

**BADANIE WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWYCH
I MOLEKULARNYCH MECHANIZMÓW DZIAŁANIA POCHODNYCH
ZAWIERAJĄCYCH SZKIELET PIRANONU, CHINOLINONU
I CHINOLINODIONU**

Joanna Drogosz-Stachowicz

PRACA DOKTORSKA
WYKONANA POD KIERUNKIEM
PROF. DR HAB. N. MED. ANNY JANECKIEJ
W ZAKŁADZIE CHEMII BIOMOLEKULARNEJ
UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO W ŁODZI

Łódź, 2023

STRESZCZENIE

Choroby nowotworowe uważane są za jedną z głównych przyczyn zgonów w XXI wieku. Intensywne poszukiwania nowych leków przeciwnowotworowych skupiają się na izolowaniu z roślin związków o właściwościach cytotoksycznych oraz ich modyfikacjach chemicznych, jak również na badaniach przesiewowych tysięcy syntetycznych cząsteczek. Związki, które potencjalnie mogą stać się kandydatami na nowe leki przeciwnowotworowe muszą mieć zdolność hamowania proliferacji i/lub indukowania apoptozy komórek nowotworowych, bez powodowania zbyt dużych szkód w prawidłowych komórkach.

Przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie poziomu cytotoksyczności 46 syntetycznych związków otrzymanych w Instytucie Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej i wyselekcjonowanie najbardziej aktywnych struktur. Badałam trzy grupy związków: aza- i oksaheterocykle zawierające wiązanie *egzo*-metylidenowe sprzężone z grupą karbonylową (3-metylidenochinolin-4-ony i 3-metylidenotetrahydropiran-4-ony) oraz hybrydy łączące szkielet furochinolino-4,9-dionu z grupą dietoksyfosforylową (3-dietoksyfosforylofurochinolino-4,9-diony). Badanie właściwości przeciwnowotworowych wybranych analogów, a w szczególności zdolność do indukowania zaprogramowanej śmierci komórek nowotworowych jak również mechanizmów odpowiedzialnych za indukcję apoptozy było głównym celem pracy.

Pierwszą grupą badanych związków były analogi 3-metylideno-1-tozylo-2,3-dihydrochinolin-4-(1*H*)-onu z różnymi podstawnikami w pozycji 2. Wszystkie związki wykazywały bardzo wysoką aktywność cytotoksyczną w komórkach HL-60, NALM-6 i MCF-7. Jednym z najbardziej obiecujących analogów z tej serii był 2-etylo-3-metyloideno-1-tozylo-2,3-dihydrochinolin-4-(1*H*)-on (chinolinon **2**), który silnie w sposób zależny od dawki hamował aktywność metaboliczną białaczkowych komórek HL-60 przy submikromolowych wartościach IC₅₀. Jednocześnie chinolinon **2** charakteryzował się wysoką selektywnością, wykazując ponad 13-krotnie niższy efekt cytotoksyczny w stosunku do zdrowych komórek HUVEC niż nowotworowych HL-60. Chinolinon **2** powodował zatrzymanie komórek HL-60 w fazie subG0/G1 cyklu komórkowego w ciągu pierwszych 24 h. Traktowanie komórek HL-60 badanym analogiem powodowało także wzrost liczby komórek wykazujących obecność aneksyny V i TUNEL-pozytywnych, wskazując na zdolność badanego analogu do indukowania programowanej śmierci komórek HL-60. Dodatkowo, chinolinon **2** indukował aktywację kaspaz-8, -9 i -3, utratę potencjału błonowego mitochondriów i zwiększenie poziomu białka Fas. Uzyskane wyniki wskazują, że apoptoza indukowana przez chinolinon **2**

zachodziła zarówno na drodze zewnętrznej, jak i wewnętrznej. Cytotoksyczne działanie badanego związku było również związane z obniżeniem aktywności ścieżki kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPK) i było niezależne od generowania reaktywnych form tlenu. Uzyskane wyniki sugerują, że chinolinon **2** wywiera silny efekt przeciwnowotworowy na komórki białaczkowe, co czyni ten analog atrakcyjnym kandydatem do dalszych badań.

Drugą grupą badanych związków były *trans*-2,6-dipodstawione 3-metyloidenotetrahydropirany-4-ony, które oceniłam pod kątem aktywności cytotoksycznej wobec dwóch nowotworowych linii komórkowych (HL-60 i MCF-7). Analogi z podstawnikami izopropylowym i fenylowym w pozycji 2 były bardziej cytotoksyczne niż analogi z podstawnikiem n-butylovym. Dwa spośród najbardziej cytotoksycznych analogów, analog **17** i **20**, wybrałam do dalszych badań na linii komórkowej HL-60. Oba analogi indukowały zmiany morfologiczne charakterystyczne dla apoptozy w komórkach nowotworowych, znacząco hamowały proliferację i indukowały apoptotyczną śmierć komórek. Oba związki generowały również uszkodzenia DNA, a analog **17**, zatrzymywał cykl komórkowy komórek HL-60 w fazie G2/M. Ponadto, oba analogi były w stanie hamować aktywność topoizomerazy II α . Na podstawie tych wyników, badane analogi mogą być dalej optymalizowane w celu opracowania nowych i skutecznych inhibitorów topoizomerazy II.

Trzecią grupę analizowanych związków stanowiły 3-dietoksyfosforylofurochinoliny-4,9-diony. Aktywność cytotoksyczną otrzymanych analogów badałam jak poprzednio wobec dwóch ludzkich nowotworowych linii komórkowych (HL-60 i MCF-7) oraz dla porównania na komórkach prawidłowych (HUVEC i MCF-10A). Kilka badanych chinolonodionów wykazało silną cytotoksyczność w stosunku do komórek nowotworowych z wartościami IC₅₀ nawet poniżej 0,1 μ M. Najbardziej obiecujące analogi **29c** i **29i**, o najwyższym stosunku cytotoksyczności komórek nowotworowych do zdrowych, badałam następnie w celu ustalenia ich mechanizmu działania. W komórkach HL-60 analogi te zwiększały generację wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu i powodowały zahamowanie aktywności oksydoreduktazy NAD(P)H:chinonowej 1 (NQO1), co prowadziło do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie S, zmniejszenia proliferacji komórek, uszkodzenia DNA i apoptozy. Ponieważ związek **29i** wykazywał obiecujące właściwości przeciwnowotworowe, w niniejszej pracy oceniłam jego wpływ również na komórki raka piersi. Analog **29i** był cytotoksyczny dla komórek nowotworowych MCF-7 i MDA-MB-231, lecz nie wywierał widocznego wpływu na wzrost prawidłowych komórek MCF-10A. W komórkach MCF-7 badany analog po 24-godzinnej inkubacji indukował powstawanie DSBs, prowadził do

zatrzymania cyklu komórkowego w fazie S i G2/M oraz do apoptozy. Komórki MDA-MB-231 były bardziej odporne, **29i** zwiększał ilość komórek z podwójnymi uszkodzeniami nici DNA, jednak znaczne różnice w rozkładzie cyklu komórkowego nie były widoczne, a apoptoza obserwowana była dopiero po 72 h ekspozycji komórek na związek. W badaniach *in vivo* u samic myszy C3H **29i** był dobrze tolerowany a maksymalna tolerowana dawka przy jednorazowym podaniu podskórnym wynosiła 160 mg/kg m.c. Średnia masa guzów piersi u badanych zwierząt otrzymujących **29i** była niższa niż u zwierząt kontrolnych, jednak różnica nie była istotna statystycznie. Związek **29i** charakteryzował się dobrą tolerancją oraz toksycznością względem komórek nowotworowych.

Podsumowując, wyniki niniejszej pracy poszerzają wiedzę w zakresie przeciwnowotworowego działania pochodnych 3-metylideno-1-tozyl-2,3-dihydrochinolin-4-(1*H*)-onu, 3-dietoksyfosforylofurochinolino-4,9-dionu oraz *trans*-2,6-dipodstawionych 3-metyloidenotetrahydropiran-4-onów. Przedstawione ustalenia mogą być pomocne w dalszych poszukiwaniach skutecznych i bezpiecznych leków, możliwych do zastosowania w terapii onkologicznej.

SUMMARY

Cancer is considered one of the leading causes of death in the 21st century. The intensive search for new anticancer drugs focuses on isolating compounds with cytotoxic properties from plants and their chemical modifications, as well as screening thousands of synthetic molecules. Compounds that could potentially become candidates for new anticancer drugs must have the ability to inhibit proliferation and/or induce apoptosis of cancer cells without causing too much damage to normal cells.

The subject of this dissertation was to determine the level of cytotoxicity of 46 synthetic compounds obtained at the Institute of Organic Chemistry of the Technical University of Lodz and to select the most active structures. I studied three groups of compounds: aza- and oxaheterocycles containing an *exo*-methylidene bond conjugated to a carbonyl group (3-methylidenequinolin-4-ones and 3-methylidene-tetrahydropyran-4-ones) and hybrids combining a furoquinoline-4,9-dione backbone with a diethoxyphosphoryl group (3-diethoxyphosphorylfuroquinolin-4,9-diones). The study of the anticancer properties of selected analogs, in particular their ability to induce programmed tumor cell death as well as the mechanisms responsible for the induction of apoptosis was the main objective of the work.

The first group of the tested compounds were analogs of 3-methylidene-1-tosyl-2,3-dihydroquinolin-4-(1H)-one with different substituents in position 2. All compounds showed very high cytotoxic activity in HL-60, NALM-6 and MCF-7 cells. One of the most promising analogs in this series was 2-ethyl-3-methylidene-1-tosyl-2,3-dihydroquinolin-4-(1H)-one (quinolinone **2**), which strongly inhibited the metabolic activity of leukemic HL-60 cells in a dose-dependent manner at submicromolar IC₅₀ values. At the same time, quinolinone **2** exhibited high selectivity, showing a more than 13-fold lower cytotoxic effect against healthy HUVECs than cancerous HL-60 cells. Quinolinone **2** caused the cell cycle arrest in HL-60 cells in the sub-G₀/G₁ phase within the first 24 h. Treatment of HL-60 cells with the tested analog also caused an increase in the number of annexin V-positive and TUNEL-positive cells, indicating the ability of the tested analog to induce programmed cell death in HL-60 cells. In addition, quinolinone **2** induced activation of caspases-8, -9 and -3, loss of mitochondrial membrane potential and increased Fas protein levels. The results indicate that quinolinone **2**-induced apoptosis occurs through both extrinsic and intrinsic pathways. The cytotoxic effect of the test compound was also associated with a decrease in the activity of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and was independent of the generation of reactive oxygen species. The results suggest that quinolinone **2** exerts a potent anti-tumor

effect on leukemic cells, making this analogue an attractive drug candidate for further research.

The second group of the tested compounds were *trans*-2,6-disubstituted 3-methylidenetetrahydropyran-4-ones, which I evaluated for cytotoxic activity against two cancer cell lines (HL-60 and MCF-7). Analogs with isopropyl and phenyl substituents at position 2 were more cytotoxic than analogs with an *n*-butyl substituent. Two of the most cytotoxic analogs - analogs **17** and **20** - were selected for further studies on the HL-60 cell line. Both analogs induced morphological changes characteristic of apoptosis in cancer cells, significantly inhibited proliferation and induced apoptotic cell death. Both compounds also generated DNA damage, and one of the analogs, **17**, arrested the cell cycle of HL-60 cells in the G2/M phase. In addition, both analogs were able to inhibit topoisomerase II α activity. Based on these results, the tested analogs can be further optimized to develop new and effective topoisomerase II inhibitors.

The third group of analyzed compounds was 3-diethoxyphosphorylfuroquinoline-4,9-diones. I tested the cytotoxic activity of the obtained analogs against two human cancer cell lines: HL-60 and MCF-7, and for comparison on normal HUVEC and MCF-10A cells. Several of the tested analogs proved highly cytotoxic to cancer cells with IC₅₀ values as low as 0.1 μ M. The most promising analogs **29c** and **29i**, with the highest cytotoxicity ratio of cancer cells to healthy cells, were further evaluated to determine their mechanism of action. In HL-60 cells, these analogs increased intracellular ROS generation and inhibition of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) activity, leading to the cell cycle arrest in S phase, decreased cell proliferation, DNA damage and apoptosis. Since compound **29i** showed promising anticancer properties, in the present study I also evaluated its effects on breast cancer cells. Analog **29i** was cytotoxic to MCF-7 and MDA-MB-231 cancer cells, but had no apparent effect on the growth of normal MCF-10A cells. In MCF-7 cells, the tested analog induced the formation of DSBs after a 24-hour incubation, led to the cell cycle arrest in S and G2/M phases and to apoptosis. MDA-MB-231 cells were more resistant, **29i** increased the number of cells with double strand DNA breaks, but significant differences in cell cycle distribution were not apparent, and apoptosis was observed only after 72 h of cell exposure to the compound. In the *in vivo* studies in female C3H mice, **29i** was well tolerated and the MTD at a single subcutaneous administration was 160 mg/kg. The mean weight of breast tumors in tested animals receiving **29i** was lower than in control animals, but the difference was not

statistically significant. The compound **29i** was characterized by good tolerability and toxicity to tumor cells.

In conclusion, the results of the present study extend the knowledge of the anticancer effects of 3-methylidene-1-tosyl-2,3-dihydroquinolin-4-(1H)-one, 3-diethoxyphosphorylfuroquinolin-4,9-dione and trans-2,6-disubstituted 3-methylidene-tetrahydropyran-4-ones. The findings presented here may be helpful in the further search for effective and safe drugs that can be used in cancer therapy.