

ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНИ ТЕХНОЛОГИИ

КАТЕДРА „ОРГАНИЧЕН СИНТЕЗ И ГОРИВА”

инж. Стефан Марчев Димов

**ДИЗАЙН, СТРУКТУРНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ И БИОЛОГИЧНА
АКТИВНОСТ НА ХЕТЕРОАРИЛ СЪДЪРЖАЩИ
ТИЕНОПИРИМИДИНОНИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

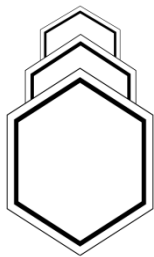
на

ДИСЕРТАЦИЯ

за придобиване на образователната и научна степен „доктор”
по научна специалност 7.3. Фармация (Фармацевтична химия)

Научни ръководители: доц. д-р Анелия Маврова
проф. дхн Владимир Божинов

София, 2017



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНИ ТЕХНОЛОГИИ

КАТЕДРА „ОРГАНИЧЕН СИНТЕЗ И ГОРИВА”

инж. Стефан Марчев Димов

**ДИЗАЙН, СТРУКТУРНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ И БИОЛОГИЧНА
АКТИВНОСТ НА ХЕТЕРОАРИЛ СЪДЪРЖАЩИ
ТИЕНОПИРИМИДИНОНИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на

ДИСЕРТАЦИЯ

за придобиване на образователната и научна степен „*доктор*”
по научна специалност 7.3. Фармация (Фармацевтична химия)

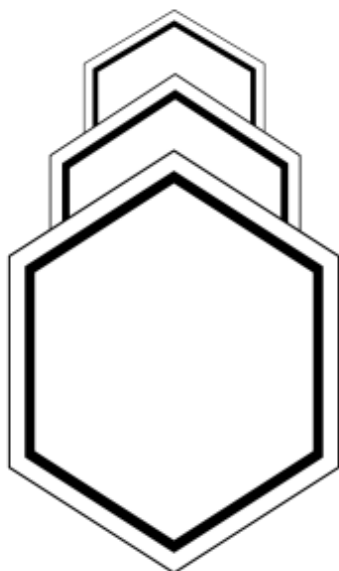
Научни ръководители: доц. д-р Анелия Маврова
 проф. дхн Владимир Божинов

Научно жури: 1. проф. д-р Емилия Найденова – председател, рецензент
 2. проф. д-р Георги Момеков - рецензент
 3. доц. д-р Анелия Маврова
 4. доц. д-р Елена Станоева
 5. доц. д-р Росица Николова

София, 2017

Дисертационният труд е написан на 157 страници, съдържа 67 фигури, 52 схеми и 8 таблици. Цитирани са 360 литературни източника.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на разширения, специализиран научен съвет на научното звено на катедра „Органичен синтез и горива“, състояло се на 7 март 2017 г.



Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 25.07.2017 г. от 11:00 часа в зала 424, сграда „А“ на ХТМУ.

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

Изказвам искрените си благодарности на научните си ръководители:

доц. д-р инж. Анелия Маврова за безрезервната подкрепа, доверие и застъпничество. Изказвам искрено уважение за професионализма, както и вдъхновяващо възхищение за изключителния обем знания. Благодарен съм за напътствията, похватите и знанието, което получих и съм горд и щастлив, че **доц. д-р Анелия Маврова** бе мой научен ръководител.

проф. д-р инж. Владимир Божинов за гласуваното доверие и помощ в професионалното ми развитие. Изказвам почит за професионализмът и възхищение за идеализма и морални ценности, от които взех пример. Благодаря на научният си ръководител за вдъхновението, което ми вдъхна.



По време на обучението ми като докторант в катедра „Органичен синтез и горива“ в ХТМУ–София имах възможността да работя пряко и непряко с редица специалисти, колеги и приятели. Изказвам своите огромни благодарности на:

доц. д-р Деница Янчева от Института по „Органична химия“ на БАН за безвъзмездната помощ в провеждането на теоритичните изчисления, както и за помощта в изготвянето, организацията и оформянето на научната публикация по дисертационния труд.

д-р Мирослав Рангелов от Института по „Фитохимия“ на БАН за бързото и професионално съдействие в провеждането на молекулно docking проучване.

проф. д-р Диана Веселинова от Института по „Експериментална морфология, патология, антропология и музеи“ на БАН за извършените *in vitro* биологични изследвания за противоракова активност.

доц. д-р Димитър Вълчев от катедра „Инфекциозни болести, паразитология и тропическа медицина“ към Медицински университет – гр. Пловдив за направените антипаразитни изследвания.

проф. д-р Деян Маркович и **д-р Йелена Звезданович** от факултета по „Технологии“, **доц. д-р Александър Джорджевич** от катедра „Химия“ на Природо-математическия факултет, **доц. д-р Андрия Смелцерович** от катедра „Химия“ и катедра „Фармация“ на факултета по Медицина и **проф. д-р Гордана Кочич** от института по „Биохимия“ на факултета по Медицина към Нишкия университет (UNNIS) – гр. Ниш, Сърбия, за бързото и професионално проведено на изследвания за ензимна инхибиция.



Изказвам специални благодарности към:

доц. д-р инж. Николай Георгиев от катедра „Органичен синтез и горива“ на Химикотехнологичен и металургичен университет – гр. София за помощта в анализа и форматирането на спектрофотометричните изследвания. Изказвам искрена благодарност за безкористната морална подкрепа, обективни съвети и напътствия за развиване на аналитичната ми мисъл.

гл. ас. д-р инж. Камелия Аничина от катедра „Органичен синтез и горива“ и **доц. д-р инж. Райна Бряскова** от катедра „Полимерно инженерство“ на Химикотехнологичния и металургичен университет – гр. София за духовната подкрепата и получените ценни съвети.

Благодарен съм за огромната подкрепа на моето семейство и моята любима, които бяха неизменно до мен в трудните моменти – помощ без която нямаше да достигна до тук.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) – минимална инхибираща концентрация

SAR (*Structure Activity Relationship*) – връзка структура-активност

EC₅₀ – количествен показател, изразяващ половината от *максимална ефективна концентрация* на лекарство, антияло или др., необходима да предизвика биологичен или биохимичен отговор в даден интервал от време.

IC₅₀ – количествен показател, даващ информация за ефективността на дадена субстанция да инхибира специфичен биологичен или биохимичен процес, изразяващ се в *половината от максималната концентрация* за инхибиране

in vitro (*лат.*) – в епруетка

ROS (*Reactive Oxygen Species*) – реактивните оксидни радикали

CAD (*Caspase Activated DNase*) – дезоксирибонуклеази, активирани от протеазни ензими – *каспази*

ICAD (*Inhibitor of Caspase Activated DNase*) – инхибитори на *каспазно*-активиращите дезоксирибонуклеази

ИЧ (*IR*) – инфрачервена спектроскопия

ATR (*Attenuated total reflection*) – ИЧ спектроскопска техника за анализ в твърдо или течено състояние на пробите върху ATR кристал

¹H ЯМР (*¹H NMR*) – протонен ядрено-магнитен резонанс

ppm (*parts-per million*) – милионна част

J – константа на спин-спиново взаимодействие

p – статистическа вероятност

d – диелектрична константа

DMSO – диметилсулфоксид

DMF – диметилформамид

DMAA – диметилацетамид

AA – оцетна киселина

AN – ацетонитрил

TFA – трифлуороцетна киселина

MTS – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сулфофенил)-2H-тетразолиева сол

TBAB – тетра-*n*-бутиламониев бромид

Kunitz – мерна единица, определяща количеството на дезоксирибунуклеаза *I*, необходимо да предизвиква увеличаване абсорбцията на 1 mg/mL A260 (сперма на съомга) с 0.001 на минута при дължина на вълната (λ) 260 nm, с участието на високо полимеризирана ДНК при 25°C и pH 5.0

TRIS-HCl – *трис*(хидроксиметил)аминометан хидрохлорид

ESIPT (*Excited state intramolecular proton transfer*) – върешномолекулен протонен трансфер

A.U. (*Arbitrary Unit*) – относителна единица за измерване, илюстрираща количествено съотношение на интензитета (или др. променлива) на дадена субстанция към предварително определена референтна стойност (I / I_0)

DFT (*Density functional theory*) – теория за електронната плътност

PDB (*Protein Data Bank*) – протеинна база данни

MOE (*Molecular Operating Environment*) – софтуерен пакет програми, изпълняващи визуализация, симулация и лекарствен дизайн чрез хомоложно моделиране, с използване на молекулни база данни.

DFG (*Asp-Phe-Gly*) – аспаргин-фенилаланин-глицинов аминокиселинен остатък, съдържащ се в повечето протеини от семейството киназите и разположен в активният център на ензима.



ВЪВЕДЕНИЕ

В резултат от развитието на фармацевтичната химия и лекарствения дизайн са установени множество разнообразни структури, притежаващи добра биологична активност. Съществените изисквания в съвременната лекарствена терапия се свеждат до получаването на субстанции, способни да проявяват висока активност и същевременно да притежават ниска токсичност с отсъствие на странични ефекти. Фармакологично атрактивни са тези съединения, притежаващи близка структура до природните продукти. Голям интерес представляват хетероциклите, съдържащи пиримидиново ядро в структурата си, тъй като пурините и пиримидините са основни градивни елементи на азотните бази, изграждащи скелета на ДНК и РНК - тимин, цитозин и урацил и е установено е, че този клас съединения проявяват висока биологична активност което ги прави подходящи за клинично приложение.

Тиено[2,3-*d*]пиримидините са съединения, представляващи фармакологичен интерес, поради сходство им с хиначолоните. Физиологичните ефекти на тиофена наподобяват тези на бензена (биоизостер) като най-често тиофенът проявява по-добри фармакодинамични, фармакокинетични и токсикологични свойства. Това е причината тиенопиримидините да проявяват по-широка биологична активност като антибактериална, противогъбична, аналгетична, адреномиметична, аналгетична, антихипертензивна, противовъзпалителна, антипаразитна, антинеопластична и др. Голям брой тиено[2,3-*d*]пиримидини са изследвани за тяхната антипролиферативна активност. Установено е, че механизмът им на действие включва потискане на различни протеин кинази чрез инхибиране трансмембранните рецептори на растежните фактори като по този начин проявяват специфична противотуморна активност. През последните години е установено, че тиено[2,3-*d*]пиримидините са биоизостери на 4-анилинохиназолините, като на база на клинично приложените хиначолинови противоракови EGFR инхибитори от първо поколение *gefitinib* (IressaTM) и *erlotinib* (TarcevaTM), и второ поколение – *dacomitinib* (PF00299804, PfizerTM), *afatinib* (BIBW2992, Boehringer IngelheimTM), *canertinib* (CI-1033, PfizerTM) са синтезирани редица тиенопиримидини, притежаващи по-висока EGFR инхибираща активност.

Бензимидазоловият хетероцикъл присъства като фармакофор в структурата на много клинично използвани химиотерапевтични агенти и привлича вниманието на изследователите като прекурсор на производни с широк спектър на биологична активност като антивирусна и антихистаминова. Оптимизацията на заместителите в

бензимидазоловия хетероцикъл е довела до създаването на много лекарствени препарати: антихелминтиците - *albendazole*, *mebendazole*, *thiabendazole*; противоязвените инхибитори на протонната помпа - *omeprazole*, *lansoprazole*, *pantoprazole*; антихистамина - *astemizole*; антихипертензивите средства – *candesartan*, *cilexetil* и *telmisartan* и др. Някои 2-аминобензимидазолови производни са проявили инхибираща EGFR активност като *EGF816* (NovartisTM) е във втора фаза на клинични изпитвания.

Развитието на структурно нови класове лекарствени средства, с нов механизъм на действие или оптимизиране на съществуващия, чрез подобряване както на афинитета на свързване, така и спектъра на активност, при запазване на бионаличността и профила на безопасност е от особен интерес в областта на фармацевтичната химия.

През последните години доминира нов подход за дизайн и синтез на лекарствени средства, при който се използва комбинация от два различни активни фрагмента в една молекула. При тази стратегия, всяка част на лекарството е проектирана така, че да се свързва самостоятелно с две различни биологични мишени или да действа синергично.

Предвид отличителните качества на бензимидазолите и тиенопиримидините, свързани с широкият им профил на биологична активност, достъпни методи за получаване и функционализация, интерес би представлявало да бъдат синтезирани и изследвани съединения, с наличие на два фармакофора в структурата, което би позволило по-добро взаимодействие с активните центрове на биологичната мишена, а биоизостеризма им с пурините и пиримидните би довело до по-ниска токсичност.



СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	3
ВЪВЕДЕНИЕ	5
СЪДЪРЖАНИЕ	7
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	9
ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ	11
1. Фармакологичен анализ	11
1.1 Антихелминтна активност	11
1.2 MTS тест	12
1.3 Ензимна инхибиция	12
1.3.1 TBA-MDA тест	12
1.3.2 Дезоксирибонуклеаза I (DNase I) инхибираща активност	13
2. Фотостабилност	14
2.1 Нанасяне на микрофилмите	14
3. Спектрофотометрични изследвания	14
3.1 Изследване възможността за фотоиндуциран протонен трансфер	14
3.2 Изследване възможността за аминок-имино тавтомерия	15
4. Молекулни изчисления	15
5. Молекулен docking	15
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	17
I. Синтез и реакционна способност на тиено[2,3-d]пиримидини	17
1. Синтез на 2-аминотиофени (1-5)	17
2. Синтез на 2-заместени производни на тиено[2,3-d]пиримидин-4-она (6-21)	17
3. Синтез на 2-заместени производни на 4-амино-тиено[2,3-d]пиримидина (22-46)	19
4. Синтез на 5,6,7,8-тетрахидротиено [2,3-d]пиримидин-4-фталимиди (48-59)	21
5. Синтез на глицин-съдържащи тиено[2,3-d]пиримидин-4-они (60, 61)	25
6. Синтез на 3-етил-тиено[2,3-d]пиримидини, съдържащи 1,3,5-тиадиазолов хетероцикл (62-76)	26
7. Синтез на 2-заместени-1H-бензимидазоли (77-81, 85-87)	27
8. Синтез на N, N'-дисубституирани бензимидазоли (82-86, 91, 91)	28
9. Синтез на 5,6,7,8-тетрахидротиено[2,3-d]пиримидин-4-они, съдържащи бензимидазол (92-94) ..	29
10. Синтез на N, N'-дисубституирани бензимидазоли, съдържащи тиено[2,3-d]пиримидини (95-107)	31
II. Биологична активност и структурни изследвания	33
1. Антихелминтна активност	33
2. Антинеопластична активност	35
3. Антиоксидантна активност	40
4. Фотостабилност	43

5.	<i>SAR анализи</i>	47
6.	<i>Молекулни изчисления</i>	52
7.	<i>Молекулен docking</i>	54
	ИЗВОДИ	59
	ПРИНОСИ	62
	ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ	63



ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Настоящата дисертационна работа има за цел синтеза на нови 2-, 3- и 4-заместени тиено[2,3-*d*]пиримидинови производни, използвайки етил 2-аминотиофен-3-карбоксилати и 2-аминотиофен-3-карбонитрили като прекурсори. Представители на всяка серия от получените съединения да бъдат подложени на фармакологичен скрининг, за установяване на тяхната антипролиферативна, антихелминтна или антиоксидантна активност, и да се извърши тест за твърдофазна фотостабилност на някои от излъчените хитови структури.

За осъществяване на поставената цел са определени следните задачи:

1. Селекция на перспективни структури въз основа на направения литературен обзор и разработване на синтетични методи за техният синтез.
2. Получаване на 2-аминотиофени като прекурсори за синтеза на тиено[2,3-*d*]пиримидини.
3. Синтез на серия от 2-субституирани тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-они и тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-амини.
4. Синтез на тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-они и тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-амини, с цел генериране на бифармакофорни системи чрез въвеждане на 1*H*-бензимидазолов, фталимидов и 1,3,4-тиадиазолов фрагмент.
5. Синтез на 2-хлорометил-1*H*-бензимидазол и серия 5(6)-заместени 1*H*-бензимидазол-2-тиоли, и 1*H*-бензимидазол-2-оли като изходни продукти за получаване на нови тиенопиримидини.
6. Получаване на нови 5(6)-заместени *N,N'*-(2-оксо-1*H*-бензимидазол-1,3(2*H*)-диил)дипропионитрили и *N,N'*-(2-тиоксо-1*H*-бензимидазол-1,3(2*H*)-диил)дипропионитрили като прекурсори за синтеза на нови бис-тиено[2,3-*d*]пиримидини, съдържащи бензимидазолов мост.
7. Експериментално изследване на някои от новополучените тиено[2,3-*d*]пиримидинови производни за антипаразитна, антиоксидантна и антинеопластична активност.
8. Определяне на твърдофазна фотостабилност на излъчени хитови съединения.

9. Теоритично SAR изследване на някои от експериментално тестваните съединения, както и *docking* проучване на най-перспективните противоракови тиено[2,3-*d*]пиримидини.

Общата реакционна схема на всички проведени синтези е представена на Схема 1.

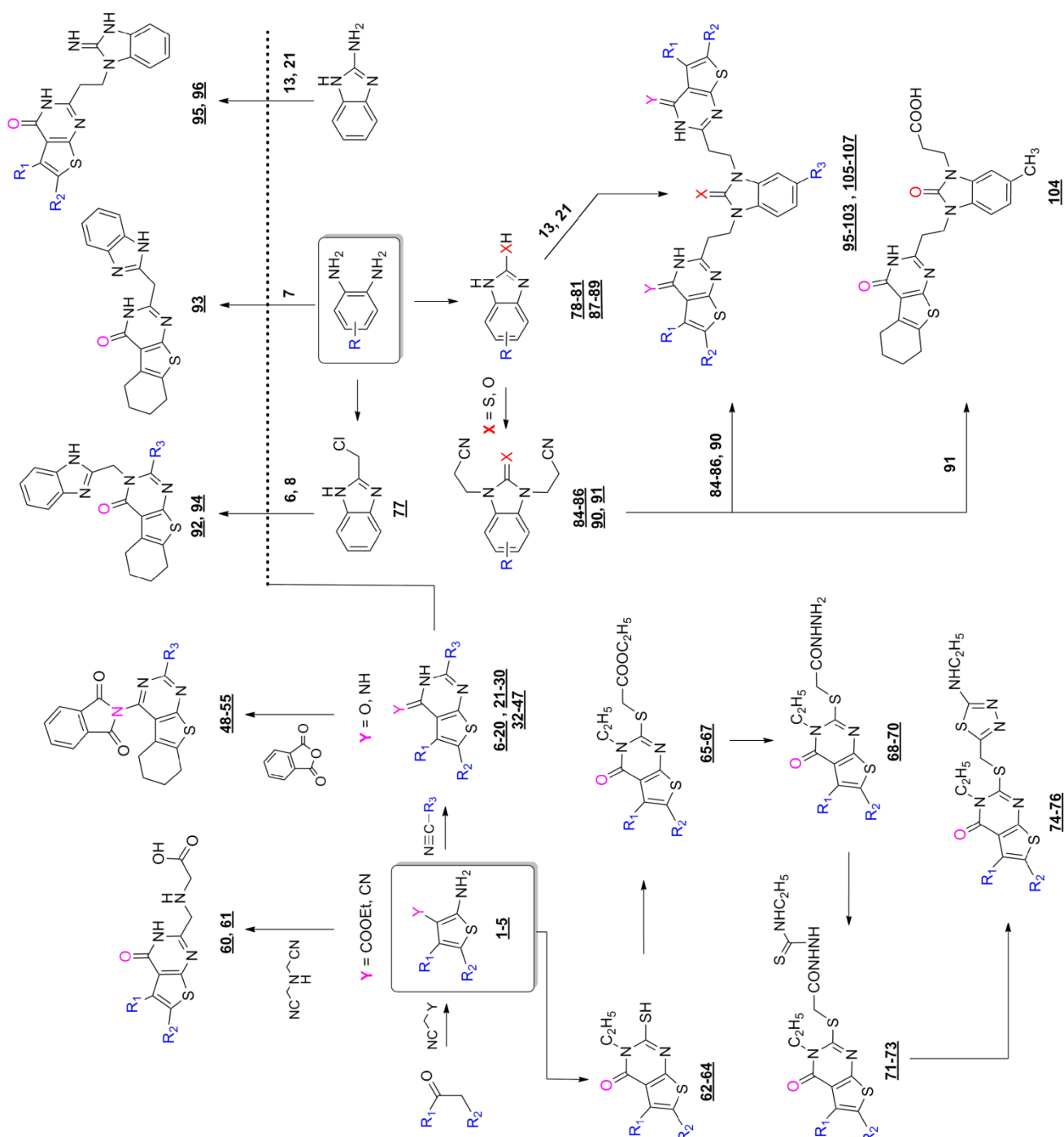


Схема 1

ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ

За разработването на дисертационият труд са използвани, без допълнително пречистване, следните търговски продукти: 2-бутанон (*Merck*), циклохексанон (*Fluka*), етил ацетоацетат (*Merck*), етил цианоацетат (*Fluka*), фенилацетонитрил (*Merck*), 2-цианопиридин (*Alfa Aesar*), 3-цианопиридин (*Alfa Aesar*), 4-цианопиридин (*Alfa Aesar*), 2-морфолинацетонитрил (*Fluka*), 3,4,5-метоксибензонитрил (*Fluka*), дифенилацетонитрил (*Fluka*), формаамид (*Merck*), пропионитрил (*Fluka*), 4-нитрофенилацетонитрил (*Fluka*), 3-хлорофенилацетонитрил (*Fluka*), 3-(трифлуорометил)бензонитрил (*Fluka*), 3-хлоропропионитрил (*Merck*), малонитрил (*Alfa Aesar*), акрилонитрил (*Merck*), имино диацетонитрил (*Merck*), 1,2-фенилендиамин (*Merck*), 4-хлоро-1,2-фенилендиамин (*Merck*), 4-метил-1,2-фенилендиамин (*Merck*), 4-нитро-1,2-фенилендиамин (*Alfa Aesar*), хлороцетна киселина (*Merck*), етил хлорацетат (*Merck*), хидразин хидрат (*Merck*), фталов анхидрид (*Fluka*), въглероден дисулфид (*Alfa Aesar*), етил изотиоцианат (*Merck*), тетрабутиламониев бромид – ТВАВ (*Merck*) и 2-аминобензимидазол (*Merck*). Всички използвани неорганични вещества и органични разтворители са чисти за синтез или анализ (*Macron*, *Merck*). Температурите на топене (Т.т.) са определени като фазов преход, от твърдо към течено състояние, при атмосферно налягане, на микроскопска нагревна масичка *Boetius PHMK 5* (*Kofler*), в мерна единица градус целзии $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$. Чистотата на всички получени съединения, както и коефициентите на задържане (R_f), са определени върху плаки силикагел F_{254} или Al_2O_3 60 (*Merck*, 0.2 mm). ИЧ-спектрите са снети в таблетка KBr на спектрофотометър *Varian Scimitar 1000* или снети посредством ATR на спектрофотометър *Bruker Equinox 55*. Всички ^1H -ЯМР спектри са снети на спектрометър *Bruker Avance DRX 250* (*Bruker*, *Faalanden*, *Switzerland*), както и на *Bruker Avance AV 600* (*Bruker*, *Faalanden*, *Switzerland*). Химичните отмествания са изразени по отношение на тетраметилсилан (TMS) и са представени в δ (ppm). Спектралните данни са обработени със софтуер *MestReNova v6.0.2-5475* (© 2009 *Mestrelab Research S.L.*).

1. Фармакологичен анализ

1.1 Антихелминтна активност

Паразитологичните фармако-терапевтични изследвания *in vitro* за антитрихинелозна активност са извършени съгласно метода на *Campbell* [1, 2]. Използвани са декапсулирани ларви на *Trichinella spiralis*, по 100 екземпляра за 1 mL физиологичен разтвор. Съединенията се разтварят в DMSO по 100 $\mu\text{g/mL}$ и 250 $\mu\text{g/mL}$.

Пробите се инкубират във "влажна камера" с термостат, при температура 37°C. Контролното микроскопско наблюдение за жизнеспособност се извършва на 24 часа и 48 часа след третирането, с помощта стереомикроскоп МВС-9 (Русия).

1.2 MTS тест

Съединенията се разтварят в DMSO, с концентрация на разтвора 4 mg/mL. Изследването се извършва чрез разреждане на стартовия разтвор в съотношение 1:10, 1:100, 1:1000 и 1:10.000. Проби от клетки, култивирани в немодифицирана среда, служат като контрола. След 24 часова инкубация на пробите, се извършва MTS колориметричен анализ. Ямковите плаки се обработват с разтвор на MTS и се инкубират за 2 часа при 37°C под 5% въглероден диоксид, и 95% атмосферен въздух. Абсорбцията на всяка ямка се отчита при $\lambda = 490 \text{ nm}$, с помощта на автоматичен четец за микроплаки "Tecan" (Австрия). Представените графики за жизнеспособност (%*Vitability*) са генерирани, при използването на софтуер Microsoft Excel v14.0.6023.1000 (©2010 Microsoft Corporation).

1.3 Ензимна инхибиция

1.3.1 TBA-MDA тест

За установяване стадия на *липидната пероксидация* (ЛП), както и процеса на инхибиране на изследваните съединения, е използван TBA-MDA (*тиобарбитурова киселина-малондиалдехид*) анализ [3, 4].

За целта на *in vitro* анализа е използвано говеждо мляко, съдържащо ензима *ксантиноксидазна* (ХО) (Sigma-Aldrich). Инхибиращата ХО активност е установена спектрофотометрично, чрез измерване количеството на образувана пикочна киселина при $\lambda = 293 \text{ nm}$.

Изследването е проведено в серия от кювети с общ обем от 2150 μL като реакционната смес на пробите е приготвена по следния начин:

1. *Проби за изследване (скрининг)* – съдържат 0.01 Kunitz единици ензим ХО, изследваният инхибитор, разтворен в DMSO (крайната концентрация на DMSO в пробата е 4.65% [v/v]), 232.5 μM ксантин (Serva) и 46.5 mM TRIS-HCl буфер (pH 7.8);

2. *Контролни проби на средата* – съдържат същото количество ХО, необходимото количество DMSO, ксантин и TRIS-HCl буфер;

Кореспондиращите *празни проби* са приготвени по идентичен на *пробите* за *скрининг* начин (1 и 2).

Пробите се инкубират при 37°C в продължение на 15 минути, след което се добавя 100 μL перхлорна киселина. Степента на ензимно инхибиране (%) е определена чрез измерване на разликата в абсорбцията, свързана с образуването на пикочна киселина. Тя се изчислява като процентно изменение на контролните проби, съдържащи съответното количество DMSO (2), които отразяват единствено въздействието на разтворителя. Крайната концентрация на DMSO от 4.65% (v/v) не оказва влияние върху анализа. Всички проби са изследвани за ХО инхибираща активност при концентрация 150 μM . Съединенията, показващи инхибираща активност по-висока от 50% при тази концентрация, са тествани в по-широки концентрационни граници, с цел изчисляване на IC_{50} . Като положителна контролна проба е използван *Allopurinol*. Всички експерименти са проведени по три пъти и представените резултати са усреднени [5].

1.3.2 Дезоксирибонуклеаза I (DNase I) инхибираща активност

За целта на *in vitro* анализа е използвана говежда панкреатична DNase I (Sigma-Aldrich). Инхибиращата DNase I активност е установена спектрофотометрично, чрез измерване количеството на образувани киселинно-разтворими нуклеозиди, при $\lambda = 260 \text{ nm}$ [6]. Инхибиращата активност е проследена в серия епруветки, с общ обем на реакционната смес 1040 μL , приготвени по следния начин:

1. *Тестови проби* – съдържащи 80 Kunitz единици ензим DNase I, изследваният инхибитор разтворен в DMSO (крайната концентрация на DMSO в пробата е 3.85% [v/v]), 0.0077% ДНК (Sigma-Aldrich) и 80.77 mM TRIS-HCl буфер (pH 7.8);

2. *Контролни проби на средата* – съдържащи същото количество DNase I, необходимото количество DMSO, ДНК и TRIS-HCl буфер;

Кореспондиращите *празни проби* са приготвени по идентичен на *тестовите проби* начин (1 и 2).

След инкубационния период от 30 минути при температура 37°C, реакцията се спира чрез добавяне на 80 μL перхлорна киселина. Степента на ензимно инхибиране (%) е определена чрез измерване на разликата в абсорбцията, свързана с образуването на киселинно-разтворими нуклеозиди. Тя се изчислява като процентно съотношение на абсорбцията на тестовите проби (1) към абсорбцията на контролните проби (2), които отразяват единствено въздействието на разтворителя. Всички проби са изследвани за DNase I инхибираща активност при концентрация 200 μM . Съединенията, показващи инхибираща активност по-висока от 50% при тази концентрация, са тествани в по-широки концентрационни граници с цел изчисляване на IC_{50} . Като положителна контролна проба е

използван *Кристал виолет* (хексаметил *пара*-розанилин хлорид). Всички експерименти са проведени по три пъти, а резултатите – усреднени.

2. Фотостабилност

Изследванията върху фотодеструкцията са проведени в симулатор на слънчева светлина *SUNTEST CPS* (Heraeus, Германия), снабден с ксенонова лампа (*Hanau*, 1.1 kW, 765 W×m⁻²), при стайна температура. Облъчването на пробите е извършено в твърдо състояние, като за целта изследваните съединения са равномерно нанесени върху плаки с размер 74/27 mm и дебелина на микрофилма 0.05±0.01 mm. Размера на микрофилма е измерен с помощта на винтов микрометър *Feinmesszeugfabrik TGL 15046-1* (0-25±0.01 mm). Абсорбционните спектри на тестваните съединения са снети в разтвор на DMF с концентрация 1×10⁻⁵ mol/L на спектрофотометър *Hewlett Packard 8452A* с разделителна способност 2 nm.

2.1 Нанасяне на микрофилмите

Върху предварително добре почистени и сухи микроскопски стъкла с размер 74/27 mm се нанася 0.2 ml разтвор на TFA, съдържащ 0.03 g от тестваното вещество. След като течността се разнесе равномерно по цялата площ плаката се поставя на предварително нагрята до 55°C повърхност. Нагриването се премахва, след пълната кристализация на филма върху плаката. Плаките се оставят 24 часа на стайна температура, за напълно изсушаване на покритието.

3. Спектрофотометрични изследвания

Абсорбцията в UV-Vis областта е измерена на спектрофотометър *Hewlett Packard 8452A* с разделителна способност 2 nm. Флуоресцентните спектри са снети на флуориметър *Perkin Elmer LS55* с разделителна способност 0.5 nm. Спектралните данни са обработени със софтуер *OriginPro 6.1*.

3.1 Изследване възможността за фотоиндуциран протонен трансфер

Стехиометрията между метални катиони и лигандите в комплекса е определена в метанол (*Macron*, ChromAR HPLC). За целта са използвани аналитично чисти соли Cu(COOMe)₂×H₂O, Co(COOMe)₂×4H₂O, CuCl₂×2H₂O, CoCl₂, SnCl₂×2H₂O и CeCl₃×7H₂O (*Fluka*).

Серията от разтвори се приготвят чрез смесване на двата компонента с равна моларна концентрация от 4×10^{-5} mol/L при съотношения от 1:13 (v/v) до 13:1 (v/v), като на всеки от приготвените разтвори е снет UV абсорбционен спектър.

За провеждане на флуоресцентният анализ са приготвени разтвори на изследваните съединения с концентрации 1×10^{-6} mol/L в метилов алкохол, DMSO, ацетонитрил и бензен (Macron, ChromAR HPLC). За дължина на вълната на възбуждане (λ_{ex}) е избран абсорбционният максимум (λ_{max}) на даденото съединение в съответния разтворител.

3.2 Изследване възможността за аминок-имино тавтомерия

За целта на спектрофотометричния анализ са приготвени разтвори на изследваните съединения с концентрация 1×10^{-6} mol/L в бензен, хлороформ и 100% оцетна киселина (Macron, ChromAR HPLC).

Проведено е титруване като към 2 ml от стандартния разтвор на съответният анализ се прибавят равни порции 100% оцетна киселина, с общ обем от 50 μ L (v/v), 100 μ L (v/v), 150 μ L (v/v) и 200 μ L (v/v). На всеки от приготвените разтвори е снет UV-Vis и флуоресцентен спектър. За дължина на вълната на възбуждане (λ_{ex}) е избран абсорбционният максимум (λ_{max}) на даденото съединение в съответния разтворител.

4. Молекулни изчисления

Построени и енергийно минимизирани са най-вероятните конформери на изследваните молекули (включително тион-тиолен и лактам-лактимен тавтомеризъм) с помощта на софтуер на *Avogadro* [7]. Въз основа на енергийния анализ са избрани най-стабилните конформери и оптимизирани на база на теорията за електронната плътност (DFT). Теоретичните изчисления са извършени с помощта на пакет програми *Gaussian 09* [8]. Геометрията и вибрационните честоти на изследваните молекули са изпълнени чрез градиентна аналитична техника без никакви симетрични ограничения. Резултатите са получени при използване на *B3LYP* (нелокален обмен на *Becke* [8] и корелационните потенциали на *Lee и сътр.* [9]) и 6-311++G** база. Оптимизираните структури са допълнително охарактеризирани чрез аналитични изчисления на хармонични вибрационни честоти на същото ниво.

5. Молекулен docking

Началните молекулни координати на ензима са взети от кристалната структура на мутирал онкогенен домейн на ^{V599E}*B-Raf* киназа в комплекс със *sorafenib* (PDB код:

1UWJ [10]). Инхибиторите са подложени на *docking* като са разположени в най-вътрешния джоб, образуван от сегмента на активиране и *P*-веригата на ^{V599E}*B-Raf*, използвайки МОЕ софтуер [11]. Конформационното търсене за подготовка на лигандите е извършено по метода *LowModelMD*, който изпълнява молекулни динамични пертурбации заедно с нискочестотни вибрационни режими с енергиен интервал от 7 kCal/mol и конформационни ограничения до 1000. Поставянето на конформерите се извършва съгласно метода на ориентиране на избраните фармакофори в положение – *алфа-триъгълник*. За установяване на *docking* конформацията е използван параметър ΔG (енергия на *Гибс*), изчислен с *MMFF94x* силово поле. Използван е графичен софтуер VMD [12] за визуализирането на 3-D фигурите на изградените модели.



РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

I. Синтез и реакционна способност на тиено[2,3-*d*]пиримидини

1. Синтез на 2-аминотиофени (1-5)

Като изходни съединения за целите на нашето изследване са синтезирани 2-аминотиофени, чрез мултикомпонентна кондензация, при използване *втория вариант* на реакцията на *Gewald* [13]. Прекурсори за реакцията са циклохексанон, етил-метил кетон или етил ацетоацетат, сяр, като за получаването на 2-аминотиофен-3-карбоксилати **1-3** е използван етил цианоацетат, а за 2-аминотиофен-3-карбонитрили **4** и **5** – малононитрил. В ролята на катализатор, необходим за активирането на сярата и съответния α -субституиран ацетонитрил, е използван диетиламин в еквимоларно количество. Реакцията се провежда при стайна температура и разбъркване, в среда от етанол.

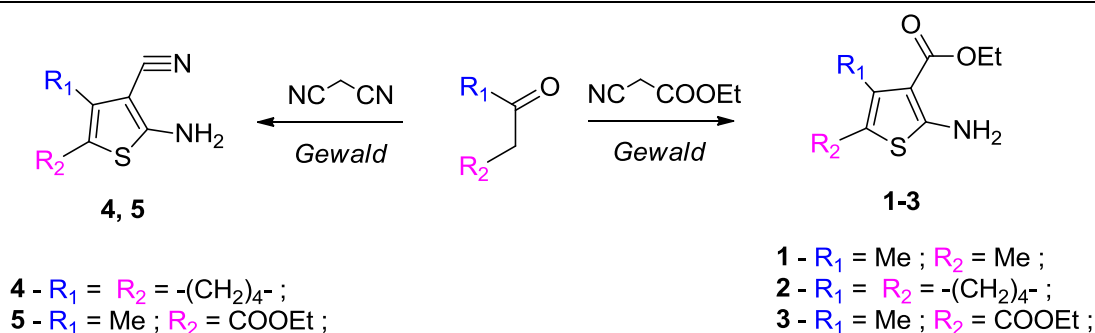


Схема 2 Синтез на 2-аминотиофени 1-6

В първият етап се получава *алкилиден нитрил*, към който в следващия етап се присъединява сярата, при което се получава съответният 2-аминотиофен.

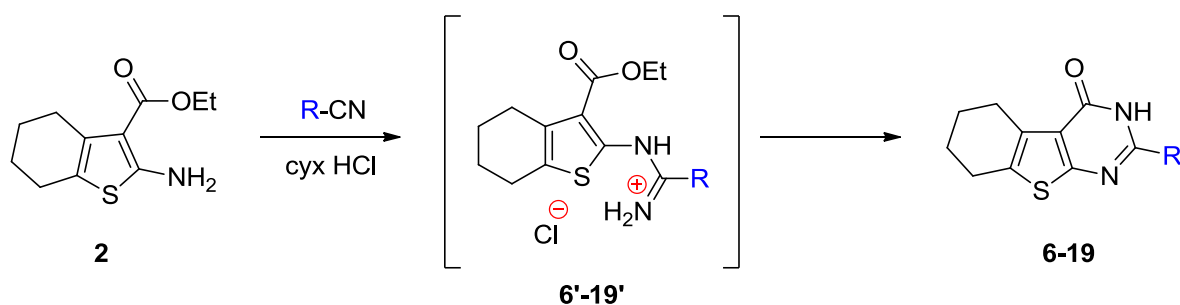
Измерените температури на топене на 2-аминотиофените отговарят на описаните в литературата [13].

2. Синтез на 2-заместени производни на тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-она (6-21)

За осъществяване синтеза на 2-субституирани 5,6,7,8-тетрахидро-тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-они **6-19** бе използвана циклокондензацията на 2-аминотиофен и нитрил.

Като изходни реагенти са използвани *етил 2-амино-4,5,6,7-тетрахидробензотиофен-3-карбоксилат* **2** и серия от ароматни и алифатни нитрили, използвани в двукратен излишък (Схема 3). Реакцията се осъществява в сух диоксан, който осигурява хомогенност на средата, а процеса на циклокондензация се катализира като към разтвора на аминотиофена **2** и нитрила се пропуска сух газ хлороводород в

продължение на 6 часа. След охлаждане, разтворът се неутрализира с 10% (v/v) воден разтвор на NH_4OH , при което се получава целевия продукт.



Съединение	Добив	R	Съединение	Добив	R
6	73		13	85	
7	57		14	92	
8	74		15	50	
9	57		16	64	
10	66		17	93	
11	93		18	88	
12	70		19*	-	

Схема 3 Синтез на 5,6,7,8-тетрахидротиено[2,3-d]пиримидин-4-они; * не получен продукт

При получаването на съединения **7** и **14** като разтворители се използват самите нитрили, взети в многократен излишък. След края на процеса остатъкът от RCN се отдестилира под вакуум, при което се отделя утайка. При използването на ацетонитрил тази утайка се разтваря във вода, подлага се на неутрализация и се филтрува.

За реакцията на циклокондензация чрез продухване със сух газ хлороводород бе създаден ефективен време спестяващ метод, посредством свързване на реакторите последователно (*Error! Reference source not found.*). По този начин се осъществява провеждане на реакцията в два реактора едновременно като е установено, че това не води до понижаване на добива в първият и втория реактор.

Реакцията за получаване на **14** е проведена при еднакви условия чрез продухване на реакционната смес със сух газ *HCl* в система, съдържаща един и съответно два реактора. Крайният продукт от трите реактора е изолиран и добивите от реакцията са сравнени. За осъществяване на експеримента е избран синтеза именно на това съединение, тъй като реакцията води до получаване на чист тиенопиримидин. По този начин се избягва етапа на пречистване, който би довел до отклонение в резултата.

Реакцията на 2,2-дифенилацетонитрил с 2-аминотиофен **2** при съотношение на реагентите 1:1 и 2:1 не доведе до получаване на съединение **19**, а бе изолиран 92% 2,2-дифенилацетамид. Това най-вероятно се дължи на стерично запрещение и следователно, невъзможност за протичане на циклокондензация до тиенопиримидин.

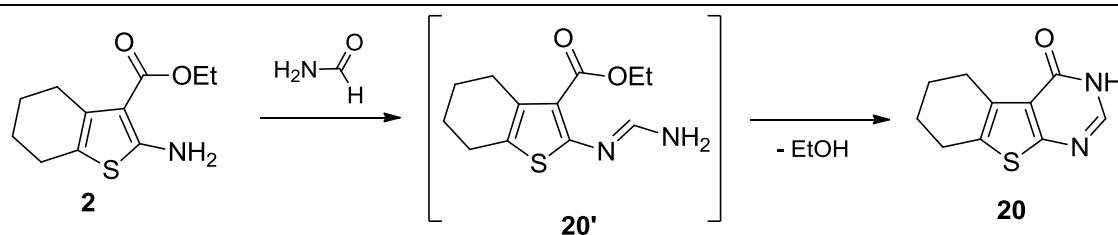


Схема 4 Синтез на 5,6,7,8-тетрахидротиено[2,3-*d*]пиримидин-4-он **20**

За синтеза на незаместен в пиримидиновото ядро тиенопиримидин **20** (90% добив) бе използван друг синтетичен подход, представен на *Схема 4* [14].

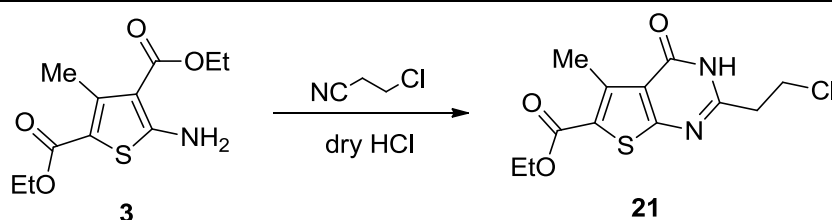


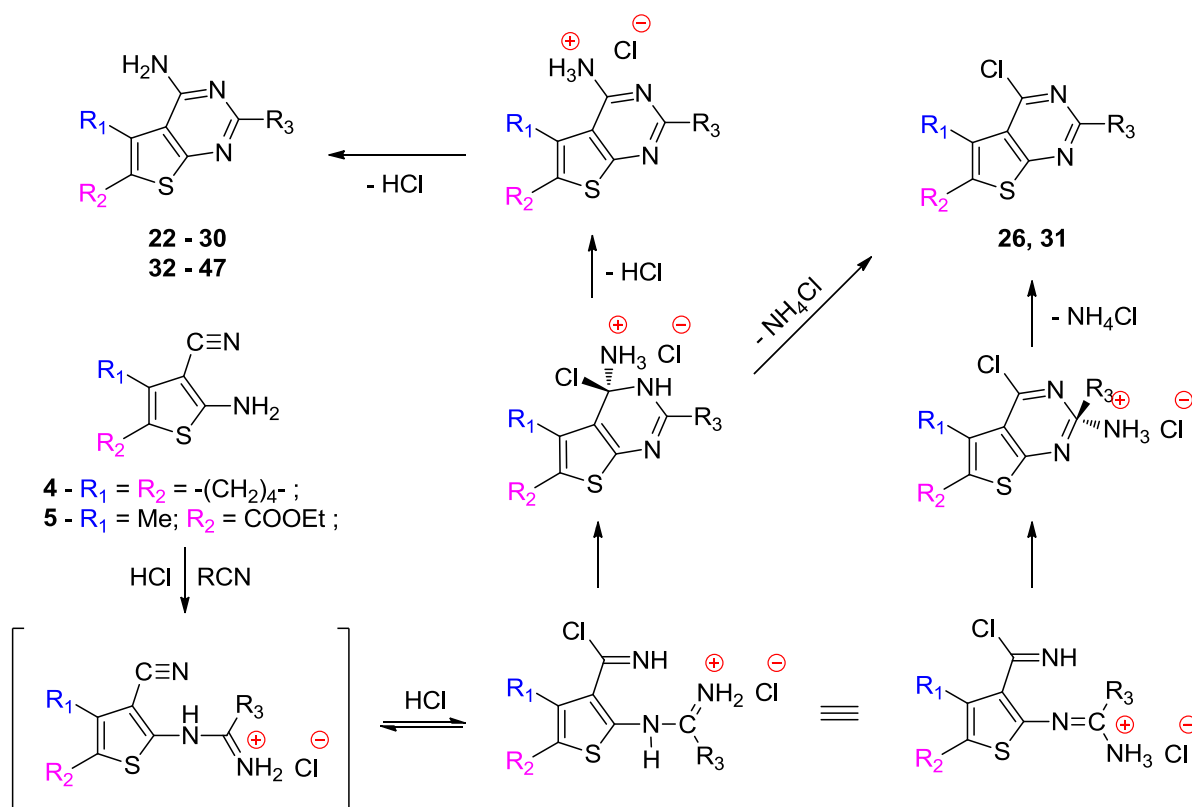
Схема 5 Синтез на 2-(2-хлоретил)-тиено[2,3-*d*]пиримидин **21**, получен с 95% добив

По аналогичен начин на синтеза на съединение **13** е получен етил 2-(2-хлоретил)-5-метил-4-оксо-3,4-дихидротиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилат **21** [15] (*Схема 5*).

Част от синтезираните тиенопиримидини са известни и получените от нас физикохимични данни отговарят на посочените в литературата.

3. Синтез на 2-заместени производни на 4-амино-тиено[2,3-*d*]пиримидина (22–46)

Подобно на алкил 2-аминотиофен-3-карбоксилатите, 2-аминотиофен-3-карбонитрилите също притежават характерният *C–N* фрагмент, необходим за образуване на пиримидиновия цикъл. Разликата в този случай е, че нитрилната група в тиофена води до циклизация на тиенопиримидина до 4-аминотиенопиримидин (*Схема 6*, *Схема 7*).



С-ну	Добив	R ₁	R ₂	R ₃	С-ну	Добив	R ₁	R ₂	R ₃
22	41	-(CH ₂) ₄ ⁻			33	45	-(CH ₂) ₄ ⁻		
23	27	Me	COOEt		34	56	Me	COOEt	
24	52	-(CH ₂) ₄ ⁻			35	81	-(CH ₂) ₄ ⁻		
25	18	Me	COOEt		36	73	Me	COOEt	
26	-	-(CH ₂) ₄ ⁻			37	37	-(CH ₂) ₄ ⁻		
27	31	Me	COOEt		38	16	Me	COOEt	
28	40	-(CH ₂) ₄ ⁻			39	51	-(CH ₂) ₄ ⁻		
					40	27	Me	COOEt	
29	43	-(CH ₂) ₄ ⁻			41	48	-(CH ₂) ₄ ⁻		
30	40	Me	COOEt						
31*	-	-(CH ₂) ₄ ⁻			42	57	-(CH ₂) ₄ ⁻		
32	39	Me	COOEt		43	8	Me	COOEt	
Схема 6 Механизъм на реакцията за синтез на 4-аминотиенопиримидини [16] (горе); Заместители кореспондиращи със синтезираните съединения (долу); * не получен продукт					44	20	-(CH ₂) ₄ ⁻		
					45	9	Me	COOEt	

Синтезът на 4-амино-тиенопиримидини **22-47** (Схема 6) е осъществен по методите, описани в т.2 [16]. Съотношението на реагентите в този случай е 1:1, в разтворител – диоксан.

Както може да се види от Схема 6, механизмът на реакцията се различава от този, с използване на 2-аминотиофен-3-карбоксилат **2**. В този случай синтезът протича преминавайки през повече междинни съединения, при което съществува възможност за образуване на страничен продукт – 4-хлоро-тиенопиримидин. Това е причината да се наблюдават по-ниски добиви при тази серия, в сравнение със серия **6-21**.

При реакциите проведени между 2-амино-4,5,6,7-тетрахидротиофен-3-карбонитрил **4** и съответните нитрили бе установено, че *пиридил*-съдържащите тиенопиримидини **26** и **31** водят до получаване на смес от 4-хлортиенопиримидин и 4-аминотиенопиримидин. Поради голямото количество на страничен продукт, пречистването на **26** бе възможно единствено чрез хроматографско разделяне. Съединение **31** не бе изолирано.

Измерените температури на топене на известните тиенопиримидини отговарят на описаните в литературата.

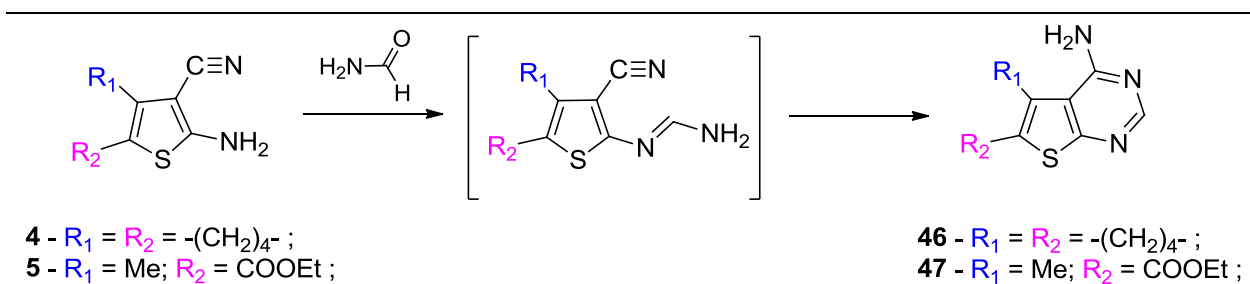


Схема 7 Синтез на 4-аминотиено[2,3-*d*]пиримидини **46** и **47**

4. Синтез на 5,6,7,8-тетрахидротиено [2,3-*d*]пиримидин-4-фталимиди (**48-59**)

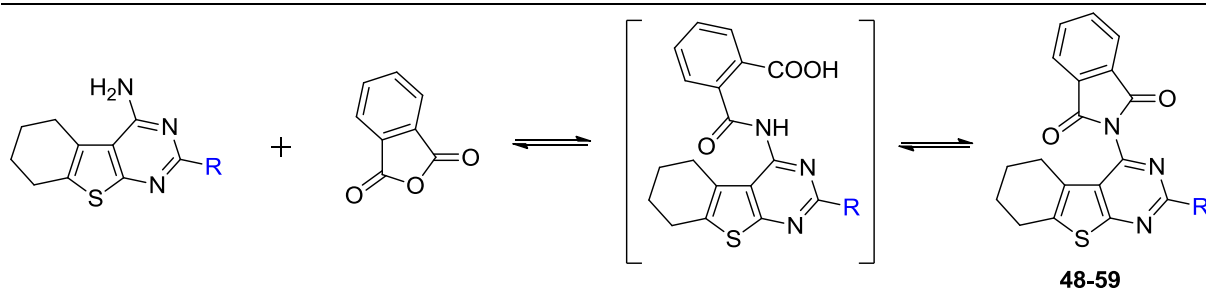
Създаването на бифармакофорни системи представлява голям интерес за фармацевтичната химия, поради възможността, която предлагат за подобряване на фармакологичната активност спрямо отделни ензимни системи, взаимодействайки от различни места с тях или чрез поява на синергизъм между двата фармакофора.

В литературата са познати редица *N*-арил и пиримидин заместени производни на фталимида, притежаващи противотуберкулозна [17, 18], антиконвулсивна [19-21], аналгетична [22], противовъзпалителна [22, 23], хиполипидемична [24, 25] и антинеопластична [26] активност.

За нас представляваше интерес синтезирането на бифармакофорна система, чрез реакция на 4-аминотиенопиримидини и фталов анхидрид. За изпълнение на поставената

задача бе използван метод, базиран на известни методики за синтез на *N*-арил фталимиди [17, 19, 20, 22, 27].

Синтезът е осъществен, чрез смесване на съответния 4-амино-5,6,7,8-тетрахидробензо[4,5]тиено[2,3-*d*]пиримидин **22**, **24**, **28**, **29**, **33**, **35**, **37**, **39**, **41** и **42** със фталов анхидрид, в съотношение 1 : 1.1. Реакцията е проведена в среда от ледена оцетна киселина при кипене на обратен хладник (Схема 8).



Съединение	Добив	R	Съединение	Добив	R
48	12		54	10	
49	21		55	35	
50	15		56*	-	
51	17		57*	-	
52	16		58*	-	
53	7		59*	-	

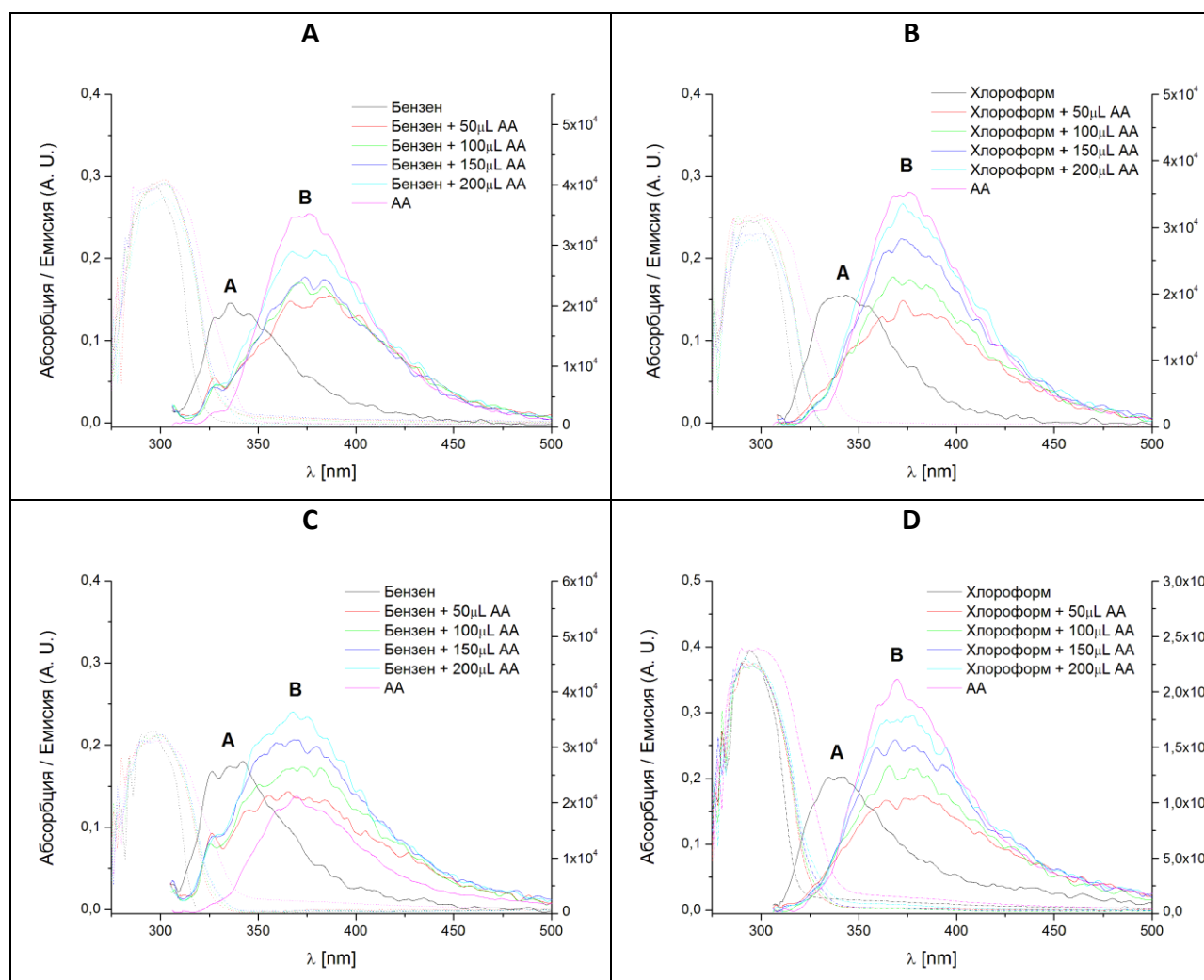
Схема 8 Механизъм на реакцията за синтез на 4-амино-5,6,7,8-тетрахидротиено[2,3-*d*]пиримидин-4-фталимиди **48–59** (горе); Заместители кореспондиращи със синтезираните съединения (долу); *неполучен продукт

От проведените синтези бяха получени тиенопиримидини **48-55**. Реакцията се провежда в продължение на около 40 часа като завършването ѝ е установено с помощта на тънкослойна хроматография. В резултат взаимодействието на **24**, **28**, **44** и **46** с фталов анхидрид (~ 40 часа) бяха изолирани изходните 4-амино-тиенопиримидини. Получените

температури на топене както и сметите ИЧ-спектри, в които се наблюдава наличие на първична *амино*-група при приблизително 3400 cm^{-1} и 3300 cm^{-1} , както и липсата на характеристичните абсорбционни ивици за фталимида при около 1780 cm^{-1} ($\nu^{\text{as}}\text{N}-\underline{\text{C}}=\underline{\text{O}}$) и 1720 cm^{-1} ($\nu^{\text{s}}\text{N}-\underline{\text{C}}=\underline{\text{O}}$), съответстват на тези на изходните 4-амино-тиенопиримидини.

Слабата реакционна способност на 4-амино-тиенопиримидините, свидетелство за което са дългото реакционно време и ниски добиви би могла да се обясни с наличието на *амино-иминна* тавтомерия. Същевременно, присъствието на протонни разтворители би довело до образуване на комплекс, което от своя страна да води до неспособност за кондензация на междинният продукт до фталимид.

Известно е, че 2-аминопиридините [28-31] и 4-аминопиримидините [32] образуват цикличен комплекс с оцетната киселина (AA), посредством водородни връзки. Това води до тавтомерия и протонен трансфер във възбудено състояние, в резултат на което молекулата преминава в *имино*-форма [28, 33].



Фиг. 1 Абсорбционни (---) и нормализирани флуоресцентни (—) спектри на: (а) **24** ($C = 1 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$) в система бензен-AA с $\lambda_{\text{ex}} = 296\text{ nm}$, (б) хлороформ-AA с $\lambda_{\text{ex}} = 298\text{ nm}$; (с) **46** ($C = 1 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$) в система бензен-AA с $\lambda_{\text{ex}} = 294\text{ nm}$, (д) хлороформ-AA с $\lambda_{\text{ex}} = 296\text{ nm}$.

Въз основа на тези факти бе проведен спектофотометричен анализ на най-нереакционноспособните 4-аминотиенопиримидини, с цел установяване възможността за тавтомеризиране на реагентите в среда от оцетна киселина. За провеждането на експеримента са подбрани съединения **24** и **46** за да се отхвърли вероятността за влияние на заместителя във втора позиция. За целта, анализите са разтворени в неполярни разтворители бензен ($\epsilon = 2.3$) и хлороформ ($\epsilon = 4.8$).

Флуоресцентните спектри (Фиг. 1) са снети при дължина на вълната на възбуждане (λ_{ex}), кореспондираща с абсорбционният максимум на съответното съединение в бензен и хлороформ. От Фиг. 1 ясно може да се види, че при прибавяне на АА към разтвора на анализа флуоресцентната ивица **A**, отговаряща на анализа в неполярен разтворител, се измества батохромно с поява на нова ивица **B** като същевременно се наблюдава батохромно отместване на абсорбцията с 6 nm на **24** и 2 nm на **46**. Това поведение на тиенопиримидини **24** и **46** изцяло кореспондира с резултатите, докладвани в литературата за комплексообразуване на 2-аминопиридини [28, 31], 4-аминопиримидини [29] и 4-аминопиримидини [32], при които се наблюдава изместване на абсорбцията с 9 nm за производните на 2-аминопиридина [28] и 7 nm за производните на 4-аминопиримидина (Схема 9) [32].

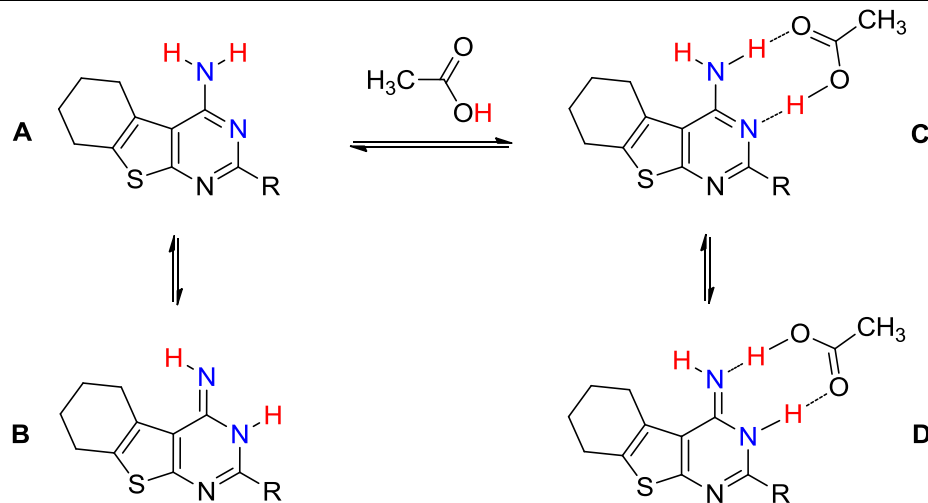
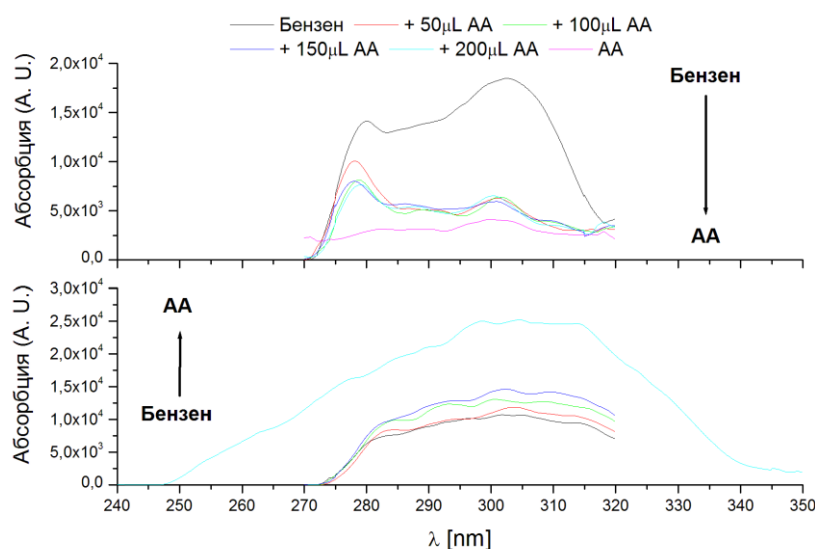


Схема 9 Химично равновесие между amino-имино тавтомери (**A** и **B**) и комплекси **C** и **D**

Въз основа на получените данни от абсорбционните и флуоресцентни спектри, интерес представляваше да се наблюдават спектрите на възбуждане на тиенопиримидин **46** при λ_{max} 332 nm и 369 nm, кореспондиращи с флуоресценцията на мономера и комплекса (Фиг. 2).

Резултатите, получени от спектрофотометричния анализ и съпоставката им с литературните данни за 2-аминопиридини и 4-аминопиримидини са доказателство за

протичането на процеса на комплексобразуване (Фиг. 2), характеризиращ се с намаляване на абсорбцията на мономера при 280 nm и поява на нов максимум при 305 nm. Батохромното отместване на флуоресцентният пик А към флуоресцентния максимум В, характеризиращ се с голямо *Стоксово отместване* (Stock's shift) спрямо абсорбцията е индикатор за наличие на фотоиндуциран протонен трансфер (ESIPT), характерен за 4-аминопиримидините [32, 34].



Фиг. 2 Нормализирани спектри на възбуждане (λ_{ex}) на **46** ($C = 1 \times 10^{-6}$ mol/L) в система Бензен-АА на $\lambda_{max} = 332$ nm (горе) и на $\lambda_{max} = 369$ nm (долу)

Известно е, че комплексобразуването е температурно зависим процес [29, 32], като с повишаване на температурата количеството на комплекса се повишава.

Въз основа на тези факти и получените резултати, може да се констатира, че ниската реакционност на 4-амино-5,6,7,8-тетрахидробензотиено[2,3-*d*]пиримидините се дължи на комплексобразуване и тавтомеризация, които възпрепятстват процеса на ацилиране при висока температура.

5. Синтез на глицин-съдържащи тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-они (60, 61)

Една от задачите, произтичащи от целите на дисертационния труд бе да се синтезират имино *bis*-метилтиенопиримидин-4-они, чрез реакция на amino диацетонитрил с 2-аминотиофени **2** и **3**, като последните са в двукратен излишък. Използван е метода описан в *т. 2*.

От проведеният при тези условия синтез бе установено, че реакцията изпълнена при тези условия не протича до получаване на *bis*-тиенопиримидини (Схема 10, **1**), а води до циклокондензация (**2**) с една от нитрилните групи и едновременно хидролиза на

втората – до карбоксилна киселина. В резултат на което са изолирани тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-они **60** и **61**, съдържащи глицинов остатък, с 15% и съответно 12% добив.

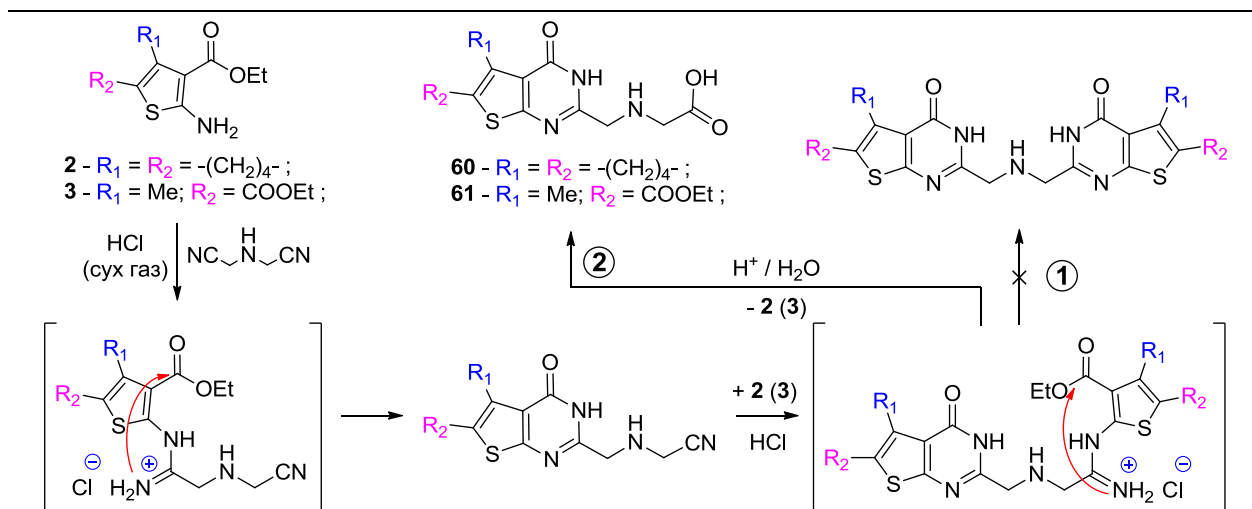


Схема 10 Синтез на тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-они **60** и **61**

6. Синтез на 3-етил-тиено[2,3-*d*]пиримидини, съдържащи 1,3,5-тиадиазолов хетероцикъл (62-76)

Формирането на пиримидиновия хетероцикъл на 3-етил-2-меркапто-тиено[2,3-*d*]пиримидин-4(3*H*)-они **62-64** е проведено чрез базично-катализирана циклокондензация на 2-аминотиофени **1**, **2** или **3** и етил изотиоцианат (Схема 11).

Известно е, че съществува равновесие между тавтомерната *тиол-тионна* форма на тиенопиримидин-2-тиолите, но в алкална среда на лице е преимуществено тиолната форма. По тази причина бе възможно алкилирането на -SH групата във втора позиция на съединения **62-64** с етил хлорацетат в присъствие на триетиламин. Ацетохидразидите **68-70** са синтезирани чрез реакция на естери **65-67** с излишък от хидразин хидрат, в среда на абсолютен етанол. С най-висок добив е получен ацетохидразид **70**, достигащ 94%.

С-ния	Добив	С-ния	Добив	С-ния	Добив	С-ния	Добив	С-ния	Добив
62	95	65	81	68	69	71	88	74	63
63	96	66	78	69	63	72	91	75	95
64	86	67	82	70	94	73	96	76	90

Табл. 1 Добиви [%] на 3-етил-тиено[2,3-*d*]пиримидини **62-76**

Съединения **68-70** взаимодействат с 1,2-кратен излишък от етил изотиоцианат като се получават тиосемикарбази **71-73**, с отлични добиви от 88% до 96%.

Тиосемикарбазиди **71-73** циклизират, чрез дехидратация в кисела среда до 1,3,4-тиадиазоли **74-76**. Добивите на крайните тиадиазоли **75** и **76** са в диапазона от 90 до 95%.

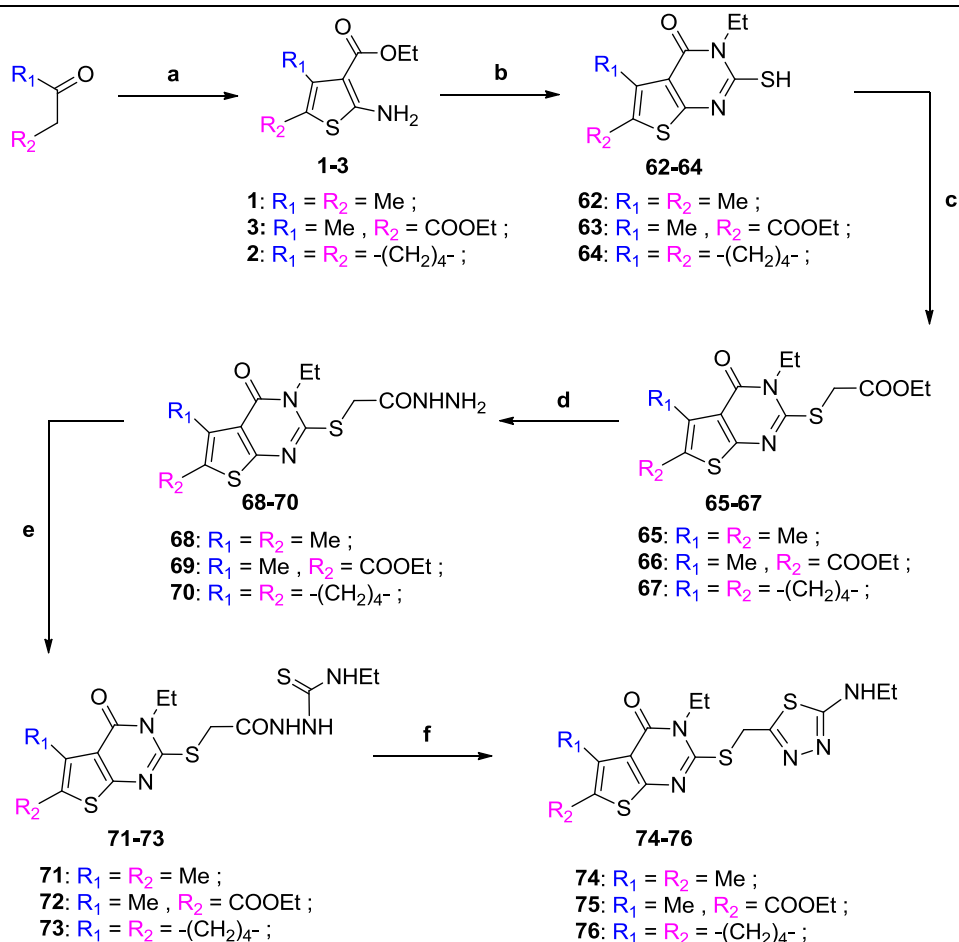


Схема 11 Синтез на тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-они, съдържащи семикарбазид и 1,3,4-тиадиазолов остатък: а) етил цианоацетат, HNEt_2 , S_8 , етанол; б) етил изотиоцианат, NaOH , DMF ; в) етил 2-хлороацетат, NEt_3 , бензен, t_K ; д) хидразин хидрат, етанол, t_K ; е) етил изотиоцианат, етанол, t_K ; ф) 98% сярна киселина, 0°C , NH_4OH ;

7. Синтез на 2-заместени-1*H*-бензимидазоли (77–81, 85–87)

Добре известно е, че един от най-прилаганите методи за получаване на *C*-2 заместени бензимидазоли е чрез реакция на *o*-фенилендиамин с карбоксилни киселини [35]. Този синтез се характеризира с кратко реакционно време и висок добив. Именно поради тази причина избрахме този метод за получаване на 2-хлорометил-1*H*-бензимидазол **77** по добре известната методика и механизъм на *Phillips* [36] (Схема 12).

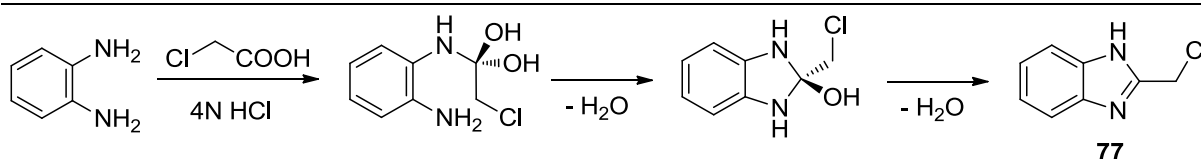


Схема 12 Синтез на 2-хлорометил-1*H*-бензимидазол **77**

За синтезът на *1H*-бензимидазол-2-тиони **78-81** бе избран метод [35, 37-39], при който калиевия дитиокарбонат, синтезиран в хода на реакционния процес от калиев хидроксид, въглероден дисулфид и етанол взаимодейства с *o*-фенилендиамин при кипене на обратен хладник в продължение на 3 часа.

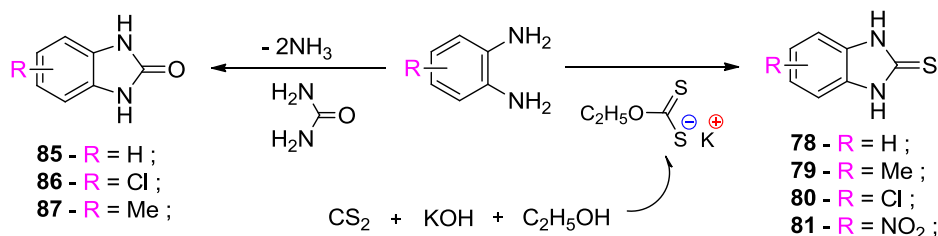


Схема 13 Синтез на *C*-2 заместени *1H*-бензимидазоли

За осъществяване на поставените цели в настоящата дисертационна работа беше необходимо да се синтезират *1H*-бензимидазол-2-они **85-87**. От съществуващите методи за синтез на бензимидазолови производни, като най-лесно достъпен метод за синтеза на 2-бензимидазолони, избрахме взаимодействието на 5-субституирани-1,2-диаминобензени с карбамид в отсъствие на разтворител [35, 40-42]. Реакцията протича при нагряване на съответния 5-субституиран 1,2-диаминобензен и карбамид на обратен хладник в продължение на 1 час (**Схема 13**).

С-ния	Добив	С-ния	Добив	С-ния	Добив
77	71	80	71	85	88
78	69	81	63	86	43
79	72	84	62	87	70

Табл. 2 Добиви [%] на *1H*-бензимидазоли **77-81** и **85-87**

8. Синтез на *N, N'*-дисубституирани бензимидазоли (**82-86**, **91**, **91**)

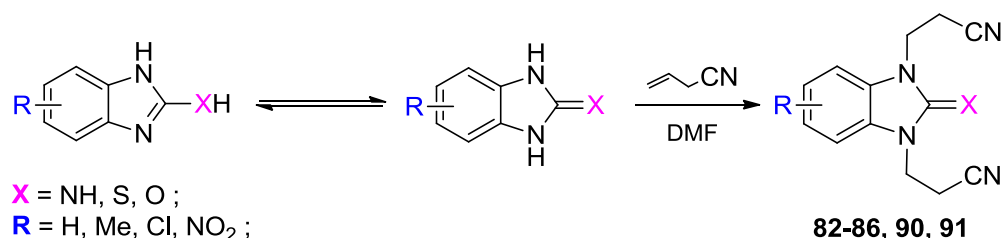
Както става ясно от литературния обзор, алкилирането на *1H*-бензимидазол-2-амини, 2-тиоли и 2-оли води до получаване на различни продукти. Това се дължи на прототропията, характерна за бензимидазоловото ядро, в резултат на което може да протече в единия случай в ¹N- или ³N-позиция, а в другия случай – при хетероатома във второ място на бензимидазоловото ядро.

Реакцията на *Michael* най-общо се състои в базично катализирано присъединяване на нуклеофил, наричан също "*донор на Michael*" (**1**), към активиран електрофилен олефин "*акцептор на Michael*" (**2**) [43, 44], в резултат на което се получава "*адукт на Michael*" **3**. Присъединяването по *Michael* се отличава с меки реакционни условия и висока степен на

превръщане, т.е. високи добиви. Хетероатомните нуклеофили на база азот, сяра, кислород и фосфор са широко използвани при този вид присъединяване.

За получаването на 1,3-дизаместените съединения **84-86**, **90**, **91** е използвана реакция на присъединяване по *Aza-Michael*. Като изходни продукти са използвани *1H*-бензимидазол-2-тиони **78-81**, *1H*-бензимидазол-2-они **87-89** и 2-амино-*1H*-бензимидазол, реагиращи с акрилонитрил в молно съотношение 1 : 2.5 (Схема 14). Реакцията се провежда в разтворител DMF, при кипене без използване на катализатор. Краят се следи с тънкослойна хроматография. След охлаждане, полученият разтвор се изсипва във вода, в резултат на което продукта кристализира. Получените кристали се филтруват.

Високите добиви на получените нитрили както и отсъствието на катализатор при провеждане на реакциите прави този метод, технологично и екологично приемлив.



Съединение	Добив	X	R
82*	-	NH	H
83*	-	O	H
84	62	S	Me
85	88	S	Cl
86	43	S	NO ₂
90	59	O	Cl
91	35	O	Me

Схема 14 Синтез на 1,3-бис(цианоетил)-2-амино-2,3-дихидро-1H-бензимидазоли; * *неполучен продукт*

От проведените синтези бе установено че, реакцията за получаване на *N,N'*-бис-заместен 2-амино-*1H*-бензимидазол **82** и *1H*-бензимидазол-2-ол **83** с акрилонитрил в условията на присъединяване по *Aza-Michael* не протича.

9. Синтез на 5,6,7,8-тетрахидротиено[2,3-*d*]пиримидин-4-они, съдържащи бензимидазол (92–94)

Структурата на тиено[2,3-*d*]пиримидин-4(3H)-она дава възможност за модификация, изразяваща се в две основни насоки – въвеждане на заместители в *N*-3 позиция и в *O*-4 позиция, както и в някои случаи – *N*-1 позиция, зависимост от заместителя в *C*-2 на пиримидиновия цикъл [45]. Промените в структурата на

фармакофора биха могли да изяснят и поставят отправна точка за установяване влиянието на отделните заместители върху фармакологичния ефект, на разглежданата група съединения.

От литературната справка става ясно, че алкилирането на тиено[2,3-*d*]пиримидин-4(3*H*)-они се извършва предимно в *N*-3, а в отделни случаи в *O*-4 и *N*-1 позиция [45, 46].

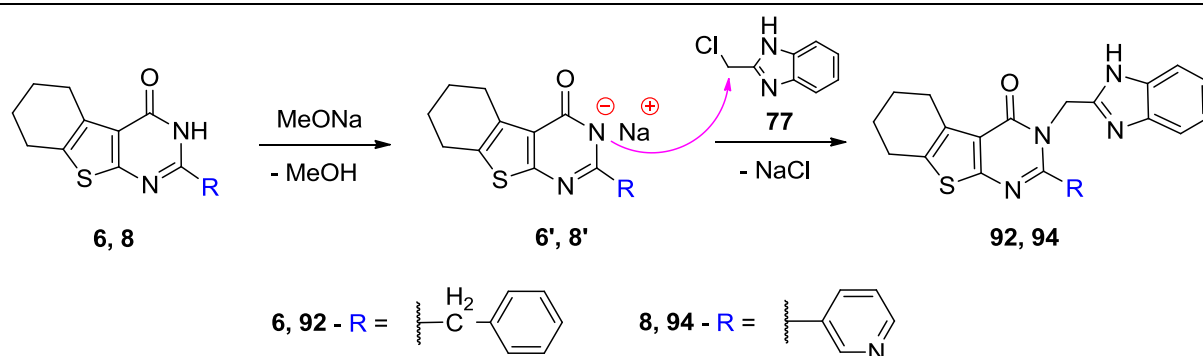


Схема 15 Синтез на тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-они, съдържащи 1*H*-бензимидазол **92** и **94**

За синтеза на тиено[2,3-*d*]пиримидин-4(3*H*)-они **92** и **94** бе избран *Метод В*, описан от *Alifanov* и *Babaev* [47], при който първоначално се приготвя пресен MeONa, след което се смесва със съответните тиенопиримидин-4-они (Схема 15). След изпаряване на разтворителя се образува Na-сол на съответния амин (**6'** или **8'**), която реагира с 2-хлорметил-1*H*-бензимидазола **77** при кипене, в среда на сух THF като се получават съединения **92** и **94** с 56% и съответно 51% добив.

С оглед разширяване и установяване на връзката структура-активност бе синтезиран и 5,6,7,8-тетрахидробензо[4,5]тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-он **93**, съдържащ 1*H*-бензимидазол във втора позиция. Съединението е получено с 17% добив.

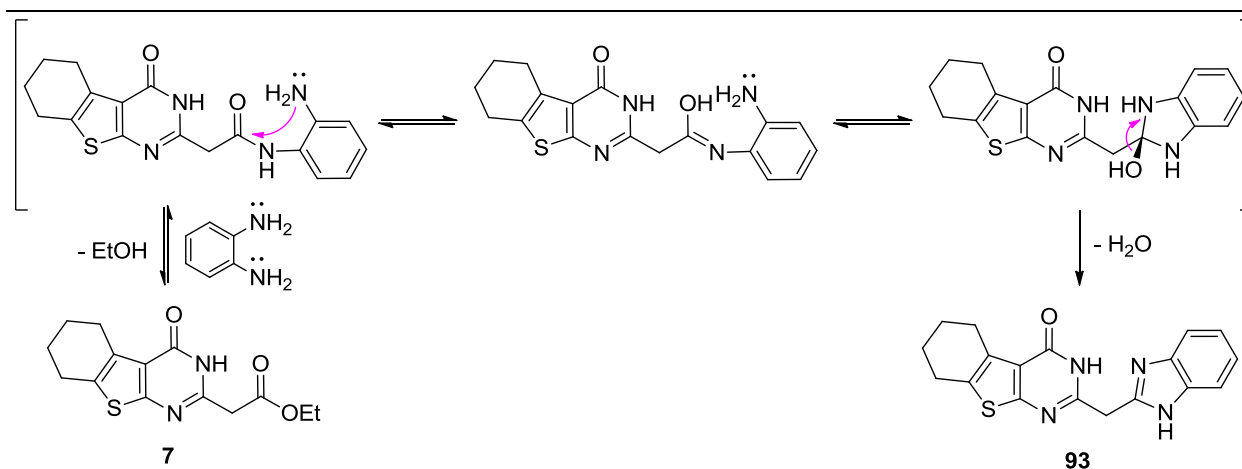


Схема 16 Синтез на 5,6,7,8-тетрахидротииено[2,3-*d*]пиримидин-4-он **93**, съдържащ 1*H*-бензимидазол

Тъй като циклокондензацията на 2-аминотиофен **2** и 2-цианометил-1*H*-бензимидазол не протече успешно, въвеждането на бензимидазол бе осъществено по метод, използван за циклокондензация на бензимидазоли от естери и *o*-фенилендиамин (Схема 16), при стапяне и висока температура [48]. За целта е използван етил 2-(4-оксо-5,6,7,8-тетрахидротиено[2,3-*d*]пиримид-2-ил) ацетат **7** и *o*-фенилендиамин. Изходните вещества предварително се стриват и се поставят в ампула, която се запоява, след което се нагряват до температура на топене на сместа.

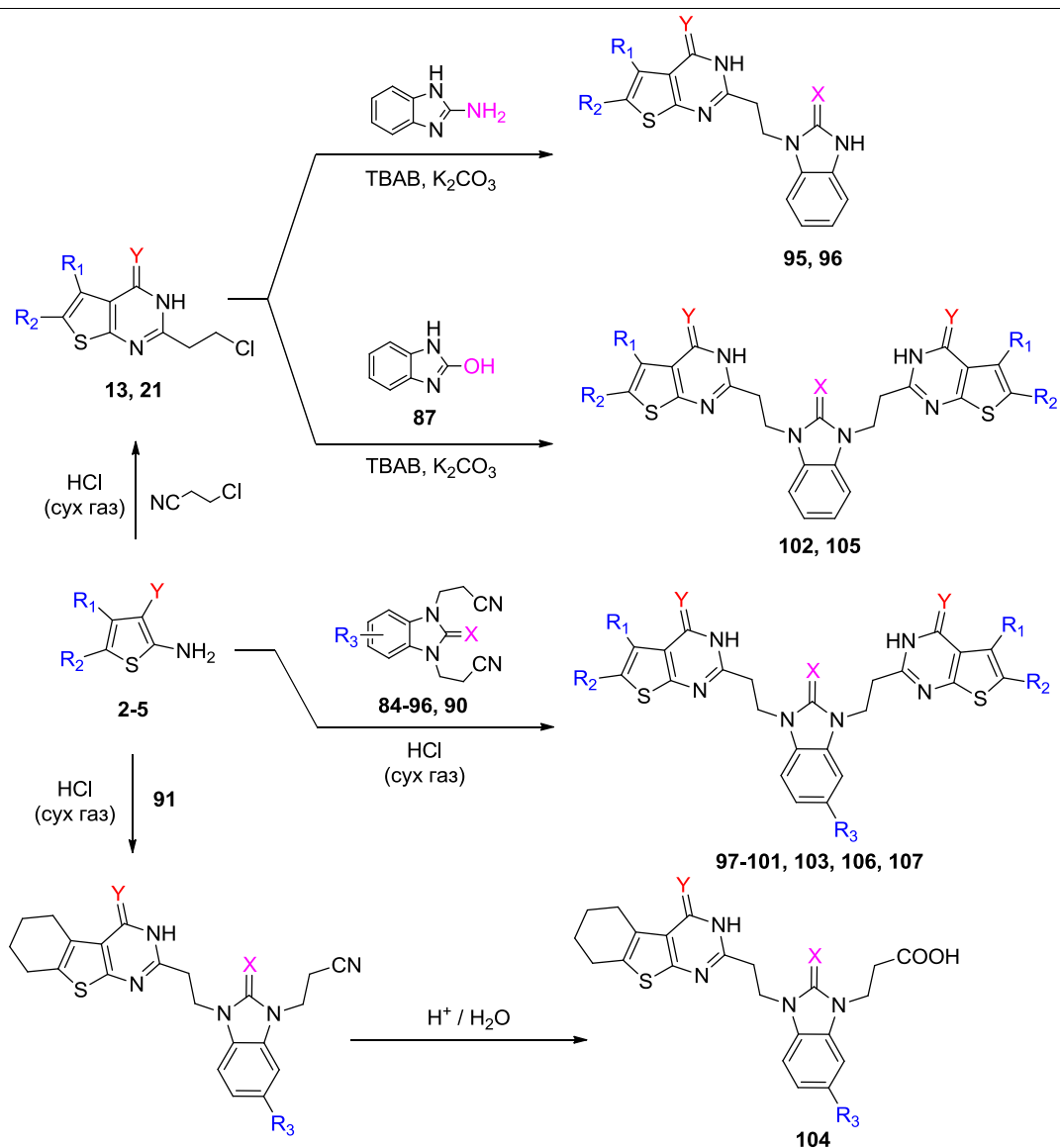
10. Синтез на *N, N'*-дисубституирани бензимидазоли, съдържащи тиено[2,3-*d*]пиримидини (95–107)

За целите на дисертационния труд интерес представляваше синтезът на 1,3-*бис*(тиенопиримидинил-етил)-бензимидазоли. За целта, като изходни съединения са използвани серия 1,3-*бис*(цианоетил)-1*H*-бензимидазол-2-тиони **84-86**, 2-они **90** и **91**, заедно с 2-аминотиофен-3-карбоксилати **2** и **3**. Реакцията е проведена в среда от безводен диоксан при пропускане на сух газ хлороводород в продължение на 6 часа. След приключване на реакцията, разтворът се оставя да престои 12 часа при стайна температура, след което се неутрализира.

В резултат на проведените синтези бяха получени съединения **97-101**, **103**, **106** и **107** (Схема 17). От друга страна, реакцията между 5-метил-1*H*-бензимидазол-2-он **91** и етил 2-амино-4,5,6,7-тетрахидробензо[*b*]тиофен-3-карбоксилат **2** протича с получаване на съединение **104**, представляващо производно на пропановата киселина. По всяка вероятност в условията, при които се провежда реакцията протича взаимодействие само с едната от нитрилните групи като втората нитрилна група при хидролиза се осапунва – до карбоксилна.

Тъй като необходимите за осъществяване синтеза на 1,3-*бис*(тиенопиримидинил-етил)-бензимидазоли, нитрили **82** и **83** не бяха получени, реакцията бе осъществена по описания в [49, 50] метод в условия на *твърдо-течен междуфазов катализ* (Схема 17).

За целта, към разтвор на 1*H*-бензимидазол-2-амин или 1*H*-бензимидазол-2-он **87** в среда от сух ацетонитрил при разбъркване последователно се прибавят безводен калиев карбонат и тетрабутиламониев бромид (ТВАВ), след което се прибавя халогенида **13** или **21**. Реакцията се провежда при кипене и интензивно разбъркване като край на процеса се определя посредством тънкослойна хроматография. След завършване на реакцията сместа се охлажда и утайката от K₂CO₃ се филтрува, а филтратът се изпарява под вакуум.



Съединение	Добив	X	Y	R ₁	R ₂	R ₃
95	12	NH	O	-(CH ₂) ₄ -		H
96	10	NH	O	Me	COOEt	H
97	53	S	O	-(CH ₂) ₄ -		Cl
98	89	S	O	-(CH ₂) ₄ -		Me
99	5	S	NH	-(CH ₂) ₄ -		Cl
100	53	S	NH	-(CH ₂) ₄ -		Me
101	19	S	O	Me	COOEt	Cl
102	9	O	O	-(CH ₂) ₄ -		H
103	4	O	O	-(CH ₂) ₄ -		Cl
104	6	O	O	-(CH ₂) ₄ -		Me
105	12	O	O	Me	COOEt	H
106	9	O	O	Me	COOEt	Cl
107	8	O	O	Me	COOEt	Me

Схема 17 Синтез на 1,3-бис(2-етилтиенопиридин) бензимидазоли

В резултат на проведените експерименти бе установено, че при използваните реакционни условия (молно съотношение, температура и разтворител), реакциите между 1*H*-бензимидазол-2-амин с 2-хлоретил-тиенопиримидини **13** и **21** в условията на междуфазов катализ водят до монозаместени продукти **95** и **96**. От друга страна, реакциите между 1*H*-бензимидазол-2-он **87** с 2-хлоретил-тиенопиримидини **13** и **21** водят до дизаместени продукти **102** и **105**. Това най-вероятно се дължи на факта, че 1*H*-бензимидазол-2-она притежава по-висока реакционност в сравнение с 2-амино-1*H*-бензимидазола, поради по-силната електроотрицателност на оксо-групата, потвърдено от по-високите добиви на дизаместените продукти **102** и **105**, в сравнение с монозаместените **95** и **96**.

От ¹H ЯМР спектрите на съединения **105** и **106**, прекристализирани от DMAA, може да се забележи че молекулите кристализират в еквимоларно отношение с DMAA. Сигналите за DMAA в DMSO-*d*₆ съответстват на тези, описани в литературата стойности на δ (ppm): 1.96 (s, 3H, COCH₃), 2.78 (s, 3H, NCH₃) и 2.94 (s, 3H, NCH₃).



II. Биологична активност и структурни изследвания

1. Антихелминтна активност

Имагиналният и ларвен стадий на паразита *Trichinellis spiralis* се развива в един и същ организъм. По време на чревната фаза полово зрелите паразити отделят ларви, които се разнасят с кръвния ток и се локализират в двигателната мускулатура. Там те се завиват спираловидно и се ограждат от съединително-тъканна капсула – *мускулна фаза*.

Изследванията върху биоизостеризма между структурата на хиназолина и тиенопиримидинът са доказали, че замяната на ароматния цикъл с тиофенов хетероцикъл, води до повишаване на антипаразитната активност. Същевременно, в литературата са изследвани редица тиено[2,3-*d*]пиримидини, притежаващи *TK*, *DHFR* и *PKC* инхибираща активност. Това бе причината да изследваме антипаразитна активност на серия 2-заместени тиено[2,3-*d*]пиримидини.

На скрининг за антихелминтна активност, бяха подложени 7 производни на 5,6,7,8-тетрахидробензо[4,5]тиено[2,3-*d*]пиримидина. Съединения **6**, **8-12** и **20** са тествани срещу хелминта *Trichinella spiralis* (Табл. 3). Изследванията за антихелминтна активност са

проведени в Медицинския университет – гр. Пловдив, в катедра „Инфекциозни болести, паразитология и тропическа медицина“.

При проведения *in vitro* паразитологичен експеримент бе установено, че изследваните съединения притежават различен антихелминтен ефект, изразен в потискане на двигателна активност на трихинелните ларви и загуба на спиралната им форма, което е белег за нежизнеспособност. В контролните проби, във физиологичен разтвор, а също така и в DMSO всички ларви са в спирална форма. Определени са статистически значими разлики между антитрихинелозна ефективност на съединенията и тази на контролите ($p \leq 0.05$).

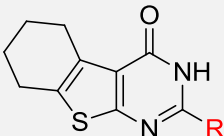
Обща структура	Съединения	Ларвоциден ефект (%) след 24 часа		Ларвоциден ефект (%) след 48 часа	
		100 µg/mL	250 µg/mL	100 µg/mL	250 µg/mL
	6	97.93	97.94	97.98	100
	8	35.9	81.90	60.0	95.65
	9	59.9	58.29	75.21	69.03
	10	51.83	54.05	64.29	81.16
	11	19.73	38.46	31.9	69.38
	12	64.75	86.56	73.77	93.47
	20	63.0	95.42	67.37	97.5
	Albendazole	10.7	13.3 ^{a)}	15.1	17.4 ^{a)}
	Ivermectin	48.6	54.3 ^{a)}	78.6	88.2 ^{a)}

Табл. 3 Ларвоциден ефект на някои тиенопириимидинови производни срещу *T. spiralis*; ^{a)} Ларвоциден ефект (%) при $C = 200 \mu\text{g/mL}$ [51].

Получените от теста *in vitro* резултати показват, че най-голяма ефективност срещу трихинелните ларви притежава съединение **6**, като ефикасността му в концентрация 100 µg/mL е еднаква с тази при 250 µg/mL след 24 часа и е съизмерима с ефективността след 48 часа: 97.94% и 100%. Почти същата ефективност след 48 часа в концентрация от 250 µg/mL, показва и съединение **20**. Трето по активност е съединение **12**, проявяващо 64.75% и респективно 86.56% след 24 часа, а след 48 часа инхибиращият му ефект за двата вида концентрации – е съответно 73.77 и 93.47 %.

Данните от проведения *in vitro* паразитологичен анализ показват, че при инкубация на пробите 24 часа в концентрация 100 µg/mL и 250 µg/mL съединения **6**, **12** и **20** проявяват по-висока активност в сравнение с референтните лекарствени средства *albendazole* и *ivermectin*. Умерена антитрихинелозна активност са показали тиенопиримидин **9** (59.9%) и **10** (51.8%), при концентрация 100 µg/mL.

Следователно, изследваните производни на тиенопиримидин-4-она притежават по-висок ларвоциден ефект в сравнение с *albendazole* срещу *Trichinella spiralis*. Същевременно се наблюдава и по-висока от *ivermectin* активност на тиенопиримидин **6**, който предизвиква 100% нежизнеспособност на трихинелозните ларви при концентрация 100 µg/mL.

Високата антитрихинелозната активност на съединения **6**, **20** и **12** *in vitro* дава основание да бъде проведен скрининг за антитрихинелозна активност в чревна и мускулна фаза *in vivo*.

2. Антинеопластична активност

Известно е, че структурата на пиримидините е тясно свързана с три от четирите азотни бази на ДНК – урацил, тимин и цистин, което прави пиримидините основни градивни елементи на живата клетка [52].

Установено е, че някои тиено[3,2-*d*]пиримидини са биоизостери на *lapatinib* (IC_{50} 120 nM) [53], поради което някои от тях са показали по-добра инхибиторна активност (IC_{50} 11 nM) срещу рецептора на епидермалния растежен фактор (*EGFR/ErbB-2*) тирозин кинтаза, в сравнение с производното на 4-аминохиназолина – *lapatinib*.

1,3,4-Тиадиазоловите (*TDA*) производни са известни с тяхната биологична активност – противовъзпалителна [54], антибактериална [55] и антинеопластична [56]. Противотуморната активност на 1,3,4-тиадиазолите, се свързва основно с възможността им да образуват водородни връзки, в резултат на силните електрон-донорни свойства на двата азотни атома. 2-Амино-1,3,4-тиадиазолите имат широкоспектърна антипролиферативна активност срещу меланом, глиобластом, лимфосарком [57]. Същевременно някои *TDA*-производни демонстрират активност срещу неопластичните клетки на простатата (*LNCaP*, *DU145* и *PC3*) и гърдата (*MCF7* и *MDA-MB-231*) [58, 59].

Мезойонният характер на тиадиазолите благоприятства преминаването им през клетъчната мембрана [60]. Именно поради тази причина въвеждането в молекулата на тиадиазола производни на тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-она като биоизостери на хиназолина

може да доведе до създаването на по-ниско токсични и по-високо активни противоракови средства. В литературата са описани производни на 1,3,4-тиадиазола, съдържащи 5,6,7,8-тетрахидробензо[4,5]тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-они, притежаващи антитуморен ефект [61, 62]. Това бе причината да синтезираме и изследваме бифармакофорни системи върху ракови и нормални човешки клетъчни линии като потенциални противоракови средства.

Производните на тиосемикарбазида (71-73) и 1,3,4-тиадиазола (74-76) са подложени на *in vitro* скрининг, за да се установи тяхното въздействие върху раковите HT-29, MDA-MB-231, HeLa, HepG2 и нормални човешки клетъчни линии – Lep3.

Клетъчната пролиферация е установена с помощта на MTS анализ, базиран на редукцията на тетразолиевата сол до цветен, водоразтворим формазаанов продукт, получен от митохондриалната активност на жизнеспособни клетки при температура 37°C. Освободеното количество на формазаан, произведен от дехидрогеназни ензими е пропорционално на броя на живите клетки в културата и може да се измерва УВ-спектрофотометрично при дължина на вълната – $\lambda = 492 \text{ nm}$ [63]. Въз основа на определените абсорбционни плътности са плотираны и изчислени съответно EC_{50} (Табл. 4) и IC_{50} – стойностите (Табл. 5).

Съединения	$EC_{50} \pm SE (\mu M)$				
	HT-29	MDA-MB-231	HeLa	Hep G2	Lep3
71	0.085 ± 0.20	8.86 ± 0.10	0.43 ± 0.034	–	–
73	1.13 ± 0.16	9.33 ± 0.12	7.97 ± 0.72	2.72 ± 0.31	8.25 ± 0.24
76	–	0.001 ± 0.14	9.28 ± 0.027	–	–

Табл. 4 Пролиферираща активност (EC_{50}) на изследваните съединения

Съединения	$IC_{50} \pm SE (\mu M)$				
	HT-29	MDA-MB-231	HeLa	Hep G2	Lep3
71	–	–	–	–	0.01 ± 0.22
72	7.38 ± 0.71	$2.31 \times 10^{-4} \pm 0.04$	8.71 ± 0.09	8.71 ± 0.58	0.8 ± 0.18
74	3.58 ± 0.25	9.4 ± 0.15	7.42 ± 0.22	0.99 ± 0.52	191 ± 0.03
75	9.12 ± 0.37	2.13 ± 0.13	0.83 ± 0.18	9.51 ± 0.03	$89 \times 10^3 \pm 0.27$
76	0.001 ± 0.11	–	–	9.8 ± 0.18	9.77 ± 0.09

Табл. 5 *In vitro* цитотоксичност срещу HeLa, Hep G2, HT-29, MDA-MB-231 и Lep 3 клетки

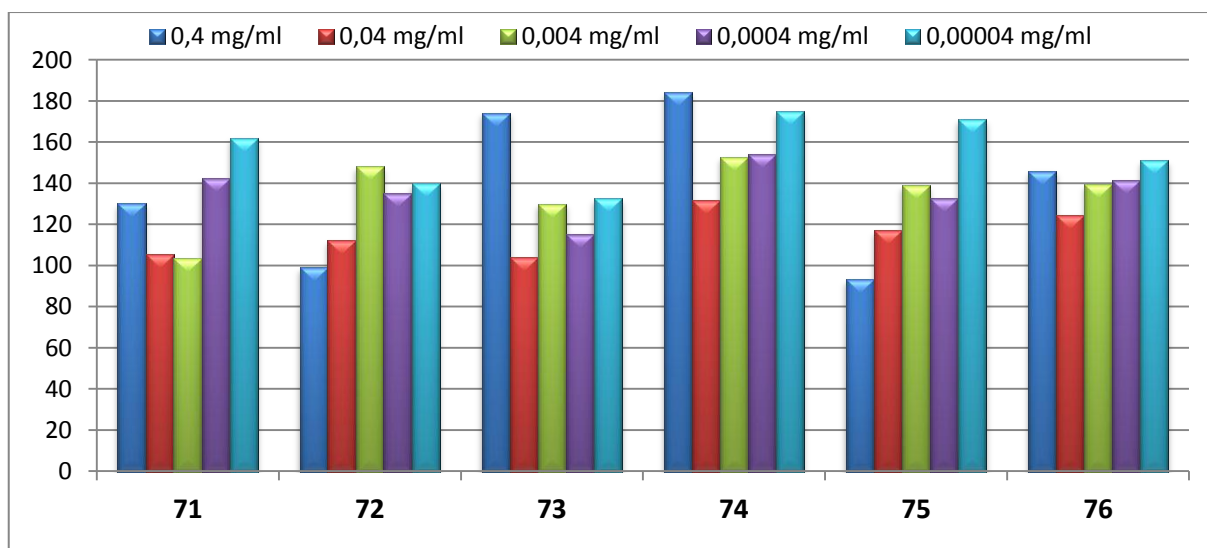
По-високите нива на формазаан показват по-висока жизнестойност на клетките, докато ниското количество формазаан е показател за цитотоксичност на изследваните съединения [64, 65]. Относителната жизнестойност на клетките (% Viability) е изразена като процент от нетретираните контроли (100% жизнестойност) и се изчислява за всяка концентрация.

Всички данни представляват средно аритметична стойност от три независими анализа. Статистически значимите разлики са определени от количеството клетки в двете контролни и опитни групи ($p \leq 0.05$).

Повечето от изследваните съединения проявяват инхибираща концентрация в широк диапазон спрямо всички тествани човешки клетъчни линии. Сред тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-оните, съдържащи тиосемикарбазиден остатък, съединение **72** е токсично срещу всички неопластични клетки, използвани в това изследване, като най-висока токсичност проявява спрямо *MDA-MB-231* клетките ($IC_{50} = 2.31 \times 10^{-4} \mu M$), а същевременно с това показва цитотоксичност към *Lep3* в много по-високи концентрации ($IC_{50} = 0.8 \mu M$).

От производните на тиенопиримидина, съдържащи тиадиазолов хетероцикъл, съединение **75** демонстрира токсичност към четирите вида ракови клетки като най-голяма е цитотоксичността му срещу *HeLa* клетките ($IC_{50} = 0.83 \mu M$). По отношение на нормалните диплоидни клетки – *Lep3* тиенопиримидиновото производно **75** проявява токсичност в много високи концентрации ($IC_{50} = 89 \times 10^3 \mu M$). Ниската цитотоксичност спрямо *Lep3* и висока селективност към четирите клетъчни линии при ниски концентрации характеризира този тиенопиримидинон като обещаващ потенциален противотуморен препарат.

Ясно може да се види, че най-активно срещу човешки колоректален рак *HT-29* е съединение **76** с $IC_{50} 0.001 \mu M$, последвано от **74** с $IC_{50} 3.58 \mu M$, но от друга страна производно **76** проявява около 100 пъти по-ниска цитотоксичност срещу нормалните човешки диплоидни клетки – *Lep3*.



Фиг. 3 Жизнеспособност (Viability) на *Lep3* клетки (%) след третиране

По отношение на човешкия карцином на черният дроб *HepG2*, съединение **74** показва най-високата инхибиторна активност, от всички изследвани съединения – с $IC_{50} = 0.99 \mu M$, както и втората по ред най-ниска цитотоксичност към *Lep3* ($IC_{50} = 191 \mu M$).

В заключение може да се отбележи, че тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-оните, съдържащи тиосемикарбазиден (**71-73**) и тиадиазолов фрагмент (**74-76**) притежават висока инхибираща ефективност върху клетъчната пролиферация на всички използвани в изследването човешки ракови и нормални клетъчни линии. Същевременно с това съединение **75** показва сравнително много по-ниска токсичност спрямо нормалните *Lep3* клетки (Фиг. 3), а съединения **73** предизвиква ензимен отговор при всички клетъчни линии. Следователно, тиенопиримидинът **75**, съдържащ тиадиазолов цикъл представлява потенциален противораков агент срещу всички тествани туморни клетки в ниска концентрация като заедно с това съединението не проявява цитотоксично действие към нормалните човешки клетки. Установено бе, че промяната на заместителите в *C*-5 и *C*-6 позиция на тиофеновия пръстен води до значително намаляване виталността на *Lep3*-клетките, като в същото време при по-липофилното тетраhydro-заместено съединение **76** се наблюдава значително увеличение на апоптозният ефект (1000 пъти) спрямо *MDA-MB-231* и *HT-29*.

Добрите резултати, получени от скрининга за антипролиферативен ефект на тиено[2,3-*d*]пиримидините, съдържащи тиадиазолов пръстен в страничната верига ни дадоха основание да насочим изследванията към синтез и изследване цитотоксичността на тиенопиримидини, притежаващи бензимидазолов остатък. Известно е, че двата фармакофора поотделно притежават висок антитуморен ефект. Въз основа на този факт може да се предположи, че комбинирането на двата фрагмента би довело до синергичен ефект, повишавайки цитотоксичността спрямо раковите клетки.

Съединения	$IC_{50} \pm SE$ (nM)				
	<i>HT-29</i>	<i>MDA-MB-231</i>	<i>HeLa</i>	<i>Hep G2</i>	<i>Lep3</i>
60	2.32 ± 0.09	12.7 ± 0.10	360 ± 0.04	23.3 ± 0.19	130 ± 0.08
61	6.49 ± 0.11	9.44 ± 0.05	44.5 ± 0.05	33.4 ± 0.04	261 ± 0.10
92	4.31 ± 0.17	9.36 ± 0.18	1.59 ± 0.12	8.59 ± 0.07	19.1 ± 0.04
93	409 ± 0.08	1.44 ± 0.76	1.53 ± 0.08	1.11 ± 0.03	33.4 ± 0.13
94	194 ± 0.05	28.4 ± 0.004	6.56 ± 0.05	38.8 ± 0.09	10.3 ± 0.06
97	6.86 ± 0.17	356 ± 0.01	61.9 ± 0.06	38.5 ± 0.10	108 ± 0.04
98	2.35 ± 0.16	16.4 ± 0.04	52.1 ± 0.04	$1,48 \times 10^3 \pm 0.02$	1.64 ± 0.03
101	6.73 ± 0.15	1.86 ± 0.12	373 ± 0.06	1.79 ± 0.02	1.93 ± 0.05

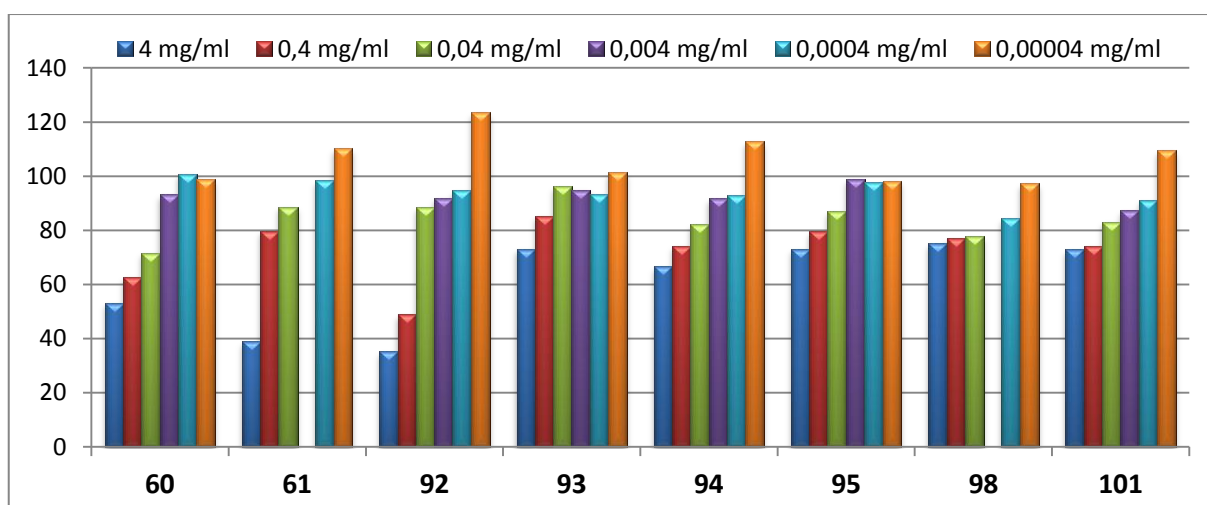
Табл. 6 *In vitro* цитотоксичност срещу *HeLa*, *Hep G2*, *HT-29*, *MDA-MB-231* и *Lep 3* клетки

Съединенията са подложени на *in vitro* скрининг за да се установи тяхното въздействие към човешките ракови *HT-29*, *MDA-MB-231*, *HeLa*, *HepG2* и нормални човешки клетъчни линии – *Lep3* (Табл. 6).

От изследваните съединения най-ниска цитотоксичност към нормалните *Lep3* клетки са показали тиенопиримидини **60** ($IC_{50} = 130$ nM) и **61** ($IC_{50} = 261$ nM), съдържащи аминокиселинен остатък както и *bis*-тиенопиримидиновото производно **97** с $IC_{50} = 108$ nM. Същевременно с това, при съединения **60**, **61** и **97** се наблюдава най-висока цитотоксичност срещу *HT-29* клетъчната линия като IC_{50} на **60** е 2.32 nM, на **61** – 6.49 nM, а тази на **97** съответно 6.48 nM. Тиенопиримидините **60** и **61** проявяват също така висока цитотоксичност спрямо *MDA-MB-231* клетките като техните IC_{50} стойности са 12.7 nM и 9.44 nM, съответно.

Висока токсичност по отношение на *HeLa* клетките показват тиенопиримидините, съдържащи бензимидазолов цикъл в *N*-3 на пиримидиновия пръстен (**92** и **94**) и респективно в *C*-2 позиция (**93**), като съединение **93** демонстрира най-силно изразена цитотоксичност ($IC_{50} = 1.53$ nM), следвано от **92** ($IC_{50} = 1.59$ nM) и **94** ($IC_{50} = 6.56$ nM). Тиенопиримидин **93** показва висока цитотоксичност и към раковите клетъчни линии *MDA-MB-231* и *HepG2* като IC_{50} стойностите са 1.44 nM и 1.11 nM съответно. Едновременно с това, съединение **93** притежава по-ниска токсичност спрямо *Lep3* ($IC_{50} = 33.4$ nM), сравнение с **92** ($IC_{50} = 19.1$ nM) и **94** ($IC_{50} = 10.3$ nM).

За разлика от останалите изследвани съединения, *bis*-тиенопиримидиновите производни **98** и **101** проявяват висока цитотоксичност към почти всички ракови, а така също и към нормалните диплоидни човешки *Lep3* клетки (Фиг. 4).



Фиг. 4 Жизнеспособност (Viability) на *Lep3* клетки (%) след третиране

От така получените резултатите следва, че всички изследвани съединения притежават висока цитотоксичност, срещу тестваните клетъчни линии в наномоларна

концентрация. Най-голяма цитотоксичност към HT-29 и ниска токсичност към Lер3 се наблюдава при съединения **60**, **61** и **97**. Въпреки по-високата цитотоксичност на **93** към Lер3, в сравнение с споменатите три тиенопиримидина, съединението проявява висока активност срещу HeLa, MDA-MB-231 и HepG2 в концентрация около 25 пъти по-ниска от тази срещу Lер3 клетките.

3. Антиоксидантна активност

Електронните акцептори като кислород реагират лесно със свободните радикали като по този начин инцирират по-нататъшна окислителна деструкция, образувайки така наречените *активни форми на кислорода* (ROS). Към ROS се включват супероксидни аниони ($\bullet\text{O}_2^-$), водороден пероксид (H_2O_2) и хидроксилни радикали ($\bullet\text{OH}$). Съществуват доказателства, че свободните радикали предизвикват окислително увреждане на биомолекулите (липиди, протеини и нуклеинови киселини) [66, 67], което води до атеросклероза, стареене, рак, диабет, възпаление, СПИН и няколко дегенеративни заболявания при хора [66].

3.1 Инхибитори на ензима ксантинооксидаза (ХО)

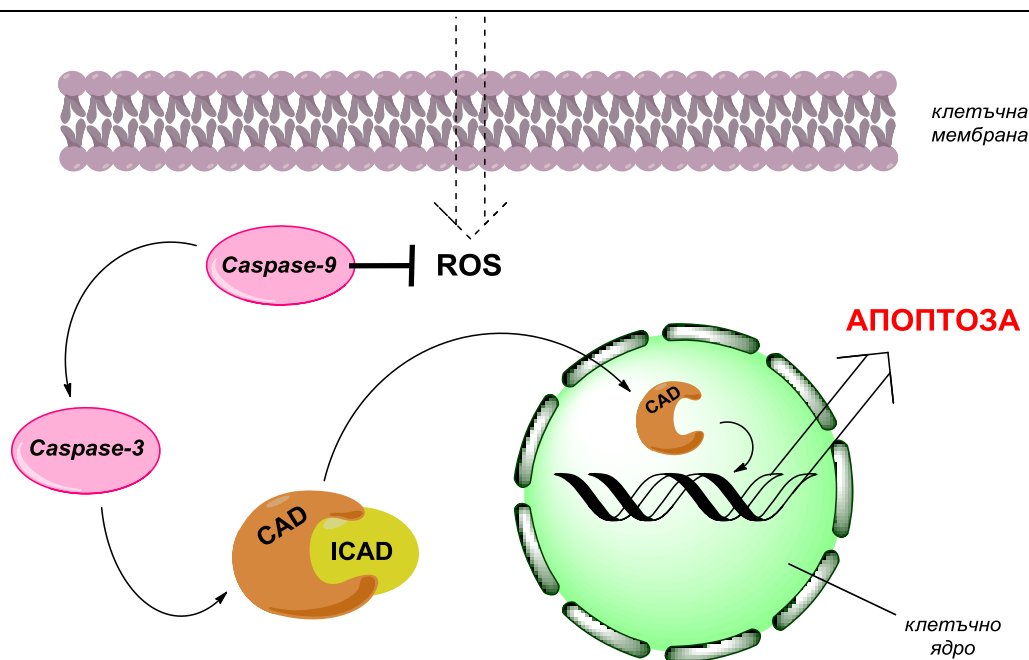
Прототипният инхибитор на ксантинооксидазата (ХО) *allopurinol* е един от основните клинично тествани препарати срещу подагра и състояния, свързани с хиперурикемия. Свърхекспресията на ХО се свързва също така с различни форми на исхемия, тъканни и съдови увреждания, възпалителни заболявания и хронична сърдечна недостатъчност. *Allopurinol* и неговият активен метаболит *oxipurinol* са показали добри резултати в посока лечение на тези заболявания както при клиничните изпитания с животни така и с хора [5].

Въз основа на структурното подобие между тиенопиримидините и препарата *allopurinol*, както и наличието на производни на тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-амин, притежаващи антиоксидантна активност [68], интерес за нас представляваше изследването за възможна проява на инхибираща ХО активност на серия тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-амини **22**, **24**, **28**, **29**, **33**, **35**, **37**, **39**, **41**, **42** и **44**.

В резултат на проведените *in vitro* изследвания на серия 4-амино-тиено[2,3-*d*]пиримидини срещу говежда ксантинооксидаза е установено, че всички съединения проявяват значително по-слаба инхибираща ХО активност спрямо *allopurinol* [69] със стойности на $IC_{50} > 150 \mu\text{M}$.

3.2 Инхибитори на Дезоксирибонуклеаза I (Dnase I)

DNase I са неутрални ендонуклеази, проявяващи максимална активност при неутрално рН (6.8), които предимно се секретират в екзокринните жлези и панкреаса, чиято функция се изразява в селективно разкъсване на фосфодиестерните връзки между пиримидиновите нуклеотиди [70]. *Nogalamycin*, *daunomycin* (*Cerubidine*[®]) и *actinomycin D* (*Cosmegen*[®]) са антибиотици, способни да инхибират *DNase I*, чрез формиране на стабилни комплекси с ДНК [71].



Фиг. 5 Молекулен механизъм на активация/деактивация на ензима *DNase I* [72]

Известно е, че в резултат на тъканно увреждане и възпаление, индуцирано от различни ксенобиотици, ендотоксини и болестни състояния (като вирусен хепатит), пост-исхемично и регенеративно увреждане, черният дроб произвежда голямо количество азотен оксид (*NO*). От своя страна *NO* е в състояние да предизвика апоптоза, което е свързано с неговата способност да индуцира ДНК увреждане, инхибиране синтеза на ДНК и арест на клетъчния цикъл. Високите количества на *NO* се асоциират не само с индуциране на възпалителна реакция и апоптоза, но също така и с туморна прогресия [73]. Докладвано е, че натриевият нитропроед ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$) и пероксинитритните радикали (ONOO^-) способстват за активацията на *DNase I* [73]. От друга страна азотният оксид (*NO*) промотира процеса на клетъчна смърт чрез активация на ензима *Caspase 9*, който задейства катализната функция на *DNase I* (Фиг. 5) [72, 73].

Поради необходимостта от контрол на тези клетъчни процеси и въз основа на факта, че активната форма на ензима *DNase I* селективно се свързва с пиримидиновите

бази в ДНК за нас представляваше интерес да изследваме ензимната инхибираща *DNase I* способност на тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-амини **22**, **24**, **28**, **29**, **33**, **35**, **37**, **39**, **41**, **42** и **44**.

За положителна контролна проба е използван един от най-активните инхибитори на *DNase I* - *Кристал виолет* (хексаметил *para*-розанилин хлорид). Неговият механизъм на действие се състои в свързване с ДНК матрицата, като по този начин възпрепятства взаимодействието ѝ с ензима [74].

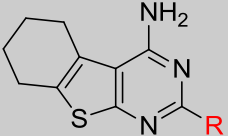
Обща структура	Съединения	IC ₅₀ [μM]	Съединения	IC ₅₀ [μM]
	22	197.10	37	194.64
	24	> 200	39	127.69
	28	> 200	41	> 200
	29	> 200	42	148.29
	33	155.83	44	> 200
	35	> 200	Crystal Violet	0.35 ^{a)}

Табл. 7 Инхибираща говежда Дезоксирибунуклеаза I (*DNase I*) активност на 4-амино-тиенопиримидини; ^{a)} in vitro инхибираща активност към *DNase I* [75]

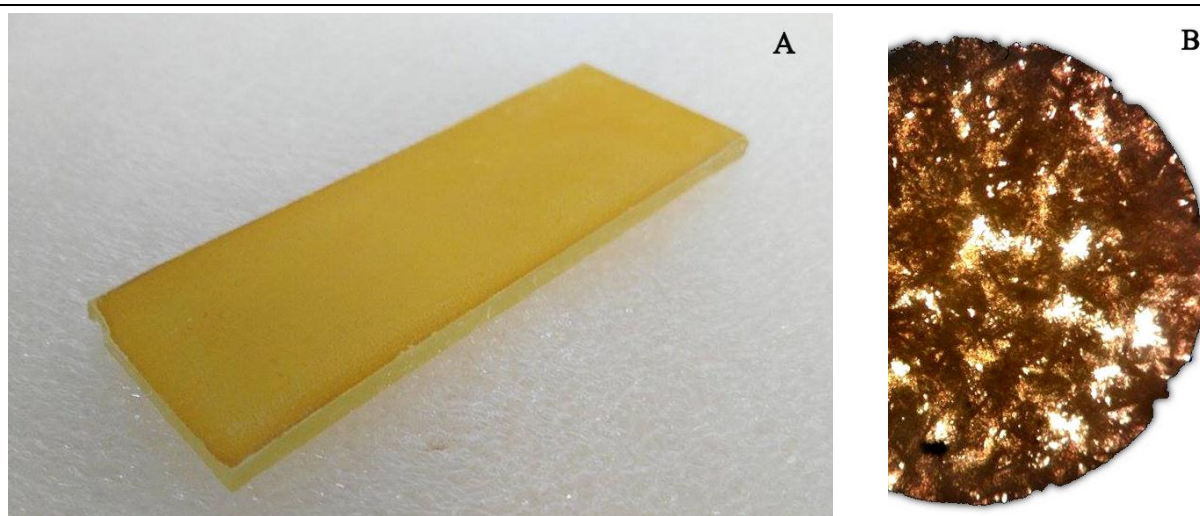
От резултатите представени в *Табл. 7* може да се види, че изследваните тиенопиримидини притежават многократно по-ниска инхибираща способност, спрямо референтния *Crystal Violet*. Въпреки това, тиенопиримидини **22**, **33**, **37**, **39** и **42** проявяват многократно по-висока активност от природните *DNase I* инхибитори – *streptomycin*, *ampicillin* [76] и синтетичните – 2-нитро-5-тиоцианобензоена киселина [77] и бис-β-хлоретиламини [71] като тази разлика в IC₅₀ се изразява в границите на един порядък. Също така, съединения **22** (55.5 mg/mL), **33** (44 mg/mL), **37** (45.4 mg/mL), **39** (43.5 mg/mL) и **42** (51.8 mg/mL) демонстрират по-ниска стойност на инхибираща концентрация, спрямо антикоагуланта *heparin* (IC₅₀ = 99 mg/mL) [78]. От изследваните тиенопиримидинови производни може да се забележи, че съединение **39** се отличава със значително от другите като IC₅₀ = 127.69 μM. От структурна гледна точка този афинитет най-вероятно се дължи на прилежащата *p*-NO₂ групата в страничната верига, която по всяка вероятност способства за свързването с активния център на ензима, аналогично на N=O производните.

В обобщение на получените резултати за антиоксидантна активност може да се каже, че въпреки липсата на инхибираща ензима XO активност, някои от представителите на 4-амино-тиенопиримидина като **33**, **39** и **42** проявяват умерена инхибираща *DNase I*

активност. Тези данни дават насока за изследване на един нов перспективен клас дезоксирибунулеазни инхибитори.

4. Фотостабилност

Терминът "фотостабилност" включва не само процеса на деструкция, причинена от излагане на светлина, но също така и процесите на образуване на радикали, енергиен трансфер и луминесценция [79]. Голям брой лекарствени вещества абсорбират светлина (енергия) в ултравиолетовата и/или видимата област и по тази причина са чувствителни към светлина, в резултат на което претърпяват дезинтеграция в течна среда или твърдо състояние при излагане на светлина, известна в литературата като *фотодеструкция* [80].

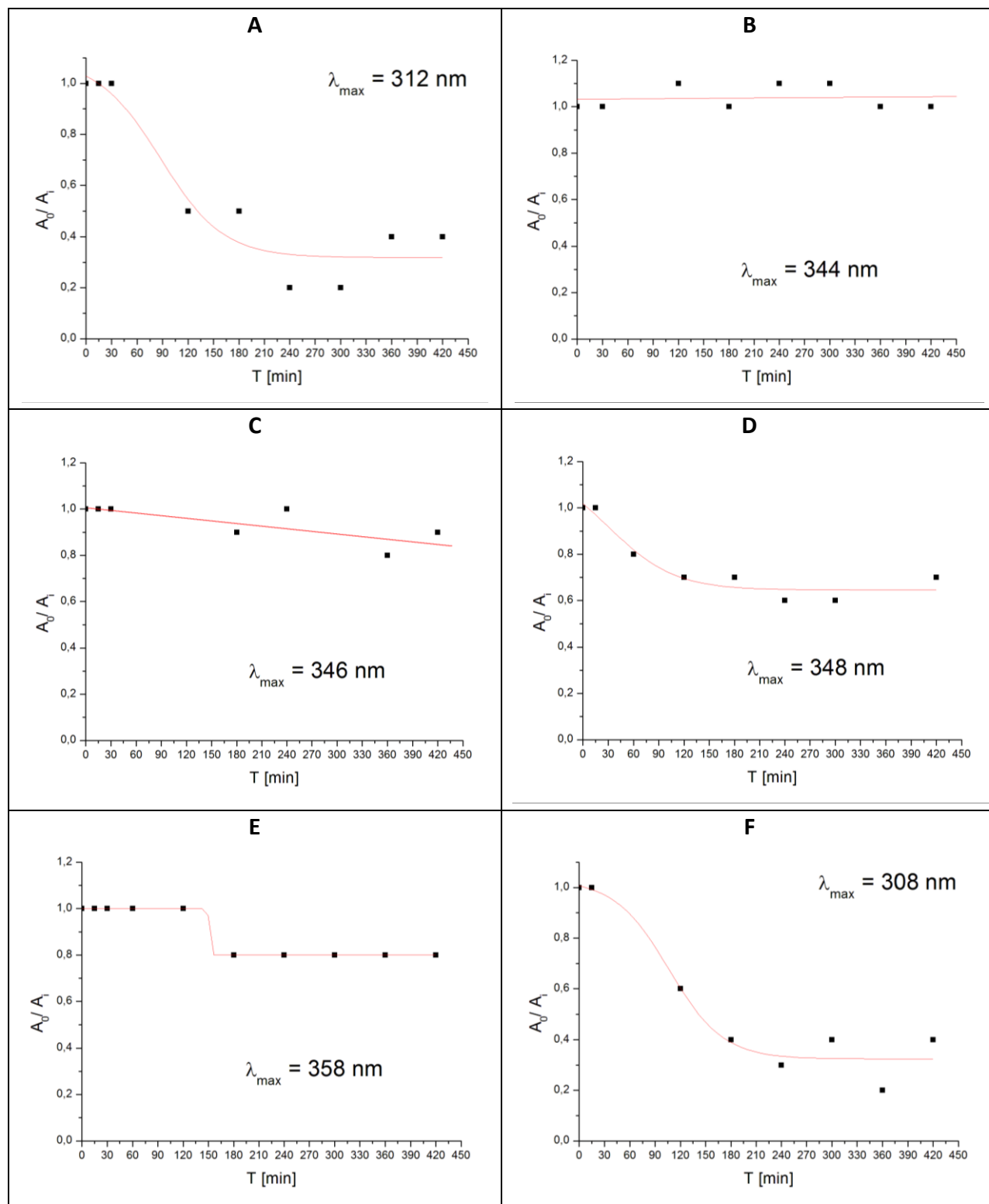


Фиг. 6: а) Стъклена плака с филм; б) снимка на микрофилма с микроскоп с Boetius PHMK 5 (Kofler)

Теста за твърдофазна фотостабилност на тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-они **6**, **8**, **10-12**, **20** и **71-76** бе осъществен чрез облъчване с ултравиолетова светлина, с помощта на *SUNTEST* оборудване. Кинетиката на фотодеструкция на изследваните съединения е наблюдавана колориметрично. С цел изпълнение на протоколните изисквания за анализа бяха изработени филми върху стъклени плаки с дебелина на микрофилма 0.05 ± 0.01 mm (Фиг. 6).

От резултатите, представени в Фиг. 7 може да се види, че най-голяма стабилност притежава съединение **8** (Фиг. 7b), при което не се наблюдава промяна в абсорбцията през 7 часовя период на облъчване. Въпреки частичното отклонение от 20% в абсорбцията след втория час на облъчване, наблюдавано при съединение **12** (Фиг. 7e), може да се приеме че съединението не претърпява фотодеструкция, като това отклонение е в грешката на измерването. За разлика от наблюдаваната константна функция в спектъра на тиенопиримидин **12**, в получената графика на съединение **10** (Фиг. 7c) ясно може да се забележи линейно понижение в абсорбцията от началото до края на облъчването, което е

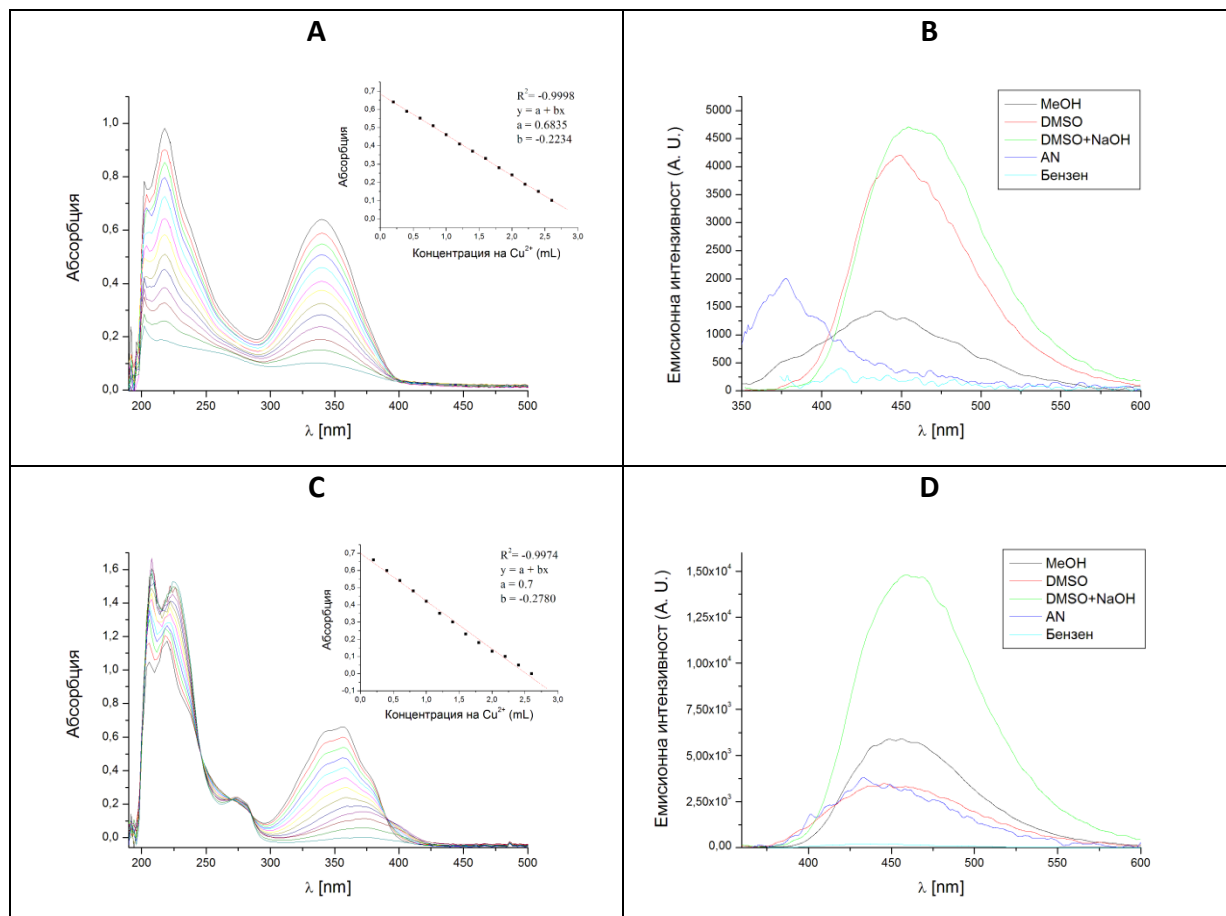
свидетелство за наличие на фотодеструкция. По-значително понижение се забелязва в абсорбционния максимум ($\lambda_{\max}$) на съединение **11** непосредствено от началото до третия час на облъчване (Фиг. 7d), след което процесите на фотодеструкция намаляват, достигайки в края на 7 час – 40%. Най-нестабилни се оказват съединения **6** (Фиг. 7a) и **20**



Фиг. 7 Твърдофазен ратиометричен анализ за фотостабилност на (a) **6** ($C=3,749.10^{-5} \text{ mol/L}$), (b) **8** ($C=3,921.10^{-5} \text{ mol/L}$), (c) **10** ($C=2,983.10^{-5} \text{ mol/L}$), (d) **11** ($C=3,921.10^{-5} \text{ mol/L}$), (e) **12** ($C=5,882.10^{-5} \text{ mol/L}$) и (f) **20** ($C=5,387.10^{-5} \text{ mol/L}$) в разтвор на DMF;

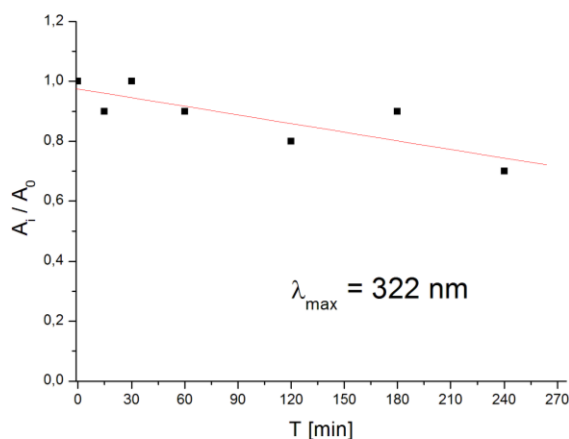
(Фиг. 7f), които претърпяват структурни промени, основно от началото до четвъртия час, достигайки 75% разлагане, след което фотохимичните промени затихват до края на седмия час на облъчване.

От проведения анализ за фотостабилност става ясно, че съединение **11** проявява по-ниска стабилност сравнение с *орто*- и *мета*-субституираните пиридили (**8** и **12**). Поради тази причина изследвахме възможността за поява на фотоиндуциран протонен трансфер (ESIPT) при **8** и **12**.



Фиг. 8 Абсорбционни спектри на **8** (a) и **12** (c) при различни концентрации на CuCl_2 ; Флуоресцентни спектри на **8** (b) и **12** (d) в MeOH, DMSO, $\text{DMSO}/\text{OH}^{(-)}$, AN и Бензен, с възбуждане при λ_{max} на абсорбция;

От Фиг. 8 може да се види, че за разлика от **8** (a) при титруване на съединение **12** (c) с Cu^{2+} катиони се наблюдава намаляване на абсорбцията в по-дълговълновата област (356 nm) и повишаване на абсорбционната ивица при 224 nm. Това намаляване кореспондира с факта, че комплексообразуването с Cu^{2+} катион води до депротониране на амида и координиране с пиридиловия цикъл. По този начин протонният трансфер бива възпрепятстван. Данните са потвърдени и от флуоресцентните анализи, където за разлика от съединение **12** (Фиг. 8d), флуоресценцията на съединение **8** (Фиг. 8b) в присъствието на протонни разтворители, както и в алкална среда се повишава. Това се дължи на факта, че в алкална среда депротонирането, респективно образуването на водородна връзка в



Фиг. 9 Твърдофазен ратиометричен анализ за фотостабилност на **71** ($C=3,128 \cdot 10^{-5}$ mol/L) в разтвор на DMF;

фотостабилността при тези производни не се дължи на *ESIPT*, което се потвърждава от факта, че **10** притежава също толкова добра фотостабилност. Известно е, че някои съединения, като например 2-хидроксифенилните производни на бензимидазола, бензооксазола и бензотиазола, не притежават фотостабилизиращ ефект, въпреки наличието на върешномолекулен трансфер на протон [81].

Тази по-висока фотостабилност на 3-пиридилното производно **8** спрямо *орто*- и *пара*- е докладвана и в литературата, където този ефект се обяснява с това, че възбуденото състояние на *орто*- и *пара*-пиридилите води до отслабване на амидната връзка, най-вероятно поради резонанс с електрон-акцепторния пиридинов азотен атом [82, 83].

Наблюдаваната значително по-ниска фотостабилност на **6** и **20** спрямо другите изследвани тиенопиримидинови производни може да се обясни с факта, че съединения **8**, **10**, **11** и **12** притежават по-дълга спрегната система с електрон-акцепторни заместители във C-2 позиция, което от своя страна измества абсорбцията им батохромно към по-ниско енергетичните дължини на вълната [83]. От друга страна по-дългата спрегната система повишава резонансната енергия, което води до по-висока фотостабилност [84].

Поради изразената цитотоксичност на съединения **71-76**, интерес за нас представляваше изследването на тяхната фотостабилност при същите условия на анализ в продължение на 4 часа.

Тъй като не са установени промени в абсорбционният максимум (λ_{max}) на съединения **71-76** по време на облъчването, корелацията между концентрацията на потенциалното лекарствено средство и времето на облъчване е постоянна величина. Фотодеструкция се наблюдава единствено при тиосемикарбазид **71** след 240 минутно облъчване на пробата, изразяваща се с близо 30% понижаване на абсорбцията (Фиг. 9).

протонен разтворител води до забрана на протонният трансфер, който обичайно води до безизлъчвателна релаксация на молекулата. В резултат на това абсорбираната енергия бива излъчена под формата на флуоресценция.

От проведеното фотометрично изследване е установено, че въпреки липсата на протонен трансфер при съединение **8** се наблюдава висока фотостабилност. Това предполага, че

Ниската фотодеструкция, установена от проведеното изследване на съединения **72-74** може да се обясни с добре известния факт, че наличието на тиосемикарбазиден [85], както и 1,3,4-тиадиазолов остатък подобрява фотоустойчивост [86]. По-ниската стабилност на съединение **71** най-вероятно се дължи на възможността за фотооксидация на метилните групи в тиофена, процес характерен за алкилбензотиофените при наличие на влага [87]. Това не се наблюдава при производно **74**, най-вероятно поради по-добрият стабилизиращ ефект на тиадиазола.

5. SAR анализи

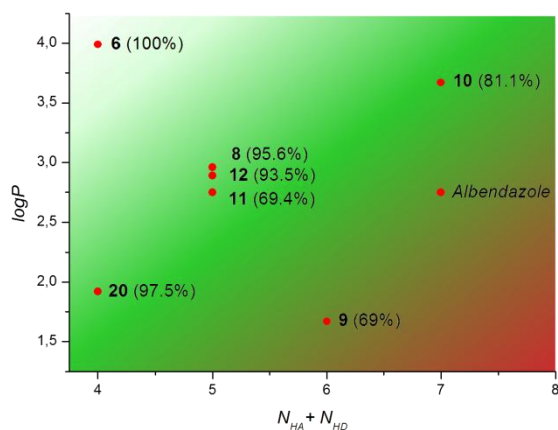
За появата на фармакологичен потенциал изследваните тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-они трябва да притежават благоприятни фармакокинетични свойства *in vivo*, т.е. достатъчна бионаличност и транспорт през различните мембрани до мястото на свързване с желан рецептор, както и оптимален профил на метаболизиране и елиминиране. Изчисленията на молекулните свойства като липофилност, молекулен размер, гъвкавост и присъствие на донори и акцептори на протони могат да предоставят полезна информация в тази връзка. Всички преставени данни са изчислителни посредством софтуерната програма *Molinspiration* [88].

Антихелминтните лекарствени средства могат да достигнат своите паразитни „мишени“ чрез орален прием (през кръвния поток и/или гастроинтестиналния тракт) или чрез дифузия през външната повърхност [89]. Именно поради тази причина топологична полярна повърхност (TPSA) е добър индикатор за чревната абсорбция на биологично активните вещества, като по-добра бионаличност се наблюдава при стойности на $TPSA \leq 140 \text{ \AA}^2$ [90]. Този параметър е използван за изчисляване *процента на абсорбция (%ABS)*, използвайки следното уравнение (1):

$$\%ABS = 109 - 0.345 \times TPSA \text{ (1) [91, 92].}$$

От данните на SAR анализа преставени в Табл. 8 се вижда, че всички изследвани съединения **6**, **8-12** и **20** отговарят на правилото на *Lipinski* [93]. Същевременно, всички съединения притежават стойности на $TPSA \leq 140 \text{ \AA}^2$. Теоритично изчислената чревна абсорбция на тиено[2,3-*d*]пиримидините варира от 88.77% до 93.22%, като тези стойности са по-високи от %ABS на *albendazole* (85.88%).

Липофилността на молекулата е физикохимичен параметър с голямо значение за потенциала на антипаразитното средство, способстващ достигнето на терапевтични концентрации в границите на третирувания паразит [89]. Наблюдавано е, че по-високият коефициент на разпределение (*logP*) при антипаразитните средства (спрямо *albendazole*),



Фиг. 10 SAR зависимост между $N_{HA}+N_{HD}$ и $\log P$

активност (Фиг. 10). Трябва да се отбележи, че от по-съществено значение се оказва липофилността, отколкото броя на $N_{HA}+N_{HD}$ (10), тъй като *albendazole* притежава многократно по-ниска антихелминтна активност (Табл. 8).

Табл. 8 Изчислени молекулни свойства на тестваните съединения: коефициент на разпределение ($\log P$), молекулна маса (MW) [g/mol], топологична полярна повърхност ($TPSA$) [$\text{\AA}^2$], молекулен обем ($Vol.$) [$\text{\AA}^3$], сума от OH and NH донори на протони (N_{HD}), сума от O и N акцептори на протони (N_{HA}), и абсорбция (%ABS).

Съединения	$mi\log P$	$M.W.$	$TPSA$	$Vol.$	N_{HA}	N_{HD}	%ABS
6	3.99	296.39	45.75	263.14	3	1	93.22
8	2.96	283.36	58.65	242.18	4	1	88.77
9	1.67	305.40	58.23	305.40	5	1	88.91
10	3.67	372.45	73.46	322.97	6	1	83.66
11	2.75	283.36	58.65	242.18	4	1	88.77
12	2.89	283.36	58.65	242.18	4	1	88.77
20	1.92	206.27	45.75	174.93	3	1	93.22
<i>Albendazole</i>	2.75	265.34	67.02	234.09	5	2	85.88

Исключение от тази зависимост се наблюдава при съединение 20, което притежава най-ниска стойност на $\log P$ и същевременно висока антитрихинелозна активност. Това е наблюдавано и при някои производни на *albendazole*, където тези притежаващи най-нисък $\log P$ (1.7), проявяват по-висока антипаразитна активност от *albendazole* срещу *T. spirallis* [95].

Това се обяснява с факта, че за да получи достатъчно серумни хранителни вещества паразитът повишава пропускливостта си по отношение на еритроцити, както и на голям набор малки молекули през аквапорините в клетъчната мембрана [89, 96]. Навлизането на

кореспондира с по-висока активност. Това предполага, че повишената липофилност спомага възможността за биомембранно проникване [94].

Такава зависимост се наблюдава и при тиенопиримидини 6, 8-12 и 20, където повишаването на $\log P$ и едновременно намаляване на броя електрон-донорни и електрон-акцепторни групи ($N_{HA}+N_{HD}$) водят до по-висока антипаразитна

активната субстанция в паразита зависи от дифузионата повърхност, концентрацията по повърхността на мембраната, рН/рК-зависимостта и липофилността на молекулата [89]. Тези промени в пропускливостта се дължат на *анионен канал с плазмодийна повърхност (PSAC)* [96].

Поради факта, че съединение **20** притежава малък молекулен обем (*Vol.*), нисък коефициент на разпределение *logP* и *pK_a* стойност (1.19) може да се предположи че активността на съединението не се дължи на дифузия през клетъчната мембрана, а на проникване през йонните канали на паразитните клетки, което обяснява отклонението от преставеният SAR модел.

Табл. 9 Изчислени молекулни свойства на тестваните съединения: коефициент на разпределение (*logP*), молекулна маса (*MW*) [g/mol], топологична полярна повърхност (*TPSA*) [$\text{\AA}^2$], молекулен обем (*Vol.*) [$\text{\AA}^3$], сума от OH and NH донори на протони (*N_{HD}*) и сума от O и N акцептори на протони (*N_{HA}*).

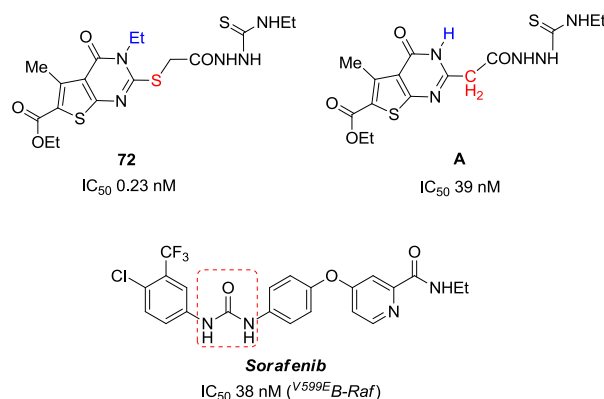
Съединения	<i>miLogP</i>	<i>M.W.</i>	<i>TPSA</i>	<i>Vol.</i>	<i>N_{HA}</i>	<i>N_{HD}</i>
71	2.14	399.57	88.05	337.77	7	3
72	2.36	457.60	114.35	382.54	9	3
73	2.71	425.61	88.05	361.01	7	3
74	2.98	381.55	72.71	319.93	6	1
75	3.21	439.59	99.01	364.70	8	1
76	3.56	407.59	72.71	343.17	6	1
A*	1.28	397.48	125.21	330.67	9	4

* съединението е публикувано в [59]; за молекулна структура виж **Фиг. 11**

Добрите резултати, получени при *in vitro* скрининга за антинеопластична активност на тиенопиримидини **71-76** бяха определящият фактор за провеждане на SAR анализ (Табл. 9).

Всички изследвани съединения **71-76** отговарят на правилото на *Lipinski* [93]. Трябва да се отбележи, че съединения, **74** и **76**, притежаващи една и съща ниска топологична полярна повърхност (*TPSA*) от 72.71 $\text{\AA}^2$ и равен брой донори (*N_{HD}*) и акцептори (*N_{HA}*) на протони са най-активни срещу клетъчна линия *HT-29*. Това се обяснява с факта, че ниската *TPSA* осигурява добра чревна резорбция на лекарството при човека [97], а по-големият брой на *N_{HA}* осигурява по-голяма разтворимост, което прави **74** и **76** обещаващи кандидати за *in vivo* анализ. Най-малко токсичните към нормалните човешки диплоидни клетки *Lep3* съединения **74** и **76** притежават *TPSA* съответно 72.71 $\text{\AA}^2$ и 99.01 $\text{\AA}^2$.

Най-активното към *MDA-MB-231* клетки съединение (**72**) притежава най-висок сбор на донорни (N_{HD}) и акцепторни (N_{HA}) групи от всички изследвани съединения както и най-висока $TPSA = 114.35 \text{ \AA}^2$. Добре известно е, че за да покаже едно съединение добра бионаличност трябва да има $TPSA$ по-ниска от $140\text{--}150 \text{ \AA}^2$. Тези молекулни свойства съвпадат добре с характеристиките на структурно подобният тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-он **A** (Фиг. 11) [59].



Фиг. 11 Структури на *MDA-MB-231* клетъчните растежни инхибитори **72**, **A** и селективния *B-Raf* инхибитор **Sorafenib**

Може да се предположи, че високото $TPSA$, молекулно тегло ($M.W.$) и обем ($Vol.$) на **72** допринасят за по-доброто пасване с активния център инхибирайки по този начин растежа на раковите *MDA-MB-231* клетки. Високата цитотоксичност на **72** може да се отдаде на алкилираната амидна група в пиримидиновия пръстен, както и на замяната на алифатния мост с тиометиленова група.

Поради високата цитотоксичност на тиенопиримидини **60**, **61**, **92**–**94**, **97**, **98** и **101** голям интерес представляваше анализа връзка структура-активност (Табл. 10).

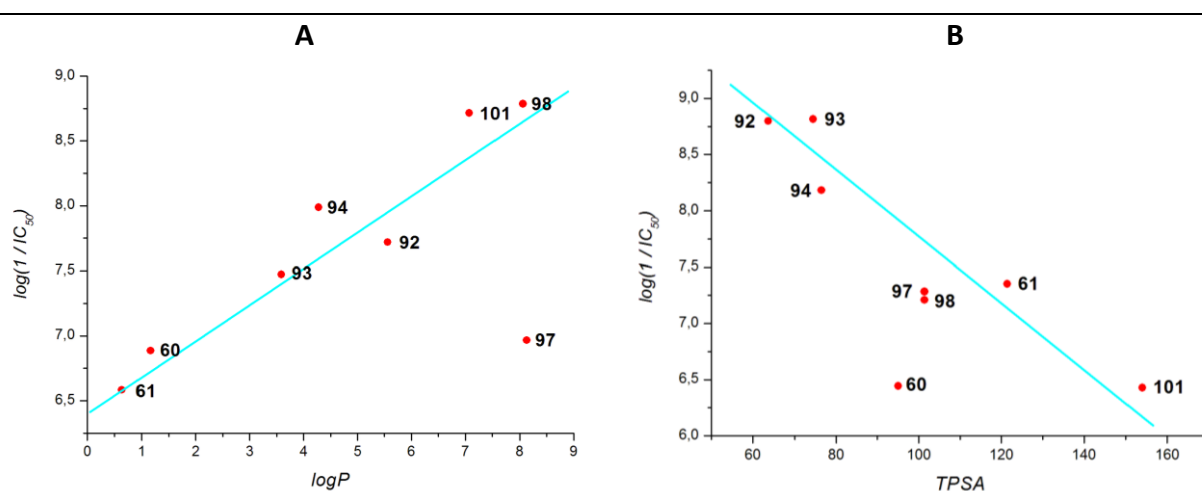
Табл. 10 Изчислени молекулни свойства на тестваните съединения: коефициент на разпределение ($\log P$), молекулна маса (MW) [g/mol], топологична полярна повърхност ($TPSA$) [$\text{\AA}^2$], молекулен обем ($Vol.$) [$\text{\AA}^3$], сума от OH and NH донори на протони (N_{HD}) и сума от O и N акцептори на протони (N_{HA}).

Съединения	$ClogP$	$M.W.$	$TPSA$	$Vol.$	N_{HA}	N_{HD}
60	1.17	293.35	95.05	247.93	6	3
61	0.64	325.35	121.39	269.46	8	3
92	5.56	426.55	63.58	376.55	5	1
93	3.59	366.42	74.44	287.96	5	2
94	4.28	413.51	76.47	355.59	6	1
97	8.13	649.27	101.38	531.95	8	2
98	8.06	628.85	101.38	534.98	8	2
101	7.07	713.26	153.99	575.01	12	2

Проведените изчисления за $\log P$ са извършени със софтуер *ChemDraw Ultra v12.0* (2009), тъй като резултатите получени по този фрагментно-базиран изчислителен метод

(*ClogP*) показват по-голяма корелация между теоретичния хидрофобен параметър и биологична активност.

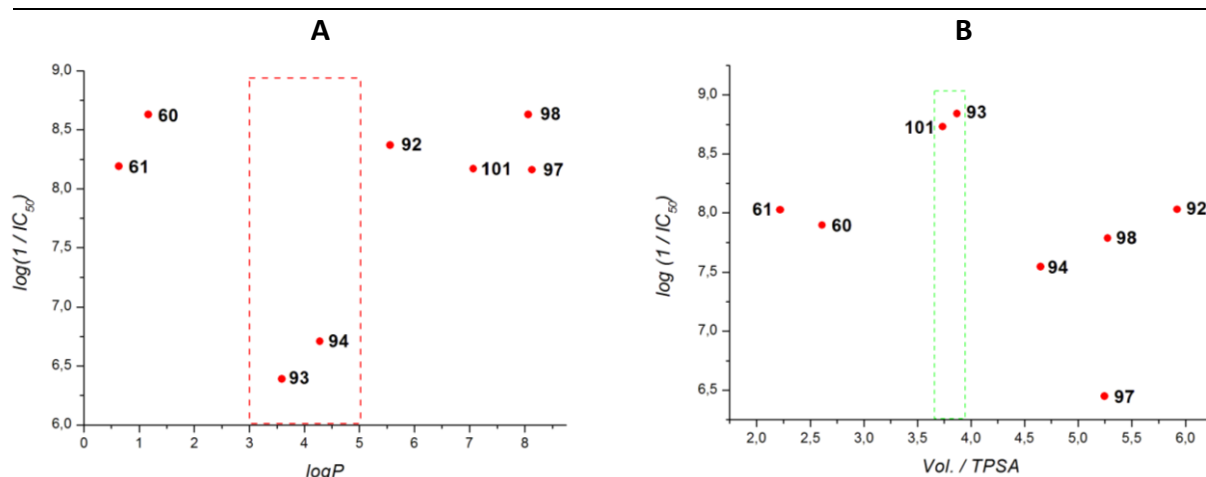
От данните представени в *Табл. 10* бе построена $\log(1/IC_{50}) / \log P$ [98] графика, където е установена зависимост между цитотоксичността към нормалните *Lep3* клетки и липофилността на молекулата (*Фиг. 12a*). Отклонение от линейната функция се наблюдава единствено при съединение **97**. Тъй като разликата в структурата между **98** и **97** се състои в заместителя при бензимидазола, то тази по-ниска токсичност най-вероятно се дължи на присъствието на халоген. Аналогично на **97**, тиенопиримидин **101** също притежава халоген в бензимидазола, но такава ниска цитотоксичност не се наблюдава, най-вероятно поради факта, че **101** притежава значително по-висока молекулна маса (*M.W.*) от **97**.



Фиг. 12 Графични зависимости за *Lep3* (a) и *HeLa* (b)

Установена е зависимост между цитотоксичността на изследваните съединения към раковите *HeLa* клетки и *TPSA* (*Фиг. 12b*). Както може да се види, с повишаване на топологичната полярна повърхност, цитотоксичността на съединенията намалява правопрпорционално. Изключение от тази функция прави съединение **60**, което проявява една от най-ниските активности срещу *HeLa*. Това може да се обясни с факта, че за разлика от тиенопиримидини **97** и **98**, които притежават близки на съединение **60** *TPSA* стойности, пиримидин **60** се характеризира със значително по-нисък $\log P$, поради наличието на глицинов остатък.

От проведенят SAR анализ е устновено, че цитотоксичността към раковите *HT-29* клетки също зависи от липофилността на молекулата. Построената $\log(1/IC_{50}) / \log P$ графика (*Фиг. 13a*) ясно изразява тази зависимост, най-ниска цитотоксичност срещу *HT-29* са проявили тиенопиримидини **93** и **94**, притежаващи $\log P$ около 4. Всички останали съединения, попадащи извън този диапазон, проявяват сравнително близка цитотоксичност срещу раковите клетки.



Фиг. 13 Графични зависимости на HT-29 (a) и MDA-MB-231 (b)

При MDA-MB-231 клетките не се наблюдава пряка зависимост между изчислените физикохимични параметри, за разлика от останалите клетъчни линии, върху които е изследвана тази серия от съединения. Корелацията между антипролиферативна активност на съединенията срещу рака на гърдата (MDA-MB-231) и тяхната структура се изразява в съотношение между обема (*Vol.*) и полярната повърхност на молекулите – *TPSA* (Фиг. 13b).

От графиката може да се види, че съотношение *Vol. / TPSA* около 3.5-4.0 води до значително повишаване на активността на тиенопиримидини **101** и **93**. Въпреки близките структурни характеристики на **97** и **98** тези съединения проявяват различна цитотоксичност спрямо MDA-MB-231, подобно на линейната функцията за *Lep3* клетките (Фиг. 12a). Тъй като разликата в структурата между **98** и **97** се състои в заместителя при бензимидазола, то тази по-ниска токсичност на **97** най-вероятно се дължи в присъствието на халоген в ароматния пръстен на бензимидазола.

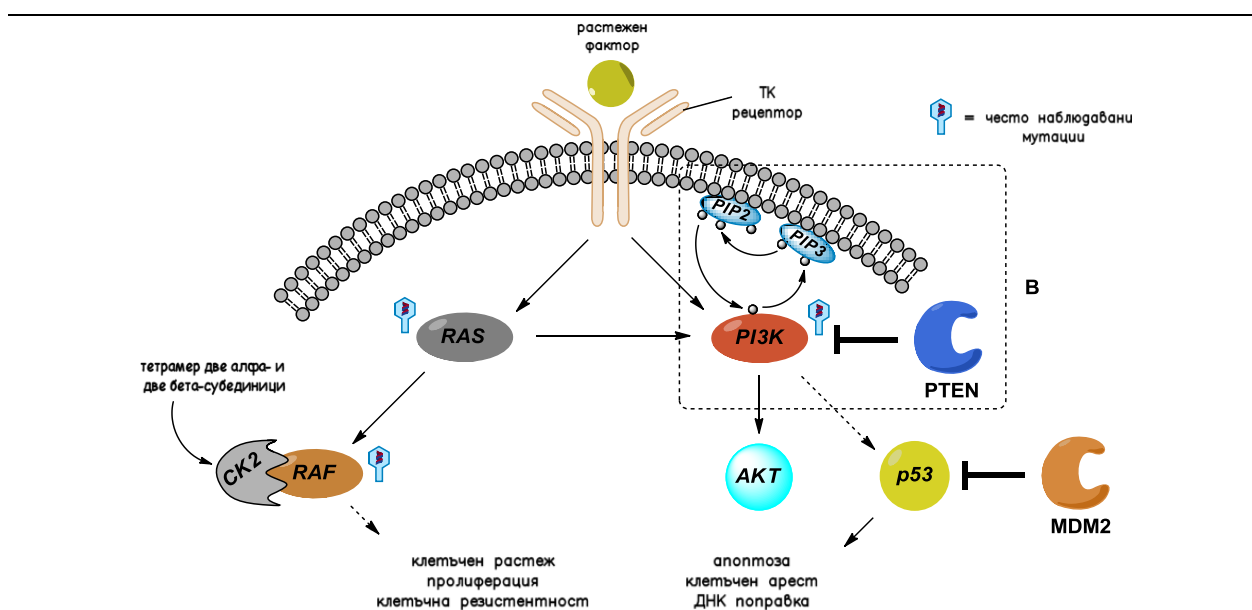
6. Молекулни изчисления

Тирозин киназите (ТК) са ключови регулатори в клетъчните процеси, представляващи едно от най-големите и функционално разнообразни генетични семейства, с особено значение за много човешки заболявания, включително рак.

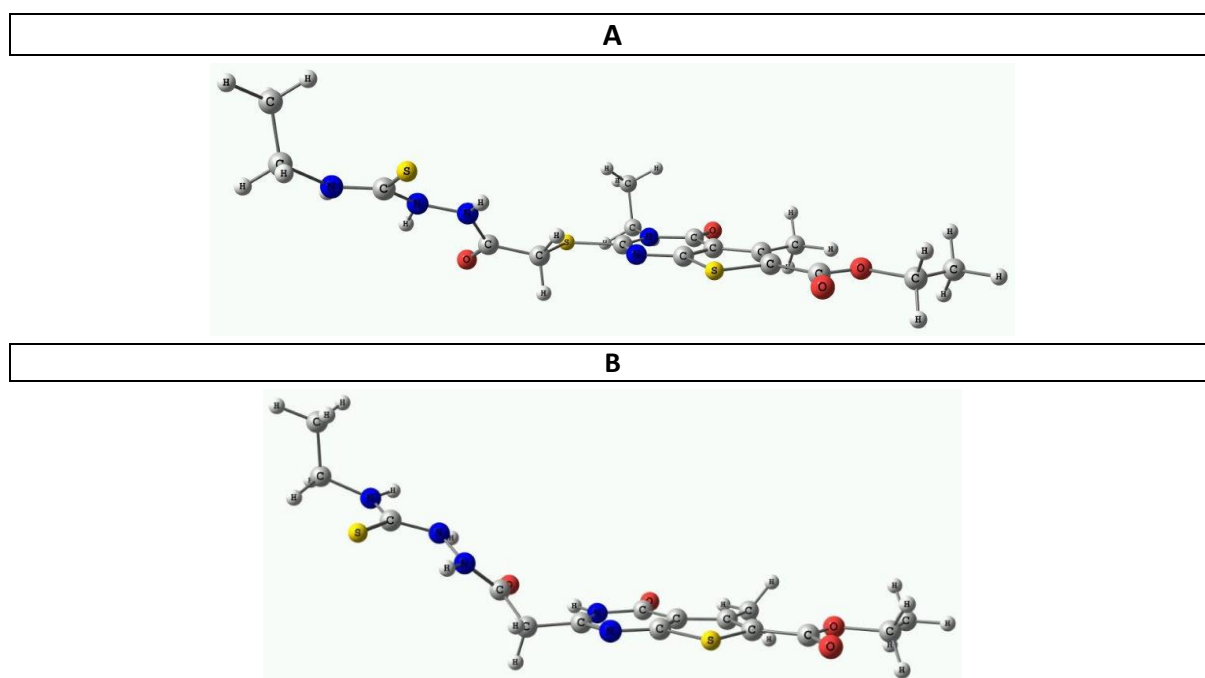
EGFR е рецептор и ключов елемент на клетъчно сигнализиране. Съществуват няколко пътища за вътреклетъчно предаване на сигнали (Фиг. 14). Един от тези пътища е *Ras-Raf-MEK* – каскадна система от протеини, които пренасят сигнали от периферията към ядрото на клетката, свързани с генна експресия и пролиферация [99].

В литературата е докладвано, че високо селективното карбамидно производно (*sorafenib*, Фиг. 11) показва наличие за регресия на рака на гърдата MDA-MB-231 след 9

дневен перорален прием [10, 100]. Същевременно с това, някои тиено[2,3-*d*]пиримидини са идентифицирани като инхибитори на една от най-важните изоформи на *Raf*, регулираща *Ras* активацията и съответно туморна прогресия – а именно *B-Raf* [101-103]. Именно поради наличието на тази клетъчна селективност на карбамида и съответно тиосемикарбазидите (72, 75 и A) може да се предположи, че те проявяват един и същ биоизостеричен механизъм на действие върху туморния растеж, блокирайки някой от двата клетъчни процеса, съществени за развитието на тумора, а именно: инхибиране на *Raf*/MEK/ERK сигналните пътища (чрез инхибиране на *Raf*) и инхибиране на тирозин киназните рецептори (чрез инхибиране на *VEGFR*).



Фиг. 14 Механизъм на вътреклетъчно сигнализиране



Фиг. 15 Молекулна B3LYP/6-311++G** оптимизация на съединения 72 (a) и A (b)

Въз основа на структурата на **72** и **A** (Фиг. 15), оптимизирани чрез използване на *DFT - B3LYP/6-311++G*** [8, 9] може да се предположи, че замяната на метиленовата група във *C-2* позиция на пиримидина със серен мост, води до много по-плоска молекулна структура на **72**. Същевременно, *N*-алкилирането в 3-та позиция води до по-голям молекулен обем на **72**, сравнение с **A**.

7. Молекулен *docking*

За да се изяснят възможните модели на свързване с *B-Raf*, на съединения **72**, **75** и **A** е проведен *docking* (напасване) в кристалната структура на човешки онкогенен ^{V599E}*B-Raf*, в комплекс със *sorafenib* (*PDB код*: 1UWJ [10]), използвайки *MOE* софтуер [11].

Киназният домейн на ^{V599E}*B-Raf* има структурно два дяла (лоба), типични и за други членове от групата на протеин киназите [10]. Подобно на *sorafenib* (Фиг. 19) трите лиганда се свързват по повърхностна на джоба, разположен между *N* и *C* веригите на киназния домейн. *Docking* конформациите на **72**, **A** и **75** са показани на Фиг. 16a, Фиг. 17a и Фиг. 18a.

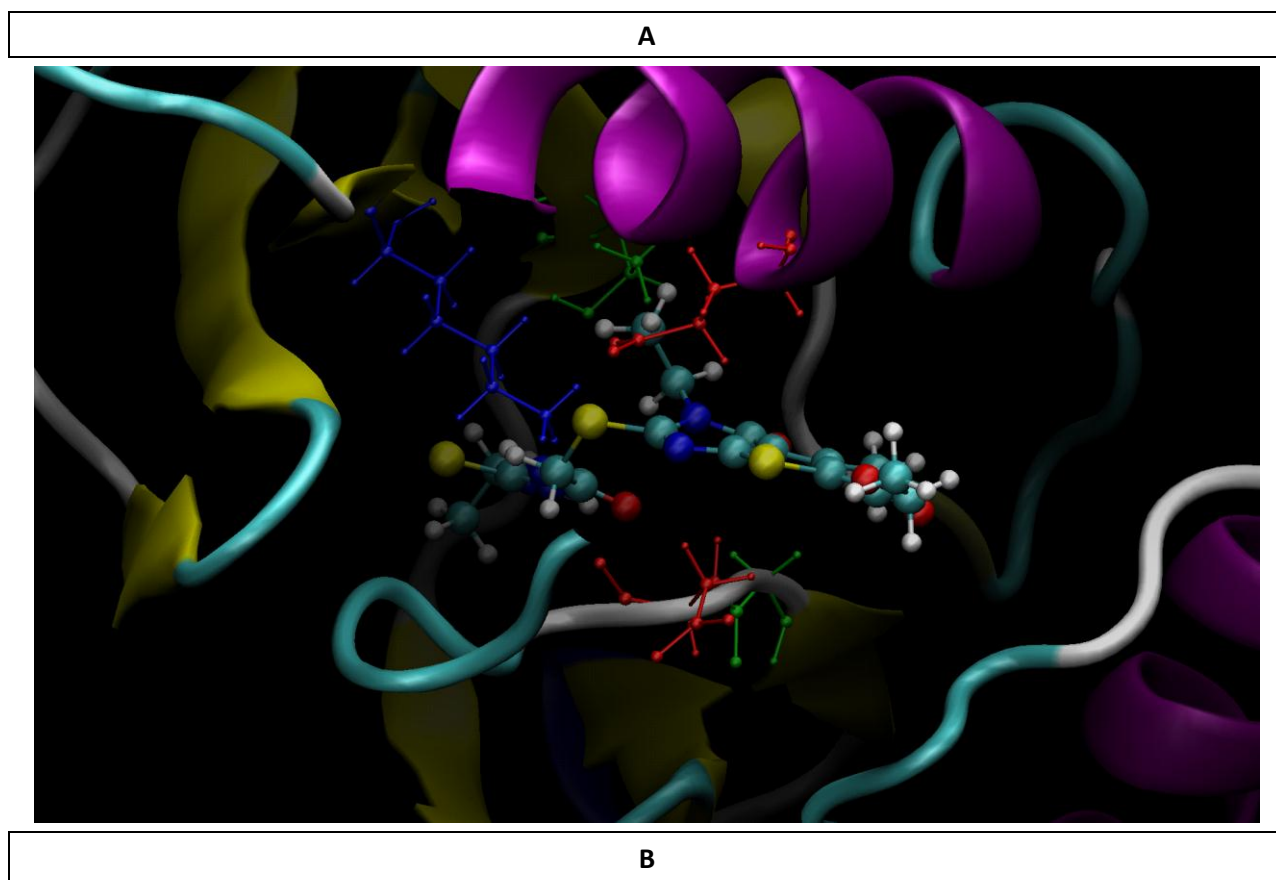
Във всички случаи, *N*-етил-тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-оновият фрагмент заема джоб, образуван от остатъци *Val503*, *Leu504*, *Ile571*, *Phe594*, *Lys482* и *Gly592*, като само етоксигрупата е изложена към разтворителя (Фиг. 16b, Фиг. 16b и Фиг. 16b). Предимно доминират *van der Waals* взаимодействия на **72** и **A** с ^{V599E}*B-Raf*, както може да се види от 2D моделите на лигандите в джоба (Фиг. 16b и Фиг. 16b).

Полярните взаимодействия от активния център на *DFG* с катализиращите *Glu500*, *Gly592*, както и координиращите *Lys482* или *Thr528* също допринасят за стабилизирането на връзката на лиганда с рецептора. Тиосемикарбазидният остатък на **72** е свързан чрез две водородни връзки към *Thr528* и *Asp593*. Другият *MDA-MB-231* селективен тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-он **A** образува водородни връзки с *Lys482* и *Asp593*.

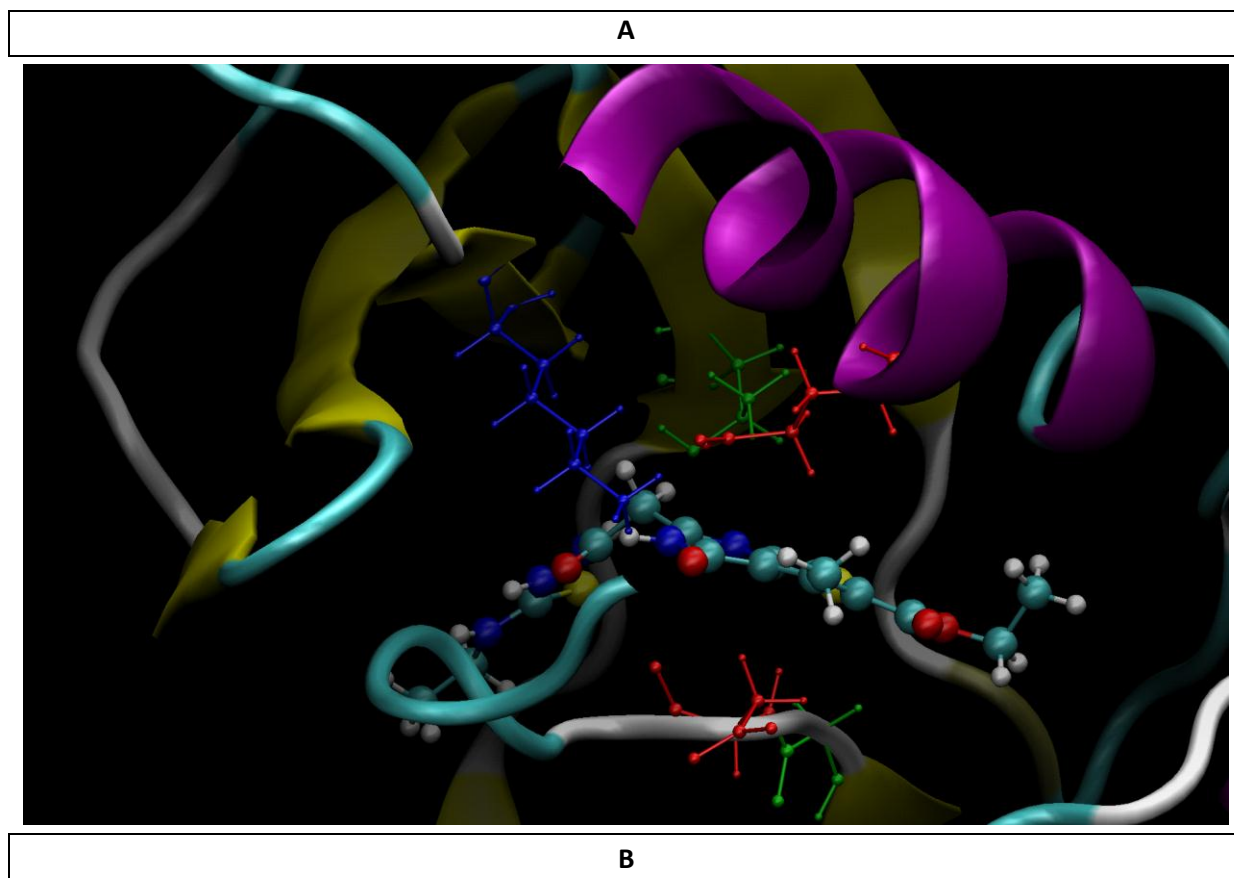
При съединение **75** един от *N*-атоми на тиадиазоловия хетероцикъл действа като електроноакцептор, образувайки водородна връзка с *Thr528*, докато *N*-етилвия заместител е ориентиран към полярния *Glu500* и *Asp593*.

Тези полярни взаимодействия заедно с хидрофобното взаимодействие с *Phe594*, водят до свързване на трите лиганда в активния център на *DFG*. От друга страна, както бе споменато по-горе, се формират редица взаимодействия с катализиращите и координиращите остатъци *Lys482* и *Glu500*. По този начин свързването на лигандите с

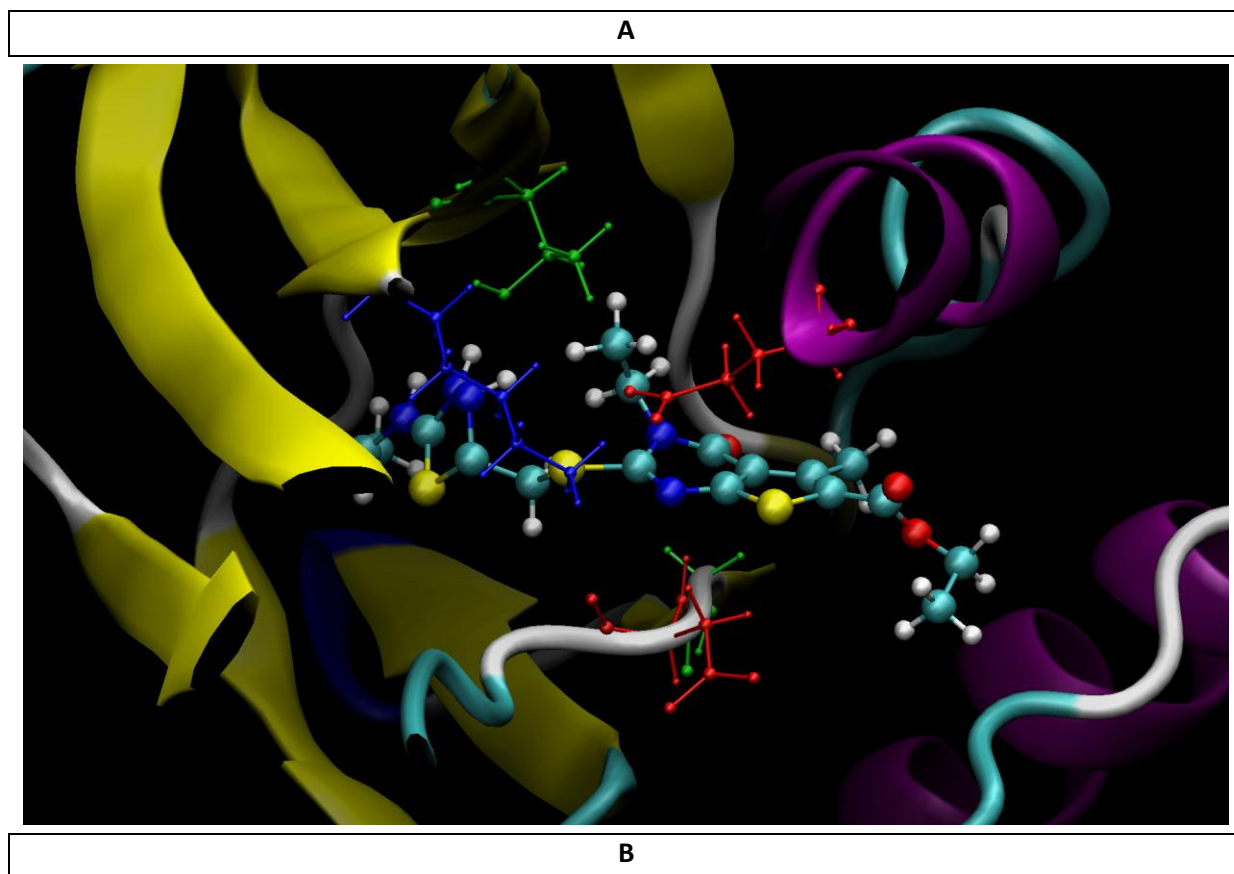
V^{599E} *B-Raf* промотира неактивната конформация на ензима, чрез блокиране на активния център на *DFG* и съответно възпрепятства неговото фосфорилиране.



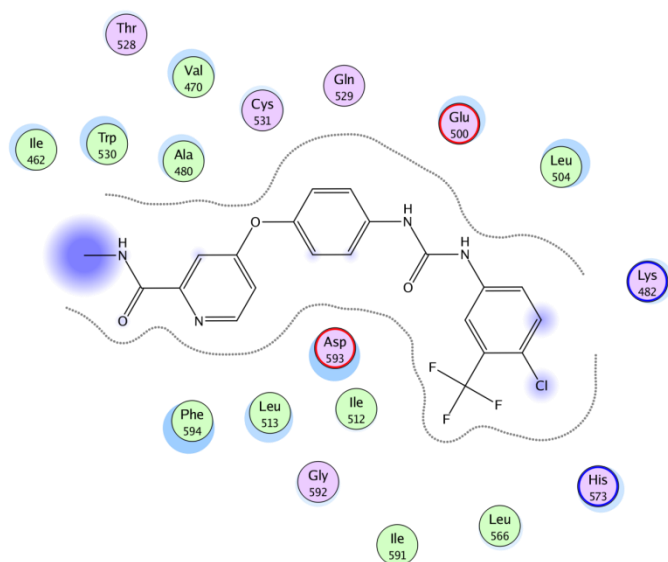
Фиг. 16 (a) Docking коформации на 72 с аминокиселинните остатъци Thr528, Asp593, Lys482, Glu500, Gly592; (b) 2D репрезентация на взаимодействията на 72 с V^{599E} *B-Raf*;



Фиг. 17: (a) Docking коформации на **A** с аминокиселинните остатъци Thr528, Asp593, Lys482, Glu500, Gly592; (b) 2D репрезентация на взаимодействията на **A** с ^{V599E}B-Raf



Фиг. 18: (a) Docking коформации на 75 с аминокиселинните остатъци Thr528, Asp593, Lys482, Glu500, Gly592; (b) 2D репрезентация на взаимодействията на 75 с ^{V599E}B-Raf



Фиг. 19 2D репрезентация на взаимодействията на sorafetib с ^{V599L}B-Raf



Изводи

В резултат на поставените цели и задачи, в настоящия дисертационен труд от извършените изследвания, могат да се направят следните по-важни изводи:

1. Синтезирани и доказани са общо 100 съединения, обособени в пет групи:
 - (1) 2-субституирани тиено[2,3-*d*]пиримидини и техните 2-аминотиофенови прекурсори (47 бр.);
 - (2) тиено[2,3-*d*]пиримидини, съдържащи фталимидов фрагмент (8 бр.);
 - (3) производни на 3-етил-тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-она (15 бр.);
 - (4) тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-они, съдържащи бензимидазол (3 бр.);
 - (5) производни на 1*H*-бензимидазол-2-она и 1*H*-бензимидазол-2-тиона (8 бр.);
 - (6) бис-субституирани бензимидазоли, съдържащи тиено[2,3-*d*]пиримидини и техните нитрилни прекурсори (13 бр.);

От тях 60 съединения са нови, неописани в литературата.

2. Детерминирани са химичните и физични свойства на синтезираните продукти.
3. Установено е, че при циклокондензацията между 2-аминотиофени с ароматни и алифатни нитрили за получаване на тиено[2,3-*d*]пиримидини от група (1), последователното свързване на реакторите за продухване с газ *HCl* не води до понижаване на добива, спрямо продухването при единична реакция.
4. В резултат на поведения синтез на тиено[2,3-*d*]пиримидини от група (1) е наблюдавано, че производните на тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-она се получават с по-висок добив от аналогичните тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-амини.
5. Установено е, че реакциите между 2-амино-4,5,6,7-тетрахидробензотиофен-3-карбонитрил с 3-цианопиридин и 4-цианопиридин водят до получаване на смес от 4-хлортиенопиримидин и 4-аминотиенопиримидин.
6. Взаимодействието между 2-аминотиофен-3-карбоксилати и имино диацетонитрил води до циклизация с участието на едната нитрилна група и кисела хидролиза на втората, при което се получават тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-они, съдържащи глицинов остатък.
7. Установено бе, че участващите в реакцията с фталовия анхидрид тиенопиримидин-4-амини образуват комплекс с оцетната киселина, което възпрепятства ацилирането и понижава тяхната реакционност.

8. Установено бе, че процесът на присъединяване по *Aza-Michael* към бензимидазоли с 2,5-кратен излишък на акрилонитрил води до 1,3-бис(ционоетилни) производни на 5(6)-заместени 1*H*-бензимидазол-2-они и 1*H*-бензимидазол-2-тиони.
9. Не се наблюдава *Aza-Michael* присъединяване, при използване на 1*H*-бензимидазол-2-амин, незаместени 1*H*-бензимидазол-2-они и 1*H*-бензимидазол-2-тиони.
10. В резултат на проведените реакции между 2-хлоретил-тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-они **13**, **21** и 1*H*-бензимидазол-2-амин, в условията на твърдо-течен междофазов катализ, се получават монозаместени продукти.
11. При фармакологично изследване за антихелминтна активност срещу тъкътния хелминт *Trichinella spiralis*, бе установено че тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-они **6**, **12** и **20** проявяват значително по-висока *in vitro* активност в сравнение с *albendazole* и *ivermectin*, което ги прави подходящи кандидати за по-нататъшни токсикологични изследвания *in vivo*.
12. При проведения *in vitro* скрининг на синтезираните тиенопиримидини за антинеопластична активност спрямо човешки клетъчни линии на колоректален рак *HT-29*, рак на гърдата *MDA-MB-231*, цервикални ракови клетки *HeLa*, чернодробен карцином *HepG2* и нормални диплоидни *Lep3* клетки бе установено, че:
 - Всички изследвани тиено[2,3-*d*]пиримидини проявяват висока цитотоксичност срещу тестваните неопластични клетъчни линии.
 - Присъсъвието на 1,3,4-тиадиазолов и глицинов остатък в молекулата на тиено[2,3-*d*]пиримидина води до значително понижаване на цитотоксичността спрямо нормални човешки диплоидни *Lep3* клетки, като се запазва високата цитотоксичност срещу раковите.
 - Съдържащите глицинов остатък тиенопиримидини **60** и **61** проявят селективна активност по отношение на *HT-29* раковите клетки при концентрации на IC_{50} многократно по-ниски от тези спрямо *Lep3*.
13. Въз основа на проведените молекулни изчисления и *docking* проучване на производните на 3-етил-тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-они **72** и **75**, бе установено че селективността им към раковите клетки се дължи на свързването им с V^{599E} *B-Raf*, което промотира неактивната конформация на ензима чрез блокиране на активния център на *DFG* и съответно възпрепятстване на неговото фосфорилиране.
14. Проведеният *in vitro* скрининг за антиоксидантна активност на 5,6,7,8-тетрахидробензо[*b*]тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-амините показва, че те не проявяват

инхибиращ ксантиноксидазата ефект, но от друга страна съединения **22, 33, 37, 39** и **42** демонстрират умерена инхибираща ензима *DNase I* активност.

15. В резултат на проведения твърдофазен тест за фотостабилност на противораково активните тиосемикарбазиди (**71-73**), 1,3,4-тиадиазоли (**74-76**) и антихелминтните тиенопиримидин-4-они (**6-12, 20**) установено бе, че:

- Тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-оните, притежаващи по-дълга спрегната верига проявяват по-висока фотостабилност.
- Съединенията, съдържащи тиосемикарбазид и 1,3,4-тиадиазол в страничната си верига, показват висока фотостабилност при 240 минутно облъчване на пробите, като 1,3,4-тиадиазолните производни не показват наличие на фотодеструкция.
- Наличието на фотоиндуциран протонен трансфер (*ESIPT*) не е задължително условие за поява на фотостабилност.

16. Проведеният SAR анализ на изследваните съединения доведе до изясняването на някои зависимости между структура и биологична активност, които могат да послужат като основа за по-нататъшен целенасочен синтез на нови тиено[2,3-*d*]пиримидини с противоракови и антихелминтни свойства.



Приноси

От най-съществените резултати, получени в настоящия дисертационен труд, могат да се констатират следните приноси от *научен* и *научно-приложен* характер:

1. Разработени са подходящи реакционни методи за синтез, изолиране и пречистване на всяка една от новогенерираните структури.
2. Създаден е ефективен метод за циклокондензация на 2-аминотиофени с ароматни или алифатни нитрили, позволяващ провеждането на две циклокондензации едновременно.
3. Определени са необходимите реакционни условия за осъществяване на *N,N'*-присъединяване по *Aza-Michael* на акрилонитрил към бензимидазол-2-они и бензимидазол-тиони.
4. Създадени са перспективни биологичноактивни съединения, проявяващи висока антинеопластична и антитрихинелозна активност.
5. Доказан е механизмът на действие на изследваните тиенопиримидинови производни с установена антинеопластична активност като отправна цел за генериране на нови структури с предварително зададени свойства.
6. Разработена е аналитична методика за провеждане на твърдофазен тест за фотостабилност.



- [1] Campbell, W. C.; Rew, R. S., *Chemotherapy of parasitic diseases*. Plenum Press, New York: 1986; p 655.
- [2] Campbell, W. C.; Denham, D. A., *Trichinella and trichinosis*. Plenum Press, USA and London, UK: 1983; Vol. Chemotherapy, p 340-355.
- [3] Fernández, J.; Pérez-Álvarez, J. A.; Fernández-López, J. A., Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chem.* **1997**, 59 (3), 345-353.
- [4] Zvezdanovic, J.; Daskalova, L.; Yancheva, D.; Cvetkovic, D.; Markovic, D.; Anderluh, M.; Smelcerovic, A., 2-Amino-5-alkylidenethiazol-4-ones as promising lipid peroxidation inhibitors. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly* **2014**, 145 (6), 945-952.
- [5] Smelcerovic, A.; Rangelov, M.; Smelcerovic, Z.; Veljkovic, A.; Cherneva, E.; Yancheva, D.; Nikolic, G. M.; Petronijevic, Z.; Kocic, G., Two 6-(propan-2-yl)-4-methyl-morpholine-2, 5-diones as new non-purine xanthine oxidase inhibitors and anti-inflammatory agents. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, 55, 493-497.
- [6] Bartholeyns, J.; Peeters-Joris, C.; Baudhuin, P., Hepatic Nucleases. *Eur. J. Biochem.* **1975**, 60 (2), 385-393.
- [7] Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R., Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminform.* **2012**, 4 (1), 1-17.
- [8] Frisch, M.; Trucks, G.; Schlegel, H.; Scuseria, G.; Robb, M.; Cheeseman, J.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G., Gaussian 09, Revision A.1. B01, (Gaussian Inc., Wallingford CT, 2010) **2009**.
- [9] Stephens, P.; Devlin, F.; Chabalowski, C.; Frisch, M. J., Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. *The Journal of Physical Chemistry* **1994**, 98 (45), 11623-11627.
- [10] Wan, P. T.; Garnett, M. J.; Roe, S. M.; Lee, S.; Niculescu-Duvaz, D.; Good, V. M.; Project, C. G.; Jones, C. M.; Marshall, C. J.; Springer, C. J., Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* **2004**, 116 (6), 855-867.
- [11] *Molecular Operating Environment (MOE)*, 2011.10; Chemical Computing Group Inc.: 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2011.
- [12] Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K., VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, 14 (1), 33-38.
- [13] Gewald, K.; Schinke, E.; Böttcher, H., Heterocyclen aus CH-aciden Nitrilen, VIII. 2-Amino-thiophene aus methylenaktiven Nitrilen, Carbonylverbindungen und Schwefel. *Chem. Ber.* **1966**, 99 (1), 94-100.
- [14] Aponte, J. C.; Vaisberg, A. J.; Castillo, D.; Gonzalez, G.; Estevez, Y.; Arevalo, J.; Quiliano, M.; Zimic, M.; Verástegui, M.; Málaga, E.; Gilman, R. H.; Bustamante, J. M.; Tarleton, R. L.; Wang, Y.; Franzblau, S. G.; Pauli, G. F.; Sauvain, M.; Hammond, G. B., Trypanoside, anti-tuberculosis, leishmanicidal, and cytotoxic activities of tetrahydrobenzothienopyrimidines. *Biorg. Med. Chem.* **2010**, 18 (8), 2880-2886.
- [15] Kang, N.; Cao, S.-J.; Zhou, Y.; He, H.; Tashiro, S.-I.; Onodera, S.; Qiu, F.; Ikejima, T., Inhibition of caspase-9 by oridonin, a diterpenoid isolated from *Rabdosia rubescens*, augments apoptosis in human laryngeal cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2015**, 47 (6), 2045-2056.
- [16] Shishoo, C.; Devani, M.; Bhadti, V.; Jain, K.; Ananthan, S., Reaction of nitriles under acidic conditions. Part VI. Synthesis of condensed 4-chloro-and 4-aminopyrimidines from ortho-aminonitriles. *J. Heterocycl. Chem.* **1990**, 27 (2), 119-126.
- [17] Santos, J. L.; Yamasaki, P. R.; Chin, C. M.; Takashi, C. H.; Pavan, F. R.; Leite, C. Q., Synthesis and in vitro anti *Mycobacterium tuberculosis* activity of a series of phthalimide derivatives. *Biorg. Med. Chem.* **2009**, 17 (11), 3795-3799.
- [18] Akgün, H.; Karamelekoğlu, İ.; Berk, B.; Kurnaz, I.; Sarıbiyık, G.; Öktem, S.; Kocagöz, T., Synthesis and antimycobacterial activity of some phthalimide derivatives. *Biorg. Med. Chem.* **2012**, 20 (13), 4149-4154.
- [19] Bhat, M. A.; Al-Omar, M. A., Synthesis, characterization and in vivo anticonvulsant and neurotoxicity screening of Schiff bases of phthalimide. *Acta Pol. Pharm.* **2011**, 68 (3), 375-380.
- [20] Bailleux, V.; Vallee, L.; Nuyts, J.-P.; Vamecq, J., Synthesis and anticonvulsant activity of some N-phenylphthalimides. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, 42 (9), 1817-1821.
- [21] Abdel-Hafez, A. A.-M., Synthesis and anticonvulsant evaluation of N-substituted-isoindolinedione derivatives. *Arch. Pharmacol. Res.* **2004**, 27 (5), 495-501.
- [22] Pophale, R. A.; Deodhar, M. N., Synthesis and evaluation of novel phthalimide derivatives as analgesic and anti-inflammatory agents. *Der Pharma Chemica* **2010**, 2 (1), 185-193.
- [23] Lima, L. d. M.; Castro, P.; Machado, A. L.; Fraga, C. A. M.; Lugnier, C.; de Moraes, V. L. G.; Barreiro, E. J., Synthesis and anti-inflammatory activity of phthalimide derivatives, designed as new thalidomide analogues. *Biorg. Med. Chem.* **2002**, 10 (9), 3067-3073.
- [24] Chapman Jr, J. M.; Voorstad, P. J.; Cocolas, G. H.; Hall, I. H., Hypolipidemic activity of phthalimide derivatives. 2. N-phenylphthalimide and derivatives. *J. Med. Chem.* **1983**, 26 (2), 237-243.

- [25] Sena, V. L.; Srivastava, R. M.; Silva, R. O.; Lima, V. L., Synthesis and hypolipidemic activity of N-substituted phthalimides. Part V. *Il Farmaco* **2003**, *58* (12), 1283-1288.
- [26] Kok, S. H. L.; Gambari, R.; Chui, C. H.; Yuen, M. C. W.; Lin, E.; Wong, R. S. M.; Lau, F. Y.; Cheng, G. Y. M.; Lam, W. S.; Chan, S. H., Synthesis and anti-cancer activity of benzothiazole containing phthalimide on human carcinoma cell lines. *Biorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (7), 3626-3631.
- [27] Pluempunapat, W.; Adisakwattana, S.; Yibchok-Anun, S.; Chavasiri, W., Synthesis of N-phenylphthalimide Derivatives as α -Glucosidase Inhibitors. *Arch. Pharmacol. Res.* **2007**, *30* (12), 1501-1506.
- [28] Inuzuka, K.; Fujimoto, A., The Amino–Imino Tautomerization of the 2-Aminopyridine–Acetic Acid System in Isooctane. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1990**, *63* (4), 971-975.
- [29] Kitamura, T.; Hikita, A.; Ishikawa, H.; Fujimoto, A., Photoinduced amino–imino tautomerization reaction in 2-aminopyrimidine and its methyl derivatives with acetic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2005**, *62* (4), 1157-1164.
- [30] Inuzuka, K.; Fujimoto, A., Electronic properties and ultraviolet absorption and fluorescence spectra of 2-pyridinamine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* **1986**, *42* (8), 929-937.
- [31] Fujimoto, A.; Inuzuka, K., Absorption and Fluorescence Spectra of 1-Methyl-2 (1H)-pyridinimines and 2-Methylaminopyridine–Acetic Acid Complex. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64* (12), 3758-3760.
- [32] Kitamura, T.; Okita, M.; Sasaki, Y.; Ishikawa, H.; Fujimoto, A., Amino–imino tautomerization reaction of the 4-aminopyrimidine/acetic acid system. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2008**, *69* (2), 350-360.
- [33] Chai, S.; Zhao, G.-J.; Song, P.; Yang, S.-Q.; Liu, J.-Y.; Han, K.-L., Reconsideration of the excited-state double proton transfer (ESDPT) in 2-aminopyridine/acid systems: role of the intermolecular hydrogen bonding in excited states. *PCCP* **2009**, *11* (21), 4385-4390.
- [34] Hung, F.-T.; Hu, W.-P.; Li, T.-H.; Cheng, C.-C.; Chou, P.-T., Ground and excited-state acetic acid catalyzed double proton transfer in 2-aminopyridine. *The Journal of Physical Chemistry A* **2003**, *107* (18), 3244-3253.
- [35] Wright, J. B., The Chemistry of the Benzimidazoles. *Chem. Rev.* **1951**, *48* (3), 397-541.
- [36] Phillips, M. A., CCCXVII.—The formation of 2-substituted benzimidazoles. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1928**, 2393-2399.
- [37] Gurralla, S.; Babu, Y. R.; Rao, G. V.; Latha, B. M., Symmetrical coupling of 2-mercapto benzimidazole derivatives and their antimicrobial activity. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2011**, *3* (2), 217-220.
- [38] Ahamed, M. R.; Narren, S. F.; Sadiq, A. S., Synthesis of 2-Mercaptobenzimidazole and Some of its Derivatives.
- [39] Mavrova, A. T.; Anichina, K. K.; Vuchev, D. I.; Tsenov, J. A.; Kondeva, M. S.; Micheva, M. K., Synthesis and antitrichinellosis activity of some 2-substituted-[1, 3] thiazolo [3, 2-a] benzimidazol-3 (2H)-ones. *Biorg. Med. Chem.* **2005**, *13* (19), 5550-5559.
- [40] Hartmann, A., Ueber die Einwirkung von Phosgen auf o-Diamine. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1890**, *23* (1), 1046-1051.
- [41] Hari, S.; Rinaldi, E.; Somlo, J., Process for the manufacture of benzimidazolones-(2). US Patent 4,138,568: 1979.
- [42] Kym, O.; Ratner, L., Zur Kenntnis substituierter α -Hydroxyl-und α -Methyl-benzimidazole. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1912**, *45* (3), 3238-3255.
- [43] Mather, B. D.; Viswanathan, K.; Miller, K. M.; Long, T. E., Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31* (5), 487-531.
- [44] Demirayak, S.; Kayagil, I.; Yurttas, L., Microwave supported synthesis of some novel 1, 3-Diarylpyrazino [1, 2-a] benzimidazole derivatives and investigation of their anticancer activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46* (1), 411-416.
- [45] Ameen, M. A.; Karsten, S.; Liebscher, J., A convenient method for constructing novel tetrahydropyrido [4', 3': 4, 5] thieno [2, 3-d]-pyrimidinones-carbohydrate and amino acid conjugates via copper (I)-catalyzed alkyne-azide 'Click Chemistry'. *Tetrahedron* **2010**, *66* (12), 2141-2147.
- [46] Varvounis, G.; Giannopoulos, T., Synthesis, chemistry, and biological properties of thienopyrimidines. *Adv. Heterocycl. Chem.* **1996**, *66* (5), 193-283.
- [47] Alifanov, V. L.; Babaev, E. V., Novel and efficient synthesis of 2-aminooxazoles from pyrimidin-2 (1H)-one. *Synthesis* **2007**, 2007 (02), 263-270.
- [48] Refaat, H. M., Synthesis and anticancer activity of some novel 2-substituted benzimidazole derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (7), 2949-2956.
- [49] Goshev, I.; Mavrova, A.; Mihaylova, B.; Wesselinova, D., Antioxidant activity of some benzimidazole derivatives to definite tumor cell lines. *J. Cancer Res. Ther.* **2013**, *1* (2), 87-91.
- [50] Mavrova, A. T.; Yancheva, D.; Anastassova, N.; Anichina, K.; Zvezdanovic, J.; Djordjevic, A.; Markovic, D.; Smelcerovic, A., Synthesis, electronic properties, antioxidant and antibacterial activity of some new benzimidazoles. *Biorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (19), 6317-6326.

- [51] Mavrova, A. T.; Denkova, P.; Tsenov, Y. A.; Anichina, K. K.; Vutchev, D. I., Synthesis and antitrichinellosis activity of some bis (benzimidazol-2-yl) amines. *Biorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (18), 6291-6297.
- [52] Dudhe, R.; Sharma, P. K.; Verma, P.; Chaudhary, A., Pyrimidine as anticancer agent: a review. *Journal of Advanced Scientific Research* **2011**, *2* (3), 10-17.
- [53] Munchhof, M. J.; Beebe, J. S.; Casavant, J. M.; Cooper, B. A.; Doty, J. L.; Higdon, R. C.; Hillerman, S. M.; Soderstrom, C. I.; Knauth, E. A.; Marx, M. A.; Marie, A.; Rossi, K.; Sobolov, S. B.; Sun, J., Design and SAR of thienopyrimidine and thienopyridine inhibitors of VEGFR-2 kinase activity. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (1), 21-24.
- [54] Palaska, E.; Şahin, G.; Kelicen, P.; Durlu, N. T.; Altinok, G., Synthesis and anti-inflammatory activity of 1-acylthiosemicarbazides, 1, 3, 4-oxadiazoles, 1, 3, 4-thiadiazoles and 1, 2, 4-triazole-3-thiones. *Il Farmaco* **2002**, *57* (2), 101-107.
- [55] Dogan, H. N.; Duran, A.; Rollas, S.; Sener, G.; Uysal, M. K.; Gülen, D., Synthesis of new 2, 5-disubstituted-1, 3, 4-thiadiazoles and preliminary evaluation of anticonvulsant and antimicrobial activities. *Biorg. Med. Chem.* **2002**, *10* (9), 2893-2898.
- [56] Mavrova, A.; Wesselinova, D., Examinations on the cytotoxicity of some 2, 5-disubstituted-1, 2, 4-triazoles and 1, 3, 4-thiadiazoles and their precursors towards guinea hen cells. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* **2012**, *47* (3), 251-256.
- [57] Kumar, D.; Kumar, N. M.; Chang, K.-H.; Shah, K., Synthesis and anticancer activity of 5-(3-indolyl)-1, 3, 4-thiadiazoles. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (10), 4664-4668.
- [58] Li, Y.; Geng, J.; Liu, Y.; Yu, S.; Zhao, G., Thiadiazole—a Promising Structure in Medicinal Chemistry. *ChemMedChem* **2013**, *8* (1), 27-41.
- [59] Mavrova, A. T.; Wesselinova, D.; Tsenov, J. A.; Lubenov, L. A., Synthesis and antiproliferative activity of some new thieno [2, 3-d] pyrimidin-4 (3H)-ones containing 1, 2, 4-triazole and 1, 3, 4-thiadiazole moiety. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *86*, 676-683.
- [60] Sivasubramanian, N.; Reddy, M. V.; Aravinda, M.; Sravanthi, R.; Sirisha, S., Synthesis, Characterization, Anti-Microbial and Anti-Cancer Activity of Novel Heterocyclic System Containing Bridgehead Nitrogen Atom. *Chemical Science Transactions* **2012**, *1* (2), 401-409.
- [61] Al-Duaij, O. K.; Hafez, H. N.; El-Gazzar, A.-R. B. A., Synthesis of novel series of benzothieno [2, 3-d] pyrimidine derivatives, promising anticancer agents. *J. Chem. Chem. Eng.* **2013**, *7* (8), 725.
- [62] Nagaraju, K.; Kotaiah, Y.; Sampath, C.; Harikrishna, N.; Rao, C. V., A facile synthesis of some novel fused [1, 2, 4] triazolo [3, 4-b][1, 3, 4] thiadiazol derivatives. *Journal of Sulfur Chemistry* **2013**, *34* (3), 264-275.
- [63] Malich, G.; Markovic, B.; Winder, C., The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology* **1997**, *124* (3), 179-192.
- [64] Berridge, M. V.; Tan, A. S., Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *303* (2), 474-482.
- [65] Jover, R.; Ponsoda, X.; Castell, J.; Gómez-Lechón, M., Acute cytotoxicity of ten chemicals in human and rat cultured hepatocytes and in cell lines: Correlation between in vitro data and human lethal concentrations. *Toxicol. In Vitro* **1994**, *8* (1), 47-54.
- [66] Choi, C. W.; Kim, S. C.; Hwang, S. S.; Choi, B. K.; Ahn, H. J.; Lee, M. Y.; Park, S. H.; Kim, S. K., Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* **2002**, *163* (6), 1161-1168.
- [67] Sokolovic, D.; Nikolic, J.; Kocic, G.; Jevtovic-Stoimenov, T.; Veljkovic, A.; Stojanovic, M.; Stanojkovic, Z.; Sokolovic, D. M.; Jelic, M., The effect of ursodeoxycholic acid on oxidative stress level and DNase activity in rat liver after bile duct ligation. *Drug Chem. Toxicol.* **2013**, *36* (2), 141-148.
- [68] Kotaiah, Y.; Harikrishna, N.; Nagaraju, K.; Rao, C. V., Synthesis and antioxidant activity of 1, 3, 4-oxadiazole tagged thieno [2, 3-d] pyrimidine derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *58*, 340-345.
- [69] Nagamatsu, T.; Yamasaki, H.; Fujita, T.; Endo, K.; Machida, H., Novel xanthine oxidase inhibitor studies. Part 2. Synthesis and xanthine oxidase inhibitory activities of 2-substituted 6-alkylidenehydrazino- or 6-aryl-methylidenehydrazino-7H-purines and 3-and/or 5-substituted 9H-1, 2, 4-triazolo [3, 4-i] purines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, (21), 3117-3125.
- [70] Shao, Z.; Zhao, H.; Giver, L.; Arnold, F. H., Random-priming in vitro recombination: an effective tool for directed evolution. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26* (2), 681-683.
- [71] Kolarevic, A.; Yancheva, D.; Kocic, G.; Smelcerovic, A., Deoxyribonuclease inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *88*, 101-111.
- [72] Kim, Y.-M.; Chung, H.-T.; Simmons, R. L.; Billiar, T. R., Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (15), 10954-10961.

- [73] Kocic, G.; Pavlovic, D.; Pavlovic, R.; Nikolic, G.; Cvetkovic, T.; Stojanovic, I.; Jevtic, T.; Kocic, R.; Sokolovic, D., Sodium nitroprusside and peroxyxynitrite effect on hepatic DNases: an in vitro and in vivo study. *Comparative Hepatology* **2004**, 3 (1), 1-9.
- [74] Cleaver, J., Repair replication of mammalian cell DNA: effects of compounds that inhibit DNA synthesis or dark repair. *Radiat. Res.* **1969**, 37 (2), 334-348.
- [75] Zhou, Z.; Zhu, C.; Ren, J.; Dong, S., A graphene-based real-time fluorescent assay of deoxyribonuclease I activity and inhibition. *Anal. Chim. Acta* **2012**, 740, 88-92.
- [76] Woegerbauer, M.; Burgmann, H.; Davies, J.; Graninger, W., DNase I induced DNA degradation is inhibited by neomycin. *The Journal of Antibiotics* **2000**, 53 (3), 276-285.
- [77] Liao, T.-H.; McKenzie, L. J., Inactivation of bovine pancreatic DNase by 2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid. I. A novel inhibitor for DNase I. *J. Biol. Chem.* **1979**, 254 (19), 9598-9601.
- [78] Bach, M. K., The inhibition of deoxyribonucleotidyl transferase, DNAase and RNAase by sodium poly ethenesulfonic acid. Effect of the molecular weight of the inhibitor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Nucleic Acids and Related Subjects* **1964**, 91 (4), 619-626.
- [79] Tonnesen, H. H., *Photostability of drugs and drug formulations*. CRC Press: Weimer, Texas, 2004.
- [80] Glass, B.; Novák, C.; Brown, M., The thermal and photostability of solid pharmaceuticals. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2004**, 77 (3), 1013-1036.
- [81] Божинов, В. Б., *Синтетични органични продукти и добавки*. ХТМУ-София: 2005.
- [82] Borowiak-Resterna, A.; Klonowska, K.; Olszanowski, A.; Tomaszewska, M., Photostability of hydrophobic amides of pyridinecarboxylic acid as copper extractants from chloride media. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2007**, 185 (2), 181-187.
- [83] Mwaura, J.; Yang, B.; Li, R.; Morton, M.; Papadimitrakopoulos, F., Photocleavage of pyridyl-based aromatic polyureas. *Macromolecules* **2003**, 36 (26), 9775-9783.
- [84] Otterstedt, J. E. A.; Pater, R., Model photostable compounds. *J. Heterocycl. Chem.* **1972**, 9 (2), 225-230.
- [85] Boyde, T.; Rahmatullah, M., Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. *Anal. Biochem.* **1980**, 107 (2), 424-431.
- [86] Yousif, E.; Hameed, S.; Bakir, E., Synthesis and photochemical study of poly (vinyl chloride)-1, 3, 4-oxadiazole and 1, 3, 4-thiadiazole. *J. Al-Nahrain Univ* **2007**, 10, 7-12.
- [87] Bobinger, S.; Andersson, J. T., Photooxidation products of polycyclic aromatic compounds containing sulfur. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, 43 (21), 8119-8125.
- [88] *Molinspiration Cheminformatics*, Molinspiration property engine v2015.01; www.molinspiration.com: 2015.
- [89] Mottier, L.; Alvarez, L.; Ceballos, L.; Lanusse, C., Drug transport mechanisms in helminth parasites: passive diffusion of benzimidazole anthelmintics. *Exp. Parasitol.* **2006**, 113 (1), 49-57.
- [90] Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D., Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, 45 (12), 2615-2623.
- [91] Barea, C.; Pabón, A.; Castillo, D.; Zimic, M.; Quiliano, M.; Galiano, S.; Pérez-Silanes, S.; Monge, A.; Deharo, E.; Aldana, I., New salicylamide and sulfonamide derivatives of quinoxaline 1, 4-di-N-oxide with antileishmanial and antimalarial activities. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21 (15), 4498-4502.
- [92] Zhao, Y. H.; Abraham, M. H.; Le, J.; Hersey, A.; Luscombe, C. N.; Beck, G.; Sherborne, B.; Cooper, I., Rate-limited steps of human oral absorption and QSAR studies. *Pharm. Res.* **2002**, 19 (10), 1446-1457.
- [93] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 46, 3-26.
- [94] Márquez-Navarro, A.; Noguera-Torres, B.; Hernández-Campos, A.; Soria-Arteche, O.; Castillo, R.; Rodríguez-Morales, S.; Yépez-Mulia, L.; Hernández-Luis, F., Anthelmintic activity of benzimidazole derivatives against *Toxocara canis* second-stage larvae and *Hymenolepis nana* adults. *Acta Trop.* **2009**, 109 (3), 232-235.
- [95] Rivera, J. C.; Yépez-Mulia, L.; Hernández-Campos, A.; Moreno-Esparza, R.; Castillo, R.; Navarrete-Vázquez, G.; Fuentes-Noriega, I.; Jung-Cook, H., Biopharmaceutic evaluation of novel anthelmintic (1H-benzimidazol-5 (6)-yl) carboxamide derivatives. *Int. J. Pharm.* **2007**, 343 (1), 159-165.
- [96] Bokhari, A. A.; Solomon, T.; Desai, S. A., Two distinct mechanisms of transport through the plasmodial surface anion channel. *J. Membr. Biol.* **2008**, 226 (1-3), 27-34.
- [97] Palm, K.; Stenberg, P.; Luthman, K.; Artursson, P., Polar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans. *Pharm. Res.* **1997**, 14 (5), 568-571.
- [98] Graham, L. P., *An Introduction to Medicinal Chemistry*. Oxford University Press Inc.: USA, New York, 1995; Vol. 7, p 336.
- [99] Remon, J.; Moran, T.; Majem, M.; Reguart, N.; Dalmau, E.; Marquez-Medina, D.; Llanes, P., Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant non-small cell lung cancer: a new era begins. *Cancer Treat. Rev.* **2014**, 40 (1), 93-101.

- [100] Wilhelm, S. M.; Carter, C.; Tang, L.; Wilkie, D.; McNabola, A.; Rong, H.; Chen, C.; Zhang, X.; Vincent, P.; McHugh, M.; Cao, Y.; Shujath, J.; Gawlak, S.; Eveleigh, D.; Rowley, B.; Liu, L.; Adnane, L.; Lynch, M.; Auclair, D.; Taylor, I.; Gedrich, R.; Voznesensky, A.; Riedl, B.; Post, L. E.; Bollag, G.; Trail, P. A., BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* **2004**, *64* (19), 7099-7109.
- [101] Elrazaz, E. Z.; Serya, R. A.; Ismail, N. S.; El Ella, D. A. A.; Abouzid, K. A., Thieno [2, 3-d] pyrimidine based derivatives as kinase inhibitors and anticancer agents. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* **2015**, *1* (2), 33-41.
- [102] Park, C.-H.; Lee, C.; Yang, J. S.; Joe, B.-Y.; Chun, K.; Kim, H.; Kim, H. Y.; Kang, J. S.; Lee, J. I.; Kim, M.-H., Discovery of thienopyrimidine-based FLT3 inhibitors from the structural modification of known IKK β inhibitors. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (12), 2655-2660.
- [103] Packard, G. K.; Papa, P.; Riggs, J. R.; Erdman, P.; Tehrani, L.; Robinson, D.; Harris, R.; Shevlin, G.; Perrin-Ninkovic, S.; Hilgraf, R.; McCarrick, M. A.; Tran, T.; Fleming, Y.; Bai, A.; Richardson, S.; Katz, J.; Tang, Y.; Leisten, J.; Moghaddam, M.; Cathers, B.; Zhu, D.; Sakata, S., Discovery and optimization of thieno [2, 3-d] pyrimidines as B-Raf inhibitors. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (1), 747-752.

ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С

ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Научни публикации и доклади във връзка с дисертационния труд:

1. Anelia Ts Mavrova, Stefan Dimov, Denitsa Yancheva, Miroslav Rangelov, Diana Wesselinova, Jordan A. Tsenov, **Synthesis, anticancer activity and photostability of novel 3-ethyl-2-mercapto-thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-ones**, *European Journal of Medicinal Chemistry* 123 (2016) 69-79;(Impact Factor: **3.902**).

За публикуваната научна статия са забелязани следните цитати:

- Saddik, A.; El-Dean A.; El-Sokary G.; Hassan K.; Abbady M.; Ismail I.;Saber S., **Synthesis and Cytotoxicity of Some Thieno[2,3-d]pyrimidine Derivatives**, *Journal of the Chinese Chemical Society* (2016), DOI: 10.1002/jccs.201600279, *in press*.
 - Wang L., Zhang Q., Zhu G, Zhang Z., Zhi Y., Zhang L., Mao T., Zhou X., Chen Y., Lu T., Tang W., **Design, synthesis and evaluation of derivatives based on pyrimidine scaffold as potent Pan-Raf inhibitors to overcome resistance**, *European Journal of Medicinal Chemistry* 130 (2017) 86-106;
 - Wang, L., Zhu, G., Zhang, Q., Duan, C., Zhang, Y., Zhang, Z., Zhou, Y., Lu, T., Tang, W., **Rational design, synthesis, and biological evaluation of Pan-Raf inhibitors to overcome resistance**, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 15(16) (2017) 3455-3465.
2. A.Mavrova, Stefan Dimov, O. Izevbekhai, **Synthesis of some novel benzimidazol-2-one derivatives**, *International Scientific and Practical Conference "WORLD SCIENCE"* 2(6) (2016) 13-15, ISSN 2413-1032;

Участия в национални и международни форуми:

- **XI НАУЧНА ПОСТЕРНА СЕСИЯ** за студенти, докторанти и млади учени на ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ – София, Май 2014 г.
- **XII НАУЧНА ПОСТЕРНА СЕСИЯ** за студенти, докторанти и млади учени на ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ – София, Май 2015 г.
- **XIII НАУЧНА ПОСТЕРНА СЕСИЯ** за студенти, докторанти и млади учени на ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ – София, Май 2016 г.
- **II INTERNACIONAL SCIENTIFIC AND PRACTICAL CONFERENCE** – “The Goals Of The World Science 2016” 27-28 Януари, 2016 г. – Дубай, УАЕ.

Отличия и награди:

НАГРАДА за отлично представяне от **ХІІ НАУЧНА ПОСТЕРНА СЕСИЯ** за студенти, докторанти и млади учени на **ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ** – София, Май 2016 г.

