



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНИ ТЕХНОЛОГИИ

КАТЕДРА „ОРГАНИЧЕН СИНТЕЗ И ГОРИВА”

инж. Мая Боянова Георгиева

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

СИНТЕЗ И ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПИРОЛ-СЪДЪРЖАЩИ ХИДРАЗОНИ, КАТО ПРИНОС В РАЗРАБОТВАНЕТО НА НОВИ ТУБЕРКУЛОСТАТИЦИ

за придобиване на образователната и научна степен „доктор”

по научна специалност

„Фармацевтична химия”

Научен ръководител: проф. дхн Атанас Бижев

Научно жури:

1. проф. дхн Атанас Бижев
2. проф. Милка Кръстева
3. доц. д-р Пламен Пейков
4. доц. д-р Александър Златков
5. доц. д-р Илиян Иванов

София, 2011

Дисертационният труд е написан на 148 страници и съдържа 58 фигури, 38 схеми и 19 таблици. Цитирани са 236 литературни източника.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет на защита на заседание на разширен научен съвет на научното звено на катедра „Органичен синтез и горива”, състояло се на 03 Май 2011г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 13 Юли 2011г. от 14 часа в зала 424, сграда „А” на ХТМУ.

Материалите са на разположение на интересуващите се на интернет страницата на ХТМУ и в отдел „Научни дейности”, стая 406, етаж 4, сграда „А” на ХТМУ.

Благодаря на научния си ръководител проф. дхн Атанас Бижев за помощта, която ми оказа при изработването и оформянето на дисертационния труд, както и за предадените ми от него знания и умения!

Благодаря на всички мои колеги от Катедра “Органичен синтез и горива” при ХТМУ, София за помощта и съдействието!

Благодаря на доц. д-р Николай Данчев, Катедра „Фармакология и Токсикология”, Фармацевтичен факултет на Медицински Университет гр. София, за проведените от него изпитания за токсичност на част от синтезираните съединения.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ТБ - туберкулоза

СЗО – Световна Здравна Организация

СПИН – Синдром на Придобита Имунна Недостатъчност

DOTS – Директно Наблюдаващ Кратък Терапевтичен Курс

M. tuberculosis – *Mycobacterium tuberculosis*

ХИВ – Човешки Имунодефицитен Вирус

DR – TB – лекарствено резистентна туберкулоза

MDR – TB - лекарствено резистентна туберкулоза спрямо множество лекарства

XDR – TB – екстензивна лекарствено резистентна туберкулоза

MIC – минимална инхибираща концентрация

SAR – Връзка Структура Активност

QSAR – Количествена Връзка Структура Активност

HPLC – Високоефективна Течна Хроматография

ТСХ – Тънкослойна Хроматография

ИЧ – Инфрачервена Спектроскопия

¹H-ЯМР – Протонен Ядрено-магнитен Резонанс

HTS – Високопродуктивен Скрининг

PDIM – фтиосеролдимикосерозат

LAM - липоарабиноманан

Номерацията на фигурите, таблиците и формулите в автореферата съответства на тази в дисертационната работа.

ВЪВЕДЕНИЕ И ЦЕЛ

Преди около 150 години туберкулозата е била причина за смъртта на всеки един от осем заболяели, но през осемдесетте години, благодарение подобряването на условията на живот, храненето и ефективното лечение, тя престава да бъде толкова често срещана. Причинител е бактерията *Mycobacterium tuberculosis* открита от Робърт Кох през 1882 г., отличаваща се със значителна устойчивост във външната среда. Основните причинители са микобактериите *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium bovis*. Другите бактерии от този род, като *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii* и *Mycobacterium microti* също могат да се разглеждат като причинители на туберкулоза, но те обикновено не могат да причинят заболяване при здрави хора.

По настоящем антитуберкулозната терапия разчита основно на лекарства които инхибират бактериалния метаболизъм, наблюдайки най-вече на инхибиторите на синтеза на клетъчната стена. По тази причина съществуващите в момента туберкулостатици са активни само спрямо активно растящи клетки, повлиявайки и инхибирайки клетъчните процеси като биогенеза на клетъчната стена и репликация на ДНК на клетката. Това предполага, че настоящата противотуберкулозна терапия се характеризира предимно със значителна бактериостатична активност, но изключително слаба стерилизираща активност. Слабата стерилизираща способност на настоящите туберкулостатици е един от основните недостатъци на съвременната противотуберкулозна терапия.

Днес, лечението на туберкулозата е комбинирано от две групи лекарствени продукти: синтетични препарати и противотуберкулозни антибиотици. Те спадат към основна анатомична група, антиинфекциозни лекарства за системна употреба, а терапевтичната им подгрупа е лекарства за лечение на туберкулоза.

Туберкулостатиците доскоро условно се подразделят на препарати от първи и втори ред. Агентите от **“Първи ред”** включват основните химиотерапевтици като **Isoniazid** и противотуберкулозни антибиотици като **Streptomycin**. Те са с висока ефективност, но силно податливи на резистентност. Туберкулостатиците от **“Втори ред”** основно са включени в довършващата терапия. Въпреки, че са по-слабо ефективни, използвани като част от “коктейлната” терапия, те подпомагат преодоляването на резистентността. Междувременно тази класификация бе актуализирана включително и с размествания между двете групи.

Нуждата от нови противотуберкулозни агенти се потвърждава от увеличаване на броя щамове *Mycobacterium tuberculosis* резистентни към анти-туберкулозни средства от **Първи ред**, като **рифампицините** и **Isoniazid (INH)**, което допълнително усложнява проблема и ясно показва необходимостта от създаването и прилагането на по-ефективни анти-туберкулозни агенти за борба със заболяването.

Основна част от проблема със завърналата се туберкулоза и една от причините за появата на MDR- и XDR-TB, както и ко-инфекцията с ХИВ е неефикасността на достъпната в момента противотуберкулозна терапия.

Този основен недостатък доведе до интензивни опити за намиране на нови противотуберкулозни агенти и едновременно с това подобряване на познатите медицински подходи за борба със завърналата се туберкулоза.

Изследвайки разнообразието от хетероциклени съединения се отделя специално внимание на **производните на пирола** и тяхното евентуално приложение като стартова платформа за намиране на нови агенти с противоуберкулозна активност. От друга страна поради разнообразната си биологична активност хидразоните, представляват също важен клас съединения от изключително значение при разработването и дизайна на нови лекарствени средства. Известната анти-туберкулозна активност на **Isoniazid** и неговите производни даде силно начало на търсенето на нови хидразоновы структури, като един от подходите за намиране на нови по-активни и по-малко токсични противотуберкулозни агенти.

Ц Е Л И И З А Д А Ч И

В отговор на възникналия интерес към по-задълбочено изследване на пирол-съдържащите хидразони като потенциални антитуберкулозни агенти бяха формулирани следните по-обща цели на дисертационния труд:

- 1). Създаване на разширена база данни чрез синтез на пирол-съдържащи хидразони с предварително подбрана структура и тестване на тяхната инхибиторна активност спрямо *Mycobacterium tuberculosis*;
- 2). Оценка на острата токсичност, химическата стабилност и някои аспекти на очакваното фармакокинетично поведение като предпоставки за евентуалната приложимост на продуктите като потенциални лекарства;
- 3). Разкриване на полезни зависимости структура-активност за направляване на бъдещата изследователска работа при търсенето на оптимизирани противотуберкулозни средства.

Във връзка с изпълнението на поставените цели следваше да се изпълнят следните работни задачи:

1) Въз основа на предварителните изследвания върху целевата група, проведени в Катедра ОСГ, да бъдат селектирани и синтезирани перспективни нови продукти с подходящо подбрана структура, позволяваща да се проследи ефекта на определени структурни елементи върху туберкулостатичната активност, като:

- а) халогенен атом в позиция 4' на ароматния пръстен;
- б) дължина на "спейсър", отделящ карбоксилната група от пироловия пръстен;
- в) общият обем на молекулата;

2) Тестване на инхибиторната активност спрямо *M. tuberculosis*, проявявана от синтезираните продукти;

3) Оценка на някои ключови свойства на целевия клас като предпоставка за евентуалната приложимост на подобни съединения като лекарствени продукти, в т.ч.:

- а) изпитания за остра токсичност;
- б) изследване на химическата стабилност (при физиологични условия и при съхранение);
- в) виртуална оценка на лекарственото подобие с Правилото на Липински, като прогноза за фармакокинетичните свойства.

4) Извличане на полезни зависимости от типа “Структура-активност”, включително и с използването на съвременните компютърни методи на QSAR методологията, които да направляват генерирането на бъдещи продукти с оптимизирани свойства;

5) Отделяне на внимание върху изомерията при хидразоните и опити за изолиране и доказване констатирани геометрични изомери.

СПЕЦИАЛНА ЧАСТ

1. Избор на перспективни целеви структури и на стратегия за техния синтез

Мотивирайки се от възможността за комбиниране на предимствата на широкият спектър на биологична активност показана от пириловите съединения и богатото хидразоново разнообразие и основавайки се на обнадеждаващи резултати получени от предишни разработки на екипа от направление “Органичен синтез” към катедрата по Органичен синтез и горива към ХТМУ бе от интерес възможността за получаване на нови хидразиди или хидразони, съдържащи един или повече пирилови цикъла в структурата си, с цел получаване на лекарствени средства притежаващи потенциална активност, както спрямо *M. tuberculosis*, така и към други видове бактерии.

Структурата на заместителите в целевите съединения бе предварително подбрана на база корелация структура-активност, определяне на общ фармакофор и изведена тенденция от предишни научни експерименти. Така новите продукти запазват общата архитектура на получените досега хитове, съдържащи пириол, като централен цикъл и Cl или F атом, като халогенен заместител в бензеновото ядро на хидразидната част на молекулата (X), а внасените структурни новости се фокусират върху типа на този халогенен заместител и върху дължината на “спейсър”, изразена като брой метиленови групи свързващи N-атом от централния пирилов пръстен със съответният карбонилен партньор:

- Въвеждането на Br като заместител в позиция 4 в ароматния пръстен е мотивирано от високата противотуберкулозна активност, проявена от съединения, съдържащи в структурата си други халогенени атоми, като Cl и F, публикувани неотдавна.
- Проследяване на влиянието на нарастването на “спейсър”, осигуряващо повишаване на хидрофобността и моларния обем на продуктите върху активността.

2. Синтез на целевите продукти

За получаване на централния пирилов цикъл в молекулата на целевите хидразони беше избрана реакцията на Паал-Кнор. Този подход се основава на получаването първоначално на α -бромирани ацетофенони, C-алкилиране на 1,3-дикарбонилни съединения до 1,4-дикарбонилни, които след това циклизират с различни аминокиселини до N- заместени пирилолни киселини. В един следващ етап с помощта на реакция на

естерифициране, бяха получени съответните естери, които бяха положени на хидразинолиза, посредством прибавяне на $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Получените хидразиди бяха кондензирани със серия карбонилни производни, за получаване на желаните хидразони.

Така проведената синтеза може да се представи с помощта на следната обобщена реакционна схема (**Схема 29**):

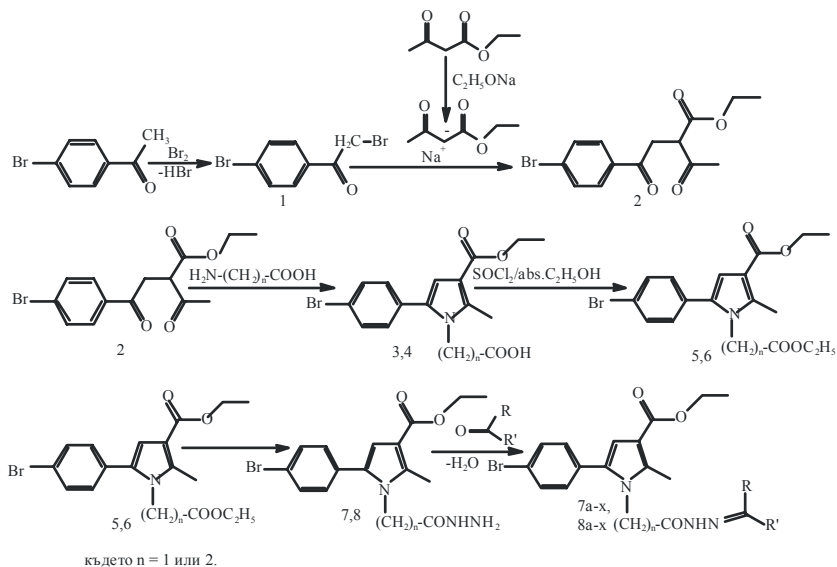


Схема 29. Обща синтетична схема за получаване на целевите за дисертационния труд хидразони и необходимите междинни продукти.

Получаването на пироли чрез кондензация на 1,4-дикарбонилни съединения и амини по метода на Паал-Кнор има редица преимущества, като: работа с достъпни реагенти и удобни реакционни условия; добър добив на целевите съединения; възможност за директно въвеждане на предварително избрани заместители на желаните места в пироловия цикъл, не изисква специфична апаратура.

2.1. Получаване на α -бромирани ацетофенони

Исходните ацетофенони, които са достъпни търговски продукти бяха подложени на α -бромиране (**Схема 30**) като за постигането на оптимално селективно монохалогениране беше избран варианта на кисела катализа с използване на един еквивалент бром. Реакцията бе проведена при кипене в среда на метанол и присъствие на оцетна киселина.

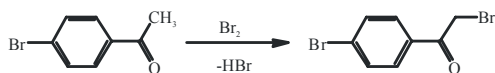


Схема 30

Полученият броман ацетофенон е описан в литературата и е охарактеризиран и доказан с ТСХ и температура на топене (т.т.) съвпадащи с публикуваните.

2.2. Получаване на 1,4-дикарбонилни съединения

За синтезирането на необходимите 1,4-дикарбонилни съединения беше използвана класическата реакция на С-алкилиране на 1,3-дикарбонилни съединения, описана от Паал в получаването на първите N-пиролилоцетни киселини.

По време на реакцията, предварително синтезиранят Na-етоксид се използва за получаване на карбаниона на съответното 1,3-дикарбонилно съединение (етилацетоацетат), който реагира със съответния α -броман ацетофенон (**Схема 31**). С цел избягване на възможните нежелани странични реакции на О-алкилиране на енолната форма, процесът бе провеждан в абсолютно суха среда (безводен етанол) при стайна температура.

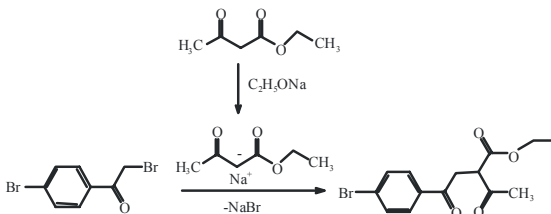
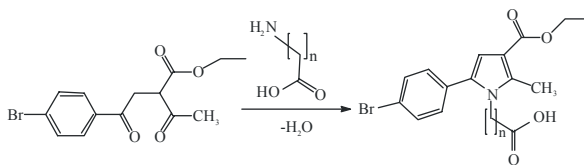


Схема 31

Протичането на реакцията до край се потвърждава хроматографски. Така получените 1,4-дикарбонилни съединения се използват в следващата циклизация без да се изолират.

2.3. Получаване на N-пиролилкарбоксилни киселини

От всички варианти на провеждане на реакцията на Паал-Кнор беше отдадено предимство на кондензацията на съответните 1,4-дикарбонилни съединения с аминокиселини в среда на ледена оцетна киселина. Реакционната схема може да се обобщи по следния начин (**Схема 32**):



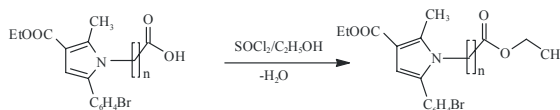
където: $n = 1$ или 2 ;

Схема 32

Получените киселини бяха изолирани и охарактеризирани посредством температури на топене (т.т.), ТСХ характеристики (R_f) и ИЧ-спектри.

2.4. Получаване на естери на N-пиролилкарбоксилни киселини

Като междинен етап от синтеза на хидразида се явява получаването на пиროлови естери на съответните описани по-горе N-пиролилкарбоксилни киселини. На първи етап от реакцията се образува междинен киселинен хлорид, който при взаимодействие с абс. C_2H_5OH води до получаване на съответният естер. Обобщена схема на реакцията е представена на **Схема 33**.



където: $n = 1$ или 2 ;

Схема 33

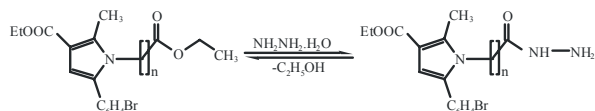
Получаването на естерите се следи хроматографски край на реакцията се установява по изчезване на петната, отговарящи на изходните реагенти. Получените продукти не се изолират, а се влагат веднага в следващата реакция за получаване на хидразида (хидразинолиза).

2.5. Получаване на хидразида на карбоксилни киселини

В настоящия дисертационен труд необходимите пиროлови хидразида бяха получени чрез хидразинолиза на съответните им естери.

Синтезът на желаните междинни хидразида бе извършен посредством селективна хидразинолиза на изолираната от ядрото естерна група. Това е възможно поради добрите качества на етоксигрупата като сравнително добър напускащ заместител, дължащи се на понижената електронна плътност при карбонилния C-атом.

Обобщена схема на реакцията е представена на **Схема 34**



където: $n = 1$ или 2 ;

Схема 34

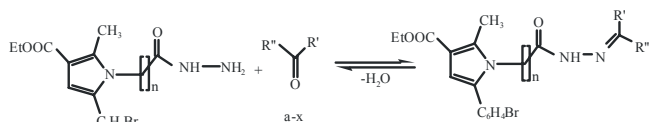
Реакциите бяха проведени при кипене на реакционната смес, като края им бе установен с помощта на ТСХ.

Получените хидразиди са охарактеризирани и доказани чрез ИЧ- и ^1H -ЯМР-спектри, а чистотата им бе потвърдена с ТСХ (виж Таблицы 9, 10) и елементарен анализ. Посочените добиви (Таблицы 9, 10) са на база прекристализиран продукт.

2.6. Получаване на хидразони от карбоксилни хидразиди на пиrola

Предвид засиления интерес към групата на хетероциклените производни и в частност на пиrola, особено след откриването на противотуберкулозни агент **BM 212** и **Sudoterb**, синтезирахме **28 нови хидразона** от получените вече хидразиди.

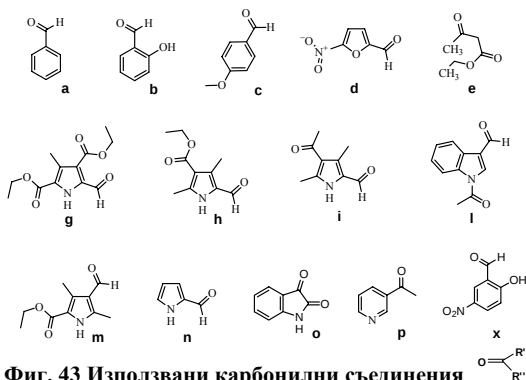
На **Схема 35** е показана общата синтетична схема за получаване на крайните хидразони, чрез кондензация на изходния хидразид и съответния карбонилен партньор от групата **a – x** (Фиг. 43):



където: $n = 1$ или 2 ;

Схема 35

Използваните карбонилни партньори са така подбрани, че да допълват структурното множество на вече синтезираните в катедрата аналогични структури.



Фиг. 43 Използвани карбонилни съединения

Кондензацията бе осъществена при нагряване на кипяща водна баня на еквимоларни количества от двата реакционни партньора в среда от ледена оцетна киселина до пълно изчерпване на двата изходни реагента, отчетено с помощта на ТСХ.

В случая на реагенти, притежаващи повече от една карбонилни функционални групи (като **e**, **g**, **h**, **i** и **m**) температурата на реакцията бе намалена до 60°C с цел да се подтисне включването на конкурентните, но значително по-слабо реактивоспособни етоксикарбонилни групи във вторични (странични) реакции. Това от двоя страна води известно забавяне на скоростта на реакцията и съответно повишаване на времето за получаване на желаният продукт.

Синтезите са осъществявани с добиви около 46 – 89% в специално оборудване за микросинтез, осигуряващо минимални вредни емисии и икономия на реагенти.

Получените нови съединения са охарактеризирани и доказани чрез ИЧ- и ¹H-ЯМР-спектри, а чистотата им бе потвърдена с ТСХ (**виж Таблицы 9, 10**) и елементен анализ. Посочените добиви (**виж Таблицы 9, 10**) са на база прекристализиран продукт и са изчислени спрямо съответния изходен хидразид.

Новосинтезираните съединения бяха предоставени на Националния Институт по Алергология и Инфекциозни Заболявания (NIAID), към Министерство на Здравеопазването (NIH), САЩ, където бяха изследвани за противотуберкуозна активност.

3. Микробиологични изследвания

Туберкулоstaticната активност на новосинтезираните хидразони бе определена чрез *in vitro* изпитвания в следните Американски агенции, подразделения на Националния Институт по Алергология и Инфекциозни Заболявания (NIAID), към Министерство на Здравеопазването (NIH), САЩ: *Tuberculosis Antimicrobial Acquisition & Coordinating Facility* (TAACF), Southern Research Institute, Frederick, USA и *SRI International*, USA. Определянията бяха изработени като Високопродуктивен скрининг (High-throughput Screening (HTS)), според методологиите на двете организации, посочени по-долу:

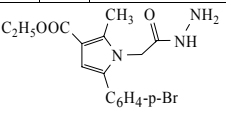
3.1. TAACF методология

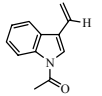
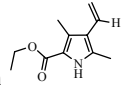
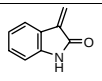
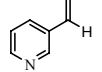
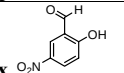
Всички съединения се тестват предварително срещу *Mycobacterium tuberculosis* щам H₃₇Rv спрямо т.нар. **Анализ доза-отговор** (Ниво 1) (**Dose Response Assay (Level 1)**) като първичен скрининг. Анализът дава като резултат следните параметри: IC₅₀ и IC₉₀,

където IC представлява “инхибиторна концентрация” – концентрацията, при която веществото инхибира туберкулозния щам 50% (IC50) или 90% (IC90).

Резултатите от скрининга, заедно с някои характеристики на молекулата като точки на топене, TCX характеристики (R_f при мобилна фаза $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) и съответни добиви на съединенията са представени на **Таблица 9**.

Таблица 9. Инхибиторна активност и структурни и физични характеристики на новите съединения.

ID	Карбохидраз ид	Структурни характеристики в обща формула I:			Инхибиторна активност		Т.т. (°C)	TCX: R_f / (CHCl_3 :EtOH)	Добив (%)
		X	n		IC50	IC90			
7	7				>100	>100	223-224	0.56/ (10:0.5)	76
7a	7	Br	1		10.320	>100	227-228	0.53/ (10:0.5)	78
7b	7	Br	1		>100	>100	226-227	0.76/ (10:0.5)	68
7c	7	Br	1		>100	>100	240-242	0.63/ (10:1.0)	86
7d	7	Br	1		9.002	13.709	251-252	0.66/ (10:1.0)	51
7e	7	Br	1		>100	>100	220-221	0.54/ (10:0.25)	57
7g	7	Br	1		>100	>100	265-267	0.47/ (10:0.5)	69
7h	7	Br	1		50.681	>100	244-246	0.70/ (10:0.5)	46
7i	7	Br	1		>100	>100	212-213	0.46/ (10:0.5)	89

7l	7	Br	1	 l	11.544	13.158	271-275	0.45/ (10:0.5)	72
7m	7	Br	1	 m	>100	>100	264-265	0.45/ (10:0.5)	88
7n	7	Br	1	 n	>100	>100	269-270	0.72/ (10:0.75)	84
7o	7	Br	1	 o	5.921	>100	265-267	0.60/ (10:0.5)	78
7p	7	Br	1	 p	52.523	>100	238-239	0.40/ (10:0.75)	72
7x	7	Br	1	 x	>100	>100	229-232	0.35/ (10:1)	75

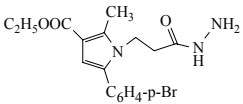
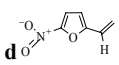
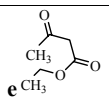
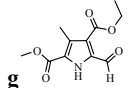
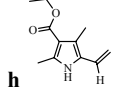
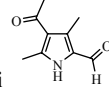
Както е видно от регистрираните при първоначалния анализ активности посочени в таблицата и изразени като IC₅₀ и IC₉₀, стойностите на IC₅₀ варират в границите от 5.92 – (>100) µg/ml, а на IC₉₀ – в границите от 13.709 – (>100) µg/ml. Като най-активен от групата се явява хидразон **7o** с IC₅₀ = 5.92, следван от **7d** и **7a** със стойности на IC₅₀ съответно 9.002 и 10.320. Хидразон **7d** показва добра стойност и на параметъра IC₉₀ – 13.709, което го прави най-перспективен от предложената група за последващ анализ и оптимизации.

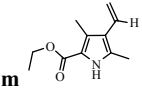
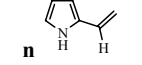
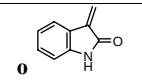
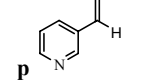
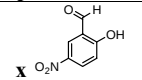
3.2. SRI International методология

Изследванията бяха извършени според скрининг програмата на SRI International.

Първоначалните резултати от скрининга, заедно с някои структурни характеристики, характерни за дадената серия хидразони са представени в **Таблица 10**.

Таблица 10. Инхибиторна активност и някои структурни характеристики на новите съединения

ID	Структурни характеристики			Инхибиторна активност		Т.т. (°C)	TCX: Rf/ (CHCl ₃ :EtOH)	Добив (%)
	X	n		% Инхибиране на растежа	% Инхибиране: *измерено **преизчислено			
8				-8.99	20.45**	167-169	0.38/ (10:0.25)	76
8a	Br	2		2.37	27.36**	150-152	0.41/ (10:0.25)	78
8b	Br	2		-2.75	26.69**	210-211	0.43/ (10:0.25)	68
8c	Br	2		-2.61	26.83**	184-188	0.46/ (10:0.25)	86
8d	Br	2		-5.81	23.63**	193-195	0.60/ (10:0.5)	51
8e	Br	2		-4.04	25.40**	129-130	0.57/ (10:0.25)	58
8g	Br	2		0.50	29.94**	136-138	0.36/ (10:0.25)	78
8h	Br	2		-4.68	24.76**	118-120	0.76/ (10:0.5)	46
8i	Br	2		-5.87	23.57**	170-175	0.57/ (10:0.25)	69
8l	Br	2		-2.52	26.92**	233-234	0.60/ (10:0.5)	72

8m	Br	2		-1.84	27.60**	270-272	0.60/ (10:0.5)	88
8n	Br	2		-4.97	24.47**	154-155	0.59/ (10:0.5)	84
8o	Br	2		-2.23	27.21**	221-222	0.31/ (10:0.25)	78
8p	Br	2		-3.48	25.96**	127-129	0.53/ (10:0.5)	72
8x	Br	2		-6.10	23.34**	231-233	0.70/ (10:0.5)	85
Isoniazide					100			

От представените данни ясно се вижда, че активностите на втората серия хидразони, изразени като % нхибиране на растежа варират в границите от -8.99 до 2.37%, като най-активен се явява хидразон **8a** с 2.37% нхибиране на растежа. Аналогът на най-активният хидразон от предишната серия (**7o**) от тази серия – хидразон **8o** проявява средна активност в рамките на серията. При приравняване на активностите (виж връзка структура-активност) се вижда, че **7o** е около 5 пъти по-активен от своя аналог.

4. Предварителна оценка на евентуалната приложимост на пирол-съдържащите хидразони в практиката.

От интерес за нас бе намирането на предварителна информация за възможността за прилагане на получените пирол-съдържащи хидразони, като бъдещи лекарства. За тази цел бяха направени експерименти за определяне на острата токсичност и стабилността при съхранение, както и влиянието на някои структурни параметри (като например параметрите, включени в “Правилото 5 на Липински”) върху фармакокинетичното поведение на новосинтезираните продукти.

4.1. Токсикологични изследвания

С цел установяването на токсичността на новополучените съединения подбрани продукти, бяха предадени за изпитване на работният колектив на доц. Николай Данчев от катедрата по Фармакология и Токсикология, към Фармацевтичен Факултет на

Медицински Университет, София, където бяха направени изпитания за остра интраперитонеална и пер-орална токсичности, за което изказвам своите благодарности на доц. Данчев и неговият колектив.

За определяне на **острата интра-перитонеална и перорална токсичност** съединенията бяха изследвани в съответствие с указанията на OECD 425 “Up and Down procedure” с помощта на програма за компютърни изчисления.

Индекс на резорбция (ИР):

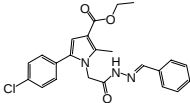
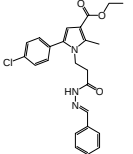
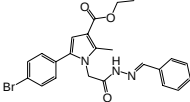
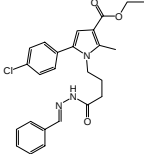
За част от изследваните съединения бе изчислен съответният индекс на резорбция, представляващ следното отношение:

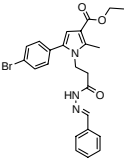
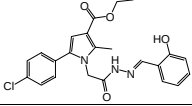
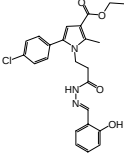
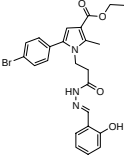
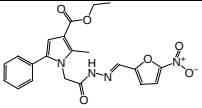
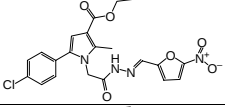
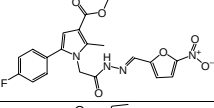
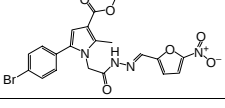
$$ИР = LD_{50 \text{ i.p.}} / LD_{50 \text{ p.o.}} * 100 (\%)$$

Получените резултати от острата интраперитонеална и пер орална токсичности, заедно с индекса на резорбция за някои от изследваните съединения са показани на

Таблица 11:

Таблица 11. Остра токсичност (LD₅₀) на подбрани съединения след интраперитонеално и перорално приложение на мишки.

№	ID	Химична структура	LD50 i.p. (mg/kg)	LD50 p.o. (mg/kg)	ИР (%)
1.	1a		>1500	-	-
2.	2a		510	1000	51
3.	7a		750	-	-
4.	12a		1200	-	-

5.	8a		730	-	-
6.	1b		760	1500	50.6
7.	2b		1200	2000	60
8.	8b		1020	-	-
9.	01d		>1500	2500	60
10.	1d		1249	-	-
11.	4d		740	>1500	49.3
12.	7d		1500	>2500	60
INH			151	176	85.8

Получените резултати за токсичността на подобраните пирол-съдържащи хидразони, бяха сравнени с токсичността на **Isoniazid**, използван като сравнително вещество. Бе установено, че подобраните структури са 7-10 пъти по-слабо токсични от контролата. Така според установената скала за токсичност LD₅₀ на Hodge и Sterner продуктите могат да бъдат категоризирани като слабо токсични (между 500 и 5000 mg/kg телесна маса). Това е изключително благоприятен атестат, както за конкретните продукти, така

и за класа съединения, към който принадлежат. Ниската токсичност на хидразоните с пиролов цикъл ги дефинира като перспективни за следващи разработки в областта.

От стойностите на изчисленият Индекс на Резорбция може да се заключи, че повечето от съединенията се резорбират около 50%. За някои от тях (**2b**, **01d**, **7d**) резорбцията е по-висока – 60%. Вероятно слабата разтворимост във вода е причина за тези стойности на индекса на резорбция. Така изчисленият индекс на резорбция и получените стойности за пер-орална токсичност са предпоставка за използването на продуктите в относително по-високи дози, без това да доведе до проява на токсични реакции.

4.2. Изследване на стабилността на получените хидразони

Ранната информация за стабилността на даден новосинтезиран продукт, получен като потенциален лекарствен агент е от съществено значение както за фармакокинетичното му поведение в организма, за условията за формулиране, съхранение, възникването на токсични ефекти, свързани с разпадните му продукти и пр., така и за включването му в процеси на оптимизация и селекция на водещи активни структури.

4.2.1. Химическа стабилност при съхранение

По дефиниция химическата стабилност представлява възможността дадена субстанция да остане непроменена вследствие на въздействия от типа на вътрешна реакция или външни фактори като: въздух, топлина, светлина, налягане и пр.

Всички продукти от дисертацията бяха съхранявани целогодишно при стайна температура и при достъп до светлина и въздух в продължение на 2.5 години. Бе установено, че съединенията запазват непроменени както физичните, така и химичните си свойства и в този смисъл могат да бъдат считани за химически стабилни при тези условия.

4.2.2. Стабилност при физиологични условия

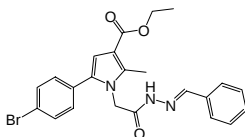
За оптимална проява на своя ефект, биологично активните вещества трябва да бъдат ефикасно доставени до мястото на действието им и да бъдат отделени с точно определена скорост. Друг важен фактор повлияващ биологичното им поведение е тяхната хидролитична стабилност при физиологични условия като: телесна

температура от 37°C и физиологични стойности на рН от 1.2 (на стомаха), 7.4 (на кръвната плазма) и 8.5 – 9.0 (на тънките черва).

Избор на моделно съединение

Целевите за настоящата работа хидразони съдържат в основата си пиролов цикъл, носещ множество функционални групи като етокси-карбонилна, ацетилна, карбоксамидна и др. Добре известен в литературата факт е, че изцяло заместеният пиролов цикъл, както и свързаните с него метилни групи са стабилни при умерени температури и в широк интервал от рН стойности. По тази причина, като потенциални “чувствителни” групи, податливи на хидролиза, могат да се считат естерната и в по-малка степен амидната групи от молекулата. Освен това, като кондензационни продукти, хидразоните притежават също така и чувствителната към хидролиза хидразонова група.

В предишни разработки проведени в нашата лаборатория с анализи, съдържащи коментираните естерна и амидна групи бе установено, че те са стабилни при условия близки до физиологичните, което доведе до заключението, че като потенциално уязвима спрямо хидролиза в нашите съединения се явява предимно хидразоновата група. Така от получените хидразони за моделно съединение избрахме (етил 1-(2-(2-бензилиденхидразинил)-2-оксоетил)-5-(4-бромобензил)-2-метил-1Н-пирол-3-карбоксилат) (**7a**), притежаващо само две хидролитично нестабилни групи: естерна група в позиция 3 в изходния хидразид, за която бе вече доказано, че е стабилна и новоформираната хидразонова група.



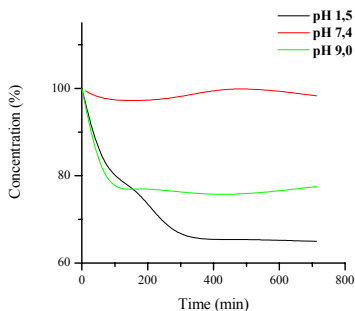
Подбора на тази структура като моделно съединение бе основно повлиян от възможността за по-лесно измерване на характеристиките му чрез UV/VIS спектроскопия, с цел изследване и анализ на протичащата реакция на хидролиза.

Определяне на хидролитичната стабилност

Поради ограничената разтворимост на хидразоните във вода, за оценка на тяхната стабилност бе необходимо да бъде приготвен смесен разтворител съдържащ както органична фракция така и вода. Така за установяване на най-подходящата смес бяха проведени известен брой опити в които, като органични фракции бяха включени следните разтворители диметилформамид, ацетонитрил, тетраhydroфуран и диоксан в

различни съотношения с вода. Тези разтворители бяха подбрани основавайки се на тяхната способност да се смесват с вода и на тяхната инертност спрямо pH. От изброените по-горе смеси, като най-подходяща за провеждане на експеримента бе определена сместа диоксан:вода в съотношение 8:2.

За определяне на хидролитичната стабилност при физиологични условия бе необходимо приготвяне на смеси от подбраният органичен разтворител и подходящи буферни разтвори при дефинираното по-горе съотношение, с цел постигне на желаните pH стойности, близки до физиологичните. Подходящи количества от моделното съединение бяха претеглени на аналитична везна и разтворени в съответните смесени разтворители получени чрез смесване на: диоксан: солнокисел буфер с pH 1.2 (**Разтвор 1**), диоксан: фосфатен буфер с pH 7.4 (**Разтвор 2**) и диоксан: лимоненокисел буфер с pH 9.0 (**Разтвор 3**), така че концентрацията да е в рамките на $5 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Така получените разтвори бяха инкубирани при непрекъснато разбъркване при температура 37°C за 720 min. Аликвотни проби от по 2 ml от анализирания разтвор бяха отпипетирани на определени времеви интервали (0, 65, 170, 275, 445 и 720 min.) и бяха снети и записани съответните UV/VIS спектри. Бе изследвано поведението на съединение **7a** при тези стойности на pH, като бе определяно количественото му съдържание чрез измерване на абсорбцията при 282 nm на определени интервали от време и бе построена зависимост концентрация/време.



Фиг. 45. Зависимост на определяната концентрация при 282 nm от времето за съответните разтвори на моделното съединение: Разтвор 1 (pH=1.2), Разтвор 2 (pH=7.4) и Разтвор 3 (pH=9.0).

Анализът на представената на **Фиг. 45** графична зависимост показва, че хидролизният процес протича с по-голяма скорост при алкално pH (pH=9.0), тъй като на 65 min. от началото на експеримента се наблюдава минимум в отчетената

концентрация, след което стойностите ѝ остават сравнително постоянни. В киселата pH област (pH=1.2) този минимум се достига едва на 275 min., което показва, че скоростта на хидролиза е значително по-ниска.

В резултат на проведените експерименти може да се заключи, че моделният хидразон съдържащ уязвими функционални групи, характерни за съединенията от дисертационния труд е чувствителен на хидролитично разпадане при стойности на pH pH=1.2 и pH=9.0. Хидролиза на моделното съединение във фосфатен буфер с pH 7.4, не бе наблюдавана и то може да се счита за стабилно при това pH.

Това от своя страна показва, че в кисела среда по-голямата част от веществото (70-75%) би могла да се резорбира и постъпи в системното кръвообръщение в непроменен вид, тъй като времето на престой в стомаха (при pH=1.2) е около 3-4 часа. За такъв период от време хидролизата на **7a** при pH = 1.2 е не повече от 30%. Фактът, че молекулата не търпи хидролитични промени при pH = 7.4 означава, че предположението, че фармакологичните ефекти са резултат от действието на цялата молекула, а не на хидролизните продукти е основателно.

Хидролитичните промени в алкална среда засягат повече от 20% от изходната концентрация на **7a**, за около 65 min. Това налага извода, че не повече от 40% от изходното количество **7a** би претърпяло хидролитични промени при цялостното преминаване през гастро-интестиналния (стомашно-чревния) тракт.

4.3. Прогнозиране на фармакокинетичното поведение с “Правилото 5 на Липински” за лекарствено подобие

Проявяваната от дадено съединение биологична активност сама по себе си е необходима, но не достатъчна предпоставка за разглеждането му като потенциално лекарство. Други важни фактори в тази насока са благоприятното му фармакокинетично поведение в живия организъм, осигуряващо необходимата бионаличност и способността за транспортирането му до мястото на действие през различни мембрани, оптималното протичане на метаболизма и елиминирането. Едно по-ранно прогнозиране на фармакокинетичните свойства би било особено полезно и би спестило излишни разходи по изпитанията на редица предварително обречени на отпадане продукти.

Оценка на лекарственото подобие с “Правилото 5 на Липински”

По настоящем има няколко принципа за дефиниране на лекарствено подобие един от които е “Правилото 5 на Липински”.

“Правилото 5 на Липински”, формулирано от Christopher A. Lipinski през 1997, се използва за оценка на лекарственото подобие или за предсказване на възможността дадено химично съединение с определена фармакологична активност да може в бъдеще да се използва като лекарство с орално приложение. По своята същност правилото описва свойствата на молекулата свързани с нейната фармакокинетика в човешкото тяло, включително абсорбция, разпределение, метаболизъм и екскреция (“ADME”).

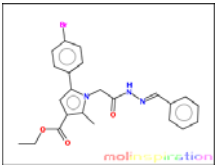
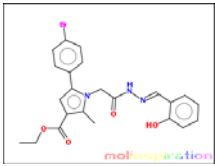
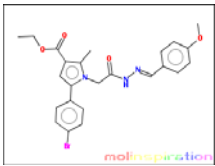
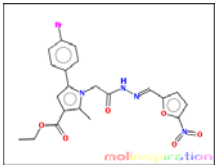
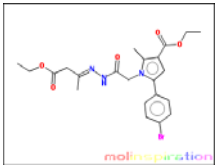
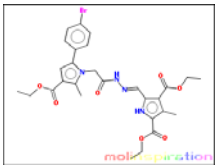
Надеждността на изследваните нови съединения (както на активните, така и на неактивните) като потенциални лекарства и прототипи за бъдещи оптимизации на структурата бе оценена с помощта на “Правилото 5 на Липински”, препоръчващо следните гранични стойности за някои молекулни параметри: *хидрофобен параметър* $\text{Log } P < 5$, *молекулна маса* $MW < 500$, *брой акцептори на протони* (nO , nN) < 10 и *брой донори на протони* (nOH , nNH) < 5 .

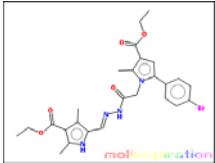
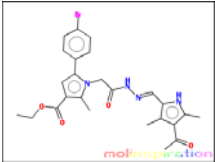
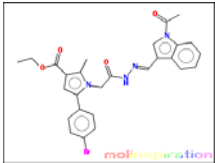
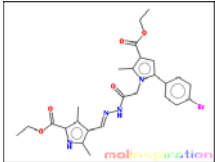
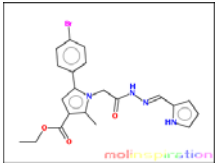
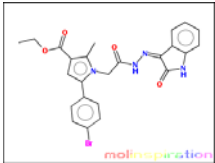
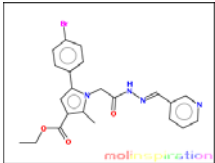
По своята същност правилото на Липински твърди, че най-общо орално прилаганите лекарствени средства не трябва да нарушават посочените параметри по повече от един показател. В последните години с цел по-добро оценяване на лекарственото подобие (druglikeness) това правило е било многократно променяно, като част от тази промяна се дължи и на характерните за антитуберкулозните агенти високи стойности на MW и $\log P$. В резултат на това критериите на Липински са били допълнени и до известна степен разширени.

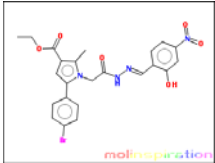
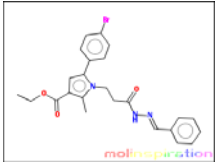
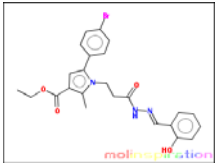
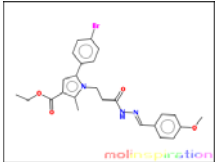
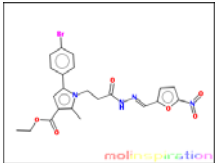
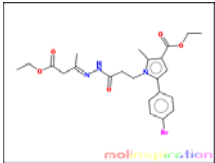
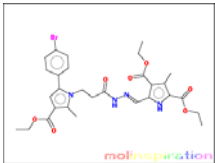
Следователно удовлетворяването на “Правилото 5 на Липински” би било благоприятна предпоставка за използването на най-активните структури като прототипи за структурни вариации при бъдещ синтез на агенти за борба с туберкулозата.

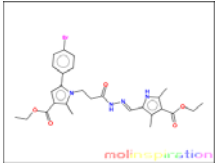
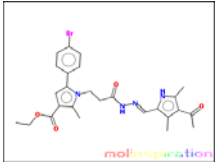
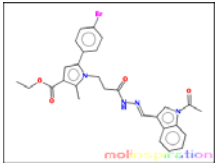
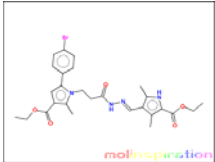
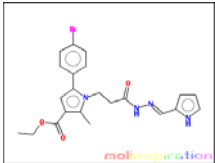
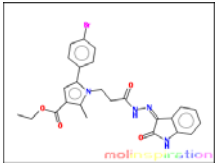
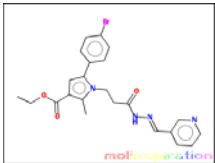
Отчитайки важността на “Правилото 5 на Липински” и възможността то да бъде използвано за предварителен подбор на модифицирани структури в процеса на разработване на нови фармакологично активни агенти, за нас бе от интерес намирането на параметрите на Липински за целевите за дисертацията съединения (виж **Таблица 15**).

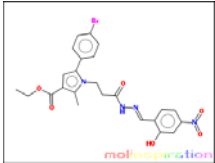
Таблица 15. Структура, активност и стойност на параметрите от “Правилото 5 на Липински” на новосинтезираните хидразони.

Код	Структура	Активност		Параметри от “Правилото 5 на Lipinski”			
		IC50	% Инхиб. на растежа	Log P	MW	n (O, N)	n (OH, NH)
7a		10.320	-	4.834	468.351	6	1
7b		>100	-	4.774	484.35	7	2
7c		>100	-	4.891	498.377	7	1
7d		9.002	-	4.174	503.309	10	1
7e		>100	-	3.353	492.37	8	1
7g		>100	-	4.948	615.481	11	2

7h		50.681	-	4.723	557.445	9	2
7i		>100	-	4.413	527.419	8	2
7l		11.544	-	5.306	549.425	8	1
7m		>100	-	4.723	557.445	9	2
7n		>100	-	3.988	457.328	7	2
7o		5.921	-	4.069	509.36	8	2
7p		52.523	-	3.598	469.339	7	1

7x		>100	-	4.709	529.347	10	2
8a		-	2.37	5.105	482.378	6	1
8b		-	-2.75	5.045	498.377	7	2
8c		-	-2.61	5.161	512.404	7	1
8d		-	-5.81	4.445	517.336	10	1
8e		-	-4.04	3.624	506.397	8	1
8g		-	0.50	5.219	629.508	11	2

8h		-	-4.68	4.993	571.472	9	2
8i		-	-5.87	4.684	541.446	8	2
8l		-	-2.52	5.577	563.452	8	1
8m		-	-1.84	4.993	571.472	9	2
8n		-	-4.97	4.259	471.355	7	2
8o		-	-2.23	4.34	523.387	8	2
8p		-	-3.48	3.868	483.366	7	1

8x		-	-6.10	4.98	543.374	10	2
----	---	---	-------	------	---------	----	---

От направените изчисления бе установено, че в основната си част новосинтезираните продукти отговарят на граничните условия на Липински за противотуберкулозни препарати, което ги прави подходящи за бъдещи оптимизации.

5. Разделяне на изомери – системи и охарактеризиране на получените продукти чрез ИЧ и ¹H-ЯМР

Основен структурен елемент на ацилхидразоните е съдържащата се хидразонова група, разпозната във фармакофорните системи на известни противотуберкулозни средства. Именно наличието на тази специфична група в целевите съединения, предполага наличие на геометрична изомерия при тях.

За разделяне на геометричните изомери се спряхме на метода на фракционната прекристализация и разделяне чрез тънкослойно-хроматографската техника. Основните предимства на тези два метода са простотата на изпълнение и бързото и лесно постигане на крайния резултат.

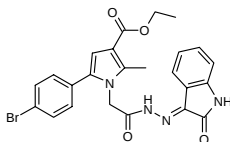
5.1. Разделяне на изомери посредством тънкослойно хроматография.

Поради редицата предимства на TLC-хроматографията при разделяне на смеси от вещества, а в това число и изомери последователно беше анализирано поведението на синтезираните от нас съединения хроматографирани върху плака силикагел/Al-фолио с дебелина на слоя 0,2 mm. От изследваните съединения от особен интерес за нас бяха хидразон **7a** и хидразон **7o**, показали добра противотуберкуозна активност. Голям брой хроматографски условия бяха анализирани и оценени като вероятна ТСХ система за разделяне на E/Z форми на посочените структури. Като неподвижна фаза бе използван 0.2 mm слой от силикагел върху алуминниева плака. От всички 21 експериментирани дву-, три- и четири-компонентни подвижни фази, като най-подходяща за изолиране на вероятните изомери на хидразон **7o**, бе определена система 17 от подсочените в Таблица 16 (Бензен:метанол:ацетонитрил:тетрахидрофуран =10:0,5:0,5:1,25), поради добрата разделителна способност, получена при тези условия.

При провеждане на хроматографския анализ в посочената система на хроматографската плака бе наблюдавано наличие на две петна, с различни R_f -стойности от тези на изходните реагенти на достатъчно разстояние едно от друго за тяхното разделяне, съответно: $R_{f1}=0,10$ и $R_{f2}=0,43$. Така получените обнадеждаващи стойности ни дадоха основание да продължим опитите в тази посока.

При изследване на хидразон **7a** за съжаление никоя от изброените в Таблица 16 хроматографски системи не беше подходяща. По тази причина бе направен опит за разделяне на изомерите на този хидразон по другия избран от нас метод, а именно фракционната прекристализация.

Така като метод на разделяне на двете изомерни форми на хидразон **7o** (етил 5-(4-бромобензил)-2-метил-1-(2-оксо-2-(2-(2-оксаиндолин-3-илиден)хидразинил)етил)-1H-пирол-3-карбоксилат) (Фиг. 47) бе избран метода на препаративната тънкослойна хроматография, с цел получаване на достатъчни количества от откритите продукти за последващо охарактеризиране на структурата им посредством спектрални техники.



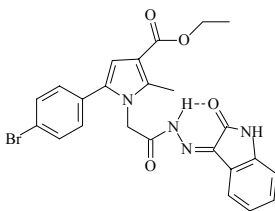
Фиг. 47. Структурна формула на хидразон **7o**.

Като неподвижна фаза в този случай бе използван носител силикагел/стъкло с дебелина на слоя 2 mm.

По време на анализа бе наблюдавано известно припокриване и размиване на слоевете. С цел подобряване на разделянето бе променен метода на елуиране от изократично в градиентно, което бе постигнато чрез последователно поставяне на хроматографската плака в системи с постепенно повишаваща се полярност.

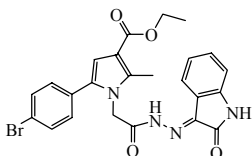
Така успешно бяха разделени два продукта. Структурата на получените продукти бе доказана посредством ИЧ- и ^1H -ЯМР спектрални анализи.

В избраният хидразон *Z*-изомерната форма се явява по-стабилна, поради способността си да образува вътрешномолекулна водородна връзка между кислородният атом от свободната карбонилна група на изатина и протона на CONH групата от амидната част на структурата (Фиг. 48). При това взаимодействие се формира шестчленен цикъл, който се явява допълнителен стабилизиращ фактор на структурата.



Фиг. 48. Структура на Z изомерната форма на хидразон 7o.

В другият случай (E- изомерна форма), образуването на тази водородна връзка е невъзможно поради конформационното разположение на двете участващи във взаимодействието групи (Фиг. 49).



Фиг. 49. Структура на E изомерната форма на хидразон 7o.

Този факт бе потвърден и от данните от полученият за съединението ИЧ спектър. В снетият в таблетка KBr (cm^{-1}) спектър бяха наблюдавани следните характеристични ивици: за структура **7o/Z**: 3265 (ν NH), 2977 (ν CH₃, CH₂), 1690 с рамо при 1678 (ν C=O, -COOC₂H₅, ν C=O Изатин), 1620 (ν C=O (Амид I)), 1570 (δ NH (Амид II)), 1523 (ν C=N), 1463 (δ CH₂), 1378 (δ CH₃), 1247 (ν C-O, -COOC₂H₅), 831 (p-заместено бензеново ядро), за структура **7o/E**: 3270 с рамо при 3250 (ν NH), 2927 (ν CH₃, CH₂), 1693 с рамо при 1687 (ν C=O, -COOC₂H₅, ν C=O Изатин), 1621 (ν C=O (Амид I)), 1564 (δ NH (Амид II)), 1463 (δ CH₂), 1379 (δ CH₃), 1248 (ν C-O, -COOC₂H₅), 831 (p-заместено бензеново ядро) съответно. Съответните температури на топене за получените изолирани изомери са както следва: за **7o/Z** 246°C и за **7o/E** 269°C.

Наблюдаваните ниски стойности за вълновите числа (ν) на всички карбонилни групи е резултат от вътрешномолекулни водородни връзки, в които те участват.

Заслужава да се отбележи, че в ИЧ спектъра на съединение **7o/E** се наблюдава рамо при 1687 cm^{-1} . Тази ивица може да бъде приписана на валентните трептения на свободната карбонилна група на изатина. Очаквано преместване на така формираното рамо към по-ниските стойности на вълновото число (1678 cm^{-1}) се наблюдава в спектъра на съединение **7o/Z**. Това се дължи на участието на C=O групата във

водородна връзка с протона от NH групата на хидразидната част на молекулата (амидната група). Аналогично отместване към по-ниски стойности на вълновото число се наблюдава и при поглъщането за Амид II. Също така заслужава да се отбележи, че областта на поглъщане между 3100 и 3300 cm^{-1} е широка и съставна и се наблюдава общо понижение на интензивността на поглъщане в сравнение със спектъра на **7o**/E.

Тези резултати бяха потвърдени от направеният ^1H -ЯМР анализ. В полученият протонен спектър, сигналите отговарящи на протоните от CONH, CH_2CH_3 , CH_3 (2) и Изатин-NH групите на E- изомера са изместени към по-слабо поле, в сравнение със сигналите отговарящи на Z- изомера. Това отместване потвърждава предположението за наличие на стабилизираща вътрешномолекулна водородна връзка в структурата на Z- изомера.

Химичите отмествания в съответните ^1H -ЯМР спектри на разглежданите структури са посочени в Таблица 17.

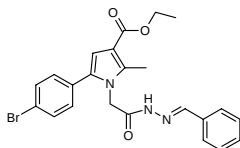
Таблица 17. Химично отместване (δ/ppm) в ^1H -ЯМР спектрите ($\text{DMSO}-d_6$) на E-/Z-конформерите на хидразон 7o.

Хидразон	CH_2CH_3 t	$\text{CH}_3(2)$ s	Pyr-H s	Isatin-NH s	CONH s	Други химични отмествания
E-	1.35	2.53	6.59	10.92	12.63	4.22(q, J=7.09 Hz, CH_2CH_3) 4.30(q, J=6.95 Hz, CH_2CH_3) 5.13(s, N- CH_2CO) 6.90(d, J=7.5 Hz, Isatin- C_6H_4 -7) 7.04(t, Isatin- C_6H_4 -6) 7.20(d, J=7.5 Hz, C_6H_4 -3,5) 7.32(t, Isatin- C_6H_4 -5) 7.49(d, J=8.07 Hz, C_6H_4 -2,6) 7.62(t, Isatin- C_6H_4 -8)
Z-	1.28	2.45	6.53	10.44	10.87	4.16(q, J=7.14 Hz, CH_2CH_3) 4.22(q, J=7.1 Hz, CH_2CH_3) 5.1(s, N- CH_2CO) 6.83(d, J=7.8 Hz, Isatin- C_6H_4 -7) 6.96(t, Isatin- C_6H_4 -6) 7.11(d, J=8.32 Hz, C_6H_4 -3,5) 7.27(t, Isatin- C_6H_4 -5) 7.39(d, J=8.31 Hz, C_6H_4 -2,6) 7.44(t, Isatin- C_6H_4 -8)

В допълнение бе установено, че Z- изомера има по-висока R_f стойност от съответният му E- изомер в система с нормални фази, както и, че по-стабилната Z-изомерна форма доминира.

5.2. Разделяне на изомери посредством фракционна прекристализация.

Опитът за разделяне на изомерите на хидразон **7o** по този метод се оказа неуспешен, поради еднаквата разтворимост на двете му изомерни форми в ползваните от нас разтворители. По тази причина този метод бе приложен само за хидразон **7a**.



Фиг. 49 Структурна формула на хидразон 7a

Съответните ИЧ и ¹H-ЯМР характеристики на разделените съединения бяха снети. От получените резултати стана ясно, че отделените кристали от по-лесноразтворимият продукт, получен след концентриране на матерната луга, отговарят на подложения на разделяне изходен хидразон **7a**. По-трудноразтворимият компонент се получава в количество недостатъчно за охарактеризиране.

В резултат на извършените експерименти бяха приложени два метода за разделяне на изомери: препаративна ТСХ хроматография с която успешно бяха разделени и изолирани двата изомера на един от синтезираните хидразони (**7o**) и фракционна прекристализация с която бяха изолирани две различни съединения, притежаващи сходни физикохимични отнасяния, като за едното бе доказано, че е изходният хидразон (**7a**). Така получените съединения бяха охарактеризирани със съответни ИЧ и ¹H-ЯМР спектри.

От получените резултати може да се заключи, че метода на фракционната прекристализация не е подходящ за прилагане при изолиране на изомери за така подобрите от нас хидразони.

6. Влияние на реакционните условия върху получаването на изомери

Известно е, че скоростопределящ етап за кондензационната реакция на получаване на хидразони е образуването на съответният карбокатион на участващият в реакцията карбонилен партньор. В това отношение един от основните влияещи параметри е типа разтворител, който може да бъде използван.

След като бяха намерени условия за разделяне на изомерите на хидразон **7o** бе изследвано влиянието на реакционните условия върху получаващите се изомери и

съотношението между тях. За тази цел бяха проведени опити за получаване на един и същ хидразон **7o**, при различни условия: в среда от чисти етилов алкохол и диоксан; етанол и диоксан с понижено pH (използва се солна киселина) и в гореописаните разтворители при два температурни режима, а именно – стайна температура и температура на кипене на съответният използван разтворител. Продължителността на реакцията се определя тънкослойнохроматографски, като за край на реакцията се отчита момента в който са изчезнали петната отговарящи на изходните реагенти. Добивът е определен на база прекристализиран продукт, изолиран от по-интензивното петно. Получените резултати показват, че промяната на разтворителя и pH на средата води до промяна единствено в скоростта на протичане на реакцията, а не влияе практически върху добива.

7. Връзка структура-биологична активност (SAR) (противотуберкуозна активност, токсичност).

7.1. Зависимост на биологичната активност от някои молекулни параметри

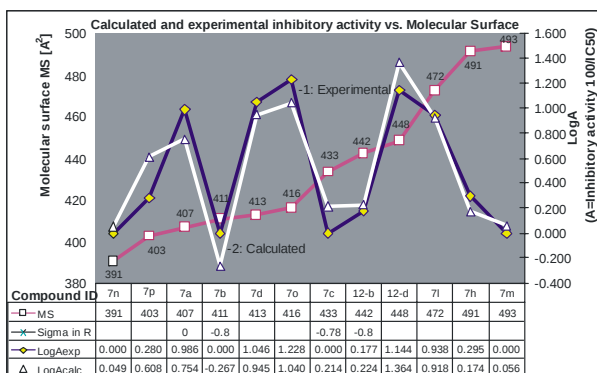
В опит да бъдат намерени и други полезни зависимости (освен за хидрофобен параметър **Log P**) на инхибиторната активност от различни физико-химични молекулни дескриптори, като са молекулна маса (**MW**), моларна рефракция (**MR**), диполен момент **μ** и молекулна повърхност (**MS**) бяха изведени и съответните им графични функции за групата новосинтезирани хидразони, целеви за настоящата дисертация, с $n = 1$. Най-добра корелация бе установена при съпоставяне на активностите със съответните стойности на молекулната повърхност **MS** на хидразоните, с изключение на продукти **7b** и **7c**. Това отклонение бе свързано с наличието на допълнителни електронни ефекти, дължащи се на присъствието на ароматни остатъци в структурата на съответните алдехиди **b** и **c**. В търсенето на общ QSAR модел, описващ пълната серия съединения, бе отчетено влиянието на съответните стойности на параметъра σ (константа на Хамет, отразяващо влиянието на електронните свойство на заместителите; за $H \sigma = 0$), според подхода на Ханч (Hansch). За удобство, инхибиращата активност “A” за всяко съединение бе изразена като $1/IC_{50} \cdot 10^2$ и на **Фиг. 51** бе изведена графичната зависимост на съответните логаритмични стойности на така преизчислената активност, спрямо нарастващата молекулна повърхност (**MS**). За съединенията с активност $IC_{50} > 100$, бе прието, че са практически неактивни и в логаритмичната скала с предположението, че $IC_{50} = 100$ тяхната активност бе приравнена на нула ($\text{Log}A = \text{Log}100/100 = 0$).

Следното уравнение (2) бе изведено с помощта на регресионен анализ, използвайки популарния метод на най-малките квадрати:

$$\text{LogA}=0.4445(\text{MS})-0.0005(\text{MS})^2-96.8574+\text{I}.\rho.\sigma \quad (2)$$

$$n = 12, r^2 = 0.862, s = 0.022$$

където **A** е инхибиращата активност определена спрямо *M. tuberculosis* H₃₇Rv, както е дефинирана по-горе; **MS** е молекулната повърхност; **I** е индикаторна променлива, по смисъла на която се отчита наличието или отсъствието на ароматни остатъци, като : **I**=1 за съединения притежаващи ароматни заместители в хидразоновата молекула и **I**=0 за останалите; **σ** е съответната константа на Хамет; **ρ** е константата на биологичната реакция (в този случай **ρ** е определена на 1.448); **n** е броя на включените съединения, **r**² е корелационния коефициент и **s** е стандартното отклонение.



Фиг. 51. Сравнение между изчислените и експериментално определените инхибиторни активности (Log A) като функция от нарастващата молекулна повърхност (MS) на анализираниите хидразони.

Фигура 51 показва, че прогнозираната активност, определена с помощта на уравнение (2) се приближава до експерименталните стойности, при което стойностите на коефициента на корелация **r**² и стандартно отклонение **s** са близки до идеалните (1 и 0 съответно), което е индикация за добра корелация. От графиката става ясно, че максималната активност съответства на хидразони със умерено голяма молекулна повърхност. Още повече, стойностите за MS (407-472 Å²) отнасящи се за продуктите с най-висока регистрирана активност напълно съответстват на стойностите на същия параметър (401-464 Å²), установени преди за серия от други 12 аналогични съединения.

Положителната стойност на ρ показва, че туберкулоостатичната активност ще се повлияе положително от наличието на по-електроотрицателни заместители в ароматната част на хидразоновата молекула (за разлика от отрицателния ефект на o-OH и $\text{p-OC}_2\text{H}_5$ забелязан при **7b** и **7c**). Като производно на незаместеният бензалдехид ($\sigma = 0$), **7a** показва средна активност.

7.2. Зависимост на биологичната активност от типа на халогенния заместител и дължината на “спейсър”.

Анализираните съединения са обобщени в следните **Серии**, според типа на халогенния заместител и дължината на “спейсър”. В следващите графики, буквите **a - x** се отнасят за съответните карбонилни съединения, използвани като синтетични партньори при получаването на хидразоните и посочени на **Фигура 43**: **Серия 01**: $\text{X} = \text{H}$, $n = 1$; **Серия 1**: $\text{X} = \text{Cl}$, $n = 1$; **Серия 2**: $\text{X} = \text{Cl}$, $n = 2$; **Серия 4**: $\text{X} = \text{F}$, $n = 1$; **Серия 7**: $\text{X} = \text{Br}$, $n = 1$; **Серия 8**: $\text{X} = \text{Br}$, $n = 2$.

В търсенето на вероятни зависимости структура-активност, бе направен опит за привеждане на всички налични фармакологични резултати от проведените скрининг анализи в общ формат, така че да бъде възможно извършването на приближено сравнение на данните за отделните анализи, получени от двата различни контрактора (TAASF и SRI International) и изразени в различни скали. За тази цел и с помощта на опростени приближения, някои от получените резултати бяха преизчислени от единици “% Инхибиране на растежа” в “% инхибираща активност” отнесена към активността на **Isoniazid** (приет за стандарт с активност 100 %). Следните приближения бяха направени:

В случаите на активност регистрирана като “% инхибиране на растежа”:

Преизчислен % инхибиторна активност = % Инхибиране на растежа + 29.44

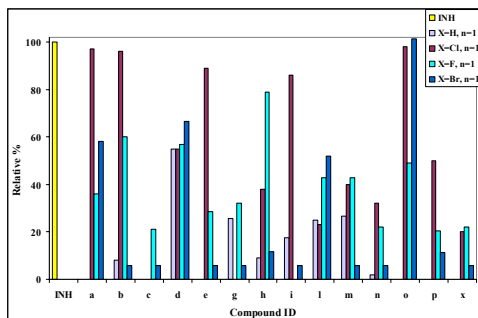
където 29.44 е абсолютната стойност на най-ниската активност дадена с отрицателен знак.

В случая на активност, регистрирана като IC_{50} :

Преизчислен % инхибиторна активност = $0.06/\text{IC}_{50} \cdot 100$

където 0.06 е стойността на IC_{50} на избраният за стандарт **Isoniazid**, използван като сравнителен компонент.

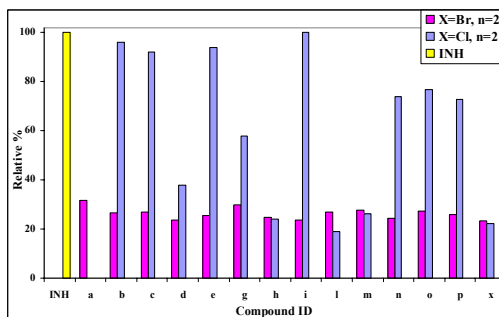
Така на **Фиг. 52** е показано влиянието на халогенния атом на позиция 4 в ароматния заместител на централния пиролов пръстен, при хидразони с един и същ “спейсър” $n = 1$, там където имаме налични данни.



Фиг. 52. Влияние на природата на халогения заместител за анализите на Сериите със “спейсър” $n = 1$ върху туберкулостатичната активност.

От горната фигура изследваща влиянието на халогена върху туберкулостатичния ефект се вижда, че при сравняване между новите и вече синтезираните анализи притежаващи различен халогенен заместител на 4-то място в ароматната част на ключовия хидразид, най-благоприятни резултати са получени за хидразоните от **Серия 1** ($X = \text{Cl}$), тъй като заместването на този атом както с F (**Серия 4**), така и с Br (**Серия 7**) води до намаляване в инхибиторната активност.

Влиянието на Cl се вижда още по-отчетливо от това на Br при сравняване на следните две серии **Серия 2** и **Серия 8** (и двете със “спейсър” $n = 2$), при което относителната активност на Cl-заместената серия е приблизително 4 пъти по-висока от тази на Br-анализи (Фиг. 53).



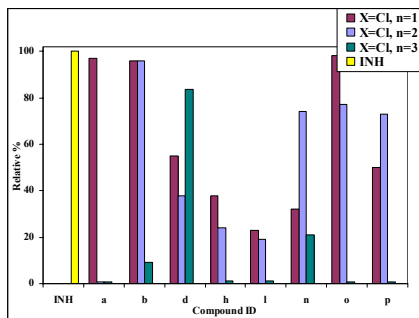
Фиг. 53. Паралелно сравняване на влиянието на заместителите Cl и Br в **Серия 2** и **Серия 8** (със дължина на “спейсъра” $n = 2$) върху противотуберкулозната активност.

От гореизложените наблюдения може да се заключи, че за получаване на най-добри резултати може да се препоръча при следващи оптимизации на структурата в този клас

съединения, предпочитанията за избор на халоген да следват реда $\text{Cl} > \text{F} > \text{Br}$.

Бе направен и следващ опит да се проследи влиянието на “спейсър” $(-\text{CH}_2)_n$: $n = 1$, 2 или 3 при фиксиран (и установен за най-добър) халоген $\text{X} = \text{Cl}$.

Графичен вид на този анализ е показан на **Фиг. 54**.



Фиг. 54. Влияние на “спейсър” $(-\text{CH}_2)_n$ върху активността.

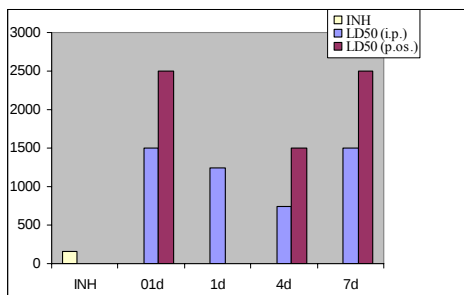
Графиката показва, че влиянието на “спейсър” не може да се интерпретира изолирано от други ефекти. Въпреки това съединенията с най-дълъг “спейсър” ($n=3$) са видимо най-слабо активни.

Изключение от гореизложеното наблюдение е хидразон **12d**, при който удължаването на “спейсър” $(\text{CH}_2)_n$ до $n = 3$ може да оказва положителен ефект. Това се потвърждава от факта, че освен, че **12d** се явява най-активният хидразон от тази серия, то и той и неговият изходен карбохидразид **12** са по-активни от аналозите им с $n = 1$ или 2.

Може да се направи обобщение, че влиянието на халогена върху туберкулоstaticната активност е доминиращо пред дължината на “спейсър”. Най-добрата комбинация от двете структурни характеристики включва **Cl**-заместени хидразони със спейсър $(-\text{CH}_2)_2$ и може да се окаже полезна информация за последващ дизайн и оптимизиране в търсенето на нови противотуберкулозни агенти.

7.3. Зависимост на токсичността от структурата

След провеждане на изследването за токсичност бе установено, че природата на халогена оказва съществено влияние върху токсичността на съединенията. Както се вижда от графиката показана по-долу за съединенията съдържащи **Br** като заместител в ароматното ядро (**7d**) е характерна най-ниска токсичност, следвани от **Cl** – заместените (**1d** и **4d**), като най-токсични се оказват производните съдържащи **F** атом (**01d**) (**Фиг. 55**).



Фиг. 55. Влияние на халогенният заместител върху токсичността.

8. Извеждане на количествена връзка структура-активност (QSAR) за обобщена серия пирол-съдържащи хидразони

Работна серия от пирол-съдържащи хидразони, синтезирани в Катедрата, беше изследвана в сътрудничество със специалисти от Центъра по Биомедицинско инженерство към БАН.

Различни конституционални, топологични, физикохимични и квантово-механични дескриптори на химичната структура бяха изчислени.

Противотуберкулозната активност на пирол-съдържащи хидразони бе изследвана с помощта на *in silico* (компютърно-подпомогнати) методи за лекарствен дизайн. QSAR анализ и молекулно моделиране бяха приложени с цел разкриване на молекулни параметри съществени за биологичния ефект. QSAR моделите бяха оценени с помощта на тестова група съединения.

За целите на QSAR анализа данните за биологичната активност (изразена като % инхибиране) бяха преизчислени с помощта на *logit* трансформация (Уравнение (3)). Получените стойности съответстват на стойностите на $\log(1/IC_{50})$:

$$\logit = \log(\% \text{ инхибиране} / (100\% - \% \text{ инхибиране})) - \log(\text{концентрация в } \mu\text{mol/mL}) \quad (3)$$

Така описаното превръщане е валидно в интервала 10-90%, поради което само съединенията попадащи в този интервал са включени в изведените QSAR уравнения.

Следните QSAR уравнения бяха получени за съединенията влизащи в гореспоменатият интервал:

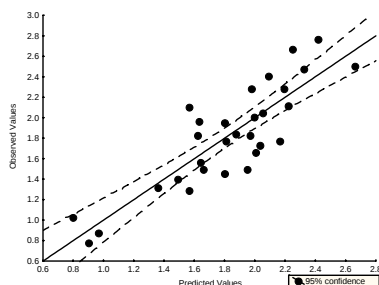
$$\logit = 0.398(\pm 0.069) \text{ KierFlex} - 13.4(\pm 2.5) \text{ Glob} - 0.0196 (\pm 0.0050) \text{ VolSurf_D8} + 2.61(\pm 0.50) \quad (4)$$

$n = 30$; $R^2 = 0.679$; $s = 0.301$; $F = 18.4$; $Q^2 = 0.600$; $\text{press} = 0.337$; $Q^2(5)_{\min} = 0.519$; $Q^2(5)_{\max} = 0.624$; $Q^2(5)_{\text{av}} = 0.591$; $\text{MAE}_{\min} = 0.205$; $\text{MAE}_{\max} = 0.411$; $\text{MAE}_{\text{av}} = 0.322$

logit = 0.342(±0.068) KierFlex - 12.1(±2.3) Glob - 0.0166(±0.0048) VolSurf_D8 + 0.0209(±0.0090) VSA+3_PEOE + 2.26(±0.48) (5)
 $n = 30$; $R^2 = 0.737$; $s = 0.278$; $F = 17.5$; $Q^2 = 0.614$; $\text{press} = 0.337$; $Q^2(5)_{\min} = 0.576$; $Q^2(5)_{\max} = 0.661$; $Q^2(5)_{\text{av}} = 0.610$; $\text{MAE}_{\min} = 0.208$; $\text{MAE}_{\max} = 0.428$; $\text{MAE}_{\text{av}} = 0.313$
 където:

*KierFlex е индекс на гъвкавостта на молекулата по Kier; Glob е глобуларността на молекулата; VolSurf_D8 е дескриптор описващ VolSurf хидрофобността; VSA+3_PEOE е сумата от Ван дер Ваалсовата площ на повърхността ($\text{\AA}^2$) на атомите с частични заряди в интервала [0.15, 0.20); N_Cl е броя хлорни атоми; N_F е броя флуорни атоми; N_N е броя азотни атоми.

Връзката между експериментално определените и изчислените по модел (5) стойности за противотуберкулозната активност на изследваните съединения е представена на **Фиг. 56**.



Фиг. 56. Връзка между експериментално определените и изчислените по модел (5) стойности за противотуберкулозната активност на изследваните съединения

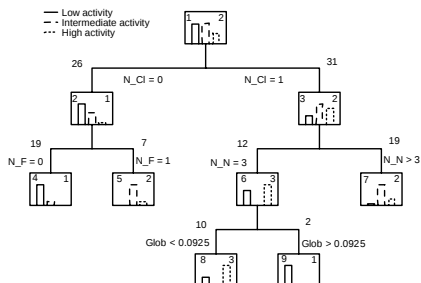
Както се вижда от **Фиг. 56**, има голямо съответствие между експериментално определените и изчислените по модел (5) стойности за противотуберкулозната активност на изследваните съединения.

Така изведените модели сочат, че повишаването на гъвкавостта на молекулата, намаляването на сферичността и хидрофобният обем и нарастването на заредената повърхност на молекулата, повишават активността.

Класификационно дърво

QSAR моделите включват съединения с активност в интервала от 10-90% инхибиране на растежа на *M. tuberculosis*. С цел изследване на всички включени в серията съединения бе приложен подхода на класификационното дърво. За тази цел съединенията бяха групирани в три групи – съединения с висока активност, притежаващи % инхибиране при концентрация 0.014 $\mu\text{mol/mL}$ по-голям или равен на

80% (12 съединения), съединения с ниска активност – с % инхибиране по-нисък или равен на 20% (22 съединения) и съединения със средна активност – с активност между 20 и 80% инхибиране (23 съединения). Полученото класификационно дърво е представено на **Фиг. 57**.



Фиг. 57. Модел на класификационно дърво (1 – ниска активност, 2 – средна активност, 3 – висока активност). Броя съединения за всяко разклонение е даден непосредствено до линията сочеща разклонението.

Броя на съединенията, разпределени по трите групи от модела е представен на **Таблица 19**.

Таблица 19. Разпределение на съединенията в трите групи по активност - предсказана (ред) и наблюдавана (колони).

Наблюдавана Предсказана	ниска	средна	висока
ниска	18	3	0
средна	1	20	5
висока	3	0	7

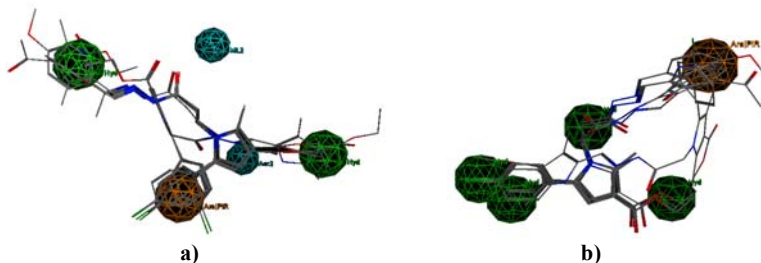
Като обобщение може да се каже, че моделът класифицира правилно 76% от съединенията. Причината за неправилното класифициране на някои от съединенията може да се дължи на някои характеристични параметри свързани с механизма на действие на съединенията, които не са взети под внимание при разработването на модела.

Определяне на фармакофора

За идентифициране на възможен фармакофор бяха разгледани и анализирани 28 съединения. Осем от тях проявяват инхибираща активност спрямо *M. tuberculosis* над 90% (активни), а за останалите 20 съединения инхибиращата активност е под 10 % (неактивни).

Получените модели на фармакофори са представени на **Фиг. 58**. Първият фармакофор (**Фиг. 58a**) съдържа: три хидрофобни (ароматни) региона, проекция на потенциален акцептор на Н-връзка върху свързващото място и проекция на потенциален метален лигатор върху свързващото място.

Това е в съответствие с потенциалния механизъм на действие, предложен от Janin предполагащ свързване на желязо. Вторият фармакофор (**Фиг. 58b**) притежава пет хидрофобни (ароматни) региона.



Фиг. 58. Фармакофорни модели а) три хидрофобни (ароматни) региона, проектирана позиция на свързващ край на потенциален акцептор на Н връзка и проектирана позиция на свързващ край на потенциален метален лигатор; б) пет хидрофобни (ароматни) региона

Фактът, че бяха очертани два вероятни фармакофора предполага, че съединенията могат да се свързват към повече от едно свързващи места или с повече от една биологични мишени. Въпреки това, както бе описано по-горе по настоящем данните подкрепящи или опровергаващи това твърдение са ограничени, тъй като механизма на действие на повечето продукти на ниво клинични изпитания все още остава неизяснен.

От получените QSAR модели може да се заключи, че за противотуберкулозната активност на разглежданите пирол-съдържащи хидразони най-голямо значение имат: *формата и гъвкавостта на молекулата; зарядът на молекулната повърхност и хидрофобният обем и броя на халогенните и азотни атоми.*

Получените фармакофорни модели посочиха, че съществено за активността на пирол-съдържащите хидразони е присъствието в структурата им на хидрофобна група, акцептор на протони и метален лигатор.

Получените резултати ни помогнаха да очертаем структурните характеристики съществени за инхибиторната активност на пирол-съдържащите хидразони и могат да бъдат използвани в последствие при рационалния лекарствен дизайн на нови съединения от тази група, като потенциални кандидати за лечение на туберкулоза.

ИЗВОДИ

1. Синтезирани са **30 нови съединения**, от които **2 нови хидразида и техни 28 хидразона**, съдържащи в структурата си пиролов цикъл и компонент от хидразоновото множество. Съединенията са проектирани като потенциални туберкулостатици и са синтезирани в екологично-съобразни условия в специално оборудване за микросинтез.

2. Структурите на новосинтезираните съединения са доказани с данни от елементен анализ за C, H и N и ИЧ-, ¹H-ЯМР- спектрален анализ.

3. Новополучените продукти бяха изследвани за противотуберкуозна активност *in vitro* в условията на Високопродуктивен скрининг от Американските организации: *Tuberculosis Antimicrobial Acquisition & Coordinating Facility* (TAACF) и *SRI International*. Резултатите от проведените изпитания показаха, че като по-перспективни структури, проявяващи добра активност се открояват хидразони **7o**, **7d**, **7a** и **8a**. Хидразон **7o** показва най-висока активност (IC₅₀ = 5.921) и е предложен за последващи изпитания.

4. Чрез Up-down процедура бяха изследвани острата интра-перитонеална и пер-орална токсичности. Установено бе, че изследваните продукти са 7-10 пъти по-слабо токсични от **Isoniazid**, използван като контрола. Бе изчислен и съответният Индекс на резорбция, според който повечето от съединенията се резорбират около 50%, но за някои от тях (**2b**, **01d**, **7d**) резорбцията е по-висока – 60%.

5. При изпитанията за стабилност върху избран обобщен модел, представящ структурните черти и лабилните групи на съединенията не бе наблюдавана хидролиза на моделното съединение при среда с pH 7.4 и температура 37°C и то може да се счита за стабилно при тези условия. Продуктът е в значителна степен чувствителен на хидролитично разпадане, характерно за хидразоновата група при условия на pH = 1.2 и pH = 9.0 и същата температура.

6. В резултат на извършените експерименти успешно бе приложена ТСХ хроматографска система за препаративна хроматография за разделяне и изолиране на двата изомера на един от синтезираните хидразони (**7o**). Структурата на получените продукти бе доказана посредством ИЧ и ¹H-ЯМР спектроскопия.

7. С оглед извършването на предварителен подбор на подходящи модифициращи структури бе направена прогноза на фармакокинетичното поведение на новосинтезираните продукти с помощта на „Правилото 5 на Липински”. От направените изчисления бе установено, че в основната си част новосинтезираните

продукти отговарят на граничните условия на Липински за противотуберкулозни препарати, което ги прави подходящи за бъдещи оптимизации.

8. Установено беше, че максимална инхибиторна активност при изследваните съединения съответства на средно голяма молекулна повърхност ($407\text{--}472 \text{ \AA}^2$). Включването на по-електроотрицателни заместители в ароматният фрагмент на хидразона засилва туберкулостатичната активност.

9. Сравнителният анализ на връзката структура-действие показва, че влиянието на халогена и дължината на ацилната верига ($(-\text{CH}_2)_n$) са взаимно свързани, като влиянието на халогена е доминиращо. Активността нараства в реда $\text{Br} < \text{F} < \text{Cl}$. Оптимална туберкулостатична активност се наблюдава при $n = 2$ и заместител на 4-то място в ароматната част на ключовия хидразид – Cl атом.

10. При провеждане на анализ за връзката между структурата и токсичността на новополучените съединения, бе установено, че природата на халогения заместител в ядрото оказва съществено влияние, като токсичността намалява в реда $\text{F} > \text{Cl} > \text{Br}$.

11. От получените QSAR модели може да се заключи, че за противотуберкулозната активност на разглежданите пирол-съдържащи хидразони най-голямо значение имат формата и гъвкавостта на молекулата, зарядът на молекулната повърхност и хидрофобният обем. Броя на халогенните и азотни атоми също са определящи за активността. Полученият модел на класификационно дърво класифицира правилно 76% от подложените на анализ съединения и подобрява правилното класифициране с 46%.

Получените фармакофорни модели посочиха, че съществено за активността на пирол-съдържащите хидразони е присъствието в структурата им на хидрофобна група, акцептор на протони и метален лигатор.

12. Като обобщен резултат от настоящите изследвания бе доказана перспективността на пирол-съдържащите хидразони при търсенето на нови и по-активни противотуберкулозни агенти. При бъдещи оптимизации на структурата трябва да се предпочитат съединения със умерено високи стойности на хидрофобния параметър Log P, средна молекулна повърхност и притежаващи електроно-акцепторни заместители в ароматното ядро, свързано с централния пиролов цикъл от хидразона.

Статии в международни списания и списания с импакт-фактор:

1. A. Bijev, **M. Georgieva**, Pyrrole-Based Hydrazones Synthesized and Evaluated In Vitro as Potential Tuberculostatics.- Lett Drug Des Discov., 7, **2010**, 430-437.

Статии, публикувани в български списания:

2. A. Bijev, **M. Georgieva**, The development of new tuberculostatics addressing the return of tuberculosis: current status and trends, Review, Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy, 45 (2), **2010**, 111-126;

3. **M. Georgieva**, A. Bijev, P. Prodanova, Synthesis and comparative study of tuberculostatic activity of pyrrole-based hydrazones related to structural variations – Farmacia, 57(1-4), **2010**, 3-14.

Участия в научни форуми

1. **Мая Георгиева**, Станислава Владимирова, Пенка Проданова, Атанас Бижев, Синтез и скрининг на пиролови хидразони като потенциални агенти за борба със завърналата се туберкулоза. V^{-та} Научна постерна сесия за студенти, докторанти и млади учени, ХТМУ, София, 22 май 2008 г., **(I Награда!) – постер;**

2. Stanislava Vladimirova, **Maya Georgieva**, Penka Prodanova, Atanas Bijev, **Synthesis and evaluation of new derivatives of pyrrole as tuberculostatics.**, 6th International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries (VI Национална Конференция По Химия, XVI Национален Симпозиум „Полимери-2008”), София, 10-14.09.2008 г. - **доклад;**

3. Atanas Bijev, Penka Prodanova, Stanislava Vladimirova, **Maya Georgieva**, **Pyrrole Hydrazones as a reliable Starting Platform in anti-tuberculosis Drugs Development**, EHRlich II – 2nd World Conference on Magic Bullets, Celebrating the 100th Anniversary of the Nobel Prize Award to Paul Ehrlich, Nürnberg, Germany, October 3-5, 2008 – **постер;**

4. **Maya Georgieva**, Atanas Bijev, **Synthesis of new analogues of pyrrol-containing hydrazones with proven anti-tuberculosis activity**, VI^{-та} Научна постерна сесия за студенти, докторанти и млади учени, ХТМУ, София, 21 май 2009 г. – **постер;**

5. **Maya Georgieva**, Atanas Bijev, **Effects of some steric parameters upon the tuberculostatic activity of newly synthesized derivatives of pyrrole**, 1st National Conference with International Participation on Biomedical and Bioprocess Engineering (BM&BP'2009), Centre of Biomedical Engineering Bulgarian Academy of Sciences Acad. Georgi Bonchev Str., bl. 105, 1113 Sofia, Bulgaria, December 3-4, 2009 – **постер;**

6. **Maya Georgieva**, Atanas Bijev, Nikolai Georgiev, **Determination of stability of pyrrole-based hydrazones as potential tuberculostatic agents**, VII^{-ма} Научна постерна

сесия за млади учени, посветена на 125 години от рождението на проф. д-р Асен Златаров, ХТМУ, София, 19 май 2010 г. – **постер**;

7. Iglia Lessigiarska, Ilza Pajeva, Penka Prodanova, **Maya Georgieva**, Atanas Bijev, **Investigation of structure activity relationships of pyrrole hydrazones as new anti-tuberculosis agents**, 18 EURO QSAR Conference, Rodos, Greece, 2010 - **постер**;

8. **Maya Georgieva**, Atanas Bijev, Ivanka Nencheva, **Isolation and characterization of isomers of previously synthesized pyrrole-hydrazones with possible tuberculostatic activity**, Vth национален конгрес по фармация с международно участие, Хисаря, 1-3 април 2011г. – **постер**.

