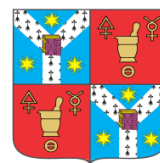


UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI

FACULTATEA DE CHIMIE

ȘCOALA DOCTORALĂ DE CHIMIE



Sinteze de noi azaheterocicli cu proprietăți speciale

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Coordonator de doctorat,

Prof. univ. dr. Elena BÎCU

Student-doctorand,

Chimist **Georgiana NEGRU**
(căs. APOSTOL)

2023

Mulțumiri

La încheiere acestui capitol important din viața mea, doresc să îmi exprim recunoștința și mulțumirea tuturor celor care mi-au oferit sprijin și îndrumare în finalizarea tezei de doctorat.

*În primul rând, doresc să îi mulțumesc conducătorului de doctorat **Prof. univ. dr. Elena Bîcu** pentru că a avut încredere în mine și pentru că mi-a oferit această oportunitate. Vă mulțumesc pentru tot ajutorul oferit, pentru toate sfaturile, încurajările, implicarea și sprijinul constant, iar faptul că am ajuns până aici se datorează în cea mai mare parte dumneavoastră!*

*Pe această cale, îi mulțumesc doamnei **Dr. habil. Alina Ghineț** pentru suportul necondiționat acordat în timpul anilor de doctorat, în special pe parcursul stagiilor de cercetare. Vă mulțumesc pentru timpul, încrederea și dedicarea dumneavoastră!*

*În egală măsură, doresc să mulțumesc membrilor comisiei de îndrumare, doamnei **Conf. dr. Dalila Belei**, domnului **Prof. dr. habil. Mihail-Lucian Bîrsă** și domnului **Conf. dr. Neculai-Cătălin Lungu** pentru sprijinul acordat pe parcursul acestor ani, pentru toate sfaturile și pentru timpul acordat.*

*Doresc să mulțumesc pentru toată susținerea oferită de domnul **Prof. dr. Rigo Benoît** și de colectivul laboratorului din cadrul instituției JUNIA-Grande ecole d'Ingenieurs, Universite Catholique de Lille, Franța.*

*Am parcurs această frumoasă călătorie alături de colega mea **Andreea Zubaș**, care a fost alături de mine încă de la început. Împreună, am trecut prin toate provocările și greutățile, iar faptul că am avut o persoană pe care m-am putut baza în permanență și care a înțeles pe deplin dificultățile și presiunile cu care ne-am confruntat, a făcut întreaga experiență mai ușoară și mai frumoasă. Îți mulțumesc!*

*De asemenea, doresc să adresez mulțumiri familiei mele, părinților și soțului meu, **Emil Apostol**, pentru susținerea necondiționată oferită în această perioadă. Ați fost acolo pentru mine, încurajându-mă să merg mai departe și ați crezut mereu în mine. Vă mulțumesc pentru răbdarea, înțelegerea și dragostea voastră!*

Georgiana

Lucrarea de doctorat intitulată "Sinteze de noi azaheterocicli cu proprietăți speciale" cuprinde 216 pagini, anexe (conțin articolele științifice publicate) și are următoarea structură:

Cuprins

Listă de abrevieri	5
Introducere	7
I. Date de literatură	11
I.1. Azaheterocicli. Importanță și aplicabilitate	12
I.2. Pirol și derivați. Reprezentanți cu acțiune biologică	15
I.2.1. Metode de sinteză a derivaților de pirol	16
I.2.1.1. Obținerea industrială a pirolului	16
I.2.1.2. Metode clasice de sinteză	16
I.2.2. Derivați de pirol cu acțiune biologică	17
I.3 Pirazol și derivați. Reprezentanți cu acțiune biologică	27
I.3.1. Metode de sinteză a derivaților de pirazol	28
I.3.1.1. Sinteza derivaților de pirazol polisubstituiți prin reacția dintre diferite hidrazine și derivați carbonilici α,β -nesaturați	28
I.3.1.2. Reacțiile de cicloadiție 1,3-dipolare	29
I.3.2. Derivați de pirazol cu acțiune biologică	30
I.4. Piridină și derivați. Reprezentanți cu acțiune biologică	38
I.4.1. Metode de sinteză a derivaților de piridină	39
I.4.1.1. Sinteza derivaților de piridină prin intermediul reacției dintre aldehide sau cetone și amoniac	39
I.4.1.2. Sinteza derivaților de piridină prin intermediul reacției dintre aldehide, cetone și malononitril	39
I.4.2. Derivați de piridină cu acțiune biologică	40
II. Contribuții personale	47
I.1. Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor derivați de pirol - Seria I	49
II.1.1. Strategii de sinteză	52

<i>II.1.2. Evaluare biologică</i>	64
<i>II.1.3. Concluzii</i>	72
<i>II.2. Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor derivați de hidrazone - Seria II</i>	73
<i>II.2.1. Strategii de sinteză</i>	73
<i>II.2.2. Evaluare biologică</i>	84
<i>II.2.3. Concluzii</i>	99
<i>II.3. Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor derivați de piridine - Seria III</i>	101
<i>II.3.1. Strategii de sinteză</i>	103
<i>II.3.2. Evaluare biologică</i>	108
<i>II.3.3. Concluzii</i>	112
<i>II.4. Concluzii generale și perspective</i>	113
<i>III. Parte experimentală</i>	117
<i>III.1. Sinteza și caracterizarea derivaților de tip pirol (Seria I)</i>	119
<i>III.2. Sinteza și caracterizarea derivaților de tip hidrazonă (Seria II)</i>	167
<i>III.3. Sinteza și caracterizarea derivaților de tip piridină (Seria III)</i>	200
<i>Bibliografie</i>	207
<i>Anexe</i>	217

Lucrarea este însoțită de 176 de referințe bibliografice, iar rezumatul cuprinde o formă succintă a cercetărilor personale, concluziile generale și o parte din referințele bibliografice. Se păstrează numerotarea originală din lucrarea de doctorat a capitolelor, a figurilor, a schemelor de reacție și a tabelor.

Introducere

În prezent, cancerul reprezintă o cauză majoră de deces la nivel mondial. Agenții antitumorali utilizați în tratarea cancerului au în general activitate citostatică sau citotoxică, prin interferențe cu mecanismele responsabile de diviziunea celulară. Chiar dacă s-au depus eforturi uriașe pentru găsirea unui tratament, cancerul rămâne una dintre cele mai dificile boli de tratat, deoarece majoritatea pacienților obțin doar o supraviețuire mai lungă. În fiecare an, numărul de cazuri noi de cancer crește, acesta fiind principalul motiv pentru care cercetătorii își îndreaptă atenția spre sinteza unor noi compuși cu acțiune antitumorală, cu scopul de a vindeca unde este posibil sau de a prelungi și de a îmbunătăți calitatea vieții pacienților.

Potrivit Organizației Mondiale a Sănătății¹, cancerul este a doua cauză principală de deces la nivel mondial, după bolile cardiovasculare, acesta provocând aproximativ 10 milioane de decese în ultimul an. În 2020¹, cele mai frecvente tipuri de cancer au fost cancerul de sân, cancerul pulmonar, cancerul de colon, cancerul de prostată, cancerul de piele (non-melanom) și cancerul de stomac. Cancerul pulmonar, cancerul de colon, cancerul de ficat, cancerul de stomac și cancerul de sân au fost cele mai frecvente cauze de deces provocate de cancer în același an. Se estimează că între 30-50% din cazurile de cancer pot fi prevenite în prezent prin evitarea factorilor de risc și că povara cancerului poate fi redusă prin depistarea precoce, tratamentul adecvat și îngrijirea pacienților.

În prezent, cercetările în oncologie au ca strategie principală țintirea unor anumite enzime, cum ar fi tubulina, farneziltransferaza, kinaza și topoizomeraza, care au un rol important în diviziunea celulară. Astfel, se realizează sinteza unor compuși cu activitate biologică potențială, în special anticancer, prin utilizarea studiilor și structurilor de compuși cunoscuți ca agenți antitumorali. Noua generație de compuși antitumorali este adesea asociată cu agenți citotoxici clasici pentru a obține efecte terapeutice. Pentru a evita mecanismele de rezistență dezvoltate de multe tumori la agenții antitubulină, este necesară identificarea unor noi compuși cu mecanisme de acțiune diferite și cu proprietăți farmacodinamice îmbunătățite

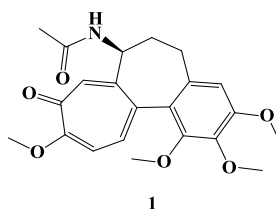


Figura I.1. Structura colchicinei.

Un exemplu de compus cu activitate antitumorală este colchicina² (compusul **1**, **Figura I.1**), alcaloid care se găsește în brândușa de toamnă și se utilizează ca citostatic (împiedică diviziunea celulară) numai în stadiile finale ale bolii, fără o altă alternativă.

Plecând de la structura colchicinei au fost sintetizați analogi cu acțiune antitumorală, de exemplu combrestatina A-4³ (CA-4), izocombrestatina³ și fenstatina³ (**Figura I.2**).

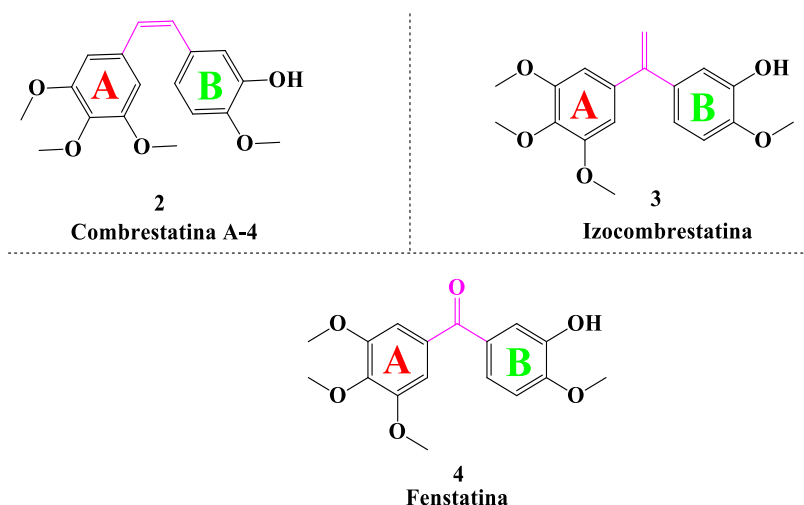


Figura I.2. Structurile analogilor de colchicină.

Tubulina joacă un rol important într-o varietate de procese celulare esențiale, cum ar fi transportul intracelular, formarea și menținerea formei celulare, astfel, prin inhibarea polimerizării acesteia, celulele canceroase nu se mai pot dezvolta, medicamentele având fie efect citostatic (opresc dezvoltarea celulelor canceroase), fie efect citotoxic (distrug celulele canceroase).

Un inhibitor al polimerizării tubulinei este CA-4 care are ca elemente structurale două nuclee A și B de tip 3,4,5-trimetoxifenil și respectiv 3-hidroxi-4-metoxifenil legate printr-o legătură dublă. Există două forme ale CA-4, *cis* și *trans*, însă doar forma *cis* prezintă activitate antitumorală. Din acest motiv au fost făcute modificări pe structură, obținându-se analogii de tipul izocombrestatinei și fenstatinei.^{3,4}

Fenstatina este un analog al CA-4 de tip benzofenonă, sintetizată de Pettit și colaboratorii³, cu un conector de tip carbonilic între inelele aromatice. Aceasta este echivalentă cu Combrestatina A-4 în interacțiunile sale cu tubulina, în prezent aflându-se în studii clinice pentru evaluarea activității antitumorale.

Atomul de carbon ce aparține grupării carbonil din fenstatină, hibridizat sp^2 constrânge orientarea *cis* și adesea îmbunătățește stabilitatea chimică și solubilitatea în apă. Acest lucru a dus la sinteza de noi inhibitori ai microtubulilor care prezintă profiluri farmacologice îmbunătățite (cu activitate antiproliferativă la concentrații nanomolare împotriva unui panou de linii celulare de cancer uman).⁴

Fenstatina și derivații săi sunt potențiali candidați anticancer datorită proprietăților lor inhibitoare asupra polimerizării tubulinei, creșterii celulare și activității antivasculară.

De-a lungul timpului, s-au făcut diferite modulări pe structura fenstatinei, cu scopul obținerii de noi compuși cu activitate biologică. S-au înlocuit, pe rând, nucleele A și B, iar compușii obținuți au fost testați pentru activitatea lor anticancer. În **Figura I.4** sunt prezentate câteva exemple de analogi ai fenstatinei, cu ciclul B modificat, ce prezintă activitate asupra inhibării polimerizării tubulinei.^{7,8}

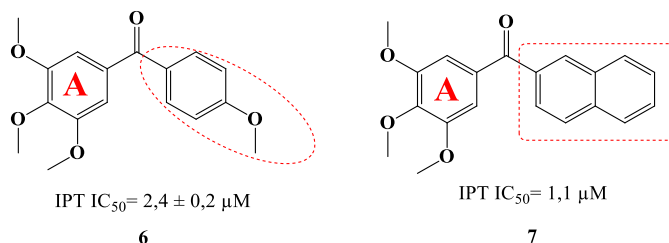


Figura I.4. Analogi ai fenstatinei cu nucleul B modificat.

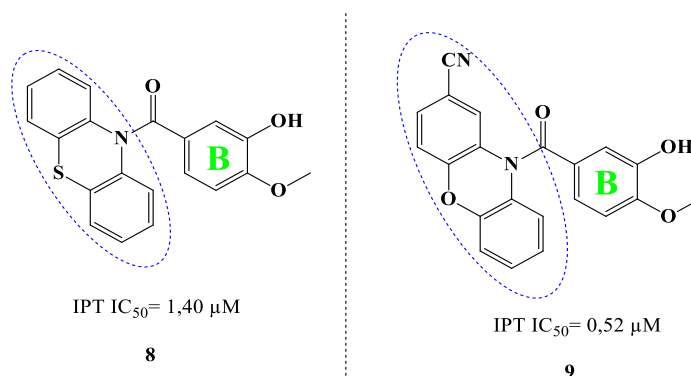


Figura I.5. Analogi ai fenstatinei cu nucleul A modificat.

Înlocuirea nucleului A și conservarea nucleului B a reprezentat o altă modulare ce a dus la sinteza unor compuși cu activitate asupra inhibării polimerizării tubulinei (compușii **8** și **9**, **Figura I.5**).⁹

În cadrul acestei teze de doctorat, ne-am propus sinteza și analiza proprietăților biologice a unor noi compuși care vor fi evaluați pentru capacitatea de inhibare a unor enzime ca tubulina și/sau farneziltransferaza. Astfel, pornind de la structura fenstatinei, prin diferite modulări, se dorește introducerea în structură a unor heterocicluri cu azot, deoarece, așa cum este prezentat în continuare, azaheterociclurile reprezintă o clasă de compuși de mare importanță în chimia medicală.

Obiective principale

Scopul acestei teze de doctorat a fost sinteza de noi compuși, analogi ai fenstatinei, care conțin în structura lor heterocicluri cu unul sau mai mulți atomi de azot, deoarece, așa cum s-a evidențiat în partea de literatură a acestei lucrări, compușii cu azot trezesc interesul oamenilor de știință prezentând numeroase activități biologice. Plecând de la structura fenstatinei, s-au făcut diferite modulări pentru a sintetiza noi serii de compuși și pentru a le studia activitatea biologică.

Primul pas în designul noilor compuși a fost conservarea conectorului de tip cetonic și înlocuirea nucleului B din structura fenstatinei cu ciclul pirolic. Nucleul A a fost variat prin înlocuirea lui, fie cu nuclee de tip fenil diferit substituit, fie cu alți heterocicli.

O altă modulare a fost modificarea conectorului de tip cetonic, astfel încât acesta să fie înlocuit pe rând cu heterocicli precum pirazol și piridină, iar nucleele A și B să fie variate, înlocuindu-se cu alte structuri de tip fenil diferit substituit sau alți heterocicli (**Figura II.1**).

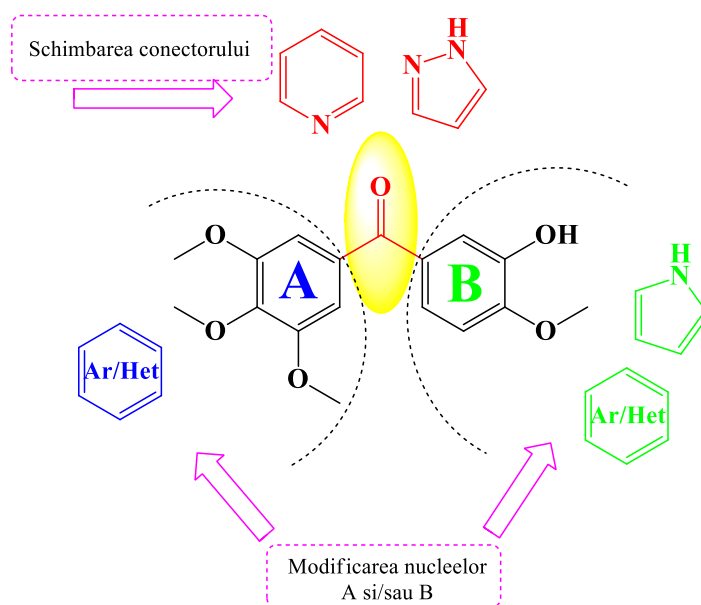


Figura II.1. Farmacomodulări făcute pe structura fenstatinei.

Designul molecular a fost proiectat pentru obținerea a trei serii de noi compuși, a căror structură să conțină cei trei azaheterocicli studiați în primul capitol al acestei teze de doctorat:

- **Seria I:** analogi ai fenstatinei în structura cărora nucleul B este înlocuit cu ciclul pirolic;
- **Seria II:** analogi ai fenstatinei în care conectorul să fie de tip pirazolic;
- **Seria III:** analogi ai fenstatinei în care conectorul să fie de tip piridinic.

I.1. Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor derivați de pirol - Seria I

Studiile de specialitate au arătat faptul că prezența în structură a unui nucleu pirol, poate crește potențialul biologic al structurilor sintetizate. Astfel, pornind de la structura fenstatinei, prin diferite modulări, s-au sintetizat o serie de derivați pirolici, în vederea studierii activității biologice. O primă modulare a fost introducerea în locul nucleului B din fenstatină a nucleului pirolic substituit cu grupările ciano (-CN) și amino (-NH₂) și conservarea lui în structurile tuturor compușilor sintetizați. S-a introdus apoi și nucleul (zona) C legat direct sau prin puntea metilenică (-CH₂-) de nucleul B. Astfel, s-au variat nucleele A și C înlocuindu-le cu cicluri fenil diferit substituit.

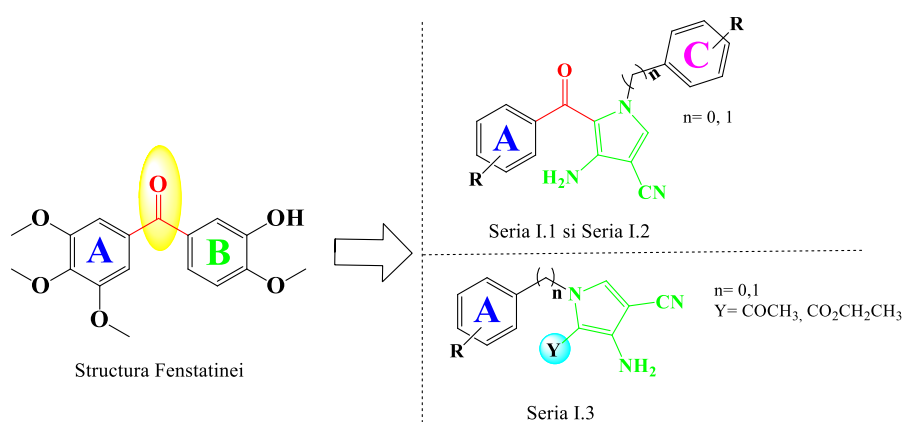
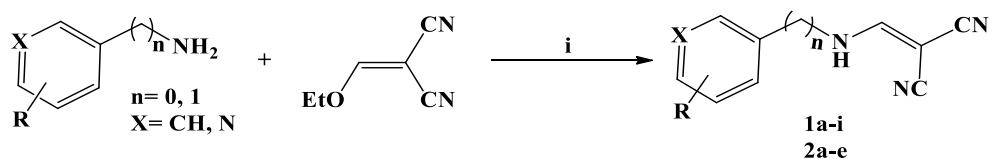


Figura II.3. Structurile generale ale derivaților pirolici sintetizați.

S-au obținut două serii de compuși (**Figura II.3**):

- *Seria I.1*: Nucleul B, fix, de tip pirol și varierea nucleului A, prin înlocuirea lui cu un nucleu de tip fenil diferit substituit și introducerea nucleului C, legat direct de nucleul B.
- *Seria I.2*: Nucleul B, fix de tip pirol, varierea nucleului A, prin înlocuirea lui cu un nucleu de tip fenil diferit substituit și introducerea nucleului C, legat de nucleul B printr-un conector de tip metilen.

Prima etapă în obținerea compușilor țintă a fost sinteza intermediarilor de tip β -diciano-enamine prin intermediul reacției dintre 2-etoximetilen-malononitril și aniline diferit substituite respectiv benzilamine diferit substituite, disponibile comercial (**Schema II.2**).^{128,129}



Schema II.2. Reacția de sinteză a interemediarilor de tip β -diciano-enamine. **Reactivi și condiții:** (i) EtOH, reflux, 6–8 ore.

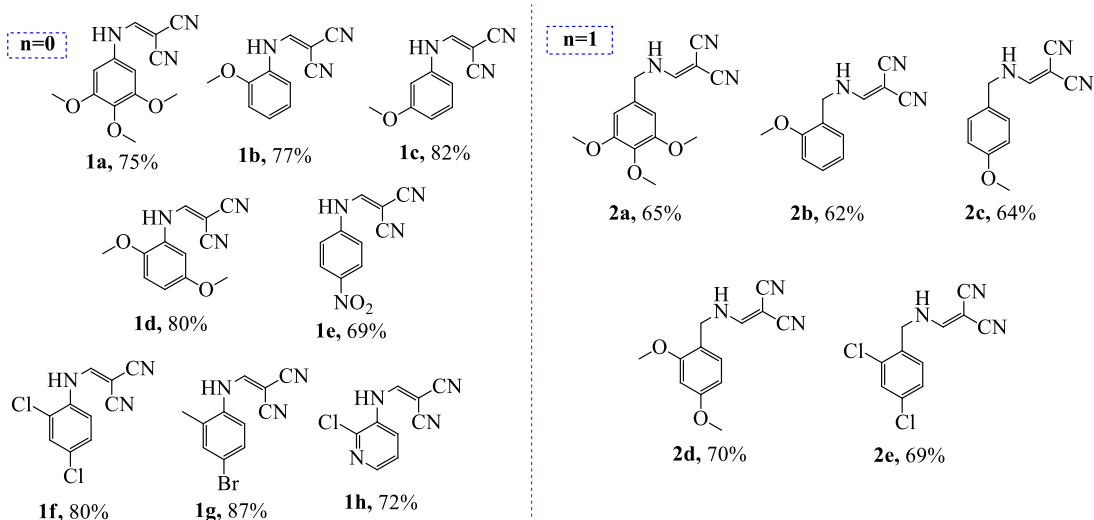
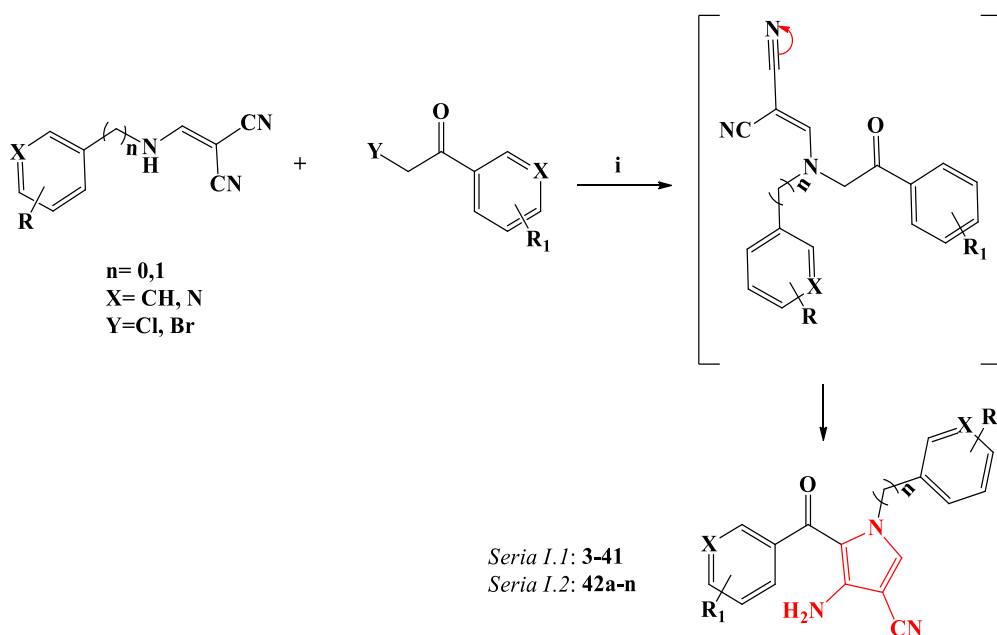


Figura II.6. Structurile compușilor **1a-h** și **2a-e**.

Pentru a sintetiza derivații pirolici de interes, s-a utilizat metoda descrisă în literatură^{128,129}, închiderea ciclului pirolic realizându-se prin intermediul reacției dintre intermediarii de tip β -diciano-enamine (seria **1a-h** și seria **2a-e**) sintetizați anterior și diferite α -halogeno-cetone, în mediu bazic (**Schema II.3**).



Schema II.3. Reacția de sinteză a derivaților de piroli. **Reactivi și condiții:** (i) 3 echiv. TEA, DMF, reflux, 12-24 ore.

S-au sintetizat astfel, 39 de compuși noi, *Seria I.1*, (**Figura II.7**) în structura cărora s-au variat atât substituenții nucleului A cât și substituenții nucleului C, fie cu halogeni (clor, brom sau fluor), fie cu alte grupări de tip metoxi sau metil.

Pentru a putea compara influența conectorului de tip metilen dintre nucleele B și C, s-a sintetizat *Seria I.2* de piroli, utilizând aceeași reacție (**Schema II.3**), obținând 14 compuși noi a căror structură este prezentată în **Figura II.13**.

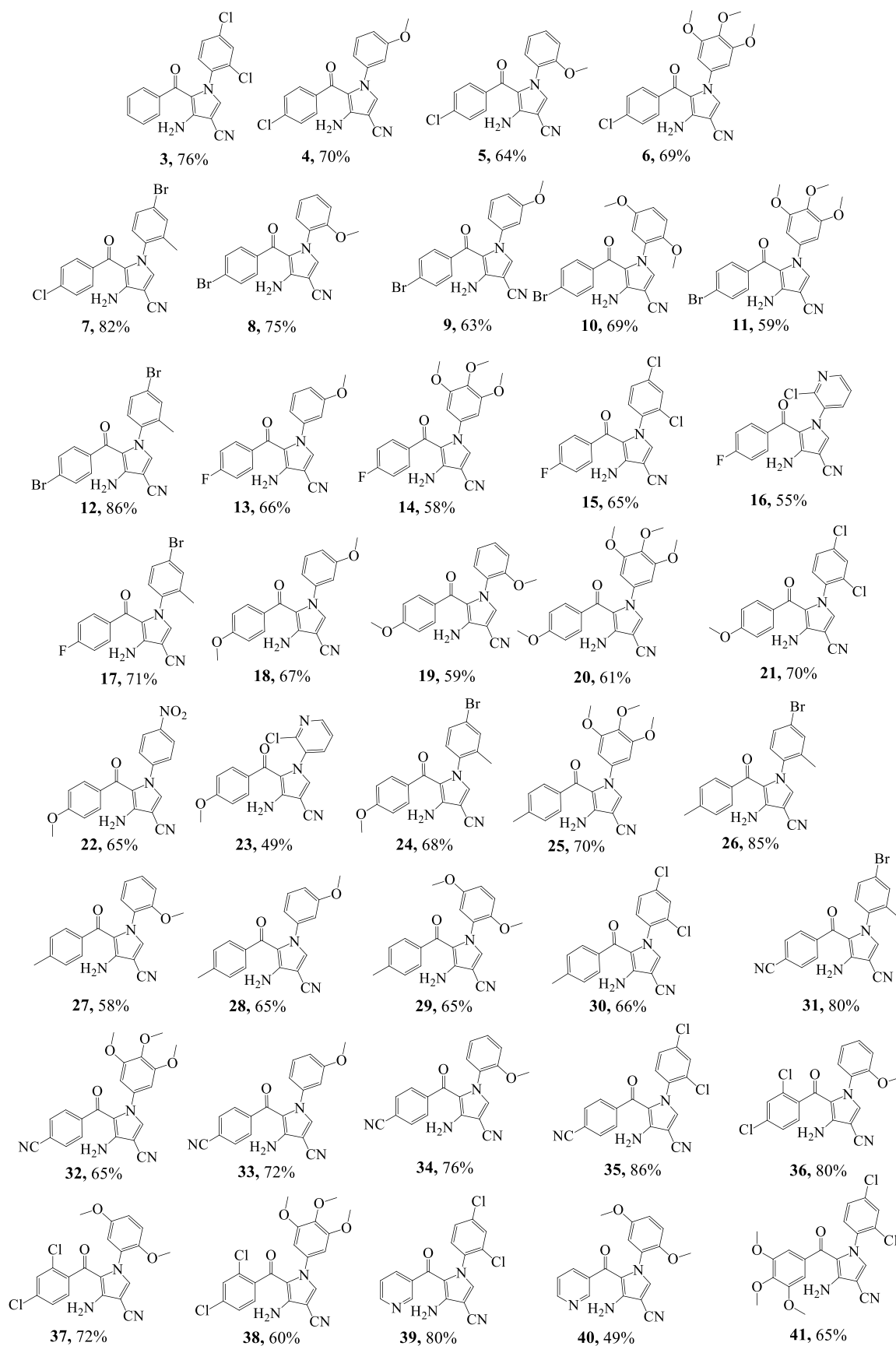


Figura II.7. Structurile și randamentele de obținere ale compușilor din *Seria I.1.*

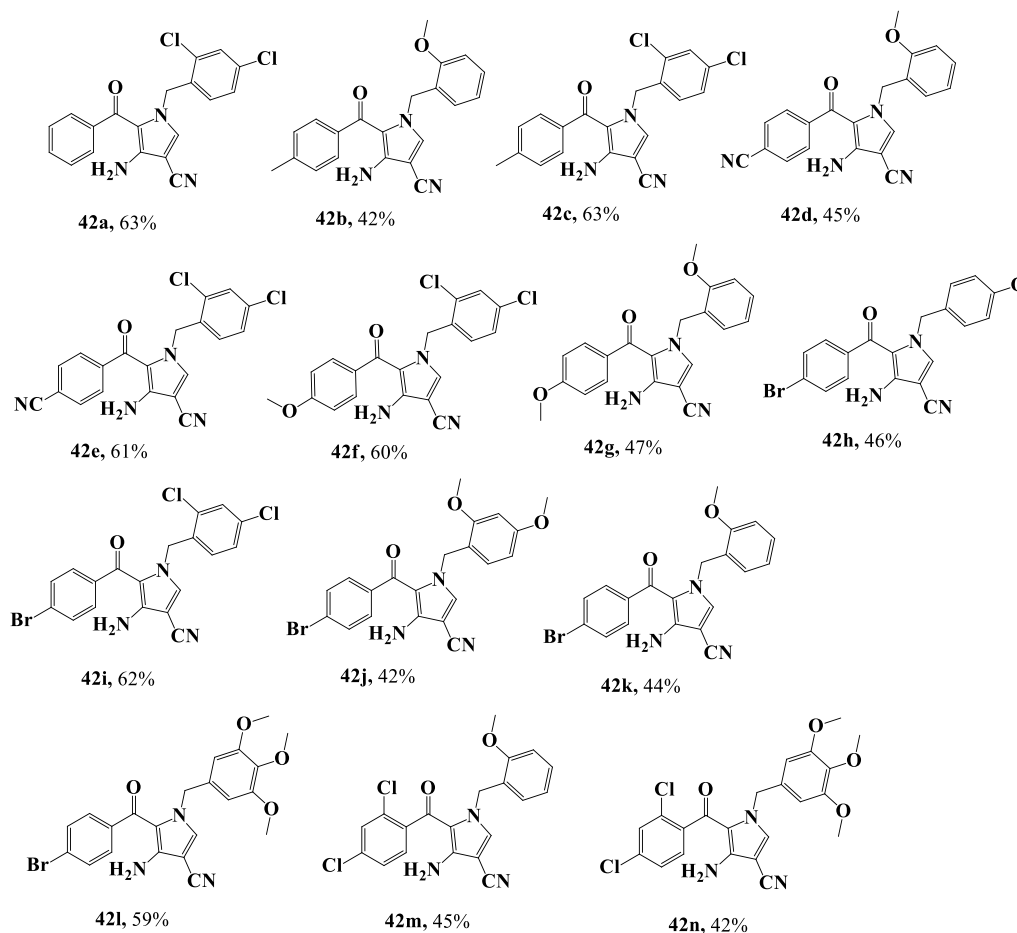
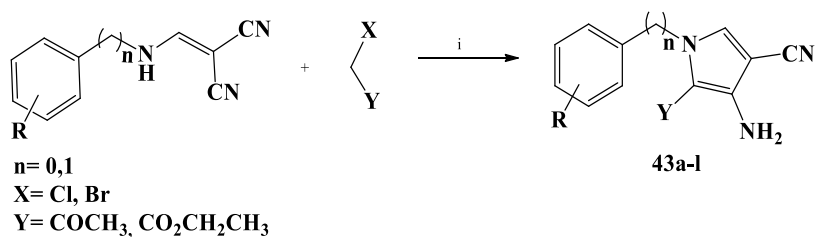


Figura II.13. Structurile și randamentele de obținere ale compușilor de tip pirol *Seriei I.2* cu doi conectori, unul de tip cetonic și unul de tip metilen.

Ultima serie de derivați pirolici sintetizată (*Seria I.3*) conform **Schemei II.4**, este alcătuită din compuși a căror structură este formată din două nuclee: nucleul A de tip fenil diferit substituit, fie cu halogeni, fie cu grupări metoxi și nucleul B de tip pirol.



Schema II.4. Reacția de sinteză a derivaților de pirol cu două nuclee, *Seria I.3*. **Reactivi și**

condiții: (i) 3 echiv. TEA, DMF, reflux, 12-24 ore.

Pentru a realiza relația structură activitate, nucleul B este substituit diferit în poziția 2 cu gruparea acetil sau cu grupare de tip ester etilic. O altă modulare făcută a fost prezența conectorului între cele două nuclee, astfel în structura compușilor **43a-g** nucleele A și B sunt legate direct, iar

În structura compușilor **43h-l** cele două nuclee sunt legate prin conectorul de tip metilen. Structurile compușilor sintetizați sunt prezentate în **Figura II.17**.

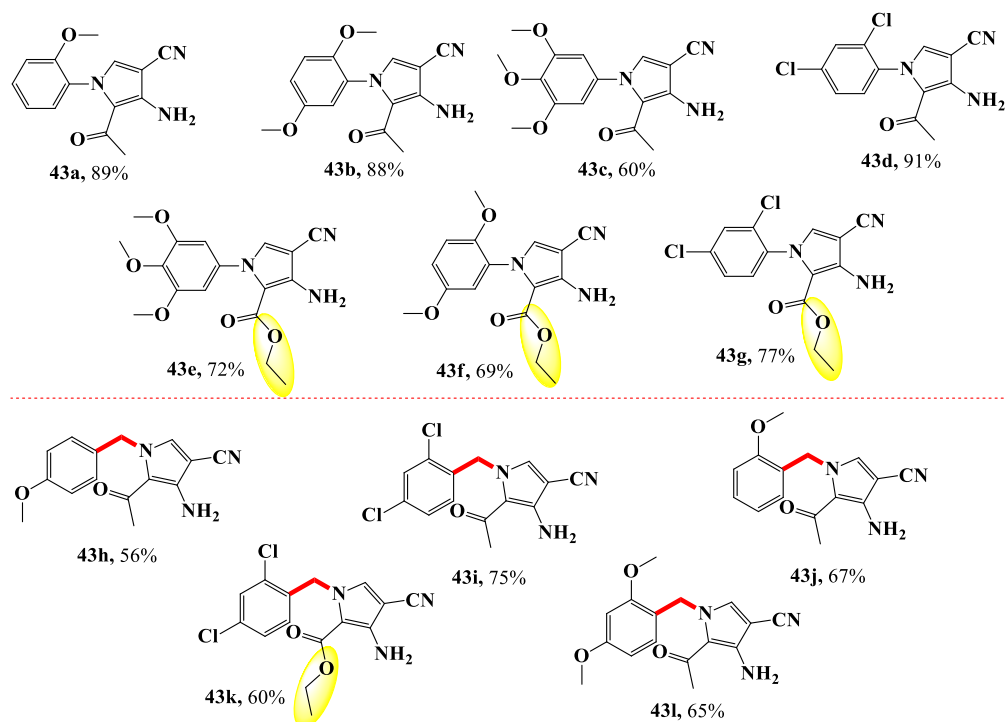


Figura II.17. Structurile și randamentele de obținere ale compușilor de tip pirol din *Seria I.3*.

Cele trei serii de compuși de tip pirol (*Seria I.1*, *Seria I.2* și *Seria I.3*) au fost propuse la Institutul Național de Cancer (NCI) pentru a le fi studiată activitatea anticancer prin capacitatea de inhibare a creșterii celulare pe 60 de linii celulare canceroase.

Valorile procentului inhibării creșterii celulare pentru cei 12 compuși activi sunt prezentate în **Tabelul II.3**.

Cei mai activi compuși, dintre cei testați pentru activitatea antiproliferativă sunt **18** și **36**. Aceștia fac parte din *Seria I.1* de derivați de pirol, nucleul C fiind legat direct de nucleul B de tip pirol ($n=0$, **Figura II.4**). O altă asemănare structurală o reprezintă faptul că nucleul C al celor doi compuși este substituit cu o grupare de tip metoxi (*meta*-metoxi pentru compusul **18** și *orto*-metoxi pentru compusul **36**).

În cazul compusului **18** nucleul A este substituit tot cu o grupare metoxi aflată în poziția *para*, iar în cazul compusului **36** nucleul A este substituit cu doi atomi de clor în pozițiile *orto* și *para*. Compusul **18** a prezentat citotoxicitate pe 6 linii celulare canceroase, iar compusul **36** pe 9 linii canceroase. Tipurile de cancer pe care cei doi compuși au prezentat acțiune citotoxică sunt: cancer al sistemului nervos central (liniile celulare SF-539 și SNB-75), melanom (linia MDA-MB-435) și cancer renal (linia A498).

Tabel II.3. Rezultatele *in vitro* de inhibare a creșterii celulelor canceroase umane pentru compușii **5**, **8**, **13**, **18**, **19**, **27**, **36**, **37**, **42h**, **42j**, **42m** și **43k**.

<i>Tip cancer</i>	<i>COMPUS</i>	5	8	13	18	19	27	36	37	42h	42j	42m	43k
	Linie celulară	Inhibarea creșterii celulare, GI%^{a,b} 10 μM											
<i>Leucemie</i>	CCRF-CEM	23	31	0	81	80	14	92	88	11	55	0	15
	HL-60(TB)	63	64	13	96	100^{d,j}	43	98	97	50	79	11	39
	K-562	79	79	60	85	86	71	87	85	75	84	11	75
	MOLT-4	35	38	0	70	69	16	79	70	31	79	0	34
	RPMI-8226	11	0	0	77	64	0	85	60	0	41	0	16
	SR	76	59	53	72	83	50	88	86	65	85	11	73
<i>Cancer pulmonar non-microcelular</i>	A549/ATCC	0	21	0	57	46	10	58	48	0	53	15	23
	EKVX	13	14	11	61	51	10	70	57	0	41	15	18
	HOP-62	12	36	0	69	43	22	61	50	0	59	34	31
	HOP-92	0	n.d. ^c	22	78	47	n.d. ^c	55	0	35	44	30	26
	NCI-H23	0	12	0	50	67	10	84	82	20	45	12	15
	NCI-H460	12	20	0	72	82	0	87	67	13	58	25	18
	NCI-H522	77	51	33	96	100^{d,k}	36	100^{d,n}	92	0	100^{d,a'}	22	32
<i>Cancer de colon</i>	COLO 205	13	23	0	74	61	0	80	67	0	69	0	0
	HTC-116	36	41	19	83	77	23	63	70	23	75	20	35
	HCT-15	63	64	31	80	73	52	75	78	41	73	10	51
	HT29	47	55	16	92	93	26	100^{d,o}	95	12	95	14	19
	KM12	41	60	24	76	72	40	77	72	14	59	12	39
	SW-620	59	61	0	90	79	47	75	73	23	68	0	55
<i>Cancer al SNC</i>	SF-295	21	54	16	100^{d,e}	91	25	80	71	23	60	22	19
	SF-539	0	17	0	100^{d,f}	87	0	100^{d,p}	74	21	52	36	26
	SNB-19	30	28	0	73	70	22	69	54	16	44	63	31
	SNB-75	37	25	17	100^d	70	17	100^{d,q}	100^{d,x}	0	49	35	52
	U251	0	33	10	66	65	20	83	75	0	73	47	35

Sinteze de noi azaheterocicli cu proprietăți speciale

<i>Melanom</i>	LOX IMVI	32	33	0	62	76	19	60	51	20	50	16	21
	MALME-3M	40	57	0	59	58	40	62	49	15	57	37	14
	M14	n.d. ^c	n.d. ^c	16	89	n.d. ^c	n.d. ^c	79	76	21	66	12	27
	MDA-MB-435	100^{d,m}	96	61	100^{d,g}	100^{d,l}	94	100^{d,r}	100^{d,y}	78	99	12	100^{d,c'}
	SK-MEL-2	21	29	0	71	54	20	100^{d,s}	100^{d,w}	0	95	23	0
	SK-MEL-28	25	30	0	54	40	26	42	40	14	45	0	0
	SK-MEL-5	39	22	0	64	93	0	82	45	0	73	0	22
	UACC-257	12	27	12	52	33	21	47	36	0	44	14	0
<i>Cancer ovarian</i>	UACC-62	53	54	34	81	76	77	73	69	19	70	24	40
	IGROV1	22	32	0	68	66	15	61	46	0	51	11	36
	OVCAR-3	36	26	0	69	85	0	82	71	0	44	0	n.d. ^c
	OVCAR-8	0	0	0	66	44	0	65	31	0	66	44	0
<i>Cancer renal</i>	NCI/ADR-RES	59	57	21	90	86	39	83	69	0	76	35	38
	786-0	0	0	0	62	56	0	47	36	10	36	32	23
	A498	42	39	13	100^{d,h}	92	25	100^{d,t}	71	0	13	0	26
	ACHN	0	0	0	61	53	0	51	46	0	15	40	12
	CAKI-1	n.d. ^c	31	32	69	n.d. ^c	21	66	63	0	54	35	37
	RXF 393	n.d. ^c	14	15	82	n.d. ^c	23	100^{d,u}	44	0	58	42	36
	SN12C	0	17	0	67	54	0	65	51	0	35	23	18
<i>Cancer de prostată</i>	UO-31	22	27	21	66	52	10	57	43	24	65	20	40
	PC-3	42	36	0	66	63	25	81	62	0	34	33	28
<i>Cancer de sân</i>	DU-145	0	0	0	49	47	0	64	34	0	20	0	0
	MCF7	67	66	18	82	86	48	83	83	27	72	0	40
	MDA-MB 231/ATCC	31	20	0	60	51	0	53	35	0	39	18	56
	HS 578T	25	21	0	88	86	14	100^{d,v}	61	0	54	32	36
	BT-549	0	11	0	58	35	16	68	51	0	100^{d,b'}	0	18

T-47D	11	39	12	84	67	17	71	57	0	64	0	21
MDA-MB-468	48	68	62	100^{d,i}	68	53	84	80	39	97	19	54

^[a] Date obținute din screeningul *in vitro* al celulelor tumorale umane de la NCI pentru o singură doză (concentrație de 10 μM). ^[b] Procent de inhibare a creșterii celulare.

^[c] Nedeterminat. ^[d] Efect citotoxic: procent de creștere celulară <0; inhibiția totală a proliferării celulare și moartea celulelor.

^[e] Procent de creștere celulară: -25%. ^[f] Procent de creștere celulară: -24%. ^[g] Procent de creștere celulară: -38%. ^[h] Procent de creștere celulară: -2%. ^[i] Procent de creștere celulară: -4%. ^[j] Procent de creștere celulară: -7%. ^[k] Procent de creștere celulară: -1%. ^[l] Procent de creștere celulară: -27%. ^[m] Procent de creștere celulară: -16%. ^[n] Procent de creștere celulară: -55%. ^[o] Procent de creștere celulară: -14%. ^[p] Procent de creștere celulară: -1%. ^[q] Procent de creștere celulară: -22%. ^[r] Procent de creștere celulară: -38%. ^[s] Procent de creștere celulară: -51%. ^[t] Procent de creștere celulară: -1%. ^[u] Procent de creștere celulară: -8%. ^[v] Procent de creștere celulară: -2%. ^[x] Procent de creștere celulară: -7%. ^[y] Procent de creștere celulară: -37%. ^[w] Procent de creștere celulară: -27%. ^[a'] Procent de creștere celulară: -29%. ^[b'] Procent de creștere celulară: -86%. ^[c'] Procent de creștere celulară: -7%.

Cei mai activi compuși ai aceste etape (testarea la o singură doză, 10 μM), **18** și **36**, au fost selectați pentru a trece în următoarea etapă de testare, pentru a se determina GI_{50} (concentrația la care creșterea celulară este inhibată în proporție de 50%). Rezultatele sunt prezentate în **Tabelul II.4**.

Tabel II.4. Valorile pentru GI_{50} în urma testului NCI *in vitro* pe 60 de linii celulare pentru compușii **18** și **36**.

Tip cancer	Compus	18	36	Tip cancer	Compus	18	36
	Linie celulară	$\text{GI}_{50}^{\text{a,b}}$ (μM)			Linie celulară	$\text{GI}_{50}^{\text{a,b}}$ (μM)	
Leucemie	CCRF-CEM	2.68	4.68	Cancer ovarian	IGROV1	5.00	7.49
	HL-60(TB)	2.01	3.15		OVCAR-3	2.87	3.86
	K-562	0.70	3.63		OVCAR-4	18.0	8.96
	MOLT-4	3.65	4.84		OVCAR-5	7.36	9.71
	RPMI-8226	2.94	9.39		OVCAR-8	5.30	21.0
	SR	0.77	3.53		NCI/ADR-RES	2.35	3.55
Cancer pulmonar non-microcelular	A549/ATCC	5.68	7.39		SK-OV-3	4.09	3.36
	EKVX	4.67	8.24		786-0	4.64	7.12
	HOP-62	4.12	6.40		A498	2.73	72.0
	HOP-92	9.53	16.8		ACHN	6.52	7.79
	NCI-H226	4.50	5.79	CAKI-1	3.20	4.70	
	NCI-H23	5.61	7.55	RXF 393	2.05	4.37	
	NCI-H460	3.41	4.66	SN12C	5.64	5.24	
Cancer de colon	NCI-H522	1.99	1.87	TK-10	6.14	52.9	
	COLO 205	3.01	5.70	UO-31	5.42	7.87	
	HCC-2998	4.98	12.4	PC-3	3.75	5.60	
	HTC-116	3.50	4.02	DU-145	4.70	9.73	
	HCT-15	2.49	3.62	MCF7	3.07	3.94	
	HT29	2.64	3.18	MDA-MB-231/ATCC	7.80	9.05	
	KM12	4.17	3.90	HS 578T	2.42	3.02	
Cancer al SNC	SW-620	2.85	3.98	BT-549	4.41	3.41	
	SF-268	5.65	9.77	T-47D	3.72	4.53	
	SF-295	2.90	3.72	MDA-MB-468	1.12	2.48	
	SF-539	2.41	3.37				
	SNB-19	3.92	6.60				
Melanom	SNB-75	1.88	2.61				
	U251	3.45	4.45				
	LOX IMVI	4.60	4.89				
	MALME-3M	N.D. ^d	4.20				
	M14	2.51	3.27				
	MDA-MB-435	0.78	1.92				

SK-MEL-2	4.58	2.69
SK-MEL-28	49.8	7.58
SK-MEL-5	3.19	4.83
UACC-257	9.48	6.31
UACC-62	3.22	3.67

^[a] Date obținute în urma testului NCI *in vitro* pe 60 linii celulare pentru 5 doze. ^[b] GI₅₀ reprezintă concentrația molară a compusului ce cauzează 50% din inhibarea creșterii celulelor tumorale. ^[c] Valorile îngroșate reprezintă cele mai bune valori GI₅₀ obținute pentru compușii testați (GI₅₀ < 1.00 μM). ^[d] Nedeterminat.

În urma rezultatelor primite pentru testele efectuate la 5 concentrații diferite, compusul **18** a prezentat cea mai bună activitate anticancer, având 3 linii celulare cu GI₅₀ < 1.00 μM (pentru leucemie pe liniile K-562, SR și melanom pe linia MDA-MB-435).

II.2. Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor derivați de hidrazone - Seria II

O altă modulare făcută pe structura fenstatinei s-a dorit a fi aceea în care conectorul cetonic dintre cele două nuclee de tip fenil substituit să fie înlocuit cu un heterociclu de tip pirazol, deoarece compușii care conțin în structura lor un astfel de heterociclu sunt cunoscuți în literatură ca având un spectru larg de activități biologice (de exemplu activitate anticancer¹³⁹ sau antiinflamatoare¹⁴⁰) (**Figura II.23**).

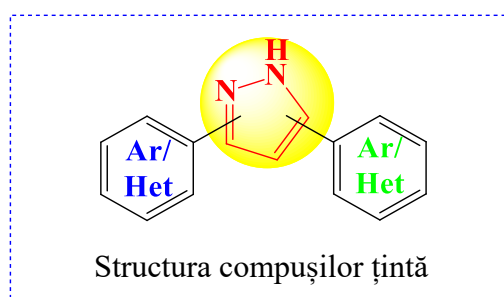
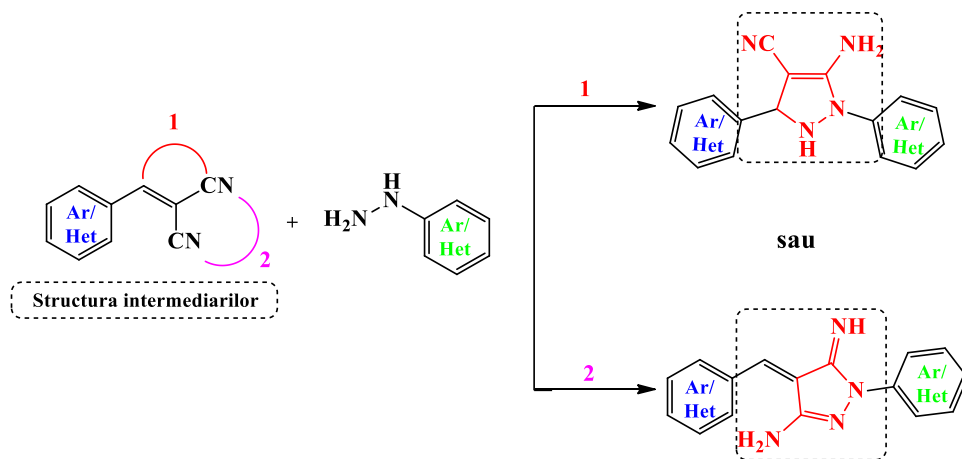


Figura II.23. Structura generală a seriei derivaților de pirazol.

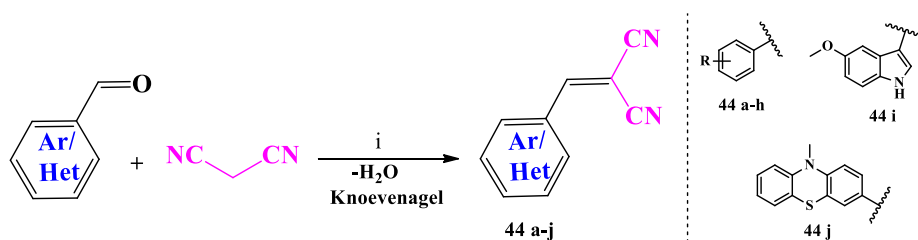
Pentru a obține această clasă de compuși a fost utilizată o metodă de sinteză descrisă în literatură¹⁴¹, prin intermediul compușilor de tip 2-(Aril(Het)metilen)-malononitril și o serie de hidrazine diferit substituie. Conform datelor de literatură închiderea ciclului pirazolic poate avea loc în două moduri:

- Cu ajutorul unei grupări ciano (CN) și legătura dublă, prezente în structura derivaților de tip 2-(Aril(Het)metilen)-malononitril (calea 1);
- prin intermediul celor două grupări ciano (CN), (calea 2), conform **Schemei II.5**, obținându-se dihidropirazoli substituiți.



Schema II.5. Schema generală de sinteză a derivaților dihidropirazolici.

Primul pas în designul noilor structuri a fost sinteza intermediarilor de tip benzilidenmalononitril, respectiv Het-metilenmalononitril prin intermediul reacției Knoevenagel, în mediu bazic, între diferite aldehide și malononitril (**Schema II.6**).¹⁴¹ Randamentele și substituțiile fiecărui compus din seria **44a-j** sunt prezentate în **Tabelul II.5**.

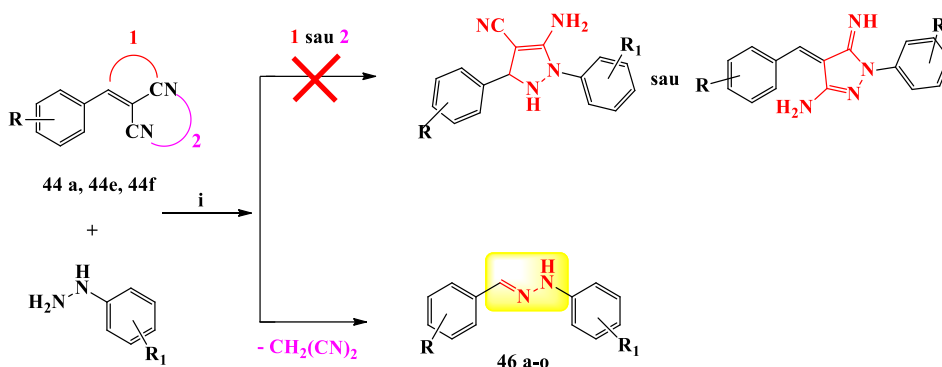


Schema II.6. Reacția de obținere a intermediarilor Aril(Het)-metilenmalononitril. **Reactivi și condiții:** (i) piperidină, EtOH, reflux, 6-8 ore.

Tabelul II.5. Substituțiile și randamentele intermediarilor Aril(Het)-metilenmalononitril.

Compus	R	Randament (%)
44a ¹⁴²	3,4,5-triOCH ₃	90
44b ¹⁴³	2,5-diOCH ₃	85
44c ¹⁴⁴	3-OCH ₃	87
44d ¹⁴⁵	4-OCH ₃	80
44e ¹⁴⁶	4-Br	79
44f ¹⁴⁷	4-NO ₂	87
44g ¹⁴⁸	4-N(CH ₃) ₂	85
44h ¹⁴⁹	4-OCH ₃ -3-NO ₂	85
44i	-	86
44j ¹⁵⁰	-	72

Strategia de sinteză a compușilor țintă a fost reacția dintre intermediarii **44a-j** sintetizați anterior și diferite hidrazine. Primele reacții au fost realizate pornind de la 3,4,5-trimetoxibenzilidenmalononitril și diferite hidrazine, pentru a păstra nucleul A de la fenstatină și pentru a modifica atât nucleul B cât și conectorul de tip cetonic, conform schemei generale de sinteză prezentată anterior, (**Schema II.5**) și pentru a obține compușii țintă din **Figura II.19**. Compușii rezultați din această reacție, după purificare, nu au fost cei așteptați deoarece heterociclul de tip pirazol nu s-a închis, eliminându-se malononitrilul conform **Schemei II.8**, obținându-se astfel compuși de tip hidrazonă (**Figura II.25**).



Schema II.8. Schema de obținere a compușilor de tip hidrazonă. **Reactivi și condiții:** (i) EtOH, reflux, 4-8 ore.

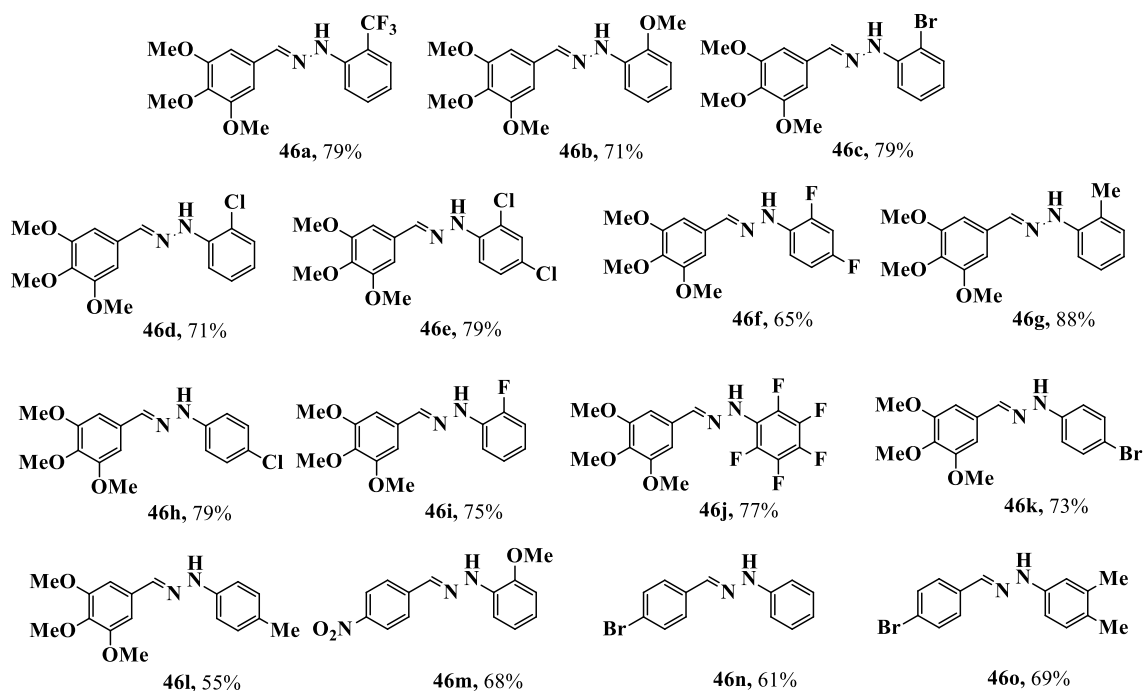


Figura II.25. Structurile și randamentele de obținere ale compușilor de tip hidrazonă.

Compușii **46e** și **46i** au fost analizați și prin metoda difracției cu raze X pe monocristal, confirmându-se astfel structura de tip hidrazonă.

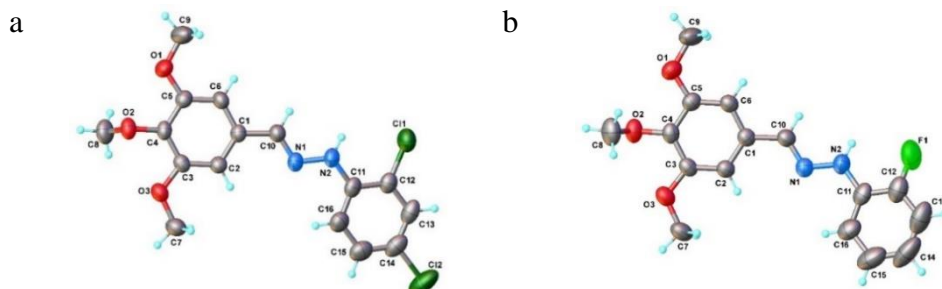
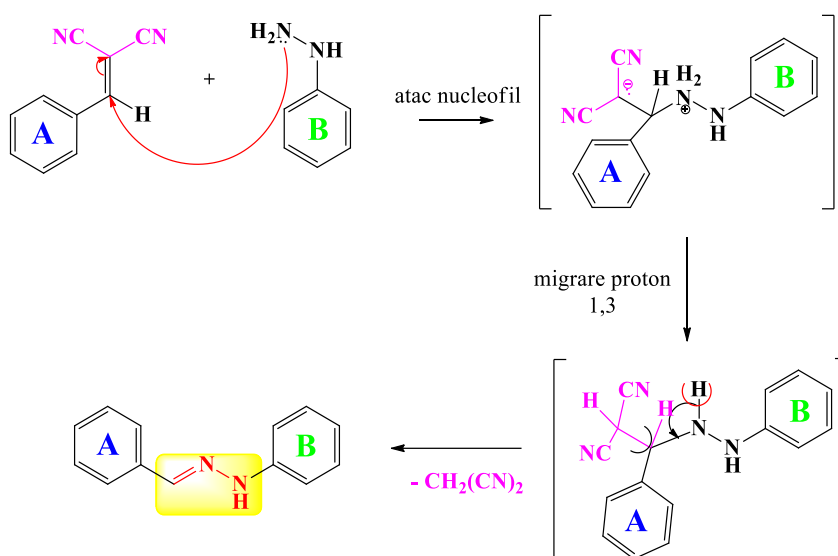


Figura II.29. Structurile compușilor **46e** (a) și **46i**(b) obținute prin difracție de RX.

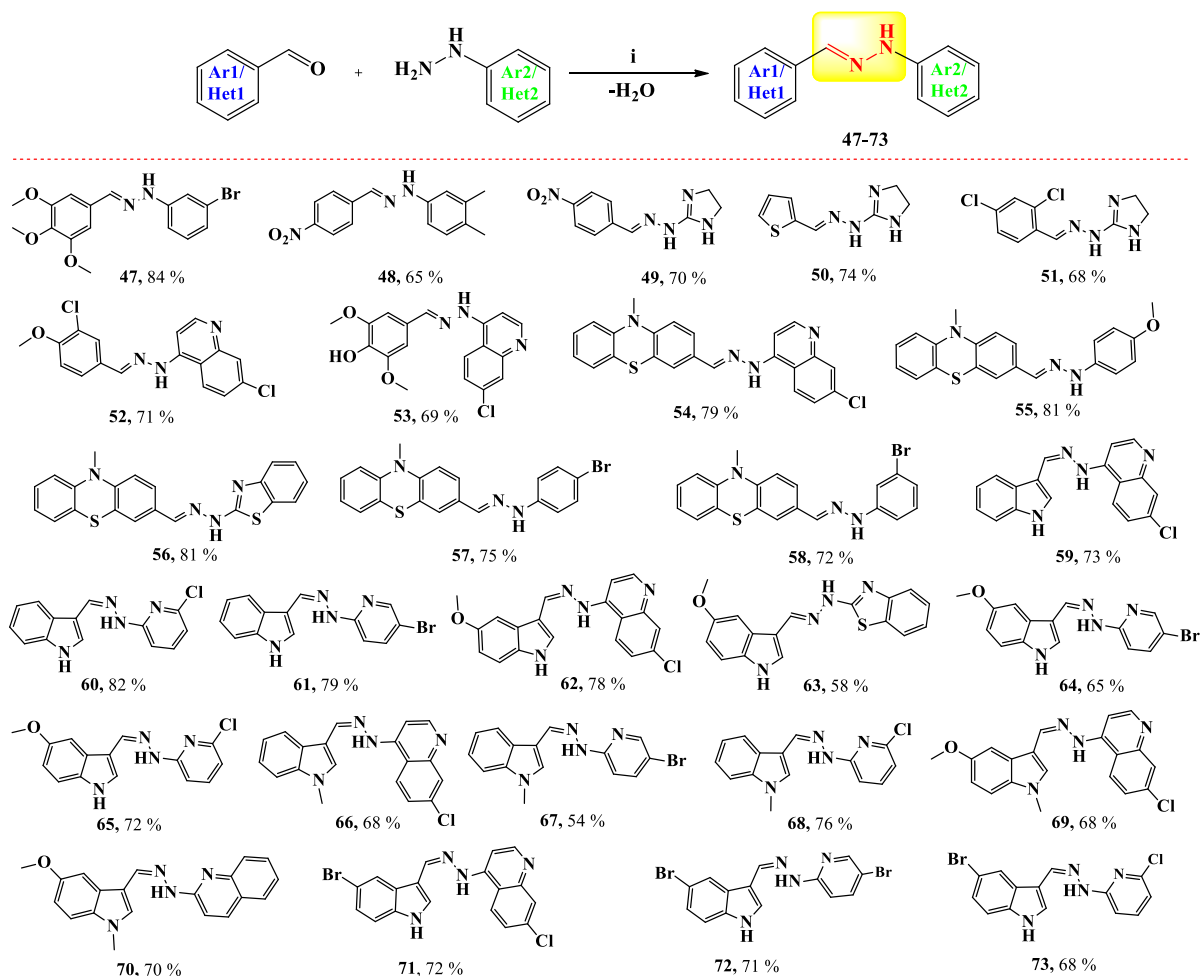


Schema II.9. Mecanismul propus pentru obținerea structurilor de tip hidrazonă **46a-o**.

Mecanismul de reacție propus pentru a explica formarea compușilor de tip hidrazonă **46a-o** (**Schema II.9**) implică următoarele etape:

- prima etapă este reprezentată de clasicul atac nucleofil al azotului marginal al hidrazinei asupra carbonului etilenic al 2-ciano-3-aryl-acrilonitrilului;
- intermediarul format a suferit o migrare 1,3 de proton și acest lucru a permis eliminarea malononitrilului și formarea hidrazonelor.

Plecând de la faptul că hidrazonele prezintă o gamă variată de activități biologice (cum ar fi antibacteriană¹⁵⁵ sau anticancer¹⁵⁶) și pentru a putea completa seria de compuși de tip hidrazonă obținuți (**Schema II.7**), s-a realizat și reacția directă dintre diferite aldehide atât aromatice cât și heteroaromatice cu diferite hidrazine aromatice respectiv heteroaromatice (**Schema II.9**).



Schema II.10. Reacția de obtinere a hidrazonelor **47-73**. **Reactivi și condiții:** (i) EtOH, reflux, 4–8 ore.

Din reacția de condensare directă dintre aldehide și hidrazine (adiție nucleofilă și eliminare de apă) s-au obținut o serie de 27 de compuși de tip hidrazonă care au fost caracterizați din punct de vedere fizico-chimic și evaluați biologic.

Seria de compuși **46a-o** a fost testată biologic pentru acțiunea antifungică împotriva a opt tipuri de fungi: *Candida albicans* SC5314, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida albicans* de la pacienții cu mucoviscidoză (*C. albicans* (*mucoviscidosis*)), *Candida albicans* rezistentă la echinocandine (*C. albicans* (*R echinocandine*)) și *Candida glabrata* rezistentă la azoli (*C. glabrata* (*R azoli*)).

Testarea preliminară a inhibării creșterii celulare la o concentrație unică de 32 μg/mL a fost realizată în mod triplicat. A fost determinată astfel Concentrația Minimum Inhibitoare (MIC). Acțiunea antifungică a fost studiată în colaborare cu Institutul Pôle de Biologie Pathologie Génétique, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) din Lille, Franța. Cinci dintre hidrazonile

testate **46c**, **46d**, **46i**, **46k** și **46l** au prezentat activitate antifungică împotriva speciilor *Candida* cu valori MIC între 16 și 32 µg/mL.

Rezultatele obținute sunt prezentate în **Tabelul II.7**, având ca referință Fluconazolul. Celelalte hidrazone sintetizate au fost mai puțin active, cu valori MIC > 32 µg/mL (datele nu sunt prezentate).

Tabel II.7. Valorile MIC ale hidrazonelor active **46c**, **46d**, **46i**, **46k** și **46l** pe *Candida spp.*

Valoare MIC (µg/mL) pe <i>Candida spp.</i> [a,b,c,d]								
Compus	<i>C. albicans</i> SC5314	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i> (<i>mucoviscidosis</i>)	<i>C. albicans</i> (<i>R echinocandins</i>)	<i>C. glabrata</i> (<i>R azoli</i>)
46c	32	>32 ^[e]	32	32	>32	>32	>32	32
46d	32	>32	16	>32	>32	>32	>32	32
46i	32	>32	32	32	>32	>32	>32	32
46k	32	>32	16	32	32	>32	>32	>32
46l	32	>32	16	32	32	>32	>32	32
Fluconazol	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	>32

^[a] Procentul de inhibare *in vitro* a agenților patogeni. ^[b] Valorile reprezintă media a trei experimente. ^[c] Compușii au fost testați la concentrații de 32, 16, 8, 4 și 1 µg/mL. ^[d] Valorile MIC date în tabel corespund MIC₉₉ (inhibarea totală a creșterii *Candida spp.*). ^[e] MIC nu a fost calculată deoarece inhibarea totală a *Candida spp.* nu a fost obținută la 32 µg/mL.

Hidrazonile active au ca unitate structurală comună nucleul A 3,4,5-trimetoxifenil și nucleul B de tip fenil monosubstituit. Cea mai bună modulare chimică a fost substituția nucleului B de tip fenil în poziția *orto* cu un atom de halogen (Br, Cl și F) în hidrazonile **46c**, **46d** și **46i**. Prin comparație, compusul **46d** a prezentat cea mai mare activitate, în special pe *C. glabrata* (MIC=16 µg/mL).

Pe lângă testarea activității antifungice împotriva speciilor *Candida*, seria de hidrazone **46a-o** și **55** au fost testate biologic și pentru evaluarea activității de inhibare a farneziltransferazei, în colaborare cu JUNIA, Lille și Institut de Chimie des Substances Naturelles, Centre de Recherche de Gif, Franța. Șase compuși au fost activi, iar rezultatele sunt prezentate în **Tabelul II.8**.

Tabel II.8. Activitatea de inhibare *in vitro* a FTazei pentru hidrazonile **46b**, **46i**, **46l**, **46h**, **46m** și **55**.

Compus	% FTI ^a	IC ₅₀ (µM) ^b	R ^{2c}
46b	94.9	20.93	0.8705
46i	22.7	-	-
46l	38.9	-	-
46h	28.7	-	-

46m	98.8	0.27	0.8288
55	76.1	4.89	0.9929

^[a] Inhibarea farneziltransferazei la o concentrație de 100μM. ^[b] Valorile reprezintă media a două experimente. ^[c]

Factorul de regresie.

Dintre toți compușii testați, doar trei au prezentat activitate foarte bună de inhibare a farneziltransferazei (**46b**, **46m** și **55**). Cea mai activă este hidrazona **46m** care este alcătuită structural dintr-un nucleu de tip *para*-nitrofenil și un nucleu de tip *orto*-metoxifenil, procentul de inhibare a acesteia fiind 98.8% și valoarea IC₅₀ de 0.27 μM. Prezența în structură a nucleului 3,4,5-trimetoxifenil în locul nucleului *para*-nitrofenil a condus la scăderea activității până la reducerea completă a acesteia.

Toate hidrazonele sintetizate (seria **46a-o** și seria **47-73**) au fost acceptate la Institutul Național de Cancer (NCI-SUA) pentru a fi testat potențialul de inhibare a creșterii celulare pe 60 de linii celulare canceroase. Prima etapă a fost testarea la o concentrație de 10 μM pe toate liniile celulare ale screening-ului experimental.

Hidrazonele din seria **46a-o** au prezentat activitate moderată a inhibării creșterii celulare, cele mai active hidrazone fiind **46k**, **46g** și **46f**, iar rezultatele sunt prezentate în **Tabelul II.9**.

Tabel II.9. Rezultatele *in vitro* de inhibare a creșterii celulelor canceroase umane pentru hidrazonele **46k**, **46g** și **46f**.

Tip cancer	Compus	46k	46g	46f
	Linie celulară	Inhibarea creșterii celulare, GI% ^{a,b} 10 μM		
Leucemie	CCRF-CEM	68	31	49
	HL-60(TB)	67	0	34
	K-562	90	53	81
	MOLT-4	56	20	39
	RPMI-8226	41	18	21
	SR	31	11	16
Cancer pulmonar non-microcelular	A549/ATCC	45	22	25
	NCI-H460	68	0	0
	NCI-H522	60	28	39
Cancer de colon	HCC-2998	54	0	0
	HCT-15	81	46	42
	HT29	70	0	30
	KM12	83	48	53
	SW-620	53	0	25
Cancer al SNC	SF-268	47	27	30
	SF-295	39	60	12
Melanom	LOX IMVI	86	51	60
	MALME-3M	44	0	0
	M14	81	27	43

	MDA-MB-435	60	19	28
	UACC-62	63	71	71
Cancer ovarian	IGROV1	42	19	29
	OVCAR-4	49	16	20
	OVCAR-8	45	13	29
	NCI/ADR-RES	42	0	15
		ACHN	68	21
Cancer renal	CAKI-1	89	64	67
	UO-31	65	38	35
		MCF7	49	21
Cancer de sân	MDA-MB-231/ATCC	53	11	28
	T-47D	69	24	46
	MDA-MB-468	50	0	0

^[a] Date obținute din screeningul *in vitro* al celulelor tumorale umane de la NCI pentru o singură doză (concentrație de 10 μM). ^[b] Procent de inhibare a creșterii celulare. ^[c] Nedeterminat.

După cum se observă în tabelul de mai sus, cea mai activă structură este **46k** alcătuită structural din nucleul A de tip 3,4,5-trimetoxifenil și nucleul B de tip *para*-bromofenil. Procentul de inhibare a creșterii celulare este de peste 50% pe 21 de linii celulare, cea mai bună activitate având-o asupra liniei K-562, cu un procent de 90% a inhibării creșterii celulare. Modificările structurale asupra nucleului B au dus la scaderea activității sau la pierderea totală a acesteia.

Tot pentru a se studia activitatea anticancer, a fost propus la NCI și intermediarul **44j**, descris în literatură, dar netestat. În prima etapă de testare, acesta a prezentat activitate bună anticancer, având procentul de inhibiție GI%= 53 pe linia celulară UACC-62 (melanom) și GI%= 62 pe linia celulară OVCAR-5 (cancer ovarian). A prezentat și activitate citotoxică pe 3 linii celulare: GI%= -32 pentru NCI-H226 (cancer pulmonar non-microcelular), GI%= -19 pentru A498 (cancer renal) și GI%= -24 pentru MDA-MB-468 (cancer de sân).

Hidrazonele din seria **47-73** au fost și ele testate la NCI pe cele 60 de linii celulare. Rezultatele pentru cei mai activi compuși sunt prezentate în **Tabelul II.10**.

Hidrazonele **52, 53, 59, 62, 66, 69** și **71** prezintă activitate citotoxică pe majoritatea liniilor celulare. Asemănarea structurală dintre cei șapte compuși este prezența în structură în locul nucleului B a nucleului 7-clorochinolină.

Cea mai activă structură, cu valoarea medie a activității citotoxice pe cele 60 de linii celulare de -80, este hidrazona **62** și are ca elemente structurale heterociclul de tip indol substituit în poziția 5 cu gruparea metoxi și heterociclul de tip chinolină substituit în poziția 7 cu un atom de clor. Comparând structurile celor mai activi compuși se observă faptul că heterociclul de tip 7-clorochinolină joacă un rol extrem de important în creșterea activității antiproliferative, astfel toți compușii care conțin în structura lor un astfel de nucleu au avut efect citotoxic.

Tabel II.10. Rezultatele, *in vitro*, de inhibare a creșterii celulelor canceroase umane, la o doză, pentru hidrazonele **47**, **52**, **53**, **55**, **58-66**, **68**, **69**, **71**.

<i>Tip cancer</i>	<i>COMPUS</i>	47	52	53	55	58	59	60	61	62	63	64	65	66	68	69	71
	Linie celulară	Inhibarea creșterii celulare, GI%^{a,b} 10 μM															
<i>Leucemie</i>	CCRF-CEM	53	-19^d	90	26	43	-10	91	93	-42	52	88	90	-35	51	-29	-7
	HL-60(TB)	56	-37^d	-44	42	32	-34	86	86	-56	60	94	76	-60	43	-52	-74
	K-562	84	-52^d	-54	95	77	-22	86	88	-4	75	90	80	97	79	-48	-25
	MOLT-4	54	-25^d	-13	61	23	-48	76	82	-48	64	75	85	-32	67	-49	-48
	RPMI-8226	28	-37^d	-9	21	0	-25	95	97	-62	52	-11	-1	-41	52	-42	-42
	SR	76	-9^d	-23	57	66	87	86	97	-27	54	96	82	-25	72	-22	-45
<i>Cancer pulmonar non-microcelular</i>	A549/ATCC	31	-41	-82	42	0	-24	47	62	-49	47	77	30	-38	24	-69	98
	EKVX	15	87	-71	34	0	-79	67	75	-96	50	77	55	-85	42	-81	-92
	HOP-62	0	-42	-78	33	0	-75	53	68	-56	N.D. ^c	54	40	-63	24	-81	-59
	HOP-96	29	-57	-74	32	0	-88	-10	-28	-91	47	-24	73	-68	57	-81	-69
	NCI-H226	28	30	0	-68	15	-52	49	64	-78	24	60	51	-67	41	-52	-64
	NCI-H23	29	-11	-41	23	0	-88	42	58	-91	32	63	35	-84	40	-80	-85
	NCI-H322M	38	-64	-45	22	17	-89	34	52	-100	20	56	28	-99	10	-95	-96
	NCI-H460	48	-78	-63	71	0	-87	71	91	-78	67	83	52	-67	36	-79	90
NCI-H522	63	-73	-73	53	58	-77	83	75	-62	71	61	72	-68	25	-65	-66	
<i>Cancer de colon</i>	COLO 205	0	-82	28	0	0	-85	62	51	-56	19	62	42	-59	32	-86	-44
	HCC-2998	48	-39	-81	15	0	-92	69	-1	-89	58	89	60	-87	51	-86	-92
	HTC-116	35	-89	-68	46	33	-91	76	93	-50	53	91	62	-46	66	-82	-10
	HCT-15	47	-20	-58	15	28	-82	81	91	-88	77	93	70	-92	71	-85	-80
	HT29	49	-55	91	0	0	-72	69	86	-42	40	76	39	-40	55	-44	-3
	KM12	66	-88	-53	83	47	-77	90	99	-77	86	-1	78	-94	66	-78	-81
	SW-620	66	-88	-30	72	42	-74	47	79	-71	25	80	20	-62	34	-76	97
<i>Cancer al SNC</i>	SF-268	44	-64	-37	46	19	-58	80	78	-60	44	79	67	-73	44	-67	-35
	SF-295	40	-53	-80	93	0	-85	50	74	-100	41	82	52	-93	26	-84	-99
	SF-539	31	-90	-84	42	0	-86	93	89	-100	29	81	73	-92	35	-82	-87
	SNB-19	0	-79	-24	19	0	-92	56	56	-100	20	48	38	-79	23	-68	-85
	SNB-75	13	-88	-81	24	11	-96	84	73	-94	33	56	38	-85	29	-91	-91
	U251	33	-90	-87	36	17	-84	65	80	-83	44	79	42	-49	43	-80	-25
<i>Melanom</i>	LOX IMVI	71	-35	-96	71	50	-92	82	-2	-92	69	92	71	-83	49	-78	-77
	MALME-3M	23	-78	-88	0	0	-95	49	35	-97	0	36	23	-82	29	-77	-83
	M14	48	-84	-90	59	0	-89	56	85	-79	48	91	50	-66	44	-71	-46
	MDA-MB-435	53	-84	-85	82	37	-92	80	69	-90	33	86	55	-83	89	-92	-77
	SK-MEL-2	0	-88	0	0	0	-82	26	26	-83	19	26	0	72	12	-80	-93
	SK-MEL-28	19	-92	0	0	0	-92	20	36	-100	16	38	0	-89	0	-85	-98
	SK-MEL-5	14	-93	-92	23	0	-98	58	48	-100	16	78	35	-98	28	-95	-100
	UACC-257	13	-84	0	0	0	-91	32	29	-84	18	47	15	-71	11	-84	-83

Sinteze de noi azaheterocicli cu proprietăți speciale

	UACC-62	59	-86	0	81	20	-61	44	45	-98	26	48	38	-66	32	-57	-85
Cancer ovarian	IGROV1	27	59	-83	44	15	-87	-4	98	-94	70	89	94	-72	53	-82	-41
	OVCAR-3	N.D. ^c	-92	N.D. ^c	22	N.D. ^c	-66	-12	80	-82	N.D. ^c	69	82	-89	36	-80	-82
	OVCAR-4	43	-60	-50	31	32	-61	58	58	-100	32	46	40	-76	39	-76	-78
	OVCAR-5	34	-71	-5	46	17	-83	47	54	-100	26	44	22	-90	0	-87	-66
	OVCAR-8	47	-57	-55	34	34	-67	59	55	-70	32	66	42	-52	19	-66	-64
	NCI/ADR-RES	46	99	97	20	25	-71	-4	94	-60	33	92	77	-79	63	-71	-77
	SK-OV-3	0	0	0	12	0	-85	36	28	-95	34	34	0	-71	0	-89	-84
Cancer renal	786-0	33	-94	-87	11	16	-89	86	99	-92	47	-4	74	-65	36	-81	-54
	A498	29	63	0	82	0	-93	24	58	-98	36	49	0	-80	0	-89	-77
	ACHN	77	-99	-98	48	37	-98	55	72	-100	36	73	52	-92	28	-97	-90
	CAKI-1	73	-83	-92	73	53	-97	64	73	-99	58	69	53	-85	33	-92	-94
	RXF 393	29	-58	-86	0	0	-87	N.D. ^c	N.D. ^c	-100	39	N.D. ^c	N.D. ^c	N.D. ^c	N.	-81	N.D. ^c
	SN12C	25	-70	-64	20	0	-77	83	84	-100	30	76	61	-59	D. ^c	-81	-56
	TK-10	0	-81	-69	0	0	-91	28	40	-96	0	46	0	-72	30	-79	-67
UO-31	58	-89	-96	57	24	-95	89	97	-100	62	89	66	-90	0	-89	-95	
														59			
Cancer de prostată	PC-3	57	-24	-61	56	51	-81	74	79	-86	66	87	64	-51	41	-83	-52
	DU-145	22	-57	-24	41	0	-90	51	62	-98	39	69	35	-92	27	-93	-79
Cancer de sân	MCF7	49	-12	-72	67	28	-71	82	90	-69	77	96	68	-78	64	-80	-56
	MDA-MB231/ATCC	43	-71	-74	15	19	-83	-1	-25	-93	32	93	96	-90	48	-82	-90
	HS 578T	12	-53	-38	0	0	-47	71	48	-49	39	74	50	-63	30	-53	-58
	BT-549	0	-79	0	0	0	-89	96	-2	-91	41	-3	87	-64	56	-76	-79
	T-47D	62	-61	-56	48	44	-54	72	74	-53	97	73	68	-60	52	-64	-54
	MDA-MB-468	44	-71	-72	N.D. ^c	20	-75	-10	-35	-80	59	-40	-13	-83	-1	-87	-94

[a] Date obținute din screeningul in vitro al celulelor tumorale umane de la NCI pentru o singură doză (concentrație de 10 μM). [b] Procent de inhibare a creșterii celulare. [c]

Nedeterminat. [d] Efect citotoxic: procent de creștere celulară <0; inhibiția totală a proliferării celulare și moartea celulelor.

În **Figura II.35** este prezentată diagrama în care se observă faptul că hidrazonetele **52**, **53**, **59**, **62**, **66**, **69**, și **71**, care conțin nucleul cu 7-clorochinolină, au media activității sub 0, adică sunt citotoxici.

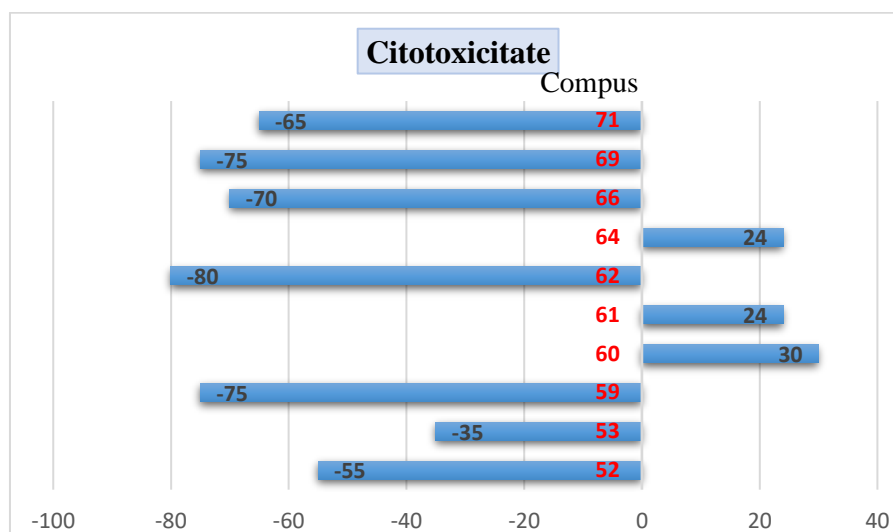


Figura II.35. Valoarea mediei activității hidrazonetele rezultate din screeningul *in vitro* al celulelor tumorale umane de la NCI pentru o singură doză (concentrație de 10 μ M).

Compușii din această serie au prezentat o puternică activitate antiproliferativă. Hidrazonetele **52**, **53**, **59-62**, **64**, **66**, **69**, **71** au avut efect anticancer (citostatic sau citotoxic) pe aproape toate liniile celulare testate, astfel îndeplinind condițiile pentru a trece în următoarea etapă și de a fi testați pentru a se determina GI_{50} (concentrația la care creșterea celulară este inhibată în proporție de 50%). Valorile obținute pentru GI_{50} în urma testului NCI *in vitro* pe 60 de linii celulare sunt prezentate în **Tabelul II.11**.

Tabel II.11. Valorile pentru GI_{50} în urma testului NCI *in vitro* pe 60 de linii celulare pentru compușii **52**, **53**, **59-62**, **64**, **66**, **69**, **71**.

Tip cancer	Compuș	52	53	59	60	61	62	64	66	69	71
	Linie celulară	$GI_{50}^{a,b}$ (μ M)									
Leucemie	CCRF-CEM	2.14	N.D. ^f	0.32	0.30	0.83	0.31	0.46	0.28	0.25	0.20
	HL-60(TB)	1.96	1.89	0.24	1.28	2.81	0.26	2.54	0.20	0.25	0.46
	K-562	2.49	1.63	0.24	1.94	4.05	0.30	2.94	0.20	0.19	0.20
	MOLT-4	2.20	2.36	1.05	1.55	2.67	0.26	2.85	0.34	0.23	0.26
	RPMI-8226	2.20	2.18	1.18	0.83	3.07	0.27	1.61	0.30	0.24	0.22
	SR	0.70	1.90	0.25	2.93	2.28	0.12	4.80	0.25	0.15	0.28
Cancer pulmonar non-microcelular	A549/ATCC	1.77	1.74	1.45	13.2	12.6	1.48	8.12	1.48	0.18	1.58
	EKVX	1.73	1.74	1.45	1.97	4.44	1.69	2.71	1.26	1.43	1.16
	HOP-62	1.66	1.69	1.67	10.0	11.0	1.91	10.1	1.52	1.45	1.58
	HOP-92	1.38	1.44	0.53	5.32	6.66	1.32	2.22	1.42	0.50	1.33
	NCI-H226	1.80	1.79	1.89	1.65	3.78	1.86	2.02	1.50	1.93	1.47
	NCI-H322M	1.72	1.72	1.73	11.4	>100	1.44	13.4	1.56	0.30	1.57
Cancer de colon	NCI-H460	2.04	2.05	1.72	11.5	14.1	2.02	7.68	0.50	0.19	0.37
	NCI-H522	1.68	1.66	1.77	1.03	2.53	1.34	3.11	1.16	0.22	1.79
	COLO 205	1.82	1.86	1.79	13.8	>100	0.25	15.7	1.21	0.35	0.35
	HCC-2998	1.75	1.73	1.78	12.0	9.35	1.62	5.74	0.71	0.26	0.76

	HTC-116	1.69	1.92	0.33	12.1	13.2	0.19	5.97	0.19	0.16	0.19
	HCT-15	1.62	1.78	0.37	8.10	9.19	0.18	4.46	0.29	0.17	0.18
	HT29	1.53	1.81	0.35	15.0	29.4	0.21	8.77	0.18	0.17	0.27
	KM12	2.08	2.39	1.79	9.78	3.68	1.65	2.71	1.65	0.18	1.80
	SW-620	1.90	1.69	0.79	13.3	76.0	0.18	15.7	0.24	0.18	0.36
Cancer al SNC	SF-268	1.90	2.00	1.76	2.99	4.15	1.86	5.23	1.72	1.55	1.70
	SF-295	1.79	1.79	1.82	11.4	19.1	1.32	9.13	1.36	1.43	1.61
	SF-539	1.80	1.75	1.72	1.47	4.70	0.18	2.65	0.18	0.21	1.66
	SNB-19	1.93	1.97	1.67	12.7	11.4	1.17	20.7	1.65	0.36	1.54
	SNB-75	1.55	1.67	1.38	0.14	0.38	1.58	0.28	0.36	1.23	1.07
	U251	1.74	1.81	0.83	10.7	21.0	0.75	15.9	0.25	0.17	0.27
Melanom	LOX IMVI	2.02	2.15	0.23	3.32	6.47	0.21	3.40	0.17	0.18	0.17
	MALME-3M	1.90	1.87	1.76	7.33	>100	1.80	82.7	1.62	1.40	1.60
	M14	1.80	1.76	1.73	11.9	78.5	1.54	7.27	1.57	0.57	1.69
	MDA-MB-435	1.79	1.69	1.75	2.46	79.4	1.61	6.73	0.60	0.20	1.69
	SK-MEL-2	1.79	16.3	1.83	12.9	>100	1.83	21.4	1.60	1.74	1.79
	SK-MEL-28	1.75	1.79	1.81	14.5	>100	1.69	29.1	1.59	1.84	1.59
	SK-MEL-5	1.77	1.77	1.75	8.61	25.6	1.65	7.41	1.29	1.76	1.50
	UACC-257	1.69	1.77	1.65	11.6	>100	1.82	25.1	1.52	1.82	1.58
	UACC-62	1.76	1.71	1.77	10.3	37.3	1.63	8.45	1.50	1.75	1.66
Cancer ovarian	IGROV1	1.91	1.85	1.54	1.37	1.63	0.30	0.63	1.64	0.17	1.65
	OVCAR-3	1.88	2.41	N.D. ^f	3.85	8.63	1.58	11.6	0.17	N.D. ^f	1.66
	OVCAR-4	1.83	1.85	1.83	10.5	77.9	1.36	43.2	1.29	0.28	1.77
	OVCAR-5	1.85	1.67	1.63	11.0	>100	1.17	4.17	1.59	0.19	1.53
	OVCAR-8	2.09	2.02	1.68	8.12	26.3	0.40	20.8	1.63	0.20	1.80
	NCI/ADR-RES	1.98	2.13	1.93	2.98	7.03	0.58	5.33	1.04	0.24	1.41
	SK-OV-3	1.82	1.72	1.67	2.40	56.2	1.86	6.19	1.56	1.54	1.57
Cancer renal	786-0	1.55	1.89	1.41	11.1	13.2	0.31	12.6	0.47	0.17	1.44
	A498	1.72	18.9	1.51	18.7	35.2	1.49	20.5	2.07	1.73	1.87
	ACHN	1.95	1.83	1.87	10.5	11.6	0.34	7.76	1.59	0.28	1.66
	CAKI-1	1.68	1.66	1.68	2.23	4.35	1.54	3.01	1.30	1.58	1.46
	RXF 393	1.75	1.75	1.47	2.84	2.50	1.40	2.09	1.48	1.54	1.42
	SN12C	1.75	1.80	1.56	2.28	2.28	0.65	2.38	1.73	0.19	1.75
	TK-10	1.74	1.81	2.09	19.5	48.0	1.80	18.6	2.61	2.81	2.27
	UO-31	1.68	1.69	1.32	1.21	1.46	1.47	1.09	1.43	1.53	1.44
Cancer de prostată	PC-3	1.64	1.66	1.55	2.98	4.83	0.53	2.55	1.15	0.24	1.31
	DU-145	1.95	1.90	1.53	13.0	20.5	0.46	13.3	1.30	0.19	0.92
Cancer de sân	MCF7	1.63	1.58	1.25	2.67	2.43	0.18	1.70	0.28	0.16	0.95
	MDA-MB231/ATCC	1.93	2.05	1.65	1.37	2.20	0.25	1.93	0.19	0.17	1.24
	HS 578T	1.99	2.03	1.73	4.17	7.45	2.00	6.91	1.32	1.70	1.52
	BT-549	1.54	1.75	1.55	0.24	0.17	1.76	0.17	1.62	1.95	1.48
	T-47D	1.83	1.80	1.55	4.04	3.97	1.28	3.22	0.33	0.16	1.61
	MDA-MB-468	1.76	1.65	1.01	1.89	1.88	0.80	1.74	0.27	0.22	1.24

^[a] Date obținute în urma testului NCI *in vitro* pe 60 linii celulare pentru 5 doze. ^[b] GI₅₀ reprezintă concentrația molară a compusului ce cauzează 50% din inhibarea creșterii celulelor tumorale. ^[c] Valorile îngroșate reprezintă cele mai bune valori GI₅₀ obținute pentru structurile testate (GI₅₀ < 1.00 μM).

Rezultatele obținute arată faptul că hidrazona **69** este cea mai activă, având 38 de linii celulare cu GI₅₀ < 1.00 μM. Structural, acest compus, este alcătuit dintr-un nucleu de tip indol substituit în poziția 5 cu gruparea metoxi și la atomul de azot cu gruparea metil și nucleul de tip 7-clorochinolină.

O parte dintre hidrazonile testate (**59**, **60**, **62**, **64**, **66**, **69**, **71**) prezintă activitate selectivă pe câteva linii celulare: CCRF-CEM și HL-60(TB) pentru Leucemie, SNB-75 și U251 pentru cancerul sistemului nervos central și LOX IMVI pentru melanom.

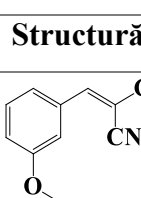


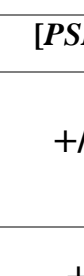


Hidrazonele **47-73** și intermediarii de tip 2-(Aril(Het)metilen)-malononitril **44a-j** au fost testați la Université de Brest, Franța, pentru activitatea lor împotriva bolilor rare de tip prion.

Termenul de “prion” provine de la „particulă infecțioasă proteinacee” și face referire la agenții patogeni transmisibili, anormali, acelulari, care sunt capabili să producă erori în procesul de formare a unor proteine specifice, numite proteine prion, ce se găsesc în special în țesutul cerebral.¹⁶⁴

Principala caracteristică a bolilor prionice este demența rapid progresivă. Având în vedere faptul că, până în prezent, nu există terapii care să conducă la reversia procesului de transformare a proteinei modificate în proteina normală sau să limiteze procesul de acumulare a acestor proteine în organismul uman, se dorește sinteza de noi compuși cu activitate împotriva bolii prionice.¹⁶⁶

Rezultatele obținute în urma testărilor au arătat faptul că doi intermediari (**44d**, **44e**) și patru hidrazone (**48**, **51**, **55**, **72**) au prezentat activitate împotriva bolii prionice, acestea fiind oglindite în **Tabelul II.12**, cu “+” sunt notați compușii cu activitate ridicată, iar cele cu “+/-” sunt cele cu acțiune moderată.

Tabel II.12. Rezultatele testărilor împotriva bolilor prionice.

Compus	Structură	[PSI+]
44d		+/-
44e		+
48		+
51		+
55		+
72		+

Intermediarul substituit cu *meta*-metoxi (**44d**) a prezentat acțiune moderată, în schimb, cel substituit cu *para*-bromo (**44e**) a avut activitate ridicată. În ceea ce privește activitatea hidrazonelor, aceasta a fost ridicată în toate cele 4 cazuri.

Asemănarea structurală dintre cele patru hidrazone active este prezența unui heterociclu, astfel, hidrazonele **48** și **51** au în locul nucleului B, nucleul de tip 4,5-dihidro-1*H*-imidazol, compusul **55** are nucleul A de tip fenotiazinic, iar compusul **72** are nucleul A de tip 5-bromoindol și nucleul B de tip 5-bromopiridină

II.3. Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor derivați de piridine - Seria III

În ultimul subcapitol al acestei lucrări de doctorat s-au sintetizat o nouă serie de azaderivați de tip piridină, prin introducerea ciclului piridinic în locul conectorului de tip cetonic din fenstatină. De asemenea, s-au variat și cele două nuclee A și B prin înlocuirea lor, fie alte nuclee de tip fenil diferit substituit, fie cu heterocicluri care pot crește activitatea biologică a structurilor finale. Modulările făcute sunt prezentate în **Figura II.40**.

Primul pas în designul noilor structuri a fost conservarea nucleului A, 3,4,5-trimetoxifenil din fenstatină și înlocuirea conectorului de tip cetonic cu piridina substituită în poziția 2 cu gruparea amino și în poziția 3 cu gruparea ciano, iar nucleul B a fost înlocuit cu 3,4-dimetoxifenil. Următorul pas a fost varierea nucleelor A și B, atât prin înlocuirea lor, fie cu fenil diferit substituit, fie cu heterocicluri.

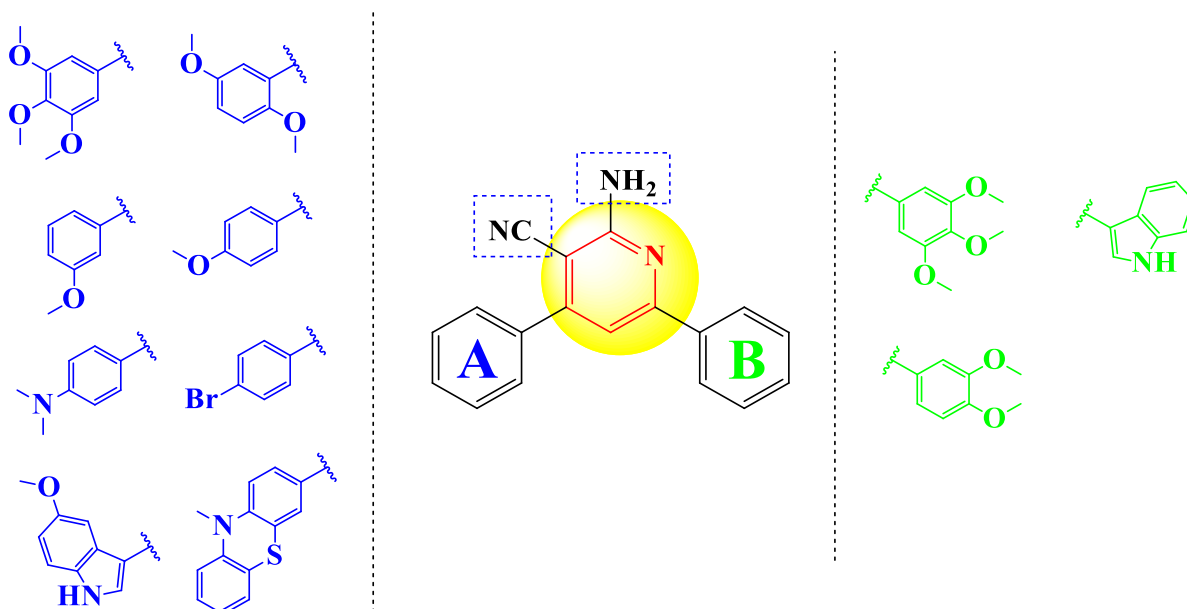


Figura II.40. Modulări ale fenstatinei pentru a obținerea seriei derivaților de piridină.

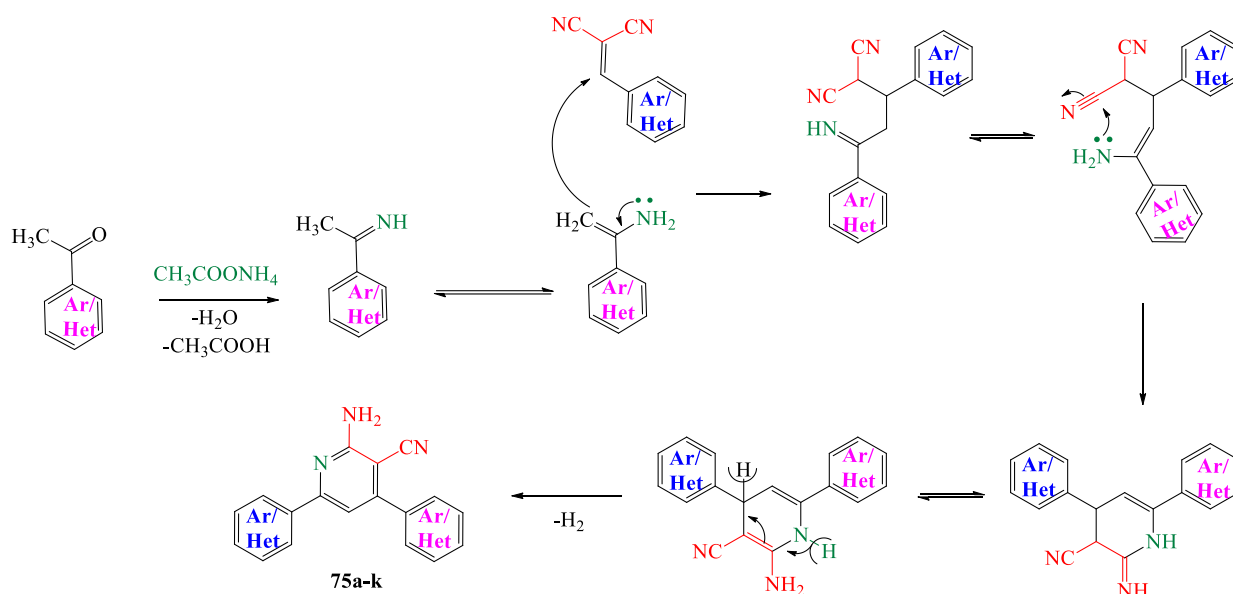
Introducerea heterocicului de tip fenotiazină în structura derivaților de piridină, în locul nucleului A, se bazează pe experiența acumulată până în prezent în cadrul grupului nostru de cercetare, deoarece, compușii sintetizați în cadrul grupului care au în structura lor ciclul fenotiazinic prezintă o bună activitate biologică.

Pentru a sintetiza compușii doriți a fost utilizată seria intermediarilor **44a-j** sintetizați anterior (**Schema II.6**, Capitolul II.2). Intermediarii astfel sintetizați au reacționat cu diferite cetone, disponibile comercial, închizându-se ciclul piridinic și obținerea compușii doriți.^{173,174}



Schema II.13. Reacția de sinteză a derivaților de piridină. **Reactivi și condiții:** (i) EtOH, reflux, 7-12 ore.

Mecanismul de reacție și modul de formare a compușilor țintă, de tip piridină, este prezentat în **Schema II.14**.¹⁷³



Schema II.14. Mecanismul de formare a compușilor de tip piridină.

Prin intermediul acestei reacții s-a obținut o nouă serie de 11 compuși noi, derivați de piridină, a căror structură este prezentată în **Figura II.43**.

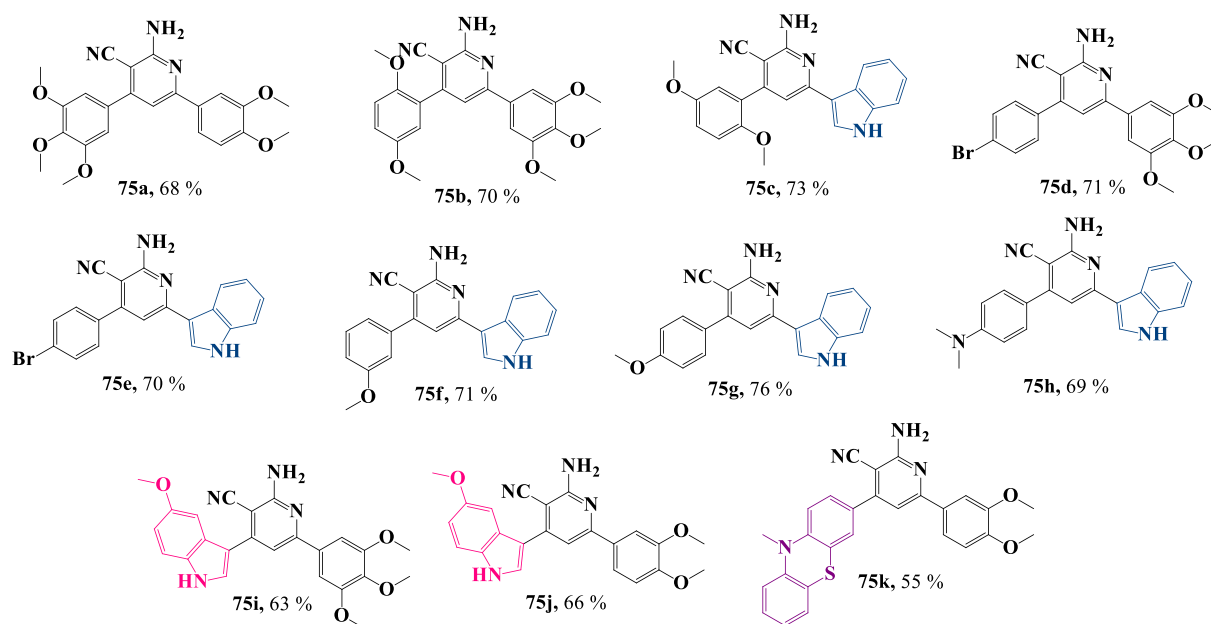


Figura II.43. Structurile și randamentele de obținere ale compușilor din *Seria III*, **75a-k**.

Toți compușii sintetizați au fost propuși, acceptați și testați, *in vitro*, la Institutul Național de Cancer (NCI) pentru a le studia activitatea anticancer pe 60 de linii celulare canceroase, prima etapă fiind testarea la o concentrație de 10 μM . În **Tabelul II.13** sunt prezentate procentele de inhibare a creșterii celulare pentru cele mai active șase dintre structurile testate.

Tabel II.13. Rezultatele *in vitro* a inhibării creșterii celulelor canceroase umane pentru piridinele **75c**, **75e-i**.

Tip cancer	COMPUS	75c	75e	75f	75g	75h	75i
	Linie celulară	Inhibarea creșterii celulare, GI% ^{a,b} 10 μM					
Leucemie	CCRF-CEM	91	65	67	58	70	27
	HL-60(TB)	100^{d,h}	71	63	51	79	39
	K-562	91	81	77	76	82	69
	MOLT-4	92	58	68	55	64	27
	RPMI-8226	93	65	60	64	95	0
	SR	91	74	83	81	90	69
Cancer pulmonar non-microcelular	A549/ATCC	78	57	57	56	74	28
	EKVX	86	48	N.D. ^c	34	38	0
	HOP-62	90	57	37	25	64	31
	HOP-92	100^{d,i}	56	38	31	72	36
	NCI-226	86	39	24	20	37	0
	NCI-H23	100^{d,j}	48	22	17	45	15
	NCI-H322M	75	32	0	20	30	0
NCI-H460	100^{d,k}	83	76	79	92	35	

	NCI-H522	100^{d,l}	89	65	64	97	27
	COLO 205	100^{d,m}	48	37	0	77	18
	HCC-2998	100^{d,n}	39	37	23	50	24
<i>Cancer de colon</i>	HTC-116	100^{d,o}	72	67	59	85	40
	HCT-15	100	83	82	76	88	68
	HT29	100^{d,p}	72	60	55	88	49
	KM12	100^{d,q}	71	63	73	81	41
	SW-620	93	72	52	52	78	42
	SF-268	90	43	39	41	47	10
	SF-295	100^{d,r}	47	45	50	73	31
<i>Cancer al SNC</i>	SF-539	100^{d,s}	56	51	56	62	12
	SNB-19	88	33	26	19	59	19
	SNB-75	100^{d,t}	62	48	26	78	14
	U251	100^{d,u}	47	59	61	73	20
LOX IMVI	100^{d,v}	71	70	61	88	22	
<i>Melanom</i>	MALME-3M	100^{d,w}	26	0	30	35	11
	M14	100^{d,x}	55	48	46	100^{d,e}	26
	MDA-MB-435	100^{d,y}	100	72	66	86	88
	SK-MEL-2	100^{d,z}	60	29	0	100^{d,f}	30
	SK-MEL-28	95	40	27	24	40	10
	SK-MEL-5	100^{d,a'}	41	40	50	70	13
	UACC-257	77	0	21	0	40	0
	UACC-62	100^{d,b'}	35	24	25	58	25
	IGROV1	84	65	45	38	57	21
	OVCAR-3	100^{d,c'}	32	31	27	42	N.D. ^c
<i>Cancer ovarian</i>	OVCAR-4	77	25	33	19	30	0
	OVCAR-5	84	36	0	29	51	0
	OVCAR-8	93	33	44	36	74	10
	NCI/ADR-RES	100^{d,d'}	75	65	49	85	41
	SK-OV-3	65	47	31	0	69	13
	786-0	100^{d,e'}	20	48	59	82	11
	A498	97	36	53	60	100^{d,g}	21
<i>Cancer renal</i>	ACHN	91	42	26	29	52	0
	CAKI-1	92	69	53	55	75	46
	RXF 393	N.D. ^c	74	52	49	97	31
	SN12C	97	33	23	28	56	0
	TK-10	62	0	21	0	27	0
	UO-31	100^{d,f'}	56	40	45	55	19
	PC-3	86	44	48	32	62	23
<i>Cancer de prostată</i>	DU-145	87	30	34	50	50	0
	MCF7	96	81	48	47	72	52

Cancer de sân	MDA-MB 231/ATCC	87	54	36	59	64	22
	HS 578T	100^{d,g'}	41	31	40	64	0
	BT-549	100^{d,h'}	67	23	21	72	20
	T-47D	100	70	34	39	60	41
	MDA-MB- 468	100^{d,i'}	92	50	70	60	53

^[a] Date obținute din screeningul *in vitro* al celulelor tumorale umane de la NCI pentru o singură doză (concentrație de 10 μM). ^[b] Procent de inhibare a creșterii celulare. ^[c] Nedeterminat. ^[d] Efect citotoxic: procent de creștere celulară <0; inhibiția totală a proliferării celulare și moartea celulelor. ^[e] Procent de creștere celulară: -27%. ^[f] Procent de creștere celulară: -1%. ^[g] Procent de creștere celulară: -1%. ^[h] Procent de creștere celulară: -33%. ^[i] Procent de creștere celulară: -37%. ^[j] Procent de creștere celulară: -10%. ^[k] Procent de creștere celulară: -43%. ^[l] Procent de creștere celulară: -6%. ^[m] Procent de creștere celulară: -24%. ^[n] Procent de creștere celulară: -38%. ^[o] Procent de creștere celulară: -46%. ^[p] Procent de creștere celulară: -13%. ^[q] Procent de creștere celulară: -28%. ^[r] Procent de creștere celulară: -70%. ^[s] Procent de creștere celulară: -61%. ^[t] Procent de creștere celulară: -9%. ^[u] Procent de creștere celulară: -2%. ^[v] Procent de creștere celulară: -66%. ^[w] Procent de creștere celulară: -4%. ^[x] Procent de creștere celulară: -9%. ^[y] Procent de creștere celulară: -6%. ^[z] Procent de creștere celulară: -19%. ^[a'] Procent de creștere celulară: -85%. ^[b'] Procent de creștere celulară: -9%. ^[c'] Procent de creștere celulară: -24%. ^[d'] Procent de creștere celulară: -35%. ^[e'] Procent de creștere celulară: -53%. ^[f'] Procent de creștere celulară: -16%. ^[g'] Procent de creștere celulară: -17%. ^[h'] Procent de creștere celulară: -26%. ^[i'] Procent de creștere celulară: -10%.

Cei mai activi compuși ai primei etape de testare sunt **75c** și **75h**. Aceștia au fost selectați pentru a trece în următoarea etapă și pentru a fi testați la 5 doze diferite, determinându-se GI₅₀ (concentrația la care creșterea celulară este inhibată în proporție de 50%). Rezultatele etapei a doua de testare a celor două structuri, **75c** și **75h**, la cinci concentrații diferite, sunt prezentate în **Tabelul II.14**.

Tabel II.14. Valorile pentru GI₅₀ în urma testului NCI *in vitro* pe 60 de linii celulare pentru compușii **75c** și **75h**.

Tip cancer	Compus	75c	75h	Tip cancer	Compus	75c	75h
	Linie celulară	GI ₅₀ ^{a,b} (μM)			Linie celulară	GI ₅₀ ^{a,b} (μM)	
Leucemie	CCRF-CEM	2.40	1.54	Cancer ovarian	IGROV1	5.59	2.35
	HL-60(TB)	2.42	1.79		OVCAR-3	2.94	N.D. ^d
	K-562	0.88	0.65		OVCAR-4	5.42	4.78
	MOLT-4	3.84	1.89		OVCAR-5	5.94	3.17
	RPMI-8226	1.95	1.95		OVCAR-8	4.94	2.78
	SR	0.53	0.41		NCI/ADR-RES	1.22	1.82
Cancer pulmonar non-microcelular	A549/ATCC	3.74	1.92	Cancer renal	SK-OV-3	3.63	2.05
	EKVX	1.57	3.38		786-0	2.61	1.93
	HOP-62	2.88	1.83		A498	8.86	1.78
	HOP-92	1.30	2.14		ACHN	4.92	2.79
	NCI-H226	5.81	4.23		CAKI-1	1.51	1.67
	NCI-H23	2.82	3.13		RXF 393	1.77	1.30
	NCI-H460	1.58	1.06		SN12C	5.06	2.87
	NCI-H522	0.73	0.44		TK-10	11.1	4.10

	COLO 205	2.81	2.11		UO-31	3.90	1.88
	HCC-2998	2.98	2.15	<i>Cancer de prostată</i>	PC-3	1.93	2.79
	HTC-116	2.42	1.60		DU-145	8.20	3.45
<i>Cancer de colon</i>	HCT-15	0.90	0.48		MCF7	0.13	1.51
	HT29	2.74	1.72		MDA-MB-231/ATCC	2.06	2.16
	KM12	2.71	1.85	<i>Cancer de sân</i>	HS 578T	2.17	2.08
SW-620	2.90	2.16	BT-549		1.96	2.22	
	SF-268	3.63	3.89		T-47D	2.18	2.32
	SF-295	3.43	1.86		MDA-MB-468	0.06	1.97
<i>Cancer al SNC</i>	SF-539	2.90	1.33				
	SNB-19	5.47	2.97				
	SNB-75	1.30	1.84				
	U251	3.20	1.53				
	LOX IMVI	2.95	1.52				
	MALME-3M	3.25	1.72				
	M14	1.60	1.70				
<i>Melanom</i>	MDA-MB-435	0.39	0.46				
	SK-MEL-28	3.46	1.79				
	SK-MEL-5	0.80	1.84				
	UACC-257	9.47	1.89				
	UACC-62	2.67	2.05				

^[a] Date obținute în urma testului NCI *in vitro* pe 60 linii celulare pentru 5 doze. ^[b] GI₅₀ reprezintă concentrația molară a compusului ce cauzează 50% din inhibarea creșterii celulelor tumorale. ^[c] Valorile îngroșate reprezintă cele mai bune valori GI₅₀ obținute pentru compușii testați (GI₅₀ < 1.00 μM). ^[d] Nedeterminat.

În urma rezultatelor primite pentru cea de-a doua etapă de testare, a rezultat faptul că structura **75c** este cea mai activă, având valoarea GI₅₀ < 1.00 μM pe 8 linii celulare, iar **75h** pe 5 linii celulare. Ambele structuri au prezentat și activitate selectivă pe anumite linii celulare: K-562 și SR pentru leucemie, NCI-H522 și HCT-15 pentru cancerul de colon și MDA-MB-435 pentru melanom.

II.4. Concluzii generale și perspective

Punctul de plecare al acestui studiu, urmărind îndeplinirea obiectivelor lucrării de doctorat, l-a reprezentat structura fenstatinei, pe care s-au făcut diferite modulări, obținându-se astfel, **121 de compuși noi**, nedescrși în literatura de specialitate, grupați în trei serii și caracterizați cu ajutorul spectrelor IR, ¹H-RMN, ¹³C-RMN și în unele cazuri RX.

Modulările făcute pe structura fenstatinei au constat în înlocuirea pe rând, fie a conectorului cetonic, fie a celor două inele aromatice, A și B. Compușii obținuți au fost grupați în trei serii, după cum urmează:

Seria I: 65 de noi compuși pirolici, grupați în trei serii, în funcție de particularitățile structurale:

- **Seria I.1:** 39 de compuși a căror structură este alcătuită din 3 cicluri, dintre care, ciclul B este pirolic. Acesta este legat direct de nucleul C;
- **Seria I.2:** 14 derivați de pirol a căror structură este formată din trei cicluri, iar ciclul B, de tip pirol, este legat de ciclul C printr-un conector de tip metilen;
- **Seria I.3:** 12 compuși alcătuiți structural din două nuclee (unul de tip pirol), cele două fiind legate direct sau printr-un conector de tip metilen.

Toți compușii sintetizați au fost testați la Institutul Național de Cancer-SUA, iar rezultatele au arătat faptul ca seria a prezentat o bună activitate anticancer, doi compuși fiind selectați pentru a trece în următoarea etapă de testare, pentru a se determina GI₅₀ (concentrația la care creșterea celulară este inhibată în proporție de 50%). Compusul **18** a fost cel mai activ, având GI₅₀ < 1.00 μM pe trei linii celulare canceroase (leucemie pe liniile K-562, SR și melanom pe linia MDA-MB-435).

Seria II: alcătuită din 42 de hidrazone împărțite în două miniserii (**46a-o** și **47-73**), în funcție de modalitatea de sinteză:

1. Prin reacția derivaților de tip 2-(Aril(Het)metilen)-malononitril și diferite hidrazine;
2. Prin reacția directă de condensare dintre aldehide și hidrazine.

Compușii au fost obținuți prin realizarea următoarelor modulări structurale:

- ❖ Conectorul cetonic din fenstatină a fost înlocuit cu cel de tip hidrazonă;
- ❖ Nucleul A a fost înlocuit fie cu un ciclu fenilic diferit substituit, fie cu heterociclii ca tiofen, 10-metilfenotiazină și indol diferit substituit;
- ❖ Nucleul B a fost înlocuit cu fenil diferit substituit sau cu heterociclii cu azot cum ar fi chinolina, piridina diferit substituită, benzotiazolul și 4,5-dihidro-1*H*-imidazolul.

Activitatea biologică a hidrazonelor sintetizate variază, astfel:

- Hidrazonele **46a-o**, obținute prin prima metodă de sinteză, au prezentat o bună activitate antifungică, cea mai activă structură (în special pe *C. glabrata*, cu MIC=16 μg/mL) este aceea în care nucleul B este *orto*-clorofenil. Activitatea anticancer a acestei serii a fost moderată (testările au fost realizate la Institutul Național de cancer-NCI-SUA).
- Hidrazonele **47-73** au prezentat o excelentă activitate anticancer (Institutul Național de cancer-NCI-SUA). În prima etapă a testărilor, pe o singură doză (10 μM), zece

compuși au fost activi pe toate liniile celulare, șapte dintre aceștia prezentând activitate citotoxică pe toate liniile celulare testate. Cea mai activă a fost hidrazona **62** cu nucleul A indol substituit în poziția 5 cu gruparea metoxi. Aceasta a prezentat activitate citotoxică pe toate liniile celulare testate, având media activității -80. Cele zece hidrazone active au trecut în a doua etapă, pe 5 doze, cea mai activă a fost hidrazona **69**, având 38 de linii celulare cu $GI_{50} < 1.00 \mu M$, cu nucleul A de tip indol substituit atât în poziția 5 cu gruparea metoxi cât și la atomul de azot cu gruparea metil.

- doi intermediari de tip benzilidenmalononitril diferit substituit (**44d**, **44e**) și patru structuri de tip hidrazonă (**48**, **51**, **55**, **72**) au prezentat activitate împotriva bolii prionice. iar intermediarul **44e** și toate cele patru hidrazone au prezentat activitate ridicată.

Seria III: ultima serie a acestei lucrări de doctorat este formată din 11 noi compuși de tip piridină, substituită în poziția 2 cu gruparea amino (-NH₂) și în poziția 3 cu gruparea ciano (-CN). Nucleele A și B din fenstatină au fost înlocuite cu fenil diferit substituit sau cu heterocicluri (fenotiazină și indol) care au capacitatea de a crește activitatea biologică a structurilor finale.

Activitatea anticancer a fost studiată la NCI-SUA (Institutul Național de Cancer) pe 60 de linii celulare pentru capacitatea de inhibare a creșterii celulelor canceroase.

Dintre derivații piridinici sintetizați, șase au prezentat o bună activitate anticancer, cinci dintre aceștia având activitate selectivă câteva linii celulare canceroase, procentul de inhibiție fiind de peste 50%. Cei mai activi doi compuși (**75c** și **75h**) au fost selectați pentru a trece în următoarea etapă (testare la 5 doze) și pentru li se calcula GI_{50} . Derivatul piridinic cel mai activ anticancer (**75c**) a avut valoarea $GI_{50} < 1.00 \mu M$ pe 8 linii celulare canceroase.

Activitatea anticancer, in vitro, a tuturor compușilor sintetizați a fost studiată la Institutul Național de Cancer-SUA prin analiza capacității de inhibare a creșterii celulare pe 60 de linii celulare canceroase. În cazul primei etape, testare la doză unică (10 μM), cei mai activi compuși au fost hidrazonele **52**, **53**, **59**, **62**, **66**, **69**, **71**, care au avut activitate citotoxică pe toate liniile celulare canceroase și piridina **75c** care a avut activitate citotoxică pe 28 de linii celulare. În a doua etapă de testare, la 5 doze, hidrazonele **62**, **66**, **69** și **71** prezintă o activitate foarte bună anticancer, compusul **69** având 38 de linii cu valoarea $GI_{50} < 1.00 \mu M$.

Activitatea antifungică a fost testată, în colaborare cu Institutul Pôles de Biologie Pathologie Génétique, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) din Lille, Franța, pentru seria de

hidrazone **46a-o**, iar cel mai activ compus a fost **46d** (în special pe *C. glabrata*, cu MIC=16 µg/mL).

Activitatea împotriva bolilor prionice (boli rare) a fost testată în colaborare cu Universită de Brest din Franța, iar cei mai activi compuși s-au dovedit a fi hidrazonele **48, 51, 55, 72**.

O parte dintre rezultatele obținute au fost diseminate prin prezentarea lor la diferite conferințe:

Negru, G., Ghinet, A., Belei, D., Bîcu, E., Synthesis and characterization of some arylidenmalononitriles, Sesiunea de comunicări științifice a studenților, masteranzilor și doctoranzilor, Iași, România, 20-21 Iunie 2019.

Negru, G., Ghinet, A., Shova, S., Bîcu, E., Synthesis and characterization of some of analogues of phenstatin, IasiChem 2019, Faculty of Chemistry Conference, Iași, România, 31 Octombrie-01 Noiembrie 2019.

Negru, G., Ghinet, A., Bîcu, E., Design, synthesis, chemical and biological characterization of new compounds, pyrrole derivatives, Sesiunea de comunicări științifice a studenților, masteranzilor și doctoranzilor, Iași, România, 29-30 Octombrie 2020.

Negru, G., Kamus, L., Bîcu, E., Shova, S., Sendid, B., Dubar, F., Ghinet, A., A new series of hydrazones with antifungal activity against candida species, Sesiunea de comunicări științifice a studenților, masteranzilor și doctoranzilor, Iași, România, 11-12 Noiembrie 2021.

Negru, G., Zubaș, A., Ghinet, A., Bîcu, E., A new series of pyridine derivatives as anticancer agents: design, synthesis and biological evaluation, Sesiunea de comunicări științifice a studenților, masteranzilor și doctoranzilor, Iași, România, 28 Octombrie 2022.

Prin publicarea unor articole:

Negru, G., Kamus, L., Bîcu, E., Shova, S., Sendid, B., Dubar, F., Ghinet, A., Attempts to access a series of pyrazoles lead to new hydrazones with antifungal potential against Candida species including azole-resistant strains, Molecules, 26(19), 5861, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26195861>, Factor de impact 4.412.

Negru (Apostol), G.; Ghinet, A.; Bîcu, E. 7-Chloroquinolinehydrazones as First-in-Class Anticancer Experimental Drugs in the NCI-60 Screen among Different Investigated Series of

*Aryl, Quinoline, Pyridine, Benzothiazole and Imidazolehydrazones*¹⁷⁶, *Pharmaceuticals* **2023**, *16*(5), 691. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph16050691>. Factor de impact: **5.215**.

Pe parcursul stagiului doctoral am fost membru în două proiecte de cercetare:

- ✚ **POCU/380/6/13/123623** (Doctoranzi și cercetători postdoctorat pregătiți pentru piața muncii 2019-2020);
- ✚ **PN-III-P4-ID-PCE-2020-0818/195/2021** (Liganzi P2X7R ca agenți terapeutici potențiali pentru tratamentul bolilor inflamatorii cronice ale intestinului și ale cancerului aferent 2021-2023).

De asemenea, am beneficiat de cinci stagii de practică/cercetare la instituția *Yncrea-Ecole des Hautes Etudes d'Ingenieur, Universite Catholique de Lille, Franța*, finanțate prin programele: **Erasmus+**, proiectul **PCDS-19-04** (Acord de colaborare între Yncrea Hauts-de-France - Lille, Franța și Universitatea "Alexandru Ioan Cuza", Iași, România; Synthèse et évaluation biologique de nouveaux composés hétérocycliques pour combattre la progéria, acronim HOPE), proiectul **UAIC-INOV-IMP2** (Susținerea competitivității în cercetare-dezvoltare și inovare prin dezvoltarea capacității instituționale a Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași) și proiectul **PN-III-P4-ID-PCE-2020-0818/195/2021** (Liganzi P2X7R ca agenți terapeutici potențiali pentru tratamentul bolilor inflamatorii cronice ale intestinului și ale cancerului aferent 2021-2023).

Mulțumiri Centrului CERNESIM, din cadrul Institutului de Cercetări Interdisciplinare de la Universitatea "Alexandru Ioan Cuza" din Iași, pentru infrastructura folosită în înregistrarea experimentelor RMN.

Bibliografie selectivă

1. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, consultat în septembrie 2021.
2. Kunel, R.W.; Duncan, G.; Watson, D; Alderson, K.; Rogawski, M.A.; Peper M., *N Engl J Med.* **1987**, 316, 1562.
3. Pettit, G. R.; Toki, B.; Herald, D. L.; Verdier-Pinard, P.; Boyd, M. R.; Hamel, E.; Pettit, R. K., *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 1688-1695.
4. Pettit, G.R.; Grealish, M.P.; Herald, D.L.; Boyd, M.R.; Hamel, E.; Pettit, R.K., *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 2731-2737.
7. Alvarez, C.; Alvarez, R.; Corchete, P.; Pérez-Melero, C; Peláez, R.; Medarde, M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 3417-3420.
8. Tozatti, C.S.S.; Khodyuk, R.G.D.; Silva, A.O.; Santos, E.A.; Dênis Pires de Lima, M.S.A.; Hamel, E., *Quim. Nova*, **2012**, 35, 1758-1762.
9. Prinz, H.; Schmidt, P.; Bohm, K. J.; Baasner, S.; Muller, K.; Unger, E.; Gerlach, M.; Gunther, E.G., *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 1284-1294.
128. Salaheldin, A.; Oliveira-Campos, A.; Rodrigues, L., *Helv. Chim. Acta* **2010**, 93, 242-248.
129. Silva, D.; Mendes, E.; Summers, E. J.; Neca, A; Jacinto, A.C.; Reis, T.; Agostinho, P.; Bolea, I.; Jimeno, M.L.; Mateus, M.L.; Oliveira-Campos, A.M.F.; Unzeta, M.; Marco-Contelles, J.; Majekova, M.; Ramsa, R.R.; Carreiras, M.C., *Drug Dev. Res.* **2020**, 81, 215-231.
139. Sun, H.Y.; Ji, F.Q., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2012**, 423, 319-324.
140. Gouhar, R.; Fathalla, O.; Abdel-Karim, R., *Der Pharma Chemica* **2013**, 5, 225-233.
141. Wada, S.; Suzuki, H., *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 399-401.
142. Attar, S. R.; Shinde, B.; Kamble, S. B., *Res. Chem. Intermed.* **2020**, 46, 4723-4748
143. Madasamy, K.; Kumaraguru, S.; Sankar, V.; Mannathan, S.; Kathiresan, M., *New J. Chem.*, **2019**, 43, 3793-3800.
144. Mannarsamy, M.; Nandeshwar, M.; Muduli, G.; Prabusankar, G., *Chem. Asian J.* **2022**, e202200594.
145. Tavakolian, M.; Najafpour, M.M., *New J. Chem.* **2019**, 43, 16437-16440.
146. Yamashita, K.; Tanaka, T.; Hayashi, M., *Tetrahedron* **2005**, 61, 7981-7985
147. Wang, Z.; Yuan, X.; Cheng, Q.; Zhang, T.; Luo, J., *New J. Chem.* **2018**, 42, 11610-11615.
148. Anamika; Yadav, C.L.; Drew, M.G.; Kumar, K.; Singh, N., *Inorg. Chem.* **2021**, 60, 6446-6462.

149. Zhan, C.G.; Zheng, F.; Ding, K.; Zhou, Z., U.S. Patent No. US11325901B2 Espacenet, **2022**.
150. Spreitzer, H.; Daub, J., *Eur. J. Chem.* **1996**, 2, 1150-1158.
155. Babalola, S.A.; Igie, N.; Idris, A.Y.; Hamza, A.; Sanni, Y.M.; Muhammad, H.Y.; Erumiseli, O.G.; Bakare, L.O., *Drug Discovery* **2022**, 16, 53-62.
156. Katariya, K.D.; Shah, S.R.; Reddy, D., *Bioorg. Chem.* **2020**, 94, 103406.
164. Weissmann, C., *Nat Rev Microbiol* **2004**, 2, 861-871.
166. Bremer, A.; Farag, M.; Borchers, W.M.; Peran, I.; Martin, E.W.; Pappu, R.V.; Mittag, T., *Nat. Chem.* **2022**, 14, 196–207.
173. Pejman, H.; Hazeri, N.; Fatahpour, M.; Faroughi Niya, H., *Rev. Roum. Chim.* **2019**, 64, 241-247.
174. Safari, J.; Banitaba, S.H.; Dehghan Khalili, Sh., *Ultrason Sonochem.* **2012**, 19, 1061-1069.
175. **Negru, G.**; Kamus, L.; Bîcu, E.; Shova, S.; Sendid, B.; Dubar, F.; Ghinet, A., *Molecules* **2021**, 26, 5861.
176. **Negru (Apostol), G.**; Ghinet, A.; Bîcu, E., *Pharmaceuticals* **2023**, 16, 691.