

STRESZCZENIE

Synteza nowych diazafenotiazynowych pochodnych pirydyny i ich właściwości cytotoksyczne

Choroby nowotworowe stanowią obok schorzeń układu sercowo - naczyniowego, jeden z głównych problemów współczesnej medycyny. Pomimo ciągłego postępu w zakresie onkologii, obecnie stosowane leki chemioterapeutyczne nadal charakteryzują się wysoką toksycznością ogólnoustrojową. Ich wykorzystanie jest również limitowane przez wykształcanie oporności wielolekowej przez komórki nowotworowe. Ograniczenie inwazyjności metod leczenia oraz poprawa komfortu życia pacjenta stwarza potrzebę opracowywania nowych terapii przeciwnowotworowych. Trwają poszukiwania nowych leków zarówno pochodzenia naturalnego jak i syntetycznego. Równolegle prowadzone są prace nad modyfikacjami dotychczas stosowanych leków przeciwnowotworowych, w celu uzyskania pochodnych o wyższej skuteczności, specyficzności i mniejszych działaniach niepożądanych.

W Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej SUM prowadzone są badania nad pozyskiwaniem półsyntetycznych oraz syntetycznych związków wielopierścieniowych o właściwościach przeciwnowotworowych. W efekcie tych prac otrzymano m.in. szereg pochodnych chinobenzotiazyniowych, wykazujących aktywność antyproliferacyjną w stosunku do komórek nowotworowych. Została również opracowana nowa metoda tworzenia pierścienia tiazynowego, polegająca na cyklizacji betain o strukturze 1-alkilo-4-(fenyloamino)chinolinio-3-tiolanów.

Celem tej pracy była synteza nowych tetracyklicznych pochodnych diazafenotiazynowych, zawierających w cząsteczce pierścień pirydynowy oraz chinolinowy. Prowadząc reakcję bis-chlorku 5,12-(dimetylo)tiochinantrenodiiniowego **1** z pochodnymi 3-aminopirydyny otrzymano szereg chlorków 5-metylo-12*H*-chino[3,4-*b*]pirydo[5,6-*e*][1,4]tiazyniowych **3(a-j)** z wydajnością 36-84%.

Opracowano nową metodę syntezy chlorków pirydochinotiazyniowych **3** oraz **4** polegającą na reakcjach chlorku 1-metylo-3-benzoilotio-4-(butylotio)chinoliniowego **5** z 3-aminopirydynami. Reakcja pozwala w łagodnych warunkach eksperymentalnych otrzymać pochodne pirydochinotiazyniowe z wydajnością 60-86%.

Wykazano, że produktem przejściowym reakcji otrzymywania chlorków pirydochinotiazyniowych są 1-metylo-4-(3-pirydyloamino)chinolinio-3-tiolany **2**.

Przeprowadzając badania nad mechanizmem reakcji cyklizacji 1-metylo-4-(3-pirydyloamino)chinolinio-3-tiolanów **2** opracowano metodę otrzymywania nowego typu pochodnej pirydochinotiazyniowej **4a**, zawierającej endocykliczny atom azotu w pozycji 10-układu tetracyklicznego.

Działając na wodne roztwory chlorków pirydochinotiazyniowych **3** oraz **4** 5% roztworem NaHCO₃, przeprowadzono je w odpowiednie pochodne 5-metylo-5*H*-chino[3,4-*b*]pirydo[5,6-*e*][1,4]tiazynowe **6(a-j)** oraz 5-metylo-5*H*-chino[3,4-*b*]pirydo[3,4-*e*][1,4]tiazynę **6l**. Strukturę związków **6** modyfikowano poprzez wprowadzenie dodatkowej grupy metylowej do endocyklicznego atomu azotu w pozycji 8- oraz 10-układu pirydochinotiazyniowego. Otrzymano w ten sposób pięć nowych metylosiarczanów pirydochinotiazyniowych **11**.

Badania nad reakcjami metylosiarczanu 1-metylo-3,4-(dimetylotio)chinolinowego **9** z 3-aminopirydynami pozwoliły otrzymać sześć 1-metylo-3-metylotio-4-(3-pirydyloamino)-1,4-dihydrochinolin **8**, z wydajnością 38-58%. Działając na etanolowe roztwory związków **8** etanolowym roztworem chlorku amonu, przeprowadzono je w odpowiednie chlorki 1-metylo-3-metylotio-4-(3-pirydyloamino)chinoliniowe **10**, z wydajnością ilościową.

Strukturę otrzymanych produktów udowodniono metodami spektrometrii MS oraz spektroskopii ¹H, ¹³C NMR z wykorzystaniem metod dwuwymiarowych: HSQC, HMBC, NOESY, COSY. Dla pochodnych pirydochinotiazyniowych **3g** oraz **3j** przeprowadzono rentgenowską analizę strukturalną monokryształów. Uzyskane wyniki pozwoliły jednoznacznie potwierdzić strukturę związków **3**.

Otrzymane nowe związki **3**, **4**, **11** analizowano pod względem ich aktywności cytotoksycznej *in vitro* wobec ludzkich komórek nowotworowych linii A549, T47D, SNB-19 oraz linii komórek prawidłowych NHDF. Wszystkie pochodne wykazywały aktywność w stosunku do testowanych linii komórek nowotworowych.

Obserwowano wpływ podstawników w pierścieniu pirydynowym na właściwości cytotoksyczne.

Największy wpływ na wzrost cytotoksyczności pirydochinotiazyn miało wprowadzenie dodatkowej grupy metylowej do endocyklicznego atomu azotu. Niektóre z otrzymywanych związków wykazywały aktywność na poziomie wyższym niż stosowana jako związek referencyjny cisplatyny.

Pochodne 1-metylo-3-metylotio-4-(3-pirydyloamino)-1,4-dihydrochinolinowe **10** wykazywały aktywność cytotoksyczną na bardzo niskim poziomie. Związki **10b** oraz **10c**

przebadano pod względem ich właściwości przeciwdrobnoustrojowych wobec sześciu szczepów bakterii G(+) oraz sześciu szczepów bakterii G(-). W przypadku szczepu *S. aureus* oraz szczepu *M. Luteus* oba związki wykazywały aktywność (MIC) na poziomie gentamycyny.

Dla wybranych deskryptorów molekularnych przeprowadzono analizę zależności struktura-aktywność. W przypadku żadnego z parametrów fizykochemicznych wyznaczonych metodami obliczeniowymi, jak i dla parametru lipofilowości wyznaczonego doświadczalnie, nie uzyskano korelacji, która mogłaby być przydatna do dalszych badań nad projektowaniem oraz pozyskiwaniem związków o najlepszych właściwościach cytotoksycznych.

Reasumując, w ramach niniejszej pracy otrzymano 37 nowych związków organicznych, w tym: 25 nowych, nieopisanych dotąd tetracyklicznych pochodnych pirydochinotiazynowych oraz 12 nowych, nieopisanych dotąd pirydynowych pochodnych 4-aminochinolinowych. Otrzymane sole pirydochinotiazyniowe oraz sole chinoliniowe przebadano pod względem ich aktywności cytotoksycznej *in vitro* w stosunku do ludzkich linii komórek nowotworowych, przez co cel pracy został osiągnięty.

Słowa kluczowe: fenotiazyny, diazafenotiazyny, pochodne pirydyny, aktywność cytotoksyczna

ABSTRACT

Synthesis of newly diazaphenothiazine derivatives of pyridine and their cytotoxic activity

Next to cardiovascular diseases, cancer is one of the main challenges of modern medicine. Despite continuous progress in the field of oncology, currently applied chemotherapeutic drugs are still characterized by high systemic toxicity. Their use is also limited by the evolution of multi-drug resistance by cancer cells. Limiting the invasive capacity of treatment methods and improving the patient's quality of life creates the need to develop new cancer treatments. The search for new drugs of both natural and synthetic origin is underway. At the same time, work is underway to modify already existing anticancer drugs in order to obtain derivatives with higher efficacy, specificity and lower side effects.

The Department of Organic Chemistry of SUM is conducting research on obtaining semi-synthetic and synthetic polycyclic compounds with anti-cancer properties. As a result of these works a number of quinobenzothiazine derivatives that have antiproliferative activity against tumor cells have been obtained, as well a new method of thiazine ring formation has been developed consisting in cyclization of betaines with 1-alkyl-4-(phenylamino)quinolin-3-thiolate structure.

The purpose of this work was synthesis of new tetracyclic diazaphenothiazine derivatives containing a pyridine and quinoline ring in the molecule. Conducting the reaction of 5,12-(dimethyl)thioquinantrenediinium bis-chloride **1** with 3-aminopyridine derivatives, a series of 5-methyl-12*H*-quino[3,4-*b*]pyrido[5,6-*e*][1,4]thiazinium chloride was obtained **3(a-j)** with a yield of 36-84%.

A new method of synthesis of pyridoquinothiazinium chlorides **3** and **4** was developed consisting in the reaction of 1-methyl-3-benzoylthio-4-(butylthio)quinolinium chloride **5** with 3-aminopyridines. The reaction allows pyridoquinothiazinium derivatives to be obtained under mild experimental conditions with a yield of 60-86%.

Conducting research on the mechanism of cyclization reaction of 1-methyl-4-(3-pyridylamino)-quinolinio-3-thiolanes **2**, a method was prepared to obtain a new type of pyridoquinothiazinium derivative **4a**, containing an endocyclic nitrogen atom in the 10-position of the tetracyclic system.

By treating aqueous solutions of pyridoquinothiazine chlorides **3** and **4** with 5% NaHCO₃ solution, they were converted into a corresponding 5-methyl-5*H*-quino[3,4-*b*]pyrido[5,6-*e*][1,4]thiazine derivatives **6(a-j)** and 5-methyl-5*H*-quino[3,4-*b*]pyrido[3,4-*e*][1,4]thiazine **6l**. The structure of the compounds **6** was modified by introducing an additional methyl group into the endocyclic nitrogen at the 8- and 10-position of the pyridoquinothiazinium system. Five new pyridoquinothiazinium methyl sulfates **11** were obtained in this way.

Studies on the reactions of 1-methyl-3,4-(dimethylthio)quinoline sulfate **9** with 3-aminopyridines gave six 1-methyl-3-methylthio-4-(3-pyridylamino)-1,4-dihydroquinoline **8**, yielding 38-58%. By acting on ethanolic solutions of compounds **8** with ethanolic ammonium chloride solution, they were converted into the corresponding 1-methyl-3-methylthio-4-(3-pyridylamino)quinoline chloride **10** in quantitative yield.

The structure of the obtained products was proved by MS spectrometry and ¹H, ¹³C NMR spectroscopy using two-dimensional methods: HSQC, HMBC, NOESY, COSY. X-ray structural analysis of single crystals was performed for **3g** and **3j** pyridoquinothiazine derivatives. The obtained results allowed to unambiguously confirm the structure of compounds **3**.

The resulting new compounds **3**, **4**, **11** were analyzed for their *in vitro* cytotoxic activity against human tumor cells lines A549, T47D, SNB-19 and NHDF normal cell lines. All derivatives were active against the tumor cell lines tested.

The effect of substituents on the pyridine ring on cytotoxic properties has been observed. The introduction of an additional methyl group into the endocyclic nitrogen atom had the greatest impact on the increase in the cytotoxicity of pyridoquinothiazines. Some of the obtained compounds showed activity at a level higher than the one used as the reference compound of cisplatin.

1-Methyl-3-methylthio-4-(3-pyridylamino)-1,4-dihydroquinoline derivatives exhibited very low levels of cytotoxic activity. Compounds **10b** and **10c** were tested for their antimicrobial properties against six G(+) bacterial strains and six G(-) bacterial strains. Both *S. aureus* and *M. Luteus* were both active (MIC) at gentamicin levels.

Structure-activity relationship analysis was performed for selected molecular descriptors. In the case of none of the physicochemical parameters determined by computational methods, as well as for the experimentally determined lipophilicity parameter, no correlation was obtained that could be useful for further research on the design and acquisition of compounds with the best cytotoxic properties.

To sum up, as part of this work 37 new organic compounds were obtained, including 25 new, not yet described tetracyclic pyridoquinothiazine derivatives and 12 new, not yet described pyridine 4-aminoquinoline derivatives. The pyridoquinothiazinium salts and quinoline salts obtained were tested for their *in vitro* cytotoxic activity in relation to human tumor cell lines, thus the aim of the work was achieved.

Key words: phenothiazines, diazaphenothiazines, pyridine derivatives, cytotoxic activity