



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

III. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2019ko maiatzaren 27, 28 eta 29
Baiona, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Aktibitate antiproliferatiboa duten
konposatu heterozikliko
fosforodunen prestaketa:
I topoisomerasaren inhibitzaile
berrien diseinua, sintesia eta
ebaluazio biologikoa**

*Asier Selas, Concepción Alonso,
Gloria Rubiales eta
Francisco Palacios*

153-158 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iii.05.21>



Aktibitate antiproliferatiboa duten konposatu heterozikliko fosforodunen prestaketa: I topoisomerasaren inhibitzaile berrien diseinua, sintesia eta ebaluazio biologikoa

Selas, Asier; Alonso, Concepción; Rubiales, Gloria eta Palacios, Francisco

Kimika Organikoa I saila, Farmazia Fakultatea eta Lascaray Ikerketa Zentroa (Lascaray Research Center), Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

asier.selas@ehu.eus

Laburpena

Lan honetan aktibitate antiproliferatiboa duten TopI-aren inhibitzaile berrien sintesia eta ebaluazio biologikoa aurkezten da. Fosforodun kinolina deribatuen hainbat konposatu serie diseinatu dira eta Povarov erreakzio multikonponentearen bitartez eraginkorki sintetizatuak izan dira. Prestatutako konposatu berriek oro har TopI-arekiko inhibizio balio onak aurkeztu dituzte, baita aktibitate antiproliferatibo esanguratsua hainbat minbizi-lerro zelularretan.

Hitz gakoak: I Topoisomerasa, Kinolina, Fosforoa, Antiproliferatiboa.

Abstract

In this work we report the synthesis and biological evaluation of candidates for novel TopI inhibitors with antiproliferative activity. Some series of phosphorus containing quinoline derivatives were rationally designed and efficiently synthesized by the multicomponent Povarov reaction. Most of the newly prepared compounds have shown a promising TopI inhibitory values and a good antiproliferative activity against different cancerous cell lines.

Keywords: Topoisomerase I, Quinoline, Phosphorus, Antiproliferative.

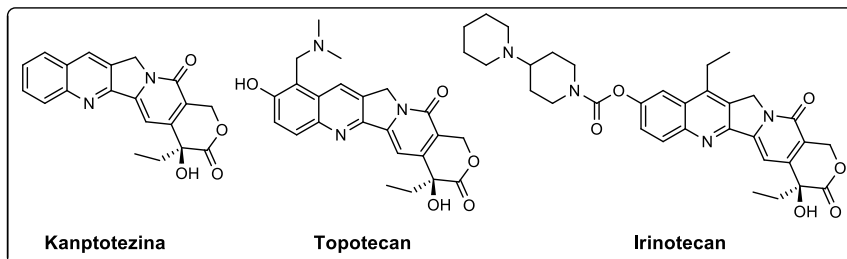
1. Sarrera eta motibazioa (Formatu orokorra eta bibliografia)

Topoisomerasak DNAREN topologian eragiten duten entzimak dira, DNA kate bikoitza kiribiltzen edo deskiribiltzen dute beharren arabera (Pommier, 1998). I topoisomerasa hain zuzen, DNAREN kate batean ebakia eginez kate bikoitza deskiribiltzen du tentsio suprahelikoidala murrizteko, hortaz, ezinbesteko entzima da ziklo zelularren hainbat prozesuetarako (erreplikazioa, transkripzioa eta konponketa) (Pommier, 1998).

TopI-a interes handiko iturri biomolekularra bilakatu da Kimika Medikoko arloan: giza TopI-aren inhibitzaileak diren kanptotezinaren deribatuak gaur egun klinikan minbiziaren tratamendurako farmako bezala erabiltzen dira (beste egitura kimikoa duten hainbat konposatu ere fase preklinikoan daude) (Pommier, 2009); Gainera, Leishmaniaren eta *Mycobacterium tuberculosis*aren TopI-ak (LTopIB eta MtopoI hurrenez hurren) ere iturri terapeutikotzat ikertzen ari dira, hauen inhibitzaileak

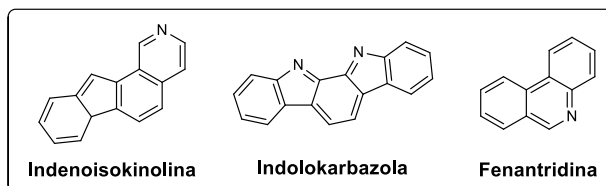
gaixotasun hauen aurkako potentziala aurkezten dutela ikusita (Balaña-Fouce et al., 2012) (Green et al., 2013).

1. irudia. Kanptotezina eta deribatuen egitura kimikoa



Lehen esan bezala, TopI-aren inhibitzaileetatik soilik kanptotezina deribatuak daude klinikoki onartuta minbiziaren tratamendurako (Topotecan eta Irinotecan), baina konposatu hauek hainbat limitazio fisiko-kimiko aurkezten dituzte: alde batetik, laktona eraztuna ezinbestekoa da bere eraginkortasun biologikorako, baina aldi berean bere ezegonkortasun kimikoa eragiten du, erraztasunez zabalzen delako (Zihou et al., 1994). Bestetik, bere administrazioan eragin zuzena duten disolbagarritasun arazoak ere aurkezten dituzte (Martino et al., 2017). Muga hauek gainditzeko kanptotezina deribatuak (CPT deribatuak) ez diren beste konposatu kimiko batzuk garatu dira, non hauetako batzuk fase preklinikoan daude jada (Pommier, 2009).

2. irudia. Kanptotezina deribatuak ez diren TopI-aren inhibitzaileen oinarriko egitura esanguratsuak (heteroziklo nitrogenatuak)



Hau dena kontuan hartuz, TopI-aren inhibitzaile berrien garapena interes zientifiko handiko ikerketa arloa iruditzen zaigu eta Kimika Organikoko saila bezala ekarpen garrantzitsua egin dezakegula uste dugu, TopI inhibitzaile berrien diseinu arrazionala eginez (egitura-aktibitate erlazioak Docking Molekularreko metodologia osagarriekin burutuz), sintesiako metodologia egokiak ikertuz eta garatuz, eta gure sailean ezarritako entsegu biologikoekin aktibitate biologikoa aztertuz. Hori dela eta, gure ikerketa taldean lehen belaunaldiko TopI-aren inhibitzaileak garatu ziren eta orain, optimizazio prozesu iteratibo baten bitartez (diseinua, sintesia eta emaitza biologikoen artekoa) aktibitate biologikoa hobetzeko helburuarekin egitura aldaketak proposatzen ditugu.

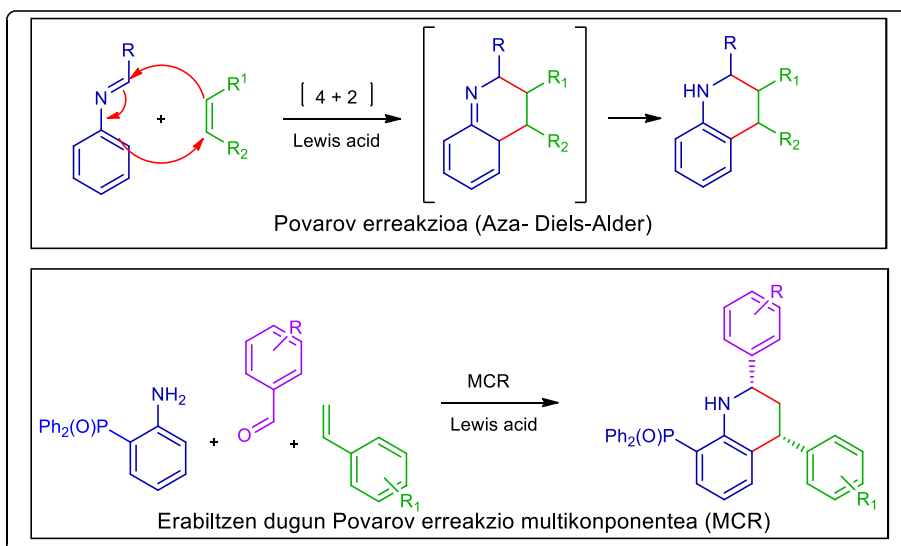
2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak (Azpiatalak eta zerrendak)

Lehen aipatu dugun bezala, TopI-a itu terapeutiko garrantzitsua da gaur egun eta honen inguruan TopI-aren inhibizioaren ikerketa gai interesgarria bilakatu da.

Interes zientifiko honi erantzuna emanez, gure ikerketa taldean naftiridina egitura duten lehen belaunaldiko TopI-aren inhibitzaileak garatu izan dira eta konposatu hauen aktibitate inhibitzailea, antiproliferatiboa, antileishmaniasikoa eta antituberkulosoak neurtu izan da (Alonso et al., 2014). Emaitzek balio itxaropentsuak aurkeztu zituzten, konposatuak TopI-aren inhibitzaile bezala eraginkorrak direla ondorioztatuz eta serie berrien diseinu eta prestaketarako ateak irekiz. Hortaz, aurreko ikerketen emaitzei jarraipena emateko, lan honetan biltzen diren fosforodun kinolina deribatuen diseinua, sintesia eta ebaluazio biologikoa proposatu da, aurreko belaunaldiko konposatuen aktibitatea hobetzeko helburuarekin eta CPT deribatuen limitazio fisiko-kimikoak gainditzen dituztenak.

Lan honetako konposatu familien sintesi kimikorako Povarov erreakzioa aukeratu da, bertsio multikonponentean. Era honetan, fosforodun kinolina deribatuak metodologia sintetiko eraginkor eta garbi batez prestatzen dira (Lavilla et al., 2018), modu erraz batean egitura-aldakortasun handiko serieak errendimendu altuekin lortuz (Alonso et al., 2018).

3. irudia. Povarov erreakzioa eta lan honetarako erabili dugun Povarov erreakzio multikonponentea



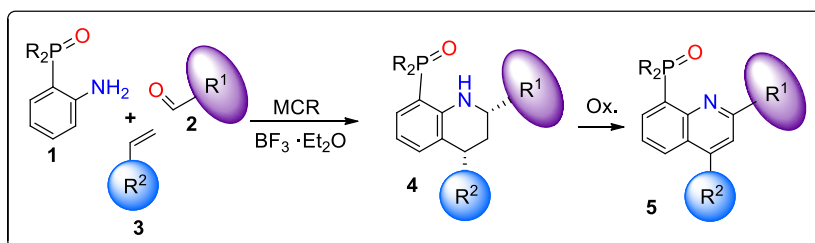
Ikerketa lan honen helburuak honako hauek dira:

- Povarov erreakzio multikonponentearen bidez, proposatutako fosforodun kinolina deribatuak sintetizatzea, ordezkatzaile ezberdin anitzekin.
- Prestatutako konposatuen ebaluazio biologikoa burutzea: TopI-aren inhibizio entseguak eta aktibitate antiproliferatiboa neurtzeko *in vitro* zitotoxizitate entseguak.
- Lortutako emaitzak aztertzea eta hurrengo konposatu serieen diseinurako erabiltzea, lortutako emaitzak SAR metodologiarekin (egitura-aktibitate erlazioak) eta Molecular Docking azterketekin lagunduta aldaketa estrukturalak egiteko behar izanez gero.

3. Ikerketaren muina

Lan honetan, Povarov erreakzioaren bitartez fosforodun kinolina deribatuak sintetizatu ziren (fosfanoxido taldea dutenak alegia), non fosforodun anilina batek (1), aldehido batek (2) eta olefina batek (3), erreakzio multikonponente baten bidez (4) tetrahidrokinolinak ematen dituzte. Ondoren, tetrahidrokinolinak deshidrogenatu ziren (5) kinolina aromatikoak eskuratzeko. 4. irudian erabilitako sintesi bidea ikus daiteke.

4. irudia. Kinolina deribatuaren sintesi bidea

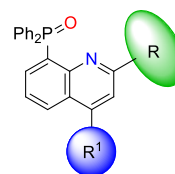
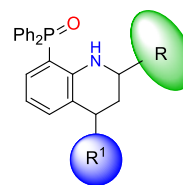


Ondoren, konposatuaren ebaluazio biologikoa burutu zen. Alde batetik, TopI-aren inhibizio entseguak egin ziren, non elektroforesi bitartez sintetizatutako konposatuak kanptotezina TopI-aren inhibizio aktibitatearekin alderatzen den. 1. taulan lortutako emaitzak irudikatzen dira. Oro har, prestatutako konposatuek inhibizio ahalmen esanguratsua lortu dutela ondorioztatu daiteke.

1. taula. Konposatuaren TopI-aren inhibizio entseguaren emaitzak

R ₁	R ₂	Inhibizioa		
		15''	1'	3'
Ph	Ph	++	++	-
<i>o</i> -MeO-C ₆ H ₄	Ph	+++	+++	++
1-naftil	Ph	++	++	+
<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	++	++	+
Ph	<i>p</i> -Me-C ₆ H ₄	+	+	-
Kanptotezina		++	++	-

R ₁	R ₂	Inhibizioa		
		15''	1'	3'
Ph	Ph	++	++	-
<i>o</i> -MeO-C ₆ H ₄	Ph	+++	+++	++
1-naftil	Ph	+++	+++	++
<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	++	++	-
Ph	<i>p</i> -Me-C ₆ H ₄	-	-	-
Kanptotezina		++	++	-



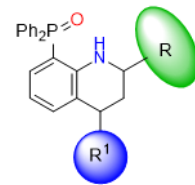
(- aktibitate ez, +++ kanptotezina baino aktibitate handiagoa, ++ kanptotezina adinako aktibitatea, + kanptotezina baino aktibitate gutxiago)

Bestalde, *in vitro* zitotoxizitate entseguak burutu ziren konposatuaren aktibitate antiproliferatiboa neurtzeko. Horretarako, hainbat minbizi-lerro zelular erabili ziren (A-549 giza birika adenokartzinoma, SKOV-3 giza obario adenokartzinoma) eta lerro zelular osasuntsu bat kontrol bezala (MRC-5 giza birika fibroblastoak). Orokorrean, konposatuek

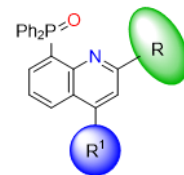
aktibitate antiproliferatibo ona aurkeztu dute minbizi-lerro zelularretan eskala mikromolarrean (bereziki A-549 lerroan), eta ez dute aktibitate zitotoxikorik erakutsi lerro osasuntsuan. Emaitzak xehetasun handiagoz ikusi daitezke 2. taulan.

2. taula. Konposatuen zitotoxizitate balioak linea zelular ezberdinetan

R ₁	R ₂	A-549 IC50 ± d.e.	SKOV-3 IC50 ± d.e.	MCR-5 IC50 ± d.e.
Ph	Ph	1,72±0,20	>50	>50
o-MeO- C ₆ H ₄	Ph	0,21±0,03	>50	>50
1-naftil	Ph	3,57±0,31	>50	>50
p-F-C ₆ H ₄	p-F-C ₆ H ₄	0,25±0,03	17,79±5,45	>50
Ph	p-Me-C ₆ H ₄	1,20±0,12	>50	>50
Kanptotezina		(1,0±0,06)·10 ⁻³	(5,5±0,01)·10 ⁻³	-



R ₁	R ₂	A-549 IC50 ± d.e.	SKOV-3 IC50 ± d.e.	MCR-5 IC50 ± d.e.
Ph	Ph	1,21±0,68	14,46±2,27	>50
o-MeO- C ₆ H ₄	Ph	3,11±0,65	13,06±1,80	>50
1-naftil	Ph	6,32±1,09	>50	>50
p-F-C ₆ H ₄	p-F-C ₆ H ₄	3,82±0,42	6,77 ± 0,85	>50
Ph	p-Me-C ₆ H ₄	7,65±0,90	17,38±1,58	>50
Kanptotezina		(1,0±0,06)·10 ⁻³	(5,5±0,01)·10 ⁻³	-



4. Ondorioak

Ordezkatzaile anitzez funtzionalizatutako fosforodun kinolina deribatuak sintetizatu dira Povarov erreakzio multikonponentearen bitartez, P(O)Ph₂ fosforodun taldearekin.

Prestatutako produktuei ebaluazio biologikoa egin zaie TopI inhibizio aktibitatea eta aktibitate antiproliferatiboa neurtzeko. Oro har, konposatuek TopI-ren inhibizio balio esanguratsua aurkeztu dituzte eta *in vitro* zitotoxizitate balio onak ere lortu dituzte hainbat minbizi-lerro zelularretan (eskala mikromolarrean), eta ez dute eragin zitotoxikorik aurkeztu MRC-5 lerro-zelularrean (osasuntsua).

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetatik abiatuta, berehalako etorkizunerako hainbat erronka planteatzen dira. Alde batetik, egitura-aktibitate erlazio azterketa egitea proposatzen da PO(OEt)₂ taldearekin, eta etil fosfonatoa erabili ordez tamaina handiagoko bat erabiliz (isopropil fosfonatoa alegia). Bestetik, sintesia era jasangarriago batean egitea ahalbidetuko lukeen estrategia sintetikoa proposatzen da, Povarov erreakzio auto-oxidatiboa delakoa, oxidatzaile kimiko klasikoak erabili ordez.

Aurrekoaz gain, prestatutako konposatuek agente antileishmaniasiko bezala duten potentziala ebaluatuko da, *Leishmania infantum* espeziearen TopIB-arekiko duen aktibitate inhibitzailea aztertuz eta espezie honen promastigote zein makrofago barneko amastigoteetan duten aktibitate antileishmaniala ikertuz.

6. Erreferentziak

- Alonso C. et al., (2014): "Synthesis and biological evaluation of 1,5-naphthyridines as topoisomerase I inhibitors. A new family of antiproliferative agents", *Curr Top Med Chem.*, 14, 2722-2728.
- Alonso C. et al., (2018): "Novel topoisomerase I inhibitors. Syntheses and biological evaluation of phosphorus substituted quinoline derivatives with antiproliferative activity", *Eur J Med Chem.*, 149, 225-237.
- Balaña-Foce R. et al. (2012): "Indotecan (LMP400) and AM13-55: two novel indenoisoquinolines show potential for treating visceral leishmaniasis, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56, 5264-5270.
- Green K.D. et al. (2013): "Resistance in tuberculosis: what do we know and where can we go?", *Front Microbiol.*, 4 (208), 1-7.
- Lavilla R. et al., (2018): "Recent advances of the Povarov reaction in medicinal chemistry", *Drug Discovery Today: Technologies*, 29, 71-79.
- Martino E. et al., (2017) "The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs", *Bioorg Med Chem Lett.*, 27, 701-707.
- Pommier Y. (1998): "Diversity of DNA topoisomerases I and inhibitors", *Biochimie*, 80, 255-270.
- Pommier Y. (2009): "DNA Topoisomerase I Inhibitors: Chemistry, Biology, and Interfacial Inhibition", *Chem. Rev.*, 109, 2894-2902.
- Zihou M. et al., (1994) "Differential Interactions of Camptothecin Lactone and Carboxylate Forms with Human Blood Components", *Biochemistry*, 33, 10325-10336.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi dizkiot nire ikerketa lerroko kideei, Gloria Rubiales, María Fuertes eta Endika Martín doktoreei eta bereziki nire tesi zuzendariei, Patxi Palacios profesoreari eta Kontxi Alonso doktoreari. Baita EHUko Gasteizko Kimika Organikoa I saileko beste kide guztiei, eta gure ikerketetarako dirulaguntza eman dizkiguten erakunde publikoei ere (Eusko Jaurlaritzari eta Espainiar Ekonomia, Industria eta Kompetitibitate Ministerioari).