

Universitatea „Alexandru Ioan Cuza”, Iași

Facultatea de Chimie

Școala Doctorală de Chimie și Științe ale Vieții și Pământului

IULIANA-MONICA MOISE

*Sinteza de noi analogi ai fenstatinei cu potențială
activitate antitumorală*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Coordonator științific:

Prof. univ. Dr. Elena BÎCU

IAȘI

2016

Lucrarea de doctorat intitulată *Sinteza de noi analogi ai fenstatinei cu potențială activitate antitumorală* cuprinde 247 de pagini, anexe (conținând articolele publicate) și prezintă următoarea structură:

Cuprins

I.	Date din literatură	6
I.1.	Cancer – generalități.....	6
I.2.	Tubulina.....	9
	Structura și proprietățile fenstatinei.....	12
I.3.	Farneziltransferaza.....	13
I.4.	Inhibitori ai polimerizării tubulinei și ai farneziltransferazei prezenți în literatură.....	16
	I.4.1. Analogi ai fenstatinei prezenți în literatură.....	16
	I.4.2. Inhibitori ai farneziltransferazei prezenți în literatură.....	28
I.5.	Concepția inhibitorilor duali tubulină/farneziltransferază.....	31
I.6.	Derivați ai fenotiazinei cu proprietăți anticancer.....	35
II.	Contribuții personale	45
	Obiective principale.....	46
II.1.	Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor derivați de tip <i>N</i> -benzoilfenotiazină - Seria A.....	47
	II.1.1. Concepția compușilor de tip <i>N</i> -benzoilfenotiazină.....	47
	II.1.2. Strategii de sinteză.....	48
	II.1.3. Măsurători de fluorescență.....	51
	II.1.4. Evaluare biologică.....	52
	II.1.5. Modelare moleculară.....	57
	II.1.6. Concluzii.....	58
II.2.	Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor derivați de tip benzilamină - Seria B.....	59
	II.2.1. Concepția compușilor de tip benzilamină.....	59
	II.2.2. Strategii de sinteză.....	60
	II.2.3. Evaluare biologică.....	63
	II.2.4. Modelare moleculară.....	68
	II.2.5. Concluzii.....	70
II.3.	Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor derivați de tip tiocarbonil și oximă - Seria C.....	71
	II.3.1. Concepția moleculelor de tip tiocarbonil și oximă.....	71
	II.3.2. Strategii de sinteză.....	73
	II.3.3. Evaluare biologică.....	78
	II.3.4. Modelare moleculară.....	83
	II.3.5. Concluzii.....	89
II.4.	Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor hibrizi indolizină-fenotiazină - Seria D.....	91
	II.4.1. Indolizine cu activitate biologică.....	91
	II.4.2. Concepția compușilor hibrizi indolizină-fenotiazină.....	94

II.4.3. Strategii de sinteză.....	95
II.4.4. Evaluare biologică.....	109
II.4.5. Modelare moleculară.....	115
II.4.6. Concluzii.....	117
II.5. Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor derivați de tip calconă - Seria E.....	119
II.5.1. Concepția compușilor de tip calconă.....	119
II.5.2. Strategii de sinteză.....	121
II.5.3. Evaluare biologică.....	125
II.5.4. Modelare moleculară.....	127
II.5.5. Concluzii.....	128
II.6. Concluzii generale și perspective.....	130
III. Parte experimentală	134
III.1. Sinteza și evaluarea biologică a unor derivați de tip N-benzoilfenotiazină (Seria A).....	135
III.2. Sinteza și evaluarea biologică a unor derivați de tip benzilamină (Seria B).....	147
III.3. Sinteza și evaluarea biologică a unor derivați de tip tiocarbonil și oximă (Seria C).....	157
III.4. Sinteza și evaluarea biologică a unor hibrizi indolizină-fenotiazină (Seria D).....	172
III.5. Sinteza și evaluarea biologică a unor derivați de tip calconă (Seria E).....	214
Bibliografie.....	231
Anexe.....	247

Rezumatul cuprinde rezultatele cercetărilor efectuate pe parcursul celor trei ani de studii doctorale prezentate pe scurt, concluzii generale precum și o parte din cele 248 de referințe bibliografice care însoțesc teza. Este păstrată numerotarea din teză a capitolelor, tabelor, figurilor, schemelor de reacție și a structurilor.

Introducere

Cancerul a devenit una dintre maladiile cele mai temute ale zilelor noastre. Fiind definit ca o boală complexă¹ întrucât e determinat de factori genetici, factori de mediu și stil de viață, este greu de combătut și cu șanse mari de recidivă. Doar în 2012 s-au semnalat în jur de 8.2 milioane de noi decese cauzate de cancer și se pare că acest număr va crește cu 70% în următoarele două decenii.²

Cancerul se manifestă prin dezvoltarea rapidă și haotică a unor celule anormale. Aglomerarea acestora generează tumori care se pot localiza la nivelul oricărui organ. Migrarea celulelor canceroase de la nivelul organelor pe care s-au format inițial și invazia acestora în țesuturile străine generează așa-numitele metastaze.

Principalele metode de tratare sunt chirurgia, imunoterapia, radioterapia, hormonoterapia și chimioterapia. Aceasta din urmă folosește molecule capabile să atace în mod selectiv celulele canceroase. Aceste molecule au ca ținte diferite enzime, proteine sau procese de la nivel celular care sunt esențiale multiplicării.

Printre obiectivele chimioterapiei actuale se numără augmentarea transportului agenților chimioterapici la tumori, îmbunătățirea controlului asupra creșterii tumorale, reducerea metastazei și mărirea ratei de supraviețuire.

Datorită eficienței taxanilor și alcaloizilor din Vinca unii ar putea spune că tubulina este una dintre cele mai promițătoare ținte anticancer. O multitudine de inhibitori ai polimerizării/depolarizării tubulinei găsiți în natură, precum și analogi sintetici ai acestora au dovedit activitate citotoxică pe un domeniu vast de celule canceroase.⁷ Aceste aspecte ne-au îndreptat cercetările spre sinteza de agenți antitubulină pentru a ne atinge scopul: obținerea unor viitoare medicamente anticancer. Pentru aceasta am pornit de la structura fenstatinei (**Figura 6**), moleculă cu bună activitate citotoxică *in vitro*.

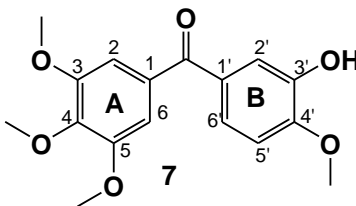


Figura 6. Structura Fenstatinei

O altă abordare a medicinei pentru obținerea unor efecte terapeutice optime este asocierea noilor compuși antitumorali cu agenți citotoxici clasici, utilizarea combinațiilor de medicamente pentru eficiență sporită a tratamentului. În consecință, o a doua țintă care a suscitat interesul nostru este farneziltransferaza. Un concept de care am fost interesați este cel de medicament dual, un compus ce acționează asupra a două ținte biologice de la nivelul celulei. Prin vizarea mai multor căi de acțiune se poate obține un efect citotoxic mult mai puternic, fără mărirea și înmulțirea efectelor adverse care ar rezulta din combinarea mai multor medicamente.⁹⁶⁻⁹⁸

Cercetările au arătat că asocierea unor inhibitori ai farneziltransferazei (FTi) cu stabilizanți ai microtubulilor precum taxanii îmbunătățește acțiunea de legare a taxolului. Pe lângă îmbunătățirea acțiunii taxolului, FTi anulează rezistența la taxani a celulelor canceroase.¹⁰⁹⁻¹¹⁰ Evidențierea eficacității compușilor micști se poate dovedi esențială, conducând la o strategie inovatoare pentru concepția de noi agenți anticanceroși. S-ar putea obține, cu o singură moleculă, o acțiune sinergică asemănătoare asocierii taxanilor cu inhibitorii de farneziltransferază, astfel mărind eficacitatea și diminuând efectele toxice ale tratamentelor. Pe lângă realizarea efectului sinergic urmărit, reacțiile adverse ar fi mult scăzute. Acest lucru se datorează pe de o parte utilizării un singur medicament și nu a unei combinații de substanțe active, iar pe de altă parte micșorării concentrației necesare manifestării efectului terapeutic. Această tactică inventivă poate ajuta la avansarea mai rapidă a cercetărilor din domeniul medical, cercetări ce privesc chimioterapia cancerului în scopul vindecării, oferind o soluție de combatere a rezistenței dezvoltate de tumori.

O mare parte din cercetările întreprinse pe durata tezei se axează, așadar, pe obținerea de medicamente duale: inhibitori micști tubulină/farneziltransferază.

Datorită numeroaselor proprietăți biologice demonstrate de compușii conținând fenotiazină, în special în domeniul anticancer, am decis să folosim acest heterociclu în majoritatea compușilor sintetizați.

Contribuții personale

Obiective principale

Cercetările din cadrul celor trei ani de doctorat se axează pe sinteza, caracterizarea structurală și evaluarea biologică a unor noi analogi ai fenstatinei, cu scopul de a obține agenți anticancer eficienți, cu structură inovatoare. Cercetările s-au bazat pe studiul literaturii prezentat în prima parte a tezei și au constatat în varierea celor trei elemente structurale ale fenstatinei ținând cont de relațiile structură-activitate descoperite până în prezent.

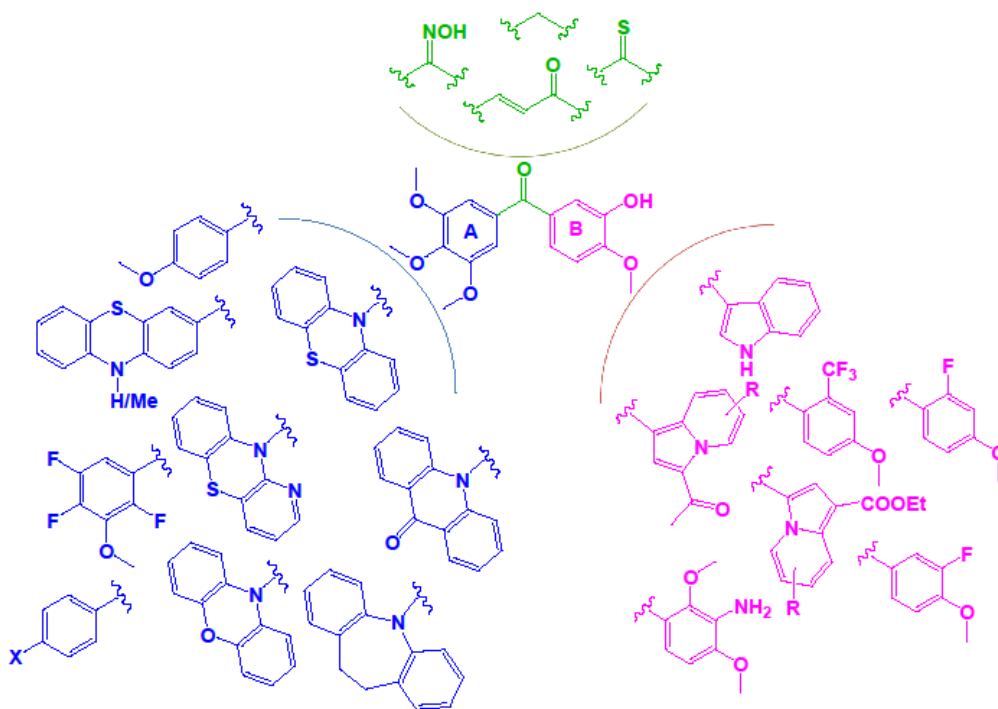


Figura 1. Principalele modulări propuse pentru structura fenstatinei

- **Ciclul A**, trimetoxifenil a fost înlocuit cu fenil substituit cu grupări precum: metoxi, halogeno, fenil, ciano, dar și cu tricycluri condensate cu azot ca: fenotiazina, 1-azafenotiazina, fenoxazina, acridona sau iminodibenzilul.
- **Ciclul B** a fost substituit cu nuclee fenilice diferit substituie (cu metoxi, amine, halogeni etc.) și cu azaheterocicluri (indol, indolizină).
- Structurile care au luat locul **conectorului carbonilic** sunt: metilen, tiocarbonil, oximă și 2-propen-1-onă.

Toți compușii nou sintetizați sunt testați *in vitro* pentru potențialul anticancer grație colaborărilor cu Franța (*École des Hautes Études d'Ingénieurs*, Lille; *CNRS*, Paris) și cu *NCI*, *USA* (asupra a 60 linii celulare tumorale).

Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor derivați de tip N-benzoilfenotiazină - Seria A

Printre structurile ce pot lua locul nucleului trimetoxifenilic se numără fenotiazina combinată cu ciclul B clasic.⁸⁵ În urma investigațiilor efectuate de către grupul nostru de cercetare, a fost publicată o serie de analogi ai fenstatinei unde fenotiazina ia locul ciclului A clasic, serie ce a dus la descoperirea unor compuși cu activitate promițătoare. La înlocuirea ciclului B cu grupări aril diferite substituie, moleculele care s-au dovedit cele mai active prezentau un nucleu 3-fluoro-4-metoxifenilic (Compusul **C**, **Figura 2**, IC_{50} (Tubulină) = 9,5 μ M), 3-amino-4-metoxifenilic (Compusul **D**, **Figura 2**, IC_{50} (Tubulină) = 12 μ M).⁸⁶

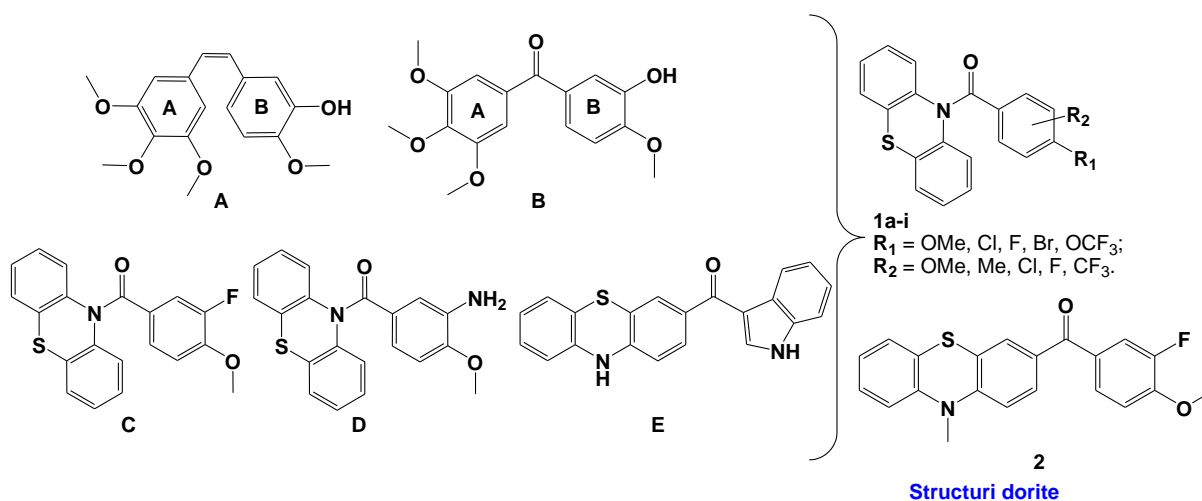
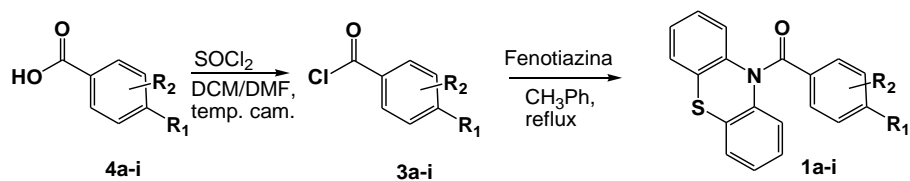


Figura 2. Analogi ai fenstatinei cu ciclul A fenotiazină și compușii urmăriți

Am hotărât așadar să continuăm explorarea acestui tip de compuși, de această dată analizând cu precădere influența substituenților din poziția 2 a ciclului B (compușii **1a-i**, **Figura 2**). Un alt compus interesant din punct de vedere al activității biologice este fenotiazina acilată în poziția 3 (**E**, **Figura 2**, IC_{50} (Tubulină) = 38 μ M). Pentru a explora această poziție a scheletului fenotiazinic și a aprofunda relațiile structură-activitate, a fost imaginată o moleculă în care N-metilfenotiazin-3-il ar lua locul fenotiazin-10-ilului ca ciclu A (compusul **2**, **Figura 2**).

Pentru a obține compușii de tip N-benzoilfenotiazină a fost utilizată calea de sinteză facilă, în două etape, folosită anterior în cadrul grupului nostru de cercetare. Aceasta pornește de la acizii benzoici doriți (**4a-i**) care sunt disponibili comercial. Ei sunt mai întâi transformați în cloruri acide (**3a-i**) și apoi supuși unei reacții de condensare cu fenotiazina pentru a da compușii doriți (**Schema 2**).



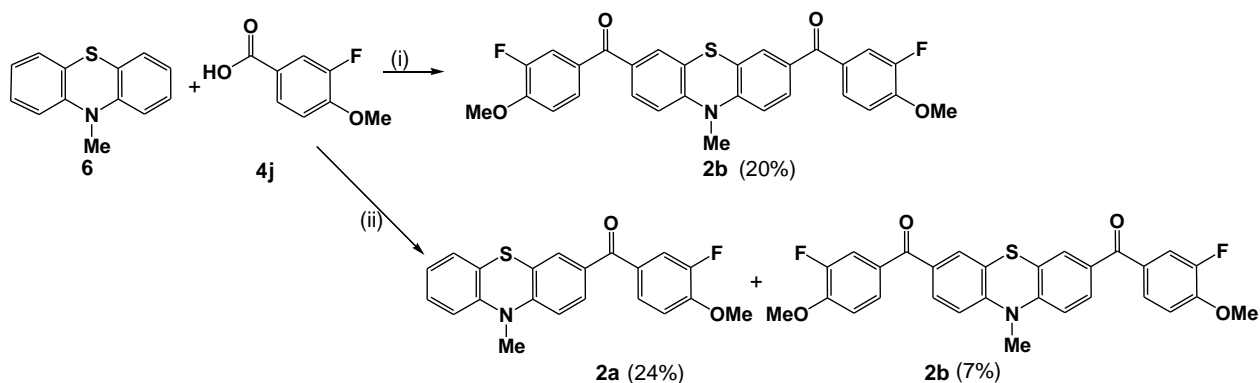
Schema 2. Sinteza *N*-benzoilfenotiazinelor

Prin această metodă s-au obținut 9 compuși (**Tabelul 1**) care au fost caracterizați și evaluați din punct de vedere biologic.

Tabelul 1. Substituenții și randamentele de obținere ale compușilor **1a-i**

Compus	R ₁	R ₂	Randament (%)
1a	OMe	2-F	60
1b	OMe	2-CF ₃	53
1c	OMe	2-OMe	77
1d	Cl	2-Cl	78
1e	F	3-Cl	78
1f	Br	3-Me	81
1g	F	2-F	76
1h	F	2-Cl	91
1i	OCF ₃	3-F	42

Pentru obținerea fenotiazinei acilate în poziția 3 au fost încercate mai multe moduri de lucru. Dintre acestea, utilizarea reactivului lui Eaton a furnizat derivatul dorit **2a** ca produs majoritar (randament 24%) împreună cu derivatul bisacilat **2b** (randament 7%) (**Schema 3**).



Schema 3. Reactivi și condiții: (i) (a) 1.5 echiv. SOCl₂, DCM/DMF, temp.cam., atmosferă inertă, 2 h, apoi (b) 2.0 echiv AlCl₃, DCM, reflux, atmosferă inertă, 24 h; (ii) 4.0 echiv. reactivul lui Eaton (P₂O₅:CH₃SO₃H 1:10 w:w), 60°C, 24 h.

Cetonele **2a** și **2b** au prezentat fluorescență intrinsecă ce nu a permis cuantificarea posibilei activități de inhibare a polimerizării tubulinei.

A fost observat și efectul solventului asupra fluorescenței cetonelor **2a** și **2b** (Figura 6). Deși *N*-metilfenotiazinele **2a** și **2b** au proprietăți similare, intensitatea fluorescenței pentru compusul bisacilat **2b** este mai mare decât cea a compusului **2a**, fapt ce poate fi explicat de conjugarea mai extinsă pe care acesta o prezintă.

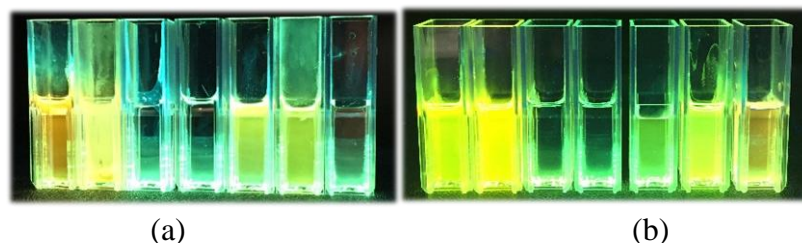


Figura 6. Soluțiile derivaților de fenotiazină **2a** și **2b** în diferiți solvenți organici (de la stânga la dreapta): CHCl_3 , CH_2Cl_2 , MeOH, EtOH, EtOAc, THF și DMSO, observate cu ajutorul unei lampe UV la $\lambda = 365$ nm: (a) compusul **2a** la o concentrație de 0.1 mg/mL (274 μM); (b) compusul **2b** la o concentrație de 0.1 mg/mL (193 μM).

Compușii sintetizați au fost evaluați biologic pentru a măsura capacitatea lor de inhibare a polimerizării tubulinei *in vitro* (Tabelul 2).

În urma testului se poate spune că, în general, fenotiazin-amidele **1a-i** sunt inhibitori mai puternici decât fenotiazin-cetonele **2a-b**. Compușii cei mai activi au fost cei ce conțin nucleul 2'-trifluorometil-4'-metoxifenil **1b** sau 2'-fluoro-4'-metoxifenil **1a**. Testele au confirmat încă o dată necesitatea grupării metoxi în poziția 4 a fenilului pentru păstrarea activității de inhibare a polimerizării tubulinei.

Opt dintre derivații de fenotiazină sintetizați **1a-e**, **1g**, **2a-b** au fost acceptați spre a fi testați la National Cancer Institute (NCI). Aici, a fost evaluat potențialul de inhibare a creșterii celulare pe 60 de linii de celule canceroase printre care se numără și linii ale unor tumori rezistente la mai multe medicamente (MDR). Un prim test a fost efectuat la o concentrație de 10 μM pe toate cele 60 de linii celulare, iar pentru cei mai activi compuși a fost determinat GI_{50} (concentrația la care creșterea celulară este inhibată în proporție de 50%).

Comportarea moleculelor la nivelul liniilor celulare canceroase a fost în concordanță cu rezultatele obținute la testul tubulină, cei mai potenți inhibitori ai polimerizării tubulinei fiind și cei mai activi agenți antitumorali *in vitro*.

Tabelul 2. Activitatea de inhibare a polimerizării tubulinei *in vitro* pentru compușii **1a-i**,

Compus	% TPI ^{a,b}	IC ₅₀ ^b (μM ± SD ^c)	R ²	Log P ^e
1a	75	22.5 ± 1.6	0.9398	4.54±0.89
1b	80	11.9 ± 1.7	0.8649	6.32±0.88
1c	53	n.d. ^d	-	4.39±0.86
1d	44	n.d.	-	5.56±0.86
1e	42	n.d.	-	5.54±0.89
1f	43	n.d.	-	6.01±0.88
1g	25	n.d.	-	4.47±0.92
1h	44	n.d.	-	4.56±0.89
1i	48	n.d.	-	6.03±0.91
Fenstatină B	99	3.4 ± 0.7	0.9378	2.75±0.42
Dezoxipodofilotoxină	100	1.8 ± 0.4	0.9740	2.44±0.45

^a Inhibarea polimerizării tubulinei la o concentrație de 100 μM.

^b Valorile reprezintă media a două experimente.

^c Deviația standard.

^d Nedeterminat.

^e Calculat cu ACD Software.

Linia celulară pe care noii analogi ai fenstatinei au fost foarte activi este MDA-MB-435 (melanom-adenocarcinom uman). Pe această linie, compușii anterior sintetizați, fenotiazinamida **C** și fenotiazincetona **E** sunt cei mai activi, cu valori GI₅₀ = 36 nM, respectiv GI₅₀ = 98 nM, urmați de fenotiazinamidele din noua serie **1a** și **1b** (GI₅₀ = **177 nM**, respectiv **176 nM**) și apoi **1c** (GI₅₀ = **212 nM**).

Compusul conținând gruparea trifluorometil **1b** a fost cel mai activ în inhibarea creșterii celulelor de tip CCRF-CEM - leucemie limfoblastică acută (GI₅₀ = **88 nM**). Toți compușii testați au prezentat activitate antiproliferativă mai accentuată decât molecula “mamă”- fenstatina pe liniile celulare COLO 205 (adenocarcinom colorectal), A498 (adenocarcinomul renal uman) și HCT-15 (adenocarcinom colorectal rezistent la medicamente).

Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor derivați de tip benzilamină - Seria B

Studiind literatura de specialitate, am putut observa că gruparea carbonilică poate fi înlocuită de către grupări relativ mici care să păstreze poziția cisoidă a nucleelor aromatice. Pentru a aprofunda relațiile structură-activitate dobândite până în prezent și a trage concluzii cu privire la importanța conectorului carbonilic, am căutat înlocuirea acestuia în compușii activi sintetizați până acum.

Am hotărât să sintetizăm noi analogi ai fenstatinei în care conectorul este unul metilenic (compușii **7a-j**, **Figura 8**), păstrând ciclurile A și B care s-au dovedit a fi cele mai active.

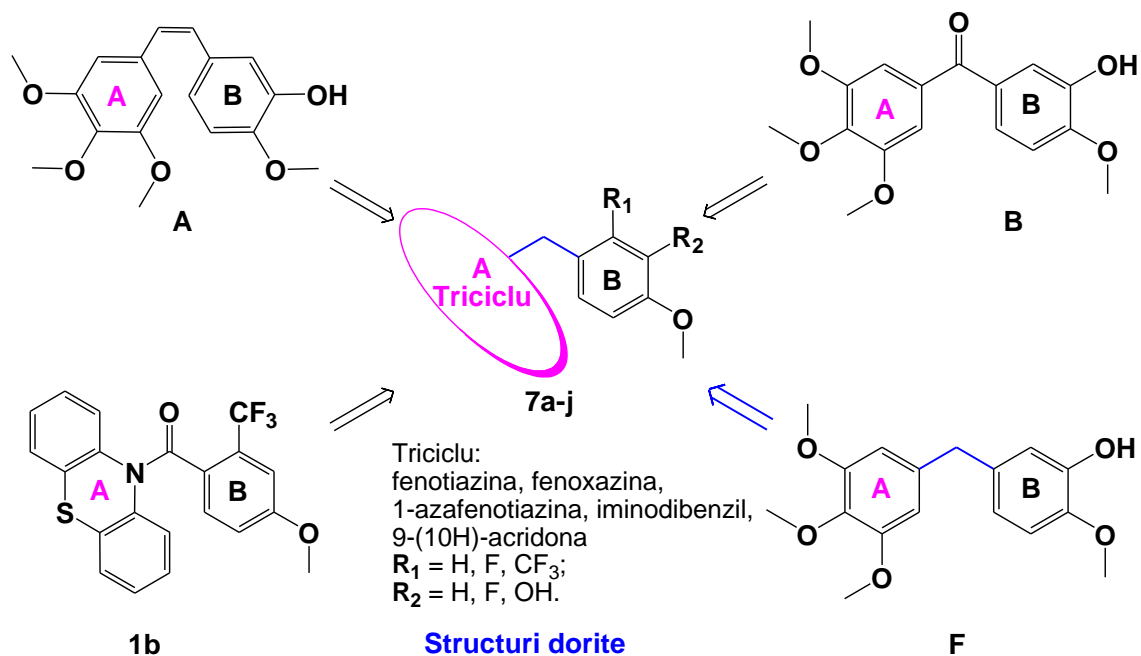
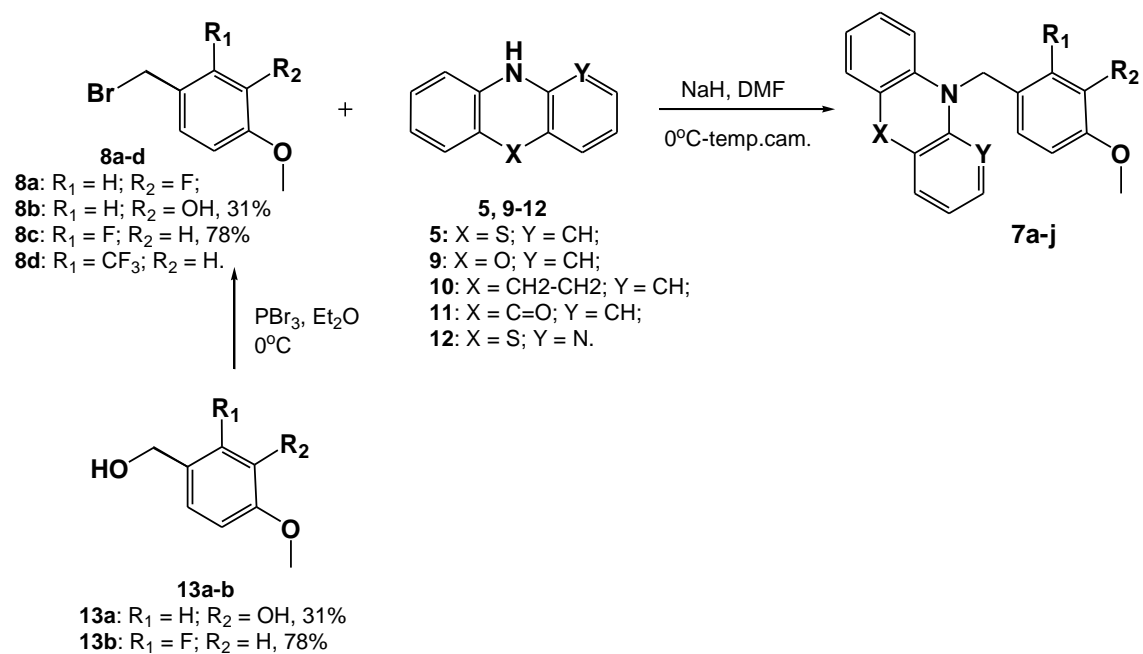


Figura 8. Structura compușilor urmăriți **7a-j** și a produșilor de referință (Combretastatina A-4 și analogi)



Schema 4. Sinteza benzilaminelor **7a-j**

Pentru a merge mai departe cu relațiile structură-activitate ne-am propus înlocuirea fenotiazinei cu diferite tricycluri asemănătoare ca structură cum ar fi fenoxazina, 10-*H*-acridona, iminodibenzil (10,11-dihidro-5*H*-dibenzo[*b,f*]azepină) și 1-azafenotiazina (10*H*-pirido[3,2-*b*][1,4]benzotiazină). Compușii doriți **7a-j** au fost obținuți pornind de la bromurile de benzil cu substituții doriți și tricyclurile alese. Bromurile de benzil **8a-d** au fost puse în reacție cu aminele (**5**, **9-12**) deprotonate (**Schema 4**). Bromurile nedisponibile comercial **8b** și **8c** au fost preparate din alcoolii corespunzători, prin metoda întâlnită în literatură.¹⁹⁵

Compușii astfel obținuți (**Tabelul 5**) au fost evaluați biologic pentru capacitatea de inhibare a polimerizării tubulinei, iar rezultatele sunt prezentate în **Tabelul 6**.

Tabelul 5. Randamentele de obținere pentru compușii **7a-j**

Compus	R ¹	R ²	X	Y	Randament (%)
7a	F	H	S	CH	44
7b	CF ₃	H	S	CH	32
7c	H	OH	S	CH	26
7d	H	F	S	CH	57
7e	CF ₃	H	O	CH	87
7f	H	OH	O	CH	23
7g	H	F	O	CH	41
7h	H	F	CH ₂ -CH ₂	CH	65
7i	H	F	C=O	CH	64
7j	H	F	S	N	61

Din cele 10 molecule, patru s-au dovedit a fi inhibitori ai polimerizării tubulinei (**7c**, **7d**, **7h**, **7j**). Cel mai eficient compus a fost cel ce conține iminodibenzil **7h** în locul fenotiazinei, cu o concentrație inhibitorie medie comparabilă cu cea a compusului părinte (IC₅₀ = 6.43 μM față de IC₅₀ = 3.43 μM pentru fenstatină).

Dintre noii analogi ai fenstatinei sintetizați cu conector metilenic, șapte (**7a-d**, **7f-h**) au fost acceptați de către NCI. În urma primului screening efectuat la o concentrație de 10 μM, cinci dintre moleculele testate (**7a-d**, **7h**) au fost suficient de active pentru a fi evaluate în testul în cinci doze spre a li se determina GI₅₀.

Compusul **7a** prezintă activitatea antiproliferativă cea mai pronunțată pe 12 linii celulare cu GI₅₀ de ordinul zecilor de nanomoli pentru 11 din aceste linii (MCF7 – **32.7 nM**, IGROV1 – **45.6**

nM, MDA-MB-435 – **24.6 nM**, M14 – **38.1 nM**, HCT116 – **39.8 nM**, HCT15 – **37.9 nM**, HT29 – **35 nM**, KM12 – **43.2 nM**, SW620 – **36.3 nM**, K562 – **38 nM**, SR – **59.6 nM**). Compusul **7b** este cel mai activ împotriva celulelor de cancer pulmonar HOP92 ($GI_{50} = 227 \text{ nM}$), compusul **7c**, care posedă ciclul B clasic al fenstatinei, a inhibat cel mai eficient creșterea celulelor de glioblastom de tip SNB-75 ($GI_{50} = 180 \text{ nM}$). 3-fluoro-4-metoxibenzilamina fenotiazinei **7d** și a iminodibenzilului **7h** au împiedicat, cu aceeași potență, în special multiplicarea celulelor de melanom MDA-MB-435 ($GI_{50} = 189 \text{ nM}$ pentru compusul **7d** și $GI_{50} = 187 \text{ nM}$ pentru compusul **7h**).

Tabelul 6. Activitatea de inhibare a polimerizării tubulinei pentru compușii **7a-j**

Compus	% TPI ^{a,b}	IC ₅₀ ^b ($\mu\text{M} \pm \text{SD}^c$)	R ²	Log P ^e
7a	7	n.d. ^d	-	6.23 ± 0.35
7b	15	n.d.	-	7.18 ± 0.33
7c	64	9.18	0.8936	5.10 ± 0.26
7d	63	20.66	0.62807	6.05 ± 0.43
7e	44	n.d.	-	5.26 ± 0.55
7f	4	n.d.	-	3.17 ± 0.50
7g	1	n.d.	-	4.12 ± 0.60
7h	58	6.43	0.7085	3.77 ± 0.55
7i	13	n.d.	-	2.54 ± 0.57
7j	72	10.47	0.7985	3.98 ± 0.46
Fenstatina B	99	3.43	0.93782	2.75 ± 0.42
Dezoxipodofilotoxina	100	1.76	0.97402	2.44 ± 0.45

^a Inhibarea polimerizării tubulinei la o concentrație de 100 μM .

^b Valorile reprezintă media a două experimente.

^c Deviația standard.

^d Nedeterminat.

^e Valori calculate cu ACD Software.

Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor derivați de tip tiocarbonil și oximă - Seria C

Studiile au arătat că la combinarea unor inhibitori ai farneziltransferazei cu agenți antitubulină se obține o foarte bună activitate anticancer.¹⁰⁹⁻¹¹² Încurajați de aceste date, am urmărit sinteza unor molecule care să posede cele două activități, fără să fie necesară combinarea mai multor agenți chimioterapeutici. În acest sens, am dorit să obținem analogi ai fenstatinei care să aibă caracteristici structurale compatibile cu farneziltransferaza. O strategie pentru obținerea

inhibitorilor duali constă în înlocuirea oxigenului cetonic cu sulf, obținând astfel analogi ai fenstatinei cu conector de tip tiocetonă.

După rezultatele promițătoare furnizate de studiile de docking, tiofenstatina (compusul **14a**, **Figura 13**) a fost sintetizată și testată *in vitro* pe cele două proteine de interes, molecula inhibând polimerizarea tubulinei (IC_{50} (Tubulină) = 1.2 μ M) și farneziltransferaza (IC_{50} (FTază) = 6.3 μ M) mai eficient decât fenstatina (IC_{50} (Tubulină) = 3.4 μ M, 40% inh FTază la 100 μ M).¹⁰⁸

Aceste rezultate ne-au determinat să sintetizăm o serie de tiocetone (**14b-j**, **Figura 14**) pornind de la produși cu acțiune de inhibare a polimerizării tubulinei, urmărind obținerea efectului biologic suplimentar de inhibare a farneziltransferazei, și astfel, de generare de agenți micști cu potențial citotoxic crescut.

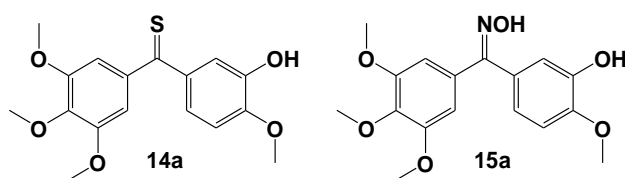


Figura 13. Structurile tiofenstatinei și a oximei provenite de la fenstatină

Testele efectuate pentru a evalua metabolizarea potențială a tiocetonelor au arătat însă că acești produși sunt instabili metabolic.¹⁰⁸ Aceasta explică de ce produșii conținând gruparea tiocarbonil nu prezintă mult interes pentru chimia medicinală. Este de menționat, totuși, faptul că tiofenstatina ar putea acționa ca pro-drog al fenstatinei, întrucât ea prezintă acțiune duală tubulină/farneziltransferază foarte bună, iar prin metabolizare eliberează în organism fenstatina - un compus ce păstrează acțiunea citotoxică.

Am sintetizat, așadar, o serie adițională de analogi ai fenstatinei, cu o funcțiune de tip oximă înlocuind atomul de oxigen/sulf. Oxima corespunzătoare fenstatinei a fost și ea sintetizată și prezintă activitate duală (compusul **15a**, **Figura 13**, IC_{50} (Tubulină) = 67.1 μ M, IC_{50} (FTază) = 8.8 μ M),¹⁰⁸ ceea ce ne-a determinat să sintetizăm și seria oximelor (**15b-j**, **Figura 14**).

În ceea ce privește structurile produșilor chimici pe care am dorit să efectuăm farmacomodulările mai sus menționate, au fost selectați compușii “lead” ai seriilor de analogi de fenstatină sintetizate până în prezent de grupul nostru de cercetare. Printre aceștia se numără benzofenone,⁸⁴ indolizine⁵⁹ și derivați de fenotiazină.⁸⁶ Sinteza acestora a fost reluată conform metodelor deja descrise.^{59,84,86,108}

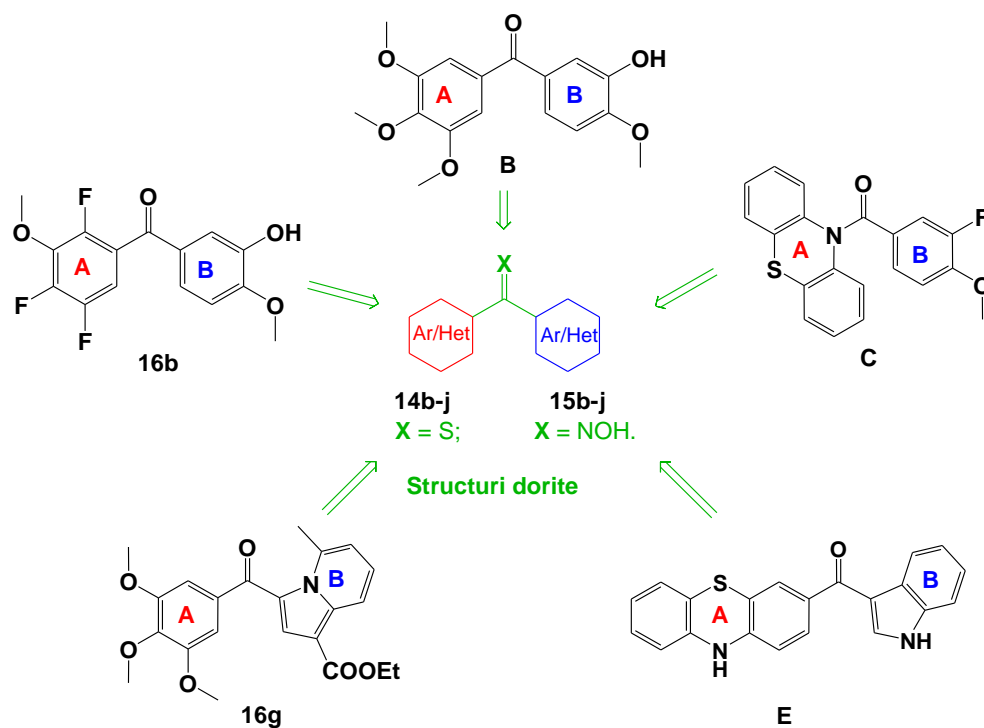
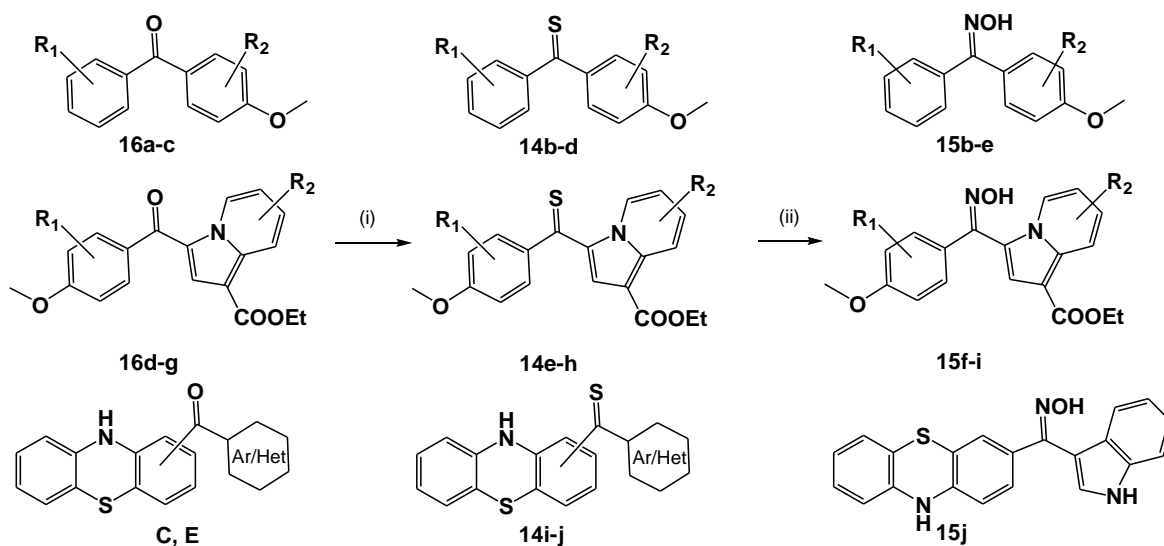


Figura 14. Structurile produșilor de referință și ale compușilor țintă

Pentru a înlocui atomul de oxigen cu cel de sulf a fost preferată utilizarea pentasulfurii de fosfor în prezența hexametildisiloxanului ($P_4S_{10}/HMDSO$). Pentru sinteza oximelor am hotărât să pornim de la tiocarbonilii obținuți prin tratare cu hidroxilamina generată *in situ* (Schema 11).



Schema 11. Reactivi și condiții: (i) P_4S_{10} , HMDSO, CH_3Ph , reflux; (ii) $NH_2OH.HCl$, NaOMe, MeOH, temp. cam.

Sinteza tiocarbonililor și oximelor a decurs conform așteptărilor cu o singură excepție. Oximele au fost obținute doar pornind de la tiocetonele **14a-i** și nu de la tioamida **14j**. După sinteză, produșii seriei discutate (**Tabelul 10**) au fost caracterizați și evaluați biologic.

Tabelul 10. Compușii obținuți din seria tiocarbonililor și oximelor

Carbonili	Tiocarbonili	Oxime		R ₁	R ₂
B	14a^a	15a^a		3,4,5-triOMe	3'-OH
16a^a	14b	15b	15c	3,4,5-triOMe	3'-NH ₂ -2'-OMe
16b^b	14c	15d		2,4,5-triF-3-Ome	3'-OH
16c^a	14d	15e		3,5-diMe-4-Ome	3'-OH
16d^c	14e	15f		-	6',8'-diMe
16e^c	14f	15g		3,5-diOMe	6',8'-diMe
16f	14g	15h		2-Br-3,5-diOMe	6',8'-diMe
16g^c	14h	15i		3,5-diOMe	5'-Me
				Fenotiazina	Ar/Het
C^d	14i	-		10H-fenotiazin-10-il	3'-F-4'-OMefenil
E^d	14j	15j		10H-fenotiazin-3-il	indol-3-il

^a Compuși publicați în Ref. 108.

^b Compuși publicați în Ref. 84.

^c Compuși publicați în Ref. 59.

^d Compuși publicați în Ref. 86.

Oximele și tiocarbonilii sintetizați în această etapă a cercetărilor au fost testați biologic atât pentru a li se evalua activitatea de inhibare a farneziltransferazei cât și cea de inhibare a polimerizării tubulinei.

Testele au arătat că au fost obținuți inhibitori duali, în special dintre tiocetonele sintetizate. Compusul **15a** este un inhibitor dual, dar nu echipotent cu **14a**.¹⁰⁸

După tiofenstatină, cel mai activ compus al seriei este **14d** ce posedă ciclul B clasic, ciclul A 4-metoxi-3,5-dimetilfenil și conectorul tiocarbonilic. Analogul său cu o grupare oximă **15e** a păstrat activitatea antitubulină, dar nu și pe cea antifarnesiltransferază, înhibând metaloenzima în proporție de 40% la o concentrație de 100 μM.

Tiocarbonilul **14b** conținând un ciclu B 2,4-dimetoxi-3-aminofenil este un inhibitor dual farneziltransferază/tubulină cu activitate excelentă asupra tubulinei și activitate bună asupra farneziltransferazei.

Tabelul 11. Rezultatele testelor biologice efectuate asupra tubulinei și FTazei

Compus	% TPI ^a	IC ₅₀ (μM) ^c	R ^{2d}	% FTI ^b	IC ₅₀ (μM) ^c
Fenstatina B	99	3.4	0.9378	40	-
14a^g	100	1.23	0.9071	96	6.32
14b	100	0.395	0.9503	88	16.02
14d	99	2.17	0.8076	99	2.05
14e	0	- ^e	-	97	0.178
14f	15	-	-	99	2.08
14g	22	-	-	99	-
14h	0	-	-	99	0.187
14i	14	-	-	97	1.70
14j	10	-	-	98	0.67
15a^g	70	67.1	-	59	8.8
15b	0	-	-	n.t. ^f	-
15c	3	-	-	n.t.	-
15d	98	24.77	0.65455	n.t.	-
15e	100	1.81	0.9024	40	-
15f	25	-	-	5	-
15g	14	-	-	60	-
15h	0	-	-	n.t.	-
15i	0	-	-	99	-
15j	15	-	-	100	1.12
FTI-276	-	-	-	100	0.007
Dezoxipodofilotoxină	100	4.32	0.8483	-	-

^a Inhibarea polimerizării tubulinei la o concentrație de 100 μM.

^b Inhibarea farnesiltransferazei la o concentrație de 100 μM.

^c Valorile reprezintă media a două experimente.

^d Factorul de regresie.

^e Nedeterminat.

^f Netestabil, fluorescență intrinsecă.

^g Date obținute din ref. 108.

Șapte oxime au fost acceptate la NCI. Cinci dintre acești produși au fost suficient de activi pentru a fi testați în cinci doze spre a li se determina GI₅₀.

Cea mai activă oximă este **15d**, conținând ciclul B clasic al fenstatinei și un ciclu A fluorurat (2,4,5-trifluoro-4-metoxifenil). Aceasta are valori GI₅₀ submicromolare pentru majoritatea celulelor canceroase. Toți compușii au avut cea mai bună activitate citostatică pe linia celulară de melanom MDA-MB-435. După aceasta, linia de celule aparținând leucemiei SR

a fost cea mai sensibilă la acțiunea moleculelor sintetizate. Compusul **15d** a mai prezentat GI_{50} cu valoare mai mică de 300 nM pe liniile HL-60(TB), K-562 de leucemie și NCI-H522 de cancer la plămân. Toate oximele au avut activitate comparabilă cu a fenstatinei pe linia de cancer la colon COLO 205.

Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor hibrizi indolizină-fenotiazină - Seria D

În domeniul chimiei medicinale, indolizina este un heterociclu promițător, prezentând numeroase acțiuni biologice. Utilizarea lui în concepția și sinteza unor analogi ai fenstatinei a dus la rezultatele sperate, obținându-se compuși cu activitate biologică promițătoare.^{59,220}

În căutarea de molecule active a fost concepută o serie unde ciclul B este o indolizină și ciclul A este fenotiazina, azaheterociclu ce face parte din expertiza laboratorului și care s-a dovedit a fi un înlocuitor de succes al trimetoxifenilului.

În cadrul grupului nostru de cercetare a fost descoperit faptul că indolizinele și fenotiazina au potențial de inhibare a farnesiltransferazei (compușii **49**: $IC_{50}(FTază) = 1.3 \mu M$, **50**: $IC_{50}(FTază) = 0.6 \mu M$, **Figura 23**).^{162,222}

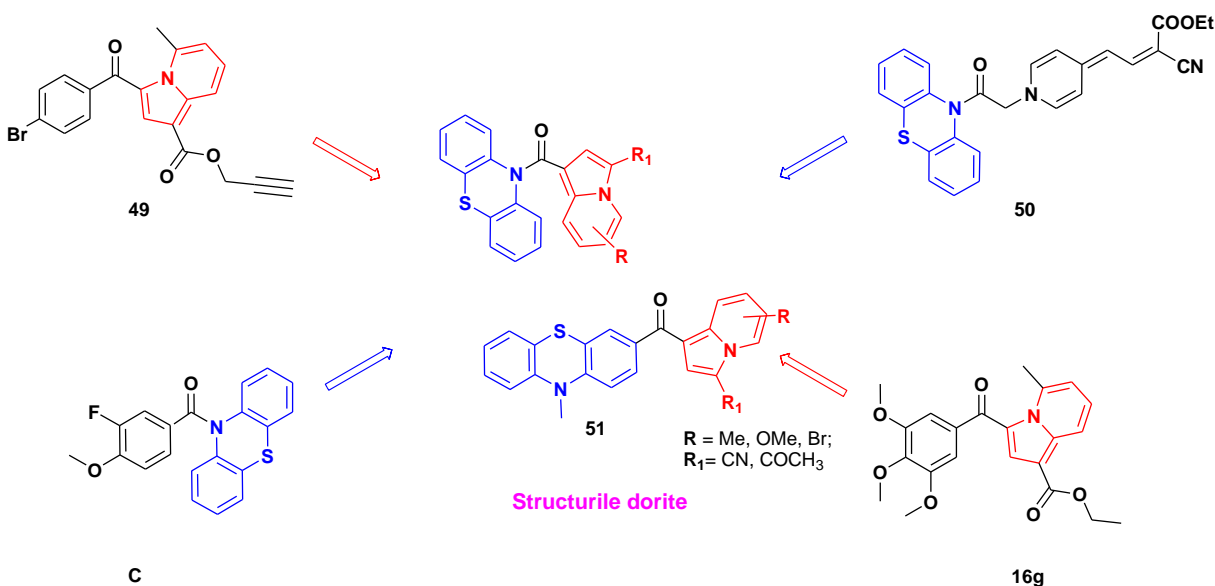
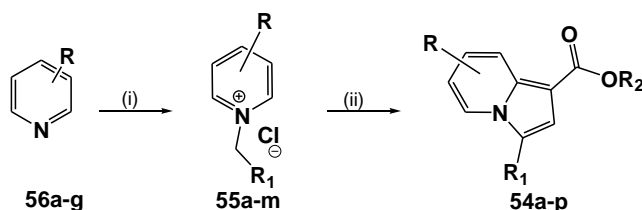


Figura 23. Structura inhibitorilor FTazei și a polimerizării tubulinei conținând fenotiazină și indolizină și a compușilor urmăriți

S-a căutat astfel obținerea unei sinergii de efecte biologice utilizându-se în aceeași structură două heterocicluri care au, fiecare în parte, o bună activitate anticancer atât ca analogi ai fenstatinei cât și ca inhibitori ai FTazei.

Pentru a obține produșii doriți a fost imaginată o sinteză în cinci etape. Prima etapă constă în obținerea sărurilor de piridiniu prin reacția derivaților de piridină cu un derivat clorurat, în speță cloroacetona sau cloroacetonitril. Odată obținute, aceste săruri sunt supuse unei reacții de cicloadiție 1,3-dipolară în prezența unei baze, pentru a furniza heterociclul indolizinic. În această reacție propiolatul de etil sau de metil a fost folosit ca dipolarofil (**Schema 13**). Cea de-a treia etapă este saponificarea grupării esterice, urmând să se obțină gruparea liberă carboxil ce urma să fie transformată în clorură acidă în cea de-a patra etapă, aceasta fiind pusă mai departe în reacție cu fenotiazina sau *N*-metilfenotiazina pentru a furniza compușii țintă **51**.



Schema 13. Reactivi și condiții: (i) cloroacetona (1,3 echiv), THF/ CH₃CN (1,3 echiv), CH₃CN, 24h, 60°C; (ii) propiolat de etil/metil (1,5 echiv), TEA (1,4 echiv), 24h, temp. cam.

Sinteza sărurilor **55a-m**²²⁴⁻²²⁸ a decurs cu randamente bune, în timp ce reacția de cicloadiție a prezentat ca inconvenient randamentul scăzut al produșilor izolați.

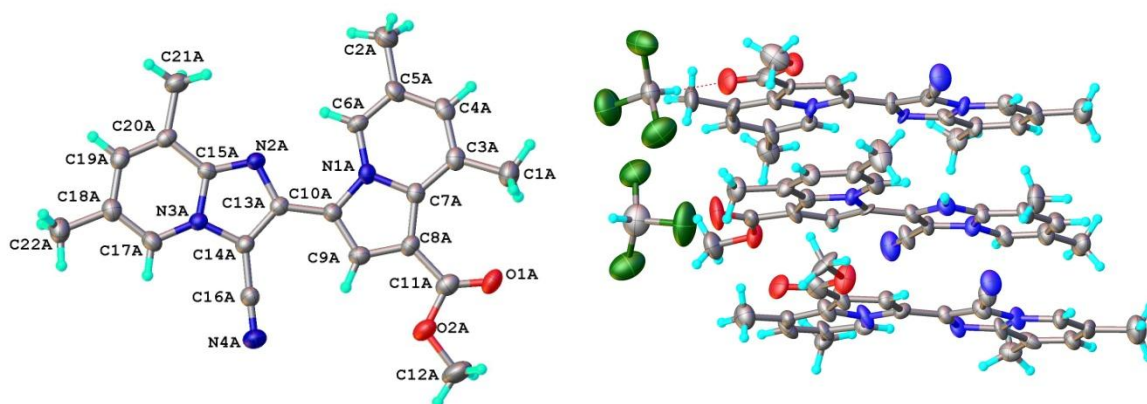
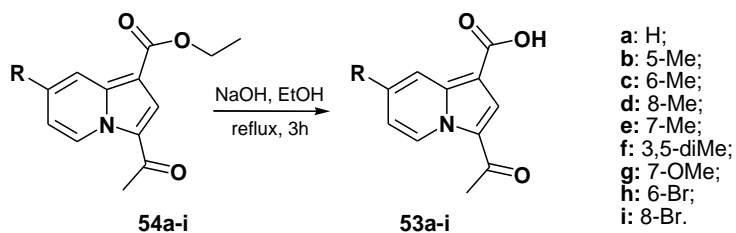


Figura 26. Difracția de RX și structura compusului **57c**

În reacțiile sărurilor de 1-cianometil piridiniu a fost observată formarea unor produși neașteptați. Cu ajutorul spectrometriei de masă și difracției de raze X am putut elucidă structura compusului necunoscut din reacția clorurii de 1-cianometil-3,5-dimetil piridiniu cu propiolat de metil, iar acesta conține o 1-azaindolizină în poziția 3 a indolizinei (**57c** **Figura 26**).

Odată obținuți, derivații indoliziniici sunt supuși saponificării pentru a se obține acizii carboxilici necesari în etapa următoare (**Schema 14**).



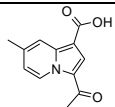
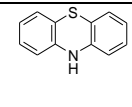
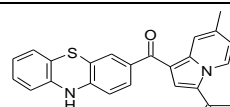
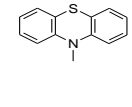
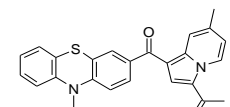
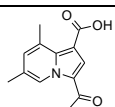
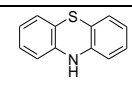
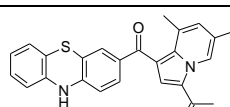
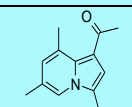
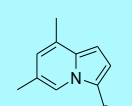
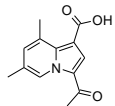
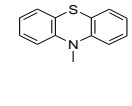
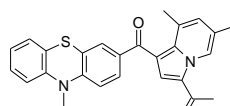
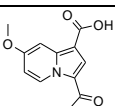
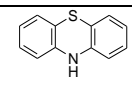
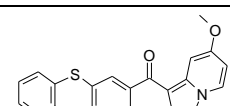
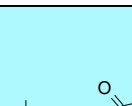
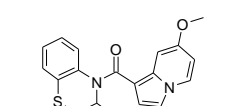
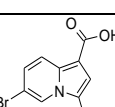
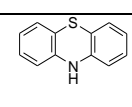
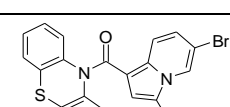
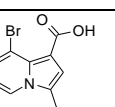
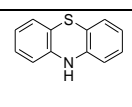
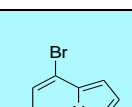
Schema 14. Sinteza acizilor **53a-i**

Ultimele două etape din calea de sinteză prevăzută inițial au fost înlocuite cu una singură, folosindu-ne de reactivul lui Eaton pentru a acila derivații de fenotiazină. S-au obținut prin această metodă compușii **51a-j**, dar și compuși neașteptați (**Tabelul 16**).

Tabelul 16. Hibrizii indolizină-fenotiazină obținuți alături de produșii secundari ai reacțiilor cu reactivul lui Eaton

Acid	Triciclu	Produs de acilare	Subprodus izolat
 53a	 	 51a (8%)	 63a (6%)
 53b	 	 51b (5%)	 65 (3%)
		 51c (4%)	 66 (6%)
 53d	 	 51d (6%)	 64a (32%)
		 51e (4%)	

Sinteza de noi analogi ai fenstatinei cu potențială activitate antitumorală

 53e		 51f (4%)	-
		 51k (3%)	-
 53f		 51g (7%)	 63b (6%)
			 64b (35%)
 53f		 51l (4%)	-
 53g		 51h (11%)	 63c (22%)
		 51i (14%)	
 53h		 51j (7%)	-
 53i		-	 64c (74%)

Compușii sintetizați din această serie au fost testați *in vitro* atât pentru capacitatea de inhibare a farneziltransferazei cât și pentru potențialul de inhibare a polimerizării tubulinei, rezultatele fiind prezentate în **Tabelul 17** și **Tabelul 18**.

Zece dintre produșii testați sunt inhibitori ai farneziltransferazei în procent de peste 65% la 100μM. Dintre aceștia, cinci prezintă concentrații medii de inhibare în domeniul submicromolar (**51a,d,f-h**, **Tabelul 17**). Se poate observa că modificările structurale optime pentru activitatea la nivelul farneziltransferazei sunt pe de o parte plasarea heterociclului indolizinic în poziția 3 a fenotiazinei și pe de altă parte păstrarea atomului de azot nesubstituit la nivelul triciclului.

Tabelul 17. Rezultatele testelor biologice efectuate asupra FTazei pentru compușii **51a-j**

Compus	% FTI ^{a,b}	IC ₅₀ (μM) ^b	R ^{2c}
51a	95	0.351	0.7179
51b	73	4.796	-
51c	79	2.9	0.9970
51d	89	0.806	0.9034
51e	49	- ^d	-
51f	96	0.25	0.8982
51g	95	0.679	0.8829
51h	86	0.391	0.8938
51i	37	-	-
51j	65	26.48	0.9902
51k	82	14.56	0.9662
51l	81	6.46	0.8632
FTI-276	100	0.007	0.8369

^a Inhibarea farneziltransferazei la o concentrație de 100μM.

^b Valorile reprezintă media a două experimente.

^c Factorul de regresie

^d Nedeterminat.

În urma testului *in vitro* efectuat asupra tubulinei, doar trei dintre produșii testați s-au dovedit activi, însă doi dintre ei (**51f**, **51h**) prezintă activitate comparabilă cu cea a compusului părinte, fenstatina **B**. Substituenții de la nivelul indolizinei care au determinat cea mai bună activitate sunt metil și metoxi în poziția 7 a heterociclului (**51f**, **51h**).

Tabelul 18. Rezultatele testelor biologice efectuate asupra tubulinei pentru hibridii **51a-j**

Compus	% TPI ^a	IC ₅₀ (μM) ^b	R ^{2c}
51a	43	- ^d	-
51b	41	-	-
51c	44	-	
51d	84	27.7	0.9046
51e	46	-	-
51f	77	3.32	0.8844
51g	56	n.d.	-
51h	100	1.11	0.8929
51i	32	-	-
51j	19	-	-
51k	0	-	-
51l	9	-	-
Fenstatină B	99	3.43	0.9378
Desoxipodofilotoxină	100	4.32	0.8483

^a Inhibarea polimerizării tubulinei la o concentrație de 100 μM.

^b Valorile reprezintă media a două experimente.

^c Factorul de regresie.

^d Nedeterminat.

Nouă dintre moleculele acestei serii au fost acceptate la NCI. Fenotiazinele acilate în poziția 3, **51f**, **51a**, **51h**, **51g** au fost acceptate pentru calcularea GI₅₀. Compușii au fost cei mai activi pe linia de melanom MDA-MB-435, dar au arătat un foarte bun potențial de inhibare a creșterii celulare și pe linii precum NCI-H522 de cancer de plămân non-microcelular, OVCAR-3 și NCI/ADR-RES ale cancerului ovarian, HL-60(TB)(leucemie). Acestea s-au dovedit la fel de active sau chiar mai active decât molecula-părinte pe liniile de celule canceroase COLO 205, A498, SF-295, MCF7. Derivații fenotiazinici **51f** (GI₅₀ < 100 nM pe 33 linii celulare) și **51h** (GI₅₀ < 100 nM pe 50 linii celulare) au arătat o inhibare a creșterii celulare comparabilă cu fenstatina și pentru linia de cancer pulmonar NCI-460, iar **51h** prezintă același comportament și pentru linia de cancer de prostată DU-145.

Cel mai bun compus al seriei este fenotiazincetona **51a** care prezintă concentrații medii de inhibare a proliferării celulare GI₅₀ < 5 nM pe 45 de linii celulare canceroase (1.8 nM pentru liniile celulare NCI-H522 și MDA-MB-435). El are, așadar, un efect citotoxic comparabil sau mai mare decât al fenstatinei.

Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor derivați de tip calconă - Seria E

Ne-am propus modularea conectorului carbonilic prin înlocuirea acestuia cu 2-propen-1-onă și am avut ca obiectiv sinteza de calcone drept analogi ai fenstatinei în care cele două nucleu arilice sunt indolizina cu rol de ciclu B și fenotiazina, un fenil substituit în poziția 4 sau 3,4,5-trimetoxifenil ca inel A (**Figura 39**). De asemenea, prin introducerea fenotiazinei și a indolizinei în structură am urmărit obținerea unor compuși cu acțiune duală, asemănători *Seriei D*. Sinteza a fost efectuată prin condensarea indolizinelor conținând o grupare acetyl în poziția 3 **54a-g** cu diferite aldehide (**Schema 18**).

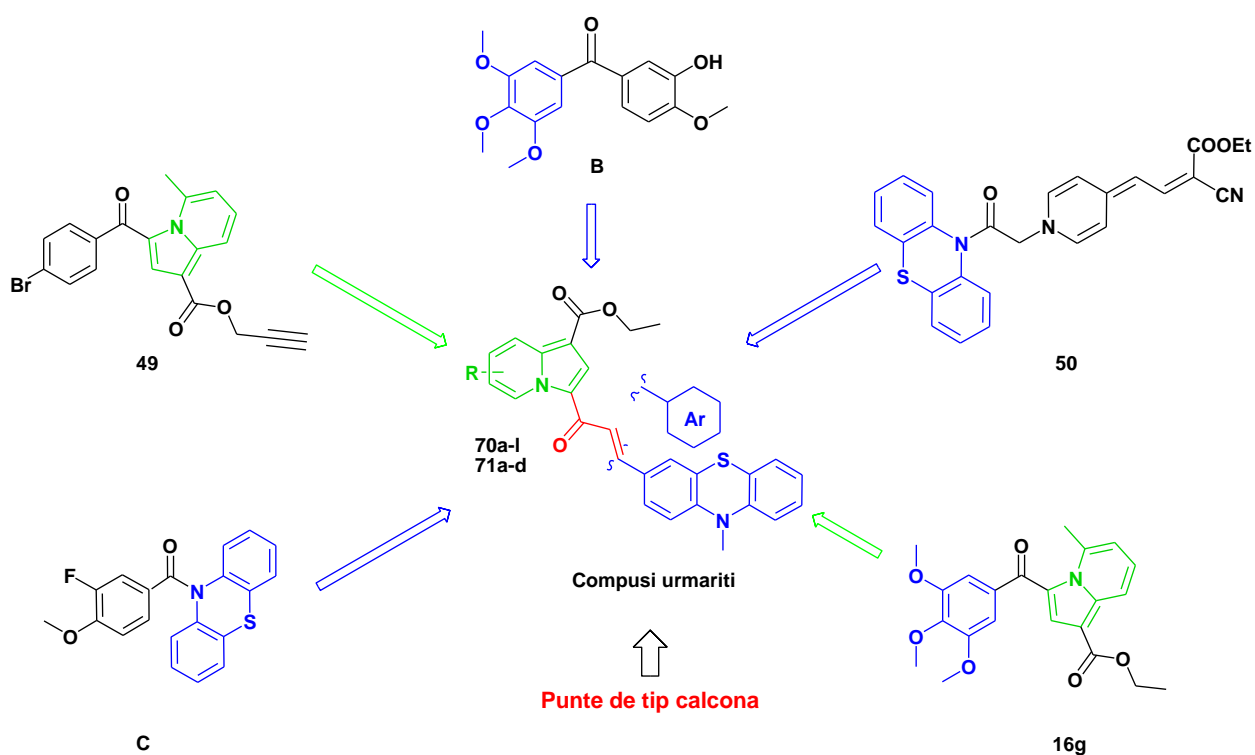
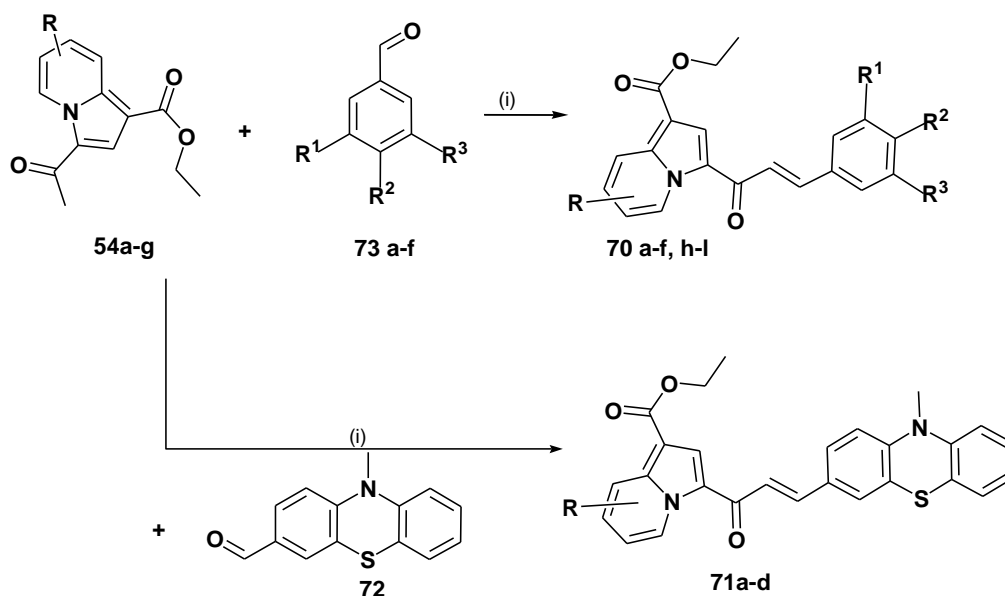


Figura 39. Structura inhibitorilor farnesiltransferazei și polimerizării tubulinei cu nucleu indolizinic și fenotiazinic și a compușilor urmăriți **70a-l** și **71a-d**

Pentru a evalua importanța grupării de tip ester etilic din poziția 1 a indolizinei aceasta a fost modificată prin saponificare cu hidroxid de sodiu pentru compusul **70h**, obținându-se astfel acidul carboxilic liber **70h'**. În acest mod, relațiile structură-activitate ce reies din testarea acestor molecule sunt mai amănunțite.



Schema 18. Reactivi și condiții: 1 echiv NaOH, EtOH, 24h, temp. cam.

Astfel, prin sinteza în trei etape descrisă au fost obținuți analogi de tip calconă **70a-f, h-l**, și **71a-d** (Tabelul 21) care au fost caracterizați și apoi testați biologic.

Tabelul 21. Calconele sintetizate **70a-f, h-l** și **71a-d**

Compus	R	R ¹	R ²	R ³	Randament (%)
70a	H	OMe	OMe	OMe	49
70b	5-Me	OMe	OMe	OMe	49
70c	6-Me	OMe	OMe	OMe	90
70d	7-Me	OMe	OMe	OMe	30
70e	8-Me	OMe	OMe	OMe	79
70f	7-OMe	OMe	OMe	OMe	42
70h	7-OMe	H	Cl	H	65
70i	7-OMe	H	Br	H	75
70j	7-OMe	H	CN	H	54
70k	7-OMe	H	OMe	H	68
70l	7-OMe	H	Ph	H	72
71a	H	-	-	-	20
71b	5-Me	-	-	-	49
71c	7-Me	-	-	-	11
71d	7-OMe	-	-	-	25

Noua familie sintetizată a fost testată pentru capacitatea de inhibare a polimerizării tubulinei, însă produșii s-au dovedit inactivi în acest sens. Rezultatele au fost însă promițătoare când produșii au fost testați *in vitro* asupra farneziltransferazei umane (**Tabelul 22**).

Cei mai activi compuși au fost aceia care conțineau triciclul fenotiazinic (**71a-d**). Cel mai potent inhibitor prezintă indolizina cu o grupare de tip ester etilic în poziția 1 ca unic substituent (**71a**: IC₅₀ = **9 nM**). O grupare metil în poziția 5 a dus la scăderea ușoară a activității (**71b**: IC₅₀ = **23 nM**), iar o grupare metil/metoxi în poziția 7 a dus la o scădere importantă a acesteia .

Tabelul 22. Activitatea inhibitorie a compușilor **70a-l** and **71a-d** asupra farneziltransferazei umane *in vitro*

Număr compus	% FTI ^{a,b}	IC ₅₀ (nM) ^b	R ^{2c}	LogP ^d ± SD
70a	94	19280	0.9317	4.66 ± 1.10
70b	7	n.d. ^f	-	5.12 ± 1.11
70c	n.t. ^e	n.d.	-	5.12 ± 1.11
70d	n.t. ^e	n.d.	-	5.12 ± 1.11
70e	n.t. ^e	n.d.	-	5.12 ± 1.11
70f	76	11630	0.9506	4.57 ± 1.48
70g	88	15890	0.9852	4.75 ± 1.11
70g'	88	726	0.8604	4.79 ± 0.85
70h	85	931	0.9507	5.58 ± 1.47
70h'	88	2330	0.9340	4.75 ± 1.47
70i	100	602	0.9273	5.76 ± 1.48
70j	95	8740	0.9496	4.42 ± 1.48
70k	68	n.d.	-	4.93 ± 1.47
70l	95	1320	0.9333	6.74 ± 1.48
71a	85	9	0.9550	7.34 ± 1.09
71b	91	23	0.9248	7.80 ± 1.09
71c	98	155	0.9845	7.80 ± 1.09
71d	84	711	0.9457	7.26 ± 1.47
FTI-276	100	7	0.8369	2.90 ± 0.71 ^g

^a Inhibarea farneziltransferazei la o concentrație de 100μM.

^b Valorile reprezintă media a două experimente.

^c Factorul de regresie

^d Valori calculate cu ACD software.

^e Netestabil, fluorescență intrinsecă.

^f Nedeterminat.

^g Valoare calculată cu ACD software pentru derivatul cu gruparea amino liberă.

Concluzii generale și perspective

- Descoperirea unor inhibitori ai polimerizării tubulinei este o strategie promițătoare în găsirea unor noi agenți cu acțiune anticancer puternică. Cercetările din cadrul acestei teze au fost îndreptate asupra unui bun inhibitor al polimerizării tubulinei – fenstatina, moleculă asupra căreia au fost efectuate diverse farmacomodulări cu scopul de a obține compuși cu activitate citostatică. Cele trei elemente structurale ale fenstatinei, la nivelul cărora au fost efectuate modificări și înlocuiri, sunt Ciclul A, Ciclul B și conectorul dintre cele două.
- Trăsătura definitivă în ceea ce privește obiectivele și cercetările din cadrul prezentei lucrări de doctorat este faptul că **designul moleculelor a fost efectuat pe baza relațiilor structură-activitate stabilite anterior** în cadrul grupului de cercetare.
- Au fost concepute și sintetizate două serii de produși chimici, analogi ai fenstatinei cu potențială activitate de inhibare a polimerizării tubulinei : **Seria A** și **Seria B**.
- **Seria A** este alcătuită din derivați de tip *N*-benzoilfenotiazină și două fenotiazin-cetone. Cei **11 compuși noi** sintetizați au fenotiazina pe post de ciclu A (acilată la nivelul atomului de N sau în poziția 3- sau 3,7-), conectorul clasic de tip carbonil și ciclul B clasic înlocuit cu un nucleu fenilic diferit substituit, în special cu atomi de halogen. Această familie de compuși a furnizat 2 noi inhibitori ai polimerizării tubulinei și 3 compuși cu efect de inhibare a proliferării mai multor linii de celule tumorale în domeniul submicromolar. Dintre aceștia, unul prezintă activitate de inhibare la **88 nM** asupra celulelor de leucemie limfoblastică acută CCRF-CEM.
- **Seria B**, a derivaților de tip *N*-benzilamină este formată din **10 compuși noi** în care au fost utilizate ciclurile B găsite ca fiind cele mai active în fenotiazin-amidele descrise. Conectorul carbonilic a fost înlocuit cu unul metilenic, iar alături de fenotiazină, au fost introduse și alte tricicluri aminice pentru a juca rolul inelului A. Din compușii sintetizați, 4 au activitate de inhibare a polimerizării tubulinei. La testele *in vitro* efectuate pe celulele canceroase, cel mai activ compus prezintă GI₅₀ de sub 100 nM pe 11 linii celulare.
- O strategie pentru a combate rezistența celulelor tumorale la agenții chimioterapici, a mări eficiența chimioterapiei fără a înmulți efectele secundare este utilizarea unor medicamente **duale farneziltransferază/tubulină**.
- Au fost concepute și sintetizate trei serii de noi compuși chimici, conținând caracteristici structurale care să prezinte activitate de inhibare a polimerizării tubulinei, dar și activitate de inhibare a farneziltransferazei: **Seria C**, **Seria D** și **Seria E**.

➤ **Seria C** formată din derivați de tip tiocarbonil și oximă reunește **18 compuși noi** care conțin scheletele inhibitorilor cei mai buni ai tubulinei cu modificarea conectorului, în scopul de a chelatiza atomul metalic al FTazei. Doi dintre produșii acestei familii au dovedit bună activitate de inhibare asupra ambelor ținte vizate, iar 4 oxime testate la NCI au activitate de inhibare a creșterii celulare în domeniul micromolar.

➤ Compușii **Seriei D** păstrează conectorul fenstatinei și urmăresc obținerea efectului dual prin utilizarea în aceeași moleculă a heterociclurilor fenotiazină și indolizină, structuri care s-au dovedit promițătoare atât în obținerea unor agenți antitubulină cât și anti FTază. Trei dintre cei **12 compuși noi** sintetizați au arătat activitatea duală dorită, iar la testele efectuate *in vitro* asupra celor 60 de linii celulare, unul din derivați prezintă activitate antiproliferativă la concentrație **mai mică de 3 nM** pe mai multe linii celulare canceroase. Faptul că această moleculă nu este cea mai activă din serie pe tubulină și FTază ne indică o potențială acțiune pe mai multe ținte la nivel celular.

Alături de cei 12 produși finali, cercetările efectuate în această etapă au dus la obținerea a **46 de compuși noi** ca intermediari de reacție și produși secundari.

➤ **Seria E** asociază aceleași heterocicluri ca și seria anterioară (fenotiazina și indolizina), de această dată utilizând conectorul 2-propen-1-onă prezent în calcone. Pentru 14 din cei **18 compuși noi** sintetizați inelul A fenotiazinic a fost înlocuit cu nuclee de tip fenil substituit care au arătat activitate biologică bună. Conectorul de lungime mai mare decât cel carbonilic nu s-a dovedit prielnic pentru acțiunea asupra tubulinei, în schimb a furnizat inhibitori ai FTazei foarte puternici, cei mai buni având IC_{50} de 9 nM și 23 nM.

➤ Această lucrare de doctorat descrie conceperea și sinteza a **115 produși noi nedescrși în literatură**. Toți au fost caracterizați cu ajutorul spectrelor IR, RMN (1H , ^{13}C , ^{19}F) și în unele cazuri cu difracție de raze X și spectre de masă.

➤ Produșii finali au fost evaluați biologic *in vitro* pentru capacitatea de inhibare a polimerizării tubulinei, a FTazei și pentru abilitatea de a inhiba creșterea celulelor canceroase. Produsul cel mai activ asupra celulelor canceroase (**GI_{50} mai mic de 3 nM**) are în structură un heterociclu indolizinic și unul fenotiazinic unite printr-un conector carbonilic. Cel mai puternic inhibitor al FTazei unește aceleași heterocicluri printr-o punte de tip calconă (**$IC_{50}(FTază) = 9$ nM**), iar cel mai activ agent de inhibare a polimerizării tubulinei (**$IC_{50}(Tubulină) = 395$ nM**) conține un ciclu A clasic, ciclul B de tip aminofenil unite printr-un conector de tip tiocarbonil.

- Cinci dintre produșii finali au prezentat activitatea duală dorită, iar dintre aceștia, cei testați pe celulele canceroase au dovedit o bună activitate citotoxică.
- Cercetările ce vor fi întreprinse în continuare urmăresc, pe de o parte, optimizarea reacțiilor de acilare în prezența reactivului lui Eaton și, pe de altă parte, utilizarea relațiilor structură-activitate dobândite pentru sinteza de agenți duali mai puternici. Aceasta va consta, printre altele, în utilizarea noilor cicluri A și B găsite ca fiind active în sinteza de noi produși anticancer.
- O parte din rezultatele prezentate fac obiectul **articolelor**:
 - *Studies on phenothiazines: New microtubule-interacting compounds with phenothiazine A-ring as potent antineoplastic agents* Alina Ghinet, Iuliana-Monica Moise, Benoît Rigo, Germain Homerin, Amaury Farce, Joëlle Dubois, Elena Bîcu, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2016**, 24(10), 2307-2317.
 - *New indolizine-chalcones as potent inhibitors of human farnesyltransferase: design, synthesis and biological evaluation* Iuliana-Monica Moise, Alina Ghinet, Dalila Belei, Joëlle Dubois, Amaury Farce, Elena Bîcu, *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, **2016**, 26(15), 370-3734.
 - *Methylene versus Carbonyl Bridge in the Structure of New Tubulin Polymerization Inhibitors with Tricyclic A-Rings* Iuliana-Monica Moise, Elena Bîcu, Joëlle Dubois, Amaury Farce, Benoît Rigo, Alina Ghinet acceptată la *Bioorganic and Medicinal Chemistry, Accepted Manuscript*.

scurtelor comunicări:

- Iuliana Moise, Alina Ghinet, Sergiu Shova, Elena Bicu, *Synthèse inattendue des nouvelles aza-indolizino-indolizines*, 3^{ème} Colloque Franco- Roumain de Chimie Medicinale, Iași (România), **2014**.
- Iuliana Moise, Alina Ghinet, Benoît Rigo, Elena Bicu, *Conception et synthèse de nouveaux analogues de la phenstatine comme agents antitumoraux*, Journées Jeunes Chercheurs HEI, Lille (Franța), **2015**.

și posterelor:

- Iuliana Moise, Elena Bîcu, Philippe Gautret, Benoît Rigo, Joëlle Dubois, Alina Ghinet, *Synthesis and antitubulin activity of new analogues of phenstatin with a*

phenothiazine A-ring 27^{emes} Journées Franco-Belges de Pharmacochimie/21^{emes} Conférences Européennes du GP2A, Lille (France), 5-7 iunie **2013**.

- Iuliana Moise, Alina Ghinet, Elena Bîcu, *Synthesis and antitubulin activity of new analogues of phenstatin*, Sesiunea de comunicări științifice a studenților, masteranzilor și doctoranzilor, Iași (România), 28 iunie **2013**.
- Iuliana Moise, Alina Ghinet, Dalila Belei , Elena Bicu, *Development of new indolizine derivatives with chalcone bridge as combretastatin analogs*, 22^{émes} Journées Jeunes Chercheurs, Paris (Franța), 4-6 februarie **2015**.
- Iuliana Moise, Alina Ghinet, Dalila Belei , Elena Bicu, *New indolizine derivatives as anticancer agents: synthesis and biological evaluation*, Journées Jeunes Chercheurs HEI, Lille (Franța), 26 martie **2015**.
- Iuliana Moise, Elena Bicu, Benoît Rigo, Joëlle Dubois, Alina Ghinet, *Synthesis and anticancer evaluation of new phenstatin analogs with a modified connector*, 23^{émes} Journées Jeunes Chercheurs, Lille (Franța), 15-17 februarie **2016**.
- Iuliana Moise, Elena Bicu, Benoît Rigo, Joëlle Dubois, Alina Ghinet, *Anticancer activity of newly synthesized phenstatin analogs bearing a modified connector* Journées Jeunes Chercheurs HEI, Lille (Franța), 31 martie **2016**.

Bibliografie selectivă

1. Site-ul Coriell Personalized Medicine - Genetic Education.
2. Site- ul Organizației Mondiale a Sănătății consultat 1 august 2015.
7. Hamel E. *Med. Res. Rev.* **1996**, *16*, 207-231.
29. Liou, J. P.; Chang, J.Y.; Chang, C.W.; Chang, C.Y.; Mahindroo, N.; Kuo, F.M.; Hsieh, H.P. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2897-2905.
59. Ghinet, A.; Abuhaie, C.-M.; Gautret, P.; Rigo, B.; Dubois, J.; Farce, A.; Belei, D.; Bîcu, E. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *89*, 115–127.
84. Ghinet, A.; Tourteau, A.; Rigo, B.; Stocker, V.; Leman, M.; Farce, A.; Dubois, J.; Gautret, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 2932–2940.
85. Prinz, H.; Chamasmani, B.; Vogel, K.; Böhm, K. J.; Aicher, B.; Gerlach, M.; Günther, E. G.; Amon, P.; Ivanov, I.; Müller, K. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4247–4263.
86. Abuhaie, C.-M.; Bîcu, E.; Rigo, B.; Gautret, P.; Belei, D.; Farce, A.; Dubois, J.; Ghinet, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 147–152.
96. Zhang, J.; Jiang, X.; Jiang, Y.; Guo, M.; Zhang, S.; Li, J.; He, J.; Liu, J.; Wang, J.; Ouyang, L. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *108*, 495-504.
97. Yin, S.; Tang, C.; Wang, B.; Zhang, Y.; Zhou, L.; Xue, L.; Zhang, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *120*, 26-36.
98. Lei, F.; Sun, C.; Xu, S.; Wang, Q.; OuYang, Y.; Chen, C.; Xia, H.; Wang, L.; Zheng, P.; Zhu, W. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *116*, 27–35.
108. Ghinet, A. *Teză de doctorat*, Université de Lille 2, 2010.
109. O’Brate, A. M.; Marcus, A. I.; Buey, R.; Zhou, J.; Thomas, S. L.; Khuri, F. R.; Andreu, J. M.; Diaz, F.; Giannakakou P. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* **2006**, *47*, 3803.
110. Marcus, A. I.; Zhou, J.; O’Brate, A. M.; Hamel, E.; Wong, J.; Nivens, M.; El-Naggar, A.; Yao, T. P.; Khuri, F. R.; Giannakakou P. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 3883-3893.
111. Taylor, S. A. ; Marrinan, C. H.; Liu, G.; Nale, L.; Bishop, W. R.; Kirschmeier, P.; Liu, M.; Long, B. J. *Gynecol. Oncol.* **2008**, *109*, 97-106.
112. Marcus, A. I.; O’Brate, A. M.; Buey, R.; Zhou, J.; Thomas, S. L.; Khuri, F. R.; Jose Andreu, J. M.; Diaz, F.; Giannakakou P. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 8838–8846.
162. Abuhaie, C. M.; Ghinet, A.; Farce, A.; Dubois, J.; Gautret, P.; Rigo, B.; Belei, D.; Bîcu, E. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *59*, 101-110.

188. Messaoudi, S.; Hamze, A.; Provot, O.; Tréguier, B.; De Losada, J. R.; Bignon, J.; Liu, J.-M.; Wdzieczak-Bakala, J.; Thoret, S.; Dubois, J.; Brion, J.-D.; Alami, M. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 488-497.
189. Nickel, H. C.; Schmidt, P.; Böhm, K. J.; Baasner, S.; Müller, K.; Gerlach, M.; Unger, E.; Günther, E. G.; Prinz, H. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3420-3438.
190. Getahun, Z.; Jurd, L.; Chu, P. S.; Lin, C. M.; Hamel, E. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1058-1067.
191. Jurd, L.; Narayanan, V. L.; Paull, K. D. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1752-1756.
192. La Regina, G.; Sarkar, T.; Bai, R.; Edler, M. C.; Saletti, R.; Coluccia, A.; Piscitelli, F.; Minelli, L.; Gatti, V.; Mazzoccoli, C.; Palermo, V.; Mazzoni, C.; Falcone, C.; Scovassi, A. I.; Giansanti, V.; Campiglia, P.; Porta, A.; Maresca, B.; Hamel, E.; Brancale, A.; Novellino, E.; Silvestri, R. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7512-7527.
193. Vine, K. L.; Locke, J. M.; Ranson, M.; Pyne, S. G.; Bremner, J. B. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5109-5117.
194. Sun, Y.; Pandit, B.; Chettiar, S. N.; Etter, J. P.; Lewis, A.; Johnsamuel, J.; Li, P.-K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 4465-4468.
195. Kamal, A.; Hussaini, S. M.; Faazil, S.; Poornachandra, Y.; Narender Reddy, G.; Kumar, C. G.; Rajput, V. S.; Rani, C.; Sharma, R.; Khan, I. A.; Jagadeesh Babu, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 6842-6846.
222. Dumea, C.; Belei, D.; Ghinet, A.; Dubois, J.; Farce, A.; Bîcu, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 5777-5781.
224. Praveen Rao, P.N.; Amini, M.; Li, H.; Habeeb, A.G.; Knaus, E.E. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4862-4882.
225. Copar, A.; Stanovnik, B.; Tisler, M. *J. Heterocycl. Chem.* **1993**, *30*, 1577-1579.
226. Dega-Szafran, Z.; Schroeder, G.; Szafran, M.; Szwajca, A.; Lesca, B.; Lewandowska, M. *J. Mol. Struct.* **2000**, *555*, 31-42.
227. Chen, P.; Chaikuad, A.; Bamborough, P.; Bantscheff, M.; Bountra, C.; Chung, C.; Fedorov, O.; Grandi, P.; Jung, D.; Lesniak, R.; Lindon, M.; Müller, S.; Philpott, M.; Prinjha, R.; Rogers, C.; Selenski, C.; Tallant, C.; Werner, T.; Willson, T. M.; Knapp, S.; Drewry, D. H. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 1410-1424.
228. Kakehi, A.; Ito, S.; Hashimoto, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1996**, *69*, 1769.