

РЕЦЕНЗИЯ

От проф. д-р Георги Цветанов Момеков

*Катедра по фармакология, фармакотерапия и токсикология, Фармацевтичен факултет
при Медицински университет-София*

*член на научно жури, съгласно заповед НД-20-59/25.04.2017 на Ректора на ХТМУ, по
процедура за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“*

Представената рецензия е относно дисертационния труд *„Дизайн, структурни изследвания и биологична активност на хетероарил съдържащи тиенопиримидинони“* на инж. Стефан Марчев Димов, редовен докторант към катедра „Органичен синтез и горива“ при Химикотехнологичния и металургичен университет- София, в Професионално направление: 7.3. Фармация (Фармацевтична химия).

1. Кратки биографични данни и характеристика на научните интереси на кандидата.

Докторантът инж. Стефан Марчев Димов е роден на 18.02.1989 г. и завършва средното си образование във II СОУ „Проф. Никола Маринов“ - Технологичен профил /Информационни технологии и Английски език през 2008 г. В същата година е приет като студент в ХТМУ-София.

През 2012 г. придобива бакалавърска степен по фин органичен синтез и през 2013 и магистърска степен по същата специалност. Считано от 01.03=2014 г. е зачислен като редовен докторант при катедра „Органичен синтез и горива“ по научна специалност 7.3. Фармация (Фармацевтична химия), със срок на обучение три години.

Докторантът инж. Стефан Димов е положил изискуемите докторантски изпити по научната специалност “Фармацевтична химия” както и по английски език.

В рамките на периода на разработване на дисертационния труд той посети специализиран курс по „Фармакология и токсикология“ и положи съответния изпит, с отличен успех, в катедрата по Фармакология, фармакотерапия и токсикология на Фармацевтичен факултет при Медицински университет-София.

Дисертацията е дискутирана на разширен катедрен съвет на катедра „Органичен синтез и горива“ при Химикотехнологичен и металургичен университет и е насочена към процедура за защита.

2. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите.

Дисертационният труд е написан на 159 машинописни страници, като отговаря на традиционно възприетата у нас структура и съдържа следните раздели: въведение, литературен обзор, цел и задачи, експериментална част, резултати и обсъждане, изводи и приноси. Цитираната библиография е внушителна като обхваща 360 източника. Извън основния текст са помесетни множество приложения – спектри, структурни формули и физикохимични свойства на получените съединения, данни за дисеминирането на собствените резултати под формата на публикации и научни съобщения. С приложенията книжното тяло на дисертацията придобива внушителните 333 страници. Трудът е отлично онагледен с 67 фигури и 8 таблици, без огромната база данни представена под формата на над 170 стр. приложения.

Обзорът отразява значението на тиенопиримидините като фармакофор и лидерна структура в областта на Фармацевтичната химия, както и методичните проблеми, асоциирани с получаването им. Дискутирани са обстойно и фармакологичните свойства на тези хетероциклени съединения, както и потенциалните стратегии за разработване на терапевтични средства, основани на този клас вещества. Методичните и експерименталните раздели са развити образцово.

В резултат на проведените изследвания е разработена библиотека от внушителните над 100 съединения, които са охарактеризирани структурно. Получените в резултат на дисертационния труд вещества могат да бъдат обособени в следните структурни 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 1H-бензимидазол-2-она и 1H-бензимидазол-2-тиона (8 бр.); (6) бис-субституирани бензимидазоли, съдържащи тиено[2,3-d]пиримидини и техните нитрилни прекурсори (13 бр.).

От тези, над 100 синтезирани вещества, 60 са нови, неописани в литературата, което намирам за особен принос и резултат на упорит целеустремен труд.

В резултат на задълбоченото охарактеризиране са дефинирани по-важните химични и физични свойства на синтезираните от докторанта съединения, а също така са изведени данни за оптимизиране на реакционните условия. Проведените синтези на тиено[2,3-d]пиримидини от структурна група показват, че добивът при получаване на дериватите на тиено[2,3-d]пиримидин-4-она е по-висок, в сравнение с този при аналогичните тиено[2,3-d]пиримидин-4-амини. В резултат на реакциите между 2-амино-4,5,6,7-тетрахидробензотиофен-3-карбонитрил с 3-цианопиридин и 4-цианопиридин се получава смес от 4-хлортиенопиримидин и 4-аминотиенопиримидин.

Установено е, че реакцията между 2-аминотиофен-3-карбоксилати и имино диацетонитрил води до циклизация, с участието на едната нитрилна група и същевременно кисела хидролиза на другата, в резултат на което се получават тиено[2,3-d]пиримидин-4-они, съдържащи глицинов остатък.

Данните показват, че реагиращите с фталовия анхидрид тиенопиримидин-4-амини образуват комплекс с оцетната киселина в реакционната смес, което възпрепятства ацилирането и съответно понижава тяхната реакционност.

Установено е, че процесът на присъединяване по Aza-Michael към бензимидазоли, проведен с 2,5-кратен излишък на акрилонитрил води до получаване на 1,3-бис(ционоетилни) производни на 5(6)-заместени 1H-бензимидазол-2-они и 1H-бензимидазол-2-тиони. При използване на 1H-бензимидазол-2-амин, незаместени 1H-

бензимидазол-2-они и 1Н-бензимидазол-2-тиони, обаче, не се осъществява *Aza-Michael* присъединяване,

Експерименталните данни показват, че в резултат на проведените реакции между 2-хлоретил-тиено[2,3-d]пиримидин-4-они 13, 21 и 1Н-бензимидазол-2-амин, в условията на твърдо-течен междуфазов катализ, се получават монозаместени продукти.

Фармакологичната оценка на подбрани структури е интегрална част от изследователската програма, залегнала в основата на дисертационния труд. Антихелминтната активност на тестваните съединения е проучена при тъканната нематода *Trichinella spiralis*. Данните от фармакологичния скрининг показват, че тиено[2,3-d]пиримидин-4-они 6, 12 и 20 проявяват значително по-висока *in vitro* активност в сравнение с мощните антихелминтни лекарства albendazole и ivermectin, използвани като референтни хелминциди. Тези данни очертават перспективата за бъдещи задълбочени токсикологични изследвания на тези съединения, както и охарактеризирането на спектъра на антихелминтна активност при други паразити.

При проведения *in vitro* скрининг на синтезираните тиенопиримидини за антинеопластична активност спрямо човешки клетъчни линии с произход от колоректален карцином (HT-29), рак на гърдата (MDA-MB-231), рак на маточната шийка (HeLa), чернодробен карцином (HepG2) е установено, че: всички изследвани тиено[2,3-d]пиримидини проявяват изразена цитотоксичност срещу подбрения спектър от неопластични клетъчни линии.

Установено е, че наличието на 1,3,4-тиадиазолов и на глицинов остатък в молекулата на тиено[2,3-d]пиримидина е асоциирано със значимо намаляване на цитотоксичността спрямо нормалните човешки диплоидни Lер3 клетки, при запазване на значителната цитотоксичност спрямо малигнено-трансформираните клетъчни линии.

Важно е да се отбележи, че съдържащите глицинов остатък тиенопиримидини 60 и 61 се характеризират със селективна инхибираща активност спрямо HT-29 клетки, с произход от колоректален карцином – техните еквиефективни концентрации IC₅₀ са многократно по-ниски от тези, получени при кетуморигенната клетъчна линия Lер3.

Въз основа на проведените молекулни изчисления и *docking* проучване на производните на 3-етил-тиено[2,3-d]пиримидин-4-они 72 и 75, докторантът прави заключението, че селективността им към раковите клетки се дължи на капацитета им да се свързват с V599E B-Raf, което промотира неактивната конформация на ензима чрез блокиране на активния център на DFG и възпрепятстване на неговото фосфорилиране. Разбира се, подобни данни са интересни, но могат да се интерпретират, само ако са верифицирани посредством оценка на способността им на практика да модулират активността на тези сигнални молекули, с помощта на подходящи молекулярно биологични и биохимични методи. В този смисъл *docking* -студиите са важни, но не могат да заместят провеждането на същинските фармакодинамични проучвания.

Проведеният *in vitro* биохимичен скрининг за дефиниране на антиоксидантния капацитет на на 5,6,7,8-тетрахидробензо[b]тиено[2,3-d]пиримидин-4-амините показва, че те не инхибират ксантинооксидазата, но същевременно аналозите 22, 33, 37, 39 и 42 демонстрират умерена способност да потискат ДНКазната активност.

Проведени са тестове за фотостабилност на избани аналози с перспективна антинеопластична и антихелминтна активност, но тези данни, поне на този етап са без съществено отношение към представения труд. Проучванията за стабилност с отношение към срок на годност, фото и термо-чувствителност са оправдани само при високо-перспективни съединения, с валидирани в условията на по-задълбочени фармакологични и токсикологични проучвания свойства на потенциални лекарствени кандидати. Необходимостта от проучване точно на фотостабилността, на този етап, намирам за неоправдана тъй като съединенията са подложени само на предварително, скринингово проучване.

Проведен е SAR анализ на тестваните вещества, който позволява извеждането на някои основни закономерности, относно връзките между химична структура и биологична активност, които на свой ред могат да послужат като отправна точка при бъдещи синтетични програми, насочени към дизайн на нови тиено[2,3-d]пиримидини с потенциално приложение като антихелминтни или антинеопластични средства.

3. Оценка на съответствието между автореферата и дисертационния труд.

Представеният от докторанта автореферат добре отразява структурата на дисертационния труд и удачно обобщава огромната база от експериментални данни, изводите и приносите. Това ми дава основание да считам, че авторефератът съответства на съдържанието на дисертационния труд.

4. Характеристика и оценка на приносите в дисертационния труд.

Дисертационният труд на инж. Стефан Димов третира една авангардна научна област – проучване на нови хетероарил-съдържащи тиенопиримидинони като потенциални таргетни антинеопластични лекарства и като антихелминтни средства. Той е продължение на дългогодишните проучвания на разнообразни хетероциклени съединения с подобна биологична активност в изследователската група към първичното звено в ХТМУ.

В основата на синтетичната стратегия стои придаването на съединенията на хибридни свойства, т.е. включването на различни фармакофори в една структура. Това позволява осигуряване на мултитаргетен механизъм на действие, преодоляване на някои от механизмите на резистентност и както е видно от собствените експериментални данни някои от съединенията са по-активни от подобрите референтни лекарства.

Като особено важен принос виждам търсенето на антинеопластични средства с прицелно действие, т.е. повлияване на сигнални молекули, характеризиращи се с повишена експресия в малигнените клетки, в частност *Ras-Raf-MEK* сигналната каскада. Този подход за разработване на т.нар. прицелни антинеопластични лекарства, позволи в рамките на последните десетилетия на арената на противотуморната химиотерапия да настъпят грандиозни промени, с комерсиализиране на десетки, високо селективни лекарства, явяващи се инхибитори на тирозинкинази, на други ензими въввлечени в туморната биология, както и на моноклонални антитела, отново характеризиращи се с

прицелна противотуморна активност и значително изменен токсикологичен потенциал, в сравнение с конвенционалните цитостатици.

Приносите на дисертационния труд могат да бъдат обобщени, както следва:

- Генерирана е библиотека от над 100 съединения, 60 от които се явяват нови, неописани в литературата. Същевременно са разработени и апробирани подходящи реакционни методи за синтез, изолиране и пречистване на всеки от новополучените аналози.
- Приложен е ефективен метод за циклокондензация на 2-аминотиофени с ароматни или алифатни нитрили, който дава възможност за едновременното провеждане на две циклокондензации.
- Дефинирани са оптималните реакционни условия за осъществяване на N,N'-присъединяване по *Aza-Michael* на акрилонитрил към бензимидазол-2-они и бензимидазол-тиони.
- В резултат на синтетичната стратегия са генерирани съединения, проявяващи висока антинеопластична и антихелминтна активност. Проведените *in silico* проучвания показват потенциалните фармакодинамични свойства, както и връзките структура активност, които могат да се използват като отправна цел за бъдещи синтетични програми.
- Разработена е аналитична методика за провеждане на твърдофазен тест за фотостабилност, която, разбира се, е принос на докторанта, но намирам, на този етап за ненужен елемент от охарактеризирането на представените съединения.

Като цяло формулираните от докторанта изводи добре отразяват получените експериментални данни. Приемам дефинираните приноси.

5. Мнение за публикациите на дисертанта по темата на дисертационния труд.

Основната част от студиите, обект на дисертационния труд, са дисеминирани в литературата, както следва: 2 реални публикации, 4 научни съобщения, представени на

национални и международни научни конференции, в т.ч. една в чужбина. Едната от реалните публикации е в престижното международно списание *European Journal of Medicinal Chemistry* (JCR-Thomson Reuters импакт фактор **3.902**). При проведената справка са установени 3 цитирания на тази публикация (2 цитата през 2016 г. и 1 през 2017 г.). Наукометричните данни напълно покриват нормативно дефинираните критерии за придобиване на образователната и научна степен „доктор“.

6. Критични бележки и коментари.

В хода на запознаването ми с дисертационния труд, както и на предварителното дискутиране в първичното звено, направих някои терминологични бележки, относно спецификата на онкофармакологичните проучвания. Със задоволство забелязвам, че, като цяло, повечето ми забележки са отразени във финалния труд.

Терминът „противораков/а“ е буквален превод от английски (*anticancer*), но независимо от това, че се прокрадва в родната научна литература (извън биомедицинските науки), е изключително некоректен тъй като по същество се касае за ефект при тумори с различен произход. В българската литература думата *рак* (т.е. карцином) се отнася коректно единствено към туморите от епителен произход. Съществуват и тумори от мезенхимен произход (саркоми), от лимфоидна и хемопоеична тъкан (левкемии и лимфоми), тератомни тумори, и др., при които употребата на термина рак е абсолютно неприемливо. Така тарминът ракови заболявания, когато се говори в общия смисъл седва да се замени с термина онкологични или туморни заболявания, а съответно anticancer на български би следвало да се превежда както антинеопластични или противотуморни лекарства. Прочее в българската медицинска и фармацевтична литература термин „противораков“ не съществува.

В онкофармакологичното проучване не е използвана положителна контрола (референтен цитостатик), което е задължителен елемент от експерименталния дизайн на подобни студии. Освен това не е ясно дефинирано какво представляват EC_{50} и IC_{50} стойностите, по точно каква е разликата между тях. Нещо повече, при проучване ефектите на

съединението 75 върху нормалната линия Лер3 е посочена IC_{50} стойност $89 \times 10^3 \mu M$, тоест 89 mmol/L. Тази стойност несъмнено не е експериментална, а е екстраполирана от кривата концентрация ефект, което не е коректно защото подобна концентрация е непостижима в *in vitro* експеримента и е многократно по висока от най-високата използвана концентрация – 0,4 mg/ml. Това не променя факта, че съединението явно е селективно към туморните линии, но в случаите при които не се постига IC_{50} е редно в таблицата стойността да се представи като $IC_{50} > 0.4 \text{ mg/ml}$. Това, разбира се, не омаловажава приноса на докторанта, тъй като тези забележки третираят изцяло интерпретирането и провеждането на фармакологичните тестове, които са проведени в колаборация с друг изследователски екип.

С оглед бъдещо, по-задълбочено, проучване на фармакодинамичните характеристики на тестваната серия би било интересно да се проследи способността на съединенията да модулират *Ras-Raf-MEK* сигналните каскади, и така да се валидират данните получени от молекулния докинг.

7. Лични впечатления за дисертанта.

Имах удоволствието да преподавам на инж. Стефан Димов в рамките на специализирания курс по Фармакология и токсикология. Това наред с дискусиите на дисертацията и неговото представяне на процедурата по обсъждане в първичното звено ми дават основание високо да оценя неговите компетенции като, работлив, отдаден и педантичен, в хубавия смисъл на думата, млад учен.

8. Заключение.

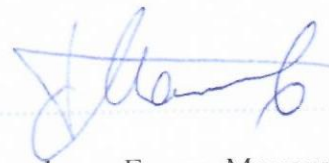
Представеният ми за рецензиране дисертационен труд на инж. Стефан Димов е една завършена студия с оригинални приноси както в областта на органичния синтез, така и в областта на рационалния дизайн и разработването на антихелминтни средства, както и на средства за прицелна терапия на онкологични заболявания – модулатори на сигналната

трансдукция. Приемам научните приноси в представената докторска теза и считам, че те, наред с наличните наукометрични показатели на публикационната активност, съответстват на профила на професионално направление 7.3. Фармация (Фармацевтична химия).

Генерирането на внушителната библиотека от биологично активни съединения, тяхното детайлно структурно, физикохимично и фармакологично охарактеризиране, извън всякакво съмнение са личен принос на докторанта. Представената експериментална работа, книжното тяло на дисертационния труд в неговата цялост и дефинираните приноси, както и наукометричните показатели, касаещи дисеминирането на данните като научни съобщения и реални публикации, напълно покриват националната и институционалната рамка от критерии за придобиване на научната и образователна степен "Доктор". Това ми дава основание за високо положителна оценка на представения дисертационен труд, както и убедено да препоръчам на почитаемите членове на научното жури да подкрепят с вота си присъждането на образователната и научна степен „Доктор“ на инж. Стефан Марчев Димов.

София, 27.06.2017 г.

Подпис:



/проф. д-р Георги Момеков/