



**UNIWERSYTET MEDYCZNY**  
**IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU**

**WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY**

**mgr Izabela Jęskowiak**

**SYNTEZA NOWYCH POCHODNYCH IZOTIAZOLU O POTENCJALNEJ AKTYWNOŚCI  
PRZECIWNOWOTWOROWEJ**

The synthesis of new isothiazole derivatives with potential anticancer activity

Rozprawa doktorska wykonana  
w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej  
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

Promotor rozprawy: prof. dr hab. n. farm. Stanisław Ryng

Promotor pomocniczy: dr hab. n. farm. Marcin Mączyński

Prace zrealizowano w ramach grantu promotorskiego dla Młodych Naukowców  
Nr STM.D090.17.003

**Wrocław 2020**

## STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Każdego roku na świecie w wyniku choroby nowotworowej umiera 7,6 mln osób, a do 2030 roku liczba ta może wzrosnąć nawet do 17 mln rocznie. Tymczasem cały czas trwają intensywne poszukiwania związków przeciwnowotworowych, które wywołają rewolucję w onkologii. Nadal chemioterapia jest jedną z najskuteczniejszych i najczęściej stosowanych metod walki z chorobami nowotworowymi. Do wprowadzenia w leczeniu wielu nowych syntetycznych leków przyczyniło się między innymi odkrycie istnienia zależności między strukturami związków chemicznych, a ich aktywnością biologiczną. Najpopularniejszymi metodami poszukiwania nowych związków, mogących wykazywać aktywność farmakologiczną, są zmiany w obrębie znanych struktur przez zastąpienie fragmentu jednej cząsteczki innym bądź zaprojektowanie nowej struktury z zachowaniem grup warunkujących aktywność biologiczną.

Głównym celem pracy badawczej było przeprowadzenie przeglądu literatury pochodnych izotiazolu wskazującego na potencjał terapeutyczny tej grupy związków ze szczególnym uwzględnieniem struktur o aktywności przeciwnowotworowej, a także opracowanie metod syntezy i otrzymanie pochodnych izotiazolu o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej oraz wykazanie wpływu struktury otrzymanych związków na aktywność przeciwnowotworową. Zaplanowane kierunki modyfikacji pierścienia izotiazolu dotyczyły pozycji 4 i 5 kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego.

Przedmiotem moich badań była synteza dwóch serii związków o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Związki otrzymano poprzez modyfikację struktury wyjściowej tj. kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego w pozycji 4 i 5 z zachowaniem stałego fragmentu 3-metyloizotiazolu. Łącznie otrzymano 39 nowych, wcześniej nieopisanych pochodnych izotiazolowych tj. kwas 5-hydrazyno-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowy, 5-podstawione pochodne kwasu 5-hydrazyno-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego (25 związków) oraz *N'*-podstawione pochodne hydrazynu kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego (14 związków). Na początku zaprojektowano serię 5-podstawionych pochodnych kwasu 5-hydrazyno-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego przez modyfikację pozycji 5 kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego otrzymując kwas 5-hydrazyno-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowy. Nieopisany wcześniej kwas 5-hydrazyno-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowy uzyskano w wyniku reakcji substytucji nukleofilowej kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego z bezwodną hydrazyną. Nowe 5-podstawione pochodne kwasu 5-hydrazyno-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego

uzyskano w wyniku reakcji addycji nukleofilowej odpowiednich związków karbonylowych z kwasem 5-hydrazyno-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowym. Natomiast *N'*-podstawione pochodne hydrazydu kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego otrzymano przez modyfikację pozycji 4 kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego. Opracowano nową, nieopisaną w literaturze metodę syntezy hydrazydu kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego. W wyniku substytucji nukleofilowej uzyskano nietrwały azyd kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego w reakcji azydki sodu z chlorkiem kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego. Hydrazyd kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego otrzymano w reakcji azydki kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego z bezwodną hydrazyną. *N'*-podstawione pochodne hydrazydu kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego uzyskano w reakcji addycji nukleofilowej hydazydu kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego z odpowiednimi związkami karbonylowymi.

Identyfikację struktury otrzymanych związków przeprowadzono za pomocą spektrometrii mas oraz badań spektroskopowych magnetycznego rezonansu jądrowego protonu  $^1\text{H}$  NMR oraz węgla  $^{13}\text{C}$  NMR, a także spektroskopii w podczerwieni IR. W przypadku wybranych *N'*-podstawionych pochodnych hydazydu kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego dodatkowo wykonano widma korelacji heterojądrowej  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  2D NMR, analizę elementarną oraz badania rentgenostrukturalne, które wykazały, że w cieple stałym otrzymane *N'*-podstawione pochodne hydazydu kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego występują w formie izomerycznej *trans* (*E*). We wszystkich zsyntetyzowanych pochodnych tej serii występują podwójne sygnały od protonów w widmach  $^1\text{H}$  NMR oraz węgli w widmach  $^{13}\text{C}$  NMR, które mogą pochodzić od izomerów konfiguracyjnych *E/Z* na wiązaniu podwójnym  $\text{C}=\text{N}$ .

Aktywność przeciwnowotworową zsyntetyzowanych związków wykazano w dwóch testach antyproliferacyjnych - teście redukcji soli tetrazolowej (MTT) oraz teście z sulforodaminą B (SRB). W badaniach wykorzystano 4 ludzkie linie komórek nowotworowych: ostrej białaczki bifenotypowej mielomonocytovej MV4-11 (w teście MTT), gruczolaka okrężnicy LoVo, opornego na Doksorubicynę LoVo/DX gruczolaka okrężnicy, gruczolaka piersi MCF-7 oraz normalną, nienowotworową linię komórkową nabłonka pochodzącego z gruczołu piersiowego MCF-10A (w teście SRB). Jako lek referencyjny wybrano 5-Fluorouracyl dla 5-podstawionych pochodnych kwasu 5-hydrazyno-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego oraz Cisplatynę dla *N'*-podstawionych pochodnych hydazydu kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego. Aktywność

przeciwproliferacyjną oszacowano na podstawie wartości  $IC_{50}$  czyli takiego stężenia badanej substancji, które prowadzi do zahamowania proliferacji 50% wszystkich komórek.

Kwas 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowy, który jest wspólnym substratem dla dwóch serii pochodnych charakteryzuje się znikomą aktywnością przeciwnowotworową. Podobnie jak otrzymane z niego substraty do syntezy pochodnych kwasu 5-hydrazyno-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego oraz pochodnych hydrazynu kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego. Związki serii 5-podstawionych pochodnych kwasu 5-hydrazyno-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego charakteryzują się zdecydowanie niższymi wartościami  $IC_{50}$  w stosunku do linii nowotworowych jelita grubego jak i nowotworu piersi w porównaniu do związków serii  $N'$ -podstawionych pochodnych hydrazynu kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego, aczkolwiek obie serie związków charakteryzują się działaniem przeciwproliferacyjnym.

Pochodne kwasu 5-hydrazyno-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego powodują wysokie zahamowanie proliferacji komórek ludzkiej białaczki bifenotypowej monomielocytowej MV4-11 (13 związków) na poziomie powyżej 0,99  $\mu\text{g/mL}$ , komórek raka jelita grubego LoVo (8 związków) na poziomie  $IC_{50}$  poniżej 10  $\mu\text{g/mL}$  oraz komórek raka jelita grubego opornego na Doksorubicynę LoVo/DX (12 związków), gdzie  $IC_{50}$  jest poniżej 4,5  $\mu\text{g/mL}$ . Tylko jeden i zarazem najaktywniejszy związek serii  $N'$ -podstawionych pochodnych hydrazynu kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego tj. 5-chloro- $N'$ -[(1*E*,2*E*)-(3-fenyloprop-2-en-1-ylideno)]3-metyloizotiazolo-4-karbohydrazyn charakteryzował się wartością  $IC_{50}$  poniżej 8  $\mu\text{g/mL}$  w stosunku do linii komórkowej raka jelita grubego LoVo. Dla pozostałych związków tej serii wartości  $IC_{50}$  wyznaczone w stosunku do wszystkich badanych linii osiągają wartości powyżej 10  $\mu\text{g/mL}$ . Ze względu na interesujące wyniki badań biologicznych związków serii 5-podstawionych pochodnych kwasu 5-hydrazyno-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego. Pochodne izotiazolu tej grupy zabezpieczono polskim i międzynarodowym zgłoszeniem patentowym o numerach P.426618 oraz PCT/PL2019/050045.

Podsumowując, aktywność antyproliferacyjna zsyntetyzowanych związków dwóch serii jest głównie związana z obecnością grupy azometinowej z podstawnikiem o odpowiednim rozmiarze i kształcie. Preferowanymi podstawnikami przy wiązaniu azometinowym w pochodnych 3-metyloizotiazolu są 3-fenyloprop-2-en-1-ylidenowy bądź fenyłowy podstawiony w pozycji 3 szczególnie atomem chloru albo grupą metoksyłową. Zdolność otrzymanych związków do przełamania lekooporności badanych linii komórek nowotworowych potwierdzono przez niskie wartości współczynników lekooporności, które

charakteryzowały się wartościami niższymi od 2. Korzystniejsze jest położenie grupy azometinowej CH=N- w pozycji 5 izotiazolu w zasadach Schiffa niż w pozycji 4 pierścienia izotiazolu w pochodnych hydrazydowych dla aktywności antyproliferacyjnej. Może to być spowodowane większą odległością wiązania azometinowego od atomów siarki i azotu w pochodnych hydrazydu kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksyłowego.

Pracę badawczą zrealizowano, dzięki projektowi promotorskiemu dla Młodych Naukowców (Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, STM D0.90.17.003). Badania rentgenostrukturalne przeprowadzono w Zakładzie Krystalografii Uniwersytetu Wrocławskiego oraz Katedrze i Zakładzie Technologii Leków Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Badania biologiczne otrzymanych związków przeprowadzono w Laboratorium Doświadczalnym Terapii Przeciwnowotworowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.