

Sejtosztódásgátló hatású vindolin- és flavonoidszármazékok előállítása⁺

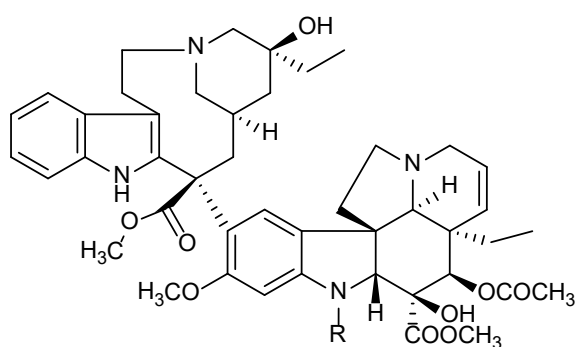
MAYER Szabolcs^a, NAGY Nóra^a, KEGLEVICH Péter^{a,*}, ÁBRÁNYI-BALOGH Péter^b, HAZAI László^a

^aBME Szerves Kémia és Technológia Tanszék, Szent Gellért tér 4., 1111 Budapest, Magyarország

^bELKH Természettudományi Kutatóközpont Gyógyszerkémiai Kutatócsoport, Magyar tudósok krt. 2., 1117 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A BME Szerves Kémia és Technológia Tanszékének Alkaloidkémiai Kutatócsoportja hosszú évtizedes múltja tekinthet vissza a *Vinca* alkaloidok területének kutatásában. Ezen természetes vegyületek indolvázat tartalmazznak, képviselőiket először a Madagaszkáron őshonos rózsás métegből (*Catharanthus roseus*) izolálták [1]. A természetes eredetű vegyületek közül csak a bisvindol származékok rendelkeznek daganatellenes hatással (vinblasztin (1), vinkrisztin (2)) (1. ábra), míg az őket felépítő monomerek (vindolin (3), katarantin (4)) (2. ábra) nem mutatnak tumorelles hatást. A *Vinca* alkaloidok daganatellenes hatásukat a sejtosztódás mitotikus (M) fázisának gátlásával fejtik ki [2]. Az ekkor kialakuló húzófonalak felelősek a sejtben felsorakozott testvérkromatidok elválasztásáért, illetve, hogy ezek a befűződés során a megfelelő leánysejtbe kerüljenek. A húzófonalak, vagy mikrotubulusok tubulin heterodimerekből álló polimer szálak, amelyek gyors polimerizációs - depolimerizációs dinamikát mutatnak. A *Vinca* alkaloidok ezt a dinamikus viselkedést gátolják, amely végeredményben apoptózishoz vezet.

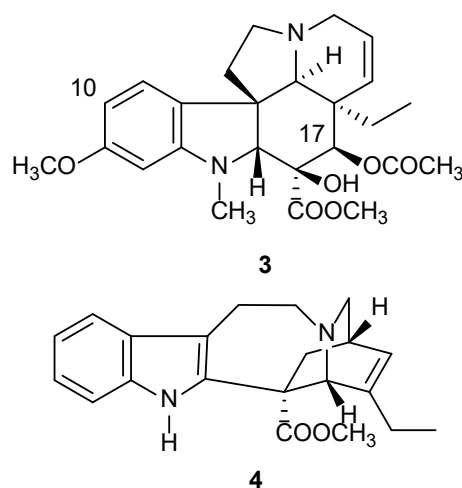


vinblasztin (1) R = CH₃

vinkrisztin (2) R = CHO

1. ábra. Vinblasztin (1) és vinkrisztin (2)

Az elmúlt években beigazolódott, hogy megfelelő molekulákkal kapcsolva a monomer vindolin (3) is hatékony daganatellenes hatású vegyületté alakítható [3-6]. Kutatócsoportunkban számos vindolintartalmú hibrid látott napvilágot, ezek között szerepelnek szteroiddal, aminosavakkal és szintetikus farmakofórokkal konjugált származékok [3-6]. Ezek közül számos vegyület jelentős daganatellenes hatást mutatott.



2. ábra. Vindolin (3) és katarantin (4)

Az általam végrehajtott kutatómunka új alkaloid-flavonoid hibrid molekulák előállítását célozta meg. A flavonoidok gyakran előforduló másodlagos növényi anyagcseretermékek [7,8]. Ezeknek a vegyületeknek számos élettani hatását leírták: található köztük antioxidáns [9], daganatellenes [7], gyulladáscsökkentő [10] és baktériumellenes [11] hatású származékok. Kutatócsoportunk figyelmét felkeltette, hogy a krizin (5,7-dihidroxi-flavon) (5) több daganatellenes hatású vegyülettel kombinációban alkalmazva szinergikus hatást mutatott [12]. Ez annak köszönhető, hogy a krizin (5) képes kölcsönhatást kialakítani ATP kötőhelyekkel, és

⁺ Mayer Szabolcs PhD értekezéséhez kapcsolódó tézisfüzet alapján készült

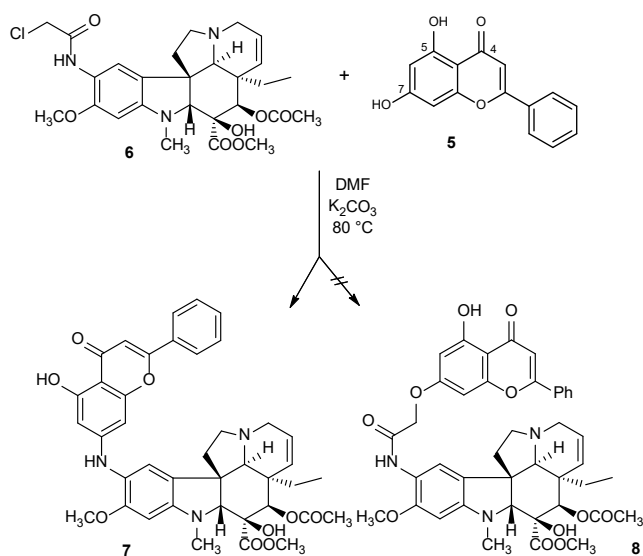
* Tel.: +36 1 463 2208, e-mail: keglevich.peter@vbk.bme.hu

ily módon gátolni tudja azokat az aktív transzportereket, amelyek a gyógyszermolekulák eltávolítását célozzák meg. A daganatos sejtek túlzó mértékben fejezik ki ezeket sejt-felszínükön, amelynek eredménye a gyógyszerrezisztencia. Ezek a pumpák ATP hidrolízissel fedezik az energiaszükségleteiket, gátlással a krizin (5) a rezisztencia csökkenésével képes növelni a daganatellenes szer hatékonyságát.

2. Eredmények

2.1. Vindolin (3) - krizin (5) hibrid előállítás

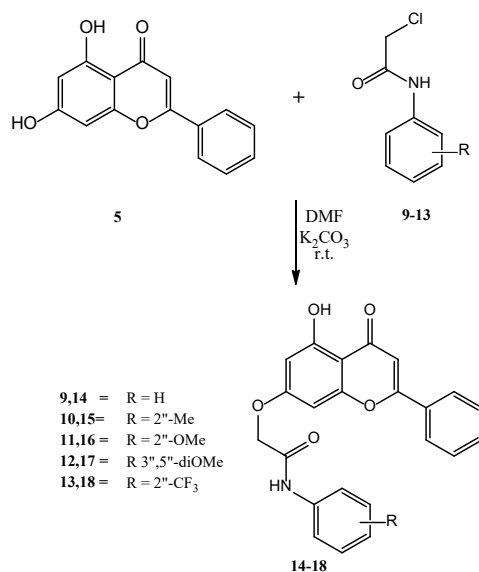
Kísérleteimet a vindolin (3) 10-es helyzetében történő linker kialakításával kezdtem. Az ehhez vezető módszer (halogénezés, nitrálás, redukció) kutatócsoportunkban ismert eljárás. A reakciósorban kapott 10-aminovindolint (25) klóracetil-kloriddal acileztem. A kapott 10-klóracetamidovindolinnal (6) kívántam alkilezni a krizint annak 7-es helyzetében. A regioselektivitás a krizin (5) 5-ös és 4-es helyzetű funkciócsoportjai között kialakuló hidrogénhidás kötéssel magyarázható. A reakciót többször végrehajtva a várt származékot (8) nem sikerült izolálni. A reakció terméke minden esetben egy linkert nem tartalmazó, difenil-amin típusú vegyület (7) volt (3. ábra).



3. ábra. A difenil-amin típusú hibrid előállítása

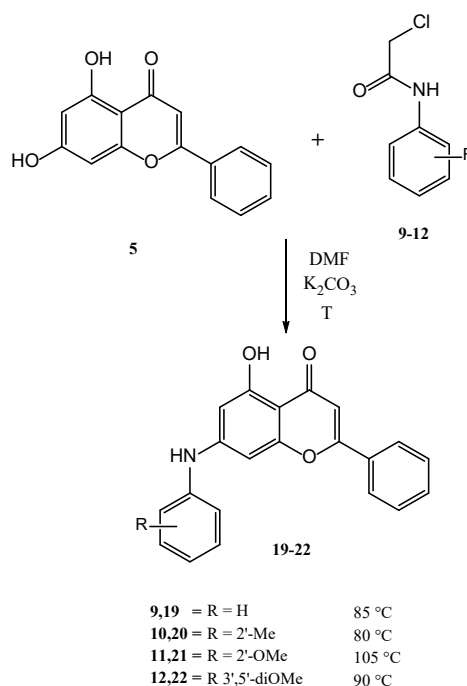
2.2. Modellkísérletek a reakciómechanizmus igazolására

A reakció feltételezett mechanizmusának kiderítése végett egy sor modellkísérletet hajtottam végre különbözően szubsztituált 2-klór-*N*-aril-acetamidokkal (9–13), amelyek a vindolin aromás gyűrűjét modellezték. A reakciók szobahőmérsékleten a várt alkilezett származékokat (14–18) eredményezték (4. ábra).



4. ábra. Szobahőmérsékleten végzett modellkísérletek

A modellkísérleteket magasabb hőmérsékleten végrehajtva sok esetben sikeresen izoláltam difenil-amin típusú vegyületeket (19–22) (5. ábra).



5. ábra. Magasabb hőmérsékleten végzett modellreakciók

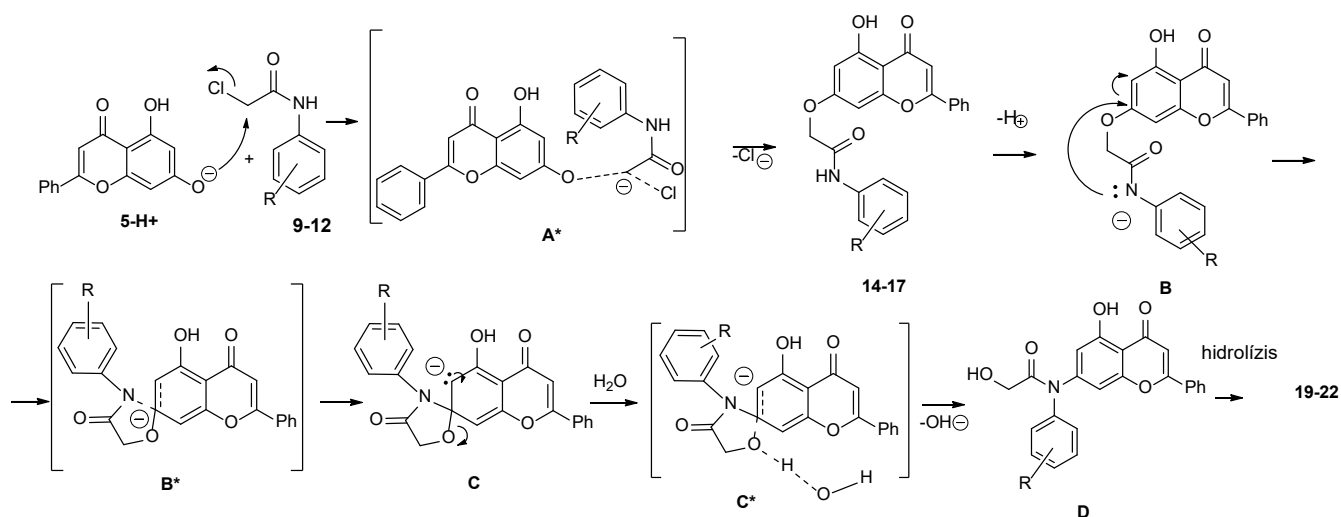
Ezeket a reakciókat HPLC-MS segítségével követtük, amely során beigazolódott, hogy a nemvárt termékhez három konzekutív lépésen keresztül lejátszódó folyamat vezet. Az első lépés a krizin (5) alkilezése, amit Smiles-átrendeződés követ, amely során deprotonálódás (B) után egy intramolekuláris nukleofil támadás játszódik le. Majd a kialakuló spiro-oxazolidinon gyűrűt tartalmazó köztitermék (C) felnyílik. A folyamatot a D savamid intermedier hidrolízise

zárja le (6. ábra). A hidrolízishez szükséges vizet az oldószerként használt DMF víztartalma és a bázisként alkalmazott Na_2CO_3 -ból képződő szénsav termikus bomlása során keletkező vízmolekulák biztosítják. A modellkísérletek végrehajthatóak one-pot a krizin (5) és a választott acetamid közvetlen reakciójában, illetve a kipreparált intermedier ariloxi-acetamid származékok önálló átrendezésével is. A választott acetamidok között a 13 vegyület elektronban hiányos aromás rendszert tartalmaz. Ezen képviselővel a reakciót magasabb hőmérsékleten végrehajtva a Smiles-átrendeződés kétszeresen játszódott le, és a linker átfordult a két molekularész között (7. ábra). Ez annak köszönhető, hogy a spiro-laktámgyűrűt tartalmazó intermedier (G) felnyílását követően az elektronszegény aromás rendszeren könnyedén lejátszódik egy második intramolekuláris aro-

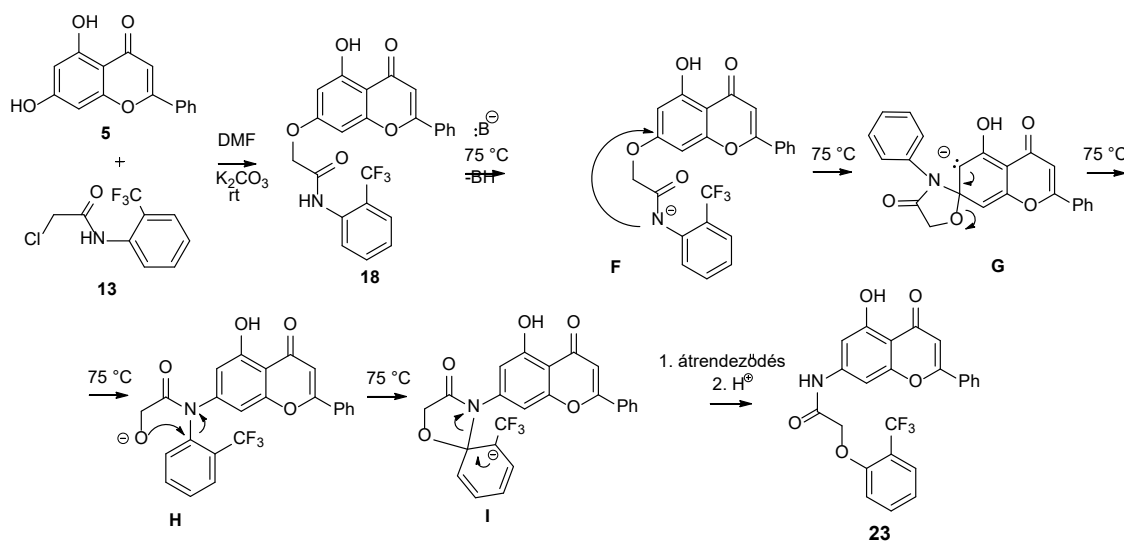
mas nukleofil szubsztitúció. A kialakuló intermedier (I) gyűrűjének felnyílása így az alkilezett származékra hasonlító, de a linkert fordított konstitúcióban tartalmazó származékot eredményez (23).

2.3. További vindolin (3) - krizin (5) hibridek szintézise

Az eredetileg célul kitűzött hibrid (8) előállítása érdekében a Cho és munkatársai által leírt módszert alkalmaztuk [13]. Ez esetben a krizin (5) 7-es helyzetében alakítottunk ki kétszénatomos linkert, és a kapott ariloxi-ecetsav származékkal (24) acileztük a 10-aminovindolint (25) EDCI (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid) és DMAP



6. ábra. A konsekutív folyamat mechanizmusa



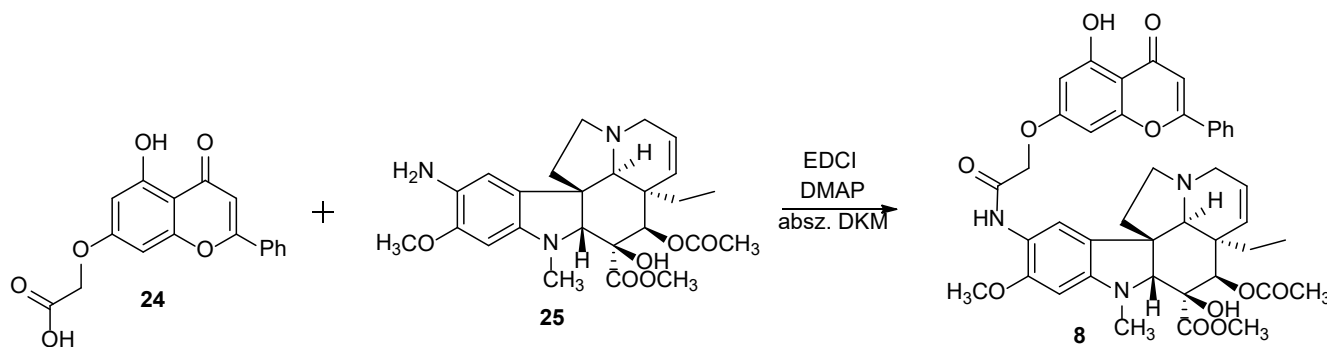
7. ábra. Kétszeres átrendeződés

(*N,N*-dimetil-4-aminopiridin) alkalmazásával, így sikeresen izoláltuk a **8** hibridet (8. ábra). Végül egy, a vindolin (**3**) 17-es helyzetén keresztül krizinnel (**5**) kapcsolt hibridet is előállítottunk. A vindolin (**3**) 17-es helyzetű acetilsoportja könnyen eltávolítható forró metanolban, nátrium-karbonát jelenlétében. A keletkező 17-deacetyl-vindolin (**26**) Steglich-féle észteresítése DCC (*N,N*-diciklohexil-karbodiimid) és DMAP segítségével kutatócsoportunkban rendszeresen alkalmazott eljárás különböző ω -halogén-karbonsavakkal. A kapott halogénvegyülettel (**27**) 7-es helyzetben alkileztük a krizint (**5**) így egy 17-helyzetben konjugált hibridhez (**28**) jutottunk (9. ábra).

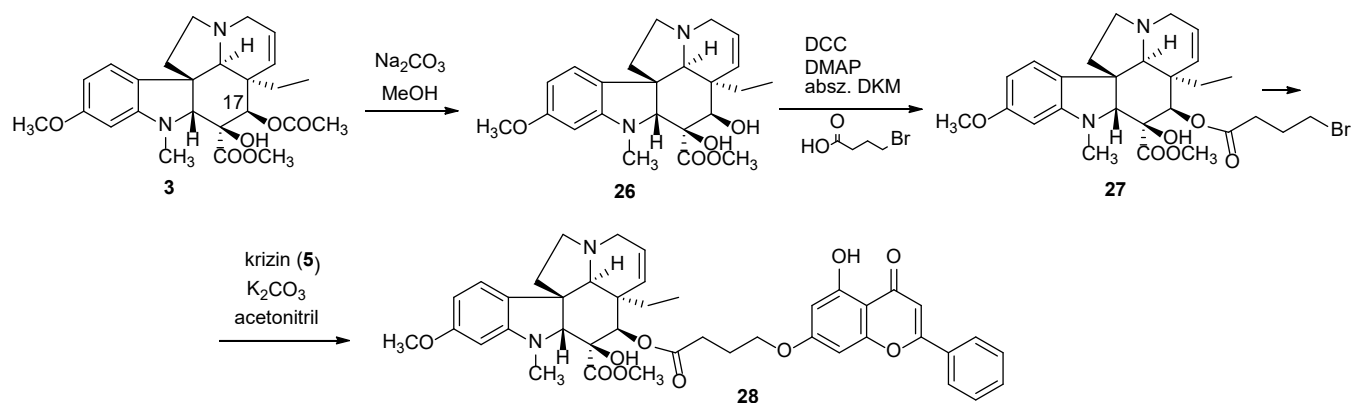
2.4. *In vitro* biológiai vizsgálatok

Az általunk előállított vegyületeket az amerikai NCI-ban (National Cancer Institute) *in vitro* sejtsztódásgátló vizsgálatoknak vetették alá 9 daganattípus 60 sejtvonalaán [14-

17]. A vegyületek tesztelése két körben történik, először ún. egydózisú vizsgálatokon esnek át. Ezek során 10 μ M-os koncentrációban kezelik a daganatos sejteket a vizsgált vegyülettel és egy referenciához képest 48 óra inkubálást követően százalékos sejtsztódásgátló hatást adnak meg. Azok a vegyületek, amelyek megfelelő eredményt mutatnak második körös vizsgálatokra kerülhetnek. Az ötdózisú vizsgálatok során egy dózis intervallumban (10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M és 100 μ M) több mintát inkubálnak 48 órán keresztül a referencia mellett. Ezekben az esetekben is százalékos sejtsztódásgátló hatást állapítanak meg a beállított dózison, amelyek segítségével három inhibíciós állandót tudnak meghatározni a kapott értékek közötti interpolációval. Ezek az értékek GI₅₀ (50 %-os sejtsztódásgátlást okozó dózis), TGI (sejtnövekedést teljes mértékben gátló dózis), LC₅₀ (50 %-os sejthalált okozó dózis).



8. ábra. Ariloxi-acetamid típusú hibrid előállítása



9. ábra. A vindolin 17-es helyzetében konjugált hibrid előállítása

Az előállított hibridek közül a **8** vegyület jelentős daganatellenes hatást mutatott. A vegyület az 1. táblázat által bemutatott sejtvonalaakon a vinblasztinhoz (**1**) mérhető vagy azt meghaladó sejtsztódásgátló hatással rendelkezett. A modellvegyületek (**9-13**) kiválasztása nem volt véletlenszerű, hasonló szerkezetű ariloxi-acetamid származékok haté-

konynak bizonyultak, mint tirozin-kináz inhibitorok [13]. Esetünkben az alkilezett származékok (**14-18**) a **18** vegyület kivételével hatástalannak bizonyultak. Átrendezve őket a megfelelő difenil-amin származékokká a daganatellenes hatás a legtöbb esetben (**20-22**) kiemelkedő értékeket mutatott (1. táblázat).

3. Összefoglalás

Munkánk során sikeresen előállítottunk több új alkaloid – flavonoid hibrid molekulát (7, 8, 28). A daganatellenes hatással nem rendelkező vindolint (3) krizinnel (5) konjugálva, egy a vinblasztin (1) hatékonyságát egyes sejtvonalakon megközelítő származékot (8) állítottunk elő. Egy eddig még nem alkalmazott módszer segítségével enyhe reakciókörülmények között sikerült difenil-amin típusú flavonoidszármazékokat előállítani, amelyek közül több (20-22) jelentős daganatellenes hatással rendelkezett.

4. Kísérleti rész

Munkánk során preparatív szerveskémiai módszereket alkalmaztunk. A reakciókat vékonyréteg-kromatográfiás (VRK) technikával követtük. A termékek tisztítása kromatográfiás módszerekkel történt, tisztaságukat és molekulaszerkezetüket spektroszkópiás és tömegspektrometriás mérések támasztják alá. Az NMR és MS spektrumok felvételét és értékelését a Richter Gedeon Nyrt. Szerkezetkutató Osztályának munkatársai végezték. Az előállított vegyületek szintézisét és fizikai jellemzőit korábban közöltük [18,19].

1. táblázat. *In vitro* vizsgálatok során mért GI_{50} értékek. Az adott sejtvonalhoz tartozó, vinblasztinnál (1) alacsonyabb értékeket vastagon kiemeltük

	1	8	18	20	21	22
Sejtvonal	GI_{50} (μ M)					
Nem-kissejtes tüdőrák						
EKVX	11,4	2,00	9,37	3,35	4,83	0,64
NCI-H226	25,6	1,81	2,28	4,11	4,38	1,25
Melanóma						
SK-MEL-2	0,02	2,00	1,51	2,44	5,62	0,79
SK-MEL-28	1,11	1,75	n.a.	n.a.	3,64	2,78
UACC-257	2,05	1,80	>100	n.a.	6,72	n.a.
Petefészekrák						
SK-OV-3	4,94	2,15	14,9	5,56	3,57	0,40
Veserák						
TK-10	7,15	2,15	1,88	n.a.	10,4	10,7
UO-31	0,02	1,6	2,44	n.a.	3,57	0,62
Emlőrák						
T47-D	8,59	1,79	2,54	2,96	4,36	0,21
MCF-7	<0,01	1,52	7,4	0,38	1,50	0,03
Vastagbélrák						
HCT-15	<0,01	1,55	3,28	0,68	1,65	0,06

Hivatkozások

- Blasko, G., Cordell, G.A., Isolation, Structure Elucidation, and Biosynthesis of The Bisindole Alkaloids of *Catharanthus*, *The Alkaloids*, Edited by Brossi, A. and Suffness, M., Academic Press Inc., New York, USA, vol. 37, pp. 1–76, **1990**.
[https://doi.org/10.1016/S0099-9598\(08\)60092-9](https://doi.org/10.1016/S0099-9598(08)60092-9)
- Jordan, M., Kamath, K. How Do Microtubule-Targeted Drugs Work? An Overview, *Curr. Canc. Drug Targ.*, **2007**, 7, 730–742.
<https://doi.org/10.2174/156800907783220417>
- Keglevich, A., Dányi, L., Rieder, A., Horváth, D., Szigetvári, Á., Dékány, M., Szántay, C., Jr., Latif, A.D., Hunyadi, A., Zupkó, I., Keglevich, P., Hazai, L. Synthesis and Cytotoxic Activity of New Vindoline Derivatives Coupled to Natural and Synthetic Pharmacophores. *Molecules* **2020**, 25, 1010–1028.
<https://doi.org/10.3390/molecules25041010>
- Keglevich, A., Zsiros, V., Keglevich, P., Szigetvári A., Dékány, M., Szántay, Cs. Jr., Mernyák, E., Wölfling, J., Hazai, L. Synthesis and *In Vitro* Antitumor Effect of New Vindoline-steroid Hybrids. *Curr. Org. Chem.*, **2019**, 23, 959–967.
<https://doi.org/10.2174/1385272823666190614113218>
- Keglevich, A., Szigetvári A., Dékány, M., Szántay, Cs. Jr., Keglevich, P., Hazai, L. Synthesis of *vinca* alkaloid–triphenylphosphine derivatives having potential antitumor effect, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.*, **2019**, 194, 606–609.
<https://doi.org/10.1080/10426507.2018.1550780>
- Bánóczy, Z., Keglevich, A., Szabó, I., Randelović, I., Hegedűs, Z., Regenbach, F.L., Keglevich, P., Lengyel, Z., Gorka-Kereskényi, Á., Dubrovay, Z., Háda, V., Szigetvári, Á., Szántay Cs. Jr., Hazai L., Tóvári, J., Hudecz, F. The effect of conjugation on antitumor activity of vindoline derivatives with octaarginine, a cell-penetrating peptide. *J. Pept. Sci.*, **2018**, 24, e3118.
<https://doi.org/10.1002/psc.3118>
- Raffa, D., Maggio, B., Riamondi M.V., Plescia, F., Daidone, G. Recent discoveries of anticancer flavonoids, *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 142, 213–228.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.034>
- Midelton, E. Jr., Kandswami, C. *The Flavonoids – Advances in Research Since 1986* (Ed.: J. B. Harborne), Chapman and Hall, Cambridge, **1993**, 619–652. ISBN 978-1-4899-2915-0
- Catapano, A.L. Antioxidant effect of flavonoids, *Angiology*, **1997**, 48, 39–44.
<https://doi.org/10.1177/000331979704800107>
- Read, M.A. Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents, *Am. J. Pathol.* **1995**, 147, 235–237.
- Boubakeur, B., Tirtouil, A., Meddah, B., Khadem, H. The evaluation of the effect of synthetic flavonoids on growth of pathogenic and probiotic bacteria, *J. Chem. Pharm. Res.*, **2015**, 7, 228–236.
- Brechbul, H.M., Kachadourian, R., Min, E., Chan, D., Day, B.J. Chrysin enhances doxorubicin-induced cytotoxicity in human lung epithelial cancer cell lines: the role of glutathione, *Toxicol Appl. Pharmacol.*, **2012**, 258, 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.08.004>
- Choe, H., Kim, J., Hong, S. Structure-based design of flavone-based inhibitors of wild-type and T3151 mutant of ABL, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 4324–4327.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.05.095>

14. Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R.H., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, L., Boyd, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines, *J. Natl. Cancer Inst.*, **1991**, *83*, 757–766.
<https://doi.org/10.1093/jnci/83.11.757>
15. Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A.M., Hursey, L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R. Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay, *Cancer Res.*, **1988**, *48*, 589–601.
16. Shoemaker, R.H., Monks, A., Alley, M.C., Scudiero, D.A., Fine, D.L., McLemore, T.L., Abbott, B.J., Paull, K.D., Mayo, J.G., Boyd, M.R. Development of Human Tumor Cell Line Panels for Use in Disease-Oriented Drug Screening., *Prog. Clin. Biol. Res.*, **1988**, *276*, 265–286.
17. NCI-60 Screening Methodology (https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/methodology.htm, Aug, 2015, last accessed: 21/02/2022)
18. Mayer, Sz., Keglevich, P., Ábrányi-Balogh, P., Szigetvári, Á., Dékány, M., Szántay, Cs. Jr., Hazai, L. Synthesis and In Vitro Anticancer Evaluation of Novel Chrysin and 7-Aminochrysin Derivatives, *Molecules*, **2020**, *25*, 888–901.
<https://doi.org/10.3390/molecules25040888>
19. Mayer, Sz., Nagy, N., Keglevich, P., Szigetvári, Á., Dékány, M., Ifj. Szántay, Cs., Hazai, L. Synthesis of Novel Vindoline-Chrysin Hybrids, *Chem. Biodiversity*, **2022**, *19*, e2100725.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.202100725>

Synthesis of vindoline – chrysin derivatives with antitumor effect

The research of *Vinca* alkaloids has a decades-long tradition at the Alkaloid Chemistry Research Group at the Department of Organic Chemistry and Technology, Budapest University of Technology and Economics. These natural compounds which consist of an indole skeleton were firstly isolated from the periwinkle *Catharanthus roseus* native to Madagascar [1]. Among these compounds which share the natural source, the bisindoles (e.g. vinblastine (**1**), vincristine (**2**)) have cytotoxic effects, while the monomers building up the dimers have no anticancer effect at all. *Vinca* alkaloids suppress the mitotic (M) phase of the cell cycle [2]. During this phase, the forming mitotic spindle is responsible for the appropriate segregation of chromosomes. The mitotic spindle consists of two centrosomes and lots of emerging microtubules, which are highly dynamic structures with fast polymerization, depolymerization kinetics. *Vinca* alkaloids suppress the microtubule kinetics, and therefore the proper functioning of the mitotic spindle, which leads to apoptosis. During the last years, it has been shown that conjugating the monomeric vindoline (**3**) with appropriate compounds can result in highly efficient cytotoxic molecules [3–6]. Our research group has synthesized several vindoline hybrids containing steroids, amino acids, and synthetic pharmacophores [3–6]. Here we show the synthesis of novel alkaloid – flavonoid hybrids. Flavonoids are common secondary plant metabolites [7,8]. These compounds have different biological activities as antioxidant [9], anticancer [7], anti-inflammatory [10], and antibacterial [11]. Chrysin (**5**) (5,7-dihydroxyflavone) has shown synergic effect with some well-known anticancer agents [12]. This is due to the fact that chrysin (**5**) can occupy ATP binding sites, and therefore inhibit the cell membrane transporters which are responsible for pumping out drug molecules from the cell. Malignant cells can overexpress these transporters and therefore develop resistance against the anticancer molecule. Chrysin can occupy the ATP binding site of these active transporters and inhibit the elimination of drug molecules.

The starting step of our work was the formation of a spacer at position 10 of vindoline (**3**). 10-Aminovindoline (**25**) was acylated with chloroacetyl chloride, then chrysin (**5**) was reacted with the resulting 10-chloroacetamidovindoline (**6**) at position 7 of chrysin (**5**). The product of this reaction was not the expected hybrid (**8**) but a diphenylamine type molecule (**7**) after several experiments.

We performed model reactions to ensure the proposed mechanism using substituted aryl acetamides (**9–13**). The reactions which

were performed at room temperature resulted in the expected alkylated compounds (**14–18**) (fig 3.). The experiments were then repeated at elevated temperatures, and in most of the cases diphenylamine derivatives (**19–22**) could be isolated (fig 4.). These reactions were monitored *via* a HPLC-MS system and found to be a 3-step consecutive process. The first step is the alkylation of chrysin (**5**), which is followed by a Smiles rearrangement, and a hydrolysis. In the case of compound **13**, the acetamide is containing an electron-withdrawing group (CF₃) on the aromatic ring, and therefore the rearrangement occurs twice (fig 4.).

To obtain the originally aimed hybrid we have utilized a reverse coupling order described by Cho et al. [13]. The linker was built up on chrysin, and 10-aminovindoline (**25**) was reacted with the intermediate **24**. In this case, the hybrid (**8**) was isolated successfully (fig. 8). A further hybrid was synthesized *via* position 17 of vindoline. The 17-ester function of vindoline can be easily hydrolysed in boiling methanol using Na₂CO₃. The resulting 17-deacetylvindoline (**26**) was reacted with 4-bromobutyric acid. Chrysin (**5**) was reacted with the intermediate **27** resulting in a new hybrid molecule (**28**) (fig. 9).

The hybrids were tested by the NCI (National Cancer Institute, USA) on 60 cell lines of 9 common cancer types [14–17]. Amongst the synthesized molecules compound **8** has shown prominent anticancer activity. On cell lines shown in table 1, the GI50 values are similar or lower as compared to vinblastine (**1**). Similar structures of our model compounds (**9–13**) had shown prominent biological effects in terms of cell proliferation inhibition as tyrosine kinase inhibitors [13]. In our case, aryloxy acetamides (**14–18**) were not found to be potent except compound **18**. The rearranged diphenylamine compounds (**20–22**), however, showed prominent *in vitro* activity (table 1).

During the experiments, we utilised common preparative methods. The compounds were purified with preparative thin-layer chromatography, the purity was measured by spectroscopic, and spectrometric methods. The NMR and MS spectra were taken and evaluated by the co-workers of the Spectroscopic Research Department, Gedeon Richter Plc. The synthetic methods of the described compounds have been published before [18–19].