

Łódź, dn. 05.06.2018

Mgr inż. Marlena Pięta

Promotor: prof. dr hab. inż. Tomasz Janecki

Promotor pomocniczy: dr inż. Jacek Kędzia

#### STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ

### **„Stereoselektywna synteza 3-metylidenodihydrochinolin-2(1*H*)-onów oraz 5-metylidenodihydrouracyli o aktywności cytotoksycznej”**

Heterocykle zawierające w swej strukturze szkielet uracylu oraz chinolin-2-onu posiadają wiele pożądanych właściwości biologicznych. Uracyl jest zasadą pirymidynową występującą naturalnie w kwasach rybonukleinowych. Używany jest w syntezie biologicznie aktywnych inhibitorów enzymów, oligonukleotydów i nukleozydów. Znaczna liczba doniesień literaturowych traktuje o aktywności cytotoksycznej uracyli. 5-Fluorouracyl, a w szczególności jego pochodna tegafur, są samodzielnie lub w kombinacji z cis-platyną szeroko stosowane w terapiach antynowotworowych. Wiele pochodnych uracylu posiada również właściwości przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne, owadobójcze oraz chwastobójcze. Wśród biologicznie aktywnych pochodnych chinolin-2-onu wyróżnić można arypiprazol - lek neuroleptyczny stosowany w leczeniu schizofrenii i epizodów maniakalnych w przebiegu choroby afektywnej dwubiegunowej. Rebamipid stosowany jest jako lek osłonowy śluzówki w chorobie wrzodowej przełyku i nieżycie żołądka. Repirinast jest lekiem antyhistaminowym.

Bardzo ważną grupą naturalnych i syntetycznych heterocykli o szerokiej gamie działania biologicznego są  $\alpha$ -alkilideno- $\gamma$ - i  $\delta$ -laktony i laktamy zawierające fragment wiązania *egzo*-alkilidenu sprzężonego z grupą karbonylową. Fragment ten jest odpowiedzialny za ich aktywność biologiczną, a w szczególności cytotoksyczną. Jak się powszechnie sądzi, mogą one działać jako akceptory Michaela i reagować z bionukleofilami, w szczególności z grupami merkaptanowymi cysteiny lub wolnym, wewnątrzkomórkowym glutationem. To wyjaśnia ich szeroką i zwykle bardzo silną aktywność biologiczną.

Jest prawdopodobne, że wiele niezbadanych heterocykli posiadających w swej strukturze fragment wiązania *egzo*-alkilidenu sprzężonego z grupą karbonylową będzie wykazywać aktywność antynowotworową. Dlatego wprowadzenie tego fragmentu farmakoforowego do szkieletu heterocyklicznego, który często występuje w związkach o udokumentowanym działaniu biologicznym, może prowadzić do otrzymania wyjątkowo aktywnych hybryd.

W zespole profesora Janeckiego już wielokrotnie udowodniono zasadność takiego podejścia. Jego zespół opracowuje metody syntezy fosforylowanych układów heterocyklicznych. W wyniku tych badań uzyskano już m.in. fosforylowane tetrahydrofuranony, pirolidynony, izoksazolidynony, pirazolony, pirydazony, chromenony i chinolin-4-ony. Otrzymane produkty zostały następnie wykorzystane jako reagenty w olefinacji aldehydu mrówkowego na drodze reakcji Hornera-Wadswortha-Emmons (HWE), co pozwoliło uzyskać struktury posiadające fragment wiązania *egzo*-metylidenowego sprzężonego z grupą karbonylową. Znaczna ilość spośród tych związków została poddana badaniom na aktywność cytotoksyczną (wobec linii komórkowych białaczki ludzkiej HL-60 i NALM-6, linii komórkowej raka piersi MCF-7 oraz innych), bakteriobójczą i grzybobójczą. Niektóre z nich wykazały obiecującą aktywność cytotoksyczną o wartości  $IC_{50}$  poniżej 1  $\mu$ M i są obiektem dalszych bardziej szczegółowych badań biologicznych.

Celem pracy doktorskiej było opracowanie efektywnych metod syntezy, również enancjoselektywnych, nowych hybrydowych układów, które mogą wykazywać pożądaną aktywność cytotoksyczną. Związki te miały być pochodnymi uracylu oraz chinolin-2-onu.

Pierwszym zadaniem była efektywna synteza 1-alkilo-3-dietoksyfosforylodihydrochinolin-2-onów oraz 1,3-dipodstawionych 5-dietoksyfosforylouracyli, które planowano uzyskać wykorzystując odpowiednie dietoksyfosforyloacetamidy. Następnie związki te miały zostać wykorzystane jako reagenty Hornera-Wadswortha-Emmons'a i przekształcone w serie 1,4-dipodstawionych 3-metylidenodihydrochinolin-2(1*H*)-onów i 1,3,6-tripodstawionych 5-metylidenodihydrouuracyli.

Kolejnym zadaniem postawionym w tej pracy była enancjoselektywna synteza serii 1,4-dipodstawionych 3-metylidenodihydrochinolin-2(1*H*)-onów i 1,3,6-tripodstawionych 5-metylidenodihydrouuracyli. Planowana strategia zakładała wykorzystanie pomocników chiralnych. Grupę dietoksyfosforylową w 1-alkilo-3-dietoksyfosforylodihydrochinolin-2-onach oraz 1,3-dipodstawionych 5-dietoksyfosforylouracylach zamierzano przekształcić w grupy bis(1-fenyletyloamino)fosforylowe z wykorzystaniem handlowo dostępnej (*R*)- oraz (*S*)-1-fenyletyloaminy, co pozwoliłoby uzyskać enancjomerycznie czyste diamidofosfoniany.

Podsumowując opisane wyniki należy stwierdzić, że wymienione we wstępie cele zostały w całości zrealizowane.

Kluczowe związki pośrednie w syntezie 1,4-dipodstawionych 3-metylidenodihydrochinolin-2(1*H*)-onów, 1-alkilo-3-dietoksyfosforylodihydrochinolin-2-ony, otrzymane zostały dwiema metodami. W obu przypadkach zmodyfikowano procedury opisane w literaturze dla analogicznych układów. W pierwszej, aldehyd *o*-aminobenzoesowy poddano reakcji kondensacji z chlorkiem dietoksyfosforyloacetanu, a powstały dietoksyfosforyloacetamid uległ wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji w obecności piperidyny, w wyniku czego otrzymano 3-dietoksyfosforylodihydrochinolin-2-on. Sumaryczna wydajność tej metody wyniosła 44%. Ten sam produkt otrzymano również przez kondensację Knoevenagla aldehydu *o*-nitrobenzoesowego z dietoksyfosforylooctanem etylu, a następnie redukcją grupy nitrowej w powstałym 2-dietoksyfosforylo-3-(2-nitrofenylo)akrylanie etylu z następującą spontanicznie wewnątrzcząsteczkową cyklizacją. Sumaryczna wydajność tej metody wyniosła 78%. Otrzymany 3-dietoksyfosforylodihydrochinolin-2-on poddano reakcji z halogenkami alkilowymi w warunkach zasadowych i otrzymano cztery 1-alkilo-3-dietoksyfosforylodihydrochinolin-2-ony (wyd. 59-70%). Addycja Michaela związków Grignarda do 1-alkilo-3-dietoksyfosforylodihydrochinolin-2-onów dająca 1,4-dipodstawione 3-dietoksyfosforylotetrahydrochinolin-2-ony z wydajnościami od 21 do 91%, a następnie wysoce efektywna olefinacja aldehydu mrówkowego metodą HWE (wyd. 73-96%) pozwoliły uzyskać czternaście 1,4-dipodstawionych 3-metylidenodihydrochinolin-2(1*H*)-onów. Związki te zostały poddane testom na aktywność cytotoksyczną wobec linii komórkowych ludzkiej białaczki szpikowej HL-60 oraz limfoblastycznej NALM-6, a także linii komórkowej raka piersi MCF-7 i wykazały umiarkowaną aktywność o wartościach  $IC_{50}$  od 40,2 do 405  $\mu$ M. Wyniki tych badań stanowią przedmiot publikacji **M. Pięta**, J. Kędzia, A. Janecka, D. K. Pomorska, M. Różalski, U. Krajewska, T. Janecki, "Novel synthesis and cytotoxic activity of 1,4-disubstituted 3-methylidene-3,4-dihydroquinolin-2(1*H*)-ones" *RSC Advances*, **2015**, 5, 78324-78335.

W celu otrzymania serii 1,3-dipodstawionych 5-dietoksyfosforylouracyli, kluczowych związków pośrednich w syntezie 1,3-di- oraz 1,3,6-tripodstawionych 5-metylidenodihydrouuracyli, opracowano metodę, w której substratami były *N*-podstawione dietoksyfosforyloacetamidy. Po poddaniu ich reakcji kondensacji z DMF-DMA, a następnie reakcji z pierwszorzędowymi aminami alifatycznymi i aromatycznymi otrzymane zostały *N,N'*-dipodstawione 3-amino-2-dietoksyfosforylopropenoamidy z dobrymi wydajnościami (50-82%). Produkty te w wyniku cyklizacji z fosgenem w zoptymalizowanych warunkach zostały przekształcone efektywnie w 1,3-dipodstawione 5-dietoksyfosforylouracyle (wyd. 68-90%). Związki te były dalej zmodyfikowane na dwóch szlakach reakcyjnych. W pierwszym, w wyniku redukcji wiązania podwójnego dającej 1,3-dipodstawione 5-dietoksyfosforylodihydrouacyle (wyd. 81-90%), a następnie olefinacji aldehydu mrówkowego (reakcja HWE, wyd. 45-95%) uzyskano czternaście 1,3-dipodstawionych 5-metylidenodihydrouuracyli. W drugim szlaku reakcyjnym, w reakcji addycji Michaela związków Grignarda do 1,3-dipodstawionych

5-dietoksyfosforylouracyli otrzymano 1,3,6-tripodstawione 5-dietoksyfosforylodihydrouracyle (wyd. 75-96%), z których następnie - również w reakcji HWE – uzyskanych zostało szesnaście 1,3,6-tripodstawionych 5-metylidenodihydrouracyli (wyd. 61-97%). Obie grupy związków, 1,3-di- oraz 1,3,6-tripodstawione 5-metylidenodihydrouracyle, zostały poddane testom na aktywność cytotoksyczną wobec linii komórkowych ludzkiej białaczki szpikowej HL-60 oraz limfoblastycznej NALM-6 oraz linii komórkowej raka piersi MCF-7 i wykazały wysoką aktywność o wartościach  $IC_{50}$  od 0,19 do 61,58  $\mu$ M. Część z wyników tych badań opublikowana została w artykule **M. Pięta**, J. Kędzia, T. Janecki "An efficient synthesis of 1,3-disubstituted 5-diethoxyphosphoryluracils" *Tetrahedron Lett.* **2015**, 56, 1891–1893.

W celu syntezy nieracemicznych 1,4-dipodstawionych 3-metylidenodihydrochinolin-2(1*H*)-onów 1-alkilo-3-dietoksfosforylochinolin-2-ony zostały przekształcone w chiralne 3-{{bis[(1-feniloetylo)-amino]}}fosforylo)dihydrochinolin-2-ony. W reakcji z 1-alkilo-3-dietoksfosforylodihydrochinolin-2-onów z pentachlorkiem fosforu powstały odpowiednie dichlorki kwasów fosfonowych, a w wyniku ich kondensacji z enancjomerycznie czystą (*R*)- i (*S*)-1-feniloetyloaminą, (*R,R*)- i (*S,S*)-3-{{bis[(1-feniloetylo)-amino]}}fosforylo)dihydrochinolin-2-ony z wydajnościami 44-82%. Następnie opracowane zostały warunki addycji odczynników Grignarda, w których 3-{{bis[(1-feniloetylo)-amino]}}fosforylo)dihydrochinolin-2-ony przekształcono w 1,4-dipodstawione 3-{{bis[(1-feniloetylo)amino]}}fosforylo)tetrahydrochinolin-2-ony w stosunkach diastereoizomerycznych od 71:29 do 92:8. Po ich oczyszczeniu z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej otrzymane zostały wzbogacone mieszaniny ze stosunkami diastereoizomerycznymi od 96:4 do 99:1. W wyniku reakcji HWE otrzymano szesnaście 1,4-dipodstawionych 3-metylidenodihydrochinolin-2(1*H*)-onów z wysokimi i bardzo wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi od 90 do 99% oraz bardzo dobrymi wydajnościami (62-96%). Wyniki tych badań stanowią przedmiot publikacji **M. Pięta**, J. Kędzia, J. Wojciechowski, T. Janecki „Asymmetric synthesis of 1,4-disubstituted 3-methylidene-dihydroquinolin-2(1*H*)-ones” *Tetr. Asymmetry* **2017**, 28, 567-576.

W celu syntezy nieracemicznych 1,3,6-tripodstawionych 5-metylidenodihydrouracyli wybrany 3-(4-bromofenilo)-5-dietoksyfosforylo-1-etylouracyl przekształcono w chiralne (*R,R*)- i (*S,S*)-5-{{bis[(1-feniloetylo)amino]}}fosforylo)uracyle. W tym celu 3-(4-bromofenilo)-5-dietoksyfosforylo-1-etylouracyl poddano reakcji z bromkiem trimetylosililowym, a następnie metanolizie otrzymując odpowiedni kwas fosfonowy. W reakcji z chlorkiem oksalilu produkt ten został przekształcony w dichlorek kwasu fosfonowego, z którego w wyniku kondensacji z enancjomerycznie czystą (*R*)- i (*S*)-1-feniloetyloaminą otrzymano (*R,R*)- i (*S,S*)-5-{{bis[(1-feniloetylo)amino]}}fosforylo)dihydrouracyle z wysokimi sumarycznymi wydajnościami 85%. Następnie opracowano warunki addycji odczynników Grignarda, w których związki te przekształcone zostały w 6-alkilo- lub 6-arylo-3-{{bis[(1-feniloetylo)amino]}}fosforylo)-3-(4-bromofenilo)-1-etylodihydrouracyle w stosunkach diastereoizomerycznych od 73:10:17 do 91:9. Przy wykorzystaniu chromatografii kolumnowej otrzymano wzbogacone mieszaniny ze stosunkami diastereoizomerycznymi od 93:0:7 do >99:1 i wydajnościami 50-60%. W wyniku reakcji HWE uzyskano osiem 6-alkilo- lub 6-arylo-3-(4-bromofenilo)-1-etylo-5-metylidenodihydrouracyli z bardzo wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi >99% i dobrymi wydajnościami 51-89%.

Obie grupy nieracemicznych związków - 1,4-dipodstawione 3-metylidenodihydrochinolin-2(1*H*)-ony oraz 1,3,6-tripodstawione 5-metylidenodihydrouracyle - poddane zostały testom na aktywność cytotoksyczną wobec linii komórkowych ludzkiej białaczki szpikowej HL-60 oraz limfoblastycznej NALM-6 oraz linii komórkowej raka piersi MCF-7. W większości par enancjomerów wartości aktywności cytotoksycznej wobec badanych linii były zbliżone. Jedynie w kilku przypadkach różniły się od dwu- do czterokrotnie.