



**СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ "СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ"
ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЯ И ФАРМАЦИЯ**

КАТЕДРА ФАРМАЦЕВТИЧНА И ПРИЛОЖНА ОРГАНИЧНА ХИМИЯ

Десислава Василева Маринова

**ДИЗАЙН, СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ НА
БЕНЗО[*b*]ИМИДАЗО[1,5-*d*][1,4]ОКСАЗЕПИН-1,4(2*H*,5*H*)-ДИОНИ.
НОВА ХЕТЕРОЦИКЛЕНА СИСТЕМА**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертация за присъждане на научна и образователна степен
"Доктор"**

Професионално направление: 7.3 Фармация

Докторска програма: Фармацевтична химия и фармацевтичен анализ

Научен ръководител: проф. д-р Огнян Петров

Научно жури в състав:

1. проф. Анели Методиева Неделчева, дб, СУ „Св. Климент Охридски“
2. доц. Калина Гочева Андреевска, дф, СУ „Св. Климент Охридски“
3. доц. Калин Валентинов Иванов, дф, Медицински университет – Пловдив
4. доц. Диана Петрова Карчева-Бахчеванска, дф, Медицински университет – Пловдив
5. доц. Силвия Йорданова Атанасова-Стамова, дф, Медицински университет – Варна

София, 2025 г.

Обобщена информация за дисертацията

- ❖ Дисертацията е написана на 148 печатни страници и съдържа 59 схеми, 54 фигури и 15 таблици.
- ❖ Цитирани са 159 литературни източника.
- ❖ Дисертацията се основава на 2 научни публикации, върху които са забелязани 7 цитата.
- ❖ Номерацията на съединенията, фигурите, таблиците и схемите в автореферата съответстват на тази от дисертацията.

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения	6
1. Увод	7
2. Цели и задачи.....	8
3. Резултати и обсъждане.....	9
3.1. Синтез на серия 1,5-бензоксазепинови производни с анелиран имидазолонов пръстен.....	9
3.1.1. Синтез на 3-(2-оксопропил/фенетил)-2-(3H)-бензоксазолони.....	9
3.1.2. Пръстенна трансформация на 3-(2-оксопропил/фенетил)-2-(3H)-бензокса(тия)золони.....	10
3.1.3. Алкилиране на 1-(2-оксо(меркапто)фенил)-4-метил-1,3-дихидро-2H-имидазол-2-они с халогензаместени естери на карбоксилни киселини.....	13
3.1.4. Вътрешномолекулно ацилиране и сключване на 1,5-бензоксазепиновия пръстен.....	16
3.2. Синтез и биологична активност на серия бензилиденови производни на 1,5-бензоксазолоните с анелиран имидазолонов пръстен.....	20
3.3. Синтез и биологична активност на серия хидроксамови киселини	37
3.3.1. Хидроксамовите киселини като хистондеацетилазни инхибитори.....	37
3.3.2. Хидроксамовите киселини като растежни регулатори.....	43
4. Изводи.....	48
5. Приноси на дисертационния труд.....	50
6. Използвана литература.....	51

7. Списък с научни публикации.....	53
8. Списък с изяви на научни форуми.....	54
9. Участие в научни проекти по темата на дисертацията.....	56
	7
	8

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

Съкращения на кирилица:

ДМФ – N,N-диметилформаид

ИЧ – инфрачервен

УВ – ултравиолетов

ПАВ – повърхностно активно вещество

ПФК – полифосфорна киселина

ТСХ – тънкослойна хроматография

ЯМР – ядрено-магнитен резонанс

Съкращения на латиница:

Bz – бензил

DMSO – диметилсулфоксид

HDAC – хистондеацетилази

i-Pr – изопропил

t-Bu – третбутил

MW – микровълни

TEBA – бензилтриетиламониевхлорид

THF – тетраhydroфуран

1. Увод

Наричани „бич на съвременното общество“ онкологичните заболявания заемат челни позиции по разпространеност и причинена смъртност сред населението. Най-голям процент от ново заболялите са диагностицирани с рак на белия дроб, млечната жлеза и колоректален карцином. Диагнозата „рак“ оказва не само здравно, но и социално, финансово и психическо въздействие върху пациентите, техните семейства и обществото като цяло.

Общата черта която споделят раковите заболявания, се състои в неконтролируемия клетъчен растеж и потенциал на злокачествените клетки да се разпространяват в почти всички тъкани и органи в организма. Ето защо част от стратегиите за намиране на нови терапевтични агенти са насочени именно към потискане на туморната клетъчна пролиферация.

Доказали своята ефективност спрямо заболявания на нервната система, бензоксазепиновите производни намират нова сфера на приложение, а именно противотуморната терапия. Друга група съединения с терапевтично значение са хидроксамовите киселини, чиято активност се основава на инхибиране на хистоновите деацетилази и „отключване“ на потиснатите гени с важна противотуморна активност.

2. Цел и задачи

Целта на настоящия дисертационен труд е разработване на нов метод за синтез на 1,5-бензоксазепини и прилагането му за получаване на серия нови молекули с потенциална противотуморна активност.

За изпълнение на поставената цел бяха формулирани следните задачи:

- Синтез на подходящо модифицирани бензоксазолони и осъществяване на пръстенната трансформация под действието на N-съдържащи нуклеофилни реагенти;
- Допълнително модифициране на продуктите от пръстенната трансформация и синтез на бензо[*b*]имидазо[1,5-*d*][1,4]оксазепин-1,4(2*H*,5*H*)-диони. Нова хетероциклена система;
- Синтез и оценка на биологичната активност на бензилиденови производни на новополучената трициклена система;
- Използване на продуктите от пръстенната трансформация за синтез на нов клас хидроксамови киселини и оценка на антипролиферативна им активност;
- Синтез на нов клас хидроксамови киселини като аналози на синтетичния ауксин с хербицидна активност 2,4-дихлорофеноксоцетна киселина (2,4-D) и оценка на растеж регулиращата им способност.

3. Резултати и обсъждане

През последните години се наблюдава засилен изследователски интерес към 2(3*H*)-бензоксазолон и неговите производни. Това се дължи не само на разнообразната биологична активност на тези съединения, но също така и на възможностите за химичното им модифициране посредством реакции на N-алкилиране или ацилиране, електрофилни заместителни реакции в ароматното ядро или реакции с нуклеофилни реагенти, водещи до отваряне на хетероцикъла. Тези негови качества го превръщат в предпочитан градивен елемент при дизайна на нови биоактивни молекули и се разглежда като "привилегирована структура" в медицинската химия (Poupaert et al., 2005).

3.1. СИНТЕЗ НА 1,5-БЕНЗОКСАЗЕПИНИ С АНЕЛИРАН ИМИДАЗОЛОНОВ ПРЪСТЕН

3.1.1 Синтез на 3-(2-оксопропил/фенетил)-2(3*H*)-бензоксазолони

Придържайки се към описаният в литературата метод на работа на Петров и сътрудници (Petrov et al., 2007) 2(3*H*)-бензоксазолон **1a**, 5- и 6-хлорните му производни **1b** и **1v**, както и 2(3*H*)-бензтиазолон **1g** успешно бяха подложени на алкилиране с еквимоларни количества хлорацетон и/или фенацилхлорид [Схема 1]. Реакцията бе проведена при разбъркване на стайна температура в среда от N,N-диметилформаид, база калиев карбонат и каталитични количества бензилтриетиламониевхлорид (ТЕВА).

Целевите съединения бяха получени с високи добиви и чистота, като не се наблюдава съществена разлика в реакционното време и получените количества при работа с незаместените бензокса(тиа)золони и техните халогенсъдържащи аналози. Това в комбинация с лесното им изолиране ги прави удобни полупродукти за целите на органичния синтез.

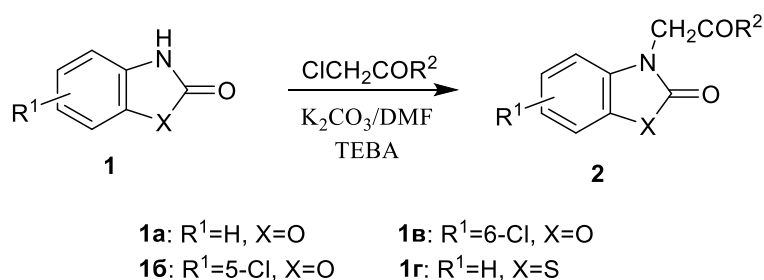


Схема 1. Синтез на 3-(2-Оксопропил/фенетил)-2(3H)-бензокса(тия)золони

Таблица 1. Добив на 3-(2-Оксопропил/фенетил)-2(3H)-бензокса(тия)золони (2a-2г)

Съединение	R ¹	R ²	X	Добив (%)
2a	H	CH ₃	O	82
2.1a	H	C ₆ H ₅	O	93
2б	5-Cl	CH ₃	O	89
2.1б	5-Cl	C ₆ H ₅	O	97
2в	6-Cl	CH ₃	O	89
2.1в	6-Cl	C ₆ H ₅	O	97
2г	H	CH ₃	S	93

Структурата на получените N-алкилирани бензокса(тия)золони се потвърждава от проведените спектрални изследвания и напълно съответства на вече описаните в литературата аналози (Petrov et al., 2007; Erol et al., 1996; Kalcheva et al., 1986).

3.1.2 Взаимодействие на 3-(2-оксопропил/фенетил)-2(3H)-бензокса(тия)золони с първични амини

Добре известно от литературата е, че оксазолоновият цикъл е изключително нестабилен спрямо действието на нуклеофили, като например първични амини (Kalcheva et al., 1977; Kalcheva, Peshakova, 1989) и хидразини (Kalcheva et al., 1979), взаимодействието с които е съпроводено с пръстенна трансформация.

Пръстенната трансформация на бензоксазолоновите производни **2** беше проведена при кипене с двукратен излишък от метил- или бензиламин [Схема 2].

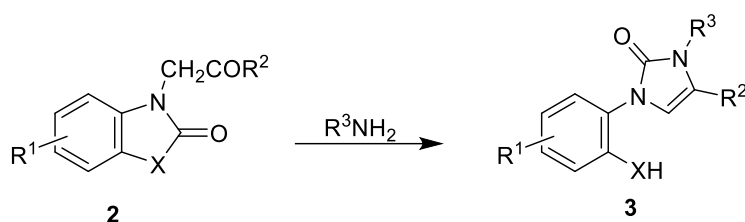


Схема 2. Пръстенна трансформация на бензокса(тия)золонови производни 2

Голямата разлика в температурите на кипене на използваните амини наложи допълнително оптимизиране на реакционните условия и в частност на реакционната среда. Пръстенните трансформации с нуклеофилен агент метиламин бяха проведени в среда от нормален пропанол (т.к. 97 °C), а поради значително по-високата температура на кипене на бензиламинът, експериментите с негово участие са осъществени в метоксиетанол (т.к. 124 °C).

Високите експериментални добиви [Таблица 2] и съкратеното реакционно време (3-5 часа) са сред безспорните предимства на този метод.

Таблица 2. Добив на заместени 1-(2-хидрокси(меркапто)фенил)-1,3-дихидро-2H-имидазол-2-они (3a-3z)

Съединение	R ¹	R ²	R ³	X	Добив (%)
3a	H	CH ₃	CH ₃	O	95
3.1a	H	C ₆ H ₅	CH ₃	O	81
3.2a	H	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	O	96
3б	5-Cl	CH ₃	CH ₃	O	90
3.1б	5-Cl	C ₆ H ₅	CH ₃	O	87
3.2б	5-Cl	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	O	90
3в	4-Cl	CH ₃	CH ₃	O	91
3.1в	4-Cl	C ₆ H ₅	CH ₃	O	89
3.2в	4-Cl	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	O	98
3z	H	CH ₃	CH ₃	S	68

Отчитайки по-голямата стабилност на тиазолоновия цикъл, пръстенната трансформация на 2г беше извършена с трикратен излишък от съответния амин и нагряване на водна баня при 70 °C в затворен съд (Aldrich pressure tube). Провеждането на реакцията в такъв тип изолирана система ограничава достъпа на въздух, водещ до превръщането на целевите съединения 3г, съдържащи тиолна група в дисулфиди

[Схема 48]. Отчитайки този факт, съединението бе своевременно подложено на следващите химични трансформации от синтетичната схема без допълнително пречистване, което би довело до загуба на продукт.

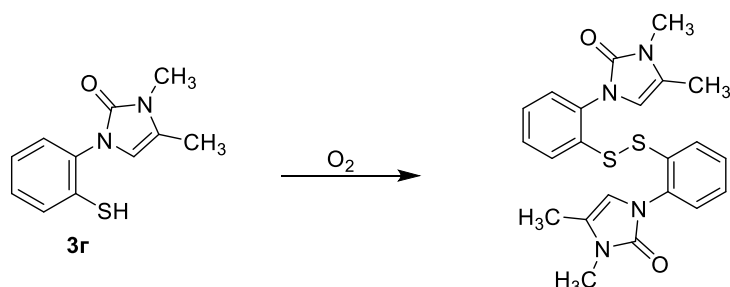


Схема 48. Превръщане на 3г в дисулфид под действието на кислорода от въздуха

В резултат от дългогодишните изследвания върху пръстенната трансформация на 3-(2-оксопропил)-2(3H)-бензокса(тия)золон, проведени в катедра Приложна органична химия (Kalcheva et al., 1977) и известните литературни данни (Milcent et al., 1996), като най-вероятен е предложен следния реакционен механизъм:

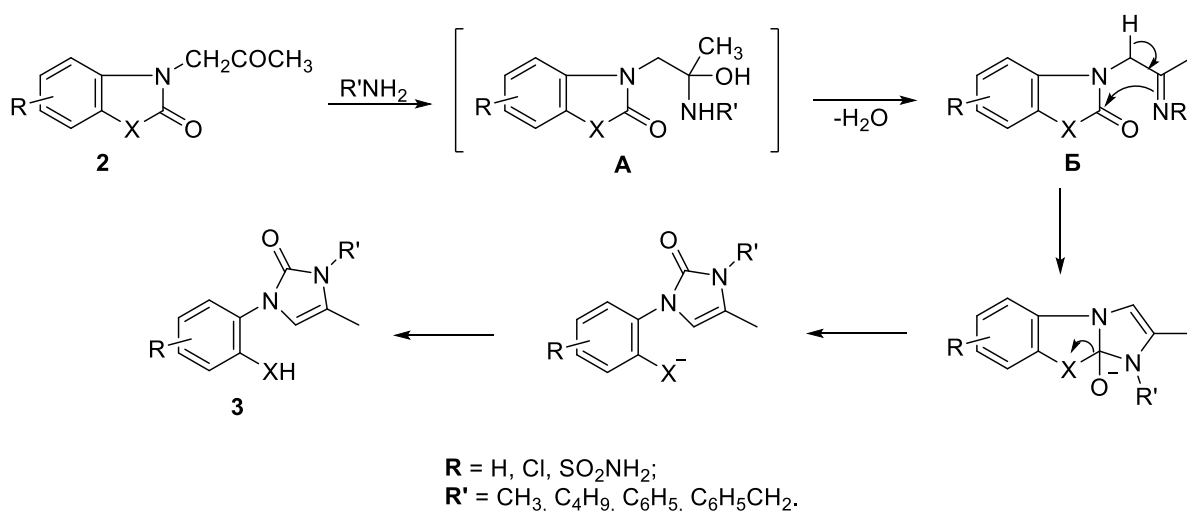


Схема 49. Предполагаме механизъм на пръстенна трансформация на N-алкилови производни на 2(3H)-бензокса(тия)золони

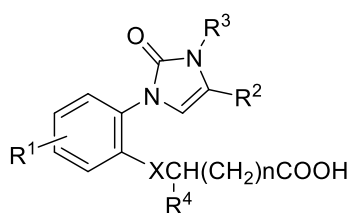
Реакцията се иницира от атаката на нуклеофила към карбонилната група от оксопропиловия фрагмент на 2, при което се получава присъединителен продукт А.

Поради своята нестабилност **A** лесно отделя молекула вода и се превръща в неизолиран интермедиат **B**. Последващата вътрешномолекулна нуклеофилна атака, насочена към цикличния C(2) атом, бива придружена с отваряне на окса(тия)золоновия пръстен (по връзката C(2)-X) и води до получаването на имидазолон **3**. Реакцията е приложима както за прости нуклеофили, като метиламин, така и за амини с по-обемиста структура (напр. бензиламин).

Сключването на имидазолонов пръстен се доказва от проведените спектрални изследвания. В ^1H ЯМР спектрите на съединения **3** при 6.30-6.36 м.ч. може да бъде забелязан пик, отговарящ на протона от метиновата група (CН=) в имидазолоновия цикъл. Сигналят за хидроксилната група (ОН) в позиция 2 на бензеновия пръстен може да бъде открит при 9.72-10.06 м.ч., а този за меркапто групата у съединение **3г** при 4.21-4.84 м.ч. Сигналите за ароматните протони се наблюдават в интервала 6.90-7.60 м.ч.

3.1.3. Алкилиране на 1-(2-оксо(меркапто)фенил)-4-метил-1,3-дихидро-2H-имидазол-2-они с халогензаместени естери на карбоксилни киселини

По-нататъшните ни изследвания бяха насочени към модифицирането на имидазолони **3**, като последните бяха превърнати в карбоксилни киселини с обща формула:



Фигура 26. Обща формула на целевите карбоксилни киселини **5**

Първоначалните експерименти за алкилиране на имидазолони **3**, проведени директно с халогенопроизводни на избраните от нас карбоксилни киселини, доведоха до получаването на целевите съединения с незадоволителни добиви. Много добри резултати бяха постигнати при провеждането на реакцията със съответните етилови

естери (етил бромацетат) в среда от N,N-диметилформамид (ДМФ), база калиев карбонат и каталитични количества ТЕВА [Схема 50].

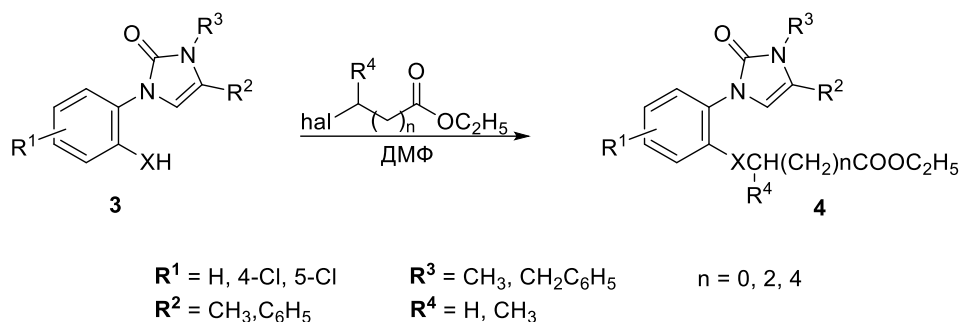


Схема 50. Алкилиране на (2-хидрокси(меркапто)арил) имидазолони 3

Гладкото протичане на експериментите, водещо до получаването на феноксиоцетни естери с права верига, ни окуражиха да разширим серията с аналози с по-дълга или разклонена въглеродородна верига. В основата на тази идея стои възможността за използването им като прекурсори за синтеза на друг тип молекули с потенциална биологична активност, а именно хидроксамови киселини.

Като алкилиращ реагент за получаването на дълговерижните естери с три метиленови групи (4.4а, 4.4б, 4.4в, 4г) беше използван етил-4-хлоробутират, а употребата на етил-6-хлорохексаноат позволи получаването на съединения с пет метиленови групи (4.5а, 4.5б, 4.5в, 4.1г). Производни с разклонена верига (4.3а, 4.6а, 4.3б, 4.6б, 4.3в, 4.6в) бяха получени посредством алкилиране с 2-бромоетилпропаноат. Забелязва се, че с увеличаване на дължината на въглеродородната верига расте и времето необходимо за изчерпване на изходните реагенти (ТЛС). От 2-6 часа при алкилиране с етил бромоацетат и 2-бромоетилпропаноат, реакционното време достига 16-20 часа при етил-4-хлоробутират и етил-6-хлорохексаноат, поради което последните бяха проведени в присъствие на каталитични количества KI.

Естерите 4.3а, 4б, 4.1б, 4.2б, 4.3б, 4.6б и 4.1в бяха получени в твърдо състояние, а структурата им бе потвърдена с ЯМР спектроскопия. В ^1H ЯМР спектрите им се наблюдава триплет в интервала 1.24-1.27 м.ч. ($J = 7.1 \text{ Hz}$) с интегрална интензивност за три протона и квартет в интервала 4.16-4.23 м.ч. ($J = 7.1 \text{ Hz}$) с интензивност за два протона, съответно за метилова и метиленова група от естерната част ($-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$). Протоните, принадлежащи на метиленовите групи от въглеродородната верига също

лесно могат да бъдат различени. В спектрите на съединенията от серия **4** също така отсъства синглетът за фенолната (9.72-10.06 м.ч) или меркапто група (4.21-4.84 м.ч), който ясно може да бъде наблюдаван в спектрите на съединенията от серия **3**, като това недвусмислено доказва тяхната пълна трансформация.

По-голямата част от естерите **4** бяха получени под формата на масла с високи добиви (70-98%) и чистота, което позволи използването им в следващия етап от синтеза без нужда от допълнително пречистване.

Хидролизирането на естерите бе проведено при стайна температура с 10% воден разтвор на разтвор на натриева основа в среда от метанол [Схема 51].

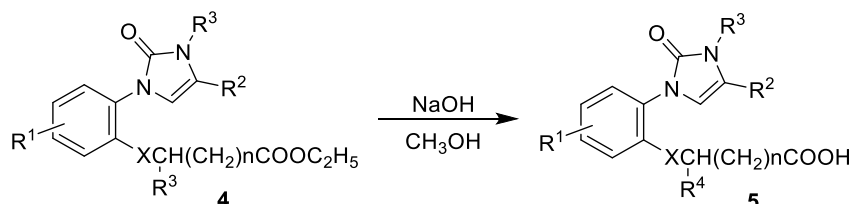


Схема 51. Хидролиза на естери **4** до карбоксилни киселини **5**

Целевите съединения от серия **5** бяха получени със средни до високи добиви [Таблица 4]. Така получените карбоксилни киселини са нови и неописани в литературата до сега. За пълното протичане на хидролизата свидетелстват ¹H ЯМР спектрите на съединенията от серия **5** в които се наблюдава специфичен синглет при около 11.99-13.16 м.ч., отговарящ на протона от карбоксилния фрагмент (-COOH), както и липсата на споменатите по-горе сигнали от етиловата естерна част.

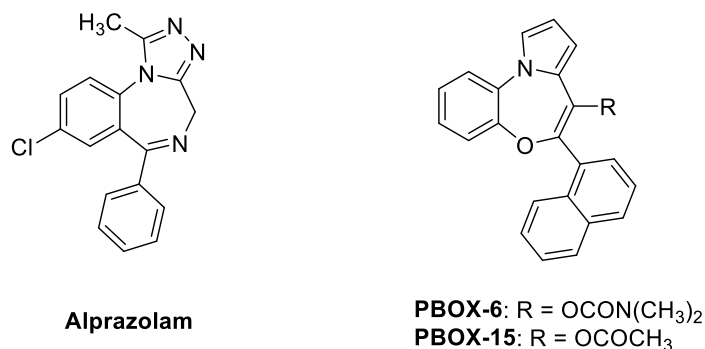
Таблица 4. Експериментални добиви на карбоксилни киселини 5

Съединение	R^1	R^2	R^3	R^4	X	n	Добив (%)
5a	H	CH ₃	CH ₃	H	O	0	94
5.1a	H	C ₆ H ₅	CH ₃	H	O	0	90
5.2a	H	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	H	O	0	85
5.3a	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	O	0	87
5.4a	H	CH ₃	CH ₃	H	O	2	92
5.5a	H	CH ₃	CH ₃	H	O	4	79
5.6a	H	C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	O	0	86
5b	5-Cl	CH ₃	CH ₃	H	O	0	90
5.1b	5-Cl	C ₆ H ₅	CH ₃	H	O	0	96
5.2b	5-Cl	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	H	O	0	86
5.3b	5-Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	O	0	85
5.4b	5-Cl	CH ₃	CH ₃	H	O	2	98
5.5b	5-Cl	CH ₃	CH ₃	H	O	4	98
5.6b	5-Cl	C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	O	0	97
5c	4-Cl	CH ₃	CH ₃	H	O	0	92
5.1c	4-Cl	C ₆ H ₅	CH ₃	H	O	0	85
5.2c	4-Cl	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	H	O	0	97
5.3c	4-Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	O	0	58
5.4c	4-Cl	CH ₃	CH ₃	H	O	2	98
5.5c	4-Cl	CH ₃	CH ₃	H	O	4	98
5.6c	4-Cl	C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	O	0	98
5z	H	CH ₃	CH ₃	H	S	2	53
5.2z	H	CH ₃	CH ₃	H	S	4	54

3.1.4. Вътрешномолекулно ацилиране и сключване на 1,5-бензоксазепиновия пръстен

С течение на годините седемчленните хетероцикли, като бензодиазепини, -тиазепини и -оксазепини са се наложили като важни градивни елементи в процеса на моделиране на нови молекули с биологична активност. От литературата е още известно, че добавянето на допълнителни пръстени към изброените по-горе хетероциклически системи, води до усилване и/или модифициране на фармакологичния профил на

молекулите (Sangshetti et al., 2015). Такива съединения, съдържащи анелиран пръстен към страна [d] са класическия бензодиазепинов анксиолитик Алпразолам (триазолов пръстен), както и новият обещаващ клас противотуморни агенти пироло-1,5-бензоксазепини PBOX (пиролов пръстен) (Nathwani et al., 2010) [Фигура 28].



Фигура 28. Лекарствени вещества и продукти, съдържащи допълнителен анелиран пръстен

Базирайки се на тези знания от полето на хетероциклената химия, бяхме мотивирани да синтезираме производни на нова трициклена система, съдържаща 1,5-бензоксазепинов скелет с анелиран по страна [d] имидазолонов цикъл.

Намирането на оптимални условия за провеждане на вътрешномолекулното ацилиране, съпроводено от сключване на 1,5-бензоксазепинов пръстен [Схема 52] бе предшествано от серия експерименти с вариране на температурата и вида реакционна среда.

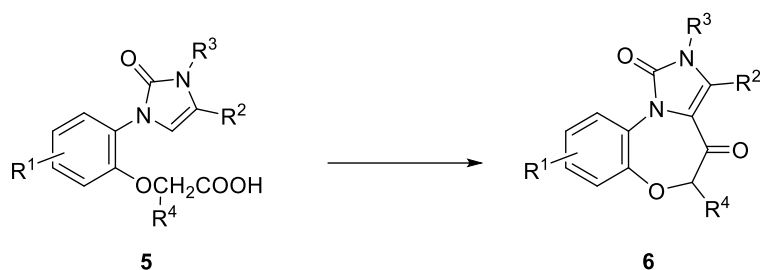


Схема 52. Вътрешномолекулно ацилиране, съпроводено от сключване на 1,5-бензоксазепинов пръстен

За първоначалните опити бе използвана феноксиоцетната киселина **5a** (0.5 ммол), чиято циклизация до 2,3-диметилбензо[*b*]имидазо[1,5-*d*][1,4]оксазепин-1,4(2*H*,5*H*)-дион

6a бе проведена в пет успоредни експеримента, използвайки 3 мл от съответните реакционни среди. Получените резултати са обобщени в *Таблица 5*.

Таблица 5. Оптимизиране на реакционните условия за провеждане на вътрешномолекулното ацилиране

№	Реакционна среда	Температура (°C)	Време (час)	Добив (%)
1	конц. H ₂ SO ₄	ст.т. – 80	12	–
2	сулфолан/ПФК	ст.т. – 80	12	–
3	CH ₃ SO ₃ H/P ₂ O ₅ (Eaton's reagent)	80	5	63
4	Полифосфорна киселина (ПФК)	120	2	78
5	(CF ₃ CO) ₂ O/BF ₃ (C ₂ H ₅) ₂ O/ 1,2-дихлороетан	кипене	1.5	86

Провеждането на опита в среда от концентрирана сярна киселина и сместа сулфолан/полифосфорна киселина, бе съпроводено от редица трудности. Първоначалното провеждане на тези експериментите при стайна температура не доведе до инициране на процеса на вътрешномолекулно ацилиране, поради този факт след изтичане на един час от реакционното време температурата бе повишена до 80°C. След като на дванадесетия час не бе регистрирано наличие на продукт, тези два метода бяха изключени като възможност за получаване на целевите съединения **6**.

Далеч по-добри резултати бяха постигнати при експеримента, проведен с реагент на Итън – CH₃SO₃H/P₂O₅ (Eaton's reagent) и този с полифосфорна киселина (ПФК). Използвайки същото съотношение карбоксилна киселина **5a** и реакционна среда, след няколко часова разбъркване и нагряване при съответната температура целевото трициклично съединение **6a** бе получено с много добри добиви (63-78%).

Провеждането на експеримента при кипене на **5a** с трифлуороцетен анхидрид, BF₃(C₂H₅)₂O в среда от 1,2–дихлороетан също протича гладко, а целевото съединение е получено с най-висок експериментален добив от 86%.

Взимайки предвид реакционното време, нужно за пълното протичане на вътрешномолекулното ацилиране и количеството на получения продукт, за целите на синтеза бяха избрани следните два метода: *Метод А* (полифосфорна киселина, 120°C) (Stanisheva et al., 2017) и *Метод Б* ((CF₃CO)₂O/BF₃(C₂H₅)₂O/1,2-дихлороетан, кипене). Резултатите от проведените експерименти са описани в *Таблица 6*.

В процеса на работа като по-удобен подход се утвърди **Метод Б**, тъй като ни дава възможност за получаване на цялата серия целеви съединения **6** с добри експериментални добиви. Други негови предимства пред **Метод А** са скъсено реакционно време и улеснено изолиране и пречистване на продуктите.

Таблица 6. Експериментален добив на имидазобензоксазепини **6**

Съединение	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Добив* (%)	
					Метод А	Метод Б
6a	H	CH ₃	CH ₃	H	44	67
6.1a	H	C ₆ H ₅	CH ₃	H	23	52
6.2a	H	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	H	31	48
6.3a	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	—	50
6b	9-Cl	CH ₃	CH ₃	H	62	67
6.1b	9-Cl	C ₆ H ₅	CH ₃	H	16	51
6.2b	9-Cl	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	H	66	53
6.3b	9-Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	—	58
6v	8-Cl	CH ₃	CH ₃	H	60	57
6.1v	8-Cl	C ₆ H ₅	CH ₃	H	32	61
6.2v	8-Cl	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	H	41	31
6.3v	8-Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	—	55

*добив след пречистване (прекрystalизация/колонна хроматография)

На **Схема 53** е представен вероятният механизъм, по който протича вътрешномолекулното ацилиране по **Метод Б**.

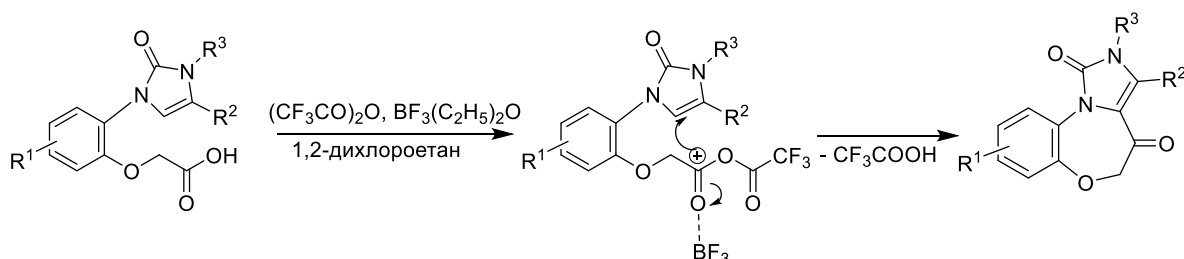


Схема 53. Вътрешномолекулно ацилиране, водещо до сключване на оксазепинов цикъл

Като първа стъпка от посоченият механизъм може да се отбележи образуването на смесен анхидрид между карбоксилна киселина от серия **5** и трифлуороцетния анхидрид ((CF₃CO)₂O). Именно този смесен анхидрид по-нататък участва във формирането на комплекс с люисовата киселина VF₃(C₂H₅)₂O, като по този начин се улеснява електрофилната атака към имадазолоновия пръстен и сключването на трициклената система. Получените имидазо[5,1-*d*][1,5]бензоксазепини от серия **6** бяха изолирани с добри добиви и пречистени чрез прекристализация. Според направената справка производни на този тип пръстенни системи все още не са описани в литературата.

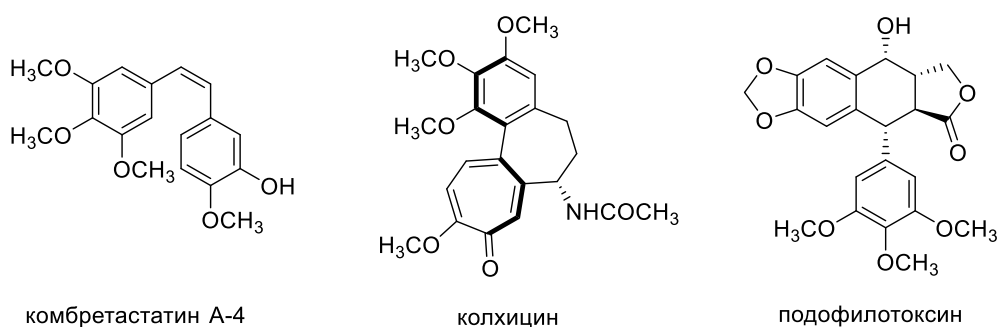
Изграждането на оксазепиновия цикъл и образуване на трициклената система беше потвърдена от приложените спектрални техники. Сравнявайки ¹H ЯМР спектрите на карбоксилните киселини **5** с тези на имидазобензоксазепини **6** може да се забележи преместване на синглетата за метиленовата група от феноксикарбоксилния фрагмент (OCH₂) от 4.78-4.81 м.ч., към 4.58-4.62 м.ч. при включването му в оксазепиновия пръстен. Категорично доказателство за изграждането на желаната трициклена система у съединения **6** е изчезването на характеристичния сигнал за метиновия протон от имидазолоновия цикъл (=CH) при 6.45-6.51 м.ч., който ясно може да бъде видян в спектрите на карбоксилни киселини **5**. Различия има и в инфрачервените спектри, където за разлика от изходните киселини **5** в спектрите на седемчленните хетероцикли отсъства широката мултиплетна ивица за валентното трептене на хидроксилната група в интервала 3120-2400 cm⁻¹. Наблюдават се две силно интензивни ивици при 1650 cm⁻¹ и 1700 cm⁻¹, отговарящи на C=O валентното трептене от имидазолоновия, респективно оксазепиновия цикъл.

3.2. СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ НА БЕНЗИЛИДЕНОВИ ПРОИЗВОДНИ НА 1,5-БЕНЗОКСАЗОЛОНИТЕ С АНЕЛИРАН ИМИДАЗОЛОНОВ ПРЪСТЕН

След успешното изпълнение на първоначалната ни задача, а именно синтезирането на нова полициклена система, състояща се от 1,5-бензоксазепинов скелет с анелиран имидазолонов цикъл, логично продължение на синтетичната ни работа бе по-нататъшното ѝ модифициране. Като най-удобно място за въвеждане на

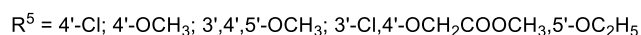
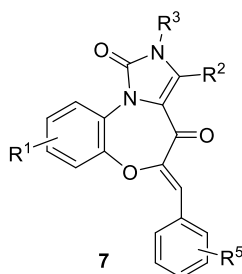
допълнителен фармакофорен фрагмент се открии позиция 5 на новосинтезираната пръстенна система. Освен **6.3а**, **6.3б** и **6.3в**, които имат метилова група в това положение, останалите съединения от серията могат да бъдат подложени на такъв тип модификация.

Комбинирането на два или повече фармакофора в една молекула е ефективен и често срещан подход в медицинската химия. 3,4,5–триметокси-фениловия фрагмент е добре познат фармакофор при дизайна на нови биологично активни молекули и е идеален кандидат за целите на нашия синтез. Известно е, че присъства в молекулите на доказалите се противораковите агенти от вида на комбретастатин А-4 (*Fosbretabulin*), колхицин, подофилотоксин и др. [*Фигура 30*].



Фигура 30. Структура на противоракови молекули, съдържащи 3,4,5-триметоксифенилов фрагмент

Финалният избор за модификация на синтезираните от нас имидазобензоксазепини **6** бе въвеждане на заместен бензилиденов фрагмент в позиция 5 на трициклената система. Общата формула на целевите бензилиденови производни **7** е представена на *Фигура 31*.



Фигура 31. Структура на целевите бензилиденови производни **7**

Първоначалните опити за получаване на желаните бензилиденови производни **7**, посредством алдолна кондензация, бяха проведени като към трициклични бензоксазепини **6** се прибавят съответните заместени бензалдехиди, триетиламин $N(C_2H_5)_3$ и излишък от оцетен анхидрид $(CH_3CO)_2O$ (*Метод А*). За изчерпателното протичане на процеса бе необходимо реакционната смес да се кипи в продължение на около 40 часа. Дългото реакционно време, трудоемкото разработване на реакционната смес, както и нуждата от допълнително пречистване на ниските експериментални добиви, ни насочиха към търсенето на по-удобен синтетичен подход.

Успех бе постигнат при провеждането на реакцията в шишенце с винтова капачка, използвайки триметилсилилхлорид $(CH_3)_3SiCl$ в среда от N,N-диметилформаид и нагриване при $100^\circ C$ (*Метод Б*) (Ryabukhin et al., 2007). Този подход доведе до получаването на целевите съединения с по-добри добиви [Таблица 7], а реакционното време бе скъсено на 6-10 часа.

Таблица 7. Експериментални добиви на бензилиденови производни 7

Съединение	R ¹	R ²	R ³	R ⁵	Добив* (%) Метод А	Добив* (%) Метод Б
7a	H	CH ₃	CH ₃	4'-Cl	35	41
7.1a	H	CH ₃	CH ₃	4'-OCH ₃	61	78
7.2a	H	CH ₃	CH ₃	3',4',5'-OCH ₃	49	43
7.3a	H	CH ₃	CH ₃	3'-Cl, 4'-OCH ₂ COOCH ₃ , 5'-OC ₂ H ₅	—	52
7б	9-Cl	CH ₃	CH ₃	4'-Cl	—	65
7.1б	9-Cl	CH ₃	CH ₃	4'-OCH ₃	25	68
7.2б	9-Cl	CH ₃	CH ₃	3',4',5'-OCH ₃	—	72
7в	8-Cl	CH ₃	CH ₃	4'-Cl	22	42
7.1в	8-Cl	CH ₃	CH ₃	4'-OCH ₃	21	46
7.2в	8-Cl	CH ₃	CH ₃	3',4',5'-OCH ₃	44	72
7.3в	8-Cl	CH ₃	CH ₃	3'-Cl, 4'-OCH ₂ COOCH ₃ , 5'-OC ₂ H ₅	—	67

*добив след пречистване (прекрystalизация/колонна хроматография)

Следвайки общ *метод на работа А*, дори след удължаване на реакционното време, върху ТСХ плаката се наблюдава остатъчно количество от изходните бензоксазепини **6**. Това, както и трудното допълнително пречистване посредством колонна хроматография и/или прекристализация доведе до ниски стойности на експерименталния добив.

От друга, страна прилагането на *метод на работа Б* води до изчерпателно протичане на реакцията и получаването на значително по-високи добиви от бензилиденови производни **7**.

Предполагамият механизъм, по който протича алдолната кондензация е представен на *Схема 55*:

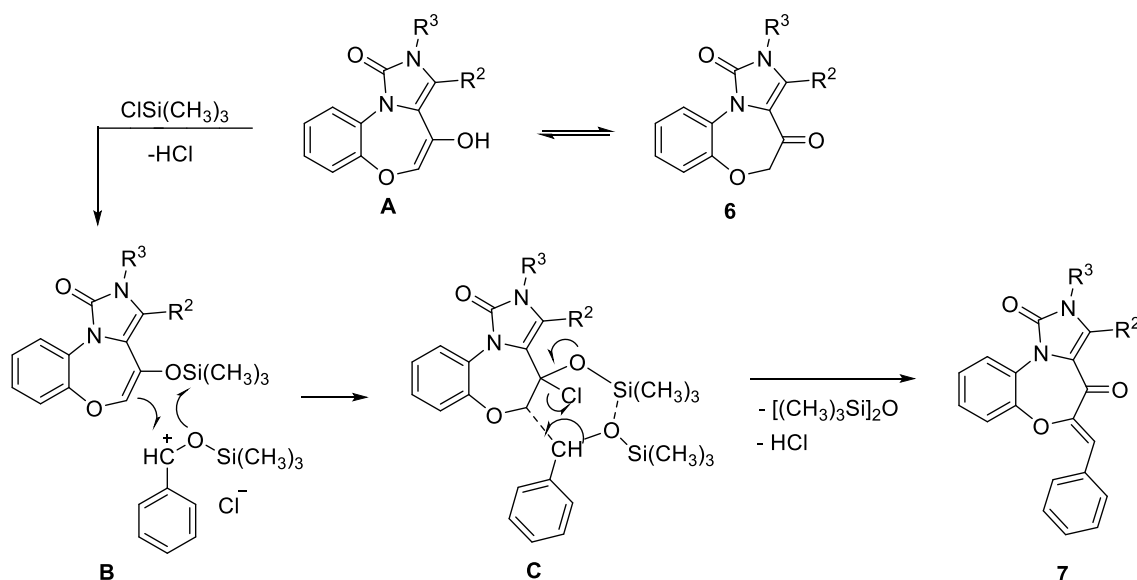


Схема 55. Предполагам механизъм на алдолна кондензация

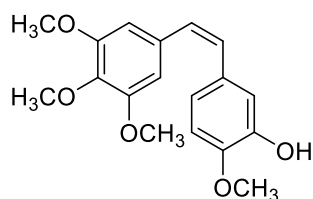
Наличието на кето-група в четвърто положение на трициклената система **6** и водороден атом в съседство, са предпоставка за осъществяването на кето-енолна тавтомерия, като двете изомерни форми (**6** и **A**) съществуват в равновесие помежду си. Участието на $\text{ClSi}(\text{CH}_3)_3$ се състои от една страна в образуването на силил етер, при взаимодействието си с енол (**A**) и от друга страна във формирането на карбокатион в избрания за работа алдехид (**B**). Последващото електрофилно присъединяване води до сформирането на интермедиат (**C**), елиминирането на солна киселина и

хексаметилдисилоксан $[(\text{CH}_3)_3\text{Si}]_2\text{O}$ от който ни отвежда до целевите бензилиденови производни **7**.

Протичането на алдолната кондензация и получаването на целевите бензилиденови производни беше потвърдено посредством ^1H ЯМР-спектроскопия, където се забелязва отсъствието на синглета при около 4.53-4.63 м.ч., отговарящ за метиленовата група в 5 позиция на имидазобензоксазепиновата пръстенна система. Освен това, в спектрите на съединения **7** се забелязва синглет с интегрална интензивност за един протон при около 7.20 м.ч., отговарящ на виниловия протон ($=\text{CH}$) от бензилиденовия фрагмент. Поради наличието на магнитно еквивалентни метокси групи в 3,4,5-триметоксифенилов фрагмент, в спектрите на съединения **7.2a**, **7.2b** и **7.2в** може да бъде забелязан синглет с интегрална интензивност за шест протона при около 3.93 м.ч. Протоните от метокси групата в четвърто положение е с химично отместване при около 3.96 м.ч. Сигналът за същата може да бъде наблюдаван при около 3.90 м.ч. в спектрите на съединения **7.1a**, **7.1b** и **7.1в**, съдържащи 4-метоксифенилов фрагмент в молекулите си.

Изомерията играе важна роля в полето на клиничната фармакология и фармакотерапия, тъй като изомерите често се различават по своите фармакокинетични и фармакодинамични свойства (Chhabra et al., 2013). Особено внимание се обръща на стереоизомерията при хирални молекули, но не по малко важност има и наличието на други видове изомерия като например геометричната. В този случай различието в свойствата може да дойде от факта, че дадена конфигурация пасва по-добре на таргетната молекула в организма, напр. ензим или рецептор.

Пример онагледяващ това твърдение е комбретастин А-4 [Фигура 32]. Счита се, че екзоцикличната двойна връзка в молекулата му осигурява подходящо ориентиране, както и необходимото разстояние между ароматните ядра за максимално взаимодействие с биологичните мишени. Той, както и неговите аналози, носители на висок цитотоксичен антитубулинов ефект се характеризират с *Z*-конфигурация на двойната връзка. Описаните в литературата *E*-изомери проявяват значително по-ниска активност (Tron et al., 2006).

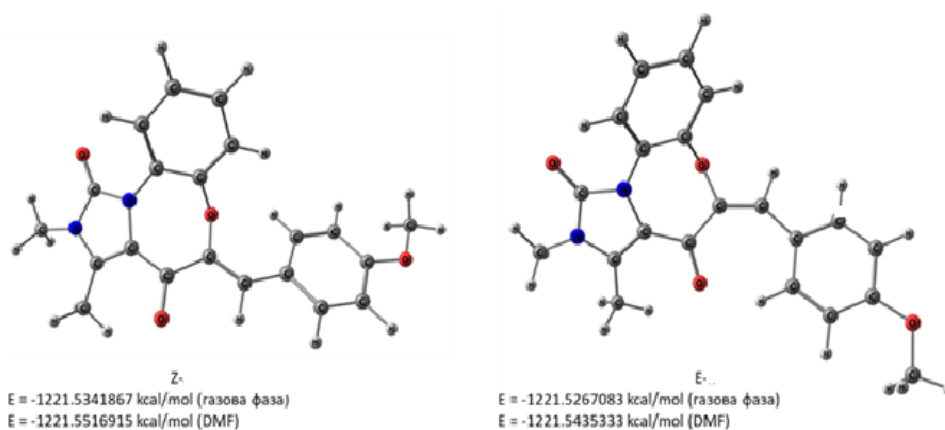


Фигура 32. Структура на *Z*-изомерна форма на комбретастатин А-4

Наличието на подобна екзоциклична двойна връзка у бензилиденовите производни от серия **7** също води до възможността те да съществуват под формата на *E*- или *Z*-диастереизомери. Анализът на ^1H и ^{13}C ЯМР-спектрите на съединенията показва, че в резултат от приложената синтетична процедура се получава само един от двата възможни изомера. За точното определяне на конфигурацията на двойната връзка бе необходимо провеждането на допълнителни теоретични и спектрални изследвания.

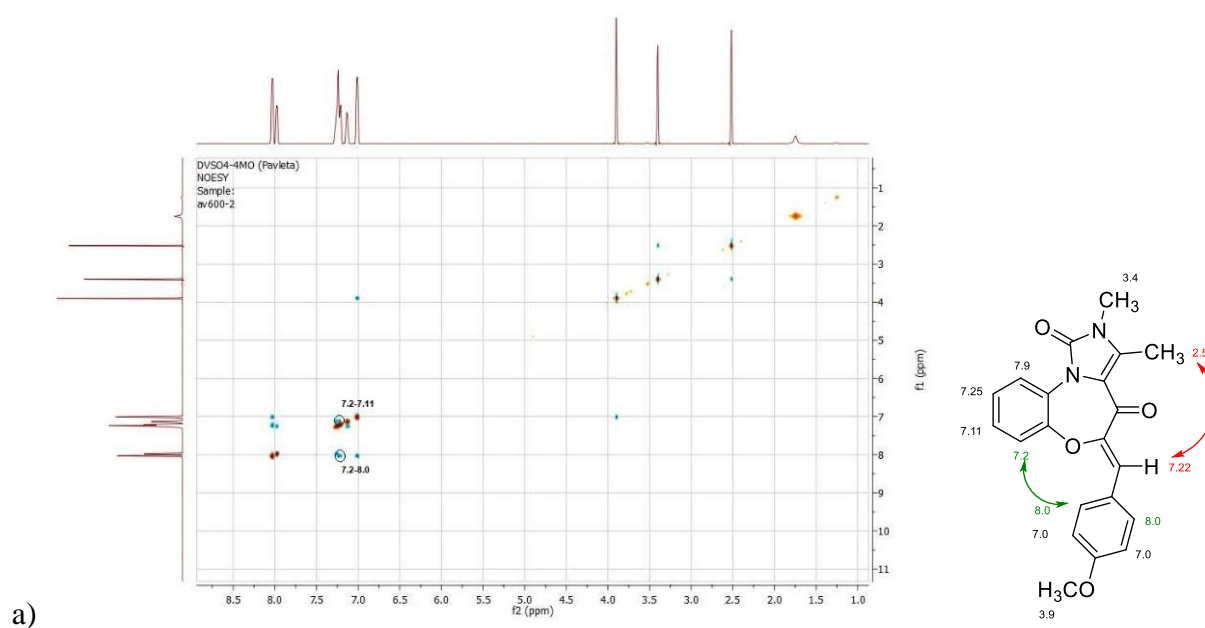
Теоретичните изчисления с цел определяне на по-стабилен конформер са направени под ръководството на доц. д-р Валя Николова в лаборатория „Компютърна химия и спектроскопия“, Факултет по химия и фармация на Софийски университет „Св. Климент Охридски“. За двата възможни диастереизомера, показани на *Фигура 33*, са извършени оптимизации в газова фаза и в среда от ДМФ. Изчисленията са проведени с теория на функционала на плътността (DFT), като е използвана комбинация на метод и базисен набор B3LYP/6-31+G(d,p). За отчитане на влиянието на разтворителя е използван РСМ -метод.

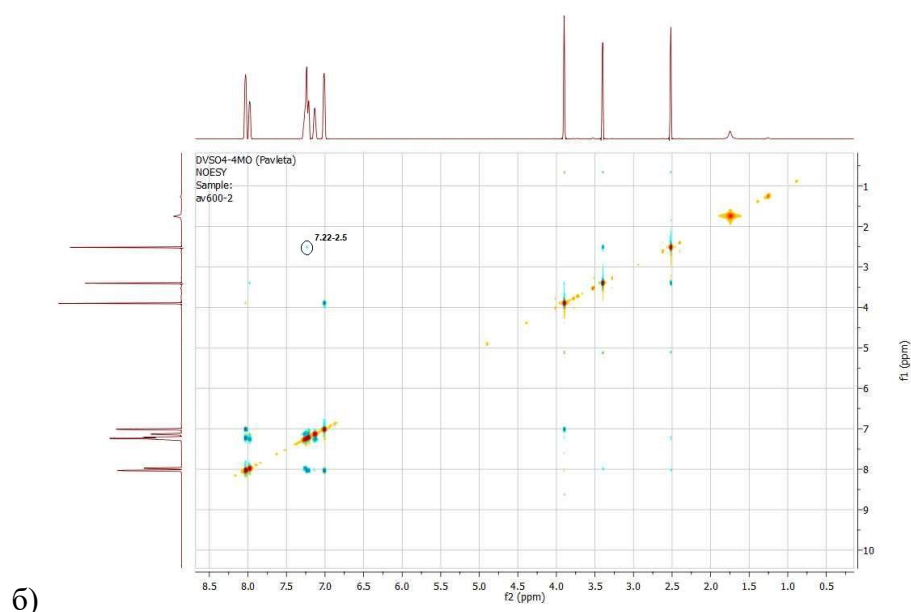
Изчисленията за енергията на *Z*-изомера са както следва $E = -1221.5341867$ kcal/mol в газова фаза и $E = -1221.5516915$ kcal/mol в разтворител ДМФ. Стойностите на тези енергии за *E*-изомера са съответно $E = -1221.5267083$ kcal/mol в газова фаза и $E = -1221.5435333$ kcal/mol в разтворител ДМФ. Въпреки близките стойности на резултатите, можем да заключим, че по-стабилен е *Z*-диастереизомерът, който има по-голяма отрицателна енергия (по абсолютна стойност), както в газова фаза, така и при отчитане на разтворителя ДМФ, в който протича реакцията.



Фигура 33. Резултати от проведените теоретични изчисления за определяне на по-стабилен конформер на бензилиденово производно **7.1a**

В подкрепа на представените теоретични резултати са проведени допълнителни спектрални изследвания в лаборатория “Център по ЯМР спектроскопия“ към Институт по органична химия с център по фитохимия БАН със съдействието на проф. д-р Павлета Шестакова. На *Фигура 34* е представен ^1H - ^1H NOESY спектърът на съединение **7.1a**.



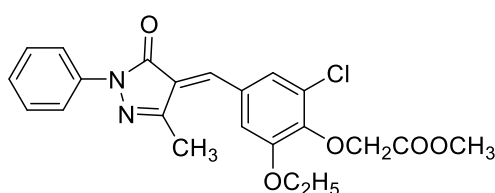


Фигура 34. ^1H - ^1H NOESY спектър на съединение 7.1a в CDCl_3

На представения спектър ясно личат далечните пространствени взаимодействия между ароматния протон в С-7 позиция (7.2 м.ч.) на имадазобензоксазепиновия скелет и *орто* протона (8.0 м.ч.) от метоксифениловия заместител [Фигура 34a]. При по-детайлно разглеждане на сигналите може да се забележат по-слабите взаимодействия между протоните от метиловия заместител в С-3 (2.5 м.ч.) и виниловият протон (7.22 м.ч.) [Фигура 34б]. Имайки предвид тези данни може да заключим, че успешно е получена и изолирана *Z*-изомерната форма на съединение 7.1a.

Част от новосинтезираните бензилиденови производни бяха подложени на *in vitro* проучване за оценка на тяхната антипролиферативна активност. Изследванията бяха проведени в лаборатория по медико-биологични изследвания към Институт по молекулярна биология БАН, под ръководството на проф. д-р Маргарита Апостолова. Като метод за оценка на цитотоксичния потенциал на веществата беше използван т.нар. МТТ тест, основаващ се на редукцията на жълтата тетразолиева сол МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид] до виолетов формазан под действието на NAD(P)H-зависими оксидоредуктазни ензими на виталните клетки (Mosmann, 1983). Количеството на формазана се определя спектрофотометрично и е пропорционално на броя на живите клетки.

Изследванията бяха проведени върху клетъчна линия A549 (ATCC, CCL-185), представляваща човешки аденокарциномни алвеоларни епителни клетки. Третирането на клетките се извърши с еднакви моларни концентрации (от 5 до 100 μM) при всички изследвани вещества. Като референтно съединение бе използвано съединение **SJ-172550**, идентифицирано като нова обещаваща молекула с противотуморна активност (Reed et al., 2010) [Фигура 37]. От получените данни за цитотоксичното действие на изследваните вещества бе определена половин максимална инхибиторна концентрация (IC_{50}) [Таблица 8].

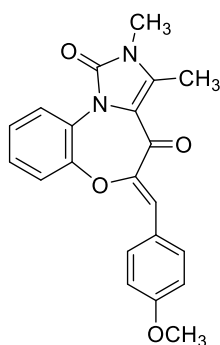


Фигура 37. Структура на референтно съединение **SJ-172550**

Таблица 8. Стойности на IC_{50} (μM) за бензимиленови производни **7** спрямо туморна клетъчна линия A549

Съединение	IC_{50} (μM)
7a	11.38
7.1a	8.0
7.2a	17.94
7.3a	22.17
7.1b	8.72
7.2b	28.32
7.2c	22.57
7.3c	20.90
SJ-172550	33.76

От получените резултати се вижда, че всички тествани аналози проявяват цитотоксично действие спрямо A549 клетки в микромоларен диапазон. В допълнение са определени стойностите на IC_{20} и IC_{80} за най-активното съединение **7.1a** [Фигура 39] и за референтното съединение **SJ-172550** [Таблица 9].



Фигура 38. Структура на лидерно бензилиденово производно 7.1a

Таблица 9. Стойности на IC_{20} и IC_{80} (μM) на бензилиденово производно 7.1a и SJ-172550 спрямо клетъчна линия A549

Съединение	IC_{20} (μM)	IC_{80} (μM)
7.1a	2	50
SJ-172550	25	50

По-нататъшните изследвания продължиха със съединение 7.1a, което бе тествано върху BEAS-2B (ATCC, CRL-9609) клетъчна линия [Таблица 10]. Клетките от тази линия са приети за контролна на A549 и представляват нетуморогенни белодробни епителни клетки.

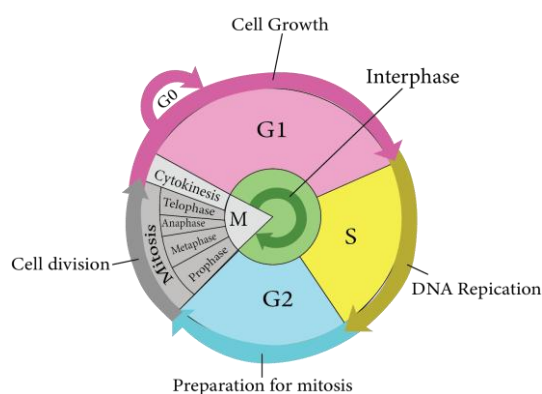
Таблица 10. Стойности на IC_{50} (μM) на 7.1a и SJ-172550 спрямо клетъчна линия BEAS-2B

Съединение	IC_{50} (μM)
7.1a	32.93
SJ-172550	21.14

Резултатите от този първоначален скрининг са обещаващи, тъй като съединение 7.1a показва по-ниска стойност на IC_{50} по отношение на тестваните туморни клетки и по-висока по отношение на клетките на бял дроб, което е признак за по-ниска токсичност по отношението на здравите клетки.

Дългогодишните изследвания върху процесите на делене на клетките в човешкия организъм довеждат до детайлното познаване на техния жизнен цикъл. Може да се каже, че в основата на този процес стои строга последователност от събития, при

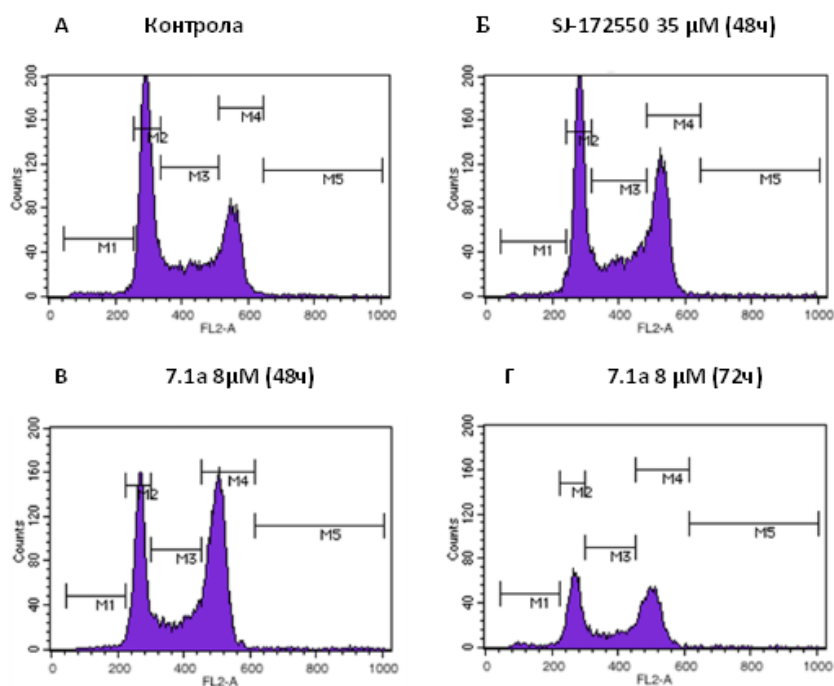
които клетките удвояват своето съдържание и се разделят на две нови дъщерни клетки (Alberts et al., 2015). Самият клетъчен цикъл се състои от няколко специфични фази: G1, S и G2-фаза, наричани с общо име интерфаза и М-фаза (митоза). По време на интерфазата клетката нараства и натрупва необходимата за процеса на удвояване енергия (G1-фаза), извършва се репликация на клетъчната ДНК (S-фаза) и се подготвя за разделяне (G2-фаза). Същинското разделяне на клетката до две нови дъщерни клетки се осъществява в М-фазата (Karinas et al., 2013) [Фигура 40].



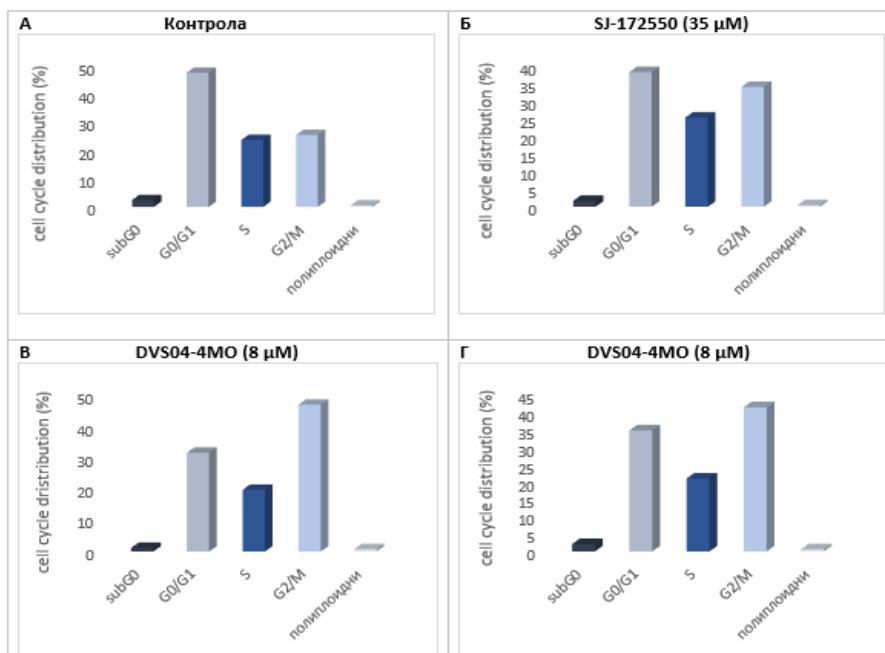
Фигура 39. Фази на клетъчния жизнен цикъл (Ligasova et al., 2023)

- **Флуцитометричен анализ**

За да се определи фазата на клетъчно делене в която се намират клетки, след третиране със съединение **7.1a**, е проведен флуцитометричен анализ [Фигура 40]. Изследването е проведено за период от 72 часа, като са използвани IC_{50} концентрации на **7.1a** и **SJ-172550**. След 48 часа от третирането на клетъчна линия A549 с тестовите съединения се забелязва увеличение на клетките, които се намират в G2/M-фаза, като тази тенденция се запазва до 72 час [Фигура 41]. Резултатите недвусмислено сочат, че блокиране на клетъчния цикъл се осъществява именно в тази фаза от клетъчното развитие.



Фигура 40. Флуцитометричен анализ на клетки от линия A549: (А) Контрола; (Б) SJ-172550 35 μM (48ч.); (В) 7.1a 8 μM (48ч.); (Г) 7.1a 8 μM (72ч.)

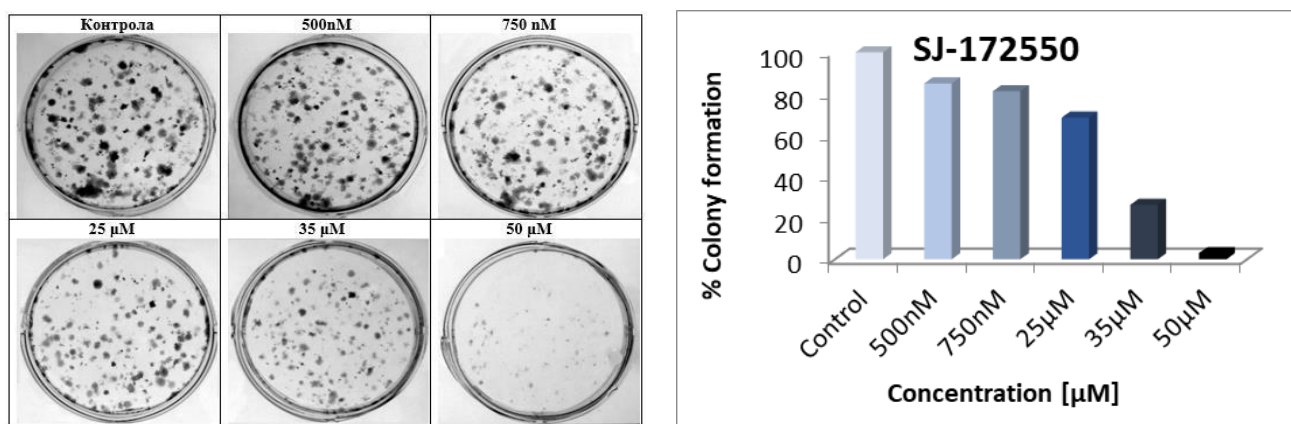


Фигура 41. Разпределение на клетките по фази на клетъчния цикъл след третиране с 7.1a и SJ-172550: (А) Контрола; (Б) SJ-172550 (35 μM) 48ч.; (В) 7.1a (8 μM) 48ч.; (Г) 7.1a (8 μM), 72 ч.

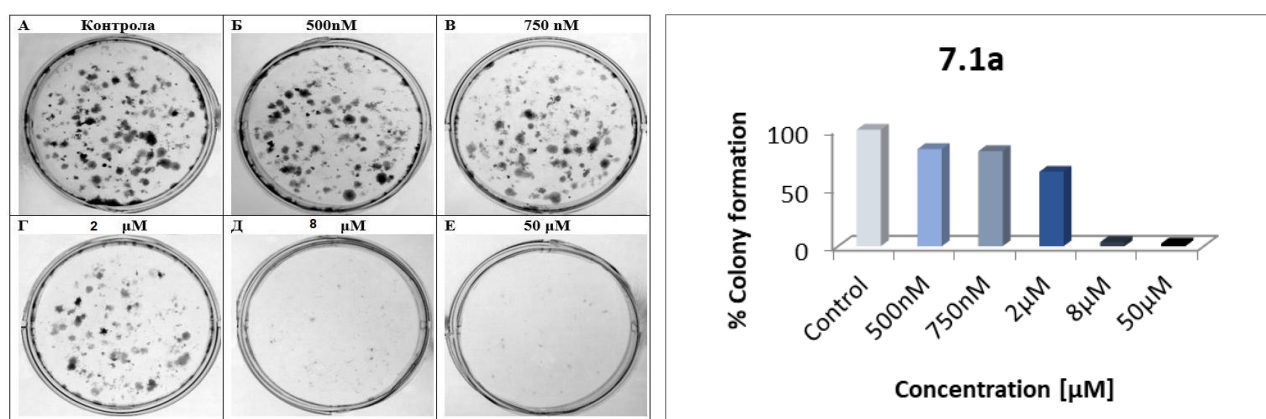
- **Клоногенен анализ**

За оценка на цитотоксичните ефекти на съединения **7.1a** и **SJ-172550** върху клетъчна линия A549 е проведен клоногенен анализ. Този метод дава представа за пролиферативните функции на клетките за продължителен период от време. Резултатите от изследването са посочени на *Фигура 42-43*.

От извършеният анализ се забелязва 97% инхибиране на формирането на колонии от клетъчна линия A549 при употреба на **SJ-172550** в концентрация 50 μM и съответно 8 и 50 μM , при употреба на съединение **7.1a**. В допълнение на което се наблюдава и намаление на размера на образуваните колонии. За концентрации 500 и 750 nM не се наблюдава съществена разлика в броя на колониите, а употребата на съответните IC₂₀ концентрации 2 μM за **7.1a** и 25 μM за **SJ-172550** намалява образуваните колонии едва с 36% и 32%. Всички тези резултати говорят за концентрационна зависимост върху блокирането на пролиферацията и клетъчното делене в A549 клетките.



Фигура 42. Влияние на **SJ-172550** върху способността за формиране на колонии на клетките от туморна клетъчна линия A549, третирани със съответните концентрации за 72 ч. Графично представяне на броя образувани колонии, като % от контролата



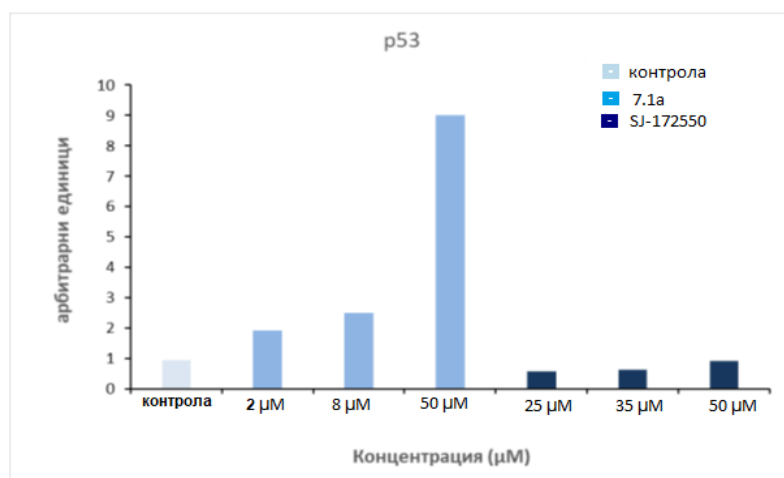
Фигура 43. Влияние на **7.1a** върху способността за формиране на колонии на клетките от туморна клетъчна линия A549, третирани със съответните концентрации за 72 ч. Графично представяне на броя образувани колонии, като % от контролата

В допълнение, проведенят Western blot анализ е установява активирането на каспаза 3 в A549 клетките, третирани с **7.1a**, което е индикация за рецепторно-индуциран път на апоптоза.

- **Изследване на p53, посредством Western blot анализ**

Наричан „пазител на генома“ тумор-супресорния протеин p53 играе ключова роля за превенцията на клетките от онкогенна трансформация. В следствие на възникнал клетъчен стрес, той индуцира блокиране на клетъчния цикъл или апоптоза (програмирана клетъчна смърт). Трябва да отбележим, че самият p53 трябва да бъде строго регулиран, за да се избегнат нежелани патологични ефекти, а като негови най-важни негативни регулатори са сочени протеините MDM2 и MDMX. В нормални клетки, действието им води до бърза деградация и спад в количеството на p53 (Pishas et al., 2011), но в условия на клетъчен стрес самите те трябва да бъдат инхибирани, за да може p53 адекватно да осъществи своите протекторни функции (Shadfan et al., 2012). Ето защо не е изненада, че един от често срещаните механизми на инактивиране на p53 у тумори е повишената експресия на MDM2 и MDMX (Karni-Schmidt et al., 2016).

Като се има предвид модела на регулация на p53 от MDM2, третирането на клетките с инхибитор на свързването на MDM2-p53 би следвало да доведе до натрупване на p53 и активация на неговия път (Zhang et al., 2009). Поради тази причина бе изследван ефекта на **7.1a** върху клетъчните нива на протеина, като за целта бе използвана клетъчна линия A549 с див тип p53. Резултатите са представени на *Фигура 44*.

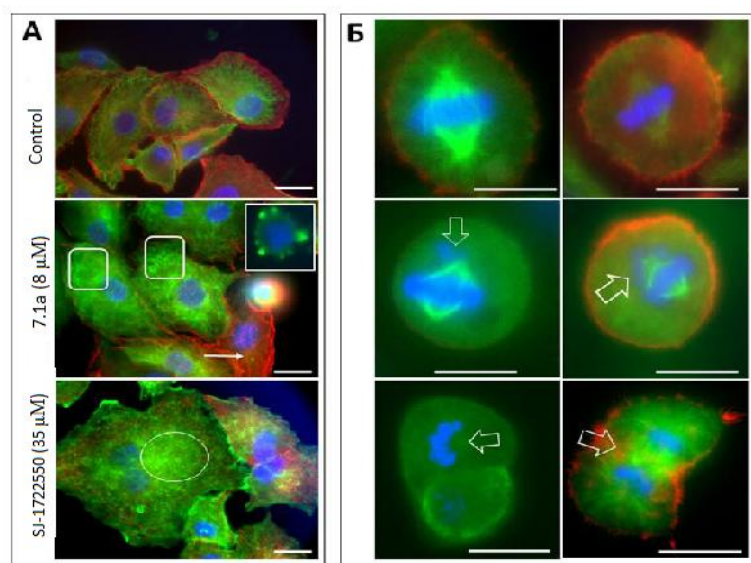


Фигура 44. Резултати от Western blot анализ, показващи експресията на белтъка p53 в клетъчна линия A549 след третиране с 7.1a и SJ-172550

От получените резултати ясно се вижда, че третирането на клетките от туморна клетъчна линия A549 с 7.1a в трите концентрации IC₂₀, IC₅₀ и IC₈₀ води до повишаване на нивата на p53 в сравнение с нетретираната контролна проба и референтно съединение SJ-172550. Най-осезаем ефект се наблюдава при прилагане на 7.1a в концентрация, съответстваща на IC₈₀ (50 µM). Тези резултати не бива да ни изненадват, тъй като литературните източници класифицират SJ-172550 като инхибитор на MDMX, което го прави обещаващ агент в борбата с тумори от типа на ретинобластома, които показват увеличена MDMX експресия (Reed et al., 2010). Използваната в настоящите тестове туморна клетъчна линия A549 (рак на белите дробове) има доминантна експресия на MDM2 (Zhang et al., 2009), което и определя 7.1a именно като инхибитор на свързването на MDM2-p53.

- **Имунофлуоресцентна микроскопия**

Отчитайки структурното сходство с Combretastatin A-4, предполагаме че антипролиферативната активност на 7.1a може да бъде свързана със специфично взаимодействие с тубулина. За да бъде проверена тази хипотеза е проведен микроскопски анализ с имунофлуоресцентно белязване както следва: α-тубулин (зелен), ДНК (син) и F-актин (червен) [Фигура 45].



Фигура 45. Флуоресцентни микрофотографии на A549 клетки с еквитоксични концентрации (IC_{50}) от съединения **7.1a** и **SJ-172550**

При контролата, намираща се в основната си част в интерфаза, A549 клетките показват нормални радиални масиви от микротубули [Фиг. 45, панел А, контрола]. Ф-актиновите нишки са разпределени предимно в краищата на клетката. Клетките, намиращи се в митотична фаза (-25% от общия брой клетки във фаза G2/M), показват отличителни белези на митотичен процес, а именно – конгресия на хромозомите в метафазална плоча, както и коректно формиране на делителното вретено [Фиг. 45, панел Б, контрола].

След третиране на клетките A549 със съединение **7.1a**, в концентрации равни на определената стойност за IC_{50} , голяма част от тях показват митотични аномалии. Типичните дефекти включват: неуспех на редица хромозоми да се подравнят правилно върху метафазалната плоча и липса на две биполярни вретена с центромерите на отделни хромозоми, произволно прикрепени към някой от полюсите на вретеното [Фиг. 45, панел Б, **7.1a**].

Интерфазните клетки в третираните с **7.1a** култури не показват нормални радиални масиви както при контролните такива. Налице е частична киротубулна дезорганизация [Фиг. 45, панел А, квадрати], както и формирането на stress fibers на клетките (стрелка). При третираните с **SJ-172550** клетки се забелязват остатъци от мрежа от микротубули, но тя е видимо дезорганизирана в сравнение с контролните клетки.

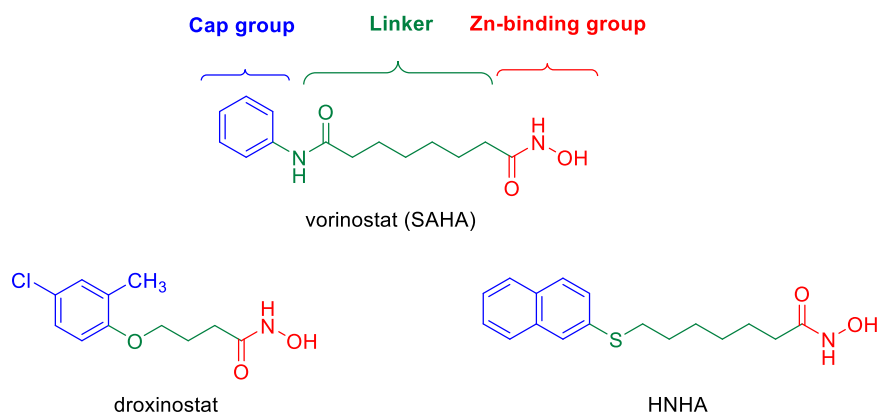
Като обобщение на посочените резултати може да кажем, че приложени в IC₅₀ концентрации, съединение **7.1a** и **SJ-172550** задействат мултиполярност на вретеното и/или апоптоза. Налице са още сегментирани ядра и апоптотични клетки.

3.3. СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ НА ХИДРОКСАМОВИ КИСЕЛИНИ

3.3.1 Хидроксамовите киселини като хистондеацетилазни инхибитори

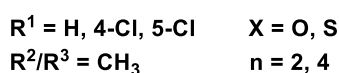
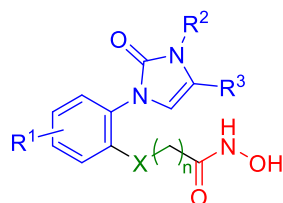
Добре описани в литературата, хидроксамовите киселини са представители на нов обещаващ клас противотуморни лекарства, спадащи към групата на хистондеацетилазните (HDACs) инхибитори.

Детайлните проучвания по отношение на техния механизъм на действие дават възможност за определяне на фармакофорните фрагменти в молекулите на потенциалните HDACs инхибитори от тази група. Основните структурни характеристики са три, а именно: хидрофобна част, въглеродороден линкер и бидентатен хелатор [Фигура 46] (Villar-Garea and Esteller, 2004). Хидрофобния фрагмент, наречен още CAP група (capping group), представлява важна част от молекулата, за която се смята, че взаимодейства със специфични фактори по ръба на хистондеацетилазния ензимен джоб. В другия край на молекулата се намира бидентатен хелатор, в случая хидроксамова група, чиято функция е свързване с цинковия йон в дъното на ензимния джоб. Последна, но не и по важност е свързващата част между тези два фрагмента, наречена линкер, като оптималната му дължина е между 3 и 7 въглеродни или хетеро атома (Yuan et al., 2017).



Фигура 46. Фармакофорни фрагменти в молекулата на хистондеацетилазните инхибитори от групата на хидроксамовите киселини

Придържайки се стриктно към тези условия, синтезирахме нов клас хидроксамови киселини като аналози на vorinostat (SAHA) и неговия сяра аналог HNHA. На *Фигура 47* е представена общата формула на целевите съединения, съдържащи горепосочените фармакофорни фрагменти.



Фигура 47. Обща хормула на целевите хидроксамови киселини

Като удобен синтетичен подход за нашите цели намерихме използването на смесено анхидридният метод (Gerova, Petrov, 2014), а като изходни съединения бяха използвани дълговерижните карбоксилни киселини от серия **5** [*Схема 57*].

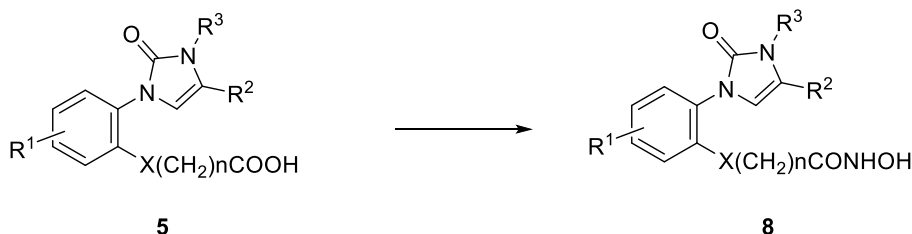


Схема 57. Синтез на хидроксамови киселини **8** от карбоксилни киселини **5** (*метод А*)

Получаването на смесен анхидрид от карбоксилни киселини **5** (1 еквивалент) и етил хлорформиат (1.3 екв.) бе проведено в среда от тетраhydroфуран и присъствие на триетиламин (1.4 екв.). Последващото превръщане в хидроксамова киселина осъществихме с пряно приготвен алкохол разтвор на хидроксиламин хидрохлорид (1.7 екв.) и база калиев хидроксид (*метод А*) [*Схема 58*] (Stanisheva et al., 2021).

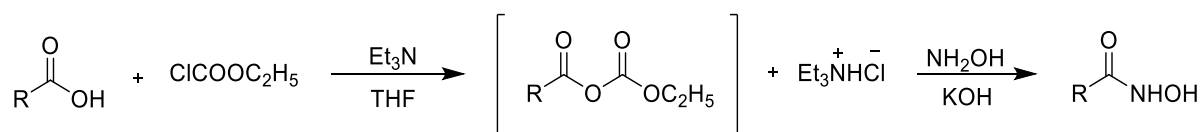


Схема 58. Получаване на смесен анхидрид и превръщането му в хидроксамова киселина

Таблица 11. Експериментален добив на хидроксамови киселини **8** (метод А)

Съединение	R ¹	R ²	R ³	X	n	Добив* (%)
8.1a	H	CH ₃	CH ₃	O	3	20*
8.2a	H	CH ₃	CH ₃	O	5	53*
8.1b	5-Cl	CH ₃	CH ₃	O	3	21*
8.2b	5-Cl	CH ₃	CH ₃	O	5	22*
8.1в	4-Cl	CH ₃	CH ₃	O	3	25*
8.2в	4-Cl	CH ₃	CH ₃	O	5	21*
8.1г	H	CH ₃	CH ₃	S	3	36*
8.2г	H	CH ₃	CH ₃	S	5	27*

*добив след пречистване (прекрystalизация/колонна хроматография)

Сравнявайки ЯМР спектрите, лесно може да бъде потвърдено превръщането на карбоксилните киселини **5** в съответстващите им хидроксамови аналози **8**. При разглеждането на ¹H ЯМР спектрите на първите характерния синглет за протона от COOH групата може да бъде наблюдаван при 11.99-12.13 м.ч., докато при хидроксамовите киселини същият сигнал се измества при 8.66-8.72 м.ч. Същата закономерност се наблюдава и в ¹³C ЯМР спектрите, където сигнала за въглеродния атом от същата група може да се забележи при 173.9-174.4 ppm за карбоксилните и 168.5-170.0 м.ч. при хидроксамовите киселини. В допълнение на това в протонните спектрите на съединения **8** се наблюдава синглет при 10.32-10.41 м.ч., отговарящ на протона от NH групата и категорично доказва получаването на желаните хидроксамови киселини.

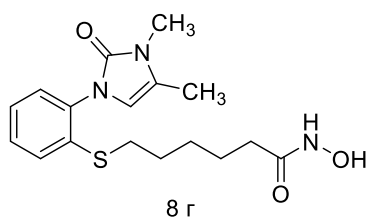
Новосинтезираните хидроксамови киселини бяха подложени на *in vitro* проучване за антипролиферативна активност спрямо човешки туморни клетъчни линии. Съединенията бяха тествани при концентрация от 0.1 до 200 μM, като за изследването бяха използвани две туморни клетъчни линии: HT-29 (карцином на дебелото черво) и MDA-MB-231 (карцином на млечната жлеза) [Таблица 12]. Като стандарт бе използван одобреният за клинична употреба антинеопластичен лекарствен продукт от семейството на хидроксамовите киселини - vorinostat (SAHA) [Фигура 4б].

Таблица 12. Цитотоксична активност на хидроксамови киселини от серия 8 по отношение на туморни клетъчни линии HT-29 и MDA-MB-231

Съединение	IC ₅₀ (µM)	
	HT-29	MDA-MB-231
8.1a	> 200	цитостатичен ефект (80%)
8.2a	56.7 ± 3.1	65 ± 4.7
8.1б	> 200	> 200
8.2б	128.5 ± 26.9	85.6 ± 9.5
8.1в	> 200	143.0 ± 19.5
8.2в	106.5 ± 17.0	42.3 ± 17.
8.1г	49.0 ± 3.7	9.7 ± 2.8
8.2г	43.7 ± 8.6	17.3 ± 2.5
<i>vorinostat (SAHA)</i>	7.5 ± 0.7	2.6 ± 0.4

Резултатите от проведения първоначален скрининг ни дават някои важни насоки за бъдещата ни работа. От изложените данните в Таблица 12, ясно проличава по-високата чувствителност на туморна клетъчна линия MDA-MB-231 към тестваните съединения, в сравнение с линия HT-29.

По отношение на връзката структура-активност може да заключим, че сярата съдържащите хидроксамови киселини **8.1г** и **8.2г** показват по-добри резултати в тестовете в сравнение с техните O-аналози. Като най-активна сред тестваните съединения се откроява хидроксамова киселина **8.1г** [Фигура 48], която потиска пролиферацията на клетъчните линии в ниски микромолярни концентрации, съответно със стойности на IC₅₀ 9.7 µM спрямо линия MDA-MB-231 и 49.0 µM за HT-29. Интересно е, че неговият кислород съдържащ аналог **8.1a** практически не проявява активност по отношение на линия HT-29, но за сметка на това притежава цитостатичен ефект (80%) към MB-231.



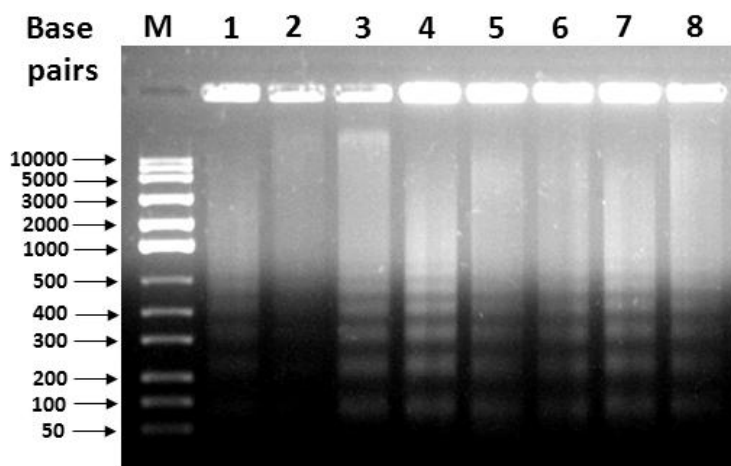
Фигура 48. Структура на лидерна хидроксамова киселина **8.2 г**

Използваната структурната аналогия с droxinostat [Фигура 46], а именно въвеждане на хлорен заместител в позиция 4 или 5 на бензеновото ядро не води до повишаване на цитотоксичната активност на съединенията в сравнение с техните незаместени аналози.

Открилата се като най-перспективна сред тестваните съединения, съра съдържащата хидроксамова киселина **8.1г**, бе подложена на допълнително изследване, оценяващо способност ѝ да предизвиква апоптоза в туморните клетки. За целта бе проведена електрофореза върху агарозен гел, която позволява да се проследи ДНК фрагментацията на туморните клетки HT-29 и MDA-MB-231, обработени с **8.1г** и референтното съединение SAHA в съответните IC₅₀ концентрации.

В основата си гелната електрофореза представлява прилагане на електрично поле върху смес от биомолекули, което ги кара да мигрират през гела. При тези електрофоретични техники, разделянето се базира на размера на молекулите – по-големите молекули се движат по трудно през гела, в резултат на което пробата се разделя на отделни ивици.

Както може да бъде видяно от Фигура 49, ДНК фрагментацията ясно нараства при двете клетъчни линии, претърпели обработка с **8.1г** в сравнение с контролните нетретирани клетки. Това потвърждава възможността апоптозата да е един от вероятните механизми за предизвикване на смърт у туморните клетки.



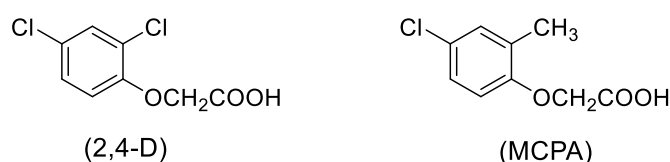
Фигура 49. Електрофореза в агарозен гел на интернуклеозомна ДНК фрагментация у туморни клетъчни линии HT-29 и MDA-MB-231 след 72 часа третиране с IC_{50} на **8.1g** или vorinostat (SAHA). **M** – 1 kb ДНК маркер за големина; HT-29 клетки третирани със съединение **8.1g** (**1**: 0 μ M, **3** и **4**: 49 μ M) и **7**: 7.5 μ M SAHA; MDA-MB-231 третирани със съединение **8.1g** (**2**: 0 μ M, **5** и **6**: 10 μ M), и **8**: 2.6 μ M SAHA

3.3.2. Хидроксамовите киселини като растежни регулатори при растения

Растителните хормони (фотохормони) са малки органични молекули, които присъстват в ниски концентрации в растителния организъм. Те не притежават хранителни качества, а действат като сигнални молекули, които насърчават растежа и развитието на растението (Asif et al., 2022).

Синтетични съединения със сходни на растителните хормони действия се назовават с терминът „растежни регулатори“ (George, 1963). Наподобявайки природните ауксини, редица синтетични аналози могат да бъдат намерени в търговски разтвори (Auxinone®- Varmac Phy. Ltd., Rooton®, Лактофол® и др.) използвани в градинарството за вкореняване на млади растения и резници, стимулиране на цъфтежа и предпазване на плодовете от опадване (Sauer et al., 2013). Приложени в по-високи дози обаче, ауксините са токсични за растенията и именно това тяхно свойство е ценно при търсенето на нови съединения с хербицидна активност (Grossmann, 2010).

Сред най-изявените синтетични хербициди от ауксиновото семейство са 2,4-дихлорофеноксицетната киселина (2,4-D) и нейният близък аналог 2-метил-4-хлорофеноксицетната киселина (MCPA) [Фигура 50].



Фигура 50. Структура на синтетични хербициди от ауксиновото семейство

Част от синтезираните от нас карбоксилни киселини от серия **5** съществено се доближават по структура именно до споменатите по-горе примери. Привлечени от това сходство решихме да проведем серия тестове за оценка на растеж-регулирущата им способност. Тестовата серия бе разширена с хидроксамовите им аналози **8**.

Ниските добиви при описания по-горе **Метод на работа А** [Схема 58] ни насочиха към смяна на синтетичния подход, като в този случай проведено директно превръщане на естери **4** в хидроксамови киселини [Схема 59]. Реакцията тече гладко при стайна температура и базични условия на средата (Hjeds, Honori, 1978).

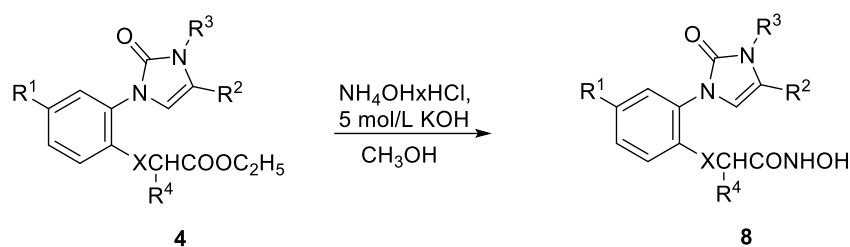


Схема 59. Синтез на хидроксамови киселини 8 от етилови естери 4 (метод Б)

Таблица 13. Експериментален добив на хидроксамови киселини 8 (метод Б)

Съединение	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	X	Добив* (%)
8.3a	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	O	44*
8б	4-Cl	CH ₃	CH ₃	H	O	45*
8.3б	4-Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	O	49*
8e	4-Cl	C ₆ H ₅	CH ₃	H	O	47*
8.3e	4-Cl	C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	O	58*

*добив след пречистване (прекристализация/колонна хроматография)

За провеждане на тестовете за определяне на растеж-регулиращата способност на съединенията беше използвана процедурата, описана от П. Йонова и Г. Стоилкова (2005), като бяха направени минимални промени в процеса на работа.

Тестовите разтвори бяха приготвени в две концентрации ($1 \cdot 10^{-3}$ и $1 \cdot 10^{-5}$ mol/L), а за стандарт ни послужи търговски продукт 2,4-дихлорофеноксидна киселина (2,4-D). За да бъде оценена селективността на тестваните съединения, изследването бе проведено успоредно върху едноседелна култура пшеница сорт Садово-1 (*Triticum aestivum* L. cv. Sadovo-1) и двуседелна култура краставица сорт Гергана (*Cucumis sativus* L. cv. Gergana).

След изтичане на тестовия период от 5 дни, дължината на главния корен у всяко едно покълнало семе бе измерена и превърната в проценти, прилагайки следната формула:

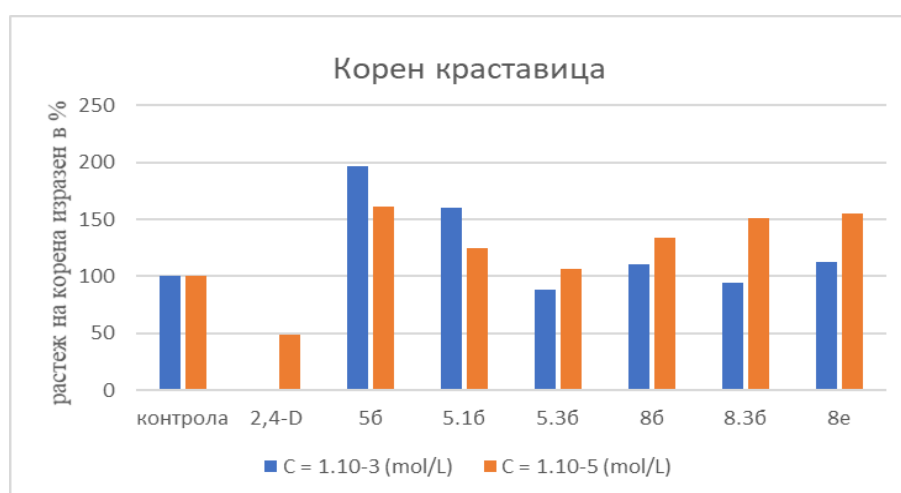
$$\frac{\text{корен тестово съединение (см)} \times 100}{\text{корен контролна проба (см)}} = \text{активност на тестваното съединение (\%)}$$

Интерпретацията на получените резултати е както следва: при стойности в интервала 0 до 30% то тестовото съединение притежава хербицидна активност. Ако стойността се намира между 31 и 99% се наблюдава инхибиращ ефект, а над 100% съединението демонстрира стимулиращ ефект.

Резултатите от проведените тестове са обобщени в Таблицы 14-15, както и онагледени с прилежащите към тях Фигури 52-53.

Таблица 14. Ефект на тестовите съединения (изразен в см и %), приложени в две концентрации, върху растежа на корен на краставица сорт Гергана

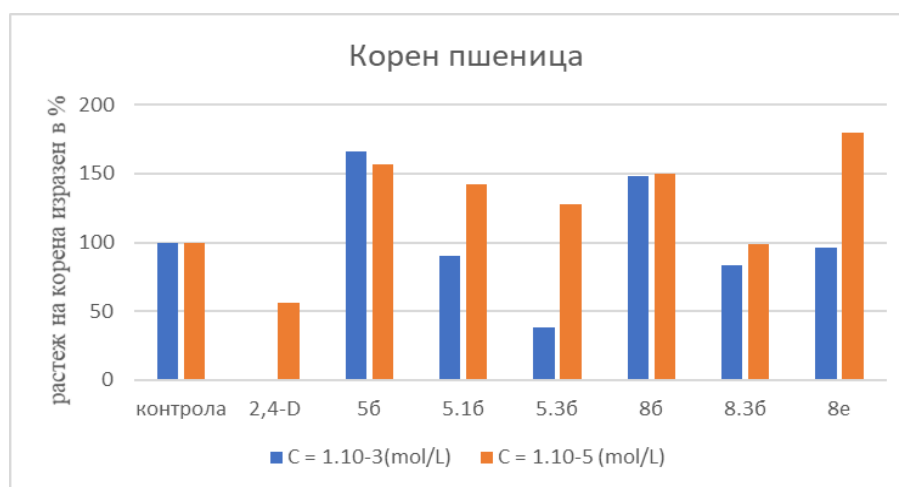
Съединение	Концентрация 1.10^{-3} (mol/L)		Концентрация 1.10^{-5} (mol/L)	
	см	%	см	%
контрола	0.96 ± 0.23	100	0.96 ± 0.23	100
2,4-D	0	0	0.47 ± 0.13	49
5б	1.89 ± 0.04	197	1.55 ± 0.55	161
5.1б	1.54 ± 0.49	160	1.20 ± 0.33	125
5.3б	0.84 ± 0.17	88	1.03 ± 0.43	107
8б	1.07 ± 0.34	111	1.29 ± 0.21	134
8.3б	0.90 ± 0.08	94	1.45 ± 0.45	151
8е	1.08 ± 0.18	113	1.49 ± 0.62	155



Фигура 52. Растеж на корен на двуседелна култура - краставица, след третиране с тестовите съединения

Таблица 15. Ефект на тестовите съединения (изразен в см и %), приложени в две концентрации, върху растежа на корен на пшеница сорт Садово-1

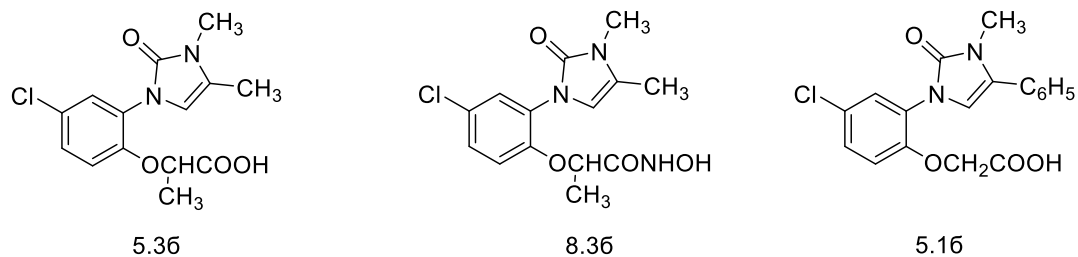
Съединение	Концентрация 1.10^{-3} (mol/L)		Концентрация 1.10^{-5} (mol/L)	
	см	%	см	%
контрола	1.20 ± 0.72	100	1.20 ± 0.72	100
2,4-D	0	0	0.67 ± 0.36	56
5б	2.00 ± 0.27	166	1.88 ± 0.47	157
5.1б	1.08 ± 0.71	90	1.70 ± 0.61	142
5.3б	0.45 ± 0.01	38	1.53 ± 0.22	128
8б	1.77 ± 0.45	148	1.80 ± 0.07	150
8.3б	1.00 ± 0.42	83	1.19 ± 0.38	99
8е	1.15 ± 0.66	96	2.16 ± 0.41	180



Фигура 53. Растеж на корен на едногоделна култура - пшеница, след третиране с тестовите съединения

Въз основа на представените по-горе резултати може да обобщим, че прилагането на тестовите съединения в концентрация 1.10^{-3} mol/L води до проявяването на слабо инхибиращ до стимулиращ ефект. Най-добър инхибиращ резултат по отношение на корените на краставица и пшеница се наблюдава при карбоксилна киселина **5.3б** и нейният хидроксамов аналог **8.3б**. Слабо инхибиране на кореновия растеж у пшеница се наблюдава още при карбоксилна киселина **5.1б** [Фигура 54].

Тестваните съединения не показват селективност по отношение на изследваните едно- и двуседелните култури.



Фигура 54. Структура на тестови съединения с инхибираща растежа активност

Както бе споменато по-горе, приложени в ниски концентрации ауксините и техните синтетични аналози стимулират образуването на корени, формирането на ксилем и флоем и др. Това бе потвърдено и от нашият експеримент, като приложени в концентрация $1 \cdot 10^{-5}$ mol/L всички тествани съединения проявиха силно стимулиращ ефект по отношение на корените на пшеница и краставица.

4. Изводи

В резултат от проведените изследвания в областта на дизайна и синтеза на нови хетероциклени системи с потенциална биологична активност, бяха получени следните резултати:

1. В резултат от приложената синтетична схема, за първи път бяха синтезирани нов клас 1,5-бензоксазепинови производни с анелиран имидазолонов цикъл.
2. Изследвано бе влиянието на реакционната среда и температурата при която се провежда вътрешномолекулното ацилиране. Най-добри резултати бяха постигнати при нагряване при 120 °C в среда от полифосфорна киселина и при кипене в среда 1,2-дихлороетан и присъствие на $(CF_3CO)_2O$, $BF_3(C_2H_5)_2O$.
3. Новосинтезираната трициклена пръстенна система бе допълнително модифициране, чрез въвеждане на заместител в позиция 5, като бяха получени серия бензилиденови производни. Проведени бяха теоретични и експериментални изследвания за определяне на конфигурацията на екзоцикличната двойна връзка. Получените резултати от DFT изчисленията и проведения 1H - 1H NOESY експеримент установиха, приложената от нас синтетична схема води до получаването на съединение **7.1a** в неговия *Z*-конфигурационен изомер.
4. Част от новосинтезираните бензилиденови производни бяха подложени на *in vitro* проучване за оценка на тяхната антипролиферативна активност. Установено е, че най-активният представител в групата тествани съединения е 2,3-Диметил-5-[(*Z*)-4-метоксибензилиден]-бензо[*b*]имидазо[1,5*d*][1,4]оксазепин-1,4(2*H*,5*H*)-дион (**7.1a**), като определената стойност на IC_{50} по отношение на туморна клетъчна линия A549 (аденокарциномни алвеоларни епителни клетки) е 8 μ M. Последващите изследвания върху лидерното съединения сочат, че **7.1a** блокира клетъчният цикъл в G2/M-фаза, а Western blot анализът установява

активирането на каспаза 3 в A549 клетки, което е индикация за наличие на рецепторно-индуциран път на апоптоза.

5. Продуктите от пръстенната трансформация бяха използвани за синтеза на серия нови хидроксамови киселини с потенциална хистондеацетилазна инхибиторна активност, съдържащи 2-имидазоллилфенил(окси/тио)алканоев фрагмент.
6. Новосинтезираните хидроксамови киселини бяха подложени на *in vitro* проучване за антипролиферативна активност спрямо човешки туморни клетъчни линии: HT-29 (карцином на дебелото черво) и MDA-MB-231 (карцином на млечната жлеза). Най-добри резултати бяха получени при работата с хидроксамова киселина **8.1г** със стойности на IC₅₀ 9.7 μM спрямо линия MDA-MB-231 и 49.0 μM за HT-29. След проведена електрофореза в агарозен гел на интернуклеозомна ДНК фрагментация у туморни клетъчни линии HT-29 и MDA-MB-231, се потвърди възможността апоптозата да е най-вероятния механизъм за предизвикване на смърт у туморните клетки.
7. Поради структурното сходство на част от новосинтезираните хидроксамови киселини с хербицида 2,4-дихлорофеноксиоцетната киселина (2,4-D) бяха проведени скринингови тестове за оценка на тяхната растеж-регулираща активност. В резултат бе установено, че прилагането на тестовите съединения в концентрация 1.10⁻³ mol/L води до слабо инхибиращ до стимулиращ ефект, а при концентрация 1.10⁻⁵ mol/L до силно стимулиращ ефект по отношение на корените на пшеница и краставица.
8. За охарактеризирането на новосинтезираните съединения са използвани ИЧ- и ЯМР-спектроскопия, елементарен анализа, както е определената и съответната температура на топене.

5. Приноси на дисертационния труд

- ❖ Разработен бе нов подход за получаване на 1,5-бензоксазепини с анелиран имидазолонов пръстен, който използва лесно достъпни изходни съединения. Методът се състои от пет стъпки – N-алкилиране на изходните бензокса(тия)золони, пръстенна трансформация под действието на първични амини, O/S-алкилиране на продуктите от пръстенната трансформация с получаване на етилови естери на карбоксилни киселини, хидролиза и вътрешномолекулно ацилиране.
- ❖ Получени са бензилиденови производни на новосинтезираната трициклена пръстенна система. Антипролиферативната активност на лидерното съединение от серията е изследвана спрямо туморна клетъчна линия A549 (човешки аденокарциномни алвеоларни епителни клетки), посредством серия от анализи.
- ❖ Получена е серия, неописани в литературата до сега, хидроксамови киселини. Обещаващи резултати са получени в резултат от проведеното *in vitro* проучване за определяне на антипролиферативна им активност спрямо човешки туморни клетъчни линии: HT-29 (карцином на дебелото черво) и MDA-MB-231 (карцином на млечната жлеза).
- ❖ Получена е серия нови хидроксамови киселини с потенциална растеж-регулираща активност. Проведени са първоначални изследвания за оценка на тяхната активност.

6. Използвана литература

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell* (6th ed.). New York: Garland Science.
2. Asif, R., Yasmin, R., Mustafa, M., Ambreen, A., Mazhar, M., Rehman, A., Umbreen, Sh., Ahmad, M. (2022) "Phytohormones as Plant Growth Regulators and Safe Protectors against Biotic and Abiotic Stress". Hano, Ch. (ed.). *Plant Hormones - Recent Advances, New Perspectives and Applications*. IntechOpen. Available at: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.102832>.
3. Chhabra, N., Aseri, M. L., Padmanabhan, D., *Int. J. Appl. Basic Med. Res.*, **3**, 16-18 (2013).
4. Erol, D.D, Calis, U., Yulug, N., *Drug Res.*, **46**, 205 (1996).
5. George, E. F. 1963. Plant propagation by tissue culture , 3rd ed. Berlin: Springer, 115–173.
6. Gerova, M.S., Petrov, O.I., *Org. Prep. Proced. Int.*, 46, 76 (2014).
7. Grossmann, K., *Pest Manag. Sci.*, 66, 113 (2010).
8. Hjeds, H., Honori, T., *Acta Chem Scand. B.*, 13, 376 (1978).
9. Kalcheva, V., Simov, D., Boicheva, Ch., *Commun. Dept. Chem. Acad. Bulg. Sci.*, **10**, 518 (1977).
10. Kalcheva, V., Boicheva, Ch., Simov, D., *J. prakt. Chem.*, **321**, 226 (1979).
11. Kalcheva, V., Antonova, A., Simov, D., Mincheva, N., *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, **39**, 59 (1986).
12. Kalcheva, V., Peshakova, L., *J. Prakt. Chem.*, **331**, 167 (1989).
13. Kapinas, K., Grandy, R., Ghule, P., Medina, R., Becker, K., Pardee, A., Zaidi, S. K., Lian, J., Stein, J., van Wijnen, A., & Stein, G., *Journal of Cellular Physiology*, **228**, 9 (2013).
14. Karni-Schmidt, O., Lokshin, M., Prives, C., *Annu. Rev. Pathol.*, **11**, 617 (2016).
15. Ligasova, A., Frydrych, I., Koberna, K., *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 3674 (2023).
16. Milcent, R., Akhnazarian, A., Lensen, N., *J. Het. Chem.*, **33**, 1829 (1996).
17. Mosmann, T., *J. Immunol. Methods*, **65**, 55 (1983).

18. Nathwani, S., Butler, S., Fayne, D., McGovern, N., Sarkadi, B., Meegan, M., Lloyd, D., Campiani, G., Lawler, M., Williams, D., Zisterer, D., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **66**, 585 (2010).
19. Petrov, O. I., Ivanova, Y. B., Gerova, M. S., Petrova, K. V., *Molbank*, **26**, M552, (2007).
20. Pishas, K.I., Al-Ejeh, F., Zinonos, I., Kumar, R., Evdokiu, A., Brown, M.P., Callen, D.F., Neilsen, P.M., *Clin. Cancer. Res.*, **17**, 494 (2011).
21. Poupaert, J., Carato, P., Colacino, E., *Curr. Med. Chem.*, **12**, 877 (2005).
22. Reed, D., Shen, Y., Shelat, A.A., Arnold, L.A., Ferreira, A.M., Zhu, F., Mills, N., Smithson, D.C., Regni, C.A., Bashford, D., Cicero, S.A., Schulman, B.A., Jochemsen, A.G., Guy, R.K., Dyer, M.A., *J. Biol. Chem.*, **285**, 10786 (2010).
23. Ryabukhin, S.V., Plaskon, A.S., Volochnyuk, D. M., Pipko, S.E., Shivanyuk, A.N., Tolmachev, A.A., *J. Comb. Chem.*, **9**, 1073 (2007).
24. Sangshetti, J., Ahmad, A., Khan, F., Zaheer, Z., *Mini-Rev. Org. Chem.*, **12**, 345 (2015).
25. Sauer, M., Robert, S., Kleine-Vehn, J., *J. Exp. Bot.*, **64**, 2565 (2013).
26. Shadfai, M., Lopez-Pajares, V., Yuan, Z., *Transl. Cancer Res.*, **1**, 88 (2012).
27. Stanisheva, D., Gerova, M., Petrov, O., *Heterocycl. Commun.*, **23**, 23 (2017).
28. Stanisheva, D., Atanasov, G., Aposstolova, M., Petrov, O., *Curr. Bioact. Comp.*, **17**, 59 (2021).
29. Tron, G.C., Pirali, T., Sorba, G., Pagliai, F., Busacca, S., Genazzani, A.A., *J. Med. Chem.*, **49**, 3033 (2006).
30. Villar-Garea, A., Esteller, M., *Int. J. Cancer*, **112**, 171 (2004).
31. Yonova, P. A., Stoilkova, G. M., *J. Plant Growth Regul.*, **23**, 280 (2005).
32. Yuan, Z., Sun, Q., Li, D., Miao, S., Chen, S., Song, L., Gao, C., Chen, Y., Tan, C., Jiang, Y., *Eur. J. Med. Chem.*, **134**, 281 (2017).
33. Zhang, L., Zhang, J., Hu, Ch., Cao, J., Zhou, X., Hu, Y., He, Q., Yang, B., *Anti-Cancer Drugs*, **20**, 416 (2009)

7. Списък с научни публикации

7.1. Научни публикации по темата на дисертацията

1. Stanisheva, D., Gerova, M., Petrov, O., Synthesis of a new polycyclic heterocyclic ring system. Part III. Benzo[b]imidazo[1,5-d][1,4] oxasepine-1,4 (2H,5H)-diones. *Heterocyclic Communications* **23**, 23 (2017). (IF = 1.3; Забелязани 6 цитата; точки* = 20)
2. Stanisheva, D., Atanasov, G., Apostolova, M., Petrov, O., Design, synthesis and biological activity of new hydroxamic acids containing 2-imidazolylphenyl(oxy/thio)alkanoic fragment. *Current Bioactive Compounds*, **16**, 59 (2021). (SJR = 0.207; Забелязани 1 цитата; точки* = 15)

Общо: 7 забелязани цитата (по SCOPUS, без автоцитатите)

Общо точки съгласно Минималните национални изисквания*: 35 точки

Минимални национални изисквания по група показатели Г*: 30 точки

*Съгласно Таблицы 1 и 2 от Област 7. Здравеопазване и спорт в Приложение към чл. 1а, ал. 1, от Правилника за прилагане на ЗРАСБ.

7.2. Научни публикации извън темата на дисертацията

3. Gerova, M., Aleksandrova, Ivanova, Y., Stanisheva, D., Momekov, G., Petrov, O., Synthesis and cytotoxic activity of new heterocyclic analogues of resveratrol, containing benzoxazolone ring. *Bulgarian Chemical Communications*, **49B**, 71 (2017)

8. Списък с изяви на научни форуми и семинари

1. Д. Станишева*, М. Герова, О. Петров, Синтез и цитотоксичност на нови 1,5-оксазепини с анелиран имидазолонов цикъл, XIV Национална конференция по химия за студенти и докторанти, България/ София 2015
2. Десислава Станишева*, М. Герова, О. Петров, Синтез и цитотоксичност на нови 1,5-бензоксазепини с анелиран имидазолонов цикъл, Научен семинар – Катедра Фармацевтична и приложна органична химия към СУ “Св. Климен Охридски”, България 2015
3. D. Stanisheva*, M. Gerova, O. Petrov, New class of heterocyclic ring systems: synthesis of benzo[*b*]imidazo[1,5-*d*][1,4]oxazepines, Ninth National Conference on Chemistry "Science and Technology for Better Life", България/София 2016
4. D. Stanisheva*, M. Gerova, B. Shivachev, O. Petrov, Synthesis and crystal structure of benzo[*b*]imidazo[1,5-*d*][1,4]-oxazepines, Sixth National Crystallographic Symposium with International Participation, България/София 2016
5. Десислава Станишева*, М. Герова, О. Петров, Synthesis of new class heterocyclic ring systems: benzo[*b*]imidazo[1,5-*d*][1,4]-oxazepines and their benzylidene derivatives, Научна сесия на Факултет по химия и фармация към СУ "Св. Кл. Охридски" – в рамките на Климентови дни, София 2017
6. Десислава Станишева*, М. Герова, О. Петров, Синтез и биологична оценка на нов клас хидроксамови киселини като потенциални хистондеацетилазни инхибитори, Научен семинар – Катедра Фармацевтична и приложна органична химия към СУ “Св. Климен Охридски”, България, София 2017
7. Desislava Stanisheva*, Mariana Gerova, Ognyan Petrov, Synthesis and biological evaluation of new class hydroxamic acids as potential histone

deacetylase inhibitors, 54th Internacional conference on medicinal chemistry RICT, Strasbourg, France 2018

8. Десислава Станишева*, Огнян Петров, Синтез на нов клас феноксикарбоксилни и хидроксамови киселини с потенциална растеж-регулируща активност, XXI Национална конференция по химия за студенти и докторанти, София 2023

9. Участие в научни проекти по темата на дисертацията

1. „Синтез на нов клас хетероциклени хидроксамови киселини като потенциални инхибитори на хистови деацетилази“, СУ договор №27/ 2013, участник
2. „Синтез и охарактеризиране на нов клас 1,5-бензоксазепинови производни с потенциална биологична активност“, СУ договор № 116/ 2016, участник
3. „Синтез на нов клас хидроксамови и карбоксилни киселини с потенциална растеж-регулираща активност“, МОН, Национална програма „Млади учени и постдокторанти 2“, 2023, ръководител