

Imię i nazwisko autora rozprawy: **Małgorzata Ryczkowska**

Dyscyplina naukowa: **Chemia**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: **Synteza małowcząsteczkowych pochodnych 2-pirydonu wykazujących właściwości przeciwnowotworowe oraz przeciwbakteryjne**

Tytuł rozprawy w języku angielskim: **Synthesis of low-molecular-weight 2-pyridone derivatives with anticancer and antibacterial properties**

Promotor

podpis

dr hab. Sławomir Makowiec, prof. uczelni

Gdańsk, rok 2023

OŚWIADCZENIE

Autor rozprawy doktorskiej: **Małgorzata Ryczkowska**

Ja, niżej podpisana, oświadczam, iż jestem świadoma, że zgodnie z przepisem art. 27 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (t.j. Dz.U. z 2021 poz. 1062), uczelnia może korzystać z mojej rozprawy doktorskiej zatytułowanej:
„Synteza małowcząsteczkowych pochodnych 2-pirydonu wykazujących właściwości przeciwnowotworowe oraz przeciwbakteryjne” do prowadzenia badań naukowych lub w celach dydaktycznych.¹

Świadoma odpowiedzialności karnej z tytułu naruszenia przepisów ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych i konsekwencji dyscyplinarnych określonych w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2021.478 t.j.), a także odpowiedzialności cywilno-prawnej oświadczam, że przedkładana rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie.

Oświadczam, że treść rozprawy opracowana została na podstawie wyników badań prowadzonych pod kierunkiem i w ścisłej współpracy z promotorem dr hab. Sławomirem Makowcem, prof. uczelni

Niniejsza rozprawa doktorska nie była wcześniej podstawą żadnej innej urzędowej procedury związanej z nadaniem stopnia doktora.

Wszystkie informacje umieszczone w ww. rozprawie uzyskane ze źródeł pisanych i elektronicznych, zostały udokumentowane w wykazie literatury odpowiednimi odnośnikami, zgodnie z przepisem art. 34 ustawy o prawie autorskim i prawach pokrewnych.

Potwierdzam zgodność niniejszej wersji pracy doktorskiej z załączoną wersją elektroniczną.

Gdańsk, dnia 11.09.2023

podpis doktoranta

Ja, niżej podpisana, wyrażam zgodę na umieszczenie ww. rozprawy doktorskiej w wersji elektronicznej w otwartym, cyfrowym repozytorium instytucjonalnym Politechniki Gdańskiej.

Gdańsk, dnia 11.09.2023

podpis doktoranta

¹ Art. 27. 1. Instytucje oświatowe oraz podmioty, o których mowa w art. 7 ust. 1 pkt 1, 2 i 4–8 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, mogą na potrzeby zilustrowania treści przekazywanych w celach dydaktycznych lub w celu prowadzenia działalności naukowej korzystać z rozpowszechnionych utworów w oryginale i w tłumaczeniu oraz zwielokrotniać w tym celu rozpowszechnione drobne utwory lub fragmenty większych utworów.

2. W przypadku publicznego udostępniania utworów w taki sposób, aby każdy mógł mieć do nich dostęp w miejscu i czasie przez siebie wybranym korzystanie, o którym mowa w ust. 1, jest dozwolone wyłącznie dla ograniczonego kręgu osób uczących się, nauczających lub prowadzących badania naukowe, zidentyfikowanych przez podmioty wymienione w ust. 1.





OPIS ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Autor rozprawy doktorskiej: Małgorzata Ryczkowska

Tytuł rozprawy doktorskiej w języku polskim: Synteza małowcząsteczkowych pochodnych 2-pirydonu wykazujących właściwości przeciwnowotworowe oraz przeciwbakteryjne

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Synthesis of low-molecular-weight 2-pyridone derivatives with anticancer and antibacterial properties

Język rozprawy doktorskiej: polski

Promotor rozprawy doktorskiej: dr hab. Sławomir Makowiec, prof. uczelni

Data obrony:

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku polskim: tetrahydrochinolony, tetrahydrochinoliny, pirydony, pilicydy, synteza „one-pot”

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku angielskim: tetrahydroquinolones, tetrahydroquinolines, pyridones, pilicides, „one-pot” synthesis

Streszczenie rozprawy w języku polskim: Tematyka i cel badawczy niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczy syntezy chemicznej związków heterocyklicznych z grupy 2-pirydonu wykazujących potencjał przeciwbakteryjny oraz przeciwnowotworowy. W części teoretycznej podjęto tematykę znanych fluorochinolonów oraz chinolonów wykazujących aktywność przeciwnowotworową. Dodatkowo przedstawiono nowe metody syntezy chinolonów niewymagające stosowania katalizatorów metali przejściowych oraz opublikowane na przestrzeni ostatnich 15 lat. W części badań własnych przedstawiono syntezę arylokarbamoilowych pochodnych 4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu oraz badania mające na celu poznanie mechanizmu demetylowania podczas acylowania 2-metoksy-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-olu izocyjanianami fenylowymi. Przedstawiono w niej również syntezę 4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onów modyfikowanych w pozycji 3 podstawnikami typu benzylowego. Ponadto opisano nową metodę syntezy typu „one-pot” rdzeni 4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu, zbadano mechanizm powstawania trójcyklicznych pochodnych oraz przedstawiono funkcjonalizację pilicydu grupami o charakterze hydrofilowym. W części eksperymentalnej przedstawiono procedury syntezy oraz analizę spektralną wszystkich otrzymanych związków.

Streszczenie rozprawy w języku angielskim: The subject and research goal of the presented doctoral dissertation concern the chemical synthesis of heterocyclic compounds from the 2-pyridone group with antibacterial and/or anticancer potential. The theoretical part discusses known fluoroquinolones and quinolones with anticancer activity. In addition, new methods for the synthesis of quinolones published over the last 15 years that do not require the use of transition metal catalysts are presented. Part of my own research presents the synthesis of arylcarbamoyl derivatives of 4-phenyl-5,6,7,8-tetrahydroquinolin-2(1H)-one and studies aimed at understanding the mechanism of demethylation during acylation of 2-methoxy-5,6,7,8-tetrahydroquinolin-8-ol with phenyl isocyanates. It also presents the synthesis of 4-phenyl-5,6,7,8-tetrahydroquinolin-2(1H)-ones modified in position 3 with benzyl-type substituents. Moreover, a new one-pot synthesis method of 4-phenyl-5,6,7,8-tetrahydroquinolin-2(1H)-one cores was described, the mechanism of formation of tricyclic derivatives was investigated, and the functionalization of pylicide with hydrophilic groups was presented. The experimental part presents the synthesis procedures and spectral analysis of all obtained compounds.





Z najgłębszych pokładów serca pragnę podziękować:

*Promotorowi niniejszej rozprawy doktorskiej, **dr hab. Sławomirowi Makowcowi** za nieocenione wsparcie, wyrozumiałość, opiekę oraz bezbłędne poczucie humoru, jakimi zostałam obdarzona podczas wspólnie prowadzonych badań naukowych. Bardzo wiele Panu zawdzięczam... Dziękuję.*

*Mojej **Rodzinie**: Mamie Grażynie, bratu Tomaszowi, Karinie, Babci Lucji, a zwłaszcza śp. Dziadkowi Stanisławowi za nieustającą wiarę we mnie i wsparcie w dążeniu do celu.*

*Mojemu **Michałowi** za wyjątkową umiejętność podnoszenia mnie na duchu, inspirowania oraz motywowanie do działania.*

*Jedynej w swoim rodzaju ekipie **LABu 111**: Ani, Alicji, Agacie, Ewelinie, a w szczególności Angeli za wspólnie spędzony czas przy laboratoryjnym stole, szczerze rozmowy i niezwykłą przyjaźń.*

*Pani **Angelice Chiliczkowskiej** za ogromne wsparcie terapeutyczne oraz mentoring w najtrudniejszych momentach tej drogi...*

M.



Wstęp autorki

Niniejsza rozprawa doktorska zatytułowana „Synteza małowymagających pochodnych 2-pirydonu wykazujących właściwości przeciwnowotworowe oraz przeciwbakteryjne” stanowi opis badań naukowych przeprowadzonych w ramach studium doktoranckiego zrealizowanego w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. Tematyka badawcza dotyczy syntezy chemicznej związków heterocyklicznych z grupy 2-pirydonu wykazujących potencjał przeciwbakteryjny oraz przeciwnowotworowy.

Z uwagi na obszerny zakres tematyczny we wstępie teoretycznym, który ma charakter przeglądowy, odniesiono się do najważniejszych i najciekawszych aspektów z punktu widzenia autorki związanych z omawianą grupą związków, które jednocześnie korespondują z tematyką badań własnych. W części tej znajdują się podrozdziały 1.1.1 oraz 1.1.2 poświęcone dobrze poznanym fluorochinolonom, które nierzadko stanowią wzór, na którego bazie projektowane są nowe związki z grupy chinolonów o właściwościach przeciwbakteryjnych. Podrozdziały 1.1.3 oraz 1.1.4 zostały poświęcone chinolonom wykazującym właściwości przeciwnowotworowe. W dalszej części, w podrozdziale 1.2 przedstawiono kilkanaście nowych metod syntezy rdzeni chinolonowych niewymagających wykorzystania katalizatorów metali przejściowych, które opublikowano na przestrzeni ostatnich 15 lat.

W rozdziale 3 opisano przebieg i wyniki przeprowadzonych eksperymentów z zakresu syntezy organicznej oraz badań nad poznaniem mechanizmów reakcji. W rozdziale tym przedstawiono proces projektowania oraz syntezę arylokarbamidowych pochodnych 4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu oraz badania mające na celu poznanie mechanizmu usuwania grupy metylowej z 2-metoksy-4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-olu podczas otrzymywania arylokarbaminianów 2-okso-4-fenyl-1,2,5,6,7,8-heksahydrochinolin-8-ylu. W rozdziale tym opisano również syntezę 3-podstawionych pochodnych 4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu oraz funkcjonalizację prekursorami hydrofilowymi jednego ze znanych w literaturze pilicydów. Dodatkowo przedstawiono proces opracowania nowej metody syntezy typu „one-pot” rdzeni 4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu niewymagającej zastosowania katalizatorów metali przejściowych oraz opisano przebieg badań mechanizmu otrzymywania niespodziewanych trójcyklicznych produktów.



W rozdziale 6 umieszczono odnośniki do opublikowanych suplementów dotyczących syntezy arylokarbamoiowych oraz 3-podstawionych pochodnych 4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu. Umieszczono w nim także procedury otrzymywania pochodnych 4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu na drodze syntezy „one-pot”, ich analizę spektralną oraz procedury otrzymywania i analizę spektralną pochodnych pilicydu.

Rozdziały 4 oraz 5 przedstawiają podsumowanie otrzymanych wyników badań oraz wykaz dorobku naukowego, natomiast Dodatek A i B stanowią publikacje naukowe dotyczące prezentowanej rozprawy doktorskiej.

Spis treści

Wykaz akronimów i skrótów	11
1. Wprowadzenie	13
1.1. Chinolony w chemii medycznej – wybrane aspekty	13
1.1.1. Początki	13
1.1.2. Fluorochinolony.....	14
Mechanizm działania chemoterapeutyków fluorochinolonowych	17
1.1.3. Chinolony o właściwościach przeciwnowotworowych	19
Chinolony a terapia fotodynamiczna	20
Kompleksy chinolonów z jonami metali	22
Hybrydy chinolonów – wybrane przykłady	25
1.1.4. Chinolony we współczesnych badaniach klinicznych.....	30
Voreloxin	30
Tasquinimod	30
Quarfloxin	31
Fluorochinolony IV generacji	32
1.2. Nowe metody syntezy rdzeni chinolonowych wolne od użycia katalizatorów metali przejściowych	34
1.2.1. Synteza rdzenia chinolin-2(1H)-onu	35
Kondensacja z wykorzystaniem kwaśnego katalizatora.....	35
Inne metody syntezy rdzenia chinolin-2(1H)-onu	37
1.2.2. Synteza rdzenia chinolin-4(1H)-onu	39
2. Cele badawcze	43
3. Badania własne	44
3.1. Arylokarbamoilowe pochodne 4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu.....	44
3.1.1. Projektowanie ścieżki syntezy	44
3.1.2. Synteza arylokarbamoilowych pochodnych 4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu	46
3.1.3. Badanie mechanizmu usuwania grupy metylowej podczas otrzymywania arylokarbaminianów 2-metoksy-4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-ylu.....	48
Badania z zastosowaniem spektroskopii NMR	52
3.2. Synteza 4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onów modyfikowanych w pozycji 3 podstawnikami typu benzylowego.....	55
3.3. Opracowanie nowej metody syntezy typu „one-pot” rdzeni 4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu.....	58
3.3.1. Projektowanie ścieżki syntezy	58
3.3.2. Synteza typu „one-pot” pochodnych 4-fenylo-6,8-dihydrochinolin-2,5(1H)-dionu	59
3.3.3. Badanie mechanizmu powstawania pochodnych 9-hydroksy-11,11-dimetylo-11,12-dihydro(4H)-[1,3]oksazino[2,3-j]chinolin-4,8(10H)-dionu	62

3.4. Funkcjonalizacja pochodnej 2,3-dihydrothiazolo[3,2- α]pirydyn-5-onu ugrupowaniami o charakterze hydrofilowym	65
4. Podsumowanie.....	69
5. Wykaz dorobku naukowego.....	70
6. Część eksperymentalna.....	72
6.1. Pochodne 4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu	72
6.2. 3-Substytuowane pochodne 4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu	72
6.3. Pochodne 4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu otrzymane na drodze syntezy typu „one-pot”	72
6.3.1. Procedura otrzymywania pochodnych 1,6,7,8-tetrahydrochinolin-2,5-dionu	73
6.3.2. Procedura otrzymywania pochodnych N-(5,5-dimetylo-3-oksocykloheksen-1-yl)-3-oksopropanamidu.....	76
6.4. Pochodne 7-(1-naftylmetylo)-5-okso-8-fenyl-2,3-dihydrothiazolo[3,2- α]pirydyno-3-karboksylanu metylu	77
6.4.1. Procedura otrzymywania 6-jodo-7-(1-naftylmetylo)-5-okso-8-fenyl-2,3-dihydrothiazolo[3,2- α]pirydyno-3-karboksylanu metylu (117)	77
6.4.2. Procedura otrzymywania 6-winylo pochodnych 7-(1-naftylmetylo)-5-okso-8-fenyl-2,3-dihydrothiazolo[3,2- α]pirydyno-3-karboksylanu metylu (118a,b)	78
6.4.3. Procedura otrzymywania kwasów 6-[(E)-2-winylo]-7-(1-naftylmetylo)-5-okso-8-fenyl-2,3-dihydrothiazolo[3,2- α]pirydyno-3-karboksylowych (119a,b)	79
Literatura	81
Dodatek A	
Dodatek B	

Wykaz akronimów i skrótów

A:H	–	octan etylu : heksan
ACN	–	acetonitryl
AcOEt	–	octan etylu
AcOH	–	kwask octowy
Ac₂O	–	bezwodnik octowy
ATP	–	adenozyno-5'-trifosforan (ang. <i>adenosine-5'-triphosphate</i>)
C:M	–	dichlorometan : metanol
(COCl)₂	–	chlerek oksalilu
DCB	–	dichlorobenzen
DCE	–	dichloroetan
DCM	–	dichlorometan
DDQ	–	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzochinon (ang. <i>2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone</i>)
DIPEA	–	N, N-diizopropylloetyloamina
DMF	–	N,N-dimetyloformamid
DMSO	–	dimetylosulfotlenek (ang. <i>dimethyl sulfoxide</i>)
DNA	–	kwask deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTA	–	N,N-dimetylotrifluoroacetamid
EDG	–	grupa elektronodonorowa (ang. <i>electron donating group</i>)
FDA	–	Agencja Żywności i Leków (ang. <i>Food and Drug Administration</i>)
GI₅₀	–	stężenie hamujące wzrost 50% komórek (ang. <i>growth inhibition of 50% of cells</i>)
HOMO	–	najwyższy zajęty orbital molekularny (ang. <i>highest occupied molecular orbital</i>)
IC₅₀	–	połowa maksymalnego stężenia hamującego (ang. <i>half-maximal inhibitory concentration</i>)
KO^tBu	–	<i>tert</i> -butanolan potasu
MeOH	–	metanol
miRNA	–	mikroRNA
MS	–	spektrometria mas (ang. <i>mass spectrometry</i>)

MsCl	–	chlorek metanosulfonowy
MTT	–	bromek 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-yl)-2,5-difenylotetrazolowy
NEt₃, TEA	–	trietyloamina
NIS	–	N-jodosukcynoimid
NMR	–	spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
PhP(O)Cl₂	–	dichlorek fenylofosfonowy
PPA	–	kwas polifosforowy (and. <i>polyphosphoric acid</i>)
RNA	–	kwas rybonukleinowy (ang. <i>ribonucleic acid</i>)
RT	–	temperatura pokojowa (and. <i>room temperature</i>)
SAR	–	zależność struktura-aktywność (ang. <i>structure - activity relationship</i>)
SET	–	przeniesienie pojedynczego elektronu (ang. <i>single electron transfer</i>)
SN₂	–	substytucja nukleofilowa dwucząsteczkowa
TBHP	–	wodoronadtlenek <i>tert</i> -butylu (ang. <i>tert-butyl hydroperoxide</i>)
TEMPO	–	2,2,6,6-tetrametylo-1-oksopiperydyna (ang. <i>tetramethylpiperidine N-oxyl</i>)
TFA	–	kwas trifluorooctowy (ang. <i>trifluoroacetic acid</i>)
Tf₂O	–	bezwodnik triflatowy
THF	–	tetrahydrofuran
TLC	–	cienkowarstwowa chromatografia cieczowa (ang. <i>thin layer chromatography</i>)
T:M:C	–	toluene : methanol : dichlorometan
TsOH	–	kwas <i>p</i> -toluenosulfonowy

1. Wprowadzenie

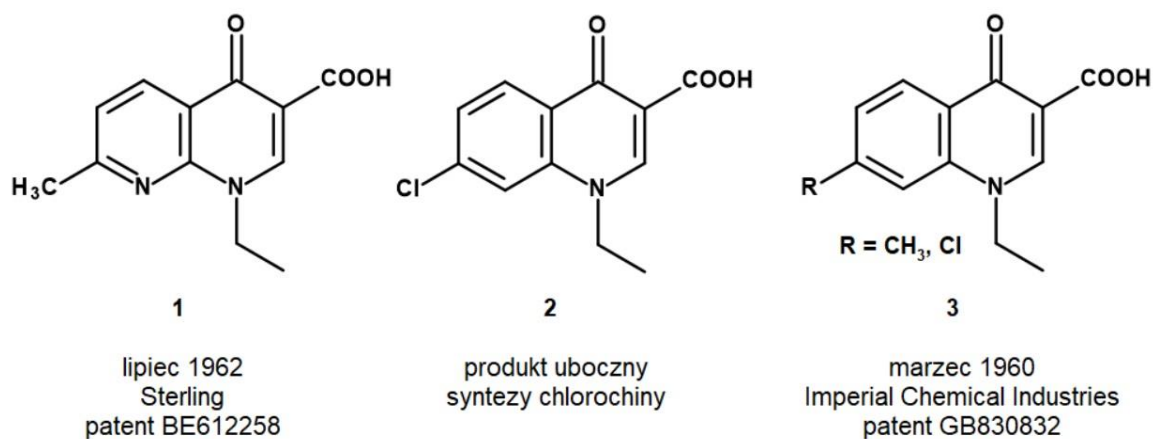
Pirydony reprezentują jedną z najistotniejszych klas związków heterocyklicznych zawierających atom azotu. Pod względem strukturalnym zbudowane są z 6-członowego pierścienia aromatycznego o wzorze sumarycznym C_5H_5NO . Rdzeń pirydonowy powszechnie występuje w naturze, jednakże najczęściej stanowi fragment bardziej rozbudowanych układów. Jednym z nich są chinolony, czyli pirydony bicykliczne, w których drugi pierścień stanowi benzen. Chinolony stanowią bardzo obszerną grupę związków o szerokim potencjale medycznym^{1,2}. Leki z grupy chinolonów od początku swego istnienia są jedną z najważniejszych klas chemoterapeutyków stosowanych w leczeniu. W grupie tej można znaleźć m.in. dobrze poznane leki przeciwbakteryjne³, przeciwmalaryczne⁴, przeciwgrzybowe⁵, czy przeciwnowotworowe⁶. Związki te wykazują również aktywność przeciwwirusową^{7,8}. Synteza chemiczna rdzeni chinolonowych z reguły nie następuje z problemów technicznych i jest szeroko rozpowszechniona we współczesnej chemii medycznej, organicznej, czy metaloorganicznej.

1.1. Chinolony w chemii medycznej – wybrane aspekty

1.1.1. Początki

W znacznej większości prac poświęconych chinolonom można przeczytać, iż era chemoterapeutyków chinolonowych rozpoczęła się od odkrycia kwasu nalidyksowego (**1**) (Rys.1). Związek ten został opisany w 1962 roku przez Georga Y. Leshera i współpracowników ze Sterling-Winthrop Research Institute w Nowym Jorku jako jedna z pochodnych kwasu 1-alkilo-1,18-naftyrydyn-4-on-3-karboksylowego. W badaniach biologicznych przeprowadzonych przez badaczy kwas nalidyksowy wykazał aktywność bakteriostatyczną głównie wobec bakterii Gram-ujemnych, a samo jego zastosowanie terapeutyczne ograniczało się do terapii bakteryjnych zakażeń dróg moczowych⁹. Interesująca z uwagi na swoją analizę historyczną jest praca z 2015 roku, w której autor Gregory S. Bisacchi odnosi się do treści prezentowanych w ramach *International Symposium on Quinolone Antibiotics* w 1986 roku, z których wynika, iż poprzednikiem kwasu nalidyksowego był odkryty przez Leshera w latach 50. kwas 7-chloro-1-etylo-4-okso-1,4-dihydrochinolino-3-karboksylowy (**2**). Związek ten został wówczas przedstawiony jako zanieczyszczenie powstające podczas syntezy przeciwpierwotniakowej chlorochiny, który po hydrolizie pomimo wykazywania niezbyt imponującego wpływu na komórki bakteryjne intuicyjnie

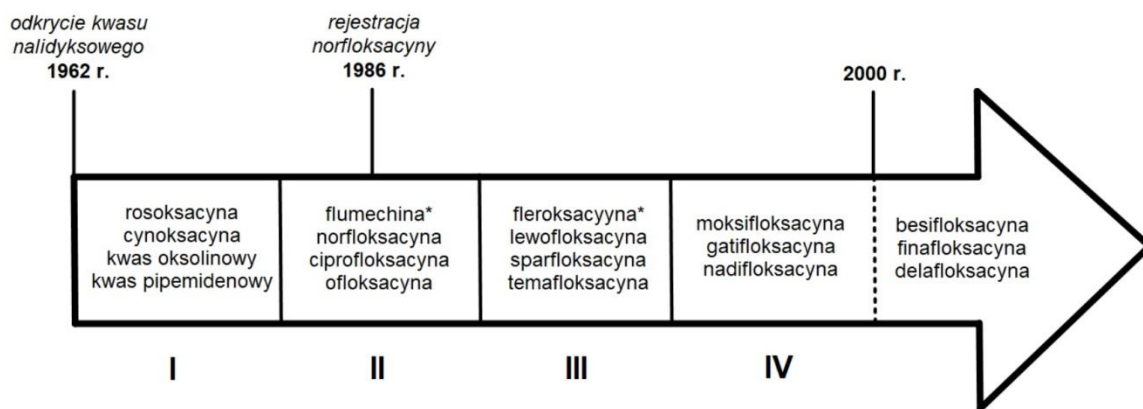
posłużył Leshnerowi za inspirację do dalszych badań nad naftyrydami¹⁰. Jednocześnie należy również zaznaczyć, iż 2 lata przed opublikowaniem wysoko cytowanej pracy o kwasie nalidyksowym, w 1957 roku z rąk Imperial Chemical Industries (ICI) wypłynęły 3 patenty, w których opisano syntezę serii chinolonów wykazujących aktywność przeciwbakteryjną. Związki te posiadały ugrupowanie karboksylowe w pozycji 3 i wśród nich znajdowały się takie pochodne jak kwas 7-chloro-1-etylo-4-okso-chinolono-3-karboksylowy i jego analog (3), chinolonowy analog kwasu nalidyksowego, 6-fluorochinolony czy chinolony nitrowane^{11,12,13}. Z dzisiejszej perspektywy trudno ocenić czy badacze ze Sterling w trakcie własnej pracy byli świadomi obszernego zbioru publikacji poświęconych chinolonom wydanych wcześniej przez ICI. Można jednak przypuszczać, iż z powodu ograniczenia własności intelektualnej finalnie Sterling został zmuszony do zgłoszenia niechinolonowych, chociaż blisko spokrewnionych struktur o wspólnym rdzeniu 1,8-naftyrydonu¹⁰.



Rys.1. Związki rozpoczynające erę leków chinolonowych: kwas nalidyksowy (1), kwas 7-chloro-1-etylo-4-okso-chinolono-3-karboksylowy (2), pochodne opublikowane przez ICI (3)

1.1.2. Fluorochinolony

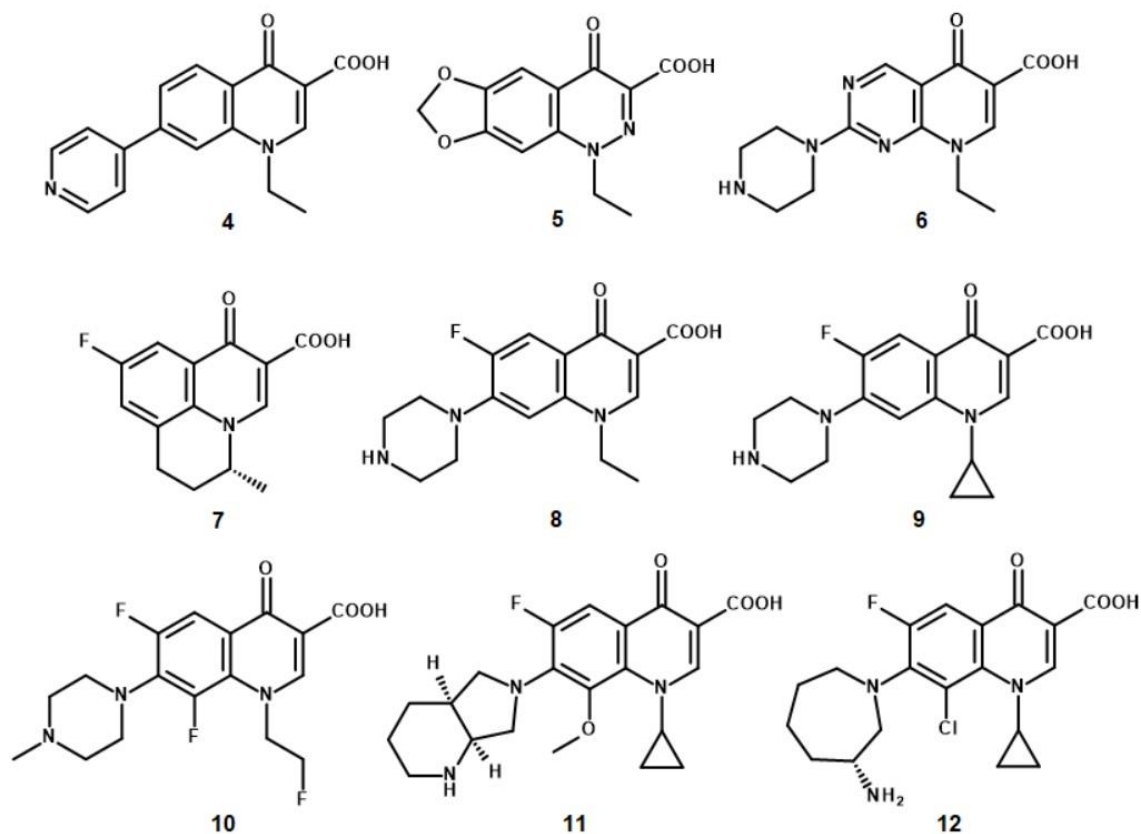
Jedną z najbardziej popularnych grup związków wśród chinolonów przeznaczenia medycznego są chemoterapeutyki przeciwbakteryjne z grupy fluorochinolonów. Jak wcześniej wspomniano, ich erę rozpoczęto od serii prac i patentów opublikowanych w latach 60. ubiegłego wieku. Od tamtego czasu z uwagi na nieustannie szerzącą się lekooporność bakterii i ściśle wiążące się z tym zapotrzebowanie na nowe leki rozwój fluorochinolonów nieprzerwanie postępuje, doprowadzając współcześnie do powolnego kształtowania się piątej generacji leków z tej grupy^{14,15} (Rys.2).



Rys.2. Graficzna reprezentacja wybranych fluorochinolonów należących do poszczególnych generacji I – IV (*fluorochinolony zaliczane również do generacji poprzedniej)

Od czasu opublikowania właściwości przeciwbakteryjnych kwasu nalidyksowego w latach 60. powstało kilka nowych analogów tego związku, wśród których można wyróżnić rosoksacyne¹⁶ (4), cynoksacyne¹⁷ (5) czy kwas oksolinowy¹⁸. Związki te nie wykazywały jednak żadnych istotniejszych zalet w porównaniu do ich pierwowzoru, a ich zastosowanie również ograniczono do leczenia zakażeń dróg moczowych lub rozrodczych. Dodatkowo po wprowadzeniu kwasu nalidyksowego do powszechnego klinicznego użycia zauważono szybki wzrost oporności bakterii *Escherichia coli* będącą jedną z głównych przyczyn tego typu infekcji^{19,20,21}. Wprowadzenie do cząsteczki chinolonu w pozycję 7 piperazyny, w wyniku czego otrzymano kwas pipemidynowy (6), spowodowało wzrost aktywności związku wobec szerszego spektrum bakterii Gram-ujemnych (w tym *Pseudomonas* spp.) oraz wpłynęło na pojawienie się nieobserwowalnej w przypadku wcześniejszych chinolonów aktywności wobec bakterii Gram-dodatnich²². Obecność piperazynowego łańcucha bocznego jednoznacznie wpłynęła na zdolność chinolonów do penetrowania ściany komórkowej bakterii, zwiększając w ten sposób aktywność związków. Pierwszym związkiem drugiej generacji posiadającym atom fluoru w pozycji 6 i wykazującym obiecującą aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich była flumechina²³ (7), jednakże za przełom w leczeniu zakażeń wywołanych tego typu bakteriami uznaje się jednocześnie wprowadzenie do rdzenia chinolonu dwóch elementów struktury – pierścienia piperazyny w pozycji 7 oraz atomu fluoru w pozycji 6 – i otrzymanie cząsteczki nazwanej norfloksacyną²⁴ (8). Pomimo tego, iż połączenie profilu farmakokinetycznego i aktywności tej pochodnej nadal nie było odpowiednie do stosowania ogólnoustrojowego, otrzymanie norfloksacyny było początkiem bardzo udanego

okresu badań nad modyfikacjami rdzenia fluorochinolonowego. Od czasu opatentowania norfloksacyny w 1978 roku w ciągu następných lat otrzymano wiele fluorochinolonów, z których kilka weszło na rynek i jest nadal stosowanych w leczeniu infekcji ogólnoustrojowych²⁵. Ciprofloksacyna (**9**) będąca chemoterapeutykem drugiej generacji, u której obecność pierścienia cyklopropylowego znacznie wpłynęła na poprawę ogólnej aktywności biologicznej, do dziś jest stosowana jako jeden z leków pierwszego wyboru w zakażeniach wywołanych przez *Pseudomonas aeruginosa*²⁶. Fleroksacyna (**10**) posiadająca w swojej strukturze 3 atomy fluoru otworzyło syntezę fluorochinolonów trzeciej generacji, do której należą m.in. lewofloksacyna oraz sparfloksacyna. Ulepszenia tej generacji obejmowały dodanie alkilowanych ugrupowań piperazyny i piroolidyny w pozycji 7 oraz grup $-NH_2$, $-OH$ i $-CH_3$ w pozycji 5 farmakoforu³. Sama fleroksacyna charakteryzowała się m.in doskonałą biodostępnością, dobrą penetracją tkanek i długim okresem półtrwania (10-12 godzin) pozwalającym na dawkowanie raz dziennie, jednakże z uwagi na jej silną fototoksyczność znacznie ograniczono jej stosowanie²⁷. Spektrum aktywności fluorochinolonów czwartej generacji, wśród których można wyróżnić gatifloksacynę i moksifloksacynę (**11**) spełnia kryteria generacji trzeciej i dodatkowo jest uzupełniony o aktywność wobec organizmów anaerobowych²⁸. Fluorochinolony tej generacji znacznie ewoluowały od 2000 roku. Na przestrzeni ostatnich 20 lat FDA zatwierdziło do użytku klinicznego takie związki jak besifloksacyna (**12**), finafloksacyna czy delafloksacyna. Najnowsze fluorochinolony wykazują aktywność zarówno wobec gyrazy, jak i topoiizomerazy IV w odróżnieniu od ich poprzedników, u których nierzadko obserwowano powinowactwo tylko do jednego z tych enzymów. Zdolność najnowszych fluorochinolonów do jednoczesnego hamowania aktywności dwóch kluczowych dla metabolizmu DNA enzymów znacznie utrudnia komórkom bakteryjnym wypracowanie mechanizmów oporności¹⁴. Struktury wybranych fluorochinolonów przedstawiono na Rys.3.



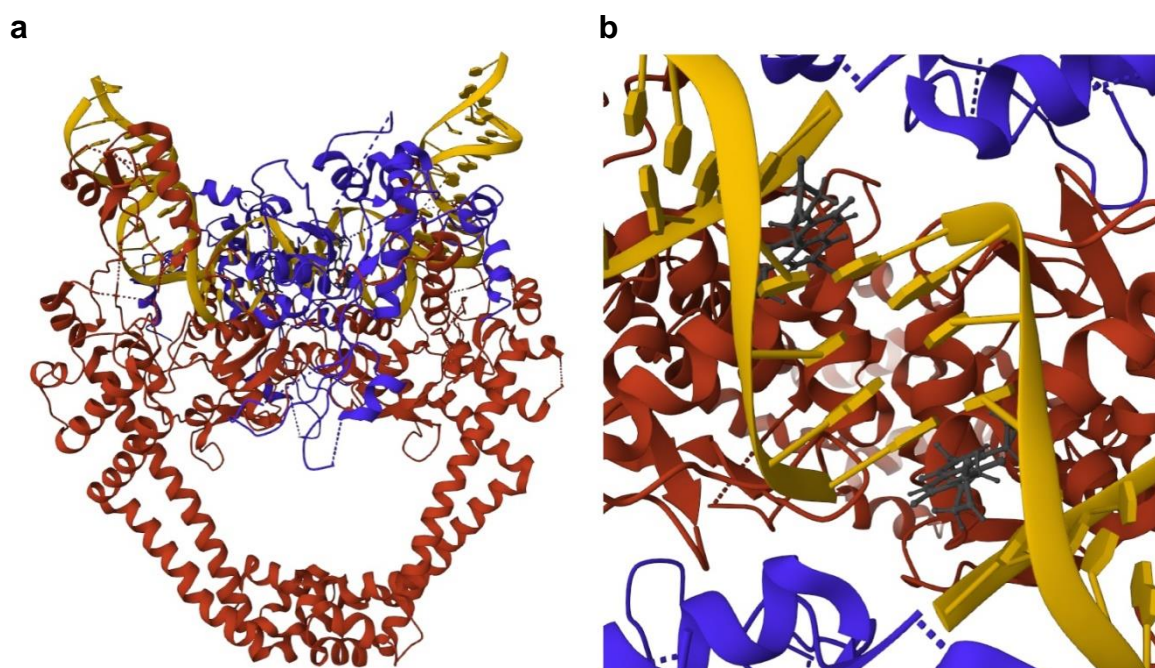
Rys.3. Struktury chemiczne wybranych przedstawicieli fluorochinolonów różnych generacji: rosoksacyny (4), cynoksacyny (5), kwasu pipemidynowego (6), flumechiny (7), norfloksacyny (8), ciprofloksacyny (9), fleroksacyny (10), moksifloksacyny (11), besifloksacyny (12)

Mechanizm działania chemoterapeutyków fluorochinolonowych

Omawiając chemoterapeutyki fluorochinolonowe, nie sposób nie wspomnieć o mechanizmie działania tych związków w komórkach bakteryjnych. Celem molekularnym fluorochinolonów są topoisomerazy typu II: gyraza oraz topoisomeraza IV. Topoisomerazy to enzymy odpowiedzialne za relaksację superskręconego DNA, które powstaje podczas takich procesów jak replikacja, transkrypcja, rekombinacja, czy naprawa bakteryjnego chromosomu. Topoisomerazy typu II przeprowadzają relaksację DNA na drodze wprowadzania kontrolowanych pęknięć w obrębie obu nici. Gyraza bierze udział przede wszystkim we wspieraniu wydłużania łańcucha, a jej podstawowym zadaniem jest wprowadzanie ujemnego superhelikalnego skrętu do podwójnej helisy. Rolą topoisomerazy IV jest oddzielenie już utworzonej nici potomnej podczas końcowego etapu replikacji. Bakteryjne topoisomerazy typu II są zakonserwowanymi ewolucyjnie heterotetramerami zbudowanymi z dwóch typów podjednostek ($GyrA_2GyrB_2$ – gyraza,

ParC₂ParE₂ – topoizomeraza IV) oraz wymagają obecności jonów magnezu jako kofaktora. Ponadto znaczna część reakcji katalizowanych przez te enzymy wymaga nakładu energii w postaci ATP^{29,30}.

Mechanizm działania fluorochinolonów na topoizomerazy typu II został bardzo dobrze poznany. Związki te wiążą się w sposób niekowalencyjny i odwracalny do kompleksu enzym-DNA na styku między białkiem a dwuniciową helisą w miejscu „cięcia-ligacji” po jednej lub obu stronach rozszczepionej nici (Rys.4). Po związaniu z topoizomerazą fluorochinolony stanowią fizyczną blokadę dla ruchu widełek replikacyjnych, co uniemożliwia enzymowi dalszą pracę. W przypadku stosowania fluorochinolonów w stężeniach wyższych niż IC₅₀ związki te trwale blokują procesy związane z metabolizmem DNA, co przyczynia się do wzrostu ilości pęknięć w obrębie podwójnej helisy i w konsekwencji prowadzi do fragmentacji genomu. Z tego powodu fluorochinolony nazywane są często „trucizną topoizomerazy”^{31,32,33}.

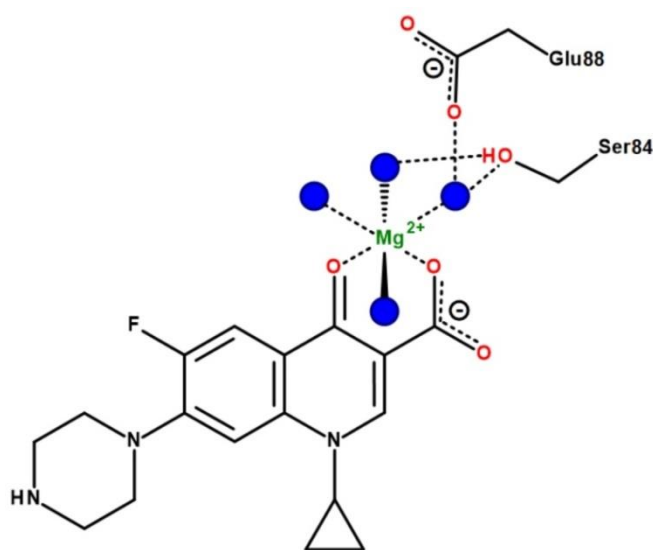


Rys.4. Kompleks klinafloksacyna-topoizomeraza IV-DNA ze *Streptococcus pneumoniae* (PDB: 3FOE)³⁴:

a) widok całego kompleksu, b) zbliżenie do miejsca wiązania (nić DNA – kolor żółty, podjednostki ParC – kolor czerwony, podjednostki ParE – kolor niebieski, klinafloksacyna – kolor szary)

Miejszem wiązania fluorochinolonów jest centrum aktywne bakteryjnej topoizomerazy typu II zlokalizowane w obrębie seryny84 (bazując na podjednostce ParC topoizomerazy IV *A. baumannii*³⁵) oraz kwasowej reszty aminokwasowej (w tym przypadku Glu88) znajdującej się

cztery aminokwasy dalej. Badania wykazały, iż między cząsteczką chinolonu oraz centrum aktywnym enzymu dochodzi do utworzenia „mostu” zbudowanego z niekatalicznego kationu Mg^{2+} (chelatowanego przez atomy tlenu grupy karboksylowej C3 oraz karbonylowej C4) oraz czterech cząsteczek wody, z których dwie są zlokalizowane na tyle blisko seryny i kwasowej reszty drugiego aminokwasu, że tworzą z nimi wiązania wodorowe (Rys.5)^{35,36}. Nie jest więc zaskoczeniem, iż kształtująca się oporność bakterii wobec fluorochinolonów związana jest m.in. z mutacjami właśnie w obrębie tych dwóch aminokwasów³⁷.



Rys.5. Graficzna reprezentacja miejsca wiązania ciprofloksacyny do topoisomerazy IV *Acinetobacter baumannii*^{32,35}

1.1.3. Chinolony o właściwościach przeciwnowotworowych

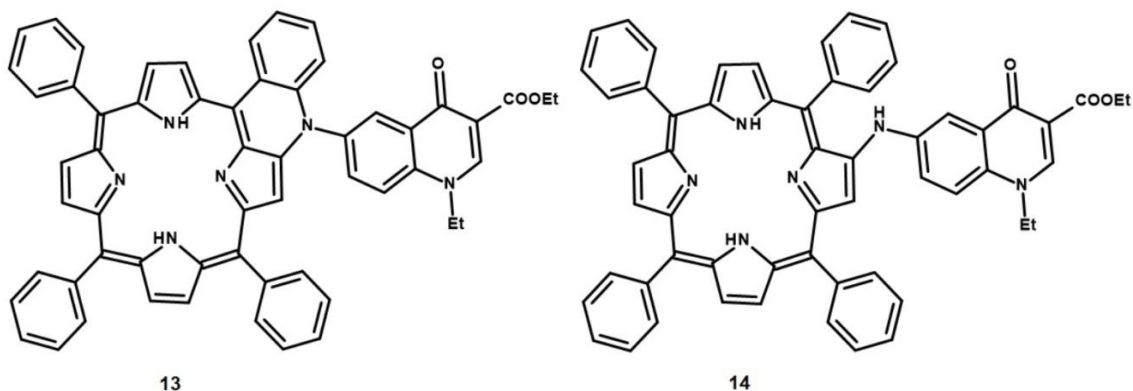
Chinolony świetnie odnalazły się również w świecie związków o potencjale przeciwnowotworowym. Z uwagi na to, iż hamowanie prokariotycznej topoisomerazy skutkuje potencjalną aktywnością przeciwbakteryjną, celowanie w ich ssacze odpowiedniki jest w pełni uzasadnione, gdyż inaktywacja enzymów związanych z metabolizmem DNA często skutkuje indukcją różnego typu śmierci komórkowej w komórkach nowotworowych. Powszechnie stosowane leki przeciwnowotworowe, jak antracykliny³⁸ czy pochodne podofilotoksyny (etopozyd, tenipozyd)³⁹, dla których celem molekularnym jest eukariotyczna topoisomeraza II, niestety charakteryzują się uciążliwymi dla pacjentów skutkami ubocznymi. Pojawiające się w latach 80. doniesienia o wpływie fluorochinolonów na mechanizmy replikacyjne DNA w komórkach eukariotycznych^{40,41} zainicjowały szereg badań mających na celu poznanie stopnia

powinowactwa tych związków do eukariotycznej topoizomerazy II, weryfikację ich potencjału przeciwnowotworowego i głębsze poznanie elementów struktury wpływających na przejście tej grupy związków z chemoterapeutyków przeciwbakteryjnych w kierunku przeciwnowotworowych^{42,43}. Na przestrzeni dekad dowiedziono, iż mechanizm aktywności przeciwnowotworowej fluorochinolonów biegnie wielotorowo, a związkiem najlepiej przebadanym pod tym względem jest ciprofloksacyna. Fluorochinolony prowadzą do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie S/G2 oraz G2/M⁴⁴, wpływają na właściwą ekspresję miRNA^{45,46}, a najczęstszym typem śmierci komórkowej indukowanej przez te związki jest apoptoza^{47,48,49,50}. Warto również zaznaczyć, iż jeden z przedstawicieli fluorochinolonów, jakim jest gemifloksacyna, wpływa na potencjał przerzutowy ludzkiego raka jelita grubego⁵¹ oraz gruczolakoraka piersi⁵² poprzez hamowanie zdolności komórek nowotworowych do przejścia epitelialno-mezenchymalnego. Fluorochinolony znajdują również zastosowanie jako tzw. wzmacniacze schematu chemioterapii adjuwantowej. Szereg fluorochinolonów w połączeniu z konwencjonalnymi lekami cytostatycznymi jak doksorubicyna czy etopozyd wzmacniają odpowiedź komórek nowotworowych na daną kombinację leków w wielu schematach leczenia różnego typu nowotworów⁵³. Fluorochinolony, oprócz korzystnego profilu farmakokinetycznego oraz właściwości fizykochemicznych, zapewniają również wiele innych pożądaných cech. Związki te charakteryzują się mniejszą toksycznością względem klasycznie stosowanych leków oraz zmniejszoną częstością rozwoju oporności i polekowych nowotworów wtórnych⁴³.

Chinolony a terapia fotodynamiczna

Terapia fotodynamiczna (*ang. photodynamic therapy – PDT*) to zatwierdzona klinicznie terapia przeciwnowotworowa oparta o reakcję fotochemiczną między chemoterapeutykiem o charakterze fotouczulającym, tlenem oraz promieniowaniem o odpowiedniej długości fali w celu wygenerowania reaktywnych form tlenu (*ang. reactive oxygen species – ROS*) w zmienionej chorobowo tkance. W wyniku obecności cytotoksycznych ROS dochodzi najczęściej do uszkodzenia komórek, co może wywołać reakcje zapalne i immunologiczne.⁵⁴ W przypadku niektórych fluorochinolonów na przestrzeni lat wielokrotnie zwracano uwagę na ich fototoksyczność^{55,56,57,58}, którą po latach postanowiono ponownie przebadać pod kątem użyteczności w PDT. Enoksacyna oraz lomefloksacyna wspomagane łagodnym promieniowaniem UVA wykazywały zwiększoną aktywność przeciwnowotworową wobec linii

komórkowej HL60, której nie uzyskano stosując te dwa czynniki osobno. Indukowana przez te fluorochinolony apoptoza, fragmentacja DNA oraz aktywacja kaspazy-3 miała charakter zależny od stężenia leku, czasu naświetlania i były konsekwencją powstania reaktywnych form tlenu^{59,60}. Sparflokscyna wraz z nanocząstkami zdolnymi do lawinowej emisji fotów zamknięta w amfifilowych micelach z polimeru wrażliwego na ciepło skutecznie hamowała zdolność komórek nowotworowych do migracji i metastazy na drodze inhibicji topoizomerazy II. Ponadto w wyniku kompleksowania jonów metali sparflokscyna hamowała również aktywność katalazy oraz dysmutazy ponadtlenkowej, co prowadziło do apoptozy komórek raka piersi 4T1 u myszy⁶¹. Co więcej, w badaniach *in vitro* skuteczne okazało się włączenie fluorochinolonów do znanej i powszechnie stosowanej terapii fotodynamicznej z użyciem kwasu 5-aminolewulinowego^{62,63,64}. Oprócz fotouszkodzeń wynikających z generowania ROS fluorochinolony wykazują powinowactwo do kationów żelaza, wpływały na nagromadzenie w komórkach nowotworowych naturalnego fotouczulacza, jakim jest protoporfiryna IX⁶². Oprócz kwasu 5-aminolewulinowego w terapii fotodynamicznej wykorzystywane są również pochodne porfiryny. Pierwszym lekiem z tej grupy związków stosowanym od 1993 roku jest *Photofrin*[®]. Od czasu jego wprowadzenia na rynek synteza porfirynowych związków fotouczulających rozwinęła się, dając obecnie do dyspozycji kilka preparatów z tej grupy^{54,65}. W latach 2008-2015 opublikowano trzy ciekawe prace poświęcone syntezie koniugatów porfiryny z chinolonami o nieskomplikowanej budowie. Większość z otrzymanych związków wykazywała wysokie zdolności do generowania tlenu singletowego, a kilka z nich dały pozytywne wyniki badań w kierunku fotoinaktywacji *Staphylococcus aureus*^{66,67,68}. Niewykluczone, iż w przyszłości tego typu koniugaty wykażą również potencjał przeciwnowotworowy. Na Rys.6 przedstawiono najaktywniejsze biologicznie chinolonowe pochodne porfiryny (**13,14**).



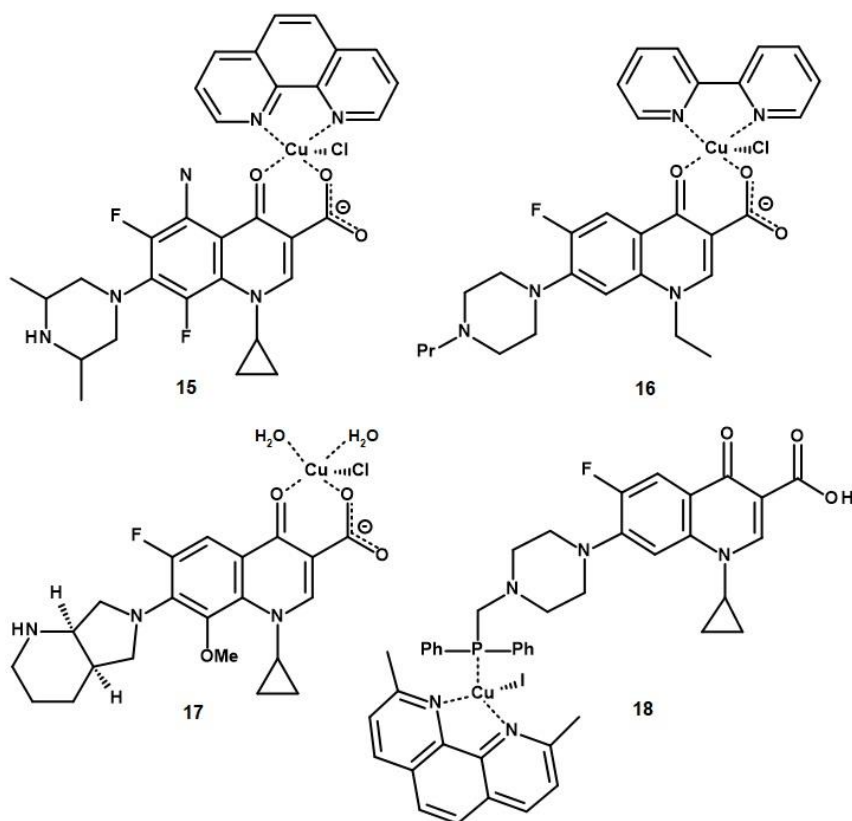
Rys.6. Struktury najbardziej aktywnych fotochemiczne koniugatów (**13,14**) badanych w kierunku fotoaktywacji *Staphylococcus aureus*⁶⁸

Kompleksy chinolonów z jonami metali

Kompleksy chemoterapeutyków z jonami metali od wielu lat cieszą się nielubianym zainteresowaniem w chemii medycznej. Jony metali wielokrotnie odgrywają kluczową rolę dla aktywności enzymów, gdyż bardzo często stanowią dla nich kofaktor lub za ich pośrednictwem dochodzi do oddziaływania leku z celem molekularnym. Wprowadzenie do terapii przeciwnowotworowej cisplatyny było istotnym momentem w historii chemioterapii, jednakże z biegiem czasu scharakteryzowano ograniczenia tego związku, takie jak niska biodostępność po podaniu doustnym, zależna od dawki toksyczność, czy oporność niektórych typów nowotworów⁶⁹. W trakcie poszukiwań i rozwoju nowych leków przeciwnowotworowych na bazie platyny (np. karboplatyna, oksaliplatyna) rozpoczęto również konfrontować ze sobą wady i zalety nowych chemoterapeutyków na bazie metali z kompleksami metali z już istniejącymi lekami. Wraz z upływem czasu pojawiły się doniesienia, iż kompleksy znanych leków z metalami są o wiele bezpieczniejsze od chemoterapeutyków na bazie metali, gdyż ich aktywność manifestuje się głównie w miejscu docelowym (jakim są komórki nowotworowe), w przeciwieństwie do leków na bazie metali wykazujących toksyczne działanie ogólnoustrojowe⁷⁰.

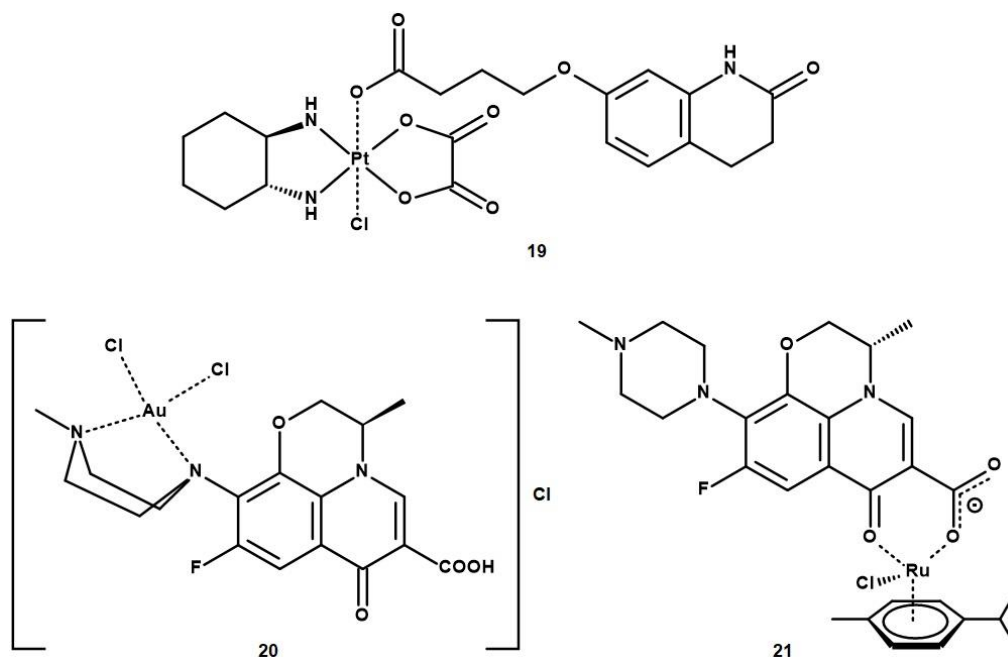
Doniesienia dotyczące powstawania mostu $Mg^{2+}/4H_2O$ między fluorochinolonami a centrum aktywnym bakteryjnej topoizomerazy typu II dały początek serii badań nad syntezą kompleksów chinolonów z różnymi kationami metali. Szereg tego typu kompleksów zostało przebadanych z pozytywnym wynikiem w kierunku aktywności przeciwbakteryjnej^{71,72,73}. Nie da się zaprzeczyć, iż z uwagi na swoje biologiczne znaczenie, niejednokrotnie metalem pierwszego wyboru do tworzenia tego typu koordynatów jest miedź. Nie dziwi też fakt, iż równoległe

w stosunku do badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej podjęto również badania nad aktywnością przeciwnowotworową tego typu kompleksów dające w rezultacie szereg ciekawych publikacji i obiecujących wyników. Koordynaty miedzi (II) ze sparfloksacyną, posiadające tzw. motyw motylkowy, wykazały w teście MTT aktywność antyproliferacyjną wobec komórek hormonozależnego raka piersi BT20⁷⁴. Rok później doniesiono, iż kompleksy miedzi ze sparfloksacyną i heterocyklicznymi ligandami zawierającymi atomy azotu (**15**) cechowała aktywność wobec linii komórkowej białaczki ludzkiej HL-60 w przeciwieństwie do niewykazującej aktywności cytotoksycznej wolnej sparfloksacyny⁷⁵. Związki N-propylo-norfloksacyny skompleksowanej z 1,10-fenantroliną⁷⁶ oraz 2,2'-bipirydyną (**16**)⁷⁷ również wykazały zwiększoną aktywność wobec komórek białaczek ludzkich w porównaniu z wolnym fluorochinolonem. Utworzenie kompleksów Cu(II)-ciprofloksacyna-1,10-fenantrolina skutkowało otrzymaniem sztucznych nukleaz zdolnych do cięcia DNA w obecności askorbinianu⁷⁸. Kilka prac donosiło również o aktywności biologicznej koordynatów moksifloksacyny (**17**) z heterocyklicznymi ligandami i metalami w różnych kombinacjach, które wykazywały właściwości cytotoksyczne wobec linii komórkowych ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc A549^{79,80} oraz ludzkich raków piersi⁸¹. W tym miejscu warto również zaznaczyć, iż zespół polskich badaczy otrzymał i dogłębnie przebadał aktywność przeciwnowotworową kompleksów miedzi z fosfinowymi pochodnymi fluorochinolonów (ciprofloksacyny (**18**), norfloksacyny, sparfloksacyny, lomefloksacyny). W badaniach aktywności biologicznej wykazano, iż wszystkie otrzymane kompleksy charakteryzowały się większą aktywnością wobec różnych typów nowotworów w porównaniu do cisplatyny, a mechanizm ich działania polega na indukcji apoptozy poprzez stres oksydacyjny oraz pęknięcia DNA na skutek interkalacji kompleksów do podwójnej helisy^{82,83,84,85,86}. Wybrane przykłady omawianych kompleksów przedstawiono na Rys.7.



Rys.7. Struktury chemiczne wybranych kompleksów miedzi (II) z fluorochinolonami: sparfloksacyną (**15**)⁷⁵, N-propylo-norfloksacyną (**16**)⁷⁷, moksifloksacyną (**17**)⁸¹, ciprofloksacyną (**18**)⁸⁵

Ostatnimi laty otrzymano również nowe kompleksy fluorochinolonów z metalami szlachetnymi (Rys.8). W roku 2020 opublikowano pracę, w której kompleksy platyny (IV) z dihydro-2-chinolonem poddano badaniom w kierunku aktywności przeciwnowotworowej na 5 liniach komórkowych (CT26, SKOV-3, HeLa, A549, A549R). Najlepszą aktywność wykazała pochodna **19**, którą z powodzeniem przetestowano również na modelu zwierzęcym z użyciem oksaliplatyny jako związku referencyjnego⁸⁷. Koordynaty złota z norfloksacyną, lewofloksacyną (**20**) i sparfloksacyną, u których wykazano, iż w sposób nieoczywisty wiąże atom metalu od strony pierścienia piperazynowego, charakteryzowały się obiecującą aktywnością cytotoksyczną wobec mysich linii komórkowych A20 i B16-F10 oraz linii ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej K562⁸⁸. Kompleksy rutenu (II), siarkowego makrocyklu i DMSO z ofloksacyną, kwasem nalidyksowym, lewofloksacyną oraz cynoksacyną wykazały umiarkowaną aktywność wobec linii komórek nabłonkowych raka szyjki macicy HeLa⁸⁹. Ponadto koordynat Ru(III)-cymen-ofloksacyna (**21**) wykazał również aktywność wobec komórek raka jajnika CH1⁹⁰.



Rys.8. Struktury chemiczne wybranych kompleksów chinolonów z metalami szlachetnymi: platyną (IV) (19)⁸⁷, złotem (III) (20)⁸⁸, rutenem (II) (21)⁹⁰

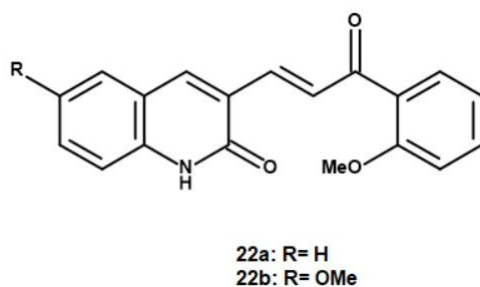
Hybrydy chinolonów – wybrane przykłady

Literatura chemiczna opisuje pokaźne ilości hybryd utworzonych zarówno z klasycznych fluorochinolonów, jak i prostych rdzeni chinolonowych. Wśród nich można znaleźć chinolony bezpośrednio skondensowane ze związkami aromatycznymi (w tym heterocyklami), jak i hybrydy utworzone z połączenia dwóch odrębnych związków za pomocą linkera⁹¹. Na przestrzeni ostatnich kilku lat opublikowano kilka ciekawych prac badawczych poświęconych syntezie chinolonowych związków hybrydowych wykazujących aktywność przeciwnowotworową. Projekt syntezy tego typu hybryd najczęściej polega na połączeniu ze sobą dwóch szkieletów pochodzących od związków wykazujących aktywność biologiczną w celu otrzymania dwurdzeniowej molekuly. Poniżej przedstawiono kilka interesujących przykładów.

Hybrydy chalkonowe

Związki chemiczne wykazujące powinowactwo do kieszeni tubuliny (np. kolchicyna) cechuje niski potencjał do indukcji lekooporności nowotworów. Niestety bardzo często związki te wykazują wysoką toksyczność i wąski zakres terapeutyczny. Pochodne na bazie chalkonów – aromatycznych enonów, które powszechnie występują w jadalnych owocach – również wykazują powinowactwo do kieszeni kolchicyny w tubulinie, co czyni je atrakcyjną grupą związków

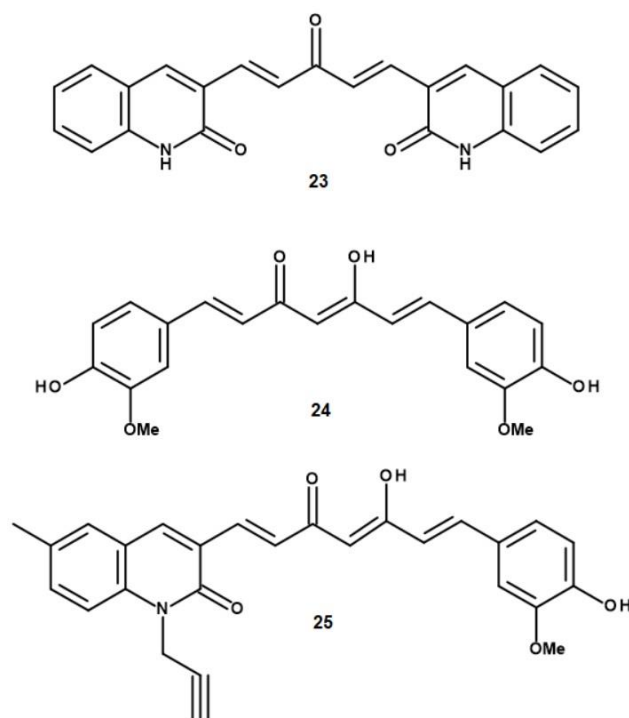
o potencjale przeciwnowotworowym. Lindamulage i współpracownicy otrzymali oraz opatentowali serię hybryd chinolonowo – chalkonowych, które poddano wstępnemu badaniu aktywności biologicznej wobec trzech linii komórkowych raka piersi (MCF-7, MDA-MB-468, MDA-MB-231) oraz dwóch linii prawidłowych komórek (MCF-10A, 184b5)⁹². Wstępne testy skryningowe wyłoniły dwie przewodnie struktury (**22a,b**) (Rys.9), z których **22b** została następnie przekazana do badań aktywności biologicznej na 60 liniach komórek nowotworowych w US National Cancer Institut (wykazując aktywność wobec wszystkich linii, włącznie z komórkami nowotworów wielolekoopornych). W ramach własnych badań badacze wykazali m.in., iż otrzymane pochodne wiążą się do kieszeni kolchicyny w β -tubulinie i hamują aktywność białka MRP1. W badaniach na modelu mysim pochodne **22a,b** stosowane zarówno pojedynczo, jak i w kombinacji z paklitakselem charakteryzowały się bardzo niską ogólnoustrojową toksycznością i wysoką aktywnością przeciwnowotworową⁹³. Najnowsza opublikowana praca w tym zakresie dotyczyła optymalizacji struktury związków w oparciu o analizę SAR⁹⁴.



Rys.9. Struktury chemiczne najaktywniejszych biologicznie hybryd chinolin-2(1H)-onu i chalkonu (**22a,b**)

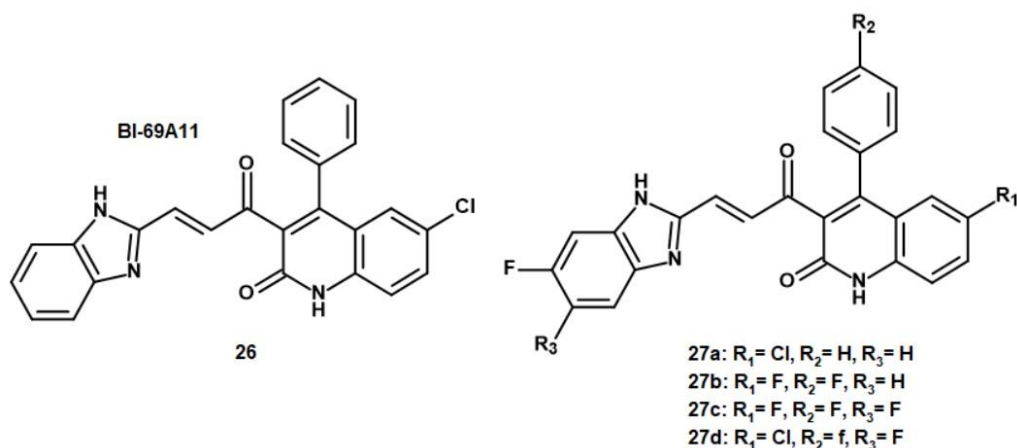
Abonia i współpracownicy kilka lat wcześniej również zaproponowali prostą syntezę chalkonowych hybryd chinolin-2(1H)-onu otrzymując serię 9 związków wykazujących aktywność przeciwnowotworową. Otrzymane hybrydy w ramach dwuetapowego skryningu także przebadano w panelu 60 linii komórkowych. Spośród testowanych związków pochodna **23** (Rys.10) wykazała bardzo wysoką aktywność wobec 50 linii (w 13 przypadkach wartość $GI_{50} \leq 0.1 \mu M$) i została przekierowana do badań *in vivo*. Podejrzewa się, iż w tym przypadku za znakomitą aktywnością przeciwnowotworową hybrydy **23** stoi jej blisko spokrewniona z kurkumina (**24**) struktura. Raghvan i współpracownicy otrzymali serię hybryd kurkuminy i chinolin-2(1H)-onu, spośród których największą aktywność przeciwnowotworową wykazała pochodna **25**. W porównaniu do

związku referencyjnego (kurkuminy) wartość IC_{50} dla hybrydy **25** w przypadku linii komórkowych A549, SKOV3 oraz H460 była o wiele niższa, a dla linii MCF-7 tylko nieznacznie odbiegała⁹⁵.



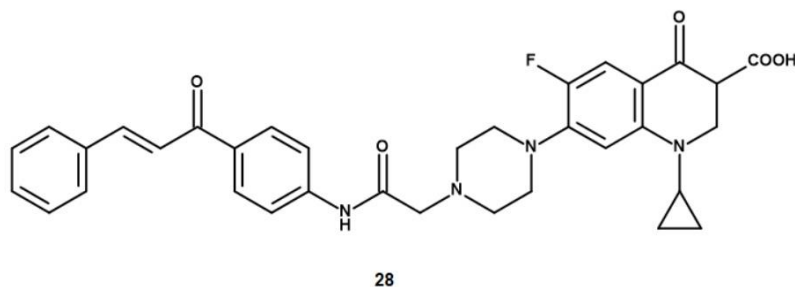
Rys.10. Struktura chemiczna chalconowego dimeru chinolin-2(1H)-onu (**23**), kurkuminy (**24**) oraz hybrydy pochodnej chinolin-2(1H)-onu i kurkuminy (**25**)

Kolejnymi ciekawymi hybrydami chinolonów są związki powstałe w wyniku połączenia halogenowych pochodnych 4-fenylchinolin-2(1H)-onu z benzoimidazolem za pomocą chalconowego linkera (Rys.11). Najważniejszym związkiem z tej grupy w ujęciu chemoterapeutyków przeciwnowotworowych jest BI-69A11 (**26**) - dobrze znany inhibitor kinazy Akt^{96,97} oraz kinazy sfingozyny⁹⁸, który dał pozytywne wyniki w badaniach *in vivo* na modelu mysim⁹⁹. Sam szlak sygnałowy AKT/PI3K/mTOR jest jednym z głównych celów molekularnych w terapii przeciwnowotworowej^{100,101}. Barile i współpracownicy podjęli próbę funkcjonalizacji BI-69A11 licznymi grupami funkcyjnymi niewielkich rozmiarów, jednakże spośród ogromnej ilości otrzymanych związków tylko fluorowane pochodne (**27a-d**) wykazywały większą aktywność w porównaniu do związku referencyjnego¹⁰².



Rys.11. Struktura chemiczna inhibitora kinazy Akt (**26**) oraz jego fluorowanych pochodnych (**27a-d**)

Połączenie klasycznego fluorochinolonu, jakim jest ciprofloksacyna z chalkonami za pomocą krótkich linkerów, dało w rezultacie serię hybryd wykazujących bardzo atrakcyjną aktywność przeciwnowotworową (Rys.12). W przypadku tego typu hybryd chalkon przyłączany jest do linkera ulokowanego od strony pierścienia piperazynowego chinolonu. Nowe hybrydy chalkonów i ciprofloksacyny (**28**) wykazywały bardzo atrakcyjną aktywność wobec wielu linii komórek nowotworowych, ulegając wiązaniu zarówno do obu topoizomeraz^{103,104}, jak i tubuliny blokując jej polimeryzację¹⁰⁵.

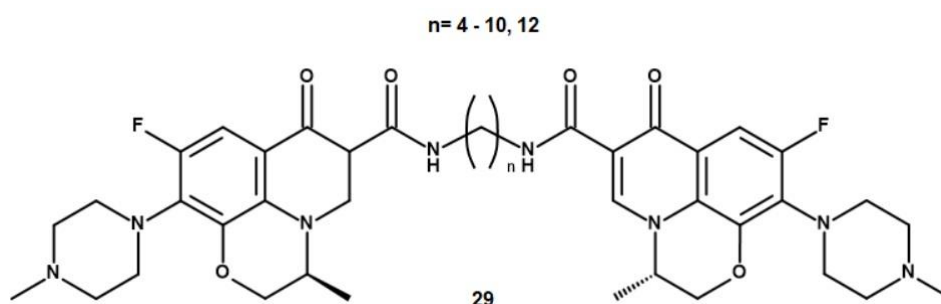


Rys.12. Struktura chemiczna hybrydy ciprofloksacyna - chalkon (**28**)¹⁰³

Dimery chinolonowe

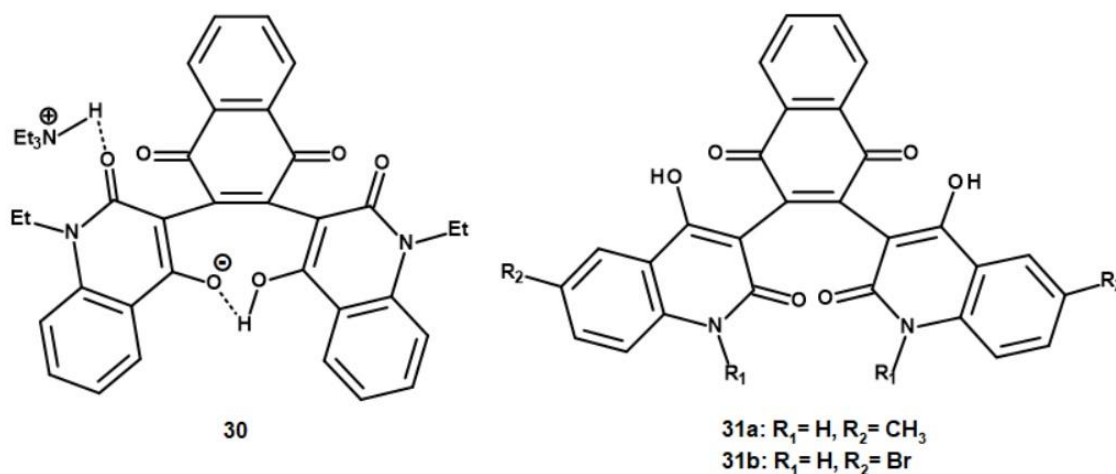
Szereg badań biologicznych dowodzi, iż homo i heterodimery klasycznych fluorochinolonów i ich pochodnych w porównaniu do pojedynczych związków wykazują wysoką aktywność antyproliferacyjną wobec wielu linii komórek nowotworowych, również tych wielolekoopornych. Najwyższą aktywność przeciwnowotworową wykazywały dimery

ciprofloksacyny^{106,107}, lewofloksacyny¹⁰⁸ (**29**) oraz dimery ciprofloksacyna-lewofloksacyna^{107,108} (Rys.13). Mechanizm działania tego typu hybryd w komórkach nie został jednak opisany.



Rys.13. Struktura chemiczna dimeru lewofloksacyny (**29**)¹⁰⁸

Chinolonowe dimery zaproponowane przez Aly i współpracowników oraz otrzymane w wyniku nieskomplikowanej jednoetapowej reakcji zostały przebadane w ramach panelu 60 linii komórek nowotworowych, wykazując aktywność od umiarkowanej do wysokiej. Celem molekularnym dla tych związków jest regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym kinaza 2 (ang. *extracellular signal-regulated kinase/ ERK2*). Inaktywacja enzymu zachodzi na drodze inhibicji kompetycyjnej, w której ligand konkuruje z ATP. W testach enzymatycznych największą aktywność wykazał związek w postaci soli (**30**) (Rys.14), jednakże podczas badań cytotoksycznych najskuteczniejsze okazały się pochodne (**31a,b**), co sugeruje konieczność optymalizacji struktury związków. Nie da się jednak zaprzeczyć, iż tego typu dimery stanowią bardzo dobry punkt wyjścia do rozwoju nowych inhibitorów ERK2¹⁰⁹.

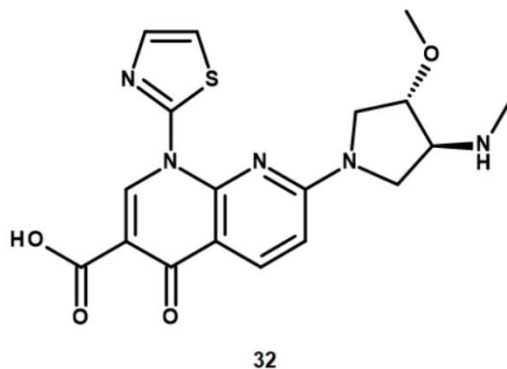


Rys.14. Struktura chemiczna nowych inhibitorów enzymu ERK2¹⁰⁹

1.1.4. Chinolony we współczesnych badaniach klinicznych

Voreloxin

Wozaroksyna (**32**) nazywana zamiennie woreloksyną (Rys.15) jest pierwszym przeciwnowotworowym naftyrydonem zatwierdzonym do badań klinicznych, znajdującym swoje główne zastosowanie w leczeniu ostrej białaczki szpikowej^{110,111}. Związek ten wykazuje wysokie powinowactwo do eukariotycznej topoizomerazy typu II i indukuje miejscowo selektywne pęknięcia podwójnej nici DNA, prowadząc w ten sposób do apoptozy komórki nowotworowej. Wozaroksyna wykazuje korzystny profil toksyczności, gdyż nie generuje reaktywnych form tlenu, co zmniejsza ryzyko kardiotoxyczności. Dodatkowo nie jest substratem dla glikoproteiny P, co skutkuje ominięciem powszechnego mechanizmu oporności wielolekowej nowotworów, a jej dystrybucja do zdrowych tkanek jest ograniczona^{112,113}. Obecnie wozaroksyna pod nazwą SNS-595 znajduje się również w II fazie badań klinicznych jako terapia drugiego rzutu w leczeniu zaawansowanej postaci niedrobnokomórkowego raka płuc u osób dorosłych¹¹⁴.

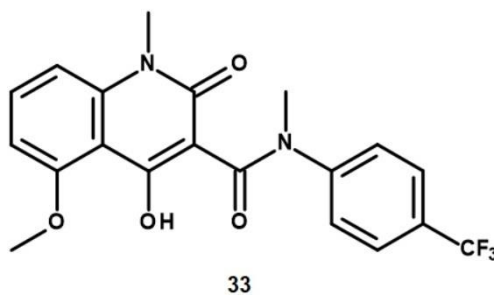


Rys.15. Struktura chemiczna woreloksyny (**32**)

Tasquinimod

Tasquinimod (**33**) jest syntetyczną pochodną chinolin-3-karboksyamidu II generacji stosowaną doustnie w immunoterapii przeciwnowotworowej (Rys.16). Celem molekularnym dla tego związku jest ważne z punktu widzenia mikrośrodowiska niektórych nowotworów wielofunkcyjne białko immunomodulacyjne S100A9, którego ekspresja w komórkach nowotworowych zachodzi na wysokim poziomie¹¹⁵. W środowisku nowotworu białko S100A9 wiąże się z receptorami prozapalnymi (RAGE oraz TLR4) znajdującymi się na powierzchni m.in. makrofagów, komórek endotelialnych, czy mieloidalnych komórek supresyjnych stymulując w ten

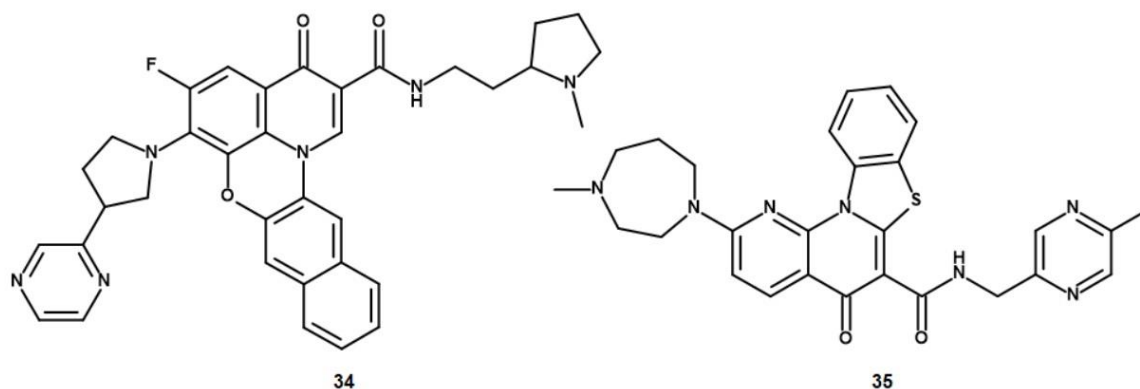
sposób proces angiogenezy, progresji i finalnie przerzutowania¹¹⁶. Konsekwencją interakcji tasquinimodu z białkiem S100A9 jest ogólne zahamowanie rozwoju nowotworu¹¹⁵. W ramach badań klinicznych tasquinimod był testowany z pozytywnym wynikiem w kierunku terapii raka prostaty opornego na kastrację^{117,118,119}, niestety jednak nie wykazał aktywności wobec zaawansowanych nowotworów litych¹²⁰. Obecnie trwa rekrutacja na badania w ramach I fazy nad aktywnością tasquinimodu wobec szpiczaka mnogiego¹²¹.



Rys.16. Struktura chemiczna tasquinimodu (**33**)

Quarfloxin

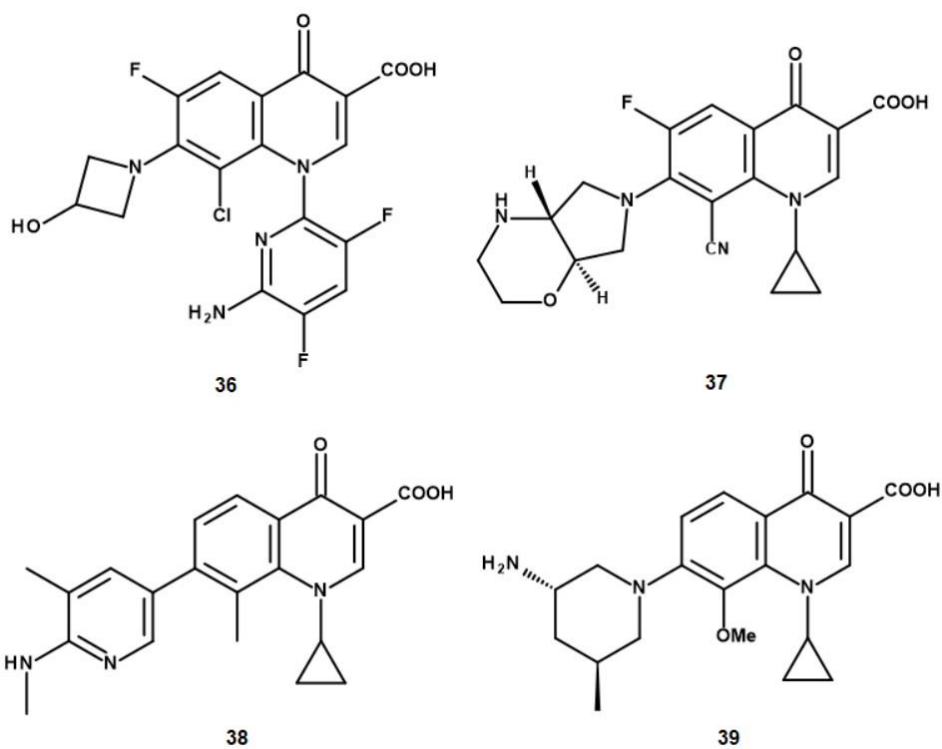
Kolejnym związkiem z grupy chinolonów zasługującym na uwagę jest quarfloksyna (**34**) (Rys.17). Związek ten jest pierwszym z klasy chemoterapeutyków interkalujących do G-kwadrupleku (GQ), który wszedł do II fazy badań klinicznych w kierunku leczenia nowotworów neuroendokrynych. Quarfloksyna oryginalnie wywodzi się z fluorochinolonów wykazujących powinowactwo zarówno do topoizomerazy II, jak i GQ. Powstała w wyniku optymalizacji struktur fluorochinolonów przeprowadzonej przez Cylene Pharmaceuticals w celu otrzymania związku wykazującego aktywność przeciwnowotworową z pominięciem inhibicji topoizomerazy II. Pomimo tego, iż finalnie quarfloksyna została wycofana z badań klinicznych i zaprzestano jej dalszego rozwoju, stanowiła matrycę, na której bazie opracowano nową grupę chemoterapeutyków anty-GQ^{122,123,124,125}. I fazę badań klinicznych w kierunku leczenia guzów litych wywołanych mutacjami w obrębie genów PALB2 oraz BRCA2 z powodzeniem zakończyła wzorowana na quarfloksynie pochodna naftyrydonu o nazwie pidnarulex (**35**)¹²⁶.



Rys.17. Struktury chemiczne quarfloksyny (**34**) i pidnaruleksu (**35**)

Fluorochinolony IV generacji

Fluorochinolony pomimo swej długiej historii są nadal rozwijane i poddawane badaniom klinicznym w kierunku monoterapii, czy też terapii kombinowanej różnych typów infekcji^{127,128,129,130}. Na przestrzeni ostatniej dekady FDA zatwierdziło do użytku klinicznego dwa nowe fluorochinolony: delafloksacynę (**36**) w 2017 r. oraz finafloksacynę (**37**) w 2014 r. (Rys.18). Początkowo delafloksacyna badana i stosowana była w leczeniu ostrych bakteryjnych zakażeń skóry¹³¹, natomiast obecnie jej zastosowanie rozszerza się w kierunku terapii pozaszpitalnego bakteryjnego zapalenia płuc^{132,133}. Finafloksacyna stosowana jest głównie w leczeniu ostrego zapalenia ucha zewnętrznego zwanego potocznie „uchem pływaka”¹³⁴. Z uwagi na wykazywaną aktywność biologiczną w kwaśnym środowisku związek ten jest obecnie poddany badaniom klinicznym w kierunku leczenia zakażeń dróg moczowych^{135,136} oraz zakażeń *Helicobacter pylori*^{134,137}. Dodatkowo warto wspomnieć, iż badaniom klinicznym poddane są obecnie dwa nowe niefluorowane chinolony: ozenoksacyna (**38**) oraz nemonoksacyna (**39**). Ozenoksacyna ukończyła z powodzeniem III fazę badań klinicznych i została zatwierdzona przez FDA do stosowania w postaci 1% kremu w terapii liszajca zakaźnego^{138,139}. W przypadku nemonoksacyny zakończono II fazę badań klinicznych dotyczących bezpieczeństwa i skuteczności chinolonu w zakażeniach stopy cukrzycowej¹⁴⁰. W rezultacie FDA zezwoliła na doustne podawanie nemonoksacyny w terapii pozaszpitalnego zapalenia płuc i bakteryjnych zakażeń skóry¹⁴¹.



Rys.18. Struktury chemiczne delafloksacyny (**36**), finafloksacyny (**37**), ozenoksacyny (**38**), nemonoksacyny (**39**)

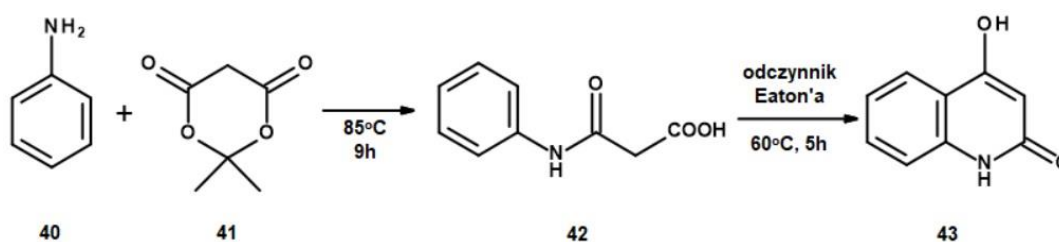
1.2. Nowe metody syntezy rdzeni chinolonowych wolne od użycia katalizatorów metali przejściowych

W ujęciu historycznym pierwszymi klasycznymi metodami syntezy chinolonów były reakcja Knorr'a¹⁴², Niementowskiego¹⁴³, Friedänder'a¹⁴⁴, Conrad-Limpach'a¹⁴⁵, czy cyklizacja Camps'a¹⁴⁶. Te pionierskie metody uzupełnione o ogrom chemicznego dorobku minionego stulecia po dziś dzień stanowią inspirację do projektowania nowych metod otrzymywania chinolonów. Wśród nich ogromną popularnością cieszą się metody syntezy z wykorzystaniem katalizatorów metali bloku d¹⁴⁷. Metody te są atrakcyjne pod względem wydajności otrzymywanych produktów, czy szerokiego spektrum aplikacyjnego względem stosowanych substratów, niestety jednak mają również swoje ograniczenia. Bardzo często reakcje katalizowane metalami przejściowymi wymagają zapewnienia warunków bezwzględnie bezwodnych i beztlenowych. Dodatkowo ceny zakupu tego typu katalizatorów są wysokie, a ich stosowanie, w rozumieniu „zielonej chemii”, obecnie uznaje się za nieekologiczne. Ponadto metale przejściowe mogą również stanowić trudne do usunięcia zanieczyszczenia produktu końcowego, co jest istotne w przypadku związków przeznaczenia farmakologicznego^{148,149}. Z tego powodu świat chemii organicznej nie ustaje w opracowywaniu nowych metod syntezy związków heterocyklicznych z uwzględnieniem ekologicznych, wygodnych i łatwych w realizacji protokołów. W niniejszym rozdziale przedstawiono kilkanaście nowych i interesujących pod względem chemicznym metod syntezy rdzeni chinolonowych opublikowanych na przestrzeni ostatnich 15 lat. Wszystkie przytoczone reakcje mają szerokie zastosowanie aplikacyjne, nie wymagają użycia katalizatorów metali przejściowych i są łatwe do zrealizowania w większości laboratoriów syntezy organicznej. Dodatkowo charakteryzują się bardzo atrakcyjnymi wydajnościami, krótkim czasem reakcji, a otrzymane rdzenie chinolonowe możliwe są do oczyszczenia z wykorzystaniem podstawowych technik laboratoryjnych. Co więcej, przedstawione metody syntezy w dużej mierze opisane są procedurami typu „one-pot”.

1.2.1. Synteza rdzenia chinolin-2(1H)-onu

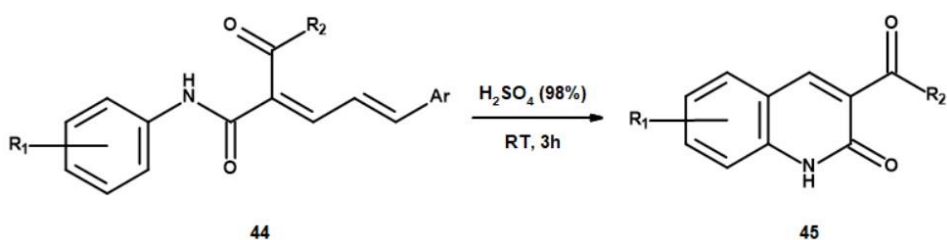
Kondensacja z wykorzystaniem kwaśnego katalizatora

Twórcy współczesnych metody syntezy chinolonów chętnie czerpią z klasycznych pierwowzorów, uwzględniając w przebiegu projektowanych reakcji odpowiednie amidy aromatyczne, czy też amidowe stany przejściowe. Park i współpracownicy poprzez modyfikację kondensacji Pechmann'a otrzymali 4-hydroksychinolin-2(1H)-on (**43**) (Rys. 19). W pierwszym etapie syntezy badacze przeprowadzili kondensację aniliny (**40**) z kwasem Meldruma (**41**) w celu otrzymania monoamidu kwasu malonowego (**42**), który następnie poddany wewnątrzcząsteczkowej kondensacji w obecności PPA lub odczynnika Eaton'a prowadził do otrzymania pożądanego produktu¹⁵⁰. W roku 2010 Gao i współpracownicy zoptymalizowali warunki omawianej reakcji i zaproponowali syntezę 4-hydroksychinolin-2(1H)-onu na drodze procedury typu „one-pot”¹⁵¹.



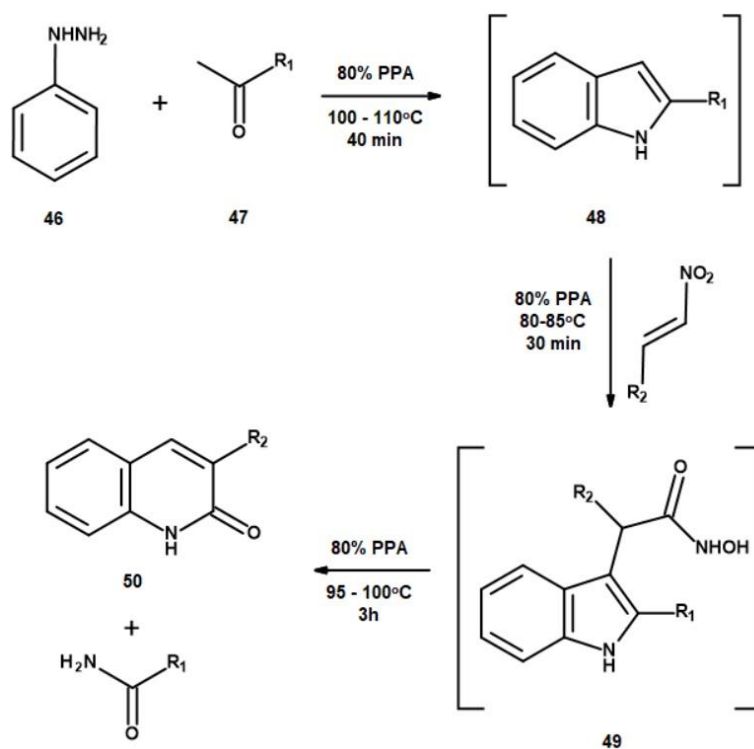
Rys.19. Schemat syntezy 4-hydroksychinolin-2(1H)-onu (**43**) z aniliny (**40**) i kwasu Meldruma (**41**)¹⁵⁰

W roku 2012 Liu wraz ze współpracownikami zaproponowali metodę syntezy typu „one-pot” podstawionych w pozycji 3 chinolin-2(1H)-onów (**45**) na drodze cyklizacji aromatycznych 2,4-dienoamidów (**44**) w stężonym H₂SO₄ (Rys.20). Z zaproponowanego przez badaczy mechanizmu reakcji wynika, iż po sprotonowaniu obu atomów tlenu w substracie dochodzi do powstania dikationowego superelektrofila, który następnie ulega wewnątrzcząsteczkowej nukleofilowej cyklizacji¹⁵².



Rys.20. Schemat syntezy 3-podstawionych chinolin-2(1H)-onów (**45**) na drodze wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji penta-2,4-dienamidów (**44**)¹⁵²

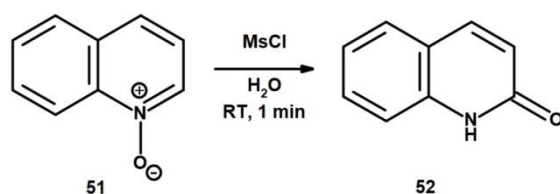
O bardzo interesującej syntezie 3-podstawionych chinolin-2(1H)-onów (**50**) raportowali również Aksenov i współpracownicy. Początkowo substratami wyjściowymi do tej reakcji były podstawione w pozycji 2 indole oraz 2-nitroalkeny. Reakcja między substratami zachodzi na drodze kaskady następujących po sobie procesów addycji nukleofilowej, otwarcia i następnie zamknięcia heterocyklicznego pierścienia (ang. *Addition of Nucleophile, Ring Opening and Ring Closure – ANRORC mechanism*), w których kluczową rolę odgrywa intermediat (**49**). W trakcie badań nad rozwojem tej metody badaczom udało się opracować procedurę typu „one-pot”, w której substratami wyjściowymi są fenylhydrazyna (**46**) oraz ketony (**47**), czy związki potrzebne do otrzymania indolu *in situ* (**48**) na drodze cyklizacji Fischera (Rys.21)^{153,154,155}.



Rys.21. Schemat syntezy 3-podstawionych chinolin-2(1H)-onów (**50**) opracowanej przez Aksenov *et al.*¹⁵⁴

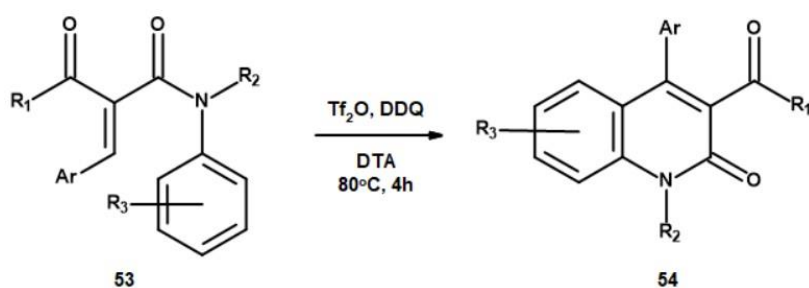
Inne metody syntezy rdzenia chinolin-2(1H)-onu

W 2017 roku, jako alternatywę w stosunku do reakcji typu Reissert – Henze'a, Xie i współpracownicy zaproponowali niezwykle prostą i szybką reakcję otrzymywania chinolin-2(1H)-onu (**52**) z N-tlenku chinoliny (**51**) (Rys.22). Do konwersji N-tlenku chinoliny dochodzi w wodzie, w obecności czynnika aktywującego (MsCl). Reakcja ta nie wymaga stosowania zasady, czy też organicznego rozpuszczalnika. Dodatkowo czas jej trwania jest niezwykle krótki, a wydajności rzędu 95%¹⁵⁶.



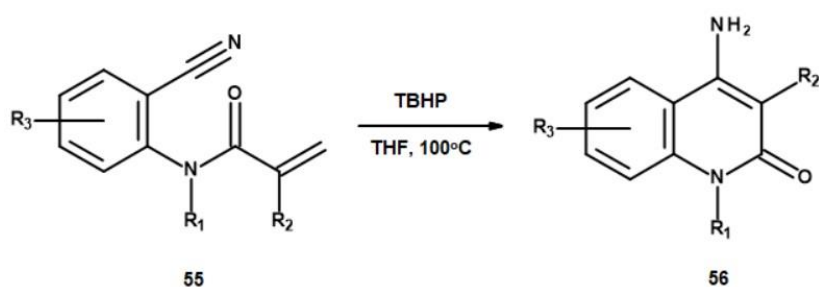
Rys.22. Konwersja N-tlenku chinoliny (**51**) do chinolin-2(1H)-onu (**52**) opublikowana przez Xie *et al.*¹⁵⁶

Zhang i współpracownicy, w ramach kontynuacji swych wcześniejszych badań¹⁵⁷, opisali syntezę wielopodstawionych chinolin-2(1H)-onów (**54**), przeprowadzając wewnątrzcząsteczkową kondensację N-aryloamidów kwasu cynamonowego (**53**) w obecności bezwodnika trifluorometanosulfonowego, w łagodnych warunkach utleniających (Rys.23). Wymagane N-aryloamidy można otrzymać na drodze kondensacji Knoevenagel'a z łatwo dostępnych β -ketoamidów oraz aldehydów¹⁵⁸. Warto zaznaczyć, iż omawiana reakcja nie zachodzi w obecności kwasu triflowego. Ponadto synteza prowadzona w samym toluenie skutkowałą otrzymaniem mieszaniny dihydrochinolin-2(1H)-onów, co sugeruje iż DTA odgrywa ważną rolę wspierającą w procesie utleniania dihydrochinolonów do właściwego produktu.



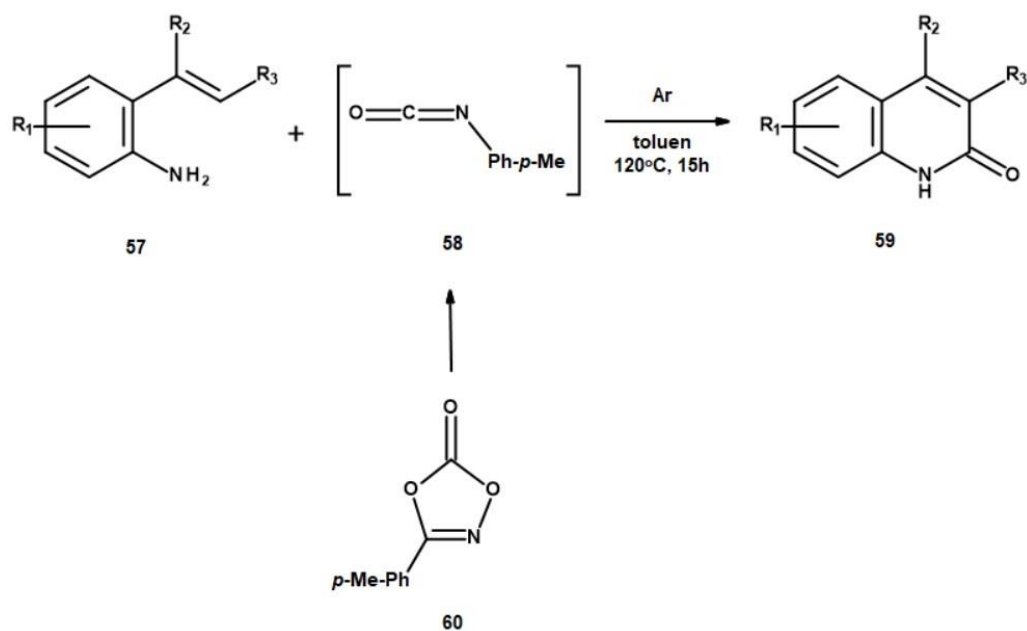
Rys.23. Kondensacja N-aryloamidów kwasu cynamonowego (**53**) w kierunku otrzymania wielopodstawionych chinolin-2(1H)-onów (**54**)¹⁵⁸

W roku 2021 opublikowano dwie prace poświęcone nowatorskim metodom syntezy chinolin-2(1H)-onów, które bazują na reakcji anulacji. Xia i współpracownicy opracowali metodę syntezy chinolin-2(1H)-onów modyfikowanych w pozycji 4 grupą aminową (**56**) (Rys.24). Proponowana reakcja polega na anulacji (2-nitryloarylo)akrylamidów na drodze rozerwania podwójnego wiązania C=C od strony ugrupowania akrylowego. W badaniach nad mechanizmem reakcji dowiedziono, iż THF nie tylko pełni rolę rozpuszczalnika, ale również bierze czynny udział w reakcji biegnącej mechanizmem rodnikowym¹⁵⁹. Przedstawiana synteza ma również zastosowanie wobec niearomatycznych, cyklicznych akrylamidów 2-nitrylowinyliowych.



Rys.24. Schemat syntezy 4-aminochinolin-2(1H)-onów (**56**) na drodze anulacji (2-nitryloarylo)akrylamidów (**55**)

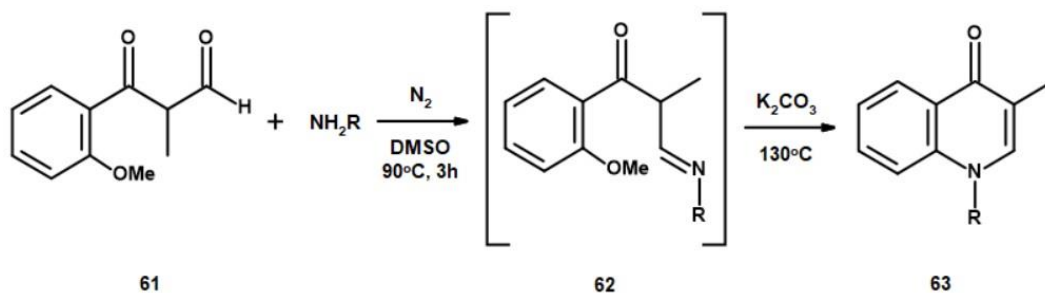
Nan i współpracownicy opracowali natomiast metodę syntezy wielopodstawionych chinolin-2(1H)-onów (**59**) w oparciu o reakcję anulacji [5+1] podstawionej w pozycji 2 ugrupowaniami winylowymi aniliny (**57**) z dioksazolonom (**60**) pełniącym w tym przypadku nieopisaną wcześniej rolę donora C=O (Rys.25). Z badań nad mechanizmem reakcji wynika, iż izocyjanian (**58**) generowany z dioksazolonu na drodze przegrupowania typu Courtis'a jest kluczowym elementem reakcji karbonylowania¹⁶⁰.



Rys.25. Schemat otrzymywania wielopodstawionych chinolin-2(1H)-onów (**59**) w wyniku reakcji winylowych pochodnych aniliny (**57**) z oksazolonom (**60**)¹⁶⁰

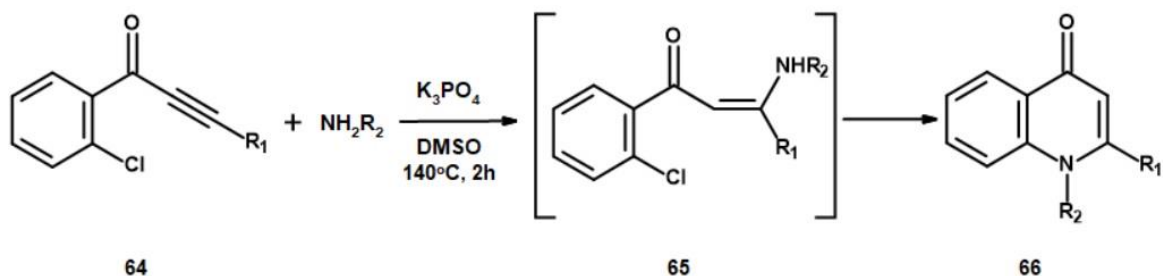
1.2.2. Synteza rdzenia chinolin-4(1H)-onu

W ciągu ostatnich lat opublikowano kilka interesujących prac dotyczących syntezy N-modyfikowanych rdzeni chinolin-4(1H)-onów. Niecodzienne rozwiązanie zaproponowali Zhao i współpracownicy, którzy dokonali syntezy N-podstawionych 3-metylocholin-4-onów (**63**) na drodze rozerwania aromatycznego wiązania C(sp²)-O (Rys.26). Takie podejście nie jest powszechnie stosowane z uwagi na wysoką energię tego wiązania. Reakcja polega na utworzeniu iminy (**62**) w wyniku kondensacji 2-metoksyarylowej pochodnej 2-metylo-3-oksopropalanu (**61**) z aminami pierwszorzędowymi, która następnie ulega katalizowanej przez K₂CO₃ wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji¹⁶¹.



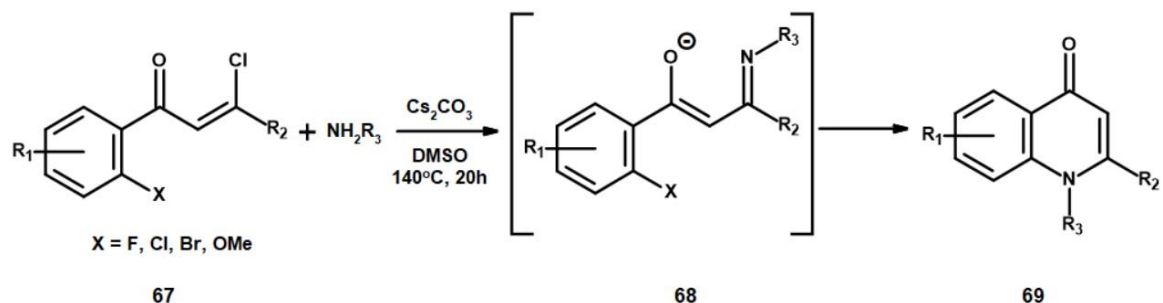
Rys.26. Schemat metody otrzymywania N-podstawionych 3-metylocholin-4(1H)-onów (**63**) opracowanej przez Zhao *et al.*¹⁶¹

Opracowana przez Shao i współpracowników synteza N-podstawionych chinolin-4(1H)-onów (**66**) polega na aminowaniu acetylenowych pochodnych 2-chloroaryloketonów (**64**) za pomocą alkilowych amin pierwszorzędowych (Rys.27). Reakcja ta również katalizowana jest za pomocą nieorganicznej zasady, z prośród których K_3PO_4 i K_2CO_3 okazały się najskuteczniejsze. W przypadku tej reakcji w ciągu kilku minut dochodzi do utworzenia intermediatu **65**, który następnie ulega cyklizacji do pożądanego produktu¹⁶².



Rys.27. Schemat otrzymywania N-podstawionych chinolin-4(1H)-onów (**66**) na drodze aminowania acetylenowych pochodnych 2-chloroaryloketonów (**64**)¹⁶²

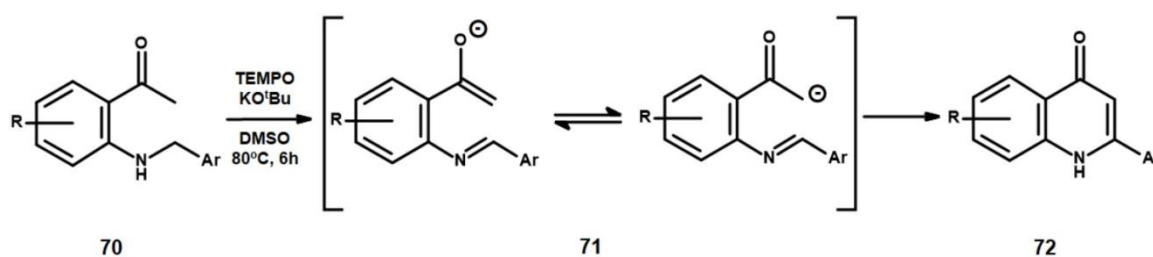
Wang i współpracownicy opracowali natomiast metodę syntezy N-podstawionych chinolin-4(1H)-onów (**69**) w oparciu o tandemową reakcję „one-pot” aromatycznych (Z)-β-chlorowinyloketonów (**67**) z aminami (Rys.28). Reakcja rozpoczyna się od addycji nukleofilowej aminy do węgla β ketonu, po której następuje eliminacja atomu chloru. W rezultacie powstaje Z-enamina (**68**), która następnie ulega wewnątrzcząsteczkowej aromatycznej S_N. Powodzenie prezentowanej tandemowej reakcji jest ściśle uzależnione od zastosowanej zasady oraz polarnego rozpuszczalnika¹⁶³.



Rys.28. Schemat syntezy pochodnych chinolin-4(1H)-onu (**69**) na opracowanej przez Wang *et al.*¹⁶³

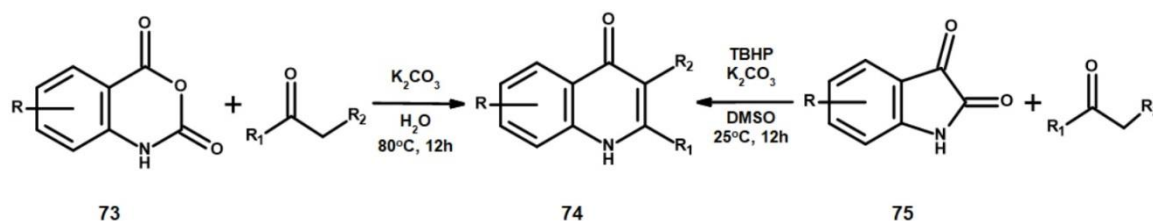
Reakcją zdecydowanie wartą uwagi jest zaproponowana przez Hu i współpracowników nowatorska utleniająca reakcja Mannicha zachodząca wewnątrzcząsteczkowo w N-benzyl-2-

aminofenylketonach (**70**) (Rys.29). Jest to przykład pierwszej takiej reakcji, w której do utworzenia rdzeni chinolin-4(1H)-onów (**72**) dochodzi poprzez bezpośrednie oksydacyjne sprzężanie wiązań C(sp³)-H/C(sp³)-H. Badacze sugerują, iż mechanizm reakcji biegnie dwuetapowo, początkowo poprzez przeniesienie elektronu z atomu azotu na TEMPO (SET), a następnie transfer proton w kierunku otrzymania iminowego intermediatu (**71**)¹⁶⁴.



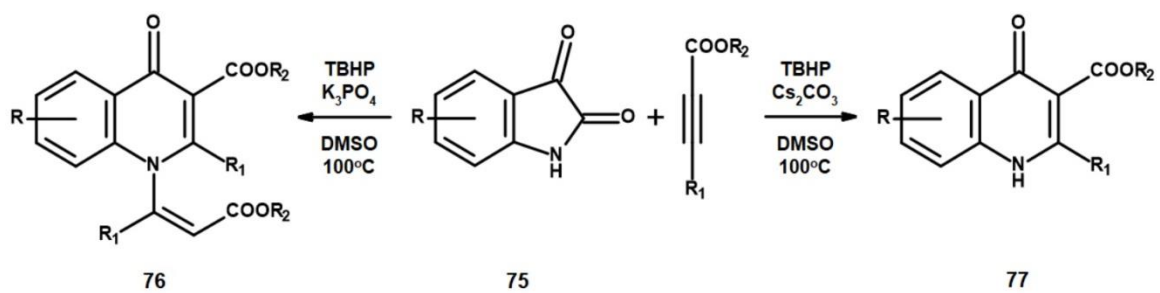
Rys.29. Schemat otrzymywania 2-arylochinolin-4(1H)-onów (**72**) na drodze utleniającej wewnątrzcząsteczkowej reakcji Mannicha¹⁶⁴

Bardzo atrakcyjną metodę syntezy chinolin-4(1H)-onów (**74**) opracowali również Ma i współpracownicy. Substratami wyjściowymi do tej reakcji są izatyna (**75**) lub bezwodnik izatowy (**73**) oraz związki 1,3-dikarbonylowe (Rys.30). Rdzeń chinolin-4(1H)-onu powstaje przy zastosowaniu nieorganicznej zasady oraz – w przypadku izatyny – TBHP na drodze cyklizacji, której towarzyszy również dekarboksylacja. Zarówno izatyna jak i bezwodnik izatowy ulegają konwersji do pożądanego produktu w łagodnych warunkach, z wytworzeniem CO₂ oraz wody, a wydajności reakcji są bardzo atrakcyjne¹⁶⁵.



Rys.30. Schemat otrzymywania rdzeni chinolin-4(1H)-onu (**74**) z izatyny (**75**) i bezwodnika izatowego (**73**)¹⁶⁵

Warto dodać, iż w tym samym czasie Jiang i współpracownicy opublikowali pracę dotyczącą syntezy pochodnych chinolin-4(1H)-onów (**76,77**) na drodze reakcji izatyny z alkinami, w której to produkt końcowy uzależniony jest od zastosowanej zasady (Rys.31)¹⁶⁶.



Rys.31. Schemat syntezy chinoin-4(1H)-onów (**76,77**) na drodze reakcji izatyny z alkinami¹⁶⁶

2. Cele badawcze

Głównym celem badań własnych była synteza związków heterocyklicznych o wspólnym fragmencie 2-pirydonu, wykazujących aktywność przeciwbakteryjną lub przeciwnowotworową. Po szczegółowym przeglądzie literaturowym postanowiono skupić swoją uwagę na syntezie pochodnych 5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu, gdyż tego typu związki i ich aktywność biologiczna są jednymi z rzadziej opisanych w literaturze. W toku badań własnych wyodrębniono kilka wyróżniających się problemów badawczych, których rozwiązanie lub próba rozwiązania znacząco wpłynęły na zawartość niniejszej rozprawy doktorskiej. Należą do nich:

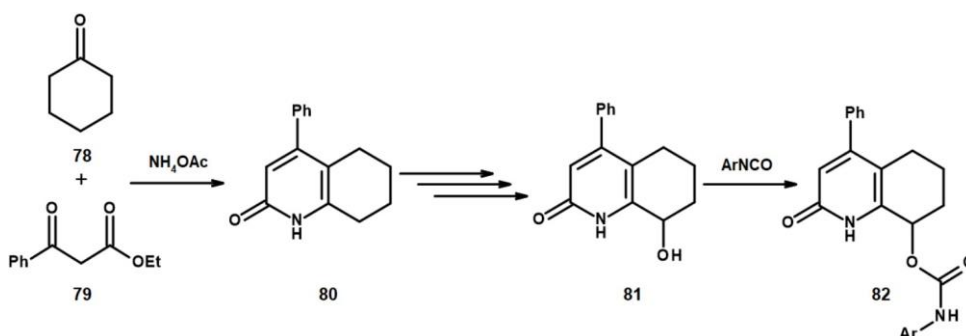
1. Synteza arylokarbamoilowych pochodnych 4-fenilo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu.
2. Synteza pochodnych 4-fenilo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu modyfikowanych w pozycji 3 podstawnikami typu benzyłowego.
3. Badanie mechanizmu usunięcia grupy metylowej z 2-metoksy-4-fenilo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-olu podczas acylowania izocyjanianami fenylowymi.
4. Opracowanie nowej, krótszej i ekonomiczniejszej metody syntezy typu "one-pot" rdzeni 4-fenilo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu.
5. Badanie mechanizmu powstawania trójcyklicznych 9-hydrokso-11,11-dimetylo-11,12-dihydro(4H)-[1,3]oksazino[2,3-j]chinolin-4,8(10H)-dionów.
6. Funkcjonalizacja pochodnej 2,3-dihydrotiazolo[3,2- α]pirydyn-5-onu ugrupowaniami o charakterze hydrofilowym.

3. Badania własne

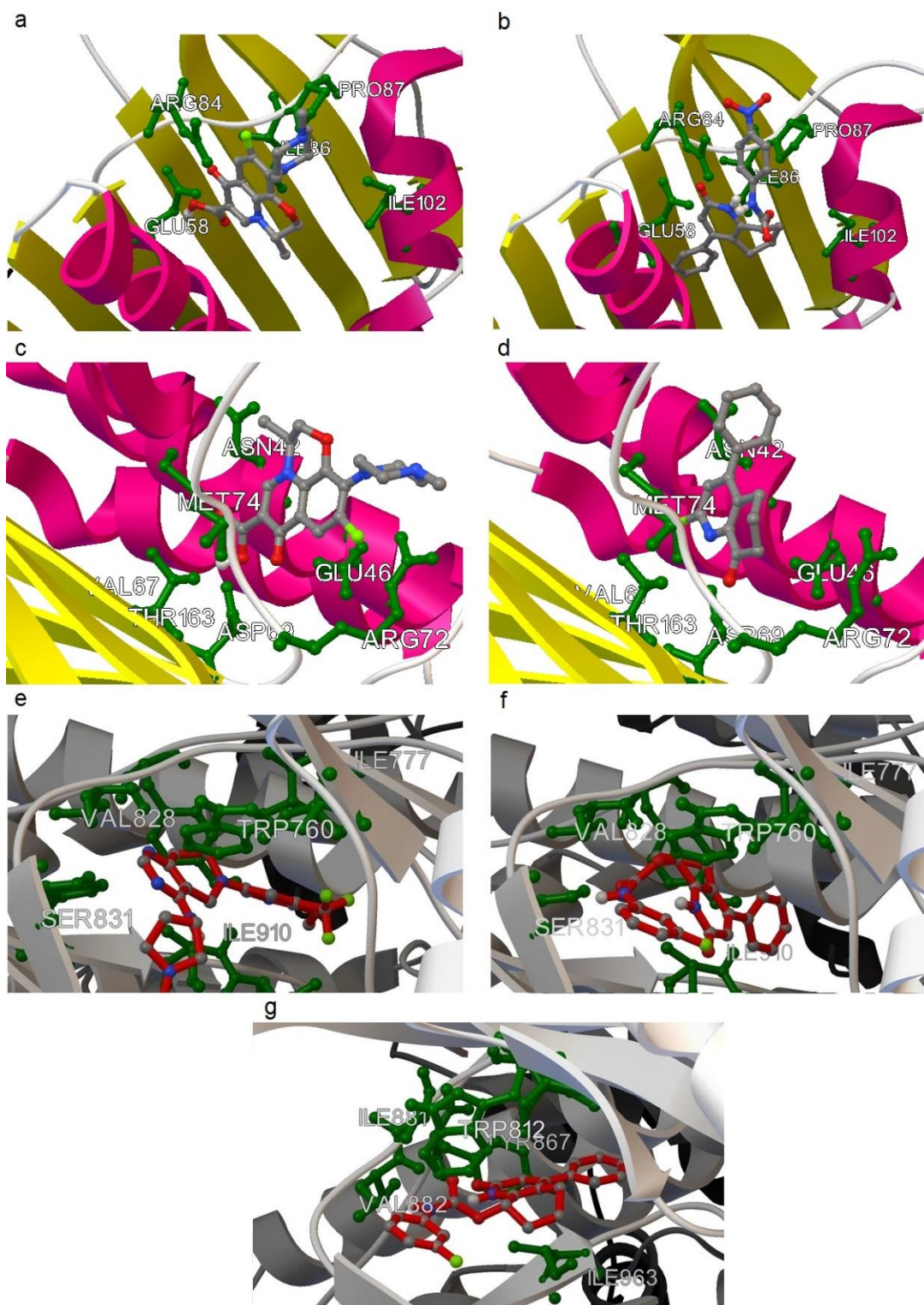
3.1. Arylokarbamoilowe pochodne 4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu

3.1.1. Projektowanie ścieżki syntezy

Badania w ramach studium doktoranckiego rozpoczęto od zaprojektowania ścieżki syntezy nowych związków z grupy 2-pirydonu niosących ze sobą potencjał biologiczny. Niezbędne informacje oraz inspiracje odnaleziono w przeglądzie literaturowym poświęconym w dużej mierze chinolonom o właściwościach bakteriobójczych i przeciwnowotworowych. Wstępny projekt zakładał kilkuetapową ścieżkę syntezy rozpoczynającą się od kondensacji beznoilooctanu etylu (**79**) z cykloheksanonem (**78**) w obecności NH_4OAc celem otrzymania 4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu (**80**) (Rys.32). W następnych etapach zaproponowano szereg przemian chemicznych, które umożliwiłyby funkcjonalizację 4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu grupą hydroksylową w pozycji 8 (**81**). W finalnym etapie syntezy zaproponowano acylowanie 4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-olu izocyjanianami fenyłowymi (**82**). Zaprojektowane pochodne **82** zostały również poddane analizie z zakresu modelowania molekularnego przeprowadzonej przez Promotora niniejszej rozprawy doktorskiej, w której dokowano struktury związków do centrów aktywnych wybranych enzymów bakteryjnych i zwierzęcych. Pozytywne wyniki dokowania uzyskano zarówno dla topoizomeraz bakteryjnych, jak i ludzkiej kinazy 3-fosfatydyloinozytolowej (PI3K) (Rys.33). Wyniki modelowania molekularnego potraktowano jako wsparcie merytoryczne zachęcające do rozpoczęcia prac syntetycznych.



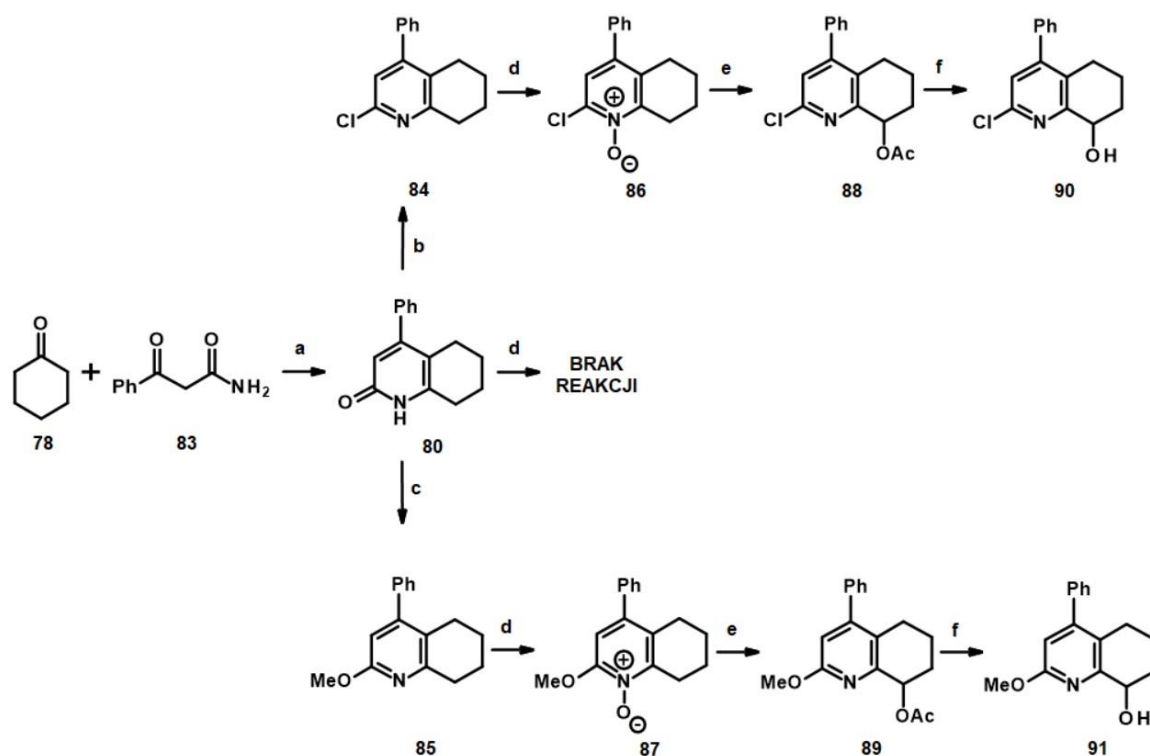
Rys.32. Wstępny projekt syntezy uretanowych pochodnych 4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu (**82**)



Rys.33. Wyniki dokowania molekularnego dla pochodnych 4-fenilo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu: (a) wiązanie lewofloksacyny do gyrazy *Staphylococcus aureus* (PDB: 3G75)¹⁶⁷; (b) wiązanie **94b** do gyrazy *Staphylococcus aureus* (PDB: 3G75); (c) wiązanie lewofloksacyny do topoizomerazy IV *Escherichia coli* K-12 (PDB: 3FV5)¹⁶⁸; (d) wiązanie **95** do topoizomerazy IV *Escherichia coli* K-12 (PDB: 3FV5); (e) wiązanie Leniolisibu do PI3K δ (PDB: 5O83)¹⁶⁹; (f) wiązanie **94d** do PI3K δ (PDB: 5O83); (g) wiązanie **94d** do PI3K γ (PDB: 3OAW)¹⁷⁰

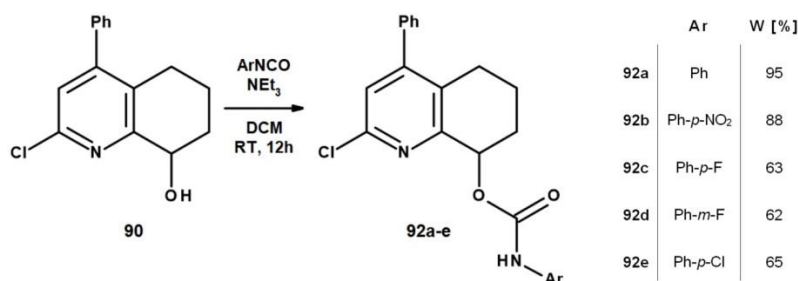
3.1.2. Synteza arylokarbamoilowych pochodnych 4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu

W pierwszym etapie syntezy w celu otrzymania 4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu (**80**) bazowano na znanych z literatury reakcjach kondensacji β -ketoestrów oraz β -ketoamidów z cyklicznymi ketonami^{171,172}. Finalnie przeprowadzono reakcję amidu kwasu benzoilooctowego (**83**) z cykloheksanonem (**78**) w obecności TsOH¹⁷³ (Rys.34). Niezbędny okazał się również dodatek środka suszającego, którego obecność znacznie poprawiła wydajność kondensacji. Z uwagi na niepowodzenie reakcji bezpośredniego utleniania 4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu (**80**) w pozycji 8, związek ten poddano chlorowaniu z wykorzystaniem PhP(O)Cl₂¹⁷⁴ oraz metylowaniu w obecności węglanu srebra¹⁷⁵. Otrzymane pochodne **84** i **85** poddano następnie utlenianiu z zastosowaniem H₂O₂ oraz bezwodnika octowego. Tak otrzymane 8-acetoksy pochodne (**88**, **89**) zhydrolizowano w środowisku zasadowym i w ten sposób otrzymano 2-chloro (**90**) oraz 2-metoksy-4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-ol (**91**), które stanowiły kluczowe substraty do finalnych modyfikacji.



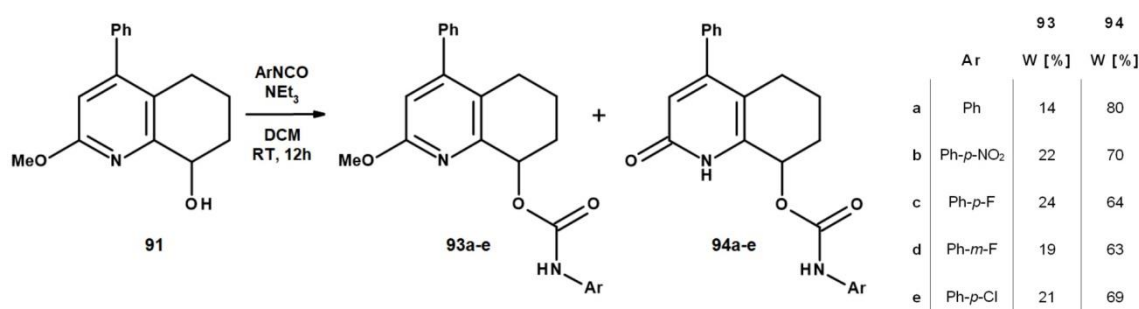
Rys.34. Schemat ścieżki syntezy 2-chloro-4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-olu (**90**) i 2-metoksy-4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-olu (**91**): (a) TsOH, MgSO₄/toluol, refluks; (b) PhP(O)Cl₂, 160 °C; (c) Ag₂CO₃, CH₃I/CHCl₃, RT; (d) 30% H₂O₂/AcOH, 80 °C; (e) Ac₂O, RT -> 100 °C, 5 h; (f) KOH/MeOH, RT

Pierwszą grupą pochodnych, jaką otrzymano, były arylokarbaminiany 2-chloro-4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-ylu (**92a-e**) uzyskane na drodze reakcji 2-chloro-4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-olu (**90**) z izocyjanianami fenylowymi w obecności zasady (Rys.35). Związki te otrzymano z wydajnością w zakresie 62-95%.



Rys.35. Otrzymywanie arylokarbamoiowych pochodnych 2-chloro-4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-olu (**92a-e**)

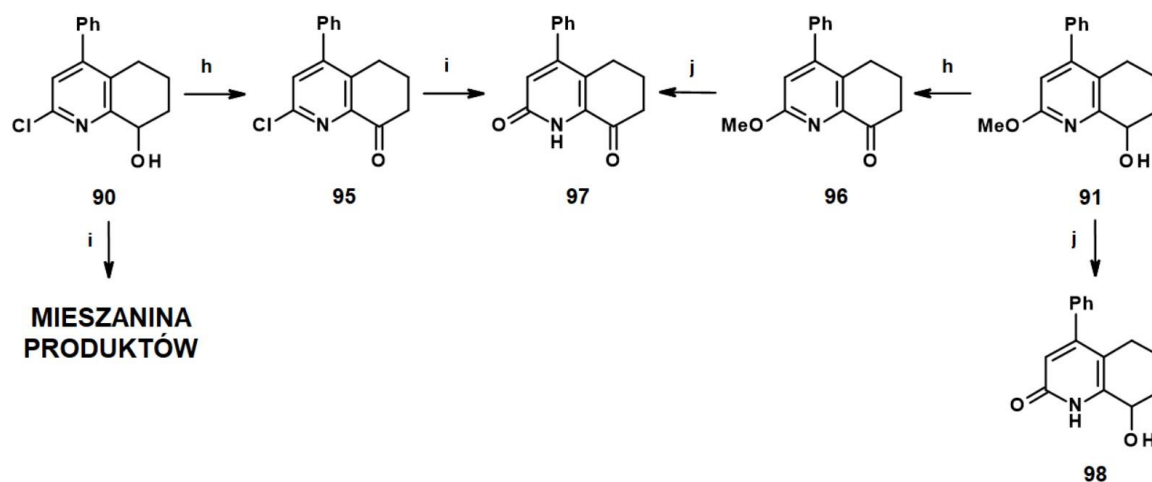
W następnym kroku przeprowadzono analogiczną reakcję dla 2-metoksy-4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-olu (**91**), w której niespodziewanie otrzymano mieszaninę dwóch produktów (Rys.36). Zaskakującym był fakt, iż dla wszystkich zastosowanych izocyjanianów, pochodne **94a-e** pozbawione grupy metylowej w pozycji 2 uzyskano w znacznej przewadze w stosunku do oczekiwanych produktów **93a-e**. Z uwagi na niespodziewany przebieg tej reakcji przeprowadzono szereg badań mających na celu wyjaśnienie mechanizmu usuwania grupy metylowej w pozycji 2. Badania te przedstawiono w podrozdziale 3.1.3.



Rys.36. Otrzymywanie arylokarbaminianów 2-metoksy-4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-ylu (**93a-e**) oraz 2-okso-4-fenyl-1,2,5,6,7,8-heksahydrochinolin-8-ylu (**94a-e**)

2-Metoksy-4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-ol (**91**) oraz 2-chloro-4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-ol (**90**) poddano również utlenianiu Swern'a, w wyniku czego otrzymano pochodne **95** i **96** (Rys.37). 4-Fenyl-6,7-tetrahydrochinolin-2,8(1H,5H)-dion (**97**) otrzymano na

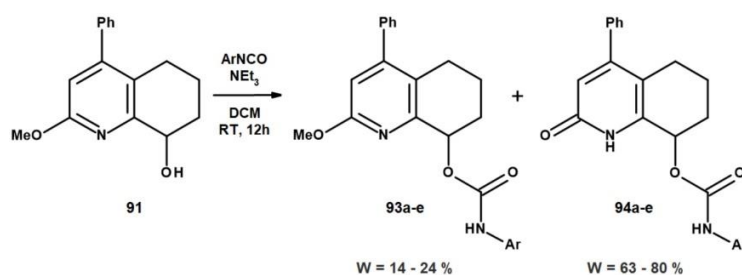
drodze hydrolizy zarówno 2-chloro-4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8(5H)-onu (**96**). Wartym zaznaczenia jest fakt, iż 8-hydroksy-4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-on (**98**) uzyskano tylko na drodze hydrolizy związku **91**, gdyż hydroliza pochodnej **90** w stężonym kwasie solnym prowadziła do powstania mieszaniny produktów dehydratacji.



Rys.37. Dodatkowe modyfikacje 2-chloro-4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-olu (**90**) oraz 2-metoksy-4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-olu (**91**) w kierunku otrzymania 4-fenylo-6,7-tetrahydrochinolin-2,8(1H,5H)-dionu (**97**) oraz 8-hydroksy-4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu (**98**); (h) DMSO, (COCl)₂, TEA/DCM, Ar, - 78 °C -> RT; (i) 12 M HCl aq., refluks; (j) NaI/AcOH, refluks

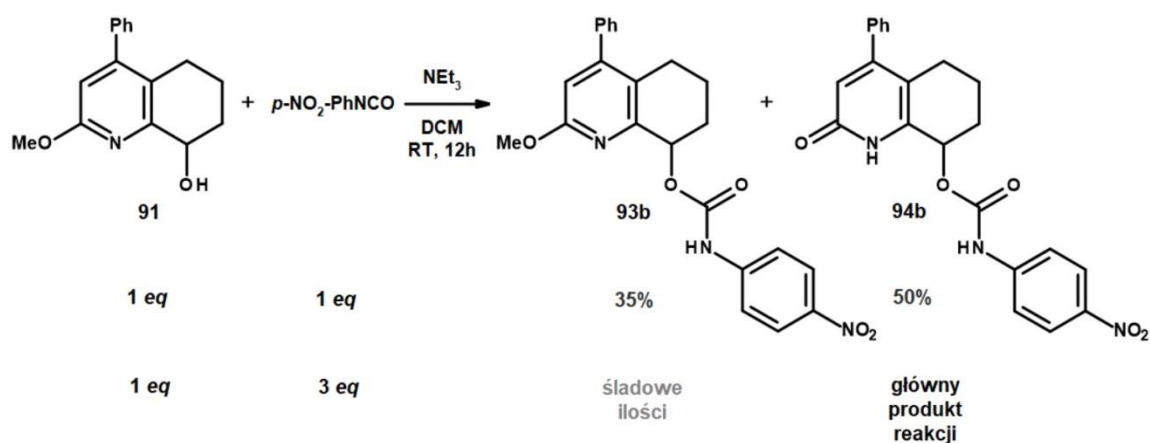
3.1.3. *Badanie mechanizmu usuwania grupy metylowej podczas otrzymywania arylokarbaminianów 2-metoksy-4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-ylu*

Jak wcześniej zaznaczono, podczas acylowania pochodnej **91** izocyjanianami fenyłowymi niespodziewanie dochodziło do powstawania dwóch produktów reakcji: oczekiwanej arylokarbamoilowej pochodnej 2-metoksy-4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-olu (**93a-e**) oraz produktu demetylowania (**94a-e**) (Rys. 38).



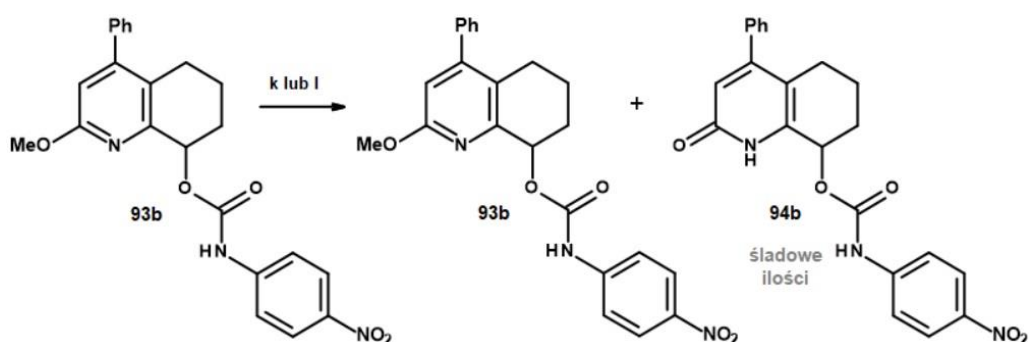
Rys.38. Schemat reakcji 2-metoksy-4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-olu (**91**) z izocyjanianami fenyłowymi, w wyniku której niespodziewanie otrzymano mieszaninę dwóch produktów

W celu zbadania migracji grupy metylowej przeprowadzono szereg eksperymentów różnicujących z wykorzystaniem izocyjanianu *p*-nitrofenylowego, mających na celu wstępne zbadanie swoistego dla tej reakcji mechanizmu. Pierwsze testy wykazały, iż procesowi demetylowania sprzyjał nadmiar izocyjanianu, gdyż przy zastosowaniu 3 ekwiwalentów tego odczynnika pochodną **93b** uzyskano w śladowych ilościach (Rys.39).



Rys.39. Wpływ stężenia izocyjanianu na przebieg reakcji demetylowania

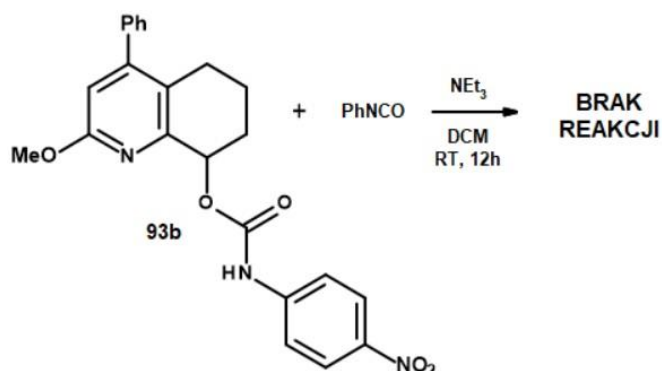
W następnym kroku postanowiono sprawdzić zdolność (*p*-nitrofenylo)karbamoilowej pochodnej 2-metoksy-4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-olu (**93b**) do utraty grupy metylowej pod wpływem obecności wody lub amin, jednakże w każdej z przeprowadzonych reakcji proces demetylowania zachodził w minimalnym stopniu (Rys.40).



Rys.40. Wpływ nukleofilu na usuwanie grupy metylowej z pochodnej **93b**: (k) THF/H₂O (2:1), RT, 12h; (l) NEt₃ lub *p*-nitroanilina/ DCM, RT, 12h

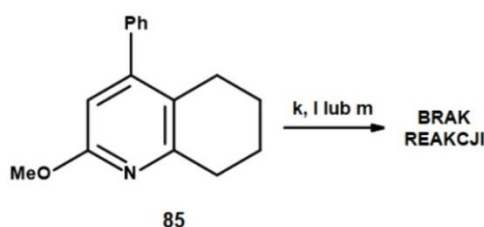
Sprawdzenia wymagał również wpływ samego izocyjanianu na pochodną **93b**, gdyż w przeprowadzonej serii syntez stosowano go w dwukrotnym nadmiarze. Założono, iż możliwa jest koordynacja izocyjanianu do pirydynowego atomu azotu oraz atak mocznika difenyłowego na

grupę metylową, co w konsekwencji prowadziłoby do utworzenia ugrupowania pirydonowego, jednakże w przypadku tego eksperymentu odnotowano całkowity brak reakcji (Rys.41).



Rys.41. Badanie wpływ izocyjanianu fenylowego na pochodną **93b**

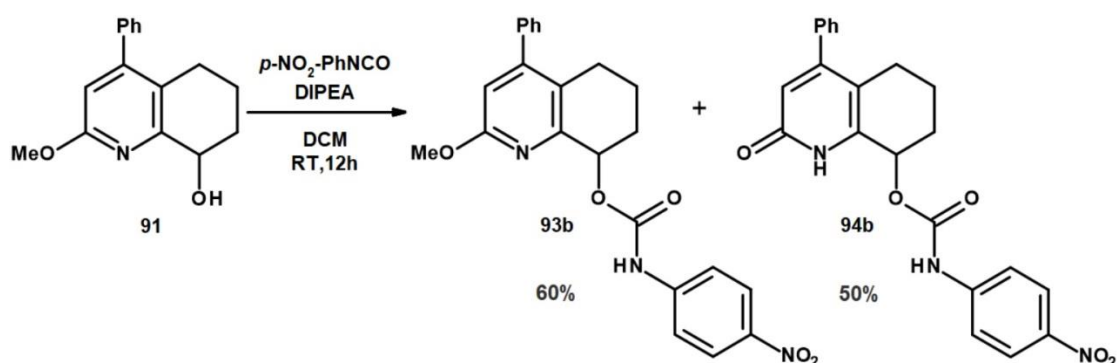
W dalszym etapie badań postanowiono poznać zdolność różnych reagentów do usuwania grupy metylowej z niefunkcjonalizowanej w pozycji 8 2-metoksy-4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinoliny (**85**), jednakże żadne z zaproponowanych warunków nie doprowadziły do demetylowania substratu, co sugerowało wpływ grupy hydroksylowej w pozycji 8 związku **91** na przebieg tego procesu (Rys.42).



Rys.42. Próby usunięcia grupy metylowej w 2-metoksy-4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolinie (**85**): (k) THF/H₂O (2:1), RT, 12h; (l) NEt₃ lub *p*-nitroanilina/ DCM, RT, 12h; (m) *p*-NO₂-PhNCO, NEt₃/ DCM, RT, 12h

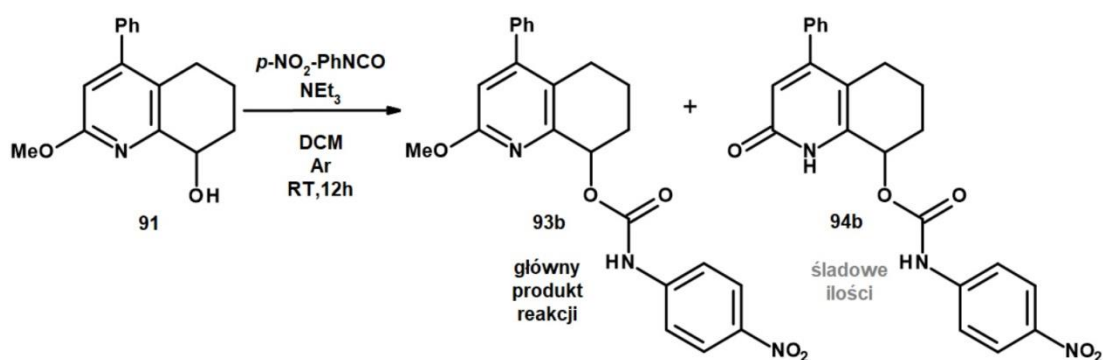
Ponadto, aby potwierdzić lub wykluczyć wpływ NEt₃ na proces demetylowania, postanowiono przeprowadzić eksperyment z wykorzystaniem zatłoczonej aminy III-rzędowej wykazującej bardzo słabe właściwości nukleofilowe (Rys.43). Założono, iż jeżeli obecność aminy alifatycznej wpływa na reakcję demetylowania, to w obecności DIPEA grupa metoksylova powinna pozostać w pozycji 2 lub dystrybucja otrzymanych produktów powinna ulec zmianie. W wyniku tego eksperymentu ponownie otrzymano dwa produkty, jednakże ich wydajności różniły

się w stosunku do wcześniejszych z korzyścią dla 2-metoksy pochodnej **93b**, co sugerowało możliwy udział NEt_3 w procesie demetylowania.



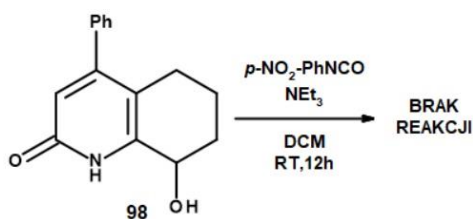
Rys.43. Reakcja acylowania 2-metoksy-4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-olu (**91**) z zastosowaniem N,N-diizopropylloetyloaminy

W celu ewaluacji wpływu reszkowej zawartości wody na przebieg usuwania grupy metylowej postanowiono przeprowadzić reakcję w atmosferze gazu obojętnego w uprzednio wysuszonym rozpuszczalniku. Na podstawie analizy TLC w mieszaninie poreakcyjnej stwierdzono obecność głównie arylokarabamoilowej pochodnej 2-metoksy-4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-olu (**93b**), co sugerowało, iż za usuwanie grupy metylowej mogą odpowiadać śladowe ilości wody w mieszaninie (Rys.44).



Rys.44. Reakcja acylowania 2-metoksy-4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-olu (**91**) w warunkach bezwodnych

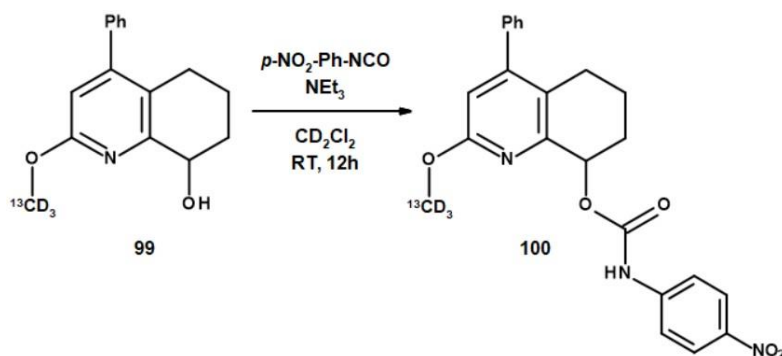
Bardzo ciekawy okazał się również wynik reakcji 8-hydroksy-4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu (**98**) z izocyjaniem *p*-nitrofenylowym, gdyż pochodna **98** przy zastosowaniu analogicznych warunków w ogóle nie ulegała acylowaniu, co dowiodło, iż uzyskanie serii związków **94a-e** tą drogą jest niemożliwe (Rys.45).



Rys.45. Nieudana próba acylowania 8-hydroksy-4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu (**98**) izocyjanianem *p*-nitrofenylowym

Badania z zastosowaniem spektroskopii NMR

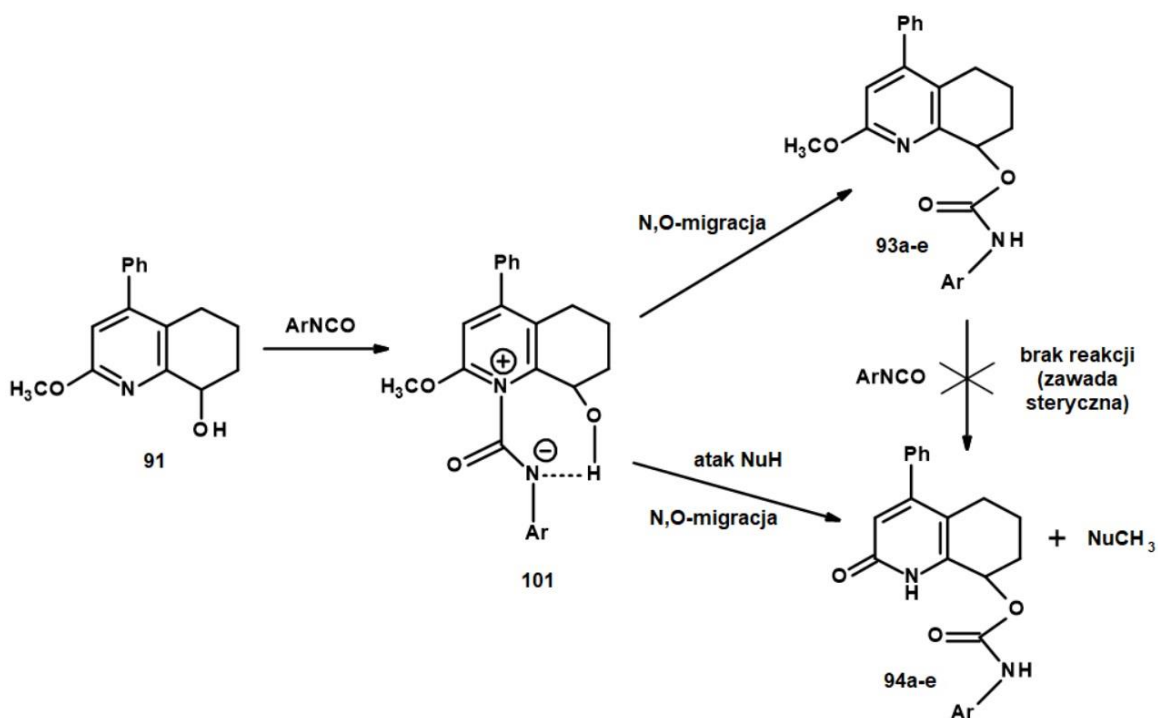
W świetle otrzymanych wyników, w kierunku dokładniejszego poznania mechanizmu reakcji demetylowania, postanowiono przeprowadzić badania z wykorzystaniem spektroskopii NMR. W tym celu otrzymano pochodną **99** znakowaną grupą $^{13}\text{CD}_3$, którą następnie w próbce NMR poddano reakcji z izocyjanianem *p*-nitrofenylowym z zachowaniem warunków odpowiadających wcześniejszej serii syntez (Rys.46). Eksperyment zakładał, iż monitorując przebieg reakcji w czasie rzeczywistym za pomocą spektroskopii ^{13}C NMR, możliwe będzie zaobserwowanie grup metylowych poszczególnych indywiduów chemicznych biorących udział w reakcji, co w konsekwencji doprowadzi do ustalenia losów grupy CH_3 . W celu obserwacji migracji grupy $^{13}\text{CD}_3$ w trakcie reakcji wykonano serię widm ^{13}C NMR, jednakże prawdopodobnie z uwagi na pojawiający się wtórny efekt izotopowy, niestety nie zaobserwowano zjawiska demetylowania, a w mieszaninie preakcyjnej zidentyfikowano tylko znakowany izotopowo (*p*-nitrofenylo)karbaminian 2-metoksy-4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydroquinolin-8-ylu (**100**).



Rys.46. Próba zbadania mechanizmu usuwania grupy metylowej na drodze analizy ^{13}C NMR

W oparciu o wynik eksperymentu ^{13}C NMR, w celu identyfikacji sygnału migrującej grupy metylowej postanowiono przeprowadzić w próbce NMR reakcję acylowania izocyjanianem *p*-

nitrofenylowym nieznakowanego izotopowo związku **91**. Eksperyment przeprowadzono dwukrotnie – standardowo w obecności trietyloaminy oraz pirydyny celem odsłonięcia widma w obszarze alifatycznym. Pomimo tego, iż wynik analizy TLC wskazywał na powstanie demetylowanego produktu w obu reakcjach, to niestety na widmach NMR nie zaobserwowano żadnego sygnału, który mógłby odpowiadać przeniesionej grupie metylowej. Pomimo tego, iż mechanizm demetylowania nadal pozostaje niejasny, na podstawie otrzymanych wyników eksperymentów zaproponowano przypuszczalny jego przebieg (Rys.47). W pierwszym etapie 2-metoksy-4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-ol (**91**) ulega acylowaniu na atomie azotu, w wyniku czego powstaje intermediat **101**. Z uwagi na ładunek dodatni zlokalizowany na atomie azotu intermediat **101** wykazuje podatność na atak nukleofila. W kolejnym etapie dochodzi do migracji ugrupowania arylokarbamoilowego z pirydynowego atomu azotu na tlen grupy hydroksylowej w pozycji 8. Ten etap może zachodzić przy jednoczesnym ataku nukleofila (np. wody lub NEt_3) na grupę metylową w pozycji 2 prowadząc do powstania produktu **94**. Uformowany produkt **93** nie ulega reakcji demetylowania ze względu na zawadę steryczną zlokalizowaną w obrębie atomu azotu pirydyny. Podsumowując, obecność pirydynowego atomu azotu pełniącego funkcję nukleofilowego katalizatora oraz grupy metoksylowej w pozycji 2 jest niezbędna zarówno do otrzymania serii pochodnych **94a-e**, jak i do zajścia reakcji demetylowania. Do usunięcia grupy CH_3 może dojść przed lub w trakcie transferu grupy arylokarbamoilowej, jednakże samo demetylowanie nie wpływa na proces migracji. Z racjonalnego punktu widzenia proces demetylowania powinien zakończyć się powstaniem N lub O alkilowanego produktu np. N-alkilowanej aminy, N-alkilowanego mocznika czy metanolu, niestety jednak żadnego z tych indywiduów chemicznych nie udało się zidentyfikować w mieszaninie reakcyjnej.

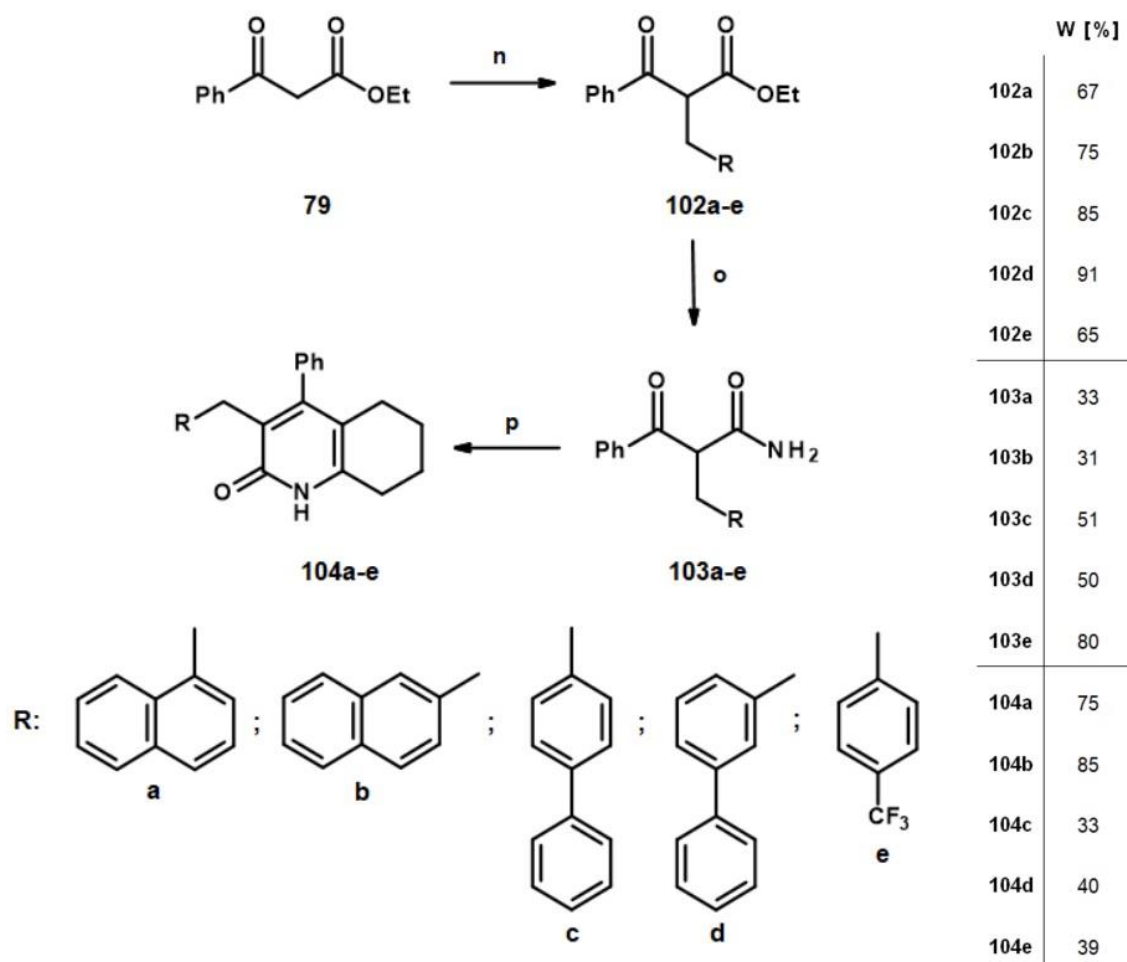


Rys.47. Przypuszczalny mechanizm reakcji demetylowania

Uzyskane arylokarbamoilowe pochodne **92a-e**, **93a-e**, **94a-e** oraz związki **90,91,95-98** poddano badaniom biologicznym w Katedrze Technologii Leków i Biochemii WChem PG. Wyniki badań aktywności biologicznej wskazywały, iż zaprojektowane pochodne nie wykazują właściwości przeciwbakteryjnych czy przeciwgrzybiczych, jednakże wykazują działanie przeciwnowotworowe wobec linii komórkowych HCT-116 oraz A-549. Analiza z zakresu dokowania molekularnego, synteza chemiczna oraz wyniki badań biologicznych zostały opublikowane w czasopiśmie Scientific Reports (Dodatek A) ¹⁷⁶.

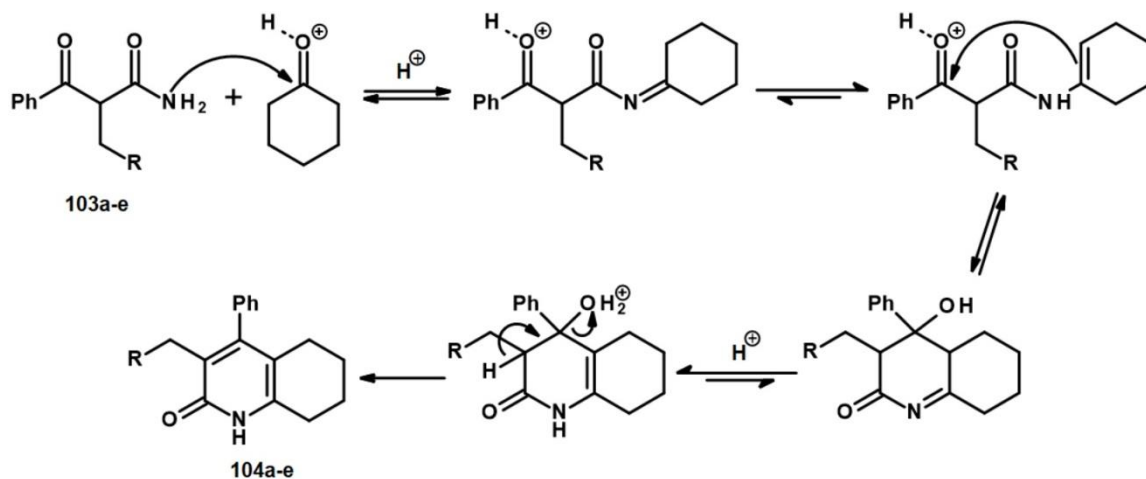
3.2. Synteza 4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onów modyfikowanych w pozycji 3 podstawnikami typu benzyłowego

W świetle sukcesu związanego z syntezą chemiczną i aktywnością przeciwnowotworową prezentowanych wcześniej związków, w ramach kolejnego projektu postanowiono otrzymać serię pochodnych 4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu modyfikowanych w pozycji 3 podstawnikami benzyłowymi. W tym celu zaprojektowano 3-etapową ścieżkę syntezy (Rys.48). W pierwszym etapie, na drodze reakcję S_N2 benzoilooctanu etylu (**79**) z halogenkami benzyłowymi, otrzymano pochodne **102a-e**, które następnie poddano amonolizie w 24% wodnym roztworze amoniaku. Tak otrzymane amidy (**103a-e**) poddano kolejno kondensacji z cykloheksanonem w obecności TsOH, w sposób analogiczny do wcześniej przeprowadzonych reakcji.



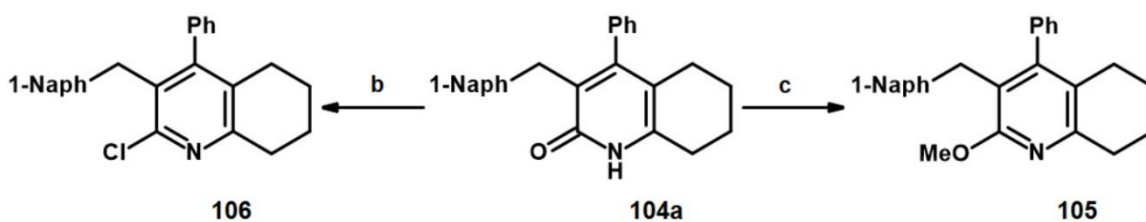
Rys.48. Ścieżka syntezy modyfikowanych w pozycji 3 pochodnych 4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu (**104a-e**): (n) RCH_2X , K_2CO_3/DMF , 60 °C, 5 h; (o) 24% NH_3 aq, 50 °C, 24-72 h; (p) cykloheksanon, TsOH/toluen, refluks, 12 h

W oparciu o przegląd literaturowy zaproponowano następujący mechanizm kondensacji cykloheksanonu z pochodnymi amidu kwasu benzoilooctowego (**103a-e**) w kierunku otrzymywania pochodnych 4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu (**104a-e**) (Rys.49).



Rys.49. Mechanizm syntezy pochodnych 4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu (**104a-e**)

Otrzymane pochodne **104a-e** również zostały poddane badaniom biologicznym w kierunku aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybowej oraz przeciwnowotworowej. Spośród prezentowanych związków tylko pochodna **104a** wykazała aktywność wobec linii komórek nowotworowych HTC-116 oraz A549. W celu szerszego poznania zależności aktywności biologicznej od struktury związku, 3-(1-naftylometylo)-4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-on (**104a**) poddano konwersji w kierunku otrzymania 2-chloro (**106**) oraz 2-metoksy (**105**) pochodnych (Rys.50).

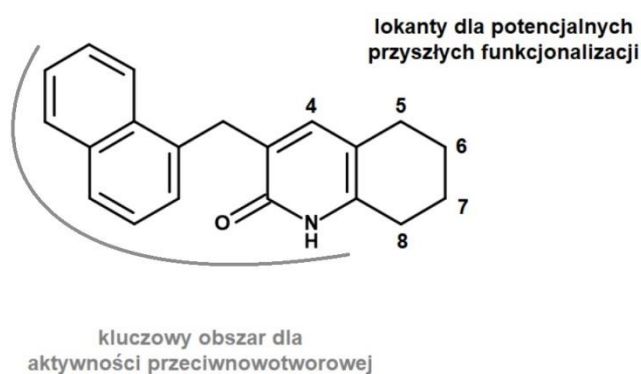


Rys.50. Modyfikacje 3-(1-naftylometylo)-4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu (**104a**) w pozycji 2:

(b) $PhP(O)Cl_2$, 160 °C, 16 h; (c) Ag_2CO_3 , $CH_3I/CHCl_3$, RT, 12 h

Badania biologiczne pochodnych **105** i **106** wykazały jednak, iż zaproponowane modyfikacje w pozycji 2 niekorzystnie wpłynęły na manifestowaną aktywność przeciwnowotworową, gdyż podwyższyły wartości IC_{50} pochodnych względem wyjściowego

związku **104a**. Uzyskane wyniki silnie sugerują, iż obecność pirydonowej grupy amidowej oraz podstawnika 1-naftylometylowego w pozycji 3 odgrywają kluczową rolę dla aktywności przeciwnowotworowej 3-(1-naftylometylo)-4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu (**104a**), dlatego też przyszła potencjalna funkcjonalizacja tego związku powinna obejmować pierścień cykloheksylowy lub pozycję 4 (Rys.51).



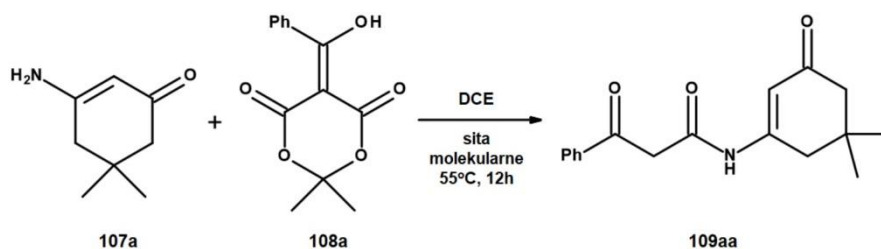
Rys.51. Analiza zależności aktywności biologicznej od struktury związku dla pochodnych **104a-e**

Synteza chemiczna pochodnych 4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu modyfikowanych w pozycji 3 podstawnikami benzyłowymi (**104a-e**) oraz wyniki badań biologicznych zostały opisane w kolejnej publikacji opublikowanej w czasopiśmie Scientific Reports (Dodatek B)¹⁷⁷.

3.3. Opracowanie nowej metody syntezy typu „one-pot” rdzeni 4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu

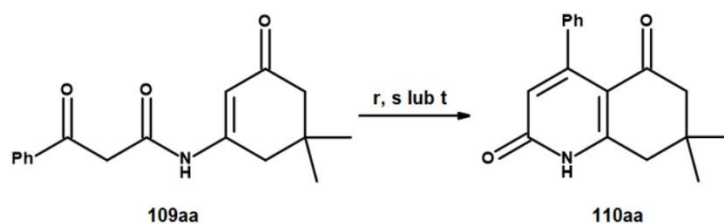
3.3.1. Projektowanie ścieżki syntezy

Kolejnym projektem badawczym podjętym w ramach studiów doktoranckich była próba zaprojektowania ścieżki syntezy umożliwiającej otrzymanie rdzenia 4-fenyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu w możliwie najkrótszym czasie i z jak najwyższą wydajnością. W literaturze chemicznej można znaleźć reakcje prowadzące przede wszystkim do otrzymania rdzeni 5,6,7,8-tetrahydrochinoliny i znaczna większość z nich wymaga zastosowania kosztownych katalizatorów¹⁷⁸. Jeden z zasadniczych etapów projektu dotyczył syntezy N-(5,5-dimetylo-3-okso-cykloheksen-1-yl)-3-okso-3-fenylpropanamidu (**109aa**) – kluczowego substratu do dalszej kondensacji. Związek ten otrzymano na drodze reakcji z łatwo dostępnych substratów: enaminy dimedonu (**107a**) oraz 5-[hydroksy(fenyl)metyleno]-2,2-dimetylo-1,3-dioksano-4,6-dionu (**108a**) w stosunku 1:4. Wydajność reakcji wynosiła 97% (Rys.52).



Rys.52. Synteza N-(5,5-dimetylo-3-okso-cykloheksen-1-yl)-3-okso-3-fenylpropanamidu (**109aa**)

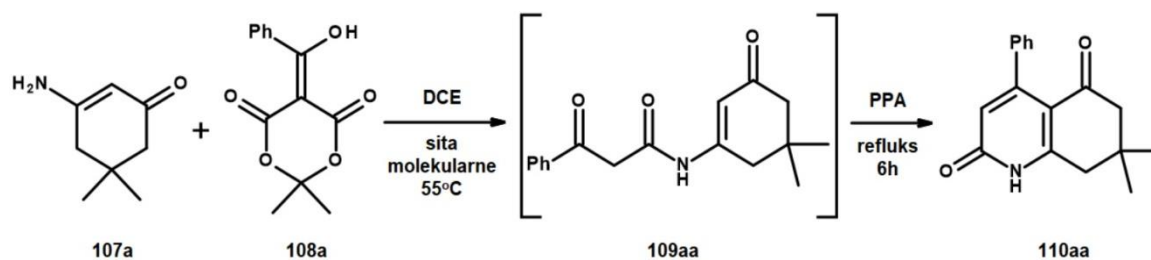
Oczyszczony enamid **109aa** poddano następnie wewnątrzcząsteczkowym cyklizacjom z wykorzystaniem PPA w warunkach odwadniających. W wyniku tych reakcji otrzymano 7,7-dimetylo-4-fenyl-7,8-dihydrochinolin-2,5(1H,6H)-dion (**110aa**) z wydajnością w granicach 35% (Rys.53). Kondensacja enamidu **109aa** przeprowadzona we wrzącym toluenie w obecności TsOH również doprowadziła do otrzymania związku **110aa** w zbliżonej wydajności.



Rys.53. Wewnątrzcząsteczkowa kondensacja enamidu **109aa** w kierunku otrzymania pochodnej **110aa**:
 (r) PPA, sita molekularne/DCE, refluks, 6h. W=34%; (s) PPA, sita molekularne/DCB, refluks, 2h. W=37%; (t)
 TsOH, MgSO₄/toluene, refluks, 12h. W=30%

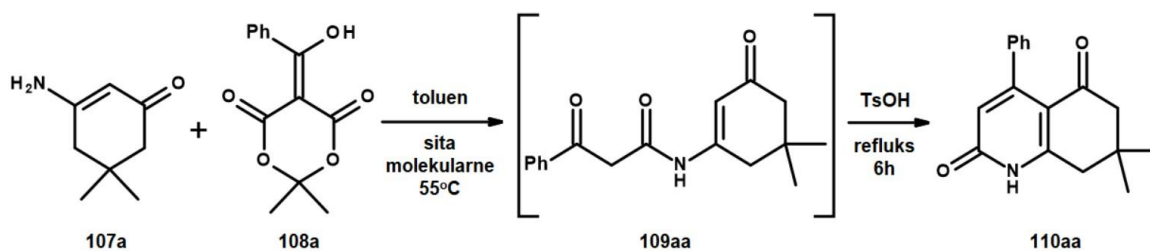
3.3.2. Synteza typu „one-pot” pochodnych 4-fenyl-6,8-dihydrochinolin-2,5(1H)-dionu

W kolejnym etapie badań podjęto próbę przeprowadzenia powyższych reakcji według procedury „one-pot”. W tym celu przeprowadzono opisaną wcześniej reakcję enaminonu **107a** z aroilową pochodną kwasu Meldruma (**108a**), a formowanie N-(5,5-dimetylo-3-okso-3-fenylpropanamidu (**109aa**) monitorowano za pomocą TLC (Rys.54). Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano PPA i całość doprowadzono do wrzenia w oczekiwaniu na zajście wewnątrzcząsteczkowej kondensacji. Analiza NMR wyizolowanego produktu potwierdziła, iż na drodze przedstawionej reakcji „one-pot” otrzymano pożądaną 7,7-dimetylo-4-fenyl-7,8-dihydrochinolin-2,5(1H,6H)-dion (**110aa**). Wydajność reakcji wyniosła 35%.



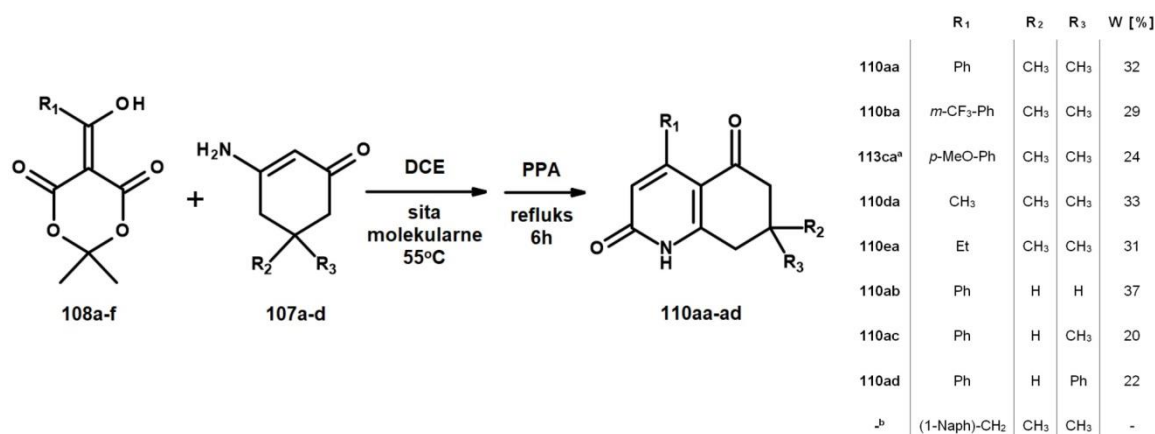
Rys.54. Synteza „one-pot” 7,7-dimetylo-4-fenyl-7,8-dihydrochinolin-2,5(1H,6H)-dionu (**110aa**)

Przeprowadzono również analogiczną reakcję, w której na etapie dodawania kwaśnego katalizatora zastosowano TsOH, jednakże w tych warunkach enamid nie uległ cyklizacji. W świetle uzyskanego wyniku postanowiono przeprowadzić powyższą reakcję, stosując TsOH w toluenie. Docelowy produkt **110aa** otrzymano, jednakże wydajność reakcji wynosiła tylko 15% (Rys.55).



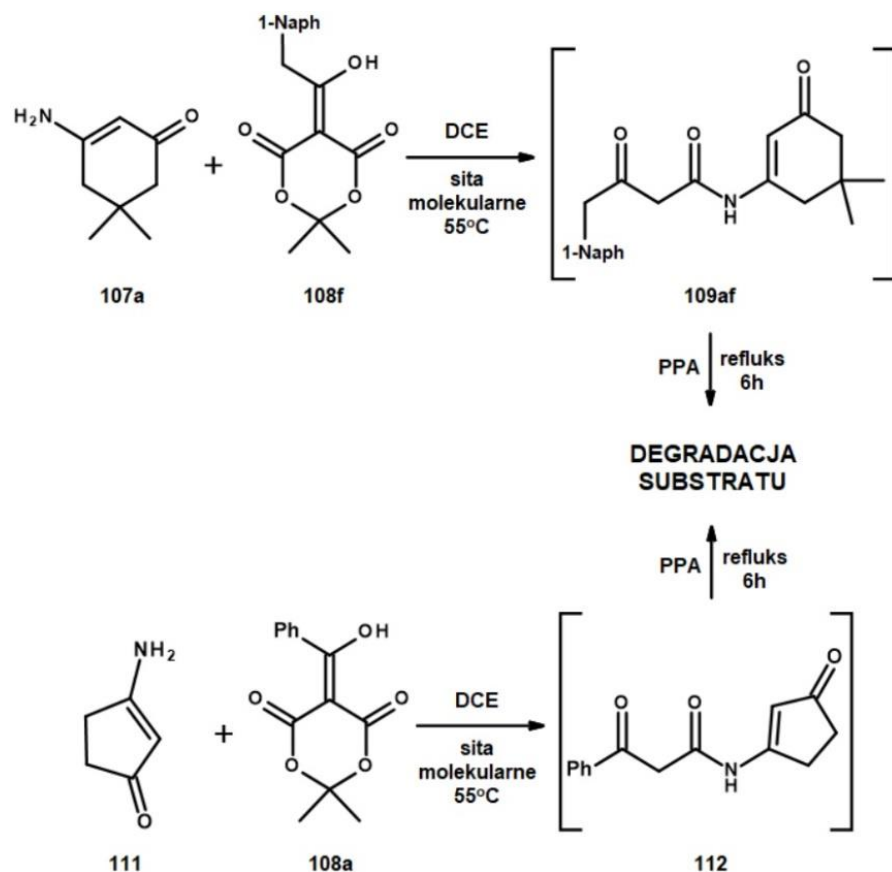
Rys.55. Synteza „one-pot” 7,7-dimetylo-4-fenyl-7,8-dihydrochinolin-2,5(1H,6H)-dionu (**110aa**) w toluenie z wykorzystaniem TsOH

W celu sprawdzenia spektrum aplikacyjnego zaprojektowanej reakcji „one-pot” postanowiono przeprowadzić serię syntez z wykorzystaniem cyklicznych enaminonów (**107a-d**) oraz acylowych/aroilowych pochodnych kwasu Meldruma (**108a-f**). Pożądaný rdzeń 4-fenyl-6,8-dihydrochinolin-2,5(1H)-dionu otrzymano w znacznej większości zastosowanych substratów (Rys.56).



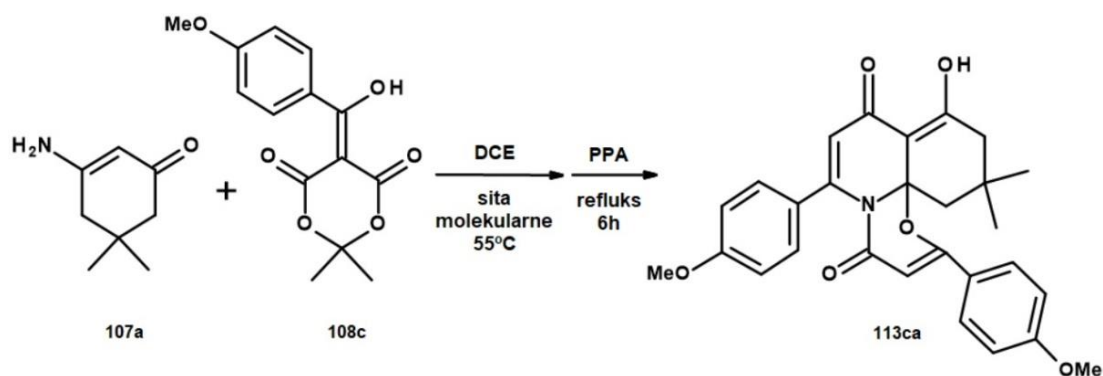
Rys.56. Seria synteza „one-pot” w kierunku otrzymania pochodnych 7,7-dimetylo-4-fenyl-7,8-dihydrochinolin-2,5(1H,6H)-dionu (**110aa-ad**); ^aprodukt o innej konstytucji; ^brozpad enamidu po dodaniu PPA

W przypadku reakcji enaminonu **107a** z 5-(1-hydroksy-2-(naftaleno-1-yl)etylideno)-2,2-dimetylo-1,3-dioksane-4,6-dionem (**108f**), analiza TLC wskazywała na powstanie enamidu **109f**, jednakże związek ten ulegał rozpadowi po dodaniu PPA (Rys.57). Analogiczna sytuacja miała miejsce podczas reakcji 3-aminocyklopent-2-enonu (**111**) z 5-[hydroksy(fenyl)metyleno]-2,2-dimetylo-1,3-dioksano-4,6-dionem (**108a**).



Rys.57. Nieudane próby kondensacji wewnątrzcząsteczkowej enamidów **109af** oraz **112**

W przypadku reakcji enaminonu **107a** z (*p*-metoksy)aroiową pochodną kwasu Meldruma (**108c**) zaobserwowano powstawanie odmiennego produktu. Widmo ^1H NMR wskazywało na związek posiadający dwa ugrupowania *p*-MeO-fenyłowe oraz jeden fragment pochodzący od enaminonu. Na podstawie analizy widm NMR oraz MS zaproponowano poniższą strukturę związku **113ca** (Rys.58).

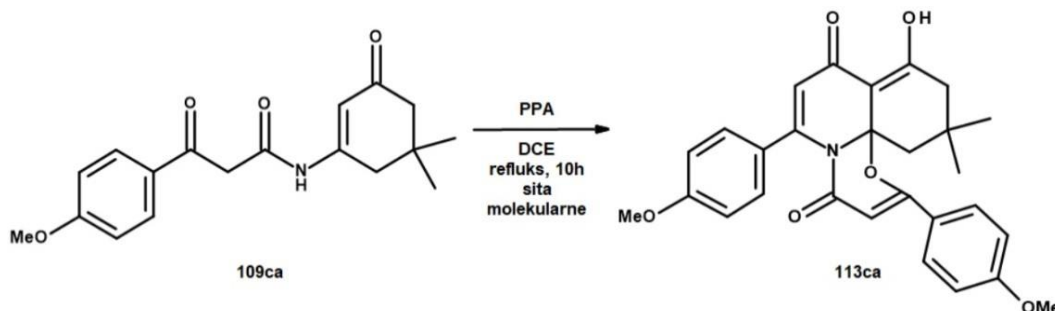


Rys.58. Nieoczekiwany produkt reakcji enaminonu **107a** z aroiową pochodną kwasu Meldruma **108c**

Spośród dostępnych aroilowych pochodnych kwasu Meldruma, pochodna **108c** była jedyną posiadającą podstawnik EDG w pierścieniu aromatycznym, co sugerowało wpływ elektronodonorowy na kierunek przebiegu reakcji. Postanowiono przyjrzeć się mechanizmowi reakcji otrzymywania pochodnej **113ca**.

3.3.3. Badanie mechanizmu powstawania pochodnych 9-hydroksy-11,11-dimetylo-11,12-dihydro(4H)-[1,3]oksazino[2,3-j]chinolin-4,8(10H)-dionu

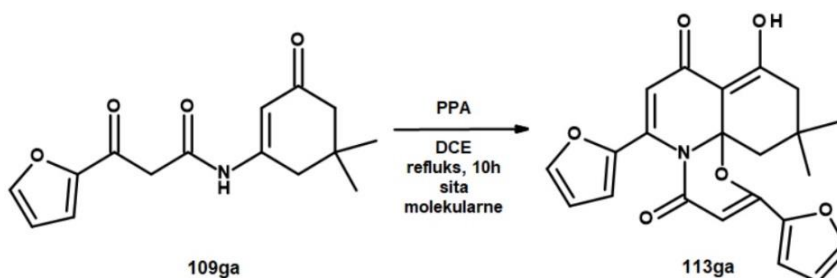
Aby dokładniej poznać czynniki odpowiadające za przebieg reakcji w kierunku otrzymania trójcyklicznego związku **113ca**, postanowiono przeprowadzić wewnątrzcząsteczkową cyklizację oczyszczonego N-(5,5-dimetylo-3-oksocycloheksen-1-yl)-3-(4-metoksyfenilo)-3-oksopropanamidu (**109ca**), celem weryfikacji wpływu nadmiaru (*p*-metoksy)aroilowej pochodnej kwasu Meldruma na przebieg kondensacji (Rys.59). W wyniku wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji enamidu **109ca** również otrzymano trójcykliczny związek **113ca**, co wykluczyło wpływ nadmiaru aroilowej pochodnej kwasu Meldruma na przebieg syntezy i jednocześnie wykazało, iż związek **113ca** powstaje na drodze interakcji dwóch cząsteczek enamidu.



Rys.59. Wewnątrzcząsteczkowa kondensacja enamidu **113ca**

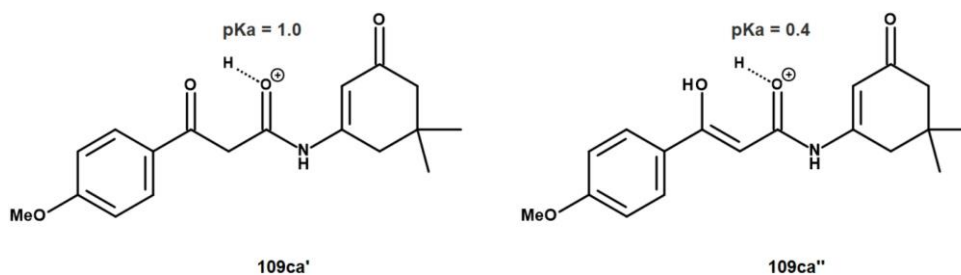
W świetle otrzymanego wyniku postawiono hipotezę, iż za powstawanie nietypowego trójcyklicznego produktu odpowiada grupa metoksylova w pozycji *para*, gdyż z teoretycznego punktu widzenia obecność EDG w pierścieniu aromatycznym powoduje obniżenie elektrofilowości ketonowego karbonylowego atomu węgla. Konsekwencją tego jest zahamowanie uprzywilejowanego procesu wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, w wyniku czego możliwe jest zajście entropowo niekorzystniejszej reakcji międzycząsteczkowej. W celu weryfikacji postawionej hipotezy otrzymano dodatkowy enamid posiadający silnie elektronodonorowy podstawnik furylowy (**109ga**). Związek ten poddano następnie analogicznej wewnątrzcząsteczkowej

kondensacji, w wyniku czego otrzymano kolejną triójcykliczną pochodną **113ga**, co potwierdza słuszność wcześniejszych założeń (Rys.60).



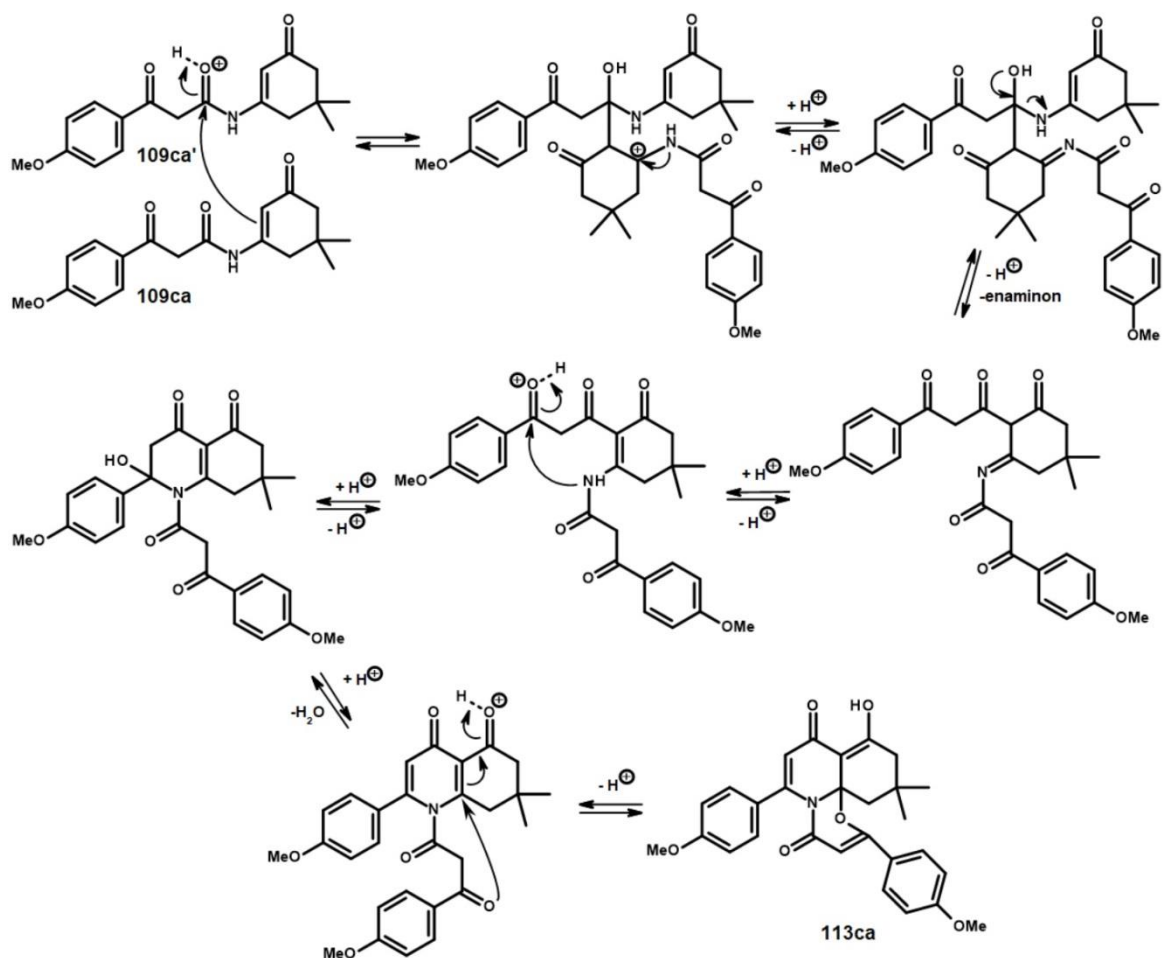
Rys.60. Wynik wewnątrzcząsteczkowej kondensacji furylowego enamidu (**109ga**)

Zarówno w przypadku kondensacji wewnątrzcząsteczkowej, jak i międzycząsteczkowej rolę nukleofila odgrywa fragment enaminyowy posiadający największy udział w orbitalu HOMO cząsteczki. W ujęciu teoretycznym kondensacja międzycząsteczkowa może zachodzić dwukierunkowo – poprzez atak nukleofila na ketonowy lub amidowy węgiel karbonylowy. Biorąc pod uwagę czynnik (obecność EDG), który powoduje przejście mechanizmu od wewnątrzcząsteczkowego do międzycząsteczkowego wydaje się, iż reakcja między dwiema cząsteczkami enamidu rozpoczyna się od ataku nukleofila na amidowy węgiel karbonylowy, gdyż w przeciwnym wypadku spodziewana byłaby cyklizacja wewnątrzcząsteczkowa. Należy również wziąć pod uwagę, iż w obecności PPA enamid będzie ulegał protonowaniu, co oczywiście wpływa na zwiększenie elektrofilowości cząsteczki. Wartości pKa obliczone za pomocą „Chemaxon pKa calculator” dla protonowanej formy enamidu (**109ca'**) oraz formy enolowej (**109ca''**) wynoszą odpowiednio 1.0 oraz 4.0 (Rys.61), jednakże biorąc pod uwagę widma ^1H NMR w niepolarnym rozpuszczalniku ilość formy enolowej jest zanedbywalnie mała, dlatego też do zaproponowania mechanizmu reakcji, jako formę będącą głównym elektrofilem w mieszaninie reakcyjnej należy uznać enamid w formie protonowej i nieprotonowanej (Rys.62).



Rys.61. Kwasy sprzężone do formy ketonowej (**109ca'**) oraz enolowej (**109ca''**) enamidu **109ca**

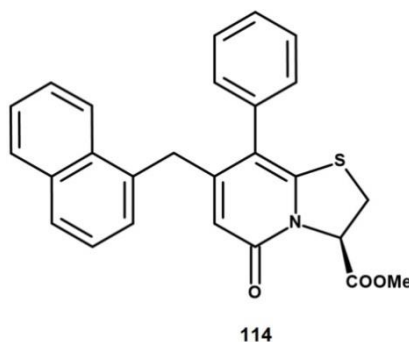
Otrzymywanie pochodnych 4-fenilo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu na drodze nowej metody syntezy typu "one-pot" oraz badanie mechanizmu powstawania trójcyklicznych 9-hydroksy-11,11-dimetylo-11,12-dihydro(4H)-[1,3]oksazino[2,3-j]chinolin-4,8(10H)-dionów zostało opisane w kolejnej publikacji będącej w procesie wydawniczym.



Rys.62. Przypuszczalny mechanizm kondensacji międzycząsteczkowej enamidu **109ca** w kierunku otrzymania trójcyklicznej pochodnej **113ca**

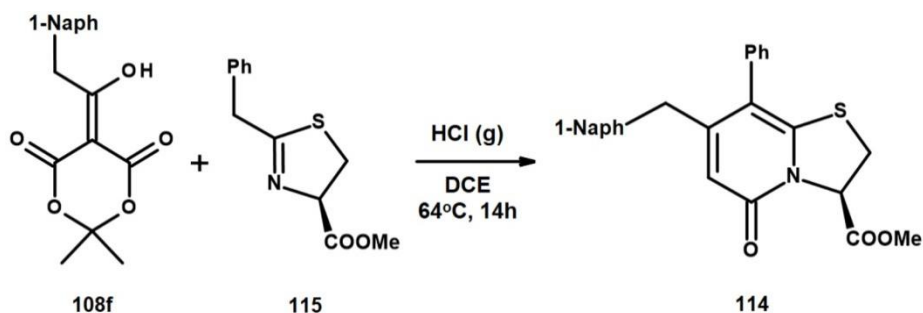
3.4. Funkcjonalizacja pochodnej 2,3-dihydrotiazolo[3,2- α]pirydyn-5-onu ugrupowaniami o charakterze hydrofilowym.

Ostatnim projektem badawczym zrealizowanym w ramach studium doktoranckiego była funkcjonalizacja 7-(1-naftylmetylo)-5-okso-8-fenilo-2,3-dihydrotiazolo[3,2- α]pirydyno-3-karboksylanu metylu (**114**) ugrupowaniami o charakterze hydrofilowym. Pochodne 2,3-dihydrotiazolo[3,2- α]pirydyn-5-onu, nazywane zwyczajowo pilicydami, to grupa związków chemicznych zaprojektowanych na drodze modelowania molekularnego, wykazujących bardzo atrakcyjne właściwości bakteriostatyczne wobec uropatogennych szczepów *Escherichia coli*. Celem molekularnym dla tych związków są białka chaperonowe biorące udział w procesie biogenezy fimbrii¹⁷⁹. Dwa związki z tej grupy zostały również z powodzeniem przebadane na Politechnice Gdańskiej¹⁸⁰. Z uwagi na silnie hydrofobowy charakter pilicydów postanowiono podjąć próbę funkcjonalizacji rdzenia 2,3-dihydrotiazolo[3,2- α]pirydyn-5-onu (**114**) w kierunku poprawienia rozpuszczalności związku w środowisku wodnym (Rys.63). Tego typu modyfikacja miałaby również szansę wpłynąć na poprawę jego aktywności biologicznej.



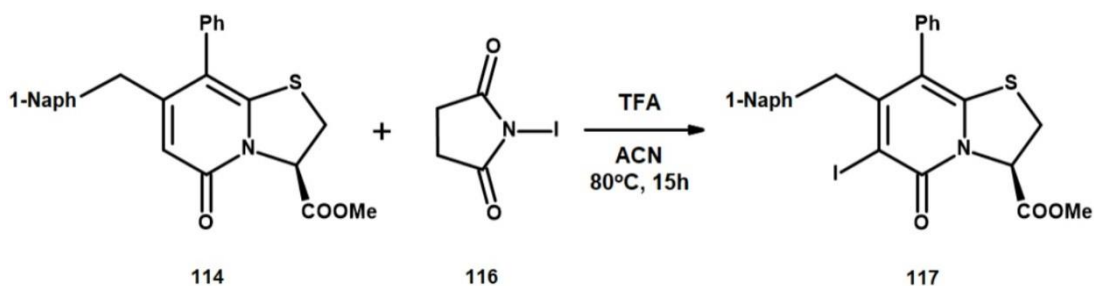
Rys.63. Struktura chemiczna pilicydu - 7-(1-naftylmetylo)-5-okso-8-fenilo-2,3-dihydrotiazolo[3,2- α]pirydyno-3-karboksylanu metylu (**114**)

Związek **114** otrzymano na drodze zaprojektowanej przez szwedzkich badaczy reakcji acylowej pochodnej kwasu Meldruma (**108f**) z pochodną tiazoliny (**115**) w środowisku kwaśnym¹⁸¹ (Rys.64).



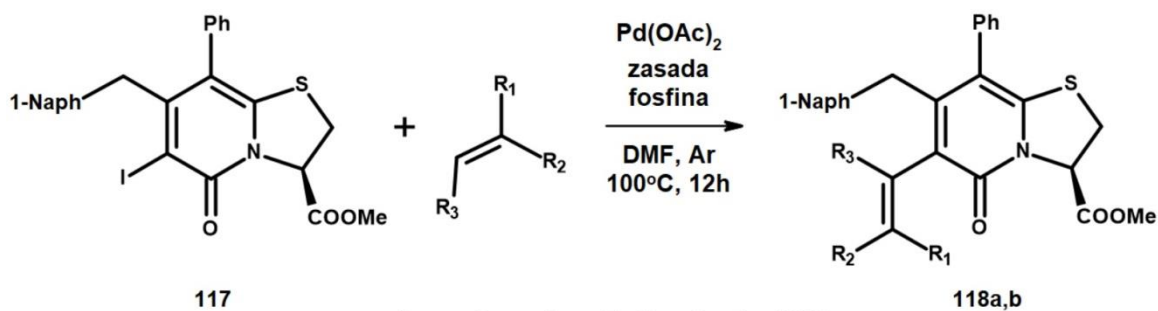
Rys.64. Schemat syntezy pilicydu **114** na drodze reakcji acylowej pochodnej kwasu Meldruma (**108f**) z pochodną tiazoliny (**115**)¹⁸¹

Z uwagi na to, iż kluczowymi elementami dla aktywności pilicydu jest ugrupowanie (1-naftylo)metylowe w pozycji 7 oraz grupa karboksylowa w pozycji 3 postanowiono podjąć próbę funkcjonalizacji związku **114** w pozycji 6. W tym celu wykorzystano wcześniej opisaną reakcję halogenowania pilicydów w obrębie pierścienia pirydonu z zastosowaniem NIS (**116**)¹⁸² (Rys.65).



Rys.65. Syntezy 6-jodo-7-(1-naftyłmetylo)-5-okso-8-fenyl-2,3-dihydrotiazolo[3,2- α]pirydyn-3-karboksylanu metylu (**117**)

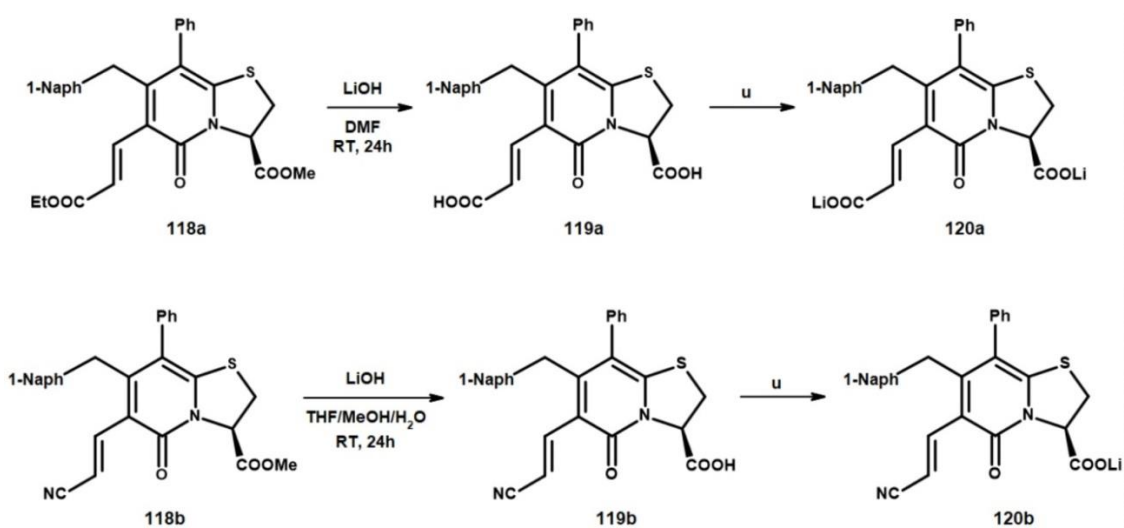
W następnym kroku 6-jodo pochodną **117** poddano sprzęganiu z akrylanem etylu oraz akrylonitrylem na drodze zoptymalizowanej reakcji Heck'a. W wyniku tego procesu otrzymano dwie nowe pochodne **118a**, **118b** z wydajnością 54% i 53% (Rys.66).



R ₁	R ₂	R ₃	Fosfina	Zasada	W [%]
H	COOEt	H	PPh ₃	NEt ₃	54
H	COOEt	H	JohnPhos	NEt ₃	b.r.
H	COOEt	H	Xantphos	NEt ₃	b.r.
H	COOEt	H	PPh ₃	TBAF	b.r.
H	COOEt	H	PPh ₃	K ₂ CO ₃	b.r.
H	COOEt	H	PPh ₃	Cs ₂ CO ₃	b.r.
H	CN	H	PPh ₃	NEt ₃	53
COO- <i>n</i> -Bu	CH ₃	H	PPh ₃	NEt ₃	b.r.
H	CH ₃	CH ₂ -CN	PPh ₃	NEt ₃	b.r.

Rys.66. Schemat i wyniki optymalizacji syntezy 6-winylowych pochodnych **118a**, **118b** otrzymanych na drodze reakcji Heck'a i z wykorzystaniem różnych alkenów; b.r. – brak reakcji

W ostatnim etapie otrzymane pochodne **118a** oraz **118b** poddano hydrolizie zasadowej z wykorzystaniem LiOH, w celu otrzymania odpowiednich kwasów karboksylowych **119a** i **119b** które następnie zostały przeprowadzone w sole litowe **120a**, **120b** (Rys.67).



Rys.67. Schemat hydrolizy funkcjonalizowanych pilicydów **118a** i **118b** w kierunku otrzymania odpowiednich soli litowych **120a** i **120b**: (u) LiOH/THF,H₂O, RT, 90 min.

Uzyskane sole **120a**, **120b** zostały następnie przekazane do badań aktywności przeciwbakteryjnej w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii WChem PG. Funkcjonalizacja chemiczna pilicydu **114** oraz wyniki badań biologicznych stanowią treść czwartej publikacji znajdującej się obecnie w przygotowaniu.

4. Podsumowanie

W trakcie studium doktoranckiego zrealizowanego w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej otrzymano ok. 35 nowych pochodnych z grupy 2-pirydonu, spośród których część wykazała bardzo atrakcyjną aktywność biologiczną. Do najważniejszych osiągnięć należą:

1. Zaprojektowanie oraz synteza arylokarbamoiłowych pochodnych 4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu wykazujących aktywność przeciwnowotworową wobec linii komórkowych HTC-116 oraz A-549.
2. Zbadanie mechanizmu usuwania grupy metylowej podczas acylowania 2-metoksy-4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-8-olu izocyjanianami fenyłowymi oraz zaproponowanie możliwego przebiegu procesu demetylowania.
3. Zaprojektowanie oraz synteza 4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onów modyfikowanych w pozycji 3 podstawnikami typu benzyłowego, wśród których jeden wykazał aktywność przeciwnowotworową wobec linii komórkowych HTC-116 oraz A-549.
4. Opracowanie nowej, krótszej i wygodniejszej ścieżki syntezy typu „one-pot” rdzeni 4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu.
5. Zbadanie mechanizmu powstawania trójcyklicznych pochodnych 9-hydroksy-11,11-dimetylo-11,12-dihydro(4H)-[1,3]oksazino[2,3-j]chinolin-4,8(10H)-dionu podczas wewnątrzcząsteczkowej kondensacji enamidów posiadających ugrupowanie elektronodonorowe w pierścieniu aromatycznym.
6. Funkcjonalizacja pilicydu w pozycji 6 ugrupowaniami o charakterze hydrofilowym, co skutkowało znacznym zwiększeniem rozpuszczalności związków w pożywce bakteryjnej.

5. Wykaz dorobku naukowego

Publikacje opublikowane w czasopismach z listy JCR dotyczące prezentowanej rozprawy doktorskiej:

1. **Ryckowska M.**, Maciejewska N., Olszewski M., Witkowska M., Makowiec S., *Tetrahydroquinolinone derivatives exert antiproliferative effect on lung cancer cells through apoptosis induction*, Scientific Reports, Vol. 12, 1 19076, 2022, IF 4.6, Q1, 140 punktów ministerialnych, DOI: 10.1038/s41598-022-23640-9
2. **Ryckowska M.**, Maciejewska N., Olszewski M., Witkowska M., Makowiec S., *Design, synthesis and biological evaluation of tetrahydroquinolinones and tetrahydroquinolines with anticancer activity*, Scientific Reports, Vol. 12, 1 9985, 2022, IF 4.6, Q1, 140 punktów ministerialnych, DOI: 10.1038/s41598-022-13867-x

Publikacje dodatkowe:

1. Szewczyk M., **Ryckowska M.**, Makowiec S., *Transition-metal-promoted oxidative cyclization to give 1,2,4-trisubstituted carbazole scaffolds*, Synthesis-Stuttgart, Vol. 51, iss. 24, 2019, s.4625-4634, IF 2.675, Q1, 70 punktów ministerialnych, DOI: 10.1055/s-0039-1690681

Wystąpienia konferencyjne:

1. Hromova A., **Ryckowska M.** Makowiec, Kalathiya U., Hupp T. D., *Synthesis of the [1,2,4]triazino[5,6-b]indole derivatives as UPF1 protein inhibitors in NMD pathway*, wystąpienie konferencyjne w formie plakatu, 23rd Tetrahedron Symposium, Goteborg, Szwecja, 2023
2. **Ryckowska M.**, Makowiec S., *Synthesis and functionalization of 5,6,7,8-tetrahydroquinolin-2(1H)-ones – structure analogs of known pilicides*, wystąpienie konferencyjne w formie plakatu, Florida Heterocyclic Conference FloHET 2020, Gainesville (FL), Stany Zjednoczone, 2020
3. Witkowska M., **Ryckowska M.**, Makowiec S., *Cyclization of 5-(1H-indol-3-yl)-3-oxopentanoic acid esters and amides promoted with transition metal triflates*, wystąpienie

konferencyjne w formie plakatu, 21st European Symposium on Organic Chemistry ESOC 2019, Wiedeń, Austria, 2019

4. **Ryckowska M.**, Makowiec S., *Functionalization of 5,6,7,8-tetrahydroquinolin-2(1H)-ones route to anti-uropathogenic iso-pilicides*, wystąpienie konferencyjne w formie plakatu, XXII International Symposium "Advances in the chemistry of heteroorganic compounds", Łódź, Polska, 2019
5. **Ryckowska M.**, Makowiec S., *Funkcjonalizowane pochodne 2H-tiazolo[3,2- α]pirydyn-5-(3H)-onów jako związki o wysokim potencjale przeciwdrobnoustrojowym*, wystąpienie konferencyjne w formie plakatu, 61 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Kraków, Polska, 2018
6. **Ryckowska M.**, Makowiec S., *Funkcjonalizowanie 2H-tiazolo[3,2- α]pirydyn-5-(3H)-onów, alternatywna ścieżka syntezy nowych pilicydów*, wystąpienie konferencyjne w formie plakatu, II Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów BioOrg 2017, Poznań, Polska, 2017

6. Część eksperymentalna

Komercyjnie dostępne reagenty zakupiono w Sigma-Aldrich lub Acros i wykorzystywano bez dodatkowego oczyszczania. Analityczną chromatografię cienkowarstwową przeprowadzono na płytkach aluminiowych z żelom krzemionkowym UV-254 Merck, a chromatografię cieczową Flash z użyciem żelu krzemionkowego SilicaFlash P60 (40–63 μm). Widma ^1H i ^{13}C NMR rejestrowano za pomocą aparatów Bruker Avance III HD 400 MHz lub Varian Gemini 500 MHz. Przesunięcia chemiczne NMR rejestrowano w δ (ppm), stosując sygnały resztkowego rozpuszczalnika jako wzorce ze stałą sprzężenia J mierzoną w Hz. Widma masowe o wysokiej rozdzielczości rejestrowano za pomocą systemu Agilent 6540 Q-TOF.

6.1. Pochodne 4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu

Część eksperymentalna dotycząca syntezy związków opisanych w rozdziale 3.1 i opublikowanych pt. *“Design, synthesis, and biological evaluation of tetrahydroquinolinones and tetrahydroquinolines with anticancer activity”*¹⁷⁶ została udostępniona w postaci suplementu znajdującego się na stronie <https://www.nature.com/articles/s41598-022-13867-x#Sec27>

6.2. 3-Substytuowane pochodne 4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu

Część eksperymentalna dotycząca syntezy związków opisanych w rozdziale 3.2 i opublikowanych pt. *“Tetrahydroquinolinone derivatives exert antiproliferative effect on lung cancer cells through apoptosis induction”*¹⁷⁷ została udostępniona w postaci suplementu znajdującego się na stronie <https://www.nature.com/articles/s41598-022-23640-9#Sec19>

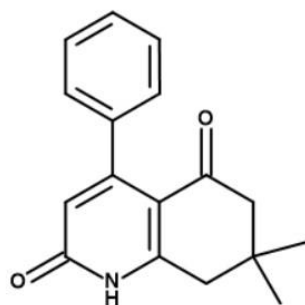
6.3. Pochodne 4-fenylo-5,6,7,8-tetrahydrochinolin-2(1H)-onu otrzymane na drodze syntezy typu „one-pot”

Acylowe/aroilowe pochodne kwasu Meldruma **108a-f** oraz enaminony **107a-d** otrzymano korzystając ze znanych w literaturze procedur: **108a**, **108b**, **108c**, **108f**¹⁸³, **108d**, **108e**¹⁸¹, **107a-d**¹⁸⁴.

6.3.1. Procedura otrzymywania pochodnych 1,6,7,8-tetrahydrochinolin-2,5-dionu

Roztwór enaminonu (0.5 mmol) w 5 ml DCE oraz sita molekularne umieszczono w kolbie okrągłodennej zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne i ogrzano do 55°C. Następnie porcjami (0.5 mmol co godzinę) dodano 2 mmol acylowej/aroiłowej pochodnej kwasu Meldruma. Formowanie enamidu monitorowano za pomocą TLC. Po przereagowaniu wolnego enaminonu do mieszaniny reakcyjnej dodano 0.8 g PPA. Całość doprowadzono do wrzenia i ogrzewano przez 6h. Po odparowaniu DCE pozostałość zawieszono w wodzie, schłodzono w łaźni z lodem i zneutralizowano za pomocą NaOH. Otrzymaną zawiesinę poddano następnie ekstrakcji z AcOEt oraz DCM. Fazę organiczną przemyto solanką i wysuszono bezwodnym MgSO₄. Finalny produkt izolowano chromatograficznie w układzie C:M 200:1 oraz A:H 2:1 w razie konieczności. Wszystkie produkty otrzymano w postaci białych amorficznych proszków.

7,7-Dimetylo-4-fenyl-7,8-dihydrochinolin-2,5(1H,6H)-dion (110aa)



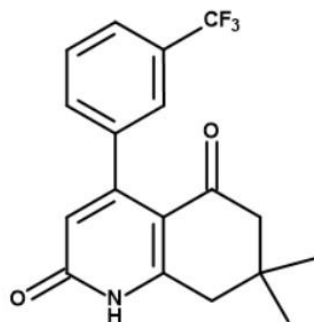
Wydajność: 34%,

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 13.21 (s, NH), 7.39 – 7.38 (m, 3 H), 7.22 – 7.20 (m, 2 H), 6.36 (s, 1 H), 2.92 (s, 2 H), 2.41 (s, 2 H), 1.16 (s, 6 H)

¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 193.46, 164.72, 156.55, 155.57, 139.36, 128.29, 127.99, 127.40, 119.40, 52.84, 41.86, 32.90, 28.21

HRMS (ESI⁺): *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₁₇H₁₈NO₂: 268.1337; found: 268.1333

7,7-Dimetylo-4-[3-(trifluorometylo)fenylo]-7,8-dihydrochinolin-2,5(1H,6H)-dion (110ba)



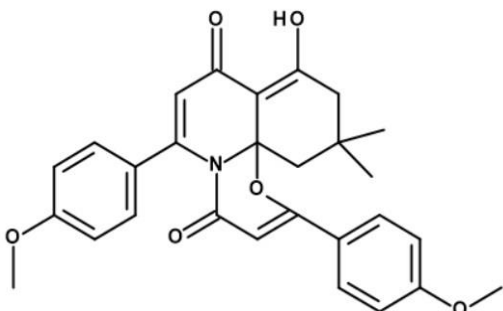
Wydajność: 29%,

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 13.34 (s, NH), 7.63 (d, *J* = 8 Hz, 1 H), 7.38 (d, *J* = 8 Hz, 1 H), 7.51 – 7.47 (m, 2 H), 6.31 (s, 1 H), 2.91 (s, 2 H), 2.40 (s, 2 H), 1.15 (s, 6 H)

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 193.34, 164.81, 156.10, 154.37, 140.20, 130.94, 130.36 (q, *J*² = 32 Hz), 128.22, 124.13 (q, *J*¹ = 270 Hz), 124.88 (q, *J*³ = 3.7 Hz), 124.24 (q, *J*³ = 3.7 Hz), 120.09, 112.79, 52.64, 41.79, 32.82, 28.16

HRMS (ESI⁺): *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₁₈H₁₇F₃NO₂: 336.1211; found: 336.1207

9-Hydroksy-2,6-bis(4-metoksyfenylo)-11,11-dimetylo-11,12-dihydro(4H)-[1,3]oksazino[2,3-*j*]chinolino-4,8(10H)-dion (113ca)



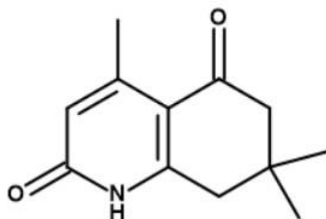
Wydajność: 24%,

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 11.17 (s, OH), 7.74 (d, J = 11 Hz, 2 H), 7.61 (d, J = 11 Hz, 2 H), 7.00 (d, J = 11 Hz, 2 H), 6.98 (d, J = 11 Hz, 2 H), 6.93 (s, 1 H), 6.79 (s, 1 H), 3.88 (s, 3H), 3.87 (s, 3 H), 2.43 (s, 2 H), 2.22 (s, 2 H), 1, 07 (s, 6 H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 200.30, 179.24, 170.59, 163.96, 163.19, 162.60, 161.92, 153.36, 131.10, 128.16, 124.39, 121.96, 116.45, 114.90, 114.11, 112.03, 108.84, 55.71, 55.60, 50.73, 42.86, 32.87, 28.37

HRMS (ESI+): m/z [M + H]⁺ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{NO}_6$: 474.1917; found: 474.1916

4,7,7-Trimetylo-7,8-dihydrochinolin-2,5(1H,6H)-dion (110da)



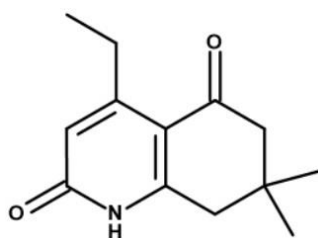
Wydajność: 33%,

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 13.28 (s, NH), 6.26 (s, 1 H), 2.83 (s, 2 H), 2.55 (s, 3 H), 2.41 (s, 2 H), 1.11 (s, 3 H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 195.60, 165.02, 155.46, 155.26, 118.44, 114.16, 53.13, 41.70, 32.50, 28.10, 23.43,

HRMS (ESI+): m/z [M + H]⁺ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}_2$: 206.1181; found: 206.1175

4-Etylo-7,7-dimetylo-7,8-dihydrochinolin-2,5(1H,6H)-dion (110ea)



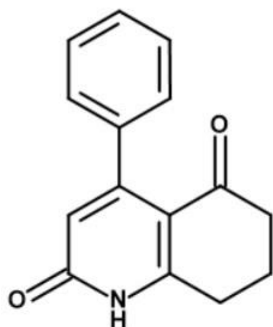
Wydajność: 31%,

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 13.38 (s, NH), 6.36 (s, 1 H), 3.02 (q, J = 9.0 Hz, 2 H), 2.87 (s, 2 H), 2.42 (s, 2 H), 1.17 (t, J = 9 Hz, 3 H), 1.11 (s, 6 H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 195.32, 165.15, 161.39, 155.72, 116.26, 114.04, 53.39, 41.88, 32.50, 28.32, 28.06, 13.78

HRMS (ESI+): m/z [M + H]⁺ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_2$: 220.1337; found: 220.1332

4-Fenyl-7,8-tetrahydrochinolin-2,5(1H,6H)-dion (110ab)



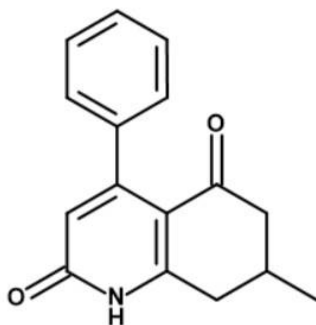
Wydajność: 37%,

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 13.37 (s, NH), 7.40 – 7.38 (m, 3 H), 7.22 – 7.20 (m, 2 H), 6.37 (s, 1 H), 3.05 (t, J = 6 Hz, 2 H), 2.55 (t, J = 6 Hz, 2 H), 2.17 (qu, J = 6 Hz, 2 H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 193.31, 163.91, 157.71, 157.18, 139.10, 128.49, 128.05, 127.32, 118.86, 115.72, 38.89, 28.43, 20.91

HRMS (ESI+): m/z [M + H]⁺ calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{NO}_2$: 240.1025; found: 240.1019

7-Metylo-4-fenyl-7,8-tetrahydrochinolin-2,5(1H,6H)-dion (110ac)



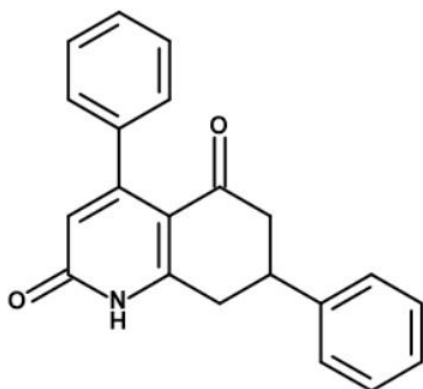
Wydajność: 20%,

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 13.40 (s, NH), 7.40 – 7.38 (m, 3 H), 7.22 – 7.20 (m, 2 H), 6.39 (s, 1 H), 3.12 (dd, J^2 = 17 Hz, J^3 = 3.5 Hz, 1 H), 2.75 (dd, J^2 = 17 Hz, J^3 = 11 Hz), 2.60 (ddd, J^2 = 17 Hz, J^3 = 3.5 Hz, J^4 = 1 Hz, 1 H), 2.46 – 2.39 (m, 1 H), 2.25 (dd, J^2 = 17 Hz, J^3 = 11 Hz, 1 H), 1.17 (d, J = 6.5 Hz, 3 H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 193.34, 156.50, 128.60, 128.58, 128.08, 127.36, 124.91, 47.15, 36.16, 28.66, 20.98 (expected 14, counted 11 carbon atoms)

HRMS (ESI+): m/z [M + H]⁺ calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{NO}_2$: 254.1181; found: 254.1176

4,7-Difenyl-7,8-tetrahydrochinolin-2,5(1H,6H)-dion (110ad)



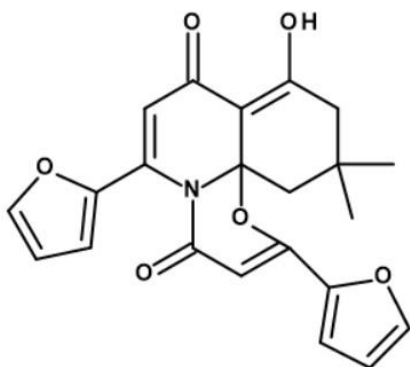
Wydajność: 22%,

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 13.42 (s, NH), 7.39 – 7.36 (m, 5 H), 7.31 – 7.28 (m, 3 H), 7.24 – 7.21 (m, 2 H), 6.34 (s, 1 H), 3.57 – 3.51 (m, 1 H), 3.31 – 3.20 (m, 2 H), 2.83 – 2.74 (m, 2 H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 192.67, 164.53, 156.50, 156.26, 141.59, 139.26, 129.07, 128.29, 127.96, 127.57, 127.31, 126.83, 119.79, 114.16, 45.91, 39.00, 35.69

HRMS (ESI+): m/z [M + H]⁺ calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{NO}_2$: 316.1338; found: 316.1334

2,6-Di(furan-2-ylo)-9-hydrokso-11,11-dimetylo-11,12-dihydro(4H)-[1,3]oksazino[2,3-j]chinolino-4,8(10H)-dion (113ga)



Wydajność: 11%,

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.84 (d, J = 1 Hz, 1 H), 7.82 (d, J = 1 Hz, 1 H), 7.37 (d, J = 3.5 Hz, 1 H), 7.36 (d, J = 3.5 Hz, 1 H), 6.92 (s, 1 H), 6.74 (dd, J = 3.5 Hz, J = 1 Hz, 2 H), 6.70 (s, 1 H), 2.44 (s, 2 H), 2.28 (s, 2 H), 1.10 (s, 6 H)

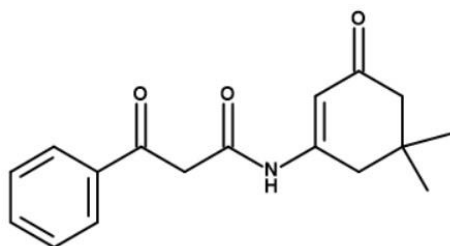
^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 203.52, 178.21, 164.69, 157.10, 156.92, 153.23, 148.81, 148.26, 146.20, 145.62, 117.21, 115.19, 114.02, 114.00, 111.82, 108.50, 51.19, 42.53, 33.74, 31.82, 28.35

HRMS (ESI+): m/z [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{NO}_6\text{Na}$: 416.1110; found: 416.1108

6.3.2. Procedura otrzymywania pochodnych *N*-(5,5-dimetylo-3-oksocykloheksen-1-ylo)-3-oksopropanamidu

Roztwór enaminonu (0.5 mmol) w 5 ml DCE oraz sita molekularne umieszczono w kolbie okrągłodennej zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne i ogrzano do 55°C. Następnie porcjami (0.5 mmol co godzinę) dodano 2 mmol acylowej/aroiowej pochodnej kwasu Meldruma. Formowanie enamidu monitorowano za pomocą TLC. Po przereagowaniu wolnego enaminonu DCE odparowano. Finalny produkt izolowano chromatograficznie w układzie C:M 120:1.

N-(5,5-dimetylo-3-oksocykloheksen-1-ylo)-3-oksopropanamid (109aa)



Jasnożółty amorficzny proszek, wydajność: 96%

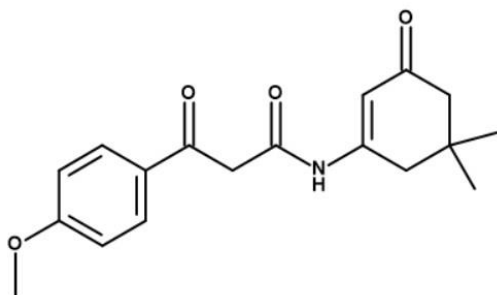
^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 13.88 (s, 0.22 OH), 9.96 (s, 0.7 NH), 9.95 (s, 0.3 NH), 7.96 – 7.94 (m, 1.45 H), 7.73 – 7.72 (m, 0.55 H), 7.68 – 7.65 (m, 0.7 H), 7.56 – 7.49 (m, 2.3 H), 6.62 (s, 0.35 H), 6.60 (s, 0.65 H), 6.02 (s, 0.3 H), 4.16 (s, 1.5 H), 2.40 (s, 0.5 H), 2.32 (s, 1.5 H), 2.13 (s, 0.5 H), 2.11 (s, 1.5 H), 1.00 (s, 1.7 H), 0.98 (s, 4.3 H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 208.19, 203.72, 176.78, 163.31, 145.50, 143.25, 138.34, 137.83, 118.87, 59.50, 57.84, 50.59, 41.73, 37.29

^{13}C NMR enole form (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 181.49, 142.58, 141.11, 138.49, 135.03, 119.38, 99.49, 50.76, 41.79

HRMS (ESI+): m/z [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{NO}_3\text{Na}$: 308.1263; found: 308.1259

N-(5,5-dimetylo-3-oksocykloheksen-1-ylo)-3-(4-metoksyfenylo)-3-oksopropanamid (109ca)



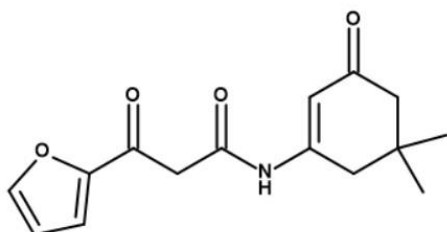
Jasnożółty amorficzny proszek, wydajność: 86%

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 9.56 (s, NH), 7.96 (d, J = 10 Hz, 2 H), 6.97 (d, J = 10 Hz, 2 H), 6.79 (s, 1 H), 4.04 (s, 2 H), 3.89 (s, 3 H), 2.44 (s, 2 H), 2.23 (s, 2 H), 1.09 (s, 6 H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 200.51, 194.02, 165.43, 164.71, 131.09, 128.65, 114.23, 111.32, 55.67, 50.45, 45.24, 42.50, 32.79, 28.24

HRMS (ESI+): m/z [M + H]⁺ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{NO}_4$: 316.1549; found: 316.1545

N-(5,5-dimetylo-3-okso-cykloheksen-1-ylo)-3-(2-furan-2-ylo)-3-oksopropanamid (109ga)



Biały amorficzny proszek, wydajność: 81%

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 9.29 (s, NH), 7.67 (d, J = 1 Hz, 1 H), 7.36 (d, J = 3.5 Hz, 1 H), 6.74 (s, 1 H), 6.6 (dd, J = 3.5 Hz, J = 1 Hz, 1 H), 3.95 (s, 2 H), 2.41 (s, 2 H), 2.21 (s, 2 H), 1.06 (s, 6 H)

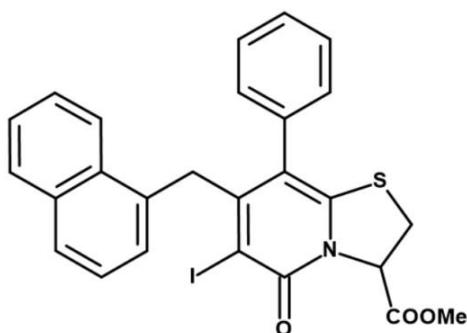
^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 200.56, 183.53, 164.59, 151.55, 148.38, 120.30, 113.29, 111.48, 50.54, 45.51, 42.55, 32.89, 28.31

HRMS (ESI+): m/z [M + H]⁺ calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{NO}_4$: 276.1236; found: 276.1230

6.4. Pochodne 7-(1-naftylmetylo)-5-okso-8-fenylo-2,3-dihydrothiazolo[3,2- α]-pirydyno-3-karboksylanu metylu

6.4.1. Procedura otrzymywania 6-jodo-7-(1-naftylmetylo)-5-okso-8-fenylo-2,3-dihydrothiazolo[3,2- α]pirydyn-3-karboksylanu metylu (117)

W kolbie okrągłodennej zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne sporządzono roztwór związku **114** (19 mmol) oraz N-jodosukcynoimidu (38 mmol) w 100 ml acetonitrylu. Następnie do mieszaniny dodano 0,385 ml TFA i pozostawiono w RT na 16 h. Powstały NHS odsączono, a rozpuszczalnik odparowano. Pozostałość rozpuszczono w DCM i przemyto 5% NaHSO_3 , 1M NaOH oraz solanką. Połączone wyciągi organiczne suszono bezwodnym MgSO_4 . Produkt oczyszczono chromatograficznie w układzie A:H 2:3.



Brązowy amorficzny proszek, wydajność: 37%

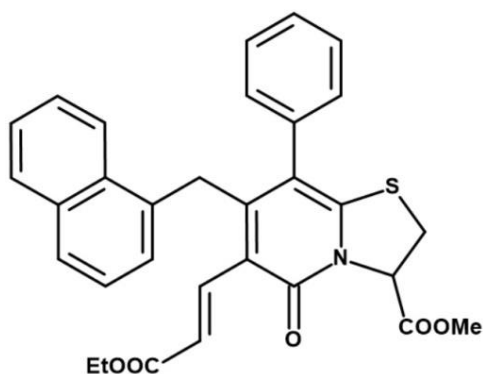
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.82 (d, J = 7.5 Hz, 1 H), 7.72 (dd, J = 3.5 Hz, J = 8 Hz, 2 H), 7.46 – 7.40 (m, 2 H), 7.36 (t, J = 7.5 Hz, 1 H), 7.17 – 7.14 (m, 2 H), 7.09 – 7.05 (m, 3 H), 6.97 (d, J = 8 Hz, 1 H), 5.79 (dd, J = 2.5 Hz, J = 8.5 Hz, 1 H), 4.36 (s, 2 H), 3.88 (s, 3 H), 3.74 (dd, J^3 = 8.5 Hz, J^2 = 11.5 Hz, 1 H), 3.47 (dd, J^3 = 2.5 Hz, J^2 = 11.5 Hz, 1 H)

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 168.28, 159.09, 156.94, 147.89, 136.48, 133.68, 132.64, 131.68, 129.74, 129.22, 128.78, 128.74, 128.60, 127.18, 126.06, 125.69, 125.53, 124.75, 122.90, 117.58, 94.33, 65.49, 53.64, 42.26, 31.90

6.4.2. Procedura otrzymywania 6-winylo pochodnych 7-(1-naftylmetylo)-5-okso-8-fenyl-2,3-dihydrothiazolo[3,2- α]pirydyno-3-karboksylanu metylu (118a,b)

W kolbie okrągłodennej wypełnionej Ar, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne umieszczono roztwór związku **117** (5 mmol), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,5 mmol) oraz PPh_3 (1,25 mmol) w 40 ml DMF. Mieszaninę ogrzano do 100°C . Po 10 min dodano 20 mmol alkeny. Po upływie kolejnych 10 min dodano 2,1 ml NEt_3 . Mieszaninę pozostawiono na 24 h. Po odparowaniu rozpuszczalnika pozostałość rozpuszczono w DCM i przemyto wodą, 2M HCl oraz solanką. Fazę organiczną suszono bezwodnym MgSO_4 . Produkt oczyszczono chromatograficznie w układzie C:M 400:1.

6-[(E)-3-Etoksy-3-okso-prop-1-enylo]-7-(1-naftylmetylo)-5-okso-8-fenyl-2,3-dihydrothiazolo[3,2- α]pirydyn-3-karboksylan metylu (118a)

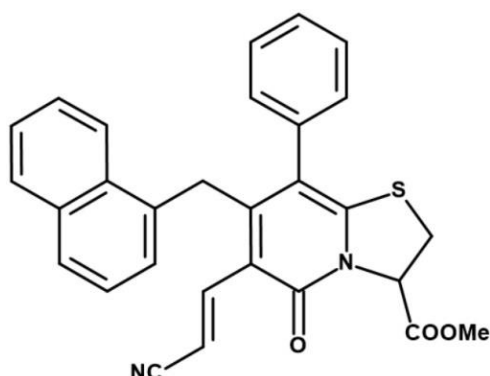


Żółty amorficzny proszek, wydajność: 54%

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.82 (d, J = 7.5 Hz, 1 H), 7.71 (t, J = 7.5 Hz, 2 H), 7.52 (d, J = 15 Hz, 1 H), 7.46 – 7.33 (m, 4 H), 7.19 – 7.15 (m, 2 H), 7.1 – 7.06 (m, 2 H), 7.02 (d, J = 7.5 Hz, 1 H), 6.97 (d, J = 7.5 Hz, 1 H), 5.81 (dd, J = 2.5 Hz, J = 8.5 Hz, 1 H), 4.31 (d, J = 16 Hz, 1 H), 4.25 (d, J = 16 Hz, 1 H), 4.04 – 3.98 (m, 2 H), 3.90 (s, 3 H), 3.72 (dd, J = 8.5 Hz, J = 11.5 Hz, 1 H), 3.48 (dd, J = 2.5 Hz, J = 11.5 Hz, 1 H), 1.07 (t, J = 7 Hz, 3 H)

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 168.50, 168.21, 159.99, 153.28, 148.94, 136.98, 136.37, 133.97, 133.67, 131.42, 129.89, 129.35, 128.84, 128.78, 128.76, 128.58, 127.36, 126.18, 125.78, 125.55, 125.31, 122.80, 122.11, 119.30, 117.92, 64.58, 60.03, 53.62, 33.18, 31.46, 14.16

6-[(E)-2-Cyjanowinylo]-7-(1-naftylmetylo)-5-okso-8-fenyl-2,3-dihydrothiazolo[3,2- α]pirydyno-3-karboksylan metylu (118b)



Biały amorficzny proszek, wydajność: 53%

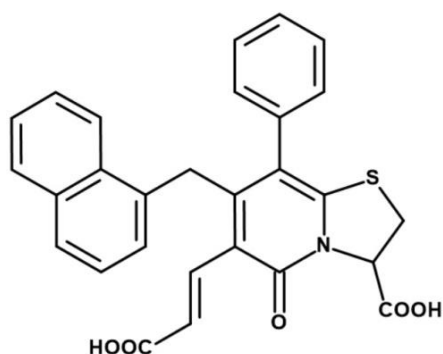
^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.86 (d, J = 8 Hz, 1 H), 7.76 (d, J = 8 Hz, 1 H), 7.71 (t, J = 7.5 Hz, 1 H), 7.51 – 7.44 (m, 2 H), 7.37 (t, J = 7.5 Hz, 1 H), 7.22 – 7.20 (m, 2 H), 7.14 – 7.10 (m, 4 H), 7.00 (d, J = 8 Hz, 1 H), 6.97 (d, J = 8 Hz, 1 H), 5.81 (dd, J = 2.5 Hz, J = 9 Hz, 1 H), 4.21 (d, J = 8 Hz, 2 H), 3.91 (s, 3 H), 3.75 (dd, J = 9 Hz, J = 12 Hz, 1 H), 3.52 (dd, J = 2.5 Hz, J = 12 Hz, 1 H),

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 168.24, 159.88, 153.21, 150.63, 142.93, 135.96, 133.75, 133.28, 131.26, 129.76, 129.21, 129.04, 128.98, 128.97, 128.89, 127.80, 126.51, 126.10, 125.55, 125.10, 122.62, 119.93, 118.17, 117.94, 100.03, 64.58, 53.76, 33.30, 31.52

6.4.3. Procedura otrzymywania kwasów 6-[(E)-2-winylo]-7-(1-naftylmetylo)-5-okso-8-fenyl-2,3-dihydrothiazolo[3,2- α]pirydyno-3-karboksylowych (119a,b)

W kolbie okrągłodennej zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne umieszczono roztwór pochodnej **118a,b** (3 mmol) w 25 ml DMF. Kolbę schłodzono w łaźni z lodem i następnie wkroplono roztwór LiOH (10 mmol) w 25 ml H_2O . Po wkropleniu mieszaninę reakcyjną pozostawiono w RT na 24 h. Po odparowaniu rozpuszczalników pozostałość schłodzono w łaźni z lodem, zakwaszono 4M HCl do pH=3 i ekstrahowano do AcOEt. Fazę organiczną przemyto wodą, solanką i suszono MgSO_4 . Produkt hydrolizy oczyszczono chromatograficznie w układzie T:M:C 6:1:6 + 3% AcOH.

Kwas (E)-6-(2-karboksywinylo)-7-(naftalen-1-ylmetylo)-5-okso-8-fenyl-3,5-dihydro-2H-thiazolo[3,2- α]pirydyno-3-karboksylowy (119a)



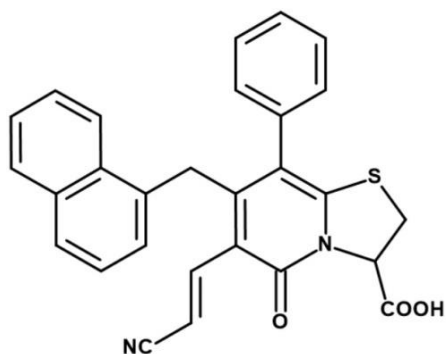
Żółty amorficzny proszek, wydajność: 45 %

^1H NMR ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{Aceton-}d_6$ 2:1 v/v, 500 MHz): δ = 7.57 (d, J = 8 Hz, 1 H), 7.49 – 7.44 (m, 2 H), 7.27 – 7.15 (m, 4 H), 7.15 – 7.07 (m, 1 H), 6.93 – 6.88 (m, 2 H), 6.85 – 6.80 (m, 2 H), 6.77 (d, J = 7 Hz, 1 H), 6.71 (d, J = 7 Hz, 1 H), 5.53 (dd, J = 1.3 Hz, J = 8.5 Hz, 1 H), 4.04 (d, J = 16.5 Hz, 1 H), 3.97 (d, J = 16.5 Hz, 1 H), 3.52 (dd, J = 8.5 Hz, J = 12 Hz, 1 H), 3.31 (dd, J = 1.3 Hz, J = 12 Hz, 1 H)

^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$ 2:1 v/v, 125 MHz): δ = 168.95, 168.00, 159.25, 152.40, 149.61, 137.05,

135.80, 133.40, 132.95, 130.70, 128.49, 128.15,
128.11, 127.89, 127.70, 126.71, 125.67, 125.26,
124.95, 124.64, 122.18, 120.09, 117.92, 116.89,
64.13, 50.73, 32.45

Kwas (E)-6-(2-cyjanowinylo)-7-(naftalen-1-ylmetylo)-5-okso-8-fenyl-3,5-dihydro-2H-tiazolo[3,2- α]pirydyno-3-karboksylowy (119b)



Żółty amorficzny proszek, wydajność: 70%

^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ = 7.93 – 7.88 (m, 2 H), 7.80 (d, J = 8 Hz, 1 H), 7.54 – 7.48 (m, 2 H), 7.44 (t, J = 8 Hz, 1 H), 7.30 – 7.22 (m, 3 H), 7.19 – 7.16 (m, 1 H), 7.13 – 7.12 (m, 1 H), 7.06 (d, J = 7.5 Hz, 1 H), 7.03 (d, J = 16 Hz, 1 H), 6.91 (d, J = 7.5 Hz, 1 H), 5.74 (dd, J = 2 Hz, J = 9.5 Hz, 1 H), 4.43 (d, J = 17 Hz, 1 H), 4.22 (d, J = 17 Hz, 1 H), 3.93 (dd, J = 9.5 Hz, J = 12 Hz, 1 H), 3.58 (dd, J = 2 Hz, J = 12 Hz, 1 H)

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ = 172.05, 169.30, 159.04, 152.96, 152.84, 144.06, 136.18, 134.27, 133.15, 130.79, 129.63, 129.28, 128.85, 128.76, 128.56, 127.06, 126.36, 126.07, 125.61, 124.53, 123.13, 119.99, 116.64, 115.98, 96.91, 64.47, 32.30, 31.46

Literatura

1. Singh, G.; Devi, V.; Monga, V. Recent developments in the synthetic strategies of 4-quinolones and its derivatives. *ChemistrySelect*, **2020**, *5*, 14100-14129
2. Dhiman, P.; Arora, N.; Thanikachalam, P. V.; Monga, V. Recent advances in the synthetic and medicinal perspective of quinolones: A review. *Bioorg. Chem.*, **2019**, *92*, 103291
3. Pham, T. D. M.; Ziora, Z. M.; Blaskovich, M. A. T. Quinolone antibiotics. *Med. Chem. Commun*, **2019**, *10*, 1719-1739
4. Fan, Y. L.; Cheng, X. W.; Wu, J. B.; Liu, M.; Zhang, F. Z.; Xu, Z.; Feng, L. S. Antiplasmodial and antimalarial activities of quinolone derivatives: An overview. *Eur. J. Med. Chem.*, **2018**, *146*, 1-14
5. Zhang, B. Quinolone derivatives and their antifungal activities: An overview. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, **2019**
6. Ilakiyalakshmi, M.; Napoleon, A. A. Review on recent development of quinoline for anticancer activities. *Arab. J. Chem.*, **2022**, *15*, 104168
7. Wang, R.; Xu, K.; Shi, W.; Quinolone derivatives: Potential anti-HIV agent - development and application. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, **2019**
8. Kojima, H.; Kaita, K. D. E.; Hawkins, K.; Uhanova, J.; Minuk, G. Y. Use of fluoroquinolones in patients with chronic hepatitis C virus-induced liver failure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2002**, *46*, 3280-3282
9. Leshner, G. Y.; Froelich, E. J.; Gruett, M. D.; Bailey, J. H.; Brundage, R. P. 1,8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J. Med. Pharm. Chem.*, **1962**, *5*, 1063-1065
10. Bisacchi, G. S. Origins of the quinolone class of antibacterials: An expanded "Discovery Story". *J. Med. Chem.*, **2015**, *58*, 4874-4882
11. Barton, N.; Crowther, A. F.; Hepworth, W.; Richardson, N. D.; Driver, G. W. New quinolones and therapeutic compositions containing them. **1960**, GB830832
12. Hepworth, W.; Richardson, D. N. Substituted nitro-quinolones. **1960**, GB831885A
13. Crowther, A. F.; Hepworth, W.; Morley, J. S. Pharmaceutical compositions comprising quinolone derivatives. **1960**, GB835474A
14. Rusu, A.; Lungu, I. A.; Moldovan, O. L.; Tanase, C.; Hancu, G. Structural characterization of the millennial antibacterial (fluoro)quinolones - shaping the fifth generation. *Pharmaceutics*, **2021**, *13*, 1289
15. Emmerson, A. M.; Jones, A. M. The quinolones: decades of development and use. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2003**, *51*, 13-20
16. Dobson, R. A.; O'Connor, J. R.; Poulin, S. A.; Kundsinn, R. B.; Smith, T. F.; Came, P. E. In vitro antimicrobial activity of rosoxacin against *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, and *Ureaplasma urealyticum*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1980**, *18*, 738-740
17. Stamey, T. A. Cinoxacin: an overview. *Urology*, **1981**, *17*, 492-495
18. Gordon, R. C.; Stevens, L. I.; Edmiston, C. E.; Mohan, K. Comparative in vitro studies of cinoxacin, nalidixic acid, and oxolinic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1976**, *10*, 918-920.
19. Hane, M. W.; Wood, T. H. *Escherichia coli* K-12 mutants resistant to nalidixic acid: genetic mapping and dominance studies. *J. Bacteriol.* **1969**, *99*, 238-241
20. Gudas, L. J.; Mount, D. W. Identification of the *recA* (*tif*) gene product of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, *74*, 5280-5284
21. Gellert, M.; Mizuuchi, K.; O'Dea, M. H.; Itoh, T.; Tomizawa, J. I. Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, *74*, 4772-4776
22. Shimizu, M.; Takase, Y.; Nakamura, S.; Katae, H.; Minami, A. Pipemidic acid, a new antibacterial agent active against *Pseudomonas aeruginosa*: in vitro properties. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1975**, *8*, 132-138
23. Rohifing, S. R.; Gerster, J. F.; Kvam, D. C. Bioevaluation of the antibacterial flumequine for enteric use. *J. Antimicrob. Chemother.*, **1977**, *3*, 615-620
24. Holmes, B.; Brogden, R. N.; Richards, D. M. Norfloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs*, **1985**, *30*, 482-513

25. Appelbaum, P. C.; Hunter, P.A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2000**, *16*, 5-15
26. El Solh, A. A.; Alhajhusain, A. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2009**, *64*, 229-238
27. Naber, K. G. Fleroxacin overview. *Chemotherapy*, **1996**, *42*, 1-9
28. Naber, K.; Adam, D. Classification of fluoroquinolones. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **1998**, *10*, 255-257
29. Sutcliffe, J. A.; Gootz, T. D.; Barrett, J. F. Biochemical characteristics and physiological significance of major DNA topoisomerases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1989**, *33*, 2027-2033
30. Champoux, J. J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.*, **2001**, *70*, 369-413
31. Kreuzer, K. N.; Cozzarelli, N. R. *Escherichia coli* mutants thermosensitive for deoxyribonucleic acid gyrase subunit A: effects on deoxyribonucleic acid replication, transcription, and bacteriophage growth. *J. Bacteriol.*, **1979**, *140*, 424-435.
32. Aldred, K. J.; Kerns, R. J.; Osheroff, N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, **2014**, *53*, 1565-1574
33. Drlica, K.; Malik, M.; Kerns, R. J.; Zhao, X. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2008**, *52*, 385-392
34. Laponogov, I.; Sohi, M. K.; Veselkov, D. A.; Pan, X. S.; Sawhney, R.; Thompson, A. W.; McAuley, K. E.; Fisher, L. M.; Sanderson, M. R. Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2009**, *16*, 667-669.
35. Wohlkonig, A.; Chan, P. F.; Fosberry, A. P. et al. Structural basis of quinolone inhibition of type IIA topoisomerases and target-mediated resistance. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2010**, *17*, 1152-1153.
36. Aldred, K. J.; McPherson, S. A.; Turnbough, C. L. Jr.; Kerns, R. J.; Osheroff, N. Topoisomerase IV-quinolone interactions are mediated through a water-metal ion bridge: mechanistic basis of quinolone resistance. *Nucleic Acids Res.*, **2013**, *41*, 4628-4639
37. Hooper, D.; Jacoby, G. A. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2015**, *1354*, 12-31
38. Szulawska, A.; Czyż, M. Molekularne mechanizmy działania antracyklin. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, **2006**, *60*, 78-100
39. Lee, K. H.; Xiao, Z. Lignans in treatment of cancer and other diseases. *Phytochem. Rev.*, **2003**, *2*, 341-362
40. Hussy, P.; Maass, G.; Tümmler, B.; Grosse, F.; Schomburg, U. Effect of 4-quinolones and novobiocin on calf thymus DNA polymerase alpha primase complex, topoisomerases I and II, and growth of mammalian lymphoblasts. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1986**, *29*, 1073-1078
41. Miller, K. G.; Liu, L. F.; Englund, P. T. A homogeneous type II DNA topoisomerase from HeLa cell nuclei. *J Biol Chem*. **1981**, *256*, 9334-9339.
42. Sissi, C.; Palumbo, M. The quinolone family: from antibacterial to anticancer agents, *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, **2003**, *3*, 439-450
43. Bisacchi, G. S.; Hale, M. R. A "Double-Edged" scaffold: antitumor power within the antibacterial quinolone, *Curr. Med. Chem.*, **2016**, *23*, 520-577
44. Aranha, O.; Grignon, R.; Fernandes, N.; McDonnell, T. J.; Wood, D. P. Jr.; Sarkar, F. H. Suppression of human prostate cancer cell growth by ciprofloxacin is associated with cell cycle arrest and apoptosis. *Int. J. Oncol.*, **2003**, *22*, 787-794
45. Sousa, E.; Graça, I.; Baptista, T.; Vieira, F. Q.; Palmeira, C.; Henrique, R.; Jerónimo, C. Enoxacin inhibits growth of prostate cancer cells and effectively restores microRNA processing. *Epigenetics*, **2013**, *8*, 548-558
46. Jałbrzykowska, K.; Chrzanowska, A.; Roszkowski, P.; Struga, M. The new face of a well-known antibiotic: a review of the anticancer activity of enoxacin and its derivatives. *Cancers*, **2022**, *14*, 3056.
47. Kloskowski, T.; Gurtowska, N.; Olkowska, J.; Nowak, J. M.; Adamowicz, J.; Tworkiewicz, J.; Dębski, R.; Grzanka, A.; Drewa, T. Ciprofloxacin is a potential topoisomerase II inhibitor for the treatment of NSCLC. *Int. J. Oncol.*, **2012**, *41*, 1943-1949

48. Aranha, O.; Wood, D. P. Jr.; Sarkar, F. H. Ciprofloxacin mediated cell growth inhibition, S/G2-M cell cycle arrest, and apoptosis in a human transitional cell carcinoma of the bladder cell line. *Clin. Cancer Res.*, **2000**, *6*, 891-900
49. Beberok, A.; Rzepka, Z.; Respondek, M.; Rok, J.; Stradowski, M.; Wrześniok, D. Moxifloxacin as an inducer of apoptosis in melanoma cells: A study at the cellular and molecular level. *Toxicol. In Vitro.* **2019**, *55*, 75-92
50. Beberok, A.; Wrześniok, D.; Szlachta, M.; Rok, J.; Rzepka, Z.; Respondek, M.; Buszman, E. Lomefloxacin induces oxidative stress and apoptosis in COLO829 melanoma cells. *Int. J. Mol. Sci.*, **2017**, *18*, 2194.
51. Kan, J. Y.; Hsu, Y. L.; Chen, Y. H.; Chen, T. C.; Wang, J. Y.; Kuo, P. L. Gemifloxacin, a fluoroquinolone antimicrobial drug, inhibits migration and invasion of human colon cancer cells. *Biomed. Res. Int.*, **2013**, *2013*, 159786
52. Chen, T. C.; Hsu, Y. L.; Tsai, Y. C.; Chang, Y. W.; Kuo, P. L.; Chen, Y. H. Gemifloxacin inhibits migration and invasion and induces mesenchymal-epithelial transition in human breast adenocarcinoma cells. *J. Mol. Med. (Berl.)*, **2014**, *92*, 53-64
53. Yadava, V.; Talwar, P. Repositioning of fluoroquinolones from antibiotic to anti-cancer agents: An underestimated truth. *Biomed. Pharmacother.*, **2019**, *111*, 934-946
54. van Straten, D.; Mashayekhi, V.; de Bruijn, H. S.; Oliveira, S.; Robinson, D. J. Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. *Cancers (Basel)*, **2017**, *9*, 19
55. Matsumoto, M.; Kojima, K.; Nagano, H.; Matsubara, S.; Yokota, T. Photostability and biological activity of fluoroquinolones substituted at the 8 position after UV irradiation. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1992**, *36*, 1715-1719
56. Pierfitte, C.; Royer, R. J.; Moore, N.; Bégaud, B. The link between sunshine and phototoxicity of sparfloxacin. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **2000**, *49*, 609-612
57. Hayashi, N.; Nakata, Y.; Yazaki, A. New findings on the structure-phototoxicity relationship and photostability of fluoroquinolones with various substituents at position 1. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2004**, *48*, 799-803
58. Hofmann, G. A.; Weber, B. Drug-induced photosensitivity: culprit drugs, potential mechanisms and clinical consequences. *J. Dtsch Dermatol. Ges.*, **2021**, *19*, 19-29
59. Shinada, H.; Watanabe, T.; Okudaira, K.; Iwase, Y.; Nishi, K.; Yumita, N. Apoptosis induced by ultraviolet A exposure in the presence of enoxacin in HL-60 cells. *Anticancer Res.*, **2019**, *39*, 687-693
60. Nakai, S.; Imaizumi, T.; Watanabe, T.; Iwase, Y.; Nishi, K.; Okudaira, K.; Yumita, N. Photodynamically-induced apoptosis due to ultraviolet A in the presence of lomefloxacin in human promyelocytic leukemia cells. *Anticancer Res.*, **2017**, *37*, 6407-6413
61. Chu, Z.; Chen, H.; Wang, P. et al. Phototherapy using a fluoroquinolone antibiotic drug to suppress tumor migration and proliferation and to enhance apoptosis, *ACS Nano*, **2022**, *16*, 4917-4929
62. Ohgari, Y.; Miyata, Y.; Chau, T. T.; Kitajima, S.; Adachi, Y.; Taketani, S. Quinolone compounds enhance α -aminolevulinic acid-induced accumulation of protoporphyrin IX and photosensitivity of tumour cells. *J. Biochem.*, **2011**, *149*, 153-160
63. Gull, H. H.; Karadag, C.; Senger, B.; Sorg, R. V.; Möller, P.; Mellert, K.; Steiger, H. J.; Hänggi, D.; Cornelius, J. F. Ciprofloxacin enhances phototoxicity of 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic treatment for chordoma cell lines. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **2021**, *35*, 102346.
64. Cornelius, J. F.; Slotty, P. J.; El Khatib, M.; Giannakis, A.; Senger, B.; Steiger, H. J. Enhancing the effect of 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy in human meningioma cells. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **2014**, *11*, 1-6
65. Ormond, A. B.; Freeman, H. S. Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials (Basel)*, **2013**, *6*, 817-840
66. Santos, F. C.; Cunha, A. C.; Souza, M. C. B. V.; Tomé, A. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Ferreira, V. F.; Cavaleiro, J. A. S. Synthesis of porphyrin-quinolone conjugates. *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 7268-7270
67. Gomes, A. T. P. C.; Cunha, A. C.; Domingues, M. do R. M.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Silva, A. M. S.; Santos, F. da C.; Souza, M. C. B. V.; Ferreira, V. F.; Cavaleiro, J. A. S.

- Synthesis and characterization of new porphyrin/4-quinolone conjugates. *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 7336-7342
68. Batalha, P. N.; Gomes, A. T. P. C.; Forezi, L. S. M. et al. Synthesis of new porphyrin/4-quinolone conjugates and evaluation of their efficiency in the photoinactivation of *Staphylococcus aureus*. *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 71228-71239
 69. Ghosh, S. Cisplatin: the first metal based anticancer drug. *Bioorg. Chem.*, **2019**, *88*, 102925,
 70. Ho, Y. P.; Au-Yeung, S. C.; To, K. K. Platinum-based anticancer agents: Innovative design strategies and biological perspectives. *Med. Res. Rev.*, **2003**, *23*, 633-655
 71. Saha, D. K.; Padhye, S.; Anson, C. E.; Powell, A. K. Antimycobacterial activity of mixed-ligand copper quinolone complexes. *Transit. Met. Chem.*, **2003**, *28*, 579-584
 72. Uivarosi V. Metal complexes of quinolone antibiotics and their applications: an update. *Molecules*, **2013**, *18*, 11153-11197
 73. Akinremi, C. A.; Obaleye, J. A.; Amolegbe, S. A.; Adediji J. F.; Bamigboye, M. O. Biological activities of some fluoroquinolones-metal complexes. *Int. J. Med. Biomed. Res.*, **2012**, *1*, 24-34
 74. Shingnapurkar, D.; Butcher, R.; Afrasiabi, Z.; Sinn, E.; Ahmed, F.; Sarkar, F.; Padhye, S. Neutral dimeric copper-sparfloxacin conjugate having butterfly motif with antiproliferative effects against hormone independent BT20 breast cancer cell line. *Inorg. Chem. Commun.*, **2007**, *10*, 459-462
 75. Efthimiadou, E. K.; Katsarou, M. E.; Karaliota, A.; Psomas, G. Copper(II) complexes with sparfloxacin and nitrogen-donor heterocyclic ligands: Structure-activity relationship. *J. Inorg. Biochem.*, **2008**, *102*, 910-920
 76. Katsarou, M. E.; Efthimiadou, E. K.; Psomas, G.; Karaliota, A.; Vourloumis, D. Novel copper(II) complex of N-propyl-norfloxacin and 1,10-phenanthroline with enhanced antileukemic and DNA nuclease activities. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 470-478
 77. Efthimiadou, E. K.; Thomadaki, H.; Sanakis, Y.; Raptopoulou, C. P.; Katsaros, N.; Scorilas, A.; Karaliota, A.; Psomas, G. Structure and biological properties of the copper(II) complex with the quinolone antibacterial drug N-propyl-norfloxacin and 2,2'-bipyridine, *J. Inorg. Biochem.*, **2007**, *101*, 64-73
 78. Hernández-Gil, J.; Perelló, L.; Ortiz, R.; Alzuet, G.; González-Álvarez, M.; Liu-González, M. Synthesis, structure and biological properties of several binary and ternary complexes of copper(II) with ciprofloxacin and 1,10 phenanthroline. *Polyhedron*, **2009**, *28*, 138-144
 79. Singh, R.; Jadeja, R. N.; Thounaojam, M. C.; Patel, T.; Devkar, R. V.; Chakraborty, D. Synthesis, DNA binding and antiproliferative activity of ternary copper complexes of moxifloxacin and gatifloxacin against lung cancer cells. *Inorg. Chem. Commun.*, **2012**, *23*, 78-84
 80. Singh, R.; Jadeja, R. N.; Thounaojam, M. C.; Devkar, R. V.; Chakraborty, D. Synthesis, characterization, DNA binding and cytotoxicity studies of moxifloxacinato complexes. *Transition Met. Chem.*, **2012**, *37*, 541-551
 81. Patitungkho, S.; Adsule, S.; Dandawate, P.; Padhye, S.; Ahmad, A.; Sarkar, F. H. Synthesis, characterization and anti-tumor activity of moxifloxacin - copper complexes against breast cancer cell lines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*, 1802-1806
 82. Bykowska, A.; Starosta, R.; Jezierska, J.; Jeżowska-Bojczuk, M. Coordination versatility of phosphine derivatives of fluoroquinolones. New Cu^I and Cu^{II} complexes and their interactions with DNA. *RSC Advances*, **2015**, *5*, 80804-80815
 83. Komarnicka, U. K.; Starosta, R.; Kyzioł, A.; Jeżowska-Bojczuk, M. Copper(I) complexes with phosphine derived from sparfloxacin. Part I - structures, spectroscopic properties and cytotoxicity. *Dalton Trans.*, **2015**, *44*, 12688-12699
 84. Komarnicka, U. K.; Starosta, R.; Płotek, M.; de Almeida, R. F. M.; Jeżowska-Bojczuk, M.; Kyzioł, A. Copper(I) complexes with phosphine derived from sparfloxacin. Part II: a first insight into the cytotoxic action mode. *Dalton Trans.*, **2016**, *45*, 5052-5063
 85. Bykowska, A.; Komarnicka, U. K.; Jeżowska-Bojczuk, M.; Kyzioł, A. Cu^I and Cu^{II} complexes with phosphine derivatives of fluoroquinolone antibiotics - A comparative study on the cytotoxic mode of action. *J. Inorg. Biochem.*, **2018**, *181*, 1-10
 86. Komarnicka, U. K.; Starosta, R.; Kyzioł, A.; Płotek, M.; Puchalska, M.; Jeżowska-Bojczuk, M. New copper(I) complexes bearing lomefloxacin motif: Spectroscopic properties, in vitro

- cytotoxicity and interactions with DNA and human serum albumin. *J. Inorg. Biochem.*, **2016**, *165*, 25-35
87. Liu, Z.; Li, Z.; Du, T.; Chen, Y.; Wang, Q.; Li, G.; Liu, M.; Zhang N.; Li, D.; Han, J. Design, synthesis and biological evaluation of dihydro-2-quinolone platinum(IV) hybrids as antitumor agents displaying mitochondria injury and DNA damage mechanism. *Dalton Trans.*, **2021**, *50*, 362-375
 88. Gouvea, L. R.; Garcia, L. S.; Lachter, D. R.; Nunes, P. R.; de Castro Pereira, F.; Silveira-Lacerda, E. P.; Louro, S. R.; Barbeira, P. J.; Teixeira, L. R. Atypical fluoroquinolone gold(III) chelates as potential anticancer agents: Relevance of DNA and protein interactions for their mechanism of action. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 67-73
 89. Kljun, J.; Bratsos, I.; Alessio, E.; Psomas, G.; Repnik, U.; Butinar, M.; Turk, B.; Turel, I. New uses for old drugs: attempts to convert quinolone antibacterials into potential anticancer agents containing ruthenium. *Inorg. Chem.*, **2013**, *52*, 9039-9052
 90. Kljun, J.; Bytzek, A. K.; Kandioller, W.; Bartel, C.; Jakupec, M. A.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K.; Turel, I. Physicochemical studies and anticancer potency of ruthenium η -*p*-cymene complexes containing antibacterial quinolones. *Organometallics*, **2011**, *30*, 2506-2512
 91. Gao, F.; Zhang, X.; Wang, T.; Xiao, J. Quinolone hybrids and their anti-cancer activities: An overview. *Eur. J. Med. Chem.*, **2019**, *165*, 59-79
 92. Lee, H.; Trivedi, P.; Karthikeyan, C.; Lindamulage, I. K. Quinolone chalcone compounds and uses thereof. **2018**, US20180344725A1
 93. Lindamulage, I. K.; Vu, H. Y.; Karthikeyan, C.; Knockleby, J.; Lee, Y. F.; Trivedi, P.; Lee, H. Novel quinolone chalcones targeting colchicine-binding pocket kill multidrug-resistant cancer cells by inhibiting tubulin activity and MRP1 function. *Sci. Rep.*, **2017**, *7*, 10298
 94. Knockleby, J.; Djigo, A. D.; Lindamulage, I. K.; Karthikeyan, C.; Trivedi, P.; Lee, H. Lead optimization of novel quinolone chalcone compounds by a structure-activity relationship (SAR) study to increase efficacy and metabolic stability. *Sci. Rep.*, **2021**, *11*, 21576
 95. Raghavan, S.; Manogaran, P.; Gadepalli Narasimha, K. K.; Kalpattu Kuppusami, B.; Mariyappan, P.; Gopalakrishnan, A.; Venkatraman, G. Synthesis and anticancer activity of novel curcumin-quinolone hybrids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, *25*, 3601-3605
 96. Pal, I.; Parida, S.; Prashanth Kumar, B. N.; Banik, P.; Kumar Dey, K.; Chakraborty, S.; Bhutia, S. K.; Mandal, M. Blockade of autophagy enhances proapoptotic potential of BI-69A11, a novel Akt inhibitor, in colon carcinoma. *Eur. J. Pharmacol.*, **2015**, *765*, 217-227
 97. Gaitonde, S.; De, S. K.; Tcherpakov, M.; Dewing, A.; Yuan, H.; Riel-Mehan, M.; Krajewski, S.; Robertson, G.; Pellecchia, M.; Ronai, Z. BI-69A11-mediated inhibition of AKT leads to effective regression of xenograft melanoma. *PCMR*, **2009**, *22*, 187-195
 98. Feng, Y.; Barile, E.; De, S. K. et al. Effective inhibition of melanoma by BI-69A11 is mediated by dual targeting of the AKT and NF- κ B pathways. *PCMR*, **2011**, *24*, 703-713
 99. Feng, Y.; Lau, E.; Scortegagna, M. et al. Inhibition of melanoma development in the Nras^(Q61K)::Ink4a^{-/-} mouse model by the small molecule BI-69A11. *PCMR*, **2013**, *26*, 136-142
 100. Yoeli-Lerner, M.; Toker, A. Akt/PKB signaling in cancer: a function in cell motility and invasion. *Cell cycle*, **2006**, *5*, 603-605
 101. Shariati, M.; Meric-Bernstam, F. Targeting AKT for cancer therapy. *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2019**, *28*, 977-988
 102. Barile, E.; De, S. K.; Feng, Y.; Chen, V.; Yang, L.; Ronai, Z.; Pellecchia, M. Synthesis and SAR studies of dual AKT/NF- κ B inhibitors against melanoma. *Chem. Biol. Drug Des.*, **2013**, *82*, 520-533
 103. Abdel-Aziz, M.; Park, S. E.; Abuo-Rahma, G. E. D. A.; Sayed, M. A.; Kwon, Y. Novel N-4-piperazinyl-ciprofloxacin-chalcone hybrids: synthesis, physicochemical properties, anticancer and topoisomerase I and II inhibitory activity. *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, *69*, 427-438
 104. Mohammed, H. H. H.; Abbas, S. H.; Hayallah, A. M.; Abuo-Rahma, G. E. D. A.; Mostafa, Y. A. Novel urea linked ciprofloxacin-chalcone hybrids having antiproliferative topoisomerases I/II inhibitory activities and caspases-mediated apoptosis. *Bioorg. Chem.*, **2020**, *106*, 104422
 105. Mohammed, H. H. H.; Abd El-Hafeez, A. A.; Ebeid, K. et al. New 1,2,3-triazole linked ciprofloxacin-chalcones induce DNA damage by inhibiting human topoisomerase I & II and tubulin polymerization. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2022**, *37*, 1346-1363

106. Hu, G. Q.; Zhang, Z. Q.; Xie, S. Q.; Huang, W. L. Synthesis and antitumor evaluation of C3/C3 fluoroquinolone dimers (I): Tethered with a fused heterocyclic s-triazolo[2,1-b][1,3,4]thiadiazole. *Chin. Chem. Lett.*, **2010**, *21*, 661-663
107. Hu, G. Q.; Yang, Y.; Yi, L.; Wang, G. Q.; Duan, N. N.; Wen, X. Y.; Cao, T. Y.; Xie, S. Q.; Huang, W. L. Design, synthesis and antitumor activity of C3/C3 bis-fluoroquinolones cross-linked with [1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole. *Acta Pharm. Sin. B*, **2011**, *1*, 172-177
108. Azéma, J.; Guidetti, B.; Korolyov, A.; Kiss, R.; Roques, C.; Constant, P.; Daffé, M.; Malet-Martino, M. Synthesis of lipophilic dimeric C-7/C-7-linked ciprofloxacin and C-6/C-6-linked levofloxacin derivatives. Versatile in vitro biological evaluations of monomeric and dimeric fluoroquinolone derivatives as potential antitumor, antibacterial or antimycobacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, *46*, 6025-6038
109. Aly, A. A.; El-Sheref, E. M.; Bakheet, M. E. M.; Mourad, M. A. E.; Brown, A. B.; Bräse, S.; Nieger, M.; Ibrahim, M. A. A. Synthesis of novel 1,2-bis-quinolinyl-1,4-naphthoquinones: ERK2 inhibition, cytotoxicity and molecular docking studies, *Bioorg. Chem.*, **2018**, *81*, 700-712
110. Washington University School of Medicine. Vosaroxin and azacitidine in treating patients with myelodysplastic syndromes. ClinicalTrials.gov ID: NCT01913951, UPTD: 2023-03-30, ACS: 2023-09-06, <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01913951?cond=vosaroxin&rank=1>
111. Ravandi, F.; Ritchie, E. K.; Sayar, H. et al. Phase 3 results for vosaroxin/cytarabine in the subset of patients ≥ 60 years old with refractory/early relapsed acute myeloid leukemia. *Haematologica*, **2018**, *103*, e514-e518
112. Nijenhuis, C. M.; Lucas, L.; Rosing, H.; Huitema, A. D. R.; Mergui-Roelvink, M.; Jamieson, G. C.; Fox, J. A.; Mould, D. R.; Schellens, J. H. M.; Beijnen, J. H. Metabolism and disposition of the anticancer quinolone derivative vosaroxin, a novel inhibitor of topoisomerase II. *Invest. New Drugs*. **2017**, *35*, 478-490
113. Jamieson, G. C.; Fox, J. A.; Poi, M.; Strickland, S. A. Molecular and pharmacologic properties of the anticancer quinolone derivative vosaroxin: a new therapeutic agent for acute myeloid leukemia. *Drugs*, **2016**, *76*, 1245-1255
114. Sunesis Pharmaceuticals. Safety and efficacy clinical study of SNS-595 for second-line therapy in patients with advanced NSCLC. ClinicalTrials.gov ID: NCT00252382, UPTD: 2018-09-24, ACS: 2023-09-07, <https://beta.clinicaltrials.gov/study/NCT00252382?tab=table>
115. Raymond, E.; Dalglish, A.; Damber, J. E.; Smith, M.; Pili, R. Mechanisms of action of tasquinimod on the tumour microenvironment. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2014**, *73*, 1-8
116. Chen, Y.; Ouyang, Y.; Li, Z.; Wang, X.; Ma, J. S100A8 and S100A9 in Cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, **2023**, *1878*, 188891
117. Bratt, O.; Häggman, M.; Ahlgren, G.; Nordle, O.; Björk, A.; Damber, J. E. Open-label, clinical phase I studies of tasquinimod in patients with castration-resistant prostate cancer. *Br. J. Cancer*, **2009**, *101*, 1233-1240
118. Pili, R.; Häggman, M.; Stadler, W. M.; Gingrich, J. R.; Assikis, V. J.; Björk, A.; Nordle, O.; Forsberg, G.; Carducci, M. A.; Armstrong, A. J. Phase II randomized, double-blind, placebo-controlled study of tasquinimod in men with minimally symptomatic metastatic castrate-resistant prostate cancer. *J. Clin. Oncol.*, **2011**, *29*, 4022-4028
119. Fizazi, K.; Ulys, A.; Sengeløv, L. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled phase II study of maintenance therapy with tasquinimod in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer responsive to or stabilized during first-line docetaxel chemotherapy. *Ann. Oncol.*, **2017**, *28*, 2741-2746
120. Escudier, B.; Faivre, S.; Van Cutsem, E. et al. Phase II multicentre, open-label, proof-of-concept study of tasquinimod in hepatocellular, ovarian, renal cell, and gastric cancers. *Target. Oncol.*, **2017**, *12*, 655-661
121. University of Pennsylvania. Tasquinimod for the treatment of relapsed or refractory myeloma. ClinicalTrials.gov ID: NCT04405167, UPTD: 2023-04-14, ACS: 2023-09-07, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04405167?term=tasquinimod&draw=2&rank=2>
122. Brooks, T. A.; Hurley, L. H. Targeting MYC expression through G-quadruplexes. *Genes Cancer*, **2010**, *1*, 641-649
123. Balaratnam, S.; Schneekloth, J. S. Transcriptional regulation of MYC through G-quadruplex structures. *Annu. Rep. Med. Chem.*, **2020**, *54*, 361-407

124. Xu, H.; Hurley, L. H. A first-in-class clinical G-quadruplex-targeting drug. The bench-to bedside translation of the fluoroquinolone QQ58 to CX-5461 (Pidnarulex). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2022**, *77*, 129016
125. Bahls, B.; Aljnadi, I. M.; Emídio, R.; Mendes, E.; Paulo, A. G-quadruplexes in c-MYC promoter as targets for cancer therapy. *Biomedicines*, **2023**, *11*, 969
126. Hilton, J.; Gelmon, K.; Bedard, P. L. et al. Results of the phase I CCTG IND.231 trial of CX-5461 in patients with advanced solid tumors enriched for DNA-repair deficiencies. *Nat. Commun.*, **2022**, *13*, 3607
127. Ko, J. H.; Kang, C. I.; Cornejo-Juárez, P. et al. Fluoroquinolones versus trimethoprim-sulfamethoxazole for the treatment of *Stenotrophomonas maltophilia* infections: A systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.*, **2019**, *25*, 546-554
128. Vardakas, K. Z.; Trigkidis, K. K.; Falagas, M. E. Fluoroquinolones or macrolides in combination with β -lactams in adult patients hospitalized with community acquired pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Microbiol. Infect.*, **2017**, *23*, 234-241
129. Ahn, J. G.; Cho, H. K.; Li, D. et al. Efficacy of tetracyclines and fluoroquinolones for the treatment of macrolide-refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.*, **2021**, *21*, 1003
130. Jasper, A. S.; Musuuza, J. S.; Tischendorf, J. S.; Stevens, V. W.; Gamage, S. D.; Osman, F.; Safdar, N. Are Fluoroquinolones or macrolides better for treating Legionella Pneumonia? A systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis.*, **2021**, *72*, 1979-1989
131. Vlachaki, I.; Vacchelli, M.; Zinzi, D.; Falla, E.; Jiang, Y.; Mantopoulos, T.; Nathwani, D. Comparative efficacy of delafloxacin for complicated and acute bacterial skin and skin structure infections: results from a network meta-analysis. *BMC Infect. Dis.*, **2021**, *21*, 1036
132. Horcajada, J. P.; Salata, R. A.; Álvarez-Sala, R.; Nitu, F. M.; Lawrence, L.; Quintas, M.; Cheng, C. Y.; Cammarata, S.; DEFINE-CABP Study Group. A Phase 3 study to compare delafloxacin with moxifloxacin for the treatment of adults with community-acquired bacterial pneumonia (DEFINE-CABP). *Open Forum Infect. Dis.*, **2019**, *7*, ofz514
133. Nascimento-Carvalho C. M. Delafloxacin as a treatment option for community-acquired pneumonia infection. *Expert Opin. Pharmacother.*, **2021**, *22*, 1975-1982
134. McKeage, K. Finafloxacin: first global approval. *Drugs*, **2015**, *75*, 687-693
135. Wagenlehner, F. M.; Wagenlehner, C. M.; Blenk, B.; Blenk, H.; Schubert, S.; Dalhoff, A.; Naber, K. G. Urinary pharmacokinetics and bactericidal activity of finafloxacin (200 and 800 mg) in healthy volunteers receiving a single oral dose. *Chemotherapy*, **2011**, *57*, 97-107
136. Vente, A.; Bentley, C.; Lückermann, M.; Tambyah, P.; Dalhoff, A. Early clinical assessment of the antimicrobial activity of finafloxacin compared to ciprofloxacin in subsets of microbiologically characterized isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2018**, *62*, e02325-17
137. Lee, J. W.; Kim, N.; Nam, R. H.; Kim, J. M.; Park, J. Y.; Lee, S. M.; Kim, J. S.; Lee, D. H.; Jung, H. C. High efficacy of finafloxacin on *Helicobacter pylori* isolates at pH 5.0 compared with that of other fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2015**, *59*, 7629-7636
138. Torrelo, A.; Grimalt, R.; Masramon, X.; Albareda López, N.; Zsolt, I. (2020). Ozenoxacin, a New effective and safe topical treatment for impetigo in children and adolescents. *Dermatology*, **2020**, *236*, 199-207
139. Wren, C.; Bell, E.; Eiland, L. S. Ozenoxacin: a novel topical quinolone for impetigo. *Ann Pharmacother.*, **2018**, *52*, 1233-1237
140. TaiGen Biotechnology Co., Ltd. Safety and efficacy study of TG-873870 (Nemonoxacin) in diabetic foot infections. ClinicalTrials.gov ID: NCT00685698, UPTD: 2015-01-09, ACS: 2023-09-07, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT00685698>
141. Jean, S. S.; Chang, L. W.; Hsueh, P. R. Tentative clinical breakpoints and epidemiological cut-off values of nemonoxacin for *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* isolates associated with community-acquired pneumonia. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, **2020**, *23*, 388-393
142. Knorr, L. Synthetische Versuche mit dem Acetessigester. *Justus Liebig's Ann. Chem.*, **1886**, *236*, 69-115

143. Niementowski, S. Synthesen der Chinolinderivate. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1894**, *27*, 1394-1403
144. Friedländer, P.; Gohring, C. F. Ueber eine Darstellungsmethode im Pyridinkern substituierter Chinolinderivate. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1883**, *16*, 1833-1839
145. Conrad, M.; Limpach, L. Synthesen von Chinolinderivaten mittelst Acetessigester. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1887**, *20*, 944-948
146. Camps, R. Synthese von α - und γ -Oxychinolinen. *Arch. Pharm.*, **1899**, *237*, 659-691
147. Dhiman, P.; Arora, N.; Thanikachalam, P. V.; Monga, V. Recent advances in the synthetic and medicinal perspective of quinolones: A review. *Bioorg. Chem.*, **2019**, *92*, 103291
148. Bahramian, B.; Ma, Y.; Rohanizadeh, R.; Chrzanowski, W.; Dehghani, F. A new solution for removing metal-based catalyst residues from a biodegradable polymer. *Green Chem.*, **2016**, *18*, 3740-3748
149. Gallagher, W. P.; Vo, A. Dithiocarbamates: reagents for the removal of transition metals from organic reaction media. *Org. Process Res. Dev.*, **2015**, *19*, 1369-1373
150. Park, S. J.; Lee, J. C.; Lee, K. I. A facile synthesis of 4-hydroxycoumarin and 4-hydroxy-2-quinolone derivatives. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2007**, *28*, 1203-1205
151. Gao, W. T.; Hou, W. D.; Zheng, M. R.; Tang, L. J. Clean and convenient one-pot synthesis of 4-hydroxycoumarin and 4-hydroxy-2-quinolinone derivatives. *Synth. Commun.*, **2010**, *40*, 732-738
152. Liu, X.; Xin, X.; Xiang, D.; Zhang, R.; Kumar, S.; Zhou, F.; Dong, D. Facile and efficient synthesis of quinolin-2(1H)-ones via cyclization of penta-2,4-dienamides mediated by H_2SO_4 . *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 5643
153. Aksenov, A. V.; Smirnov, A. N.; Aksenov, N. A.; Aksenova, I. V.; Matheny, J. P.; Rubin, M. Metal-free ring expansion of indoles with nitroalkenes: a simple, modular approach to 3-substituted 2-quinolones. *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 8647-8656
154. Aksenov, A. V.; Smirnov, A. N.; Aksenov, N. A.; Aksenova, I. V.; Frolova, L. V.; Kornienko, A.; Magedov, I. V.; Rubin, M. Metal-free transannulation reaction of indoles with nitrostyrenes: a simple practical synthesis of 3-substituted 2-quinolones. *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 9305-9307
155. Aksenov, A. V.; Smirnov, A. N.; Aksenov, N. A.; Aksenova, I. V.; Bijjeva, A. S.; Rubin, M. Highly efficient modular metal-free synthesis of 3-substituted 2-quinolones. *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 9786-9788
156. Xie, L. Y.; Duan, Y.; Lu, L. H.; Li, Y. J.; Peng, S.; Wu, C.; Liu, K. J.; Wang, Z.; He, W. M. Fast, base-free and aqueous synthesis of quinolin-2(1H)-ones under ambient conditions. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2017**, *5*, 10407-10412
157. Xiang, D.; Xin, X.; Liu, X.; Kumar, S.; Dong, D. S. One-pot synthesis of pyrano[2,3-*b*]quinolines from enamines under solvent-free conditions. *Synlett.*, **2011**, *15*, 2187-2190
158. Zhang, Q.; Yuan, J.; Yu, M.; Zhang, R.; Liang, Y.; Huang, P.; Dong, D. Triflic anhydride promoted intramolecular cyclization of N-aryl cinnamides: access to polysubstituted quinolin-2(1H)-ones. *Synthesis*, **2017**, *49*, 4996-5002
159. Xia, W. J.; Fan, T. G.; Zhao, Z. W.; Chen, X.; Wang, X. X.; Li, Y. M. Radical annulation of 2-cyanoaryl acrylamides via C=C double bond cleavage: access to amino-substituted 2-quinolones. *Org. Lett.*, **2021**, *23*, 6158-6163
160. Nan, J.; Chen, P.; Gong, X.; Hu, Y.; Ma, Q.; Wang, B.; Ma, Y. Metal-free C-H [5 + 1] carbonylation of 2-alkenylpyrrolylanilines using dioxazolones as carbonylating reagents. *Org. Lett.*, **2021**, *23*, 3761-3766
161. Zhao, J.; Zhao, Y.; Fu, H. K_2CO_3 -catalyzed synthesis of chromones and 4-quinolones through the cleavage of aromatic C-O bonds. *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 2710-2713
162. Shao, J.; Huang, X.; Hong, X.; Liu, B.; Xu, B. Synthesis of N-alkyl-substituted 4-quinolones via tandem alkenyl and aryl C-N bond formation. *Synthesis*, **2012**, *44*, 1798-1805
163. Wang, D.; Sun, P.; Jia, P.; Peng, J.; Yue, X.; Chen, C. Transition-metal-free one-pot tandem synthesis of 4-quinolone and 4H-thiochromen-4-one derivatives through sequential nucleophilic addition-elimination- S_NAr reaction. *Synthesis*, **2017**, *49*, 4309-4320
164. Hu, W.; Lin, J. P.; Song, L. R.; Long, Y. Q. Direct synthesis of 2-aryl-4-quinolones via transition-metal-free intramolecular oxidative C(sp³)-H/C(sp³)-H coupling. *Org. Lett.*, **2015**, *17*, 1268-1271

165. Ma, Y.; Zhu, Y.; Zhang, D.; Meng, Y.; Tang, T.; Wang, K.; Ma, J.; Wang, J.; Sun, P. Eco-friendly decarboxylative cyclization in water: practical access to the anti-malarial 4-quinolones. *Green Chem.*, **2019**, *21*, 478-482
166. Jiang, S. F.; Xu, C.; Zhou, Z. W.; Zhang, Q.; Wen, X. H.; Jia, F. C.; Wu, A. X. Switchable access to 3-carboxylate-4-quinolones and 1-vinyl-3-carboxylate-4-quinolones via oxidative cyclization of isatins and alkynes. *Org. Lett.*, **2018**, *20*, 4231-4234
167. Ronkin, S. M.; Badia, M.; Bellon, S. et al. Discovery of pyrazolthiazoles as novel and potent inhibitors of bacterial gyrase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 2828-2831
168. Wei, Y.; Letiran, A. Design and syntheses of novel C7-derived-aminobenzimidazole ureas: bacterial gyrase/topoisomerase IV inhibitors with potent Gram-positive antibacterial activity. To be published.
169. Hoegenauer, K.; Soldermann, N.; Zécri, F. Discovery of CDZ173 (leniolisib), representing a structurally novel class of PI3K delta-selective inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2017**, *8*, 975-980
170. Liu, K. K. C.; Bagrodia, S.; Bailey, S. et al. 4-Methylpteridinones as orally active and selective PI3K/mTOR dual inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 6096-6099
171. Sakurai, A.; Midorikawa, H. The cyclization of ethyl acetoacetate and ketones by ammonium acetate. *BCSJ*, **1968**, *41*, 165-167
172. Kato, T.; Sato, M.; Noda, M.; Itoh, T. Synthesis of methylpyridine derivatives. XXXIV. Condensation of acetoacetamide with ketones to form pyridone derivatives. *Chem. Pharm. Bull.*, **1980**, *28*, 2244-2247
173. Huilai, Y.; Jie, M.; Xuexi, S. A method of preparing of blonanserin. **2015**, CN 104447551
174. Lyle, M. P. A.; Narine, A. A.; Wilson, P. D. A new class of chiral *P,N*-ligands and their application in palladium-catalyzed asymmetric allylic substitution reactions. *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 5060-5064
175. Brodney, M. A.; Padwa, A. Electrophilic aromatic substitution on pyridine rings. Intramolecular cyclization using N-acyliminium ions. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 6153-6156
176. Ryczkowska, M.; Maciejewska, N.; Olszewski, M.; Witkowska, M.; Makowiec, S. Design, synthesis, and biological evaluation of tetrahydroquinolinones and tetrahydroquinolines with anticancer activity. *Sci. Rep.*, **2022**, *12*, 9985
177. Ryczkowska, M.; Maciejewska, N.; Olszewski, M.; Witkowska, M.; Makowiec, S. Tetrahydroquinolinone derivatives exert antiproliferative effect on lung cancer cells through apoptosis induction. *Sci. Rep.*, **2022**, *12*, 19076
178. Sridharan, V.; Suryavanshi P. A.; Menendez, J. C.; Advances in the chemistry of tetrahydroquinolines, *Chem. Rev.* 2011, *111*, 7157-7259
179. Pemberton N. Synthesis and functionalization of ring-fused 2-pyridones. Targeting pili formation in *E. coli*. Rozprawa doktorska, **2007**, Uniwersytet w Umeå
180. Piątek, R.; Zalewska-Piątek, B.; Dzierzbicka, K.; Makowiec, S.; Pilipczuk, J.; Szemiako, K.; Cyranka-Czaja, A.; Wojciechowski M. Pilicides inhibit the FGL chaperone/usher assisted biogenesis of the Dr fimbrial polyadhesin from uropathogenic *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.*, **2013**, *13*, 131
181. Emtenäs, H.; Alderin, L.; Almqvist, F. An enantioselective keteneimine cycloaddition method for synthesis of substituted ring-fused 2-pyridinones. *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 6756-6761
182. Bengtsson C.; Almqvist F. Regioselective halogenations and subsequent Suzuki-Miyaura coupling onto bicyclic 2-pyridones. *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*, 972-975
183. Khopade, T. M.; Warghude, P. K.; Mete, T. B.; Bhat, R. G. Acyl/aroyl Meldrum's acid as an enol surrogate for the direct organocatalytic synthesis of α,β -unsaturated ketones. *Tetrahedron Lett.*, **2019**, *60*, 197-200.
184. R., C.; Pise, A.; Shah, S. K.; D., R.; V., S.; Tiwari, K. N. Copper-catalyzed thiolation of terminal alkynes employing thiocyanate as the sulfur source leading to enamionone-based alkynyl sulfides under ambient conditions. *Org. Lett.*, **2020**, *22*, 6557-6561



Dodatek A





OPEN

Design, synthesis, and biological evaluation of tetrahydroquinolinones and tetrahydroquinolines with anticancer activity

Małgorzata Ryczkowska^{1,3}, Natalia Maciejewska^{2,3}, Mateusz Olszewski², Milena Witkowska¹ & Sławomir Makowiec¹✉

Colorectal cancer (CRC) is the most commonly diagnosed cancer in Europe and the United States and the second leading cause of cancer related mortality. A therapeutic strategy used for the treatment of CRC involves targeting the intracellular levels of reactive oxygen species (ROS). In this study, we synthesized a series of novel tetrahydroquinolinones and assessed their ability to inhibit CRC growth and proliferation by evoking cellular stress through ROS. Our results revealed that (2-oxo-4-phenyl-5,6,7,8-tetrahydroquinolin-8-yl) N-(3-fluorophenyl)carbamate (20d) exhibited in vitro antiproliferative activity at micromolar concentrations. The compound also suppressed colony formation and the migration of HCT-116 cells, as well as deregulated the expression of several proteins involved in cell proliferation and metastasis. Furthermore, 20d induced massive oxidative stress by disrupting the balance of cells survival resulting in autophagy via the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. These findings suggest that this tetrahydroquinolinone can be an ideal lead compound for drug discovery based on quinone derivatives.

Biologically active compounds containing the 2-pyridone system are considered valuable to their antimicrobial activity. Bicyclic 2-pyridones such as ABT-719 (1) (Fig. 1) exhibit excellent antibacterial properties with type II topoisomerases as a molecular target¹. Pilocidines (2), a specific type of 2-pyridones which display affinity to PapD and FimC chaperones, have been shown to effectively block pilus biogenesis and thus limit the virulence of uropathogenic *Escherichia coli* responsible for urinary tract infections²⁻⁸. Compound 3 containing a fused 2-pyridone and [1,2,4]-triazolo ring is characterized by antibacterial as well as antifungal activity⁹. PF-1140 (4), a naturally occurring 4-hydroxy-2-pyridone alkaloid, which is isolated from *Penicillium* sp., is another example of 2-pyridones with antifungal activity^{10,11}. On the other hand, the derivatives of 2-pyridones also manifest anticancer activity¹². A considerable number of studies focusing on the antitumor activity of 2-pyridone derivatives can be found in the chemical literature. Sambutoxin (5) isolated from *Heridium alpestre*¹³ and *Fusarium sambucinum* inhibits proliferation and induce apoptosis in cancer cells¹⁴. Camptothecin¹⁵ (6) and topotecan¹⁶ inhibit the activity of human DNA topoisomerase and cause the apoptosis of cancer cells¹⁷. However, the most interesting examples are the two PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) inhibitors approved for medicinal use—Duvetlisib (7) and Idelalisib (8). Both these inhibitors possess rigid isoquinolinone.

The aforementioned facts inspired us to start searching for new anticancer compounds that are structurally based on modified tetrahydroquinolin-2(1H)-one. We aimed to find molecules containing shifted or inverted 2-pyridone moiety similar to pilocidines or PI3K inhibitors. Thus, taking into account the Lipinski rule as well as the possibilities of synthesis, we designed a semirigid tetrahydroquinolin-2(1H)-one scaffold (A) substituted at position 4 with a hydrophobic moiety, whereas at position 8 moderately hydrophilic group like keto, hydroxyl, or N-substituted urethane was introduced. For 2-pyridone derivatives, it is necessary to consider their equilibrium with 2-hydroxypyridine form A', which should change into a 2-pyridone form in a water solution^{18,19}.

¹Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Gdansk University of Technology, Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, Poland. ²Department of Pharmaceutical Technology and Biochemistry, Faculty of Chemistry, Gdansk University of Technology, Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, Poland. ³These authors contributed equally: Małgorzata Ryczkowska and Natalia Maciejewska. ✉email: mak@pg.edu.pl

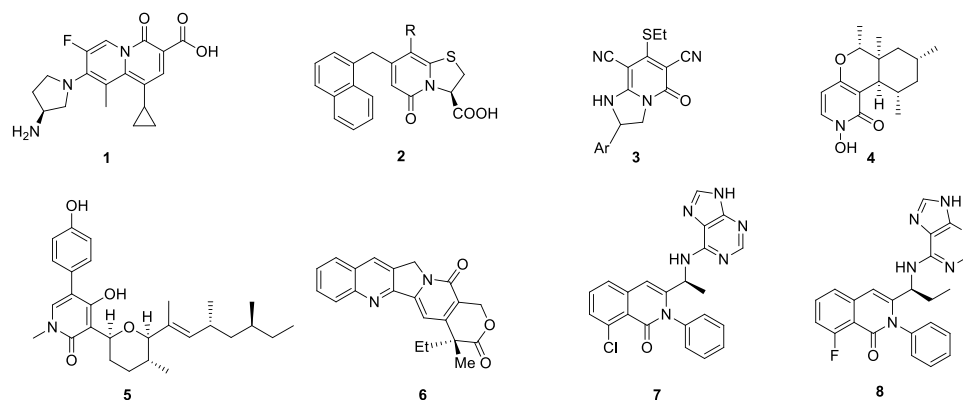


Figure 1. Examples of biologically active 2-pyridones.

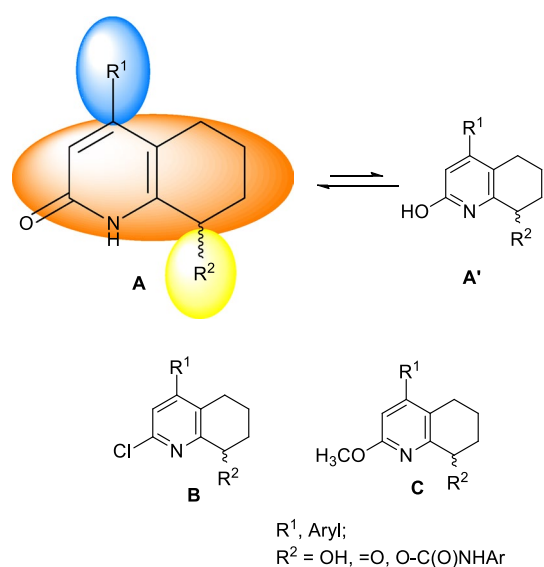


Figure 2. Structures of designed compounds.

Furthermore, considering the possible synthesis pathways, we decided to synthesize and verify the biological properties of two additional branches of derivatives: 2-chlorotetrahydroquinoline (**B**) and 2-methoxytetrahydroquinoline (**C**) (Fig. 2).

Results

Docking study. The assessment of the biological activity of the proposed structures as well as the preselection of molecules for synthesis was performed using AutoDock Vina²⁰ and AutoDock4.2 software packages^{21,22}. As mentioned above, 2-pyridones with potential anticancer activity often act on PI3K, which are responsible for cellular growth and survival signals and thus regulate tumor growth and expansion. Therefore, for the evaluation of our molecules, we chose PI3K from the PI3K/protein kinase B (AKT)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. In silico calculation was performed using the crystallographic structure of two kinase isoforms—human γ 3OAW²³ and mouse δ 5O83²⁴ PI3K—obtained from PDB. We used the PI3K δ kinase complexed with Leniolisib, a well known and selective PI3K δ inhibitor, to verify if Leniolisib will dock at the same position as was observed in the crystallographic structure. The analysis showed a positive result, and docked Leniolisib overlapped the molecule present in the crystallographic structure, with a binding energy value of -9.13 kcal/mol (RMSD 38.34 Å) and inhibition constant value of 203.87 nM. Thus, we carried out a docking study with our designed ligands. In the first attempt, we docked a series of compounds (**20**) to PI3K δ . An overview of the estimated binding energy values pointed out that the highest affinity to PI3K δ was shown by the molecules with N-aryl urethane moiety (**20**). The lowest binding energy (-10.11 kcal/mol) (RMSD 39.06 Å), as well as inhibition constant value (38.9 nM) was observed for (R)-**20d**. (R)-**20d** exhibited hydrophobic interactions with TRP 760, ILE 777, TYR 813, ILE 825, PHE 908, ILE 910, and ASP 911. Hydrogen bond formation was observed between the urethane moiety of (R)-**20d** and VAL 828 and SER 831 (Fig. 3a).

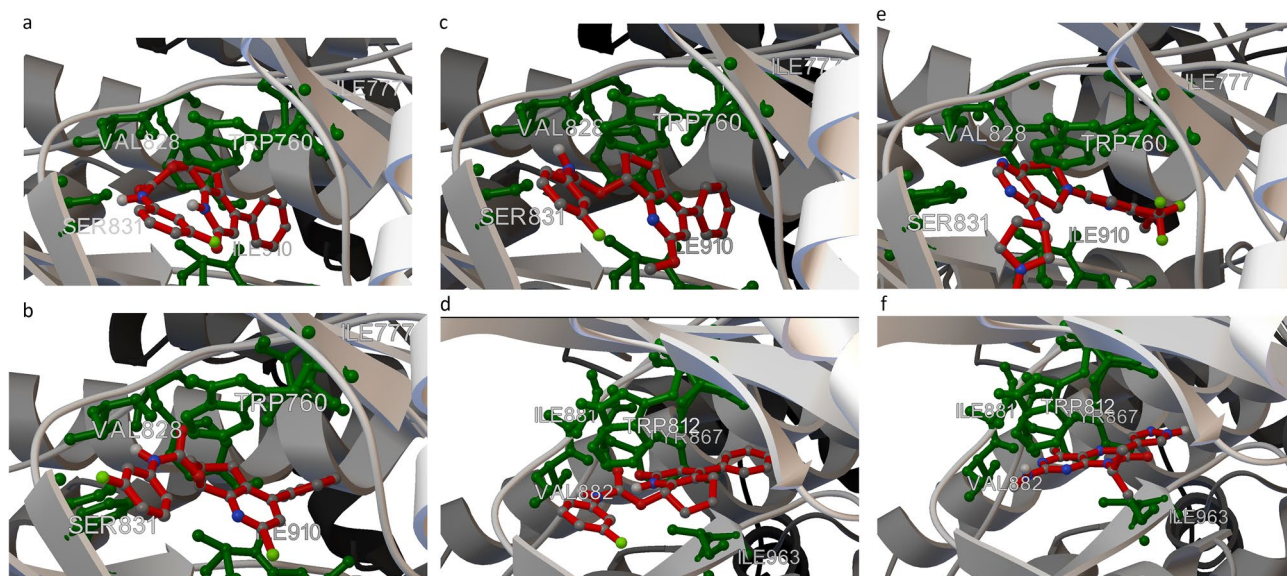


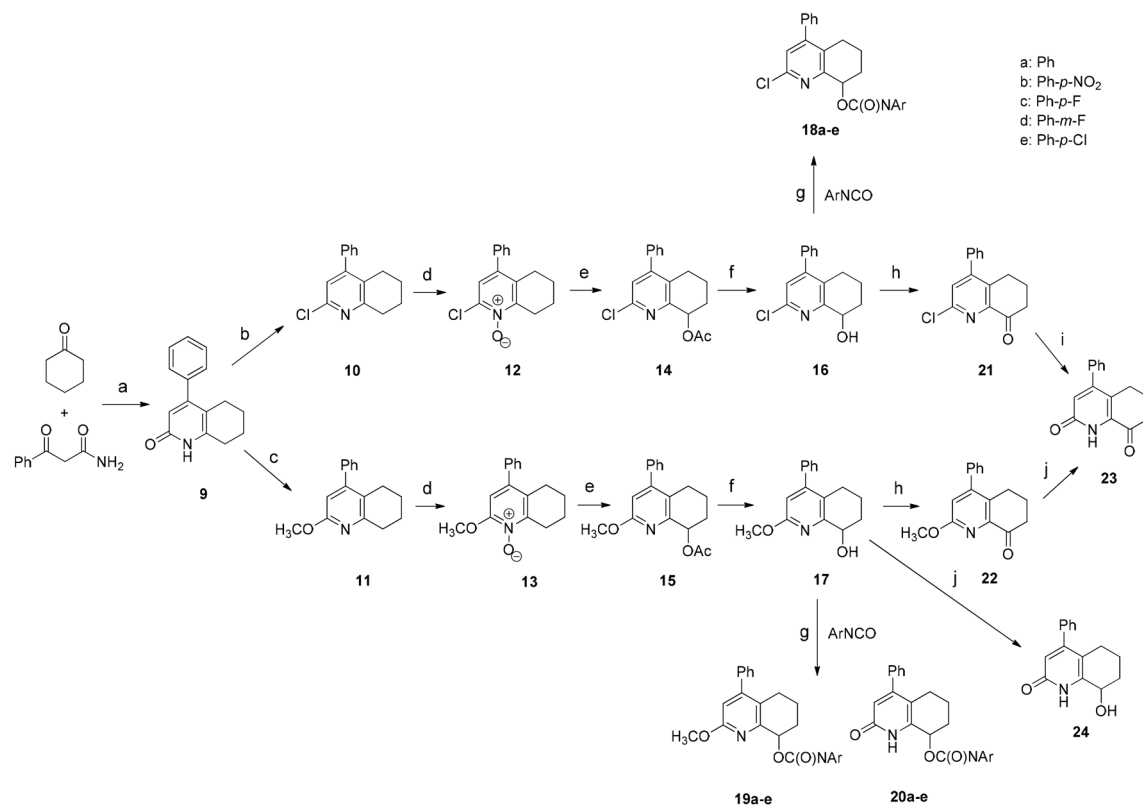
Figure 3. Results of molecular docking. (a) Binding mode of (R)-**20d** to PI3K δ . (b) Binding mode of (S)-**18d** to PI3K δ . (c) Binding mode of (R)-**19d** to PI3K δ . (d) Binding mode of (S)-**20d** to PI3K γ . (e) Binding mode of Leniolisib to PI3K δ . (f) Binding mode of 2-amino-4-methyl-8-(1-methylethyl)-6-(1H-pyrazol-4-yl)pteridin-7(8H)-one to PI3K γ .

Next, we evaluated a series of chloropyridine derivatives (**18**) to determine their binding mode. Even in this case, N-aryl urethanes exhibited the highest affinity to kinase. Compound (S)-**18d** had the lowest binding energy in this series (-10.88 kcal/mol) (RMSD 39.28 Å) and a lower inhibition constant (10.6 nM) than 2-pyridone derivative. The binding mode of (S)-**18d** is presented in Fig. 3b. The compound showed hydrophobic interactions with TYR 813, ILE 825, PHE 908, and ILE 910. In addition, hydrogen bond formation was observed between the urethane moiety of (S)-**18d** and VAL 828, and π -stacking between TRP 760 and 3-fluorophenyl ring. We also tested the binding mode of a series of methoxypyridine derivatives (**19**). Interesting docking results were observed for (R)-**19d** (Fig. 3c) with a binding energy value of -10.53 kcal/mol (RMSD 38.45 Å) and inhibition constant value of 19.1 nM. Similar hydrophobic interactions were observed between TYR 813, ILE 825, and ILE 910, and additional interaction between ILE 777 with a cyclohexyl ring and ASP 911 with a phenyl ring. Urethane formed hydrogen bond with VAL 828 and additionally with SER 831. In addition, π -stacking was observed between TRP 760 and 3-fluorophenyl ring.

In the next step, we checked the modes of binding of our designed ligands to PI3K γ . We noted that interaction with protein was not as effective as that observed for PI3K δ ; however, the binding energy calculated for (S)-**20d** (binding energy: -10.08 kcal/mol, (RMSD 52.84 Å) inhibition constant: 40.7 nM) was better than that of Leniolisib. A similar pattern of interactions was observed: hydrophobic interactions with ILE 831, TYR 867, ILE 879, ILE 881, ILE 963, and ASP 964; hydrogen bond between the urethane moiety of (S)-**20d** and VAL 882, and a π -stacking interaction between TRP 812 and 3-fluorophenyl ring, as well as between TYR 867 and 2-pyridone ring (Fig. 3d). Binding modes of re-docked Leniolisib to PI3K δ and 2-amino-4-methyl-8-(1-methylethyl)-6-(1H-pyrazol-4-yl)pteridin-7(8H)-one to PI3K γ as reference compounds are presented on Fig. 3e,f respectively.

Summing up, our *in silico* calculation confirmed that our tetrahydroquinolin-2(1H)-ones showed a consistent mode of interaction with kinase. The following parts of the ligand were of key importance in the interactions: 3-fluorophenyl ring for π -stacking, urethane for hydrogen bond with VAL 828, and bicyclic tetrahydroquinoline moiety for hydrophobic interaction. Moreover, docking showed that all considered structures exhibited a higher affinity to the active site of PI3K δ than for the reference compound Leniolisib. These results prompted us to synthesize a series of new tetrahydroquinolin-2(1H)-ones and evaluate their biological activity.

Chemistry. *Synthesis of tetrahydroquinoline derivatives.* We synthesized the new PI3K inhibitors through the following pathway (Scheme 1). In the first step, we used a modified procedure for the synthesis of tetrahydroquinolin-2(1H)-one core (**9**)^{25,26}. During condensation, we found out that it is additionally necessary to remove water formed with anhydrous MgSO_4 . Since it was not possible to perform direct functionalization of **9** at position 8, we had to transform tetrahydroquinolin-2(1H)-one (**9**) into 2-chlorotetrahydroquinoline (**10**) and 2-methoxytetrahydroquinoline (**11**) via typical chlorination with $\text{PhP}(\text{O})\text{Cl}_2$ ²⁷ and alkylation with silver carbonate²⁸. Compounds **10** and **11** were oxidized at position 8. However, this two-step process required the formation of N-oxides (**12**, **13**) which subsequently underwent intramolecular disproportionation into 8-acetoxy derivatives (**14**, **15**). The acetyl group was removed by alkaline hydrolysis. Structures **16** and **17** were important for multiway functionalization. The first pathway led to the formation of 2-chloro-4-phenyl-5,6,7,8-tetrahydroquinolin-8-yl arylcarbamates (**18a–e**) by the addition of alcohol **16** to various isocyanates in the presence of tertiary amine. Formation of 6,7-dihydroquinolin-8(5H)-one derivatives (**21**, **22**) required to perform Swern oxidation. The compound 4-phenyl-6,7-dihydroquinoline-2,8(1H,5H)-dione (**23**) might be independently formed



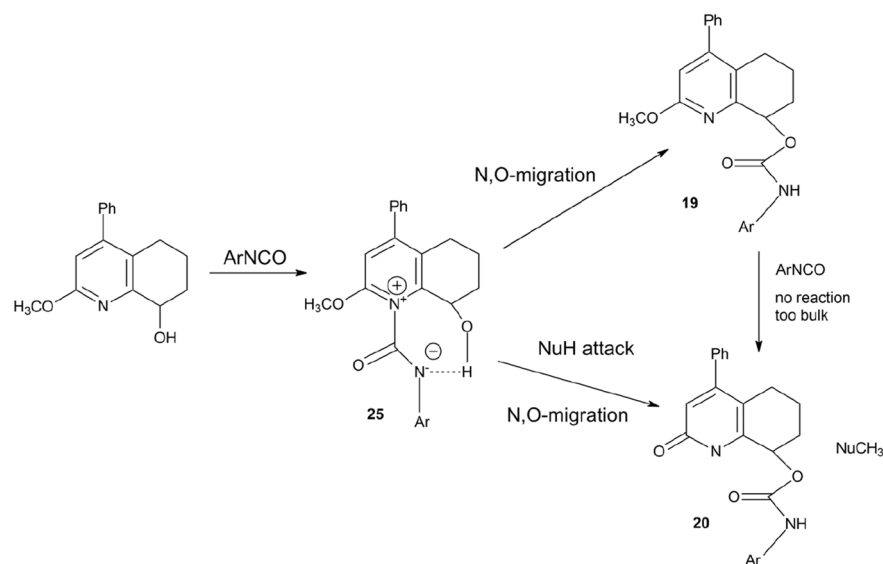
Scheme 1. The synthetic pathways during preparation of potential PI3K kinase inhibitors: (a) TsOH/toluene, reflux; (b) PhP(O)Cl₂, 160 °C; (c) Ag₂CO₃, CH₃I/CHCl₃, RT; (d) 30% H₂O₂/AcOH, 80 °C; (e) Ac₂O, RT to 100 °C, 5 h; (f) KOH/MeOH, RT; (g) TEA/DCM, RT; (h) DMSO, (COCl)₂, TEA/DCM, Ar, -78 °C to RT; (i) 12 M HCl aq., reflux; (j) NaI/AcOH, reflux;

through acidic hydrolysis of **21** or hydrolysis of **22** with acetic acid catalyzed by NaI. It must be noted that 8-hydroxytetrahydroquinolin-2(1H)-one (**24**) can only be formed from **17** via hydrolysis with AcOH and NaI, because acid hydrolysis of 2-chloro-tetrahydroquinolin-8-ol (**16**) led to the formation of a dehydrated product. However, the results of our subsequent experiments indicated that the preparation of intermediate **24** was not necessary at all. From the reaction mixtures consisting of **17**, triethyl amine, and appropriate isocyanate, we isolated a carbamate derivative of the parent compound (**19**) together with a significant amount of 2-oxo-4-phenyl-1,2,5,6,7,8-hexahydroquinolin-8-yl arylcarbamate (**20**). Generally, the amount of secondary products formed depends on the used isocyanate; however, we observed the aforementioned phenomenon. We experimentally evaluated several possible ways for demethylation.

To track the migration of the methyl group, we prepared **17** with a ¹³C-labeled methyl group. We introduced the labeled methyl group using commercially available ¹³CD₃I as an alkylating agent. Surprisingly, our attempts to perform an identical reaction between ¹³CD₃-labeled **17** and *p*-nitrophenyl isocyanate in the presence of amine were not successful. ¹³CD₃-labeled **17** does not undergo demethylation. The first obvious solution was to remove the methyl group by a nucleophilic attack, for example, using water. However, during nuclear magnetic resonance-monitored reaction with nonlabeled **17**, we did not observe any CH₃ signal of methanol in the reaction mixture using a pyridine base to uncover the aliphatic part of the spectrum. The thin-layer chromatographic analysis of this reaction mixture revealed the formation of the demethylated product **20**. We also observed that strong exclusion of water from the reaction mixture during the process may inhibit demethylation, which may be due to, for example, the molecular sieves present in the solvent. Therefore, we postulated that demethylation is caused by traces of water. Additionally, we found that compound **19**, which was formed already, did not undergo demethylation, even if it was treated with a fresh portion of isocyanate. Similarly, pure **17** was not demethylated in solution in the absence of isocyanate.

Nevertheless, although the mechanism of demethylation is still unclear, we assumed a tentative reaction mechanism to elucidate the observed process (Scheme 2).

At the first step, 2-methoxy-4-phenyl-5,6,7,8-tetrahydroquinolin-8-ol (**17**) is acylated with isocyanate on the nitrogen atom. The resulting intermediate **25** is susceptible to nucleophilic attack on the methyl group due to the positive charge of nitrogen. In the next step, the migration of isocyanate moiety from pyridinium nitrogen to alcoholic oxygen is carried out in order to terminate the process. This step might be accompanied by simultaneous nucleophilic attack of water on the methyl group, leading to the formation of demethylation product **20**. The already formed product **19** did not undergo demethylation because nitrogen atom is associated with steric hindrance, which excludes the possibility of its reaction with isocyanate.



Scheme 2. Tentative demethylation reaction mechanism.

Thus, the complete lack of demethylation in experiments with $^{13}\text{CD}_3$ -labeled **17** strongly suggests the existence of reversed secondary isotope effects, which can influence the reaction rate, and indicates that the observed demethylation reaction should be of $\text{S}_{\text{N}}2$ type or a similar type involving modified sp^3/sp^2 hybridization of the methyl group.

Biological activity. *Tetrahydroquinoline derivatives displays potent cytotoxic and antiproliferative activities.* To evaluate the effects of the newly synthesized tetrahydroquinolin-2(1H)-one derivatives on cell viability, we treated human colon cancer cells HCT-116, human breast cancer cells MCF-7, and human non-small cell lung cancer cells A-549 with different concentrations of the compounds for 72 h. After incubation, the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay was performed and the cytotoxic potency of compounds (expressed in IC_{50}) on the cells was determined in comparison to control cells treated with 1% of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Table 1). Compounds **9**, **16**, **18b**, **18d**, **21**, **23**, **22**, **17**, **24**, and **20e** showed no cytotoxicity on tested cell lines at concentrations up to 50 μM . Other compounds showed moderate activity against A-549 and HCT-116 cell lines, while none of the compounds displayed cytotoxic effect on MCF-7 breast cancer cells. The IC_{50} values were estimated at the lowest micromolar concentration (cytotoxicity at $\sim 13 \mu\text{M}$) for compounds **19b**, **19c**, **19e**, **20a**, and **20d** in HCT-116 cells among the studied derivatives. While these derivatives showed pronounced cytotoxicity against colon cancer cells, only compounds **20d** and **19b** exhibited similar potency against A-549 lung cancer cells (Fig. 4a,b). We also compared the activity of **20d** and **19b** to the reference control drug Cisplatin, which is widely used in chemotherapy²⁹. It was observed that the tested compounds were more effective and selective than Cisplatin in both HCT-116 and A-549 cell lines (Table 1), suppressing 50% of cell viability at 7.5- and 5-fold lower concentrations, respectively. Importantly, none of the investigated compounds caused a reduction in the viability of the nonmalignant human embryonic kidney cells (HEK293) at concentrations up to 50 μM . Next, we investigated the antiproliferative activity of **20d** and **19b** in HCT-116 cells using clonogenic assay and observed that both compounds effectively inhibited the formation of colonies in a concentration-dependent manner in this cell line (Fig. 4c,d).

Based on their antiproliferative activity, **20d** and **19b** were evaluated for their effect on cell cycle phase distribution and DNA content by flow cytometry. The compounds induced alterations in cell cycle distribution in HCT-116 cells at every time-point of treatment. In comparison to vehicle, treatment with compounds **20d** and **19b** for 24 to 72 h led to a time-dependent increase (up to < 14%) in the number of cells in the G_0/G_1 phase (Fig. 5). Concomitantly, a substantial decrease in the number of cells in the S-phase as well as negligible change in the sub- G_1 and G_2/M fractions was observed, especially in the case of **20d**.

Considering its interesting *in vitro* antiproliferative activity and the strong inhibitory effect on cell cycle progression, we selected compound **20d** for the further analysis of the mechanism of its molecular action.

20d induces generation of ROS in HCT-116 cells. Reactive oxygen species (ROS) affect the cellular redox homeostasis resulting in extensive and irreparable damage and ultimately cell death³⁰. Anticancer compounds with cytotoxic properties often cause disturbances in the redox state in cells. Therefore, we performed a time-dependent kinetic analysis of the intracellular ROS level in colon cancer cell lines after treatment with **20d**. As depicted in Fig. 6, the compound induced the generation of a high amount of ROS in HCT-116 cells, but not in A-549 cell line, independently of the exposure time ($\sim 30\%$ and 5% increase in ROS level compared to vehicle).

We further attempted to determine whether **20d**-induced cancer cell death was related to the induction of ROS production in HCT-116 cells. For this purpose, we pretreated cells with N-acetyl-L-cysteine (NAC), which

Compound	Cell lines				SI ^b
	HCT-116	A-549	MCF-7	HEK293	
	IC ₅₀ [μM] ^a				
9	> 50	> 50	> 50	> 50	ND
16	> 50	> 50	> 50	> 50	ND
17	> 50	> 50	> 50	> 50	ND
18a	39.83 ± 2.62	27.24 ± 1.53	> 50	> 50	1.55
18b	> 50	> 50	> 50	> 50	ND
18c	18.93 ± 1.26	23.83 ± 4.02	> 50	> 50	6.2
18d	> 50	> 50	> 50	> 50	ND
18e	> 50	45.33 ± 4.20	> 50	> 50	ND
19a	26.17 ± 1.69	> 50	> 50	> 50	1.99
19b	13.49 ± 0.20	15.69 ± 2.56	> 50	> 50	4.07
19c	12.96 ± 2.68	28.44 ± 0.56	> 50	> 50	2.51
19d	31.64 ± 0.58	41.07 ± 0.93	> 50	> 50	1.50
19e	13.88 ± 1.30	> 50	> 50	> 50	3.79
20a	13.11 ± 1.55	21.79 ± 0.22	> 50	> 50	2.91
20b	> 50	> 50	> 50	> 50	ND
20c	18.44 ± 2.04	23.83 ± 4.02	> 50	> 50	ND
20d	12.04 ± 0.57	12.55 ± 0.54	> 50	> 50	20.68
20e	> 50	> 50	> 50	> 50	ND
21	> 50	> 50	> 50	> 50	ND
22	> 50	> 50	> 50	> 50	ND
23	> 50	> 50	> 50	> 50	ND
24	> 50	> 50	> 50	> 50	ND
Cisplatin	24.89 ± 1.14	29.01 ± 0.12	33.80 ± 1.56	28.45 ± 1.97	1.05

Table 1. In vitro anticancer activity of investigated compounds (IC₅₀ ± SD (μM)) towards human colon cancer (HCT-116), non-small cell lung adenocarcinoma (A-549), and human breast carcinoma (MCF-7), human and embryonic kidney cells (HEK293). ^aIC₅₀ value represent a concentration that inhibits 50% of cell growth. ^bSI value represent selectivity indexes (IC_{50 HEK-293}/Average IC_{50 cancer cell lines}); ND: not determined, since the compound was inactive in the experimental conditions.

is a commonly used antioxidant and ROS scavenger. As shown in Fig. 6b,c, NAC diminished the cytotoxic effect of **20d** in HCT-116. This indicated that ROS-dependent cellular redox imbalance is the main mechanism of **20d**-mediated cell death in this cell line. HCT-116 cell line has high-frequency microsatellite instability, which is associated with deficient DNA mismatch repair (MMR)³¹. The MMR system corrects DNA-mismatched and insertion–deletion loop bases generated during DNA replication³². One of the key proteins involved in the MMR pathway is MLH1, which is mutated or epigenetically silenced in many MMR-deficient (MMR⁻) cells, such as HCT-116³³. To further determine the selectivity for MMR deficiency, we analyzed the cell viability of human MutL homologue 1 (hMLH1)-deficient (MMR⁻) and hMLH1-proficient (MMR⁺) RKO human colon carcinoma cell lines. The latter was established by transfecting hMLH1 cDNA into MMR⁻ RKO cell line³⁴. In MMR⁻ RKO cells, the hMLH1 gene promoter was silenced transcriptionally by hypermethylation³⁵. The viability assay revealed that MMR⁻ RKO cells were 3.95-fold more sensitive to **20d** ($p < 0.001$) compared to the MMR⁺ RKO cells (Fig. S55 in supplementary information), and the respective IC₅₀ values (mean ± SD) were 1.21 ± 0.13 and 4.78 ± 0.38 μM.

20d oxidative properties are related to MMR deficiency. Then, we confirmed whether the induction of cellular stress by **20d** is related to MMR deficiency by exposing MMR-deficient and MMR-proficient cells to the compound for different times and measuring the ROS levels. Our results indicated a greater increase in the level of ROS after 1 h of exposure in **20d**-treated MMR-deficient cells than in MMR-proficient cells (54.71 ± 2.70% and 22.27 ± 1.7%, respectively), in comparison to control (Fig. 7). This finding suggests that **20d** could modulate oxidative stress in human MLH1-defective colon cancer cells through synthetic lethality.

20d treatment induces autophagy cell death in HCT-116 cells through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. Due to its ability to mediate the redox signaling pathways, ROS interplays between two major types of programmed cell death: autophagy and apoptosis³⁶. One of the early events in the process of apoptosis is the translocation of phosphatidylserine to the exposed membrane surface, which can be detected using Annexin V, a protein with a high affinity to this phospholipid³⁷. In order to study the impact of **20d** on apoptotic cell death, flow cytometry analyses with double-staining using Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate and propidium iodide (PI) was performed. As shown in Fig. S55 in the supplementary information, percentage of both early (Annexin V(+)/PI(-)) and late (Annexin V(+)/PI(+)) apoptotic as well as

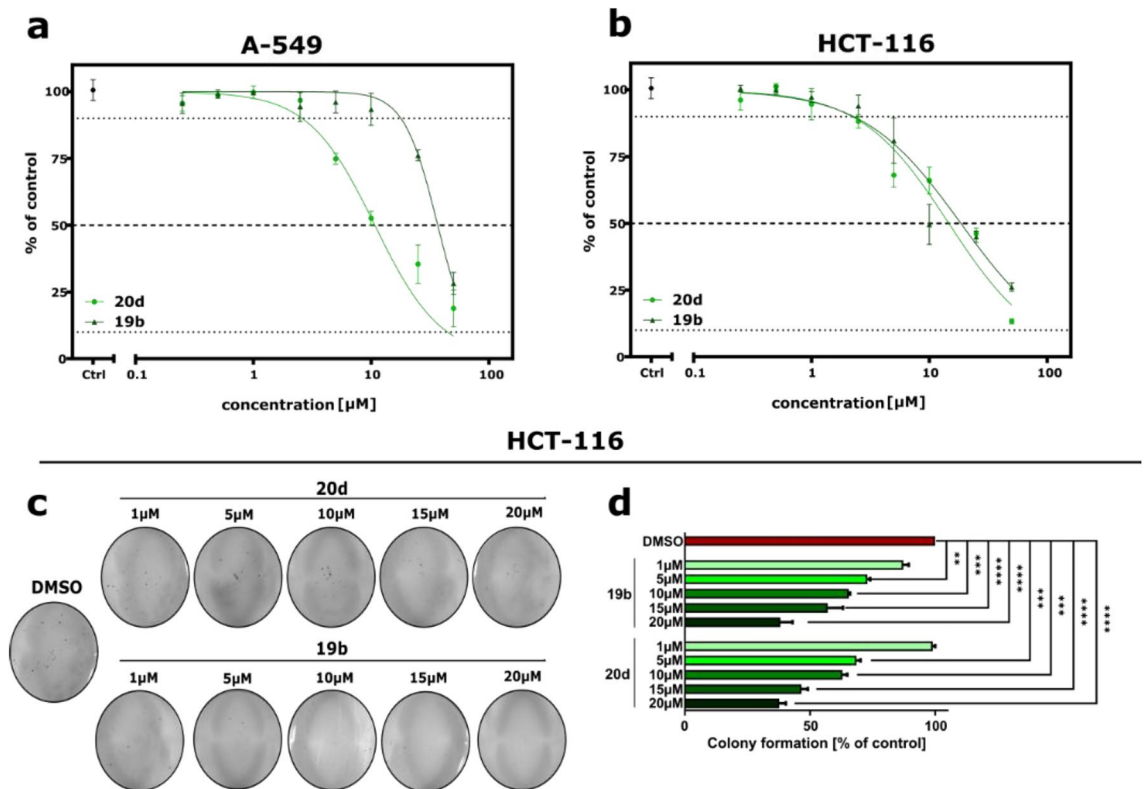


Figure 4. Dose–response curves of **20d** and **19b** in A-549 (**a**) and HCT-116 (**b**) after 72 h of treatment cells determined by the MTT assay. All data are presented as mean \pm SEM of three independent experiments in triplicates. (**c,d**) The effect of the examined compound on the colony-forming ability of HCT-116 cells. (**c**) Representative images of colonies formed by HCT-116 cells after treatment with different concentrations of **20d** and **19b**. (**d**) Quantitative analysis of clonogenicity assays. Error bars represent the SEM of data obtained from three independent experiments. ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, and **** $p < 0.00001$ vs. vehicle.

necrotic (Annexin V(-)/PI(+)) fractions, after treatment with HCT-116 cells incubated with **20d**, were on the same level as in DMSO-treated group. This result indicates that **20d** induced apoptosis- and necrosis-independent cell death in HCT-116 cells.

Then, to elucidate whether compound **20d** can act as an autophagy modulator, we stained cells with acridine orange (AO), a lysotropic agent³⁸. AO is a weak base that can permeate the cell membrane in an uncharged state emitting green fluorescence. After protonation, AO forms aggregates in acidic vesicular organelles (AVOs), emitting red fluorescence³². As shown in Fig. 8a,b, treatment with **20d** significantly enhanced the accumulation of AVOs in HCT-116 cells, resulting in a 1.9-fold ($p < 0.01$) increase in red fluorescence in comparison to vehicle. One of the hallmarks of autophagy is the conjugation of LC3-I with phosphatidylethanolamine, followed by its conversion to autophagosome-associated form LC3-II³⁹. Taking this into account, we evaluated the expression of LC3I/II in colon cancer cells after exposure to **20d**. Furthermore, we studied the expression of LAMP-1, a well-known lysosomal marker⁴⁰. Immunoblot assays revealed that the levels of LC3-II were higher in **20d**-treated HCT-116 cells compared to control groups (Fig. 8c,f). This observation was also confirmed by increased punctate cytosolic LC3 fluorescence intensity when HCT-116 cells were assessed by confocal microscopy (Fig. 8e,g). In addition, a time-dependent increase in the expression of LAMP-1 protein was noted after **20d** treatment. It has been shown that multiple signaling pathways are involved in the modulation of autophagy, including the PI3K/AKT/mTOR pathway, which is especially involved in the stage of autophagosome elongation^{41,42}. In this study, we investigated whether **20d**-induced autophagy in HCT-116 cells is related to PI3K/AKT/mTOR signaling. The results showed that **20d** significantly reduced the levels of phospho-AKT (Ser473) and phospho-mTOR (Ser2448) proteins, in a time-dependent manner (Fig. 8d,f). This proves that **20d** induced autophagy cell death in HCT-116 cells by interfering with the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.

20d modulates expression of the cell cycle-related protein. To understand the mechanisms underlying **20d**-induced cellular death in detail, we estimated the expression levels of cyclin D1, p21, p27, and p53 in HCT-116 cells by Western blot assay for the indicated time (Fig. 9). p21 is a negative regulator of the cell cycle, which mediates many cellular processes primarily by inhibiting the activity of cyclin-dependent kinase (CDK) 2 and CDK1 (also known as CDC2), leading to growth arrest⁴³. p27, another tumor suppressor, halts the cell cycle via CDK complexes, while also playing a role in survival, differentiation, and migration⁴⁴.

As shown in Fig. 9, the expression of p53 and cell cycle regulatory proteins p21 and p27 were markedly higher in **20d**-treated cells ($p < 0.001$) than in the control group. Oxidative stress leads to the stabilization of p53, which

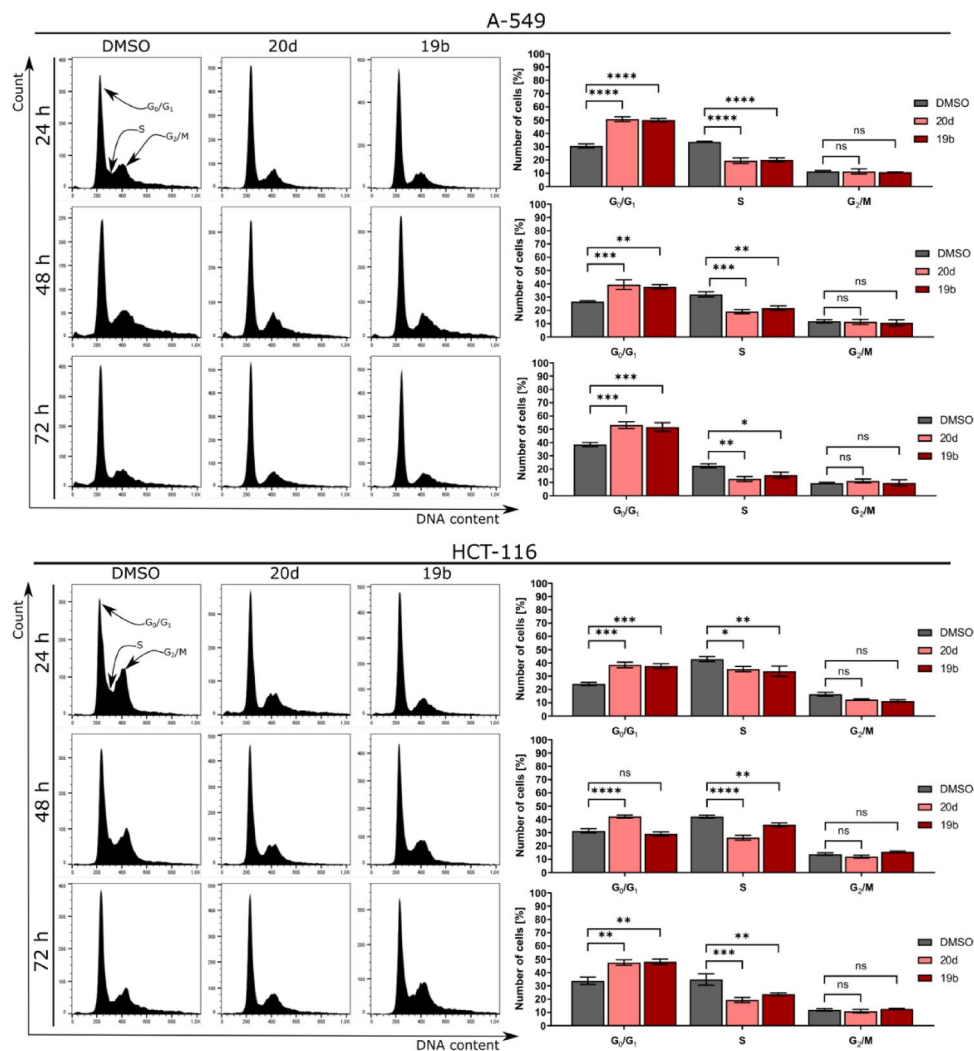


Figure 5. Cell cycle analyses. Representative histograms after DNA staining are presented in left panels. Statistical analyses of histograms are presented on right panels. Error bars show the SEM of data obtained in three independent experiments. Statistical differences were analyzed with a one-way ANOVA post-hoc Dunnett's test. ns $p > 0.05$, * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ *** $p < 0.0001$ vs. vehicle.

is then activated to promote cell cycle arrest and induce autophagy by transcriptionally activating target genes, such as DNA damage-regulated autophagy modulator 1 (*DRAM1*)⁴⁵ and Sestrin 1/2 (*SESN1* and *SESN2*)⁴⁶. While upregulation of proteins p21 and p27 causes halting of G1/S-phase transition, transcription factor p53 upregulates many genes in response to double-strand breaks (DSBs), including proto-oncogene MYC, which codes for the transcription factor c-Myc⁴⁷. Therefore, we analyzed the expression of c-myc after treatment with **20d** and found that it was downregulated in the treated cells as compared to vehicle. This suggests that p53 negatively regulates c-myc. Suppression of MYC may cause tumor cells to lose their neoplastic properties, because of diverting cellular resources toward stress response pathways, permitting cells to recognize DNA damage, leading to enforces their regression and differentiation⁴⁷.

20d induces DNA damage in HCT-116 cells. ROS formation can induce DNA oxidation followed by mutagenic alterations in DNA bases or double-helix breaks, resulting in cell cycle arrest and subsequently cell death⁴⁸. Therefore, we further investigated the effect of **20d** on DNA damage response. HCT-116 cells were incubated with **20d** for 24–72 h, and then the expression of p- γ -H2AX, a known DNA damage marker, was determined by immunoblot and immunofluorescence. As shown in Figs. 9 and 10, even after 24 h, the expression of p- γ -H2AX was found to be significantly increased. It was also noted that **20d** led to this increase in p- γ -H2AX in a time-dependent manner.

β -Catenin is a member of the Armadillo repeat protein family and an important component of the cell–cell adhesion machinery. It is also involved in the Wnt growth factor signaling pathway^{49,50}. As shown in Fig. 9, **20d** caused the cleavage of β -catenin, even after 24 h of exposure. Proteolysis of β -catenin has often been observed during apoptotic cell death. However, some reports indicate that such proteolysis may also occur due to the

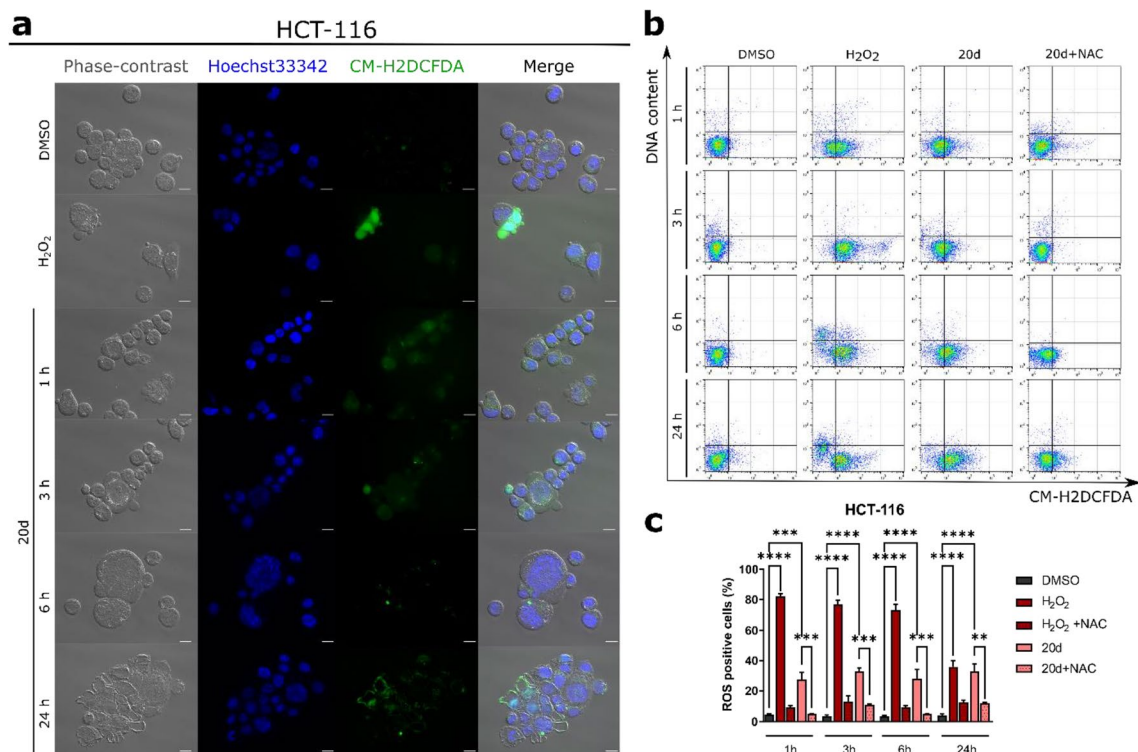


Figure 6. Effect of **20d** treatment on ROS induction in HCT-116 cells after 1, 3, 6, and 24 h of exposure. **(a)** Representative microscopic images of H2DCFDA-stained cells. Scale bar = 50 μ m. **(b)** Representative dot plots of H2DCFDA-stained HCT-116 cells. DMSO and H₂O₂ were used as reference compounds. **(c)** Quantification of dot plots is depicted as mean \pm SEM of data obtained from three independent experiments.

disorganization of endothelial adhesion junctions^{51–53}. To investigate whether β -catenin regulates the expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells, we determined its expression after **20d** treatment⁵⁴. We noted a slight inhibition of cyclin D1 expression in **20d**-treated cells compared with the DMSO-treated cells after 72 h of treatment, which might be associated with its induction of growth arrest in colon cancer cells. Additionally, we analyzed the changes in the expression of vimentin, another protein known to be involved in cell–cell junctions and thus contribute to epithelial–mesenchymal transition⁵⁵. As shown in Fig. 9, the expression of vimentin was significantly altered in **20d**-treated cells.

Suppression of HCT-116 cells migration following 20d treatment. A decrease in cell–cell adhesion correlates with tumor invasion and metastasis⁵⁶. Migration leads to spreading and metastasis of cancer cells and is thus associated with poor prognosis of many types of cancer⁵⁷. Moreover, studies indicate that metastasis is the major cause of death in patients with colorectal cancer (CRC)⁵⁸. To investigate the effect of **20d** on migration, HCT-116 cells were cultured and investigated by wound healing assay. The percentage of migration was monitored over time by capturing a series of images after every 6 h up to 36 h of treatment. As shown in Fig. 10c,d treatment with **20d** led to a significant reduction ($p < 0.0001$) in migration in HCT-116 cells, compared to DMSO-treated vehicle. This antimigratory effect was more evident at 30 and 36 h of treatment, during which a 30–50% inhibition of migration was observed in HCT-116 cells treated with 10 and 20 μ M **20d**. Importantly, we did not observe any detached cells after treatment, which indicates that exposure to **20d** did not cause cell death at any tested time-point. In addition, as shown in Fig. S65 in the supplementary information, the compound **20d** shows a slight cytotoxic effect after 24 h and 48 h exposure at concentrations of 10 and 20 μ M, thus observed antimigratory properties of investigated compound is not affected by cell death.

Discussion

CRC is the most diagnosed cancer in Europe and the second leading cause of cancer-related mortality⁵⁹. The incidence of CRC is likely to increase considerably, mainly due to the aging of the human population and the resistance of CRC to drugs used in conventional chemotherapy⁶⁰. The development of CRC, like other types of cancer, is fostered by the accumulation of genetic and epigenetic alterations, which mainly occurred in tumor suppressor genes, oncogenes, and genes involved in DNA repair mechanisms. Based on the origin of mutation, CRCs are classified as sporadic, inherited, and familial⁶¹. Moreover, many genomic instability alterations like chromosomal instability (CIN) phenotype, CpG island methylator phenotype (CIMP), and microsatellite instability (MSI) phenotype promote CRC development⁶². The most common CIN occurring in 75% of CRCs is characterized by alterations in chromosome segregation, loss of heterozygosity, abnormalities in the mitotic checkpoint, defective DNA damage response, and others⁶¹. Chromosome instability involves mutations in tumor

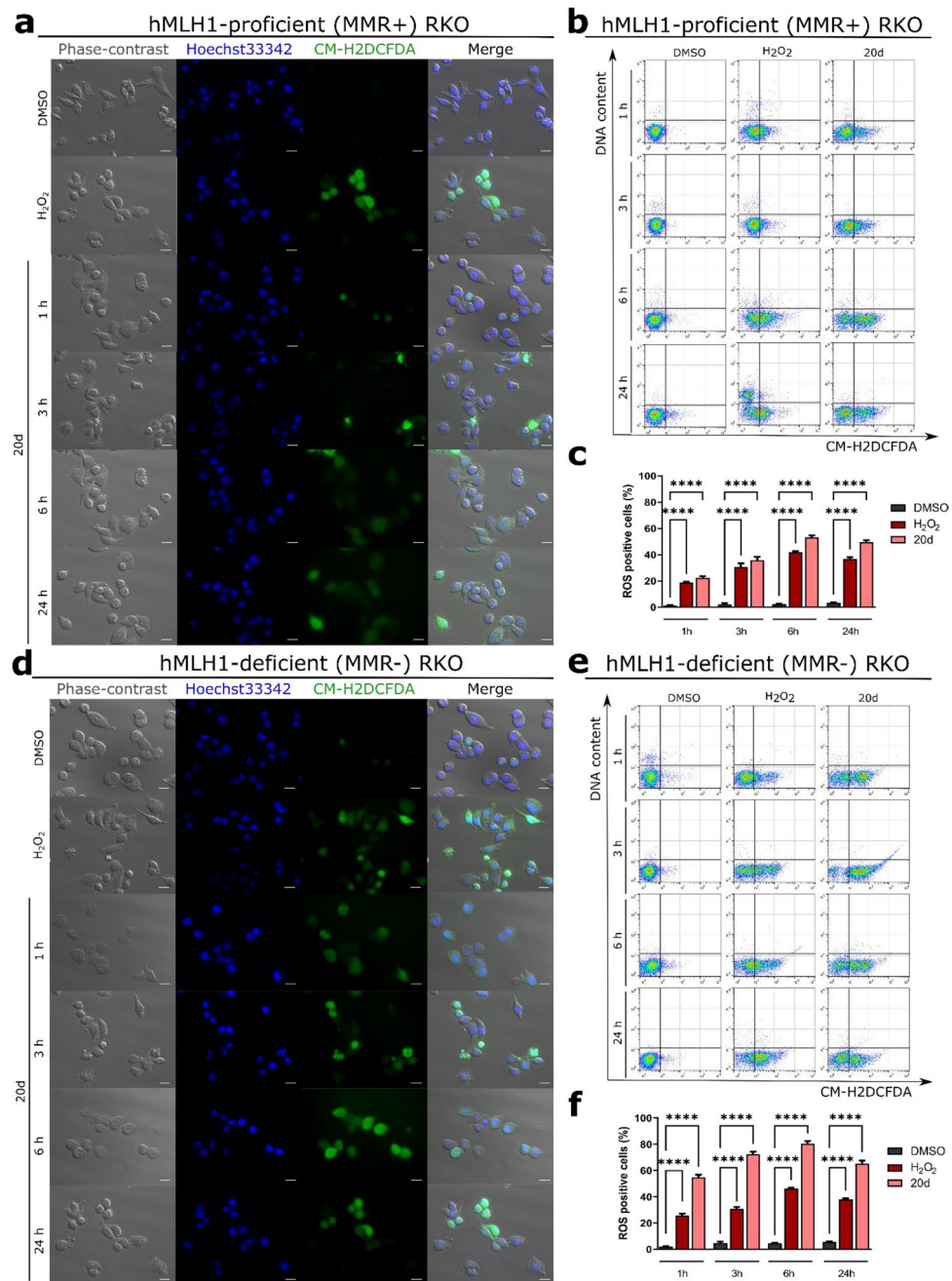


Figure 7. Effect of 20d treatment on ROS induction in hMLH1-proficient and hMLH1-deficient RKO cells after 1, 3, 6, and 24 h of exposure. **(a,d)** Representative microscopic images of H2DCFDA-stained cells. Scale bar = 50 μ m. **(b,e)** Representative dot plots of H2DCFDA-stained RKO cells. DMSO and H₂O₂ were used as reference compounds. **(c,f)** Quantification of dot plots is depicted as mean \pm SEM of data obtained from three independent experiments.

suppressor genes and oncogenes, such as Adenomatous Polyposis Coli (APC) in Wnt signaling, and TP53 playing a crucial role in cell cycle arrest and induction of apoptosis. Other examples include KRAS and BRAF providing molecular switches leading to cellular proliferation and growth, and PI3K promoting cell growth and invasion^{62,63}.

The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway control many cellular processes such as proliferation, growth, motility, apoptosis, autophagy, and metabolism⁶⁴. Therefore, alteration of this pathway is one of the promising therapeutic targets in therapy of primary and metastatic CRCs⁶⁵. The PI3Ks belong to the lipid kinase family and are divided into 3 classes based on their substrate preference and sequence homology. The class I of PI3Ks consists of catalytic (p110 α , p110 β , p110 γ , and p110 δ) and regulatory (p85) subunits, and is most frequently mutated in cancers⁶⁵. PI3K inhibitors are subdivided into three categories: (i) isoform-specific inhibitors, e.g. GSK2636771 as an inhibitor of PI3K β with anti-tumor activity in PTEN-deficient cancers⁶⁶; (ii) dual PI3K/mTOR inhibitors, such as Dactolisib inhibiting the proliferation and migration of HT-29 human colorectal

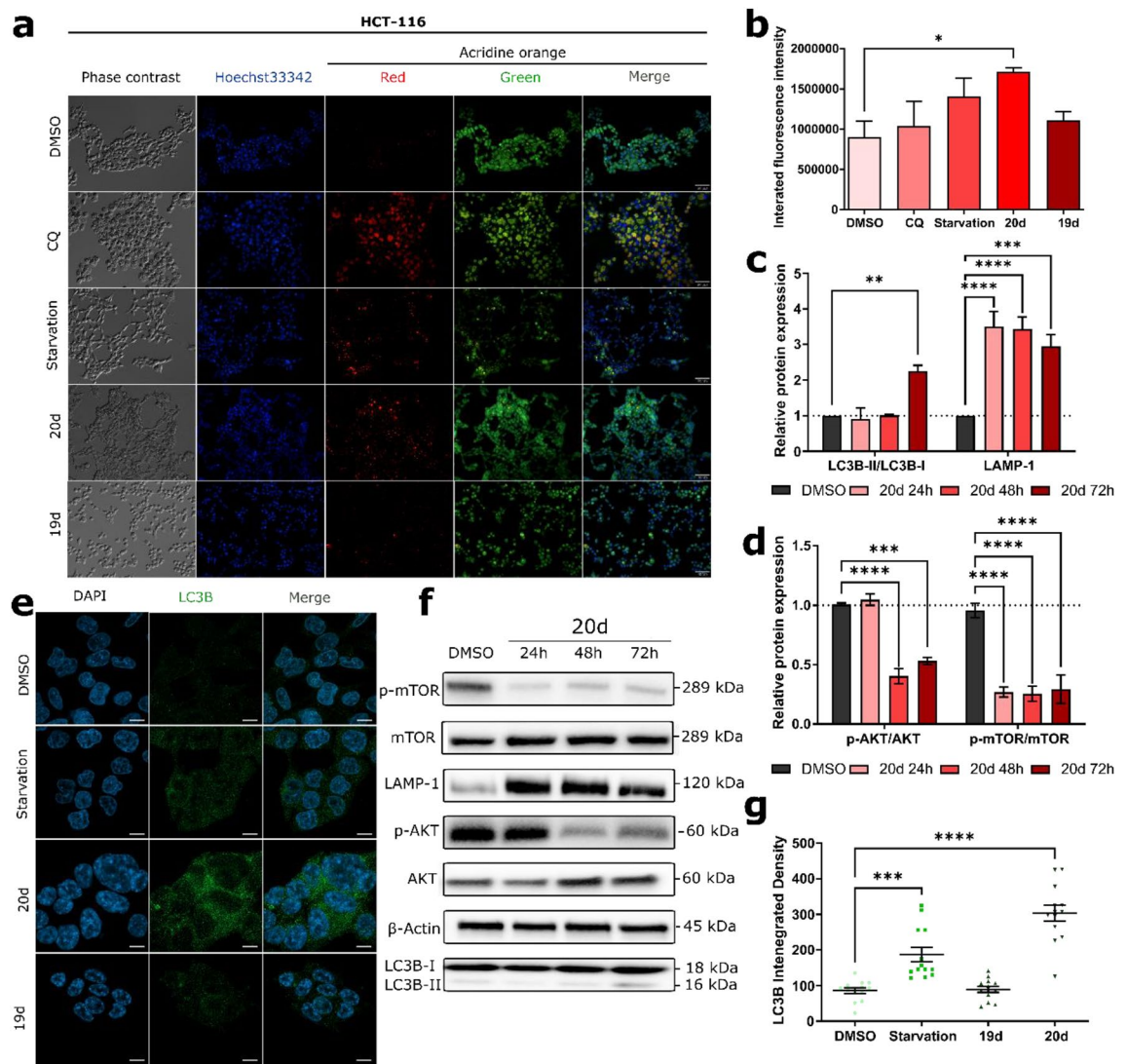


Figure 8. (a) Representative microscopic images of Hoechst33342- and AO-stained HCT-116 cells. Scale bar = 50 μm. Chloroquine was used as a reference. (b) Quantification of microscopic images, presenting the integrated red fluorescence intensity, depicted as mean ± SEM of data obtained from 10 random fields of view. (c,d,f) The expression of various proteins detected by Western blot assay after HCT-116 treatment with 20d or DMSO. The level of each protein was normalized to that of β-actin. Error bars represent the data ± SEM (e) Representative microscopic images of HCT-116 cells. LC3B is depicted in green and nucleus in blue (DAPI). Scale bar = 10 μm (g) Quantification of microscopic images showing the integrated density of LC3B presented as mean ± SEM of data obtained from 10 random fields of view.

adenocarcinoma cells⁶⁷; and (iii) pan-PI3K inhibitors, e.g. DHNQ decreasing Colo-205, and HCT-116 colorectal cell proliferation and survival⁶⁸.

Considering the need for novel therapeutic strategies, we synthesized new quinolone derivatives and tested their anticancer properties. Among the synthesized compounds, 20d and 19b showed interesting in vitro antiproliferative effects against human colon cancer cell line HCT-116, but no cytotoxicity to nonmalignant embryonic cell line HEK293. Furthermore, the compounds effectively decreased the colony-forming ability of HCT-116 and induced cell cycle arrest at the G1 phase. The PI3K/AKT/mTOR pathway promotes the G1/S transition through transcriptional regulation and control of cyclins and cyclin-dependent kinases like cyclin D1, p21, or p27⁶⁸. Therefore, inhibition of this pathway prevents G1 progression into S, leading to the accumulation of cells in the G1 phase.

Further analyses revealed that 20d induced massive oxidative stress in colon cancer HCT-116, RKO MMR-proficient and MMR-deficient cells. ROS are involved in several steps in tumorigenesis and play a crucial role in the cellular signaling, regulating cell proliferation and cell survival⁶⁹. However, excess ROS causes an imbalance between intracellular reduction–oxidation processes, causing to damage to cellular components like DNA, proteins, and lipids³⁰. Prooxidative compounds are mostly highly selective to ROS-dependent cancer cells without affecting normal cells, representing a notable strategy in the anticancer battle⁷⁰. Many studies report that

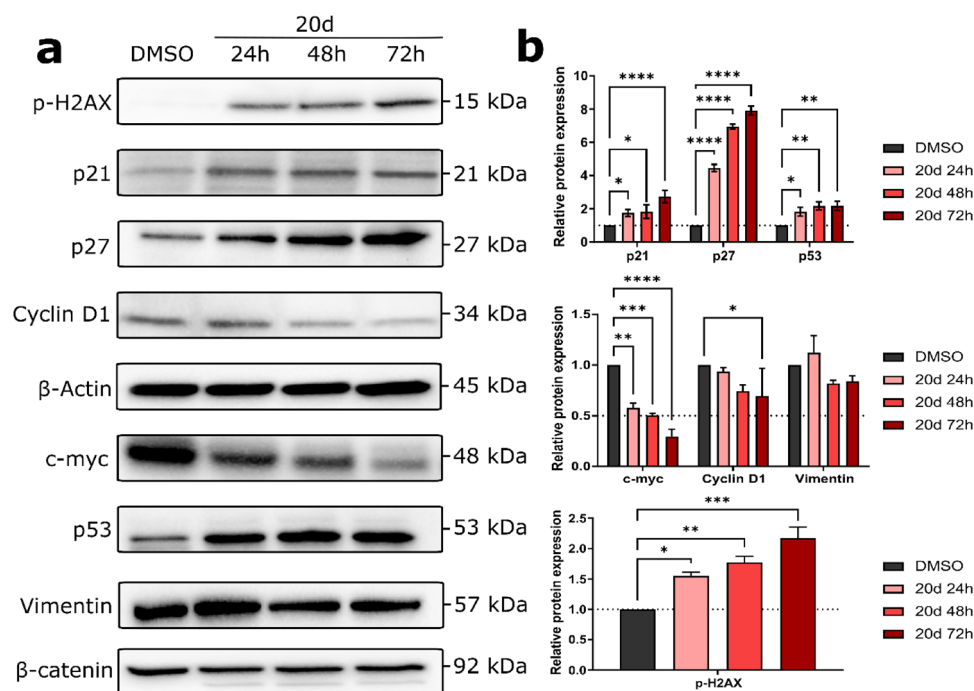


Figure 9. (a,b) The expression of various proteins detected by Western blot assay after HCT-116 treatment with **20d** or DMSO. The level of each protein was normalized to that of β -actin. Error bars represent the data \pm SEM. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, and **** $p < 0.00001$ vs. vehicle.

excessive levels of ROS can induce autophagy through several distinct mechanisms involving Atg4, catalase, the mitochondrial electron transfer chain, and PI3K/AKT/mTOR pathway^{71,72}.

Autophagy is controlled by several kinase cascades, among which, the main regulator is the mammalian target of rapamycin, complex 1 (mTORC1) kinase. This kinase is involved in each step of the autophagy process, including nucleation, autophagosome elongation, autophagosome maturation and termination⁷³. Inhibition of mTORC1 suppresses the autophagy-initiating UNC-5 like autophagy activating kinase (ULK) and PI3K, followed by the initiation of the formation of a phagophore⁴¹. In the present study, **20d** was found to induce autophagic cell death in HCT-116 cells. A variety of autophagic markers related to the formation and maturation of autophagosomes and phagosomes like LC3-II and LAMP1 were observed. Moreover, **20d** suppressed the activity of mTOR and diminished the phosphorylation of AKT and the level of c-Myc, followed by decreasing the expression of several key proteins involved in the regulation of the cell cycle. Degtyarev et al. reported that knockdown or inactivation of AKT leads to markedly increased autophagy rather than apoptosis and interestingly this phenomenon was related to marked accumulation of ROS¹⁸. Indeed, we did not observe any typical features of apoptosis-like cell shrinkage, membrane blebbing, chromatin condensation, or loss of plasma membrane phosphatidylserine asymmetry. However, inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway could promote cancer cell death via different mechanisms. Wen et al. reported that chaetocin, a natural product isolated from the *Chaetomium*, inhibited the proliferation of gastric cancer in cell xenografts and patient-derived xenografts through inactivation of the PI3K/AKT pathway by inducing ROS leading to both apoptotic and autophagy cell death⁴¹. Other reports showed that PI3K inhibitor LY294002 and the mTOR inhibitor rapamycin promoted the expression of autophagy-related proteins via inhibition of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. Furthermore, it was found that **20d** suppressed the cell migration in HCT116 cells in a time-dependent manner. Indeed, inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway has also been found to suppress migration in other tumors including breast cancer⁷⁴, bile duct cancer⁷⁵, and osteosarcoma⁷⁶. These findings indicate that **20d** is a potential tumor suppressor in colon cancer.

In summary, we presented new quinolone derivatives with promising anticancer properties against CRCs. The most potent compound **20d** induced massive oxidative stress leading to autophagy by interfering with the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. The compound also caused deregulation of several proteins involved in cell cycle progression and maintenance and showed an anti-migratory effect on HCT-116 cells. Overall, the study provides convincing experimental evidence for the application of novel quinolone derivatives as compounds inhibiting cancer cell growth and metastasis. Thus, it can be concluded that **20d** could be used as a lead compound for drug discovery based on quinolone derivatives.

Methods and experimental. General: Commercially available reagents were purchased from Sigma-Aldrich or Acros and used without further purification. DCM was distilled over P_4O_{10} and stored over molecular sieves. The reagents were prepared as described in the literature. Analytical thin-layer chromatography was performed on aluminum sheets of UV-254 Merck silica gel, and flash chromatography using SilicaFlash P60 silica gel (40–63 μ m). 1H and ^{13}C NMR spectra were recorded with Bruker Avance III HD 400 MHz, and NMR

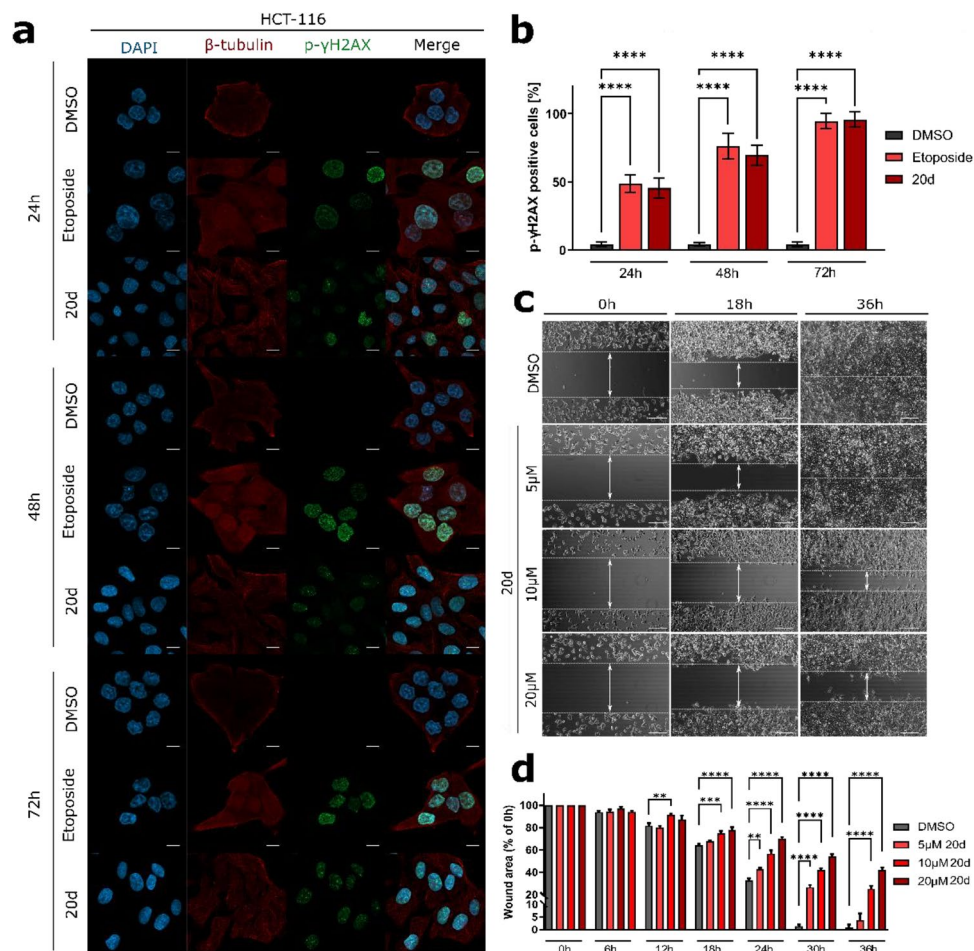


Figure 10. (a,b) Analyses of the induction of DSBs in HCT-116 cells. Representative microscopic images presenting immunofluorescence. Scale bar = 10 μm . Etoposide and DMSO were used as reference compounds. The microtubule is depicted in red, γ -H2AX in green, and nucleus in blue (DAPI). (b) Quantification of the average percent of p- γ -H2AX-positive cells depicted as mean \pm SEM of data obtained from 15 random fields of view. (c,d) The effect of the 20d compound on the migration ability of HCT-116 cells. (c) Representative images captured at 0, 18, and 36 h of treatment of cells with various concentrations of 20d and DMSO (control). Scale bar = 100 μm . (d) Quantification of wound healing by measuring the percent of the open scratch area relative to 0 h every 6 h for 36 h. Error bars represent the SEM of data obtained from three independent experiments. ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, and **** $p < 0.00001$ vs. vehicle.

chemical shifts were reported in δ (ppm) using residual solvent peaks as standards with the coupling constant J measured in Hz. High-resolution mass spectra were recorded with an Agilent 6540 Q-TOF system. Melting points were determined with a Warsztat Elektromechaniczny W-wa apparatus and were used uncorrected. All experimental data and spectra are collected in Supplementary Information.

Docking study. Molecular docking of the designed molecules was performed using AutoDock Vina²⁰ and AutoDock4.2 software packages^{21,22,77}. The structures of kinases were deduced from PDB. We used the crystallographic structures of human γ ²³ and mouse δ ²⁴ PI3K for our analysis. In the case of crystallographic structures containing complexed ligand, the atoms of the ligand were selectively removed from the crystallographic structures of the proteins if necessary. The energy of the ligand molecules was minimized using an MM2 force field. During docking, the ligands had torsion allowed for all rotating dihedral angles.

Cell culturing. A-549 (CCL-185) and MCF-7 (HB-8065) cells were cultured in RPMI-1640 medium, while HCT-116 (CVCL-427), (hMLH1)-deficient (MMR⁻) and hMLH1-proficient (MMR⁺) RKO cells were cultured in McCoy's 5A medium. The culture media were supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, and antibiotics (penicillin 62.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and streptomycin 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Cultivation of cell lines was carried out at 37 $^{\circ}\text{C}$ under a humidified atmosphere containing 5% CO_2 , and the cultures were routinely screened for *Mycoplasma* contamination. A-549, MCF-7, and HCT-116 cells were obtained from American Type Culture Col-

lection (ATCC), while RKO colon carcinoma cells were a kind gift of Dr Timothy Kinsella (Brown University, USA).

Cell viability assay. The viability of cells was determined in response to the newly synthesized compounds using the MTT (Sigma-Aldrich) assay. Briefly, cells were seeded into 96-well plates and allowed to attach overnight. Then, cells were exposed to various concentrations of compounds for 24, 48 or 72 h. Negative controls were treated with the same amount of DMSO solvent (1%). After treatment, the MTT solution (0.4 mg/ml) was added to each well and allowed to react with cells for 2–3 h at 37 °C. Next, the medium was removed, the formazan product formed was dissolved in 100 µl of DMSO, and the absorbance was determined at 540 nm using an ASYS UVM340 microplate reader (Biochrom Ltd.). The IC₅₀ value, which represents the concentration of the compound required to inhibit cell growth by 50% compared to vehicle, was calculated using GraphPad Prism 8 software based on the curves plotting survival against dose averaged from at least three independent experiments.

Colony formation assay. A total of 500 HCT-116 cells/well was seeded into six-well plates. After attachment, cells were pretreated with DMSO (1%) or various concentrations of **20d** and **19b** for 24 h. Following incubation, the medium was changed, and cells were cultured for 9 days. After culturing, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with 100% methanol for 30 min, and then stained with 0.5% crystal violet for 15 min. The plates were air-dried, and visible colonies were counted using ImageJ software. The percentage viability of cells was calculated in comparison to the control.

Cell cycle distribution analysis. HCT-116 and A-549 cells were seeded into culture plates and allowed to attach overnight. Then, cells were incubated with the investigated compounds for the indicated time points. After incubation, the harvested cells were fixed with ice-cold 75% ethanol and stored overnight at –20 °C. Next, cells were rehydrated with PBS in ice for 15 min and washed twice in PBS. Finally, cells were stained with 20 µg/µl propidium iodide (PI) and 50 µg/µl RNase A in PBS for 30 min at room temperature. Cell cycle distribution was determined using a Guava easyCyte 8 flow cytometer (Merck Millipore) and FlowJo v10 software.

Annexin V-FITC staining. To determine the proapoptotic activity of compounds, cells were seeded into Petri dishes. After overnight attachment, cells were treated with IC₅₀ concentrations of **20d** and **19b** for 6, 24, and 48 h. DMSO (1%, Merck) and Etoposide (10 µM, Sigma-Aldrich) were used as references. Cells were harvested and stained with FITC-Annexin V, (Thermo Fisher, V13242) according to the manufacturer's instructions. Finally, cells were stained with propidium iodide (Thermo Fisher) and assessed using a Guava easyCyte 8 cell sorter (Merck Millipore). The results were analyzed using FlowJo v10 software.

Measurement of extracellular ROS activity. The extracellular ROS levels were determined using an H2DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) probe (Thermo Fisher) following the manufacturer's protocol. Briefly, HCT-116 and A-549 cells were treated with IC₅₀ concentrations of **20d** and **19b** for 1, 3, 6, and 24 h. DMSO (1%, Merck) and 250 µM H₂O₂ were used as a negative and positive control, respectively. NAC (500 µM, Sigma-Aldrich) was used as an ROS scavenger to confirm the ROS activity. After treatment with **20d** and **19b**, cells were incubated with H2DCFDA at 37 °C for 30 min. Subsequently, cells were harvested by trypsinization, rinsed with PBS, and stained with 7-AAD (Thermo Fisher). Finally, the stained cells were analyzed by flow cytometry using a Guava easyCyte 8 cell sorter (Merck Millipore) and FlowJo v10 software.

Confocal live cell imaging. ROS analysis was performed by seeding the cells into cover glass-bottom 24-well plates for live-cell imaging. Cells were treated with compounds and stained as described above for flow cytometry. Images were acquired with an LSM 800 inverted laser-scanning confocal microscope (Carl Zeiss), equipped with an airyscan detector for high-resolution confocal scanning, using a ×63 1.4-NA Plan Apochromat objective (Carl Zeiss). The incubation chamber was maintained at 37 °C with 5% CO₂ throughout the analysis.

Western blot. HCT-116 cells were seeded into 60-mm Petri dishes at a density of 1.5 × 10⁶ cells per dish and incubated overnight. Then, cells were treated with IC₅₀ concentration of **20d** or 1% DMSO for 24, 48, and 72 h. After treatment, cells were lysed in Laemmli buffer with a protease and phosphatase inhibitors cocktail (Roche), followed by sonification. The lysate was cleared by centrifuging at 16,000 × g for 15 min at 12 °C. The supernatant was collected, and the extract was quantified for protein using the DC Protein Assay (Bio-Rad). Proteins were resolved by 10% or 12% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad). Membranes were blocked using 5% (w/v) bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) in 1 × TBST (pH 7.4 and 0.1% Tween-20) for 1 h at room temperature and subsequently incubated overnight with primary antibodies at 4 °C. The blots were washed thrice with TBST and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated antibodies for 1 h at room temperature. After washing, the membranes were evaluated for detecting the protein bands using enhanced chemiluminescence detection reagent kit (Thermo Fisher) and ChemiDoc XRS + Imaging System (Bio-Rad). The band intensity was measured using ImageLab 5.2 software (Bio-Rad). All the used antibodies are listed in Table 2.

Wound healing assay. The antimigratory properties of **20d** were investigated in HCT-116 cell line using wound healing assay. Briefly, cells were seeded and allowed to attach to the Ibidi-silicone insert on a cover glass-bottom 24-well plate for live-cell imaging. Next, the inserts were dislodged, and subsequently, cells were washed

Antibody name	Company	Dilution
Anti-mTOR, #2983	Cell signaling	1:1000
Anti-p(Ser2448) mTOR, #5536	Cell signaling	1:1000
Anti-LAMP1 (D4O1S), #15665	Cell signaling	1:1000
Anti-LC3B, #2775	Cell signaling	1:1000
Anti-AKT, #4691	Cell signaling	1:1000
Anti-pAKT, #9271	Cell signaling	1:1000
Anti-c-myc, #5605	Cell signaling	1:1000
Anti-p-H2AX	Cell signaling	1:100
Anti-vimentin, #5741	Cell signaling	1:1000
Anti-actin, sc-1616	Santa Cruz	1:100
Anti- β -catenin, sc-133240	Santa Cruz	1:250
Anti-cyclin D1, sc-246	Santa Cruz	1:100
Anti-p21, sc-397	Santa Cruz	1:250
Anti-p27, sc-1641	Santa Cruz	1:250
Anti-p53, sc-126	Santa Cruz	1:250
Anti-mouse-HRP, 715-035-150	Jacson ImmunoResearch Labs	1:10,000
Anti-rabbit-HRP, 711-035-152	Jacson ImmunoResearch Labs	1:10,000
Anti-goat-HRP, 705-036-147	Jacson ImmunoResearch Labs	1:10,000

Table 2. List of antibodies used in Western Blot.

with a fresh medium and incubated with various concentrations of **20d** in an imaging chamber (cellVivo incubation system, Olympus). For monitoring the migration of cells by live-cell microscopy with time-lapse photography, images were captured every 15 min for 36 h under 10 \times magnification using a fluorescence microscope (IX83 Inverted Microscope, Olympus) equipped with an XC50 phase-contrast digital color camera (Olympus). The distance between gaps was measured using ImageJ software.

Statistical analyses. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8 software. Unless stated otherwise, statistical significance was determined using one-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Dunnett's test. A probability value of <0.05 was considered statistically significant.

Data availability

The datasets presented in the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 28 March 2022; Accepted: 30 May 2022

Published online: 15 June 2022

References

- Li, Q., Mitscher, L. A. & Shen, L. L. The 2-pyridone antibacterial agents: Bacterial topoisomerase inhibitors. *Med. Res. Rev.* **20**, 231–293 (2000).
- Emtenas, H., Alderin, L. & Almqvist, F. An enantioselective ketene-imine cycloaddition method for synthesis of substituted ring-fused 2-pyridinones. *J. Org. Chem.* **66**, 6756–6761 (2001).
- Pemberton, N., Aberg, V., Almstedt, H., Westermark, A. & Almqvist, F. Microwave-assisted synthesis of highly substituted aminomethylated 2-pyridones. *J. Org. Chem.* **69**, 7830–7835 (2004).
- Emtenas, H., Soto, G., Hultgren, S. J., Marshall, G. R. & Almqvist, F. Stereoselective synthesis of optically active β -lactams, potential inhibitors of pilus assembly in pathogenic bacteria. *Org. Lett.* **14**, 2065–2067 (2000).
- Pemberton, N. *et al.* Functionalization of bicyclic 2-pyridones targeting pilus biogenesis in uropathogenic *Escherichia coli*. *Tetrahedron Lett.* **48**, 4543–4546 (2007).
- Emtenas, H., Carlsson, M., Pinkner, J. S., Hultgren, S. J. & Almqvist, F. Stereoselective synthesis of optically active bicyclic β -lactam carboxylic acids that target pilus biogenesis in pathogenic bacteria. *Org. Biomol. Chem.* **1**, 1308–1314 (2003).
- Zalewska-Piątek, B. & Piątek, R. Alternative treatment approaches of urinary tract infections caused by uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Acta Biochim. Pol.* **66**, 129–138 (2019).
- Piątek, R. *et al.* Pilicides inhibit the FGL chaperone/usher assisted biogenesis of the Dr fimbrial polyadhesin from uropathogenic *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* **13**, 131–142 (2013).
- Azzam, R. A. & Elgemeie, G. H. Synthesis and antimicrobial evaluation of novel N-substituted 4-ethylsulfanyl-2-pyridones and triazolopyridines. *Med. Chem. Res.* **28**, 62–70 (2019).
- de Silva, E. D. *et al.* Isolation of 2-pyridone alkaloids from a New Zealand marine-derived *Penicillium* species. *J. Nat. Prod.* **72**, 477–479 (2009).
- Hosoya, R. *et al.* Chem. Abstr Vol. 124, 143744k (1996).
- Lv, Z. *et al.* Design and synthesis of novel 2'-hydroxy group substituted 2-pyridone derivatives as anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **67**, 447–453 (2013).
- Kim, J. C., Lee, Y. W., Tamura, H. & Yoshizawa, T. Sambutoxin: A new mycotoxin isolated from *Fusarium sambucinum*. *Tetrahedron Lett.* **36**, 1047–1050 (1995).
- Li, L. *et al.* Discovery and characterization of 4-hydroxy-2-pyridone derivative sambutoxin as a potent and promising anticancer drug candidate: Activity and molecular mechanism. *Mol. Pharm.* **15**, 4898–4911 (2018).

15. Efferth, T. *et al.* Molecular target-guided tumor therapy with natural products derived from traditional chinese medicine. *Curr. Med. Chem.* **14**, 2024–2032 (2007).
16. Kollmannsberger, C., Mross, K., Jakob, A., Kanz, L. & Bokemeyer, C. Topotecan—A novel topoisomerase I inhibitor: Pharmacology and clinical experience. *Oncology* **56**, 1–12 (1999).
17. Liu, L. F. *et al.* Mechanism of action of Camptothecin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **922**, 1–360 (2000).
18. Aksnes, D. W. & Håkon, K. Substituent and solvent effects in Proton Magnetic-Resonance (PMR) spectra of six 2-substituted pyridines. *Acta Chem. Scand.* **26**, 2255–2266 (1972).
19. Cox, R. H. & Bothner-By, A. A. Proton Magnetic Resonance spectra of tautomeric substituted pyridines and their conjugated acids. *J. Phys. Chem.* **73**, 2465–2468 (1969).
20. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, 455–461 (2010).
21. Morris, G. M. *et al.* Autodock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785–2791 (2009).
22. Forli, S. & Olson, A. J. A force field with discrete displaceable waters and desolvations entropy for hydrated ligand docking. *J. Med. Chem.* **55**, 623–638 (2012).
23. Liu, K.K.-C. *et al.* 4-Methylpteridinones as orally active and selective PI3K/mTOR dual inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 6096–6099 (2010).
24. Hoegenauer, K. *et al.* Discovery of CDZ173 (leniolisib), representing a structurally novel class of PI3K delta-selective inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **8**, 975–980 (2017).
25. Markov, V. I. *et al.* Synthesis and formylation of substituted 2-spiropyrimidin-4-ones and related compounds. *Chem. Heterocycl. Comp.* **49**, 1158–1165 (2013).
26. Kato, T., Sato, M., Noda, M. & Itoh, T. Synthesis of methylpyridine derivatives. XXXIV. Condensation of acetoacetamide with ketones to form pyridone derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 2244–2247 (1980).
27. Lyle, M. P. A., Narine, A. A. & Wilson, P. D. A new class of chiral P, N-ligands and their application in palladium-catalyzed asymmetric allylic substitution reactions. *J. Org. Chem.* **69**, 5060–5064 (2004).
28. Brodney, M. A. & Padwa, A. Electrophilic aromatic substitution on pyridine rings. Intramolecular cyclization using N-acyliminium ions. *Tetrahedron Lett.* **38**, 6153–6156 (1997).
29. Saber, M. M. *et al.* Targeting colorectal cancer cell metabolism through development of cisplatin and metformin nano-cubosomes. *BMC Cancer* **18**, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4727-5> (2018).
30. Jia, P. *et al.* The role of reactive oxygen species in tumor treatment. *RSC Adv.* **10**, 7740–7750 (2020).
31. Alvino, E. *et al.* High-frequency microsatellite instability is associated with defective DNA mismatch repair in human melanoma. *J. Investig. Dermatol.* **118**, 79–86 (2002).
32. Murugan, S. & Amaravadi, R. K. Methods for studying autophagy within the tumor microenvironment. *Adv. Exp. Med. Biol.* **899**, 145–166 (2016).
33. Rashid, S. *et al.* MLH1 deficiency leads to deregulated mitochondrial metabolism. *Cell Death Dis.* **10**, 795. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2018-y> (2019).
34. Yan, T., Berry, S. E., Desai, A. B. & Kinsella, T. J. DNA mismatch repair (MMR) mediates 6-thioguanine genotoxicity by introducing single-strand breaks to signal a G2-M arrest in MMR-proficient RKO Cells 1. *Clin. Cancer Res.* **9**, 2327–2334 (2003).
35. Vilar, E. *et al.* Microsatellite instability due to hMLH1 deficiency is associated with increased cytotoxicity to irinotecan in human colorectal cancer cell lines. *Br. J. Cancer* **99**, 1607–1612 (2008).
36. Kim, S. J., Kim, H. S. & Seo, Y. R. Understanding of ROS-inducing strategy in anticancer therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* <https://doi.org/10.1155/2019/5381692> (2019).
37. Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S. R. & Yan, G. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques* **23**, 525–531 (1997).
38. Lin, Y.-C. *et al.* Acridine orange exhibits photodamage in human bladder cancer cells under blue light exposure. *Sci. Rep.* **7**, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13904-0> (2017).
39. Parzych, K. R. & Klionsky, D. J. An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 460–473 (2014).
40. Xu, Y., Cao, X., Zhang, S., Zhang, Y. & Shen, Z. High expression of LAMP1 as a prognostic marker in patients with epithelial ovarian cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **10**, 9104–9111 (2017).
41. Paquette, M., El-Houjeiri, L. & Pause, A. mTOR pathways in cancer and autophagy. *Cancers* **10**, 18. <https://doi.org/10.3390/cancers10010018> (2018).
42. Kim, Y. C. & Guan, K.-L. mTOR: A pharmacologic target for autophagy regulation. *J. Clin. Invest.* **125**, 25–32 (2015).
43. Shamloo, B. & Usluer, S. p21 in cancer research. *Cancers* **11**, 1178. <https://doi.org/10.3390/cancers11081178> (2019).
44. Hnit, S. S. T. *et al.* p27(Kip1) signaling: Transcriptional and post-translational regulation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **68**, 9–14 (2015).
45. Zhang, Y. *et al.* DNA Damage-Regulated Autophagy Modulator 1 (DRAM1) mediates autophagy and apoptosis of intestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* **66**, 3375–3390 (2021).
46. Sánchez-Álvarez, M., Strippoli, R., Donadelli, M., Bazhin, A. V. & Cordani, M. Sestrins as a therapeutic bridge between ROS and autophagy in cancer. *Cancers* **11**, 1415. <https://doi.org/10.3390/cancers1101415> (2019).
47. Porter, J. R. *et al.* Global inhibition with specific activation: How p53 and MYC redistribute the transcriptome in the DNA double-strand break response. *Mol. Cell* **67**, 1013–1025.e9 (2017).
48. Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., Vellayappan, B. A. & Jeyasekharan, A. D. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol.* **25**, 101084. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084> (2019).
49. Valenta, T., Hausmann, G. & Basler, K. The many faces and functions of β -catenin. *EMBO J.* **31**, 2714–2736 (2012).
50. Shang, S., Hua, F. & Hu, Z. W. The regulation of β -catenin activity and function in cancer: Therapeutic opportunities. *Oncotarget* **8**, 33972–33989 (2017).
51. Nakamoto, K., Kuratsu, J. I. & Ozawa, M. Beta-catenin cleavage in non-apoptotic cells with reduced cell adhesion activity. *Int. J. Mol. Med.* **15**, 973–979 (2005).
52. Del Maschio, A. *et al.* Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *J. Cell Biol.* **135**, 497–510 (1996).
53. Allport, J. R., Ding, H., Collins, T., Gerritsen, M. E. & Luscinskas, F. W. Endothelial-dependent mechanisms regulate leukocyte transmigration: A process involving the proteasome and disruption of the vascular endothelial-cadherin complex at endothelial cell-to-cell junctions. *J. Exp. Med.* **186**, 517–527 (1997).
54. Tetsu, O. & McCormick, F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**, 422–426 (1999).
55. Strouhalova, K. *et al.* Vimentin intermediate filaments as potential target for cancer treatment. *Cancers* **12**, 184. <https://doi.org/10.3390/cancers12010184> (2020).
56. Janiszewska, M., Primi, M. C. & Izard, T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *J. Biol. Chem.* **295**, 2495–2505 (2020).
57. Tahtamouni, L., Ahram, M., Koblinski, J. & Rolfo, C. Molecular regulation of cancer cell migration, invasion, and metastasis. *Anal. Cell. Pathol.* <https://doi.org/10.1155/2019/1356508> (2019).

58. Pretzsch, E. *et al.* Mechanisms of metastasis in colorectal cancer and metastatic organotropism: Hematogenous versus peritoneal spread. *J. Oncol.* <https://doi.org/10.1155/2019/7407190> (2019).
59. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
60. Van der Jeught, K., Xu, H. C., Li, Y. J., Lu, X. B. & Ji, G. Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **24**, 3834–3848 (2018).
61. Evrard, C., Tachon, G., Randrian, V., Karayan-Tapon, L. & Tougeron, D. Microsatellite instability: Diagnosis, heterogeneity, discordance, and clinical impact in colorectal cancer. *Cancers* **11**, 1567. <https://doi.org/10.3390/cancers11101567> (2019).
62. Simons, C. C. J. M. *et al.* A novel classification of colorectal tumors based on microsatellite instability, the CpG island methylator phenotype and chromosomal instability: Implications for prognosis. *Ann. Oncol.* **24**, 2048–2056 (2013).
63. Bardhan, K. & Liu, K. Epigenetics and Colorectal Cancer Pathogenesis. *Cancers (Basel)*. **5**, 676 (2013).
64. Alzahrani, A. S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: at the bench and bedside. In *Semin. Cancer Biol.* Vol. 59, <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.009> (2019).
65. Narayanankutty, A. PI3K/ Akt/ mTOR pathway as a therapeutic target for colorectal cancer: A review of preclinical and clinical evidence. *Curr. Drug Targets* **20**, 1217–1226 (2019).
66. Mateo, J. *et al.* A first-time-in-human study of GSK2636771, a phosphoinositide 3 kinase beta-selective inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* **23**, 5981–5992 (2017).
67. Yu, Y., Yu, X. F., Ma, J., Tong, Y. & Yao, J. Effects of NVP-BEZ235 on the proliferation, migration, apoptosis and autophagy in HT-29 human colorectal adenocarcinoma cells. *Int. J. Oncol.* **49**, 285–293 (2016).
68. Hussain, A. *et al.* A novel PI3K axis selective molecule exhibits potent tumor inhibition in colorectal carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* **55**, 2135–2155 (2016).
69. Kumari, S., Badana, A. K. & Malla, R. Reactive oxygen species: A key constituent in cancer survival. *Biomark. Insights* **13**, 1177271918755391 (2018).
70. Liou, G. Y. & Storz, P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.* **44**, 479–496 (2010).
71. Hasan, A. *et al.* Crosstalk between ROS and autophagy in tumorigenesis: Understanding the multifaceted paradox. *Front. Oncol.* **12**, 829 (2022).
72. Poillet-Perez, L., Despouy, G., Delage-Mourroux, R. & Boyer-Guittaut, M. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biol.* **4**, 184–192 (2015).
73. Dossou, A. S. & Basu, A. The emerging roles of mTORC1 in macromanaging autophagy. *Cancers* **11**, 1422. <https://doi.org/10.3390/cancers11101422> (2019).
74. Park, J. Y. *et al.* Inhibition of the PI3K-AKT-mTOR pathway suppresses the adipocyte-mediated proliferation and migration of breast cancer cells. *J. Cancer* **11**, 2552–2559 (2020).
75. Joechle, K. *et al.* Dual inhibition of mTORC1/2 reduces migration of cholangiocarcinoma cells by regulation of matrixmetalloproteinases. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 3826 (2022).
76. Mickymaray, S. *et al.* Rhaponticin suppresses osteosarcoma through the inhibition of PI3K-Akt-mTOR pathway. *Saudi J. Biol. Sci.* **28**, 3641–3649 (2021).
77. Cosconati, S. *et al.* Virtual screening with AutoDock: Theory and practice. *Expert Opin. Drug Discov.* **5**, 597–607 (2010).

Author contributions

M.R. conducted the experiments of compounds synthesis, analyzed data, wrote manuscript; N.M. and M.O. conducted the experiments of biological evaluation, analyzed data, wrote manuscript; M.W. wrote manuscript; S.M. conceived the experiments, analyzed data, wrote manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13867-x>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022



Dodatek B





OPEN

Tetrahydroquinolinone derivatives exert antiproliferative effect on lung cancer cells through apoptosis induction

Małgorzata Ryczkowska^{1,3}, Natalia Maciejewska^{2,3}, Mateusz Olszewski², Milena Witkowska¹ & Sławomir Makowiec^{1✉}

The anticancer properties of quinolones is a topic of interest among researchers in the scientific world. Because these compounds do not cause side effects, unlike the commonly used cytostatics, they are considered a promising source of new anticancer drugs. In this work, we designed a brief synthetic pathway and obtained a series of novel 8-phenyltetrahydroquinolinone derivatives functionalized with benzyl-type moieties at position 3. The compounds were synthesized via classical reactions such as nucleophilic substitution, solvent lysis, and condensation. Biological evaluation revealed that 3-(1-naphthylmethyl)-4-phenyl-5,6,7,8-tetrahydro-1H-quinolin-2-one (4a) exhibited potent cytotoxicity toward colon (HTC-116) and lung (A549) cancer cell lines. Analysis of the mechanism of action of compounds showed that compound 4a induced cell cycle arrest at the G₂/M phase, leading to apoptotic cell death via intrinsic and extrinsic pathways. Taken together, the findings of the study suggest that tetrahydroquinolinone derivatives bearing a carbonyl group at position 2 could be potential lead compounds to develop anticancer agents for the treatment of lung cancers.

Apoptosis or programmed cell death is a basic physiological process that plays a key role in the maintenance of tissue homeostasis. It is genetically regulated as a normal physiological response to many stimuli and is associated with other processes such as aging and embryogenesis. Disorders in apoptosis mechanisms can lead to various diseases, such as cancers. The disability of cancerous cells to keep up the balance between proliferation and death results in the development of abnormal tissue and formation of solid tumors^{1,2}. Apoptosis is a double-track mechanism that occurs via extrinsic and intrinsic pathways. The extrinsic pathway involves transmembrane death receptor-mediated interactions, whereas the intrinsic pathway is mediated by mitochondria and starts with the binding of BAX/BAK protein to the mitochondrial membrane leading to the release of cytochrome c³. Both pathways converge at the same point—caspases-regulated execution. The majority of cytostatic drugs used in anticancer therapy cause burdensome side effects in patients; therefore, there is a constant search for novel chemical compounds that are safe. Quinolones are a family of compounds characterized by antibacterial properties. However, research indicates that some of them exhibit potential anticancer properties, especially apoptosis activation. It has been proven that ciprofloxacin, which is the most active fluoroquinolone, can activate apoptosis in breast, bladder, and prostate cancers, colorectal carcinoma, and melanoma. At the molecular level, this chemotherapeutic causes an adverse increase in the concentration of BAX protein which results in differences in the BAX:BCL-2 ratio. It also enhances the expression of p53 protein and activation of caspases^{4–8}. Another fluoroquinolone, enoxacin, also works by activating apoptosis. It has been shown that programmed cell death is induced in prostate cancer by a significant increase in CASP3 mRNA and cleaved PARP expression as well as mitochondrial depolarization⁹. Levofloxacin, which is also a fluoroquinolone, induces apoptosis in breast and lung cancer through a caspase-dependent pathway and mitochondrial dysfunction¹⁰. Obviously, several well-known chemotherapeutic agents from the quinolone family display anticancer properties¹¹. One of the newer quinolones, voreloxin, which is currently in clinical trials for the treatment of acute myeloid leukemia, shows a high affinity to eukaryotic type II topoisomerase and induces apoptosis through double-strand DNA breaks. Because the stable quinolone core is characterized by a favorable toxicity profile, voreloxin does not generate

¹Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Gdansk University of Technology, Narutowicza 11/12, 80-233 Gdansk, Poland. ²Department of Pharmaceutical Technology and Biochemistry, Faculty of Chemistry, Gdansk University of Technology, Narutowicza 11/12, 80-233 Gdansk, Poland. ³These authors contributed equally: Małgorzata Ryczkowska and Natalia Maciejewska. ✉email: mak@pg.edu.pl

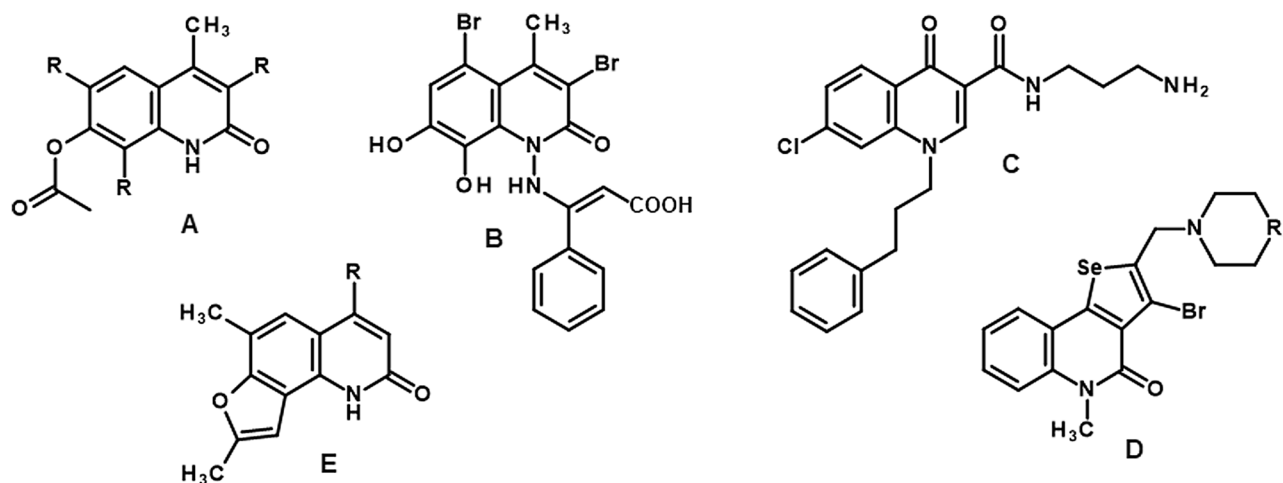


Figure 1. Examples of modified quinolinone cores that induced apoptosis in various cancer cells.

reactive oxygen species and free radicals unlike the widely used anthracyclines. Hence, this compound is much less harmful to the off-target tissues compared to the commonly used chemotherapeutic drugs^{12,13}.

Over the past few years, researchers have proposed several interesting short synthesis pathways for the formation of various quinolinone cores. A.M.Y. Moustafa and S.B. Bakare described the synthesis of new 7-hydroxy quinolinone derivatives based on parent 7-hydroxy-4-methyl-2-oxo-1-amino quinolone. A series of new chemical compounds containing different substituents at positions 3–8 were assessed for their biological activity against breast cancer. It was observed that the most active compound **A** (Fig. 1) increased the level of active caspase-3, leading to the induction of apoptosis via mitochondrial pathway¹⁴. An interesting study demonstrated the synthesis of hybrid molecules containing cinnamic acid and 1-amino-4-methyl-2-quinolinone derivatives. The final products were synthesized via pyrogallol and ethyl acetoacetate condensation, resulting in the formation of 7,8-dihydroxy-4-methyl-coumarin which was then treated with hydrazine in pyridine to obtain a desirable 2-quinolinone core. Biological studies showed that compound **B**, which was qualified for further assessment, caused an increase in apoptotic cell fraction in the HCT-116 cell line¹⁵. Zhou P. et al. also proposed a few-step synthetic pathway for novel 4(1H)-quinoline derivatives based on the lead compound 7-chloro-4(1H)-quinolone characterized by poor solubility. In this study, five novel, functionalized chemical compounds were obtained via a previously described procedure to improve the solubility of final products. All these compounds exhibited antitumor activity; however, structure **C** also displayed proapoptotic properties and increased the level of Bak protein, inducing cell cycle arrest at the G2/M phase via a p53-dependent pathway in the HepG2 cell line¹⁶. Another study described the brief synthesis of ring-fused quinolinones. P. Arsenyan et al. proposed simple methods for the synthesis of substituted selenopheno[2,3-*c*] and selenopheno[3,2-*c*] quinolinones **D**¹⁷. Biological evaluation of compounds showed that these derivatives induced apoptosis via an intrinsic pathway in human breast adenocarcinoma, estrogen-positive (MCF-7) tumor cell line¹⁸. A. Chilin et al. reported a novel, more convenient pathway for synthesizing 1,6,8-trimethylfuro[2,3-*h*]quinolin-2-one derivatives **E**, which induced programmed cell death through mitochondrial depolarization. The synthesized compounds exerted a cytotoxic effect in Jurkat cells in the dark, which was dependent on ADH-catalyzed oxidation¹⁹. Finally, new tetrahydroquinoline derivatives synthesized in our previous work demonstrated potent anticancer activity on human colon cancer cells (HTC-116) and nonsmall cell lung cancer cells (A549). The literature review and experience derived from this project inspired us to propose and evaluate a short synthetic route for the synthesis of new tetrahydroquinoline derivatives modified with benzyl-type substituents at position 3²⁰.

Chemistry. *Synthesis of tetrahydroquinoline derivatives modified at position 3.* We synthesized the new tetrahydroquinoline derivatives through the following three-step pathway (Fig. 2a). The starting compound was ethyl benzoylacetate (**1**). In the first step, ethyl benzoylacetate and a variety of benzyl-type halides were subjected to the S_N2 reaction. The reaction was carried out in dimethylformamide (DMF) in the presence of K_2CO_3 . Then, the resulting benzyl-type derivatives of ethyl benzoylacetate (**2a–e**) were subjected to ammonolysis in 24% ammonia water solution. The corresponding benzoylpropanamides (**3a–e**) were condensed with cyclohexanone in the presence of TsOH and anhydrous $MgSO_4$ to obtain desirable tetrahydroquinolinones (**4a–e**) modified with benzyl-type substituents at position 3²¹. After biological evaluation, the most active 3-(1-naphthylmethyl)-4-phenyl-5,6,7,8-tetrahydro-1H-quinolin-2-one (**4a**) was converted into chlor²² and methoxy²³ derivatives (**5**, **6**) (Fig. 2b). It is worth mentioning that in some cases tautomers and rotamers were observed, which is described in the supplementary information.

Biology evaluation. *Compound 4a significantly inhibits the viability of human nonsmall cell lung cancer and colon cancer cells with minimal toxicity to nonmalignant human kidney cells.* All new tetrahydroquinoline derivatives were assessed for cytotoxicity on a broad panel of cancer and normal cell lines, using the MTT assay. The half-inhibitory growth inhibitory concentration (IC_{50}) values of each compound were calculated after 72 h

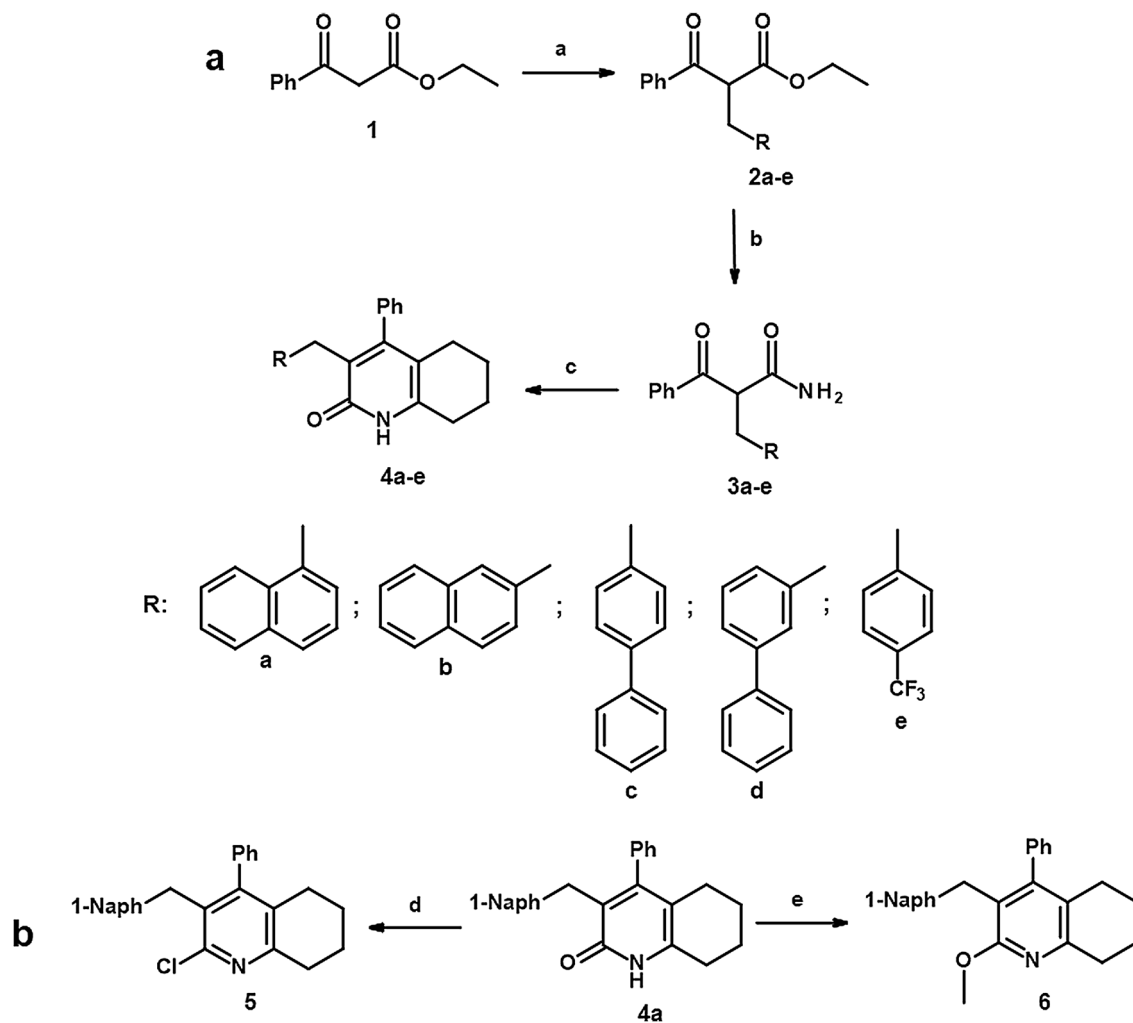


Figure 2. Synthetic pathways for the preparation of new tetrahydroquinolinone derivatives: (a) RCH_2X , K_2CO_3/DMF , $60\text{ }^\circ\text{C}$, 5 h; (b) 24% NH_3 aq, $50\text{ }^\circ\text{C}$, 24–72 h; (c) $TsOH$ /toluene, reflux, 12 h; (d) $PhP(O)Cl_2$, $160\text{ }^\circ\text{C}$, 16 h; (e) Ag_2CO_3 , $CH_3I/CHCl_3$, RT, 12 h.

Compound	Cell lines					
	HCT-116	A549	MCF-7	HepG2	Hela	HEK293
5	13.10 ± 0.96	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
4a	$12.18 \pm 1.61^{****}$	$11.33 \pm 0.67^{****}$	> 50	> 50	> 50	49.01 ± 2.21
6	15.61 ± 1.29	40.18 ± 0.94	> 50	> 50	50	> 50
4b	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
4c	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
4d	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
4e	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
5-FU	$5.78 \pm 0.38^{****}$	$8.12 \pm 1.01^{***}$	$8.41 \pm 0.98^{**}$	$13.12 \pm 0.32^*$	$11.09 \pm 1.53^*$	16.82 ± 0.34
ETP	0.39 ± 0.01^{ns}	0.54 ± 0.21^{ns}	0.83 ± 0.15^{ns}	5.01 ± 0.22^{ns}	3.40 ± 0.51^{ns}	1.91 ± 0.97

Table 1. Cytotoxic activity of tetrahydroquinoline derivatives against various cancer and normal cells presented as an IC_{50} value referring to the concentration that inhibits 50% of cell growth. Data are expressed as the mean \pm SD (μM) of $n = 3$ independent experiments. $****p < 0.00001$ in comparison to IC_{50} for HEK293 (Student's t-test).

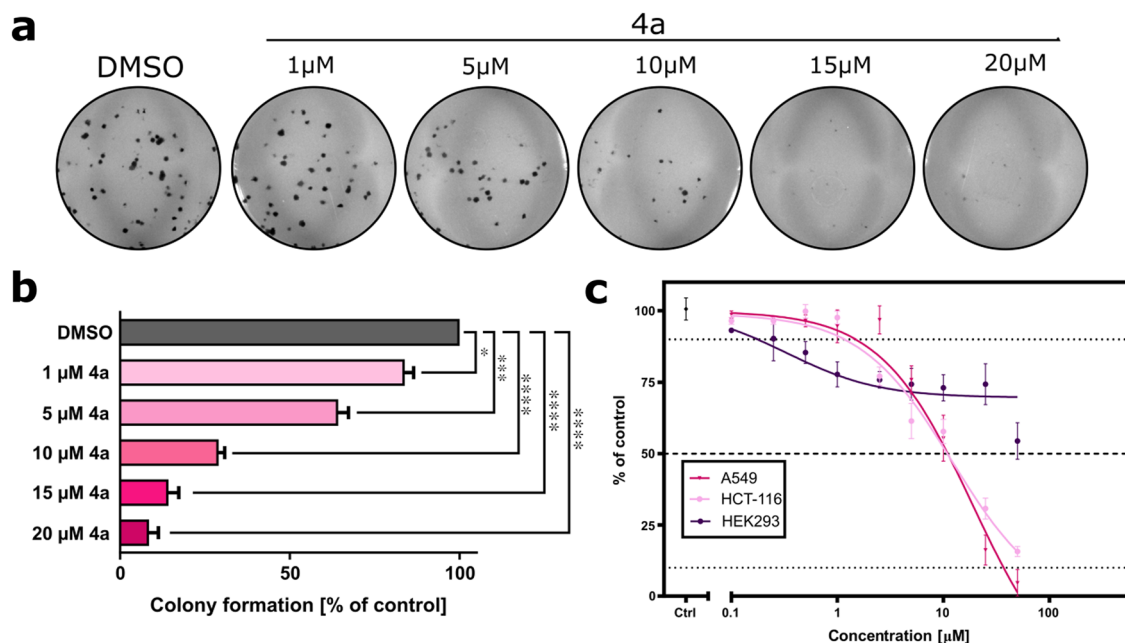


Figure 3. Effect of **4a** on colony formation and cell viability. (a) Representative photos of the colony formation assay after the treatment of A549 cells with increasing concentrations of **4a**. (b) Quantification of the colony formation assay. (c) Effect of **4a** on cell viability after incubation with compound for 72 h. Data represent the mean \pm SEM of $n=3$ independent experiments. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, and **** $p < 0.00001$.

of treatment and presented in Table 1. The results of the biological evaluation showed that compounds **4b**, **4c**, **4d** and **4e** did not have any effect on the tested cell lines in the range of 0–50 μM , whereas compounds **5**, **4a**, and **6** significantly decreased the viability of colon cancer cells (HCT-116) with an IC_{50} value of approximately 13 μM . Additionally, **4a** and **6** (A549) had an IC_{50} value of 11.33 ± 0.67 and 40.18 ± 0.94 μM , respectively, and exhibited almost no suppressive effect on human normal HEK293 kidney cells in tested concentrations compared to the effect of compounds on A549 and HCT-116 cells (Fig. 3). In this assay, the IC_{50} value of 5-FU and ETP was recorded as a positive control. Based on the observations, **4a** was recognized as the most potent, and was therefore chosen for further analysis of the mechanisms underlying the antiproliferative action.

Next, the effect of **4a** on the number of cell-forming clones was examined by the colony formation assay. As shown in Fig. 3, the number of observed colonies was found to be significantly decreased after treatment in comparison to the DMSO-treated control, and this effect was dose-dependent.

Compound 4a induces sub- G_1 -phase cell cycle arrest in A549 cells. The antiproliferative effect of **4a** was further assessed by examining the progression of the cell cycle (Fig. 4). The tested compound induced cell cycle arrest at the G_2 phase in A549 cells. The fraction of cells in this phase increased significantly from 3.2% (DMSO-treated cells) to 15.5% and 33.8% (cells treated with the compound for 24 and 48 h, respectively). The observed changes corresponded with a time-dependent decrease in the fraction of cells at the G_0/G_1 phase and a concomitant increase in the sub- G_0 phase.

Compound 4a induces caspase-dependent apoptosis in A549 cells. To further explain the mechanism by which **4a** induced cell death in cancer cells, a flow cytometric analysis was performed by dual-staining the cells with 7-aminoactinomycin D (7-AAD) and Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC). Annexin-V is a Ca^{2+} -dependent protein with potent affinity to phosphatidylserine²⁴. During early apoptosis, cells lose plasma membrane asymmetry through, for example, the externalization of phosphatidylserine. Once exposed to the outside of the cell surface, phosphatidylserine can be recognized by Annexin-V, and quantified²⁵. On the other hand, 7-AAD is a dye that cannot penetrate the intact cell membrane, and allows differentiating between necrotic and late apoptotic cells from living and early apoptotic cells. As shown in Fig. 5, exposure of A549 cells to **4a** at its IC_{50} concentration for 6 h caused a significant decrease in the percentage of surviving cells ($20.76 \pm 1.24\%$, $p = 0.0004$), with a simultaneous increase in the fraction of early-apoptotic cells [7-AAD (-), Annexin V-FITC (+); $14.03 \pm 1.74\%$, $p = 0.0078$] in comparison to DMSO-treated control cells (Fig. 5). Treatment with the tested compound for 24 h caused 3.9-fold augmentation in apoptosis [early: 7-AAD (-), Annexin V-FITC (+); late: 7-AAD (+), Annexin V-FITC (+)] in comparison to the vehicle. Further incubation of cells with **4a** for 48 h led to a significant increase in the percentage of apoptotic cells ($p < 0.0001$), while the level of the necrotic fraction was similar to that in control.

Compound 4a induces apoptosis via intrinsic and extrinsic pathways. Apoptosis induction via both intrinsic and extrinsic pathways is mediated by caspase cascade events²⁶. Therefore, in this study, the ability of **4a** to activate

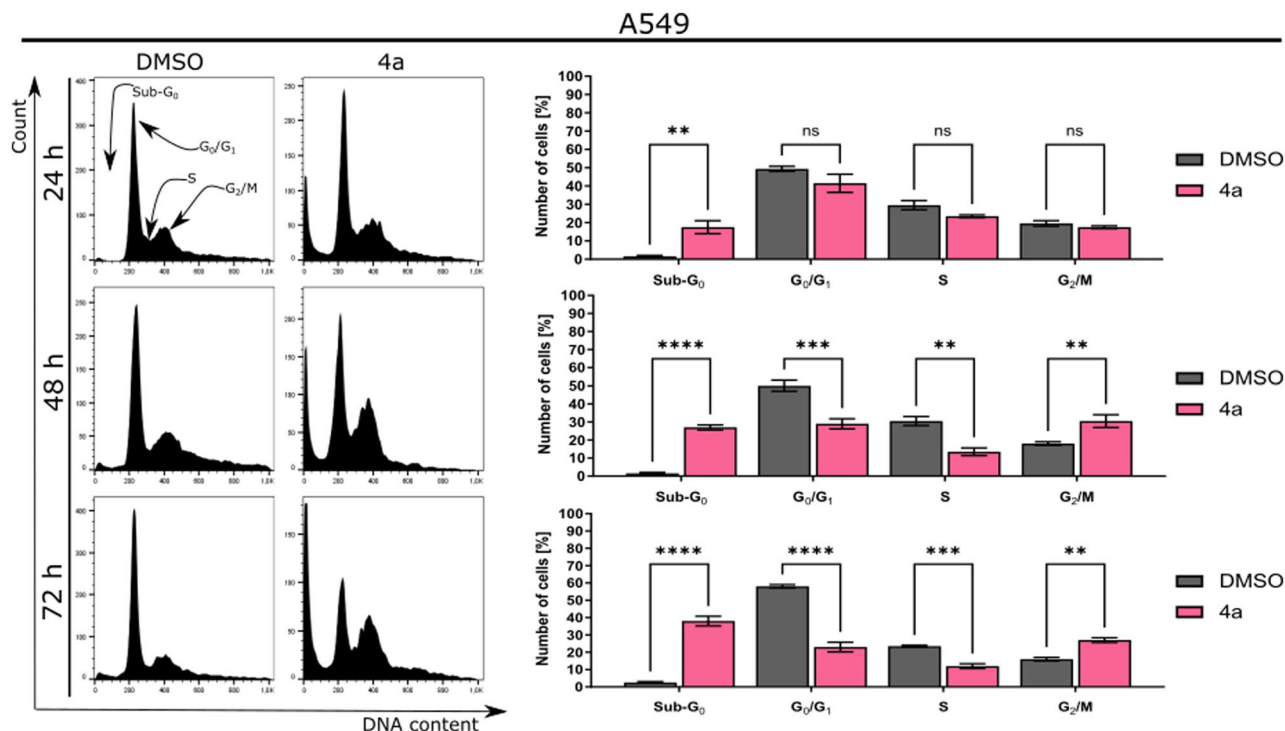


Figure 4. Analysis of cell cycle distribution after treatment of A549 cells with **4a**. Data represent the mean \pm SEM of $n=3$ independent experiments. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, and **** $p < 0.00001$.

two effector caspases (caspase-3 and caspase-7) was evaluated by flow cytometry. As shown in Fig. 5, after 6 h of exposure to this compound, a slight increase (2.32 ± 0.05 -fold) in the activity of caspase-3/7 was observed in A549-treated cells. After 24 and 48 h of incubation, remarkable activation of caspase-3/7 (3.9 ± 0.33 -fold, $p=0.04$) was observed in comparison to the vehicle.

Furthermore, the expression of several apoptosis-related proteins was measured by Western blotting. As shown in Fig. 6, treatment of A549 cells with **4a** resulted in time-dependent modulation of expression of all investigated proteins. The expression of BCL-2 protein was significantly decreased, while the expression of BID was slightly activated and that of BAD and BAX protein was higher than that in the control group. Treatment with **4a** also led to the disappearance of the band corresponding to intact PARP-1 resulting in its proteolytic cleavage and the formation of an 85-kDa fragment. In addition, all the examined caspases (caspase-3, caspase-8, and caspase-9) were cleaved into their corresponding catalytically active forms. Expression of AIF remained unchanged in comparison to DMSO-treated control, which confirmed that treatment with **4a** induced caspase-dependent cell death²⁷.

Structure–activity relationship (SAR). During our work, we noticed that the IC_{50} values of presented compounds determined for HCT-116 and A549 strongly suggested that the (1-naphthyl)methyl moiety present at position 3 was crucial for the anticancer activity of the synthesized tetrahydroquinolinone derivatives (Fig. 7). Among the synthesized compounds, the best result was achieved for compound **4a** with the amide group. Modifications of compounds at position 2 with a chlorine atom or methoxy group increased their IC_{50} values. Therefore, alternatively, any other functionalization should be performed in the cyclohexyl ring or at position 4. The presented conclusions should be considered while designing subsequent derivatives from this subgroup.

Discussion

From the perspective of the latest published data, it is worth noticing that new small-molecule compounds from the 2- and 4-quinolones group, which are often structurally based on antibacterial fluoroquinolones manifest an attractive activity in many cancer cell lines. It's likely that compounds containing similar quinolone scaffold will exhibit activity towards the same cancer cell lines. For example derivatives with functionalised quinolone nitrogen proposed by A.M.Y. Moustafa & S.B. Bakare and Zhou P. et al. were active toward hepatocellular cell line, whereas our molecule with free NH was active against non-small lung cancer cells. From the chemical point of view reservoir of possible functionalizations of different quinolone cores, seems to be very wide. The synthesis of compounds presented by A.M.Y. Moustafa & S.B. Bakare or Zhou P. et al. is easy to perform and gives a rich spectrum of interesting derivatives. For this reason, it's encouraging and justified to use brief synthetic solutions more and more often. A very important aspect pointed out by Zhou P. et al. was related to new 7-chloro-4(1H)-quinolone derivatives. Due to the poor solubility of the initial compound in water which was probably responsible for its weak antiproliferative activity scientists paid attention to the ClogP value of each compound. The results show that the ClogP values of whole molecules could be a helpful factor in providing

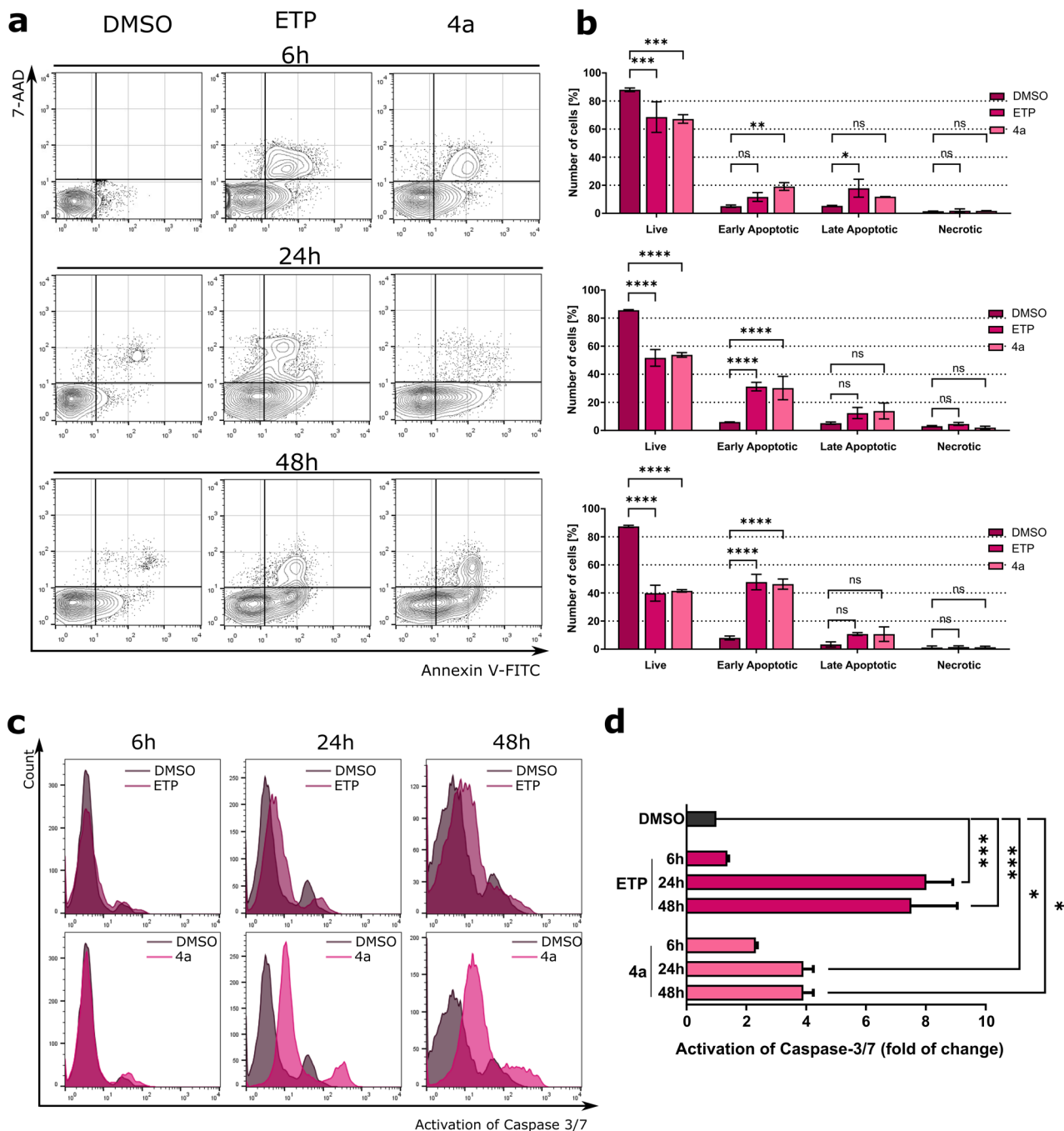


Figure 5. Detection of apoptosis by flow cytometry. **(a)** Representative dot plots after treatment of A549 cells with **4a**. **(b)** Quantitation of A549 cells after Annexin V-FITC/7-AAD staining. **(c)** Detection of caspase-3/7 activation in **4a**-treated A549 cells, presented as representative histograms. **(d)** Quantification of analysis from **(c)**. Data represent the mean \pm SEM of $n = 3$ independent experiments. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, and **** $p < 0.00001$.

the antiproliferative properties of compounds and we will consider that in the future. Interesting and nonobvious functionalization of 2-quinolinone was also proposed by A.M.Y. Moustafa & S.B. Bakare and A. H. Abu Almaaty et al. Both research groups decided to bromine 4-methylquinolin-2(1H)-one derivative which isn't a modification of the first choice. The introduction of halides into chemical structure increases the hydrophobicity of compounds which is usually an undesirable effect. Fortunately, researchers found an effective compromise between the potential reduction of solubility and still high biological activity of design compounds which led to obtaining IC_{50} values comparable to Doxorubicin and Staurosporine. That encourages us to further development of presented compounds by choosing less standard solutions. During our synthesis, the most problematic stage was a monolysis of benzyl-type derivatives of ethyl benzoylacetate which required a long reaction time and its yields were often unsatisfactory. That difficulty occurred most probably because of sterical hindrance

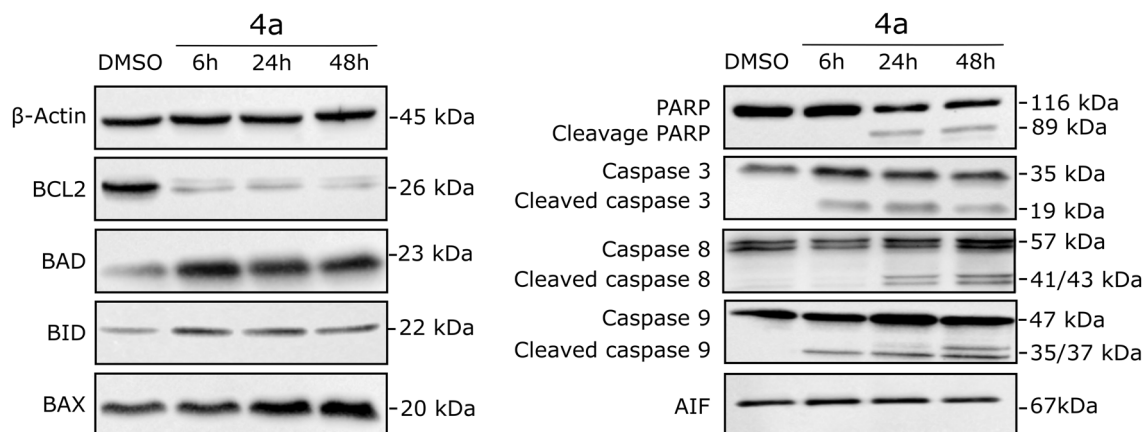


Figure 6. Western blotting analysis showing the effects of **4a** on the expression of apoptosis-related proteins in the A549 cell line. Full-length Western blots are presented in the supplementary information.

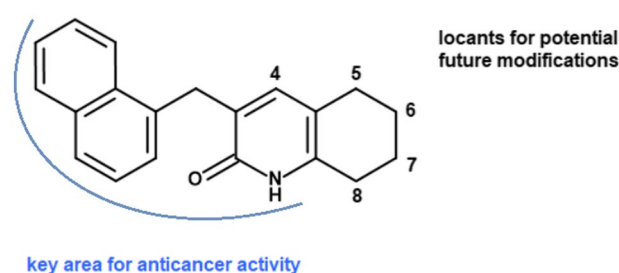


Figure 7. Conclusion of structure–activity relationship studies of the presented tetrahydroquinolinone derivatives.

and enolization of used compounds. Due to the fact that we're interested in this type of condensations, it is possible that in the near future we will propose some synthetic paths which will solve this problem. Over the last several years, there is an increasing need for anticancer drugs that can perturb the proliferation of tumor cells by inhibiting various stages of the cell cycle²⁸. In the present study, we examined the effect of compound **4a** on the progression of the cell cycle and observed that it arrested the cell cycle at the G₂/M phase in A549 cells, leading to cell apoptotic cell death. Antimitotic properties of quinoline-based compounds were also observed by others: e.g. Metwally et al. showed that pyrimido[4,5-c]quinoline-1(2H)-one ring skeleton exhibited high cytotoxicity towards fibrosarcoma HT-1080 cells inducing G₂/M arrest and apoptosis, whereas a Yang's group presented quinoline derivative MPT0B392 as a strong antimitotic agent against acute leukemia^{29,30}. Many studies reported that the antimitotic activity of quinolone results from their interaction with tubulin at the colchicine-binding site, disrupting microtubule organization; however, in the case of the **4a**, the exact mechanism of blocking the G₂/M cell cycle remains unresolved and will be subject of the future studies^{31–34}. Caspase-3 and caspase-7 are members of the cysteine-aspartic acid protease family, which play an important role in executing apoptotic death³⁵. Once activated, both these enzymes cleave multiple key structural and repair proteins. Compound **4a** stimulated the activation of both caspase-3 and caspase-7, which could have triggered the antiproliferative effect on A549 cells. Caspase activation in response to anticancer chemotherapy can occur via two major pathways: intrinsic pathway mediated by mitochondria, or extrinsic pathway mediated by receptors. The mitochondria-mediated pathway is initiated by the activation of proapoptotic BCL-2 effector molecules, such as BAX and BAK, which leads to the permeabilization of mitochondrial outer membrane and subsequently the release of cytochrome c from the mitochondrial intermembrane space to the cytosol. Once released, it binds to its partner, Apaf-1 protein, forming an apoptosome complex, which induces the activation of pro-caspase-9³⁶. The extrinsic pathway is activated by the stimulation of death receptors (e.g. Fas (CD95/APO-1)), TNF receptors (e.g. TNF/R1/p55/CD120), or TNF-related apoptosis-inducing ligand³⁷. Ligation of TNF-receptor family proteins results in the assembly of DISC, and the subsequent recruitment of caspase-8 which occurs through the interaction between the death effector domain of caspase 8 and the Fas-associated death domain. Then, caspase 8 is oligomerized and activated by self-cleavage, after which it initiates downstream apoptotic events, including the activation of effector caspases such as caspase-3³⁸.

The results of Western blotting indicated that exposure of A549 cells to **4a** diminished the expression of the antiapoptotic protein BCL-2, while enhancing the expression of the proapoptotic protein BAX, in comparison to the control group. Moreover, the BAX:BCL-2 ratio was significantly increased, which suggests the permeabilization of the mitochondrial outer membrane³⁹. The level of the proapoptotic molecule BAD was also elevated

upon treatment with **4a**. Huang et al. reported that the loss of BAD expression may indicate a poor prognosis in patients with nonsmall cell lung cancer, due to increased resistance to the treatment⁴⁰. Therefore, high BAD expression may be considered to suppress tumorigenesis. In this study, together, with the modulating members of the BCL-2 family, treatment with **4a** led to the cleavage of procaspase-9, promoting mitochondria-mediated apoptosis. However, the levels of cleaved caspase-8, which is the initiator caspase of the extrinsic apoptotic pathway, were also increased in the treated cells in comparison to the control cells⁴¹. Additionally, exposure to **4a** induced proteolytic cleavage of PARP-1, which catalyzes the transfer of ADP-ribose polymers onto itself and the proteins activated in response to double-strand DNA breaks. It should be mentioned that cleavage of PARP-1, which is initiated by caspase-3 and caspase-7, is known as a hallmark of apoptosis⁴².

Activation of both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways by quinolinone was also reported by Janecka's group, which showed that 2-ethyl-3-methyliden-1-tosyl-2,3-dihydroquinolin-4-(1H)-one exhibited cytotoxic activity by down-regulation MAPK pathway in myeloid leukemia HL-60 cell line⁴³. On the other hand, Beretta et al. revealed that cytotoxic properties of quinoline-pyrrolidine gamma-lactam alkaloid towards prostate cancer cells result from activation of transmembrane receptor-mediated interactions⁴⁴; whereas Chiu et al. showed that quinoline derivative BPIQ induced mitochondrial apoptosis in lung cancer models⁴⁵. Potent anticancer activities of quinolones have been found against various cancer cell lines and targets, including topoisomerase, protein tyrosine kinases, histone deacetylase, and many others⁴⁶. Interestingly, inhibition of all mentioned targets may trigger G₂/M cell cycle arrest and apoptotic cell death, similar to **4a**. In conclusion, the newly synthesized tetrahydroquinolinone derivatives containing (1-naphthyl)methyl moiety at position 3 reduced the activity of non-small cell lung cancer cells in a time-dependent manner. Among them, compound **4a** inhibited colony formation and proliferation of A549 cells. Further analysis of this compound revealed that it induced apoptosis through both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. These findings may be valuable for the future development of anticancer agents based on tetrahydroquinolinone derivatives.

Methods

Cell cultivation. Non-small cell lung cancer cells A549 (CCL-185), breast cancer cells MCF-7 (HB-8065), hepatocarcinoma cells HepG2 (HB-8065), normal kidney cells HEK293 (CRL-1573), and osteosarcoma cells U-2 OS (HTB-96) were obtained from the American Type Culture Collection. HCT-116 cell line was kindly provided by prof. Bert Vogelstein (Johns Hopkins University, Howard Hughes Medical Institute, USA). The obtained A549 and MCF-7 cells were cultured in RPMI-1640 medium, HepG2 cells in Minimum Essential Medium Eagle medium, HEK-293 cells in Dulbecco's Modified Eagle's medium, and U-2 OS and HCT-116 cells in McCoy's **4a** medium. All culture media were supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, and antibiotics (penicillin 62.6 µg/ml and streptomycin 40 µg/ml; Sigma-Aldrich). Both cancer and normal cells were cultured at 37 °C under a humidified atmosphere with 5% or 10% CO₂ and routinely screened for *Mycoplasma* contamination. All materials and reagents were obtained from Corning unless stated otherwise.

Cell viability assay. The cytotoxic effect of the synthesized compounds was assessed by the MTT (4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazoliumbromide; Sigma-Aldrich) assay. Briefly, the cells were seeded into 96-well transparent flat-bottom plates and allowed to attach overnight. On the next day, the cells were treated with compounds in the range of 0–50 µM for 72 h. Dimethyl sulfoxide (DMSO; Merck) and 5-fluorouracil (5-FU; Sigma-Aldrich) were used as a reference. After exposure to the compounds, 20 µl of the MTT solution at a concentration of 4 mg/ml was added to each well, and the plates were incubated again for 2–3 h at 37 °C. Next, the media in the wells was replaced with 100 µl DMSO to solubilize the formazan crystals. The absorbance was measured at 540 nm using an ASYS UVM340 microplate reader (Biochrom Ltd.). The IC₅₀ value of the compounds was calculated using GraphPad Prism 9 software, based on the curves plotted with survival as a function of dose, averaged from three independent experiments.

Colony formation assay. HCT-116 and A549 cells were seeded into six-well plates at a density of 500 cells per well and allowed to attach overnight. On the next day, the cells were pretreated with compound **4a** at different concentrations or with 1% v/v DMSO for 24 h. After incubation, the cells were washed and cultured for 9 days. Next, the cells were fixed with methanol for 20 min and stained with 0.5% crystal violet (Sigma-Aldrich). Finally, the plates were dried overnight and imaged using a UVITEC Cambridge imaging system. Quantification was performed with ImageJ software. The surviving fraction was calculated as previously described⁴⁷. Each experiment was repeated three times.

Cell cycle progression. A549 and HCT-116 cells were incubated with the tested compounds at their IC₅₀ concentrations for 24, 48, and 72 h. DMSO (1% v/v) was used as a reference (Sigma-Aldrich). After incubation, the cells were collected in trypsin, fixed with 75% ice-cold ethanol, and stored overnight at –20 °C. Then, the cells were stained with 20 µg/ml propidium iodide (Sigma-Aldrich) and 50 µg/ml RNaseA (Thermo Fisher Scientific) in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min at room temperature (RT). The content of DNA in cells was determined by flow cytometry (Guava EasyCyte 8 cell sorter; Merck Millipore) using FlowJo software v10. Each experiment was repeated three times.

Apoptosis and caspase-3/7 assay. Cells were seeded in a 5-cm² dish at a density of 15 × 10⁵ cells per dish and allowed to attach overnight at 37 °C. Then, compounds at IC₅₀ concentrations were added to the medium. After 6, 24, and 48 h, the cells were harvested and washed with PBS. Subsequently, the cells were resuspended in the binding buffer and stained with Annexin V Alexa Fluor™ 488 conjugate (#A13201; Thermo Fisher Scientific) for the apoptosis assay and with CellEvent™ Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit (#C10427; Thermo

Fisher Scientific) for the activation of caspase-3/7, as per the manufacturer's instructions. After incubation, the samples were immediately analyzed using a Guava EasyCyte 8 cell sorter (Merck Millipore) and FlowJo software v10. Each experiment was repeated three times.

Western blotting. The expression of apoptosis-related proteins was determined by Western blotting. Briefly, A549 cells were treated with compound **4a** at its IC₅₀ concentration for 6, 24, and 48 h. The cells treated with 1% v/v DMSO served as the negative control. The total protein content was extracted from the cells using the NP-40 cell lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.5% Nonidet P-40, cComplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail). Then, 30 µg of protein extract was separated by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and the separated proteins were transferred to microporous polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad). The membranes were blocked with 5% bovine serum albumin in tris-buffered saline-Tween 20 (TBST) buffer (0.2 M Tris-base, 0.137 M NaCl, 0.1% Tween 20) for 1 h at RT, and incubated overnight with primary antibodies at 4 °C. The blots were washed three times with TBST and incubated with appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 h at RT. Then, the blots were washed in TBST for 30 min and developed using an enhanced chemiluminescence detection reagent kit (Thermo Fisher Scientific) and a ChemiDoc XRS + Imaging System (Bio-Rad). All materials and reagents were obtained from Sigma-Aldrich unless stated otherwise. The antibodies used in Western blotting are listed in Table S1.

Statistical analyses. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9 software. Data were obtained from at least three independent experiments and are presented as mean ± SEM. Statistical significance was calculated in comparison to the DMSO-treated control (1% v/v) using one-way ANOVA (post hoc Dunnett's test) unless stated otherwise.

Data availability

The datasets presented in the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 15 June 2022; Accepted: 2 November 2022

Published online: 09 November 2022

References

1. Renhan, A. G., Booth, C. & Potten, C. S. What is apoptosis, and why is it important?. *BMJ* **322**, 1536–1538 (2001).
2. Sjöström, J. & Bergh, J. How apoptosis is regulated, and what goes wrong in cancer. *BMJ* **322**, 1538–1539 (2001).
3. Jan, R. & Chaudhry, G. Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Adv. Pharm. Bull.* **9**, 205–218 (2019).
4. Beberok, A. *et al.* Ciprofloxacin triggers the apoptosis of human triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells via the p53/Bax/BCL-2 signaling pathway. *Int. J. Oncol.* **52**, 1727–1737 (2018).
5. Beberok, A. *et al.* Ciprofloxacin-mediated induction of S-phase cell cycle arrest and apoptosis in COLO829 melanoma cells. *Pharmacol. Rep.* **70**, 6–13 (2018).
6. Aranha, O. *et al.* Suppression of human prostate cancer cell growth by ciprofloxacin is associated with cell cycle arrest and apoptosis. *Int. J. Oncol.* **22**, 787–794 (2003).
7. Aranha, O., Wood, D. P. Jr. & Sarkar, F. H. Ciprofloxacin mediated cell growth inhibition, S/G2-M cell cycle arrest, and apoptosis in a human transitional cell carcinoma of the bladder cell line. *Clin. Cancer Res.* **6**, 891–900 (2000).
8. Herold, C. *et al.* Ciprofloxacin induces apoptosis and inhibits proliferation of human colorectal carcinoma cells. *Br. J. Cancer* **86**, 443–448 (2002).
9. Sousa, E. J. *et al.* Enoxacin inhibits growth of prostate cancer cells and effectively restores microRNA processing. *Epigenetics* **8**, 548–558 (2013).
10. Song, M. *et al.* Antibiotic drug levofloxacin inhibits proliferation and induces apoptosis of lung cancer cells through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Biomed. Pharmacother.* **84**, 1137–1143 (2016).
11. Yadev, V. & Talwar, P. Repositioning of fluoroquinolones from antibiotic to anti-cancer agents: An underestimated truth. *Biomed. Pharmacother.* **111**, 934–946 (2019).
12. Hawtin, R. E. *et al.* Voreloxin is an anticancer quinolone derivative that intercalates DNA and poisons topoisomerase II. *PLoS ONE* **5**, e10186. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010186> (2010).
13. Jamieson, G. C., Fox, J. A., Poi, M. & Strickland, S. A. Molecular and pharmacologic properties of the anticancer quinolone derivative vosaroxin: A new therapeutic agent for acute myeloid leukemia. *Drugs* **76**, 1245–1255 (2016).
14. Moustafa, A. M. Y. & Bakare, S. B. Synthesis of some hybrid 7-hydroxy quinolinone derivatives as anti breast cancer drugs. *Res. Chem. Intermed.* **45**, 3895–3912 (2019).
15. Abu Almaaty, A. H. *et al.* Design, synthesis and anticancer evaluation of substituted cinnamic acid bearing 2-quinolone hybrid derivatives. *Molecules* **26**, 4724–4738 (2021).
16. Zhou, P. *et al.* Discovery of novel 4(1H)-quinolone derivatives as potential antiproliferative and apoptosis inducing agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**, 4185–4189 (2017).
17. Arsenyan, P., Vasiljeva, J., Shestakova, I., Domracheva, I. & Belyakov, S. The synthesis and cytotoxic properties of selenopheno[3,2-c]- and selenopheno-[2,3-c]quinolones. *Chem. Heterocycl. Compd.* **49**, 1674–1680 (2014).
18. Domracheva, I., Kanep-Lapsa, I., Jackvica, L., Vasiljeva, J. & Arsenyan, P. Selenopheno quinolinones and coumarins promote cancer cell apoptosis by ROS depletion and caspase-7 activation. *Life Sci.* **186**, 92–101 (2017).
19. Chilin, A. *et al.* 4-Hydroxymethyl-1,6,8-trimethylfuro[2,3-h]quinolin-2(1H)-one induces mitochondrial dysfunction and apoptosis upon its intracellular oxidation. *J. Med. Chem.* **48**, 192–199 (2005).
20. Ryczkowska, M., Maciejewska, N., Olszewski, M., Witkowska, M. & Makowiec, S. New tetrahydroquinoline derivatives with anticancer activity: Design, synthesis, and biological evaluation. *Sci. Rep.* **12**, 9985. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13867-x> (2022).
21. Huilai, Y., Jie, M. & Xuexi, S. A method of preparing of blonanserin, CN 104447551 (2015).
22. Lyle, M. P. A., Narine, A. A. & Wilson, P. D. A new class of chiral P, N-ligands and their application in palladium-catalyzed asymmetric allylic substitution reactions. *J. Org. Chem.* **69**, 5060–5064 (2004).
23. Brodney, M. A. & Padwa, A. Electrophilic aromatic substitution on pyridine rings. Intramolecular cyclization using N-acyliminium ions. *Tetrahedron. Lett.* **38**, 6153–6156 (1997).

24. Meers, P. & Mealy, T. Calcium-dependent annexin V binding to phospholipids: Stoichiometry, specificity, and the role of negative charge. *Biochemistry* **32**, 11711–11721 (1993).
25. Lee, S. H., Meng, X. W., Flatten, K. S., Loegering, D. A. & Kaufmann, S. H. Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm. *Cell. Death Differ.* **20**, 64–76 (2013).
26. Olsson, M. & Zhivotovsky, B. Caspases and cancer. *Cell Death Differ.* **18**, 1441–1449 (2011).
27. Sevrioukova, I. F. Apoptosis-inducing factor: Structure, function, and redox regulation. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 2545–2579. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3445> (2011).
28. Schwartz, G. K. & Shah, M. A. Targeting the cell cycle: A new approach to cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* **23**, 9408–9421 (2005).
29. Chao, M. W. *et al.* An oral quinoline derivative, MPT0B392, causes leukemic cells mitotic arrest and overcomes drug resistant cancer cells. *Oncotarget* **8**, 27772–27785. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15115> (2017).
30. Metwally, K., Khalil, A., Pratsinis, H. & Kletsas, D. Synthesis, in-vitro cytotoxicity, and a preliminary structure–activity relationship investigation of pyrimido[4,5-c]quinoline-1(2H)-ones. *Arch. Pharm. (Weinh.)* **343**, 465–472 (2010).
31. McLoughlin, E. C. & O’Boyle, N. M. Colchicine-binding site inhibitors from chemistry to clinic: A review. *Pharmaceuticals* **13**, 8. <https://doi.org/10.3390/PH13010008> (2020).
32. Lindamulage, I. K. *et al.* Novel quinolone chalcones targeting colchicine-binding pocket kill multidrug-resistant cancer cells by inhibiting tubulin activity and MRP1 function. *Sci. Rep.* **71**, 1–13 (2017).
33. Hagra, M. *et al.* Discovery of new quinolines as potent colchicine binding site inhibitors: Design, synthesis, docking studies, and anti-proliferative evaluation. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **36**, 640–658. <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1883598> (2021).
34. Wang, S. W. *et al.* CHM-1, a novel synthetic quinolone with potent and selective antimetastatic activity against human hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 350–360 (2008).
35. Walsh, J. G. *et al.* Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 12815–12819 (2008).
36. Saraste, A. & Pulkki, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc. Res.* **45**, 528–537 (2000).
37. Fulda, S. & Debatin, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**, 4798–4811 (2006).
38. Kim, J. W., Choi, E. J. & Joe, C. O. Activation of death-inducing signaling complex (DISC) by pro-apoptotic C-terminal fragment of RIP. *Oncogene* **19**, 4491–4499 (2000).
39. Kuwana, T. *et al.* Mitochondrial residence of the apoptosis inducer BAX is more important than BAX oligomerization in promoting membrane permeabilization. *J. Biol. Chem.* **295**, 1623 (2020).
40. Huang, Y. *et al.* Loss of BAD expression confers poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Med. Oncol.* **29**, 1648–1655 (2020).
41. Tummers, B. & Green, D. R. Caspase-8; regulating life and death. *Immunol. Rev.* **277**, 76–89 (2017).
42. Chaitanya, G. V., Alexander, J. S. & Babu, P. P. PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun. Signal.* **8**, 1–11 (2010).
43. Drogosz-Stachowicz, J. *et al.* Molecular mechanisms of apoptosis induced by a novel synthetic quinolinone derivative in HL-60 human leukemia cells. *Chem. Biol. Interact.* **320**, 109005. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109005> (2020).
44. Beretta, G. *et al.* Apoptosis-mediated anticancer activity in prostate cancer cells of a chestnut honey (*Castanea sativa* L.) quinoline-pyrrolidine gamma-lactam alkaloid. *Amino Acids* **53**, 869–880 (2021).
45. Chiu, C. C. *et al.* BPIQ, a novel synthetic quinoline derivative, inhibits growth and induces mitochondrial apoptosis of lung cancer cells in vitro and in zebrafish xenograft model. *BMC Cancer* **15**, 1–10 (2015).
46. Gao, F., Zhang, X., Wang, T. & Xiao, J. Quinolone hybrids and their anti-cancer activities: An overview. *Eur. J. Med. Chem.* **165**, 59–79 (2019).
47. Guzmán, C., Bagga, M., Kaur, A., Westermarck, J. & Abankwa, D. ColonyArea: An ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays. *PLoS ONE* **9**, e92444. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0092444> (2014).

Author contributions

M.R. conducted the experiments of compounds synthesis, analyzed data, wrote manuscript; N.M and M.O. conducted the experiments of biological evaluation, analyzed data, wrote manuscript; M.W. wrote manuscript; S.M. conceived the experiments, analyzed data., All authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23640-9>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022