

**Gdański Uniwersytet Medyczny**

**Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej**



mgr inż. Joanna Fedorowicz

*Praca doktorska*

**SYNTEZA I ZASTOSOWANIA  
IZOKSAZOLO[3,4-*b*]PIRYDYN-3(1*H*)-ONÓW**

Promotor pracy: **dr hab. Jarosław Sączewski**

Praca wykonana w **Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej**

Gdańsk, 2018

## STRESZCZENIE

Chinolony należą do syntetycznych antybiotyków, których hybrydowe pochodne znajdują szerokie zastosowania w chemii medycznej obejmujące między innymi tworzenie nanocząstek i nanoleków oraz koniugatów o działaniu terapeutycznym. W ostatnim dziesięcioleciu ukazało się wiele doniesień literaturowych opisujących zastosowania i mechanizmy działania farmakologicznego pochodnych chinolonów, między innymi ich kompleksów z metalami, koniugatów z polimerami, białkami i peptydami, donorami i analogami NO, związkami anionowymi, sideroforami, fosfonianami, fototerapeutykami, związkami fluorescencyjnymi czy triazolami. Chinolony były również szeroko wykorzystywane do syntezy proleków o zwiększonej lipofilowości, leków hybrydowych, bis-chinolonów i w wielu innych modyfikacjach prowadzących do uzyskania wysoce użytecznych koniugatów zarówno z punktu widzenia interesujących modyfikacji chemicznych, jak i uzyskania nowych, dwufunkcyjnych hybrydowych środków terapeutycznych. Również pochodne izoksazol-5-onów stanowią niezwykle istotne ugrupowanie farmakoforowe występujące w wielu aktywnych biologicznie cząsteczkach.

W Katedrze i Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych GUMed odkryto w ostatnich latach fluorogeniczną tandemową reakcję Mannicha – elektrofilowego aminowania, w wyniku której profluorogeniczne pochodne izoksazolo[3,4-*b*]pirydyn-3(1*H*)-onu w obecności formaldehydu i aminy drugorzędowej prowadzą do powstania fluorescencyjnych produktów o budowie 2,2-dialkilo-1,2-dihydro-[1,2,4]triazolo[4,3-*a*]pirydyn-2-*io*-karboksylanów (barwników *Safirinium*).

Przedmiotem niniejszej pracy była synteza pochodnych i analiza reaktywności układu izoksazolo[3,4-*b*]pirydyn-3(1*H*)-onu w reakcjach alkilowania, acylowania, addycji aza-Michaela, czy tandemowych reakcjach Mannicha – elektrofilowego aminowania oraz ocena potencjalnego zastosowania uzyskanych produktów pod kątem ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej, jako barwniki fluorescencyjne w mikroskopii konfokalnej, jako odczynniki derywatyzujące w badaniach

oznaczania substancji niskocząsteczkowych posiadających ugrupowanie aminowe oraz jako znaczniki jonizacyjne i wzmacniacze sygnałów w proteomicznych analizach masowych.

W wyniku prowadzonych prac badawczych zsyntezowano serię hybrydowych pochodnych fluorochinolonów i *Safirinium*, wykazujących zdolność do fluorescencji, właściwości przeciwbakteryjne i przeciwbiofilmowe oraz odznaczających się brakiem cytotoksyczności. Ponadto zsyntezowano serię N1-podstawionych pochodnych 4,6-dimetyloizoksazolo[3,4-*b*]pirydyn-3(1*H*)-onu, które były analizowane pod kątem ich właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Zsyntezowano nowe pochodne izoksazolo[3,4-*b*]chinolin-3(1*H*)-onu różniące się podstawnikami w pierścieniu chinoliny oraz przeprowadzono szereg reakcji alkilowania i acylowania badanych układów. Dowiedziono, że związki o strukturze izoksazolo[3,4-*b*]chinolin-3(1*H*)-onów występują w roztworze i fazie stałej w formie tautomerów N9-*H*-oxo, a w wyniku kontrolowanych orbitalowo reakcji alkilowania dochodzi do wytworzeniem preferowanego termodynamicznie produktu podstawionego w pozycji N1 oraz niewielkich ilości produktu N9-alkilowego.

Badania reaktywności układu izoksazolo[3,4-*b*]pirydyn-3(1*H*)-onów w reakcjach z akceptorami Michaela doprowadziły do uzyskania produktów przejściowych typu Paala-Knorra w syntezie piroli metodą Trofimova. W reakcji z propiolanem etylu w środowisku zasadowym w temperaturze pokojowej uzyskano niedostępne uprzednio produkty pośrednie wychwycone nadmiarem  $\alpha$ -karbonylowego związku acetylenowego, które scharakteryzowano z zastosowaniem analizy rentgenograficznej monokryształów. Przeprowadzono obliczenia kwantowo-chemiczne przegrupowania [3,3]-sigmatropowego *N,O*-diwinylowych hydroksyloamin do odpowiednich imino-aldehydów (produktów przejściowych typu Paala-Knorra) oraz dowiedziono, że reakcja jest egzotermiczna i zachodzi przy udziale stanu przejściowego o konformacji krzeselkowej, a bariera aktywacji badanej transformacji wynosi w przybliżeniu 20 kcal/mol.

Przeprowadzono szereg tandemowych reakcji Mannicha – elektrofilowego aminowania z formaldehydem, dietyloaminą i pochodnymi izoksazolo[3,4-*b*]chinolin-3(1*H*)-onów. W wyniku przeprowadzonych syntez otrzymano serię fluorescencyjnych [1,2,4]triazolo[4,3-*a*]chinolin-2-*io*-4-karboksylanów. Zmierzono eksperymentalnie parametry optyczne otrzymanych barwników. Następnie właściwości fotofizyczne związków w postaci jonów obojnaczych oraz chlorowodoroków analizowano teoretycznie z wykorzystaniem metod obliczeniowych zależnej od czasu teorii funkcjonału gęstości (TD-DFT). Wykazano, że wydajności kwantowe fluorescencji w rozpuszczalnikach aprotycznych (DMF) były znacznie niższe niż w rozpuszczalnikach protycznych (woda). Obliczenia parametrów absorbcyjno-emisyjnych przeprowadzono uwzględniając przybliżenie nierównowagowe albo wariant stanowo-specyficzny z użyciem funkcjonałów konwencjonalnych (APFD, B3LYP i PBE0) oraz funkcjonałów z korekcją dalekiego zasięgu (CAM-B3LYP i  $\omega$ B97XD) dla modeli solwatacyjnych PCM i SMD. Wykazano, że klasycznie funkcjonały hybrydowe nie są w stanie precyzyjnie przewidywać widm absorpcji i emisji w przypadku stanów wzbudzonych z przeniesieniem ładunku z podstawnika do układu heteroaromatycznego, natomiast funkcjonały z korekcją dalekiego zasięgu dostarczają wyników spójnych z danymi wyznaczonymi eksperymentalnie, zwłaszcza z zastosowaniem modelu PCM w ujęciu stanowo-specyficznym.

Zsyntezowano szereg pochodnych *Safirinium P* i *Q* posiadających różne podstawniki alkilowe w pozycji 2 pierścienia triazoliniowego oraz ich reaktywne wobec odczynników nukleofilowych estry *N*-hydroksysukcynimidowe. Następnie wyznaczono lipofilowość zsyntezowanych związków. Uzyskane pochodne zostały użyte w badaniach barierowości skóry *ex vivo* do wizualizacji struktur naskórka w preparatach. Zoptymalizowany barwnik **26e** wykazywał wysoką rozpuszczalność w wodzie, trwałość optyczną, zdolność do wyrazistego wybarwienia kanionów otaczających skupiska korneocytów oraz umożliwiał wizualizację dystrybucji lipofilowych substancji testowych.

Uzyskane estry *N*-hydroksysukcynimidowe posłużyły do syntezy znakowanych fluorescencyjnie aminokwasów i amin biogennych. Analizowano aplikacyjność uzyskanych reaktywnych estrów jako odczynników derywatyzujących w analizie drobnocząsteczkowych substancji hydrofilowych wykorzystując micelarną elektrokinetyczną chromatografię i kapilarną elektroforezę strefową. Podczas optymalizacji warunków elektroforetycznych dowiedziono, że testowane substancje derywatyzujące wykazują wysoki potencjał wykorzystania w rutynowych analizach.

Zsyntezowano analogi *Safirinium* oraz pochodne znakowane izotopowo <sup>13</sup>C celem oceny ich aplikacyjności jako znaczników jonizacyjnych w analizach proteomicznych. Za pomocą pochodnych *Safirinium P* przekształconych do postaci aktywnych estrów *N*-hydroksysukcynimidowych wyznakowano testowe tripeptydy, celem wykazania użyteczności otrzymanych w proteomice. Przeprowadzone eksperymenty dowiodły, że układy triazoliniowe *Safirinium* mogą być wykorzystane jako znaczniki jonizacyjne do wzmacniania sygnałów oraz zwiększenia czułości detekcji w analizach sekwencjonowania peptydów prowadzonych z zastosowaniem metod LC-MS i LC-MS/MS. Pochodna **25a** odznaczała się wydajnym sprzężeniem z wolnymi grupami aminowymi *N*-końców peptydów oraz łańcuchów bocznych reszt lizyny hydrolizatów białkowych. Po inkubacji z lizatem ubikwitynowym otrzymano blisko 80% stopień pokrycia sekwencji peptydu. Sygnały zostały wzmocnione do 8 razy, co umożliwiała identyfikację produktów. Analizy potwierdziły potencjalne zastosowanie związku **25a** do znakowania jonizacyjnego, zwłaszcza dla peptydów bogatych w reszty lizyny.

Podsumowując zsyntezowano i scharakteryzowano 151 nowych, nieopisanych uprzednio w literaturze związków, w tym 16 hybrydowych pochodnych fluorochinolonów **3-6**, 1 *N*1-alkilową pochodną 4,6-dimetyloizoksazolo[3,4-*b*]pirydyn-3(1*H*)-onu **7**, 4 kwasy 2-chlorochinolino-3-karboksyłowe **9**, 10 kwasów (sulfoksyamino)chinolino-3-karboksyłowych **10**, 7 izoksazolo[3,4-*b*]chinolin-3(1*H*)-onów **2**, 18 pochodnych *N*1- i *N*9-alkilowych oraz *N*1-acylowych izoksazolo[3,4-*b*]chinolin-3(1*H*)-onów **11-14**, 12 produktów reakcji pochodnych izoksazolo[3,4-

b]pirydyn-3(1H)-onów z  $\alpha$ -karbonyłowymi związkami acetylenowymi **15-20**, 12 barwników o strukturze 2,2-dietylo-1,2-dihydro-[1,2,4]triazolo[4,3-*a*]chinolin-2-io-4-karboksylanu (*Safirinium Q*) **21**, 2 dimery *Safirinium Q* **22**, 4 pochodne *Safirinium P* i *Q* posiadające zróżnicowane ugrupowania 2,2-alkilowe w pierścieniu triazoliniowym **23-24** oraz ich 9 estrów *N*-hydroksysukcynimidowych **25-26**, 1 pochodną estrową *Safirinium Q* **27**, 45 amidowych i aminokwasowych pochodnych *Safirinium P* i *Q* **28-29**, 3 znakowane *Safirinium P* aminy biogenne **30**, 2 znakowane pochodnymi *Safirinium P* tripeptydy **31**, 2 hybrydy proliny z *Safirinium P* i *Q* **32**, 2 pochodne 1-hydroksymetylowe 4,6-dimetyloizoksazolo[3,4-*b*]pirydyn-3(1H)-onu i izoksazolo[3,4-*b*]chinolin-3(1H)-onu **33** oraz 1 znakowany izotopowo  $^{13}\text{C}$  analog *Safirinium Q* **34**.

Część uzyskanych wyników badań opublikowano w pracach:

- Sączewski J, Fedorowicz J, Kędzia A, Ziółkowska-Klinkosz M, Jalińska A (2016) *Medicinal Chemistry* 12:640
- Sączewski J, Fedorowicz J, Korcz M, Sączewski F, Wicher B, Gdaniec M, Konopacka A (2015) *Tetrahedron* 71:8975
- Sączewski J, Fedorowicz J, Gdaniec M, Wiśniewska P, Sieniawska E, Drażba Z, Rzewnicka J, Balewski Ł (2017) *The Journal of Organic Chemistry* 82:9737
- Fedorowicz J, Sączewski J, Drażba Z, Wiśniewska P, Gdaniec M, Wicher B, Suwiński G, Jalińska A (2018) *Dyes and Pigments*, <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.09.005>
- Fedorowicz J, Sączewski J (2018) *Monatshefte für Chemie* 149:1199

## ABSTRACT

Quinolones belong to a class of synthetic antibiotics. Their hybrid derivatives find broad applications in medicinal chemistry including, among others, nanoparticles and nanodrugs formulations or various conjugates with therapeutic activity. In the last decade a plethora of literature reports regarding applications and mechanisms of pharmacological action of quinolone derivatives have been described, *inter alia*, quinolone-metal complexes, conjugates with polymers, proteins and peptides, NO donors and analogs, anionic compounds, siderophores, phosphonates, phototherapeutics, fluorescent compounds or triazoles. Quinolones were broadly used in synthesis of prodrugs with enhanced lipophilicity, hybrid drugs, bis-quinolones and other modifications that led to the discovery of highly useful conjugates as a resource concerning both chemical modifications and novel hybrid bifunctional therapeutic agents.

In recent years at the Department of Chemical Technology of Drugs, fluorogenic tandem Mannich - electrophilic amination reaction have been discovered that led to the development of fluorescent products. Hence, profluorogenic isoxazolo[3,4-*b*]pyridin-3(1*H*)-one derivatives in the presence of formaldehyde and a secondary amine undergo transformation to fluorescent 2,2-dialkyl-1,2-dihydro-[1,2,4]triazolo[4,3-*a*]pyridin-2-ium-carboxylates, also known as *Safirinium* dyes.

The objective of the Thesis was synthesis of novel isoxazolo[3,4-*b*]pyridin-3(1*H*)-one derivatives and their reactivity studies in terms of alkylation, acylation, aza-Michael addition, and tandem Mannich - electrophilic amination reactions, as well as evaluation of potential applications of the obtained products as antimicrobial agents, fluorescent dyes in confocal microscopy, derivatization reagents for electrophoretic analysis of amine group containing low-molecular-weight substances, and ionization tags or signal enhancers in proteomic mass spectrometry analysis.

As a result of conducted research, a set of hybrid fluoroquinolone and *Safirinium* derivatives have been obtained. The conjugates exhibit fluorescent, antibacterial, and antibiofilm properties with no cytotoxic effect. Moreover, a series of N1-substituted 4,6-dimethylisoxazolo[3,4-*b*]pyridin-3(1*H*)-one derivatives have been synthesized and evaluated in terms of antimicrobial activity. Novel variously substituted profluorophoric isoxazolo[3,4-*b*]quinolin-3(1*H*)-one derivatives have been obtained. The products have been subjected to a number of alkylation and acylation reactions. It has been proved that that isoxazolo[3,4-*b*]quinolin-3(1*H*)-ones exist in the solid state and in polar solvents as 9*H*-oxo tautomers. The conducted experiments also proved that orbital-controlled alkylation reactions of the investigated system lead to the formation of thermodynamically preferred N1-substituted products and accompanied by only minor amounts of thermodynamically disfavored N9-alkyl isomers.

The Paal-Knorr intermediates in the Trofimov synthesis of pyrroles have been prepared as a result of reaction isoxazolo[3,4-*b*]pyridin-3(1*H*)-ones with Michael acceptors. The previously inaccessible intermediates, trapped by an excess of  $\alpha$ -carbonyl acetylenic compound, were obtained by reacting the corresponding isoxazolone with ethyl propiolate under basic conditions at ambient temperature. The structures of the products were proved by single crystal X-ray analysis. Quantum chemical calculations of a [3,3]-sigmatropic rearrangement of the *N,O*-divinyl hydroxylamines to the corresponding imino-aldehydes (Paal-Knorr intermediates) revealed that this reaction is exothermic and proceeds *via* chairlike transition state of energy barrier ca. 20 kcal/mol.

A series of tandem Mannich - electrophilic amination reactions of isoxazolo[3,4-*b*]quinolin-3(1*H*)-one derivatives with formaldehyde and diethylamine have been performed. Hence, a color-tunable fluorescent core skeleton of dihydro-[1,2,4]triazolo[4,3-*a*]pyridin-2-ium-carboxylate has been developed, which can accommodate various absorption and emission maxima by changing substituents within the quinolone ring. The optical parameters of obtained dyes were determined experimentally. Subsequently, the photophysical properties of the dyes in the forms



of zwitterions and hydrochlorides were fully rationalized by DFT/TD-DFT calculations. It was established that for the hydrochlorides the first allowed electron transition corresponds exclusively to the transfer of an electron from HOMO to LUMO ( $\pi$ - $\pi^*$  excitation). The calculations of absorption and emission parameters were carried out within the vertical non-equilibrium approximation or the state-specific approach using conventional (APFD, B3LYP, and PBE0) and long-range-corrected hybrid functionals (CAM-B3LYP and  $\omega$ B97XD) by means PCM and SMD solvation models. It has been proven that global hybrid functionals fail for absorption and emission predictions of charge-transfer excited states in which charge is moved from the substituent to the heteroaromatic system, while the long-range corrected functionals deliver estimates consistent with experiment, especially within the state-specific PCM modeling framework.

A series of *Safirinium P* and *Q* derivatives with various alkyl substituents in position 2 of triazolium moiety as well as their *N*-hydroxysuccinimide esters reactive toward nucleophilic reagents have been synthesized. Subsequently, the lipophilicity of obtained compounds was determined in order to select compounds suitable for visualization of epidermis in *ex vivo* human skin. The optimized compound **26e** exhibited photostability and ability to stain skin, especially the corneocyte clusters, which enabled visualization of lipophilic test substances penetration to the skin.

The obtained *N*-hydroxysuccinimide esters were used to synthesize fluorescently labeled amino acids and biogenic amines. The applicability of the reactive esters as derivatization reagents in analysis of low-molecular weight hydrophilic molecules was evaluated with use of micellar electrokinetic chromatography (MEKC) and capillary zone electrophoresis (CZE). It was proved that the tested substances demonstrate high potential as derivatization reagents for routine analytical applications.

The *Safirinium* analogs and their  $^{13}\text{C}$  isotope-labeled derivative have been synthesized to evaluate their applicability as ionization tags in proteomic analysis. Hence, *Safirinium P* derivatives were converted into *N*-hydroxysuccinimide esters and subsequently used as ionization tags for signal enhancing and increasing

detection sensitivity in peptide sequencing by means of LC-MS and LC-MS/MS methods. The esters were proved to efficiently conjugate with free amine groups of peptide *N*-term and lysine residues in protein hydrolysates. Protein sequence coverage was ca. 80% after incubation. The signal was enhanced up to 8-fold which enabled products identification. The conducted experiments proved that synthesized compounds could find potential application as ionization tags, especially for lysine-rich peptides.

Summing up, 151 novel, previously not described in the literature compounds were synthesized and characterized, including: 16 hybrid fluoroquinolone derivatives **3-6**, 1 *N*1-alkyl 4,6-dimethylisoxazolo[3,4-*b*]pyridin-3(1*H*)-one derivative **7**, 4 2-chloroquinolin-3-carboxyl acids **9, 10** (sulfoxyamine)quinoline-3-carboxyl acids **10, 7** isoxazolo[3,4-*b*]quinolin-3(1*H*)-ones **2, 18** *N*1- and *N*9-alkyl and *N*1-acyl isoxazolo[3,4-*b*]quinolin-3(1*H*)-one derivatives **11-14**, 12 isoxazolo[3,4-*b*]pyridin-3(1*H*)-ones and  $\alpha$ -carbonyl acetylenic compounds reaction products **15-20**, 12 dyes with a structure of 2,2-diethyl-1,2-dihydro-[1,2,4]triazolo[4,3-*a*]quinolin-2-ium-4-carboxylate (*Safirinium Q*) **21**, 2 *Safirinium Q* dimers **22**, 4 *Safirinium P* and *Q* derivatives with variable 2,2-alkyl substituents in triazolium ring **23-24** and 9 their *N*-hydroxysuccinimide esters **25-26**, 1 *Safirinium Q* ester derivative **27**, 45 amide and amino acid derivatives of *Safirinium P* and *Q* **28-29**, 2 proline-*Safirinium P* or *Q* hybrids **32**, 3 *Safirinium P* labeled biogenic amines **30**, 2 tripeptides labeled with *Safirinium P* **31**, 2 1-hydroxymethyl derivatives of isoxazolones **33** and 1 <sup>13</sup>C-isotope labeled *Safirinium Q* analog **34**.

A part of obtained results was published in:

- Sączewski J, Fedorowicz J, Kędzia A, Ziółkowska-Klinkosz M, Jalińska A (2016) *Medicinal Chemistry* 12:640
- Sączewski J, Fedorowicz J, Korcz M, Sączewski F, Wicher B, Gdaniec M, Konopacka A (2015) *Tetrahedron* 71:8975
- Sączewski J, Fedorowicz J, Gdaniec M, Wiśniewska P, Sieniawska E, Drażba Z, Rzewnicka J, Balewski Ł (2017) *The Journal of Organic Chemistry* 82:9737

- Fedorowicz J, Sączewski J, Drażba Z, Wiśniewska P, Gdaniec M, Wicher B, Suwiński G, Jalińska A (2018) *Dyes and Pigments*, <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.09.005>

Fedorowicz J, Sączewski J (2018) *Monatshefte für Chemie* 149:1199