



Semnan University

Journal of Applied Chemistry

Journal homepage: <https://chemistry.semnan.ac.ir/>

Research Article

Preparation of Imidodicarbonic diamide Derivatives by Microwave Method Using Layered Double Hydroxides (LDHs), as an Efficient Catalyst and Evaluation of their Anti-HIV Effect: Experimental and Theoretical Studies

Zahra Ghasifar^a, Neda Adibpour^{b,*}, Eskandar Alipour^a, Farzad Kobarfard^c,
 Mohammad Reza Shoushizadeh^d

^a Department of Organic Chemistry, Islamic Azad University Tehran North Branch, Tehran, Iran

^b Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

^c Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

^d Marine Pharmaceutical Science Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

PAPER INFO

Article history:

Received: 01/Jul/2022

Revised: 26/Dec/2022

Accepted: 18/Jan/2023

Keywords:

Green Chemistry,
 Microwave, Layered double hydroxides,
 Imidodicarbonic diamide,
 Anti-AIDS effect,
 Molecular docking.

ABSTRACT

In this paper, to develop green chemistry, a catalyst based on layered double hydroxides (LDHs) attached by hexamethylene-1,6-diisocyanate (HMDI) and citric acid (LDH-g-HMDI-citric acid) were prepared and characterized by FT-IR, XRD, EDX, SEM, TGA, and DTG analytical methods. The catalytic activity of this recyclable heterogeneous catalyst was evaluated for the synthesis of new imidodicarbonate diamide derivatives (biuret) under microwave conditions. The use of the microwave method led to the use of organic solvents in small amounts, reduced reaction times, and increased yields of products, which was achieved for the development of green chemistry and environmental protection. These biurets were evaluated for inhibitory activity on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by HIV-1 p24 antigen ELISA kit and three of them (5b, 5c, and 5f) had moderate activity on HIV -1 virus with IC50 values in the range of 55.1 to 100 μ M compared to azidothymidine as the reference drug (IC50 = 0.11 μ M). Finally, to investigate the mechanism of the effect of biuret compounds on the virus protease enzyme, docking analysis studies were performed and the results of in vitro test and docking study were in good correlation.

DOI: <https://doi.org/10.22075/CHEM.2023.27484.2080>

© 2023 Semnan University.

This is an open access article under the CC-BY-SA 4.0 license. (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)

*.Corresponding author: Assistant Professor of Medicinal Chemistry. E-mail address: n.adibpour@zums.ac.ir

How to cite this article: Ghasifar, Z., Salehabadi, H., Adibpour, N., Alipour, E., Kobarfard, F., Shoushizadeh, M. R. (2023). Preparation of Imidodicarbonic diamide Derivatives by Microwave Method Using Layered Double Hydroxides (LDHs), as an Efficient Catalyst and Evaluation of their Anti-HIV Effect: Experimental and Theoretical Studies. *Applied Chemistry*, 18(68), 199-216. (in Persian)

تهیه مشتقات ایمیدو دی کربونیک دی آمید به روش مایکروویو با استفاده از هیدروکسیدهای لایه ای دوگانه (LDHs) به عنوان کاتالیزوری کارآمد و بررسی اثر

ضدایدز آن ها: مطالعه تجربی و نظری

زهرا غیاثی فر^۱، ندا ادیب پور^{۲*}، اسکندر علی پور^۱، فرزاد کبارفرد^۲، محمدرضا شوشی زاده^۴

^۱ گروه شیمی آلی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

^۲ گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

^۳ گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

^۴ مرکز تحقیقات علوم دارویی دریایی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: ۰۱/۱۰/۲۸

تاریخ تصحیح: ۰۱/۱۰/۰۵

تاریخ دریافت: ۰۱/۰۴/۱۰

چکیده

در این مطالعه، با هدف گسترش شیمی سبز، کاتالیزوری بر پایه هیدروکسیدهای لایه ای دوگانه (LDHs) متصل به هگزامتیلن-۱ و ۶-دی ایزوسیانات (HMDI) و اسید سیتریک (LDHs-g-HMDI-Citric acid) تهیه و با استفاده از تکنیک‌های مختلف *TGA*، *SEM*، *EDX*، *XRD*، *FT-IR* و *DTG* شناسایی گردید. فعالیت کاتالیستی این کاتالیزور هتروژن قابل بازیافت برای سنتز مشتقات جدید ایمیدو دی کربونیک دی آمید (بیورت) تحت شرایط مایکروویو مورد ارزیابی قرار گرفت. استفاده از روش مایکروویو منجر به استفاده ی بسیار اندک از حلال های آلی، کاهش زمان واکنش و افزایش راندمان محصولات گردید که در جهت توسعه شیمی سبز و حفاظت از محیط زیست محقق شد. همچنین این بیورت ها جهت بررسی فعالیت بازدارندگی بر تکثیر ویروس نقص ایمنی انسانی نوع ۱ (HIV-1)، توسط کیت *ELISA* آنتی ژن *HIV-1 p24* مورد ارزیابی قرار گرفته و سه مورد از آن ها (*5b* و *5c* و *5f*) فعالیت متوسطی روی ویروس *HIV-1* با مقادیر *IC50* در محدوده ۵۵/۱ تا ۱۰۰ میکرومولار در مقایسه با آزیدوتیمیدین به عنوان داروی مرجع ($IC_{50} = 0/11$ میکرومولار) نشان داد. در نهایت مطالعات داکینگ مولکولی جهت بررسی مکانیسم اثر ترکیبات بر آنزیم پروتئاز ویروس صورت گرفت، که نتایج کارهای عملی آزمایشگاهی و مطالعه داکینگ مولکولی تطابق خوبی را از خود نشان دادند.

کلمات کلیدی: شیمی سبز، مایکروویو، هیدروکسیدهای لایه ای دوگانه، ایمیدو دی کربونیک دی آمید، اثر ضدایدز، داکینگ مولکولی.

۱- مقدمه

ویروس نقص ایمنی انسانی نوع ۱ (HIV-1) یک رتروویروس می باشد که با از بین بردن لنفوسیت های CD4 قادر به سرکوب سیستم ایمنی است [۱]. با گذشت زمان، عفونت ناشی از HIV باعث آسیب به سیستم ایمنی شده و منجر به مشکلات پاتولوژیک مختلف، از جمله عفونت های شدید و حتی سرطان می شود [۲]. آنزیم HIV-1 پروتئاز (EC 3.4.23.16)، یک پروتئاز آسپارتیک ویروسی است که پلی پروتئین های ویروسی Gag و Gag-Pol را به آنزیم های موثر تبدیل کرده و وضعیت مناسبی برای بقاء و تکثیر HIV-1 فراهم می کند [۳]. مهارکننده های پروتئاز HIV-1 می توانند به صورت بالقوه برای درمان HIV/AIDS در نظر گرفته

شوند. تا به امروز، مهارکننده‌های پروتئاز HIV-1 متعددی در مقالات علمی معرفی شده‌اند که برخی از آنها مانند ساکونیناویر، ایندیناویر و هم خانواده‌های آن‌ها توسط سازمان غذا و دارو آمریکا (FDA) تایید شده‌اند [۴]. با این حال، در درمان طولانی مدت، عوارض جانبی متعددی مانند مقاومت به انسولین، دیس لیپیدی، بیماری‌های عروق مغزی و قلبی و سمیت غیرقابل قبول برای این مهارکننده‌ها شناسایی شده است که استفاده بالینی از آن‌ها را محدود می‌کند [۵]. بنابراین، یافتن مهارکننده‌های جدید پروتئاز HIV-1 با ساختار جدید، اثر بیولوژیکی مطلوب و سمیت کم برای بهبود کیفیت بیماران HIV الزامی است. امروزه پپتیدهای ضد HIV-1 نقش اساسی در درمان عفونت HIV دارند [۶]. در این راستا، مشتقات ایمیدو دی کربونیک دی آمید (بیورت) با ساختار شبه پپتیدی می‌توانند به عنوان عوامل شبه پپتید پروتئاز ضد HIV-1 در نظر گرفته شوند. گزارش‌های متعددی در مورد اثرات دارویی مختلف مشتقات بیورت، مانند مهار ترشح اسید معده، ضد درد، ضد التهاب، ضد لیشمانیوز، ضد تومور و اثر کاهندگی قند خون ارائه شده است [۷-۱۰]. با این حال، فعالیت این ترکیبات در برابر HIV بررسی نشده است. با در نظر گرفتن اهمیت توسعه شیمی سبز، اسید سیتریک یکی از سالم‌ترین و بی‌خطرترین موادی است که به‌عنوان بیوکاتالیست سبز به طور گسترده در سنتز تک مرحله‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۱]. پیرو مطالعه قبلی ما در مورد سنتز ترکیبات جدید بیورت [۱۰]، یک روش سازگار با محیط زیست با استفاده از هیدروکسیدهای لایه ای دوگانه (LDHs)، به عنوان یک کاتالیزور ناهمگن قابل بازیافت سبز (شمای ۱)، برای سنتز این مشتقات بیورت در زمان کوتاه‌تر و بازده بالاتر استفاده شد. هیدروکسیدهای لایه ای دوگانه (LDHs)، دسته ای از کانی‌های رسی آنیونی با ساختار لایه ای هشت وجهی می‌باشند که با فرمول کلی $[M_1]$ نشان داده می‌شوند [۱۲]. در این فرمول، M^{2+} و M^{3+} به ترتیب کاتیون فلزی دو ظرفیتی و سه ظرفیتی و x نسبت فلزی $M^{3+}/(M^{2+} + M^{3+})$ را نشان داده و نیز A^{n-} لایه میانی و آنیون قابل تبادل (آلی یا معدنی) و m مقدار آب موجود در ناحیه بین لایه ای است [۱۳]. کاربردهای LDH ها شامل کاربردهای پزشکی از آنتی‌اسیدهای ساده تا مکانیسم‌های دارورسانی هدفمند [۱۴ و ۱۵]، افزودنی در پلیمرها [۱۶]، تشکیل مواد نانوکامپوزیتی جدید [۱۷] و همچنین کاتالیزورها و پیش‌سازهای کاتالیزورهای اکسید فلزی [۱۸] می‌باشند. روش‌های مختلفی برای تهیه LDH وجود دارد از جمله روش هم‌رسوبی [۱۹]، هیدرولیز اوره [۲۰]، روش سل-ژل [۲۱]، سنتز هیدروترمال [۲۲] و آسیاب مکانیکی [۲۳]. در این مقاله از روش هم‌رسوبی که رایج‌ترین و ارزان‌ترین روش تک مرحله ای می‌باشد، برای تهیه هیدروکسیدهای لایه ای دوگانه متصل به هگزامتیلن-۱ و ۶-دی‌ایزوسیانات و اسید سیتریک (LDHs-g-HMDI-Citric acid) به عنوان یک کاتالیزور ناهمگن قابل بازیافت سبز برای سنتز مشتقات جدید بیورت (5a-f) استفاده شده است. فعالیت ضد HIV این ترکیبات در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین مطالعه داکینگ بر روی مشتقات با بالاترین اثر بازدارندگی بر پروتئاز HIV-1 نیز انجام شد.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد شیمیایی مصرفی و تجهیزات

در این تحقیق، حلال‌ها و مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت‌های آلدریچ و مرک خریداری شده و بدون خالص سازی مورد استفاده قرار گرفته اند. مواد اولیه لازم برای کشت سلولی از شرکت Gibco آمریکا و همچنین SCR HIV-1 از شرکت انستیتو پاستور ایران تهیه شده اند. کیت الایزای HIV-1 p-24 از شرکت BioMerieux خریداری شده است. طیف های IR توسط دستگاه Nicolet Magna FT-IR 550 گرفته شده اند. طیف های NMR توسط دستگاه 400 MHz-FTNMR ساخت شرکت Bruker در حلال های $CDCl_3$ و $[d_6]DMSO$ ثبت شده اند. نقطه ذوب محصولات با استفاده از دستگاه اندازه گیری نقطه ذوب Melting point SMPI تعیین شده اند. طیف های جرمی توسط دستگاه FINNIGAN-MAT 8430 گرفته شده اند. تصویربرداری پراش انرژی اشعه ی X (EDX) (Energy Dispersive X-ray) با استفاده از دستگاه FESEM-SIGMA و همچنین تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (Scanning Electron Microscopy) با استفاده از دستگاه VEGA 2 TESCAN 15-20 kV انجام شده اند. نمودارهای آنالیز وزن سنجی حرارتی (TGA) (Thermogravimetric Analysis) با استفاده از دستگاه TGA/DTA PYRIS DIAMOND تحت شرایط هوای محیط انجام شده است. از دستگاه مایکروویو مدل Dom Wave برای سنتز برخی مشتقات بیورت استفاده شده است. برای دنبال کردن پیشرفت واکنش ها و خلوص محصولات و مواد اولیه از کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و لامپ UV با طول موج 254nm و 366nm ساخت شرکت موتنز-شوینز استفاده گردید.

۲-۲- سنتز کاتالیزور Zn-Cr-LDHs-g-HMDI-Citric acid

۲-۲-۱- سنتز هیدروکسیدهای دوگانه لایه ای (Zn-Cr-NO₃-LDHs) به روش هم رسوبی تحت شرایط ترمال

برای تهیه هیدروکسیدهای لایه ای دوگانه، از روش هم رسوبی در واکنش تک ظرفی استفاده شد [۲۴]. بدین منظور نمک های $Cr(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ (۰/۰۱ مول، ۴/۰۰۲ گرم) و $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (۰/۰۳ مول، ۸/۹۲۵ گرم)، در ۳۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل شد و تحت جو گاز N_2 به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق استیرر شد. پس از انحلال کامل نمک ها در حلال با استفاده از سود ۸ مولار، PH محلول در مقدار ۷ تنظیم شد. سپس محلول واکنش در دمای ۸۰ °C به مدت ۴ ساعت تحت فرآیند پیرسازی قرار گرفت. رسوب بنفش رنگ حاصل، طی فرآیند سانتریفیوژ، از محلول جدا شده و چندین مرتبه با آب دیونیزه شستشو و در دمای ۷۰ °C خشک شد. جهت تأیید ساختار نهایی از رسوب به دست آمده طیف FT-IR گرفته شد.

۲-۲-۲- سنتز Zn-Cr-LDHs-g-HMDI

به منظور اتصال هگزامتیلن دی ایزوسیانات به سطح کاتالیزور، به ۱ گرم از (Zn-Cr-LDHs)، ۲۰ میلی لیتر دی متیل فرمامید اضافه شد و سپس ۱۵ میلی لیتر محلول دی متیل فرمامید حاوی هگزامتیلن دی ایزوسیانات (۱۷ میلی مول، ۲/۷۶ میلی لیتر)،

به صورت قطره قطره به مخلوط اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳ ساعت در دمای محیط هم زده شد. پس از اتمام واکنش رسوب را صاف کرده و چندین مرتبه با حلال دی متیل فرمامید شستشو و در دمای ۷۰°C خشک شد. طیف FT-IR ترکیب نیز گرفته شد.

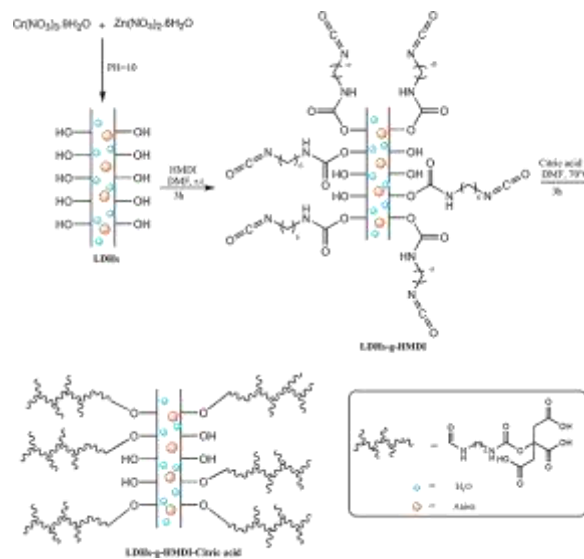
۳-۲-۲-سنتر Zn-Cr-LDHs-g-HMDI-Citric acid

به ۱ گرم از Zn-Cr-LDHs-g-HMDI، ۲۰ میلی لیتر دی متیل فرمامید اضافه و سپس ۱۵ میلی لیتر محلول دی متیل فرمامید حاوی سیتریک اسید (۲۰ میلی مول، ۳/۸۴ میلی لیتر)، به صورت قطره قطره به مخلوط اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳ ساعت در دمای ۷۰°C هم زده شد. پس از اتمام واکنش رسوب حاصل را سانتریفیوژ کرده و ۳ مرتبه با اتانول شستشو داده و در دمای ۷۰°C خشک شد. جهت تأیید ساختار نهایی کاتالیزور به دست آمده طیف های FT-IR، XRD، EDX، TGA و SEM گرفته شد.

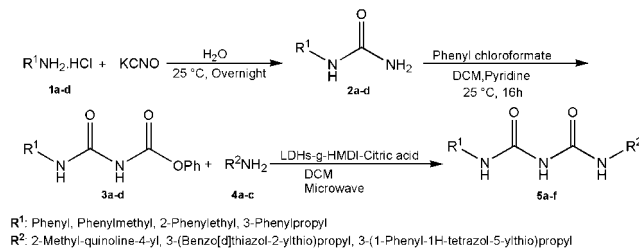
۳-۲- روش کلی تهیه بیورت‌ها (R'-N'-R-N-ایمیدو دی کربونیک دی آمید) از طریق واکنش فنیل آلفانات‌ها

با آمین‌ها در حضور کاتالیزور LDHs-g-HMDI-Citric acid تحت امواج مایکروویو

همانند مطالعه قبلی، از واکنش آمین هیدروکلریدها ۱a-d با ایزوسیانات پتاسیم در حلال آب، مشتقات اوره ۲a-d سنتز شدند [۲۵]. از واکنش میان مشتقات اوره ۲a-d و فنیل کلروفرمات در دی کلرومتان و در حضور پیریدین و دمای صفر درجه سانتیگراد فنیل آلفانات‌ها ۳a-d حاصل شدند [۱۰]. واکنش مقادیر مولی مساوی از مشتقات فنیل آلفانات ۳a-d (۱ میلی مول) و آمین های استخلافی ۴a-c (۱ میلی مول) در حضور LDHs-g-HMDI-Citric acid به عنوان کاتالیزور، در مقدار بسیار اندک حلال دی کلرومتان تحت امواج مایکروویو به مدت چند دقیقه صورت گرفت. سپس محتوای ظرف واکنش را سانتریفیوژ کرده و با صاف کردن مخلوط واکنش، کاتالیزور را جداسازی کرده و با افزودن آب به باقیمانده و استخراج مایع-مایع، محصول وارد فاز آلی شده و با سدیم سولفات آگیری شد. پس از تبخیر حلال، محصول از طریق کروماتوگرافی صفحه ضخیم خالص سازی شده و بیورت‌های موردنظر به دست آمدند (شمای ۲). ساختار بیورت‌های سنتز شده بر اساس داده های فیزیکی و طیفی آنها (FT-IR، ¹H NMR و MS) پذیرفته شد.



شماى ۱: سنتز کاتالیزور LDHs-g-HMDI-Citric acid



شماى ۲: سنتز مشتقات بیورت با استفاده از کاتالیزور LDHs-g-HMDI-Citric acid و امواج مایکروویو

۲-۳-۱- داده های طیفی برخی از مشتقات بیورت سنتز شده

***N*-(Phenylmethyl)-*N'*-[3-(1-phenyl-1H-tetrazol-5-ylthio)propyl]imidodicarbonyl diamide (5b)**

Yield 75 %; mp 80-84°C; IR (KBr) ν_{\max} : 3347, 3311, 3080, 2948, 1701, 1689, 1605 cm^{-1} ; ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 2.01-2.04 (m, 2H), 3.3-3.4 (m, 4H), 4.35-4.37 (m, 2H), 7.2-7.27 (m, 5H), 7.5-7.55 (m, 5H), 9.31 (br, 1H). MS (EI) m/z: 411 (M⁺), 321, 283, 262, 240, 219, 205, 192, 178, 145, 132, 118, 106, 91.

***N*-(Phenylmethyl)-*N'*-[3-(benzo[d]thiazol-2-ylthio)propyl]imidodicarbonyl diamide (5c)**

Yellow oil; Yield 85 %; mp 70-73°C; IR (KBr) ν_{\max} : 3348, 3309, 3080, 2946, 1700, 1688, 1600 cm^{-1} . ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.9-2.07 (m, 2H), 3.3-3.4 (m, 4H), 4.35 (d, 2H, $J=6.4$ Hz), 7.0-7.5 (m, 7H), 7.65-7.8 (m, 2H), 9.6 (br, 1H). MS (EI) m/z: 400 (M⁺), 292, 283, 250, 203, 194, 166, 105.

***N*-(2-Phenylethyl)-*N'*-(2-methylquinolin-4-yl)imidodicarbonyl diamide (5d)**

White solid; Yield 64 %; mp 160°C; IR (KBr) ν_{\max} : 3408, 3348, 3066, 1708, 1698, 1664, 1602 cm^{-1} ; ¹HNMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 2.6 (s, 3H), 2.82-2.83 (t, 2H, $J=7$ Hz), 3.43-3.47 (m, 2H), 7.2-7.34 (m, 5H), 7.6-7.64 (m, 1H), 7.72-7.75 (m, 1H), 7.91 (d, 1H, $J=8.5$ Hz), 7.95 (d, 1H, $J=8.0$ Hz), 8.1 (s, 1H), 9.54 (s, 1H), 11.24 (br, 1H). MS (EI) m/z: 348.1 (M⁺), 256.9, 191, 158, 119, 105, 91.

۲-۴- مطالعات سلولی**۲-۴-۱- سلول ها و ویروس HIV-1**

نمونه خون انسانی درون لوله های محتوی ماده ضد انعقاد هیپارین جمع آوری شد. سلول های تک هسته ای خون محیطی با استفاده از فایکول و سانتریفوژ با دور ۱۸۰۰ rpm، به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد جداسازی شدند. سلول ها در محیط کشت RPMI حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاو (FBS) و ۱ درصد فیتوهمالگوتینین (PHA)، L-گلوتامین ۲ میلی مولار، محلول پنسیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) کشت داده شدند. سپس سلول ها در انکوباتور دی اکسید کربن ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۶ ساعت انکوبه شدند [۲۶]. استوک ویروس HIV-1 SCR (Single Chain Replication) از شرکت انستیتو پاستور تهران تهیه شد. تیترو ویروس با استفاده از کیت الایزای آنتی ژن P24 (شرکت بیومریکس، فرانسه) اندازه گیری شد. ویروس ها تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

۲-۴-۲- سنجش تکثیر ویروس HIV-1

فعالیت ضد HIV-1 مشتقات بیورت توسط کیت الایزای آنتی ژن p24 طبق پروتکل شرکت سازنده مورد مطالعه قرار گرفت [۲۷]. به طور خلاصه $10^6 \times 5$ سلول تک هسته ای خون محیطی انسان در ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت با $0.1/0$ مول از ویروس HIV-1 ساب تایپ A آلوده سازی شد و سپس غلظت های مختلف مشتقات بیورت ($0.1/1$ ، $1/10$ ، $1/50$ و $1/100$ میکرومولار) به هر نمونه سنجش اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت انکوبه شد. سپس سلول های آلوده شسته شده و با غلظت های مختلف مشتقات بیورت در محیط کشت قرار گرفتند. آزیدوتیمیدین (AZT) ($0.1/1$ ، $1/10$ ، $1/50$ و $1/100$ میکرومولار) و دی متیل سولفوکساید (DMSO) ($1/1$) به عنوان شاهد مثبت و بلانک استفاده شدند. پس از سه روز انکوباسیون، مایع رویی جمع آوری شد و به صفحه ۹۶ چاهکی برای تعیین کمی پروتئین هسته HIV-1 p24 منتقل شد. چگالی نوری (OD) ویروس ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط الیزا ریدر (Awareness Technology Inc, USA) اندازه گیری شد. داده ها با آزمون آمار ی آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند

۲-۴-۳- مطالعات داکینگ مولکولی

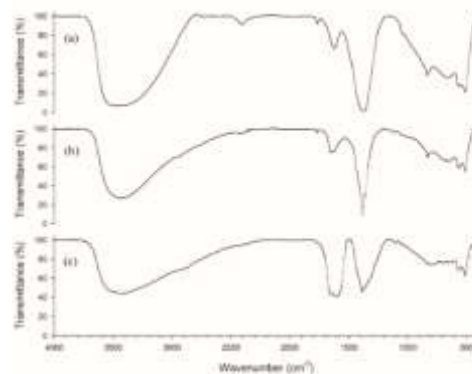
مطالعات داکینگ مولکولی روشی مناسب، سریع و ارزان جهت پیش بینی مکانیسم اثر ترکیبات مختلف است که در دهه های اخیر مورد توجه قرار گرفته است [۲۸]. جهت بررسی مکانیسم اثر ترکیبات بیورت موثر در تست آزمایشگاهی، اثر مهارتی این ترکیبات بر آنزیم پروتئاز HIV1 توسط مطالعات داکینگ مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور ابتدا ساختار پروتئاز HIV1 با کد 1hvp از بانک اطلاعات پروتئین (PDB: Protein Data Bank) استخراج شد. لیگاند، زنجیره های اضافه و کولیگاندها

حذف و سپس هیدروژن های قطبی و بار جزیبی به ساختار پروتئین اضافه شد. لیگاندها نیز مانند پروتئین با استفاده از نرم افزار AutoDockTools (ADT; version 1.5.6) به فرمت مناسب PDBQT در آمدند. برای انجام داکینگ از جعبه ای با اندازه $40 \times 40 \times 40$ آنگستروم و با مختصات X,Y,Z مناسب سایت فعال آنزیم استفاده شد. در این مطالعه از الگوریتم ژنتیک لامارکین استفاده شد و سایر پارامترها بصورت پیش فرض در نظر گرفته شدند. داکینگ مولکولی در ۱۰۰ صورت بندی با استفاده از برنامه AutoDock 4.2 شبیه سازی شد. در نهایت نتایج بدست آمده آنالیز شده و بر اساس انرژی اتصال و جهت گیری در سایت فعال رتبه بندی شدند.

۳- بحث و نتیجه گیری

۳-۱- سنتز و شناسایی کاتالیست Zn-Cr-LDHs-g-HMDI-Citric acid

همانطور که در شمای ۱ نشان داده شده است، روند تهیه کاتالیزور LDHs-g-HMDI-Citric acid در ۳ مرحله انجام شد که این پودر بنفش رنگ سنتز شده با استفاده از تکنیک های مختلف از جمله FT-IR, XRD, EDX, SEM, TGA و DTG مورد شناسایی و آنالیز قرار گرفت. طیف IR ترکیب (a) Zn-Cr-LDHs، ترکیب (b) Zn-Cr-LDHs-g-HMDI و ترکیب (c) Zn-Cr-LDHs-g-HMDI-Citric acid در شکل ۱ نشان داده شده است.

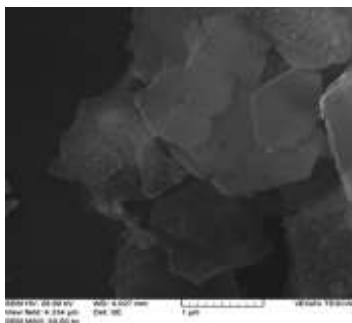


شکل ۱: طیف FT-IR ترکیبات (a) LDHs، (b) LDHs-g-HMDI و (c) LDHs-g-HMDI-Citric acid

مطابق با شکل ۱ پیک های نشان داده شده در ناحیه $500-800 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاشات پیوندی گروه های Zn-O و Cr-O می باشند. وجود یک نوار جذبی در 1385 cm^{-1} در شکل b و c مربوط به گروه های کربنات می باشد که این امر پیوستن HMDI به سطح Zn-Cr-LDHs را نشان می دهد، ظهور پیک های مشخص در 1575 cm^{-1} و 1627 cm^{-1} در شکل b و c حضور گروه کربونیل را تایید می کند. پیک موجود در شکل b در ناحیه 2400 cm^{-1} به گروه عاملی $\text{N}=\text{C}=\text{O}$ مربوط می شود که اتصال هگزامتیلن-۱-۶-دی ایزوسیانات به گروه های هیدروکسی سطح LDHs را تایید می کند و از طرفی حذف کامل این پیک در شکل c حاکی از اتصال سیتریک اسید به سطح هگزامتیلن-۱-۶-دی ایزوسیانات در ترکیب Zn-Cr-LDHs-g-

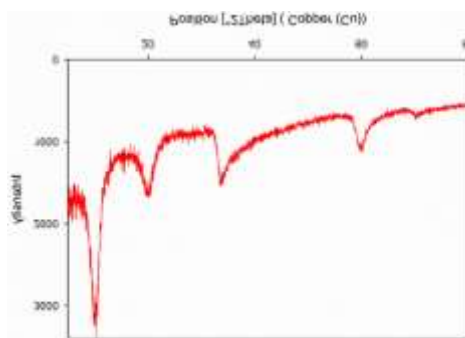
HMDI می باشد. پیوند O-H مربوط به گروه اسید کربوکسیلیک (COOH) جذبی بین $2500-3300 \text{ cm}^{-1}$ را در شکل ۱c نشان می دهد که اتصال موفقیت آمیز سیتریک اسید بر سطح LDHs را تایید می کند.

مورفولوژی و سایز ذرات ترکیب Zn-Cr-LDHs-g-HMDI-Citric acid همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است از طریق تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) آنالیز شده است. مطابق با شکل ۲، لایه ای بودن ساختار ترکیب کاملاً مشهود می باشد.



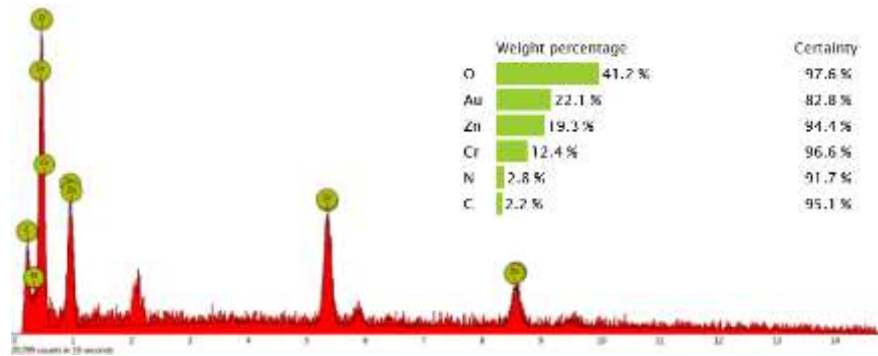
شکل ۲: تصاویر SEM از ترکیب Zn-Cr-LDHs-g-HMDI-Citric acid

در شکل ۳ ساختار بلوری ترکیب Zn-Cr-LDHs-g-HMDI-Citric acid از طریق تکنیک XRD، شناسایی شد. موفقیت و پراکندگی نسبی پیک ها در محدوده (۱) $10/04$ ، (۲) $19/91$ ، (۲) $33/67$ ، (۲) $59/81$ و (۵) $70/20$ همگی به خوبی ساختار را این کاتالیزور را تایید می کند. این الگو، اتصال موفقیت آمیز سیتریک اسید به سطح ترکیب Zn-Cr-LDHs-g-HMDI را آشکار ساخته است.



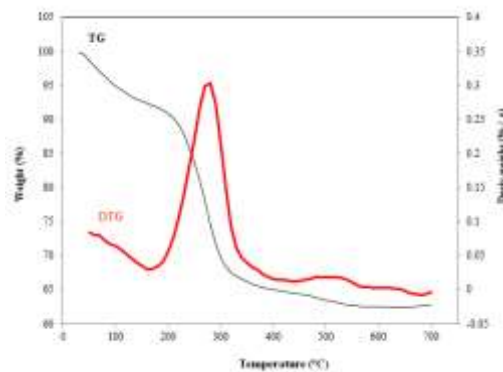
شکل ۳: الگوی XRD ترکیب Zn-Cr-LDHs-g-HMDI-Citric acid

مطابق با شکل ۴ با توجه به درصد عناصر مربوط به ذرات ترکیب Zn-Cr-LDHs-g-HMDI-Citric acid در طیف EDX می توان از خلوص و اتصال سیتریک اسید به گروه هگزا متیلن ۱ و ۶-دی ایزو سیانات روی سطح LDHs اطمینان حاصل کرد.



شکل ۴: طیف EDX ترکیب Zn-Cr-LDHs-g-HMDI-Citric acid

بر اساس منحنی گرما وزن سنجی (TGA) نشان داده شده در شکل ۵، ترکیب Zn-Cr-LDHs-g-HMDI-Citric acid تا دمایی حدود 270°C پایدار می باشد. طبق این نمودار، اولین کاهش وزن ($5/5\%$) در محدوده 170°C به علت حذف آب و گروه های هیدروکسیلی که بر روی سطح کاتالیست باقی مانده اند می باشد. دومین کاهش وزن (17%) در محدوده حرارتی $370-200^{\circ}\text{C}$ به علت حذف حلال های آلی و اوره تان می باشد. در مرحله بعد، سومین کاهش وزن حدود ($2/5\%$) که در محدوده حرارتی $500-370^{\circ}\text{C}$ رخ داده است به دلیل تجزیه و حذف قطعات اسید سیتریک از کاتالیزور است.



شکل ۵: آنالیز TGA ترکیب Zn-Cr-LDHs-g-HMDI-Citric acid

۳-۲- کاربرد کاتالیزور هتروژن Zn-Cr-LDHs-g-HMDI-Citric acid در سنتز مشتقات جدید بیورت تحت امواج

مایکروویو

از آنجایی که بازده سنتز یک سری از مشتقات بیورت با توجه به گزارشات ارایه شده قبلی پایین می باشد، بر آن شدیم که جهت افزایش راندمان و کاهش مدت زمان انجام واکنش، سنتز این مشتقات را با استفاده از کاتالیزور Zn-Cr-LDHs-g-HMDI-Citric acid در شرایط مقادیر بسیار اندک حلال و تحت تابش امواج مایکروویو انجام دهیم. به منظور بهینه کردن شرایط واکنش در ابتدا واکنش شاهد با انحلال فنیل [(۲-فنیل اتیل) آمینو کربونیل] کاربامات (۱ میلی مول) و ۲-متیل-کینولین-۴-آمین (۱ میلی مول) در ۱ میلی لیتر از حلال های مختلف مانند: تترا هیدرو فوران (THF)، دی کلرومتان (DCM)، اتانول (Ethanol) و دی متیل فرمامید (DMF) و تحت امواج مایکروویو با قدرت های ۱۸۰، ۳۶۰ و ۵۴۰ واتی در حضور مقادیر متفاوت از کاتالیزور

مورد بررسی قرار گرفته شد. مطابق با نتایج نشان داده شده در جدول ۱ (ردیف ۱-۴) محصول با راندمان بسیار پایین به دست آمد. با افزایش قدرت دستگاه مایکروویو در حضور حلال های تترا هیدرو فوران، اتانول و دی متیل فرمامید نتایج رضایت بخشی حاصل نشد (ردیف ۵-۷). در حضور حلال دی کلرومتان و قدرت ۳۶۰ واتی دستگاه مایکروویو و با افزایش مقدار کاتالیزور تا ۳ mg راندمان افزایش یافته ولی افزایش بیشتر مقدار کاتالیزور و افزایش بیشتر قدرت دستگاه مایکروویو تاثیر در کاهش زمان یا افزایش راندمان نداشته و در شرایط عدم حضور کاتالیزور واکنش هیچ گونه پیشرفتی نداشته است (ردیف ۹-۱۲). بدین ترتیب واکنش در حلال دی کلرومتان و قدرت ۳۶۰ واتی دستگاه مایکروویو و استفاده از مقدار ۳ mg کاتالیزور به عنوان بهترین شرایط برای سنتز مشتقات جدید بیورت انتخاب شد که نتایج حاصل در جدول ۲ نشان داده شده اند.

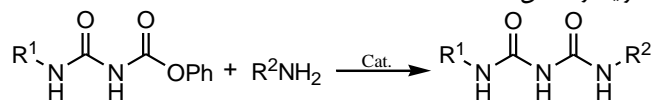
جدول ۱- بهینه سازی شرایط واکنش بین فنیل [(۲-فنیل اتیل) آمینو کربونیل] کاربامات و ۲-متیل-کینولین-۴-آمین الف

شماره	حلال	مقدار کاتالیست (میلی گرم)	قدرت اشعه مایکروویو	زمان (دقیقه)	بازده ^ب
۱	THF	۲	۱۸۰	۲۰	۲۲
۲	EtOH	۲	۱۸۰	۲۰	۱۵
۳	DMF	۲	۱۸۰	۲۰	۱۰
۴	CH ₂ Cl ₂	۲	۱۸۰	۲۰	۴۷
۵	THF	۲	۳۶۰	۲۰	۲۷
۶	EtOH	۲	۳۶۰	۲۰	۲۰
۷	DMF	۲	۳۶۰	۲۰	۱۳
۸	CH ₂ Cl ₂	۲	۳۶۰	۱۵	۷۰
۹	CH ₂ Cl ₂	۳	۳۶۰	۱۰	۸۵
۱۰	CH ₂ Cl ₂	۴	۳۶۰	۱۰	۸۵
۱۱	CH ₂ Cl ₂	۲	۵۴۰	۱۷	۵۸
۱۲	CH ₂ Cl ₂	در غیاب کاتالیزور	۳۶۰	۵۰	جزئی

الف) شرایط واکنش: فنیل [(۲-فنیل اتیل) آمینو کربونیل] کاربامات (۱ میلی مول)، ۲-متیل-کینولین-۴-آمین (۱ میلی مول) و حلال (۱ میلی لیتر)، ب) بازده جداسازی شده

به منظور سنجش فعالیت کاتالیزوری Zn-Cr-LDHs-g-HMDI-Citric acid با سایر کاتالیزورهای گزارش شده، سنتز مشتقات بیورت در حضور این کاتالیزور جدید با روش قدیمی که در آن از K₂CO₃ به عنوان کاتالیزور استفاده گردیده، مقایسه و در جدول ۲ گزارش شد. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می شود، استفاده از کاتالیزور Zn-Cr-LDHs-g-HMDI-Citric acid منجر به تولید فرآورده در زمان کوتاه تر و بازده بالاتر نسبت به روش قبلی شده است و همچنین از مزایای این کاتالیزور می توان به سازگاری با محیط زیست و قابلیت بازیافت آسان از محیط واکنش اشاره کرد.

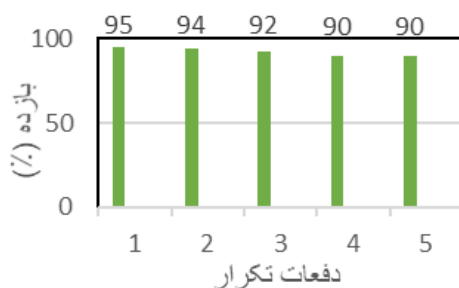
جدول ۲: مقایسه نتایج سنتز مشتقات بیورت با روش استفاده از کاتالیزور Zn-Cr-LDHs-g-HMDI-Citric acid تحت امواج مایکروویو و روش استفاده از کاتالیزور K_2CO_3 تحت شرایط رفلاکس



محصول	R ₁	R ₂	زمان (دقیقه)		بازده (%) الف	
			شرایط مایکروویو	گزارش قبلی ^ب	شرایط مایکروویو	گزارش قبلی ^ب
5a	Phenyl	2-Methyl-quinoline-4-yl	۱۰	تمام طول شب	۷۸	۵/۲
5b	Phenyl methyl	3-(1-Phenyl-1H-tetrazol-5-ylthio)propyl	۱۲	تمام طول شب	۹۱	۳۴
5c	Phenyl methyl	3-(Benzo[d]thiazol-2-ylthio)propyl	۸	تمام طول شب	۸۹	۲۳
5d	2-Phenylethyl	2-Methyl-quinoline-4-yl	۱۱	تمام طول شب	۹۵	۳۸/۸
5e	3-Phenylpropyl	2-Methyl-quinoline-4-yl	۱۰	تمام طول شب	۸۲	۱۵
5f	3-Phenylpropyl	3-(1-Phenyl-1H-tetrazol-5-ylthio)propyl	۸	تمام طول شب	۸۷	۲۸

الف) بازده جداسازی شده، ب) Fouladdel et al., 2010

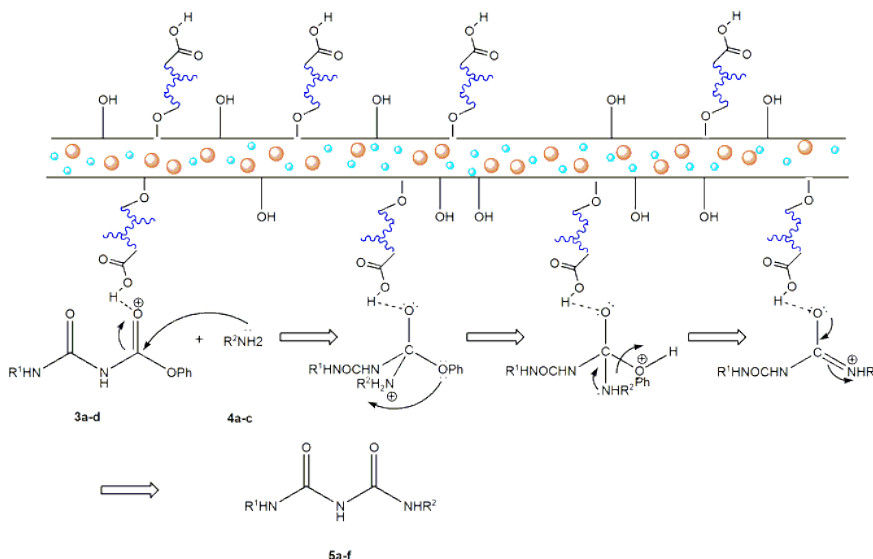
با توجه به اهمیت باز یافت کاتالیزورهای هتروژن، این کاتالیزور در واکنش شاهد مورد استفاده قرار گرفت. پس از اتمام واکنش و جداسازی کاتالیزور، به منظور حذف ناخالصی های آلی متصل به کاتالیزور، کاتالیزور چندین مرتبه با اتانول جوشان شستشو داده شد و سپس خشک گردید و تا پنج مرتبه برای سنتز محصول مورد نظر مورد استفاده قرار گرفت. مطابق با شکل ۶ استفاده مجدد از این کاتالیزور حتی بعد از پنج مرتبه استفاده در واکنش شاهد، کاهش قابل ملاحظه ای در فعالیت کاتالیزوری نشان نداده است.



شکل ۶: نمودار باز یافت کاتالیزور Zn-Cr-LDHs-g-HMDI-Citric acid در سنتز مشتقات بیورت

مکانیسم پیشنهادی برای واکنش بین ترکیبات فنیل آلفانات ها و آمین ها در حضور کاتالیزور Zn-Cr-LDHs-g-HMDI-Citric acid در شمای ۳ نشان داده شده است. مطابق با این مکانیسم در ابتدا، به دلیل تعامل بین هیدروژن اسیدی کاتالیزور و اکسیژن کربونیل از آلفانات، سایت کربونیل برای افزایش نوکلوفیلی آمین فعال تر شده و جایگزینی هسته دوستی آسان تر صورت می

پذیرد. به عبارت دیگر کاتالیزور با کاهش سطح انرژی HOMO^a از آمین و نزدیک شدن به سطح انرژی LUMO^b از کربونیل، باعث افزایش سرعت واکنش و افزایش بازده محصولات می شود.



شماره ۳: مکانیسم پیشنهادی برای سنتز مشتقات بیورت در حضور کاتالیزور Zn-Cr-LDHs-g-HMDI-Citric acid

۳-۳-ارزیابی بیولوژیکی

فعالیت ضد ویروسی غلظت های مختلفی از بیورت ها و آزیدوتیمیدین (AZT) و همچنین غلظتی از ترکیبات بیورت که ۵۰٪ رشد سلول را نسبت به کنترل متوقف می کند (IC₅₀) محاسبه و در جدول ۳ گزارش گردید. ترکیب 5f، در غلظت (μg/ml) ۱۰۰، دارای بالاترین اثر مهارکنندگی، معادل با ۶۵٪ و ترکیب 5a، دارای کمترین اثر مهارکنندگی، معادل با ۲۳٪ می باشد. باتوجه به نتایج جدول، ترکیبات 5b، 5c و 5f فعالیت ضدویروسی علیه ویروس HIV-1 از خود نشان دادند (IC₅₀ بین ۵۵/۱ و ۱۰۰ میکرومولار).

جدول ۳: درصد بازدارندگی غلظت های متفاوت از مشتقات بیورت بر رشد سلول های ویروسی HIV-1 و IC₅₀ ترکیبات فعال

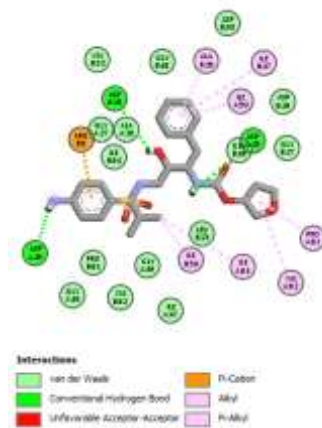
ترکیب	اثر بازدارندگی غلظت های متفاوت مشتقات بیورت بر رشد ویروس (%)					مقدار IC ₅₀ ترکیبات فعال (μM)
	۰/۱	۱	۱۰	۵۰	۱۰۰	
	(میکروگرم/ میلی لیتر)	(میکروگرم/ میلی لیتر)	(میکروگرم/ میلی لیتر)	(میکروگرم/ میلی لیتر)	(میکروگرم/ میلی لیتر)	
5a	۰	۱	۷	۱۱	۲۳	-
5b	۰	۱	۱۵	۲۸	۵۰	۱۰۰/۰ ± ۱/۷
5c	۰	۳	۱۸	۴۴	۶۱	۶۴/۶ ± ۰/۷
5d	۰	۲	۹	۱۶	۲۹	-
5e	۰	۲	۱۰	۱۷	۳۲	-
5f	۰	۳	۱۷	۴۸	۶۵	۵۵/۱ ± ۰/۹
آزیدوتیمیدین	۳۵	۵۰	۹۴	۹۴	۹۴	۰/۱۱ ± ۰/۱

^a Highest Occupied Molecular Orbital

^b Lowest Unoccupied Molecular Orbital

۳-۴- مطالعات داکینگ مولکولی

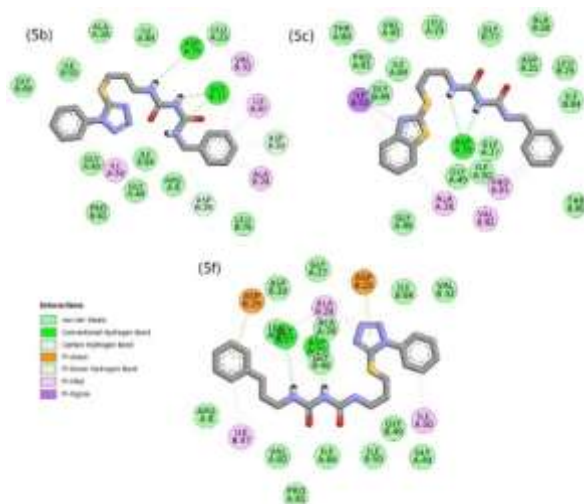
جهت معتبر سازی روش داکینگ مولکولی ابتدا لیگاند کریستالوگرافی، بعنوان مهارکننده آنزیم پروتئاز HIV-1، از کد 1hpv استخراج و بر آنزیم طبق روش ذکر شده در قسمت (۲-۴-۳) داک گذاشته شد. همانطور که در شکل ۷ نشان داده شده است، نتایج حاصل از داکینگ مولکولی و ساختار کریستالوگرافی از لحاظ نحوه قرار گیری این مهارکننده در سایت فعال آنزیم و نیز برهم کنش با اسیدهای آمینه مهم و کلیدی با هم در توافق هستند. لیگاند مورد نظر با انرژی اتصال $-۸/۳۷$ کیلو کالری بر مول به آنزیم پروتئاز HIV-1 اتصال می یابد. همچنین اثر فاصله میانگین ریشه مربعات (RMSD) بین ساختار کریستالوگرافی و ساختار کمپلکس بعد از داک محاسبه و کمتر از ۲ آنگستروم بدست آمد که تاییدی بر صحت روش داکینگ است [۲۸].



شکل ۷: برهمکنش دوبعدی لیگاند کریستالوگرافی با اسیدهای آمینه پروتئاز HIV-1

مشقات بیورت سنتز شده بخاطر ساختار شبه پپتیدی می توانند بعنوان مهارکننده آنزیم پروتئاز HIV-1 مطرح شوند. بنابراین در این مطالعه، مطالعات داکینگ مولکولی جهت بررسی میزان انرژی اتصال، نحوه قرار گیری در سایت فعال آنزیم و برهم کنش با اسیدهای آمینه کلیدی آنزیم پروتئاز HIV-1 مورد بررسی قرار گرفت. آنزیم یک همودیمر است که هر زنجیره ۹۹ اسید آمینه دارد، ناحیه کاتالیتیک شامل سه اسید آمینه کلیدی آسپاراتات، ترئونین و گلايسين ۲۵ تا ۲۷ است که آسپاراتات مهمترین نقش را این ناحیه دارد [۲۹]. سه ترکیب منتخب 5b, 5c, 5f به ترتیب انرژی اتصال $-۸/۸۱$ ، $-۸/۵۸$ و $-۸/۵۲$ کیلو کالری بر مول را با آنزیم پروتئاز HIV-1 دارند. همانطور که در شکل ۸ نشان داده شده است هر سه ترکیب منتخب (5b, 5c, 5f) با اسیدهای آمینه مهم ناحیه کاتالیتیک برهمکنش مناسب دارند. ترکیب 5b با ایجاد سه پیوند هیدروژنی مناسب با اسیدهای آمینه آسپاراتات ۲۵ و گلايسين ۲۷ و نیز برقراری پیوندهای هیدروفوب مناسب در سایت فعال آنزیم قرار گرفته است. ترکیب 5c با ایجاد دو پیوند هیدروژنی با آسپاراتات ۲۵ و پیوند واندروالس با گلايسين ۲۷ در سایت فعال قرار گرفته و ترکیب 5f دو پیوند هیدروژنی مناسب با اسیدهای آمینه آسپاراتات ۲۵ و گلايسين ۲۷ و پیوندهای مناسب با سایر اسیدهای آمینه را دارد، که نشان می دهد هر سه ترکیب در در موقعیت مناسبی در سایت فعال قرار گرفته و لذا اثر مهاری روی آنزیم دارند. نتایج بدست آمده در مطالعات

داکینگ در توافق با نتایج حاصل از تست ویروسی است، و از اینرو این سه ترکیب می توانند کاندید مناسبی بعنوان ترکیبات پیشرو در طراحی ترکیبات ضد ایدز با مکانیسم مهار آنزیم پروتئاز HIV-1 بکار روند.



شکل ۸: تصاویر دوبعدی از برهمکنش بین ترکیبات بیورت منتخب و آنزیم پروتئاز HIV-1

۴- نتیجه گیری

ترکیب LDHs-g-HMDI-Citric acid به عنوان یک کاتالیزور جدید، کارآمد و ناهمگن برای سنتز مشتقات بیورت معرفی و با تکنیک های FT-IR، EDX، XRD، SEM و TGA به طور کامل شناسایی شد. از ویژگی های جذاب کاتالیزور ارائه شده می توان به راندمان بالای محصولات، زمان کوتاه واکنش، شرایط ساده واکنش، قابلیت بازیافت کارآمد و قابلیت استفاده مجدد از کاتالیزور در سنتز مشتقات جدید بیورت اشاره کرد. در مطالعه *in vitro* اثر بازدارندگی غلظت های متفاوتی از مشتقات بیورت بر رشد سلول های ویروسی HIV-1 مورد ارزیابی قرار گرفت. مطابق با داده های آنالیز شده، بالاترین اثر ضدایدز مشتقات بیورت به ترتیب مربوط به ترکیبات 5b > 5c > 5f می باشند. به نظر می رسد که سنتز و شناسایی مشتقات دیگر از بیورت ها، ممکن است به ترکیباتی با اثر بالای بازدارندگی پروتئاز HIV-1 منجر شود.

۵- تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله، از دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی زنجان جهت تهیه مکان و تجهیزات این پژوهش صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایند.

۶- مراجع

- [1] Simon, V., Ho, D. D., & Abdool Karim, Q. (2006). HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet*, 368(9534), 489-504.
- [2] Shiels, M. S., & Engels, E. A. (2017). Evolving epidemiology of HIV-associated malignancies. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 12(1), 6-11.

- [3] Saleh, N. A., Elhaes, H., & Ibrahim, M. (2017). *Viral Proteases and Their Inhibitors* (1st ed.). Academic Press.
- [4] Ghosh, A. K., Osswald, H. L., & Prato, G. (2016). Recent Progress in the Development of HIV-1 Protease Inhibitors for the Treatment of HIV/AIDS. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(11), 5172-5208.
- [5] Soontornniyomkij, V., Umlauf, A., Chung, S. A., Cochran, M. L., Soontornniyomkij, B., Gouaux, B., Toperoff, W., Moore, D. J., Masliah, E., Ellis, R. J., Grant, I., & Achim, C. L. (2014) HIV protease inhibitor exposure predicts cerebral small vessel disease. *AIDS*, 28(9), 1297-1306.
- [6] Qureshi, A., Thakur, N., & Kumar, M. (2013). HIPdb: a database of experimentally validated HIV inhibiting peptides. *PLoS One*, 8, e54908.
- [7] Adibpour, N., Poornajjari, A., Khodayar, M. J., & Rezaee, S. (2014). Antinociceptive effect of some Biuret derivatives on formalin test in mice. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 4(2), 179-183.
- [8] Jia, J. M., Wu, C. F., Liu, W., Yu, H., Hao, Y., Zheng, J. H., & Ji, Y., R. (2005). Antiinflammatory and analgesic activities of the tissue culture of *Saussurea involucre*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(9), 1612-1614.
- [9] Khademvatan, S., Adibpour, N., Eskandari, A., Rezaee, S., Hashemitabar, M., & Rahim, F. (2013). In silico and in vitro comparative activity of novel experimental derivatives against *Leishmania major* and *Leishmania infantum* promastigotes. *Experimental Parasitology*, 135(2), 208-216.
- [10] Fouladdel, S., Khalaj, A., Adibpour, N., & Azizi, E. (2010). Synthesis and cytotoxicity of some biurets against human breast cancer T47D cell line. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(19), 5772-5775.
- [11] Gundala, T., R., Godugu, K., & Nallagonda, C., G. (2017). Citric Acid-catalyzed Synthesis of 2,4-Disubstituted Thiazoles from Ketones via C-Br, C-S, and C-N Bond Formations in One Pot: A Green Approach. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 64(12), 1408-1416.
- [12] Rives, V. (2001). *Layered Double Hydroxides: Present and Future*, Nova Science Pub.
- [13] Duan, X., & Evans, D. G. (2016). *Layered double hydroxides*, in: D.M.P. Mingos (Ed.), *Structure and Bonding*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [14] Choi, S. J., Oh, J. M., & Choy, J. H. (2007). Anticancer Drug-Layered Hydroxide Nanohybrids as Potent Cancer Chemotherapy Agents. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 69(5-6), 1528-1532.
- [15] Dong, H., Chen, M., Rahman, S., Parekh, H. S., Cooper, H. M., & Xu, Z. P. (2014). Engineering small MgAl-layered double hydroxide nanoparticles for enhanced gene delivery. *Applied Clay Science*, 100, 66-75.
- [16] Evans, D. G., & Duan, X. (2006). Preparation of layered double hydroxides and their applications as additives in polymers, as precursors to magnetic materials and in biology and medicine. *Chemical Communications*, 5(5), 485-496.

- [17] Li, L., Feng, Y., Li, Y., Zhao, W., & Shi, J. (2009). Fe₃O₄ Core/Layered Double Hydroxide Shell Nanocomposite: Versatile Magnetic Matrix for Anionic Functional Materials. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(32), 5888-5892
- [18] Othman, M. R., Helwani, Z., Martunus, & Fernando, W. J. N. (2009). Synthetic hydrotalcites from different routes and their application as catalysts and gas adsorbents: a review. *Applied Organometallic Chemistry*, 23(9), 335-346.
- [19] Serrano-Lotina, A., Rodríguez, L., Muñoz, G., Martín, A. J., Folgado, M. A., & Daza, L. (2011). Biogas reforming over La-NiMgAl catalysts derived from hydrotalcite-like structure: Influence of calcination temperature. *Catalysis Communications*, 12(11), 961-967.
- [20] Choudary, B. M., Lakshmi Kantam, M., Neeraja, V., Koteswara Rao, K., Figueras, F., & Delmotte, L. (2001). Layered double hydroxide fluoride: a novel solid base catalyst for C–C bond formation. *Green Chemistry*, 3(5), 257-260.
- [21] Lv, W. M., Yang, L., Fan, B. B., Zhao, Y., Chen, Y. F., Lu, N. Y., & Li, R. F. (2015). Silylated MgAl LDHs intercalated with MnO₂ nanowires: Highly efficient catalysts for the solvent-free aerobic oxidation of ethylbenzene. *Chemical Engineering Journal*, 263, 309-316.
- [22] Bechara, R., D'Huysser, A., Fournier, M., Forni, L., Fornasari, G., Trifirò, F., & Vaccari, A. (2002). Synthesis and Characterization of Boron Hydrotalcite-Like Compounds as Catalyst for Gas-Phase Transposition of Cyclohexanone-Oxime. *Catalysis Letters*, 82, 59-67.
- [23] Theiss, F. L., Ayoko, G. A., & Frost, R. L. (2016). Synthesis of layered double hydroxides containing Mg²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺ and Al³⁺ layer cations by co-precipitation methods—A review. *Applied Surface Science*, 383, 200-213.
- [24] Kuwahara, Y., Tsuji, K., Ohmichi, T., Kamegawa, T., Mori, K., & Yamashita, H. (2012). Transesterifications using a hydrocalumite synthesized from waste slag: an economical and ecological route for biofuel production. *Catalysis Science & Technology*, 2(9), 1842-1851.
- [25] Moschel, R. C., Hudgins, W. R., & Dipple, A. (1986). Reactivity effects on site selectivity in nucleoside aralkylation: a model for the factors influencing the sites of carcinogen-nucleic acid interactions. *Journal of Organic Chemistry*, 51(22), 4180-4185.
- [26] Borrajo, A., Ranazzi, A., Pollicita, M., Bruno, R., Modesti, A., Alteri, C., Perno, C. F., Svicher, V., & Aquaro, S. (2017). Effects of Amprenavir on HIV-1 Maturation, Production and Infectivity Following Drug Withdrawal in Chronically-Infected Monocytes/Macrophages. *Viruses*, 9(10), 277-288.
- [27] Behbahani, M. (2014). Evaluation of anti-HIV-1 activity of a new iridoid glycoside isolated from *Avicenna marina*, in vitro. *International Immunopharmacology*, 23(1), 262-266.
- [28] Rezaei, Z., Didehvar, M. M., Mahdavi, M., Azizian, H., Hamedifar, H., Mohammed, E. H. M., Ostad, S., & Amini, M. (2019). Anticancer properties of N-alkyl-2, 4-diphenylimidazo [1, 2-a] quinoxalin-1-amine derivatives; kinase inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 90, 103055.

- [29] Razzaghi-Asl, N., Sepehri, S., Ebadi, A., Miri, R., & Shahabipour, S. (2015). Effect of Biomolecular Conformation on Docking Simulation: A Case Study on a Potent HIV-1 Protease Inhibitor. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 14(3), 785-802.