

UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI
FACULTATEA DE CHIMIE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE CHIMIE

***SINTEZA ȘI PROPRIETĂȚILE BIOLOGICE ALE
UNOR NOI DERIVAȚI CU SCHELET
AZAHETEROCICLIC***

Rezumatul tezei de doctorat

**Conducător de doctorat:
Prof. univ. dr. Ionel MANGALAGIU**

**Student-doctorand:
Lăcrămioara-Elena TIRU (căs. Popovici)**

2018

Mulțumiri

Odată cu finalizarea acestei etape din viața mea, îmi doresc să adresez câteva cuvinte de mulțumire celor care m-au îndrumat sau mi-au acordat suportul pe parcursul acestei lucrări de doctorat.

*În primul rând, îmi doresc să mulțumesc coordonatorului științific, domnului **Prof. dr. Ionel Mangalagiu**, pentru permanenta sa îndrumare, sprijinire și încurajare de-a lungul perioadei de pregătire a doctoratului și de elaborare a tezei.*

*În egală măsură, doresc să îi mulțumesc doamnei **Conf. dr. Ramona Danac**, care m-a sprijinit în mod constant pe toată perioada studiilor doctorale, fără sprijinul dumneavoastră nu aș fi putut realiza această teză.*

*În continuare, doresc să îmi exprim gratitudinea față de **membrii comisiei de evaluare** a lucrării pentru toate sfaturile pertinente și constructive, oferite pe perioada corectării tezei de doctorat.*

*Mulțumesc doamnei **Catalina Ciobanu** pentru ajutorul oferit în înregistrarea spectrelor RMN.*

*Aș dori să mulțumesc **Dr. Cristina AL-Matarneh, Lect. Dr. Dorina Mantu, Lect. Dr. Vasilichia Antoci**, colegilor **Drd. Anda Olaru, Drd. Monica Sardaru**, pentru înțelegerea și sprijinul acordate pe durata studiilor.*

*Mulțumesc **dr. Roxana Amarandi** pentru ajutorul oferit în realizarea și interpretarea studiilor de doking molecular.*

*Mulțumesc de asemenea doamnelor **dr. ing. Fulga Tanase și ing. Mariana Aioanei** pentru sprijinul acordat.*

Mulțumesc în mod deosebit, familiei mele, soțului și fiului meu care m-au ajutat necondiționat, mamei și surorii mele pentru atenția, îndrumarea, dragostea și iubirea acordate de-a lungul întregii mele vieți.

Dedic această lucrare memoriei tatălui meu

Cuprins

Introducere.....	2
I. Sinteza și proprietățile derivaților cu structură condensată pirolheterociclică.....	5
I.1. Sinteza și proprietățile pirolpiridazinelor.....	5
I.1.1. Sinteza pirolpiridazinelor prin reacții de ciclizare intramoleculară..	5
I.1.2. Sinteza pirolpiridazinelor prin reacții de cicloadiție 3+2 dipolară....	7
I.1.3. Sinteza pirolpiridazinelor prin alte reacții de ciclizare.....	11
I.2. Sinteza și proprietățile piroloftalazinelor.....	13
I.3. Sinteza și proprietățile indolizinelor.....	18
I.3.1. Sinteza indolizinelor cu ajutorul reacției Cicibabin și adaptări ale acesteia.....	19
I.3.2. Sinteza indolizinelor prin ciclizarea intramoleculară cu ajutorul anhidridei acetice.....	20
I.3.3. Sinteza indolizinelor prin reacții de cicloadiție.....	21
I.3.4. Sinteza indolizinelor prin închiderea ciclului în pozițiile 3,4.....	26
I.3.5. Alte metode de sinteză ale indolizinelor.....	28
I.4. Sinteza și proprietățile biologice ale pirolpirimidinelor.....	32
I.4.1. Sinteza derivaților pirol[1,2- <i>c</i>]pirimidinici din derivați pirolici.....	34
I.4.2. Sinteza derivaților pirol[1,2- <i>c</i>]pirimidinici din derivați pirimidinici	35
I.5. Sinteza și proprietățile pirolpirazinelor.....	39
I.5.1. Sinteza 5H-pirol[2,3- <i>b</i>]pirazinelor.....	40
I.5.2. Sinteza pirol[1,2- <i>a</i>]pirazinelor.....	42
I.6. Sinteza și proprietățile pirolfenantrolinelor.....	46
II.1. Obiective.	53
II.2. Sinteza și evaluarea activității anticanceroase a unor noi derivați cu structură pirol[1,2- <i>b</i>]piridazinică și pirol[2,1- <i>a</i>]ftalazinică.....	58
II.2.1. Sinteza unor derivați cu structură pirol[1,2- <i>b</i>]piridazinică.....	58

II.2.2. Sinteza unor derivați cu structură pirolo[2,1- <i>a</i>]ftalazinică.....	66
II.2.3. Evaluarea activității anticanceroase a derivaților cu structură pirolo[1,2- <i>b</i>]piridazinică și pirolo[2,1- <i>a</i>]ftalazinică.....	71
II.2.4. Modelare moleculară.....	76
II.2.5. Concluzii.....	81
II.3. Sinteza și evaluarea activității anticanceroase a unor noi derivați cu structură indolizinică, pirolo[1,2- <i>c</i>]pirimidinică, pirolo[1,2- <i>b</i>]pirazinică, pirolo[1,2- <i>i</i>][1,7]fenantrolinică, pirolo[2,1- <i>c</i>][4,7]fenantrolinică și pirolo[1,2- <i>a</i>][1,10]fenantrolinică.....	82
II.3.1. Sinteza unor derivați de tip indolizinic.....	82
II.3.2. Sinteza unor derivați de tip pirolo[1,2- <i>c</i>]pirimidinic.....	86
II.3.3. Sinteza unor derivați de tip pirolo[1,2- <i>b</i>]pirazinic.....	92
II.3.4. Sinteza unor derivați de tip pirolo[1,2- <i>i</i>][1,7]fenantrolinic, pirolo[2,1- <i>c</i>][4,7] fenantrolinic și pirolo[1,2- <i>a</i>][1,10]fenantrolinic.....	97
II.3.5. Evaluarea activității anticanceroase a derivaților cu structură indolizinică, pirolo[1,2- <i>c</i>]pirimidinică, pirolo[1,2- <i>b</i>]pirazinică, pirolo[1,2- <i>i</i>][1,7]fenantrolinică, pirolo[2,1- <i>c</i>][4,7]fenantrolinică și pirolo[1,2- <i>a</i>][1,10]fenantrolinică.....	104
II.3.6. Modelare moleculară.....	109
II.3.7. Concluzii.....	111
II.4. Derivați de 7-(piridin-4-il)indolizină ca intercalatori ADN și coloranți fluorescenți sensibili la pH.....	113
II.4.1. Introducere.....	113
II.4.2. Sinteza derivatului 7-(piridin-4-il)indolizinic conținând restul antraceni.....	114
II.4.3. Studii spectroscopice.....	119

II.4.4. Interacțiunile dintre compușii 39a și 44 cu acizi nucleici în soluție apoasă.....	122
II.4.5. Studii de modelare moleculară.....	125
II.4.6. Concluzii.....	127
II.5. Concluzii generale.....	128
III. PARTE EXPERIMENTALĂ.....	131
III.1. Procedeele de obținere a compusului 2b	132
III.2. Procedeele generale pentru prepararea compușilor 3a-c	133
III.3. Procedeele generale pentru prepararea compușilor 9a-u , 16a-d , 17a-d , 21a-d și 24a-d	133
III.4. Procedeele generale pentru prepararea compușilor 12a-d	142
III.5. Procedeele generale pentru prepararea compușilor 29a-d , 30a-d și 31c-d	144
III.6. Procedeele generale pentru prepararea compușilor 10a-t și 13a-d	146
III.7. Procedeele generale pentru prepararea compușilor 18a-d , 19a-d , 22a-d , 25a-d , 32a-d , 33a-d și 34c-d	154
III.8. Procedeele de obținere a compușilor 37a-b	161
III.9. Procedeele pentru obținerea 3-benzoil-N-(prop-2-in-1-il)-7-(piridin-4-il)indolizin-1-carboxamidei 39a	162
III.10. Procedeele de obținere pentru 9-(azidometil)antracenui 43	163
III.11. Procedeele de obținere a N-((1-(antracen-9-ilmetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3-benzoil-7-(piridin-4-il) carboxamidei 44	163
III.12. Procedeele de realizare a testului de electroforeză pe gel de agaroză pentru determinarea legării compușilor 39a și 44 de sADN.....	164
Bibliografie.....	165
Anexa 1. Lucrări publicate.....	174
Anexa 2. Activitate biologică.....	182

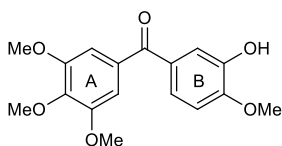
Introducere

Tumorile canceroase sunt considerate cauza principală a deceselor în întreaga lume. Deoarece celulele canceroase sunt mai susceptibile la replicare față de celulele normale, cercetările cu privire la terapia cancerului sunt conduse către studiul proceselor de inhibare a diviziunii celulare de către majoritatea agenților chimioterapeutici. În ultimii ani eforturile s-au concentrat pe design-ul și descoperirea de noi medicamente care să posede eficiență antitumorală îmbunătățită, toxicitate scăzută, un cost final cât mai accesibil și care să fie cât mai puțin predispuse la dezvoltarea rezistenței la tratament¹⁻³.

În lupta acerbă a omului împotriva cancerului se folosesc medicamente care acționează țintit, țintele alese fiind variate (ADN-ul sau ARN-ul, diverse enzime sau proteine, procesul de angiogeneză, etc).

Unul dintre mecanismele de acțiune considerat a avea potențial în design-ul medicamentelor anticanceroase, este cel de inhibare a polimerizării tubulinei⁴⁻⁷.

Una dintre cele mai simple structuri sintetizate care a arătat proprietăți de inhibare a polimerizării tubulinei prin legarea la situsul colchicinic al acesteia, este fenstatina (Figura I.1)^{12,13}. Datorită proprietăților biologice pe care le posedă și a simplității structurale a moleculei, fenstatina continuă să fie un bun reper pentru numeroase cercetări privind sinteza și proprietățile unor analogi ai acesteia, raportate în ultimii ani¹⁴⁻¹⁸.



Fenstatina

Figura I.1. Structura fenstatinei

Derivații fuzionați pirolo-heterociclici însumează o clasă de compuși cu reprezentanți biologici activi care par să fie molecule promițătoare în dezvoltarea de medicamente antitumorale, antimicrobiale, antivirale, antimalarice, antituberculoase, antiinflamatorii sau cu acțiune inhibitorie pentru enzime¹⁷.

Înlocuirea unuia dintre ciclurile fenstatinei (Figura I.1) cu diverși pirolo-heterocicli a reprezentat în ultimii ani una din direcțiile atractive pentru descoperirea de noi molecule cu acțiune antitumorală. Astfel, în literatura de specialitate există rapoarte asupra sintezei și proprietăților unor compuși analogi ai fenstatinei care posedă un ciclu indolic^{5,17}, indolizinic⁴² sau a unui sistem pirolo[2,3-*d*]pirimidinic⁴³. Până în prezent însă nu au fost raportați analogi ai fenstatinei în care unul dintre ciclurile **A** sau **B** ale acesteia (Figura I.1) să fie înlocuit cu cicluri pirolo[1,2-*b*]piridazine, pirolo[2,1-*a*]ftalazine, 7-(piridin-4-il)-indolizinică, pirolo[1,2-*c*]pirimidinică, pirolo[1,2-*a*]pirazinică sau pirolo-fenantrolinică.

Astfel, în prezenta lucrare ne-am propus sinteza de noi analogi ai fenstatinei care să conțină astfel de sisteme în locul ciclului **B** al acesteia, precum și testarea proprietăților biologice (anticanceroase) ale acestora.

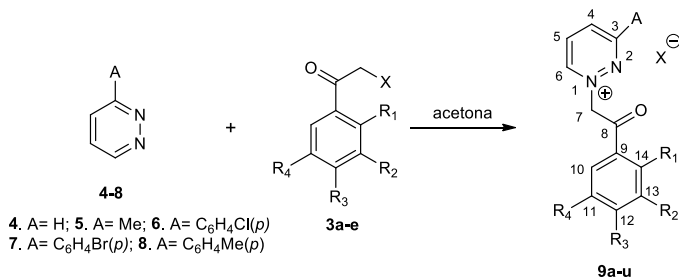
Am ales ca heterocicluri care să înlocuiască unul dintre ciclurile fenstatinei: pirolo[1,2-*b*]piridazina, pirolo[2,1-*a*]ftalazina, pirolo[1,2-*c*]pirimidina, pirolo[1,2-*a*]pirazina, respectiv diverse pirolo-fenantroline și derivați 7-(piridin-4-il)-indolizini, atât datorită faptului că există numeroase studii recente care arată proprietăți biologice interesante ale acestora, cât și datorită posibilității de a fi sintetizați prin intermediul reacțiilor de cicloadiție 3+2 dipolare a ilidelor generate *in situ* de sărurile monocuaternare de piridiniu, pirimidiniu, piraziniu, pirimidiniu, ftalaziniu, respectiv fenantroliniu, domeniu de tradiție al Colectivului de Chimie Organică din cadrul Facultății de Chimie a Universității „Al. I. Cuza” din Iași.

Un alt obiectiv propus în cadrul acestei teze a fost obținerea de derivați cu structură indolizinică substituiți cu substituenți care conțin o grupare antracenil și realizarea unui studiu privind interacțiunea cu ADN-ul a unor compuși cu structură indolizinică.

II.2. Sinteza și evaluarea activității anticancerose a unor noi derivați cu structură pirolo[1,2-*b*]piridazinică și pirolo[2,1-*a*]ftalazinică

II.2.1. Sinteza unor derivați cu structură pirolo[1,2-*b*]piridazinică

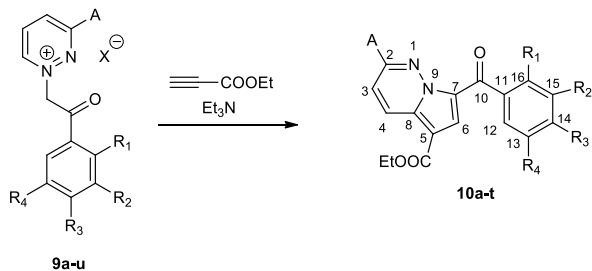
Sărurile de piridazin-1-*iu* **9a-u** au fost sintetizate prin reacția directă dintre piridazinele **4-8** și 2-halogeno-acetofenonele **3a-e** (Schema II.3). Precizăm că piridazinele **6-8** au fost sintetizate anterior în grupul dlui. prof. Ionel Mangalagiu^{18,23,24}, iar piridazinele **4** și **5** se găsesc disponibile comercial.



Schema II.3. Reacția de sinteză a sărurilor de piridazin-1-*iu*

Structura sărurilor **9a-u** a fost dovedită cu ajutorul spectroscopiei IR, ¹H-RMN și ¹³C-RMN.

Pentru obținerea derivaților pirolpiridazinică corespunzători, s-au efectuat reacții de cicloadiție 3+2 dipolară a ilidelor obținute *in situ* în mediu bazic din sărurile monocuaternare **9a-u** la propiolatul de etil (Schema II.4).



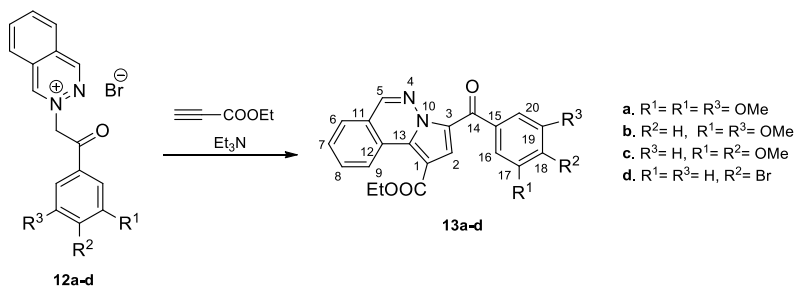
Schema II.4. Sinteza compuşilor cu structură pirolpiridazinică **10a-t**

În urma reacției, au fost obținuți compușii aromatizați cu structura piropiridazinică **10a-t**, structura acestora fiind dovedită cu ajutorul spectroscopiei IR, $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$, dar și prin analiza spectrelor de corelație $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, $^1\text{H-}^{13}\text{C-HMQC}$ și $^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$.

II.2.2. Sinteza unor derivați cu structură pirolo[2,1-a]ftalazinică

În continuare, într-o manieră similară celei prezentate anterior, am realizat și sinteza sărurilor **12a-d**.

Pentru obținerea derivaților piroloftalazinici doriți, s-au efectuat reacții de cicloadiție 3+2 dipolară a ilidelor obținute *in situ* corespunzătoare sărurilor **12a-d** la propiolatul de etil (Schema II.6). În urma reacției, au fost obținuți compușii aromatizați cu structura piroloftalazinică **13a-d**, structura acestora fiind dovedită cu ajutorul spectroscopiei IR, $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$, dar și prin analiza spectrelor de corelație $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, $^1\text{H-}^{13}\text{C-HMQC}$ și $^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$.



Schema II.7. Reacția de obținere a compușilor cu structură piroloftalazinică **13(a-d)**

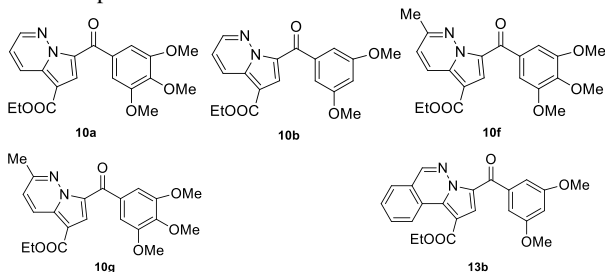
II.2.3. Evaluarea activității anticanceroase a derivaților cu structură pirolo[1,2-*b*]piridazinică și pirolo[2,1-*a*]ftalazinică

Dintre analogii sintetizați, paisprezece compuși (**10a**, **10b**, **10d**, **10f**, **10g**, **10i**, **10j**, **10k**, **10l**, **10o**, **10r**, **13a**, **13b**, **13c**) au fost selectați de Institutul National de Cancer (NCI) din SUA pentru primul stadiu de testări pe cele 60 de linii celulare tumorale umane la o singură concentrație de 10 μ M.

Datorită capacității excelente de a inhiba creșterea celor mai multe dintre liniile celulare, compușii **10a**, **10b**, **10f**, **10g** și **13b** au fost selectați pentru a doua etapă de testare constând în efectuarea de măsurători ale inhibării creșterii celulare tumorale la 5 concentrații diferite. Rezultatele relevante obținute sunt prezentate în tabelul II.2.

Toti cei cinci compuși testați au confirmat rezultatele preliminare din prima fază de testări, arătând o bună acțiune antiproliferativă. Cel mai bun candidat, 2-metil-pirolo[1,2-*b*]piridazina **10f** a arătat valori GI_{50} (concentrația molară a compușilor la care se observă o activitate inhibatorie de 50% a creșterii celulelor tumorale) < 100 nM împotriva a treisprezece linii celulare. Cele mai bune rezultate au fost înregistrate împotriva celulelor cancerului de piele MDA-MB-435 ($GI_{50} = 25.6$ nM), a celor leucemice SR ($GI_{50} = 48.1$ nM) și împotriva celulelor MCF7 ($GI_{50} = 48.1$ nM) aparținând cancerului de sân.

Tabelul II.2. Procentul de inhibare a creșterii celulare (GI₅₀) pentru compușii **10a**, **10b**, **10f**, **10g** și **13b** la testarea pe 60 de linii celulare tumorale



Tip de cancer/linie celulară	Compus/Procentul de inhibare GI ₅₀ (nM)					
	Fenstatină	10a	10b	10f	10g	13b
<i>Leucemie</i>						
SR	-	46.1	573	48.1	75.9	442
<i>Cancer de colon</i>						
HCT-15	-	171	587	84.4	280	484
KM12	-	216	n.d.	57.7	254	351
SW-620	-	155	518	68.7	280	483
<i>Cancer cerebral</i>						
SF-295	52 ³⁹	180	2100	65.7	311	483
<i>Cancer de piele</i>						
MDA-MB-435	-	31.4	221	25.6	45.6	188
SK-MEL-5	-	269	508	58.5	276	623
UACC-62		176	523	61.5	477	692
<i>Cancer ovarian</i>						
OVCAR-3	2.0 ⁴	145	402	64.9	289	341
<i>Cancer renal</i>						
A498	380 ⁴	46.6	n.d.	76.2	388	n.d.
<i>Cancer de sân</i>						
MCF7	437 ⁴ /34 ¹³	94.6	1310	48.1	313	410
MDA-MB-468	-	281	1110	66.8	297	403

^a Date obținute de către NCI la testarea *in vitro* pe 60 de linii celulare la cinci concentrații

^b GI₅₀ – concentrația molară a compușilor la care se observă o activitate inhibitorie de 50% a creșterii celulelor tumorale.

^c n.d. – Nedeterminat

Chiar dacă în medie, acțiunea inhibitorie exercitată de compusul **10a** este mai redusă decât cea a compusului 2-metil substituit **10f**, acesta arată o selectivitate mai bună și o excelentă acțiune de inhibare a creșterii împotriva celulelor MDA-MB-435 (cancer de piele) cu o valoare $GI_{50} = 46.1$ nM și a celor de cancer renal A498 cu o valoare $GI_{50} = 46.6$ nM. De asemenea, și compusul **10g** a arătat o foarte bună activitate antiproliferativă și selectivitate împotriva celulelor MDA-MB-435 (cancer de piele) cu o valoare $GI_{50} = 45.6$ nM.

Activitate citotoxică semnificativă a fost înregistrată doar în cazul compusului **10a** împotriva liniei celulare MDA-MB-435 (cancer de piele) cu o valoare LC_{50} (concentrația la care se înregistrează un procent de mortalitate a celulelor de 50%) de 438 nM.

Deși pirolo[2,1-*a*]ftalazina **13b** a arătat cea mai bună acțiune inhibitorie medie în prima etapă de evaluare (tabel II.1), în cazul acesteia nu s-au obținut valori GI_{50} sub 100nM, așa cum a fost în cazul celorlalți compuși cu structură mai simplă pirolo[1,2-*b*]piridazinică. Introducerea unui heterociclu mai voluminos cum este cel pirolo[2,1-*a*]ftalazinic în locul ciclului 3'-hidroxi-4'-metoxifenil (ciclul **A**) al fenstatinei se pare că nu este favorabil în ceea ce privește activitatea antiproliferativă.

Se observă de asemenea că pe anumite linii celulare activitatea inhibitorie înregistrată în cazul compușilor testați este similară sau chiar mai mică decât cea raportată în cazul fenstatinei.

II.2.4. Modelare moleculară

Deoarece atât modelele computaționale cât și datele biologice ale analogilor de fenstatină conținând ciclul **A** 3,4,5-trimetoxifenilic susțin ipoteza că efectele antiproliferative ale acestor compuși sunt induse prin inhibarea polimerizării tubulinei,^{5,9,153,154} am presupus că și compușii nou sintetizați cu activitate biologică relevantă prezentați aici acționează printr-un procedeu molecular similar.

Astfel, în scopul determinării posibilității ca acești compuși să prezinte activitate antiproliferativă prin acțiunea asupra procesului de polimerizare a tubulinei, s-au realizat studii teoretice de docking molecular în Autodock Vina¹⁵⁵, utilizând o cușcă de 18x22x22 Å³ centrată la situsul colchicinic de legare a heterodimerului α , β -tubulină (PDB: 1SA0)¹⁵⁶. Astfel se pot evalua forma și complementaritatea electrostatică între liganzi și interfața heterodimerului α , β -tubulină, care ar putea explica observarea efectelor antiproliferative ale acestora. Structurile 3D a compușilor au fost construite în programul Avogadro v1.2.0¹⁵⁷ și au fost supuse la 10000 de pași determinând energiile minime în câmpul de forță MMFF94. În urma acestor optimizări au fost generate 100 de conformații posibile pentru fiecare ligand, iar cele mai bune modele au fost alese în urma unei inspecții vizuale pentru evaluarea compatibilității rezultatelor docking generate în concordanță cu alte sisteme docking cunoscute ale colchicinei (cu proprietăți inhibitorii). Graficele moleculare și analizele vizuale au fost realizate cu PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.2. (Schrödinger, LLC). Valorile LogP au fost calculate utilizând serverul ChemAxon/Chemicalize¹⁵⁸ (www.chemicalize.com)

Compușii **10a** și **10b** au prezentat conformații similare de legare grupate în două categorii distincte, ambele având subunitatea trimetoxifenil suprapusă cu cea a ligandului DAMA colchicină co-cristalizat (Figura II.16.a) și interacționează cu tubulina prin legături de hidrogen cu β Cys241. Liganzii sunt în continuare stabiliizați în punctul de legare prin interacțiuni hidrofobe cu β Leu242, β Leu248, β Ala250, β Leu252, β Leu255 și β Val238.

Gruparea diazinică este fie așezată pe partea de sus a punctului de legare, având gruparea funcțională orientată spre interfața cu dimerul (Figura II.16.b și Figura. II.16.c) sau este răsturnată la aproximativ 180°, pentru a avea gruparea esterică suprapusă cu al treilea inel de colchicină în structura cristalină. Interesant este faptul că compusul 4-bromosubstituit **10d**, care prezintă o activitate biologică mai puțin pronunțată decât compuşii **10a** și **10b**, a adoptat o conformație în care gruparea *p*-bromofenil a fost

încapsulată mai adânc în situsului de legare a colchicinei, având ca rezultat o schimbare în poziția heterociclului central față de centrul situsului de legare din colchicină, ceea ce a dus la întreruperea legăturilor de hidrogen cu β Cys241 (Figura II.17.d).

În general, experimentele de modelare moleculară sugerează că îndepărtarea grupării 4-metoxi nu influențează localizarea ligandului în situsul de legare, în acord cu datele biologice, în timp ce introducerea unui substituent cum este atomul de brom poate induce o conformație diferită de legare care conduce la întreruperea legăturilor de hidrogen dintre ligand și β Cys241, care ar putea să influențeze activitatea antiproliferativă redusă a compusului **10d**.

Analogii 2-metil-substituiți ai lui **10a** și **10b** (compușii **10f** și **10g**) au fost introduși în situsul de legare într-o manieră similară cu cea a compușilor de bază (Figura II.16), sugerând că introducerea unui substituent metil nu influențează modalitatea de legare a compușilor a colchicinei în situs, aceasta fiind în acord cu datele biologice. Compusul **10i**, care a prezentat o scădere marcantă a activității biologice în comparație cu compusul **10d**, nu a format cele două cluster conformaționale așteptate bine definite, ci mai degrabă are o gamă largă de poziții de interacțiune, cel mai favorizat din punct de vedere energetic fiind similar cu cel de-al doilea cluster din compusul **10d**.

Studiile moleculare pentru compușii pirolo[2,1-*a*]ftalazinici **13a-c** au arătat formarea unui singur cluster conformațional pentru fiecare compus, cluster similar celui de-al doilea obținut pentru pirolo[1,2-*b*]piridazinele **10a**, **10b**, **10f** și **10g**, în care subunitatea heterociclică este orientată astfel încât gruparea esterului să se suprapună aproximativ cu al treilea inel de colchicină din structura cristalină (Figura II.18).

Subunitatea metoxifenil este stabilizată printr-o interacțiune tip legătură de hidrogen cu β Cys241, similar cu cazul analogilor pirolo[1,2-*b*]piridazinici. Un caz diferit a fost observat pentru compusul **13b** care adoptă o conformație ce se leagă mai adânc în structura hidrofobă ceea ce induce o rotație a nucleului heterociclic și facilitează o interacțiune hidrofobă cu β Leu248, acest caz fiind unic între cei trei derivați pirolo[2,1-*a*]ftalazinici. Această particularitate ar putea explica activitatea

antiproliferativă mai pronunțată exercitată de compusul **13b** dintre cele trei pirolo[2,1-*a*]ftalazine testate.

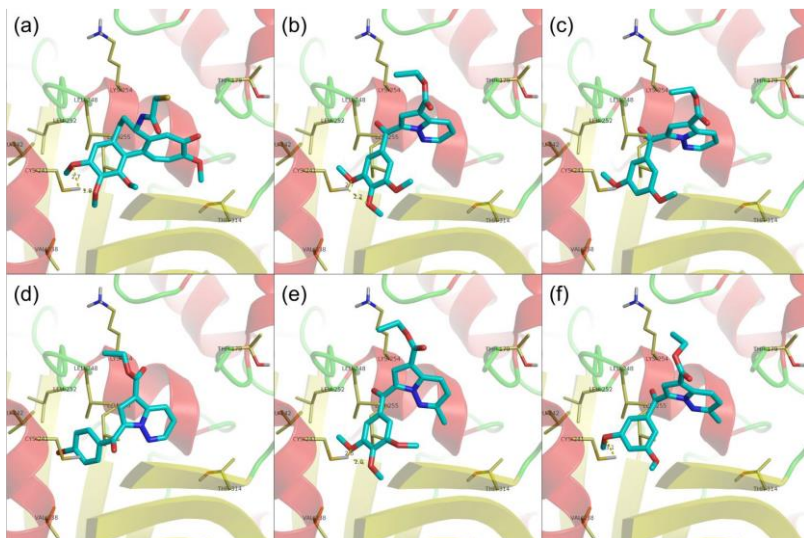


Figura II.16. Structura și interacțiunile diazinelor în situsul de legare a tubulinei: (a) DAMA-colchicină, (b) **10a**, (c) **10b**, (d) **10d**, (e) **10f**, (f) **10g**; heterodimerul de α , β -tubulină este reprezentat ca panglici; aminoacizii din locul de legare sunt reprezentați ca bastoane.

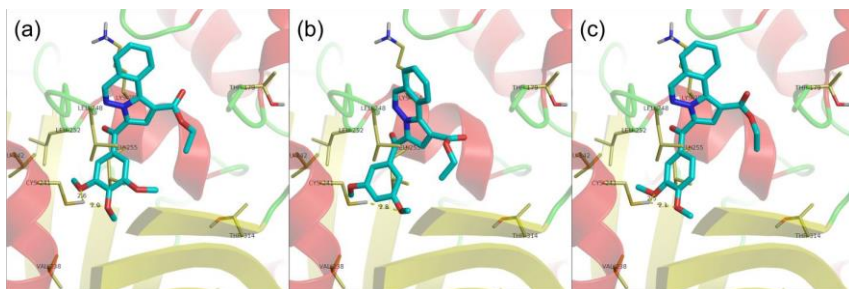
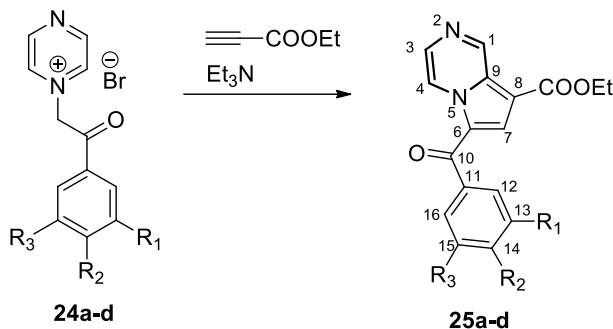


Figura II.18. Structura și interacțiunile ftalazinelor în situsul de legare a tubulinei: (a) **13a**, (b) **13b**, (c) **13c**; heterodimerul α , β -tubulină este reprezentat ca panglici; aminoacizii din situsul de legare sunt reprezentați ca bastoane.

II.3. Sinteza și evaluarea activității anticanceroase a unor noi derivați cu structură indolizinică, pirolo[1,2-*c*]pirimidinică, pirolo[1,2-*b*]pirazinică, pirolo[1,2-*i*][1,7]fenantrolică, pirolo[2,1-*c*][4,7]fenantrolică și pirolo[1,2-*a*][1,10]fenantrolică

II.3.3. Sinteza unor derivați de tip pirolo[1,2-*b*]pirazinic

Cicloadaucții cu structură pirolopirazinică **25a-d** au fost sintetizați în condiții similare din ilidele generate *in situ* corespunzătoare sărurilor de piraziniu **24a-d** (Schema II.13).



Schema II.13. Reacția de obținere a compușilor cu structură pirolopirazinică **25a-d**

II.3.5. Evaluarea activității anticanceroase a derivaților cu structură indolizinică, pirolo[1,2-*c*]pirimidinică, pirolo[1,2-*b*]pirazinică, pirolo[1,2-*i*][1,7]fenantrolică, pirolo[2,1-*c*][4,7]fenantrolică și pirolo[1,2-*a*][1,10]fenantrolică

Dintre analogii sintetizați, paisprezece compuși (**18a-b**, **18d**, **19a-b**, **22b-c**, **25b-d**, **32c**, **33a-b** și **34c**) au fost selectați de Institutul National de Cancer (NCI) din SUA pentru primul stadiu de testări pe cele 60 de linii celulare tumorale umane la o singură concentrație de 10 μM.²⁶⁸

Compușii **18a** și **34c** au fost selectați pentru stadiul al doilea de testări care constă în determinarea activității inhibitorii la cinci concentrații diferite, această testare permițând determinarea GI₅₀ (concentrația molară a compușilor la care se observă o activitate inhibitorie de 50% a creșterii celulelor tumorale), rezultatele fiind prezentate în tabelul II.5.

Compusul **18a** prezintă o activitate inhibitorie GI₅₀ < 54 nM asupra a 26 de linii celulare tumorale din cele 54 testate. O activitate excelentă se remarcă asupra celulelor de cancer de piele MDA-MB-435 (GI₅₀ < 10 nM).

Compusul **34c** prezintă în general o activitate inhibitorie mai slabă decât compusul **18a**, însă se remarcă prin valori GI₅₀ de 0.3–1 μM pe 12 dintre liniile celulare, cea mai bună activitate fiind pe celulele de cancer de piele MDA-MB-435 (296 nM).

II.3.6. Modelare moleculară

Ca și în cazul derivaților piropiridazinici și piroloftalazinici anterior prezentați, și în această serie s-au efectuat studii docking la situsul colchicinic de legare a heterodimerului α,β -tubulina (PDB: 1SA0), în cazul compușilor care au prezentat acțiune inhibitorie a creșterii celulelor tumorale.

Experimentele de docking molecular pentru compușii **18a** și **18b** au scos în evidență un singur cluster conformațional pentru fiecare compus, asemeni pirolo[1,2-*b*]piridazinelor prezentate anterior, în care subunitatea 4-metoxifenil este stabilizată printr-o interacțiune tip legătură de hidrogen cu βCys241 din situsul de legare a colchicinei. Compusul **18a** este dispus pe întreaga suprafață a situsului de legare, cu subunitatea heterociclică extinsă spre βLys254, și este stabilizat la nivelul interfaței dimerice de acest aminoacid printr-o legătură de hidrogen cu gruparea esterică (Figura II.40).

În cazul compusului **18b**, îndepărtarea grupării 4-metoxi conduce la o poziționare a nucleului heteroaromatic în așa fel încât gruparea esterică să se suprapună aproximativ cu al treilea inel de colchicină din structura cristalină, fără formarea de legături adiționale de hidrogen. Compusul 4-bromosubstituit **18d**, care prezintă o

activitate biologică mai puțin pronunțată decât compușii **18a** și **18b**, adoptă o conformație similară derivatului 2,5-dimetoxilat, însă nu formează legături de hidrogen cu aminoacizi de la nivelul situsului de legare. Prezența interacțiunilor de tip legătură de hidrogen dintre aminoacizii de la nivelul situsului de legare a colchicinei și compușii **18a** și **18b** este în concordanță cu datele biologice.

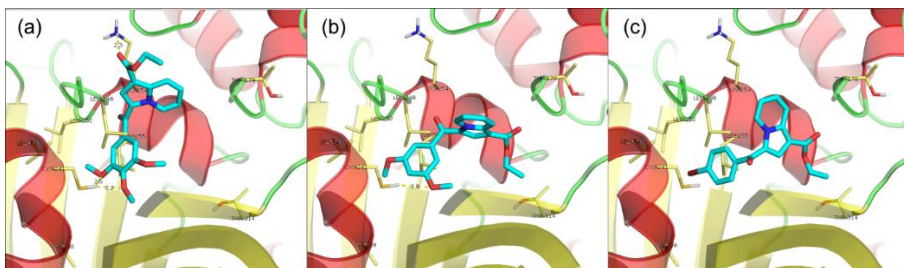


Figura II.40. Structura și interacțiunile a indolizinelor în situsul de legare a tubulinei: (a) **18a**, (b) **18b**, (c) **18d**; heterodimerul α , β -tubulină este reprezentat ca panglici; aminoacizii din situsul de legare sunt reprezentați ca bastoane, iar legăturile de hidrogen sunt reprezentate prin linii punctate

Derivatul de 1,10-fenantrolină **34c** este acomodat la nivelul situsului de legare a colchicinei asemănător compusului **33a**, având gruparea esterică aproximativ suprapusă cu al treilea inel de colchicină din structura cristalină, asemeni **18b**. Ciclul 3,4-dimetoxisubstituit este stabilizat în cavitatea de legare prin legături de hidrogen cu β Cys241, lucru reflectat prin activitatea biologică pronunțată a acestui compus.

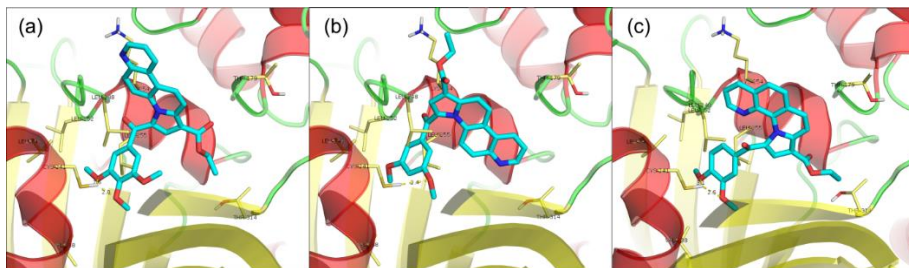


Figura II.41. Structura și interacțiunile a indolizinelor în situsul de legare a tubulinei: (a) **33a**, (b) **33b**, (c) **34c**; heterodimerul α , β -tubulină este reprezentat ca panglici; aminoacizii din situsul de legare sunt reprezentați ca bastoane, iar legăturile de hidrogen sunt reprezentate prin linii punctate

II.4. Derivați de 7-(piridin-4-il)indolizină ca intercalatori ADN și coloranți fluorescenți sensibili la pH

Acest capitol a fost realizat în colaborare cu dr. Alexandru Rotaru, din cadrul Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași.

Studii recente prezintă sinteza și structura proprietăților de emisie ale platformelor fluorescente pe bază de indolizină, denumite Seoul-Fluor¹⁶⁹, structuri care prezintă potențialul imens al derivaților de indolizină pentru aplicații în bioimagistică și ca biosenzori. Pe baza studiilor anterioare efectuate în grupul de cercetare și a progreselor recente în aplicațiile derivaților de indolizină, ne-am gândit că trăsăturile unice ale piridin-indolizinelor și structura lor plană ar putea conduce la noi aplicații ca intercalanți ai acizilor nucleici sau coloranți sensibili la pH.

În acest scop, am început să investigăm proprietățile de legare la ADN a moleculelor noastre prin variația substituenților specifici din inelul indolizinic. În special, am conceput o cale de sinteză pentru a introduce fragmentul antracenic pe scheletul de indolizină datorită proprietăților electro-optice bine cunoscute ale antracenui. În același timp, gruparea antracenic ar putea spori afinitatea de legare la

acizii nucleici, prin prezența panourilor rigide aromatice capabile să favorizeze diferite interacțiuni aromatice, oferind interacțiuni ideale cu structura elicoidală a ADN-ului.¹⁷⁰ În plus, am dorit să investigăm diferențele în proprietățile de legare la acidul nucleic a indolizinelor substituie cu antracen **A** și **B** și a precursorilor acestora care conțin numai porțiunea piridil-indolizină pentru a înțelege mai bine influența substituentului antracenic în mecanismul de legare a acidului nucleic (Figura II.42).

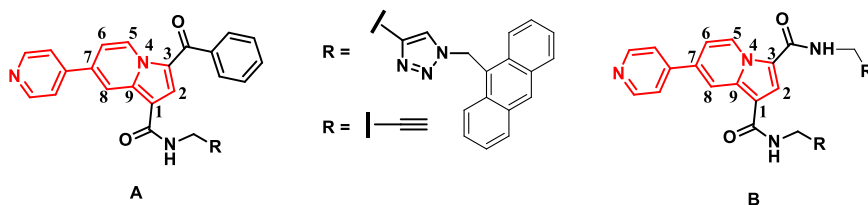


Figura II.42. Structura 7-(piridin-4-il)indolizinelor studiate

Spectrele de absorbție ale indolizinei **39a** în apă la diferite valori ale pH-ului prezintă benzi largi cu un maxim bine definit la 395 nm, cu excepția formei protonate în HCl 0.1M, care prezintă două maxime distincte la 358 nm și 415 nm (Figura II.45). Indolizina **44** (Figura II.46) prezintă benzi structurale largi, datorită prezenței fragmentului antracenic, la aproximativ 380 nm, cu variații ușoare de intensitate, cu excepția spectrului în HCl 0.1M care datorită substituentului piridinic complet protonat prezintă de asemenea un maxim mai mare la 370 nm și o bandă largă la 440 nm.

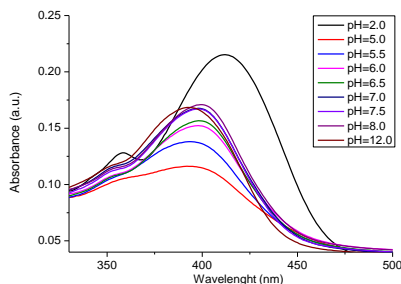


Figura II.45. Spectrele UV-Vis în apă pentru compusul **39a** la pH = 2.0 (0.1M, HCl); 5.0; 5.5; 6.0; 6.5; 7.0; 7.5; 8.0; 12.0 (0.1M, NaOH)

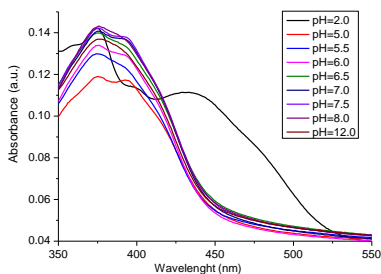


Figura II.46. Spectrele UV-Vis în apă pentru compusul **44** la pH = 2.0 (0.1M, HCl); 5.0; 5.5; 6.0; 6.5; 7.0; 7.5; 8.0; 12.0 (0.1 M, NaOH)

II.4.4. Interacțiunile dintre compușii **39a** și **44** cu acizi nucleici în soluție apoasă

În sistemele biologice, derivații de antracen se leagă intens de ADN^{175,176}, unde interacționează prin intercalare și prin legare în cavitățile minoră și majoră ale acestuia¹⁷⁷. Aceasta a constituit baza pentru utilizarea lor ca agenți chimioterapeutici. Pentru a investiga interacțiunea acizilor nucleici cu piridin-indolizinele **39a** și **44**, am efectuat analize de electroforeză pe gel de agaroză și investigații spectroscopice. Astfel, acidul deoxiribonucleic cu greutatea moleculară scăzută extras din sperma de somon (sADN) a fost utilizat ca ADN dublu catenar natural pentru a testa proprietățile de legare ale compușilor **39a** și **44** (Figura II.48).

Compușii **39a** și **44** (5 μL , 1×10^{-3} M în DMF) au fost amestecați cu soluție apoasă de ADN (40 μL , 5mg/ml) și incubăți timp de 24 de ore și apoi supuși electroforezei pe un gel de agaroză nednaturat 1,0%. Legarea compușilor **39a** și **44** cu sADN a fost vizualizată la lungimea de undă de 254 nm utilizând un sistem DNR de Bioimagică în absența (Figura II.48.A) și în prezența (Figura II.48.B) colorantului bromură de etidiu.

Dintr-o examinare a gelului din figura II.48.A, este evident că ambii compuși investigați interacționează cu sADN obținându-se spoturi de migrare cu fluorescență scăzută în banda 3 și banda 4, corespunzătoare amestecurilor de compus **39a** respectiv **44** cu sADN. Compușii nativi **39a** și **44** nu au prezentat mobilitate (liniile 2 și 5)

reprezentând spoturi fluorescente la baza gelului, în timp ce sADN nativ nu a fost vizibil în aceste condiții.

După colorarea aceluiași gel cu bromură de etidiu (Figura II.48.B), spotul de referință de migrare al ADN-ului a putut fi vizualizat (linia 1) și comparat cu spoturile de migrare similare ale amestecurilor de reacție din liniile 3 și 4, arătând natura ADN-compus organic a spoturilor fluorescente. În mod deosebit, intensitatea punctului de referință al sADN după colorare (Figura II.48.B, linia 1) este mai slabă atunci când se compară cu spoturile din liniile 3 și 4 (intensitățile spoturilor măsurate cu software-ul, datele comparative nu sunt prezentate) probabil datorită emisiilor combinate în benzile corespunzătoare atât ale bromurii de etidiu intercalate cu sADN cât și ale compușilor **39a** și **44** legați de sADN.

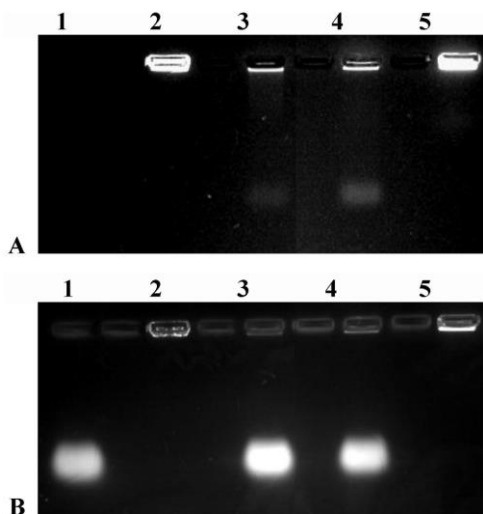


Figura II.48. Fotografii ale gelului de agaroză nedenaturat 1% care arată interacțiunea compușilor **39a** și **44** cu sADN înainte (A) și după (B) dezvoltarea gelului cu bromură de etidiu. Linia 1: sADN; Banda 2: compusul **44**; Banda 3: compusul **39a** + ADN; Banda 4: compusul **44** + ADN; Banda 5: compusul **44**.

Au fost înregistrate și spectrele UV-VIS și de fluorescență, pentru a examina și în acest mod interacțiunile compușilor **39a** și **44** cu sADN (Figura II.49).

Astfel, compușii **39a** și **44** (30 μL , 1×10^{-3} M în DMF) au fost dizolvați în soluție tampon 1xTAE (3 ml, pH 7.4) și s-au înregistrat spectrele de absorbție UV-vizibil în regiunea 600 -300 nm la 22°C înainte de adăugarea sADN, imediat după adăugarea soluției de sADN (10 μL , 5 mg/ml) și după incubarea amestecului de sADN-indolizina la temperatura camerei timp de 24 de ore. Spectrul de absorbție al compusului **39a** nu a prezentat modificări ale formei sau a intensității benzii imediat după adăugarea sADN (Figura II.49.A), diferențele putând fi observate însă după perioada de incubare de 24 de ore prin scăderea intensității benzii de absorbție.

În mod contrar, după adăugarea sADN, spectrul de absorbție al compusului **44** a prezentat modificări instantanee în forma benzii (Figura II.49.B), banda structurată specifică antracenului suferind modificări, iar după 24 de ore transformându-se într-o bandă largă cu o intensitate ușor scăzută. Aceste modificări în forma benzii de absorbție sugerează interacțiunea aproape imediată a compusului **44** cu sADN.

Diferențele comportamente în interacțiunea indolizinelor **39a** și **44** cu sADN sugerează diferențe în mecanismele de interacțiune, acestea fiind determinate de structura compușilor. Aparent, prezența porțiunii de antracen în structura indolizinei **44** facilitează interacțiunea mai ușoară cu acizii nucleici datorită afinității sale mai mari pentru ADN comparativ cu porțiunea propargil a indolizinei **39a**.

Această afirmație este susținută de diferențele dintre spectrele de emisie ale amestecurilor. În cazul compusului **39a**, adăugarea de ADN, nu a produs modificări semnificative ale formei sau intensității benzii de emisie inițiale (Figura II.49.C), diferența fiind observată numai după 24 de ore de incubare. Pe de altă parte, după adăugarea ADN la soluția compusului **44** în condiții experimentale similare, s-a observat o creștere imediată a intensității fluorescenței amestecului (Figura II.49.D), urmată de o creștere suplimentară după cele 24 de ore de incubare.

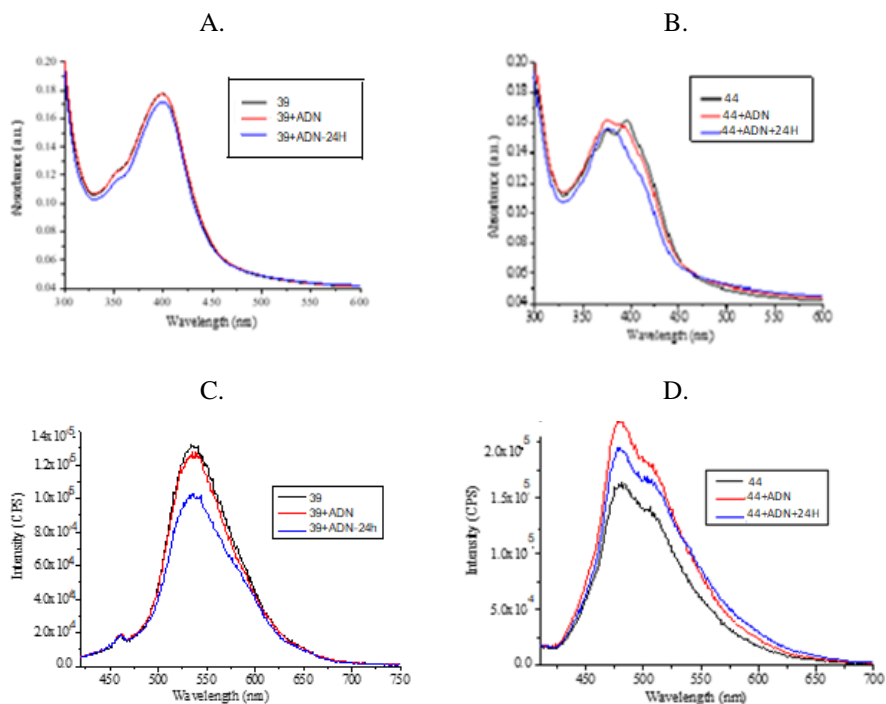


Figura II.49. Spectrele de absorbție UV-vizibil ale compușilor **39a** (A) și **44** (B) și spectrele de emisie de fluorescență ale compușilor **39a** (C) și **44** (D) înregistrate la 22 °C în soluție tampon 1xTAE pH 7.4 înainte și după adăugarea ADN-ului (0 min și 24 ore).

O posibilă explicație a intensității scăzute a fluorescenței compusului **44** înainte de adăugarea sADN ar putea fi explicată prin stingerea fluorescenței cauzată de agregarea fragmentului antracenic din structura acestuia în apă, agregare care este întreruptă în prezența unei ținte biologice (în cazul acesta, ADN-ul), ceea ce a condus la o creștere considerabilă a fluorescenței.¹⁷⁸

II.4.5. Studii de modelare moleculară

Pentru a înțelege diferențele din mecanismul de legare al compușilor **39a** și **44** la ADN, am efectuat studii de docking molecular ale sistemelor corespunzătoare. Această tehnică este o metodă computațională aplicată pentru predicția interacțiunii și afinității necovalente a macromoleculilor, sau a unei macromolecule (receptor) și a unei molecule mici (ligand), pornind de la structurile lor nelegate.¹⁷⁹ În acest studiu, pentru docking molecular s-a folosit metoda AutoDock Metoda Vina³⁰³ implementată în pachetul software YASARA Structure.¹⁸⁰

Structurile piridin-indolizinelor **39a** și **44** (liganzi) au fost mai întâi reprezentate și optimizate în teoria PM3 utilizând software-ul Hyperchem¹⁸¹ și apoi exportate în programul YASARA. Oligonucleotida (receptorul) de ADN simulat în acest studiu a fost Duda-Dickerson dodecamer d (CGCGAATTCGCG) conținând 24 de nucleotide, construită direct de programul YASARA. Programul implică o procedură de parametrizare automată (denumită "AutoSMILES") pentru structurile necunoscute, algoritmul fiind utilizat pentru a genera parametrii câmpului de forță pentru receptorul ADN și liganzi (compușii **39a** și **44**). Toate simulările moleculare au fost realizate utilizând câmpul de forță YASARA bazat pe auto-parametrizare^{182,183}. Înainte de simularea moleculară, minimizarea energiei a fost efectuată pe structurile receptorului (ADN) și liganzi. Astfel, structurile nelegate ale receptorului și liganzilor au fost optimizate mai întâi, solventul utilizat fiind apa la pH 7,4. În timpul simulărilor moleculare, receptorul a fost tratat ca structură rigidă, în timp ce liganzii au fost tratați ca molecule flexibile. Calculele (VINA) au fost efectuate folosind un număr de 100 de rulări de docking urmate de analiza clusterilor. În mod obișnuit, rezultatele de docking sunt grupate în jurul anumitor conformații, iar complexul care prezintă energia minimă din fiecare grup este salvat de programul YASARA. De reținut că două complexe aparțin unor clustere diferite dacă ligandul RMSD (deviația standard medie-pătratică) este mai mare decât o valoare minimă impusă. În această lucrare am menținut un cluster RMSD (pentru atomi grei) egal cu 5 Å. După efectuarea celor 100 de runde docking, s-

au găsit conformații complexe distincte și acestea au fost grupate în 7 clusteri pentru ligandul **44** și 9 clusteri pentru ligandul **39a**. Aceste rezultate au sugerat multiple hotspot-uri pentru legare și pentru fiecare conformer complex s-a determinat energia de legare și constanta de disociere.³⁰⁸ Rezultatele simulării moleculare de docking VINA au prezis cele mai probabile conformații ale complexelor dintre ADN (receptorul) și indolizinele **39a** și **44** așa cum se arată în figura II.50.

Valorile calculate ale energiei de legare E_b și constanta de disociere K_d au fost următoarele:

- 1) $E_b = -9.87$ kcal/mol și $K_d = 58.1$ nM, pentru complexul ADN-ligand **44** (Figura II.50.a) și
- 2) $E_b = -7.60$ kcal / mol și $K_d = 2681.6$ nM, pentru complexul ADN-ligand **39a** (Figura II.50.b).

Aceste rezultate sugerează că indolizina **44** modificată cu antracen are o afinitate superioară față de receptor (ADN) comparativ cu indolizina sa precursor **39a**, datorită valorii mult mai scăzute a energiei de legare și a constantei de disociere a complexului corespunzător.

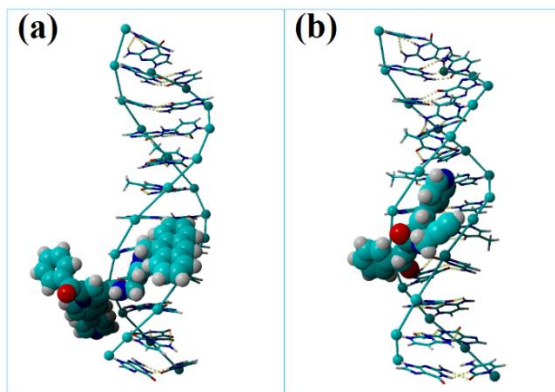


Figura II.50. Structurile docking ale complexelor dintre: (a) oligonucleotidă ADN (receptor) și indolizină **44** (ligand): $E_b = -9.87$ kcal/mol și $K_d = 58.1$ nM; (b) oligonucleotidă ADN (receptor) și indolizină **39a** (ligand): $E_b = -7.60$ kcal/mol și $K_d = 2681.6$ nM.

Așa cum se poate vedea în figura II.50, ambele indolizine **39a** și **44** s-au legat la receptorul ADN la cavitatea minoră prin interacțiuni hidrofobe. Conform figurii II.50.a, următoarele grupări ale ligandului **44** au fost înglobate în cavitatea minoră a ADN-ului: porțiunea piridinică, grupa peptidică, gruparea triazolică și o parte din restul antraceni. În mod similar, pentru ligandul **39a**, grupurile conectate la cavitatea minoră a ADN-ului au fost: grupa piridinică și peptidică (Figura II.50.b). În ambele cazuri, gruparea fenacil din poziția 3 a inelului indolizinic al liganzilor (**39b** și **44**) a fost poziționată în afara cavității minore a receptorului.¹⁸⁴

Concluzii generale

► În cadrul prezentei teze au fost sintetizate mai multe serii de compuși, ca analogi ai fenstatinei, în vederea testării activității anticanceroase a acestora. Toate sintezele au avut la bază reacții de cuaternizare ale atomului de azot din heterociclii de bază (nesubstituiți sau substituiți cu diverși substituenți), urmate de generarea *in situ* a cicloimoniu ilidelor corespunzătoare sărurilor monocuaternare, și cicloadiția 3+2 dipolară a acestora la propiolatul de etil.

► A fost de asemenea sintetizat și un derivat de indolizină 7-(piridin-4-il)-substituit cu un substituent conținând un fragment antracenil în vederea studierii proprietăților acestuia de emisie precum și a celor de legare la acizii nucleici.

► Toți compușii sintetizați au fost caracterizați din punct de vedere structural utilizând spectroscopia FTIR și RMN, și în unele cazuri și spectrometria de masă.

► Pentru compușii **10a**, **10b**, **10d**, **10f**, **10g**, **10i**, **10j**, **10k**, **10l**, **10o**, **10r**, **13a**, **13b**, **13c**, **18a**, **18b**, **18d**, **19a**, **19b**, **22b**, **22c**, **25b**, **25c**, **25d**, **32c**, **33a**, **33b** și **34c** a fost determinată capacitatea acestora de a inhiba creșterea celulelor tumorale.

- în prima etapă, testarea s-a efectuat pe 60 de linii celulare din diferite tipuri de cancer la concentrația unică de 10^{-5} M;

- rezultatele promițătoare privind activitatea de inhibare a creșterii celulelor tumorale a compușilor **10a**, **10b**, **10f**, **10g**, **13b**, **18a** și **34c** au condus la selectarea acestora pentru testarea *in vitro* din stadiul al doilea, pe aceleași linii celulare, dar la 5 concentrații diferite;

- compusul **10a** prezintă o activitate inhibitorie cu valori GI_{50} de 0.030 – 0.540 μ M asupra a 21 de linii celulare tumorale din cele 60 testate. O activitate foarte bună se remarcă asupra celulelor MDA-MB-435 care aparțin cancerului de piele ($GI_{50} = 30$ nM).

- în cazul 2-metil-pirololo[1,2-*b*]piridazinei **10f** au fost obținute valori ale $GI_{50} < 100$ nM pe treisprezece linii celulare, cele mai bune rezultate fiind înregistrate împotriva celulelor cancerului de piele MDA-MB-435 ($GI_{50} = 25.6$ nM), a celor leucemice SR

(GI₅₀ = 48.1 nM) și împotriva celulelor MCF7 (GI₅₀ = 48.1 nM) aparținând cancerului de sân.

- compusul **18a** prezintă o activitate inhibitorie GI₅₀ < 54 nM împotriva a 26 de linii celulare tumorale din cele 60 testate. O activitate excelentă se remarcă împotriva liniei celulare MDA-MB-435 care aparține cancerului de piele (GI₅₀ < 10 nM);

- se remarcă de asemenea și activitatea inhibitorie foarte bună (pe toate liniile celulare testate) a compusului pirolofenantrolinic **34c** la care cele mai bune rezultate au fost obținute împotriva cancerului de colon COLO205, cancerului de piele MDA-MB-435 și cancerului renal A498, însă cu valori GI₅₀ > 296 nM.

► În vederea susținerii ipotezei că efectele antiproliferative ale compușilor sunt induse prin inhibarea polimerizării tubulinei (așa cum s-a dovedit în cazul fenstatinei), pentru compușii testați s-au realizat studii teoretice de docking molecular, acestea fiind efectuate la situsul colchicinic de legare a heterodimerului α,β -tubulina (PDB: 1SA0).

- rezultatele simulării au evidențiat faptul că o posibilă cale de acțiune a compușilor activi, care să explice acțiunea biologică a acestora, este interacțiunea cu situsul colchicinic de legare a heterodimerului α,β -tubulina.

- în cazul compușilor 2-(p-halogenofenil)-substituiți **10j**, **10k**, **10l** și **10o**, care au prezentat o scădere semnificativă a activității biologice în comparație cu analogii nesubstituiți, studiile docking au arătat de asemenea o legare într-o manieră similară cu cea a analogilor nesubstituiți sau 2-metil-substituiți (compuși cu activitate biologică), la heterodimerul α,β -tubulină. Lipsa activității proliferative în cazul acestora ar putea fi explicată prin lipofilitatea și solubilitatea acestora, care nu este cea optimă.

► Pentru derivatul de indolizină 7-(piridin-4-il)-substituit cu un substituent conținând un fragment antracenil și precursorul propargilat al acestuia, au fost realizate comparativ studii de absorbție și fluorescență, aceștia prezentând proprietăți de emisie dependente de pH.

► Derivații de indolizină investigați se leagă la ADN la pH fiziologic, fapt dovedit atât de modificările spectrelor de absorbție și de emisie înainte și după adăugarea de ADN, cât și prin experimente de electroforeză pe gel.

► A fost realizat un studiu de modelare moleculară asupra mecanismului de interacțiune a indolizinelor **39** și **43** și ADN-ului dublu catenar, acesta evidențiind faptul că indolizina **43** care conține un fragment antracenic are o afinitate mult mai bună pentru ADN decât indolizina **39** care conține doar porțiunea piridin-indolizină, date care se corelează cu datele privind absorbția și emisia indolizinelor și sADN-ului, investigate.

► Rezultatele prezentate în cadrul acestei teze de doctorat au făcut până în prezent subiectul a două articole științifice publicate în reviste cotate ISI și a 5 participări la conferințe științifice naționale și internaționale:

Lucrări științifice:

◆ Narcisa-Laura Marangoci, **Lacramioara Popovici**, Elena-Laura Ursu, Ramona Danac, Lilia Clima, Corneliu Cojocaru, Adina Coroaba, Andrei Neamtu, Ionel Mangalagiu, Mariana Pinteala and Alexandru Rotaru, Pyridylindolizine derivatives as DNA binders and pHsensitive fluorescent dyes, *Tetrahedron*, 72(50), (2016), 8215-8222.

◆ **Lacramioara Popovici**, Roxana-Maria Amarandi, Ionel.I. Mangalagiu, Ramona Danac, Synthesis, molecular modelling and anticancer evaluation of new pyrrolo[1,2-*b*]pyridazine and pyrrolo[2,1-*a*]phthalazine based derivatives, *Eur. J. Med. Chem.*, acceptată cu revizuire majore.

Participări la conferințe:

◆ **Lacramioara Popovici**, Ramona Danac, Ionel I. Mangalagiu, Synthesis of new fluorescent indolizine derivatives bearing 1,2,3. triazoles with potential sensor applications, The XVIII-th International Conference „Physical Methods in Coordination and Supramolecular Chemistry”, Chișinău, 8-9 Octombrie, 2015.

- ◆ Narcisa-Laura Marangonci, **Lacramioara Popovici**, Ramona Danac, Ionel Mangalagiu, Pyridylindolizine derivatives as DNA binders and pHsensitive fluorescent dyes, Conferința Facultatii de chimie, Zilele Universitatii, Iași Octombrie, 2016.
- ◆ **Lacramioara Popovici**, Ionel I. Mangalagiu, Ramona Danac, Synthesis and anticancer evaluation of new pyrrolo-heterocyclic compounds, Conferința Facultatii de chimie, Zilele Universitatii, Iași Octombrie, 2017.
- ◆ **Lacramioara Popovici**, Ionel I. Mangalagiu, Ramona Danac, Synthesis and anticancer evaluation of new azaindolizines, 4ème Colloque Franco-Roumain de Chimie Médicinale, Iași, Octombrie, 2017.
- ◆ Ramona Danac, **Lacramioara Popovici**, Ionel I. Mangalagiu, Synthesis and anticancer evaluation of new heterocyclic compounds designed as Phenstatin analogues, 4th Euro-Organic-Chemistry, Londra, 2018.

Doctorandul mulțumește următoarelor proiecte pentru suportul acordat:

POSCCE-O 2.2.1, SMIS-CSNR 13984-901, nr. 257/28.09.2010, CERNESIM.

Institutului Național de Cancer (NCI) din SUA.