителите в този пръстен все още е неясна и са необходими допълнителни изследвания на такива серии от съединения. Например, някои публикувани резултати²⁰⁵ показват, че заместването на циано групата с карбоксилна група в MDL-860 води до карбоксилна киселина с добра антивирусна активност. Освен това тази замяна автоматично позволява подобряване на разтворимостта във вода чрез възможно образуване на соли.

Най-активните съединения (**472**, **474** и **480**) срещу CVB1 бяха тествани за *in vivo* активност при новородени мишки, експериментално заразени с 20 MLD₅₀ CVB1. Съединения **472**, **474** и **480** се прилагат подкожно като дневни дози от 25 и 50 mg/kg след 12-дневен курс от деня на вирусната инокулация. Получените резултати показват умерени защитни ефекти на **472** и **474**. Наблюдава се подчертано удължаване на средното време на преживяване за **474** (25 mg/kg) и **480** (25 mg/kg) (Таблица 18 и Фигура 12). Като се вземе предвид тази липса на активност, заедно с докладваните по-рано обещаващи резултати за съединения (Таблица 17) **398** (PI 50%), **408** (PI 33%) и **409** (PI 11%), може да се предположи, че няма корелация между *in vitro* и *in vivo* активност. Тъй като фармакологичните свойства и особено механизмите на транспорт през клетъчните мембрани за тези диарил етери са неизвестни, е трудно да се обяснят тези резултати. Освен това диарил етерните структури предполагат изключително слаба разтворимост във вода. Природата на заместителите не позволява химическа модификация на активните съединения с цел подобряване на разтворимостта и/или мембрания транспорт (напр. превръщане в пролекарства – соли, естери и др.). По-нататъшното формулиране на *in vitro* активните съединения чрез получаване на наночастици или комплекси с водоразтворими полимери може значително да увеличи *in vivo* ефектите.

Таблица 17. *In vitro* анти-ентеровирусна активност на съединения 446-481, 491-500, 512-522, 526-528 и 531.

Съединение ^a	Цитотоксичност CC ₅₀ (μM)	PV1		CVB1		CVB3	
		IC ₅₀ (μM)	SI	IC ₅₀ (μM)	SI	IC ₅₀ (μM)	SI
MDL-860	493.0	6.8	72.5	0.8	586.9	2.7	182.0
446	123.0	NA	–	NA	–	NA	–
447	175.0	NA	–	NA	–	NA	–
448	123.0	NA	–	NA	–	NA	–
449	332.0	30.6	11.5	22.8	14.5	NA	–
450	346.6	NA	–	NA	–	NA	–
451	280.0	NA	–	NA	–	NA	–
452	450.0	NA	–	NA	–	NA	–
453	576.0	NA	–	NA	–	NA	–
454	423.0	NA	–	NA	–	NA	–
455	367.0	NA	–	142.0	2.5	NA	–
456	165.0	NA	–	NA	–	NA	–
457	10.1	NA	–	NA	–	NA	–
458	291.0	NA	–	12.7	22.9	NA	–
459	680.0	NA	–	NA	–	54.0	12.5
460	47.1	NA	–	NA	–	NA	–
461	195.0	79.0	2.4	NA	–	NA	–
462	287.0	22.8	12.6	NA	–	NA	–
463	18.7	1.0	18.7	NA	–	NA	–
464	95.0	11.0	8.6	NA	–	NA	–
465	199.0	32	6.2	2.1	95	NA	–
466	572.0	NA	–	NA	–	NA	–
467	219.0	6.8	32.2	NA	–	NA	–
468	272.0	NA	–	NA	–	NA	–
469	30.7	1.8	17.0	NA	–	NA	–
470	92.0	NA	–	NA	–	NA	–
471	547.0	NA	–	NA	–	NA	–
472	785.0	11.0	71.3	6.4	122.6	6.8	115.4
473	234.0	2.7	86.6	6.1	38.3	NA	–
474	342.0	NA	–	2.9	117.9	NA	–
475	200.0	4.3	46.0	NA	–	NA	–
476	155.0	10.0	15.5	NA	–	NA	–
477	30.5	5.2	5.8	NA	–	NA	–
478	107.0	1.0	107	NA	–	NA	–
479	215.0	NA	–	NA	–	NA	–
480	493.0	NA	–	3.7	133.2	1.0	493.0
481	273.0	NA	–	NA	–	NA	–
491	132.0	NA	–	NA	–	NA	–
492	211.0	NA	–	NA	–	NA	–
493	187.5	NA	–	24.9	7.5	NA	–
494	161.3	NA	–	NA	–	NA	–
495	13.6	NA	–	NA	–	NA	–
496	14.6	NA	–	NA	–	NA	–
497	16.5	NA	–	NA	–	NA	–
498	18.7	NA	–	3.1	6.0	NA	–
500	349.2	NA	–	NA	–	NA	–
512	651.0	NA	–	NA	–	NA	–
513	332.6	NA	–	NA	–	NA	–
514	336.7	NA	–	NA	–	NA	–
515	495.4	NA	–	NA	–	NA	–
516	617.0	255.0	2.4	NA	–	NA	–
517	12.6	NA	–	NA	–	NA	–
518	346.6	NA	–	NA	–	NA	–
519	199.0	NA	–	NA	–	NA	–
520	55.4	NA	–	NA	–	NA	–
521	336.4	NA	–	NA	–	NA	–
522	454.0	NA	–	NA	–	NA	–
526	332.8	NA	–	NA	–	NA	–
527	94.2	NA	–	NA	–	NA	–
528	339.9	NA	–	NA	–	NA	–
531	22.8	NA	–	NA	–	NA	–

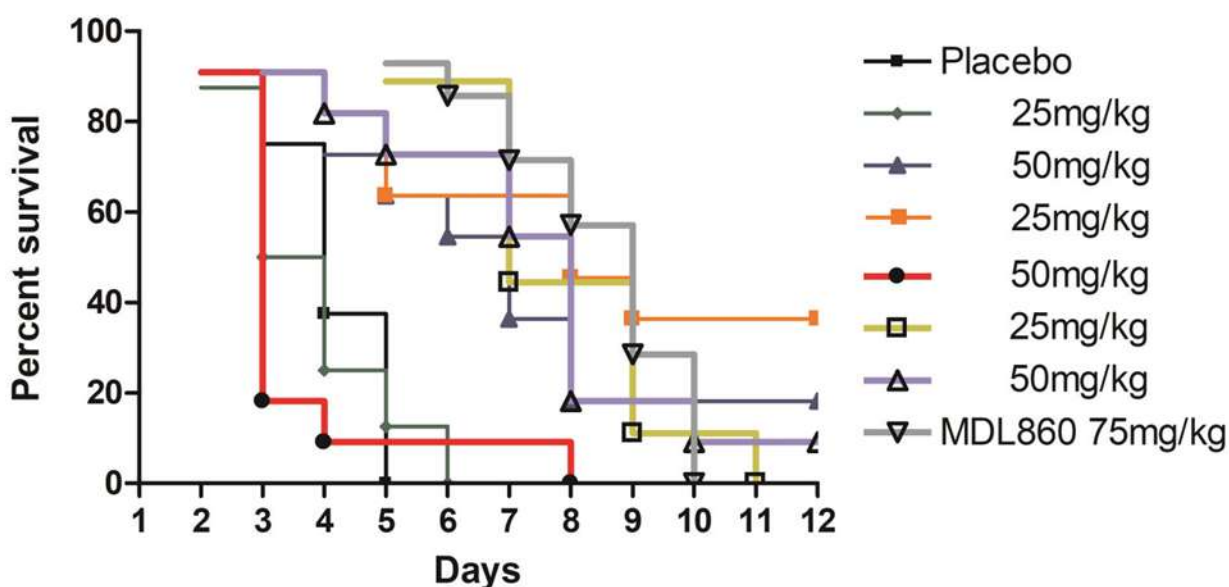
^a MDL-860 е използвано като референт.

NA – не е активно

Таблица 18. *In vivo* активности на съединения **472**, **474** и **480** срещу експериментална CVB1 невроинфекция при новородени мишки. Данните са усреднени от 3 експеримента.

Съединение/ Доза	Оцелели/ Общо	MST±SD, дни ^a	Δ, дни	Смъртност, %	PI, %
472/25 mg/kg	0/16	3.2±0.5 ^{ns}	0.2	100	0
472/50 mg/kg	3/21	5.4±0.5 ^{ns}	+2.4	86	14.2
474/25 mg/kg	6/23	7.0±1.0 ^{**}	+4.0	74	26
474/50 mg/kg	0/26	3.1±0.4 ^{ns}	+0.1	100	0
480/25 mg/kg	0/17	6.1±0.8 [*]	+3.1	100	0
480/50 mg/kg	1/23	4.6±0.6 ^{ns}	+1.6	96	4.3
MDL-860	0/27	6.1±0.9 [*]	+3.1	100	0
Плацебо	0/16	3.0 ±0.3	–	100	0

^a One-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparison post-test); MST – средно време на оцеляване; PI – индекс на защита; SD – стандартно отклонение; ^{**}*p*<0.01 спрямо плацебо групата; ^{*}*p*<0.05 спрямо плацебо групата; ns – не е значително



Фигура 12. Индивидуални ефекти за съединения **472** (зелено и сиво), **474** (оранжево и червено) и **480** (жълто и сиво) при експериментална CVB1 невроинфекция при новородени мишки. MDL-860 е използвано като референтно съединение.

Синтез и QSAR анализ на диарил етери и техните аналози като широкоспектърни антивирусни средства

Коронавирусите са вид едноверижни вируси с положителна РНК, които причиняват заболяване при птици и бозайници. При хората те причиняват инфекции на дихателните пътища, които могат да варират от леки (като обикновена настинка от коронавируси 229Е и OC43 (HCoV-229Е и HCoV-OC43)), до животозастрашаващи състояния (като тежък остър респираторен синдром (SARS-CoV)). Способността на този тип вируси да се развият в глобални епидемии, засягащи огромен процент от населението на света и причинявайки огромни материални и икономически щети, е добре известна. В края на 2019 г. в град Ухан, Китай, започна нова епидемия от коронавирус SARS, чийто причинител е описан като SARS-CoV-2, а специфичната форма на заболяването се нарича COVID-19. За няколко месеца заразата завладя планетата и започна пандемия, безпрецедентна по брой жертви и икономически щети, като това беше първата пандемия от такъв мащаб от 1918 г. (времето

на т. нар. "испански грип"). Относително по-високата смъртност в сравнение с други вирусни инфекции, огромните икономически щети, нарушеното функциониране на всички общества по света, превръщат пандемията от коронавирус в най-голямото предизвикателство пред човечеството днес.

Борбата с тези вирусни патогени включва различни подходи, но засега те са недостатъчни, за да осигурят ефективна изкореняване на причинените заболявания. Инфекциите с вируса на херпес симплекс (HSV) са нелечими, но има някои антивирусни лекарства, които показват активност срещу вируса под формата на намаляване на тежестта и продължителността на лезиите, свързани с огнището. Антивирусни агенти като ацикловир²¹⁶ и валацикловир могат да намалят степента на размножаване.²¹⁷ Установено е също, че много природни продукти показват обещаваща анти-HSV активност.²¹⁸ Понастоящем за човешкият аденовирус (HAdV) няма прието химиотерапевтично лечение. Вместо това различните симптоми, които могат да се развият от инфекция с човешки аденовирус се лекуват независимо, като например се предписват антибиотици за борба с вторични бактериални инфекции. В тежки случаи може да се приложи антивирусното лекарство *cidofovir*,²¹⁹ но неговата ефективност е под въпрос. Ваксина срещу някои видове HAdV е налична за армията на Съединените щати, но не и за останалото население.

Огромна напредък в борбата с PV1 е постигнат с въвеждането на полиомиелитната ваксина. Вирусът на полиомиелит обаче все още не е напълно изкоренен в страни като Афганистан, Пакистан и Таджикистан, където поради различни фактори ваксината не е достъпна за около 5-25% от децата.²²⁰ Няма ефективна и одобрена химиотерапия срещу PV1 инфекции съществуват. Същото важи и за инфекциите с *Coxsackie B*.

Възможностите за химиотерапевтично лечение на коронавирусните инфекции са изключително ограничени. Само антивирусният агент ремдезивир има официално разрешение от Американската агенция по храните и лекарствата (FDA) за употреба срещу COVID-19.²²¹ Това лекарство обаче също е доста противоречиво поради ограничената си ефективност и много странични ефекти. Липсата на ефективни и общопризнати лекарства срещу COVID-19 остава сериозен проблем и основен източник на несигурност по отношение на бъдещото развитие на пандемията. Големи усилия се полагат в областта на имунологията, откъдето идват някои забележителни резултати – в ход е масова ваксинация на населението, която засега допринася за ограничаване на пандемията, но все още не дава изгледи за нейния скорошен край.

Отдавна е известно, че диарилите етери проявяват антивирусни свойства. Голям брой техни аналози са синтезирани в рамките на наши предишни изследвания.^{18,210} Установена е тяхната *in vitro* и *in vivo* антивирусна активност. Открити са много съединения с отлично действие срещу различни ентеровируси. Въпреки обещаващите резултати, този клас съединения никога не е бил тестван срещу по-широк спектър от вируси, извън групата на пикорнавирусите/ентеровирусите. Целта на настоящото изследване е синтезът на нови диарил етери (аналози на MDL-860) и скринингът на тяхната *in vitro* активност срещу панел от различни вируси. Освен това QSAR моделите са получени за панел от новосинтезирани съединения, както и съединения, докладвани в нашите предишни проучвания. Моделите предоставят ценна представа за структурните/физикохимични характеристики на съединенията, които са от съществено значение за набора от изследвани антивирусни дейности. Молекулярният дизайн на съединенията в това изследване се основава на предишния ни опит в приготвянето на нови диарилите етери като антивирусни средства.^{18,210} Получени са няколко малки серии от съединения (Фигура 13), съдържащи два ароматни фрагмента, свързани с хетероатом X.

Първата серия се основава на продължаването на синтеза на нови диарилите етери, притежаващи класическата позиция на нитро- и циано- групите в едно ароматно ядро, както в MDL-860 (X=O, Фигура 13a). Другата серия се основава на дихало- заместено южно полукълбо, и северно полукълбо с две електрон-акцепторни групи в позиции 2 и 4 (Фигура 13b).

Същата процедура се използва за получаване на диарил тиоестер **573** от тиофенол **551**, и на амини **574-575** от вторични амини **552-553**, съответно. Диарил етери **577** и **578** се получават впоследствие от продукти **557** и **559** чрез използване на различни синтетични процедури (Схема 26). Кондензацията на **557** с барбитурова киселина (**576**) в гореща вода води до диарил етер **577** с отличен добив. Диол **578** се синтезира чрез реакция на **559** с разтвор на BBr_3 при $-78^\circ C$.

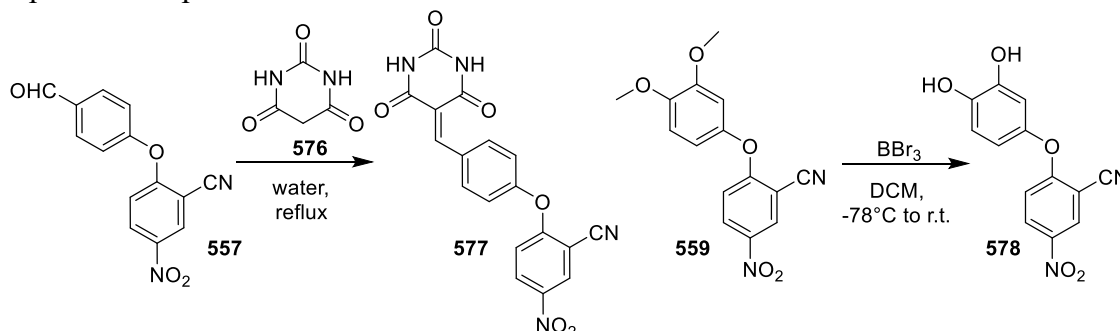


Схема 26. Синтез на съединения **577-578**.

Малка серия от диарил етер-киселини **583-587** беше постигната чрез реакция на 2-хлоро-5-нитробензоена киселина (**579**) с халофеноли **386**, **437** и **580-582**, съответно (Схема 27). Реакциите се провеждат в сух DMF при $120^\circ C$ и присъствие на K_2CO_3 като база. Киселини **583-585** впоследствие се превръщат в техните първични амиди **588-590** с етил хлороформат и NH_4Cl в Et_3N/THF среда. Както в случая на съединения от Схема 25, синтезът на диарил етери **595-601** и диарил тиоестер **603** се осъществява чрез използване на K_3PO_4 в сух DMSO (Схема 28).

Съединение **554** беше синтезирано преди това и използвано като междинен продукт.²²² Синтезът на **559** и **583** и тяхната активност срещу някои пикорна вируси също беше спомената.^{205,223} *Pürstinger et al.* получи **558** и тества активността му срещу CVB3 вирус.²⁰⁶

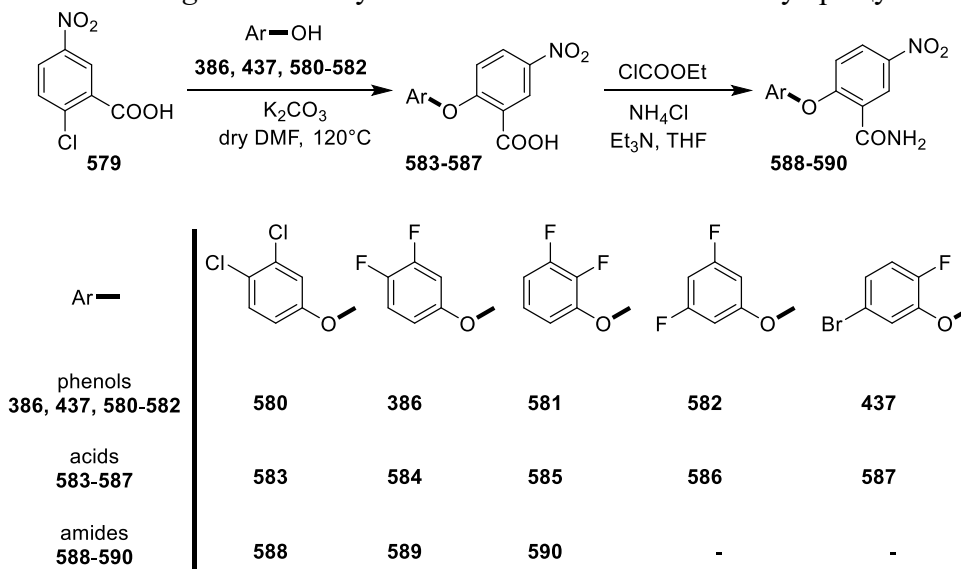


Схема 27. Синтез на съединения **583-590**.

В резултат на нашия QSAR анализ (вижте по-долу), съединения **606-607** бяха синтезирани впоследствие (Схема 29). Техният дизайн е вдъхновен не само от заключенията на QSAR, но също така те са избрани да бъдат и аналози на фенофибрат – лекарство, използвано за лечение на аномални нива на липидите в кръвта. Интересното е, че последните проучвания разкриват, че това съединение може значително да намали инфекцията със SARS-CoV-2 *in vitro*.²²⁴

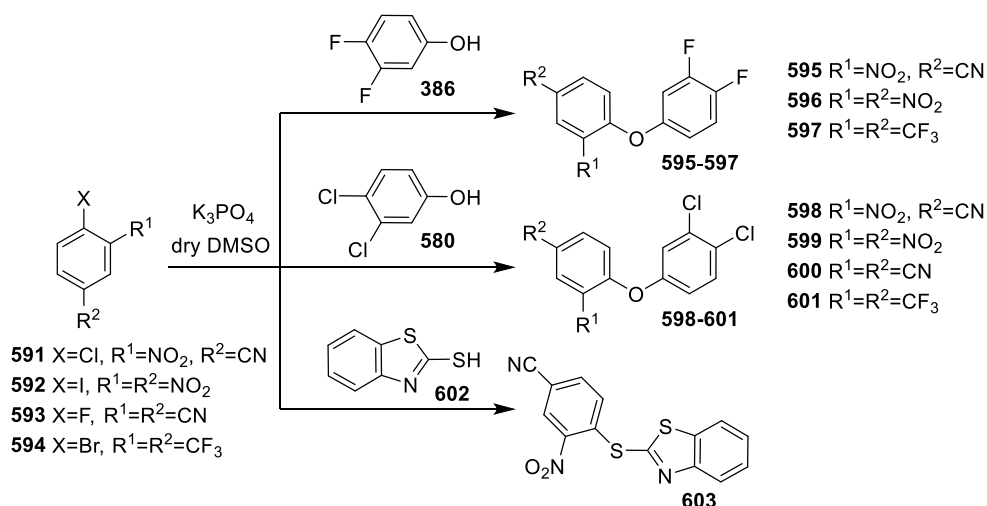


Схема 28. Синтез на съединения **595-601**, **603**.

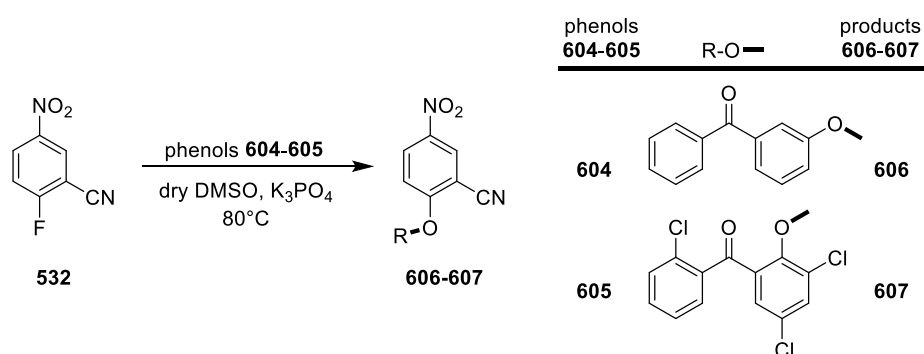


Схема 29. Синтез на съединения **606-607**.

In vitro антивирусна активност на съединения **554-575**, **577-578**, **583-590**, **595-601**, **603** и **606-607**

Всичките 42 синтезирани съединения²²⁵ бяха тествани *in vitro* срещу шест вируса (Таблица 19), а именно PV1, CVB1, CVB3, човешки аденовирус С серотип 5 (HAdV-5), херпес симплекс вирус тип 1 (HSV-1) и човешки коронавирус OC43 (HCoV-OC43). Съединение MDL-860 беше синтезирано съгласно описаната процедура²⁰⁶ и използвано като референтно в това изследване. Две съединения в тази серия могат да бъдат очертани като забележително активни - **555** към HCoV-OC43 и **556** към HAdV-5 (SI 97.4 и 99.7, съответно). Интересното е, че **556** демонстрира доста различна цитотоксичност спрямо различни клетъчни линии – от 20 до 698 μM. Амидът **588** и бензофенонът **606** са умерено активни спрямо HCoV-OC43 (SI 57 и 48.7, съответно). Както в предишните ни проучвания,^{18,210} съединенията демонстрират силна селективност към различни вируси, без да се наблюдава широкоспектърна активност. Интересно е да се отбележи, че MDL-860 е неактивен спрямо HAdV-5, HSV-1 и HCoV-OC43 и обратно - всички синтезирани съединения в това проучване²²⁵ не са активни срещу PV1, CVB1 и CVB3.

Таблица 19. *In vitro* антивирусна активност на съединения 554-575, 577-578, 583-590, 595-601, 603 и 606-607.^[a]

Съед.	HEP-2 CC ₅₀ ^[b]	PV1		CVB1		CVB3		HAdV-5		MDBK CC ₅₀ ^[b]	HSV-1		HCT-8 CC ₅₀ ^[b]	HCoV-OC43	
		IC ₅₀ ^[b]	SI	IC ₅₀ ^[b]	SI	IC ₅₀ ^[b]	SI	IC ₅₀ ^[b]	SI		IC ₅₀ ^[b]	SI		IC ₅₀ ^[b]	SI
MDL-860	493±27	6.8±2.0	72.5	0.8±0.02	616.3	2.7±0.1	182.6	NA	-	90±2.5	NA	-	174±11	69±3.3	2.5
554	658±30	NA	-	NA	-	NA	-	123±4.3	5.3	490±22	170±11	2.9	416±34	NA	-
555	402±31	NA	-	NA	-	60±2.0	6.7	17.9±1.0	22.5	400±33	NA	-	341±25	3.5±0.01	97.4
556	698±25	NA	-	NA	-	129±4.0	5.4	7.0±0.2	99.7	20±1.5	NA	-	253±23	NA	-
557	187±5.9	NA	-	NA	-	NA	-	70±2.1	2.7	260±25	NA	-	579±50	300±22	1.9
558	196±10	NA	-	NA	-	NA	-	22±1.3	8.9	235±21	NA	-	570±55	NA	-
559	750±32	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	520±34	NA	-	320±26	NA	-
560	443±29	NA	-	78±3.0	5.7	NA	-	33.9±2.1	13.1	550±26	32±1.8	17.2	262±22	90±4.7	2.9
561	667±34	NA	-	NA	-	431±21	1.5	77±3.1	8.7	615±33	NA	-	333±24	39±2.7	8.5
562	420±12	NA	-	107±8.0	3.9	NA	-	87±2.3	4.8	530±24	230±12	2.3	381±30	NA	-
563	460±26	NA	-	NA	-	NA	-	20.7±1.2	22.2	600±56	24±1.8	25.0	363±30	NA	-
564	160±8.2	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	580±46	30±1.8	19.3	3.1±0.1	NA	-
565	170±10	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	170±10	55±4.7	3.1	80±4.6	NA	-
566	231±11	NA	-	33.2±2.0	7.0	NA	-	NA	-	540±35	NA	-	438±34	NA	-
567	200±15	NA	-	NA	-	NA	-	73.5±3.4	2.7	360±24	18±0.9	20.0	135±11	42±33	3.2
568	214±15	NA	-	NA	-	25±1.3	8.6	100±8.2	2.1	215±19	NA	-	82±5.4	NA	-
569	405±21	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	610±34	NA	-	160±10	11±0.9	14.5
570	581±32	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	610±45	NA	-	570±45	100±8.9	5.7
571	624±34	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	680±45	67±3.7	10.1	654±56	NA	-
572	724±41	NA	-	NA	-	267±18	2.7	67±3.1	10.8	610±44	70±5.8	8.7	495±40	NA	-
573	210±11	NA	-	NA	-	100±6	2.1	NA	-	255±21	NA	-	196±10	7.5±0.6	26.1
573	17.0±0.5	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	680±46	NA	-	196±12	NA	-
575	520±29	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	550±34	NA	-	561±45	60±4.2	9.4
577	302±16	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	640±49	250±21	2.6	447±40	122±10	3.7
578	183±9.4	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	100±4.9	66±5.5	1.5	356±30	NA	-
583	287±13	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	380±23	NA	-	192±12	NA	-
584	581±23	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	520±45	NA	-	698±57	NA	-
585	597±31	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	490±34	NA	-	597±46	NA	-
586	589±27	NA	-	NA	-	NA	-	102±7.2	5.8	545±41	NA	-	256±20	NA	-
587	404±30	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	520±49	NA	-	597±50	86±7.9	6.9
588	581±34	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	530±45	NA	-	627±58	11±1.0	57.0
589	505±35	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	580±50	NA	-	623±58	NA	-
590	637±38	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	620±56	NA	-	723±66	NA	-
595	476±28	NA	-	NA	-	63±2.0	7.6	180±5.9	2.6	120±9.4	NA	-	161±14	NA	-
596	9.1±0.8	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	9.3±0.4	NA	-	205±18	51±2.9	4.0
597	205±11	NA	-	NA	-	205±12	-	NA	-	100±7.8	NA	-	170±11	170±9	-
598	200±14	NA	-	NA	-	25±1.0	8.0	18.0±0.9	11.1	620±45	NA	-	152 12	NA	-
599	58±2.0	NA	-	NA	-	34±1.2	1.7	32±2.1	1.8	8.5±0.5	4.7±0.2	1.8	654±60	170±10	3.8
600	245±10	NA	-	NA	-	NA	-	81±4.5	3.0	580±35	NA	-	192±11	77±6.0	2.5
601	74±3.0	NA	-	NA	-	NA	-	61±3.2	1.2	73±4.8	NA	-	209±18	73±4.6	2.9
603	27±1.0	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	48±3.7	NA	-	47±2.7	NA	-
606	530±14	NA	-	NA	-	100±4	5.3	NA	-	38±2.5	NA	-	151±9	3.1±0.2	48.7
607	105±3.1	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	5±0.3	0.3±0.02	16.6	64±2	NA	-

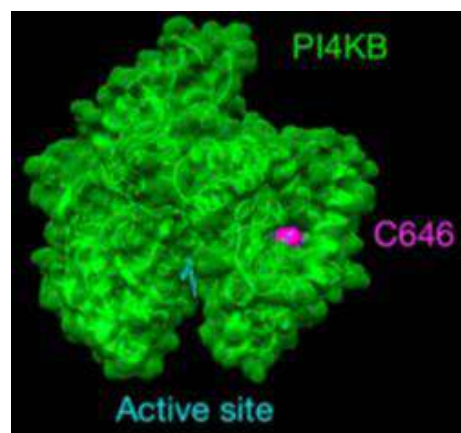
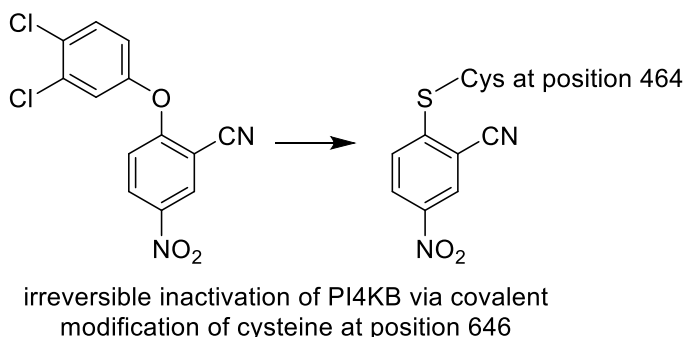
^[a] NA – не е активно; CC₅₀ – *in vitro* цитотоксичност (в µM); IC₅₀ – *in vitro* антивирусна активност при експеримент в клетъчна култура (в µM); SI – индекс на селективност като съотношение между CC₅₀ и IC₅₀; ^[b] CC₅₀ и IC₅₀ стойностите са усреднени от 3 експеримента.

Механизъм на действие на MDL-860 (кратко описание)

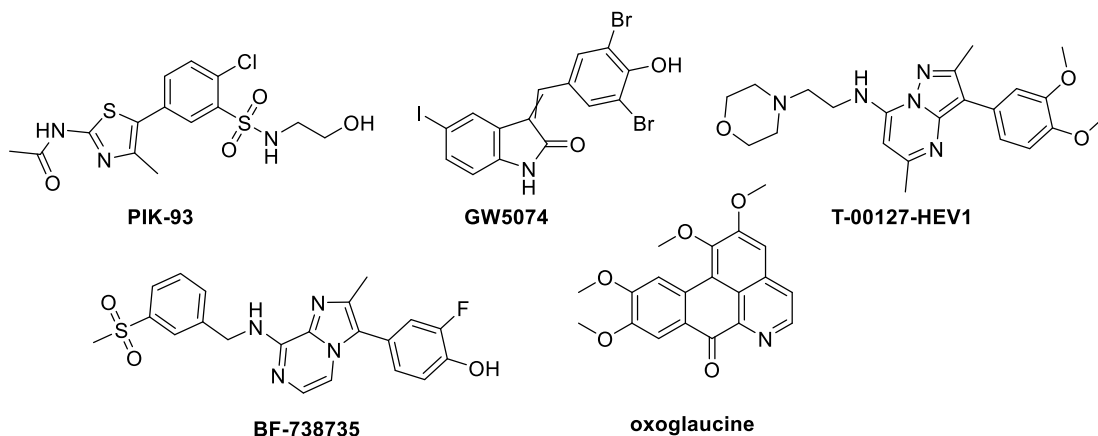
За да разберем механизма на действие, първо анализирахме спецификата на антивирусния ефект на MDL-860. Това съединение показва умерена анти-PV активност (EC_{50} от $6.8 \mu M$) с видима липса на цитотоксичност в изследваните концентрации ($CC_{50} > 100 \mu M$ и $SI > 14$). MDL-860 не инхибира репликацията на вируса на енцефаломиокардит (EMCV), което предполага, че MDL-860 е атипично енвиросим-подобно съединение, вероятно насочено към ензима фосфатидилинозитол-4 киназа III бета (PI4KB). Освен това открихме, че MDL-860 засяга активността на PI4KB само *in vivo*. Ние също така открихме необратим анти-PV ефект върху клетките и активиране на някои антиоксидантни пътища.

Въпреки ефективността, целта и механизмът на действие на MDL-860 бяха неизвестни. В това проучване²⁰³ ние характеризирахме антиполиовирусната активност на MDL-860 и идентифицирахме гостоприемник (PI4KB) като цел. Тази работа разкрива механизма на действие на този клас инхибитори на PI4KB и предлага предположения за нова алостерична регулация на активността на PI4KB. Накратко, лечението с MDL-860 причинява ковалентна модификация и необратимо инактивиране на PI4KB (Фигура 14). Цистеинов остатък при аминокиселина 646 на PI4KB беше идентифициран като целево място на MDL-860. Този остатък се намира на дъното на повърхностен джоб (извън активния център на ензима).

PI4KB е една от четирите PI4 кинази на бозайници (PI4K2A, PI4K2B, PI4KA и PI4KB). Този ензим е от съществено значение в човешките клетки и произвежда фосфатидилинозитол 4-фосфат (PI4P) и участва в транспортирането на керамиди, мембранния трафик от *Golgi* и нормалната функция на лизозомата. Значението на PI4KB в репликацията на ентеровирус е признато за първи път от *Hsu et al.* с мощен инхибитор на PI4KB PIK93.^{215,226} Впоследствие PI4KB беше идентифициран като мишена на група кандидати за лекарства срещу пикорнавирус, известни като енвиросим-подобни съединения - т.е. енвиросим, Ro 09-0179, оксоглауцин, GW5074, T-00127-HEV1, и BF-738735 (виж Фигура 15).²²⁷⁻²³²



Фигура 14. Механизъм на действие на MDL-860.



Фигура 15. Мощни инхибитори на ензима PI4KB.

4. REFERENCES

- (1) Hayman, J. *Mycobacterium Ulcerans*: An infection from Jurassic time? *The Lancet* **1984**, 324 (8410), 1015.
- (2) Fernandes, G. F. S.; Thompson, A. M.; Castagnolo, D.; Denny, W. A.; Dos Santos, J. L. Tuberculosis drug discovery: Challenges and new horizons. *Journal of Medicinal Chemistry* **2022**, 65 (11), 7489.
- (3) Perveen, S.; Kumari, D.; Singh, K.; Sharma, R. Tuberculosis drug discovery: Progression and future interventions in the wake of emerging resistance. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2022**, 229, 114066.
- (4) Joshi, J. M. Tuberculosis chemotherapy in the 21 century: Back to the basics. *Lung India* **2011**, 28 (3), 193.
- (5) World Health Organization. *WHO Consolidated Guidelines on Tuberculosis. Module 4: Treatment - Drug-Resistant Tuberculosis Treatment*; WHO: Geneva, 2020.
- (6) Worley, M. V.; Estrada, S. J. Bedaquiline: A novel antitubercular agent for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* **2014**, 34 (11), 1187.
- (7) Field, S. K. Bedaquiline for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: great promise or disappointment? *Therapeutic Advances in Chronic Disease* **2015**, 6 (4), 170.
- (8) Yuan, T.; Sampson, N. S. Hit generation in TB drug discovery: From genome to granuloma. *Chemical Reviews* **2018**, 118 (4), 1887.
- (9) Brown, D. G.; Boström, J. Where do recent small molecule clinical development candidates come from? *Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, 61 (21), 9442.
- (10) Kumar, V.; Patel, S.; Jain, R. New structural classes of antituberculosis agents. *Medicinal Research Reviews* **2018**, 38 (2), 684.
- (11) Prasad, M. S.; Bhole, R. P.; Khedekar, P. B.; Chikhale, R. V. Mycobacterium enoyl acyl carrier protein reductase (InhA): A key target for antitubercular drug discovery. *Bioorganic Chemistry* **2021**, 115, 105242.
- (12) Daben, J. L. M.; Boshoff, H. I. M.; Barry, C. E. The present state of the tuberculosis drug development pipeline. *Current Opinion in Pharmacology* **2018**, 42, 81.
- (13) Campaniço, A.; Moreira, R.; Lopes, F. Drug discovery in tuberculosis. New drug targets and antimycobacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, 150, 525.
- (14) An, Q.; Li, C.; Chen, Y.; Deng, Y.; Yang, T.; Luo, Y. Repurposed drug candidates for antituberculosis therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, 192, 112175.
- (15) Urban, M.; Šlachťová, V.; Brulíková, L. Small organic molecules targeting the energy metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, 212, 113139.
- (16) Fernandes, G. F.; Man Chin, C.; Dos Santos, J. L. Advances in drug discovery of new antitubercular multidrug-resistant compounds. *Pharmaceuticals* **2017**, 10 (2), 51.
- (17) Rotbart, H. A. Treatment of picornavirus infections. *Antiviral Research* **2002**, 53 (2), 83.
- (18) Dobrikov, G. M.; Slavchev, I.; Nikolova, I.; Stoyanova, A.; Nikolova, N.; Mukova, L.; Nikolova, R.; Shivachev, B.; Galabov, A. S. Synthesis and anti-enterovirus activity of new analogues of MDL-860. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2017**, 27 (19), 4540.
- (19) Cathcart, A. L.; Baggs, E. L.; Semler, B. L. In *Reference Module in Biomedical Sciences*; Elsevier, 2015.
- (20) Baggen, J.; Thibaut, H. J.; Strating, J. R. P. M.; van Kuppeveld, F. J. M. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nature Reviews Microbiology* **2018**, 16 (6), 368.
- (21) Wilkinson, R. G.; Shepherd, R. G.; Thomas, J. P.; Baughn, C. Stereospecificity in a new type of synthetic antituberculous agent. *Journal of the American Chemical Society* **1961**, 83 (9), 2212.

- (22) Thomas, J. P.; Baughn, C. O.; Wilkinson, R. G.; Shepherd, R. G. A new synthetic compound with antituberculous activity in mice: Ethambutol (dextro-2,2'-(ethylenediimino)-di-1-butanol). *American Review of Respiratory Disease* **1961**, 83 (6), 891.
- (23) Trost, B. M.; Bunt, R. C.; Lemoine, R. C.; Calkins, T. L. Dynamic kinetic asymmetric transformation of diene monoepoxides: A practical asymmetric synthesis of vinylglycinol, vigabatrin, and ethambutol. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122 (25), 5968.
- (24) Lee, R. E.; Mikusova, K.; Brennan, P. J.; Besra, G. S. Synthesis of the arabinose donor .beta.-D-arabinofuranosyl-1-monophosphoryldecaprenol, development of a basic arabinosyl-transferase assay, and identification of Ethambutol as an arabinosyl transferase inhibitor. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117 (48), 11829.
- (25) Zhang, J.; Khoo, K.-H.; Wu, S.-W.; Chatterjee, D. Characterization of a distinct arabinofuranosyltransferase in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129 (31), 9650.
- (26) Alderwick, L. J.; Seidel, M.; Sahm, H.; Besra, G. S.; Eggeling, L. Identification of a novel arabinofuranosyltransferase (AftA) involved in cell wall arabinan biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, 281 (23), 15653.
- (27) Shepherd, R. G.; Baughn, C.; Cantrall, M. L.; Goodstein, B.; Thomas, J. P.; Wilkinson, R. G. Structure-activity studies leading to ethambutol, a new type of antituberculous compound. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1966**, 135 (2), 686.
- (28) Häusler, H.; Kawakami, R. P.; Mlaker, E.; Severn, W. B.; Stütz, A. E. Ethambutol analogues as potential antimycobacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2001**, 11 (13), 1679.
- (29) Lee, R. E.; Protopopova, M.; Crooks, E.; Slayden, R. A.; Terrot, M.; Barry, C. E. Combinatorial lead optimization of [1,2]-diamines based on ethambutol as potential antituberculosis preclinical candidates. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2003**, 5 (2), 172.
- (30) Boshoff, H. I. M.; Myers, T. G.; Copp, B. R.; McNeil, M. R.; Wilson, M. A.; Barry, C. E., III. The transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* to inhibitors of metabolism: Novel insights into drug mechanisms of action. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279 (38), 40174.
- (31) Reynolds, R. C.; Bansal, N.; Rose, J.; Friedrich, J.; Suling, W. J.; Maddry, J. A. Ethambutol-sugar hybrids as potential inhibitors of mycobacterial cell-wall biosynthesis. *Carbohydrate Research* **1999**, 317 (1), 164.
- (32) Onajole, O. K.; Govender, K.; Govender, P.; van Helden, P. D.; Kruger, H. G.; Maguire, G. E. M.; Muthusamy, K.; Pillay, M.; Wiid, I.; Govender, T. Pentacyclo-undecane derived cyclic tetra-amines: Synthesis and evaluation as potent anti-tuberculosis agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 44 (11), 4297.
- (33) Andrianina Ralambomanana, D.; Razafimahefa-Ramilison, D.; Rakotohova, A. C.; Maugein, J.; Péliniski, L. Synthesis and antitubercular activity of ferrocenyl diaminoalcohols and diamines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, 16 (21), 9546.
- (34) Gao, M. Z.; Gao, J.; Xu, Z. L.; Zingaro, R. A. Synthesis of novel chiral macrolides and their antifungal activity. *Tetrahedron Letters* **2002**, 43 (28), 5001.
- (35) Dobrikov, G. M.; Valcheva, V.; Stoilova-Disheva, M.; Momekov, G.; Tzvetkova, P.; Chimov, A.; Dimitrov, V. Synthesis and *in vitro* antimycobacterial activity of compounds derived from (R)- and (S)-2-amino-1-butanol – The crucial role of the configuration. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 48, 45.
- (36) Dobrikov, G. M.; Valcheva, V.; Nikolova, Y.; Ugrinova, I.; Pasheva, E.; Dimitrov, V. Efficient synthesis of new (R)-2-amino-1-butanol derived ureas, thioureas and acylthioureas and *in vitro* evaluation of their antimycobacterial activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 63, 468.

- (37) Desrosiers, J.-N.; Côté, A.; Charette, A. B. Enantioselective synthesis of β -amino alcohols and α -amino acids via a copper catalyzed addition of diorganozinc reagents to *N*-phosphinoylimines. *Tetrahedron* **2005**, *61* (26), 6186.
- (38) Elliott, M. C.; Kruiswijk, E. Asymmetric hetero-Diels–Alder reactions of alkenyldihydrooxazoles. Synthesis of oxazolo[3,2-*c*]pyrimidines and related compounds. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1999**, (21), 3157.
- (39) Berglund, B. A.; Fleming, P. R.; Rice, K. C.; Shim, J. Y.; Welsh, W. J.; Howlett, A. C. Development of a novel class of monocyclic and bicyclic alkyl amides that exhibit CB1 and CB2 cannabinoid receptor affinity and receptor activation. *Drug Des Discov* **2000**, *16* (4), 281.
- (40) Wainer, I. W.; Alembik, M. C. Resolution of enantiomeric amides on a cellulose-based chiral stationary phase. Steric and electronic effects. *J Chromatogr* **1986**, *358* (1), 85.
- (41) Tang, X.; Zhang, D.; Jie, S.; Sun, W.-H.; Chen, J. Nickel(II) complexes bearing phosphinoxazoline ligands: Synthesis, structures and their ethylene oligomerization behaviors. *Journal of Organometallic Chemistry* **2005**, *690* (17), 3918.
- (42) Kumar, G. B.; Shah, A. C.; Cardin, C. J.; Trenkle, M. A substituted isoindolin-1-one derived from (*R*)-(-)-2-amino-1-butanol. *Acta Crystallographica Section C* **1999**, *55* (3), IUC9900019.
- (43) Allin, S. M.; Hodkinson, C. C.; Taj, N. Neighbouring group assistance in the formation of phthalimidines from *o*-phthalaldehyde: An "intramolecular auxiliary effect". *Synlett* **1996**, *1996* (08), 781.
- (44) Sikoraiová, J.; Marchalín, Š.; Chihab-Eddine, A.; Dařch, A. Diastereoselective access to chiral non-racemic [1,3]oxazolo-[2,3-*a*]isoindol-5-one ring systems via *O*-cationic cyclization. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2002**, *39* (2), 383.
- (45) Chung, J.-C.; Kong, K.-K.; Do, C.-K.; Paek, K.-H. In *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*; Maleimide monomer for forming copolymer with aliphatic cyclic olefin monomer for photoresist copolymer resin resist composition for semiconductor fabrication, 11228536 A: Japan, **1999**.
- (46) Matuszak, N.; Muccioli, G. G.; Labar, G.; Lambert, D. M. Synthesis and *in vitro* evaluation of *N*-substituted maleimide derivatives as selective monoglyceride lipase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52* (23), 7410.
- (47) Oishi, T.; Momoi, M.; Fujimoto, M.; Kimura, T. Reactivities of *N*-alkylitaconimides in radical copolymerizations with styrene or methyl methacrylate. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition* **1983**, *21* (4), 1053.
- (48) Pilati, T.; Kumar, G. B.; Shah, A. C. (*R*)-*N*-(1-Hydroxybut-2-yl)pyrrolidine-2,5-dione. *Acta Crystallographica Section C* **1999**, *55* (4), 612.
- (49) Tsuge, O.; Kanemasa, S.; Kuraoka, S.; Takenaka, S. New C–C bond formation with pyridinium methylide: Hydromethylenation of olefin. *Chemistry Letters* **1984**, *13* (2), 281.
- (50) Ananthan, S.; Faaleolea, E. R.; Goldman, R. C.; Hobrath, J. V.; Kwong, C. D.; Laughon, B. E.; Maddry, J. A.; Mehta, A.; Rasmussen, L.; Reynolds, R. C.; Secrist, J. A.; Shindo, N.; Showe, D. N.; Sosa, M. I.; Suling, W. J.; White, E. L. High-throughput screening for inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Tuberculosis* **2009**, *89* (5), 334.
- (51) Phetsuksiri, B.; Baulard Alain, R.; Cooper Andrea, M.; Minnikin David, E.; Douglas James, D.; Besra Gurdyal, S.; Brennan Patrick, J. Antimycobacterial activities of isoxyl and new derivatives through the inhibition of mycolic acid synthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1999**, *43* (5), 1042.
- (52) Phetsuksiri, B.; Jackson, M.; Scherman, H.; McNeil, M.; Besra, G. S.; Baulard, A. R.; Slayden, R. A.; DeBarber, A. E.; Barry, C. E., III; Baird, M. S.; Crick, D. C.; Brennan, P. J. Unique mechanism of action of the thiourea drug isoxyl on *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278* (52), 53123.
- (53) Liu, J.; Ren, H. P. Tuberculosis: Current treatment and new drug development. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* **2006**, *5* (4), 331.

- (54) Karakuş, S.; Rollas, S. Synthesis and antituberculosis activity of new *N*-phenyl-*N'*-[4-(5-alkyl/arylamino-1,3,4-thiadiazole-2-yl)phenyl]thioureas. *Il Farmaco* **2002**, *57* (7), 577.
- (55) Kim, T. H.; Min, J. K.; Lee, G.-J. One-pot synthesis of 2-phenylaminothiazolines from *N*-2-hydroxyethyl)-*N'*-phenylthioureas. *Tetrahedron Letters* **1999**, *40* (47), 8201.
- (56) Kim, T. H.; Lee, N.; Lee, G.-J.; Kim, J. N. A mild cyclodesulfurization of *N*-(2-hydroxyethyl)-*N'*-phenylthioureas to 2-phenylamino-2-oxazolines using TsCl/NaOH. *Tetrahedron* **2001**, *57* (33), 7137.
- (57) Bernacki, A. L.; Zhu, L.; Hennings, D. D. A selective and convenient method for the synthesis of 2-phenylaminothiazolines. *Organic Letters* **2010**, *12* (23), 5526.
- (58) Najer, H.; Chabrier, P.; Giudicelli, R. Sur quelques aralcoyl- ou arylamino-2 alcoyl-4 ou alcoyl-S oxazolines. *Bull. Chem. Soc. Fr.* **1959**, 1611.
- (59) Kubo, K.; Ito, N.; Isomura, Y.; Sozu, I.; Homma, H.; Murakami, M. Studies on the synthesis of condensed heterocyclic isoquinolone derivatives. I. Studies on the synthesis and pharmacology of thiazino, oxazino and pyrimido isoquinolones. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1979**, *27* (10), 2372.
- (60) Narasimhulu, M.; Mahesh, K. C.; Reddy, T. S.; Rajesh, K.; Venkateswarlu, Y. Lanthanum(III) nitrate hexahydrate or p-toluenesulfonic acid catalyzed one-pot synthesis of 4(3*H*)-quinazolinones under solvent-free conditions. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47* (26), 4381.
- (61) Desai, P.; Naik, B.; Desai, C. M.; Patel, D. Quinoline and quinazoline compounds as antitubercular agents. *Asian Journal of Chemistry* **1998**, *10*, 615.
- (62) Bandekar, P. P.; Roopnarine, K. A.; Parekh, V. J.; Mitchell, T. R.; Novak, M. J.; Sinden, R. R. Antimicrobial activity of tryptanthrins in *Escherichia coli*. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53* (9), 3558.
- (63) Gavrilov, K.; Tsarev, V.; Zheglov, S.; Korlyukov, A.; Antipin, M.; Davankov, V. P. *N*-bidentate phosphites with a chiral ketimine fragment, their application in enantioselective allylic substitution and comparison with phosphine analogues. *Synthesis* **2007**, *2007* (11), 1717.
- (64) Brown, E.; Penfornis, A.; Bayma, J.; Touet, J. Asymmetric reductions of ketones using lithium aluminium hydride modified with *N,N*-dialkyl derivatives of (*R*)-(-)-2-aminobutan-1-ol. *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, *2* (5), 339.
- (65) Brown, E.; Lézé, A.; Touet, J. Preparative synthesis of optically pure ortho-substituted benzhydrols by asymmetric reductions of the corresponding benzophenones. *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3* (7), 841.
- (66) Brown, E.; Chevalier, C.; Huet, F.; Le Grumelec, C.; Lézé, A.; Touet, J. Determination of the enantiomeric excesses of chiral acids by ¹⁹F NMR studies of their esters deriving from (*R*)-(+)-2-(trifluoromethyl)benzhydrol. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5* (7), 1191.
- (67) Corelli, F.; Summa, V.; Brogi, A.; Monteagudo, E.; Botta, M. Chiral azole derivatives. 2. Synthesis of enantiomerically pure 1-alkylimidazoles. *The Journal of Organic Chemistry* **1995**, *60* (7), 2008.
- (68) Zhao, J. U. N.; Zhou, W.; Yang, S.; Jin, D. Asymmetric reduction of ketones using optically active *N,N*-dialkyl-β-aminoalcohol-borane complexes. *Chinese Journal of Organic Chemistry* **1995**, *15* (1), 39.
- (69) Brown, E.; Lézé, A.; Touet, J. Synthesis of chiral alcohols by asymmetric reductions of various ketones including α-aminophenones. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7* (7), 2029.
- (70) Dullin, A.; Dufrasne, F.; Gelbcke, M.; Gust, R. Enantiomerically pure [1,2-diamino-1-(4-fluorophenyl)butane]platinum(II) complexes: Synthesis and antitumor activity against MCF-7 and MDA-MB 231 breast cancer and LnCaP/FGC prostate cancer cell lines. *Archiv der Pharmazie* **2004**, *337* (12), 654.

- (71) Schwerdtfeger, J.; Kolczewski, S.; Weber, B.; Fröhlich, R.; Hoppe, D. Stereoselective deprotonation of chiral and achiral 2-aminoalkyl carbamates: Synthesis of optically active β -amino alcohols via 1-oxy-substituted alkylolithium intermediates. *Synthesis* **1999**, 1999 (09), 1573.
- (72) Occhiato, E.; Bryan Jones, J. Probing enzyme stereospecificity. Inhibition of α -chymotrypsin and subtilisin Carlsberg by chiral amine- and aminoalcohol-derivatives. *Tetrahedron* **1996**, 52 (12), 4199.
- (73) Hartz, R. A.; Ahuja, V. T.; Arvanitis, A. G.; Rafalski, M.; Yue, E. W.; Denhart, D. J.; Schmitz, W. D.; Ditta, J. L.; Deskus, J. A.; Brenner, A. B.; Hobbs, F. W.; Payne, J.; Lelas, S.; Li, Y.-W.; Molski, T. F.; Mattson, G. K.; Peng, Y.; Wong, H.; Grace, J. E.; Lentz, K. A.; Qian-Cutrone, J.; Zhuo, X.; Shu, Y.-Z.; Lodge, N. J.; Zaczek, R.; Combs, A. P.; Olson, R. E.; Bronson, J. J.; Mattson, R. J.; Macor, J. E. Synthesis, structure-activity relationships, and *in vivo* evaluation of *N*³-Phenylpyrazinones as novel Corticotropin-Releasing Factor-1 (CRF1) receptor antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 52 (14), 4173.
- (74) Abdel-Magid, A. F.; Maryanoff, C. A. Reductive amination of aldehydes and ketones with weakly basic anilines using sodium triacetoxyborohydride. *Synlett* **1990**, 1990 (09), 537.
- (75) Abdel-Magid, A. F.; Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shah, R. D. Reductive amination of aldehydes and ketones with sodium triacetoxyborohydride. Studies on direct and indirect reductive amination procedures. *The Journal of Organic Chemistry* **1996**, 61 (11), 3849.
- (76) Abdel-Magid, A. F.; Mehrman, S. J. A review on the use of sodium triacetoxyborohydride in the reductive amination of ketones and aldehydes. *Organic Process Research & Development* **2006**, 10 (5), 971.
- (77) Leskovšek, V.; Urleb, U. A new approach to the synthesis of *N*-arylakyl aminoalcohols. *Synthetic Communications* **1994**, 24 (10), 1415.
- (78) Seayad, A. M.; Ramalingam, B.; Chai, C.; Nagata, T.; Yoshinaga, K. In *PCT Int. Appl.*; Chiral titanium catalyst systems for asymmetric cyanation of imines, WO 2009041919 A1, **2009**.
- (79) Seayad, A. M.; Chai, C.; Ramalingam, B.; Nagata, T.; Yoshinaga, K. In *PCT Int. Appl.*; Titanium compound and process for asymmetric cyanation of imines, WO 2008121076 A1, **2008**.
- (80) Boye, S. V.; Thinggaard, J. In *PCT Int. Appl.*; Nitrogen-containing compounds blocking binding of cytotoxic compounds to the megalin receptor for the prevention of druginduced cytotoxicity, including nephrotoxicity, WO 2008113364 A2, **2008**.
- (81) Cegla, M. *Polish Journal of Chemistry* **1986**, 59, 1265.
- (82) Li, B.-G.; Juan, A.; Bian, Z.-H.; Zhao, H.-Y. Synthesis and water sensitivity of ferrocenylmethylaminoalkoxysilanes. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao. (Chem. J. Chin. Universities)* **1996**, 17, 1725.
- (83) Vriamont, N.; Govaerts, B.; Grenouillet, P.; de Bellefon, C.; Riant, O. Design of a genetic algorithm for the simulated evolution of a library of asymmetric transfer hydrogenation catalysts. *Chemistry – A European Journal* **2009**, 15 (25), 6267.
- (84) Bair, K. W.; Tuttle, R. L.; Knick, V. C.; Cory, M.; McKee, D. D. [(1-Pyrenylmethyl)amino] alcohols, a new class of antitumor DNA intercalators. Discovery and initial amine side chain structure-activity studies. *Journal of Medicinal Chemistry* **1990**, 33 (9), 2385.
- (85) Canetti, G.; Rist, N.; Grosset, J. Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibacillary drugs by the method of proportions. Methodology, resistance criteria, results and interpretation. *Rev Tuberc Pneumol (Paris)* **1963**, 27, 217.
- (86) Canetti, G.; Fox, W.; Khomenko, A.; Mahler, H. T.; Menon, N. K.; Mitchison, D. A.; Rist, N.; Smelev, N. A. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull World Health Organ* **1969**, 41 (1), 21.

- (87) Krátký, M.; Vinšová, J.; Buchta, V.; Horvati, K.; Bösze, S.; Stolaříková, J. New amino acid esters of salicylanilides active against MDR-TB and other microbes. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *45* (12), 6106.
- (88) Férriz, J. M.; Vávrová, K.; Kunc, F.; Imramovský, A.; Stolaříková, J.; Vavříková, E.; Vinšová, J. Salicylanilide carbamates: Antitubercular agents active against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18* (3), 1054.
- (89) Kakwani, M. D.; Suryavanshi, P.; Ray, M.; Rajan, M. G. R.; Majee, S.; Samad, A.; Devarajan, P.; Degani, M. S. Design, synthesis and antimycobacterial activity of cinnamide derivatives: A molecular hybridization approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21* (7), 1997.
- (90) De, P.; Koumba Yoya, G.; Constant, P.; Bedos-Belval, F.; Duran, H.; Saffon, N.; Daffé, M.; Baltas, M. Design, synthesis, and biological evaluation of new cinnamic derivatives as antituberculosis agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54* (5), 1449.
- (91) Belanger, A. E.; Besra, G. S.; Ford, M. E.; Mikusová, K.; Belisle, J. T.; Brennan, P. J.; Inamine, J. M. The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93* (21), 11919.
- (92) *European Pharmacopoeia 3th Edition. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart* **1997**, 113.
- (93) Sortino, M.; Garibotto, F.; Cechinel Filho, V.; Gupta, M.; Enriz, R.; Zacchino, S. Antifungal, cytotoxic and SAR studies of a series of *N*-alkyl, *N*-aryl and *N*-alkylphenyl-1,4-pyrrolediones and related compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19* (9), 2823.
- (94) Doub, L.; Richardson, L. M.; Herbst, D. R.; Black, M. L.; Stevenson, O. L.; Bambas, L. L.; Youmans, G. P.; Youmans, A. S. Some phenylthiourea derivatives and their antituberculous activity. *Journal of the American Chemical Society* **1958**, *80* (9), 2205.
- (95) Sriram, D.; Yogeewari, P.; Dinakaran, M.; Thirumurugan, R. Antimycobacterial activity of novel 1-(5-cyclobutyl-1,3-oxazol-2-yl)-3-(sub)phenyl/pyridylthiourea compounds endowed with high activity toward multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2007**, *59* (6), 1194.
- (96) Nava-Zuazo, C.; Estrada-Soto, S.; Guerrero-Álvarez, J.; León-Rivera, I.; Molina-Salinas, G. M.; Said-Fernández, S.; Chan-Bacab, M. J.; Cedillo-Rivera, R.; Moo-Puc, R.; Mirón-López, G.; Navarrete-Vazquez, G. Design, synthesis, and in vitro antiprotozoal, antimycobacterial activities of *N*-{2-[(7-chloroquinolin-4-yl)amino]ethyl}ureas. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18* (17), 6398.
- (97) Tewari, N.; Tiwari, V. K.; Mishra, R. C.; Tripathi, R. P.; Srivastava, A. K.; Ahmad, R.; Srivastava, R.; Srivastava, B. S. Synthesis and bioevaluation of glycosyl ureas as α -glucosidase inhibitors and their effect on mycobacterium. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2003**, *11* (13), 2911.
- (98) Brown, J. R.; North, E. J.; Hurdle, J. G.; Morisseau, C.; Scarborough, J. S.; Sun, D.; Korduláková, J.; Scherman, M. S.; Jones, V.; Grzegorzewicz, A.; Crew, R. M.; Jackson, M.; McNeil, M. R.; Lee, R. E. The structure–activity relationship of urea derivatives as anti-tuberculosis agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19* (18), 5585.
- (99) Dover, L. G.; Coxon, G. D. Current status and research strategies in tuberculosis drug development. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54* (18), 6157.
- (100) Kim, T. H.; Lee, G.-J. Regiocontrolled cyclization reaction of *N*-(2-hydroxyethyl)ureas by transfer of activation: One-pot synthesis of 2-Imidazolidinones. *The Journal of Organic Chemistry* **1999**, *64* (8), 2941.
- (101) Kim, T. H.; Lee, G.-J.; Cha, M.-H. Investigation of the Mitsunobu reaction of *N*-(2-hydroxyethyl)-*N'*-phenyl-ureas. *Synthetic Communications* **1999**, *29* (16), 2753.

- (102) Zarzyka-Niemiec, I. Products of reaction between *N,N'*-Bis(2-hydroxyethyl)urea and ethylene carbonate and their application to obtain polyurethane foams. *Journal of Applied Polymer Science* **2009**, *114* (2), 1141.
- (103) Kim, T. H.; Cha, M.-H. Efficient synthesis of 2-methylaminothiazolines via Mitsunobu reaction of *N*-(2-hydroxyethyl)-*N'*-methyl-thioureas. *Tetrahedron Letters* **1999**, *40* (16), 3125.
- (104) Peng, H.; Liang, Y.; Chen, L.; Fu, L.; Wang, H.; He, H. Efficient synthesis and biological evaluation of 1,3-benzenedicarbonyl dithioureas. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21* (4), 1102.
- (105) Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, *65* (1), 55.
- (106) Dobrikov, G. M.; Valcheva, V.; Nikolova, Y.; Ugrinova, I.; Pasheva, E.; Dimitrov, V. Enantiopure antituberculosis candidates synthesized from (–)-fenchone. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *77*, 243.
- (107) Onajole, O. K.; Coovadia, Y.; Kruger, H. G.; Maguire, G. E. M.; Pillay, M.; Govender, T. Novel polycyclic ‘cage’-1,2-diamines as potential anti-tuberculosis agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *54*, 1.
- (108) P. Tripathi, R.; S. Bisht, S.; Ajay, A.; Sharma, A.; Misra, M.; Pd. Gupt, M. Developments in chemical approaches to treat tuberculosis in the last decade. *Current Medicinal Chemistry* **2012**, *19* (4), 488.
- (109) Dimitrov, V.; Dobrikov, G.; Genov, M. Chiral β - and γ -aminoalcohols derived from (+)-camphor and (–)-fenchone as catalysts for the enantioselective addition of diethylzinc to benzaldehyde. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12* (9), 1323.
- (110) Cremlyn, R. J. W. Sulphonohydrazides and related compounds. Part VIII. Some aryl carboxylic acid sulphonohydrazides. *Journal of the Chemical Society C: Organic* **1968**, 11.
- (111) Valeur, E.; Bradley, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews* **2009**, *38* (2), 606.
- (112) Quancard, J.; Labonne, A.; Jacquot, Y.; Chassaing, G.; Lavielle, S.; Karoyan, P. Asymmetric synthesis of 3-substituted proline chimeras bearing polar side chains of proteinogenic amino acids. *The Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69* (23), 7940.
- (113) Malwal, S. R.; Sriram, D.; Yogeewari, P.; Chakrapani, H. Synthesis and antimycobacterial activity of prodrugs of sulfur dioxide (SO₂). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22* (11), 3603.
- (114) Malwal, S. R.; Sriram, D.; Yogeewari, P.; Konkimalla, V. B.; Chakrapani, H. Design, synthesis, and evaluation of thiol-activated sources of sulfur dioxide (SO₂) as antimycobacterial agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55* (1), 553.
- (115) Janin, Y. L. Antituberculosis drugs: Ten years of research. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15* (7), 2479.
- (116) Nefzi, A.; Appel, J.; Arutyunyan, S.; Houghten, R. A. Parallel synthesis of chiral pentaamines and pyrrolidine containing bis-heterocyclic libraries. Multiple scaffolds with multiple building blocks: A double diversity for the identification of new antitubercular compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19* (17), 5169.
- (117) Slavchev, I.; Dobrikov, G. M.; Valcheva, V.; Ugrinova, I.; Pasheva, E.; Dimitrov, V. Antimycobacterial activity generated by the amide coupling of (–)-fenchone derived aminoalcohol with cinnamic acids and analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24* (21), 5030.
- (118) Landerer, A. *Anweisung zur Behandlung der Tuberculose mit Zimmtsäure*; F. C. W. Vogel, Leipzig, 1893.
- (119) Jacobson, M. J. Ethylcinnamate in experimental tuberculosis. *Bulletins et Mémoires de la Société Médicale des Hôpitaux de Paris* **1919**, *35*, 322.
- (120) Corper, H. J.; H., G.; A., G. W. Studies on the inhibitory action of sodium cinnamate in tuberculosis. *American Review of Tuberculosis* **1920**, *4*, 464.

- (121) Gainsborough, H. A note on the use of benzyl cinnamic ester in tuberculosis: The method of Jacobson. *The Lancet* **1928**, 211 (5462), 908.
- (122) Rastogi, N.; Goh, K. S.; Horgen, L.; Barrow, W. W. Synergistic activities of antituberculous drugs with cerulenin and trans-cinnamic acid against *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **1998**, 21 (2), 149.
- (123) Cegielski, J. P. Extensively drug-resistant tuberculosis: "There must be some kind of way out of here". *Clinical Infectious Diseases* **2010**, 50 (Supplement_3), S195.
- (124) Mata, R.; Morales, I.; Pérez, O.; Rivero-Cruz, I.; Acevedo, L.; Enriquez-Mendoza, I.; Bye, R.; Franzblau, S.; Timmermann, B. Antimycobacterial compounds from *Piper sanctum*. *Journal of Natural Products* **2004**, 67 (12), 1961.
- (125) Barnes, C. C.; Smalley, M. K.; Manfredi, K. P.; Kindscher, K.; Loring, H.; Sheeley, D. M. Characterization of an anti-tuberculosis resin glycoside from the prairie medicinal plant *Ipomoea leptophylla*. *Journal of Natural Products* **2003**, 66 (11), 1457.
- (126) Yoya, G. K.; Bedos-Belval, F.; Constant, P.; Duran, H.; Daffé, M.; Baltas, M. Synthesis and evaluation of a novel series of pseudo-cinnamic derivatives as antituberculosis agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19 (2), 341.
- (127) Lekphrom, R.; Kanokmedhakul, S.; Kanokmedhakul, K. Bioactive styryllactones and alkaloid from flowers of *Goniothalamus laoticus*. *Journal of Ethnopharmacology* **2009**, 125 (1), 47.
- (128) Carvalho, S. A.; da Silva, E. F.; de Souza, M. V. N.; Lourenço, M. C. S.; Vicente, F. R. Synthesis and antimycobacterial evaluation of new trans-cinnamic acid hydrazide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, 18 (2), 538.
- (129) Stavrov, G.; Philipova, I.; Valcheva, V.; Momekov, G. Synthesis and antimycobacterial activity of novel camphane-based agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, 24 (1), 165.
- (130) Stavrov, G.; Valcheva, V.; Philipova, I.; Doytchinova, I. Novel camphane-based anti-tuberculosis agents with nanomolar activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 70, 372.
- (131) Tsou, H.-R.; Overbeek-Klumpers, E. G.; Hallett, W. A.; Reich, M. F.; Floyd, M. B.; Johnson, B. D.; Michalak, R. S.; Nilakantan, R.; Discafani, C.; Golas, J.; Rabindran, S. K.; Shen, R.; Shi, X.; Wang, Y.-F.; Upeslakis, J.; Wissner, A. Optimization of 6,7-disubstituted-4-(arylamino)quinoline-3-carbonitriles as orally active, irreversible inhibitors of human epidermal growth factor receptor-2 kinase activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 48 (4), 1107.
- (132) Bergmann, E.; Bograchov, E. Some reactions of pyrene. *Journal of the American Chemical Society* **1940**, 62 (11), 3016.
- (133) Šmejkal, T.; Breit, B. A supramolecular catalyst for the decarboxylative hydroformylation of α,β -unsaturated carboxylic acids. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, 47 (21), 3946.
- (134) Slavchev, I. M.; Mitrev, Y.; Shivachev, B.; Valcheva, V.; Dogonadze, M.; Solovieva, N.; Vyazovaya, A.; Mokrousov, I.; Link, W.; Jiménez, L.; Cautain, B.; Mackenzie, T. A.; Portugal, I.; Lopes, F.; Capela, R.; Perdigão, J.; Dobrikov, G. M. Synthesis, characterization and complex evaluation of antibacterial activity and cytotoxicity of new arylmethylened ketones and pyrimidines with camphane skeletons. *ChemistrySelect* **2022**, 7 (17), e202201339.
- (135) Shokova, E. A.; Kim, J. K.; Kovalev, V. V. Camphor and its derivatives. Unusual transformations and biological activity. *Russian Journal of Organic Chemistry* **2016**, 52 (4), 459.
- (136) Petkova, Z.; Valcheva, V.; Momekov, G.; Petrov, P.; Dimitrov, V.; Doytchinova, I.; Stavrov, G.; Stoyanova, M. Antimycobacterial activity of chiral aminoalcohols with camphane scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, 81, 150.

- (137) Stavrakov, G.; Valcheva, V.; Philipova, I.; Doytchinova, I. Design of novel camphane-based derivatives with antimycobacterial activity. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2014**, *51*, 7.
- (138) Mikláš, R.; Miklášová, N.; Bukovský, M.; Horváth, B.; Kubincová, J.; Devínsky, F. Synthesis, surface and antimicrobial properties of some quaternary ammonium homochiral camphor sulfonamides. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2014**, *65*, 29.
- (139) Jubeen, F.; Iqbal, S. Z.; Shafiq, N.; Khan, M.; Parveen, S.; Iqbal, M.; Nazir, A. Eco-friendly synthesis of pyrimidines and its derivatives: A review on broad spectrum bioactive moiety with huge therapeutic profile. *Synthetic Communications* **2018**, *48* (6), 601.
- (140) Dhongade, H. J.; Dansena, H.; Kavita Chandrakar, K. Pharmacological potentials of pyrimidine derivative: a review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* **2015**, *8*, 171.
- (141) Koroleva, E.; N. Gusak, K.; V. Ignatovich, Z. Synthesis and applications of 2-aminopyrimidine derivatives as key intermediates in chemical synthesis of biomolecules. *Russian Chemical Reviews (Engl. Tr.)* **2010**, *79*, 655.
- (142) Altenbach, R. J.; Adair, R. M.; Bettencourt, B. M.; Black, L. A.; Fix-Stenzel, S. R.; Gopalakrishnan, S. M.; Hsieh, G. C.; Liu, H.; Marsh, K. C.; McPherson, M. J.; Milicic, I.; Miller, T. R.; Vortherms, T. A.; Warrior, U.; Wetter, J. M.; Wishart, N.; Witte, D. G.; Honore, P.; Esbenshade, T. A.; Hancock, A. A.; Brioni, J. D.; Cowart, M. D. Structure–activity studies on a series of a 2-aminopyrimidine-containing histamine H4 receptor ligands. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51* (20), 6571.
- (143) Zhang, M.; Thurmond, R. L.; Dunford, P. J. The histamine H4 receptor: A novel modulator of inflammatory and immune disorders. *Pharmacology & Therapeutics* **2007**, *113* (3), 594.
- (144) de Esch, I. J. P.; Thurmond, R. L.; Jongejan, A.; Leurs, R. The histamine H4 receptor as a new therapeutic target for inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences* **2005**, *26* (9), 462.
- (145) Yaziji, V.; Rodríguez, D.; Gutiérrez-de-Terán, H.; Coelho, A.; Caamaño, O.; García-Mera, X.; Brea, J.; Loza, M. I.; Cadavid, M. I.; Sotelo, E. Pyrimidine derivatives as potent and selective A3 adenosine receptor antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54* (2), 457.
- (146) Akkari, R.; Burbiel, J. C.; Hockemeyer, J.; Muller, C. E. Recent progress in the development of adenosine receptor ligands as antiinflammatory drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2006**, *6* (13), 1375.
- (147) Bano, T.; Kumar, N.; Dudhe, R. Free radical scavenging properties of pyrimidine derivatives. *Organic and Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *2* (1), 34 (6 pages).
- (148) Ingarsal, N.; Saravanan, G.; Amutha, P.; Nagarajan, S. Synthesis, *in vitro* antibacterial and antifungal evaluations of 2-amino-4-(1-naphthyl)-6-arylpyrimidines. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *42* (4), 517.
- (149) Lindsey, E. A.; Worthington, R. J.; Alcaraz, C.; Melander, C. 2-Aminopyrimidine as a novel scaffold for biofilm modulation. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2012**, *10* (13), 2552.
- (150) Deshmukh, M. B.; Salunkhe, S. M.; Patil, D. R.; Anbhule, P. V. A novel and efficient one step synthesis of 2-amino-5-cyano-6-hydroxy-4-aryl pyrimidines and their anti-bacterial activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *44* (6), 2651.
- (151) Kanagarajan, V.; Thanusu, J.; Gopalakrishnan, M. Synthesis and *in vitro* microbiological evaluation of an array of biolabile 2-morpholino-*N*-(4,6-diarylpyrimidin-2-yl)acetamides. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *45* (4), 1583.
- (152) Siddiqui, A. A.; Rajesh, R.; Mojahid Ul, I.; Alagarsamy, V.; De Clercq, E. Synthesis, antiviral, antituberculous, and antibacterial activities of some novel, 4-(4-substituted phenyl)-6-(4-nitrophenyl)-2-(substituted imino)pyrimidines. *Archiv der Pharmazie* **2007**, *340* (2), 95.

- (153) Nagai, S.-I.; Ueda, T.; Nagatsu, A.; Nakaoka, K.; Murakami, N.; Sakakibara, J.; Fujita, M.; Hotta, Y. Synthesis and central nervous system stimulant activity of 5,8-methanoquinazolines fused with imidazole, thiadiazole, pyrimidine and 1,3,5-triazine. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1998**, *35* (2), 329.
- (154) Wu, J.; Wang, P.-N.; Xu, X.; Yang, Y.-Q.; Wang, S.-F. Synthesis and antibacterial activity of pinanyl-2-amino pyrimidines. *Asian Journal of Chemistry* **2014**, *26* (22), 7769.
- (155) Wang, Z.; Zhang, Y.; Li, M.; Yang, Y.; Xu, X.; Xu, H.; Liu, J.; Fang, H.; Wang, S. Two D- π -A type fluorescent probes based on isolongifolanone for sensing acidic pH with large Stokes shifts. *Tetrahedron* **2018**, *74* (24), 3030.
- (156) Mueller-Westerhoff, U. T.; Zheng, Y.; Ingram, G. A simple synthesis of metallocene aldehydes from lithiometalloenes and *N,N*-dimethylformamide: Ferrocene and ruthenocene aldehydes and 1,1'-dialdehydes. *Journal of Organometallic Chemistry* **1993**, *463* (1), 163.
- (157) Gońka, E.; Chmielewski, P. J.; Lis, T.; Stępień, M. Expanded hexapyrrolohexaazacoronenes. Near-infrared absorbing chromophores with interrupted peripheral conjugation. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (46), 16399.
- (158) Pez, D.; Leal, I.; Zuccotto, F.; Boussard, C.; Brun, R.; Croft, S. L.; Yardley, V.; Ruiz Perez, L. M.; Gonzalez Pacanowska, D.; Gilbert, I. H. 2,4-Diaminopyrimidines as inhibitors of leishmanial and trypanosomal dihydrofolate reductase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2003**, *11* (22), 4693.
- (159) Charisiadis, A.; Nikolaou, V.; Karikis, K.; Giatagana, C.; Chalepli, K.; Ladomenou, K.; Biswas, S.; Sharma, G. D.; Coutsolelos, A. G. Two new bulky substituted Zn porphyrins bearing carboxylate anchoring groups as promising dyes for DSSCs. *New Journal of Chemistry* **2016**, *40* (7), 5930.
- (160) Liew, K.-F.; Chan, K.-L.; Lee, C.-Y. Blood–brain barrier permeable anticholinesterase aurones: Synthesis, structure–activity relationship, and drug-like properties. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *94*, 195.
- (161) Penning, T. D.; Chandrakumar, N. S.; Chen, B. B.; Chen, H. Y.; Desai, B. N.; Djuric, S. W.; Docter, S. H.; Gasielki, A. F.; Haack, R. A.; Miyashiro, J. M.; Russell, M. A.; Yu, S. S.; Corley, D. G.; Durley, R. C.; Kilpatrick, B. F.; Parnas, B. L.; Askonas, L. J.; Gierse, J. K.; Harding, E. I.; Highkin, M. K.; Kachur, J. F.; Kim, S. H.; Krivi, G. G.; Villani-Price, D.; Pyla, E. Y.; Smith, W. G.; Ghoreishi-Haack, N. S. Structure–activity relationship studies on 1-[2-(4-Phenylphenoxy)ethyl]pyrrolidine (SC-22716), a potent inhibitor of leukotriene A4 (LTA4) hydrolase. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43* (4), 721.
- (162) Popov, A. B.; Krstulović, L.; Koštrun, S.; Jelić, D.; Bokulić, A.; Stojković, M. R.; Zonjić, I.; Taylor, M. C.; Kelly, J. M.; Bajić, M.; Raić-Malić, S. Design, synthesis, antitrypanosomal activity, DNA/RNA binding and *in vitro* ADME profiling of novel imidazoline-substituted 2-arylbenzimidazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *207*, 112802.
- (163) Kozlov, M. V.; Konduktorov, K. A.; Malikova, A. Z.; Kamarova, K. A.; Shcherbakova, A. S.; Solyev, P. N.; Kochetkov, S. N. Structural isomers of cinnamic hydroxamic acids block HCV replication via different mechanisms. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *183*, 111723.
- (164) Kafle, B.; Aher, N. G.; Khadka, D.; Park, H.; Cho, H. Isoxazol-5(4*H*)one derivatives as PTP1B inhibitors showing an anti-obesity effect. *Chemistry – An Asian Journal* **2011**, *6* (8), 2073.
- (165) Grošelj, U.; Bevk, D.; Jakše, R.; Meden, A.; Stanovnik, B.; Svete, J. Stereoselective additions to the exocyclic CC bond of some α -alkylidene-(+)-camphor derivatives. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17* (8), 1217.
- (166) Nevalainen, M.; Nevalainen, V. (+)-Camphor-derived amino alcohols as ligands for the catalytic enantioselective addition of diethylzinc to benzaldehydes. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12* (12), 1771.

- (167) Sališová, M.; Puciová, M.; Postnov, V. N.; Toma, Š. Phase-transfer catalyzed synthesis of α -ferrocenylmethylenecycloalkanones. *Chemical Papers* **1990**, *44* (2), 201.
- (168) Kamenova-Nacheva, M.; Schröder, M.; Pasheva, E.; Slavchev, I.; Dimitrov, V.; Momekov, G.; Nikolova, R.; Shivachev, B.; Ugrinova, I.; Dobrikov, G. M. Synthesis of ferrocenylmethylidene and arylidene substituted camphane based compounds as potential anticancer agents. *New Journal of Chemistry* **2017**, *41* (17), 9103.
- (169) CrysAlis PRO, in, Rigaku Oxford Diffraction Ltd., UK Ltd, Yarnton, England, 2021.
- (170) Sheldrick, G. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallographica Section C* **2015**, *71* (1), 3.
- (171) Dolomanov, O. V.; Bourhis, L. J.; Gildea, R. J.; Howard, J. A. K.; Puschmann, H. OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program. *Journal of Applied Crystallography* **2009**, *42* (2), 339.
- (172) Farrugia, L. J. WinGX and ORTEP for Windows: an update. *Journal of Applied Crystallography* **2012**, *45* (4), 849.
- (173) Schön, T.; Werngren, J.; Machado, D.; Borroni, E.; Wijkander, M.; Lina, G.; Mouton, J.; Matuschek, E.; Kahlmeter, G.; Giske, C.; Santin, M.; Cirillo, D. M.; Viveiros, M.; Cambau, E. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates – the EUCAST broth microdilution reference method for MIC determination. *Clinical Microbiology and Infection* **2020**, *26* (11), 1488.
- (174) Chetty, S.; Ramesh, M.; Singh-Pillay, A.; Soliman, M. E. S. Recent advancements in the development of anti-tuberculosis drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2017**, *27* (3), 370.
- (175) Krasavin, M.; Lukin, A.; Vedekhina, T.; Manicheva, O.; Dogonadze, M.; Vinogradova, T.; Zabolotnykh, N.; Rogacheva, E.; Kraeva, L.; Sharoyko, V.; Tennikova, T. B.; Dar'in, D.; Sokolovich, E. Attachment of a 5-nitrofuoyl moiety to spirocyclic piperidines produces non-toxic nitrofurans that are efficacious *in vitro* against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *166*, 125.
- (176) Mokrousov, I.; Vyazovaya, A.; Zhuravlev, V.; Otten, T.; Millet, J.; Jiao, W.-W.; Shen, A. D.; Rastogi, N.; Vishnevsky, B.; Narvskaya, O.; Moser, S. A. Real-time PCR assay for rapid detection of epidemiologically and clinically significant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **2014**, *52* (5), 1691.
- (177) Mokrousov, I.; Narvskaya, O.; Vyazovaya, A.; Otten, T.; Jiao, W.-W.; Gomes Lia, L.; Suffys Philip, N.; Shen, A. D.; Vishnevsky, B. Russian “successful” clone B0/W148 of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a multiplex PCR assay for rapid detection and global screening. *Journal of Clinical Microbiology* **2012**, *50* (11), 3757.
- (178) Shitikov, E.; Vyazovaya, A.; Malakhova, M.; Guliaev, A.; Bespyatykh, J.; Proshina, E.; Pasechnik, O.; Mokrousov, I.; Miller Melissa, B. Simple assay for detection of the Central Asia outbreak clade of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. *Journal of Clinical Microbiology* **2019**, *57* (7), e00215.
- (179) Cautain, B.; Castillo, F.; Musso, L.; Ferreira, B. I.; de Pedro, N.; Quesada, L. R.; Machado, S.; Vicente, F.; Dallavalle, S.; Link, W. Discovery of a novel, isothiazolonaphthoquinone-based small molecule activator of FOXO nuclear-cytoplasmic shuttling. *PLOS ONE* **2016**, *11* (12), e0167491.
- (180) Kamenova-Nacheva, M.; Dobrikov, G. M.; Dimitrov, V. Synthesis and catalytic application of ferrocene substituted camphane-based aminoalcohols and S-containing heterocyclic analogues. *Tetrahedron: Asymmetry* **2016**, *27* (17), 852.
- (181) Kamenova-Nacheva, M.; Dobrikov, G.; Dimitrov, V. Preparation of β -amino-alcohol analogs by the addition of N-, O- and S-containing substituents to ferrocenyl-camphorsulfonamide – ligands for enantioselective addition of diethylzinc to benzaldehyde. *ARKIVOC* **2009**, *12*, 141.

- (182) Dobrikov, G. M.; Philipova, I.; Nikolova, R.; Shivachev, B.; Chimov, A.; Dimitrov, V. Functionalized organolithium reagents in the synthesis of chiral ligands for catalytic enantioselective addition of diethylzinc to aldehydes. *Polyhedron* **2012**, *45* (1), 126.
- (183) Schröder, M.; Yusein-Myashkova, S.; Petrova, M.; Dobrikov, G.; Kamenova-Nacheva, M.; Todorova, J.; Pasheva, E.; Ugrinova, I. The effect of a ferrocene containing camphor sulfonamide DK-164 on breast cancer cell lines. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2019**, *19* (15), 1874.
- (184) Schröder, M.; Petrova, M.; Vlahova, Z.; Dobrikov, G. M.; Slavchev, I.; Pasheva, E.; Ugrinova, I. *In vitro* anticancer activity of two ferrocene-containing camphor sulfonamides as promising agents against lung cancer cells. *Biomedicines* **2022**, *10* (6), 1353.
- (185) Mokrousov, I.; Slavchev, I.; Solovieva, N.; Dogonadze, M.; Vyazovaya, A.; Valcheva, V.; Masharsky, A.; Belopolskaya, O.; Dimitrov, S.; Zhuravlev, V.; Portugal, I.; Perdigão, J.; Dobrikov, G. M. Molecular insight into *Mycobacterium tuberculosis* resistance to nitrofuranyl amides gained through metagenomics-like analysis of spontaneous mutants. *Pharmaceuticals* **2022**, *15* (9), 1136.
- (186) Rawat, B. D. S. Antituberculosis drug research: A critical overview. *Medicinal Research Reviews* **2013**, *33* (4), 693.
- (187) Shu, Y.-Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products* **1998**, *61* (8), 1053.
- (188) Balunas, M. J.; Kinghorn, A. D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* **2005**, *78* (5), 431.
- (189) Gallardo-Macias, R.; Kumar, P.; Jaskowski, M.; Richmann, T.; Shrestha, R.; Russo, R.; Singleton, E.; Zimmerman, M. D.; Ho, H. P.; Dartois, V.; Connell, N.; Alland, D.; Freundlich, J. S. Optimization of *N*-benzyl-5-nitrofuranyl-2-carboxamide as an antitubercular agent. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2019**, *29* (4), 601.
- (190) Elsaman, T.; Mohamed, M. S.; Mohamed, M. A. Current development of 5-nitrofuranyl-2-yl derivatives as antitubercular agents. *Bioorganic Chemistry* **2019**, *88*, 102969.
- (191) Barry, E. C.; Boshoff, I. M. H.; Dowd, S. C. Prospects for clinical introduction of nitroimidazole antibiotics for the treatment of tuberculosis. *Current Pharmaceutical Design* **2004**, *10* (26), 3239.
- (192) Smith, M. A.; Edwards, D. I. Redox potential and oxygen concentration as factors in the susceptibility of *Helicobacter pylori* to nitroheterocyclic drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **1995**, *35* (6), 751.
- (193) Le, V. V. H.; Rakonjac, J. Nitrofurans: Revival of an “old” drug class in the fight against antibiotic resistance. *PLOS Pathogens* **2021**, *17* (7), e1009663.
- (194) Vervoort, J.; Xavier Basil, B.; Stewardson, A.; Coenen, S.; Godycki-Cwirko, M.; Adriaenssens, N.; Kowalczyk, A.; Lammens, C.; Harbarth, S.; Goossens, H.; Malhotra-Kumar, S. An *in vitro* deletion in ribE encoding lumazine synthase contributes to nitrofurantoin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2014**, *58* (12), 7225.
- (195) Tangallapally, P. R.; Yendapally, R.; Daniels, J. A.; Lee, E. B. R.; Lee, E. R. Nitrofurans as novel anti-tuberculosis agents: Identification, development and evaluation. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2007**, *7* (5), 509.
- (196) Manjunatha, U.; Boshoff, H. I. M.; Barry, C. E. The mechanism of action of PA-824. *Communicative & Integrative Biology* **2009**, *2* (3), 215.
- (197) Girase, P. S.; Dhawan, S.; Kumar, V.; Shinde, S. R.; Palkar, M. B.; Karpoormath, R. An appraisal of anti-mycobacterial activity with structure-activity relationship of piperazine and its analogues: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, *210*, 112967.

- (198) Schön, T.; Werngren, J.; Machado, D.; Borroni, E.; Wijkander, M.; Lina, G.; Mouton, J.; Matuschek, E.; Kahlmeter, G.; Giske, C.; Santin, M.; Cirillo, D. M.; Viveiros, M.; Cambau, E. Multicentre testing of the EUCAST broth microdilution reference method for MIC determination on *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology and Infection* **2021**, 27 (2), 288.e1.
- (199) Cole, S. T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S. V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C. E.; Tekaiia, F.; Badcock, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R.; Devlin, K.; Feltwell, T.; Gentles, S.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Krogh, A.; McLean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Osborne, J.; Quail, M. A.; Rajandream, M. A.; Rogers, J.; Rutter, S.; Seeger, K.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S.; Sulston, J. E.; Taylor, K.; Whitehead, S.; Barrell, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **1998**, 393 (6685), 537.
- (200) De Palma, A. M.; Vliegen, I.; De Clercq, E.; Neyts, J. Selective inhibitors of picornavirus replication. *Medicinal Research Reviews* **2008**, 28 (6), 823.
- (201) Powers, R. D.; Gwaltney Jr, J. M.; Hayden, F. G. Activity of 2-(3,4-dichlorophenoxy)-5-nitrobenzotrile (MDL-860) against picornaviruses *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1982**, 22 (4), 639.
- (202) Torney, H. L.; Dulworth, J. K.; Steward, D. L. Antiviral activity and mechanism of action of 2-(3,4-dichlorophenoxy)-5-nitrobenzotrile (MDL-860). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1982**, 22 (4), 635.
- (203) Arita, M.; Dobrikov, G.; Pürstinger, G.; Galabov, A. S. Allosteric regulation of Phosphatidylinositol 4-Kinase III Beta by an antipicornavirus compound MDL-860. *ACS Infectious Diseases* **2017**, 3 (8), 585.
- (204) Padalko, E.; Verbeken, E.; De Clercq, E.; Neyts, J. Inhibition of Coxsackie B3 virus induced myocarditis in mice by 2-(3,4-dichlorophenoxy)-5-nitrobenzotrile. *Journal of Medical Virology* **2004**, 72 (2), 263.
- (205) Markley, L. D.; Tong, Y. C.; Dulworth, J. K.; Steward, D. L.; Goralski, C. T.; Johnston, H.; Wood, S. G.; Vinogradoff, A. P.; Bargar, T. M. Antipicornavirus activity of substituted phenoxybenzenes and phenoxy pyridines. *Journal of Medicinal Chemistry* **1986**, 29 (3), 427.
- (206) Pürstinger, G.; De Palma, A. M.; Zimmerhofer, G.; Huber, S.; Ladurner, S.; Neyts, J. Synthesis and anti-CVB 3 evaluation of substituted 5-nitro-2-phenoxybenzotriles. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2008**, 18 (18), 5123.
- (207) Wan, K.; Zhou, C.-H. Synthesis of novel halobenzyloxy and alkoxy 1,2,4-triazoles and evaluation for their antifungal and antibacterial activities. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2010**, 31 (7), 2003.
- (208) Stasyuk, A. J.; Banasiewicz, M.; Cyrański, M. K.; Gryko, D. T. Imidazo[1,2-a]pyridines susceptible to excited state intramolecular proton transfer: One-pot synthesis via an Ortoleva–King reaction. *The Journal of Organic Chemistry* **2012**, 77 (13), 5552.
- (209) Stoyanova, A.; Nikolova, I.; Pürstinger, G.; Dobrikov, G.; Dimitrov, V.; Philipov, S.; Galabov, A. S. Anti-enteroviral triple combination of viral replication inhibitors: activity against coxsackievirus B1 neuroinfection in mice. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **2015**, 24 (5-6), 136.
- (210) Nikolova, I.; Slavchev, I.; Ravutsov, M.; Dangalov, M.; Nikolova, Y.; Zagranjarska, I.; Stoyanova, A.; Nikolova, N.; Mukova, L.; Grozdanov, P.; Nikolova, R.; Shivachev, B.; Kuz'min, V. E.; Ognichenko, L. N.; Galabov, A. S.; Dobrikov, G. M. Anti-enteroviral activity of new MDL-860 analogues: Synthesis, *in vitro/in vivo* studies and QSAR analysis. *Bioorganic Chemistry* **2019**, 85, 487.
- (211) Baudet, H. P. The replaceability of the halogen atom in 1-chloro- and 1-bromo-2-cyano-4-nitrobenzene. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1924**, 43 (10), 707.

- (212) George, T.; Tahilramani, R. Condensed 1,3-benzothiazines. Facile rearrangement of 3-alkyl-8-nitro-s-triazolo[3,4-b](1,3,4)benzothiadiazepine. *The Journal of Organic Chemistry* **1971**, *36* (15), 2190.
- (213) Brzozowski, Z.; Sławiński, J. Reaction products of activated aromatic and heteroaromatic chlorides with *N,N*-disubstituted formamides. *Synthetic Communications* **2010**, *40* (11), 1639.
- (214) Borenfreund, E.; Puerner, J. A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Journal of tissue culture methods* **1985**, *9* (1), 7.
- (215) Hsu, N.-Y.; Ilnytska, O.; Belov, G.; Santiana, M.; Chen, Y.-H.; Takvorian, P. M.; Pau, C.; van der Schaar, H.; Kaushik-Basu, N.; Balla, T.; Cameron, C. E.; Ehrenfeld, E.; van Kuppeveld, F. J. M.; Altan-Bonnet, N. Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell* **2010**, *141* (5), 799.
- (216) <https://www.cdc.gov/std/Herpes/STDFact-Herpes.htm>.
- (217) Koelle, D. M.; Corey, L. Herpes simplex: Insights on pathogenesis and possible vaccines. *Annual Review of Medicine* **2008**, *59* (1), 381.
- (218) Kimberlin, D. W.; Whitley, R. J.; Wan, W.; Powell, D. A.; Storch, G.; Ahmed, A.; Palmer, A.; Sánchez, P. J.; Jacobs, R. F.; Bradley, J. S.; Robinson, J. L.; Shelton, M.; Dennehy, P. H.; Leach, C.; Rathore, M.; Abughali, N.; Wright, P.; Frenkel, L. M.; Brady, R. C.; Van Dyke, R.; Weiner, L. B.; Guzman-Cottrill, J.; McCarthy, C. A.; Griffin, J.; Jester, P.; Parker, M.; Lakeman, F. D.; Kuo, H.; Lee, C. H.; Cloud, G. A. Oral acyclovir suppression and neurodevelopment after neonatal herpes. *New England Journal of Medicine* **2011**, *365* (14), 1284.
- (219) Safrin, S.; Cherrington, J.; Jaffe, H. S. Clinical uses of cidofovir. *Reviews in Medical Virology* **1997**, *7* (3), 145.
- (220) Lugo, D.; Krogstad, P. Enteroviruses in the early 21st century: new manifestations and challenges. *Current Opinion in Pediatrics* **2016**, *28* (1), 107.
- (221) <https://files.covid19treatmentguidelines.nih.gov/guidelines/covid19treatmentguidelines.pdf>.
- (222) Okuda, K.; Yoshida, M.; Hirota, T.; Sasaki, K. Polycyclic *N*-heterocyclic compounds. Part 63: Improved synthesis of 5-amino-1,2-dihydrofuro[2,3-*c*]isoquinolines via Truce-Smiles rearrangement and subsequent formation to furo[2,3-*c*]isoquinoline. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2010**, *58* (3), 363.
- (223) Verma, R. P.; Hansch, C. Understanding human rhinovirus infections in terms of QSAR. *Virology* **2007**, *359* (1), 152.
- (224) Davies, S. P.; Mycroft-West, C. J.; Pagani, I.; Hill, H. J.; Chen, Y.-H.; Karlsson, R.; Bagdonaite, I.; Guimond, S. E.; Stamataki, Z.; De Lima, M. A.; Turnbull, J. E.; Yang, Z.; Vicenzi, E.; Skidmore, M. A.; Khanim, F. L.; Richardson, A. The hyperlipidaemic drug fenofibrate significantly reduces infection by SARS-CoV-2 in cell culture models. *Frontiers in Pharmacology* **2021**, *12*.
- (225) Nikolova, I.; Slavchev, I.; Zagranyarska, I.; Nikolova, N.; Vilhelmova, N.; Stoyanova, A.; Grozdanov, P.; Mukova, L.; Galabov, A. S.; Lessigiarska, I.; Tsakovska, I.; Dobrikov, G. M. Synthesis and QSAR analysis of diaryl ethers and their analogues as potential antiviral agents. *ChemistrySelect* **2022**, *7* (34), e202203088.
- (226) Knight, Z. A.; Gonzalez, B.; Feldman, M. E.; Zunder, E. R.; Goldenberg, D. D.; Williams, O.; Loewith, R.; Stokoe, D.; Balla, A.; Toth, B.; Balla, T.; Weiss, W. A.; Williams, R. L.; Shokat, K. M. A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110 α in insulin signaling. *Cell* **2006**, *125* (4), 733.

- (227) Wikel, J. H.; Paget, C. J.; DeLong, D. C.; Nelson, J. D.; Wu, C. Y. E.; Paschal, J. W.; Dinner, A.; Templeton, R. J.; Chaney, M. O.; Jones, N. D.; Chamberlin, J. W. Synthesis of *syn* and *anti* isomers of 6-[[[(hydroxyimino)phenyl]methyl]-1-[(1-methylethyl)sulfonyl]-1*H*-benzimidazol-2-amine. Inhibitors of rhinovirus multiplication. *Journal of Medicinal Chemistry* **1980**, *23* (4), 368.
- (228) Ishitsuka, H.; Ohsawa, C.; Ohiwa, T.; Umeda, I.; Suhara, Y. Antipicornavirus flavone Ro 09-0179. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1982**, *22* (4), 611.
- (229) Arita, M.; Wakita, T.; Shimizu, H. Characterization of pharmacologically active compounds that inhibit poliovirus and enterovirus 71 infectivity. *Journal of General Virology* **2008**, *89* (10), 2518.
- (230) Arita, M.; Kojima, H.; Nagano, T.; Okabe, T.; Wakita, T.; Shimizu, H. Phosphatidylinositol 4-kinase III beta is a target of enviroxime-like compounds for antipoliovirus activity. *Journal of Virology* **2011**, *85* (5), 2364.
- (231) Delang, L.; Paeshuyse, J.; Neyts, J. The role of phosphatidylinositol 4-kinases and phosphatidylinositol 4-phosphate during viral replication. *Biochemical Pharmacology* **2012**, *84* (11), 1400.
- (232) MacLeod, A. M.; Mitchell, D. R.; Palmer, N. J.; Van de Poël, H.; Conrath, K.; Andrews, M.; Leyssen, P.; Neyts, J. Identification of a series of compounds with potent antiviral activity for the treatment of enterovirus infections. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *4* (7), 585.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЯ И ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИЯТА

5.1. Заключение

Разработване на нови съединения с антитуберкуозна активност:

- Синтезирана е серия от 50 нови *N*-ацилирани, *N*-алкилирани и *N*-арилирани производни на търговски енантиомерно чист (*R*)-2-амино-1-бутанол. Тяхната *in vitro* антитуберкуозна активност е оценена и 4 съединения са демонстрирали отлична активност и ниска цитотоксичност (индекси на селективност между 91.8 и 375.5). Освен това, е тествана *in vitro* и антибактериалната активност на повечето съединения спрямо 13 патогенни бактерии и гъбички. Широка антибиотична активност са показали 3 съединения в тази серия.
- Синтезирана е серия от 22 нови уреи, тиюреи и ацилтиуреи, съдържащи остатък на (*R*)-2-амино-1-бутанола. Тяхната *in vitro* противотуберкуозна активност е оценена и едно съединение е показало отлична активност и ниска цитотоксичност (индекс на селективност 104.4).
- Синтезирана е поредица от 17 нови (-)-фенхонови енантиомерно чисти амиди. Тяхната *in vitro* антитуберкуозна активност е оценена и едно съединение е демонстрирало умерена активност и ниска цитотоксичност (индекс на селективност 54.7).
- Синтезирани са 33 нови аналози на цинамамиди с фенханов скелет. Тяхната *in vitro* антитуберкуозна активност е оценена и едно съединение е демонстрирало умерена активност и ниска цитотоксичност (индекс на селективност 67).
- Синтезирани са серии от 20 арилметилиден кетони (16 от тях нови) и 15 нови пиримидини с камфанови скелети. Изследвана е тяхната *in vitro* противотуберкуозна активност и цитотоксичност. Извършени са по-подробни антитуберкуозни тестове спрямо 11 мултирезистентни и кръстосано резистентни щамове на *M. tuberculosis*. Две съединения са демонстрирали отлична противотуберкуозна активност и метаболитна стабилност. Наред с това е тествана *in vitro* антибактериалната и антигъбична активност на всички съединения спрямо 4 вида гъбички и патогенни бактерии. Едно съединение е очертано като широкоспектърен антибиотик, активен срещу всички изследвани бактерии и гъбички. Над 10 от съединенията показват селективна висока активност спрямо отделни бактерии.
- Синтезирана е малка серия от 6 нови нитрофураноиламиди, като 3 от тях демонстрират отлична антитуберкуозна активност. С участието на 1 от активните съединения е осъществена *In vitro* мутагенеза върху *M. tuberculosis* референтен щам H37Rv субкултури, отгледани при нарастващи концентрации на избраното съединение. Идентифицирани са шест мутации в 6 гена.

Разработване на нови съединения с антивирусна активност:

- Синтезирани са няколко серии от нови аналози на диарилетера MDL-860 (общо 137 съединения). Всички съединения са тествани спрямо ентеровируси: Coxsackie 1 и 3, полиовирус. Някои съединения са тествани и спрямо човешки корона вирус OC43, херпес симплекс вирус тип 1 и човешки аденовирус С серотип 5. Повече от 10 структури могат да бъдат определени като много активни и нетоксични *in vitro* (индекси на селективност над 97). Някои активни съединения са избрани за *in vivo* експерименти, показващи висок процент оцелели животни (мишки). Извършен е задълбочен QSAR анализ на синтезираните съединения, за да се установят допълнителни възможни вариации в техните молекули, с цел бъдещо получаване на по-активни аналози.

5.2. Приноси

- Синтезиран е нов подклас аналози на класическото противотуберкулозно лекарство етамбутол. Някои от тези аналози демонстрират по-висока активност и по-ниска цитотоксичност от етамбутола.
- Синтезиран е нов клас противотуберкулозни съединения с фенханов скелет.
- Синтезиран е нов клас противотуберкулозни съединения с камфанов скелет, показващи висока противотуберкулозна и антибактериална активност.
- Синтезирани са нови нитрофураноилови съединения и техният възможен механизъм на висока противотуберкулозна активност е изследван чрез използване на *in vitro* провокирана мутагенеза.
- Синтезирани са различни нови аналози на известния диарилетер MDL-860. Много от тях демонстрират по-добра активност спрямо б вируса. Установен е механизъмът на действие на MDL-860.
- Открити са голям брой обещаващи биоактивни съединения (така наречените „hit compounds“) сред горепосочените групи. Те са подходящи за по-нататъшно разработване на лекарства в следващите предклинични фази.

6. ПРИЛОЖЕНИЯ

6.1. Списък на публикациите, включени в конкурса

Забележка: Избраните статии в този списък са използвани само за този конкурс!

Development of new compounds with antitubercular activity:

1. Mokrousov, I., Slavchev, I., Solovieva, N., Dogonadze, M., Vyazovaya, A., Valcheva, V., Masharsky, A., Belopolskaya, O., Dimitrov, S., Zhuravlev, V., Portugal, I., Perdigão, J., Dobrikov, G. M. Molecular insight into *Mycobacterium tuberculosis* resistance to nitrofuranyl amides gained through metagenomics-like analysis of spontaneous mutants. *Pharmaceuticals*, **2022**, *15*, 1136.

Q1, IF: 5.215, first/corresponding author, no citations

2. Schröder, M., Petrova, M., Vlahova, Z., Dobrikov, G. M., Slavchev, I., Pasheva, E., Ugrinova, I. *In vitro* anticancer activity of two ferrocene-containing camphor sulfonamides as promising agents against lung cancer cells. *Biomedicines*, **2022**, *10*, 1353.

Q1, IF: 4.757, 1 citation

3. Slavchev, I., Mitrev, Y., Shivachev, B., Valcheva, V., Dogonadze, M., Solovieva, N., Vyazovaya, A., Mokrousov, I., Link, W., Jiménez, L., Cautain, B., Mackenzie, T. A., Portugal, I., Lopes, F., Capela, R., Perdigão, J., Dobrikov, G. M. Synthesis, characterization and complex evaluation of antibacterial activity and cytotoxicity of new arylmethylidene ketones and pyrimidines with camphane skeletons. *ChemistrySelect*, **2022**, *7*, e202201339.

Q2, IF: 2.307, first/corresponding author, no citations

Development of new compounds with antiviral activity:

4. Stoyanova, A.; Nikolova, I.; Pürstinger, G.; Dobrikov, G.; Dimitrov, V.; Philipov, S.; Galabov, A. S. Anti-enteroviral triple combination of viral replication inhibitors: activity against coxsackievirus B1 neuroinfection in mice. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, **2015**, *24*, 136.

Q2, IF: 1.89, 4 citations

5. Dobrikov, G. M., Slavchev, I., Nikolova, I., Stoyanova, A., Nikolova, N., Mukova, L., Nikolova, R., Shivachev, B., Galabov, A. S. Synthesis and anti-enterovirus activity of new analogues of MDL-860. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2017**, *27*, 4540.

Q2, IF: 2.454, first/corresponding author, 4 citations

6. Arita, M., Dobrikov, G., Pürstinger, G., Galabov, A.S. Allosteric regulation of Phosphatidylinositol 4 Kinase III Beta by an antipicornavirus compound MDL-860. *ACS Infectious Diseases*, **2017**, *3*, 585.

Q1, IF: 4.325, 9 citations

7. Nikolova, I., Slavchev, I., Ravutsov, M., Dangalov, M., Nikolova, Y., Zagranjarska, I., Stoyanova, A., Nikolova, N., Mukova, L., Grozdanov, P., Nikolova, R., Shivachev, B., Kuz'min, V. E., Ognichenko, L. N., Galabov, A. S., Dobrikov, G. M. Anti-enteroviral activity of new MDL-860 analogues: Synthesis, *in vitro/in vivo* studies and QSAR analysis. *Bioorganic Chemistry*, **2019**, *85*, 487.

Q1, IF: 4.831, first/corresponding author, 6 citations

8. Nikolova, I., Slavchev, I., Zagranjarska, I., Nikolova, N., Vilhelmova, N., Stoyanova, A., Grozdanov, P., Mukova, L., Galabov, A.S., Lessigiarska, I., Tsakovska, I., Dobrikov, G.M. Synthesis and QSAR analysis of diaryl ethers and their analogues as potential antiviral agents. *ChemistrySelect*, **2022**, *7*, e202203088.

Q2, IF: 2.307, first/corresponding author, no citations

Общ брой на публикациите, избрани за настоящия конкурс: 8 (4 Q1 и 4 Q2)

Сумарен импакт фактор (IF) за избраните статии: 28.086

Среден импакт фактор (IF) за избраните статии: 3.51

В 5 от 8-те публикации Георги Добриков е първи/кореспондиращ автор (2 Q1 и 3 Q2)

Общ брой цитати (съгласно SONIX, цитатите за степен „доктор“ са изключени): 303

6.2. Участия в конференции

1. Violeta Valcheva, Georgi M. Dobrikov. In vitro antimycobacterial activity of series new potent (R)-2-aminobutanol derivatives. 4th Congress of European Microbiologists, 26.06.2011 - 30.06.2011, Geneva, Switzerland (poster).
2. Violeta Valcheva, Georgi M. Dobrikov. In vitro antimycobacterial activity of new potent (R)-2-aminobutanol derived acyl thioureas. 43rd Union World Conference on Lung Health, 13.11.2012 - 17.11.2012, Kuala Lumpur, Malaysia (poster).
3. Adelina Stoyanova, Ivanka Nikolova, Gerhard Puerstinger, Georgi M. Dobrikov, Vladimir Dimitrov, Stefan Philipov, Angel S. Galabov. Effect of the anti-enteroviral combination of Pleconaril, MDL-860 and Oxoglucine applied in consecutive alternating administration (CAA) course in Coxsackievirus B1 neuroinfection in mice. 28th International Conference on Antiviral Research, 11.05.2015 - 15.05.2015, Rome, Italy (poster).
4. Georgi M. Dobrikov, Vladimir Dimitrov, Yana Nikolova, Ivailo Slavchev, Zhanina Petkova. Antimycobacterial activity of small molecules generated by synthetic transformations of natural products. COST Action CM1407 - Challenging organic syntheses inspired by nature - from natural products chemistry to drug discovery, 05.10.2015 - 06.10.2015, Rome, Italy (poster).
5. Georgi M. Dobrikov, Ivailo Slavchev, Milka Mileva, Ivanka Nikolova, Almira Georgieva, Elina Tzvetanova. Antiviral and antioxydant activity of new substituted 2-cyano-4-nitro benzenes. 2nd International conference on natural products utilization: from plants to pharmacy shelf, Plovdiv, Bulgaria, 14.10.2015 - 17.10.2015 (poster).
6. Ivailo Slavchev, Georgi M. Dobrikov, Vladimir Dimitrov, Violeta Valcheva, Iva Ugrinova, Evdokia Pasheva. Antimycobacterial activity generated by the amide coupling of (-)-fenchone derived aminoalcohol with cinnamic acids and analogues. 2nd International conference on natural products utilization: from plants to pharmacy shelf, Plovdiv, Bulgaria, 14.10.2015 - 17.10.2015 (poster).
7. Yana Nikolova, Georgi M. Dobrikov, Vladimir Dimitrov, Violeta Valcheva, Iva Ugrinova, Evdokia Pasheva. Efficient synthesis of enantiopure antituberculosis candidates derived from (-)-fenchone. 2nd International conference on natural products utilization: from plants to pharmacy shelf, Plovdiv, Bulgaria, 14.10.2015 - 17.10.2015 (poster).
8. V. Jordanova, D. Borisova, Ts. Paunova-Krasteva, Georgi M. Dobrikov, Yana Nikolova, Stoyanka Stoitsova. Anti-biofilm activity of (-)-fenchone and synthetic derivatives. 2nd International conference on natural products utilization: from plants to pharmacy shelf, Plovdiv, Bulgaria, 14.10.2015 - 17.10.2015 (poster).
9. Adelina Stoyanova, Georgi M. Dobrikov, Vladimir Dimitrov, Stefan Philipov, Ivanka Nikolova, Gerhard Puerstinger, Angel S. Galabov. Effect of a triple combination of Pleconaril, MDL-860 and Oxoglucine administered by consecutive alternating treatment scheme against Coxsackievirus B1 neuroinfection in mice. 9th Balkan Congress of Microbiology (Microbiologia Balkanica 2015), 22.10.2015 - 24.10.2015, Thessaloniki, Greece (report).
10. Violeta Ruseva, Georgi Dobrikov. The urgency of effective antitubercular drug development – new promising structures derived from natural terpenoids. 17th International Congress on Infectious Diseases, 02.03.2016 - 05.03.2016, Hyderabad, India (poster).
11. Adelina Stoyanova, Ivanka Nikolova, Angel Galabov, Gerhard Pürstinger, Georgi Dobrikov, Vladimir Dimitrov, Stefan Philipov. Triple combination of viral replication inhibitors against Coxsackievirus B1 neuroinfection in mice. 29th International Conference on Antiviral Research, 17.04.2016 - 21.04.2016, La Jolla, USA (poster).
12. Yana Nikolova, Georgi M. Dobrikov, Violeta Valcheva, Iva Ugrinova, Evdokia Pasheva, Vladimir Dimitrov. Antimycobacterial activity of small molecules generated by synthetic transformations of (R)-2-amino-1-butanol and (1S)-(-)-fenchone. 6th European Workshop in Drug Synthesis, 15.05.2016 - 19.05.2016, Siena, Italy (poster).
13. Георги Добриков, Мартин Равуцов, Ивайло Славчев, Яна Николова, Иванка Николова, Аделина Стоянова, Ангел Гълъбов. Синтез на нови диарилетери с анти-ентеровирусна активност. 4th National Congress of Virology with International Participation, Days of Virology in Bulgaria, 18.05.2016 - 20.05.2016, Sofia, Bulgaria (report).
14. Иванка Николова, Аделина Стоянова, Надя Николова, Петър Грозданов, Георги Добриков, Ангел Гълъбов. Скрининг за анти-ентеровирусна активност на новосинтезирани диарил етери. 4th National Congress of Virology with International Participation, Days of Virology in Bulgaria, 18.05.2016 - 20.05.2016, Sofia, Bulgaria (report).

15. Ivanka Nikolova, Adelina Stoyanova, Nadya Nikolova, Lucia Mukova, Petar Grozdanov, Georgi Dobrikov, Angel S. Galabov. Antiviral activity of series of derivatives of MDL-860 against enteroviruses. Power of Viruses, 16.05.2018 - 18.05.2018, Poreč, Croatia (poster).
16. Adelina Stoyanova, Lucia Mukova, Ivanka Nikolova, Nadya Nikolova-Velislavova, Georgi Dobrikov, Stefan Filipov, Angel Galabov. Combined effects of newly synthesized diaryl ethers and some enteroviral inhibitors against Coxsackievirus B1. 6th Congress of the Microbiologists of Macedonia with international participation, 01.06.2018 - 02.06.2018, Ohrid, Macedonia (poster).
17. Ivanka Nikolova, Adelina Stoyanova, Nadia Nikolova, Lucia Mukova, Peter Grozdanov, Georgi Dobrikov, Angel Galabov. Antienteroviral activity of newly synthesized diaryl ethers. 14th Congress of Microbiologists in Bulgaria with International Participation, 10.10.2018 - 13.10.2018, Hisarya, Bulgaria (report).
18. Yana Nikolova, Georgi M. Dobrikov, Violeta Valcheva, Iva Ugrinova, Evdokia Pasheva, Vladimir Dimitrov. Efficient synthesis of small molecules derived from (-)-fenchone and evaluation of their antimycobacterial activity. 3rd Training School of COST Action CM1407 - Computational modeling tools in drug discovery with natural products, 10.12.2018 - 12.12.2018, Tenerife, Spain (poster).
19. Yana Nikolova, Martin Ravutsov, Ivaylo Slavchev, Irena Zagranyarska, Miroslav Dangelov, Ivanka Nikolova, Adelina Stoyanova, Nadya Nikolova, Lucia Mukova, Petar Grozdanov, Rosica Nikolova, Boris Shivachev, Viktor E. Kuz'min, Liudmila N. Ognichenko, Angel S. Galabov, Georgi M. Dobrikov. Novel derivatives of the anti-enteroviral agent MDL-860: Synthesis, in vitro/in vivo studies and QSAR analysis. 10th Jubilee National Conference on Chemistry, 26.09.2019 - 28.09.2019, Sofia, Bulgaria (poster).
20. Ana Vyazovaya, Ivaylo Slavchev, Violeta Valcheva, Marine Dogonadze, Maya Zaharieva, Natalia Solovieva, Olga Narvskaya, Viacheslav Zhuravlev, Georgi Dobrikov. Synthesis and evaluation of new compounds efficient against mycobacterium tuberculosis isolates circulating in high-burden country, Russian federation. 51st World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (The Union), 20.10.2020 - 24.10.2020, Virtual Event, (poster).
21. Anna Vyazovaya, Ivaylo Slavchev, Yana Nikolova, Marine Dogonadze, Violeta Valcheva, Maya Zaharieva, Natalia Solovieva, Daria Starkova, Neliya Vasilieva, Igor Mokrousov, Viacheslav Zhuravlev, Georgi Dobrikov. Screening of compounds containing aminobutanoland camphane moieties against Mycobacterium tuberculosis clinical isolates of different genotypes. 3rd Asian African Congress of Mycobacteriology, 27.01.2021 - 29.01.2021, Virtual Event, (report).
22. Violeta Valcheva, Anna Vyazovaya, Georgi Dobrikov, Ivaylo Slavchev, Joao Perdigão. In vitro antimycobacterial activity of new synthetic (+)-camphor derivatives. 52nd Union World Conference on Lung Health, 19.10.2021 - 22.10.2021, Virtual Event, (report).
23. Irena Zagranyarska, Ivaylo Slavchev, Ivanka Nikolova, Petar Grozdanov, Iglia Lessigiarska, Ivanka Tsakovska, Georgi M. Dobrikov. Synthesis and QSAR analysis of diarylethers and their analogues as potential antiviral agents. National conference with international participation "Innovations in drug molecules", 19.07.2022 - 22.07.2022, Hisarya Spa Resort, Bulgaria (poster).
24. Zhanina Petkova, Ivaylo Slavchev, Yavor Mitrev, Violeta Valcheva, Georgi M. Dobrikov. Synthesis, characterization and complex evaluation of antibacterial activity and cytotoxicity of new arylmethylidene ketones and pyrimidines with camphane skeletons. National conference with international participation "Innovations in drug molecules", 19.07.2022 - 22.07.2022, Hisarya Spa Resort, Bulgaria (poster).
25. Irena Zagranyarska, Ivaylo Slavchev, Ivanka Nikolova, Petar Grozdanov, Iglia Lessigiarska, Ivanka Tsakovska, Georgi M. Dobrikov. Diarylethers and their analogues as potential antiviral agents – synthesis and computational studies. 8th International Black Sea coastline countries scientific research conference, 29.08.2022 - 30.08.2022, Sofia, Bulgaria (poster).
26. Zhanina Petkova, Ivaylo Slavchev, Yavor Mitrev, Violeta Valcheva, Georgi M. Dobrikov. Synthesis of new arylidencamphors and pyrimidines with camphane skeleton – structural characterization and complex evaluation of their antibacterial activity and cytotoxicity. 8th International Black Sea coastline countries scientific research conference, 29.08.2022 - 30.08.2022, Sofia, Bulgaria (poster).

6.3. Проекти, свързани с тематиката на дисертацията

1. Фонд Научни изследвания №ДФНИ Б02/11. Синтез и анти-ентеровирусна активност на нови диарил етери и техни комплекси с циклодекстрини. 2014-2018 г. 81900 лв. за базовата организация. Ръководител Георги Добриков.
2. COST Action CM1407 - Challenging organic syntheses inspired by nature - from natural products chemistry to drug discovery. 2015-2019 г. 12 800 лв. за базовата организация.
3. Фонд Научни изследвания № ДКОСТ 01/4. Използване на природните продукти (+)-камфор и (-)-фенхон като източници за получаване на биологично активни съединения чрез синтетични трансформации. 2017-2019 г. 40000 лв. за базовата организация. Ръководител Георги Добриков.
4. Russian Science Foundation № RNF-19-15-00028. Development of new efficient compounds against drug resistant Mycobacterium tuberculosis taking into account the population structure of the pathogen. 2019-2021 г. 72100 лв. за базовата организация.
5. Фонд Научни изследвания № КП-06-Н31/7. Нови производни на 2-циано-4-нитробензена и негови аналози с обещаваща антивирусна активност. 2019-2024 г. 60000 лв. за базовата организация. Ръководител Георги Добриков.
6. Фонд Научни изследвания № КП-06-Н39/7. Откриване на нови лекарствени кандидати чрез синтетични модификации на природна шикимова киселина. 2019-2024 г. 60000 лв. за базовата организация.
7. Фонд Научни изследвания КП-06-Китай/5. Откриване на нови ковалентни инхибитори на ензима Р/4КВ с потенциален антивирусен ефект. 2020-2023 г. 40000 лв. за базовата организация. Ръководител Георги Добриков.
8. Operational Program “Science and Education for Smart Growth” 2014-2020, co-financed by European Union through the European Structural and Investment Funds, Grant BG05M2OP001-1.002-0012.