

Gdański Uniwersytet Medyczny

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej



Mgr inż. Martyna Korcz

Praca doktorska

*Synteza i badania biologiczne in vitro nowych pochodnych
chinoliny o potencjalnym działaniu chemioterapeutycznym*

Promotor: prof. dr hab. Franciszek Sączewski

Pracę wykonano w: Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Srodków Leczniczych

Kierownik jednostki: prof. dr hab. Franciszek Sączewski

Gdańsk, rok 2017

STRESZCZENIE

Na przestrzeni minionych lat rozwój diagnostyki medycznej, a także wdrażanie leków innowacyjnych znacznie poprawiły skuteczność terapii nowotworów ludzkich. Tym niemniej, współczesna medycyna wciąż wymaga nowych, bardziej zaawansowanych i efektywnych metod terapeutycznych, gdyż zgodnie z prognozami, zachorowalność na nowotwory ma tendencję rosnącą. Z drugiej strony, z roku na rok obserwujemy malejącą liczbę rejestracji nowych leków innowacyjnych. Wobec faktu, iż przemysł farmaceutyczny coraz częściej sięga po wyniki badań ośrodków akademickich, istotnym staje się syntezowanie małych bibliotek związków o potencjalnym działaniu biologicznym, a zarazem odznaczających się pożądanymi właściwościami farmakokinetycznymi.

Głównym celem niniejszej pracy była synteza biblioteki nowych pochodnych chinoliny oraz ocena ich wpływu na wzrost komórek nowotworów ludzkich. W dalszej perspektywie przewidziane jest także przeprowadzenie badań pod kątem działania przeciwbakteryjnego i przeciwgrzybowego.

Substratem dla prowadzonych syntez był 2-chlorochinolino-3-karbalddehyd (**I**), który posłużył do otrzymania półproduktów podstawionych w pozycji 2 chinoliny ugrupowaniem pierścieniem 1,2,4-triazolu (**III**) lub benzotriazolu (**IV**), a więc związków o zróżnicowanej lipofilowości. Następnie, wykorzystując obecność grupy aldehydowej w pozycji 3, otrzymano dwie serie połączeń chinoliny (1,2,4-triazolową - **Seria B** i benzotriazolową - **Seria C**) o strukturze odpowiednich hydrazonów (**3** i **4**), N'-acylohydrazonów (**5** i **6**), N'-arylosylfonohydrazonów (**7** i **8**), semikarbazonów (**9** i **10**) oraz oksyów (**11** i **12**).

Z kolei utlenianie grupy aldehydowej w związkach **III** i **IV** przy użyciu NaClO₂ w obecności H₂O₂ umożliwiło uzyskanie odpowiednich pochodnych kwasu chinolino-3-karboksyłowego (**13** i **14**), które w kolejnych etapach prac eksperymentalnych przeprowadzono w ester metylowy kwasu 2-okso-1,2-dihydrochinolino-3-karboksyłowego (**15**) oraz odpowiedni hydrazyd (**16**) i hydrazony (**17**).

Niepowodzeniem zakończyły się natomiast próby otrzymania pochodnych chinoliny zawierających a położeniu 2 ugrupowanie *O*-sulfonylohydroksylaminy (związków **Serii A**) na drodze reakcji 2-chlorochinolino-3-karbalddehydu (**I**) z kwasem hydroksylamino-*O*-sulfonowym (HOSA), która prowadziła do wytworzenia 2-chloro-3-cyjanochinoliny.

Otrzymano natomiast pochodne zawierające w pozycji 2 pierścienia chinoliny ugrupowanie *N,O*-dipodstawionej hydroksyloaminy (**2a-d**), przy wykorzystaniu izoksazolo[3,4-*b*]chinolin-3(*1H*)-onów, oznaczonych w pracy symbolem **E**, które reagują z chlorkami alkilowymi w obecności stałego NaOH z otwarciem pierścienia izoksazolonu. Produkty **2a-d**, obok *N,O*-dipodstawionej hydroksyloaminy, zawierają ugrupowanie estrowe w pozycji 3 chinoliny. Mechanizm reakcji otwarcia pierścienia izoksazolonu zbadano w oparciu o obliczenia kwantowo-chemiczne

z użyciem programu Spartan v. 8.0. Reakcja, która polega na ataku nukleofilowym jonu hydroksylowego na atom węgla grupy karbonylowej, jest egzotermiczna i przebiega spontanicznie, bez tworzenia stanu przejściowego o strukturze tetraedycznej.

W sumie otrzymano 70 nie opisanych wcześniej w literaturze chemicznej pochodnych chinoliny, których struktury potwierdzono analizą elementarną CHN, metodami spektroskopowymi: IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR i MS, a także - w uzasadnionych przypadkach - badaniami rentgenograficznymi.

Przed podjęciem badań biologicznych *in vitro*, przeprowadzono analizę trwałości chemicznej produktów w środowisku wodnym z wykorzystaniem spektroskopii UV-Vis. Związki trwałe chemicznie, o najkorzystniejszych właściwościach fizykochemicznych, poddano następnie badaniom biologicznym w celu określenia ich wpływu na wzrost komórek nowotworów ludzkich. Badania te przeprowadzono w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej i Medycznej Uniwersytetu w Greifswaldzie, Niemcy, w ramach międzynarodowego programu Erasmus. W zamirzeniach, związki hamujące wzrost komórek nowotworowych stanowić miały punkt wyjścia dla poszukiwań nowej klasy potencjalnych leków przeciwnowotworowych, natomiast związki nieaktywne utworzą bibliotekę pochodnych chinoliny, pozbawionych działania cytotoksycznego, które można będzie wykorzystać do badań biologicznych pod kątem działania na inne cele biologiczne.

Spośród 70. otrzymanych pochodnych chinoliny do wstępnych badań biologicznych (ang. *primary screening*) z użyciem linii komórkowych raka trzustki DAN-G, raka płuca LCLC-103H i raka szyjki macicy SISO, wyselekcjonowano 56 trwałych chemicznie związków. Stwierdzono, że związki o niskiej lipofilowości, zawierające ugrupowanie hydroksylaminy (związki typu **2**) lub 1,2,4-triazolu (związki **Serii B**) w pozycji 2 pierścienia chinoliny nie wykazują wpływu cytotoksycznego na badane komórki nowotworowe. Wysoką aktywność

wykazało natomiast 13 pochodnych chinoliny zawierających w pozycji 2 pierścień benzotriazolu (związki **Serii C**).

W rezultacie badań poszerzonych (ang. *secondary screening*), których celem było określenie wartości IC_{50} działania cytotoksycznego, do dalszych prac rozwojowych nad poszukiwaniem nowych leków przeciwnowotworowych wyselekcjonowano dwa związki: 2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)-3-[2-(pirydyn-2-yl)hydrazono]metylo-chinolinę (**4e**), która działa hamująco na wzrost trzech zróżnicowanych genotypowo i fenotypowo komórek nowotworowych (IC_{50} w zakresie 1.35 – 1.49 μM) i N^7 -{[2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)chinolin-3-yl]metyleno}-benzoilohydrazyd (**6a**), który działa selektywnie na komórki DAN-G i SISO (IC_{50} w zakresie 4.19 – 6.35 μM), a zarazem wykazuje znikomy wpływ na komórki LCLC-103H ($IC_{50} > 20 \mu\text{M}$).

ABSTRACT

Recently, human cancer therapy has been considerably improved due to the development of medical diagnostic techniques as well as implementation of innovative drugs. However, according to statistical prognosis, morbidity from cancer in developed countries is constantly increasing, and cancer rate rises with increasing level of country income.

While contemporary medicine continuously requires new effective therapeutic methods, it has been observed a decreasing number of authorized innovative drugs. Therefore, academic research on small libraries of chemical compounds representing new chemotypes may constitute a valuable source of biologically active lead structures with desired pharmacokinetic and pharmacodynamic properties.

The Thesis is devoted to the synthesis of a small library of novel quinoline derivatives and their *in vitro* biological tests aimed at discovering potential anticancer agents.

Thus, starting from 2-chloroquinoline-3-carbaldehyde (**I**), compounds bearing either 1,2,4-triazole (**Series B**) or benzotriazole ring (**Series C**) were synthesized. The aldehyde functionality was further transformed to furnish the corresponding hydrazones **3** and **4**, N⁷-acylhydrazones **5** and **6**, N;-arylsulfonylhydrazones **7** and **8**, (thio)semicarbazones **9** and **10** as well as oximes **11** and **12**.

On the other hand, oxidation of aldehydes to corresponding carboxylic acids **13** and **14** was achieved with use of NaClO₂ in the presence of H₂O₂. However, attempted esterification of the acids obtained was met with failure, as the reaction resulted in the formation of methyl 2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylate **15** which, in turn, was converted into the corresponding hydrazide **16** and hydrazones **17**.

Another reaction of **I** with hydroxylamine-*O*-sulfonic acid (HOSA) was supposed to provide an easy access to a series of polar and quinolones with hydroxylamine moiety at position 2 (**Series A**). Unfortunately, the only product isolated from this reaction was 2-chloroquinoline-3-carbonitrile which did not react with an excess of HOSA. Therefore, compounds of type **2** with O,N-disubstituted hydroxylamine group were prepared by a different method. It was found that the reaction of isoxazolo[3,4-*b*]quinolin-3(1*H*)-ones (**E**) with alkyl halides in the presence of solid NaOH resulted in the formation of 2,3-disubstituted quinoline derivatives **2** bearing O,N-disubstituted hydroxylamine group at position 2 and an ester group

at position 3. Mechanism of the isoxazolone ring opening, which consists in the nucleophilic attack of hydroxide ion at the carbon atom of carbonyl group, was investigated theoretically by means of quantum-chemical calculations using Spartan program v. 8.0.

As a result of chemical experiments, a library of 70 novel quinoline derivatives was obtained, and structures of all compounds were confirmed by CHN elemental analysis and IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and MS spectroscopic data. Moreover, several structures were characterized by single crystal X-ray diffraction studies.

Biological tests were accomplished in the Department of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, University of Greifswald, Germany, within the student exchange program Erasmus. Compounds that proved to be stable under physiological conditions, as determined by UV method, were tested *in vitro* for their cytotoxic properties against three human tumor cell lines: pancreas cancer DAN-G, lung cancer LCLC-103H and cervical adenocarcinoma SISO.

It was found that compounds with relatively low lipophilic character, i.e. compounds of type **2** with O,N-disubstituted hydroxylamine group and 1,2,4-triazole-containing quinolines of **Series B** were inactive, while the more lipophilic benzotriazole derivatives of **Series C** exhibited a moderate to high cytotoxic effects.

Based on the determined IC₅₀ values, two compounds were selected for further development as new potential anticancer agents: 2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)-3-[2-(pyridin-2-yl)hydrazonomethyl]-quinoline **4e** (IC₅₀ values in the range of 1,35-1,49 μM) and N'-{[2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)quinolin-3-yl]methylene}-benzoylhydrazide **6a** (IC₅₀ values for DAN-G and SISO cell lines in the range of 4,19-6,35 μM, and for LCLC-103H cell line >20 μM). On the other hand, the non-cytotoxic compounds will be available for further testing, e.g. in search for potential antibacterial and antifungal agents.