



ЮГОЗАПАДЕН УНИВЕРСИТЕТ
“НЕОФИТ РИЛСКИ”
ПРИРОДО - МАТЕМАТИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

Резюмета
на научните публикации

на гл. ас. д-р Радослав Чайров –

кандидат за заемане на академична длъжност „доцент“ в Област 4. Природни науки, математика и информатика, Професионално направление 4.2. „Химически науки“ (Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества), в конкурс обявен в Държавен Вестник бр. 57/04.07.2023 г.

Web of Science Researcher ID: G-9471-2014
Scopus Author Identifier: 56786407600
ORCID: 0000-0002-2522-7020

1. Tailoring acyclovir prodrugs with enhanced antiviral activity: Rational design, synthesis, human plasma stability and in vitro evaluation.

Chayrov, R. L., Stylos, E. K., Chatziathanasiadou, M. V., Chuchkov, K. N., Tencheva, A. I., Kostagianni, A. D., Milkova, T., Angelova, A., Galabov, A., Shishkov, S., Todorov, D., Tzakos, A. G., & Stankova, I. G. (2018).

Amino acids, 50, 1131-1143. <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2590-y>

Резюме: Предлекарства включващи жлъчни киселини в структурата си биха били полезни като стратегия за усъвършенстване на фармацевтичния профил на изходни лекарства чрез използване на транспортерите на жлъчните киселини. Серия от три естерни предлекарства на антихерпесния медикамент ацикловир (ACV) с жлъчните киселини холева, дезоксихолева и хенодезоксихолева бяха синтезирани и оценени *in vitro*, заедно с валацикловир за противовирусна активност срещу вируси херпес симплекс тип 1 и тип 2 (HSV-1, HSV-2). Беше оценена *in vitro* противовирусната активност на трите предлекарства на жлъчните киселини и срещу Epstein-Barr (EBV) вирус. Бяха проведени тестове за химична стабилност в кръвна плазмата чрез UPLC, съчетана с масспектрометрия, *in vitro* цитотоксичност и инхибиторни експерименти за да се установи биологичният профил на предлекарствата. Антивирусните анализи показват, че ACV-холатът има малко по-добра антивирусна активност от ACV срещу HSV-1. По отношение на ACV срещу HSV-2 ACV-холатът показва до осем пъти по-висока активност. ACV-хенодеоксихолатът показва шест пъти по-висока антивирусна активност срещу HSV-2 спрямо ACV. Що се отнася до EBV, най-високият противовирусен ефект е демонстриран от ACV-хенодеоксихолат. Тестовите за химична стабилност в човешката кръвна плазма показват, че ACV-дезоксихолатът е по-стабилен от другите две предлекарства. Тези резултати предполагат, че добавянето на жлъчни киселини към основната структура на ACV може да създаде предлекарства с по-добре изразена противовирусна активност.

Abstract: Bile acid prodrugs have served as a viable strategy for refining the pharmaceutical profile of parent drugs through utilizing bile acid transporters. A series of three ester prodrugs of the antiherpetic drug acyclovir (ACV) with the bile acids cholic, deoxycholic and chenodeoxycholic were synthesized and evaluated along with valacyclovir for their *in vitro* antiviral activity against herpes simplex viruses type 1 and type 2 (HSV-1, HSV-2). The *in vitro* antiviral activity of the three bile acid prodrugs was also evaluated against Epstein-Barr virus (EBV). Plasma stability assays, utilizing ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *in vitro* cytotoxicity and inhibitory experiments were conducted in order to establish the biological profile of ACV prodrugs. The antiviral assays demonstrated that ACV-cholate had slightly better antiviral activity than ACV against HSV-1, while it presented an eight-fold higher activity with respect to ACV against HSV-2. ACV-chenodeoxycholate presented a six-fold higher antiviral activity against HSV-2 with respect to ACV. Concerning EBV, the highest antiviral effect was demonstrated by ACV-chenodeoxycholate. Human plasma stability assays revealed that ACV-deoxycholate was more stable than the other two prodrugs. These results suggest that decorating the core structure of ACV with bile acids could deliver prodrugs with amplified antiviral activity.

- 2. In Vitro Antioxidant Activity of Memantine Derivatives Containing Amino Acids.** Stankova, I. G., Stoilkova, A. I., Chayrov, R. L., Tsvetanova, E. R., Georgieva, A. P., & Alexandrova, A. V. (2020). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 54, 268-272. <https://doi.org/10.1007/s11094-020-02189-9>

Резюме: Болестта на Алцхаймер (AD) е най-често срещаният тип деменция при възрастните хора. Тъй като оксидативният стрес е важна характеристика на AD, може да се предположи, че конюгирането на наличните лекарства с вещества с антиоксидантни свойства може да доведе до благоприятен ефект. Целта на това проучване беше да се изследва антиоксидантният капацитет на 7 аналози на мемантин (MEM) с Gly, Ala, β -Ala, Val, Phe, Phe(4-F) и Gly-Gly. Антиоксидантният капацитет на MEM конюгатите беше тестван в химически системи, генериращи супероксиден анион ($\bullet\text{O}_2^-$) и хидроксил ($\bullet\text{OH}$) радикали и чрез прилагане на DPPH тест. Резултатите показват незначителен ефект на веществата върху намаляването на DPPH \bullet . Phe-MEM, (4-F)-Phe-MEM и Gly-Gly-MEM демонстрират потенциал за улавяне на $\bullet\text{O}_2^-$. Phe-съдържащите производни упражняват защитен ефект при $\bullet\text{OH}$ -индуцираното разграждане на дезоксирибозата и имат способности за хелатиране на желязни йони. В заключение изследваните Phe-съдържащи MEM производни проявяват добра антиоксидантна активност и може да се очаква обещаващ ефект при лечението на AD.

Abstract: Alzheimer's disease (AD) is the most common type of dementia in elderly. Since oxidative stress is an important feature of AD, it could be assumed that conjugation of the available medicines with substances having antioxidant properties may produce beneficial effect. The aim of this study was to investigate the antioxidant capacity of 7 analogs of memantine (MEM) with Gly, Ala, β -Ala, Val, Phe, Phe(4-F), and Gly-Gly. The antioxidant capacity of the MEM conjugates was tested in chemical systems generating superoxide anion ($\bullet\text{O}_2^-$) and hydroxyl ($\bullet\text{OH}$) radicals, and by applying the DPPH test. The results showed a negligible effect of the substances on DPPH \bullet reduction. Phe-MEM, (4-F)-Phe-MEM and Gly-Gly-MEM demonstrated $\bullet\text{O}_2^-$ scavenging potential. The Phe-containing derivatives exerted protective effect on $\bullet\text{OH}$ -induced deoxyribose degradation and had abilities for chelating iron ions. In conclusion, the investigated Phe-containing MEM derivatives manifested a good antioxidant activity, and a promising effect in AD treatment could be expected.

- 3. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of adamantane derivatives: interpretation of proton and carbon chemical shifts.** Mitrev, Y., Chayrov, R., & Stankova, I. (2020). *Spectroscopy Letters*, 53(7), 489-493. <https://doi.org/10.1080/00387010.2020.1772828>

Резюме: В настоящата работа системно изследвахме чрез ядрено-магнитен резонанс 12 адамантанови амиди с потенциална биологична активност. Определянето на химичните отмествания при протони и въглерод-13 показва сходни тенденции в тяхното спектрално поведение, заедно с някои специфични за структурата промени в случаите с ароматните заместители. Наблюденията предоставят добра основа за бъдещи изследвания или за подпомагането на базата данни при изследване на отместванията на нови съединения, или като отправна точка за анализ на конфигурация и конформация.

Abstract: Systematic nuclear magnetic resonance investigation on 12 adamantane amides with potential biological activity is reported. The assignment of proton and carbon-13 chemical shifts shows similar trends in their spectral behavior, along with some structure-specific changes in the cases of aromatic substituents. The observations provide a good basis for future investigations, either as a tool for the database-assisted assignment of novel compounds or as a starting point for configuration and conformation analysis.

4. Synthetic Analogues of Aminoadamantane as Influenza Viral Inhibitors—In Vitro, In Silico and QSAR Studies.

Chayrov, R., Parisis, N. A., Chatziathanasiadou, M. V., Vrontaki, E., Moschovou, K., Melagraki, G., Sbirikova – Dimitrova, H., Shivachev, B., Schmidtke, M., Mitrev, Y., Štícha, M., Mavromoustakos, T., Tzakos, A. G., & Stankova, I. (2020). *Molecules*, 25(17), 3989. <https://doi.org/10.3390/molecules25173989>

Резюме: Синтезирани са серия от деветнадесет аминокиселинни аналози на амантадин (Amt) и римантадин (Rim). Оценена е и тяхната противовирусна активност срещу грипен вирус А (H3N2). Сред тези аналози съединението на римантадин с глицин илюстрира висока противовирусна активност, комбинирана с ниска цитотоксичност. Освен това съединението показва изключително висока стабилност след *in vitro* инкубиране в човешка кръвна плазма за 24 часа. Неговата термична стабилност е установена чрез диференциален и гравиметричен термичен анализ. Кристалната структура на глицил-римантадин разкрива, че той кристализира в орторомбичната пространствена група Pbcа. Връзката структура-активност за този клас съединения беше установена с CoMFA (сравнителен анализ на молекулярно поле) и 3D-Quantitative Structure Activity Relationships (3D-QSAR) изследвания, предвиждащи активността на синтетичните молекули. Освен това бяха проведени и докинг изследвания, разкриващи структурните особености за активността на синтезираните молекули.

Abstract: A series of nineteen amino acid analogues of amantadine (Amt) and rimantadine (Rim) were synthesized and their antiviral activity was evaluated against influenza virus A (H3N2). Among these analogues, the conjugation of rimantadine with glycine illustrated high antiviral activity combined with low cytotoxicity. Moreover, this compound presented a profoundly high stability after *in vitro* incubation in human plasma for 24h. Its thermal stability was established using differential and gravimetric thermal analysis. The crystal structure of glycy-l-rimantadine revealed that it crystallizes in the orthorhombic Pbcа space group. The structure-activity relationship for this class of compounds was established, with CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) 3D-Quantitative Structure Activity Relationships (3D-QSAR) studies predicting the activities of synthetic molecules. In addition, molecular docking studies were conducted, revealing the structural requirements for the activity of the synthetic molecules.

5. Hydrolytic Stability of New Amino Acids Analogues of Memantine.

Tencheva, A., **Chayrov, R.**, Mandjukov, P., Danalev, D., & Stankova, I. (2020). *Scientia Pharmaceutica*, 88(3), 38. <https://doi.org/10.3390/scipharm88030038>

Резюме: В настоящата работа беше оценена хидролитичната стабилност на нови аналози на мемантин с аминокиселини при рН, съответстващо на човешките

биологични флуиди и органи. Мемантин е неконкурентен *N*-метил-*D*-аспартат рецепторен антагонист с нисък до умерен афинитет. В допълнение той е първият представител на нов клас лекарства използвани при болест на Алцхаймер (AD), действащи върху глутаматергичната система чрез блокиране на *N*-метил-*D*-аспартат рецепторите. Предлекарствата са съединения имащи за цел да подобрят стабилността на активния фрагмент и да улеснят транспортирането му през клетъчните мембрани или липидни бариери. Изследваната серия от предлекарства включва модифициран мемантин със следните аминокиселини: аланин, β -аланин, глицин, фенилаланин и валин. Хидролитичната стабилност е определена при две различни стойности на рН - рН 2.0 и рН 7.4 при 37°C, подобни на тези в човешкия стомах и кръвна плазма. При кинетичните изследвания е приложен специално разработен UV-VIS спектрофотометричен метод за количествено определяне на концентрациите на непроменени съединения. Val-MEM е най-стабилното съединение в неутрална среда и 37°C с $t_{1/2} = 50.2\text{h}$. Съединението Phe-MEM също има много добра хидролитична стабилност с $t_{1/2} = 29.6\text{h}$. Редът на съединенията по намаляваща стабилност в неутрално рН е: Val-MEM \gg Phe-MEM \gg Ala-MEM \approx Gly-MEM $>$ β -Ala-MEM. Ala-MEM и Gly-MEM са най-стабилните съединения при киселинни условия с почти идентични стойности за $t_{1/2} = 17.8\text{h}$ и $t_{1/2} = 16.3\text{h}$ съответно. Стабилността на тестваните съединения в киселинни условия е относително по-малка, отколкото в неутрални. Те са подредени както следва: Ala-MEM \approx Gly-MEM $>$ Val-MEM \approx Phe-MEM \approx β -Ala-MEM. Всички съединения имат относително добра хидролитична стабилност – повече от 10h както при неутрални, така и при киселинни условия. Това е напълно достатъчно, за да преминат в кръвообращението и да се служат като потенциални антимикробни агенти.

Abstract: In the present work, the hydrolytic stability of new memantine analogues modified with amino acids, at different pH corresponding to the human biological liquids and organs, was evaluated. Memantine is an uncompetitive *N*-methyl-*D*-aspartate receptor antagonist with low to moderate affinity. In addition, it is the first representative of a novel class of Alzheimer's disease (AD) medications acting on the glutamatergic system by blocking *N*-methyl-*D*-aspartate receptors. Generally, prodrugs are compounds aiming to improve stability of active fragment and to facilitate transportation across the cell membranes or lipid barriers. The investigated series of prodrugs include modified memantine with the following amino acids: alanine, β -alanine, glycine, phenylalanine, and valine. Hydrolytic stability was determined at two different pH values - 2.0 and 7.4 at 37°C, similar to those in the human stomach and blood plasma. Specially developed UV-VIS spectrophotometric method for quantification of the concentrations of unchanged compounds was applied in the kinetic studies. Val-MEM is the most stable in neutral medium and at 37°C compound with $t_{1/2} = 50.2\text{ h}$. The compound Phe-MEM has also very good hydrolytic stability with $t_{1/2} = 29.6\text{ h}$. The order of other compounds is: Val-MEM \gg Phe-MEM \gg Ala-MEM \approx Gly-MEM $>$ β -Ala-MEM. Ala-MEM and Gly-MEM are the most stable compounds at acid condition with almost identical values for $t_{1/2} = 17.8\text{ h}$ and $t_{1/2} = 16.3\text{ h}$, respectively. The stability of tested compounds in acid conditions are relatively less than in neutral one. They are ordered as follows: Ala-MEM \approx Gly-MEM $>$ Val-MEM \approx Phe-MEM \approx β -Ala-MEM. All compounds have relatively good hydrolytic stability of more than 10h at both neutral and acid conditions, which is quite enough in order to pass in the blood circulation and to be used as a potential antimicrobial agent.

6. Synthetic analogues of memantine as neuroprotective and influenza viral inhibitors: *In vitro* and physicochemical studies.

Tencheva, A., Liu, R., Volkova, T. V., **Chayrov, R.**, Mitrev, Y., Štícha, M., Li, Y., Jiang, H., Li, Z., Stankova, I., & Perlovich, G. L. (2020).

Amino Acids, 52, 1559-1580. <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02914-4>

Резюме: Лекарствени съединения включващи мемантинов фрагмент са важна група от биологично активни вещества за различни патологични изменения, особено болестта на Алцхаймер. В настоящото изследване са синтезирани серия от мемантинови производни, включващи аминокиселинни остатъци. Изследвани са *in vitro* и техните невропротективни свойства по отношение на болестта на Алцхаймер. Изследването включва ефектите върху резистентността към А β токсичност, ексцитотоксичност, оксидативен стрес, хипоксия и невровъзпаление. Цитотоксичността на съединенията се открива чрез CPE анализ. TC₅₀ и IC₅₀ се определят с помощта на метода на Reed и Muench. Разтворимостта и разпределението се определят с помощта на класически метод с разклащане на колбите. Пропускливостта на съединенията е изследвана с помощта на дифузионна клетка на Franz и Permeapad™ бариера. Съединенията показват недвусмислено мулти-невропротективни ефекти при предизвикана от медни йони А β токсичност, глутамат-индуцирана ексцитотоксичност, оксидативни и хипоксични увреждания. Те също така показваха способността да инхибират породеното при възпаления освобождаване на цитокини от активираната микроглия и потенциални антиневроинфламаторни ефекти. Най-обещаващи съединения са Phe(4-F)-мемантин и Tyr-мемантин. Те демонстрират еквивалентни функционални биоактивности в сравнение с положителната контрола мемантин хидрохлорид. Разтворимостта им в киселинен (съдържащ HCl) буфер е по-голяма отколкото във фосфатен буфер. Коефициентите на разпределение показват оптималната липофилност за съединенията. Представените резултати предлагат нов клас мемантинови производни като потенциални лекарствени съединения. Въз основа на експерименталните резултати са получени корелациите между биологичните, физикохимичните параметри и структурните дескриптори. Корелационните уравнения са предложени за евентуално бъдещо предсказване на свойствата на нови мемантинови производни при налична единствено само структурна формула.

Abstract: Drug compounds including memantine moieties are an important group of biologically active agents for different pathologies, including the Alzheimer's disease. In the present study, a series of memantine derivatives incorporating amino acid residues have been synthesized and their neuroprotective *in vitro* evaluation in respect of the Alzheimer's disease, involving the effects on the resistance to A β toxicity, excitotoxicity, oxidative stress, hypoxia, and neuroinflammation has been studied. The cytotoxicities of the compounds were detected by CPE assay. TC₅₀ and IC₅₀ were determined using Reed and Muench method. Solubility and distribution were measured using a shake-flask method. Permeability of the compounds was studied using Franz diffusion cell and Permeapad™ barrier. These compounds displayed apparent multi-neuroprotective effects against copper-triggered A β toxicity, glutamate-induced excitotoxicity, and oxidative and hypoxic injuries. They also showed the ability to inhibit the inflammatory cytokine release from the activated microglia and potential anti-neuroinflammatory effects. Especially, two most promising compounds Phe(4-F)-memantine and Tyr-memantine demonstrated the equivalent functional bioactivities in comparison with the positive control memantine

hydrochloride. Higher solubility in muriatic buffer than in phosphate buffer was detected. The distribution coefficients showed the optimal lipophilicity for compounds. The presented results propose new class of memantine derivatives as potential drug compounds. Based on the experimental results, the correlations have been obtained between the biological, physicochemical parameters and structural descriptors. The correlation equations have been proposed to predict the properties of new memantine derivatives knowing only the structural formula.

7. Newly synthesized amantadine derivative: safety and neuropharmacological activity. Stankova, I., Lazarova, M., Chayrov, R., Popatanasov, A., Tancheva, L., & Kalfin, R. E. N. I. (2021).

Farmacia, 69(6), 1112-1119. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2021.6.14>

Резюме: Клиничната употреба на амантадин (АМТ, Am) е ограничена поради проблеми с безопасността, поносимостта и продължителността на неговата антидискинетична ефикасност. Следователно, целта на това проучване е да се синтезират нови аналози на амантадин като потенциални антипаркинсонови средства: фенилаланил-амантадин (1), (4-F)-фенилаланил-амантадин (2) и тирозинил-амантадин (Тур-Ам) (3). Тур-Ам показаха най-добри токсикологични характеристики при мъжки ICR мишки: най-ниска остра токсичност (LD₅₀ 320 mg/kg телесно тегло - т.т., интраперитонеално - i.p.); ED₅₀ = 16 mg/kg т.т., i.p.; терапевтичен индекс = 20; NOEL 5 mg/kg т.т. и праг на остро действие под 8 mg/kg т.т., i.p. В единична ефективна доза (16 mg/kg т.т., i.p.) Тур-Ам удължава хексобарбиталната наркоза вероятно поради взаимодействието си с хексобарбитал на метаболитно ниво. Той подобрява значително нервнo-мускулната работа при мишки. Освен това Тур-Ам подобрява пространствената памет, както и процесите на учене и запаметяване в сравнение с контролите след еднократно или многократно (6 дни) третиране на гризачи. Ефектът на Тур-Ам е по-добър от този на референтния амантадин. В заключение – новосинтезираното производно на амантадин Тур-Ам има добра невробиологична активност сравнима с тази на амантадин и заслужава допълнителни изследвания като потенциален антипаркинсонов агент.

Abstract: The clinical use of amantadine (AMT, Am) is limited because of safety, tolerability issues, and duration of its anti-dyskinetic efficacy. Hence, the aim of this study was to synthesize new amantadine analogues as potential antiparkinsonian agents: phenylalanyl-amantadine (1), (4-F)-phenylalanyl-amantadine (2) and tyrosinyl-amantadine (Tyr-Am) (3). Tyr-Am showed the best toxicological characteristics in male ICR mice: the lowest acute toxicity (LD₅₀ 320 mg/kg bw intraperitoneally, i.p.); ED₅₀ = 16 mg/kg bw, i.p.; therapeutic index = 20; NOEL 5 mg/kg bw and threshold of acute action under 8 mg/kg bw, i.p. In single effective dose (16 mg/kg bw, i.p.), Tyr-Am prolonged the hexobarbital narcosis probably due to its interaction with hexobarbital on the metabolic level. It improved significantly the neuromuscular performance in mice. Moreover Tyr-Am improved spatial memory as well as the learning and memory processes in compare to controls both after single or multiple (6 days) treatment of rodents. The effect of Tyr-Am was better than those of the referent amantadine. In conclusion the newly synthesized amantadine derivative Tyr-Am has a good neurobiological activity comparable with those of amantadine and deserves further investigations as potential antiparkinsonian agent.

8. Quantitative structure-activity relationship modelling of influenza M2 ion channels inhibitors.

Stankova, I. G., **Chayrov, R. L.**, Schmidtke, M., Danalev, D. L., Ognichenko, L. N., Artemenko, A. G., Shapkin, V. A., & Kuz'min, V. E. (2021).

Journal of the Serbian Chemical Society, 86(7-8), 625-637.
<https://doi.org/10.2298/JSC200509036S>

Резюме: Серия адамантанови производни (римантадин и амантадин) включващи аминокиселинни остатъци, са изследвани чрез подхода на симплексно представяне на молекулярната структура (SiRMS). Целта е да се намери корелация между химичните структури на изследваните съединения и получените данни за противовирусна активност и цитотоксичност. Получените данни от QSAR анализ показват, че адамантановите производни, съдържащи аминокиселини с къси алифатни неполярни остатъци в страничната верига ще имат добра противовирусна активност (срещу тествания вирус A/H3N2, щам Hong Kong/68) и ниска цитотоксичност. Експериментите с QSAR и *in vitro* данните показват добра корелация и разкриват, че модифицираните адамантинови производни, включително гуанидирана в страничната верига аминокиселина и β -аминокиселини като заместители показват ниска или никаква активност.

Abstract: A series of adamantane derivatives (rimantadine and amantadine) incorporating amino acid residues are investigated by simplex representation of molecular structure (SiRMS) approach in order to found correlation between chemical structures of investigated compounds and obtained data for antiviral activity and cytotoxicity. The obtained data from QSAR analysis show that adamantane derivatives containing amino acids with short aliphatic non-polar residues in the lateral chain will have good antiviral activity against the tested virus A/H3N2, strain Hong Kong/68 with low cytotoxicity. QSAR experiments and *in vitro* data also show good correlation and reveal that modified adamantane derivatives including guanidated in the lateral chain amino acid and β -amino acids as substituents show low to none activity.

9. Tyrosinyl-amantadine: a new amantadine derivative with an ameliorative effect in a 6-OHDA experimental model of Parkinson's disease in rats.

Lazarova, M., Tancheva, L., **Chayrov, R.**, Tzvetanova, E., Alexandrova, A., Popatanasov, A., Uzunova, D., Stefanova, M., Stankova, I., & Kalfin, R. (2022).

Journal of Molecular Neuroscience, 72(4), 900-909. <https://doi.org/10.1007/s12031-021-01964-x>

Резюме: Беше оценен невропротективният капацитет на новосинтезираното производно на амантадин – тирозинил-амантадин (Тур-Ам), с очаквани антипаркинсонови свойства в модел на болест на Паркинсон с 6-хидроксидопамин (6-OHDA). Мъжки плъхове Wistar бяха разделени на следните групи: фиктивно оперирани (SO), контролна група с 6-OHDA-лезии в стриатума, плъхове с 6-OHDA-лезии предварително третирани в продължение на 6 дни с Тур-Ам (16 mg/kg, приложени интраперитонеално, i.p.) и 6-OHDA-лезиониращи плъхове, третирани предварително в продължение на 6 дни с амантадин (40 mg/kg i.p.), използван като референт. На първата, втората и третата седмица след появяване на лезиите, животните бяха подложени на някои поведенчески тестове (индуцирана от апоморфин ротация, ротарод тест и тест за пасивно избягване). Активността на ацетилхолинестеразата (AChE) и ключовите параметри на оксидативния стрес,

включително нивата на липидна пероксидация (LPO) и супероксид дисмутаза (SOD), бяха измерени в мозъчни хомогенати. Резултатите показват, че невропротективният ефект на Tyr-Am е сравним с този на амантадин, подобрявайки нервно-мускулната координация, ученето и паметта дори при 2,5 пъти по-ниска доза. Tyr-Am демонстрира значителни антиоксидантни свойства чрез понижени нива на LPO, но няма ефект върху активността на AChE. Можем да заключим, че новосинтезираното производно на амантадин Tyr-Am демонстрира значителна антипаркинсонова активност в експериментален модел с 6-OHDA.

Abstract: The neuroprotective capacity of newly synthesized amantadine derivative tyrosinyl-amantadine (Tyr-Am) with expected antiparkinsonian properties was evaluated in a 6-hydroxydopamine (6-OHDA) model of Parkinson's disease. Male Wistar rats were divided into the following groups: sham-operated (SO), striatal 6-OHDA-lesioned control group, 6-OHDA-lesioned rats pretreated for 6 days with Tyr-Am (16 mg/kg administered intraperitoneally, i.p.), and 6-OHDA-lesioned rats pretreated for 6 days with amantadine (40 mg/kg i.p.), used as a referent. On the first, second and third week post-lesion, the animals were subjected to some behavioral tests (apomorphine-induced rotation, rotarod, and passive avoidance test). The acetylcholinesterase (AChE) activity and key oxidative stress parameters including lipid peroxidation levels (LPO) and superoxide dismutase (SOD) were measured in brain homogenates. The results showed that the neuroprotective effect of Tyr-Am was comparable to that of amantadine, improving neuromuscular coordination and learning and memory performance even at a 2.5-fold lower dose. Tyr-Am demonstrated significant antioxidant properties via decreased LPO levels but had no effect on AChE activity. We can conclude that the newly synthesized amantadine derivative Tyr-Am demonstrated significant antiparkinsonian activity in a 6-OHDA experimental model.

10. Guanidinoadamantanes – Design, Synthesis and Biological Activity.

Chayrov, R., Chuchkov, K., Tencheva, A., Galabov, A., Yurukov, B., & Stankova, I. (2022).

Journal of Chemical Technology and Metallurgy, 57(4), 718-722.
https://journal.uctm.edu/node/j2022-4/8_22-54_br4_2022_pp718-722.pdf

Резюме: Грипният вирус е един от най-често мутиращите през годините. Повече от 30 години адамантанови производни се използват успешно за профилактика и лечение на грипния вирус тип А. За съжаление поради вирусни мутации ефектът на много лекарства се губи или драстично намалява. В настоящата работа докладваме за направена модификация в аминокислотната група на две противогрипни лекарства амантадин и римантадин. Трансформацията на аминокислотната група в гуанидинова група е възможен подход за преодоляване на резистентността на вирусите. Тази модификация се осъществява с помощта на 1Н-пиразол-1-карбоксамидин. Новополучените гуанидиноадаманти са тествани за тяхната противовирусна активност срещу щам на грипния вирус А/Aichi/H3N2. Определени са цитотоксичността CC_{50} и концентрациите на инхибиране IC_{50} . Изчислен е селективният индекс. Получените данни показват, че и двете модифицирани съединения имат сравнително висока противовирусна активност, която е по-добра при гуанидиноримантадина със селективен индекс 3396.

Abstract: Influenza virus is one of the most mutant viruses during the years. Since more than 30 years adamantane derivatives are successfully used for prevention and treatment of

influenza virus type A. Unfortunately, due to virus mutations the effect of many medical drugs is lost or drastically diminished. Herein, we report our study where a specific modification in the amino group of two anti-influenza medical drugs amantadine and rimantadine was done. The transformation of amino to guanidine group is a possible approach to overcome the resistance of virus. This modification was realized by means of 1H-pyrazole-1-carboxamide. The newly obtained guanidinoadamantanes were tested for their antiviral activity against influenza virus strain A/Aichi/H3N2. The cytotoxicity expressed as CC₅₀ and inhibition concentrations IC₅₀ were determined and the selective index was calculated. The obtained data revealed that both modified compounds have high antiviral activity, which is better in the guanidinorimantadine with a selective index 3396.

11. Hydrolytic Stability of New Amantadine Analogues Including Aromatic Amino Acids.

Chayrov, R., Yurukov, B., & Stankova, I. (2022).

Journal of Chemical Technology and Metallurgy, 57(6), 1094-1098.
https://journal.uctm.edu/node/j2022-6/2_22-91_JCTM_57_6_pp1094-1098.pdf

Резюме: Амантадинът е блокер на M2 протонния канал и се използва за лечение на грипен вирус тип А. Той е утвърдено лекарство за симптоматично лечение при болест на Паркинсон. Създаването на предлекарства има за цел да увеличи стабилността и да подобри транспорта през клетъчните мембрани или през липидните бариери на вече установени лекарства. В наше предишно изследване *in vivo* открихме, че производното на амантадин с аминокиселината тирозин има значителен ефект срещу болестта на Паркинсон при модел с мишки. Някои лекарства са нестабилни в човешкия организъм, особено в стомаха и човешката кръвна плазма поради вариациите на рН. Целта на работата ни е да се изследваме стабилността на серия от нови аналози на амантадин, съдържащи ароматните аминокиселини фенилаланин, (4-F)-фенилаланин и тирозин, при две различни стойности на рН – 2.0 и 7.4, при 37°C. Условието са подобни на тези в човешкия организъм. За да изпълним целта беше разработен HPLC метод за количествено определяне на концентрацията на непроменено съединение. Фенилаланил-амантадин (1) проявява най-висока химична стабилност при рН 2,0 и рН 7,4, в сравнение с другите изследвани съединения. Останалите тествани съединения (4-F)-фенилаланил-амантадин (2) и тирозинил-амантадин (3) показват задоволителна химическа стабилност и при двете изследвани стойности на рН. Също така можем да направим заключение, че при неутрално рН наличието на електронодонорната група (-OH) при тирозина води до по-ниска хидролитична стабилност за разлика от електроноакцепторния заместител (-F) при (4-F)-фенилаланина.

Abstract: Amantadine is a M2 proton channel blocker that was used to treat influenza virus A. It is a medication that is useful for treatment of some symptoms of Parkinson's disease as well. The creation of prodrugs aims to increase stability and improve transport across cell membranes, or through lipid barriers of already established drugs. In our previous investigation *in vivo* we discover that amantadine derivative with the amino acid tyrosine has significant effect against Parkinson disease in mice model. Some medicinal drugs are unstable in the human organism, especially stomach and human plasma due to the various pH. Aim of the work was to study the stability of series of new amantadine analogues containing aromatic amino acids phenylalanine, (4-F)-phenylalanine and tyrosine at two different pH 2.0 and 7.4 at 37°C similar to those in human organism. In

order to complete the aim of our work HPLC method was developed for quantification of the unchanged compound concentration. Phenylalanyl-amantadine (**1**) exhibit the highest chemical stability at pH 2.0 and pH 7.4, compared to the other examined compounds. The rest of tested compounds (4-F)-phenylalanyl-amantadine (**2**) and tyrosinyl-amantadine (**3**) exhibit satisfying chemical stability at both studied pH. But also can conclude that at neutral pH electron donor group (-OH) leads to lower hydrolytic stability than electron attracting (-F) group.

12. Development of N, N-Dimethylglycine-Amantadine for Adjunctive Dopaminergic Application: Synthesis, Structure and Biological Activity.

Chayrov, R., Kalfin, R., Lazarova, M., Tancheva, L., Sbirikova-Dimitrova, H., Shivachev, B., & Stankova, I. (2022).

Crystals, 12(9), 1227. <https://doi.org/10.3390/cryst12091227>

Резюме: Рецепторното блокиране на *N*-метил-D-аспартата (NMDA) може да подобри предизвиканите от L-DOPA (1-3,4-дихидроксифенилаланин) дискинезии при пациенти с болестта на Паркинсон (PD). Амантадин е добре поносимо и ефективно антипаркинсоново средство, за което наскоро беше установено, че притежава NMDA антагонистични свойства. Оксидативното увреждане може да допринесе за допаминергична (DAergic) невродегенерация в *substantia nigra* при пациенти с PD. *N,N*-диметилглицин (DMG) (известен също като витамин B15 или пангамова киселина) действа като антиоксидант и удължава живота на животинските клетки предпазвайки ги от окисление. В това проучване ние синтезирахме и тествахме *in vivo* новополученото съединение *N,N*-диметилглицин-амантадин (DMG-Am) за антипаркинсонова активност. МРТР (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрахидропиридин) е широко използван невротоксин за индуциране на експериментален модел, който се създават симптоми подобни на тези при болест на Паркинсон. Беше оценен невропротективния капацитет на новото производно на амантадина – DMG-Am, като наблюдавахме подобрението на нервно-мускулната координация и промените в поведението, първоначално влошени от невротоксина. Нашите експериментални резултати показаха, че DMG-Am прилаган в продължение на 12 последователни дни (5 дни едновременно и 7 дни след МРТР) възстановява двигателната функция и паметта на животните до контролното ниво. Това е недвусмислена индикация за благоприятен защитен ефект, оказан от новополученото вещество. В обобщение, нашите резултати разкриват потенциала на DMG-Am като обещаващ антипаркинсонов агент.

Abstract: *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor blockade can improve L-DOPA (1-3,4-dihydroxyphenylalanine)-induced dyskinesias in Parkinson's disease (PD) patients. Amantadine is a well-tolerated and effective antiparkinsonian agent, recently found to possess NMDA antagonistic properties. Oxidative damage may contribute to dopaminergic (DAergic) neurodegeneration in the *substantia nigra* of patients with PD. *N,N*-dimethylglycine (DMG) (also known as vitamin B15 or pangamic acid) acts as an antioxidant, extending the lifespan of animal cells through protection from oxidation. In this study, we synthesized and tested *in vivo* the newly obtained compound *N,N*-dimethylglycine-amantadine (DMG-Am) for antiparkinsonian activity. MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) is a widely used neurotoxin to induce an experimental model which mimics Parkinson disease-like symptoms. The neuroprotective capacity of the new amantadine derivative DMG-Am was evaluated by its potential to ameliorate the

neuromuscular coordination and behavioral changes worsened by the toxin. Our experimental results showed that DMG-Am applied for 12 consecutive days, 5 days simultaneously and 7 days after MPTP, restored motor and memory performance of the animals to the control level, indication of beneficial protective effect of this compound. In summary, our results reveal the potential of newly synthesized DMG-Am as promising antiparkinsonian agent.

13. Synthesis, Neuroprotective Effect and Physicochemical Studies of Novel Peptide and Nootropic Analogues of Alzheimer Disease Drug.

Chayrov, R., Volkova, T., Perlovich, G., Zeng, L., Li, Z., Šticha, M., Liu, R., & Stankova, I. (2022).

Pharmaceuticals, 15(9), 1108. <https://doi.org/10.3390/ph15091108>

Резюме: Глутаматът е възбуждащ невротрансмитер в нервната система. Прекомерното освобождаване на глутамат може да доведе до повишена експресия на калциеви йони, която е свързана с повишена невротоксичност. Мемантин се използва при лечение на пациенти с болестта на Алцхаймер (AD). Той притежава защитното действие върху невроните срещу токсичността породена от прекомерното активиране на *N*-метил-D-аспартатните рецептори. Ноотропиците, наричани още „умни лекарства“, се използват за лечение на когнитивни дефицити. В тази работа ние оценяваме невропротективното действие на четири мемантинови аналога с производни на глицин, а именно с глицил-глицин, глицил-глицил-глицин, саркозин, диметилглицин и три конюгата с ноотропиците – модафинил, пирацетам и пикамилон. Новите структурни мемантинови производни подобряват клетъчната жизнеспособност срещу Cu^{2+} -индуцирана невротоксичност в APP_{Swe} клетки и глутамат-индуцирана невротоксичност в SH-SY5Y клетки. Сред тези нови съединения – модафинил-мемантин, пирацетам-мемантин, саркозин-мемантин, диметилглицин-мемантин и глицил-глицин-мемантин показаха добри EC_{50} стойности на защитни ефекти върху APP_{Swe} клетките, придружени с умерено подобрение на глутамат-индуцираната невротоксичност. В заключение нашето проучване показва, че новите структурни производни на мемантин вероятно имат потенциала да се разработят като обещаващи съединения за лечение на AD. Определена е разтворимостта на аналозите на мемантина с ноотропиците и аналозите на мемантина с производните на глицин в буферни разтвори при pH 2,0 и pH 7,4, при 298,15 K – условия симулиращи биологичната среда. Анализирани са взаимното влияние на структурните фрагменти в молекулите върху поведението на разтворимостта. Изведени са значимите корелационни уравнения, свързващи разтворимостта и биологичните свойства със структурните НУВОТ (термодинамика на водородната връзка) дескриптори. Тези уравнения биха опростили значително задачата за насочен дизайн на аналози на мемантина с подобрена разтворимост и повишена бионаличност.

Abstract: Glutamate is an excitatory neurotransmitter in the nervous system. Excessive glutamate transmission can lead to increased calcium ion expression, related to increased neurotoxicity. Memantine is used for treating patients with Alzheimer's disease (AD) due to its protective action on the neurons against toxicity caused by over activation of *N*-methyl-D-aspartate receptors. Nootropics, also called “smart drugs”, are used for the treatment of cognitive deficits. In this work, we evaluate the neuroprotective action of four memantine analogues of glycine derivatives, including glycyglycine, glycyglycyl-

glycine, sarcosine, dimethylglycine and three conjugates with nootropics, modafinil, piracetam and picamilon. The new structural memantine derivatives improved cell viability against copper-induced neurotoxicity in APP_{swe} cells and glutamate-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. Among these novel compounds, modafinil-memantine, piracetam-memantine, sarcosine-memantine, dimethylglycine-memantine, and glycyl-glycine-memantine were demonstrated with good EC₅₀ values of the protective effects on APP_{swe} cells, accompanied with moderate amelioration from glutamate-induced neurotoxicity. In conclusion, our study demonstrated that novel structural derivatives of memantine might have the potential to develop promising lead compounds for the treatment of AD. The solubility of memantine analogues with nootropics and memantine analogues with glycine derivatives in buffer solutions at pH 2.0 and pH 7.4 simulating the biological media at 298.15 K was determined and the mutual influence of the structural fragments in the molecules on the solubility behavior was analyzed. The significative correlation equations relating the solubility and biological properties with the structural HYBOT (Hydrogen Bond Thermodynamics) descriptors were derived. These equations would greatly simplify the task of the directed design of the memantine analogues with improved solubility and enhanced bioavailability.