



***Югозападен университет „Неофит Рилски“***

***Природо-математически факултет***

***Катедра „Химия“***

---

**Радослав Людмилов Чайров**

**„Синтез и анализ чрез HPLC на аналози на  
противовирусни препарати“**

## **АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертация за присъждане на образователната и научна

степен „ДОКТОР“

Научна специалност „Органична химия“

Научен ръководител: доц. д-р Иванка Станкова

Научен консултант: доц. д-р инж. Данчо Даналев

**Благоевград, 2017**

Дисертационният труд е написан на 141 стр. формат А4. Съдържа 7 таблици, 24 схеми и 35 фигури. Номерацията им в автореферата съответства на тази в дисертацията. Цитирани са 199 литературни източника.

Дисертационният труд е изработен в катедра „Химия” към Природо-математически факултет на ЮЗУ „Неофит Рилски”, Благоевград.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 26.10.2017г. в катедра „Химия” към Природо-математически факултет на ЮЗУ „Неофит Рилски”, Учебен корпус № 2, Благоевград, ул. „Тодор Александров” No 56, ет.3, зала 301.

## Използвани съкращения

За съкратеното означаване на аминокиселините е приложена номенклатурата на IUPAC (Eur. J. Biochem., 1984).

### Най-често използвани съкращения на английски език

AZT – Азидотимидин

BOC – Трет - бутилоксикарбонил

BOP-Cl – Бис (2-оксо-3-оксазолидинил) фосфорил хлорид

BuOH – Бутанол

CDCl<sub>3</sub> – Деутериран хлороформ

COMT – Катехол-орто-метил-трансфераза

CC<sub>50</sub> – Цитотоксична концентрация

DANA (Neu5Ac2en) – 2-деокси-2,3-дехидро-N-ацил невраминова киселина

DCC – N, N'-дициклохексилкарбамид

DCM – Дихлорометан

DMAP – 4-N,N-диметиламинопиридин

DMSO – Диметилсулфоксид

DMSO-d<sub>6</sub> – Деутериран диметилсулфоксид

DPPH – 2,2-дифенил-1-пирил-хидразил-хидрат

ED – Ефективна доза

EDTA – Етилендиаминтетраоцетна киселина

EPFR – Устойчиви в околната среда свободни радикали

ESI-MS – Мас-спектрометрия с електроспрей йонизация

EtOAc – Етилацетат

Et<sub>2</sub>O – Диетилов етер

HA – Хемаглутинин

HIV – Човешки имунодефицитен вирус

HNTC – Най-висока нетоксична концентрация

HOBT – 1-хидроксибензотриазол

HPLC – Високоэффективна течна хроматография

IBCF – Изобутилхлороформиат  
IC<sub>50</sub> – Инхибираща концентрация  
L-DOPA – L-3,4-дихидроксифенилаланин  
LD – Летална доза  
Lim<sub>ac</sub> – Праг на острото действие  
MAO – Моноаминооксидаза  
MDCK – Madin–Darby клетъчни култури от кучешки бъбрек  
MeCN – Ацетонитрил  
MeOH – Метанол  
NA – Невраминидаза  
NAT – N-ацетилтрансфераза  
NMDA – N-метил-D-аспартат  
NMR – Ядрено магнитен резонанс  
NOEL – Ниво на липсващ ефект  
Prodrug – Предлекарство  
SSAT – Спермидин/спермин N-ацетилтрансфераза  
TBTU – 2-(1H-Бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметиламин тетрафлуороборат  
tBu – Трет - бутил  
TEA – Триетиламин  
TFA – Трифлуорооцетна киселина  
TI – Терапевтичен индекс  
TLC – Тънкослойна хроматография  
Z – Бензилоксикарбонил

### **Най-често използвани съкращения на български език**

АФК – Активни форми на кислорода

ДНК – Дезоксирибонуклеинова киселина

МС – Мас спектър

НБТ – Нитроблу тетразол

ПБ – Паркинсонова болест

РНК – Рибонуклеинова киселина

СЗО – Световна здравна организация

ТБК – Тиобарбитурова киселина

ХБ – Хексобарбитал

ЦНС – Централна нервна система

ЦПЕ – Цитопатичен ефект

ЯМР – Ядрено магнитен резонанс

## 1. УВОД

В областта на противовирусните лекарствени средства науката отбелязва значителен напредък. Въпреки добрите разработки и успехи съществуват множество вируси, които мутират и се приспособяват към прилаганите срещу тях препарати. В следствие на вирусните мутации голяма част от успешно прилаганите медикаменти стават ниско ефективни или изцяло губят своя ефект.

Сред проблемите на съвременните противовирусни лекарствени средства са ниската бионаличност, споменатата резистентност, висока токсичност и ниска селективност. Това са причините, които налагат да се търсят нови алтернативи на утвърдените в практиката медикаменти.

При създаването на нови препарати, основополагаща роля имат редица открития в областта на химията и биологията. С развитието на изчислителната химия, чрез предварителни математически изчисления и анализи може да бъде предвидено действието на някои нови лекарствени средства (QSAR подход).

Биологичната роля, данни за механизма на действие, специфичните ензими, отговорни за метаболизирането на определени вещества са ключови при определянето дизайна на конкретна химическа структура и последващото ѝ допълнителното модифициране, в зависимост от получените резултати за токсичност и евентуална активност.

Един от подходите за създаване на нови терапевтици е добавянето на позната за организма структура към активната молекула т. е. създаване на предлекарство (prodrug). В резултат на подобни модификации са получени предлекарства с многократно по-голяма бионаличност, като в някои случаи това е съпроводено и със значително повишаване на активността, както и с понижаване на токсичността.

За първи път терминът предлекарство (prodrug) [1] е използван от Алберт за химически модифицирана субстанция, която сама по себе си е лишена от фармакологична активност. Предлекарството претърпява ензимна хидролиза, след което се превръща в активния фармакологичен агент.

Основните подходи за получаване на нови лекарствени средства се развиват и усъвършенстват в две направления:

1. Химически модификации в структурата на вече познати и утвърдени препарати, с цел подобряване активността на изходното съединение, увеличаване бионаличността и понижаване на токсичността.

2. Създаване на напълно нови химични структури с нови биохимични механизми на действие.

В настоящата дисертация е приложен първият подход. Синтезирани са аминокиселинни производни на известни в практиката противовирусни препарати (римантадин и амантадин), описани са резултатите от биологичното им действие и е изследвана химичната стабилност при различно рН. Извършените изследвания дават възможност да се направят изводи за връзка структура/биологична активност.

## 2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящия дисертационният труд е синтезиране на производни на амантадин и римантадин с аминокиселини, изследване биологичната им активност, с оглед установяване на някои закономерности „**химичен строеж-биологична активност**“.

За постигане на тази цел си поставихме **следните задачи:**

1. Синтезиране на производни на амантадин с природните аминокиселини аланин, фенилаланин, валин, тирозин и неприродната аминокиселина – (4-F)-фенилаланин;
2. Синтезиране на производни на римантадин с природните аминокиселини – аланин, глицин, левцин, изолевцин, фенилаланин, валин,  $\beta$ -аланин и двата изомера на модифицираната аминокиселина – (4-F)-фенилаланин (R,S);
3. Гуанидиране аминогрупата на аминокиселинните остатъци на някои от новосинтезираните адамантанови производни;
4. Изследване *in vitro* противовирусната активност на производните на амантадин и римантадин спрямо грипни вируси A/H3N2, щам Hong Kong/68 и A/H3N2, щам Aichi;
5. Изследване антипаркинсонова активност на някои от производните на амантадин;
6. Изследване химичната стабилност посредством HPLC на някои от новополучените производни на амантадин, с оглед прилагането им като предлекарства.

## 3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 3. 1. Подходи при създаването на лекарствени средства

Литературният обзор показва, че някои структурни промени в молекулата на лекарствените средства, водят до промяна на тяхната биологична активност. Това ни насочи към модифициране на лекарствените препарати: амантадин и римантадин. Те са подходящи за лечението на инфекции, причинени от грипни вируси тип А, поради:

- високата селективност;
- ефективност в ниски концентрации;
- ниска токсичност с незначителни странични ефекти [175].

Известно е, че аминокиселините и късите пептиди, представляват естествени метаболити. Модифицирането на лекарствени средства с аминокиселини и пептиди се очаква да доведе до получаване на по-ниско токсични производни със запазено противовирусно действие. Това предизвика интереса ни към свързването на амантадин и римантадин с аминокиселини.

Един от подходите при създаването на съвременни лекарствени средства е т.нар. насочена синтеза. При нея се цели:

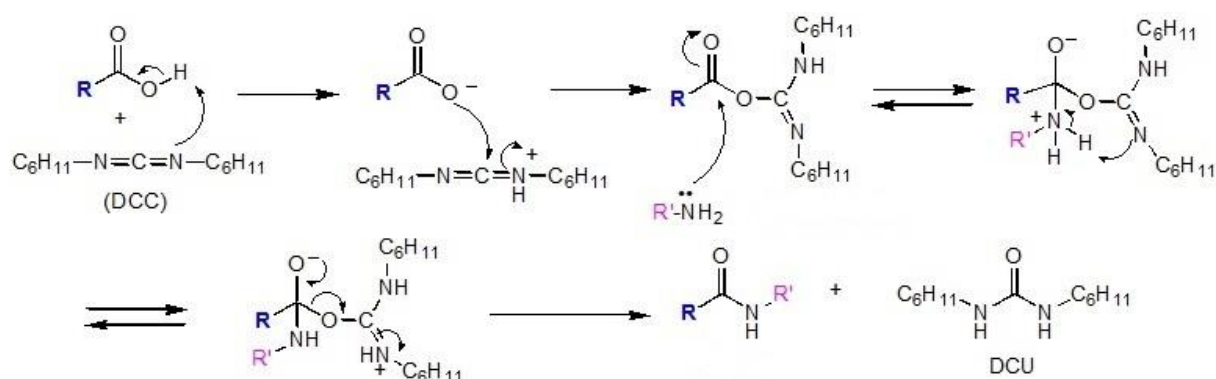
- възпроизвеждане на съединения, характерни или образуващи се в организма;
- синтез на структурни аналози на естествени метаболити с аналогично или противоположно (видоизменено) действие;
- химическо модифициране на молекули на съединения с известна биологична активност;
- синтез на съединения, придобиващи фармакологична активност след съответна биотрансформация в организма (предлекарства);
- създаване на ензимни активатори или инхибитори.

Ние модифицирахме в аминокиселинната група на двата противогрипни препарата – амантадин и римантадин с протеиногенни, и с модифицирани аминокиселини. Доказано е, че подобни модификации водят до увеличаване на биологичната активност и в някои случаи и на бионаличността - Val-ацикловир, Val-ганцикловир, 3'-азидо-2',3'-

дидезокситимидин, 3'-азидо-2',3'-дидезоксиуридин, 9-(2-хидроксиетокси-метил)-гуанин, абакавир. [176-177].

### 3. 2. Методи за органичен синтез

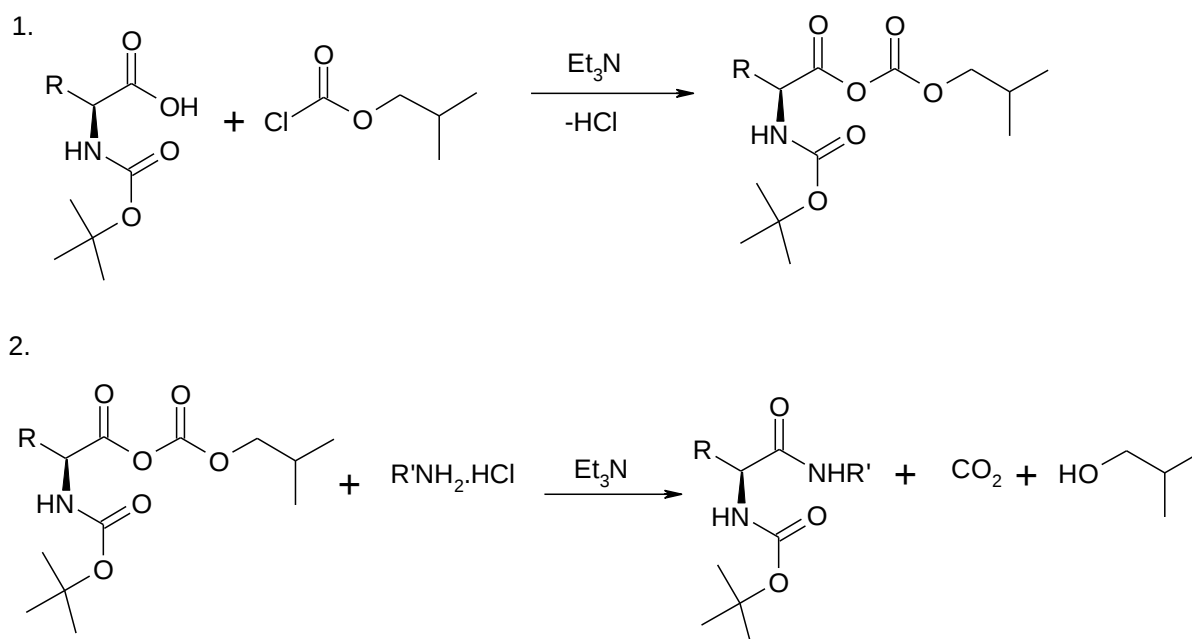
С цел да се увеличи разтворимостта на метронидазола (лекарствен препарат за лечение на определени анаеробни инфекции, но притежаващ ниска разтворимост) J. M. Cho и C. L. Haynes [178] синтезират глицил, аланил, валил, левцил, изолевцил, фенилаланил и лизил естери на метронидазола. Авторите използват Вос-защитени аминокиселини, а аминокиселинните естери на метронидазола получават по карбодиимидния метод (Схема 2) и по метода на смесените анхидриди (Схема 3) с добив 43% - 56%.



**Схема 2.** Механизъм на получаване на амидна връзка по карбодиимиден метод

M. S. Agrawal и сътр. [179] синтезират фенилаланил, тирозил, изолевцил, лизил и глутамилови естери на AZT, използвайки Вос-защитени аминокиселини, а за активиране на карбоксилната група използват карбодиимидния метод (DCC/HOBt). Аминокиселинните естери се получават с добив 48% - 65%.

E. De Clercq и сътр. [180] изследват за противовирусна активност 3'- и 5'-моноестери и 3', 5'- бис-естери на тимидина и уридина с R- и S-пенициламин и с R- и S-цистеин. Те използват Вос-защитени аминокиселини, а като метод за активиране използват карбодиимидния метод (DCC/HOBt), метода на смесените анхидриди (Схема 3) и също BOP-Cl като активиращ реагент. Авторите доказват, че получаването на естерите по метода на смесените анхидриди води до 100% рацемизация и добив на крайния продукт 36-43%, което се потвърди и при нашите изследвания.



**Схема 3.** Метод на смесените анхидриди с използване на изобутилхлороформиат

L. M. Beauchamp и сътр. синтезират редица аминокиселинни естери (глицил, R/S-аланил, N-метил-S-аланил, R/S- валил, R/S-норвалил, R/S-изолевцил, S-левцил, S-метионил, R/S-лизил, S-пролил, R/S-фенилаланил) на противоверпесния препарат ацикловир като потенциални предлекарства за орално приложение. Авторите получават естерите по карбодиимидния метод на два етапа. Първоначално защитават аминогрупата на използваните аминокиселини с N-Cbz или с Вос-група. В разтвор на ацикловир в DMF се прибавя защитената аминокиселина, свързващият реагент DCC и катализатор на реакцията - DMAP.

### 3. 3 Аналози на амантадин

Предходни биологични изследвания върху определени аминокиселинни производни ни дадоха основание да се спрем на аминокиселини, които вече са били използвани като заместители и са подобрили качествата на съответния новосинтезиран аналог (като валиловият естер на ацикловира, фенилаланиловият и изолевциловият естер на AZT).

Съществуват аминокиселини, които са необходими за репликацията на някои вируси (липсата на глутамин намалява репликацията на полиовируса, други аминокиселини, дадени в излишък потискат вирусната репликация) [181]. От друга страна, някои аминокиселини и трипептиди, съдържащи сулфхидрилна група, като S-

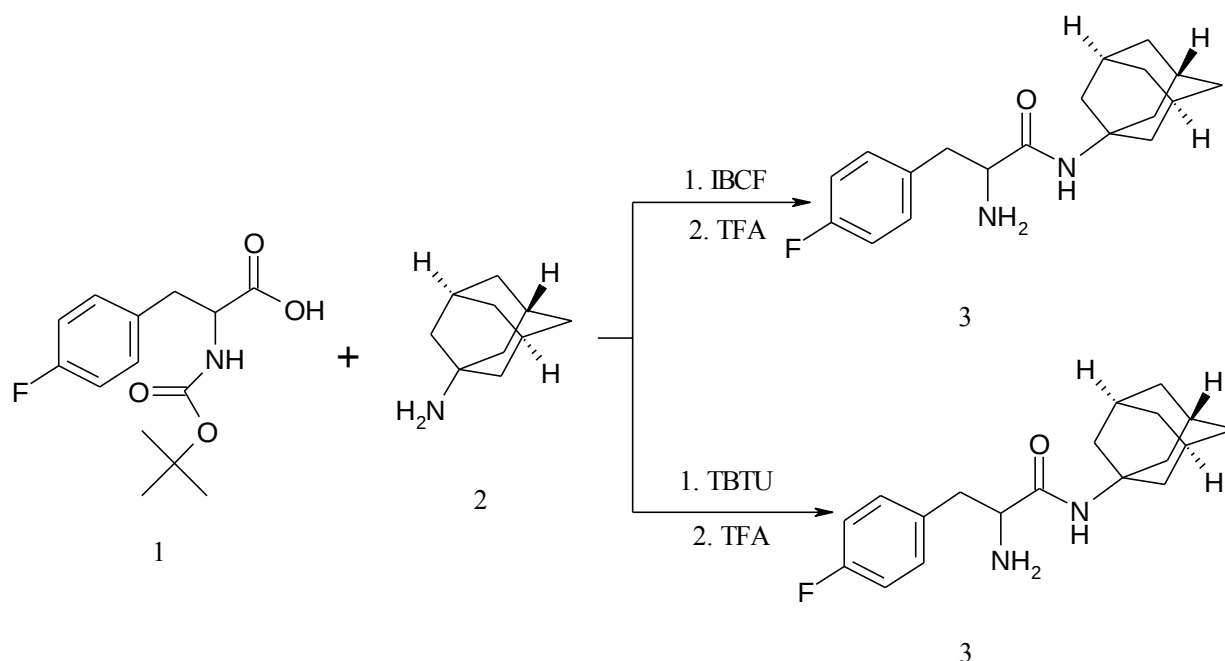
цистеин потискат репликацията на херпесните вируси *in vitro*. Противовирусна активност притежават и някои карбобензокси-пептиди. Например Z-Phe-Arg-OH въведен дори 24 часа след заразяването, потиска действието на вируса на грипа и на риновируса щам JH 2060.

### 3. 3. 1. Синтез на фенилаланил(4-F)-амандатин

Сред най-добре изучените аминокиселини проявяващи изразено противовирусно действие е (4-F)-фенилаланинът, който е най-мощният аналог-антагонист на фенилаланина [40].

Доказаната противовирусна активност на определени аминокиселини и техните производни ни даде основание да използваме Boc-Phe(4-F)-OH за модифициране на амантадина. Считаме, че с резултатите от биологичните изследвания ще се разширят познанията върху зависимостта структура-действие на новосинтезираните аналози.

Ацилирането на амантадина бе извършено в amino групата с Boc-защитената аминокиселина, първоначално по метода на смесените анхидриди с IBCF и с добив 58 %. В следствие, предвид високата рацемизация синтезата беше повторена с TBUTU при по-меки условия (**Схема 4**) и минимална рацемизация. Добивът остана приблизително същият - 55 %. Новополученото съединение беше тествано *in vitro* за противовирусна активност срещу грипен вирус A/H3N2, щам Hong Kong/68, *in vivo* за активност срещу болестта на Паркинсон, както и за антиоксидантна активност.

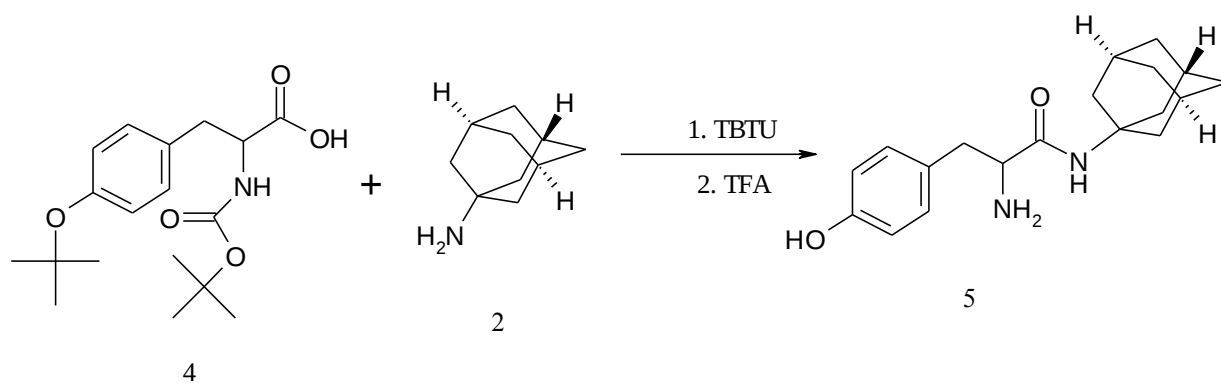


**Схема 4 . Синтез на фенилаланил(4-F)-амантадин**

### 3. 3. 2. Синтез на тирозинил-амантадин

Леводопа - прекурсор на невротрансмитера допамин е ключово съединение за лечението на ПБ [182 - 183]. Въпреки добрите резултати относно овладяването на симптомите по време на терапията с леводопа, лекарството има и редица недостатъци. Това налага търсенето на съединения, които могат да го заменят при лечението на невродегенеративното заболяване. Леводопа предлага известен брой възможности за синтезиране на производни, съдържащи биоразградима връзка, което открива път за разработване на предлекарства. Аминокиселината тирозин е естествен прекурсор на леводопа и предлага същите възможности за създаване на биоразградима връзка.

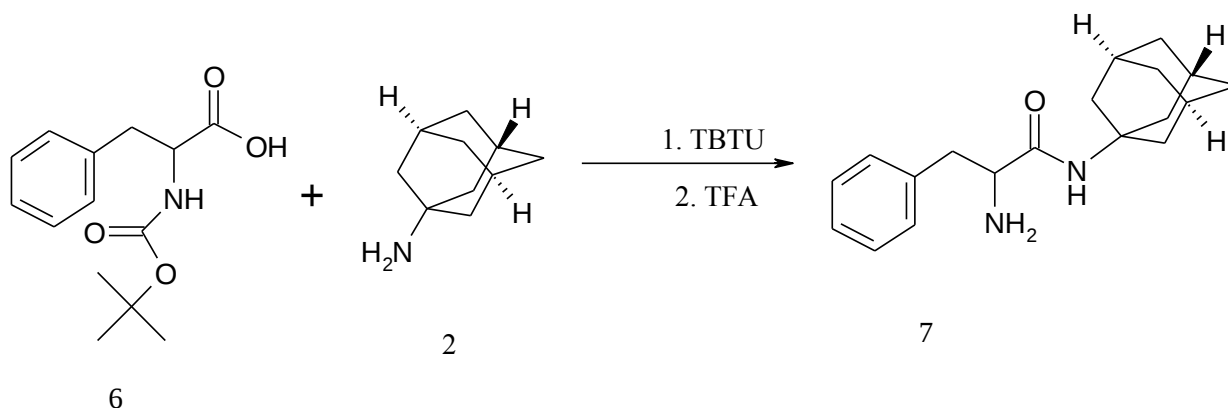
Тъй като амантадин има положителен ефект, основно при акинетичните кризи, особено в комбинация с леводопа и се предписва когато лечението само с нея не е достатъчно ефективно [135 - 136], ние синтезирахме амантадинов аналог с тирозин. Синтезата беше изпълнена по TBTU метод (**Схема 5**). Съединението беше получено с 59 % добив и беше тествано *in vitro* срещу грипен вирус A/H3N2, щам Hong Kong/68, *in vivo* за активност срещу болестта на Паркинсон, както и за антиоксидантна активност.



**Схема 5.** Синтез на тирозинил-амантадин

### 3. 3. 3. Синтез на фенилаланил-амандатин

Незаменимата аминокиселина фенилаланин, прекурсор на тирозин дава началото на редица биотрансформации, водещи до получаването на невротрансмитера допамин. Ние синтезирахме амантадиновите производни с фенилаланин по TBTU метода (**Схема 6**), с добив 44 %. Получените съединения бяха изследвани *in vitro* за противовирусно действие срещу грипен вирус A/H3N2, щам Hong Kong/68, *in vivo* за активност срещу болестта на Паркинсон и за антиоксидантна активност.

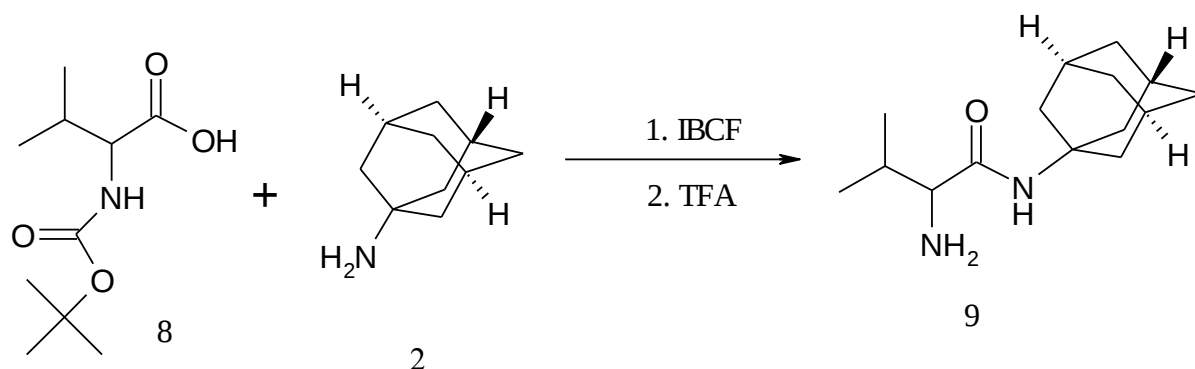


**Схема 6 .** Синтез на фенилаланил-амантадин

### 3. 3. 4. Синтез на валил-амантадин

За подобряване на оралната биодостъпност на ацикловира са правени редица опити като през 1992 г. Beauchamp L. M. и сътр. синтезират осемнадесет аминокиселинни естера на ацикловира. Сред тях S-валиловият естер се отличава като ефикасно предлекарство. Приеман орално той има 3-4 пъти по-висока бионаличност

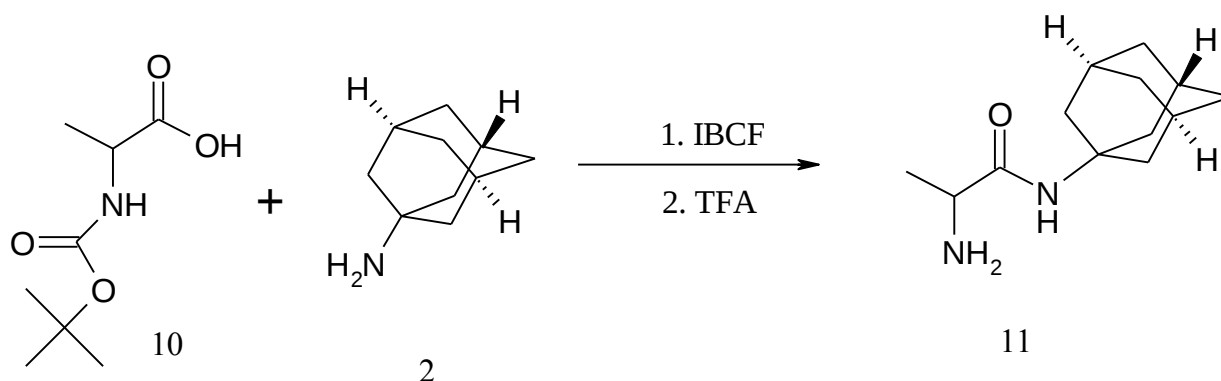
спрямо ацикловира. Стабилен е във водно-кисели разтвори, *in vivo* бързо се абсорбира в червата като в последствие метаболизира до ацикловир. Според изследванията валиновото производно не е токсично [184], което се потвърди и при новополучения амантадинов амид. Той беше синтезиран по метода на смесените анхидриди (**Схема 7**) с добив 36 %. Съединението беше изследвано за противовирусно действие срещу грипен вирус A/H3N2, щам Hong Kong/68.



**Схема 7.** Синтез на валил-амантадин

### 3. 3. 5. Синтез на аланил-амантадин

Попадайки в черния дроб аланинът лесно метаболизира до глюкоза. Процесът е обратим, известен е под името глюкозо-аланинов цикъл и представлява един от основните механизми за биохимичен синтез на глюкоза в организма. Позовавайки се и на изследване на Kim, Se-Но, и сътр. [185] ние свързахме аланин с амантадин (**Схема 8**). Той има по-ясно изразени хидрофилни свойства, спрямо гореописаните производни, което е важно за по-добрата бионаличност. Синтезата беше осъществена по метода на смесените анхидриди с добив - 56%. Новополученият аналог беше изследван за противовирусно действие срещу грипен вирус A/H3N2, щам Hong Kong/68.



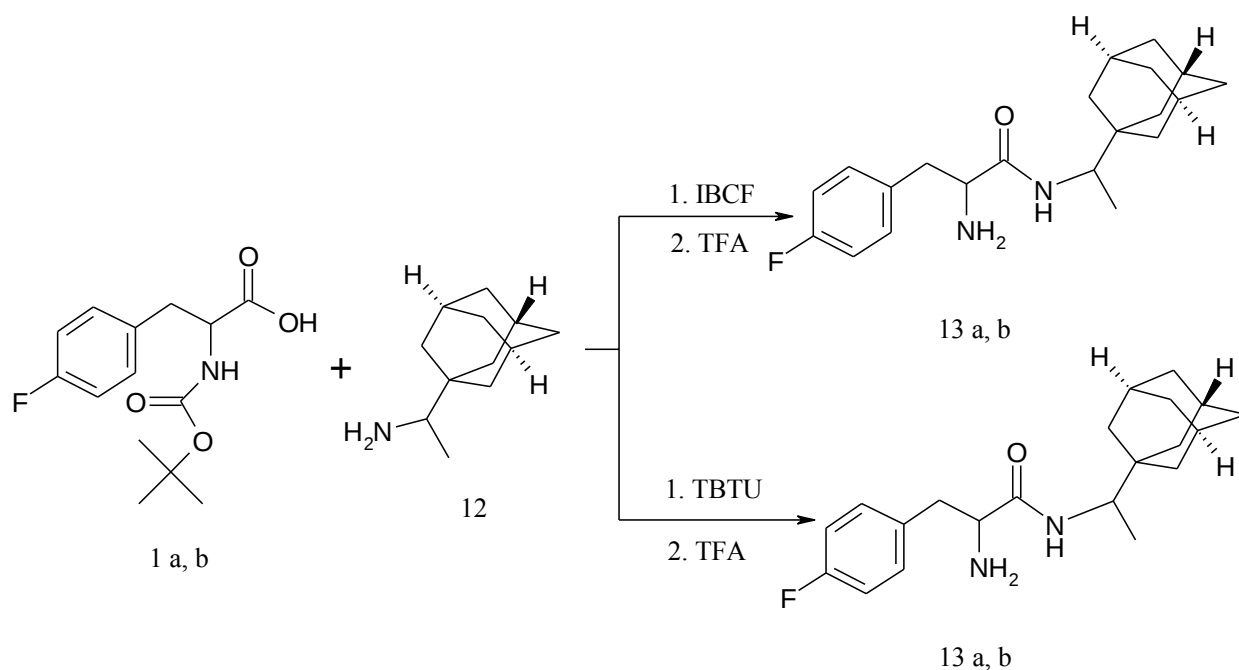
**Схема 8.** Синтез на аланил-амантадин

### 3. 4. Аналози на римантадин

Синтезираните римантадинови аналози са повече, тъй като направената литературна справка показва, че римантадинът е по-обещаващ противовирусен агент [186] в сравнение с амантадина, който преимуществено влияе върху невродегенеративни състояния. Римантадиновите производни, съдържащи фенилаланин, (4-F)-фенилаланин (R,S) и тирозин показаха по-голяма цитотоксичност от аналогичните съединения на амантадина, което обезсмисли по-нататъшни тестове, свързани с антипаркинсонова активност. Поради тази причина аналозите на римантадина са изследвани само за противовирусна активност.

#### 3. 4. 1. Синтез на (4-F)--фенилаланил-римантадин (R,S)

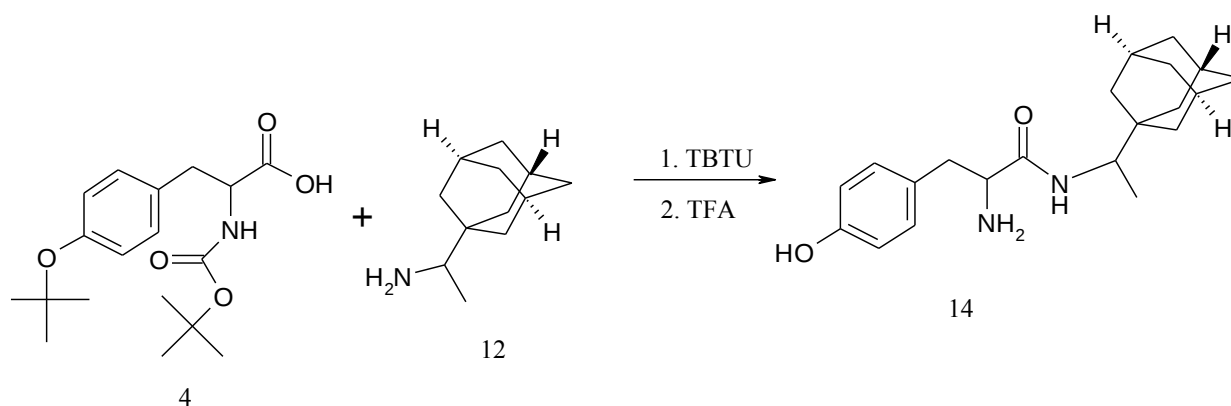
Синтезът на римантадиновите производни (**13 a, b**) с (4-F)-Phe-OH (R,S) беше извършен по аналогичен начин, както при амантадин с (4-F)-Phe-OH (**Схема 9**) - и по двата метода. Изолирахме (4-F)-фенилаланил-римантадин (R) с добив 61%, а (4-F)-фенилаланил-римантадин (S) – 67% по метода на смесените анхидриди. При синтезата чрез метода с TBUTU, добивите бяха съответно 54 % за (4-F)-фенилаланил-римантадин (R) и 59 % за (4-F)-фенилаланил-римантадин (S). Синтезата, посредством метода на смесените анхидриди приключи напълно за 1 час. Това беше установено чрез TLC, като се съдеше по изчерпването на римантадина в реакционната смес. Новополучените аналози на римантадина с (4-F)-Phe-OH (R/S) бяха тествани *in vitro* за противовирусна активност срещу грипни вируси A/H3N2, щам Hong Kong/68 и A/H3N2, щам Aichi.



**Схема 9.** Синтез на (4-F)-фенилаланил-римантадин (R/S)

### 3. 4. 2. Синтез на тирозинил-римантадин

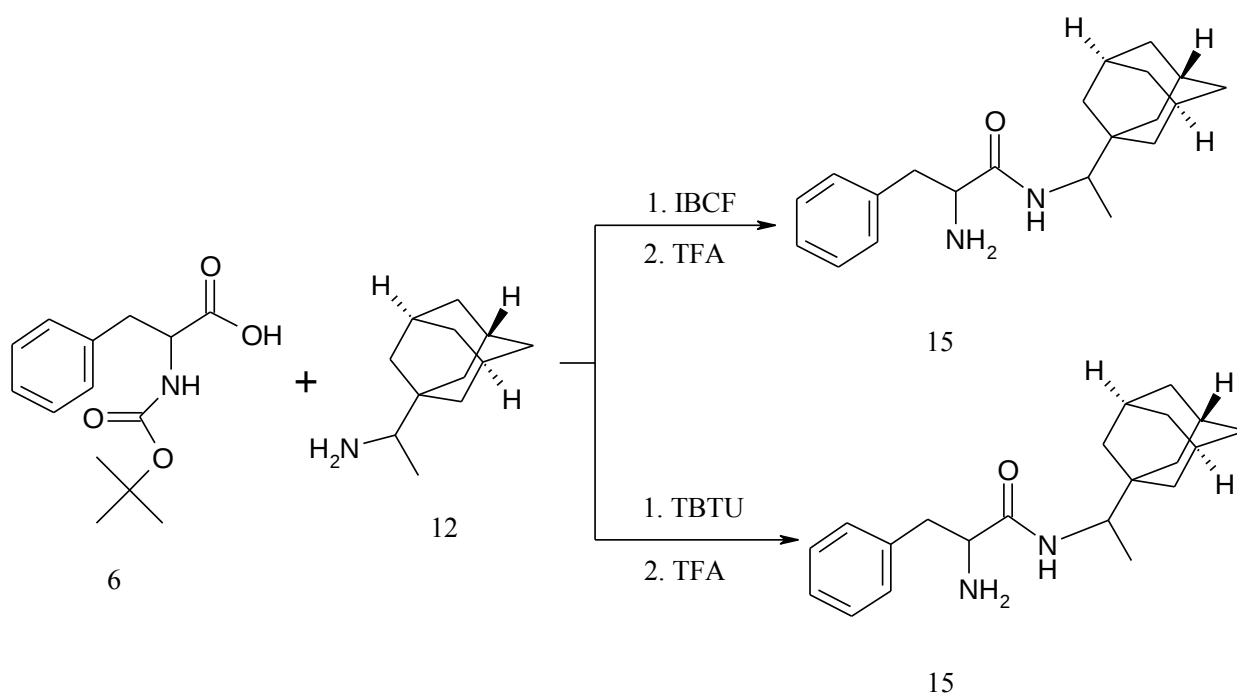
Римантадиновият аналог беше получен по метода с TBTU реагент (**Схема 10**). Добивът му беше 56 %. При изолирането му срещнахме някои трудности, а именно трудното утаяване на кристалите. Обикновено, особено при анализите с по-хидрофилни аминокислелини ставаше бързо. При този аналог този процес отне повече от 24 часа. Полученият тирозинил-римантадин беше тестван *in vitro* за противовирусна активност срещу грипен вирус A/H3N2, щам Hong Kong/68.



**Схема 10.** Синтез на тирозинил-римантадин

### 3. 4. 3. Синтез на фенилаланил-римантадин

Синтезата на римантадиновия аналог протече по метода смесените анхидриди, като беше повторена след това с TBTU като свързващ реагент (**Схема 11**). При реакцията по метода на смесените анхидриди съединенията се получаваха за около час, включително и това. Този вид синтези правехме с повишено внимание, ако продължителността на реакцията беше повече от час наблюдавахме разпадни продукти като допълнителни петна на TLC хроматограмите. Очистването на продукта в тези случаи ставаше много трудно и се налагаше синтезата да бъде повторена. При TBTU реакциите такива проблеми не бяха установени. Получените добиви бяха съответно 41% и 38%. Фенилаланиловият аналог беше тестван *in vitro* за противовирусна активност срещу грипни вируси A/H3N2, щам Hong Kong/68 и A/H3N2, щам Aichi.

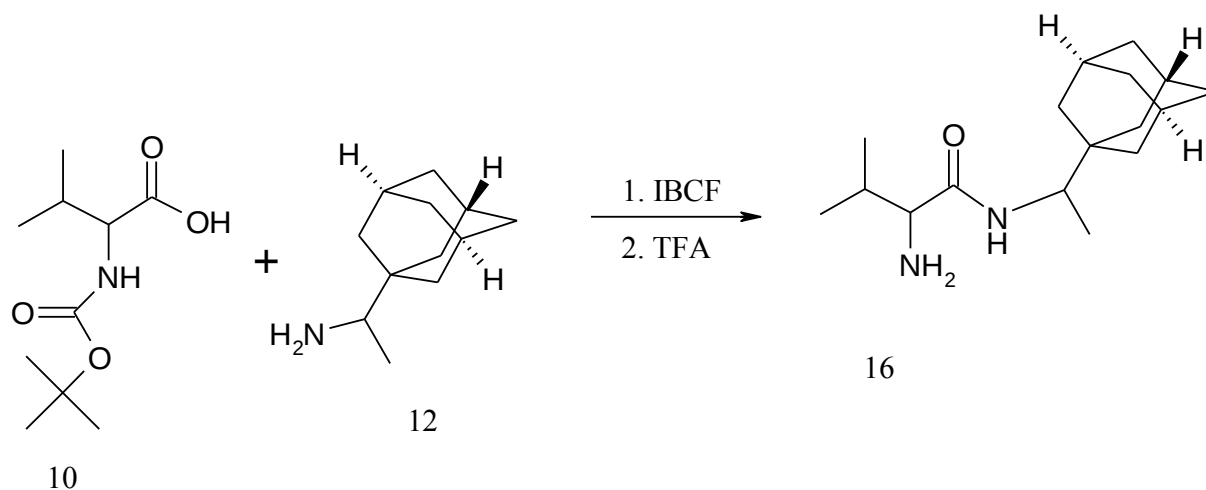


**Схема 11.** Синтез на фенилаланил-римантадин

### 3. 4. 4. Синтез на валил-римантадин

Аналогично на синтезата на амантадиновото производно, преценихме че трябва да бъде синтезиран и римантадинов аналог на валина. Производното беше синтезирано по метода на смесените анхидриди (**Схема 12**). Продължителността на реакцията отне

около 1,5 часа, като беше преустановена преди изчерпването на изходните вещества. По-голямата продължителност, както вече споменахме води до възникването допълнителни онечиствания. Въпреки преждевременното спиране на синтеза полученият добив беше сравнително висок - 59%. Извършено беше изследване за противовирусна активност спрямо грипни вируси A/H3N2, щам Hong Kong/68 и A/H3N2, щам Aichi.

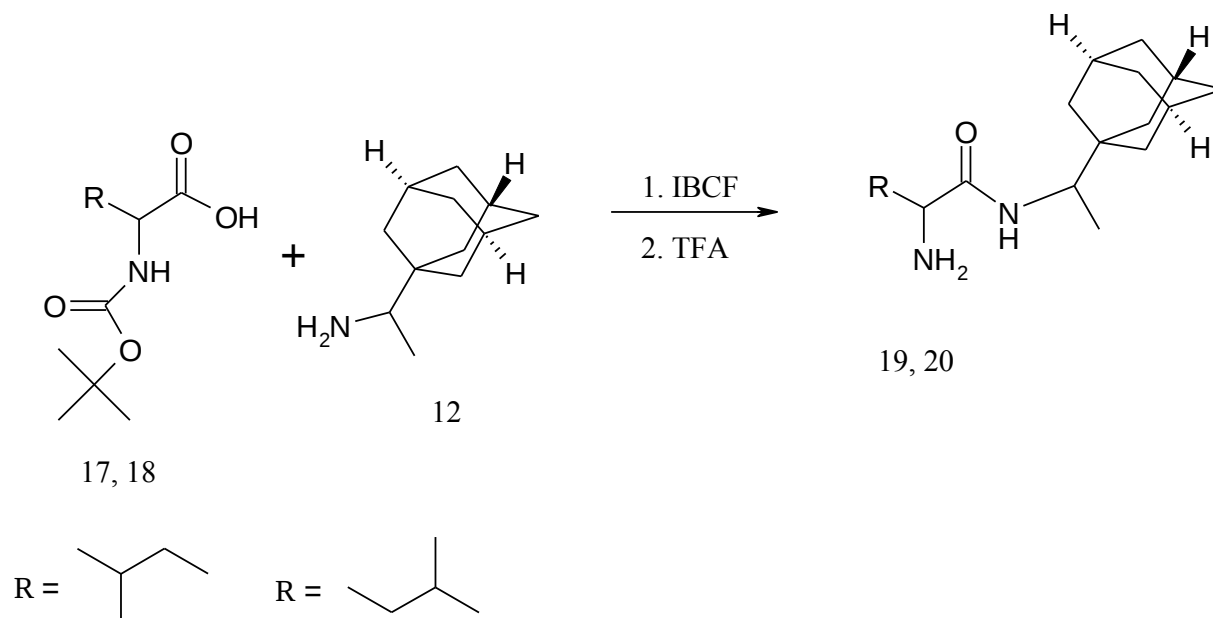


**Схема 12.** Синтез на валил-римантадин

### 3. 4. 5. Синтез на левцинил-римантадин и изолевцинил-римантадин

Предвид успеха на валиновите производни в борбата с някои вируси, вероятно дължащ се на амфифилността на валина [184], [187 - 188], взехме решение в синтезите да бъдат включени и други две подобни структури, а именно левцин и изолевцин. Тяхната амфифилна роля би могла да се окаже от голямо значение за водоразтворимостта на новите производни и в същото време да улесни и преминаването на адамантановите структури през клетъчните и вирусните мембрани [189]. Синтезите бяха реализирани по метода на смесените анхидриди (**Схема 13**) с добиви – левцинил-римантадин 64% и изолевцинил-римантадин 62%. При тези реакции имаме проблеми с чистота на изолираните кристали. Бяха допълнително екстрахирани като към онечистените кристали добавихме метанол и вода в съотношение 4:1, и екстрахирахме двукратно с n-хексан. Извлекът изпарихме до сухо, а онечистванията

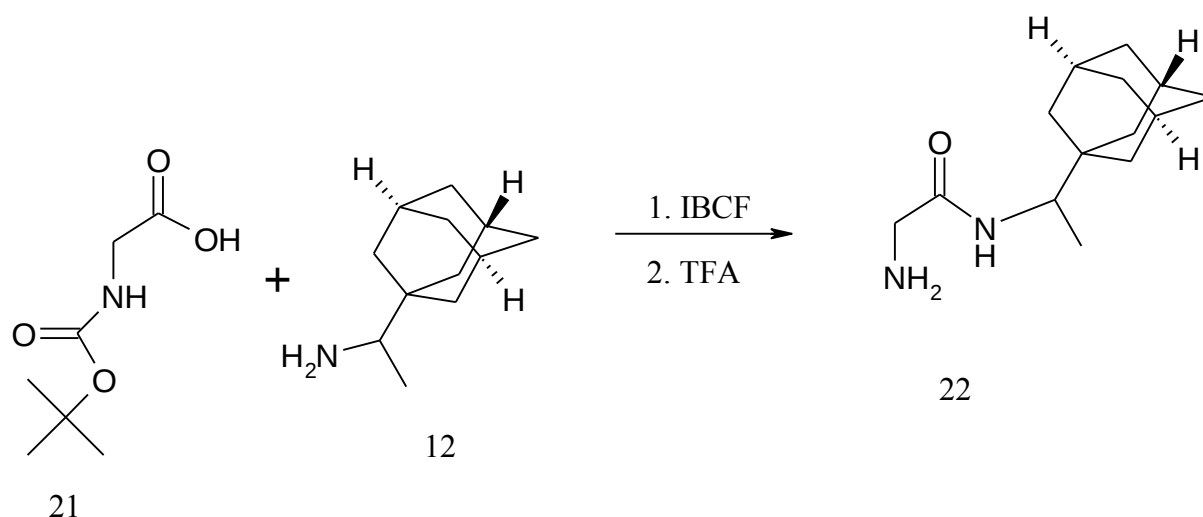
липсваха. И двете съединения бяха тествани за активност срещу грипен вирус A/H3N2, щам Hong Kong/68, а левциновият амид и срещу грипен вирус A/H3N2, щам Aichi.



**Схема 13.** Синтез на левцил-римантадин (19) и изолевцил-римантадин (20)

### 3. 4. 6. Синтез на глицил-римантадин

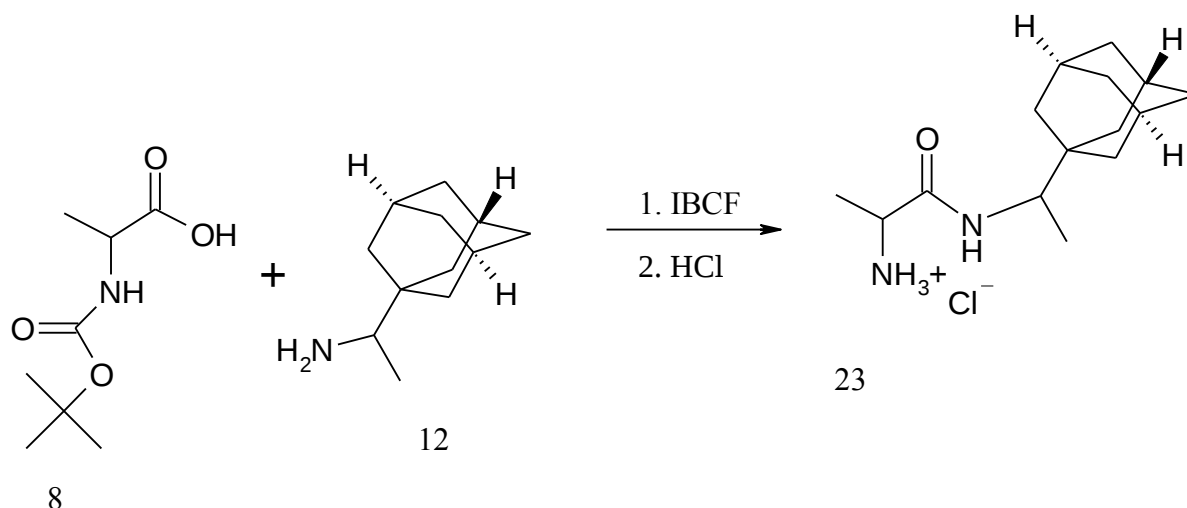
Аминокиселината глицин със своята значителна хидрофилност е подходяща за подобряване на значително хидрофобната молекула на римантадина. Това би довело до по-голяма бионаличност. Осъществихме синтезата по метода на смесените анхидриди (**Схема 14**) като добивът, който получихме беше 77%. При това съединение както и при другите производни с по-хидрофилни аминокиселини получихме високи добиви – над 70%. Като цяло с тях се работи по-лесно. Получават се високи добиви, а при утаените кристали липсваха замърсявания. Новополученото съединение беше изследвано за противогрипна активност спрямо вирус A/H3N2, щам Hong Kong/68.



**Схема 14.** Синтез на глицил-римантадин

### 3. 4. 7. Синтез на аланил-римантадин хидрохлорид

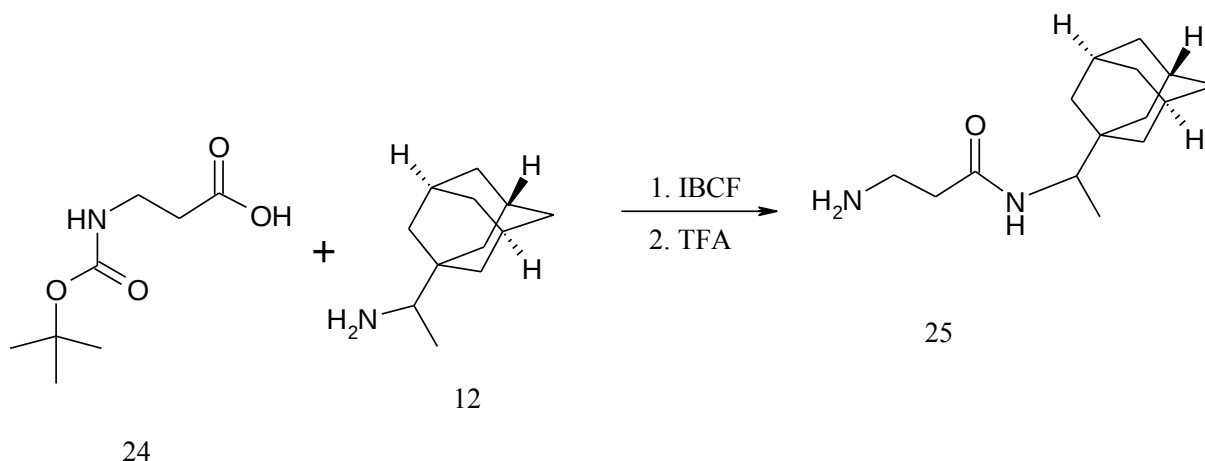
Синтезата на аналога беше изпълнена по метода на смесените анхидриди (**Схема 15**) с добив – 74%. Защитната Boc- група беше премахната в разтвор на к.НCl в MeOH (1:1) при непрекъснато разбъркване в продължение на 3 часа за разлика от всички други адамантанови аналози, които синтезирахме. Тук целяхме получаването на хидрохлорид за да бъде още по-лесно разтворим при *in vitro* изследванията. Деблокирането по-този начин създаде проблеми с изпаряването на водата и получаването на кристали. Поради тази причина деблокирахме останалите вещества с TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Съединението беше тествано *in vitro* за противовирусна активност спрямо грипни вируси A/H3N2, щам Hong Kong/68 и A/H3N2, щам Aichi.



**Схема 15.** Синтез на аланил-римантадин хидрохлорид

### 3. 4. 8. Синтез на $\beta$ -аланил-римантадин

Към синтезите, които извършихме с цел подобряване водоразтворимостта на римантадина, прибавихме още една хидрофилна аминокиселина, за която е известно, че вмъкната в молекулите на пептиди предизвиква втвърдяване на тяхната структура -  $\beta$ -аланин. Допълнителен аргумент за тази синтеза е факта, че молекулата на тази аминокиселина, поради линейната си структура и аминогрупата в края наподобява полиамин. М2 белтъците имат специфично свързващо място за полиамини, което е различно от мястото на свързване на амантадин [119]. Методът по който реализирахме синтезата (**Схема 16**) беше „смесени анхидриди“. Полученият добив, подобно на предишните две синтези беше сравнително висок – 70%. Съединението беше изследвано за противогрипна активност срещу грипен вирус A/H3N2, щам Hong Kong/68.



**Схема 16.** Синтез на  $\beta$ -аланил-римантадин

Деблокирането на аминогрупите на всички синтезирани аналози, с изключение на аланил-римантадина беше направен по стандартна методика – TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Всички новосинтезирани съединения бяха доказани с МС и ЯМР анализи.

### 3. 5. Гуанидиране на някои амантадинови производни

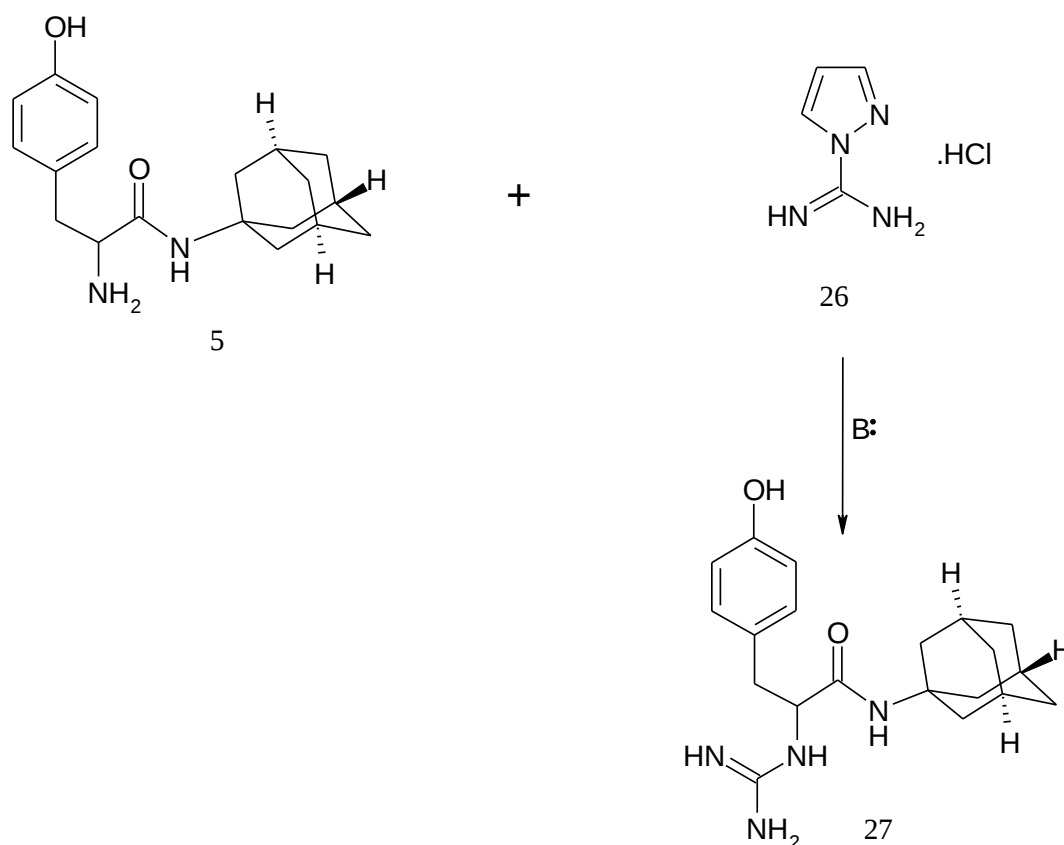
Гуанидино групата влиза в структурата на много биологично активни съединения. Тя се характеризира със специфични свойства главно дължащи се на нейната много висока базичност ( $pK_a = 13.6$ ,  $pK_b = 0.4$ ). Това я прави изключително интересна от гледна точка на нейната физиологична активност. Гуанидин-съдържащи съединения се изолират от природни източници, като например водорасли, гъби и микроорганизми. Гуанидираните производни са широко използвани при дизайна на лекарствени средства, обхващащи различни терапевтични области. В резултат на това гуанидирането е широко изследвано [190], особено след успешното прилагане в молекулата на 2-деокси-2,3-ди-дехидро-D-N-ацетилневраминовата киселина (Neu5Ac2en). С цел повишаване на липофилността, OH-група е била заменена с NH<sub>2</sub>-група, след което тя е заместена с гуанидино група, в резултат на което активността на съединението се е повишила значително.

Разбирайки значимостта от базичността на инхибиторите [191] в активните центрове ние решихме да използваме гуанидино групата за модификация на част от новополучените съединения. Избрахме да модифицираме някои от синтезираните

производни, показали изразено противовирусно действие и да изследваме влиянието им върху биологичната активност *in vitro*.

### 3. 5. 1. Гуанидиране на тирозинил-амандатин

Гуанидирането (**Схема 17**) беше направено по метод, описан в литературата [192]. Разтворителят MeCN беше избран, поради факта, че той разтваря добре изходните съединения, необходими за реакцията – тирозинил-амантадина и 1-*H*-пиразол-1-карбоксамидина. Реакцията протече при непрекъснато разбъркване в продължение на 48 часа на стайна температура и присъствието на TEA – база, която е задължителна от гледна точка на механизма на протичане на синтеза. През цялото време процесът беше следен хроматографски. Ниският добив (16%) се дължи на трудното извличане на съединението от разтвора, както и това, че голяма част от него оставаше, заедно с онечистванията в промивните води. За да се увеличи количеството кристали се наложи, след утаяването им (MeOH/Et<sub>2</sub>O) реакционната смес да престои на хладно около 12 часа.



**Схема 17.** Гуанидиране на тирозинил-амантадин с 1-*H*-пиразол-1-карбоксамидин

### 3. 5. 2. Гуанидиране на валил-амантадин

Следващото съединение, което гуанидирахме (Схема 18) беше новосинтезираното производното на амантадин с валин. Синтезата протече по аналогичен начин. Добив – 54%.

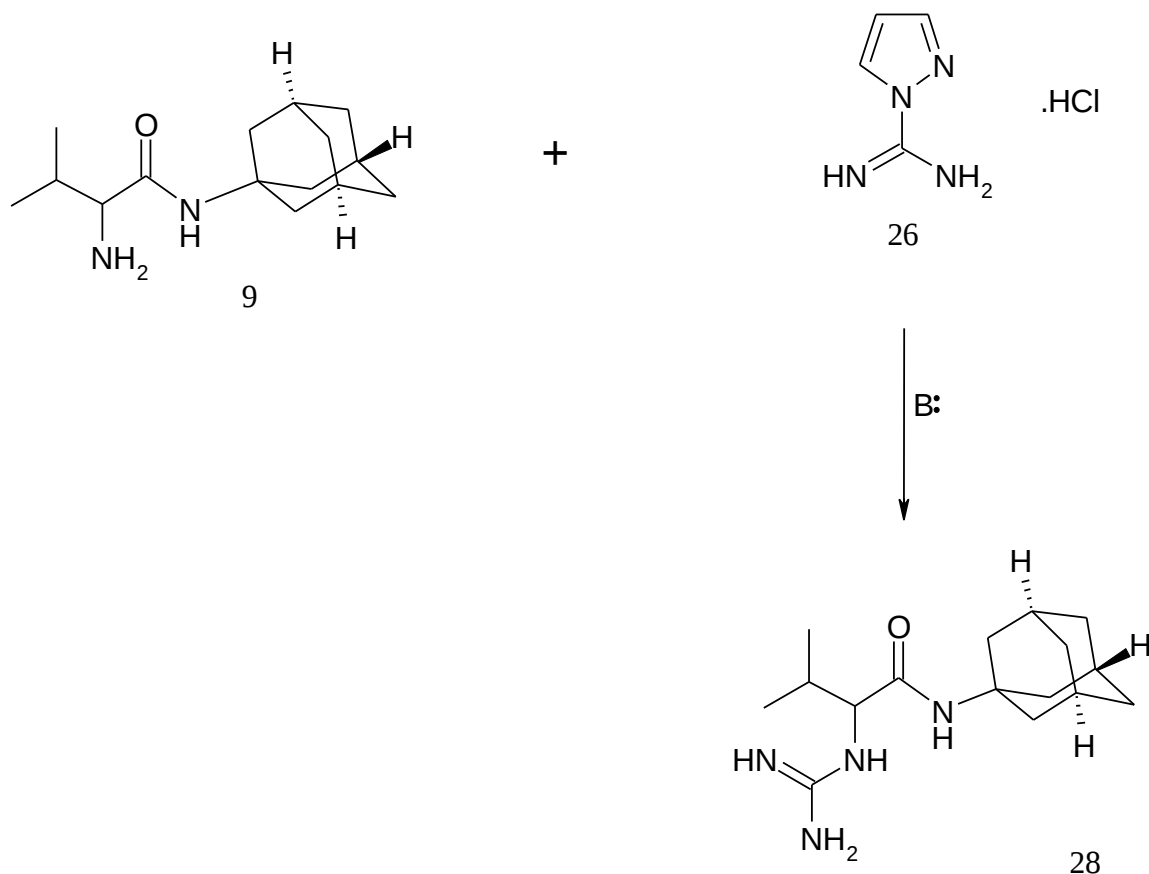
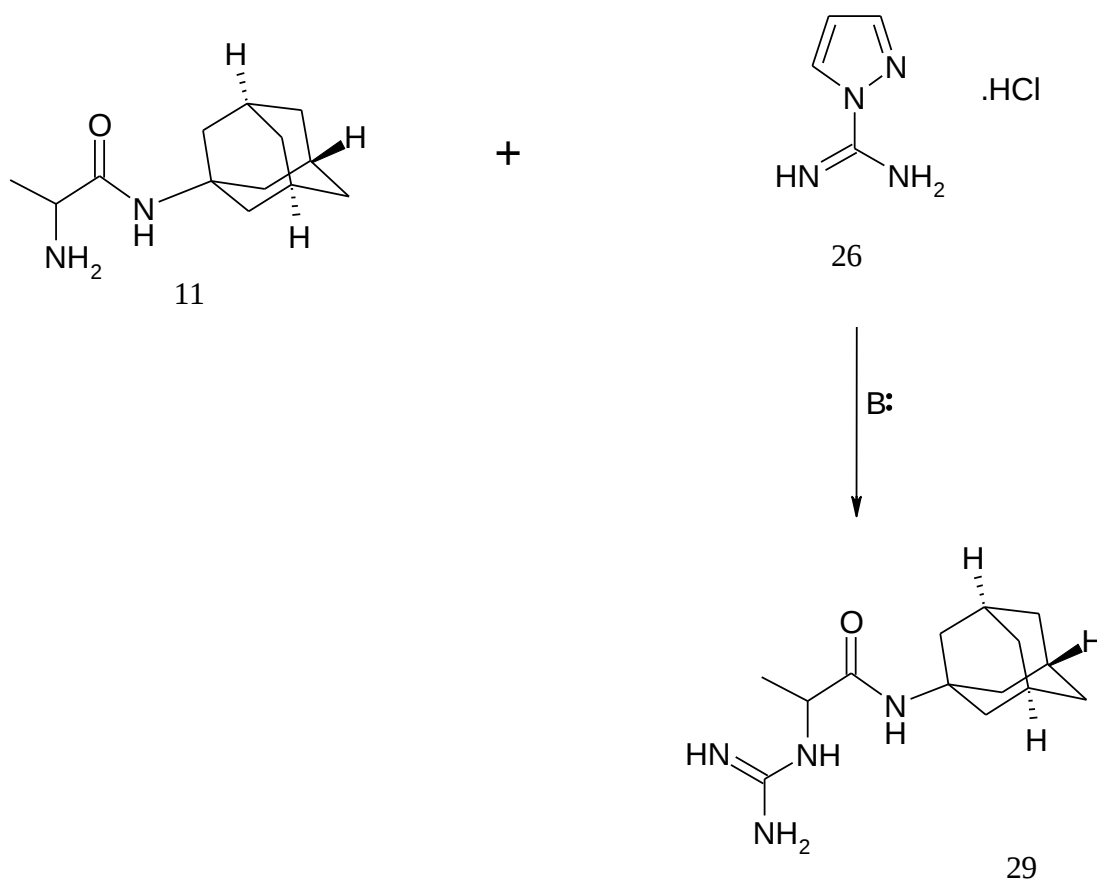


Схема 18. Гуанидиране на валил-амантадин с 1-*H*-пиразол-1-карбоксамидин

### 3. 5. 3. Гуанидиране на аланил-амантадин

Аланил-амантадина беше получен при същите условия, като по-горните синтези (Схема 19). Изненадващото тук беше трудното изолиране на съединението, за разлика от аналога на аланин с римантадина. Първоначално в опит да се получат кристали използвахме MeOH/Et<sub>2</sub>O, но това не доведе до утаяване на продукта. След множество опити и последващо изпаряване на разтворителите кристали бяха получени като разтворихме смолата в малко количество EtOAc и добавихме *n*-хексан. Полученият добив беше 26%.



**Схема 19.** Гуанидиране на аланил-амантадин с 1-*H*-пиразол-1-карбоксамидин

Всички гуанидирани амантадинови аналози бяха изследвани за противогрипна активност срещу вирус A/H3N2, щам Hong Kong/68.

### 3. 6. Гуанидиране на някои римантадинови производни

С увеличаване базичността на римантадиновите производни се цели формирането на по-здрави връзки с M2 протеина и инхибиране на вирусите в по-голяма степен. Възможно е новите гуанидирани аналози да се свързват с M2 белтъка подобно на полиамините, чието свързващо място там е различно от това на амантадин и римантадин [119]. Можем да предположим, че новите гуанидирани от нас аналози - биха могли да се свързват и по-двата начина, което би било най-добрия вариант. Подобен вид двойно инхибиране със сигурност ще затрудни мутацията на вируса, която трябва да възникне едновременно на две места за да може вирусът да преодолее 100% блокиранто на M2 йонния канал.

### 3. 6. 1. Гуанидиране на тирозинил-римантадин

Синтезата на тирозинил-римантадина протече гладко за не повече от 48 часа на стайна температура. (Схема 20). Веществото беше изолирано доста по-лесно от аналога с амантадин, с добив от 46%.

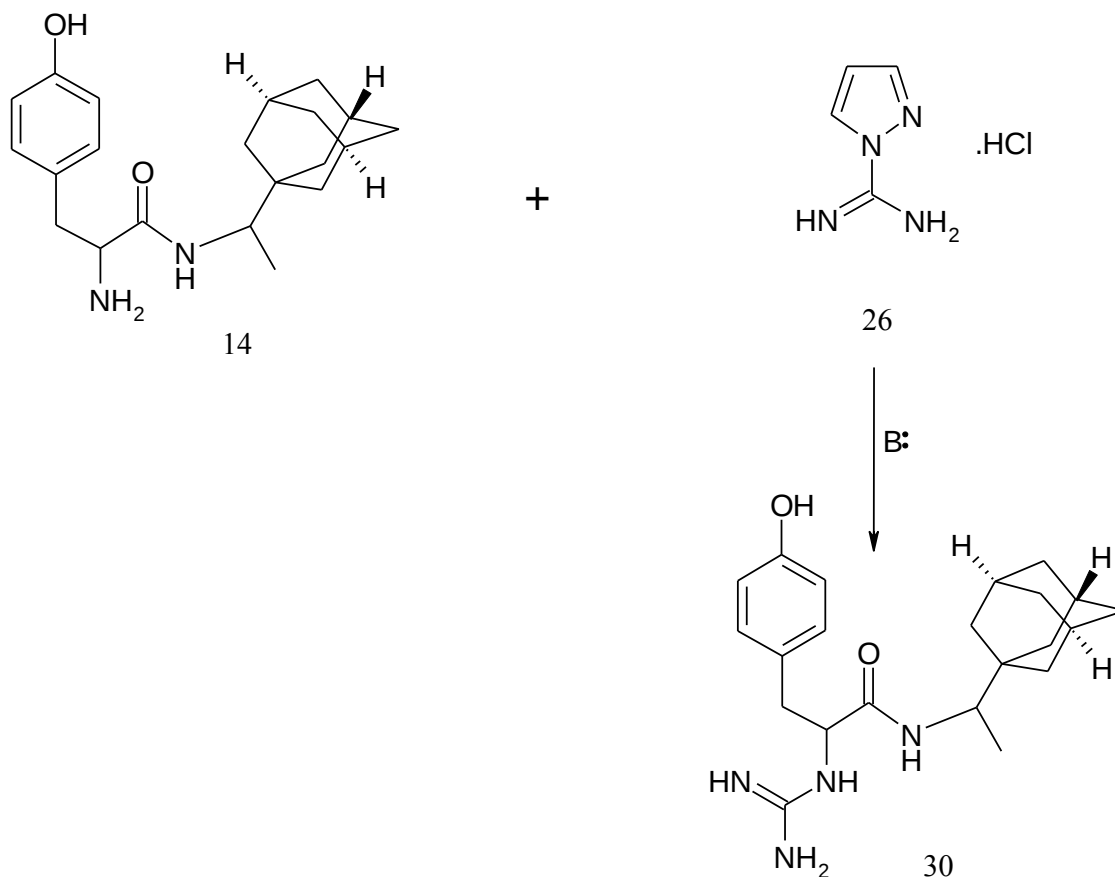
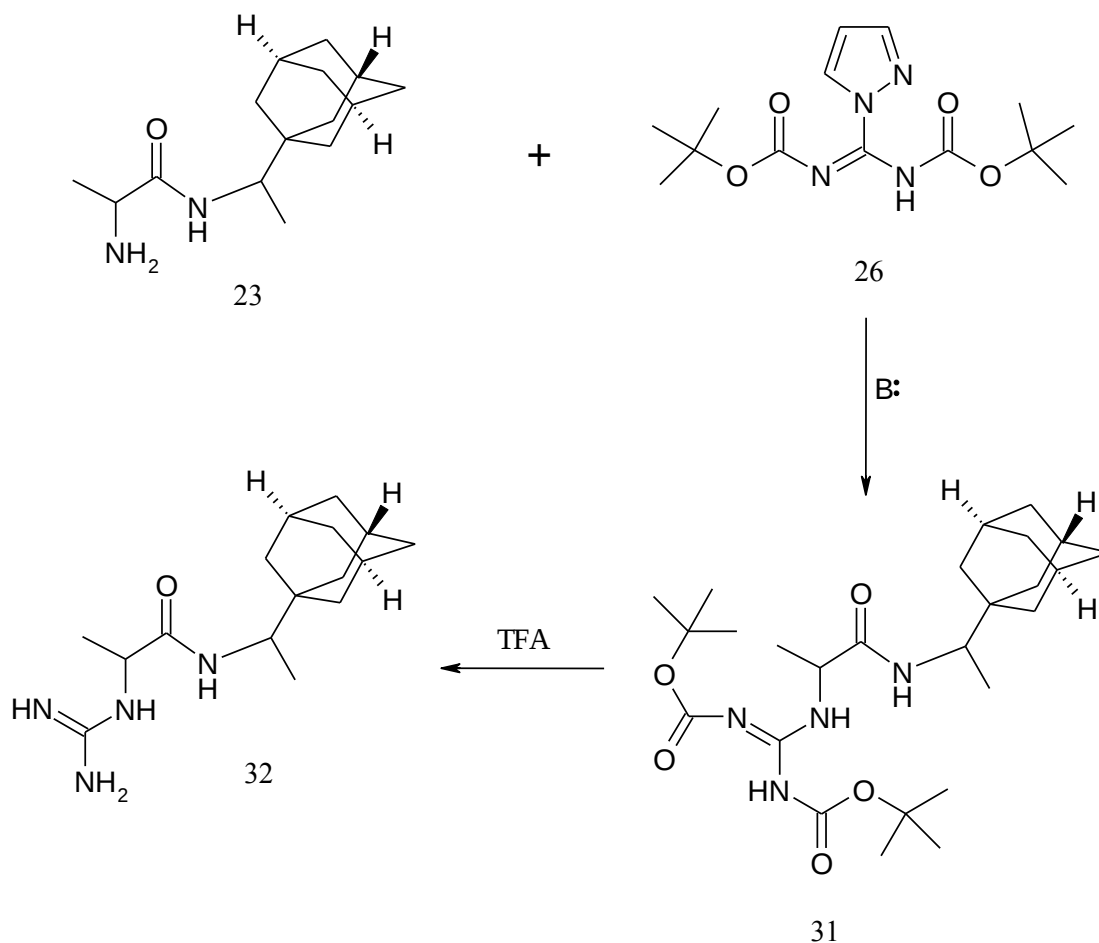


Схема 20. Гуанидиране на тирозинил-римантадин с 1-*H*-пиразол-1-карбоксамидин

### 3. 6. 2. Гуанидиране на аланил-римантадин

Гуанидирането на аналога на римантадин с аланин беше проведено с различен гуанидиращ реагент. Разтворителят - DCM беше специфично подбран сред няколко възможности, поради факта, че той разтваря еднакво добре и двата изходни продукта на реакцията – аланил-римантадин и di-Вос защитения 1-*H*-пиразол-1-карбоксамидин. Реакцията беше проведена в присъствие на органична база, която е задължителна от гледна точка на механизма на протичане на синтеза (Схема 21) . В нашият случай като подходяща база беше подбран отново TEA. Реакцията беше следена чрез TLC, като изчерпването на аланил-римантадина беше установено на 48 час. Целевото съединение

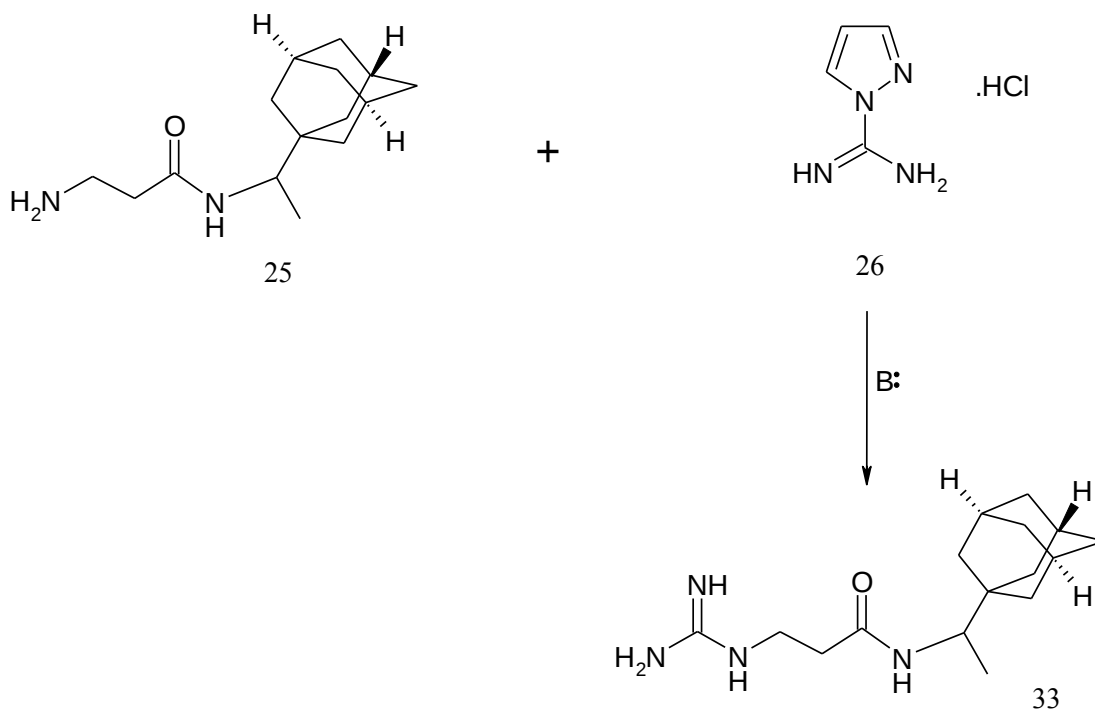
беше изолирано чрез утаяване на кристалите в  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ . Продуктът беше деблокиран с TFA/DCM за 3 часа в безводна среда, а получения добив - 46%.



**Схема 21.** Гуанидиране на аланил-римантадин с N,N'-di-Вос-1-Н-пирозол-1-карбоксамидин

### 3. 6. 3. Гуанидиране на β-аланил-римантадин

Съединение β-аланил-римантадин се отличи от останалите аналози с най-висока противовирусна активност. Преценихме, че гуанидирането му би го направило още по-ефективно срещу грипни вируси. За разлика от останалите гуанидиращи синтези, тази отне 54 часа при непрекъснато разбъркване и следене чрез TLC. Изолиран беше добив от 64%. Сравнително високият добив беше изолиран лесно, като при утаените кристали липсваха онечиствения, според тънкослойната хроматография.



**Схема 22.** Гуанидиране на  $\beta$ -аланил-римантадин с 1-*H*-пиразол-1-карбоксамидин

Всички гуанидирани римантадинови аналози бяха изследвани за противовирусна активност срещу грипен вирус A/H3N2, шам Hong Kong/68.

### 3. 7. Химична стабилност на някои амантадинови производни

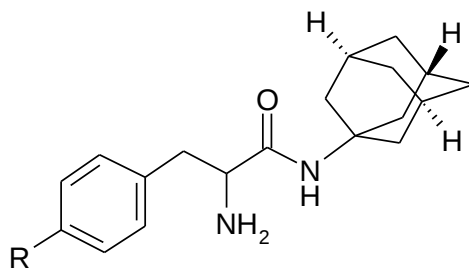
Създаването на предлекарства има за цел да увеличи стабилността, да подобри транспорта през клетъчните мембрани или през липидните бариери на вече утвърдени лекарствени препарати.

Един от подходите за създаване на предлекарства е получаване на естери или амиди, които търпят ензимна хидролиза, освобождавайки лекарствения препарат. В тези случаи е от изключително значение да се изследва нивото на превръщане на лекарството до неговата активна част. Това може да се постигне чрез изследване на химичната стабилност на предлекарството при различни рН стойности, като при всички случаи една от тях съответства на рН в стомаха. По време на изследването се определя степента на хидролиза на съответните естери или амиди до получаване на изходното съединение.

С оглед евентуалното прилагане на амантадиновите аналози като предлекарства, изследвахме тяхната химична стабилност при рН и температура, съответстващи на стомашно-чревния тракт.

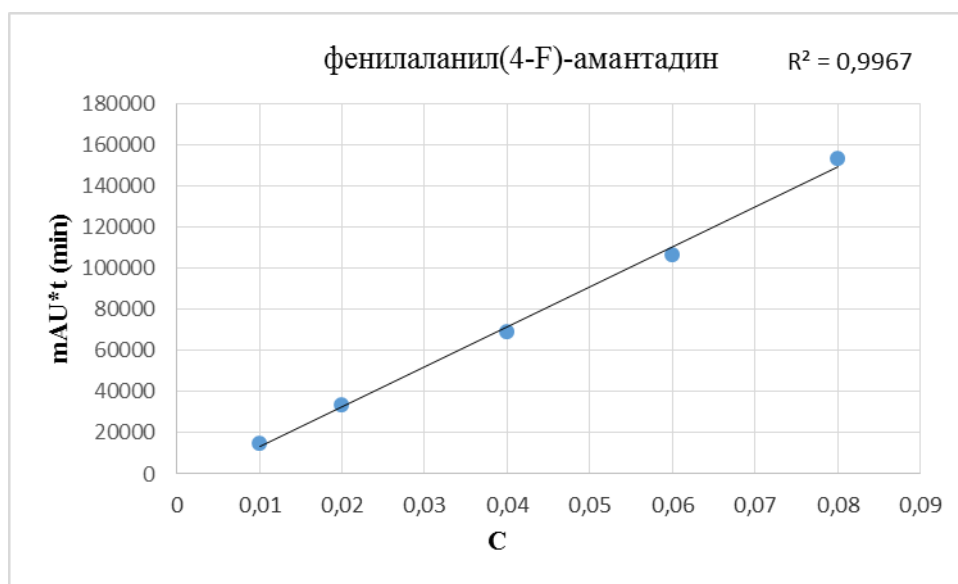
Изследвахме кинетиката на хидролиза на амидите на (4-F)-фенилаланин, тирозин и фенилаланин с амантадин (**3**, **5**, **7**), поради потенциалното им приложение, освен като противовирусни и като антипаркинсонови лекарствени средства, при pH 1.0 и 7.4 и  $T^{\circ}=37^{\circ}\text{C}$  (**Фиг. 25**). Поради слабата разтворимост на изследваните вещества във вода изходните разтвори бяха приготвяни с концентрация 0.4 mg/mL и впоследствие бяха разредени до 0.04 mg/mL със съответния буферен разтвор. Концентрационния диапазон е избран освен с оглед добрата разтворимост на изследваните субстрати и с оглед на линейния диапазон на концентрациите. Както става ясно от получените стандартни прави корелационните коефициенти за изследваните съединения са над 0.99, което доказва попадане в линейния диапазон на стандартната права. Пробите бяха инкубирани при  $37^{\circ}\text{C}$  в продължение на 5 часа, като на всеки 30 минути беше вземана проба за анализ на концентрацията чрез високо ефективна течна хроматография по предварително установени стандартни прави като измерванията са направени с фотометричен детектор в режим „интегрална абсорбция“, при условия и апаратура представени в раздела “Материали и Методи“ (**Фиг. 26, 27 и 28**). Апаратурата, поддържаща  $37^{\circ}\text{C}$  представлява магнитна бъркалка с поставена върху нея стъклена вана. През ваната преминава медна серпентина, която е свързана с термостат, нагласен на желаната температура. Така се постига едновременно постоянно разбъркване и точна температура от  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ .

Хидролизният процес протича като реакция от първи порядък. Скоростната константа на хидролиза –  $k$  се пресмята от наклона на правата, илюстрираща промяната на логаритъма от концентрацията на изходното вещество с времето ( $\ln C = \ln C_0 + kt$ ). Времето на полуразпадане се изчислява по формулата  $t_{1/2} = \ln 2/k$ .

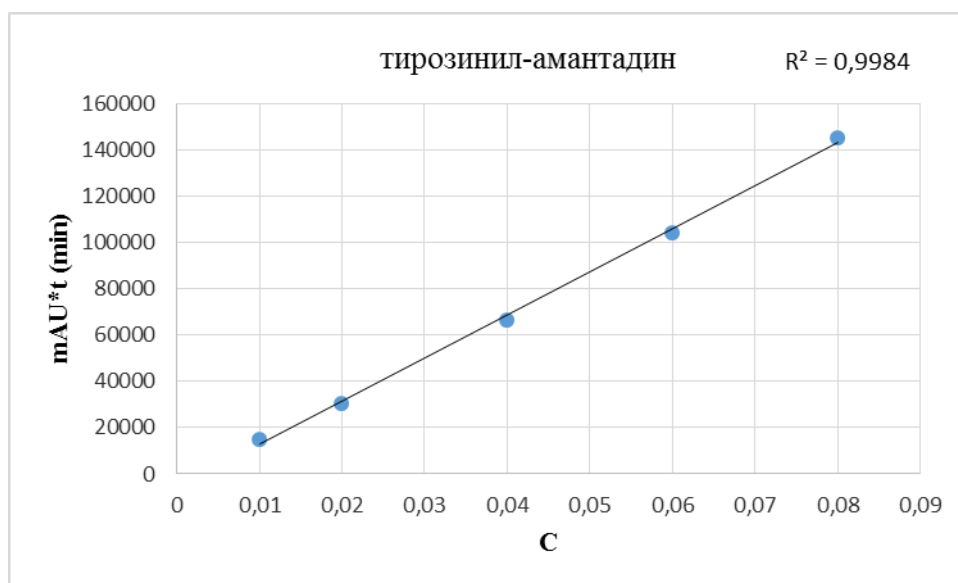


1. R = F
2. R = OH
3. R = H

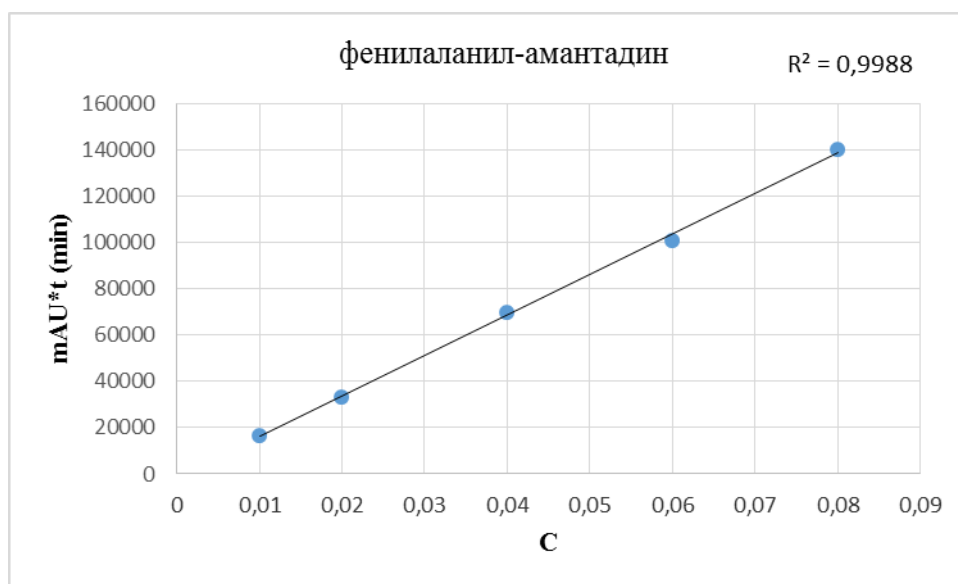
**Фиг. 25.** Аминокиселинни амиди на амантадина, изследвани за химична стабилност



Фиг. 26. Калибрационна права: фенилаланил(4-F)-амантадин



Фиг. 27. Калибрационна права: тирозинил-амантадин



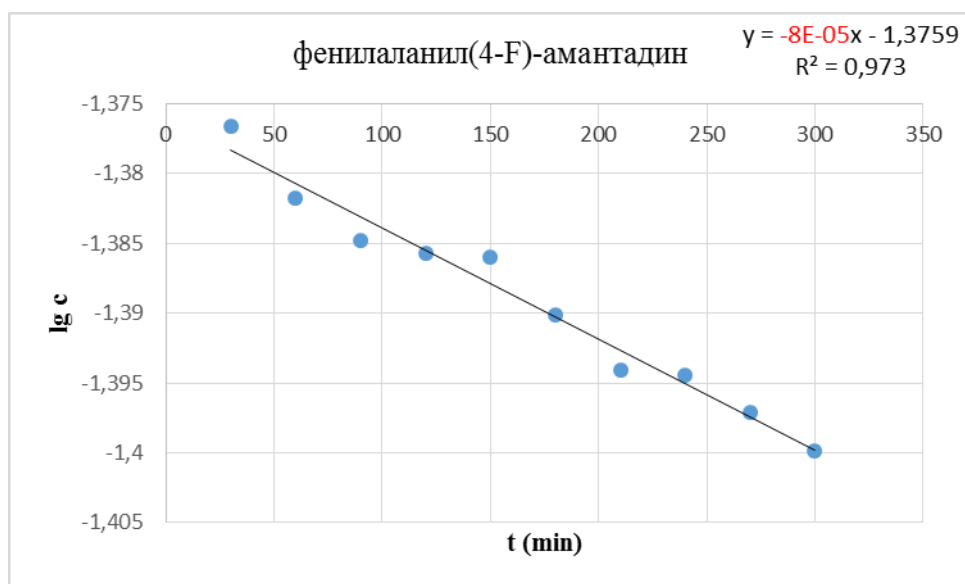
**Фиг. 28.** Калибрационна права: фенилаланил-амантадин

**Таблица 3.** Кинетични данни за хидролиза на производни **3**, **5** и **7**

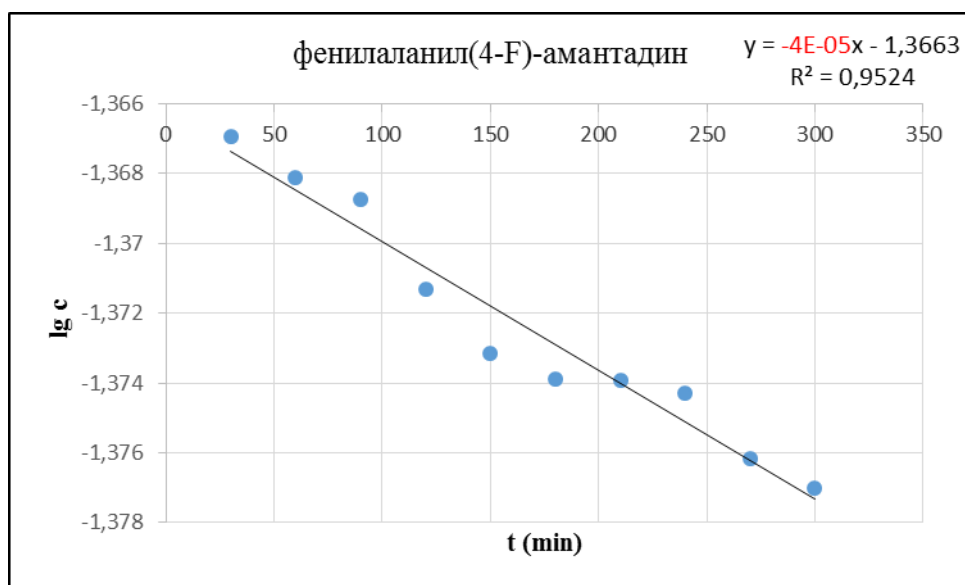
| Съединение                               | *pH 1.0, 37°C    | **pH 7.4, 37°C    |
|------------------------------------------|------------------|-------------------|
| (4-F)-фенилаланил-амантадин ( <b>3</b> ) | $t_{1/2} = 61$ h | $t_{1/2} = 122$ h |
| тирозинил-амантадин ( <b>5</b> )         | $t_{1/2} = 52$ h | $t_{1/2} = 73$ h  |
| фенилаланин-амантадин ( <b>7</b> )       | $t_{1/2} = 85$ h | $t_{1/2} = 218$ h |

\* 0.1 M HCl; \*\* 2.5g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> в 800 mL вода, коригиран до pH 7.4 с H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

Като цяло всички изследвани съединения са стабилни при pH 1.0 и при pH 7.4. При pH 7.4 показват между 1.5 и 2.5 пъти по-голяма стабилност спрямо тази в кисела среда. фенилаланил(4-F)-амантадин (**3**) е стабилно при pH 1.0, а при pH 7.4 показва два пъти по-продължителна стабилност. Промяната на концентрацията на амида с течение на времето при температура 37 °C е показана на **фиг. 29 а, б**.

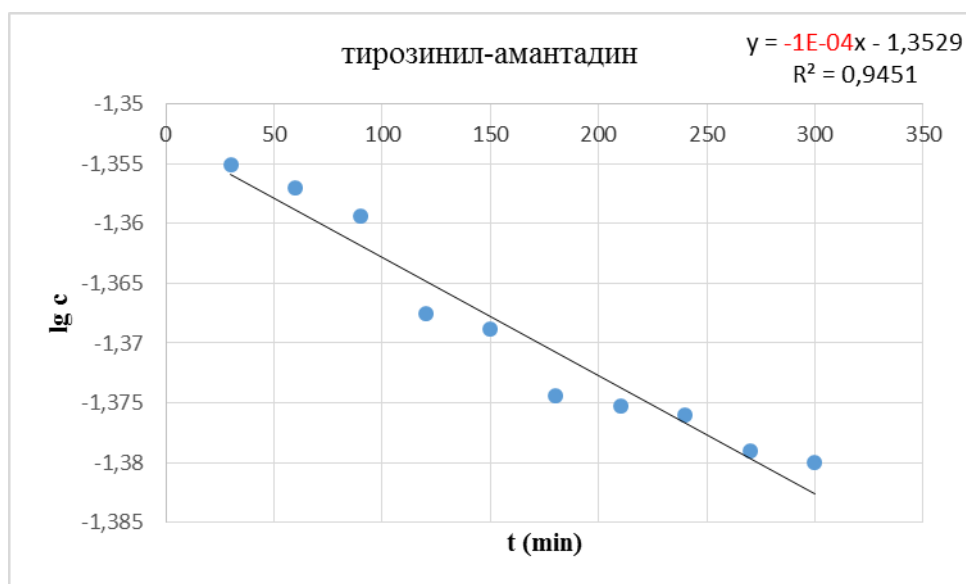


**Фиг. 29 а.** Полулогаритмична зависимост на концентрацията на изходното вещество спрямо времето за производното на амантадин с фенилаланин(4-F) при рН 1.0/37 °С

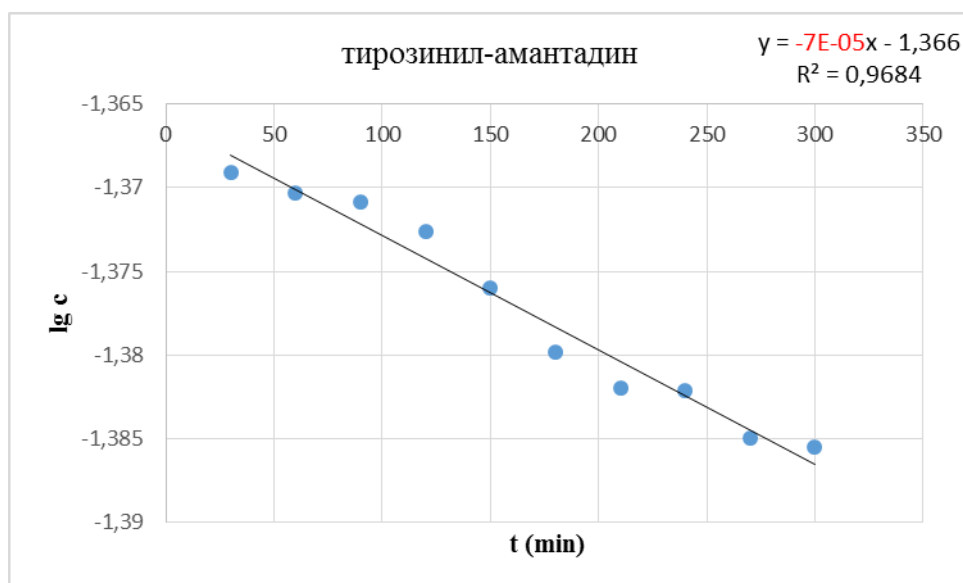


**Фиг. 29 б.** Полулогаритмична зависимост на концентрацията на изходното вещество спрямо времето за производното на амантадин с фенилаланин-(4-F) при рН 7.4/37 °С

Амидът на тирозин (5) хидролизира с по-голяма скорост както при рН 1.0, така и при рН 7.4. Въпреки това остава стабилен - 52 h и 73 h (**Таблица 3**). Промяната на концентрацията му с течение на времето при 37 °С е представена на **фиг. 30 а, б**.

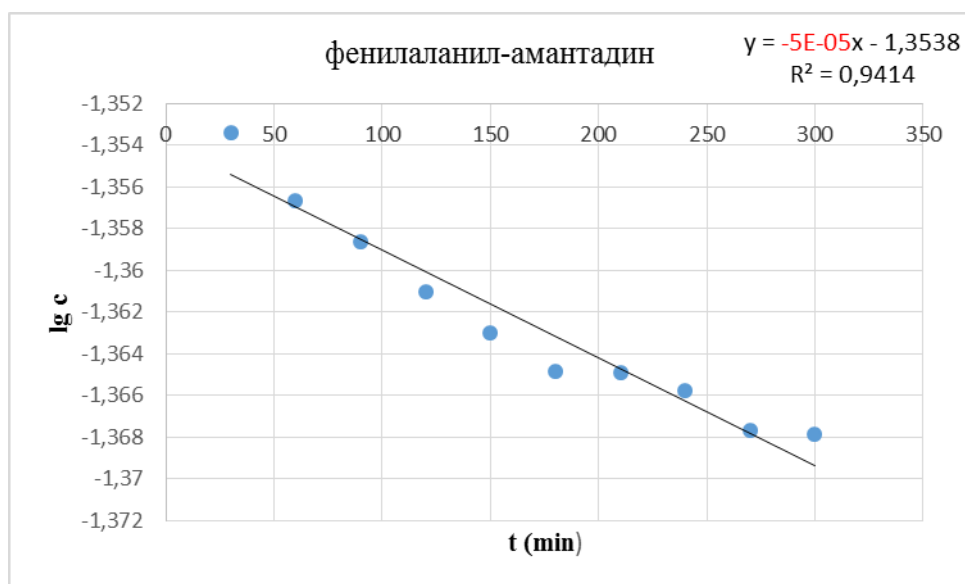


**Фиг. 30 а.** Полулогаритмична зависимост на концентрацията на изходното вещество спрямо времето за производното на амантадин с тирозин при рН 1.0/37 °С

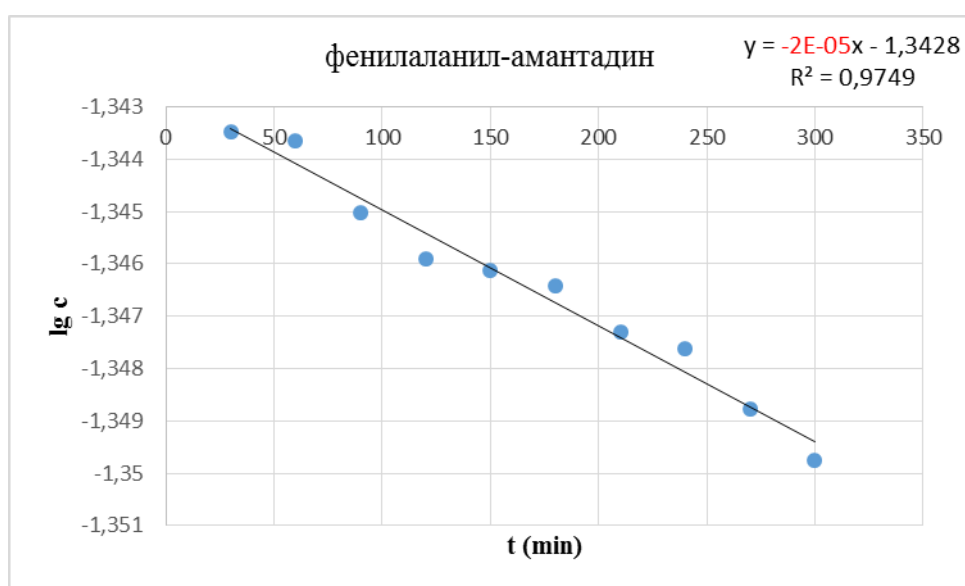


**Фиг. 30 б.** Полулогаритмична зависимост на концентрацията на изходното вещество спрямо времето за производното на амантадин с тирозин при рН 7.4/37 °С

С най-голяма стабилност се отличава производното на амантадина с фенилаланин, което показва  $t_{1/2} = 85$  h в средата с рН 1.0 и около 2.5 пъти по-продължително време в среда близка до неутралното рН (Таблица 3). Графично намаляването на концентрацията с времето е отразена на **фиг. 31 а, б.**



**Фиг. 31 а.** Полулогаритмична зависимост на концентрацията на изходното вещество спрямо времето за производното на амантадин с фенилаланин при рН 1.0/37 °С



**Фиг. 31 б.** Полулогаритмична зависимост на концентрацията на изходното вещество спрямо времето за производното на амантадин с фенилаланин при рН 7.4/37 °С

В зависимост от установената стабилност изследваните съединения могат да бъдат подредени в реда: 7 > 3 > 5.

Съединение 5 (тирозинил-амантадин) има ниска токсичност, *in vivo* е показало добър терапевтичен индекс, стабилно е в среда при рН 1.0 и 7.4 съответно – 52 h, 73 h.

Резултатите получени от изследваните вещества са обещаващи и са основание за бъдещи изследвания.

### 3. 8. Биологична активност на новосинтезираните аминокиселинни амиди на амантадин и римантадин

Особен интерес при създаването на противовирусни средства представляват антиметаболитите на пиримидиновите и пуриновите бази (в по-голямата си част като нуклеозиди), както и аналозите на аминокиселините, които ефективно повлияват фазата на биосинтезата на вирусните компоненти.

С оглед изясняване на зависимостите между химичния строеж и биологичната активност ние изследвахме противовирусната активност на новосинтезираните аминокиселинни производни на амантадина и римантадина.

#### 3. 8. 1. Противовирусна активност *in vitro*

Изследване на противовирусната активност спрямо грипен вирус A/H3N2, щам Hong Kong/68 беше проведено в Университета „Фридрих Шилер“, гр. Йена, Германия, а изследванията за активност срещу грипен вирус A/H3N2, щам Aichi в Института по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН в София. Всички синтезирани в настоящата работа съединения бяха изследвани за противовирусна активност спрямо грипен вирус A/Hong Kong/68 (Таблицы 4 и 5).

**Таблица 4.** Резултати от противовирусното изследване на амантадиновите производни срещу грипен вирус A/H3N2, щам Hong Kong/68

| Съединение                     | CC <sub>50</sub> (μM)<br>при MDCK<br>клетки |       | HNTC (μM)<br>при MDCK<br>клетки |      | IC <sub>50</sub> (μM)<br>срещу грипен<br>вирус A/Hong<br>Kong/68 |       |
|--------------------------------|---------------------------------------------|-------|---------------------------------|------|------------------------------------------------------------------|-------|
|                                | средно                                      | SD    | средно                          | SD   | средно                                                           | SD    |
| L-Phe(4-F)-амантадин (3)       | 83,61                                       | 2,92  | 15,35                           | 1,58 | 0,81                                                             | 0,33  |
| L-Tyr-амантадин (5)            | > 100                                       | n/a   | > 100                           | n/a  | 3,93                                                             | 1,18  |
| L-Phe-амантадин (7)            | 89,4                                        | 21,58 | 15,1                            | 0,71 | 0,75                                                             | 0,2   |
| L-Val-амантадин (9)            | > 100                                       | n/a   | > 100                           | n/a  | 1,32                                                             | 0,31  |
| L-Ala-амантадин (11)           | > 100                                       | n/a   | > 100                           | n/a  | 1,41                                                             | 0,61  |
| гуанидино-L-Tyr-амантадин (27) | > 100                                       | n/a   | > 100                           | n/a  | 59,71                                                            | 3,06  |
| гуанидино-L-Val-амантадин (28) | > 100                                       | n/a   | > 100                           | n/a  | 17,13                                                            | 0,37  |
| гуанидино-L-Ala-амантадин (29) | > 100                                       | n/a   | > 100                           | n/a  | 18,37                                                            | 0,94  |
| амантадин (2)                  | n/a                                         | n/a   | n/a                             | n/a  | 0,39                                                             | 0,22  |
| оселтамивир                    | n/a                                         | n/a   | n/a                             | n/a  | 0,002                                                            | 0,001 |

Средната стойност се формира на базата на три измервания. Стандартното отклонение (SD) се изчислява по формулата за средна квадратична величина, приложена върху отклоненията на значенията на признака от тяхната средна аритметична стойност. Това изисква повдигане на втора степен на тези отклонения, въз основа на които се изчислява дисперсията  $\sigma^2$  на стойностите на признака.

$$\sigma^2 = \sum (x_i - \bar{x})^2 / N \qquad SD = \sigma / \bar{x}$$

От получените данни за активност на новосинтезираните производни на амантадина с аминокиселини, спрямо грипен вирус A/Hong Kong/68 става ясно, че най-висока активност показва съединение (7), съдържащо аминокиселината Phe свързана към амантадин. Неговата активност е малко по-ниска от тази на изходния амантадин, но се очаква то да има по-висока стабилност и по-добра бионаличност. Съединенията съдържащи аминокиселините Tug, Ala и Val, показват малко по-ниска активност в сравнение с тази на изходния амантадин. В случай, че тези съединения проявяват по-висока стабилност и бионаличност, малко по-ниската стойност на активността би била оправдана. От табл. 4. обаче се вижда, че гуанидирането на аминокиселините след тяхното свързване не води до увеличаване на активността им, съгласно нашите очаквания, а тя намалява. Това може да бъде обяснено с факта, че страничният остатък в молекулата е прекалено обемист, за да е възможно проникването му в M2-йонния канал и проявяване на неговата активност. Съединение (3), което съдържа флуорираният аналог на Phe, показва активност сходна с тази на нефлуорирания аналог, което показва, че въвеждането на електроноакцепторен заместител в структурата на съединенията не повлиява тяхната активност. От резултатите получени за противовирусната активност на новосинтезираните аналози би могло да се заключи, че наличието на незаместен бензенов пръстен (съединение 7) е граничната по обем структура позволяваща навлизане на молекулата в M2-йонния канал. Това вероятно би могло да обясни факта и за значителното намаляване на активността вече при производното съдържащ Tug-остатък.

**Таблица 5.** Резултати от противовирусното изследване на римантадиновите производни срещу грипен вирус A/H3N2, щам Hong Kong/68

| Съединение                        | CC <sub>50</sub> (μM)<br>при MDCK<br>клетки |       | HNTC (μM)<br>при MDCK<br>клетки |      | IC <sub>50</sub> (μM)<br>срещу грипен<br>вирус A/Hong<br>Kong/68 |       |
|-----------------------------------|---------------------------------------------|-------|---------------------------------|------|------------------------------------------------------------------|-------|
|                                   | *средно                                     | SD    | *средно                         | SD   | *средно                                                          | SD    |
| D-Phe(4-F)-римантадин (13 a)      | 19,91                                       | 5,28  | 6,23                            | 1,81 | n/a                                                              | n/a   |
| L-Phe(4-F)-римантадин (13 b)      | 15,46                                       | 3,98  | 4,37                            | 0,5  | n/a                                                              | n/a   |
| L-Туг-римантадин (14)             | > 100                                       | n/a   | 9,97                            | 2,38 | 0,52                                                             | 0,14  |
| L-Phe-римантадин (15)             | 21,93                                       | 1,82  | 4,75                            | 0,54 | n/a                                                              | n/a   |
| L-Val-римантадин (16)             | 70,33                                       | 10,89 | 10,2                            | 3,72 | n/a                                                              | n/a   |
| L-Leu-римантадин (19)             | > 100                                       | n/a   | 11,66                           | 1,99 | 0,75                                                             | 0,12  |
| L-Ile-римантадин (20)             | 58,35                                       | 17,89 | 5,33                            | 1,45 | n/a                                                              | n/a   |
| L-Gly-римантадин (22)             | > 100                                       | n/a   | 13,89                           | 6,14 | 0,11                                                             | 0,05  |
| L-Ala-римантадин (23)             | > 100                                       | n/a   | 14,65                           | 1,44 | 1,53                                                             | 0,59  |
| β-Ala-римантадин (25)             | > 100                                       | n/a   | 20,78                           | 2    | 15,72                                                            | 0,76  |
| гуанидино-L-Туг-римантадин (30)   | > 100                                       | n/a   | 36,69                           | 3,39 | 8,19                                                             | 1,08  |
| гуанидино-L-Ala-римантадин (32)   | > 100                                       | n/a   | > 100                           | n/a  | 41,9                                                             | 11,32 |
| гуанидино-L-β-Ala-римантадин (33) | > 100                                       | n/a   | > 100                           | n/a  | n/a                                                              | n/a   |
| амантадин (2)                     | n/a                                         | n/a   | n/a                             | n/a  | 0,39                                                             | 0,22  |
| оселтамивир                       | n/a                                         | n/a   | n/a                             | n/a  | 0,002                                                            | 0,001 |

\* средната стойност се формира на базата на три измервания

При производните на римантадина най-висока активност очаквано показва това с аминокиселината Gly. Неговата активност е около 3 пъти по-висока от тази на амантадина, използван като стандарт за сравнение, но все още е в същият порядък. Нейната малка по обем структура вероятно позволява лесно да влезе в M2-йонния канал на вируса. Изненадваща е активността на аналога с аминокиселината Ala, която е по-ниска от тази на аналозите с Туг и Val, макар все още да е добра. Сравнително добрата активност на този аналог на римантадина (**23**), ни потикна да синтезираме и производно съдържащо аминокиселината β-Ala. Добре известен от литературата е факта, че β-аминокиселините включени във верига втвърдяват нейната структура и ограничават конформационната свобода. Видно от получената стойност за активността на съединение (**23**) е, че тя силно намалява, като минава в друг концентрационен порядък, което доказва, че липсата на възможност за сгъване на молекулата води до невъзможност за проникване в M2-йонния канал, а от там и до загуба на активност.

Увеличаването на обема на молекулата, чрез въвеждане на допълнителни гуанидино групи води отново до намаляване на активността. Някои от производните бяха тествани и спрямо грипен вирус A/H3N2, щам Aichi (**Таблица 6**).

**Таблица 6.** Резултати от изследването на римантадиновите производни за противовирусна активност спрямо грипен вирус A/H3N2, щам Aichi

| Съединение                   | CC <sub>50</sub> (μM)<br>при MDCK клетки | IC <sub>50</sub> (μM)<br>срещу грипен вирус<br>A/Aichi |
|------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| D-Phe(4-F)-римантадин (13 a) | 29,18                                    | n/a                                                    |
| L-Phe(4-F)-римантадин (13 b) | 32,34                                    | n/a                                                    |
| L-Phe-римантадин (15)        | 20,3                                     | n/a                                                    |
| L-Val-римантадин (16)        | 55,82                                    | n/a                                                    |
| L-Leu-римантадин (19)        | 193,11                                   | n/a                                                    |
| L-Ala-римантадин (23)        | 200                                      | 39,45                                                  |
| римантадин                   | > 220                                    | n/a                                                    |

Резултатите показват, че изомерите на фенилаланина(4-F) и фенилаланина проявяват сходна цитотоксичност. Левцинил-римантадинът (**19**) и валил-римантадинът (**16**) не проявяват активност, но левциновото производно е с около 3,5 пъти по-ниска цитотоксичност от валиновия амид. Единственото съединение, което проявява умерена активност спрямо този щам, резистентен към римантадин очаквано е аланил-римантадинът.

### 3. 8. 2. Изследвания, свързани с антипаркинсонова активност *in vivo*

Настоящите изследвания са проведени в Института по Невробиология на БАН.

#### Разтворимост

За провеждане на *in vivo* изследвания е от изключително значение разтворимостта на съединенията в подходящи за целите на изследването разтворители.

В DMSO веществата (4-F)-фенилаланил-амантадин (**3**) и тирозинил-амантадин (**5**) показаха добра разтворимост, особено след престояване на разтвора няколко часа. Фенилаланил-амантадин (**7**) суспендираше в разтвора дори след престоя поради което беше елиминирано в следващите ни изследвания.

Във вода веществата показаха много слаба разтворимост. Фенилаланил-амантадин (7) и (4-F)-фенилаланил-амантадин (3) се утаяват, което бе съпроводено с екзотермична реакция. Поради тази причина те бяха разтваряни и разреждани само в 100% DMSO. В случаите на добавяне на вода към първичния разтвор на DMSO тирозинил-амантадин (5) показва добра разтворимост - при различни съотношения на DMSO и вода.

## **Токсикологични изследвания**

### **Остра токсичност**

#### **Изследване собствената токсичност на разтворителя DMSO**

Преди да се пристъпи към определяне токсичността на съединенията е необходимо да се вземе предвид до колко токсичен е разтворителя. От направената литературна справка [196 - 197] е установено, че тя е 7.5 – 6.2 mg/kg за мишки. Направени са разреждания на DMSO с вода и са въведени на по 2 бр. мишки по 0.1 mL/10 g интраперитонеално (веществото се доставя директно в коремната област), както следва: 100% DMSO; 50% DMSO; 25% DMSO. Установено е, че липсва смъртност от въведения обем на разтворителя до 48-я час от третирането. При въвеждане на по-голям обем на използвания разтворител обаче - по 0.2 mL/10 g интраперитонеално неразреден (100% DMSO) – 2 от 2 инжектирани мишки умират с клоничен гърч в първите няколко минути преди първия час.

#### **Приготвяне на разтвори за изследване на острата токсичност на веществата**

Използвани са изходни разтвори на веществата, разтворени в DMSO. Най-високата използвана доза е 1000 mg/kg. Всички останали разреждания са направени с DMSO или вода за интраперитонеално прилагане на мишки и плъхове.

Нашите опити демонстрираха средно висока остра токсичност на едно от изследваните вещества - тирозинил-амантадин (5), останалите две са с по-висока токсичност. Тирозинил-амантадин (5), приложено в дози под 150 mg/kg телесно тегло при интраперитонеално въвеждане на мишки и плъхове не предизвиква явни симптоми на интоксикация.

**Таблица 7. Смъртност в групите, третирани с вещества 7, 3 и 5**

| Дози/Вещества                      | <b>Phe-Am (7)</b> | <b>(4-F)-Phe-Am (3)</b> | <b>Tyr-Am (5)</b> |
|------------------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|
| 1000 mg/kg (DMSO)                  | 2/2 /до 1 час     | 2/2 /до 1 час           | 2/2 /до 24 час    |
| 500 mg/kg (DMSO)                   | 2/2 /до 1 час     | 2/2 /до 24 час          | 2/2 /до 1 час     |
| 350 mg/kg (DMSO)                   | n/a               | 2/2 /до 24час           | 2/2 /до 1 час     |
| 320 mg/kg (DMSO)                   | n/a               | 2/2 /до 1 час           | 1/2 /до 72 час    |
| 300 mg/kg (DMSO)                   | 2/2 /до 1 час     | 2/2 /до 1 час           | 2/2 /до 5 ден     |
| 300 mg/kg (H <sub>2</sub> O)       | преципитация      | преципитация            | 0/2 /до 5 ден     |
| 160 mg/kg (DMSO)                   | n/a               | 2/2 /до 1 час           | 0/2 /до 24 час    |
| 50 mg/kg (DMSO)                    | 2/2 /до 48час     | 2/2 /до 48 час          | 2/2 /до 48 час    |
| 32, 16, 8 mg/kg (H <sub>2</sub> O) | n/a               | n/a                     | 0/2 /до 7 ден     |

От доза 320 mg/kg тирозинил-амантадин (5) половината умират (както при разтворител 100% DMSO, така и при DMSO разреден с вода). (4-F)-фенилаланил-амантадинът (3) и фенилаланил-амантадинът (7) дават 100% смъртност от тази доза. Вероятна LD<sub>50</sub> за 5 е 320 mg/kg. По-висока е токсичността на останалите две вещества, поради което ги елиминирахме от по-нататъшните изследвания.

#### **Остра токсичност на тирозинил-амантадин (5):**

**При мишки** - LD<sub>50</sub> е 350 mg/kg интраперитонеално

**При плъхове** - токсичността е над 150 mg/kg интраперитонеално. Бъдещи изследвания ще дадат по-точна информация за токсичността на тирозинил-амантадина (5) при плъхове.

#### **Симптоми на острата интоксикация с веществата при бели мъжки мишки:**

В първия час на третирането животните са силно потиснати, омърлушени и стоят замръзнали в една поза, разкрячени и неподвижни, застинали, атаксични, с нарушена походка, ваят се клатушкат се, полузаспали, не реагират дори при докосване. Не бягат, летаргични, скупчени в групи са и не се хранят. Появяват се клонични гърчове с мятане и тремор почти веднага (10-15 минути) след високите дози. Няма вокализация, липсват рефлекс на обръщане от легнало положение, наблюдаван е феномена на Щрауб с вдигане на опашката, вероятно поради спазъм на сфинктерите, влачене на задните крайници, затруднено дишане, цианоза и смърт с клонични гърчове. Преживялите се възстановяват почти напълно до 2-я час от инжектирането. Въз основа

на настоящите начални наблюдения считаме, че прага на острото действие (**Lim<sub>ac</sub>**) е около 8 mg/kg, а нивото на липсващия ефект (**NOEL**) е около 5 mg/kg интраперитонеално.

Имаме основания да считаме, че веществата имат известна пролонгирана токсичност - наблюдавахме промени в поведението на животните, в приемането на храна и вода, във външния им вид и в общото им състояние до 7-я ден, наблюдавана е смъртност след 5-я ден в групите от дози 300 mg/kg.

Направената дисекция на животните на 24-я, 48-я час и на 5-я ден изяви някои видими промени във вътрешните органи след макроскопското им изследване. Налице са слаби изменения във външния вид на черния дроб с поява на по-светли петна и увеличаване на размера му. Липсват промени в белия дроб, но стомаха беше увеличен значимо, както и червата и лигавиците, в сравнение с контролните животни.

Изчислен беше **терапевтичният индекс** на тирозинил-амантадина (5) при мишки, който е около 20, при възприета за ED<sub>50</sub> за 320 mg/kg (\*виж данните за неврофармакологична активност на веществата).

$$TI = LD_{50}/ED_{50} = 320 \text{ mg/kg}/16 \text{ mg/kg} = 20$$

При плъхове липсва смъртност при доза 150 mg/kg, като токсичните симптоми след третиране с тирозинил-амантадин (5) наподобяваха тези при мишки.

### **Фармакологична активност**

#### **Наблюдения върху поведенческите реакции на третираните животни**

##### **Ефекти при мишки**

Установени бяха забележими отклонения в поведението на третираните с веществата мишки, в сравнение с контролните. Наблюдава се промяна в координацията на движенията на животните - видимо беше променена двигателната им активност - акинезия, атаксия, неподвижност, потиснатост продължаващи в първите 2 часа от третирането. Бяха наблюдавани тремор и клонични гърчове, които съпровождаха леталния край на животните. Ритъмът и дълбочината на дишането беше учестен; имаше промени в стомашно - чревния тракт (отказ от храна). Чрез палпация установихме намален тонус на различни мускулни групи; наблюдавахме отслабена

реакция на животните към звукови, тактилни и болеви дразнители. Липсваше рефлекс на „обръщане“ при поставяне на животните в странично положение.

**Наблюдения в поведението на мишките след прилагане на тирозинил-амантадин (5) в 3 ниски дози - 8, 16 и 32 mg/kg интраперитонеално.**

Доза 8 mg/kg - животните имат по-слаба активност в сравнение с контролите, чистят се, ядат, но по-малко в сравнение с контролите, някои стоят изолирани и дремещи, статични и вяли, стоят в ъглите. След 1 час излизат и се раздвижват, отиват да ядат.

Доза 16 mg/kg - мишките са по-малко активни от контролите, задрямали, забравят да се хранят, стоят неподвижни.

Доза 32 mg/kg - животните са по-слабо активни, не ядат, стоят разделени в различни ъгли на клетката, леко се придвижват и пак замръзват неподвижно в една поза без да се движат, дремещи и унили.

Контролните животни - се движат, чистят, ядат, активни са през цялото време, катерят се едно върху друго, окупират цялата площ, комуникират, боричкат се и не се изолират.

След начално обучение ги проверяваме след около 1 час на тестовете Rota rod и на Step through .

**Влияние на тирозинил-амантадина (5) върху невромускулната координация - Rota rod тест**

Доза 32 mg/kg показва значимо намаляване на мускулния тонус при мишки, за разлика от по-ниските дози, при които липсваха достоверни промени.

На 24-я час ефектите на изследваните дози на веществото отзвучават.

**Влияние на тирозинил-амантадина (5) върху паметта и обучението - Step through тест**

След начално обучение на животните бяха проучени ефектите на вещество 5 върху паметта на мишки на 3-я и на 24-я час след прилагането му.

Доза 8 mg/kg показва достоверно скъсяване на латентното време на 3-я час след прилагането на веществото при мишки. При по-високата доза 16 mg/kg латентният период нараства като цяло в сравнение с контролите, но е достоверно само на 24-я час, което отново говори за продължителния ефект на веществото, свързан вероятно с по-бавния му чернодробен метаболизъм.

#### **Влияние на тирозинил-амантадина (5) върху ориентировъчното поведение - Hole board тест на мишки**

Теста за **ориентировъчно поведение** (Hole board) позволи да установим някои промени у изследваните животни, предизвикани от приложеното вещество 5.

#### **Влияние на (4-F)-фенилаланил-амантадин (3) и тирозинил-амантадин (5) върху метаболизма на някои барбитурати.**

Като моделно вещество използвахме хексобарбитал (50 mg/kg, интраперитонеално).

#### **Ефекти при плъхове**

#### **Влияние на тирозинил-амантадин (5) върху невромускулната координация на плъхове - Rota rod тест**

Приложен на плъхове вещество 5 както и при мишки показва тенденция към намаляване на мускулния тонус, както на 3-я час така и на 24-я час.

#### **Влияние на тирозинил-амантадин (5) върху паметта и обучението на плъхове - Step through тест**

По-високите дози на вещество 5 (100 - 150 mg/kg) показаха по-слаб ефект в сравнение с по-ниските изследвани дози на веществото (10-62 mg/kg)

#### **Обобщение на резултатите**

Изследвана беше острата и пролонгирана токсичност на трите новосинтезирани вещества върху мишки и плъхове. Наблюдавано беше наличие на поведенчески промени и органични увреждания при дози над 300 mg/kg телесно тегло при интраперитонеално прилагане на мишки.

Този извод се потвърждава както от субективните ни наблюдения в хода на експериментите върху поведението на третираните животни, така и от някои видими патологични увреждания в главните вътрешни органи на третираните животни след дисекция - както непосредствено след третирането (24-ти и 48-ми час), така и на 5-я ден след третирането.

Има известни данни за пролонгирана токсичност на веществата. Поради лошата разтворимост и по-висока токсичност на (4-F)-фенилаланил-амантадин (3) и фенилаланил-амантадин (7) беше избрано само вещество 5 - тирозинил-амантадин, с което продължихме по-нататъшните изследвания.

Получените данни показват наличието на терапевтичен индекс на изследваното вещество 5 (около 20), ефективна доза 16 mg/kg и  $LD_{50} = 320$  mg/kg интраперитонеално. Заедно с това установихме значима неврофармакологична активност на съединение 5 и по-слаба такава при вещество 3.

Интересно е установеното от нас въздействие на тирозинил-амантадина (5) върху невро-мускулната координация и двигателната активност на мишки и на плъхове чрез теста **Rota-rod**. Това ни дава основание да предполагаме неговия позитивен ефект при ригидност на мускулатурата, съпровождаща Паркинсоновата болест.

Заедно с това съгласно теста за **ориентировъчно поведение (Hole board)** е налице тенденция към значимо намаляване на любопитството, което подсказва, че изследваното вещество 5 улеснява процеса на хабитуация към непозната околна среда.

Подобряващият ефект на тирозинил-амантадина (5) върху паметта и обучението е достоверен и се наблюдава както при мишки, така и при плъхове.

(4-F)-фенилаланил-амантадинът (3) и тирозинил-амантадинът (5) удължават значимо хексобарбиталния сън при доза - 16 mg/kg.

Известно е, че хексобарбиталът е типичен субстрат на микрозомалната цитохром Р-450 монооксигеназата, поради което е широко използван като индикатор за нейната активност *in vivo*. Конкурирането на съединенията като вероятни субстрати на

монооксигеназата с хексобарбитала може да обясни значимото удължаване на хексобарбиталната наркоза. Ангажирането на монооксигеназата с метаболизма на изследваните съединения може да предизвика забавяне на метаболизма на хексобарбитала, рефлектиращо в неговото удължено действие. Получените експериментални данни ни дават основание да предполагаме, че микрозомалната цитохром Р-450 зависимата монооксигеназа би могла да участва в биотрансформацията на веществата в черния дроб. От друга страна, експерименталните данни за централните ефекти на тирозинил-амантадина (5) ни карат да допуснем наличието на комплексни механизми в наблюдавания потенциращ ефект върху хексобарбиталната наркоза. Диференциране участието на метаболитни и на централно - нервни механизми може да стане в целенасочени бъдещи изследвания.

Тъй като веществата показаха слаба разтворимост във вода, но добра разтворимост в алкохоли - метанол, етанол, диметилсулфоксид и по-всяка вероятност и в липиди, това предопределя афинитета им към богатата на липиди ЦНС и е предпоставка за проникването и разпределението на съединенията в структурите ѝ. Това се вижда от изразената неврофармакологична активност, която показва на тирозинил-амантадина (5) и то в сравнително ниски дози (под 1/10 от LD<sub>50</sub>). Наличието на добра липорастворимост на веществата предполага също известна метаболитна биотрансформация до по-добре водоразтворими метаболити, които биха се екскретирали по-бързо от организма. В полза на това свидетелстват и данните за динамиката на техните ефекти във времето.

Получени са данни относно **острата токсичност** на изследваното на тирозинил-амантадина (5), а именно:

- LD<sub>50</sub> - 320 mg/kg (интраперитонеално)
- TI - 20
- NOEL - около 5 mg/kg (интраперитонеално)
- праг на острото действие - под 8 mg/kg (интраперитонеално)
- ED<sub>50</sub> - около 16 mg/kg телесно тегло (интраперитонеално)

Има данни за пролонгирана токсичност на 5-я ден след третирането с веществата на мишки и плъхове.

Тирозинил-амантадинът (5) показва известна неврофармакологична активност.

**(4-F)-фенилаланил-амантадинът (3) и тирозинил-амантадинът (5) повлияват ефектите, а вероятно и метаболизма на някои моделни субстрати:**

- удължават хексобарбиталния сън, вероятно по комплексни централно - нервни и метаболитни механизми

### **Значимост на резултатите и бъдещи перспективи**

Особен интерес представлява установения от нас значим неврофармакологичен ефект на **тирозинил-амантадинът (5)**, съчетан с добър терапевтичен индекс.

Получените оригинални експериментални данни, ще позволяват да се направят предположения за вероятната фармакокинетика, механизмите на действие и фармакодинамиката на изследваните съединения.

Бъдещото изучаване на връзката структура - действие ще послужи за основа на целенасочени синтети на сродни съединения - един от съвременните стратегически подходи при създаването на нови лекарствени средства.

### **3. 8. 3. Антиоксидантна активност**

Парадокслано за живота на нашата планета е, че молекулата, която поддържа аеробния живот и е в основата на енергийния метаболизъм, участва и в много процеси, свързани с болестни и дегенеративни състояния. В различни заболявания като сърдечносъдови, диабет, артрит, рак, невродегенеративни увреждания, стареене и много други, участват т.н. активни форми на кислорода (АФК).

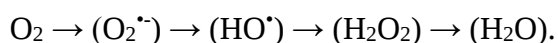
Кислородната молекула в основно, триплетното състояние ( $^3\text{O}_2$ ) е с електронна конфигурация включваща два несдвоени електрона, заемащи две антисвързващи молекулни орбитали, т.е. атмосферният кислород е бирадикал и това определя парамагнитните му свойства. За да се преодолее спиновото ограничение на основното състояние е необходима енергия за сдвояването на двата електрона и преминаването в синглетно ( $^1\text{O}_2$ ) състояние, при което е възможно участието му в процеси на двувалентна редукция. Следователно кислородната молекула в триплетно, основно състояние е нереактивоспособна по отношение на молекули, в които електроните с противоположни спинове са сдвоени, както е при органичните молекули.

Активацията на кислородната молекула може да протече по два начина:

а) чрез абсорбция на достатъчно енергия, която да обърне спина на единия от несдвоените електрони и да премине в синглетно състояние;

б) моновалентна редукция.

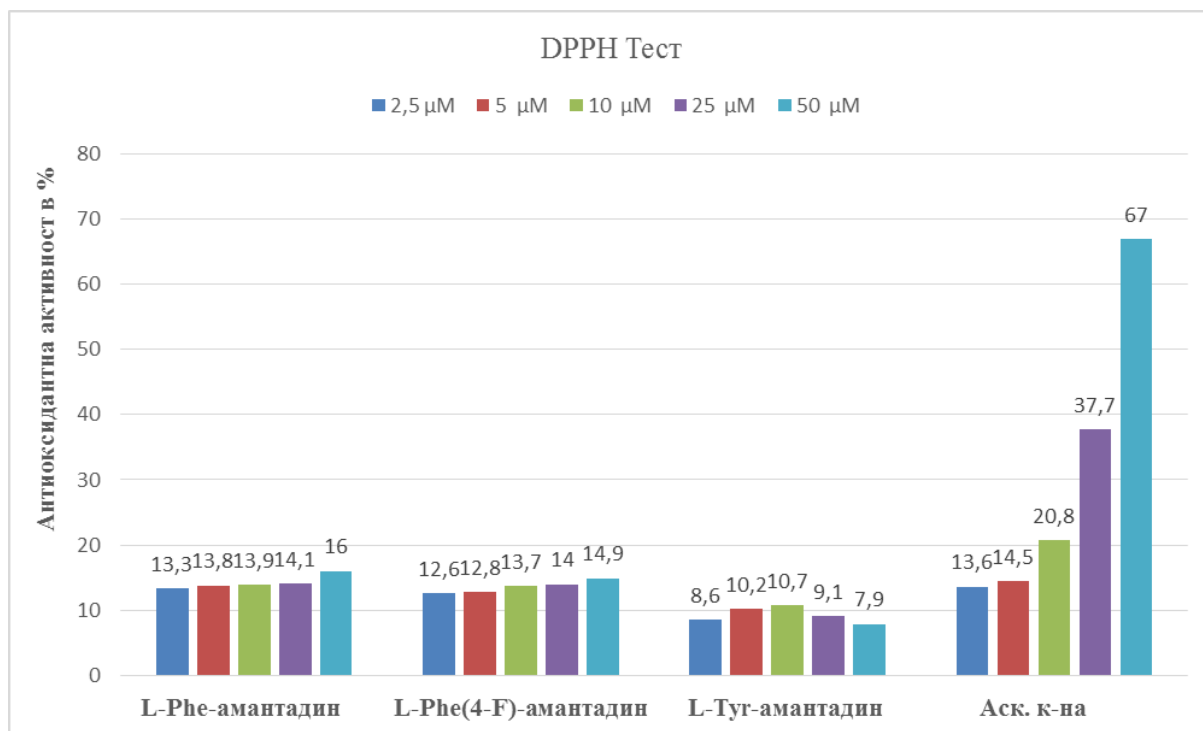
При биохимичните реакции, кислородната молекула чрез последователна моновалентна редукция се превръща в безвредната водна молекула:



При непълната ѝ редукция, в аеробните организми като странични продукти са получават силно реактивоспособни самостоятелни частици или молекули. Те се означават като активни форми на кислорода (АФК): супероксиден анион радикал ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), хидроксиден радикал ( $\text{HO}^{\bullet}$ ) и водороден пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

#### **Изследване на антиоксидантната активност чрез DPPH тест**

DPPH (2,2-дифенил-1-пирил-хидразил-хидрат) методът е антиоксидантен анализ, базиран на електронен трансфер. В разтвор на етанол DPPH<sup>•</sup> има виолетов цвят. При наличието радикал улавящи вещества („scavenger“ потенциал) в разтвора, те свързват DPPH<sup>•</sup> и разтворът променя цвета си [198].

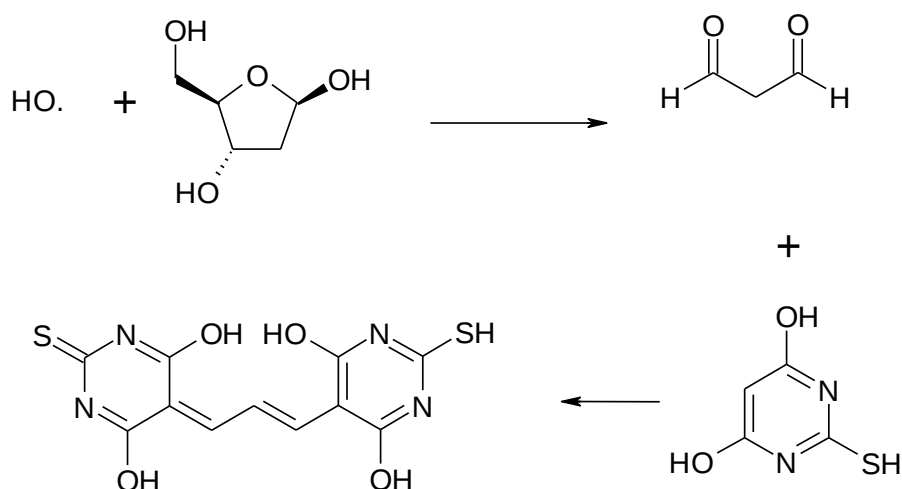


**Фиг. 32.** Антиоксидантната активност DPPH тест

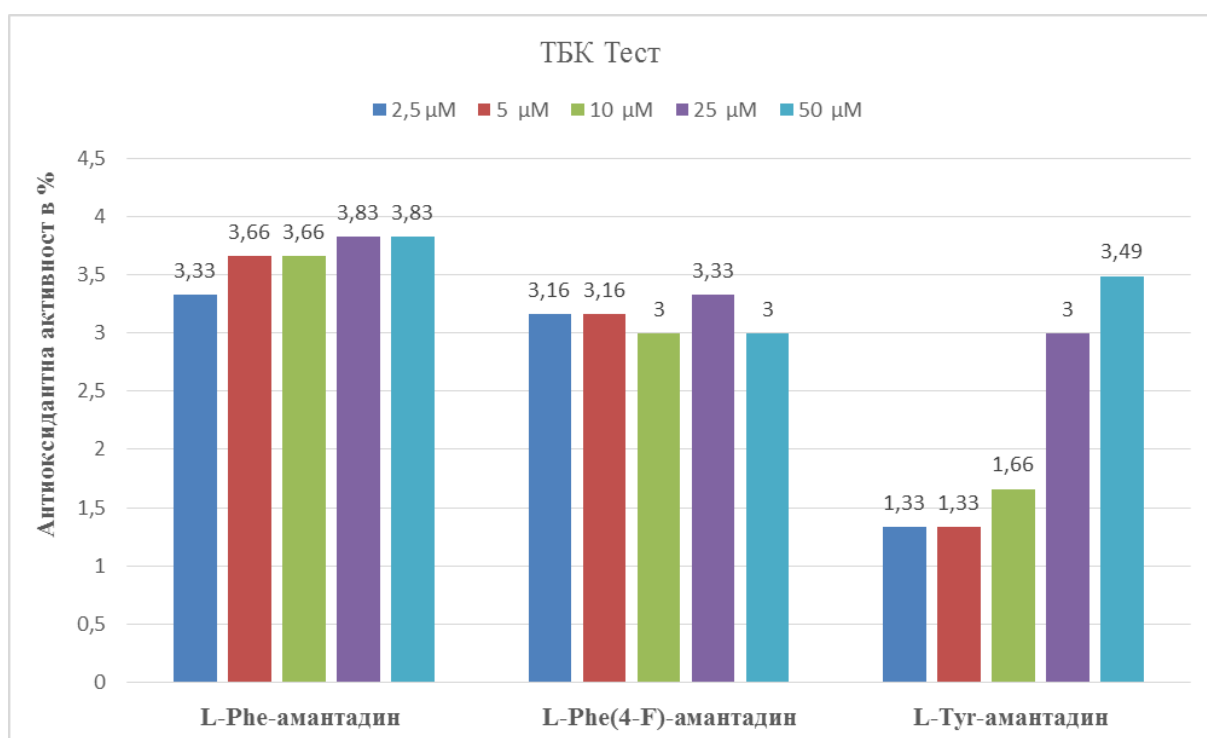
### Измерване на продукцията на хидроксилни радикали

Метод: Използван беше метода на Halliwell et al. (1988) - ТБК тест

Измереното количество на тиобарбитурова киселина - реагиращ материал, получено в резултат на деградацията на дезоксирибозата, служи като мярка за продукция на  $\text{HO}^\bullet$  радикали (Схема 23).

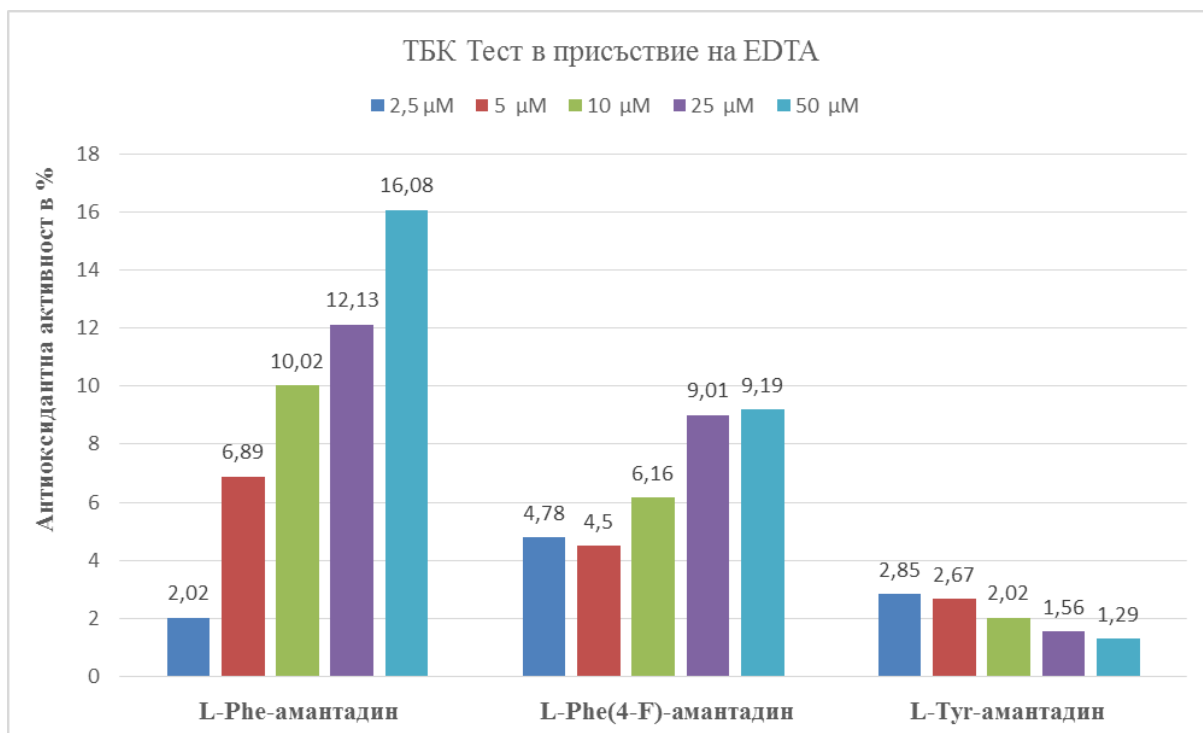


**Схема 23.** Взаимодействие на хидроксилен радикал с дезоксирибоза и последващата реакция на получения малонов диалдехид с ТБК до продукт с  $\lambda_{\text{max}} = 532 \text{ nm}$



**Фиг. 33.** Антиоксидантната активност ТБК тест

Дезоксирибозният тест (измереното количество на тиобарбитурова киселина в присъствие на EDTA) беше използван, за да се определи хелаторен или „scavenger“ потенциал имат изследваните амиди. Този тест е базиран на способността на дезоксирибозата да свързва желязни йони. Те, свързвайки се с тази детекторна молекула в присъствие на  $\text{H}_2\text{O}_2$  спонтанно генерират  $\text{HO}^\bullet$  радикали на мястото на свързване [199]. Ако тестваната молекула има по-висок афинитет на свързване с желязото отколкото детектора (т.е. проявява хелаторни свойства и то по-силни от тези на дезоксирибозата), тя може да протектира детекторната молекула, поемайки увреждането върху себе си. Степента на защита зависи от съотношението между концентрациите на субстанцията и детектора. В присъствие на хелатор (в случая етилендиаминтетраоцетна киселина), обаче, последният ще взаимодейства с металния йон и по този начин ще предотврати свързването му с молекулата на дезоксирибозата. Така  $\text{HO}^\bullet$  радикалите, генерирани от реакцията между  $\text{Fe}^{2+}$  - EDTA и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ще имат равен достъп до всички компоненти на реакционната среда, включително дезоксирибозата. Намаляването на степента на деградация на детекторната молекула ще се основава на „scavenger“- свойствата на изследваното вещество.

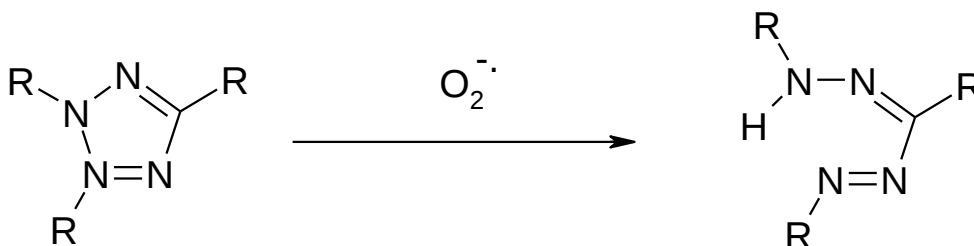


**Фиг. 34.** Антиоксидантната активност ТБК тест с EDTA

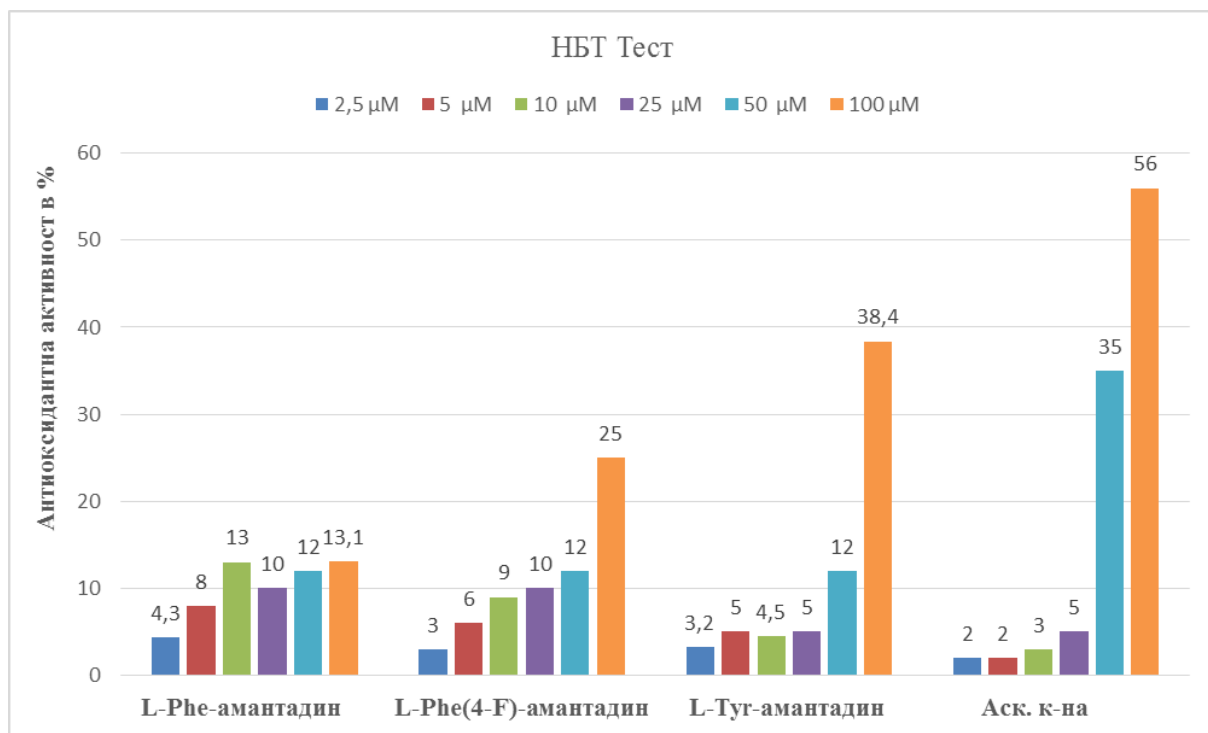
### Измерване на продукцията на супероксидни радикали

Метод: НБТ тест

НБТ (нитроблу тетразол) тестът е метод за определяне „scavenger” ефекта на различни вещества, т.е. дали изследваните вещества са уловители на  $O_2^{\cdot-}$ . Супероксидните анион радикали се генерират фотохимично чрез използване на живачна лампа.



**Схема 24.** Редукция на тетразол до формаза



**Фиг. 35.** Антиоксидантната активност НБТ тест

От проведените тестове можем да заключим, че изследваните съединения не показаха антиоксидантна активност, дължаща се вероятно на химичната им стабилност.

## 4. ИЗВОДИ

1. Синтезирани са пет нови аналози на амантадин - с неприродната аминокиселина Phe(4-F)-ОН и с природните аминокиселините Tyr, Phe, Val и Ala;

- ✓ модифицирана е аминогрупата на амантадиновите производни с Tyr, Val и Ala с гуанидино група. За гуанидиращ агент е използван 1*H*-пиразол-1-карбоксамидин.

2. Синтезирани са девет нови аналози на римантадин - с неприродните аминокиселини D-Phe(4-F)-ОН и L-Phe(4-F)-ОН и природните аминокиселините - Phe, Val, Leu, Ile, Gly, Ala и  $\beta$ -Ala;

- ✓ модифицирана е аминогрупата на римантадиновите производни с Tyr, Ala и  $\beta$ -Ala с гуанидино група. За гуанидиращи агенти са използвани 1*H*-пиразол-1-карбоксамидин и N,N'-ди-Вос-1*H*-пиразол-1-карбоксамидин.

3. Изследвана е химичната стабилност на част от новите аналози на амантадин с L-Phe(4-F)-ОН, Phe и Tyr при pH=1 и pH=7.4. Получените резултати показват висока стабилност на новосинтезираните съединения, която е в интервала от 52 до 218 часа.

4. Изследвана е противовирусна активност спрям грипен вирус щам A/H3N2, щам Hong Kong/68 *in vitro* на новите аналози на амантадин и римантадин и е установено:

- ✓ аналозите на амантадин с аминокиселините Phe и L-Phe(4-F)-ОН проявяват най-висока активност, но тя е по-ниска от тази на изходния амантадин в същия концентрационен порядък. Останалите аналозите са неактивни.
- ✓ гуанидираните амантадинови аналози са с ниска токсичност, но проявяват ниска активност.
- ✓ при производните на римантадина най-висока активност показва производното с аминокиселината Gly, съчетана с ниска цитотоксичност. Неговата активност е около 3 пъти по-висока от тази на амантадина.
- ✓ гуанидираните аналози на римантадина са с ниска токсичност, но проявяват противогрипна активност по-ниска от тази на амантадина.

5. Изследвана е противовирусна активност спрямо грипен вирус A/H3N2, щам Aichi *in vitro* на някои от новите аналози на римантадин и е установено:

- ✓ повечето аналози проявяват високата цитотоксичност и не проявяват противогрипна активност, а най-обещаващият от гледна точка на обема на неговата молекула аналог, аланинил-римантадинът проявява умерена активност, но тя е значително по-ниска от тази на използвания като стандарт амантадин.

6. Изследвана е *in vivo* (плъхове и мишки) активността на тирозинил-амантадин, фенилаланил-(4-F)-амантадин срещу невродегеративни заболявания (анти-паркинсон) и е установено:

- ✓ тирозинил-амантадинът не предизвика явни симптоми на интоксикация и притежава терапевтичен индекс около 20, при възприета за ED<sub>50</sub> за 320 mg/kg.
- ✓ тирозинил-амантадинът проявява позитивен ефект при ригидност на мускулатурата, съпровождаща Паркинсоновата болест и улеснява процеса на хабитуация към непозната околна среда.
- ✓ фенилаланил-(4-F)-амантадин и тирозинил-амантадин удължават значимо хексобарбиталния сън.

7. Изследвана е антиоксидантната активност на фенилаланил(4-F)-амантадин, тирозинил-амантадин и фенилаланил-амантадин, и е установено, че тя е незначителна.

**Направен е опит за установяване на зависимости „химичен строеж – биологична активност“, при което се оказа:**

- ✓ Използването на алифатни аминокиселини като заместители в молекулата на амантадина не оказва влияние върху противовирусната активност. Производните, които проявяват най-висока активност (Phe-амантадин и L-Phe(4-F)-амантадин) показват, че ароматния пръстен е граничната по обем структура, която вероятно е в състояние да проникне в М2-йонния канал, както и че въвеждането на електроноакцепторен заместител (L-Phe(4-F)-ОН) в структурата не повлиява активността.
- ✓ Използване на алифатни и ароматни аминокиселини като заместители в молекулата на римантадина не оказва съществено влияние върху противовирусната активност, както и замяната на  $\alpha$ - с  $\beta$ -аминокиселина ( $\alpha$ -Ala-римантадин и  $\beta$ -Ala-римантадин), което показва, че ограничаването на конформационната свобода на молекулата води до негативен ефект и намаляване на противовирусната активност. Единствено Gly-римантадина проявява висока активност (3 пъти по-висока от тази на амантадина), съчетана с ниска цитотоксичност. Производното съдържа аминокиселина без странична верига. Вероятно нейната малка по обем структура позволява лесно да влезе в М2-йонния канал и да повлияе репликацията на вируса.
- ✓ Гуанидиране на аминокгрупата на производните на амантадина и римантадина не оказва влияние върху противогрипна активност, което показва, че нарастване на обема на молекулата води до намаляване на възможността за проникване в М2-йонния канал, а от там и до намаляване на активността.
- ✓ Съединенията на амантадина с ароматни аминокиселини, проявяващи противовирусна активност, имат висок антипаркинсонов ефект и се оказват най-стабилни при рН, съответстващо на това във гастроинтестиналния тракт;
- ✓ Бъдещи изследвания *in vivo* ще изяснат възможността те да бъдат приложени като **ПРЕДЛЕКАРСТВА**.

## 5. ПРИНОСИ

1. Синтезирани са 20 нови, неописани в литературата аминокиселинни и техни гуанидирани аналози на противовирусните препарати амантадин и римантадин.

2. Синтезираните производни на амантадина и римантадина са изследвани за противогрипна активност спрямо A/H3N2, щам Hong Kong/68.

3. Изследвана е химичната стабилност на част от новите аналози на амантадин при рН=1 и рН=7.4.

4. Синтезирани са производни на амантадина, които са изследвани за невродегенеративни заболявания.

## Приложения

### Списък на научните публикации, свързани с дисертационния труд:

1. **Chayrov, R.**, Rizova, S., Galabov, A. and Stankova, I., (2014) Synthesis and antiviral activity of the arginine derivatives of influenza virus drugs. in: *Peptides, Proceedings of the 33rd European Peptide Symposium, 31 August – 5 September, 2014*, Sofia, Bulgaria (Emilia Naydenova, Tamara Pajpanova, Dancho Danalev (Editors)), pp. 145-145.

2. **Chayrov, R.**, Veselinova, V., Markova, V., Mukova, L., Galabov, A. and Stankova, I., (2015) Synthesis and antiviral activity of some amino acids derivatives of influenza virus drugs. *Chemistry, Bulgarian Journal of Science Education*, **24**, 348-354. (SJR **0.190**)

3. **Chayrov, R.**, Mukova, L., Galabov, A., Mitrev, Y. and Stankova, I., (2017) Amantadine analogues – synthesis and biological activity. *Bulgarian Chemical Communication (in press)* (IF: **0.349**)

### Резултатите от дисертацията са докладвани на следните научни форуми:

1. Chemical stability of esters of acyclovir with amino acid and cholic acids, Kiril Chuchkov, **Radoslav Chayrov**, and Ivanka Stankova.

*32<sup>nd</sup> European Peptide Symposium, 2-7 September 2012 – Athena, Greece;*

2. Synthesis and antiviral activity of the arginine derivatives of influenza virus drugs, **Radoslav Chayrov**, Spaska Rizova, Vasilka Markova, Angel Galabov and Ivanka Stankova.

*33<sup>rd</sup> European Peptide Symposium, 31 August – 05 September 2014 – Sofia, Bulgaria;*

3. Synthesis and antiviral activity of the some amino acids derivatives of influenza virus drugs, **Radoslav Chayrov**, Vesela Veselinova, Vasilka Markova, Luchia Mukova, Angel Galabov and Ivanka Stankova.

*6<sup>th</sup> International Conference of FMNS (FMNS 2015), 10-14 June 2015, Blagoevgrad, Bulgaria*

4. Rimantadine analogues - synthesis and influenza viral activity, **Radoslav Chayrov**, Vesela Veselinova, Vasilka Markova, Angel Galabov and Ivanka Stankova .

*RICT 2015 Drug Discovery and Selection Understanding Targets and Mechanisms, 51st International Conference on Medicinal Chemistry, 1-3 July 2015 – Avignon, France*

5. Amantadine analogues - synthesis and biological activity, **Radoslav Chayrov**, Lucia Mukova, Angel Galabov and Ivanka Stankova.

*7th Bulgarian Peptide Symposium, 10-12 June 2016, Blagoevgrad, Bulgaria*

6.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectral assignments of the fifteen systematically modified adamantane derivatives, Yavor Mitrev, **Radoslav Chayrov** and Ivanka Stankova.

*7th International Conference of FMNS (FMNS 2017), 14-18 June 2017, Blagoevgrad, Bulgaria*

#### **Списък на научните публикации извън дисертационния труд:**

1. **Chayrov R.**, Argirova R. and Stankova I. (2008). Esters of purine nucleosides (abacavir) with natural and unnatural amino acids-synthesis and antiviral activity. *In Journal of peptide science* ,**14**, 8, pp. 158-158.

2. Manev S., Dimitrova V., Vakarelska M., **Chayrov R.**, Avramov G., and Arsova D. (2009) Tasks in “BULGARIAN ARITHMETIC” issued in 1856—one example for forming key competencies. MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCE, 251.

3. Chuchkov K., **Chayrov R.** and Stankova I. G. (2012). Chemical stability of esters of acyclovir with amino acid and cholic acids. *In Journal of peptide science* ,**18**, pp. S152-S152.

4. Stankova I., Stanoeva K., Hinkov A., Alexiev I., Genova-Kalou P., **Chayrov R.**, and Argirova R. (2012). Amino acid and peptide esters of abacavir: synthesis and activity against human immunodeficiency virus type 1 in cell culture. *Medicinal Chemistry Research*, 21(12), 4053-4059.

#### **Списък със забелязани цитати:**

- Stankova, I., Stanoeva, K., Hinkov, A., Alexiev, I., Genova-Kalou, P., **Chayrov, R.** and Argirova, R. (2012). Amino acid and peptide esters of abacavir: synthesis and activity against human immunodeficiency virus type 1 in cell culture. *Medicinal Chemistry Research*, 21(12), 4053-4059.
- 1. Iglesias, L. E., Lewkowicz, E. S., Medici, R., Bianchi, P., & Iribarren, A. M. (2015). Biocatalytic approaches applied to the synthesis of nucleoside prodrugs. *Biotechnology advances*, 33(5), 412-434.
- 2. Valino, A. L., Iribarren, A. M., & Lewkowicz, E. (2015). New biocatalysts for one pot multistep enzymatic synthesis of pyrimidine nucleoside diphosphates from readily available reagents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 114, 58-64.
- 3. Zhu, H., Shi, J., Huang, Z., Lv, L., & Duan, J. (2015). Structures, spectroscopic analysis, herbicidal activities and enamine–aminone tautomerism of new  $\beta$ -diketone derivatives modified with glycylglycine methyl ester. *Journal of Molecular Structure*, 1089, 170-177.

#### **Участие в проекти:**

1. „Химични модификации на аминокиселини и невраминидазни инхибитори“ SRP A11/14
2. „Гуанидино и азометинови производни на противогрипни агенти“ SRP-A19/15
3. „Дизайн на нови аминокиселини производни и техни метални комплекси с потенциална биологична активност“ RP-A9/16
4. „Аминокиселини и пептидни аналози на адамантан и АСЕ-инхибитори: синтез и биологична активност“.

#### **Награди:**

33-ти ЕВРОПЕЙСКИ ПЕПТИДЕН СИМПОЗИУМ – Награда за най-добър постер.

## СЪДЪРЖАНИЕ

|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. УВОД.....                                                                                       | 6  |
| 2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....                                                                               | 8  |
| 3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....                                                                      | 9  |
| 3.1. Подходи при създаването на лекарствени средства вируси.....                                   | 9  |
| 3.2. Методи за органичен синтез.....                                                               | 10 |
| 3.3. Аналоги на амантадин.....                                                                     | 11 |
| 3.3.1. Синтез на фенилаланил(4-F)-амандатин.....                                                   | 12 |
| 3.3.2. Синтез на тирозинил-амандатин.....                                                          | 13 |
| 3.3.3. Синтез на фенилаланил-амандатин.....                                                        | 14 |
| 3.3.4. Синтез на валил-амантадин.....                                                              | 14 |
| 3.3.5. Синтез на аланил-амантадин.....                                                             | 15 |
| 3.4. Аналоги на римантадин.....                                                                    | 16 |
| 3.4.1. Синтез на R/S-фенилаланил(4-F)-римантадин.....                                              | 16 |
| 3.4.2. Синтез на тирозинил-римантадин.....                                                         | 17 |
| 3.4.3. Синтез на фенилаланил-римантадин.....                                                       | 18 |
| 3.4.4. Синтез на валил-римантадин.....                                                             | 18 |
| 3.4.5. Синтез на левцинил-римантадин и изолевцинил-римантадин.....                                 | 19 |
| 3.4.6. Синтез на глицил-римантадин.....                                                            | 20 |
| 3.4.7. Синтез на аланил-римантадин хидрохлорид.....                                                | 21 |
| 3.4.8. Синтез на $\beta$ -аланил-римантадин.....                                                   | 22 |
| 3.5. Гуанидиране на някои амантадинови производни.....                                             | 23 |
| 3.5.1. Гуанидиране на тирозинил-амандатин.....                                                     | 24 |
| 3.5.2. Гуанидиране на валил-амандатин.....                                                         | 25 |
| 3.5.3. Гуанидиране на аланил-амандатин.....                                                        | 25 |
| 3.6. Гуанидиране на някои римантадинови производни.....                                            | 26 |
| 3.6.1. Гуанидиране на тирозинил-римантадин.....                                                    | 27 |
| 3.6.2. Гуанидиране на аланил-римантадин.....                                                       | 27 |
| 3.6.3. Гуанидиране на $\beta$ -аланил-римантадин.....                                              | 28 |
| 3.7. Химична стабилност на някои амантадинови производни.....                                      | 29 |
| 3.8. Биологична активност на новосинтезираните аминокиселинни амиди на амантадин и римантадин..... | 36 |
| 3.8.1. Противовирусна активност in vitro.....                                                      | 36 |

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.8.2. Изследвания, свързани с антипаркинсонова активност in vivo..... | 39 |
| 3.8.3. Антиоксидантна активност.....                                   | 47 |
| 4. ИЗВОДИ.....                                                         | 53 |
| 5. ПРИНОСИ.....                                                        | 56 |
| ПРИЛОЖЕНИЯ.....                                                        | 57 |