

UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI

FACULTATEA DE CHIMIE

ȘCOALA DOCTORALĂ DE CHIMIE

**Sinteze de noi derivați de tip calconă, indolizină și piridină
cu proprietăți biologice**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat,

Prof. univ. dr. Elena BÎCU

Student doctorand,

Chimist Andreea ZUBAȘ

2023

Mulțumiri

Cu emoție, considerație și recunoștință, scriu aceste rânduri la finalul anilor de doctorat, dar și cu speranța noilor experiențe și provocări care mă așteaptă. Îmi îndrept gândurile către toți cei care mi-au fost alături și m-au sprijinit în realizarea tezei de doctorat, cărora le mulțumesc din suflet.

*În mod deosebit, doresc să îi mulțumesc doamnei **Prof. univ. dr. Elena Bîcu**, care mi-a fost mai mult decât conducător de doctorat. Am început călătoria împreună, încă din perioada licenței și vă sunt recunoscătoare pentru tot parcursul. Cu dumneavoastră am învățat care sunt primii pași pentru a face cercetare, să nu mă dau bătută atunci când rezultatele nu sunt ceea ce așteptăm, să fiu mai înțeleaptă și să am răbdare. Vă mulțumesc pentru toată implicarea dumneavoastră, pentru încrederea pe care ați avut-o și o aveți în mine, pentru răbdarea, sfaturile neîncetate și suportul oferit atât în timpul doctoratului, cât și pentru realizarea licenței și a disertației. Vă mulțumesc!*

*Aș dori să îi mulțumesc doamnei **Dr. habil. Alina Ghineț**, care a avut o contribuție importantă în realizarea tezei de doctorat. Vă mulțumesc pentru încrederea dumneavoastră și pentru oportunitățile oferite încă din perioada anilor de master. Am avut șansa să lucrez într-un laborator modern, să îmi depășesc în fiecare zi limitele și să învăț lucruri extraordinare. Vă mulțumesc pentru timpul oferit, încurajările, sfaturile și implicarea dumneavoastră!*

*Pe această cale, doresc să mulțumesc membrilor comisiei de îndrumare **Conf. dr. Dalila Belei, Prof. univ. dr. Mihail-Lucian Bîrsă, Conf. dr. Neculai-Cătălin Lungu**, care au avut răbdare în toata perioada doctoratului. Vă mulțumesc pentru tot suportul oferit, sfaturile, sugestiile, încurajările și timpul dumneavoastră!*

*Je tiens à exprimer ma gratitude envers le **Prof. dr. Benoit Rigo** et l'ensemble de l'équipe du „Laboratory of Sustainable Chemistry and Health” pour leur accueil chaleureux, leur assistance et leurs conseils précieux!*

*Îi mulțumesc colegei mele **Georgiana Negru**, care mi-a devenit prietenă și mi-a fost alături la fiecare pas. Am trăit experiențe extraordinare împreună, care ne vor uni toata viața. Cu tine am învățat ce înseamnă să faci încercări, să nu iasă lucrurile așa cum plănuiai, să o iei de la capăt în următoarea zi cu speranță în rezultat și să am încredere că lucrurile se vor așeza în direcția potrivită. Îți mulțumesc pentru prietenia ta!*

Nu în ultimul rând, doresc să mulțumesc părinților, sorei, viitorului soț și întregii familii, care mi-au fost alături și m-au susținut constant. Vă mulțumesc deoarece m-ați învățat să am încredere în mine, în oameni și în valorile umane. M-ați învățat să ascult părerile celor din jur, dar să am o gândire critică, pentru a-mi forma propria opinie. Vă mulțumesc pentru încurajările și dragostea voastră!

Andreea

Teza de doctorat cu titlul „Sinteze de noi derivați de tip calconă, indolizină și piridină cu proprietăți biologice” cuprinde 201 pagini, anexe (articole științifice publicate) și prezintă următoarea structură:

Cuprins

Introducere	5
I. Studiu de literatură	9
I. 1. Farneziltransferaza.....	9
I. 2. Inhibitori clasici ai farneziltransferazei și ai polimerizării tubulinei.....	11
I. 3. Medicamente antiinflamatoare	14
I. 4. Calcone - generalități.....	15
I. 4. 1. Metode de sinteză ale calconelor	17
I. 4. 2. Modificarea conectorului 2-propenonă din calconă prin ciclizare.....	21
I. 5. Proprietăți biologice ale calconelor și derivaților heterociclici descriși în literatură	22
I. 5. 1. Acțiuni antiinflamatoare	22
I. 5. 2. Acțiuni anti-Leishmania și antimalarică.....	26
I. 5. 3. Acțiuni antioxidantă	27
I. 5. 4. Acțiuni anti-HIV	28
I. 5. 5. Acțiuni antimicrobiană	29
I. 5. 6. Acțiuni anticancer.....	34
II. Contribuții personale	44
Obiectivele tezei	44
II. 1. Strategii de sinteză ale derivaților de calcone ce conțin heterocicluri cu azot (piridina și fenotiazina) – SERIA A	46
II. 1. 1. Studiul comparativ al reacției de condensare Claisen-Schmidt în sinteza derivaților de calconă, sinteza clasică <i>versus</i> sinteza asistată de ultrasunete.....	46
II. 1. 2. Concluzii.....	54
II. 2. Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor analogi de tip fenotiazin-10-il-calcone – SERIA B	56
II. 2. 1. Designul analogilor de tip fenotiazin-10-il-calcone	56
II. 2. 2. Strategii de sinteză ale analogilor de tip fenotiazin-10-il-calcone	58
II. 2. 3. Evaluare biologică	66
II. 2. 4. Concluzii.....	70
II. 3. Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor derivați indoliziniici – SERIA C ..	72
II. 3. 1. Designul derivaților de tip indolizinic	72
II. 3. 2. Strategii de sinteză ale derivaților indoliziniici	73

II. 3. 3.	Evaluare biologică.....	87
II. 3. 4.	Concluzii	90
II. 4.	Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor hibrizi de tip indolizin-1-il-calcone - SERIA D.....	92
II. 4. 1.	Designul compușilor de tip indolizin-1-il-calcone.....	92
II. 4. 2.	Strategii de sinteză ale hibrizilor de tip indolizin-1-il-calconă – seria D1	94
II. 4. 3.	Strategii de sinteză ale bis-calconelor – seria D2.....	98
II. 4. 4.	Reacții ale hibrizilor de tip indolizin-1-il-calconă – compuși ciclizați	100
II. 4. 5.	Evaluare biologică.....	103
II. 4. 6.	Concluzii	106
II. 5.	Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor hibrizi indolizină-piridină – SERIA E.....	108
II. 5. 1.	Designul compușilor hibrizi indolizină-piridină	108
II. 5. 2.	Strategii de sinteză ale compușilor hibrizi indolizină-piridină.....	110
II. 5. 3.	Evaluarea biologică	113
II. 5. 4.	Concluzii	116
II. 6.	Concluzii generale și perspective	118
III.	Parte experimentală.....	125
III. 1.	Materiale și instrumente	125
III. 2.	Procedee de sinteză ale derivaților de calcone ce conțin heterocicluri cu azot (piridina și fenotiazina) – SERIA A	126
III. 3.	Procedee de sinteză ale analogilor de tip fenotiazin-10-il-calcone – SERIA B.....	129
III. 4.	Procedee generale de sinteză ale derivaților indoliziniici – SERIA C	143
III. 5.	Procedura generală pentru sinteza hibrizilor indolizin-1-il-calcone (48a-s) și a hibrizilor de tip indolizin-1,3-diil-bis-calcone (49a-c) - SERIA D	170
III. 6.	Procedura generală pentru sinteza hibrizilor indolizină-piridină (51a-g) –SERIA E ..	185
Bibliografie	191
Anexe.	202

Rezumatul conține prezentarea pe scurt a rezultatelor cercetărilor întreprinse în cadrul acestei teze de doctorat, concluziile finale și bibliografia selectivă, fiind menținută numerotarea capitolelor, subcapitolelor, figurilor, schemelor de reacție, tabelor și structurilor chimice.

Introducere

Bolile fac parte din istoria civilizației umane, depunându-se constant eforturi pentru combaterea acestora, în speranța supraviețuirii și a îmbunătățirii calității vieții. De-a lungul timpului, acestea au evoluat și au influențat existența umană, cele mai cunoscute fiind bolile care au condus la decesul unui număr mare de persoane, spre exemplu prin infecție: variola, gripa, ciurma, tuberculoza.¹ În secolul nostru, la fel de cunoscut a devenit și cancerul.

Cancerul este o boală genetică ce se caracterizează prin înmulțirea necontrolată a celulelor și răspândirea acestora în țesuturile învecinate. O formă de cancer se poate dezvolta din orice parte a corpului uman. În condiții obișnuite, celulele normale cresc și se divid pentru formarea unor noi celule necesare organismului, care vor suferi procesul de apoptoză atunci când îmbătrânesc sau nu își mai pot îndeplini funcțiile specifice. Spre deosebire de celulele normale, celulele anormale nu îndeplinesc funcții specifice și sunt capabile să ignore semnalele organismului precum oprirea diviziunii sau începerea apoptozei celulare, formându-se și multiplicându-se necontrolat.³ Aceste celule, pot forma tumori canceroase (maligne) sau necanceroase (benigne).

Tumorile maligne se răspândesc în țesuturile învecinate și de asemenea, pot migra spre alte zone îndepărtate ale corpului, formând noi tumori, proces numit metastază (**Figura 2**).⁵ În majoritatea tipurilor de cancer, tumorile au un aspect solid și uneori pot fi îndepărtate, însă în cazul leucemiilor acest lucru nu este posibil. Tumorile benigne nu se răspândesc și atunci când sunt îndepărtate, în general, nu reapar.

Cancerul se dezvoltă ca urmare a mutațiilor genetice. În general, nu se poate determina cu exactitate de ce apare cancerul la o anumită persoană, însă pe baza studiilor efectuate au fost stabiliți anumiți factori de risc care pot crește rata îmbolnăvirii.⁶

Există mai multe tipuri de tratamente care se aplică în cazul cancerului, însă comportamentul și răspunsul organismului la o terapie este diferit în funcție de organism și forma bolii. În unele cazuri poate fi utilizat un singur tratament (precum chirurgia), însă preponderent tratamentele sunt combinate (spre exemplu: operația cu chimioterapia, radioterapia, hipertermia). Hipertermia, cunoscută și sub denumirea de termoterapie, presupune încălzirea celulelor la temperatura de 45 °C cu scopul de a distruge celulele canceroase, fără a fi afectate cele normale.^{7,8} Chimioterapia este tratamentul în care sunt utilizate medicamente citostatice și citotoxice.

Există peste 100 de forme de cancer, în general denumirea fiind atribuită după organul sau țesutul afectat sau tipul celulei de la care pornește cancerul: de colon, pulmonar, ovarian, de prostată, la sân, leucemie, carcinom, sarcom.³ În anul 2018, IARC estima faptul că la nivel global vor apărea 18,1 milioane de noi cazuri de cancer și 9,6 milioane de decese vor fi provocate de

cancer⁹, cele mai răspândite forme fiind: cancerul de prostată, cancerul pulmonar, de colon, la stomac și la sân.¹⁰ În anul 2020, au fost estimate 19,3 milioane de noi cazuri de cancer și 10 milioane de decese cauzate de cancer. Aproximativ un sfert din noile cazuri de cancer (4,4 milioane) și 1/5 (1,9 milioane) din decese au fost estimate în Europa, deși reprezintă doar 9% din populația globală.¹¹

Ca urmare, la nivel global se urmărește mobilizarea comunității științifice de cercetare a cancerului spre dezvoltarea de noi căi pentru identificarea și înțelegerea țintelor anticancer (proteine, enzime sau procese implicate în transducție și multiplicare) și implicit dezvoltarea unor noi agenți inhibitori ai acestora.

Datorită biodisponibilității foarte bune a calconelor (compusul **1**, **Figura 3**) și a toleranței ridicate a organismului, cercetările în domeniul acestora și al compușilor derivați au dobândit un interes deosebit în designul unor noi agenți anticancer. În prezent, un număr important de compuși care conțin unități calconice se află în studii clinice.¹²

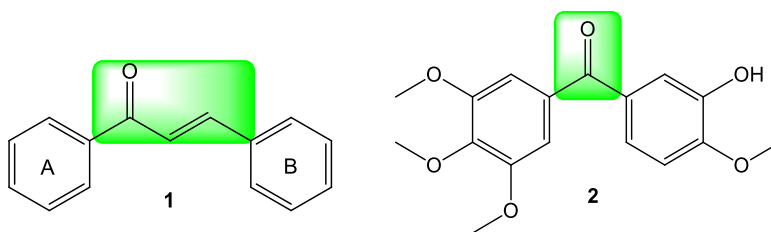


Figura 3. Structurile calconei **1** și a fenstatinei **2**.

Prezenta lucrare este compusă din două părți principale (parte de literatură și cercetări personale), structurate în trei capitole: studiu de literatură, contribuții personale și partea experimentală. Contribuțiile personale se bazează pe designul, sinteza și evaluarea biologică a unor noi compuși de tip calcone (analogi ai fenstatinei, compusul **2** din **Figura 3**) și compuși azaheterociclici cu cinci sau șase atomi, respectiv îmbunătățirea unor metode de sinteză, pentru eficientizarea procesului din punct de vedere al timpului, randamentului, toxicității, respectiv al implicațiilor asupra mediului înconjurător (chimia verde), care reprezintă pentru noi o direcție atractivă de cercetare. În ceea ce privește proprietățile biologice au fost urmărite activitățile: anticancer și antimicrobiene. În proiectarea compușilor anticancer cele două ținte urmărite au fost farneziltransferaza și tubulina.

II. Contribuții personale

Obiectivele tezei

Cercetările realizate pe parcursul anilor de doctorat au avut ca obiectiv central obținerea unor noi compuși cu proprietăți biologice, în principal acțiune anticancer și antimicrobiană.

Cercetările au la bază studiul literaturii rezumat în prima parte a tezei de doctorat și au presupus parcurgerea următoarelor etape:

- designul compușilor de interes (derivați de tip calconă, indolizină și piridină), ținând cont de relațiile structură-activitate cunoscute până în prezent,
- sinteza compușilor, având în vedere eficientizarea procesului din punct de vedere al timpului, randamentului, economiei de atomi, toxicității, respectiv al implicațiilor asupra mediului înconjurător (respectarea unor principii ale chimiei verzi), și
- evaluarea biologică.

În proiectarea compușilor țintă au fost variate cele trei elemente structurale ale calconei, considerată un analog al fenstatinei.

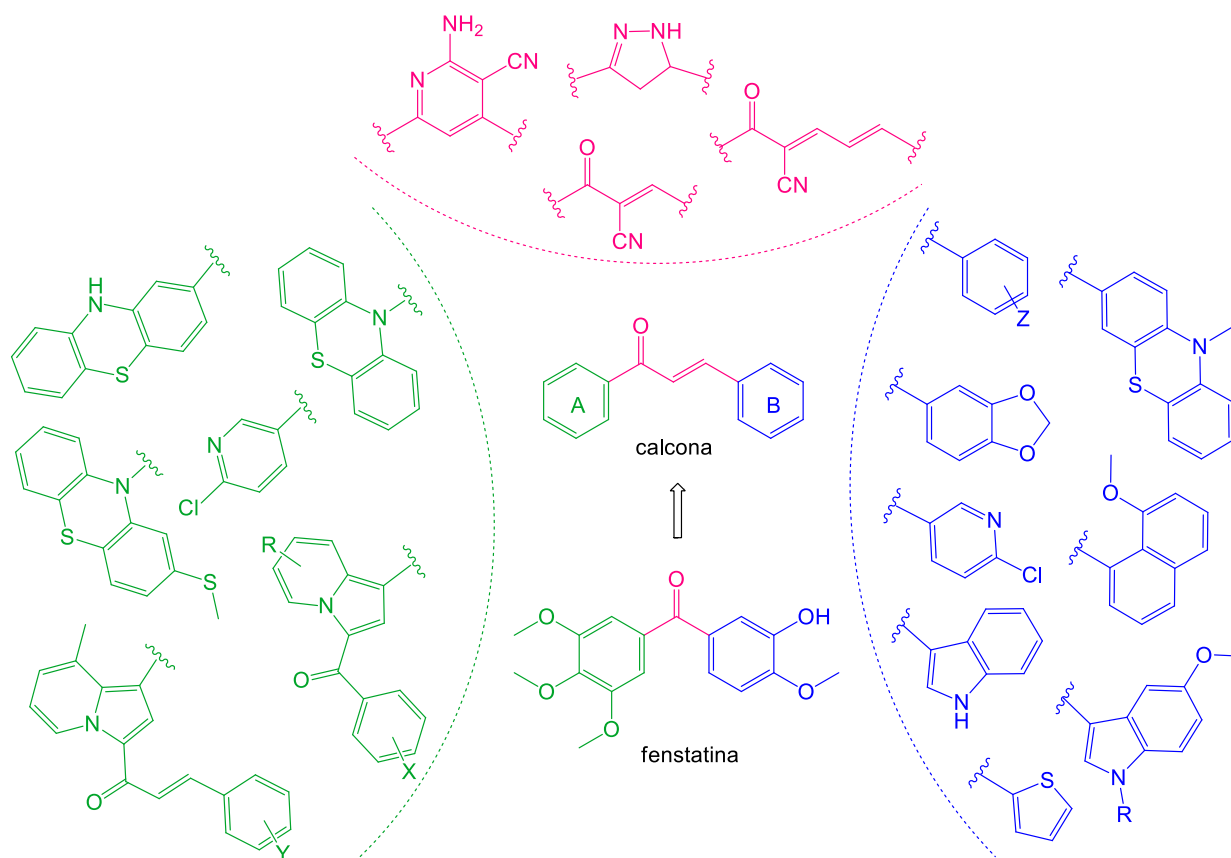


Figura 1. Principalele modulări propuse în designul compușilor de interes.

Modulările de la structura fenstatinei presupun:

- ✚ înlocuirea **inelului aromatic A** cu heterocicluri cu azot precum: fenotiazina, 2-metiltiofenotiazina, 6-cloropiridina, indolizina diferit substituită;
- ✚ înlocuirea **inelului aromatic B** cu nuclee fenil diferit substituie (cu grupări: metil, metoxi, ciano, dimetilamino, halogeno), cu 2-metoxinaftalen, cu heterocicluri cu azot (indol, piridină, fenotiazină), cu oxigen (1,3-benzodioxol) sau sulf (tiofen);
- ✚ înlocuirea **conectorului ceton** cu puntea de trei atomi de carbon de tip 2-propenonă; în ceea ce privește modulările asupra conectorului din **calconă** s-a urmărit introducerea grupării ciano în poziția α față de gruparea carbonil $>C=O$ din catena nesaturată de trei atomi de carbon, înlocuirea grupării cetonice cu gruparea amidică și modificarea conectorului într-un heterociclu cu azot: piridină, 4,5-dihidro-1*H*-pirazol.

Evaluarea potențialului biologic al noilor compuși sintetizați, și anume:

- ✓ acțiune anticancer asupra panoului de linii celulare canceroase (~ 60 linii) în colaborare cu NCI, SUA și asupra FTazei în colaborare cu Junia, Lille, Franța și Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR2301 CNRS, Centre de Recherche de Gif, Gif-sur-Yvette Cedex, Franța;
- ✓ acțiune antifungică în colaborare cu Junia, Lille și Facultatea de Medicină, Universitatea din Lille – Pôle Recherche (CNRS-UMR 8576, Inserm U1285, Glycobiologie structurale et fonctionnelle).

II. 1. Strategii de sinteză ale derivaților de calconă ce conțin heterocicluri cu azot (piridina și fenotiazina) – SERIA A

În cadrul acestui studiu ne-am propus aplicarea a două proceduri de sinteză diferite a derivaților de calconă prin reacția de condensare Claisen-Schmidt, cu scopul identificării metodei mai eficiente pentru obținerea seriilor compușilor de interes.

Unul dintre obiectivele acestei teze de doctorat a fost înlocuirea nucleului A din structura calconei (**Figura 2**) cu diverse heterocicluri cu azot. Pentru realizarea studiului comparativ s-au aplicat procedura convențională și condensarea asistată de ultrasunete pentru trei reacții de sinteză a unor derivați de calconă ce au în structură nucleele piridină sau fenotiazină. A fost aleasă piridina, deoarece în literatură au fost raportați¹⁴⁹ derivați de tip piridinil-calconă obținuți prin metoda mediată de ultrasunete, o parte dintre compuși (compușii **C**, **D**, **Figura 2**) prezentând acțiune anticancer prin inhibarea FTazei și a creșterii unor liniile celulare canceroase umane.

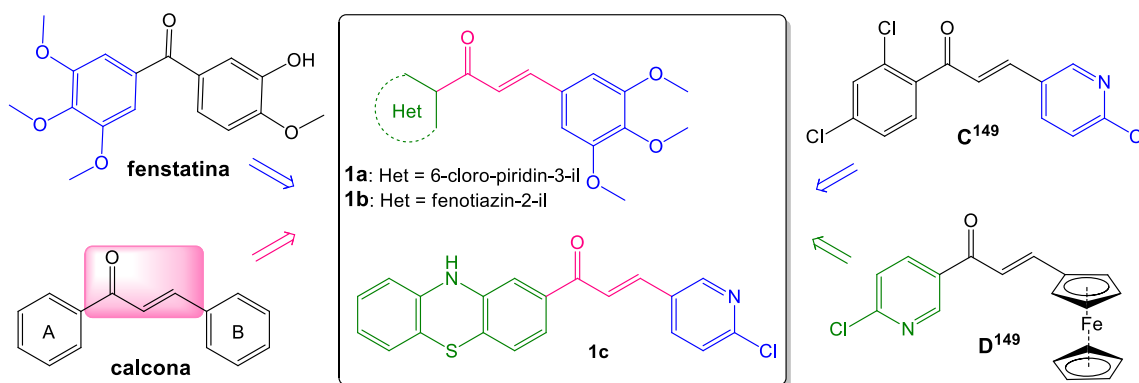
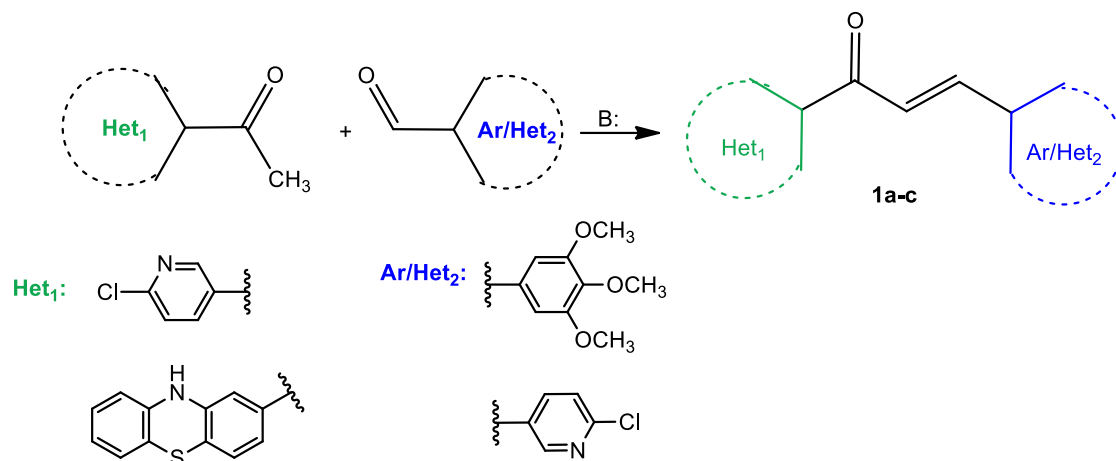


Figura 2. Structurile derivaților de calconă sintetizați (**1a-c**) și ale compușilor de referință.

Obținerea unor familii de compuși cu activitate biologică a reprezentat obiectivul nostru principal, astfel în sintezele realizate a fost utilizat trimetoxifenilul făcând analogie cu fenstatina (**Figura 2**) și 6-cloropiridin-3-il prin analogie cu structura compusului **C** (**Figura 2**).

În stabilirea metodei mai eficiente pentru sintezele noastre am avut în vedere o serie de factori: timpul, randamentul, prelucrarea reacției, existența reacțiilor secundare, solventul, catalizatorul, toxicitatea, care vine totodată în sprijinul unei strategii de „chimie verde”, ținând cont de inițiativele mondiale de reducere a poluării mediului înconjurător.

Cele trei reacții de sinteză a derivaților de calconă au presupus condensarea unei aldehide aromatice (trimetoxibenzaldehida) sau heteroaromatice (6-cloropiridin-3-carbaldehida) cu o metilcetona heteroaromatică (3-acetil-6-cloropiridina, 2-acetilfenotiazina), în mediu bazic (**Schema 1**). Pentru exemplificare am realizat sinteza unui compus cunoscut în literatură **1b**¹⁵² și a două structuri noi **1a**, **1c** (**Figura 3**).



Schema 1. Sinteza generală a derivaților de calcone din metil-cetone și aldehide.

În cazul metodei clasice (*metoda A*), compușii de interes **1a-c** au fost sintetizați conform procedurii din literatură.¹⁵² Condițiile de reacție și randamentele de obținere a celor trei derivați de calcone sunt prezentate în **Tabelul 1**.

Tabel 1. Condițiile reacției de condensare Claisen-Schmidt în sinteza clasică a derivaților de calcone **1a-c**.

Nr.	Cod compus	Solvent	Cantitate reactanți (equiv)	Catalizator	Timp (h)	t (°C)	η (%)
1	1a	EtOH	1/1	LiOH	1	78	23
2	1b	MeOH	1/1	KOH	5	65	35
3	1c	MeOH	1/1	KOH	4	65	amestec (1c + 2c)

aq – soluție apoasă t = temperatura; η = randament.

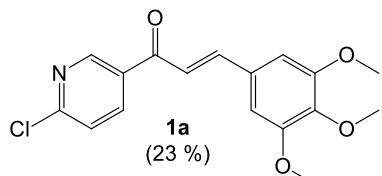
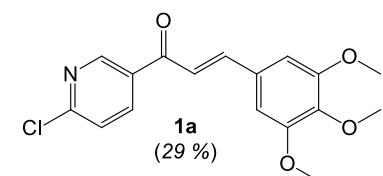
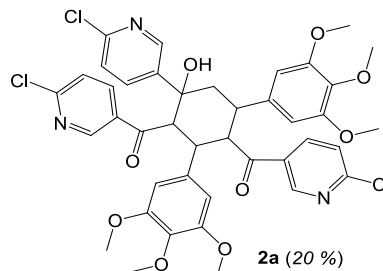
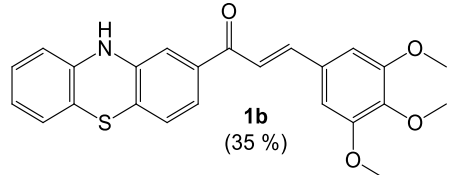
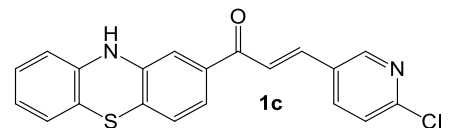
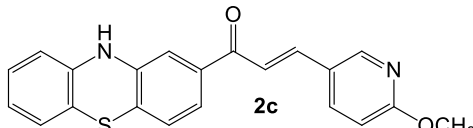
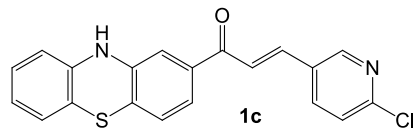
Reacția de condensare a fost realizată utilizând un reactor cu ultrasunete QSONICA. În funcție de aldehida sau metil-cetona utilizată și solubilitatea acestora, timpul de reacție, temperatura și energia au variat, în timp ce amplitudinea a fost constantă 30%. Experimentele asistate de ultrasunete au fost realizate în Laboratoire Chimie durable et Santé, Lille, Franța.

Tabel 2. Condițiile reacției de condensare Claisen-Schmidt în sinteza asistată de US a derivaților de calcone **1a-c**.

Compus	Solvent (mL)	Cantitate reactanți (equiv)	Cat.	Amp	Timp (s)	t _i – t _f (°C)	Energie (J)	η (%)	η _{sec} (%)
1a	50	1/1	LiOH	0.3	30	19-26	102	29	20
1b	50	1/1	LiOH	0.3	60	17-34	201	amestec	0
1c	50	1/1	LiOH	0.3	60	17-33	187	55	0

Cat. = catalizator; t_i = temperatura medie inițială; t_f = temperatura medie finală; η = randament produs principal; η_{sec} = randament produs secundar;

Tabel 3. Produși obținuți prin cele două proceduri de condensare Claisen-Schmidt.

<i>Metoda A</i>		<i>Metoda B</i>	
Produs principal	Produs secundar	Produs principal	Produs secundar
 <p>1a (23 %)</p>	-	 <p>1a (29 %)</p>	 <p>2a (20 %)</p>
 <p>1b (35 %)</p>	-	Amestec inseparabil	-
 <p>1c</p> <p>Obținut în amestec cu compusul 2c</p>	 <p>2c</p> <p>Identificat spectral</p>	 <p>1c (55 %)</p>	-

II. 2. Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor analogi de tip fenotiazin-10-il-calcone – SERIA B

II. 2. 1. Designul analogilor de tip fenotiazin-10-il-calcone

Unul dintre heterocicurile cu potențial farmacologic cunoscut este fenotiazina. Analizând rezultatele biologice promițătoare ale derivaților *N*-benzoilfenotiazinici, raportate în literatură^{58, 155, 156}, am decis să introducem acest heterociclu în dezvoltarea unei noi serii de analogi ai calconei de tip fenotiazin-10-il-calcone, cu scopul îmbunătățirii proprietăților biologice și obținerii unor inhibitori anticancer duali, ai polimerizării tubulinei și FTazei.

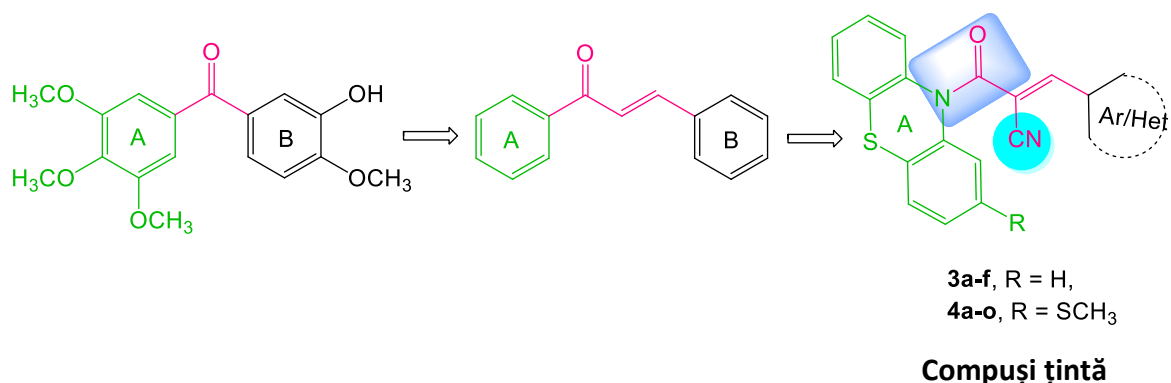


Figura 9. Structurile compușilor de interes (**3a-f**, **4a-o**) și ale compușilor de referință

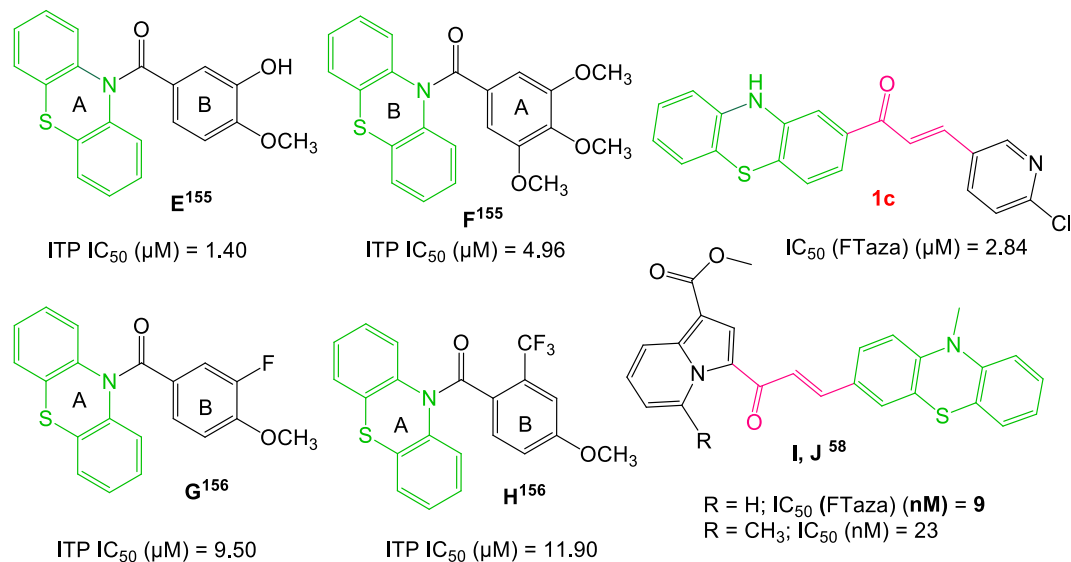


Figura 10. Analogi ai fenstatinei cu nucleu fenotiazinic studiați ca agenți anticancer.

Pentru a analiza și influența conectorului clasic carbonil asupra activității antitumorale am urmărit modularea acestuia. Derivatul de calconă **1c** (**Figura 10**) în structura căruia s-a introdus fenotiazina drept nucleu A a prezentat potențial anticancer prin inhibarea FTazei la o concentrație IC₅₀ = 2,84 μM. Plecând de la aceste rezultate încurajatoare, în noua serie de compuși am înlocuit

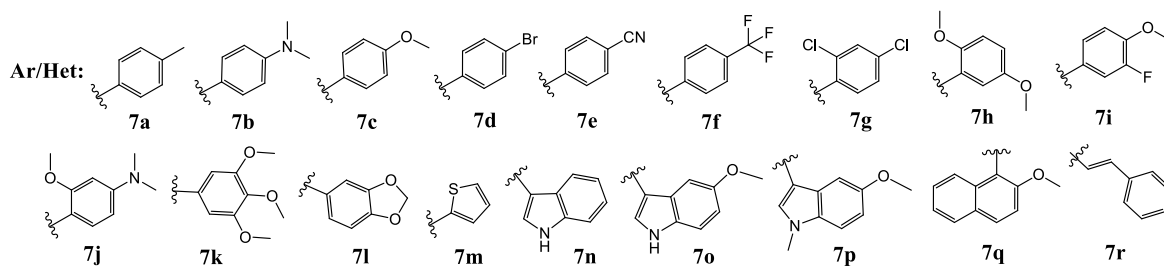
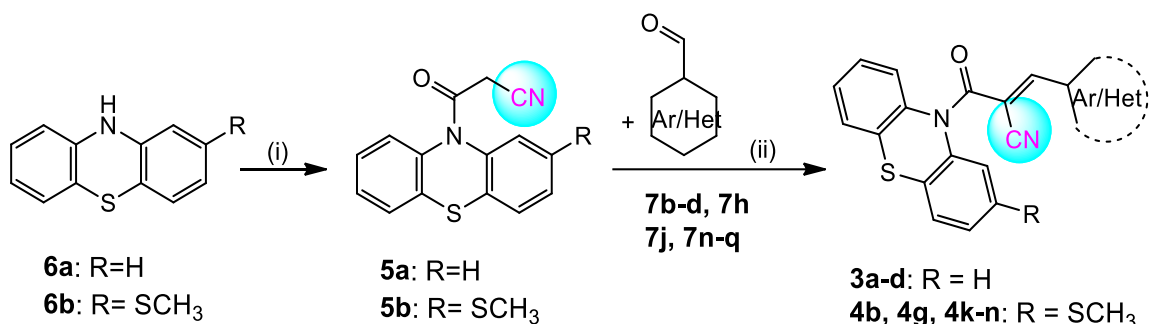
gruparea carbonică cu prop-2-en-1-ona și am introdus substituentul nitril în poziția α față de gruparea carbonil din catena nesaturată de trei atomi de carbon.

Pentru a avea o viziune amplă asupra relațiilor structură-activitate, am utilizat drept ciclu A nucleul fenotiazinic nesubstituit și substituit cu gruparea tiometil.

II. 2. 2. Strategii de sinteză ale analogilor de tip fenotiazin-10-il-calcone

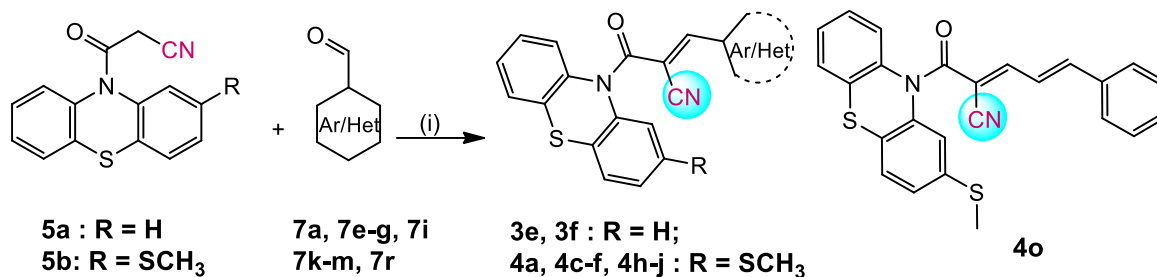
Metoda generală de sinteză a celor 21 noi analogi de tip fenotiazin-10-il-calcone **3a-f** și **4a-o** (**Figura 13**) este condensarea Claisen-Schmidt a unei aldehide aromatice sau heteroaromatice cu o componentă metilenică, în a cărei structură se regăsește gruparea amidică $>N-CO-CH_2$. Derivații amidici utilizați drept componente metilenice 10*H*-(2'-cianoacetil)-fenotiazina și 10*H*-(2'-cianoacetil)-2-metilfenotiazina au fost sintetizați printr-o reacție de acilare la atomul de azot cu anhidrida mixtă obținută din anhidrida acetică și acid cianoacetic conform procedurilor din literatură¹⁵⁷.

Pentru obținerea analogilor calconici **3a-d**, **4b**, **4g**, **4k-n** (**Schema 2**) a fost aplicată reacția de condensare clasică (*metoda A*). Prin această metodă au fost obținuți 10 noi compuși cu randamente peste 55% (**Schema 2**).



Schema 2. Reactivi și condiții: (i) 1.0 equiv **6a** sau **6b**, 2.0 equiv acid cianoacetic, 2.0 equiv anhidridă acetică, 50 → 100 °C, 1h; (ii) 1.0 equiv **5a** sau **5b**, 1.2 equiv aldehydă, piperidină (cat.), EtOH sau CH₃CN, reflux, 3-24 h.

Metoda B a fost aplicată, utilizând un reactor cu ultrasunete QSONICA cu amplitudinea constantă 30%. Prin această metodă s-au obținut 11 noi compuși cu randamente peste 50%.



Schema 3. Experimente mediate de US în sinteza analogilor de tip fenotiazin-10-il-calcone.

Reactivi și condiții: (i) 0.7 equiv LiOH, EtOH, 45-120 s.

Tabel 4. Condițiile reacției de condensare Claisen-Schmidt mediate de US în sinteza analogilor de tip fenotiazin-10-il-calcone **3d, 3f, 4a, 4c-f, 4h-j, 4o**.

Nr.	Comp.	EtOH (mL)	Cantitate		LiOH (equiv)	Timp (s)	t _i – t _f (°C)	Energie (J)	η (%)
			derivat amidic (mmol)	Cantitate aldehidă (mmol)					
1	3e	25	0.94	1.13	0.7	120	20-50	539	75
2	3f	30	1.87	2.26	0.7	120	19-52	575	74
3	4a	30	1.28	1.41	0.7	45	19-35	125	68
4	4c	30	1.28	1.60	0.7	60	18-41	169	78
5	4d	30	1.28	1.44	0.7	60	19-41	158	61
6	4e	30	1.28	1.53	0.7	60	19-45	160	74
7	4f	30	1.28	1.41	0.7	60	18-45	149	67
8	4h	25	1.08	1.08	0.7	90	20-59	282	67
9	4i	25	0.80	0.82	0.7	90	20-59	343	72
10	4j	30	1.28	1.43	0.7	60	19-44	169	77
11	4o	30	1.28	1.41	0.7	60	19-44	166	61

Comp. – compus; t_i = temperatura medie inițială; t_f = temperatura medie finală; η = randament.

Am avut în vedere cele două procedee de sinteză, deoarece am dorit să aplicăm o metoda mai eficientă din punct de vedere al timpului, randamentului, dar și o procedură de „chimie verde”, ținând cont de inițiativele mondiale de reducere a toxicității și poluării mediului înconjurător.

Pentru a avea o perspectivă extinsă asupra relațiilor structură-activitate și pentru a stabili influența substituentului tiometil asupra randamentului, am menținut constant ciclul B în următoarele 3 cazuri: 4-dimetilaminofenil, **3a** (85%) și **4b** (70%), 2,4-diclorofenil, **3e** (75%) și **4h** (67%), 3,4,5-trimetoxifenil, **3f** (74%) și **4i** (72%).

După purificare, produșii **3a-f** și **4a-o**, au fost caracterizați fizico-chimic și structural cu ajutorul spectrelor IR și ¹H, ¹³C, ¹⁹F RMN, precum și ale experimentelor bidimensionale HMQC și HMBC.

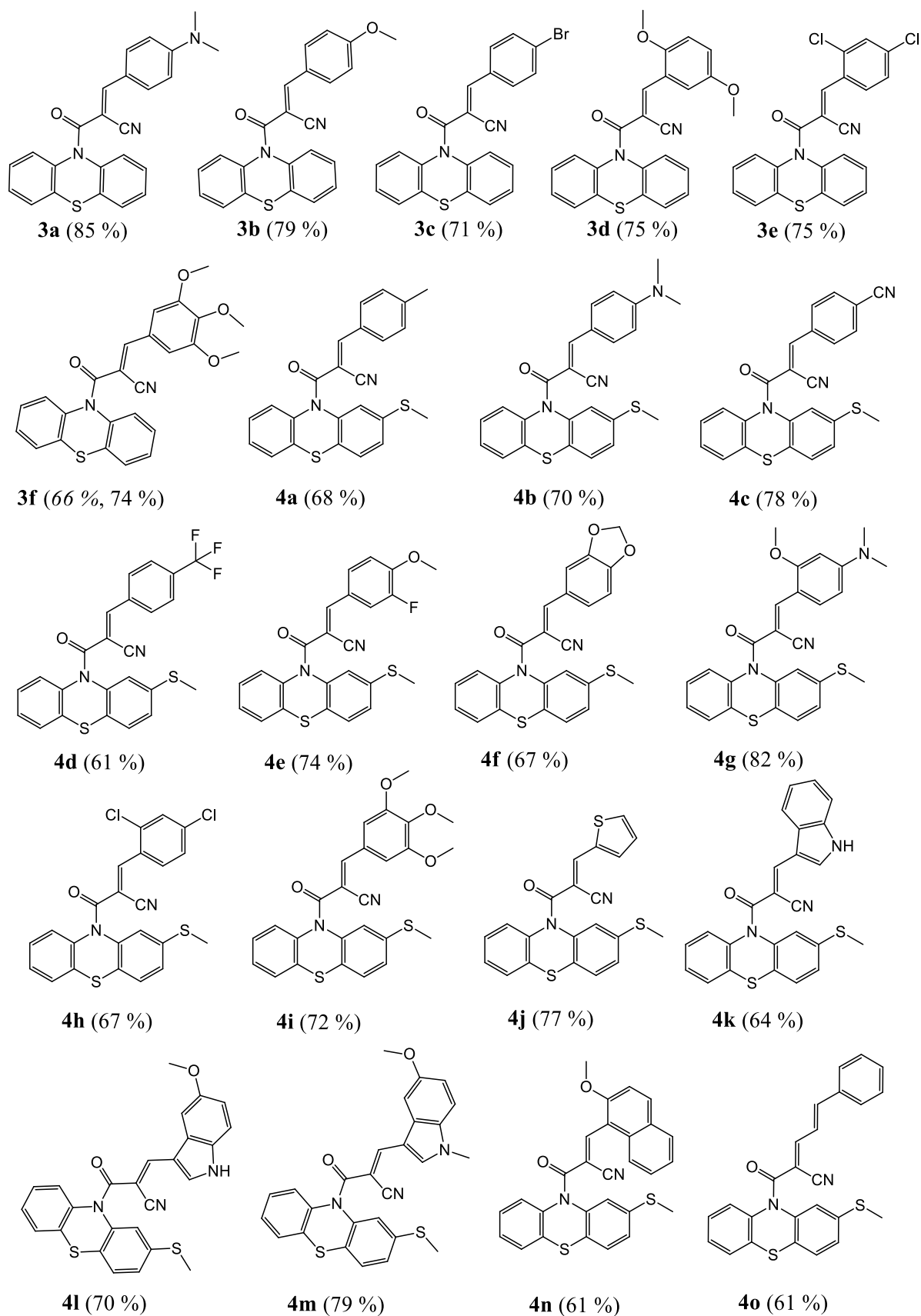


Figura 13. Anali de tip fenotiazin-10-il-calcone sintetizați și randamentele de obținere.

II. 2. 3. Evaluare biologică

Seria B reprezintă o parte a unui studiu amplu al grupului nostru de cercetare ce presupune obținerea unor compuși cu acțiune duală anticancer, cele două ținte vizate fiind FTaza și tubulina.

Tabel 5. Activitatea inhibitoare a FTazei umane și a polimerizării tubulinei *in vitro* pentru compușii sintetizați **3a-f**, **4h**, **4i**.

Nr.	Compus	% FTaza ^{a,b}	IC ₅₀ (μM) ^b	R ^{2c}	% TPI ^{d,b}	IC ₅₀ (μM) ^b	R ^{2c}
1	3a	65	n. d. ^e	-	n. d.	-	-
2	3b	0	n. d.	-	n. d.	-	-
3	3c	48	n. d.	-	n. d.	-	-
4	3d	76	7.268	0.9335	5	-	-
5	3e	n. d.	-	-	n. d.	-	-
6	3f	68	n. d.	-	n. d.	-	-
7	4h	72	30.510	0.9818	n. d.	-	-
8	4i	58	n. d.	-	n. d.	-	-
Fenstatina 3b		40	-	-	99	3.430	0.9378
Dezoxipodofilotoxină		-	-	-	100	1.760	0.9740
FTI-276		100	7	0.8369	-	-	-

^a Inhibarea FTazei umane la concentrația de 100 μM

^b Valorile IC₅₀ reprezintă media a doua experimente independente

^c Factor de regresie liniară

^d Inhibarea polimerizării tubulinei la concentrația de 100 μM

^e Nedeterminat

Prin înlocuirea ciclului A cu nucleul fenotiazinic sau 2-metiltiofenotiazinic s-a observat că activitatea inhibitoare a polimerizării tubulinei scade semnificativ (până la inactivare), iar cea a FTazei este redusă.

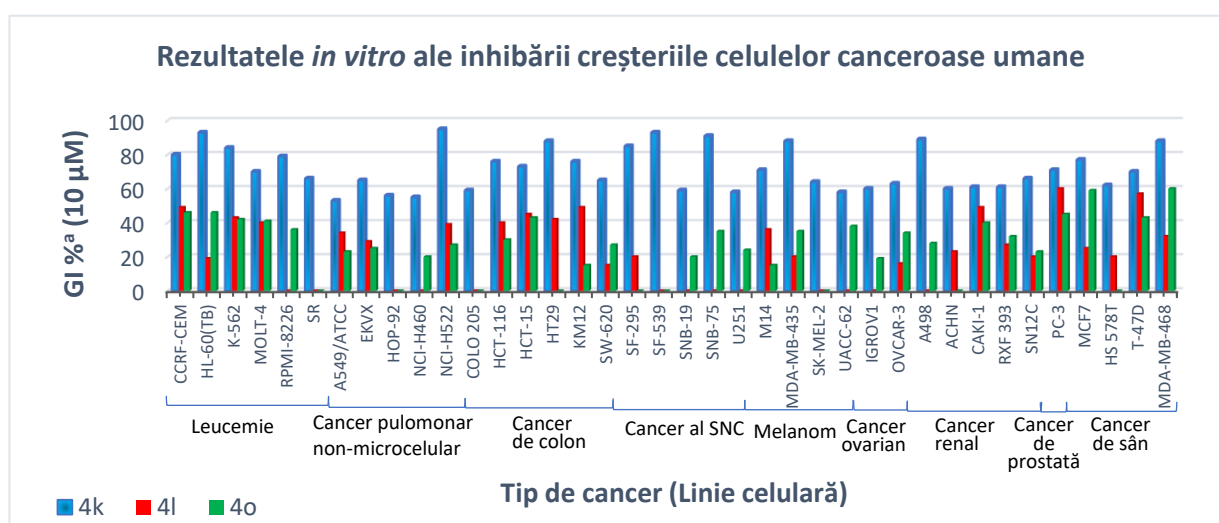


Figura 3. Rezultatele *in vitro* ale inhibării creșterii celulelor canceroase umane pentru compușii **4k**, **4l** și **4o**.

Cel mai eficient inhibitor al FTazei din această serie este compusul **3d**, care conține 2,5-dimetoxifenilul drept ciclu B și fenotiazin-10-ilul drept ciclu A, având o concentrație inhibitorie medie comparabilă cu a substanței standard FTI-276 (inhibitor FTază 276) ($IC_{50} = 7.268 \mu\text{M}$ față de $IC_{50} = 7 \mu\text{M}$). Atunci când în poziția *para* a fenilului sunt introduși substituenții metoxi (**3b**) sau bromo (**3c**) activitatea biologică este redusă semnificativ.

O parte (16 compuși) dintre noii analogi de tip fenotiazin-10-il-calcone sintetizați, **3e**, **4a-o**, au fost testați *in vitro* pentru capacitatea de inhibare a creșterii celulare pe 60 linii celulare canceroase umane, la concentrația de $10 \mu\text{M}$ de către NCI. Pentru evidențierea acțiunii antiproliferative am făcut o selecție a celor mai bune rezultate, acestea fiind prezentate în **Tabelul 6** și ilustrate în **Figura 19**.

II. 3. Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor derivați indoliziniici – SERIA C

II. 3. 1. Designul derivaților de tip indolizinic

Indolizina (pirolo[1,2- α]piridina) este un izomer structural al indolului. Deși pe piață sunt disponibile medicamente care conțin în structură indolul, din ceea ce cunoaștem, până în prezent nu este cunoscut un medicament cu nucleul indolizinic. Totodată în literatură, sunt raportate numeroase studii cu rezultate promițătoare, în care au fost evaluate proprietățile antitumorale ale derivaților indoliziniici.^{151, 156, 160-163}

Întrucât analogii de tip fenotiazin-10-il-calconă ai **seriei B** au demonstrat potențial anticancer, am dorit să vedem dacă prin utilizarea nucleului indolizinic și menținerea conectorului 2-propenonă al calconei, vom obține structuri mai active, atât anticancer, cât și cu alte acțiuni biologice. În acest context, a fost concepută seria derivaților indoliziniici, pe care i-am considerat atât analogi ai fenstatinei din perspectiva proprietăților biologice, cât și intermediari în sintezele pentru obținerea unor noi serii de compuși (hibridi indolizina-1-il-calconă cu trei centre A, B și C unite prin punțile carbonil, specifică fenstatinei, și 2-propenonă, specifică calconei - **seria D** - și alți derivați heterociclici hibridi indolizina-piridină - **seria E**).

Pentru a aprofunda relațiile structură-activitate am variat și ciclul A (3,4,5-trimetoxifenil) cu nucleu de tip fenil nesubstituit sau substituit și heterociclu de tip 2*H*-benzo[b][1,4]oxazin-3(4*H*)-onă sau fenotiazin-10-il.

O altă modulare importantă în conceperea acestei familii de compuși a reprezentat-o greșirea grupării acetyl în poziția 1 a nucleului indolizinic, atât din perspectiva relațiilor structură-activitate, cât și a formării unui centru de reacție pentru obținerea unor noi serii de compuși cu potențial biologic (**seria D și seria E**).

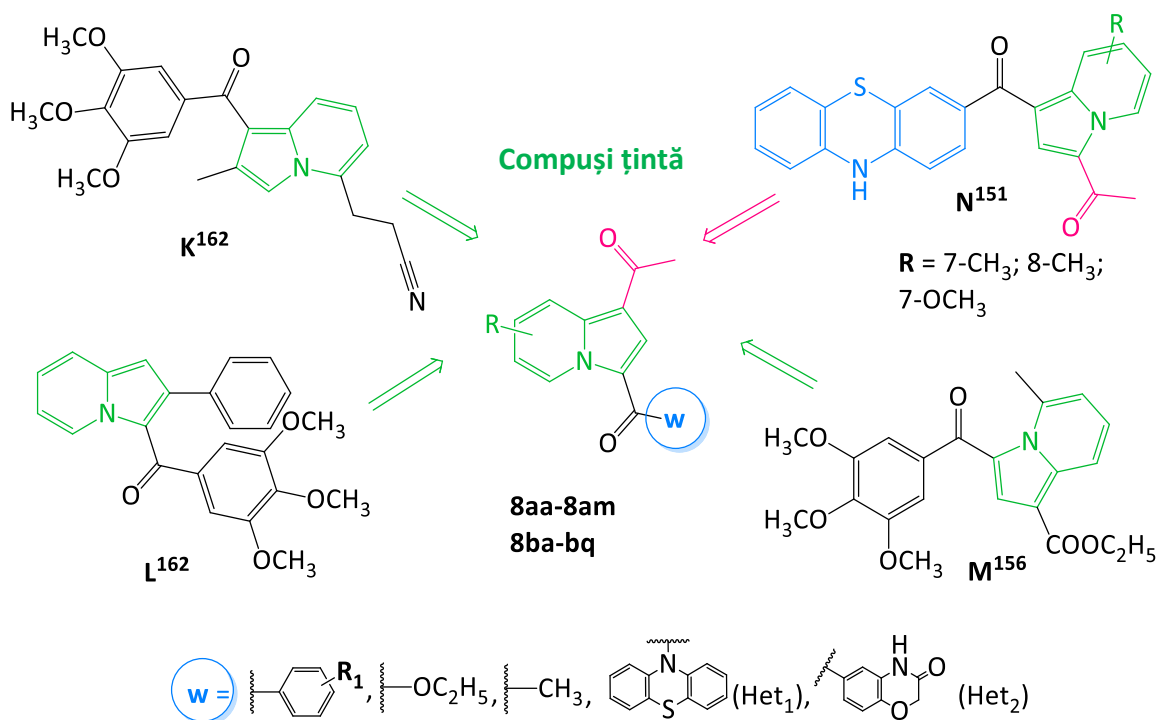
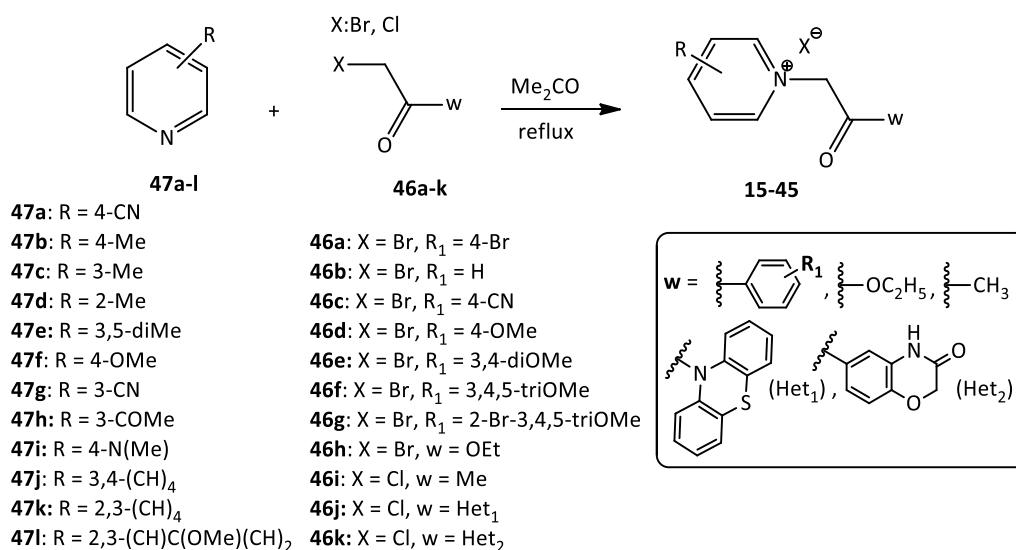


Figura 4. Structurile compușilor de referință descriși în literatură (**K-N**) și ale compușilor țintă (**8aa-am, 8ba-bq**).

II. 3. 2. Strategii de sinteză ale derivaților indolizici

Această serie de compuși a fost obținută printr-o sinteză în două etape, utilizată anterior în cadrul grupului nostru de cercetare. Prima etapă constă în sinteza sărurilor de piridiniu, chinoliniu și izochinoliniu, necesare generării *in situ* a piridiniu, chinoliniu sau izochinoliniu *N*-ilidelor corespunzătoare, prin reacția de *N*-alchilare a derivaților piridinici cu un derivat halogenat reactiv (de tip halogenuri de fenacil), obținând 31 de săruri (**Schema 4**).



Schema 4. Sinteza sărurilor de piridiniu, chinoliniu și izochinoliniu.

Sărurile de piridiniu, chinolinu și izochinolinu au fost obținute^{58, 156, 161, 165-170} cu randamente foarte bune, conform procedurii din literatură. Derivații halogenați au fost disponibili comercial, cu excepția 2-bromo-3',4',5'-trimetoxiacetofenonei pe care am sintetizat-o în laborator prin reacția de bromurare a 3,4,5-trimetoxiacetofenonei, conform procedurii din literatură.¹⁵⁶

Tabel 6. Substituenții sărurilor de piridiniu, chinolinu și izochinolinu **15-45**.

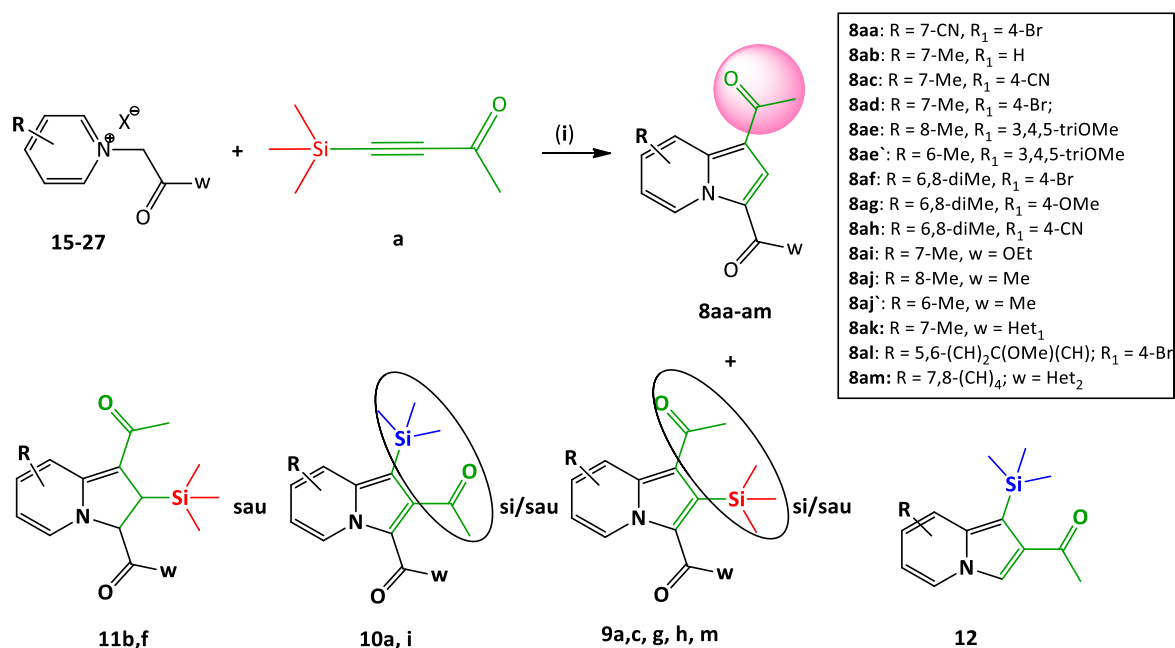
Sare	X	R	R ₁ sau w
15	Br	4-CN	4-Br
16	Br	4-Me	H
17	Br	4-Me	4-CN
18	Br	4-Me	4-Br
19	Br	3-Me	3,4,5-triOMe
20	Br	3,5-diMe	4-Br
21	Br	3,5-diMe	4-OMe
22	Br	3,5-diMe	4-CN
23	Br	4-Me	w = OEt
24	Cl	3-Me	w = Me
25	Cl	4-Me	w = Het ₁
26	Br	2,3-(CH)C(OMe)(CH) ₂	4-Br
27	Cl	4,5-(CH) ₄	w = Het ₂
28	Br	2-Me	H
29	Br	2-Me	4-Br
30	Br	4-Me	4-OCH ₃
31	Br	4-OMe	4-Br
32	Br	3-CN	4-Br
33	Br	2-Me	3,4,5-triOMe
34	Br	4-Me	3,4,5-triOMe
35	Br	3-COCH ₃	OMe
36	Br	4-N(Me) ₂	3,4-diOMe
37	Br	3,5-diMe	H
38	Br	3,5-diMe	3,4,5-triOMe
39	Cl	2-Me	w = Het ₁
40	Br	2,3-(CH) ₄	H
41	Br	3,4-(CH) ₄	H
42	Br	3,4-(CH) ₄	3,4,5-triOMe
43	Cl	2,3-(CH) ₄	w = Het ₁
44	Cl	3,4-(CH) ₄	w = Het ₁
45	Br	2-Me	2-Br-3,4,5-triOMe

Cea de-a doua etapă constă în sinteza derivaților de tip acetilindolizin-3-acil-substituiți de interes printr-o reacție de cicloadiție 1,3-dipolară dintre *N*-ilidele corespunzătoare și un dipolarofil

de tip alchină activată.¹⁶⁴ Am utilizat doi agenți dipolarofili de tip alchină activată: 4-(trimetilsilil)-3-butin-2-ona (**Schema 5**) și 3-butin-2-ona (**Schema 7**).

Dipolarofilul substituit cu trimetilsilil are o toxicitate mai scăzută și este mai avantajos din punct de vedere financiar, însă randamentele de obținere a produșilor de interes sunt mai mici, obținându-se diverși produși secundari neașteptați.

Pe această cale am obținut 22 de noi derivați indolizini (**8ac-8am, 9a,c,g,h,m, 10a,i, 11b,f, 12**), dintre care 10 compuși ce conțin gruparea trimetilsilil în structură (**9-12**) și 3 compuși cunoscuți în literatură (**8aa, 8ab, 8aj'**)¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ (**Figura 21**).



Schema 5. Sinteza derivaților acetilindolizini cu 4-trimetilsilil-3-butin-2-ona. Reactivi și condiții: (i) 1.3 equiv TEA, 1.3 equiv 4-(trimetilsilil)-3-butin-2-ona, DMF:DMSO (5:1 v:v), 80°C, 24 - 30 h.

Structurile celor doi compuși cu gruparea trimetilsilil, **9a** și **10a** (**Figura 21**), obținuți în reacția de cicloadiție 1,3-dipolară a bromurii de 4-ciano-fenacil piridiniu cu 4-trimetilsilil-3-butin-2-ona, au fost elucidate cu ajutorul difracției de raze X (**Figura 22**).

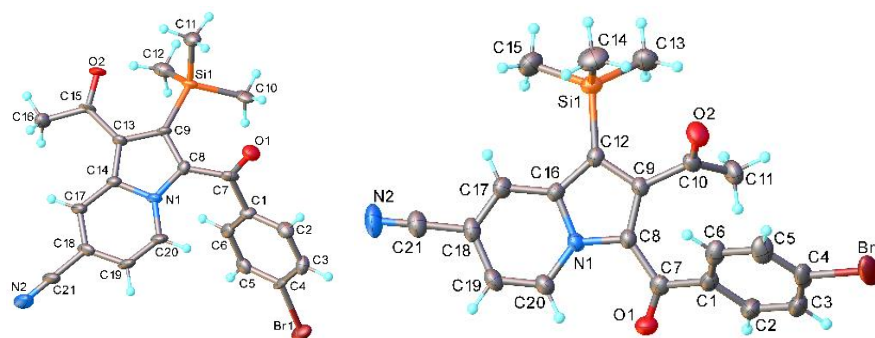


Figura 22. Structurile regioizomerilor **9a** și **10a** elucidate prin difracție de RX.

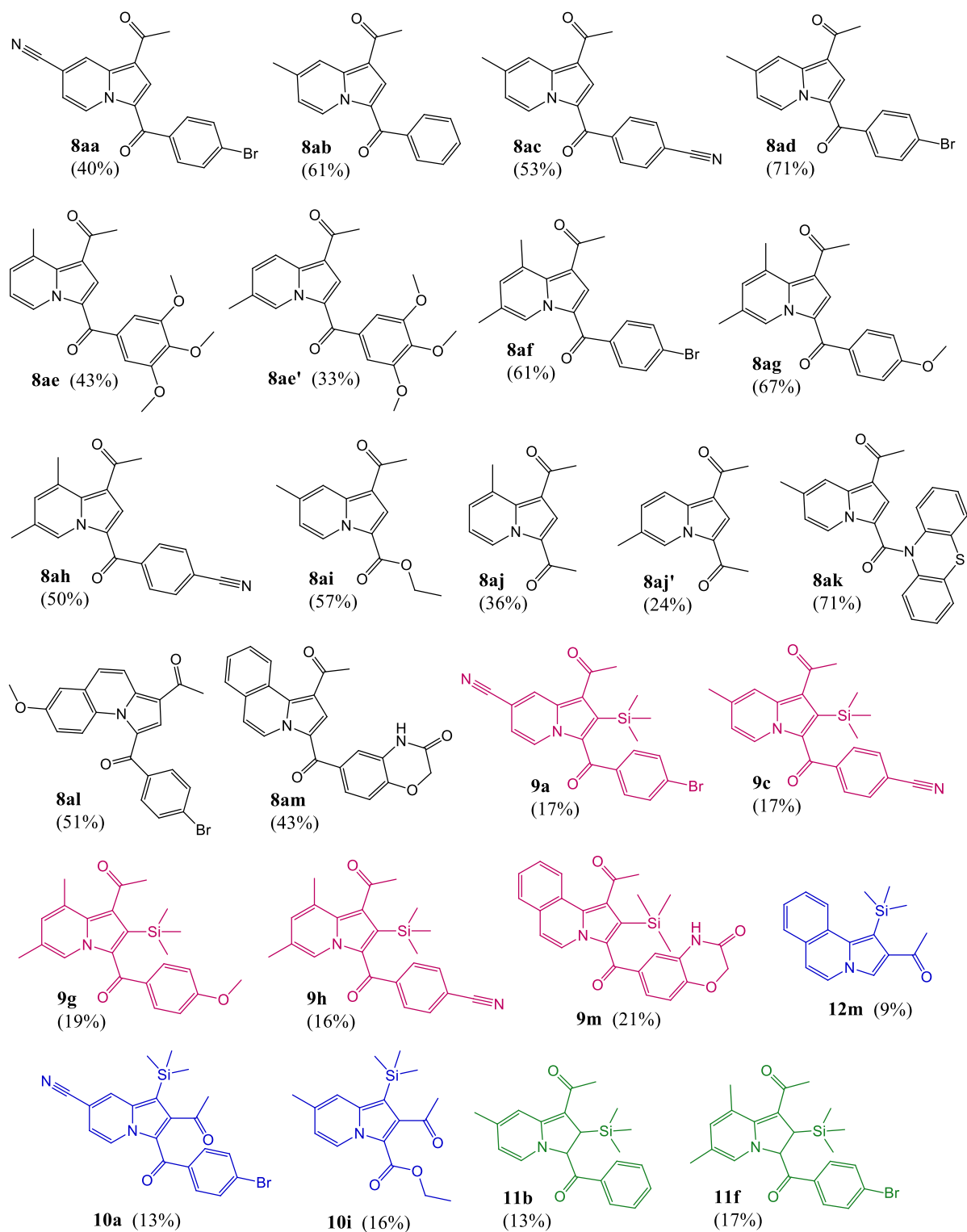


Figura 21. Compuși obținuți în reacția de cicloadiție cu 4-trimetilsilil-3-butin-2-ona.

Derivații de tip indolizinic cu siliciu sunt o noutate, dipolarofilul 4-trimetilsilil-3-butin-2-ona, din ceea ce cunoașteam noi, fiind utilizat pentru prima dată în reacții de cicloadiție [3+2] cu săruri de cicloimoniu.

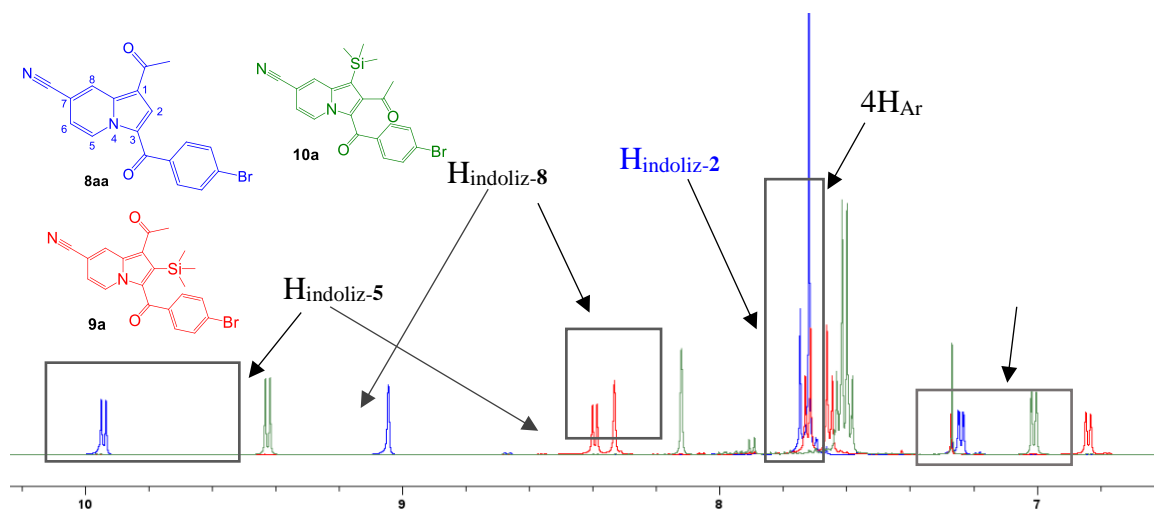
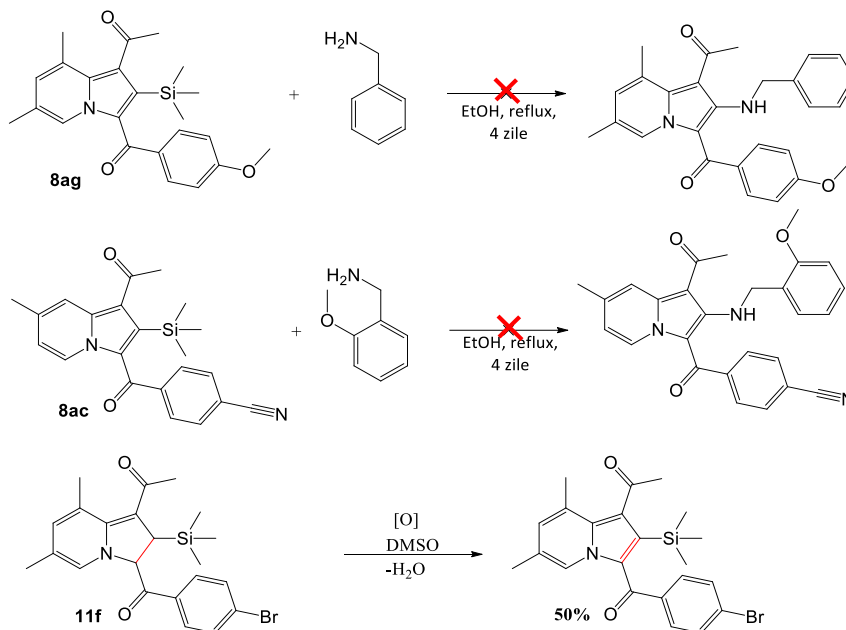


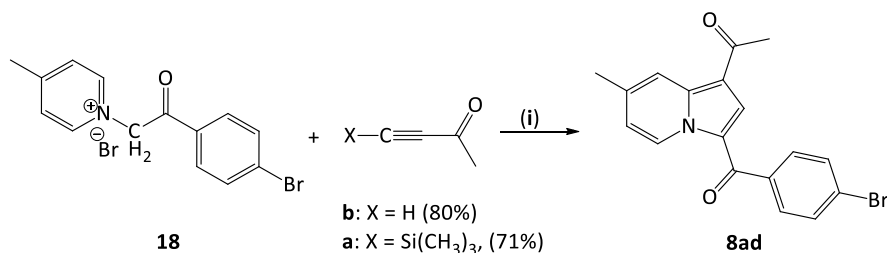
Figura 23. Suprapunerea spectrelor ^1H (zona aromatică) a compușilor **8aa**, **9a** și **10a**.

Pentru a evalua stabilitatea grupării trimetilsilil în structurile produșilor obținuți, am efectuat o serie de reacții (**Schema 6**).



Schema 6. Reacții ale derivaților trimetilsilil-indolizini.

Pentru a determina influența dipolarofilului asupra reacției de cicloadiție, am efectuat sinteza compusului **8ad** cu cei doi dipolarofili în aceleași condiții de reacție (**Schema 7**).

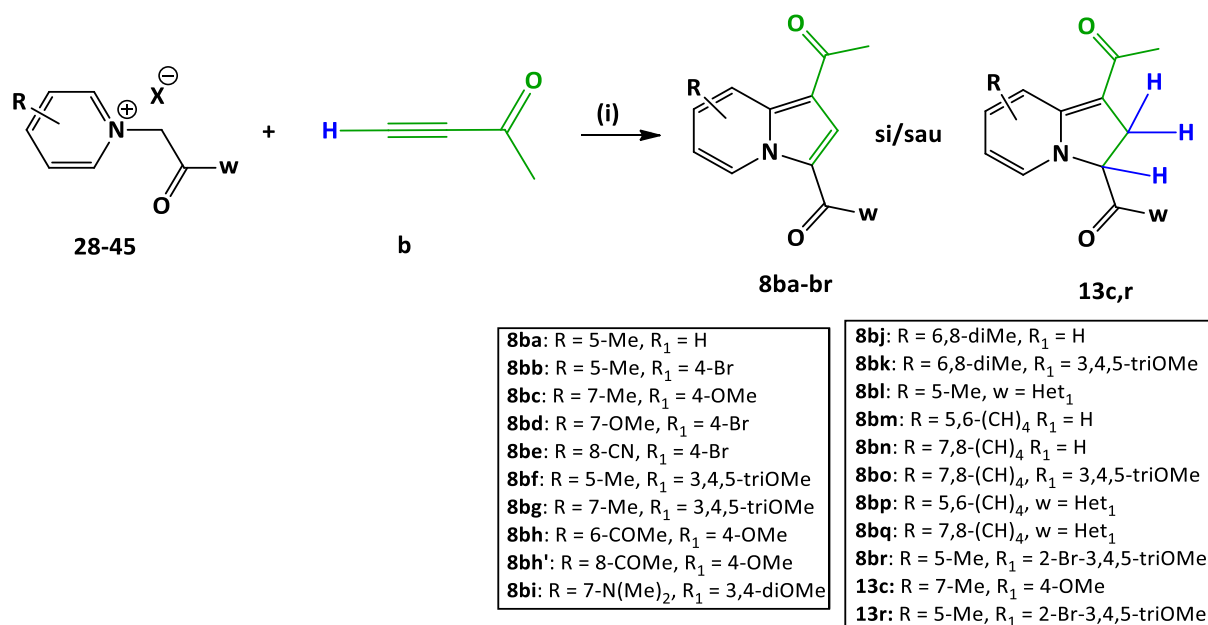


Schema 7. Reactivi și condiții: (i) 1.3 equiv TEA, 1.3 equiv dipolarofil,

DMF:DMSO (5:1 v:v), 80 °C, 24 h.

În sinteza altor derivați indolizinic am utilizat drept dipolarofil 3-butin-2-ona (**Schema 8**). Cu acest dipolarofil am obținut 20 noi derivați de tip indolizinic (**8ba-bl**, **8bo-br**, **14**), dintre care 2 compuși parțial aromatizați (**13c**, **13r**), și 2 compuși cunoscuți (**8bm**, **bn**)¹⁷¹, prezentați în **Figura 28**.

În urma reacțiilor efectuate cu 3-butin-2-ona am constatat faptul că puritatea acestuia determină calea reacției. În situațiile în care am utilizat un reactant depozitat în condiții corespunzătoare, reacția de cicloadiție 1,3-dipolară a decurs în modul așteptat, obținând în acest mod compușii **8ba-8br** (**Schema 8**).



Schema 8. Sinteza derivaților acetilindolizinici cu 3-butin-2-ona.

Structurile compușilor **8bh** și **13r** au fost confirmate cu ajutorul difracției de raze X (**Figura 29**).

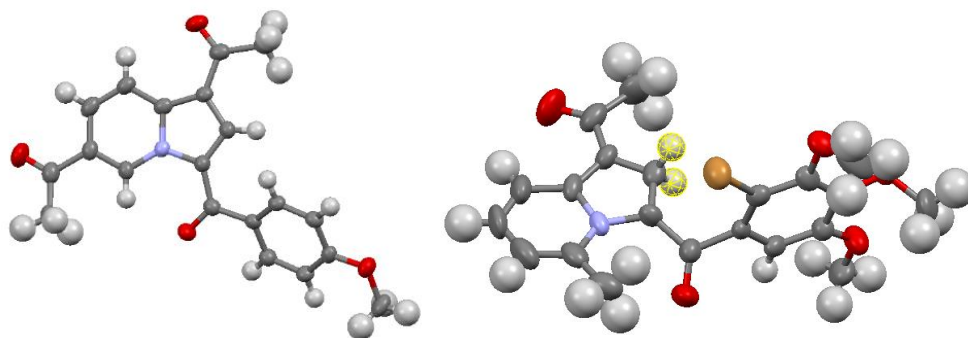


Figura 29. Structurile compușilor **8bh** și **13r** confirmate prin difracția de raze X.

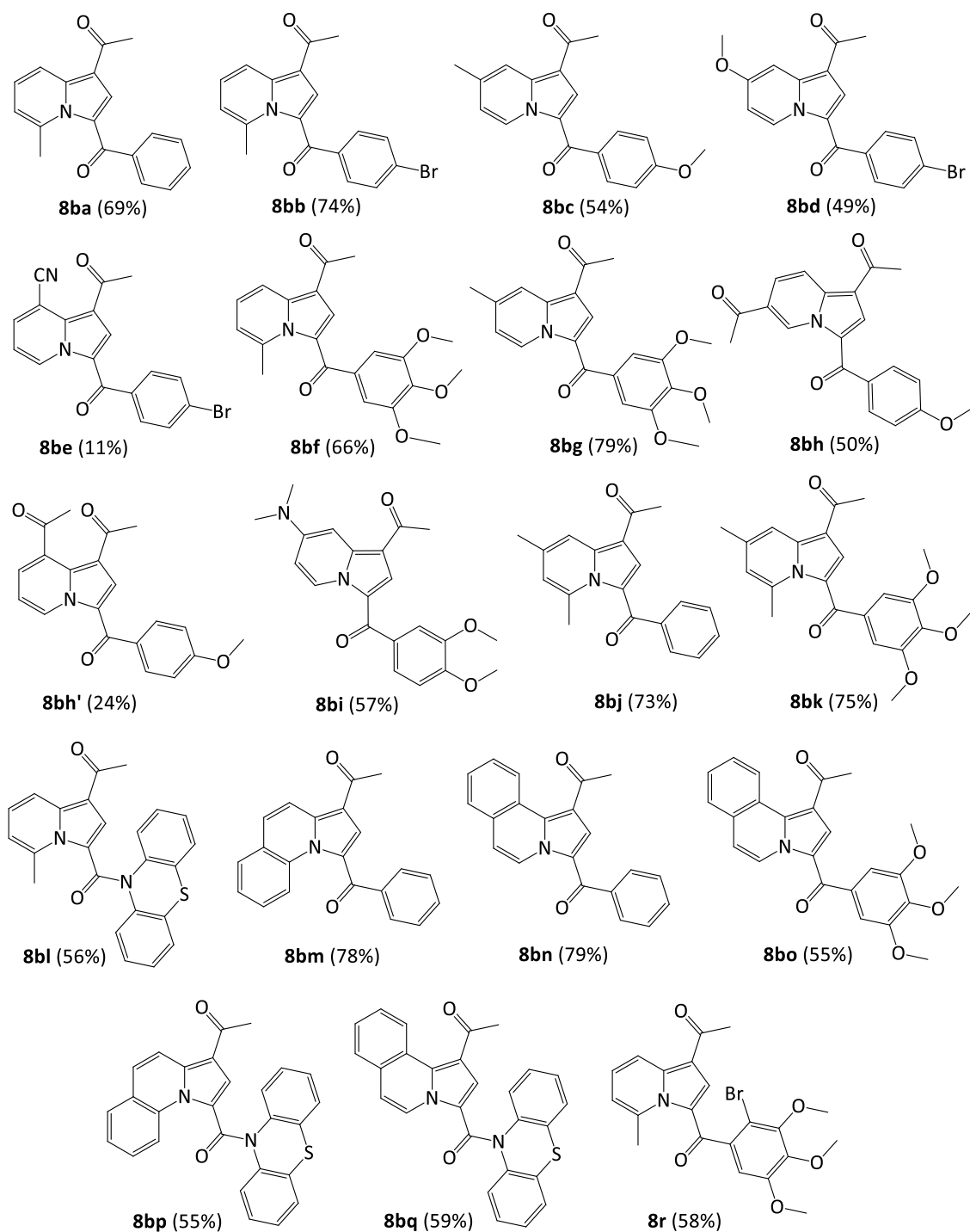
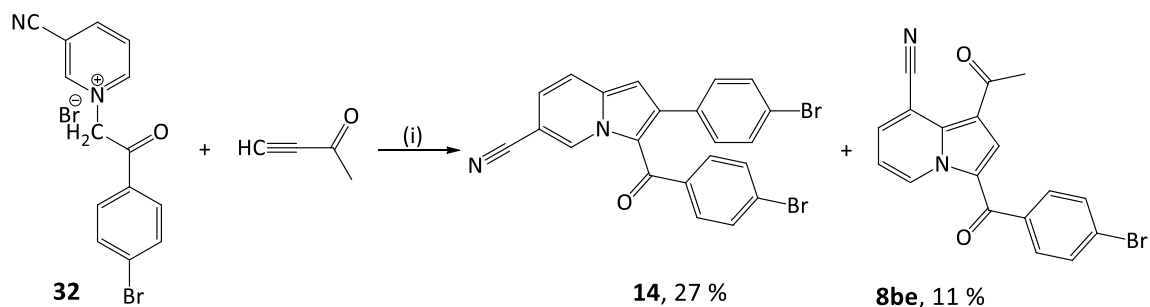
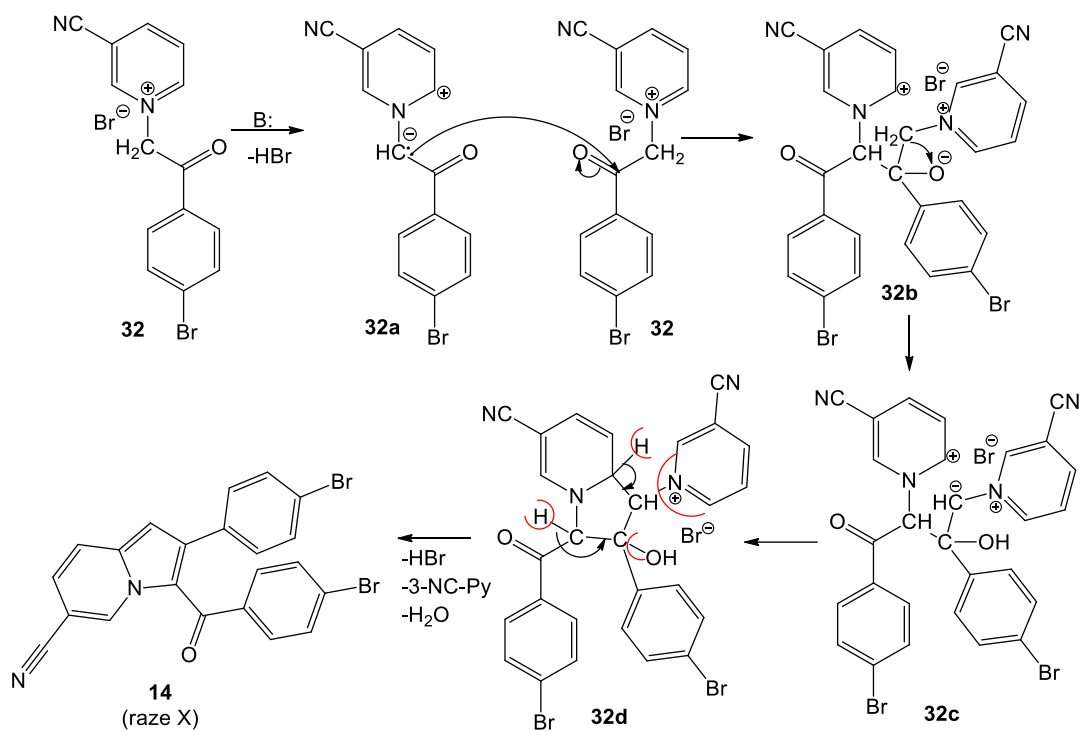


Figura 28. Compușii obținuți în reacția de cicloadiție 1,3 dipolară cu 3-butin-2-ona și randamentele acestora.

Atunci când, experimentul a fost realizat cu un reactant de puritate scăzută, fapt observabil vizual și confirmat ulterior prin spectrul ^1H RMN, reacția a urmat o nouă cale, obținându-se compusul de interes (**8be**) și un produs neașteptat **14** (**Schema 9**). Structura compusului **14** a fost elucidată cu ajutorul difracției de raze X. Pentru această reacție a fost propus un mecanism de reacție (**Schema 10**).



Schema 9. Reactivi și condiții: (i) 1.3 equiv TEA, 1.3 equiv 3-butin-2-ona, DMF:DMSO (5:1 v:v), 80 °C, 24 h.



Schema 10. Mecanism propus pentru obținerea produsului 14.

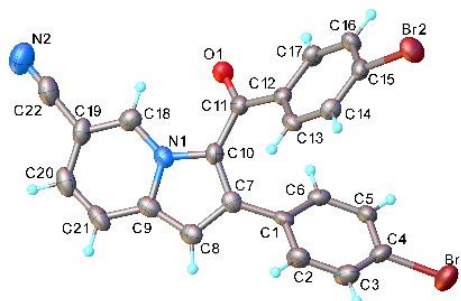
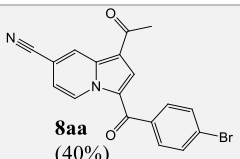
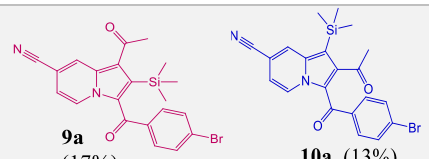
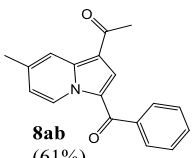
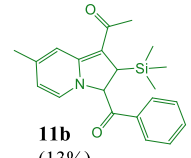
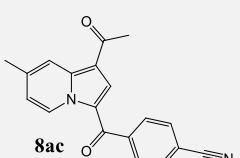
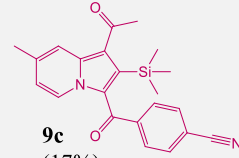
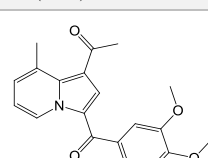
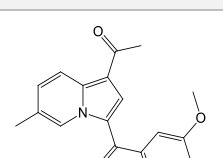
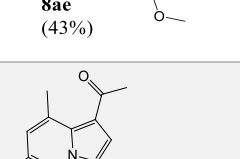
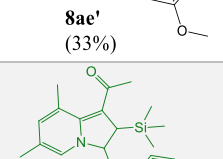
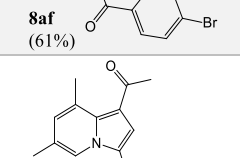
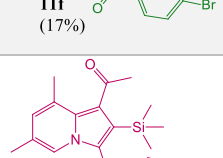
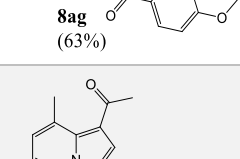
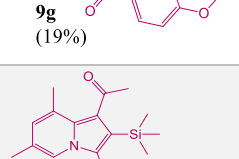
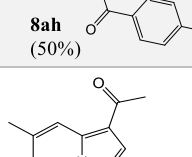
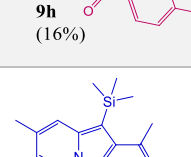
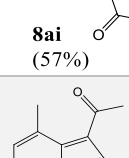
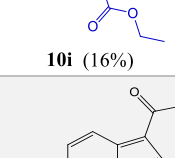
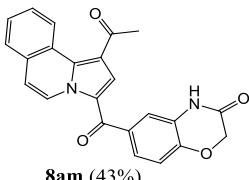
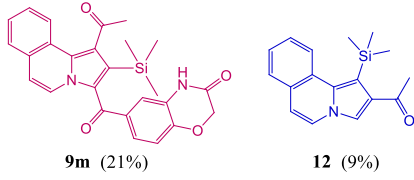
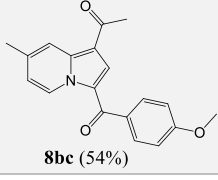
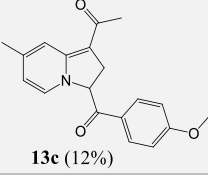
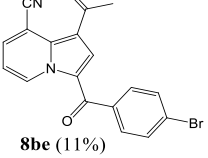
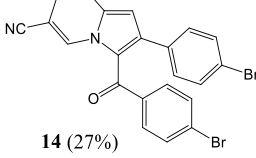
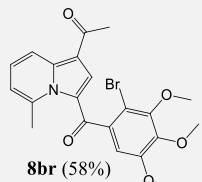
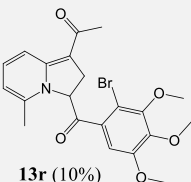


Figura 30. Structura compusului 14 obținută prin difracție de raze X.

Seria C conține un număr de **78 de compuși** sintetizați, dintre care **48 sunt noi**. Unele reacții au condus la obținerea a doi sau mai mulți produși, prezentați în **Tabelul 8**.

Tabel 7. Compuși de interes și produșii secundari izolați.

Nr. crt.	Produs de interes izolat	Subproduși izolați
1.	 <p>8aa (40%)</p>	 <p>9a (17%)</p> <p>10a (13%)</p>
2.	 <p>8ab (61%)</p>	 <p>11b (13%)</p>
3.	 <p>8ac (53%)</p>	 <p>9c (17%)</p>
4.	 <p>8ae (43%)</p>	 <p>8ae' (33%)</p>
5.	 <p>8af (61%)</p>	 <p>11f (17%)</p>
6.	 <p>8ag (63%)</p>	 <p>9g (19%)</p>
7.	 <p>8ah (50%)</p>	 <p>9h (16%)</p>
8.	 <p>8ai (57%)</p>	 <p>10i (16%)</p>
9.	 <p>8aj (36%)</p>	 <p>8aj' (24%)</p>

10.	 8am (43%)	 9m (21%) 12 (9%)
11.	 8bc (54%)	 13c (12%)
12.	 8be (11%)	 14 (27%)
13.	 8br (58%)	 13r (10%)

II. 3. 3. Evaluare biologică

În ceea ce privește activitatea biologică, **40** dintre derivații indolizinicici obținuți (șapte derivați cu gruparea trimetilsilil) au fost acceptați spre a fi testați de către NCI pentru capacitatea de inhibare a creșterii celulare pe 60 linii celulare canceroase umane. Testarea pentru determinarea potențialului anticancer a fost efectuată la concentrația de 10 μM pe aproximativ 60 linii celulare. Pentru evidențierea acțiunii antiproliferative (citostatic) și a efectului citotoxic (inhibare 100% a proliferării celulare și moarte celulară) am făcut o selecție a celor mai bune rezultate, acestea fiind prezentate în **Tabelul 9**.

Tabel 8. Rezultatele inhibării *in vitro* a creșterii celulelor canceroase umane pentru compușii selectați **8ae, 8ae', 8ag, 8ak, 8al, 8am, 12, 8bf, 8bi, 8bl, 8bo, 8bp, 8bq**.

Tip de cancer	Compus Linie celulară	8ae	8ae'	8ag	8ak	8al	8am	12	8bl	8bf	8bi	8bo	8bp	8bq
		GI% ^{a, b} (10 μM)												
Leucemie	CCRF-CEM	4	53	0	75	0	17	18	0	55	23	51	64	72
	HL-60(TB)	11	91	22	67	0	5	0	36	89	27	67	86	90
	K-562	5	81	14	81	18	16	37	32	84	18	76	76	80
	MOLT-4	8	72	18	77	0	33	40	40	61	21	65	45	51
	RPMI-8226	5	45	32	80	0	37	35	42	49	14	48	52	60
	SR	3	73	68	93	22	37	31	44	83	55	83	89	83
Cancer pulmonar non-microcelular	A549/ATCC	0	53	55	43	17	70	11	12	50	6	38	41	50
	EKVX	0	53	51	47	19	25	10	11	46	4	- ^d	21	39
	HOP-62	0	48	65	41	60	26	0	7	63	18	44	44	58
	HOP-92	0	3	53	62	19	0	7	-	66	0	73	15	55

Sinteze de noi derivați de tip calconă, indolizină și piridină cu proprietăți biologice

	NCI-H226	10	34	56	60	36	38	12	8	48	19	33	40	55
	NCI-H23	0	51	52	58	27	42	23	8	40	4	36	21	37
	NCI-H460	0	84	56	88	22	36	0	0	84	32	55	62	70
	NCI-H522	10	62	98	50	35	28	9	22	81	25	48	100^c	100^c
Cancer de colon	COLO 205	0	60	7	32	14	8	0	0	89	11	61	60	64
	HCC-2998	0	38	24	67	14	12	9	0	39	0	37	22	26
	HCT-116	5	82	80	93	27	55	31	39	85	38	58	74	76
	HCT-15	11	81	34	90	9	28	28	27	82	59	71	58	71
	HT29	0	84	28	67	19	43	43	18	91	0	60	70	85
	KM12	3	71	29	72	0	49	18	4	70	5	56	55	68
	SW-620	0	68	18	74	19	7	9	6	74	3	55	58	74
Cancer SNC	SF-268	0	39	77	51	26	21	6	8	46	18	26	32	56
	SF-295	0	92	69	64	45	0	0	8	82	0	45	59	81
	SF-539	2	65	76	67	34	68	7	11	55	15	25	31	70
	SNB-19	21	60	75	50	38	30	7	19	60	7	36	42	51
	SNB-75	35	94	98	17	55	0	0	-	95	22	55	61	65
Melanom	U251	3	66	68	64	28	73	12	5	69	24	26	52	62
	LOX IMVI	3	66	45	100	18	43	6	8	60	20	42	41	59
	MALME-3M	11	56	28	46	23	100	0	0	54	8	35	38	50
	M14	4	84	15	64	0	35	5	17	94	0	41	59	57
	MDA-MB-435	3	100	51	72	27	19	0	3	100	3	95	97	99
	SK-MEL-2	0	62	29	28	0	0	0	0	100	0	49	62	100
	SK-MEL-28	0	42	27	51	20	12	0	0	38	10	19	38	37
	SK-MEL-5	3	63	76	100	14	42	19	14	66	34	73	56	63
Cancer ovarian	UACC-257	0	33	21	68	0	14	6	6	44	0	24	48	43
	UACC-62	30	83	37	76	29	5	13	37	87	25	62	66	79
	IGROV1	0	58	19	63	7	4	6	16	56	8	47	47	50
	OVCAR-3	0	72	56	42	7	0	5	0	26	8	34	34	-
	OVCAR-4	10	20	50	48	40	52	29	13	34	3	31	22	26
	OVCAR-8	0	49	20	54	0	50	6	0	49	3	37	28	30
	NCI/ADR-RES	0	82	65	82	33	31	0	7	88	8	72	64	87
Cancer renal	SK-OV-3	0	23	71	0	17	0	21	19	53	13	44	40	51
	786-0	9	49	55	56	30	48	0	16	53	0	30	39	62
	A498	100	62	14	15	0	3	9	0	78	22	66	70	87
	ACHN	0	49	44	71	33	50	0	15	49	19	28	50	58
	CAKI-1	16	66	61	65	38	45	0	40	67	18	70	55	60
	RXF 393	19	41	92	58	5	14	12	0	53	0	51	33	68
	SN12C	19	58	45	58	32	22	14	8	55	16	26	13	34
UO-31	24	56	32	65	10	41	17	39	55	28	57	35	57	
Cancer de prostată	PC-3	10	44	17	72	12	20	12	40	44	31	52	54	62
Cancer sân	MCF7	17	85	65	74	23	36	31	-	80	20	56	69	82
	MDA-MB-231/ATCC	24	45	25	54	29	70	3	22	63	21	43	0	23
	HS 578T	9	41	57	46	26	37	7	17	56	21	59	45	84
	BT-549	0	47	75	84	7	22	6	26	74	6	41	47	63
	T-47D	18	62	51	79	16	25	70	39	80	11	75	24	72
	MDA-MB-468	18	100	40	97	13	50	18	25	85	14	56	49	57

^a Date obținute de la NCI – screening monodoză *in vitro* la o concentrație de 10 μM

^b GI% este procentul de inhibare a creșterii celulelor canceroase

^c Efectul citotoxic; inhibarea 100% a creșterii celulare și moartea celulară: **-10%** pe linia A498 indus de compusul **8ae**, **-13%** pe linia MDA-MB-435 și **-3%** pe linia MDA-MB-468 indus de **8ae'**, **-40%** pe linia LOX IMVI și **-36%** pe linia SK-MEL-5 indus de **8ak**, **-6%** pe linia MALME-3M indus de **8am**, **-30%** pe linia MDA-MB-435 și **-12%** pe linia SK-MEL-2 indus de **8bf**, **-1%** pe linia NCI-H522 indus de **8bp**, **-38%** pe linia NCI-H522 și **-78%** pe linia SK-MEL-2 indus de **8bq**.

^d Nedeterminat

Nouă dintre compușii testați inhibă total creșterea celulară (100%) pe unele linii celulare canceroase, prezentând un efect citotoxic cuprins între -1 și -78, ceea sugerează o moarte a celulelor canceroase de până la 78%. Cei mai activi derivați ai acestei serii pentru efectul citostatic (inhibare mai mare de 50% pe mai multe linii celulare) și citotoxic sunt **8ae**, **8ae'**, **8ag**, **8ak**, **8am**, **8bf**, **8bo**, **8bp**, **8bq**.

II. 4. Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor hibrizi de tip indolizin-1-il-calcone - SERIA D

II. 4. 1. Designul compușilor de tip indolizin-1-il-calcone

Rezultatele testelor anticancer obținute pentru compușii sintetizați în seriile anterioare sunt promițătoare astfel că în conceperea acestei noi serii de compuși ne-am propus să aprofundăm relațiile structură-activitate. Noii hibrizi proiectați conțin în structură trei cicluri, A, B și C, unite prin doi conectori și sunt clasificați în două subserii: hibrizi de tip indolizin-1-il-calconă și bis-calcone (**Figura 31**).

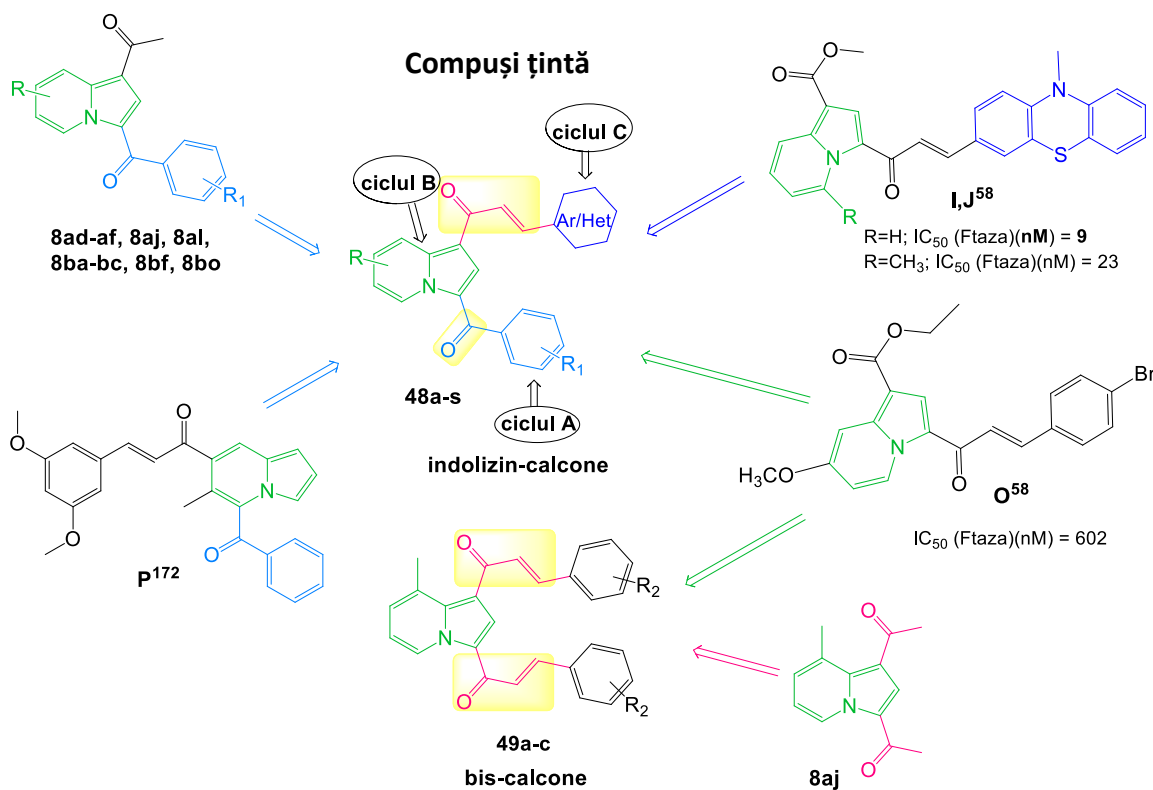


Figura 31. Structurile compușilor țintă (**48a-s**, **49a-c**) și ale celor de referință cu nucleu indolizinic.

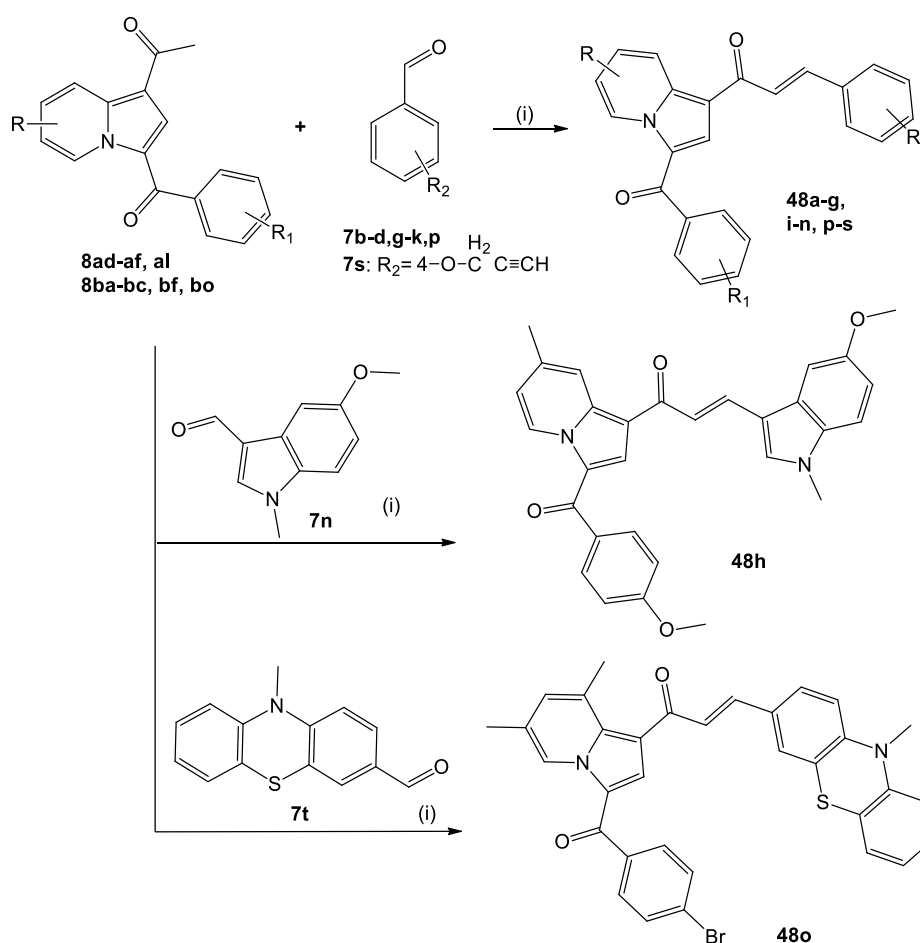
În subseria hibrizilor indolizin-1-il-calconă, ciclurile A și B sunt unite printr-un conector carbonilic, iar ciclurile B și C printr-un conector de tip 2-propenonă. În subseria bis-calconelor,

cele trei cicluri sunt unite prin conectorul 2-propenonic. În ambele subserii, ciclul B este reprezentat de un nucleu indolizinic.

II. 4. 2. Strategii de sinteză ale hibrizilor de tip indolizin-1-il-calconă – seria D1

Compușii doriți au fost sintetizați prin reacția de condensare Claisen-Schmidt a unei aldehide aromatice sau heteroaromatice cu un derivat indolizinic (**8ad-af**, **8al**, **8ba-bc**, **8bf**, **8bo**), ce conține gruparea acetyl în poziția 1 cu rol de componentă metilenică, în mediu bazic (**Schema 11**). 3-formil-10-metil-fenotiazina a fost sintetizată în laborator prin formilarea Vilsmeier.¹⁷³

În această serie am obținut **19 noi hibrizi** de tip indolizin-1-il-calconă (**48a-s**) cu randamente satisfăcătoare peste 73%, care au fost caracterizați și ulterior evaluați biologic.



Schema 11. Reactivi și condiții: (i) NaOH, EtOH, reflux.

Pentru obținerea hibrizilor de tip indolizin-1-il-calconă am avut în vedere realizarea experimentele cu ajutorul ultrasunetelor, însă nu am reușit izolarea acestora (**48t**, **48u**) din amestec cu derivații indolizini de plecare. Astfel, am decis să realizăm sintezele prin metoda clasică.

Toți compușii sintetizați au fost purificați și analizați spectral prin IR și ¹H, ¹³C RMN și experimente bidimensionale.

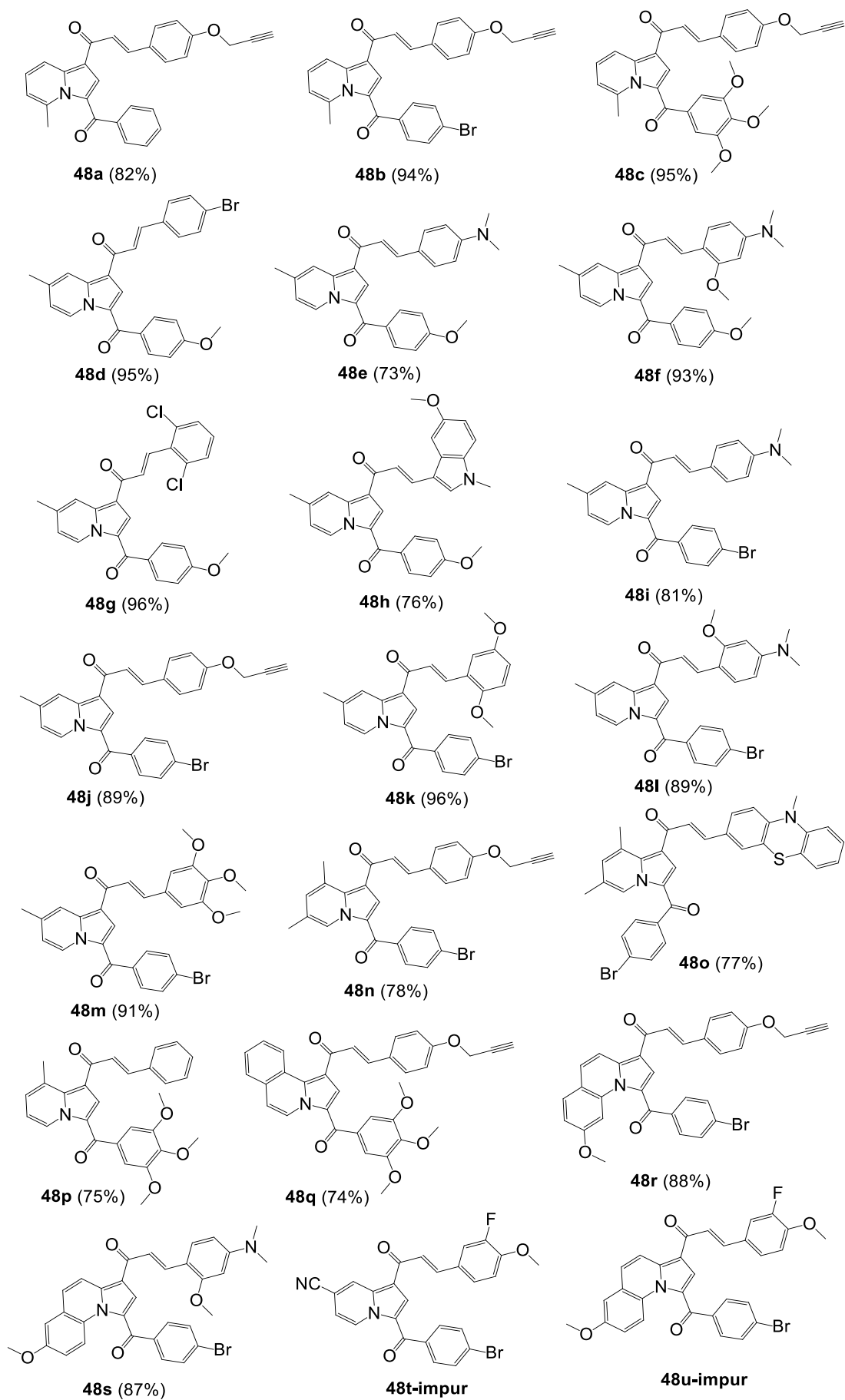
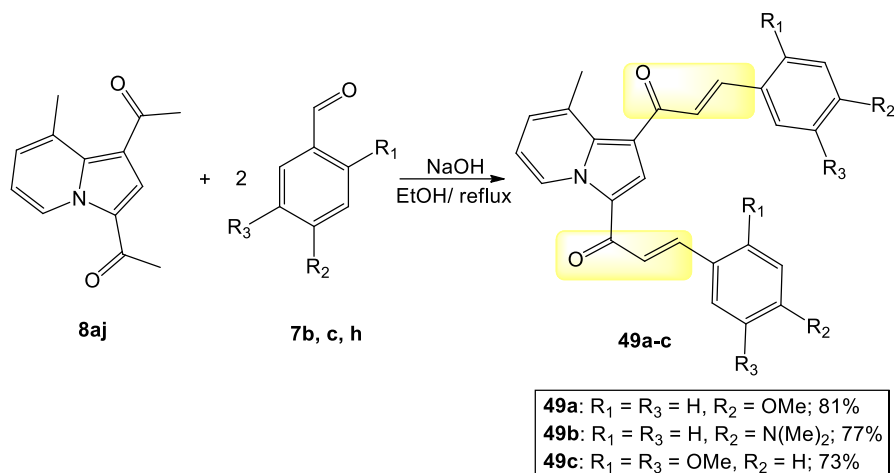


Figura 32. Hibrizii indolizin-calconă sintetizați 48a-u.

II. 4. 3. Strategii de sinteză ale bis-calconelor – seria D2

Pentru a continua explorarea relațiilor structură-activitate am decis să sintetizăm derivații de tip bis-calcone, printr-o reacție într-o singură etapă (**Schema 12**).

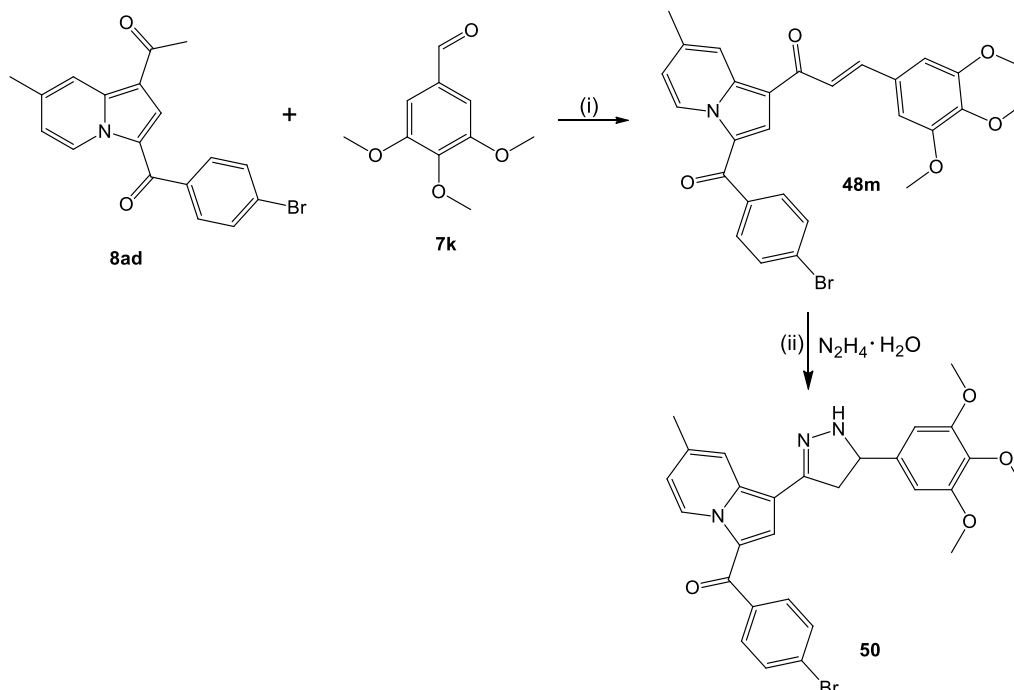


Schema 12. Sinteza bis-calconelor **49a-c**.

Cu ajutorul spectrelor ¹H RMN și ¹³C RMN a fost confirmat faptul că reacția de condensare are loc la ambele grupări acetil din nucleul indolizinic.

II. 4. 4. Reacții ale hibrizilor de tip indolizin-1-il-calconă – compuși ciclizați

Pentru a demonstra posibilitatea utilizării acestei serii de hibrizi într-o nouă direcție, am realizat sinteza derivatului ciclizat **50** (**Schema 13**).



Schema 13. Reactivi și condiții: (i) NaOH, EtOH, reflux; (ii) EtOH, reflux.

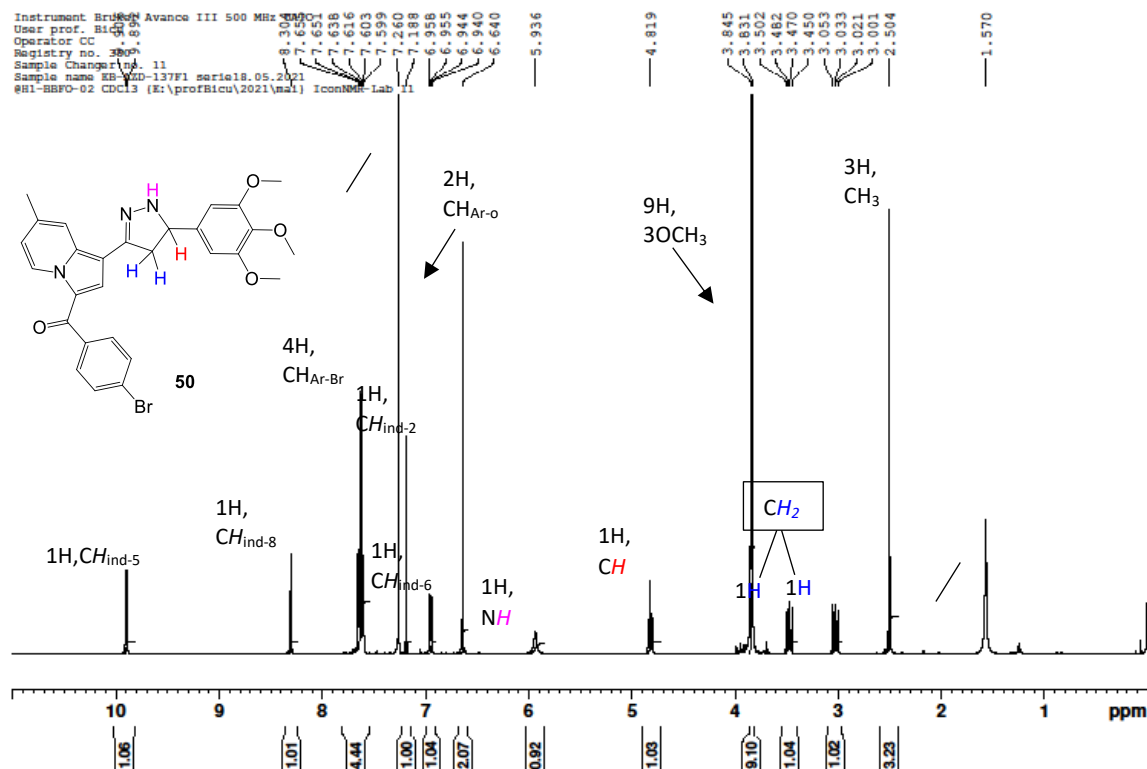


Figura 37. Spectrul ^1H RMN (CDCl_3) al compusului **50**.

În spectrul de ^1H RMN (Figura 37), sunt evidențiate semnalele care aparțin protonilor din ciclul dihidropirazolic. Semnalele corespunzătoare protonilor care aparțin 4,5-dihidro-1H-pirazolului au fost identificate cu ajutorul corelațiilor directe.

II. 4. 5. Evaluare biologică

În ceea ce privește activitatea biologică, compușii seriei **D** au fost testați anticancer și antifungic.

Cei **22 de compuși noi** de tip indolizin-1-il-calconă au fost testați pentru capacitatea de inhibare a creșterii celulare pe 60 linii celulare canceroase umane de către NCI. Cel mai activ compus (**48p**) se remarcă printr-un efect citostatic bun, cu $\text{GI}\% > 50$ pe 25 de linii celulare.

Tabel 9. Rezultatele inhibării *in vitro* a creșterii celulelor canceroase umane pentru compușii **48a**, **48b**, **48k**, **48m**, **48p**, **48r**.

Tip de cancer	Compus	48a	48b	48k	48m	48p	48r
	Linie celulară	$\text{GI}\%^{a, b}$ (10 μM)					
Leucemie	CCRF-CEM	27	16	28	19	81	21
	K-562	66	69	9	34	53	43
	MOLT-4	29	0	14	11	62	20
	RPMI-8226	29	15	- ^d	11	83	0
	SR	100 ^c	51	10	37	78	67
Cancer pulmonar non-microcelular	HOP-62	35	22	26	11	50	5
	HOP-92	13	13	70	35	67	0
	NCI-H460	58	24	56	0	35	31
	NCI-H522	42	67	53	26	49	27

Cancer de colon	HCT-116	3	3	27	19	84	0
	HCT-15	54	54	13	41	63	36
	KM12	20	20	15	36	51	35
Cancer al SNC	SNB-19	29	21	56	9	36	34
	SF-295	66	41				91
	SNB-75	-	-	-	38	82	-
Melanom	MDA-MB-435	84	93	12	75	41	52
	LOX IMVI	68	26				56
	MALME-3M						75
	UACC-62	47	38	16	27	54	22
Cancer ovarian	OVCAR-3	7	5	31	11	67	0
	OVCAR-4	21	4	0	8	54	62
	OVCAR 8						65
	NCI/ADR-RES	-	-	27	30	61	-
Cancer renal	SK-OV-3	14	0	30	-	62	0
	786-0	24	25	51	0	21	57
	ACHN	32	22	41	40	56	8
	CAKI-1	51	51	72	30	70	15
	RXF 393	43	18	73	0	62	19
	UO-31	12	17	15	13	58	17
Cancer de sân	MCF7	55	35	12	33	84	48
	MDA-MB 231/ATCC	28	23	30	16	54	24
	HS578T	50	44	75	0	34	51
	BT-549	52	54	39	7	51	98
	T-47D	42	25	27	22	56	21
	MDA-MB-468	51	33	49	37	84	51

^a Date obținute de la NCI – screening monodoză *in vitro* la o concentrație de 10 μM

^b GI% este procentul de inhibare a creșterii celulelor canceroase

^c Efectul citotoxic; inhibarea 100% a creșterii celulare și moartea celulară: **-22%** pe linia SR indus de compusul **48a**;

^d Nedeterminat

Seria D se distinge însă prin activitatea antifungică împotriva ciupercii *C. albicans*, astfel că lipsa generală a citotoxicității reprezintă un avantaj în contextul obținerii unor antifungice.

Activitatea antifungică a fost evaluată împotriva *C. albicans in vitro* pentru toți hibridii și *in vivo* pentru cei mai eficienți compuși conform MIC.

Prin determinarea concentrației minime inhibitorii s-a constatat faptul că 5 compuși prezintă MIC sub 32 μg/mL. Această valoare este stabilită de către Comitetul European pentru Testarea Susceptibilității La Antimicrobiene (EUCAST) și indică potențialul unei substanțe antimicrobiene pentru dezvoltarea industrială. Rezultatele celor mai activi compuși pentru această acțiune biologică sunt evidențiate în **Tabelul 11**.

Tabel 10. Rezultatele evaluării acțiunii antifungice *in vitro* – MIC obținute pentru hibridii testați **48a-s** și **49a-c**.

Compus	Concentrație finală (μg/mL)	MIC ^a (μg/mL)
48d	5.00E-04	237.000
48f	5.00E-04	234.270
48g	5.00E-05	23.2170
48h	5.00E-05	23.9300
48m	5.00E-05	26.7200
48o	5.00E-04	296.765

48p	5.00E-05	22.7850
48s	5.00E-05	29.1700
49c	5.00E-04	255.785

^a MIC – concentrația minimă inhibitorie la care creșterea *C. albicans* este complet inhibată;

Testarea *in vivo* a celor mai buni agenți antifungici a fost efectuată la două concentrații diferite, 10^{-4} $\mu\text{g/mL}$ și $5 \cdot 10^{-5}$ $\mu\text{g/mL}$, pe nematodul *Caenorhabditis elegans*, care a fost infectat în prealabil cu *C. albicans*. În prima etapă a testelor, niciun nematod nu a supraviețuit, urmând a fi efectuate investigații suplimentare.

II. 5. Designul, sinteza și evaluarea biologică a unor hibrizi indolizina-piridină – SERIA E

II. 5. 1. Designul compușilor hibrizi indolizina-piridină

O altă modulare prin care ne-am propus să aprofundăm relațiile structură-activitate dobândite până în prezent este modificarea conectorului calconei. Studiind literatura am constatat faptul că puntea de tip 2-propenonă poate fi transformată într-un heterociclu cu cinci¹⁷⁵⁻¹⁷⁹ sau șase atomi^{180, 181}, în funcție de reactantul care participă la reacție. Un heterociclu cu șase atomi, interesant din punct de vedere farmacologic este piridina¹⁸³⁻¹⁸⁶.

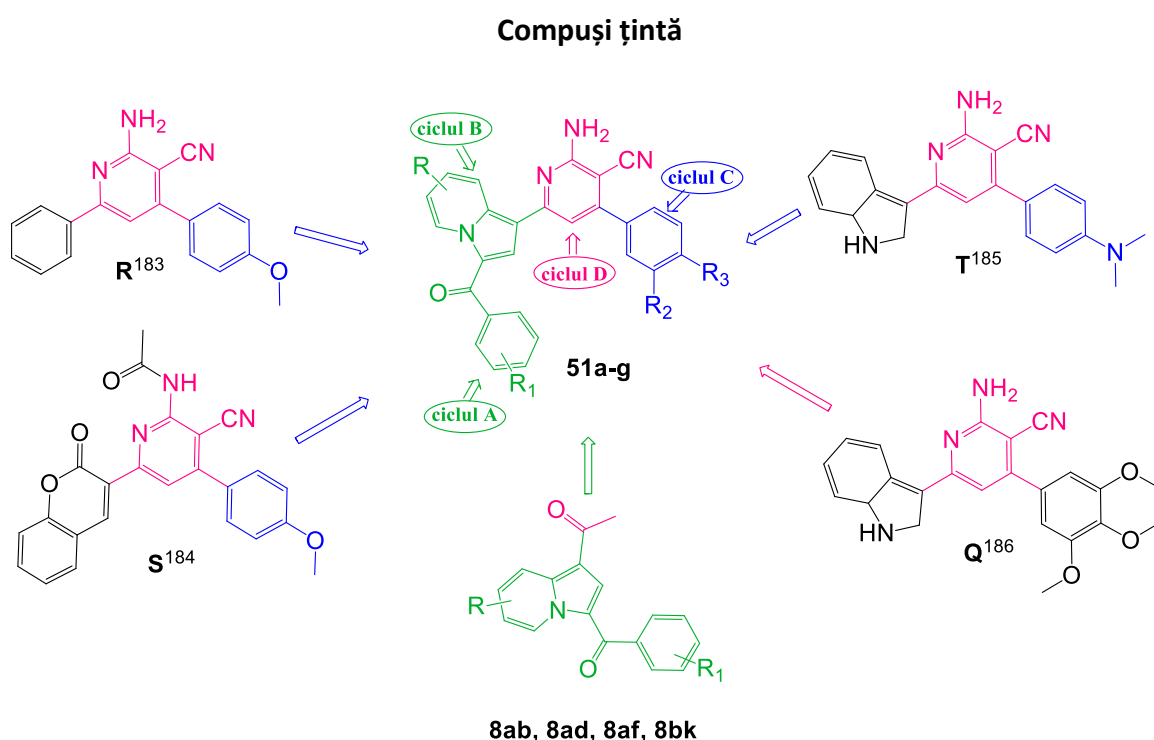


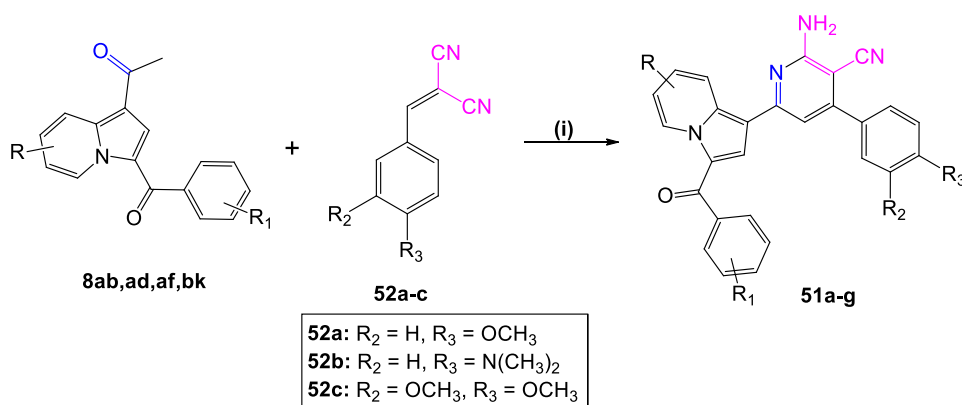
Figura 41. Structurile compușilor de referință cu nucleu 3-ciano-2-amino-piridinic cu activitate anticancer (**R, S, T, Q**) și ale celor de interes **51a-g**.

În cadrul acestei serii, ne-am concentrat atenția spre dezvoltarea unor noi hibrizi indolizină-piridină (**Figura 41**). Noii hibrizi sintetizați în **seria E** conțin în structură patru cicluri A, B, C și D. Ciclurile A și B sunt unite prin conectorul cetonic, iar B și C prin ciclul D. În ceea ce privește ciclul D, care poate fi privit și ca un conector, acesta este constant 2-amino-3-cianopiridina-4,6-disubstituită.

II. 5. 2. Strategii de sinteză ale compușilor hibrizi indolizină-piridină

Compușii acestei serii au fost sintetizați prin reacția derivaților 1-acetilindolizini (**8ab**, **8ad**, **8af**, **8bk**) din **seria C**, ce au rol de metil-cetonă, cu derivații de benzilidenmalononitril (**52a-c**) și acetat de amoniu (**Schema 14**), conform procedurii din literatură¹⁸⁹. Derivații de benzilidenmalononitril au fost obținuți în cadrul grupului¹⁸⁵ și utilizați în continuare în reacția de sinteză a hibrizilor de tip indolizină-piridină. Precursorii 1-acetilindolizini au fost sintetizați conform metodelor descrise în sinteza **seriei C**.

Astfel, cei **7 noi hibrizi** indolizină-piridină (**51a-g**, **Tabel 12**, **Figura 41**) au fost obținuți printr-o sinteză în trei etape.



Schema 14. Reactivi și condiții: (i) H₃CCOONH₄, EtOH, reflux, 14-20h;

Tabel 11. Hibrizii indolizină-piridină sintetizați **51a-g**

Compus	R	R ₁	R ₂	R ₃	Randament (%)
51a	7-Me	H	H	OMe	63
51b	7-Me	H	H	N(Me) ₂	64
51c	7-Me	Br	H	OMe	68
51d	7-Me	Br	H	N(Me) ₂	69
51e	6,8-diMe	Br	H	N(Me) ₂	59
51f	6,8-diMe	Br	OMe	OMe	65
51g	6,8-diMe	3,4,5-triOMe	H	N(Me) ₂	74

Compușii obținuți au fost purificați prin cromatografie pe coloană și/sau recristalizare și ulterior caracterizați cu ajutorul spectrelor de ^1H , ^{13}C RMN, experimente bidimensionale și de IR.

II. 5. 3. Evaluarea biologică

Cei 7 compuși hibridi obținuți în această serie au fost testați pentru capacitatea de inhibare *in vitro* a creșterii celulelor canceroase pe aproximativ 60 de linii celulare umane de către NCI. Testarea acțiunii anticancer a fost efectuată la concentrația de 10 μM pe toate liniile celulare. Pentru evidențierea acțiunii citostatice și citotoxice am făcut o selecție a celor mai bune rezultate, acestea fiind prezentate în **Tabelul 13**.

Tabel 12. Rezultatele inhibării *in vitro* a creșterii celulelor canceroase umane pentru compușii **51a-d**.

Tip de cancer	Compus	51a	51b	51c	51d
		Linie celulară			
		GI% ^{a, b} (10 μM)			
Leucemie	RPMI-8226	21	18	13	16
	SR	13	24	21	36
Cancer pulmonar non-microcelular	A549/ATCC	20	54	7	30
	EKVX	19	12	10	32
	HOP-62	70	43	5	21
	HOP-92	100^c	76	13	69
	NCI-H226	64	83	40	39
	NCI-H23	45	54	37	72
	NCI-H460	55	44	15	59
	NCI-H522	29	21	10	46
Cancer de colon	COLO 205	27	34	33	55
	HCC-2998	19	8	0	35
	HCT-116	42	37	26	64
	HCT-15	22	27	10	60
	HT29	25	37	23	65
	KM12	15	27	18	38
	SW-620	21	30	8	59
Cancer al SNC	SF-268	59	39	6	32
	SF-295	55	31	11	32
	SF-539	92	100	95	76
	SNB-19	55	39	9	32
	SNB-75	8	22	0	0
	U251	55	68	35	80
Melanom	LOX IMVI	49	88	46	69
	MALME-3M	49	36	26	100
	M14	20	19	35	43
	MDA-MB-435	21	21	7	42
	SK-MEL-2	15	19	0	35
	SK-MEL-28	12	26	30	49
	SK-MEL-5	32	42	13	47
	UACC-257	16	14	12	20
	UACC-62	34	35	19	23
Cancer ovarian	IGROV1	21	14	10	23
	OVCAR-3	40	42	0	50
	OVCAR-4	76	56	14	37
	OVCAR-8	80	85	34	34

	NCI/ADR-RES	56	49	18	62
	SK-OV-3	6	35	0	6
Cancer renal	786-0	86	79	43	59
	A498	0	0	0	8
	ACHN	44	69	18	29
	CAKI-1	30	47	32	33
	SN12C	30	38	7	23
	UO-31	35	35	36	37
	Cancer de prostată	PC-3	37	22	11
Cancer de sân	MCF7	47	46	21	54
	MDA-MB-231/ATCC	66	74	40	60
	HS 578T	91	67	9	30
	BT-549	88	42	0	38
	T-47D	35	36	17	49
	MDA-MB-468	51	49	76	100

^a Date obținute de la NCI – screening monodoză *in vitro* la o concentrație de 10 μM

^b GI% este procentul de inhibare a creșterii celulelor canceroase

^c Efectul citotoxic; inhibarea 100% a creșterii celulare și moartea celulară: **-7%** pe linia HOP-92 indus de compusul **51a**; **-62%** pe linia SF-539 indus de compusul **51b**; **-2%** pe linia MALME-3M și **-15%** pe linia MDA-MB-468 indus de compusul **51d**;

Cei mai activi hibrizi indolizină-piridină din perspectiva efectului antiproliferativ și citotoxic sunt **51a-d**. Trei dintre compușii testați (**51a**, **51b**, **51d**) prezintă și efect citotoxic pe câteva linii celulare diferite.

Prin compararea procentului de inhibare a creșterii celulelor canceroase pentru compușii **51a** cu **51b** (Tabelul 13), respectiv **51c** cu **51d** (Figura 46 și Tabelul 13), putem deduce că introducerea 4-dimetilaminofenilului drept nucleu C (**51b**, **51d**), determină o activitate anticancer mai bună față de 4-metoxifenil (**51a**, **51c**).

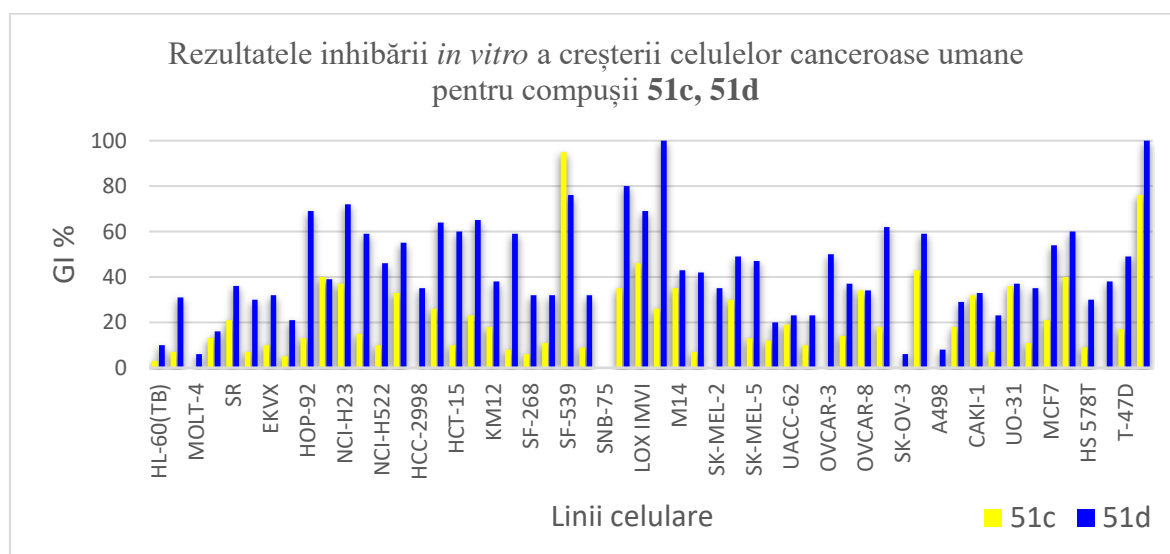


Figura 46. Compararea rezultatelor GI% *in vitro* pentru hibrizii **51c** și **51d**.

II. 6. Concluzii generale și perspective

Cercetările efectuate în cadrul acestei teze de doctorat au fost concentrate asupra dezvoltării unor noi compuși cu **proprietăți biologice**, în principal cu acțiune anticancer sau antimicrobiană, urmărind o strategie de „chimie verde” în sintezele efectuate. În prezenta teza de doctorat sunt descrise conceperea, sinteza și proprietățile biologice a **103 noi compuși nedescrși în literatură**, care au fost caracterizați cu ajutorul spectrelor RMN (^1H , ^{13}C , ^{19}F , experimente bidimensionale), IR și în unele cazuri MS sau difracție de raze X.

Designul compușilor a fost realizat pe baza relațiile structură-activitate cunoscute până în prezent în cadrul grupului nostru de cercetare în raport cu structura calconei, compus cu multiple acțiuni farmacologice.

În conceperea compușilor, au fost efectuate modulări asupra celor trei elemente structurale ale calconei, considerată analog al fenstatinei, acestea fiind: ciclul A, ciclul B și conectorul.

La nivel global se urmărește mobilizarea comunității științifice de cercetare a cancerului spre dezvoltarea de noi căi pentru identificarea și înțelegerea țintelor anticancer și implicit dezvoltarea unor noi inhibitori ai acestora. Astfel, unul dintre obiectivele noastre a fost proiectarea unor noi agenți antitumorali, care să fie inhibitori ai farneziltransferazei și/sau compuși cu activitate citostatică. Totodată am urmărit realizarea sintezelor prin metode cât mai „verzi”. În acest context, au fost concepute și obținute primele două serii de compuși: **seria A** și **seria B**.

Seria A este formată din 3 derivați de calcone ce conțin heterocicluri cu azot și un derivat policiclic. În structura derivaților de calconă, ciclul A introdus este piridina sau fenotiazina, iar ciclul B este 3,4,5-trimetoxifenilul sau piridina, conectorul fiind 2-propenona. Compușii au fost obținuți prin două metode: condensare Claisen-Schmidt în condiții clasice (**metoda A**) și **sinteza asistată de ultrasunete (metoda B)**. Avantajele aplicării metodei neconvenționale în sintezele noastre sunt: timpul scurt de reacție (**30-60 secunde**), utilizarea unor solvenți și catalizatori cu o **toxicitate redusă**, temperaturi mai joase (20-35 °C), ceea ce determină un **consum mai scăzut al resurselor** (energie și apă). Noii compuși obținuți în această serie au fost testați pentru capacitatea de inhibare a FTazei umane *in vitro*. Cel mai activ compus (**1c**) conține nucleul fenotiazinic (ciclul A) și nucleul piridinic (ciclul B) și prezintă inhibare a acțiunii farneziltransferazei de 90% cu o concentrație **IC₅₀ = 2.84 μM**.

Seria B, a analogilor de tip fenotiazin-10-il-calcone, cuprinde modulări în toate cele trei puncte din structura calconei: ciclul A - fenotiazina sau 2-metiltiofenotiazina, iar ciclul B - fenil diferit substituit sau heterocicluri cu azot, oxigen sau sulf. În puntea de tip 2-propenonă a fost introdus substituentul ciano în poziția α față de gruparea carbonil. În această serie au fost sintetizați

23 compuși: 21 analogi de tip fenotiazin-10-il-calconă și 2 intermediari, 10*H*-(2'-cianoacetil)-fenotiazina și 10*H*-(2'-cianoacetil)-2-metiltiofenotiazina. Cei **21 noi analogi** calconici au fost obținuți prin condensarea Claisen-Schmidt, 10 prin metoda convențională și 11 prin sinteza asistată de US (1-2 minute), abordând o **strategie de chimie verde**. În ceea ce privește activitatea biologică, 3 analogi de tip 2-metiltiofenotiazin-10-il-calcone au potențial antiproliferativ bun asupra cancerului de prostată (linia PC-3) și cancerului de sân (liniile MDA-MB-468, MCF7, T-47D). Cel mai activ compus, **4k** cu 2-metiltiofenotiazin-10-il (nucleu A) și 1*H*-indol-3-il (nucleu B), are efect citostatic pe toate tipurile de cancer, cea mai pronunțată activitate antiproliferativă fiind asupra liniei NCI-H522 (cancer pulmonar non-microcelular, **GI% ~ 95**). O parte din compușii acestei serii au fost testați *in vitro* și pentru capacitatea de inhibare a FTazei, cel mai activ analog (**3d**) prezintă **IC₅₀ = 7.268 μM**.

Întrucât analogii de tip fenotiazin-10-il-calconă ai **seriei B** au demonstrat potențial anticancer, am dorit să continuăm explorarea relațiilor structură-activitate și să introducem un alt heterociclu (indolizina) în noua serie de compuși (**seria C**), cunoscut pentru îmbunătățirea proprietăților biologice. Astfel am obținut o nouă serie de compuși pe care am abordat-o din două perspective: analogi ai fenstatinei urmărind proprietățile anticancer și intermediari în sintezele unor noi serii de compuși: hibridi de tip indolizin-1-il-calconă, **seria D**, și hibridi indolizină-piridină, **seria E**.

Seria C este formată din derivații acetilindolizini și presupune unirea prin conectorul cetonic a ciclului B de tip indolizinic (indolizinic, pirolo[1,2-*a*]chinolinic și pirolo[2,1-*a*]izochinolinic) cu ciclul A clasic: trimetoxifenil, fenil substituit cu grupări metoxi, bromo, ciano, sau neclasic: fenotiazina, 2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-onă. Totodată a fost grefată gruparea acetil în poziția 1 a nucleului de tip indolizinic pentru crearea unui nou centru de reacție. În această serie au fost sintetizați **78 compuși**, dintre care 47 produși finali și subproduși și 31 de intermediari. Din compușii obținuți, **sunt noi 42 derivați indolizini și 6 săruri de piridiniu**.

În sintezele derivaților indolizini am folosit doi dipolarofili de tip alchină activată. Cu dipolarofilul trimetilsilil-3-butin-2-ona am obținut 25 de compuși dintre care **22 produși noi**. Experimentele realizate cu trimetilsilil-3-butin-2-ona au condus la obținerea a doi sau mai mulți produși de reacție: 1-acetilindolizini, 1-acetil-2-trimetilsilil-indolizini, 2-acetil-1-trimetilsilil-indolizini. Cu dipolarofilul 3-butin-2-ona au fost obținuți 22 de compuși, dintre care **20 produși noi**. Atunci când reacția de cicloadiție s-a efectuat cu o 3-butin-2-ona de puritate inferioară, reacția a urmat o altă cale, obținându-se un produs de cicloadiție neașteptat.

În ceea ce privește activitatea anticancer, **nouă compuși** din această serie prezintă un efect antiproliferativ foarte bun, iar **șapte** dintre aceștia prezintă efect citotoxic. Cel mai activ derivat

este 1-(3-(10*H*-fenotiazin-10-carbonil)pirolo[2,1-*a*]izochinolin-1-il)etanona (**8bq**) și prezintă **efect citotoxic GI de -78%** pe linia SK-MEL-. Compușii din această serie au prezentat cele mai bune rezultate anticancer asupra melanomului (**GI% = 100** asupra unor linii celulare). Producții cu nucleu fenotiazinic au prezentat citotoxicitate și asupra liniei NCI-H522 corespunzătoare cancerului pulmonar non-microcelular. Compușul cu nucleul A 3,4,5-trimetoxifenil și nucleul B 1-acetil-8-metilindolizin-3-il a fost citotoxic selectiv asupra liniei celulare A498 (cancerul renal).

Calcone sunt cunoscute în literatură pentru diversitatea proprietăților biologice. Din acest motiv, am dorit obținerea unor compuși, analogi de calconă, cu acțiuni biologice multiple.

Seria D este formată din **23 noi compuși** împărțiți în: 19 hibrizi de tip indolizin-1-il-calconă, 3 bis-calcone și un derivat cu puntea de tip 2-propenonă transformată în dihidropirazol. Compușii acestei serii conțin în structură 3 cicluri A, B și C, care sunt unite prin **doi conectori**. În cazul hibrizilor de tip indolizin-1-il-calconă, un conector este cetonic și al doilea 2-propenonic, iar în cazul bis-calconelor cei doi conectori sunt de tip 2-propenonă, ciclurile A și C fiind identice. Rezultatele biologice au confirmat potențialul antifungic al acestei serii împotriva *C. albicans*: 5 produși prezintă **MIC-uri foarte bune**, în jurul valorii de **20 μg/mL** și 4 compuși prezintă MIC-uri cu o semnificație biologică mai scăzută (200-300 μg/mL). Totodată compușii au fost evaluați și anticancer, cel mai activ compus (**48p**) remarcându-se printr-un efect citostatic bun, ceea ce indică activitatea biologică multiplă a acestuia, fiind **în același timp citostatic și antifungic**. Ceilalți compuși ai seriei au capacitatea de inhibare a creșterii celulare moderată, cu excepția hibridului **48a** care prezintă efect citotoxic pe o linie celulară. Absența citotoxicității reprezintă un avantaj în perspectiva dezvoltării unor antifungice.

Seria E de compuși este formată din **7 noi hibrizi indolizină-piridină** și a fost concepută pentru a evalua influența conectorului, 2-amino-3-cianopiridinic introdus, asupra activității biologice. Structurile acestor hibrizi indolizină-piridină conțin 4 cicluri: ciclul A este fenil diferit substituit unit de ciclul B, indolizine-3-il, prin conectorul cetonic, ciclul C introdus este 4-aminofenilul, 4-metoxifenilul și 3,4-dimetoxifenilul, iar ciclul D este 2-amino-3-cianopiridina-4,6-disubstituit. Compuși obținuți în această serie au fost testați anticancer pentru capacitatea de inhibare a creșterii celulelor canceroase. Patru hibrizi au efect citostatic bun asupra mai multor linii celulare canceroase ($GI\% > 50$), iar **trei** dintre aceștia (**51a, 51b, 51d**) prezintă **efect citotoxic (GI% = 100)** asupra unor linii celulare: HOP-92 (cancer pulmonar non-microcelular), SF-539 (cancer al CNS), MALME-3M (melanom) și MDA-MB-468 (cancer de sân), cu valori $-2\% \leq GI\% \leq -62\%$.

În ceea ce privește evaluarea biologică, compușii finali au fost selectați pentru a fi testați anticancer *in vitro* pentru capacitatea de inhibare a creșterii celulelor canceroase de către NCI, la

concentrația de 10 μM . Produșii noi din **seria A** și o parte a produșilor **seriei B** au fost testați anticancer *in vitro* și pentru capacitatea de inhibare a acțiunii FTazei. Cel mai activ inhibitor al farneziltransferazei ($\text{IC}_{50} = 2.84 \mu\text{M}$) conține în structură nucleul fenotiazin-2-il unit prin conectorul 2-propenonă cu nucleul 6-cloropiridin-3-il. Produșii **seriei D** au fost testați și pentru activitatea antifungică *in vitro* și *in vivo* la Facultatea de Medicină, Universitatea din Lille. Cel mai eficient antifungic ($\text{MIC} = 22.785 \mu\text{g/mL}$) s-a dovedit a fi și un citostatic bun, având în structură 3,4,5-trimetoxifenilul (ciclul A) unit cu 8-metilindolizina (ciclul B) prin puntea cetonică în poziția 3 și fenilul unit prin puntea 2-propenonică în poziția 1 a nucleului indolizinic.

În viitor ne propunem să îmbunătățim metoda de sinteza asistată de ultrasunete a compușilor, pentru a lărgi aria reacțiilor în care poate fi aplicată. De asemenea, dorim să continuăm sinteza hibrizilor indolizină-piridină pentru a obține rezultate concludente în ceea ce privește relațiile structură-activitate, compușii dovedindu-se în această etapă mai activi antitumoral. O altă perspectivă este aceea a transformării punții de tip 2-propenonă din hibrizii indolizin-1-il-calconă într-un heterociclu cu cinci sau șase atomi (precum derivatul dihidropirazolic) pentru a îmbogăți relațiile structură-activitate dobândite până în prezent și pentru dezvoltarea unor agenți antitumorali mai puternici. Totodată ne propunem ca ciclurile cele mai bune să fie investigate în continuare pentru proprietățile biologice în scopul obținerii unor inhibitori anticancer duali și a unor agenți duali antimicrobieni și antiinflamatori.

O parte a cercetărilor întreprinse în cadrul acestei teze de doctorat au fost valorificate prin publicarea a două **articole**:

- ✚ **Zubaș, A.**; Ghineț, A.; Shova, S.; Bîcu, E. 1,3-Dipolar cycloaddition of cycloimmonium salts and 4-(trimethylsilyl)-3-butyn-2-one to access new functionalized indolizines with potential cytostatic activity. *New J. Chem.* **2023**, *47*, 3758-3772.¹⁹¹ (I.F. = **3.925**)
- ✚ **Zubaș, A.**; Ghineț, A.; Farce, A.; Dubois, J.; Bîcu, E. Phenothiazine- and carbazole-cyanochalcones as dual inhibitors of tubulin polymerization and human farnesyltransferase. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 888.¹⁵⁸ (I.F. = **5.215**)

și prin participarea la **manifestări științifice**:

- ✚ *Design and synthesis of new phenothiazine-chalcones with potential biological activities.* **Zubaș, A.**; Ghineț, A.; Dubois, J.; Bîcu, E. Sesiunea de Comunicări Științifice a Studenților, Masteranzilor și Doctoranzilor, Iași (România), 29-30 Octombrie **2020**. (poster)
- ✚ *A new electron-deficient alkyne as dipolarophile in the synthesis of new indolizine derivatives.* **Zubaș, A.**; Ghineț, A.; Shova, S.; Bîcu, E. Sesiunea de comunicari stiintifice

a studentilor, masteranzilor și doctoranzilor, Iași (România), 11-12 Noiembrie 2021. (poster)

✚ *New indolizine-1-yl-chalcone hybrids as antifungal and anti-inflammatory agents: synthesis and biological evaluation.* Zubaș, A.; Ghineț, A.; Jawhara, S.; Bîcu, E. Sesiunea de comunicări științifice a studentilor, masteranzilor și doctoranzilor, Iași (România), 28 Octombrie 2022. (comunicare orală)

✚ *A new series of pyridine derivatives as anticancer agents: design, synthesis and biological evaluation.* Negru, G.; Zubaș, A.; Ghineț, A.; Bîcu, E., Sesiunea de comunicări științifice a studentilor, masteranzilor și doctoranzilor, Iași (România), 28 Octombrie 2022. (comunicare orală).

Mulțumiri pentru suportul acordat următoarelor:

- ✓ Proiect **PN-III-P4-ID-PCE-2020-0818/195/2021**. Titlu: Liganzi P2X7R ca agenți terapeutici potențiali pentru tratamentul bolilor inflamatorii cronice ale intestinului și ale cancerului aferent. Acronim REPAIR, *membru* în proiect 2021-2023.
- ✓ Proiect **PN-III-P4-ID-PCE-2020-0818/195/2021**. Titlu: Liganzi P2X7R ca agenți terapeutici potențiali pentru tratamentul bolilor inflamatorii cronice ale intestinului și ale cancerului aferent. Acronim REPAIR, *stagiu de documentare* la Junia, Lille, Franța, aprilie-mai 2022.
- ✓ Proiect **UAIC-INOV-IMAP2**. Titlu: Susținerea competitivității în cercetare-dezvoltare și inovare prin dezvoltarea capacității instituționale a Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași. *Stagiu de cercetare* la Junia, Lille, Franța, martie 2022.
- ✓ Program **ERASMUS+ KA103 2019-2020**. Contract de finanțare nr. 2019-1-RO01-KA103-061892. *Stagiu de practică* student, Université Catholique De Lille, Yncréa- École des Hautes Études d’Ingénieur, Laboratoire Chimie durable et Santé, Lille, France, februarie-martie 2020.
- ✓ Proiect **PCDS-19-04**. Acord de colaborare între Yncréa Hauts-de-France - Lille, Franța și Universitatea „Alexandru Ioan Cuza”, Iași, România. Titlu: Synthèse et évaluation biologique de nouveaux composés hétérocycliques pour combattre la progéria. Acronim HOPE, *stagiu de cercetare* la Yncréa - École des Hautes Études d’Ingénieur, Laboratoire Chimie durable et Santé, Lille, France, aprilie-iunie 2020.
- ✓ 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. Cartwright, F.; Biddiss, M. *Bolile și istoria*. Editura All, **2008**.
3. *Understanding Cancer*. Accesat în iulie 2022, pe National Cancer Institute: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
5. *Metastatic Cancer: When Cancer Spreads*. Accesat în iulie 2022, pe National Cancer Institute: <https://www.cancer.gov/types/metastatic-cancer>
6. *Risk Factors for Cancer*. Accesat în iulie 2022, pe National Cancer Institute: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk>
7. *Types of Cancer Treatment*, Accesat în august 2022, pe National Cancer Institute: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>
8. Behrouzki, Z.; Joveini, Z.; Keshavarzi, B.; Eyvazzadeh, N.; Aghdam, R.-Z. *Oman Med J*. **2016**, *31*, 89-97.
9. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.-L.; Torre, L.-A.; Jemal, A. *CA Cancer J Clin*. **2018**, *68*(6), 394-424.
10. *Cancer*. Accesat în august 2022, pe World Health Organization: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
11. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Parkin, D.-M.; Pineros, M.; Znaor, A.; Bray, F. *Int. J. Cancer* **2021**, *149*, 778-789.
12. <https://clinicaltrials.gov/>, Accesat în August 2022.
58. Moise, I.-M.; Ghinet, A.; Belei, D.; Dubois, J.; Farce, A.; Bîcu, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2016**, *26*(15), 3730-3734.
149. Homerin, G.; Nica, A.-S.; Farce, A.; Dubois, J.; Ghinet, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2020**, *30*(11), 127149.
151. Moise, I.-M.; Bîcu, E.; Farce, A.; Dubois, J.; Ghinet, A. *Bioorg. Chem*. **2020**, *103*, 104184.
152. Gul, H.-I.; Yamali, C.; Gunesacar, G.; Sakagami, H.; Okudaira, N.; Uesawa, Y.; Kagaya, H. *Med. Chem. Res*. **2018**, *27*, 2366–2378.
155. Prinz, H.; Chamasmani, B.; Vogel, K.; Bohm, K.-J.; Aicher, B.; Gerlach, M.; Gunther, E.-G.; Amon, P.; Ivanov, I.; Muller, K. *J. Med. Chem*. **2011**, *54*, 4247-4263.
156. Ghinet, A.; Abuhaie, C.-M.; Gautret, P.; Rigo, B.; Dubois, J.; Farce, A.; Belei, D.; Bîcu, E. *Eur. J. Med. Chem*. **2015**, *89*, 115-127.
157. Fadda, A.-A.; Fekri, A.; Bayoumy, N.-M. *RSC Adv*. **2015**, *5*, 80844-80852.
158. Zubaș, A.; Ghineț, A.; Farce, A.; Dubois, J.; Bîcu, E. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 888.

160. Dumea, C.; Belei, D.; Ghinet, A.; Dubois, J.; Farce, A.; Bicu, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*(24), 5777-5781.
161. Lucescu, L.; Ghinet, A.; Belei, D.; Rigo, B.; Dubois, J.; Bîcu, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*(18), 3975-3979.
162. Kim, N.-D.; Park, E.-S.; Kim, Y.-H.; Moon, S.-K.; Lee, S.-S.; Ahn, S.-K.; Yu, D.-Y.; No, K.-T.; Kim, K.-H. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7092-7100.
163. Lucescu, L.; Bîcu, E.; Belei, D.; Dubois, J.; Ghinet, A. *Lett. Drug Des. Discov.* **2016**, *13*, 479-488.
164. Bâcu, E.; Samson-Belei, D.; Nowogrocki, G.; Couture, A.; Grandclaudeon, P. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*(13), 2377-2382.
165. Dumitrascu, F.; Georgescu, E.; Georgescu, F.; Filip, P.; Miu, B.; Dumitrescu, D. G. *Rev. Roum. Chim.* **2008**, *53*, 589-594
166. Tamuea, Y.; Sumida, Y.; Haruki, S.; Ikeda, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1973**, *1*, 2091-2095.
167. Armarego, W. L. F. *J. Chem. Soc.* **1964**, 4226-4233.
168. Cheng, M.; Yang, X.; Li, J.; Chen, C.; Zhao, J.; Wang, Y.; Sun, L. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 16196-16202.
169. Abuhaie, C.-M.; Bicu, E.; Rigo, B.; Gautret, P.; Belei, D.; Farce, A.; Ghinet, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 147-152.
170. Dascalu, A.-E.; Bîcu, E.; Shova, S.; Lipka, E.; Rigo, B.; Billamboz, M.; Ghinet, A. *ChemistrySelect* **2019**, *4*, 13724-13730.
171. Zhang, X.; Cao, W.; Wei, X.; Hu, H. *Synth. Commun.* **1997**, *27*(8), 1395-1403.
173. Xiao, H.; Xin, K.; Dou, H.; Yin, G.; Quan, Y.; Wang, R. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 1442-1445.
175. Kumari, P.; Mishra, V.-S.; Narayana, C.; Khanna, A.; Chakrabarty, A.; Sagar, R. *Sci Rep.* **2020**, *10*, 6660.
176. Manna, F.; Chimenti, F.; Fioravanti, R.; Bolasco, A.; Secci, D.; Chimenti, P.; Ferlini, C.; Scambia, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*(20), 4632-5.
177. Venugopala, K.-N.; Habeebuddin, M.; Aldhubiab, B.-E.; Asif, A.-H. *Molecules* **2021**, *26*, 5235.
178. Tilekar, K.; Upadhyay, N.; Meyer-Almes, F.-J.; Loiodice, F.; Anisimova, N.-Y.; Spirina, T.-S.; Sokolova, D.-V.; Smirnova, G.-V.; Choe, J. et al. *Chem. Med. Chem.* **2020**, *15*(19), 1813-1825.

179. Khodadad, H.; Pourshamsian, K.; Hatamjafari, F.; Sadeghi, B. *Rev. Roum. Chim.* **2020**, *65*(2), 165-171.
180. Eissa, A.-A.-M.; Aljamal, K.-F.-M.; Ibrahim, H.-S.; Abdelrasheed Allam, H. *Bioorg. Chem.* **2021**, *116*, 105318.
181. Pasha, M.-A.; Nagashree, S. *Ultrason. Sonochem.* **2014**, *21*(4), 1279-1283.
183. Mansour, S.-Y.; Sayed, G.-H.; Marzouk, M.-I.; Shaban, S.-S. *Synth. Commun.* **2021**, *51*(8), 1160-1170.
184. Fayed, E.-A.; Sabour, R.; Harras, M.-F.; Mehany, A.-B.-M. *Med. Chem. Res.* **2019**, *28*, 1284-1297.
185. Negru, G. *Teză de doctorat*, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza din Iasi”, **2023**.
186. Zhang, F.; Zhao, Y.; Sun, L.; Ding, L.; Gu, Y.; Gong, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*(7), 3149-57.
189. Belhadj, F.; Kibou, Z.; Cheikh, N.; Choukchou-Braham, N.; Villemin, D. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*(44), 5999-6002.
191. **Zubaș, A.**; Ghineț, A.; Shova, S.; Bîcu, E. *New J. Chem.* **2023**, *47*, 3758-3772.