

UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" DIN IAȘI  
FACULTATEA DE CHIMIE  
ȘCOALA DOCTORALĂ DE CHIMIE

***AZAHETEROCICLI DE 5 ȘI 6 ATOMI CU  
POTENȚIALE APLICAȚII PRACTICE***

***Rezumatul tezei de doctorat***

**Conducător științific:**

**Prof. Dr. Ionel I. Mangalagiu**

**Doctorand:**

**Monica-Cornelia Sardaru**

## **Mulțumiri**

*La finalul acestei etape din viața mea, în calitate de student-doctorand, doresc să aduc mulțumiri acelor persoane care m-au susținut și îndrumat în elaborarea tezei de doctorat.*

*Mulțumiri sincere și întreaga mea recunoștință domnului **Prof. Dr. Ionel I. Mangalagiu**, care în calitate de conducător științific, m-a îndrumat și susținut pe toată perioada studiilor doctorale pentru obținerea rezultatelor științifice și elaborarea tezei de doctorat.*

*Întreaga mea recunoștință, profund respect și alese mulțumiri pentru sprijinul, ajutorul, îndrumarea și ideile oferite pe întreaga perioadă de cercetare științifică, doamnei **Conf. Dr. Ramona Dănac**. De asemenea, îi mulțumesc și îi sunt profund recunoscătoare pentru încrederea acordată și pentru colaborarea deschisă pe parcursul acestei perioade.*

*Deosebite mulțumiri comisiei de îndrumare pentru sfaturile și sprijinul profesional acordat pe parcursul stagiului doctoral.*

*Aleasă considerație și profunde mulțumiri doamnelor **Dr. Mariana Pinteală** și **Dr. Narcisa Marangoci** și domnului **Dr. Alexandru Rotaru** pentru sprijinul permanent acordat și posibilitatea de a lucra într-un mediu în care am putut învăța și utiliza noi tehnici experimentale ce m-au ajutat să mă dezvolt ca cercetător pe parcursul stagiului de doctorat.*

*Deosebite mulțumiri tuturor colegilor din colectivele de **Chimie Organică** de la „Universitatea Alexandru Ioan Cuza” și **IntelCentru** de la Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, precum și colegilor din alte departamente ale acestor instituții care m-au ajutat și s-au implicat în realizarea studiilor din cadrul tezei de doctorat.*

*Mulțumiri speciale colegilor mei de laborator: **Anda, Cristina-Alexandra, Cristina, Dana, Lucian și Bogdan** pentru sprijinul și suportul moral și profesional acordat pe parcursul stagiului doctoral, făcând această perioadă mai ușor de parcurs.*

*În mod deosebit doresc să mulțumesc familiei, în special părinților și fratelui, cât și prietenului meu, pentru toată dragostea și pentru sprijinul oferit în această perioadă.*

*Țin să mulțumesc proiectului ”Polimeri coordinativi poroși noi cu liganzi organici de dimensiuni variabile pentru stocarea gazelor”, acronim POCPOLIG (ID P\_37\_707, cod MySMIS: 104810, Contract de finanțare nr. 67/8.09.2016) pentru suportul financiar.*

*De asemenea, mulțumiri proiectului POSCCE-O 2.2.1, SMIS-CSNR 13984-901, nr. 257/28.09.2010, CERNESIM, pentru experimentele RMN și de difracție de raze X și Institutului Național de Cancer (NCI) din SUA pentru testările biologice.*

*Vă mulțumesc!*

*Drd. Monica-Cornelia Sardaru*

## Cuprins

|                                                                                                                                                                                                             |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>CAPITOL I. COMPUȘI MIC MOLECULARI AZAHETEROCICLICI CU POTENȚIALE APLICAȚII ÎN DOMENIUL BIOMEDICAL.....</b>                                                                                               | <b>1</b>   |
| I.1. N-heterocicluri cu importanță aplicativă .....                                                                                                                                                         | 2          |
| I.1.1. Pirolul și derivații săi.....                                                                                                                                                                        | 2          |
| I.1.2. Tetrazolul și derivații săi.....                                                                                                                                                                     | 7          |
| I.1.3. Indolizina și derivații săi.....                                                                                                                                                                     | 12         |
| I.2. Terapia anticanceroasă.....                                                                                                                                                                            | 14         |
| I.2.1. Mecanisme de acțiune a medicamentelor anticanceroase.....                                                                                                                                            | 15         |
| I.2.2. Microbulii- țintă în terapia anticanceroasă .....                                                                                                                                                    | 29         |
| I.2.3. Stabilizarea ADN-ului G-cvadruplex (G4-ADN) și substanțe care au ca țintă G4-ADN.....                                                                                                                | 39         |
| <b>CAPITOL II. COMPUȘI AZAHETEROCICLICI CU POTENȚIALE APLICAȚII PRACTICE .....</b>                                                                                                                          | <b>50</b>  |
| II.1. Sinteza și proprietățile unor noi derivați heterociclici proiectați ca analogi ai Fenstatinei.....                                                                                                    | 50         |
| II.1.1. Sinteza și proprietățile unor noi derivați indoliziniici piridil-substituiți.....                                                                                                                   | 54         |
| II.1.2. Sinteza și proprietățile unor noi derivați de indolizină substituiți cu unități piridinice prin intermediul unei punți trans-etilenice, precum și a unor derivați cu structură bisindolizinică..... | 77         |
| II.1.3. Sinteza și proprietățile unor noi derivați de tetrazol 1,5-disubstituiți                                                                                                                            | 99         |
| II.2. Sinteza și proprietățile unor noi derivați proiectați ca stabilizatori pentru ADN-ul G-cvadruplex (G4-ADN).....                                                                                       | 105        |
| II.2.1. Sinteza unor noi derivați de indolizină proiectați ca stabilizatori de ADN G-cvadruplex.....                                                                                                        | 106        |
| II.2.2. Sinteza unor noi derivați cu schelet pirolol[1,2- <i>i</i> ][1,7]fenantrolinic proiectați ca stabilizatori de ADN G-cvadruplex .....                                                                | 112        |
| II.2.3. Evaluarea activității anticanceroase a compușilor <b>29</b> și <b>36</b> .....                                                                                                                      | 117        |
| II.3. Studiu asupra unor noi ansambluri host-guest (oaspete-gazdă) supramoleculare sensibile la pH, pentru marcarea organitelor celulare acide                                                              | 120        |
| II.3.1. Sinteza și caracterizarea unor noi complecși de incluziune pe bază de $\beta$ -ciclodextrină.....                                                                                                   | 121        |
| II.3.2. Experimente celulare <i>in vitro</i> .....                                                                                                                                                          | 134        |
| <b>CAPITOL III. PARTEA EXPERIMENTALĂ.....</b>                                                                                                                                                               | <b>139</b> |
| III.1. Materiale și echipamente .....                                                                                                                                                                       | 139        |

|                                                                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III.2. Procedee experimentale de sinteză și date spectrale.....                                                                         | 140 |
| III.2.1. Procedura de obținere a compusului <b>2b</b> .....                                                                             | 140 |
| III.2.2. Procedura generală de obținere a compușilor <b>3a-c</b> .....                                                                  | 140 |
| III.2.3. Procedura generală de obținere sărurilor monocuaternare <b>6a-i, 9a-d și 14a-g</b> .....                                       | 140 |
| III.2.4. Procedura generală de obținere a monoindolizinelor <b>7a-h, 10a-d și 15a-f</b> .....                                           | 147 |
| III.2.5. Procedura generală de obținere a sărurilor monocuaternare de indolizininil-piridiniu <b>16a-e</b> .....                        | 153 |
| III.2.6. Procedură generală de obținere a bisindolizinelor <b>17a-e</b> .....                                                           | 156 |
| III.2.7. Procedura generală de obținere a compușilor <b>24a-e</b> .....                                                                 | 158 |
| III.2.8. Procedura generală de obținere a compușilor <b>29b-f, 30a-b și 31b</b> .....                                                   | 160 |
| III.2.9. Procedura generală de obținere a compușilor <b>36b-c</b> .....                                                                 | 165 |
| III.2.10. Procedura generală pentru obținerea complexilor de incluziune <b>13a-c_CD</b> .....                                           | 168 |
| III.3. Protocoale experimentale de determinare a proprietăților investigate ...                                                         | 169 |
| III.3.1. Protocolul experimental de testare a activității anticanceroase pe 60 de linii celulare tumorale.....                          | 169 |
| III.3.2. Procedura generală pentru determinarea mecanismului de acțiune a compușilor prin polimerizarea tubulinei <i>in vitro</i> ..... | 170 |
| III.3.3. Protocoale experimentale de modelare moleculară.....                                                                           | 171 |
| III.3.4. Protocolul experimental de testare a activității antimicrobiene .                                                              | 172 |
| III.3.5. Protocolul experimental de determinare a proprietăților redox...                                                               | 173 |
| III.3.6. Protocoale experimentale de determinare a proprietăților de fluorescență.....                                                  | 173 |
| III.3.7. Protocoale experimentale în cazul experimentelor celulare <i>in vitro</i> utilizate în studiul complexilor de incluziune ..... | 174 |
| <b>Concluzii generale</b> .....                                                                                                         | 176 |
| <b>Bibliografie</b> .....                                                                                                               | 183 |
| <b>Listă de abrevieri</b> .....                                                                                                         | 193 |
| <b>ANEXE</b> .....                                                                                                                      | 195 |

## Introducere

Cancerul reprezintă una dintre cele mai devastatoare boli, implicând diverse modificări genetice și anomalii celulare. Complexitatea, respectiv creșterea agresivă a celulelor canceroase conduce la o morbiditate și o mortalitate semnificativă la pacienți. În prezent, diferiți agenți chimioterapeutici sunt utilizați în mod eficient pentru terapia anticancerigenă, vizând diferite căi.

Astfel, cercetările prezentate în cadrul tezei de doctorat au avut ca scop sintetizarea de noi compuși azaheterociclici, caracterizarea structurală a acestora, precum și evaluarea proprietăților lor, în special cele biologice, iar în cazul compușilor biologici activi determinarea mecanismului prin care aceștia acționează.

Pe parcursul stagiului doctoral am urmărit realizarea următoarelor obiective principale:

**O1.** Sinteza a două serii de noi indolizine, pornind de la derivați de 2,4'-bipiridil și 2,2'-bipiridil, prin intermediul reacțiilor de cicloadiție 3+2 dipolară;

**O2.** Sinteza unor serii de noi monoindolizine și bisindolizine pornind de la trans-1,2-di(4-piridil)etilenă, prin intermediul reacțiilor de cicloadiție 3+2 dipolară;

**O3.** Sinteza unor noi derivați de tetrazol-1,5-disubstituiți prin intermediul reacțiilor de cicloadiție 3+2 dipolară de tip „click”;

**O4.** Sinteza unor noi derivați pe bază de piridină, bipiridil, respectiv 1,7-fenantrolină, proiectați ca stabilizatori de ADN G-cvadruplex;

**O5.** Obținerea de noi compuși de incluziune ai  $\beta$ -ciclodextrinei cu săruri monocuaternare de (indolizin-7-il)piridiniu;

**O6.** Caracterizarea structurală a noilor compuși sintetizați prin spectrometrie de rezonanță magnetică nucleară (RMN), spectroscopie FTIR, spectrometrie de masă (MS) și difracție de raze X pe monocristal (DRX);

**O7.** Evaluarea proprietăților anticanceroase ale compușilor sintetizați în cadrul obiectivelor O1, O2, O3 și investigarea mecanismului de acțiune în cazul compușilor activi;

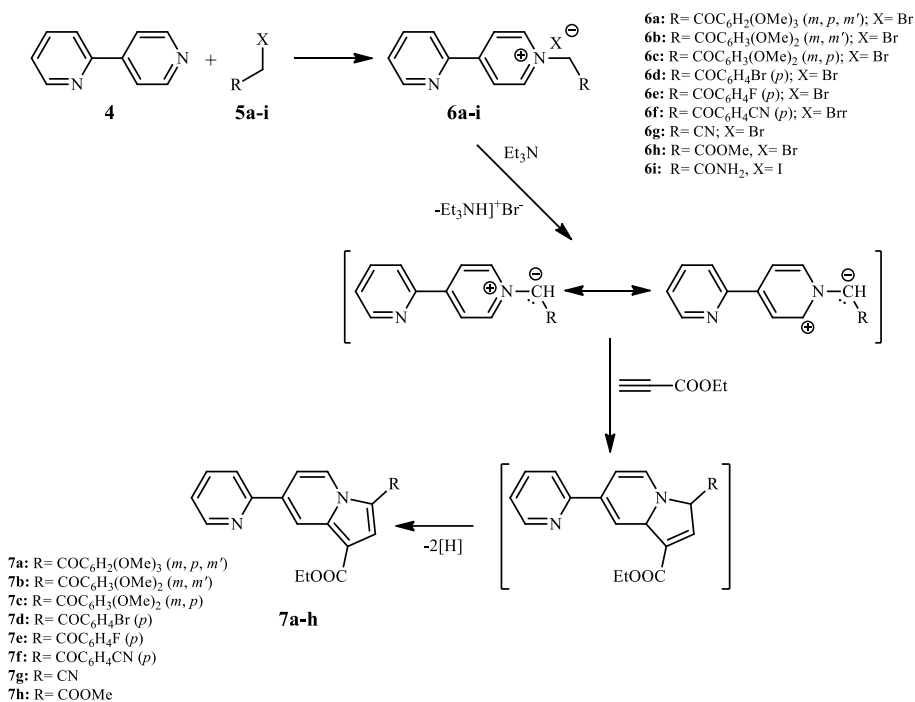
**O8.** Investigarea biologică a complexilor de incluziune obținuți în cadrul obiectivului O5 și testarea acestora ca posibili markeri ai organitelor celulare.

## CAPITOLUL II. COMPUȘI AZAHETEROCICLICI CU POTENȚIALE APLICAȚII PRACTICE

### II.1. Sinteza și proprietățile unor noi derivați heterociclici proiectați ca analogi ai

#### Fenstatinei

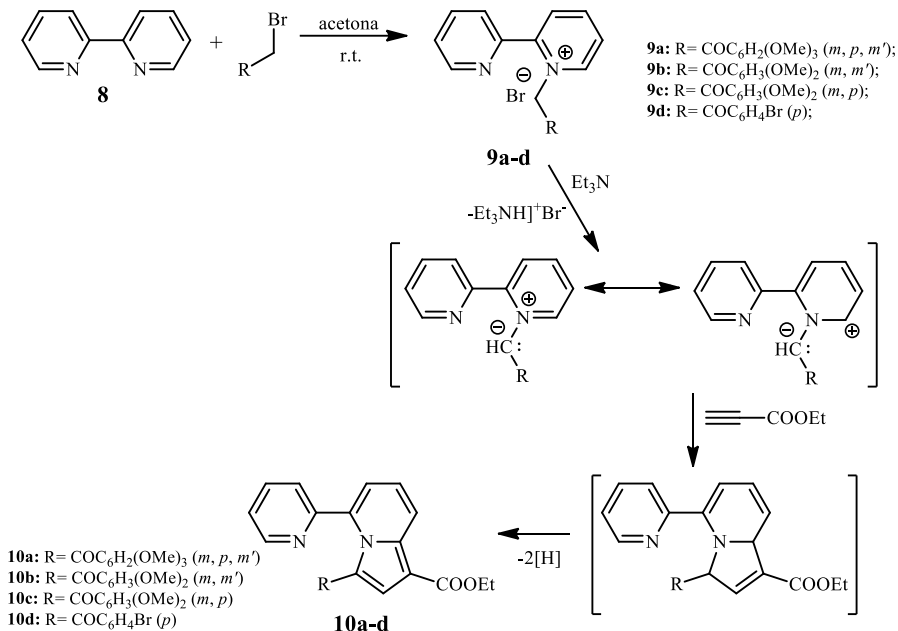
Au fost sintetizați 8 derivați indolizini pe bază de 2,4'-bipiridil utilizând ca dipolarofil propiolatul de etil.



**Schema II.3.** Sinteza sărurilor monocuaternare **6a-i** și a derivaților indolizini **7a-h** pe bază de 2,4'-bipiridil

Spectroscopia FTIR și RMN au demonstrat obținerea compușilor propuși prin apariția benzilor, respectiv semnalelor caracteristice în spectrele înregistrate.

Au fost sintetizați 4 derivați indolizininici pe bază de 2,2'-bipiridil utilizând ca dipolarofil propiolatul de etil, compusul **10d** fiind raportat în literatură.



**Schema II.4.** Sinteza sărurilor monocuaternare **9a-d** și a derivaților indolizininici **10a-d** pe bază de 2,2'-bipiridil

Spectroscopia FTIR și RMN au demonstrat obținerea compușilor propuși prin apariția benzilor, respectiv semnalelor caracteristice în spectrele înregistrate.

Compușii de tip **11** și **13** au fost sintetizați în grupul nostru de cercetare, sinteza acestora fiind prezentată în cadrul tezelor de doctorat realizate de Lăcrămioara-Elena Tiru (căs. Popovici), respectiv Anda-Mihaela Olaru (căs. Crăciun)

În vederea testării activității biologice a compușilor, în urma unui proces de selecție, au fost acceptați spre testare 14 compuși (**7a**, **7b**, **7c**, **7d**, **10a**, **10d**, **11a**, **11b**, **11d**, **12a**, **12b**, **12c**, **13a**, **13b**). Această testare s-a realizat pe 60 de linii celulare tumorale umane la o singură concentrație de 10  $\mu\text{M}$ , rezultatele testării activității de inhibiție a creșterii acestora fiind raportate în tabelul II.1 (selecție).

**Tabel II.1.** Rezultatele testării activității de inhibare a creșterii a 60 de linii celulare tumorale umane (GI %), pentru compușii **7a, 7b, 7c, 10a, 11a, 11b, 11d, 12a, 12b, 13a** și **13b** la concentrația 10 μM (selecție)

| Tip de cancer/<br>linie celulară | Compus /Procentul de inhibare a creșterii (GI, %) <sup>a</sup> |    |                  |     |                    |                    |     |     |     |                     |                     |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------|----|------------------|-----|--------------------|--------------------|-----|-----|-----|---------------------|---------------------|
|                                  | 7a                                                             | 7b | 7c               | 10a | 11a                | 11b                | 11d | 12a | 12b | 13a                 | 13b                 |
| <i>Leucemie</i>                  |                                                                |    |                  |     |                    |                    |     |     |     |                     |                     |
| CCRF-CEM                         | 0                                                              | 0  | 0                | 0   | 83                 | 65                 | 24  | 10  | 20  | 100 <sup>b,p</sup>  | 100 <sup>b,i'</sup> |
| K-562                            | 0                                                              | 0  | 0                | 2   | 89                 | 86                 | 23  | 1   | 11  | 100 <sup>b,q</sup>  | 100 <sup>b,j'</sup> |
| SR                               | 0                                                              | 0  | 14               | 5   | 76                 | 84                 | 32  | 30  | 30  | 100 <sup>b,r</sup>  | 100 <sup>b,k'</sup> |
| HL-60(TB)                        | 0                                                              | 0  | 0                | 2   | 100 <sup>b,c</sup> | 100 <sup>b,l</sup> | 30  | 35  | 28  | 67                  | 75                  |
| MOLT-4                           | 0                                                              | 0  | 0                | 3   | 76                 | 69                 | 34  | 0   | 0   | 100 <sup>b,s</sup>  | 89                  |
| RPMI-8226                        | 0                                                              | 0  | 27               | 15  | 77                 | 72                 | 10  | 43  | 13  | 100 <sup>b,t</sup>  | 77                  |
| <i>Cancer pulmonar</i>           |                                                                |    |                  |     |                    |                    |     |     |     |                     |                     |
| A549/ATCC                        | 0                                                              | 14 | 53               | 0   | 74                 | 64                 | 11  | 20  | 11  | 68                  | 68                  |
| HOP-62                           | 13                                                             | 4  | 47               | 4   | 72                 | 70                 | 10  | 10  | 11  | 5                   | 12                  |
| NCI-H460                         | 0                                                              | 12 | 82               | 0   | 86                 | 85                 | 0   | 3   | 0   | 100 <sup>b,u</sup>  | 96                  |
|                                  |                                                                |    | 10               |     |                    |                    |     |     |     |                     |                     |
| NCI-H522                         | 34                                                             | 7  | 0 <sup>b,o</sup> | 13  | 74                 | 59                 | 25  | 21  | 19  | 100 <sup>b,v</sup>  | 29                  |
| <i>Cancer de Colon</i>           |                                                                |    |                  |     |                    |                    |     |     |     |                     |                     |
| COLO205                          | 0                                                              | 0  | 35               | 0   | 100 <sup>b,d</sup> | 86                 | 0   | 0   | 0   | 56                  | 57                  |
| HCT-116                          | 11                                                             | 0  | 0                | 3   | 81                 | 88                 | 19  | 24  | 3   | 100 <sup>b,w</sup>  | 95                  |
| HCT-15                           | 0                                                              | 0  | 17               | 3   | 71                 | 74                 | 17  | 1   | 0   | 17                  | 25                  |
| HT-29                            | 0                                                              | 0  | 23               | 0   | 99                 | 90                 | 23  | 8   | 12  | 100 <sup>b,x</sup>  | 100 <sup>b,l'</sup> |
| SW-620                           | 0                                                              | 0  | 41               | 4   | 70                 | 78                 | 7   | 0   | 0   | 100 <sup>b,z</sup>  | 100 <sup>b,m'</sup> |
| KM12                             | 0                                                              | 0  | 23               | 0   | 75                 | 76                 | 2   | 0   | 2   | 55                  | 36                  |
| <i>Cancer al SNC</i>             |                                                                |    |                  |     |                    |                    |     |     |     |                     |                     |
| SF-295                           | 9                                                              | 0  | 31               | 0   | 79                 | 73                 | 3   | 0   | 0   | 6                   | 0                   |
| SF-539                           | 12                                                             | 11 | 70               | 0   | 100 <sup>b,e</sup> | 55                 | 3   | 6   | 0   | 70                  | 10                  |
| SNB-75                           | 17                                                             | 15 | 76               | 38  | 67                 | 79                 | 2   | 11  | 9   | 24                  | 7                   |
| U251                             | 26                                                             | 14 | 78               | 0   | 78                 | 61                 | 10  | 7   | 5   | 100 <sup>b,a'</sup> | 87                  |
| SF-268                           | 3                                                              | 7  | 75               | 11  | 44                 | 53                 | 11  | 4   | 0   | 100 <sup>b,b'</sup> | 21                  |
| <i>Cancer de piele</i>           |                                                                |    |                  |     |                    |                    |     |     |     |                     |                     |
| LOX IMVI                         | 0                                                              | 0  | 15               | 6   | 53                 | 61                 | 8   | 1   | 3   | 100 <sup>b,c'</sup> | 87                  |
| M14                              | 5                                                              | 0  | 0                | 0   | 100 <sup>b,f</sup> | 96                 | 0   | 0   | 0   | 45                  | 43                  |
| MDA-MB-435                       | 0                                                              | 0  | 29               | 11  | 100 <sup>b,g</sup> | 100 <sup>b,m</sup> | 0   | 0   | 0   | 31                  | 24                  |
| UACC-62                          | 8                                                              | 1  | 16               | 6   | 50                 | 69                 | 11  | 1   | 2   | 13                  | 0                   |
| SK-MEL-5                         | 0                                                              | 7  | 63               | 4   | 62                 | 73                 | 7   | 17  | 3   | 18                  | 2                   |
| <i>Cancer Ovarian</i>            |                                                                |    |                  |     |                    |                    |     |     |     |                     |                     |
| OVCAR-3                          | 0                                                              | 0  | 21               | 0   | 100 <sup>b,h</sup> | 100 <sup>b,n</sup> | 0   | 0   | 0   | 18                  | 63                  |
| NCI/ADR-RES                      | 0                                                              | 0  | 34               | 5   | 89                 | 88                 | 8   | 1   | 0   | 6                   | 11                  |
| SK-OV-3                          | 6                                                              | 0  | 94               | 0   | 78                 | 64                 | 18  | 13  | 19  | 0                   | 9                   |
| OVCAR-8                          | 0                                                              | 9  | 63               | 8   | 67                 | 58                 | 12  | 9   | 6   | 93                  | 23                  |
| OVCAR-4                          | -                                                              | -  | -                | 0   | 32                 | 28                 | 8   | 4   | 0   | 100 <sup>b,d'</sup> | 70                  |



|                           |    |    |    |    |                    |    |    |    |    |    |
|---------------------------|----|----|----|----|--------------------|----|----|----|----|----|
| <i>Cancer Renal</i>       |    |    |    |    |                    |    |    |    |    |    |
| A498                      | 0  | 6  | 58 | 0  | 100 <sup>b,i</sup> | 71 | 2  | 14 | 0  | 26 |
| RXF393                    | 9  | 6  | 36 | 0  | 100 <sup>b,j</sup> | 50 | 3  | 5  | 0  | 27 |
| ACHN                      | 19 | 10 | 70 | 8  | 41                 | 51 | 0  | 0  | 0  | 4  |
| 786-0                     | 9  | 0  | 0  | -  | 65                 | 64 | 0  | 10 | 0  | 91 |
| TK10                      | 0  | 0  | 45 | 0  | 51                 | 44 | 0  | 10 | 0  | 0  |
| <i>Cancer de sân</i>      |    |    |    |    |                    |    |    |    |    |    |
| MCF7                      | 5  | 10 | 17 | 6  | 76                 | 78 | 15 | 0  | 0  | 99 |
| MDA-MB-468                | 10 | 6  | 25 | 0  | 100 <sup>b,k</sup> | 70 | 3  | 30 | 9  | 29 |
| T-47D                     | 9  | 20 | 77 | 0  | 53                 | 51 | 16 | 16 | 0  | 17 |
| MDA-MB-231/ATCC           | 10 | 6  | 42 | 12 | 62                 | 44 | 18 | 30 | 11 | 29 |
| BT-549                    | 13 | 0  | 4  | 0  | 60                 | 64 | 0  | 9  | 0  | 18 |
| <i>Cancer de prostată</i> |    |    |    |    |                    |    |    |    |    |    |
| PC-3                      | 2  | 9  | 13 | 2  | 88                 | 60 | 17 | 15 | 12 | 49 |
| DU-145                    | 0  | 0  | 35 | 0  | 75                 | 46 | 0  | 0  | 0  | 70 |

<sup>a</sup>Date furnizate de NCI în urma testărilor *in vitro* pe 60 de linii celulare tumorale umane, valori raportate pentru testarea la o singură concentrație (10  $\mu$ M);

<sup>b</sup>Efect citotoxic;

Procentul de citotoxicitate: <sup>c</sup>-25; <sup>d</sup>-32; <sup>e</sup>-7; <sup>f</sup>-22; <sup>g</sup>-42; <sup>h</sup>-6; <sup>i</sup>-1; <sup>j</sup>-0.4; <sup>k</sup>-7; <sup>l</sup>-14; <sup>m</sup>-5; <sup>n</sup>-5; <sup>o</sup>-4; <sup>p</sup>-15; <sup>q</sup>-45; <sup>r</sup>-16; <sup>s</sup>-9; <sup>t</sup>-22; <sup>u</sup>-10; <sup>v</sup>-21; <sup>w</sup>-61; <sup>x</sup>-10; <sup>y</sup>-65; <sup>a'</sup>-74; <sup>b'</sup>-14; <sup>c'</sup>-44; <sup>d'</sup>-33; <sup>e'</sup>-82; <sup>f'</sup>-29; <sup>g'</sup>-23; <sup>h'</sup>-6; <sup>i'</sup>-3; <sup>j'</sup>-53; <sup>k'</sup>-27; <sup>l'</sup>-10; <sup>m'</sup>-30;

În urma rezultatelor obținute în cadrul primului stadiu de testare, cei mai activi compuși (**11a**, **13a** și **13b**) au fost selectați pentru etapa a doua de testare privind evaluarea activității antiproliferative pe cele 60 de linii celulare ale NCI, la cinci concentrații diferite, testarea realizandu-se în aceleași condiții și pentru Fenstatină, ca și control pozitiv. O selecție a rezultatelor obținute în urma etapei a doua de testare este prezentată în tabelul II.2.

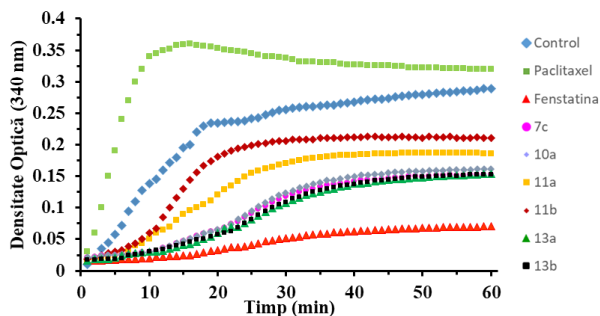
**Tabel II.2.** Rezultatele inhibării creșterii celulare *in vitro* (GI<sub>50</sub>) pentru compușii **11a**, **13a** și **13b** și Fenstatina (control). (selecție)

| Tip de cancer/<br>linie celulară | Compus                         |                                |                                |                                |                                |                                |                             |                             |
|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                                  | 11a                            | 11a                            | 13a                            | 13a                            | 13b                            | 13b                            | Fenstatina                  | Fenstatina                  |
|                                  | GI <sub>50</sub><br>( $\mu$ M) | LC <sub>50</sub><br>( $\mu$ M) | GI <sub>50</sub><br>( $\mu$ M) | LC <sub>50</sub><br>( $\mu$ M) | GI <sub>50</sub><br>( $\mu$ M) | LC <sub>50</sub><br>( $\mu$ M) | GI <sub>50</sub> ( $\mu$ M) | LC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) |
| <i>Leucemie</i>                  |                                |                                |                                |                                |                                |                                |                             |                             |
| K-562                            | 0.036                          | >100                           | n.d.                           | n.d.                           | n.d.                           | n.d.                           | <0.010                      | >100                        |
| HL-60(TB)                        | 0.032                          | >100                           | 2.58                           | >100                           | 2.05                           | >100                           | 0.011                       | >100                        |
| SR                               | 0.023                          | >100                           | 2.9                            | >100                           | 0.33                           | >100                           | <0.010                      | >100                        |
| CCRF-CEM                         | 0.055                          | >100                           | 3.28                           | >100                           | 1.75                           | >100                           | 0.034                       | >100                        |
| MOLT-4                           | 0.077                          | >100                           | 2.58                           | >100                           | 2.04                           | >100                           | 0.04                        | >100                        |
| RPML-8226                        | 0.044                          | >100                           | n.d.                           | n.d.                           | n.d.                           | n.d.                           | 0.037                       | >100                        |

|                           |                  |             |             |             |             |             |                  |      |
|---------------------------|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------------|------|
| <i>Cancer pulmonar</i>    |                  |             |             |             |             |             |                  |      |
| NCI-H460                  | 0.042            | >100        | 2           | 7.16        | <b>1.63</b> | n.d.        | 0.033            | >100 |
| NCI-H522                  | 0.041            | >100        | 2.13        | >100        | 1.93        | 7.81        | 0.027            | >100 |
| A549/ATCC                 | 0.074            | >100        | 3.29        | >100        | 1.88        | n.d.        | 0.057            | >100 |
| HOP-62                    | 0.051            | >100        | 1.83        | n.d.        | 1.78        | n.d.        | 0.073            | >100 |
| <i>Cancer de Colon</i>    |                  |             |             |             |             |             |                  |      |
| COLO205                   | <b>0.035</b>     | >100        | n.d.        | n.d.        | n.d.        | n.d.        | 3.05             | >100 |
| HCT-15                    | <b>0.035</b>     | >100        | 2.62        | >100        | <b>1.64</b> | 7.87        | <b>&lt;0.010</b> | >100 |
| HT29                      | 0.037            | >100        | 1.83        | 7.38        | <b>1.63</b> | n.d.        | 2.95             | >100 |
| SW-620                    | 0.036            | >100        | 1.76        | <b>6.83</b> | <b>1.38</b> | 7.7         | <b>&lt;0.010</b> | >100 |
| KM12                      | 0.038            | >100        | 1.81        | <b>6.46</b> | 1.93        | n.d.        | <b>&lt;0.010</b> | >100 |
| HCT-116                   | 0.053            | >100        | <b>1.72</b> | 7.1         | <b>1.61</b> | n.d.        | 0.038            | >100 |
| <i>Cancer al SNC</i>      |                  |             |             |             |             |             |                  |      |
| SF-295                    | <b>0.032</b>     | >100        | 1.86        | n.d.        | <b>1.7</b>  | <b>6.46</b> | 0.367            | >100 |
| SF-539                    | 0.053            | >100        | <b>1.61</b> | <b>6.77</b> | <b>1.68</b> | <b>6.35</b> | <b>0.011</b>     | >100 |
| SNB-75                    | 0.039            | >100        | <b>1.46</b> | 7.77        | <b>1.47</b> | <b>6.5</b>  | <b>&lt;0.010</b> | >100 |
| U251                      | 0.053            | >100        | 2.17        | n.d.        | <b>1.7</b>  | 7.39        | 0.043            | >100 |
| SF268                     | 0.088            | >100        | 1.9         | n.d.        | 1.86        | n.d.        | 0.053            | >100 |
| SNB-19                    | 0.098            | >100        | 2.12        | n.d.        | 1.83        | n.d.        | 0.031            | >100 |
| <i>Cancer de piele</i>    |                  |             |             |             |             |             |                  |      |
| LOX IMVI                  | 0.133            | >100        | 1.87        | n.d.        | 1.82        | n.d.        | <b>0.013</b>     | >100 |
| M14                       | 0.038            | >100        | 1.91        | n.d.        | 2.02        | n.d.        | <b>&lt;0.010</b> | >100 |
| MDA-MB-435                | <b>&lt;0.010</b> | <b>20.4</b> | 1.9         | 7.82        | 1.86        | 7.22        | <b>&lt;0.010</b> | >100 |
| UACC-62                   | <b>0.031</b>     | >100        | 2.32        | 39.9        | 1.82        | <b>6.79</b> | 0.448            | >100 |
| MALME-3M                  | 0.089            | >100        | <b>1.73</b> | 7.82        | 2.01        | 7.88        | n.d.             | >100 |
| SK-MEL-2                  | 0.067            | >100        | 2.6         | >100        | 2.04        | 9.32        | 0.52             | >100 |
| SK-MEL-5                  | 0.041            | >100        | 1.81        | <b>6.93</b> | 1.77        | <b>6.6</b>  | 0.04             | >100 |
| <i>Cancer Ovarian</i>     |                  |             |             |             |             |             |                  |      |
| OVCAR-3                   | <b>0.033</b>     | >100        | 1.83        | 7.11        | 1.88        | 7.08        | 0.021            | >100 |
| NCI/ADR-RES               | 0.039            | >100        | >100        | >100        | 3.16        | >100        | <b>0.012</b>     | >100 |
| SK-OV-3                   | 0.06             | >100        | 19.6        | >100        | 2.01        | <b>6.51</b> | 0.623            | >100 |
| <i>Cancer Renal</i>       |                  |             |             |             |             |             |                  |      |
| 786-0                     | 0.047            | >100        | <b>1.75</b> | <b>6.58</b> | 1.8         | n.d.        | 0.905            | >100 |
| A498                      | <b>0.027</b>     | >100        | 1.96        | 7.55        | 1.6         | <b>6.29</b> | 2.28             | >100 |
| CAKI-1                    | 0.066            | >100        | n.d.        | n.d.        | n.d.        | n.d.        | 0.296            | >100 |
| RXF 393                   | 0.07             | >100        | 1.66        | 7.27        | <b>1.4</b>  | <b>6.57</b> | <b>0.016</b>     | >100 |
| <i>Cancer de sân</i>      |                  |             |             |             |             |             |                  |      |
| MCF7                      | 0.044            | >100        | 1.79        | n.d.        | <b>1.4</b>  | 8.11        | 0.033            | >100 |
| HS 578T                   | 0.046            | >100        | <b>1.74</b> | 25          | 1.81        | >100        | 0.031            | >100 |
| BT-549                    | 0.06             | >100        | 1.98        | >100        | 1.87        | n.d.        | 0.034            | >100 |
| T-47D                     | 0.051            | >100        | 1.94        | >100        | 1.83        | n.d.        | 30.4             | >100 |
| MDA-MB-468                | 0.094            | >100        | 1.66        | 7.49        | 1.84        | 7.62        | 2.71             | >100 |
| <i>Cancer de prostată</i> |                  |             |             |             |             |             |                  |      |
| PC-3                      | 0.038            | >100        | 2.61        | >100        | 1.93        | n.d.        | 0.045            | >100 |
| DU-145                    | 0.09             | >100        | 1.8         | <b>6.4</b>  | <b>1.69</b> | <b>6.05</b> | 0.039            | >100 |

GI<sub>50</sub>- concentrația molară a compusului testat care conduce la inhibarea creșterii a 50 % din celulele tumorale;  
LC<sub>50</sub>- concentrația molară a compusului testat care conduce la moartea a 50 % din celulelor tumorale;  
n.d.- nedeterminat;

Pentru a confirma dacă activitatea anticanceroasă observată la compușii prezentați este conferită printr-un mecanism de interacțiune cu tubulina, am evaluat efectul compușilor activi **7c**, **11a**, **11b**, **13a** și **13b**, dar și al compusului inactiv **10a** (pentru comparație) asupra polimerizării tubulinei. De asemenea, pentru validarea datelor experimentale, a fost realizat și un studiu docking privind interacțiunea compușilor cu situsul colchicinic al tubulinei. Compușii au fost testați la o concentrație finală de 10  $\mu\text{M}$ , în triplicat, pentru a putea compara datele obținute prin realizarea testului de polimerizare a tubulinei *in vitro* cu cele furnizate de NCI. Au fost utilizate două controale pozitive: Paclitaxelul (ca promotor al polimerizării tubulinei și stabilizator al microtubulilor) și Fenstatina (ca inhibitor al polimerizării tubulinei). În figura II.9. sunt prezentate rezultatele obținute în urma experimentului.



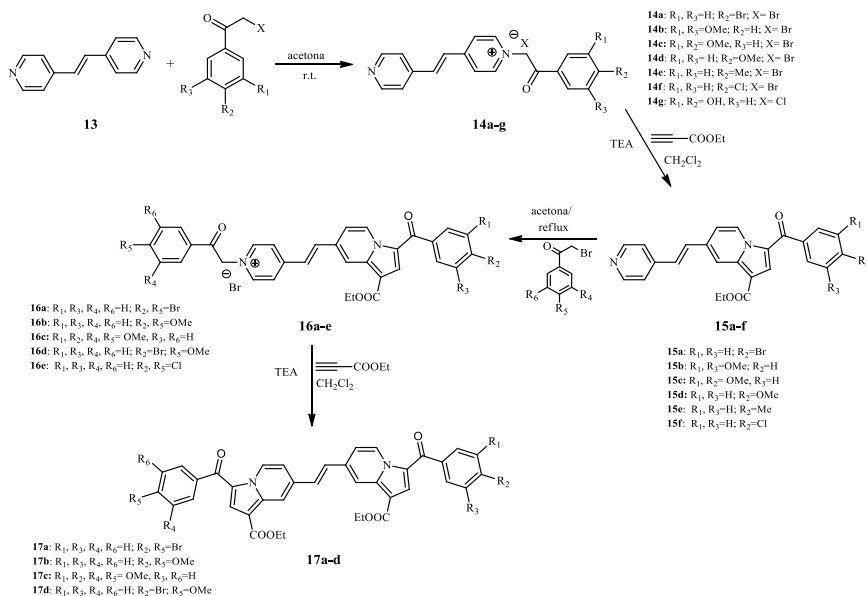
**Figura II.9.** Efectele compușilor **7c**, **10a**, **11a**, **11b**, **13a** și **13b** (10  $\mu\text{M}$ ) asupra polimerizării tubulinei folosind Paclitaxel (10  $\mu\text{M}$ ) ca agent de stabilizare a microtubulilor și Fenstatina (10  $\mu\text{M}$ ) ca agent de destabilizare a microtubulilor

Așa cum se poate observa în figura II.9., Paclitaxelul stimulează polimerizarea tubulinei, în timp ce Fenstatina și toți ceilalți șase compuși testați inhibă procesul de polimerizare a acesteia. Datele obținute au indicat faptul că toți compușii țintă testați prezintă un grad ridicat de inhibare a polimerizării tubulinei *in vitro*, deși nu la fel de eficient ca Fenstatina (control).

## II.1.2. Sinteza și proprietățile unor noi derivați de indolizină substituiți cu unități piridinice prin intermediul unei punți trans-etilenice, precum și a unor derivați cu structură bisindolizinică

Acest subcapitol cuprinde sinteza și proprietățile unor noi analogi de Fenstatină, derivații indoliziniici și bisindoliziniici, obținuți plecând de la trans-1,2-di(4-piridil)-etilenă. Sinteza noilor derivați s-a efectuat în conformitate cu strategia raportată în grupul nostru, succesiunea de reacții utilizate fiind prezentată în Schema II.7. Astfel, compușii monoindoliziniici **15a-f** și bisindoliziniici (simetrici sau nesimetrici) **17a-d** au fost obținuți prin reacții de cicloadiție 3+2 dipolară la propiolatul de etil.

Spectroscopia FTIR și RMN au demonstrat obținerea compușilor propuși prin apariția benzilor, respectiv semnalelor caracteristice în spectrele înregistrate. Compusul **14a** a fost raportat anterior în literatură.



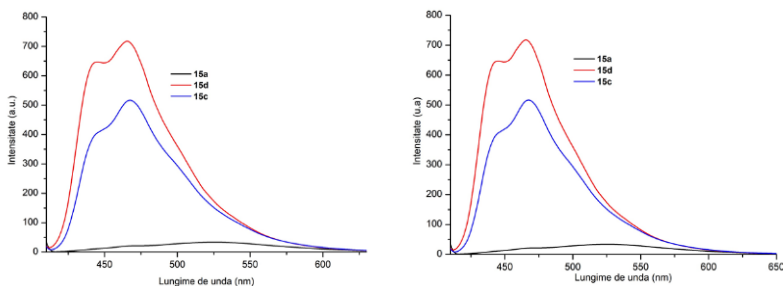
**Schema II.5.** Schema de reacție corespunzătoare sintezei derivaților **14a-g**, **15a-f**, **16a-e** și **17a-d**

Din această serie, au fost selectați de către NCI, 14 compuși (**14a-d**, **15a-c**, **16a-d**, **17a-b**, **17d**) pentru a fi testați în prima etapă la concentrația unică de 10 μM.

### II.1.2.5. Studii preliminare de fluorescență pentru compușii 15a, 15c-d și 17a-c

Proprietățile de emisie a indolizinelor fac ca acestea să poată fi folosite ca senzori sau fluorofori pentru legarea biomoleculelor. Ținând cont de studiile anterioare efectuate în grupul de cercetare și a progreselor recente în aplicațiile derivaților de indolizină, am efectuat un studiu preliminar de investigare a fluorescenței în cazul compușilor cu structură piroloindolizinică **15a**, **15c**, **15d**, **17a**, **17b** și **17c**. Acest studiu a fost realizat în colaborare cu grupul domnului dr. Anton Airinei de la Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași.

În cazul compușilor de tip **15** se poate observa o diferență majoră între fluorescența compușilor **15b-c** și **15a**, acesta din urmă prezentând o fluorescență foarte slabă comparativ cu ceilalți doi compuși (Figura II.21.).



**Figura II.21.** Spectrele de fluorescență ale compușilor **15a**, **15c** și **15d** în clorură de metilen (stânga) și DMF (dreapta)

De asemenea, au fost determinate randamentele cuantice pentru cei 6 compuși investigați, însă cele mai bune randamente cuantice au fost obținute în cazul derivaților bisindolizinici de tip **17**, rezultatele fiind prezentate în tabelul II.7.

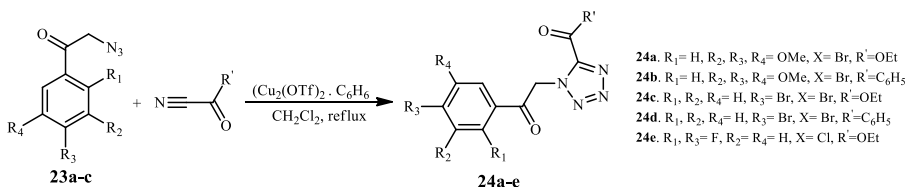
**Tabel II.7.** Valorile randamentelor cuantice ( $\Phi$ ), pentru compușii **17**, în clorură de metilen, respectiv DMF

| Solvent            | Compus     | $\Phi$ (%)   |
|--------------------|------------|--------------|
| Clorură de metilen | <b>17a</b> | <b>69.52</b> |
|                    | <b>17c</b> | 48.28        |
|                    | <b>17d</b> | 48.66        |
| DMF                | <b>17a</b> | 34.67        |
|                    | <b>17c</b> | <b>54.44</b> |
|                    | <b>17d</b> | <b>69.75</b> |

### II.1.3. Sinteza și proprietățile unor noi derivați de tetrazol 1,5-disubstituiți

De asemenea, ne-am propus sintetizarea unor analogi ai Fenstatinei, ce prezintă în structura lor un rest tetrazolic 1,5-disubstituit.

Sinteza tetrazolilor se bazează pe o metodă de ciclizare recent raportată în literatura de specialitate, care utilizează reacții de cicloadiție 3+2 dipolare de tip „click” dintre azide și diferiți dipolarofili cu grupări  $C\equiv N$  activate, în prezența catalizatorului complex  $Cu_2(OTf)_2 \cdot C_6H_6$ . Astfel, au fost sintetizați derivații **24a-e**, utilizând ca și dipolarofili cianoformiatul de etil, și respectiv cianura de benzoyl (Schema II.8.). Structura tetrazolică 1,5-disubstituită a acestora a fost confirmată prin spectroscopie RMN și IR și DRX (în cazul compusului **24**).



**Schema II.8.** Schema de reacție pentru sinteza tetrazolilor **24a-e**

Din această serie, au fost selectați de către NCI, 4 compuși (**24a**, **24b**, **24d** și **24e**) pentru a fi testați în prima etapă la concentrația unică de 10  $\mu M$ . Tetrazolii au arătat un efect inhibitor slab asupra creșterii celulelor tumorale, procentul maxim de inhibare fiind de 22% în cazul compusului **24b** (Tabel II.8.).

**Tabel II.8.** Rezultatele testării activității de inhibare a creșterii a 60 de linii celulare tumorale umane (GI,%)<sup>a</sup>, pentru compușii **24a**, **24b**, **24c** și **24e** la concentrația 10 μM (selecție)

| Tip de cancer/ linie celulară                    | Compus/ Procentul de inhibare a creșterii (GI, %) <sup>a</sup> |              |              |              |
|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|
|                                                  | 24a                                                            | 24b          | 24c          | 24e          |
| <i>Cancer pulmonar</i>                           |                                                                |              |              |              |
| A549/ ATCC                                       | 7.39                                                           | 1.13         | 11.69        | 0.00         |
| HOP-62                                           | 9.99                                                           | 3.42         | 4.13         | 6.24         |
| NCI-H23                                          | 3.84                                                           | 4.57         | 6.24         | 3.26         |
| NCI-H522                                         | <b>19.30</b>                                                   | 1.89         | 3.57         | 1.43         |
| <i>Cancer al sistemului nervos central (SNC)</i> |                                                                |              |              |              |
| SF-268                                           | 0.00                                                           | 4.57         | 0.00         | <b>16.50</b> |
| SNB-75                                           | 14.00                                                          | 0.00         | 12.83        | 13.64        |
| <i>Cancer Ovarian</i>                            |                                                                |              |              |              |
| IGROV1                                           | 0.28                                                           | 5.51         | 7.94         | 0.00         |
| OVCAR-4                                          | 8.80                                                           | 1.09         | n.d.         | 0.00         |
| SK-OV-3                                          | 10.64                                                          | 0.00         | 0.00         | 4.09         |
| <i>Cancer Renal</i>                              |                                                                |              |              |              |
| A498                                             | 3.00                                                           | <b>22.02</b> | 0.00         | 4.60         |
| CAKI-1                                           | n.d.                                                           | 14.26        | <b>15.90</b> | n.d.         |
| UO-31                                            | 11.45                                                          | 16.97        | 14.39        | 8.11         |

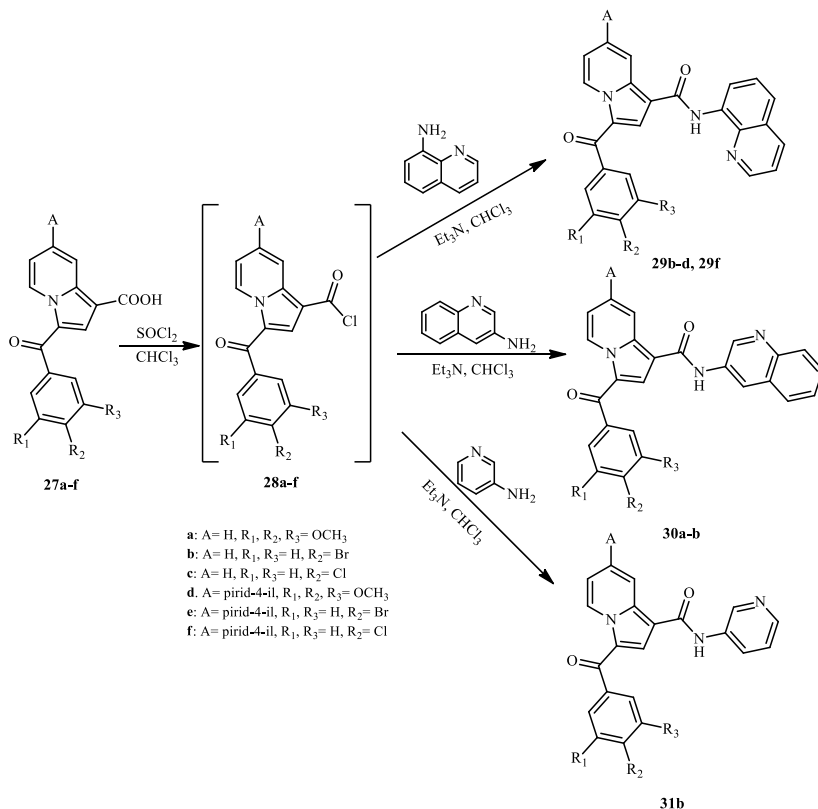
<sup>a</sup>Date furnizate de NCI în urma testărilor *in vitro* pe 60 de linii celulare tumorale umane, valori raportate pentru testarea la o singură concentrație 10 μM;

n.d. - nedeterminat;

## II.2. Sinteza și proprietățile unor noi derivați proiectați ca stabilizatori pentru ADN-ul G-cvadruplex (G4-ADN)

Au fost sintetizate două serii de derivați proiectați ca stabilizatori pentru ADN-ul G-cvadruplex, una cu structură indolizinică și cealaltă cu structură pirolofenantrolinică.

Etapa de cuplare a acizilor **27a-f**, care au fost sintetizați anterior, cu diverse amine aromatice s-a realizat prin intermediul clorurilor acide.



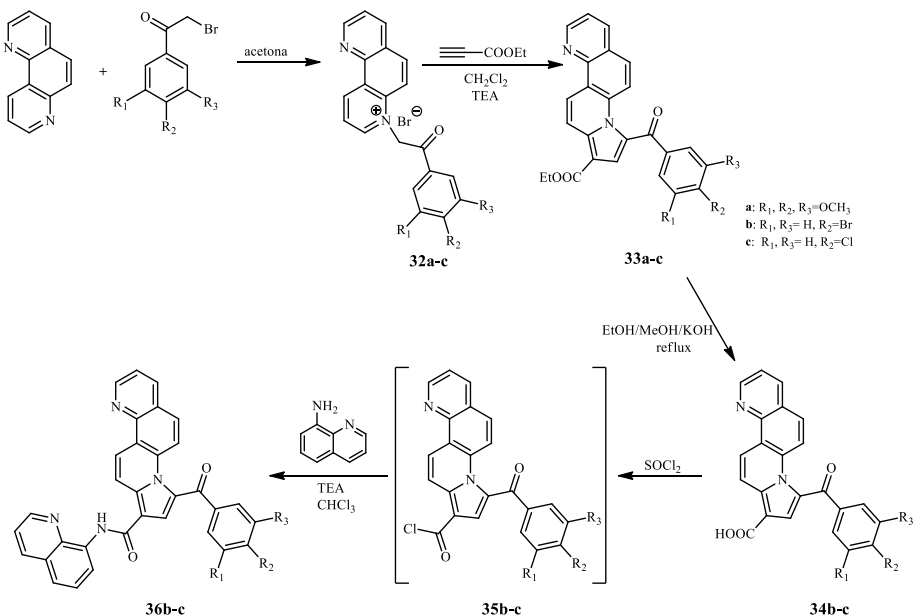
**Schema II.10.** Schema de obținere a derivaților amidici **29a-f**, **30b** și **31b**

Toți compușii sintetizați au fost complet caracterizați din punct de vedere structural, utilizând spectroscopia RMN și IR.



În cazul derivaților pirolofenantrolinici, sinteza compușilor țintă a urmat etapele prezentate în Schema II.11.

Obținerea derivaților **33a-c**, raportați în literatură, a fost realizată printr-un mecanism de cicloadiție 3+2 dipolară, etapă urmată de hidroliza grupării esterice cu formarea derivaților **34a-c**. Etapa de cuplare a acizilor **34a-c** cu 8 aminochinolină s-a realizat prin intermediul clorurilor acide **35b-c**.



**Schema II.11.** Calea de sinteză a derivaților **36a-c**

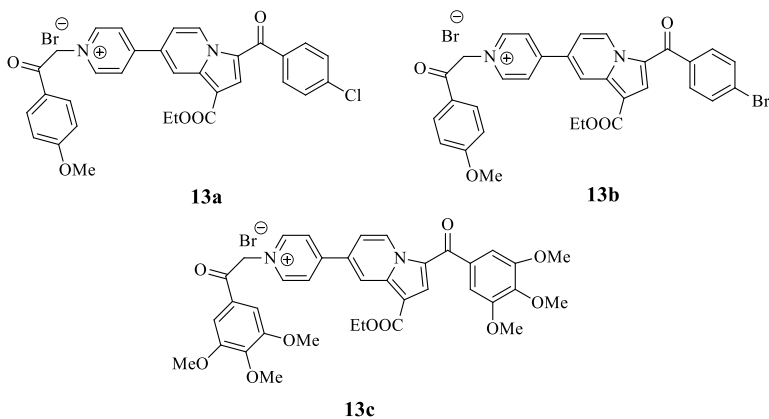
Toți compușii sintetizați au fost complet caracterizați din punct de vedere structural, utilizând spectroscopia RMN și IR.

În vederea testării activității anticanceroase a noilor derivați, structurile acestora au fost înregistrate pe platforma electronică a NCI. Astfel în urma procesului de selecție, au fost selectați 6 compuși pentru testare (**29b**, **29c**, **29d**, **29f**, **36b** și **36c**).

### **II.3. Studiu asupra unor noi ansambluri host-guest (oaspete-gazdă) supramoleculare sensibile la pH, pentru marcarea organitelor celulare acide**

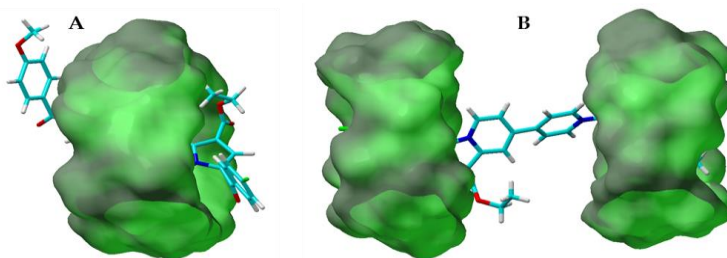
În ultimele decenii, una dintre temele de interes pentru cercetători a fost abilitatea distinctivă a ciclodextrinelor (CD) de a forma complecși de incluziune cu molecule sau polimeri lipofili. În cercetările noastre recente, am raportat studii experimentale și teoretice asupra mecanismului formării complecșilor de incluziune între un derivat fluorescent de indolizinin-piridiniu și  $\beta$ -CD cu aplicarea lor în marcarea celulelor și a componentelor celulare.

Pentru a extinde seria de complecși de incluziune ai CD sensibili la pH, pentru aplicații de colorare a celulelor și pentru a investiga afinitatea lor selectivă pentru componentele celulare acide, am utilizat trei săruri fluorescente de indolizinin-piridiniu, divers substituie la resturile fenilice.



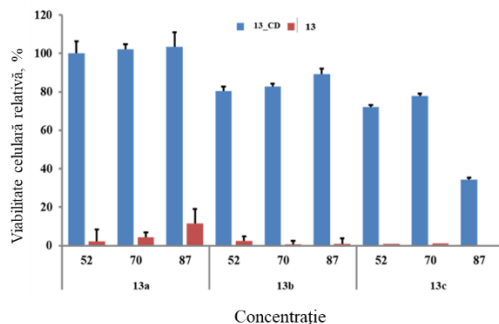
Formarea complecșilor de incluziune a fost demonstrată prin experimentele ESI-MS, metodă frecvent utilizată în studiul fenomenelor de incluziune și în determinarea ulterioară a stoechiometriei complecșilor. În spectrele ESI-MS se observă formarea complecșilor de incluziune atât în raport 1:1, cât și 1:2. De asemenea, formarea

complecșilor de incluziune în cele două rapoarte a fost confirmată și de studiile de modelare moleculară (Figura II.48)



**Figura II.48.** Modelele moleculare de simulare ale complexului **13a-CD**, în raport molar 1:1 (A) și 1:2 (B)

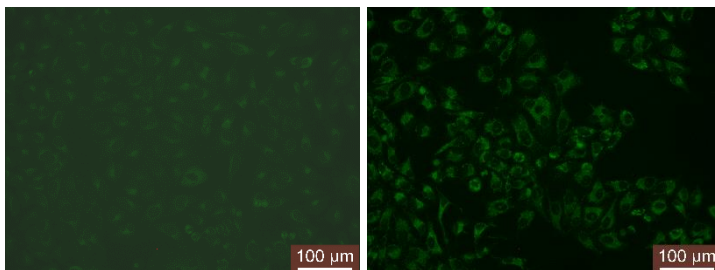
Evaluarea citotoxicității compușilor **13a-c-CD** în comparație cu cea a compușilor **13a-c**, s-a realizat folosind metoda MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazoliu. Testul a fost realizat utilizând linia de celule canceroase HeLa, aparținând cancerului cervical (Figura II.51)



**Figura II.51.** Rezultatele testului de viabilitate celulară *in vitro* (test MTS) pentru compușii **13a-c** (roșu), respectiv compușii **13a-c-CD** (albastru) la concentrații de 52μM, 70μM, respectiv 87μM pe linia de celule canceroase HeLa

Compușii inițiali, sărurile de indolizinin-piridiniu **13a-c**, au prezentat o toxicitate puternică la toate concentrațiile investigate. În cazul complecșilor de incluziune a fost observată o viabilitate celulară semnificativ îmbunătățită. Rezultate obținute sunt în conformitate cu toxicitatea ridicată raportată anterior a sărurilor de piridiniu, respectiv cu observațiile noastre recente privind atenuarea toxicității după formarea complecșilor de incluziune.

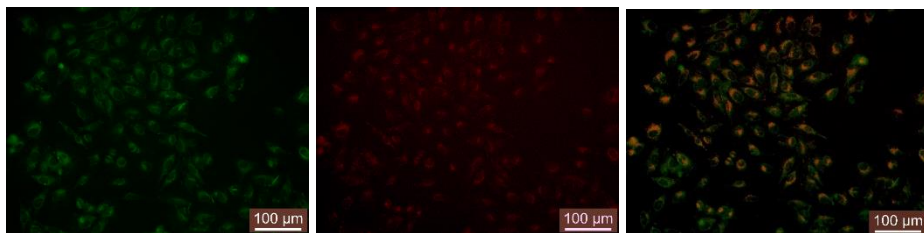
Compușii **13a-c\_CD** au fost evaluați pentru capacitatea lor de a traversa membrana celulară, și de a patrunde în interiorul celulei, dar și cea de marcarea componentelor celulare în celulele vii în microscopia de fluorescență. Astfel, celulele HeLa au fost incubate cu o soluție apoasă de complecși **13a-c\_CD** (52μM), apoi s-au comparat imaginile (după 15 minute, respectiv 24h). În figura II.52 sunt prezentate rezultatele obținute în cazul complexului de incluziune **13b\_CD**.



**Figura II.52.** Imaginile complexul **13b\_CD** acumulat în liniile de celule HeLa după 15 minute (stanga), respectiv 24h de incubare (dreapta)

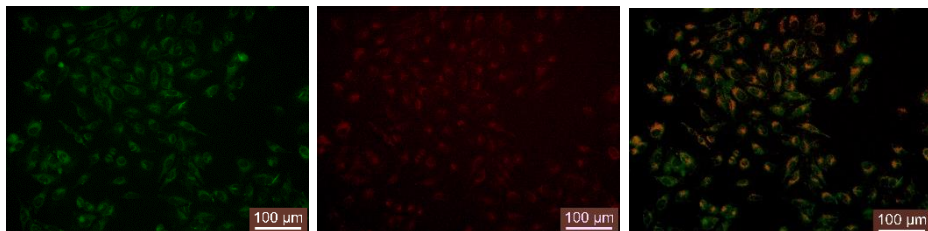
După 15 minute de incubare a celulelor HeLa cu soluțiile investigate, a fost observată o localizare intracelulară, extranucleară, clar vizibilă pentru toate eșantioanele. Incubarea celulelor tratate până la 24h, a evidențiat o creștere puternică a semnalului fluorescent, însoțită de aglomerații localizate particular în citoplasmă.

Aceste localizări specifice a complexelor de incluziune **13a-c\_CD** au fost examinate în continuare folosind markeri specifici ai organelor celulare. Astfel, pentru a verifica specificitatea complexelor **13a-c\_CD** de a marca selectiv organele celulare, s-au efectuat experimente de co-colorare (co-developare) paralele în celulele HeLa cu LysoTracker (marker specific lizozimilor) și MitoTracker (marker specific mitocondriilor). În consecință, celulele au fost incubate timp de 24h cu soluțiile complexelor **13a-c\_CD**, apoi au fost tratate cu LysoTracker Red timp de 30 de minute, și în final au fost înregistrate imagini pentru a observa un eventual model distinct de etichetare lizozomală. Suprapunerea imaginilor rezultate a sugerat localizarea complexelor de incluziune în lizozomi. În figura II.53. sunt prezentate datele obținute în cazul complexului de incluziune **13b\_CD**.



**Figura II.53.** Imaginile distribuției celulare a complexului **13b\_CD** (stânga) comparată cu imaginea cu LysoTracker Red (mijloc) și suprapunerea acestora (dreapta)

Experimentul de co-developare efectuat în mod similar cu MitoTrackerRed pe celulele HeLa incubate 24h cu soluțiile compuşilor de incluziune **13a-c\_CD**, a condus la rezultate complet diferite (Figura II.54.), complexii prezentând o distribuție și o localizare în afara mitocondriilor. Analiza imaginilor suprapuse a sugerat o suprapunere scăzută între semnalele fluorescente ale complexelor **13a-c\_CD** și agentul de colorare. În figura II.54. sunt prezentate datele obținute în cazul complexului de incluziune **13b\_CD**.



**Figura II.54.** Imaginile distribuției celulare a complexului **13b\_CD** (stânga) comparată cu imaginea cu MitoTracker Red (mijloc) și suprapunerea acestora (dreapta)

În consecință, rezultate de co-developare dublă a mitocondriilor au pus sub semul întrebării ipoteza noastră cu privire la asemănările structurale dintre complexii **13a-c\_CD** și alți agenți cunoscuți de marcarea mitocondriilor, precum și la obținerea de noi markeri mitocondriali fluorescenți. Pe de altă parte, rezultatele pozitive pentru colorarea lizozomilor recomandă compuşii **13a-c\_CD** nu numai ca markeri fluorescenți selectivi de lungă durată, ci și ca agenți pentru monitorizarea modificărilor de pH în timp, în organele celulare respective.

## Concluzii generale

- În cadrul prezentei teze de doctorat a fost sintetizat un număr de 103 compuși dintre care 68 neraportați în literatură, acești compuși fiind grupați în următoarele serii de compuși:
  - ✓ două serii de derivați indolizininici piridil-substituiți (**7a-h** și **10a-d**);
  - ✓ o serie derivați de indolizină substituiți cu unități piridinice prin intermediul unei punți trans-etilenice **15a-f**;
  - ✓ o serie derivați de derivați cu structură bisindolizinică **17a-d**, cele doua cicluri indolizininice fiind separate prin intermediul unei punți trans-etilenice;
  - ✓ o serie de tetrazoli 1,5-disubstituiți **24a-e**;
  - ✓ o serie de compuși proiectați ca stabilizatori de ADN G4 cu structură indolizinică (**29b-d**, **29f**, **30a-b**, **31b**);
  - ✓ o serie de compuși proiectați ca stabilizatori de ADN G4 cu structură pirolo[1,2-*i*][1,7]fenantrolinică (**36b-c**);
- Toți compușii sintetizați au fost caracterizați din punct de vedere structural utilizând spectroscopia RMN și FTIR, dar și difracția de raze X în cazul compusului **24a**.
- Compușii **7a-d**, **10a**, **10d**, **11a-b**, **11d**, **12a-c**, **13a-b**, **14a-d**, **15a-b**, **16a-c**, **17a-b**, **17d**, **24a-c**, **24e**, **29b-d**, **29f** și **36b-c** au fost testați pentru a determina capacitatea de inhibare a creșterii celulare tumorale umane, astfel:
  - ✓ În primul stadiu testarea compușilor s-a efectuat pe 60 de linii celulare din diferite tipuri de cancer la o singură concentrație (10 μM);
  - ✓ Rezultatele promițătoare privind activitatea de inhibare a creșterii celulare tumorale a compușilor **11a**, **13a-b**, **16b** au condus la selectarea acestora pentru testarea *in vitro* la 5 concentrații diferite pe aceleași linii celulare;
  - ✓ Compusul **11a** s-a remarcat datorită activității inhibitorii foarte bune pe 47 de linii celulare cu o valoare  $GI_{50} < 100$  nM, dar și datorită activității sale citotoxice selective doar pe linia MDA-MB-435 ( $LC_{50} = 20.4$  μM) care aparține cancerului de piele;
  - ✓ Compușii **13a** și **13b** au arătat o activitate citotoxică excelentă împotriva tuturor liniilor celulare aparținând cancerului de colon, cancerului renal, cancerului de piele, cancerului pulmonar, cancerului ovarian, cancerului de sân și, respectiv cancerului de prostată;
  - ✓ Compusul **16b** prezentat valori  $GI_{50}$  superioare Fenstatinei (control) în cazul celulelor COLO205 (cancer de colon) și T47-D și MDA-MB-468 (cancer de sân) ;

- În cazul compușilor **7c**, **10a**, **11a-b**, **15a-b**, **16b** și **16d** a fost investigat un posibil mecanism de acțiune al acestora prin determinarea efectului asupra polimerizării tubulinei *in vitro*, toți compușii investigați arătând proprietăți de inhibare a polimerizării tubulinei.
- În vederea susținerii ipotezei privind mecanismul de acțiune al compușilor **7a-c**, **10a**, **11a-b**, **11d**, **12a-b** și **13a-b**, s-au realizat studii teoretice de docking molecular, acestea fiind efectuate la situsul colchicinic de legare a heterodimerului  $\alpha, \beta$  –tubulina, rezultatele obținute susținând datele experimentale obținute în ceea ce privește acțiunea de inhibare a polimerizării tubulinei.
- O serie de compuși au fost investigați privind activitatea biologică împotriva tulpinilor *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 și *Candida albicans* ATCC10231, rezultatele obținute fiind sintetizate astfel:
  - ✓ Compușii **6a-k**, **7c-i**, **14c-d**, **15a-d**, **16b-c** și **17a-c** nu prezintă activitate antimicrobiană asupra liniilor testate;
  - ✓ Compușii **14a** și **16a** au fost moderat eficienți împotriva tulpinii Gram-pozitive reprezentate de *S. Aureus*. Diametrul zonei de inhibiție a compusului **14a** a fost de  $10 \pm 0.11$  mm, în timp ce diametrul zonei de inhibiție pentru compusul **16a** a fost de  $8.4 \pm 0.18$  mm;
- În cazul compușilor **24a**, **24c**, **24e** a fost investigat caracterul redox, voltamogramele obținute arătând existența unor picuri de oxidare/reducere atribuite transferului electronic la nivelul ciclului tetrazolic și restului fenil; Astfel, un studiu mai avansat urmează să fie realizat în vederea stabilirii unei posibile utilizări a acestor compusi ca senzori electrochimici.
- A fost efectuat un studiu privind obținerea, caracterizarea și proprietățile unei serii de trei complecși de incluziune **13a-c\_CD** ai  $\beta$ -ciclodextrinei cu săruri monocuaternare de (indolizin-7-il)piridiniu, obținându-se următoarele concluzii:
  - ✓ Complecșii de incluziune **13a-c\_CD** au fost investigați prin experimente ESI-MS, microscopie TEM și prin studii de modelare moleculară, aceste studii demonstrând formarea în cazul celor trei compuși a complecșilor de incluziune în raport molar 1:1 și 1:2 (**13 : CD**);
  - ✓ Studiile de fluorescență atât a sărurilor de indolizin-7-il piridiniu, cât și a complecșilor de incluziune au arătat variația fluorescenței acestora în funcție de pH;
  - ✓ Investigarea proprietăților biologice pe celule HeLa a arătat creșterea viabilității celulare în cazul complecșilor de incluziune (> 80%) comparativ cu a sărurilor monocuaternare de (indolizin-7-il) piridiniu (< 10 %);

- ✓ Compușii **13a-c\_CD** au fost evaluați pentru capacitatea lor de a traversa membrana celulară, și de a patrunde în interiorul celulei, dar și cea de marcarea componentelor celulare în celulele vii în microscopia de fluorescență, prin experimente de co-colorare paralele în celulele HeLa cu LysoTracker și MitoTracker. Suprapunerea imaginilor a arătat localizarea complexelor de incluziune în lizozomi, în afara mitocondriilor, sugerând o posibilă utilizare a acestora pentru marcarea intracelulară a organelor acide.
- ✓ Complecșii prezintă o stabilitate celulară excelentă (nu se observă scăderea intensității fluorescenței în 24h) comparativ cu agenții comerciali LysoTracker și MitoTracker.
- Rezultatele obținute în cadrul tezei de doctorat au făcut până acum subiectul a 3 articole științifice publicate în reviste indexate Web of Science din *cuartila* Q1 (zona roșie, conform UEFISCDI) și a 9 participări la conferințe, astfel:
  - ✓ **Articole științifice:**
    - ❖ Pricope G., Ursu E.L., **Sardaru M.**, Cojocaru C., Clima L., Marangoci N., Danac R., Mangalagiu I.I., Simionescu B.C., Pinteala M., Rotaru A., „Novel cyclodextrin-based pH-sensitive supramolecular host-guest assembly for staining acidic cellular organelles”, *Polymer Chemistry.*, **9**, 968, 2018. (IF= 5.342)
    - ❖ **Sardaru M.-C.**, Craciun A.M., Al Matarneh C.-M., Sandu I.S., Amarandi R.M., Popovici L., Ciobanu C.I., Peptanariu D., Pinteala M., Mangalagiu I.I., Danac R., „Cytotoxic substituted indolizines as new colchicine site tubulin polymerization inhibitors”, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **35(1)**, 1581-1595, (2020). (IF= 4.673)
    - ❖ **Sardaru M.**, Carp O., Ursu E.L., Craciun A.M., Cojocaru C., Silion M., Kovalska V., Mangalagiu I., Danac R., Rotaru A., “Cyclodextrin encapsulated pH sensitive dyes as fluorescent cellular probes: self-aggregation and *in vitro* assessments”, *Molecules*. (under review).
  - ✓ **Participari la conferințe:**
    - ❖ **Monica- Cornelia Sardaru**, Ramona Danac, Catalina Ionica Ciobanu, Mircea Odin Apostu, “Synthesis, structure and evaluation of potential anticancer activity of new tetrazoles derivatives”, Conferința științifică “Zilele Universității Alexandru Ioan Cuza”, 27-28 Octombrie 2016, Iași, România.
    - ❖ **Monica-Cornelia Sardaru**, Gabriela Pricope, Cornel Cojocaru, Ramona Danac, Ionel Mangalagiu, Alexandru Rotaru, “Novel pH-sensitive supramolecular host-guest



assembly for staining acidic cellular organelles“, Zilele Universității “IașiChem2017”, 26-27 Octombrie 2017, Iași, România.

❖ **Monica-Cornelia Sardaru**, Ionel Mangalagiu Ramona Danac, Catalina Ionica Ciobanu, Mircea Odin Apostu, “Synthesis and anticancer evaluation of new tetrazoles derivatives“, “Chemistry Conference for Young Scientists (ChemCys 2018)“, 21-23 Februarie 2018, Blankenberge, Belgia.

❖ **Monica-Cornelia Sardaru**, Sinziana Oniciuc, Ionel Mangalagiu, Ramona Danac, Catalina Ionica Ciobanu, “Synthesis and anticancer evaluation of new Phenstatin analogues“, Sesiunea de comunicări științifice a studenților, masteranzilor și doctoranzilor “CHIMIA - FRONTIERĂ DESCHISĂ SPRE CUNOAȘTERE“, ediția a IX-a, 29-30 Iunie 2018, Iași, România.

❖ **Monica-Cornelia Sardaru**, Ionel Mangalagiu Ramona Danac, Catalina Ionica Ciobanu, “Pyrollo-fused heterocyclic compounds designed as quadruplex DNA ligands: synthesis and anticancer evaluation“, “22nd International Conference on Organic Synthesis, (22-ICOS)“, 16-21 Septembrie 2018, Florența, Italia.

❖ **Monica-Cornelia Sardaru**, Maria Sobaru, Catalina Ciobanu, Ramona Danac, “Synthesis and structure of new 7,7'-(ethane-1,2-diyl)bisindolizine derivatives“, “a XXXV-a Conferinta Nationala de Chimie“, 2-5 Octombrie 2018, Căciulata(Vâlcea), Romania.

❖ **Monica-Cornelia Sardaru**, Ionel Mangalagiu, Ramona Danac, Violeta Mangalagiu, “Synthesis of new aza-heterocyclic compounds designed as quadruplex DNA ligands and their anticancer activity“, Zilele Universității “IașiChem2018”, 25-26 Octombrie 2018, Iași, România.

❖ **Monica-Cornelia Sardaru**, Ramona Danac, Ionel Mangalagiu, Catalina I. Ciobanu, “Synthesis and anticancer evaluation of new indolizine derivatives“, Sesiunea de comunicări științifice a studenților, masteranzilor și doctoranzilor “CHIMIA - FRONTIERĂ DESCHISĂ SPRE CUNOAȘTERE“, ediția a X-a, 20-31 Iunie 2019, Iași, România.

❖ **Monica-Cornelia Sardaru**, Ramona Danac, Catalina Ciobanu, Ionel Mangalagiu, “Synthesis, structure and properties of new bisindolizine derivatives“, Zilele Universității “IașiChem2019”, 31 Octombrie-1 Noiembrie 2019, Iași, România.

- Pe parcursul stagiului doctoral am beneficiat de doua **proiecte de mobilitate**, astfel:
  - ❖ Proiect PN-III-P1-1.1-MC-2017-1104 Contract de finanțare nr: <https://uefiscdi.ro/index.php> (Titlu acțiune: Proiect mobilitate pentru cercetători, Participare la Chemistry Conference for Young Scientists (Belgium))
  - ❖ Proiect PN-III-P1-1.1-MC-2018-0672 Contract de finanțare nr. 203/09.07.2018 <https://uefiscdi.ro/index.php> (Titlu acțiune: Proiect mobilitate pentru cercetători, Participare la 22nd International Conference on Organic Synthesis (Italy)).
- Pe parcursul stagiului doctoral am fost, de asemenea, **membru în echipa unor proiect de cercetare**, astfel:
  - ❖ Proiect ”Polimeri coordinativi poroși noi cu liganzi organici de dimensiuni variabile pentru stocarea gazelor”, acronim POCPOLIG (ID P\_37\_707, cod MySMIS: 104810, Contract de finanțare nr. 67/8.09.2016) (poziție asistent cercetare).
  - ❖ Proiect ”Noi structuri polifuncționale azasteroid-mimetice: compuși fluorescenți și biologic activi”, cod PN-III-P1-1.1-TE-2016-1205, acronim NPAMFB, Contract de finanțare nr.15/2018.
- Pe parcursul stagiului doctoral am publicat în calitate de **coautor un număr de 5 articole ISI** (rezultate care nu sunt incluse în teză), astfel:
  - ❖ Bejan D., Bahrin L.G., Shova S., **Sardaru M.**, Clima L., Nicolescu A., Marangoci N., Lozan V., Janiak C., “Spontaneous resolution of non-centrosymmetric coordination polymers of zinc(II) with achiral imidazole-biphenyl-carboxylate ligands”, *Inorganica Chimica Acta*, **482**, 275-283, (2018). (IF: 2.304)
  - ❖ Bahrin L.G., Rosca I., Clima L., Shova S., Bejan D., Nicolescu A., Marangoci N.L., **Sardaru M.C.**, Lozan V., Rotaru A., ”Zinc(II) coordination polymer on the base of 3’-(1H-tetrazol-5-yl)-[1,1’-biphenyl]-4-carboxylic acid: Synthesis, crystal structure and antimicrobial properties”, *Inorganic Chemistry Communications*, **92**, 60–63, (2018). (IF = 1.943)
  - ❖ Bahrin L.G., Clima L., Shova S., Rosca I., Cojocaru C., Bejan D., **Sardaru M.C.**, Marangoci N., Lozan V., Rotaru A., “Synthesis, structure, computational modeling and biological activity of two novel bimesitylene derivatives”, *Research on Chemical Intermediates*, 2019, **45(2)**, 453-469, (2019). (IF = 2.262)
  - ❖ Ursu E.L., Rosca I., Bahrin L.G., Clima L., Bejan D., **Sardaru M.C.**, Marangoci N., Lozan V., Rotaru A., “Aqueous Dispersion of Single-Walled Carbon Nanotubes Using Tetra-Phenyl Bimesitylene Derivative via Noncovalent Modification and

Improved Antimicrobial Activity”, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **19**, 7960–7966, (2019). (IF = 1.134)

❖ Al Matarneh C.M., **Sardaru M.C.**, Apostu M.O., Rosca I., Ciobanu C.I., Mangalagiu I.I., Danac R., “Synthesis and antibacterial evaluation of new pyrrolo[3',4':3,4]pyrrolo[1,2-a] quinolone and pyrrolo[3',4':3,4]pyrrolo[2,1-a]isoquinoline derivatives, *STUDIA UBB CHEMIA*, **LXIV**, **3**, 67-80, (2019). (IF=0.275)

#### **Doctorandul mulțumește următoarelor proiecte pentru suportul acordat:**

❖ Proiectului POSCCE-O 2.2.1, SMIS-CSNR 13984-901, nr. 257/28.09.2010, **CERNESIM**, pentru experimentele RMN și de difracție de raze X și Institutului Național de Cancer (NCI) din SUA pentru testările biologice.

❖ Proiectului ”Polimeri coordinativi poroși noi cu liganzi organici de dimensiuni variabile pentru stocarea gazelor”, acronim **POCPOLIG** (ID P\_37\_707, cod MySMIS: 104810, Contract de finanțare nr. 67/8.09.2016)

❖ Proiectului PN-III-P1-1.1-MC-2017-1104 Contract de finanțare nr: <https://uefiscdi.ro/index.php> (Titlu acțiune: Proiect mobilitate pentru cercetători, Participare la Chemistry Conference for Young Scientists (Belgium))

❖ Proiectului PN-III-P1-1.1-MC-2018-0672 Contract de finanțare nr. 203/09.07.2018 <https://uefiscdi.ro/index.php> (Titlu acțiune: Proiect mobilitate pentru cercetători, Participare la 22nd International Conference on Organic Synthesis (Italy)).