

RECEȚIONAT

Agencia Națională pentru Cercetare și Dezvoltare

La data: _____

AVIZAT

Secția AȘM _____

RAPORT ȘTIINȚIFIC FINAL privind executarea proiectului pentru Tinerii cercetători

Proiectul "Stereoizomerii spiro[ciclopropan-oxindolilor] cu activitatea antivirală"

Cifra Proiectului 19.80012.80.07A

Direcția Strategică „Sănătate și biomedicină”

termen de executare:” 31” decembrie 2019

Directorul proiectului

SUCMAN Natalia

(semnătura)

Directorul instituției/consiliul științific

ARÎCU Aculina

(semnătura)

L.Ș.

Chișinău 2019

CUPRINS :

1. Lista executorilor (Anexa nr.1)
2. Obiectivele și sarcinile proiectului (până la o pagină)
3. Rezultatele științifice ale cercetărilor efectuate în cadrul proiectului
4. Rezumat (până la 2 pagini)
5. Participarea în programe și proiecte internaționale (ORIZONT 2020, SCOPES, JOP, IRSIS, NATO, etc.), inclusiv propunerile prezentate/câștigate în cadrul concursurilor naționale și internaționale cu tangență la tematica cercetării proiectului realizat
6. Lista publicațiilor științifice ce țin de rezultatele obținute în cadrul proiectului (Anexa nr.2)
7. Fișa de prezentare a rezultatelor proiectului de cercetare (Anexa nr.3)

Nota: Rezumatul proiectului obligatoriu se va prezenta în format electronic (pentru publicarea ulterioară pe pagina web)

Lista executorilor (*funcția în cadrul proiectului, titlul științific, semnătura*)

Nr d/o	Numele/Prenumele	Titlul științific	Funcția în cadrul proiectului	Semnătura
1.	Sucman Natalia	Dr.	Director proiect	
2.	Macaev Fliur	Dr.hab.	executant	
3.	Boldescu Veaceslav	Dr.	executant	
4.	Pogrebnoi Vsevolod	Dr.	executant	
5.	Bilan Dmitri	-	executant	
6.	Cojocari Sergiu	-	executant	

2. Obiectivele și sarcinile proiectului

Obiectivul principal al proiectului a fost sinteza și caracterizarea derivaților spiro[ciclopropan-oxindolilor] la fel ca și separarea diastereomerică a spiro[ciclopropan-oxindolilor] și testarea biologică

Pentru realizarea obiectivelor propuse au fost stabilite următoarele sarcini:

- sinteza și separarea stereozomerilor spiro [ciclopropan-oxindolilor].
- caracterizarea compușilor obținuți prin metode RMN, IR, difractometrie cu raze X
- sinteza derivaților peptidici ai spiro[ciclopropan-oxindolilor] cu separarea diastereomerică.
- testarea activității antivirale a compușilor contra virusurilor HIV-1 (sușă IIIB) și HIV-2 (sușă ROD) și a citotoxicității compușilor obținuți în celulele MT-4

3. Rezultatele științifice ale cercetărilor efectuate în cadrul proiectului

Caracteristicile structurale unice ale spirooxindolilor în combinație cu diverse activități biologice atrag un interes major pentru cercetarea acestora în calitate de structurile de baza în designul și descoperirea noilor compuși medicamentoși. Conform unui număr mare de publicații, astfel de spiro-compuși au proprietăți biologice diferite [1] printre care se numără și activitatea anti-HIV [2, 3]. Se știe că unii dintre derivații de spirooxindol au o capacitate ridicată de a inhiba transcriptaza inversă HIV, care este responsabilă de reproducerea virusului. Această capacitate se manifestă la concentrații apropiate de concentrațiile compușilor active în medicamentele anti-HIV contemporane care sunt utilizate în prezent în terapia antiretrovirală ($EC_{50} = 50$ nM).

În prezent, nu există un vaccin eficient contra HIV, iar tratamentul medical nu asigură o vindecare definitivă a virusului. Mai mult, medicamentele utilizate în prezent pentru tratamentul infecției cu HIV pot induce dezvoltarea diferitelor reacții adverse. Prin urmare, dezvoltarea de noi medicamente antivirale, care vor fi mai active și mai puțin toxice decât cele existente este de o importanță majoră.

Anterior am demonstrat că derivații de spirooxindol au activitate semnificativă împotriva unei alte enzime retrovirale - integrază [4]. Totuși, trebuie de menționat faptul că proprietățile biologice ale acestor derivați au fost determinate prin testarea amestecurilor racemice și nu a enantiomerilor individuali. Având în vedere faptul că adesea numai unul dintre enantiomeri este activ, se poate presupune că utilizarea derivaților puri din punct de vedere enantiomeric va crește activitatea la jumătate, ceea ce va reduce doza globală și, în consecință, va diminua toxicitatea compușilor.

Grupul nostru a încercat o sinteză enantioselectivă a spiro [ciclopropan-oxindolilor] [5]. Au fost obținute valori ridicate ale enantioselectivității (mai mult de 95% ee) cu o anumită

modificare a structurii substanței finale, dar aceasta a dus la o pierdere completă a proprietăților biologice ale moleculei, ceea ce poate fi explicat prin faptul că suprafața și / sau dimensiunea moleculei noi nu corespund dimensiunii centrului activ al enzimelor.

În scopul obținerii stereozomerilor individuali și a creșterii eficacității compușilor țintă, au fost obținuți niște derivați noi prin introducerea anumitor grupări asimetrice în structura moleculelor inițiale și separarea ulterioară a diastereomerilor formați.

Există mai multe centre de reacție în structura spiro[ciclopropan-oxindolilor], pe care am încercat să o folosim în obținerea de derivați diastereoizomerici. În primul rând, din compușii de bază (acizii **2a**, **b**) (Fig. 1) au fost obținute diferite amide **3**, **4** și **5**, **6** (Fig.2).

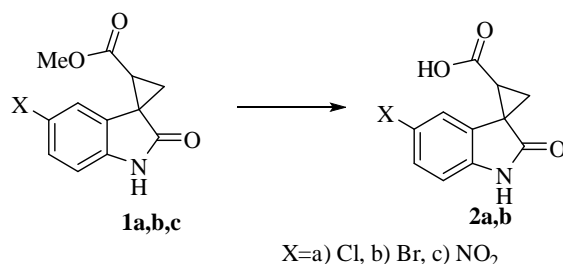


Figura 1. Compușii de bază în sinteza spiroxindolilor

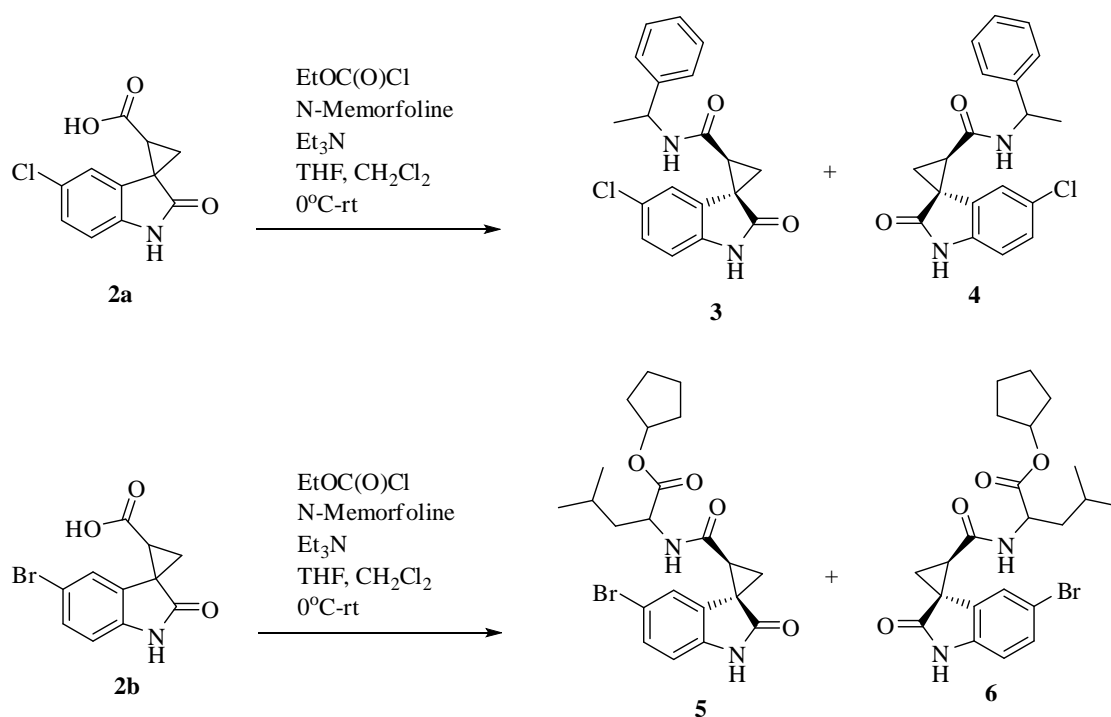


Figura 2. Sinteza amidelor diastereomerice **3-6**.

Trebuie remarcat faptul că reacțiile au fost efectuate în condiții blânde de sinteză a peptidelor [6] ca să evităm epimerizarea unuia dintre centrele chirale din fragmentul ciclopropan care are loc în condiții obișnuite cu formarea clorurilor acide. Diastereomerii obținuți au fost separați prin cromatografie. În cea de-a doua reacție, separarea cromatografică a fost imposibilă însă a fost posibilă recristalizarea acestora cu separarea compușilor individuali. Utilizarea

leucinei și valinei ca reactivi chirali duce la formarea diastereomerilor, care nu pot fi separați prin aplicarea metodelor descrise anterior.

Următoarea etapă a fost introducerea fragmentului chiral în moleculă datorită substituției hidrogenului din amida oxindolică. Sintezele s-au efectuat prin alchilare în conformitate cu schemele prezentate în Figura 3.

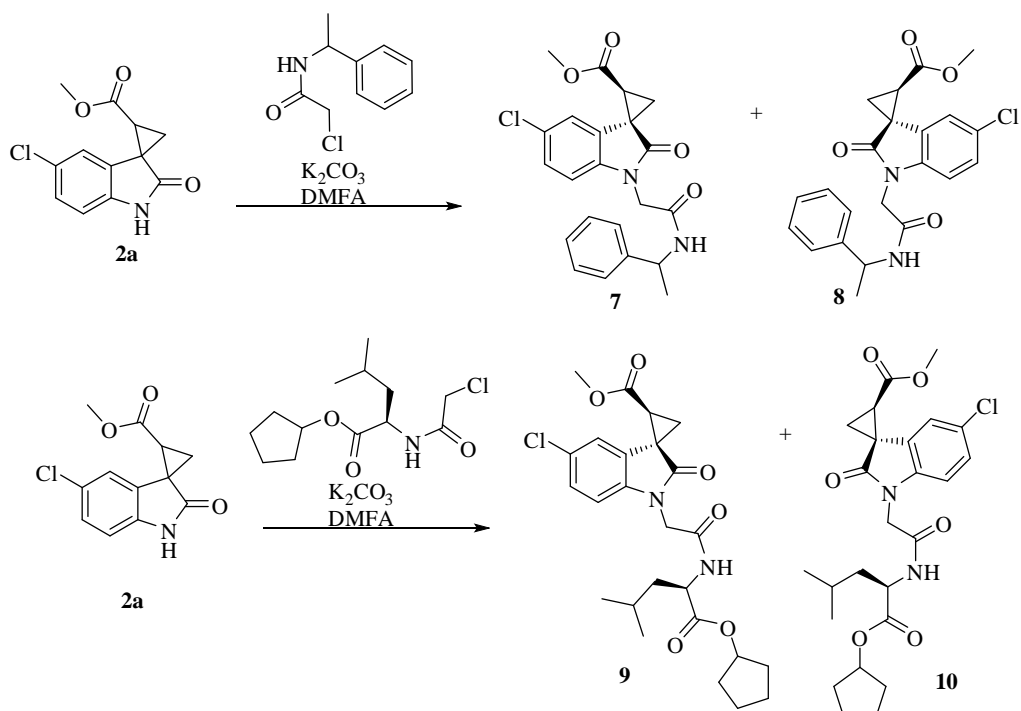


Figura 3. Sinteza diastereomerelor **7-10** prin alchilare.

Din amestecul de **6** și **7**, unul dintre diastereomeri a fost izolat în formă individuală prin recristalizare. Amestecul de **9** și **10** s-a obținut sub formă un ulei inseparabil cromatografic.

Derivatul amino **11** a fost obținut din compusul nitro **1c** prin reducerea cu hidrogen pe Pd/C. În continuare, după condensarea cu cloranhidridă acidului dehidroabietic **12** (Fig.4), s-a format un amestec de tip nou de amide **13,14** care a fost ulterior separat prin cromatografie pe coloană.

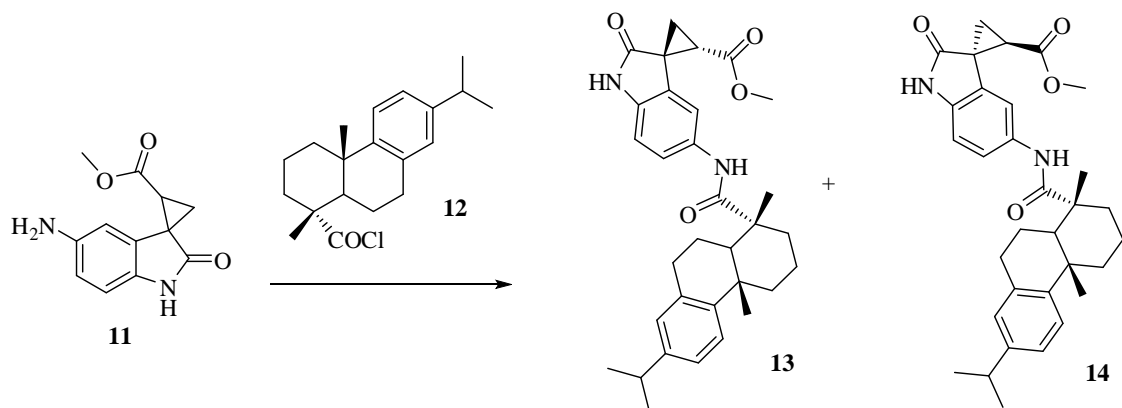


Figura 4. Sinteza compușilor **12,13**

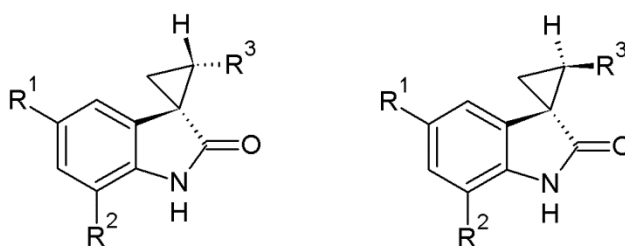
Activitatea vitală și reproducerea HIV este determinată de funcționarea a trei enzime de virus: transcriptază inversă, integrază și protează. Substanțele obținute ca urmare a acestui

proiect inhibă activitatea a două enzime simultan, ceea ce reprezintă specificul și avantajele lor distinctive în comparație cu medicamentele cunoscute utilizate în terapie.

Compusul	Inhibiția transcriptazei EC50 (μM)	Inhibiția integraziei
Efavirenz	0.0005	
Nevirapine	0.05	
1a	0.015	
1b	0.5	27.3%
1d		23.4%
1c	0.98	17.6 %

Cu toate acestea, toate studiile au fost efectuate pe amestecuri racemice. Se știe că, în cele mai multe cazuri, doar enantiomerul din dinți are activitate biologică, adică atunci când sunt separați, este posibil să dubleze activitatea biologică la aceeași concentrație a substanței active. În rezultatul proiectului a fost efectuată separarea diastereoselectivă a compușilor-hit.

Rezultatele testării compușilor pentru capacitatea de inhibiție a integraziei HIV-1



Compuși 10 μM				Inhibiția integraziei HIV-1, %
	R ¹	R ²	R ³	
28a	H	H	COOMe	-
27a	H	H	COOMe	-
28g	I	H	COOMe	0.0
27g	I	H	COOMe	23.4
27h	Cl	Br	COOMe	27.3
28h	Cl	Br	COOMe	0.0
28c	NO ₂	H	COOMe	-
27c	NO ₂	H	COOMe	17.6
26a	H	H	CN	0.0
25a	H	H	CN	8.9
26e	Br	H	CN	-
25e	Br	H	CN	15.7

O capacitate de inhibiție a integralei mai scăzută la nivelul derivaților obținuți se explică prin faptul că mărimea moleculelor a crescut ceea ce nu le-a permis să intre în locul catalitic activ al enzimei.

Rezultatele testării pentru capacitatea de inhibiție a reverstranscriptazei HIV-1 și a tulpinelor virale mutante au demonstrat că derivatul 5-Cl posedă activitate antivirală pronunțată față de HIV-1 tulpina III_b la concentrația 0.5 μg/ml cu indicele de selectivitate mai mare de 300. Interesant este faptul, că compusul dat posedă o activitate mai înaltă față de mutantul HIV-1 E138K cu valoarea IC₅₀ = 0.39 μg/ml. O activitate comparabilă a manifestat derivatul 5-I cu valoarea IC₅₀ = 0.77 μg/ml și indicele de selectivitate mai mare de 200. Derivații 5-F, 5-Me și 5-NO₂ au manifestat o activitate mai scăzută.

4. Rezumat

Impactul științific al proiectului: Pentru prima dată au fost efectuate design, sinteza și caracterizarea structurii compușilor noi din grupul sprioxindolilor. Structura compușilor obținuți a fost confirmată prin variate metode de analiză fizico-chimică inclusiv cea de difracție cu raze X. Compușii au fost obținuți cu o puritate enantiomerică înaltă.

Impactul social al proiectului: proiectul aduce oportunități noi pentru tinerii cercetători de a-și realiza competențele în domeniul chimiei medicinale și sintezei organice în elaborarea noilor compuși medicamentoși cu utilizare în medicina umană și veterinară. Prin participarea în proiect tinerii cercetători își dezvoltă și competențe noi care îi fac mai competitivi în spațiul de cercetare European. Rezultatele proiectului pot fi utilizate în procesul de instruire a noilor specialiști în domeniul dezvoltării compușilor biologic activi noi cu proprietăți dirijate. Pe termen lung, rezultatele proiectului pot fi utilizate pentru dezvoltarea clinică a noilor agenți antivirali cu utilizare în tratamentul virusului HIV ceea ce poate ameliora situația periculoasă în domeniul ocrotirii sănătății legată de răspândirea bolilor infecțioase față de care încă nu au fost elaborate vaccinurile potrivite.

Impactul economic al proiectului: datele privind design și elaborare compușilor medicamentoși noi obținuți în cadrul proiectului pot aduce un beneficiu industriei farmaceutice care poate îngloba metodele și procesele elaborate în ciclul de producere industrială a remediilor deja existente sau poate prelua procesul de dezvoltare a remediilor noi de la nivelul studiilor preclinice care sunt prevăzute în cadrul proiectului. Pe termen lung, brevetarea remediilor și tehnologiilor inventate poate aduce profit statului prin licențierea ulterioară a invenției companiilor care se ocupă de dezvoltarea clinică a remediilor antivirale sau companiilor care se ocupă de producerea farmaceutică.

Impactul asupra mediului ambiant: utilizarea metodelor stereoselective de sinteză reduce formarea compușilor secundari și ca rezultat se reduce cantitatea de deșeurile chimice

formate. În perspectivă astfel de metode vor reduce presiunea industriei chimice și farmaceutice asupra mediului ambiant.

5. Participarea în programe și proiecte internaționale (Horizon2020, FP7, SCOPES, JOP, IRSES, NATO, etc.)

Dr. Veaceslav Boldescu a depus propunere de proiect și a câștigat finanțarea oferită de către fundația Alexander von Humboldt. Proiectul a fost realizat în colaborare cu grupul dlui Prof. Klein de la Universitatea din Heidelberg, Germania.

LISTA

lucrărilor publicate în cadrul proiectului de cercetare

- Articol din revista internațională:

SUCMAN, N., POGREBNOI, V., BOLDESCU, V., MACAEV, F. Diastereoselective synthesis of 3,4-dibenzoil-3,4-dihydro-1H-spiro [benzo[cd]indol-5,3'-indoline]-2,2'(2ah)-diones. UAZIMDER 2019, 1, 20-23 ISSN: 2667-7571

- articole în culegeri (naționale / internaționale)

- SUCMAN N., POGREBNOI V., BOLDESCU V., MACAEV F. Synthesis and Separation of the Spiro[oxindole-cyclopropane] Diastereomers with Anti-HIV-1 or Anti-HIV-2 Activity. În "PROCEEDING BOOK", 2nd international congress on engineering and life science, Kastamonu/TURKEY, 11-14 April 2019, p. 506-509. ISBN: 978-605-031-169-3

- rapoarte publicate/Teze ale comunicărilor la congrese, conferințe, simpozioane, în culegeri (naționale / internaționale)

- SUCMAN, N., ANDRUSENCO, T., MACAEV, F. Interaction of 2-hydroxy-juglone with Different Aldehydes in the Presence of Hantzsch Ester. În "PROCEEDING BOOK", 2nd international congress on engineering and life science, Kastamonu/TURKEY, 11-14 April 2019, p. 457. ISBN: 978-605-031-169-3
- ANDRUSENCO, T., SUCMAN, N., BOLDESCU, V., MACAEV, F. Interaction features of 2-hydroxy-juglone with perillaldehyde. În "Achievements And Perspectives Of Modern Chemistry", International Conference, Chisinau/Republic of Moldova, 9-11 October, 2019, p. 33.
- POGREBNOI, V., STINGACHI, E., SUCMAN, N., MACAEV F. The first example of spirocyclopropanoxindole functionalized by dehydroabiatic acid. În "Achievements And Perspectives Of Modern Chemistry", International Conference, Chisinau/Republic of Moldova, 9-11 October, 2019, p. 169.
- SUCMAN, N., ANDRUSENCO, T., MACAEV, F. The identification of the structure of new 2-hydroxyjuglone derivative. În "BOOK OF ABSTRACTS", 21st Central European NMR Symposium & Bruker Users Meeting, Belgrade/Serbia, 4-5 September 2019, p. 58.
- SUCMAN, N., CALINICENCO, S., MACAEV, F. The use of NMR analyzes in determination of some unusual products of reactions. În "BOOK OF ABSTRACTS", 21st Central European NMR Symposium & Bruker Users Meeting, Belgrade/Serbia, 4-5 September 2019, p. 34.
- SUCMAN, N., CEBANU, V., TERTEAC, T., ARMASU, S., MACAEV F. The influence of cis-methyl 5'-chloro-2'-oxospiro[cyclopropane1,3'-indoline]-2-carboxylate on the activity of some phytophotogenic viruses. În "Achievements And Perspectives Of Modern Chemistry", International Conference, Chisinau/Republic of Moldova, 9-11 October, 2019, p. 161.
- SUCMAN, N., BOLDESCU, V., MACAEV, F. Diastereomeric separation of the derivatives of potential anti-HIV agents. În "Achievements And Perspectives Of Modern Chemistry", International Conference, Chisinau/Republic of Moldova, 9-11 October, 2019, p. 176.

Fișa de prezentare a rezultatelor proiectului de cercetare

I. Sumarul activităților proiectului realizate

#	Activități planificate	Activități realizate și rezultate noi obținute în cadrul proiectului (150 de cuvinte)
1.	Sinteza și caracterizarea derivaților spiro[ciclopropan-oxindolilor]	Au fost obținuți în stare pură și caracterizați din punct de vedere fizico-chimic mai mult de 10 stereozomeri ai spiro[ciclopropan-oxindolilor].
2.	Separarea diastereomerică a spiro[ciclopropan-oxindolilor] și testarea biologică	Au fost separați diastereomerii spiro[ciclopropan-oxindolilor] prin obținerea derivaților peptidici. A fost determinată activitatea antivirală și citotoxicitatea a stereozomerilor spiro[ciclopropan-oxindolilor] obținuți.

II. Relevanța rezultatelor științifice obținute (până la 200 de cuvinte).

Proiectul aduce oportunități noi pentru tinerii cercetători de a-și realiza competențele în domeniul chimiei medicinale și sintezei organice în elaborarea noilor compuși medicamentoși cu utilizare în medicina umană și veterinară. Prin participarea în proiect tinerii cercetători își dezvoltă și competențe noi care îi fac mai competitivi în spațiul de cercetare European. Rezultatele proiectului pot fi utilizate în procesul de instruire a noilor specialiști în domeniul dezvoltării compușilor biologic activi noi cu proprietăți dirijate.

Datele privind design și elaborare compușilor medicamentoși noi obținuți în cadrul proiectului pot aduce un beneficiu industriei farmaceutice care poate ingloba metodele și procesele elaborate în ciclul de producere industrială a remediilor deja existente sau poate prelua procesul de dezvoltare a remediilor noi de la nivelul studiilor preclinice care sunt prevăzute în cadrul proiectului. Pe termen lung, brevetarea remediilor și tehnologiilor inventate poate aduce profit statului prin licențierea ulterioară a invenției companiilor care se ocupă de dezvoltarea clinică a remediilor antivirale sau companiilor care se ocupă de producerea farmaceutică.

Utilizarea metodelor stereoselective de sinteză reduce formarea compușilor secundari și ca rezultat se reduce cantitatea de deșeurile chimice formate. În perspectivă astfel de metode vor reduce presiunea industriei chimice și farmaceutice asupra mediului ambiant.

III. Volumul total al finanțării

<i>Finanțarea planificată (mii lei)</i>	<i>Executată (mii lei)</i>
165,00	165,00

IV. Volumul cofinanțării (mii lei)

30,00

V. Lista colaborărilor inițiate în cadrul proiectului

-

VI. Lista evenimentelor organizate / la care s-a participat în cadrul proiectului

- Conferința Internațională “Achievements And Perspectives Of Modern Chemistry”, Chisinau, Moldova, 9-11 October, 2019
- 21st Central European NMR Symposium & Bruker Users Meeting, Belgrad, Serbia, 4-5 September 2019
- 2nd International Congress on Engineering and Life Science, Kastamonu, Turcia, 11-14 April 2019

VII. Lista de mobilități efectuate în cadrul proiectelor

- Natalia Sucman, 21st Central European NMR Symposium & Bruker Users Meeting, Belgrad, Serbia, 4-5 September 2019
- Natalia Sucman, 2nd International Congress on Engineering and Life Science, Kastamonu, Turcia, 11-14 April 2019
- Natalia Sucman, Bilan Dmitri, Universitea Alexandru Ioan Cuza, Iași, România, 19-20 decembrie 2019

VIII. Informații despre infrastructura utilizată în realizarea proiectului

Spectrometre RMN, IR, UV-vis, mass, cromatograf de gaze, HPLC (Institutul de Chimie, Chișinău, MD)
Difrectometre cu raze X (Institutul de Fizica Aplicată, Chișinău, MD)

IX. Dificultăți/ impedimente apărute pe parcursul realizării proiectului

-

X. Beneficiarul (ministere, instituții de stat sau private, întreprinderi etc.)

Ministerul Educației, Culturii și Cercetării
Universitatea de Stat din Moldova
Universitatea de Medicina Farmacie „N. Testemițanu”

Director proiectului SUCMAN Natalia, dr. _____

Șeful laboratorului MACAEV Fliur, dr. hab., prof. _____