

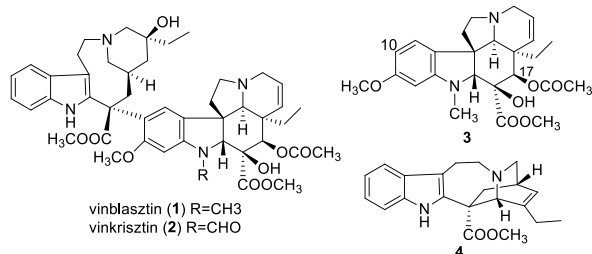
Daganatellenes hatású hibridek kutatása

HALMAI Mónika, KEGLEVICH Péter*, HAZAI László**

Szerves Kémia és Technológia Tanszék, Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Műegyetem rkp. 3., H-1111 Budapest, Magyarország,

1. Bevezetés

A vinblasztin (1) és a vinkrisztin (2) jól ismert vegyületek a rákellenes terápiában mint klasszikus tubulin inhibitorok. Ezek a molekulák a rózsameténgből (*Catharanthus roseus*) izolált *Vinca* alkaloidok közé tartoznak, és dimer alkaloidokként két monomerből, a vindolinból (3) és a katarantinból (4) épülnek fel (1. ábra). Közülük a növényben a legnagyobb mennyiségben a vindolin (3) található.



1. ábra. A vinblasztin (1), a vinkrisztin (2), a vindolin (3) és a katarantin (4) szerkezete

Bár a kutatók igen nagy erőfeszítéseket tettek, hogy újabb és kevésbé toxikus származékokat állítsanak elő [1, 2], a fluortartalmú vinflunin, a kisebb tagszámú gyűrűt tartalmazó vinorelbin és egy savamid származék, a vindezin szintézise ellenére igazi áttörés az onkológiai terápiában ez idáig nem történt.

A kombinációs terápiát, amikor ún. koktélokot használnak, pl. vinblasztin mellett egyéb más hatékony molekulákat egy oldatban, széles körben alkalmazzák a klinikai gyakorlatban. Ezt a koncepciót váltja ki a molekuláris hibridizáció, amely mintegy három évtizeddel ezelőtt indult, és igen

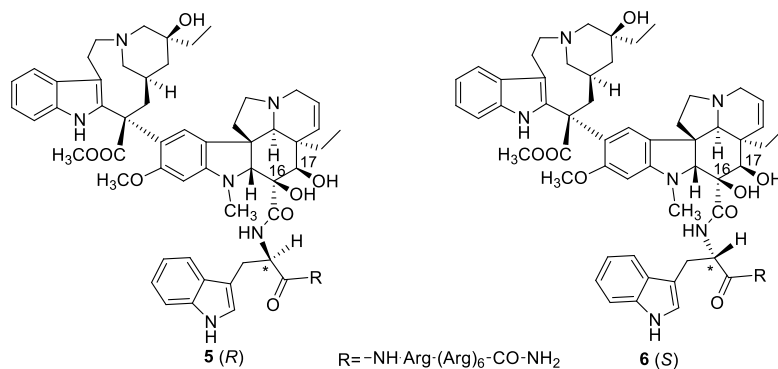
alapos összefoglaló munkák mutatják be [3, 4]. Röviden: a hibridek általános formájában két különböző farmakofór molekulát kötnek össze kovalens kötéssel egy linkernek nevezett mozgékony, illetve merev láncon keresztül vagy akár közvetlenül. A hibrid molekulák a jobb biohasznosulást, a könnyebb membránpenetrációt, a rezisztencia és a mellékhatások csökkentését segíthetik elő.

A Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Szerves Kémia és Technológia Tanszékén működő Alkaloidkémiai Kutatócsoport fő kutatási területe a daganatellenes hatású hibridek szintézise, melyekben az egyik komponens természetes szerves molekula, elsősorban *Vinca* alkaloid, illetve flavonoid.

2. Eredmények

2.1. Hibridek *Vinca* alkaloidokkal

Célul tűztük ki olyan molekuláris hibridek előállítását, ahol az egyik komponens *Vinca* alkaloid, a másik pedig egy ismert és gyakran alkalmazott farmakofór. A szintézisekhez elsőként a daganatellenes hatású vinblasztint (1) és az egyik komponensét, az önmagában nem rákellenes hatású vindolint (3) választottuk. Így előállítottuk a vinblasztin triptofán aminosavval képzett hibridjét, melyet konjugáltunk az (Arg)₈ penetrációs oktapeptiddel [5]. A vinblasztint a 16-os helyzetben konjugáltuk Busshana Rao [6] módszerével triptofán-metilészterrel, miközben a 17-es helyzetű észterfunkció dezacetileződött. Az aminosav észtercsoportjának hidrolízise után a kapott karbonsav kapcsolható volt az oktapeptid lánccal, majd a keletkezett epimereket, az 5(R) és 6(S) molekulákat sikeresen elválasztottuk (2. ábra).



2. ábra. Hordozó peptidekkel konjugált vinblasztin-triptofán hibridek

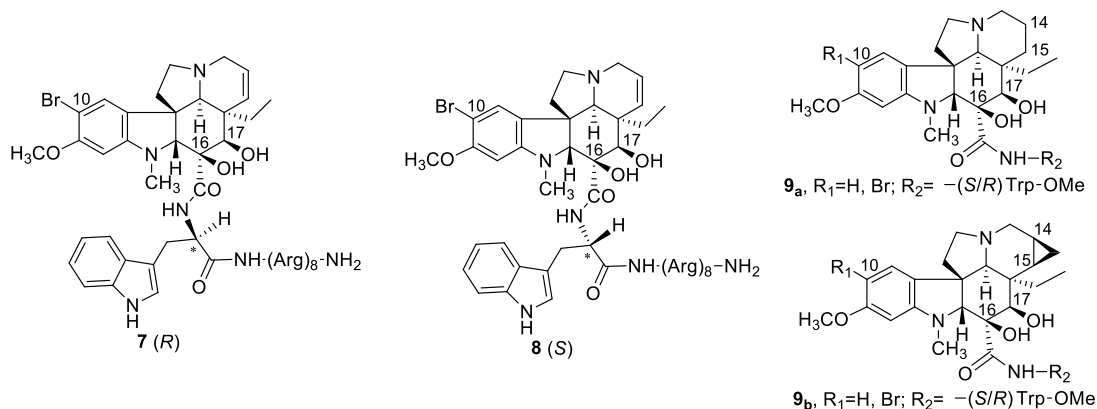
* E-mail: keglevich.peter@vbk.bme.hu,

** E-mail: hazai.laszlo@vbk.bme.hu

A kapott vegyületek antiproliferatív aktivitását HL-60 szenzitív, illetve rezisztens leukémia, valamint HeLa sejteken vizsgáltuk. Az **5** és **6** konjugátumok aktivitása (IC_{50} : 0,97-1,26 μ M) összemérhető volt a vinblasztinra jellemző értékkel (IC_{50} : 1,26 μ M), sőt rezisztens sejteken is hatékonyak voltak. Jelentős eredmény, hogy az **5** vegyület HeLa sejtek esetében is ronsolja a mitotikus orsót, ami a sejtciklus gátlását eredményezi.

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy megmarad-e a biológiai hatás akkor is, ha az alkaloid egyik komponensét

eltávolítjuk. Ekkor a vindolint (**3**) kapcsoltuk triptofánnal az alkalmazott módszerrel [7]. Bár a **7(R)** és **8(S)** (3. ábra) esetén az antitumor hatások szignifikánsok voltak, nem érték el az előző, 2. ábrán bemutatott, vinblasztint tartalmazó vegyületekét. A leukémia HL-60 (IC_{50} : 11,5-15,1 μ M), emlőkarcinóma MDA-MB-231 (IC_{50} : 10-15,1 μ M) és az MCF-7 (IC_{50} : 5,1-6,4 μ M) sejteken a két epimer hatása csaknem azonos volt, a vastagbélrák C26 és a leukémia P388 tumor sejtvonalakon a **8(S)** epimer hatásosabbnak bizonyult.



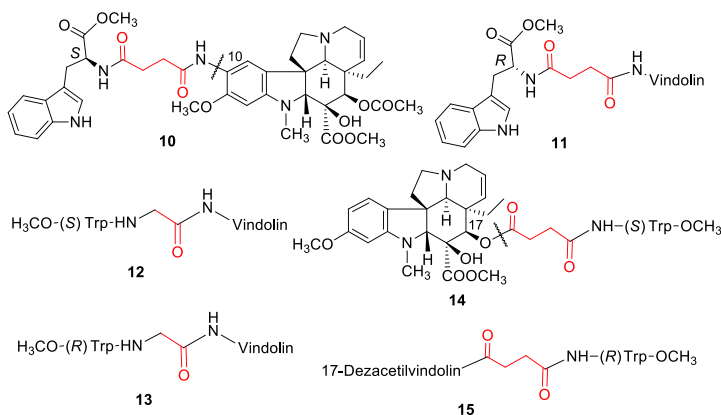
3. ábra. Vindolin-aminosav hibridek

A konjugátumok tumorelles hatását *in vivo* is vizsgáltuk, P388 és C26 tumor sejteket használva egereken szubkután beadással. A **8(S)** lényegesebben hatékonyabbnak mutatkozott a **7(R)** vegyületnél, ez utóbbi nem mutatott jelentősebb aktivitást, és érdemes megemlíteni, hogy az alkalmazott kísérleti körülmények között az **8(S)** epimer kissé, bár nem szignifikánsan aktívabbnak bizonyult a kontrol vinblasztinnál. A vastagbél tumor sejtek (C26) esetén mindkét hibrid inaktív volt.

Néhány módosított vindolin-strukturát is szintetizáltunk [8]; a 14,15-helyzetben telített származékot (**9a**) a vindolin (**3**) katalitikus hidrogénezése eredményezte, a 14,15-ciklopropano vegyületet (**9b**) pedig szintén a **3**-ból Simmons-Smith-reakcióval állítottuk elő. Közülük csak a **9a** mutatott mérsékelt aktivitást (IC_{50} : 27,5 μ M) HL-60 sejteken, ezért a

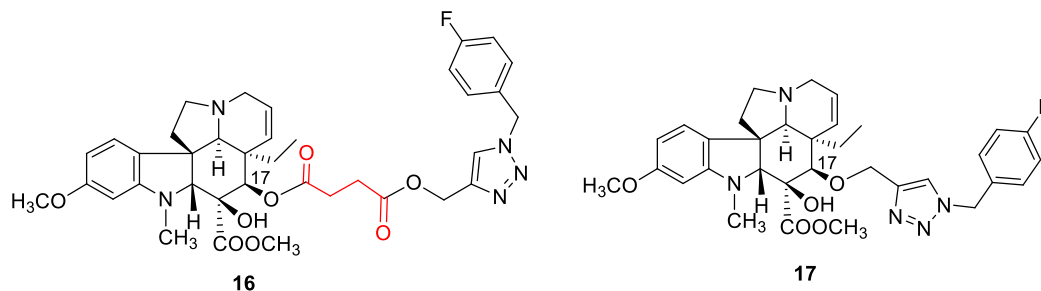
hordozó peptid konjugálására ebben az esetben nem került sor.

További vindolin-aminosav hibrideket szintetizáltunk, melyekben a két farmakofórt egy mozgékony szénlánccal, azaz linkerrel kovalensen kötöttük össze [9]. A kapcsolás a vindolin 10-es, illetve 17-es helyén történt (4. ábra). Így a 10-aminovindolint acileztük borostyánkősav-anhidriddel, és az ezt követő amidálás a megfelelő (l)- és (d)-triptofán-metilésztterrel eredményezte a **10**, illetve a **11** hibrideket. Hasonlóan a **12** és **13** vegyületeket, melyek rövidebb és merevebb linkert tartalmaznak, a 10-aminovindolin klóracetilézésével és a kapott 10-klóracetamido-származék megfelelő triptofán-metilésztterekkel történő reakciójával állítottuk elő.



4. ábra. Linkerrel összekötött vindolin-aminosav hibridek

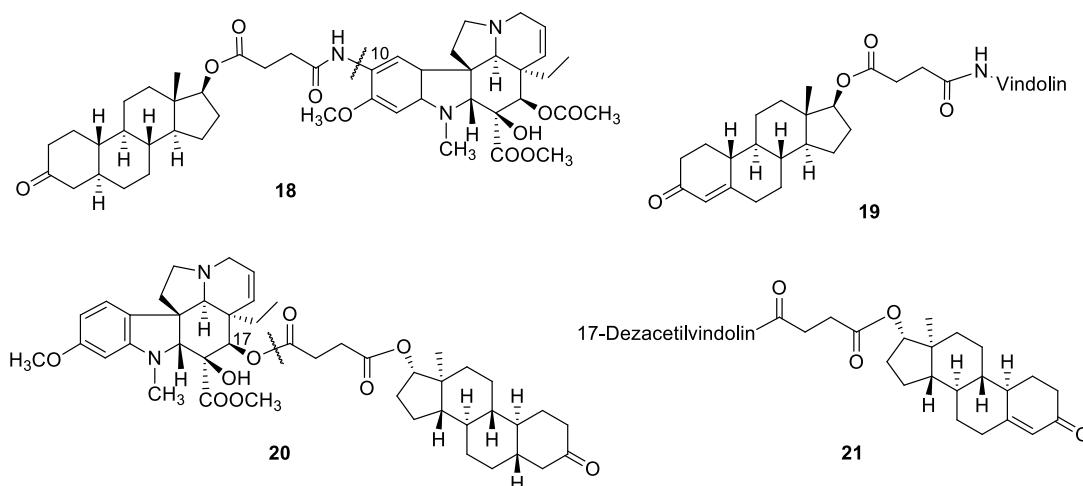
A 17-es helyen történő konjugálással is hasonló módszerekkel szintetizáltunk aminosav hibrideket, a **14** és **15** epimereket a megfelelő 17-dezacetilvindolinból kiindulva állítottuk elő. A kapott származékok antiproliferatív hatását humán nőgyógyászati daganatsejteken (HeLa, SiHa méhnyakrák sejteken, valamint MCF-7, MDA-MB-231 emlőráksejteken) vizsgáltuk. SiHa sejteken a kontrol vinblasztin rezisztensnek mutatkozott (IC_{50} : 14,42 μ M), azonban a **14** vegyület hatékonyabbnak bizonyult (IC_{50} : 6,01 μ M). A **15** hibrid valamennyi sejtvonalon mérsékelt aktivitást mutatott, a 10-es pozícióon keresztül kialakított hibridek viszont hatástalanok voltak.



5. ábra. Vindolin-triazol hibridek szerkezete

A hibridek speciális csoportját képezik a szteroid hibridek, pl. 5 α -dihidrotesztozsteronnal illetve 19-nortesztozsteronnal [10], melyeket a már ismertetett módszerekkel szintetizáltunk. A vindolint a 10-es helyzetben az aminocsoporton

keresztül, a 17-es helyzetben pedig a hidroxilcsoporton át konjugáltuk borostyánkősav-anhidridből képzett linkert alkalmazva. Így kaptuk a **18** és **19**, illetve a **20** és **21** hibrideket (6. ábra).

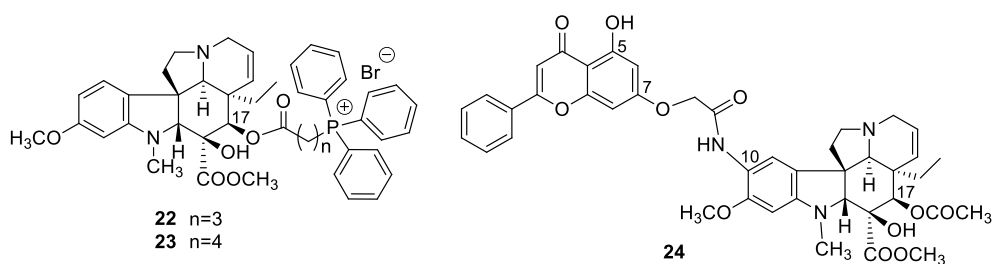


6. ábra. Vindolin-szteroid hibridek

A legszignifikánsabb antiproliferatív hatást a **21** vegyület mutatta, különösen vastagbélrák (COLO 205) és melanóma (SK-MEL-2, SKMEL-5) esetén, a többi szteroidszármazék alacsony vagy csak mérsékelt aktivitást eredményezett

A trifenilfoszfínnal (TPP) képzett hibridek különleges helyet foglalnak el a hibridek területén, miután a TPP szerkezeti rész hordozóként lehetővé teszi, hogy a molekula a mitokondriumban felhalmozódjon és ott fejtse ki a daganat-

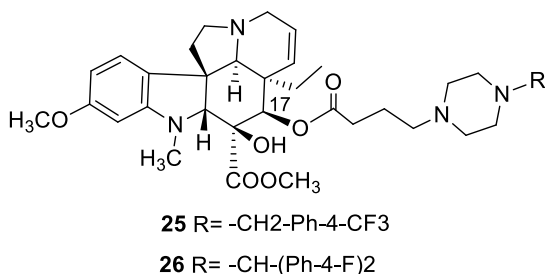
tellenes hatást. Ezért a vindolint 17-es helyzetben kapcsoltuk TPP-nal, különböző hosszúságú acil-linkereken keresztül előállítva a **22** és **23** származékokat (7. ábra). Ez utóbbi vegyületek sejtosztódásgátló hatása hasonlóan mutatkozott [11, 12]. A kiváló, 50%-os gátlást mutató GI_{50} adatok szerint a molekulák jelentős hatást értek el különféle sejtvonalakon, így melanóma, ovárium és emlőrák sejteken (GI_{50} < 0,5 μ M), ezenkívül a **22** jelentős aktivitást eredményezett HOP-92 nemkissztes tüdőrák sejteken (GI_{50} : 0,066 μ M).



7. ábra. Vindolin-hibridek trifenil-foszfinnal és krizinnel

A hibridek fontos csoportja a flavon hibridek (ld. köv. fejezet), melyek közé a flavon-alkaloidok is sorolhatók [13]. Ezt a csoportot tanulmányozva vindolint és krizint kapcsolunk a vindolin 10-es és 17-es helyzetén keresztül linkerekkel vagy azok nélkül (7. ábra). Egy esetben a krizin mindkét, 5-ös és 7-es helyzetben lévő hidroxilcsoportját is kihasználva két vindolin molekularész is beépítésre kerülhetett. Számos szintetizált származék közül azonban csak a **24** hibrid bizonyult hatékonynak [14]; a vegyületre kapott GI_{50} $<1,5 \mu\text{M}$ nemkissejtes tüdőrák (HOP-92), CNS (SNB-75), melanóma (LOX IMVI), vese (A498 és CAKI-1), prosztata (PC-3) és emlőrák sejtvonalakon (MCF7).

Igazi áttörést jelentenek ezen a területen a vindolin piperazinszármazékai [15]. Számos *N*-szubsztituált piperazint konjugáltunk a vindolin 10 és 17-es helyzetébe különféle linkereken keresztül a korábban bemutatott módszereket alkalmazva (8. ábra).



8. ábra. Vindolin-hibridek fluortartalmú piperazinszármazékokkal

A leghatékonyabb daganatellenes molekuláknak a **25** és **26** hibridek bizonyultak, melyek fluortartalmú piperazin építő-

követ tartalmaznak; a **25** leginkább MDAMB-488 emlőrák sejtvonalon (GI_{50} : $1,00 \mu\text{M}$), míg a **26** elsősorban HOP-92 nem kissejtes tüdőrák sejtvonalon (GI_{50} : $1,35 \mu\text{M}$) mutatott kiváló aktivitást. Ezen túlmenően ezek a származékok jelentős szelektivitást eredményeztek nem tumoros sejteken vizsgálva.

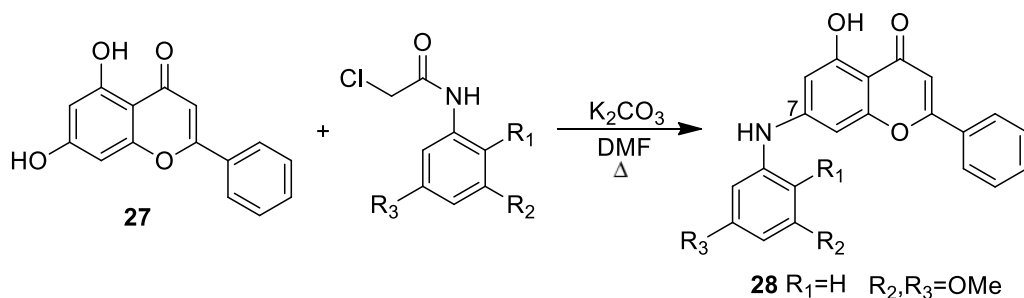
2.2. Hibridek flavonoidokkal

Kutatócsoportunk nem csak *Vinca* alkaloidokkal, hanem flavonoidokkal konjugált bioaktív hibridek szintézisét és biológiai hatását is vizsgálta. Ezen kívül törekvésünk az, hogy a *Vinca* alkaloidokkal kapott sikeres hibridek szerkezetét a flavonoidokra is kiterjesszük.

Számos flavonoidszármazék ismert, amik hibrideknek tekinthetők és fontos biológiai hatásokat mutatnak [16]. A flavonoidok közül egyik target molekulának a krizint választottuk.

Ezen a területen első eredményünk a 9. ábrán bemutatott krizin-aminoaril hibridek. A krizin (**27**) különféleképpen helyettesített *N*-klóracetilanilidekkel történő reakciója nem várt termékeket, 7-amilamino-krizineket eredményezett. A reakció mechanizmusát (ún. Smiles-átrendeződés) is felderítettük, és a számos szintetizált molekula daganatellenes hatása vizsgálatakor a **28** dimetoxiszármazék bizonyult a legaktívabbnak [17].

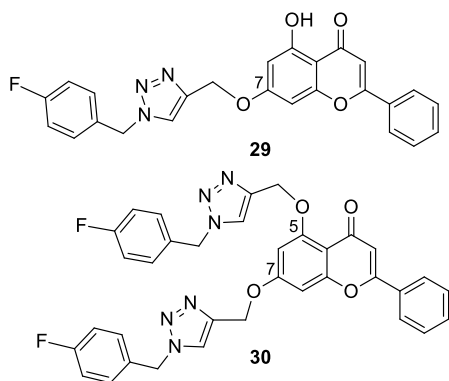
A vegyület nanomoláris gátlást mutatott: MCF7 emlőrák-sejteken GI_{50} : 30 nM, valamint CT-15 vastagbélrák sejteken GI_{50} : 60 nM értékeket kaptunk.



9. ábra. Arilaminoflavon származékok előállítása

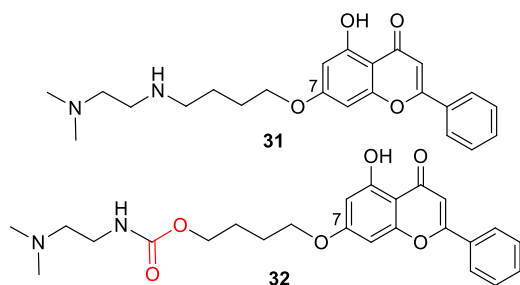
A krizint (**27**) konjugáltuk *N*-benzil-triazol-származékokkal is. Ezek közül az antiproliferatív hatást illetően a fluorhelyettesített **29** és **30** hibrid (10. ábra) bizonyult a leghatásosabbnak [18]. Érdekes, hogy a **30** már két triazol farmakofór egységet tartalmaz, itt sikerült az 5-ös helyzetű hidroxilcsoportot is reakcióba vinni.

A **29** és **30** hibridek több sejtvonalon is szignifikáns antiproliferatív hatást mutattak. A monohibrid **29** HeLa sejteken IC₅₀ 1,9 µM értéket adott, míg SiHa sejteken rezisztens volt. A **30** bisz-hibrid származék mindkét sejtvonalon hatékonyabbnak bizonyult, sőt, HeLa sejteken szubmikromólos értéket ért el (0,73 µM). HeLa esetén mindkét vegyület nagyobb aktivitásúnak bizonyult, mint a kontrol ciszplatin.



10. ábra. Krizin-triazol hibridek

A továbbiakban számos krizintartalmú hibridet szintetizáltunk, így a krizint (**27**) összekapcsoltuk tetrahidroizokinolinnal, *N,N*-dimetiletiléndiaminnal, pirrollal, az aminosavak közül triptofánnal és prolinnal, valamint aril- és hetarilaminokkal [19]. Az előállított nagyszámú vegyület többsége nem mutatott antiproliferatív hatást, azonban a **31** és **32** származékok (11. ábra) 10 µM dózisban több sejtvonalon, így melanóma, vastagbél és CNS esetén csaknem 100% gátlást eredményezett.



11. ábra. Amin oldalláncot tartalmazó krizinszármazékok

3. Összefoglalás

A vindolint és a krizint különféle típusú szintetikus, illetve természetes farmakofórral kapcsoljuk, és számos biológiai

ilag hatékony, jelentős daganatellenes hatást mutató hibrid molekulát sikerült szintetizálni. A kapcsoló komponensek szerkezete igen széles kört ölelt fel, így alkalmaztunk aminosavakat, elsősorban triptofánt, *N*-helyettesített benzil-triazolokat, szteroidokat, trifenil-foszfint, nyílt láncú és gyűrűs aminokat, valamint helyettesített aril- és hetarilaminokat. A vegyületek közül több a vinblasztinnal összemérhető aktivitást mutatott, sőt néhány hatékonyabbnak bizonyult. Néhány esetben sikerült kimutatni, hogy az antiproliferatív hatású molekulák szelektíven nem toxikusak a nem-tumoros, egészséges sejteken vizsgálva. A biológiai vizsgálatok során együttműködtünk több intézménnyel, így NCI-vel (USA), valamint az ELTE, az SZTE és a PTE egyetemekkel.

Hivatkozások

- Keglevich, P.; Hazai, L.; Kalaus, G.; Szántay, C. *Molecules* **2012**, *17*, 5893-5914.
<https://doi.org/10.3390/molecules17055893>
- Mayer, S.; Keglevich, P.; Keglevich, A.; Hazai, L. *Curr. Org. Chem.* **2021**, *25*, 1224-1234.
<https://doi.org/10.2174/1385272825666210216123256>
- Nepali, K.; Sharma, S.; Sharma, M.; Bedi, P. M. S.; Dhar, K. L. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *77*, 422-487.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.018>
- Choudhary, S.; Singh, P. K.; Verma, H.; Singh, H.; Silkari, O. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *151*, 62-97.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.057>
- Bánóczy, Z.; Gorka-Kereskényi, Á.; Reményi, J.; Orbán, E.; Hazai, L.; Tókési, N.; Oláh, J.; Ovádi, J.; Béni, Z.; Háda, V.; Szántay, Cs. Jr.; Hudecz, F.; Kalaus, Gy.; Szántay, Cs. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 1948-1955.
<https://doi.org/10.1021/bc100028z>
- Bhushana Rao, K. S. P.; Collard, M. P. M.; Dejonghe, J. P. C.; Atassi, G.; Hannart, J.A.; Trouet, A. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1079-1088.
<https://doi.org/10.1021/jm00146a017>
- Bánóczy, Z.; Keglevich, A.; Szabó, I.; Randelović, I.; Hegedüs, Z.; Regenbach, F. L.; Keglevich, P.; Lengyel, Zs.; Gorka-Kereskényi, Á.; Dubrovay, Zs.; Háda, V.; Szigetvári, Á.; Szántay, Cs. Jr.; Hazai, L.; Tóvári, J.; Hudecz, F. *J. Pept. Sci.* **2018**, *24*, e3118.
<https://doi.org/10.1002/psc.3118>
- Keglevich, P.; Hazai, L.; Gorka-Kereskényi, Á.; Péter, L.; Gyenese, J.; Lengyel, Zs.; Dubrovay, Zs.; Kalaus, Gy.; Dékány, M.; Orbán, E.; Szabó, I.; Bánóczy, B.; Szántay, Sz. *Heterocycles* **2013**, *87*, 2299-2317.
<https://doi.org/10.3987/COM-13-12827>
- Keglevich, A.; Dányi, L.; Rieder, A.; Horváth, D.; Szigetvári, Á.; Dékány, M.; Szántay, Cs. Jr.; Dhahir Latif, A.; Hunyadi, A.; Zupkó; Keglevich, P.; Hazai, L. *Molecules* **2020**, *25*, 1010-1028.
<https://doi.org/10.3390/molecules25041010>
- Keglevich, A.; Zsiros, V.; Keglevich, P.; Szigetvári, Á.; Dékány, M.; Szántay, Cs.; Mernyák, E.; Wölfling, J.; Hazai, L. *Curr. Org. Chem.* **2019**, *23*, 959-967.
<https://doi.org/10.2174/1385272823666190614113218>
- Keglevich, A.; Szigetvári, Á.; Dékány, M.; Szántay, C. Jr.; Keglevich, P.; Hazai, L. *Phosphorus, Sulfur, Silicon, Relat. Elem.* **2019**, *194*, 606-609.
<https://doi.org/10.1080/10426507.2018.1550780>
- Keglevich, A.; Szigetvári, Á.; Dékány, M.; Szántay, Cs. Jr.; Keglevich, P.; Hazai, L. *Curr. Org. Chem.* **2019**, *23*, 852-858.
<https://doi.org/10.2174/1385272823666190524083236>

13. Mayer, S.; Keglevich, A.; Sepsey Für, C.; Bölskei, H.; Ilkei, V.; Keglevich, P.; Hazai, L. *Chemistry* **2020**, *2*, 714–726. <https://doi.org/10.3390/chemistry2030046>
14. Mayer, S.; Nagy, N.; Keglevich, P.; Keglevich, A.; Sepsey Für, Cs.; Bölskei, H.; Ilkei, V.; Keglevich, P.; Hazai, L. *Chem. Biodivers.* **2021**, *19*, :e202100725. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100725>
15. Zsoldos, B.; Nagy, N.; Donkó-Tóth, V.; Keglevich, P.; Weber, M.; Dékány, M.; Nehr-Majoros, A.; Szőke, É.; Helyes, Zs.; Hazai, L. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 7929. <https://doi.org/10.3390/ijms25147929>
16. Hazai, L.; Zsoldos, Zs.; Halmai, M.; Keglevich, P. *Appl. Sci.* **2024**, *14*, 1039. <https://doi.org/10.3390/app14031039>
17. Mayer, Sz.; Keglevich, K.; Ábrányi-Balogh, P.; Szigetvári, Á.; Dékány, M.; Szántay, Cs. Jr.; Hazai, L. *Molecules* **2020**, *25*, 888; <https://doi.org/10.3390/molecules25040888>
18. Németh-Rieder, A.; Keglevich, P.; Hunyadi, A.; Dhahir Latif, A.; Zupkó, I.; Hazai, L. *Molecules* **2023**, *28*, 626. <https://doi.org/10.3390/molecules28020626>
19. Mayer, Sz.; Herr, D. M.; Nagy, N.; Donkó-Tóth, V.; Keglevich, P.; Weber, M.; Dékány, M.; Hazai, L. *Period. Polytech. Chem. Engin.* **2023**, *67*, 316–336. <https://doi.org/10.3311/PPch.21919>

Research work on hybrids with antitumor activities

Vindoline and chrysin were coupled with various types of synthetic and natural pharmacophores, and several biologically effective hybrid molecules with significant antitumor activity were synthesized. The structure of the coupling components covered a very wide range, so in our research group, amino acids, primarily tryptophan, *N*-substituted benzyltriazaoles, steroids, triphenylphosphine, open-chain and cyclic amines, and substituted aryl and hetarylaminines were used. Several of the compounds showed activity comparable to vinblastine, and some even proved to be more effective.

In some cases, it was revealed that the molecules with antiproliferative effects were selectively non-toxic when tested on non-tumorous, healthy cells. During the biological studies, we collaborated with several institutions, such as the NCI (USA), the Department of Organic Chemistry, Eötvös L. University, Budapest, the Department of Pharmacodynamics and Biopharmacy, Interdisciplinary Excellence Centre, Interdisciplinary Centre for Natural Products, University of Szeged, and the HUN-REN PTE Chronic Pain Research Group, Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School & Centre for Neuroscience, University of Pécs.