

A PTE GYTK Gyógyszerészi Kémiai Intézetben folyó kutatásokról

I. Szerkezet-reaktivitás és szerkezet-hatás vizsgálatok

ROZMER Zsuzsanna, KENARI Fatemeh, TYUKODI Levente, KULCSÁR Győző,
HUBER Imre és PERJESI Pál*

PTE GYTK Gyógyszerészi Kémiai Intézet, Rókus utca 2., 7624 Pécs, Magyarország

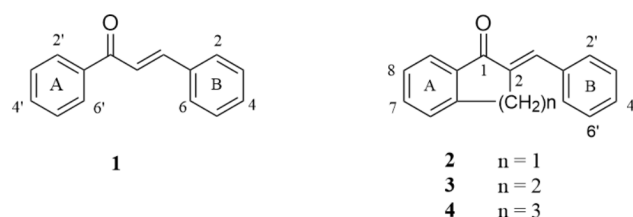
1. Bevezetés

A Gyógyszerészi Kémiai Intézet 2002. január 1-én alakult, mint a Pécsen 2000-ben indult gyógyszerészképzés egyik szakintézete. Az intézet végleges helyének kialakítása 2003. októberétől kezdődhetett meg. Az adminisztratív ügyek intézésére és az oktatással kapcsolatos feladatainak ellátására - 2002. augusztusától – 2003. októberéig – a PTE Egyetemi Gyógyszertár két helyiségében kapott ideiglenes elhelyezést. A munkatársak 2003. november elején foglalták el a Rókus utcai épület földszinti helyiségeit. Ezt követően kezdődött meg az intézet kutató laboratóriumainak és kutatási profiljainak kialakítása. Az intézetben jelenleg két egymással szorosan kapcsolódó, de tematikusan különböző területen – szerkezet-reaktivitás és szerkezet-hatás vizsgálatok, valamint *in vitro* és *in vivo* gyógyszermetabolizmus vizsgálatok – folyik kutatómunka. Jelen közlemény az előbbi területen folytatott vizsgálatok néhány fontosabb eredményeit mutatja be.

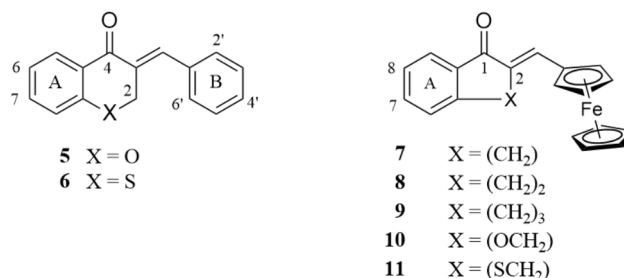
2. Eredmények

2.1. Kalkonok, gyűrűs kalkonanalógok és kurkuminoidok szintézise

A kalkonokkal és gyűrűs kalkonanalógokkal folytatott kutatások szerves folytatását képezik az intézet alapító professzorának az 1990-es évek elején a PTE ÁOK Orvosi Kémiai Intézetben megkezdett munkájának. A természetes kalkonok (**1**) a flavonoidok bioszintetikus prekursorai, melyek számos kedvező biológiai hatással, így antioxidáns, antimikrobiális, gyulladáscsökkentő és sejtprolifrációt gátló hatással bírnak (1. Ábra).^{1,2} A korábbi munkák során nagyszámú, a kalkon szerkezeti elemét magában foglaló, öt-, hat-, és héttagú karbociklusos (**2-4**), valamint hattagú heterociklusos (X=O,S) kalkonanalógokat (**5,6**) szintetizáltunk (1. és 2. Ábra).^{3,4,5} A konjugált vegyületek három meghatározó szerkezeti eleme a két aromás (benzol) gyűrű és az azokat összekötő enon molekularész. A legtöbb természetes és szintetikus kalkon (*E*) geometriájú *s*-cisz konfigurációjú 1,3-diarilszubsztituált enon.⁶



1. Ábra. A kalkonok (**1**) és a gyűrűs kalkonanalógok (**2-4**) szerkezete és számozása.



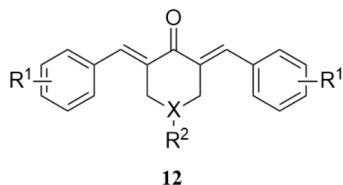
2. Ábra. A heterociklusos (**5,6**) és a ferrocén-analóg (**7-11**) kalkonszármazékok szerkezete.

A különböző szerkezetű és térszerkezetű gyűrűs kalkonanalógok (**2-6**) vizsgálata lehetővé tette olyan térszerkezetű kalkon molekularészek reakcióinak és biológiai hatásainak vizsgálatát, melyek a nyíltláncú vegyületek konformációs egyensúlyi rendszereiben nem fordulnak elő. Sohár Pál professzorral kialakított együttműködés keretében a gyűrűs kalkonszármazékok ferrocén analógjainak (**7-11**) szintézisét és reaktivitásainak vizsgálatát végeztük el.⁷

A kalkonok és gyűrűs kalkonszármazékok szintézise az elmúlt években kiegészült a rokon szerkezeti elemeket hordozó C5-kurkuminoidok szintézisével. A kurkumin hét szénatomból álló konjugált rendszer, melynek öt szénatomos „töredék” formája is megtalálható a természetben. A vegyületek, a kalkonokhoz hasonlóan, számos jól dokumentált gyógyászati hasznosítható biológiai hatással rendelkeznek.⁸ Szintetikus munkáink során a természetes C5-kurkuminoidok karbociklusos és heterociklusos ana-

* Tel.: +36 72 503 626; e-mail: pal.perjesi@gytk.pte.hu.

lógjait, valamint azoknak a központi gyűrű 4-es helyzetében szubsztituált származékait szintetizáltuk (3. Ábra). A vegyületek enon molekulárisrészei a C5-kurkumin analógok esetében is (*E*)-geometriájú *s*-cisz konfigurációjú származékok voltak.⁹⁻¹¹



3. Ábra. A szintetizált C5-kurkuminoid analógok szerkezete.

A természetes kalkonok és C5-kurkuminoidok karbociklusos és heterociklusos analógjainak szintézise lehetőséget biztosított az (a) aromás-szubsztitúció (R^1), (b) a gyűrűtag-szám, valamint (c) a központi gyűrű szubsztituensei (R^2) változásainak a vegyületek biológiai aktivitásaira, valamint néhány, azokat befolyásoló fizikai-kémiai tulajdonságára gyakorolt hatásainak vizsgálatára.

2.2. Kalkonok, gyűrűs kalkonanalógok UV és NMR vizsgálata

A vegyületek biológiai hatásai a vegyületek kovalens és nem-kovalens kölcsönhatásain alapulnak. A kovalens kölcsönhatások biológiailag legfontosabb típusait az (a) enon rendszer kén-nukleofilekkel lejártszódó (Michael-típusú) addíciós reakciói, valamint (b) az aromás gyűrűk és/vagy (elsősorban hidroxil) szubsztituenseinek elektrofil partnerekkel (pl. reaktív oxigén gyökökkel) lejártszódó reakciói képviselik.¹²⁻¹⁴

Mind a vegyületek reakcióit, mind nem-kovalens kölcsönhatásait befolyásolja a polaritás (polarizálhatóság), a térszerkezet (elsősorban a két aromás gyűrű egymáshoz viszonyított térállása), valamint nukleofil reagensekkel szemben mutatott reaktivitása. E három alapvető fizikai-kémiai tulajdonság együttes hatása vizsgálatának egyik lehetőségét képezi az aromás szubsztituenshatások tovaterjedésének spektroszkópiai módszerekkel történő vizsgálata. Korábbi IR és ^{13}C NMR vizsgálataink során igazoltuk, hogy a B-gyűrű 4-, (1) illetve 4'-szubsztituensei (2-4) elektronikus hatásainak terjedése a konjugált rendszeren a nyíltláncú (1) és az öttagú gyűrűs analógok (2) esetében a leghatékonyabb.¹⁵⁻¹⁷ Az aromás szubsztituenshatások eltérő hatásfokú tovaterjedése (és a vegyületek sztereokémiájának különbözősége) következtében az azonos 4-, illetve 4'-szubsztituált származékok enon molekulárisrészének polaritása különböző. Ez a különbség többek között megjelenik a vegyületek tiol-reaktivitásában is. Elektronküldő szubsztituensek (pl. 4- $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), vagy a karbociklusos B-gyűrű ferrocenil-szubsztituensre történő cseréje lecsökkentette (1), illetve megszüntette (7-11) a vegyületek tiol-reaktivitását.

A korábbi NMR vizsgálataink folytatásaként, az 1-4 alapvázsal rendelkező, 4-, illetve 4'-helyzetben különbözőképpen szubsztituált származékok UV-spektrumainak oldószer- és szubsztituensfüggését vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy a vegyületek pozitív szolvatokromizmust mutatnak (1. Táblázat). A megfigyelt pozitív szolvatokromizmus összhangban van egy jelentős töltésátviteli (CT) jellegű átmenettel.^{18,19} E megfigyelés alapján következtetéseket tudunk levonni a vegyületek biológiai membránokkal, illetve makromolekulákkal kialakított nemkovalens kölcsönhatásai molekuláris környezetével kapcsolatban.

Szubsztituens	H	4- CH_3	4- OCH_3	4- $\text{N}(\text{CH}_3)_2$
Oldószer/Vegyület	1a	1b	1c	1d
TOLUOL	308,4	318,8	337,8	403,6
ACN	305,5	317,4	336,0	408,6
MeOH	309,2	320,8	342,0	420,2
DMSO	314,2	325,0	346,6	424,0

1. Táblázat. Az 1a-d 4-szubsztituált kalkonok UV-abszorpciós maximumainak oldószerfüggése.

2.3. Kalkonok és kalkonanalógok tiol-reaktivitásának vizsgálata

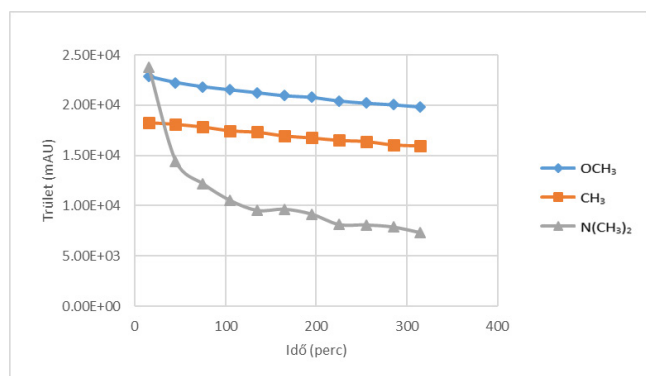
A kalkonok, gyűrűs kalkon analógok kén-nukleofilekkel lejártszódó reakcióinak vizsgálatai a vegyületek illetve debenzo analógjaik és ditiokarbaminsav, illetve N-szubsztituált ditiokarbaminsavak között lejártszódó reakcióinak vizsgálataival kezdődtek. A gyűrűs származékok adduktjainak sztereokémiai vizsgálatai azt mutatták, hogy az adduktok szerkezetét mind a kiindulási kalkonok gyűrűtagszáma, mind a reakcióközeg savassága befolyásolja.^{20,21} A keletkező nyítláncú adduktok gyűrűzárási reakcióit a keletkező biciklusos 4-hidroxi-1,3-tiazin-2-tion származékok kedvezményezett konformációja határozta meg.²⁰⁻²³

A kalkonokkal és gyűrűs kalkonszármazékokkal végzett saját és irodalmi vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a tiol-reaktivitás szerepet játszhat a vegyületek néhány biológiai hatásának (pl. gyulladáscsökkentő, daganatsejt citotoxikus hatás) kialakulásában.²⁴⁻²⁷ E megfigyelések alapján megvizsgáltuk néhány, különböző gyűrűtagszámú és aromás gyűrűin különbözőképpen szubsztituált vegyület redukált glutationnal (GSH) és N-acetilciszteinnel (NAC) lejártszódó reakciójának kinetikáját és sztereokémiáját. A kiválasztott vegyületek a biológiailag leghatékonyabb és a legkevésbé hatékony származékok voltak. A reakciók lejátszódását három különböző savasságú oldatban (pH 3,2, pH 6,3 és pH 8,0) HPLC-UV módszerrel követtük; modellezve a daganatos sejtek enyhén savas (pH 6,3) és az enzim-katalizált reakciók (pH 8,0) körülményeit, valamint megvizsgálva a protonált tiolok (pH 3,2) addícióját.

Az A-gyűrűn 3'- és 5'-helyzetben (dimetilamino)metilén-szubsztituált 4'-hidroxil-4-klór-kalkon és GSH savas közegben (pH 3,2) lejártszódó reakciójának HPLC-UV vizsgálata

lata során nem várt diasztereoselektivitást tapasztaltunk. A reagens-indukált diasztereoselektív Michael-addíciót egy kalkon-GSH ionpároképződéssel magyaráztuk. Az ionpároképződés által meghatározott orientáció következtében a kén-nukleofil támadása csak a planáris enonrész *Re*- vagy *Si*-oldaláról történhet. GSH helyett N-acetilciszteint (NAC) alkalmazva, alacsonyabb diasztereoselektivitást észleltünk.²⁸ Ugyanakkor, a B-gyűrűn 4-es helyzetben metilszubsztituált kalkon (**1b**) és NAC erősen savas közegben lejátszódó reakciójában az A-gyűrűn szubsztituált származékhoz képest magasabb diasztereoselektivitás volt megfigyelhető.²⁹ Mindkét esetben a kevésbé poláros addukt keletkezett nagyobb mennyiségben. A magas diasztereoselektivitás magyarázatát jelenleg is vizsgáljuk.

A gyűrűs kalkonanalógok (**2-4**) hasonló reakcióinak vizsgálata és azok eredményeinek kiértékelése folyamatban van. A hattagú gyűrűs (**3**) 4'-CH₃-, 4'-OCH₃ és 4'-N(CH₃)₂ vegyületek etanolos oldatainak és 10-szeres molarányú GSH pH 6,3 kémhatású oldata között lejátszódó reakciók kalkon-koncentrációjának változásait a 4. Ábra mutatja be. Az adatok ez esetben – az **1** sorozatbeli analógokkal ellentétben – a 4'-N(CH₃)₂-származék koncentrációjának gyors csökkenését mutatta (4. Ábra). A várt adduktok szerkezetét HPLC-HRMS módszerrel igazoltuk.³⁰



4. Ábra. A 4'-CH₃-, 4'-OCH₃- és 4'-N(CH₃)₂-szubsztituált **3** származékok HPLC csúcsterületeinek változása a vegyületek és GSH (pH 6,3) 37 °C hőmérsékleten lejátszódó reakcióiban.

2.4. Kalkonok, gyűrűs kalkonanalógok és kurkuminoidok lipofilitásának vizsgálata

A kalkonok és a kalkonokkal rokon szerkezetű kurkuminoidok biológiai hatásainak másik alapvető mechanizmusa a vegyületek biológiai makromolekulákkal kialakított nem-kovalens kölcsönhatása. A kölcsönhatások kialakításában alapvető jelentőséggel bír a molekulák konformációja, polaritása, polarizálhatósága, szubsztituenseik fizikai-kémiai tulajdonságai, valamint a vegyületek lipofilitása.^{31,32}

A lipofilitás a biológiai aktív molekulák egyik legfontosabb, és igen régóta használatos fizikai-kémiai paramétere, amely, mint anyagi tulajdonság, a vegyületek apoláris (lipofil) környezethez való affinitását jellemzi. A lipofilitás általános jellemzésére választott oktanol/víz oldószer-rend-

szerre vonatkozó megoszlási hányadost *P* betűvel jelöljük, leginkább ennek logaritmusát alkalmazzuk ($\log P$).^{33,34} A $\log P$ meghatározására jelenleg a leggyakrabban alkalmazott eljárások az indirekt, másnéven alternatív meghatározási módszerek. A meghatározások elvi alapját a folyadék/folyadék megoszláson alapuló fordított fázisú kromatográfia retenció és a megoszlási hányados között fennálló összefüggés adja meg. A módszer lényege, hogy az eljárás során egy, a lipofilitástól függő kromatográfias paramétert (a retenciósfaktorral közvetlenül összefüggésben álló ún. R_M értéket: $R_M = \log(1/R_F - 1)$) határozzuk meg, majd kalibrációs egyenes felhasználásával $\log P$ értéket számolunk ($\log P = aR_M + b$).³⁵

A kalkon- és kurkuminoid-származékok különböző szubsztituensekkel bíró tagjai $\log P$ értékének meghatározását egy korábbi, a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézetével kialakult kooperációs munka során alkalmazott és kis mértékben módosított fordított-fázisú vékonyréteg-kromatográfias technika alkalmazásával végeztük.³⁶ A módszer alkalmazásával ezideig közel 60 kalkonszármazék és közel 80 kurkuminoid származék vizsgálata történt meg. A vizsgált vegyületek igen lipofilek, $\log P$ értékük viszonylag széles tartományba ($\log P_{TLC} = 2-6,5$) esik, a gyűrű tag-számának, valamint a szubsztituensek minőségének, jellegének és helyzetének függvényében.

A gyűrűs kalkonanalógok esetén a gyűrűtagszám lipofilitást befolyásoló hatását a 4'-helyzetben szubsztituált származékok kísérletesen meghatározott $\log P$ értékeinek összehasonlítása révén figyelhetjük meg.³⁷ A gyűrű tagszámának növekedése a ciklikus kalkonanalógok lipofilitásának növekedésével jár. Egy további metilcsoport beépülése a gyűrűbe átlagosan 0,4 egységgel növelte meg a $\log P_{TLC}$ értéket. Az **1-4** sorozat átlagos $\log P_{TLC}$ (-CH₂-) inkrementum értéke az **1** és **2** sorozat tagjai között alacsonyabb (0,2 log egység) mint a **2** és **3** (0,42 log egység), illetve a **3** és **4** sorozat tagjai között (0,38 log egység). Mindezek arra utalnak, hogy az intra- és intermolekuláris interakciók, valamint a térszerkezet is befolyással vannak a lipofilitásra.

A szubsztituens minőségének vizsgálatakor megfigyelhető, hogy a 4'-helyzetben szubsztituált származékok esetén a lipofilitás a következők szerint változik:



A szubsztituenseknek nemcsak a minősége, hanem a helyzete is befolyásolja a $\log P$ értékeket. A 7-tagú gyűrűs benzozuberone származékok (**4**) esetén megállapítható volt, hogy adott szubsztituens *orto*-, *meta*-, illetve *para*-helyzetben tartalmazó vegyületek $\log P_{TLC}$ értéke a következők szerint változik: $\log P(orto) \leq \log P(para) \leq \log P(meta)$. A **2** és **3** sorozat tagjainál azonban a különböző helyzetben szubsztituált analógok $\log P_{TLC}$ értékeiben nem figyelhető meg hasonló szabályszerűség.³⁸ Ez a tapasztalat szintén arra utal, hogy a tér- és elektronszerkezet – amit a szubsztituensek

minősége és helyzete is nagyban befolyásol - jelentős hatással van a molekulák lipofilitására.

A különböző gyűrűs szerkezettel bíró fenil (2-6) és ferrocenil analógok (7-11) összehasonlító $\log P_{TLC}$ adatai alapján a ferrocenil analógok $\log P_{TLC}$ értékei átlagosan 0,94 log egységgel magasabbak voltak. Ugyanakkor Jurkat T sejtekkel szemben mért citotoxicitási adataik ugyanabba az IC_{50} tartományba (9,9-65,9 μM) estek.³⁹

A vizsgált kurkuminoid származékok szintén igen lipofilek, $\log P$ értékük széles tartományba ($\log P_{TLC}=3,22-7,29$) esik, a gyűrűrendszer, valamint a szubsztituensek minőségének, jellegének függvényében. A vegyületek szerkezete és a szubsztituensek jellege alapján várt (számított) $\log P_{TLC}$ értékek jól korrelálnak a mért adatokkal. Szerkezet-hatás vizsgálat céljából összehasonlítottuk a vegyületek IC_{50} értékeit a $\log P$ értékekkel. A két paraméter között egyenes arányosság nem mutatható ki, viszont a leghatékonyabb vegyületek $\log P$ értékei egy viszonylag szűk $\log P_{TLC}$ tartományba (3,22-4,11) esnek, ami ez alapján optimális $\log P$ tartománynak fogható fel.¹¹

2.5. Kalkonok, gyűrűs kalkonanalógok és kurkuminoidok szérum albuminnal és DNS-el kialakuló kölcsönhatásának vizsgálata

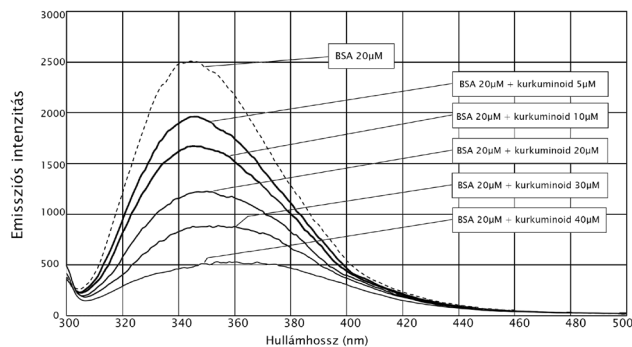
A vegyületek biológiai hatásának hátterében álló további mechanizmusok megismerése céljából vizsgáltuk a gyűrűs kalkonanalógok, valamint a kurkuminoidok szérum albuminnal és DNS-sel kialakított kölcsönhatásait. A vegyületek albuminkötődés (BSA és HSA) vizsgálatára UV-Vis és fluoreszcens spektroszkópiai módszereket alkalmaztunk.

Az inkubátumok spektrumaiban tapasztalt hipszokróm eltolódások a vizsgált molekulák és a fehérje hidrofób kötőrégiója között kialakuló kölcsönhatásra utalt. A mérési eredmények alapján a vegyületek és a fehérje molekulák között spontán, nem-kovalens interakció játszódik le, amely feltételezhetően a kalkonok aromás gyűrűje és a fehérje triptofán-, tirozin- és/vagy fenilalanin-oldalláncai között alakul ki.^{40,41}

A fluoreszcens spektroszkópiai eredmények alapján a vizsgált kurkuminoid származékok, valószínűsíthetően kötődésük eredményeképpen, koncentrációjuk növekedésének függvényében kioltják az albumin fluoreszcenciáját (5. Ábra). A kötődési állandókat – a szükséges korrekciós módszerek figyelembevételével - a spektrális adatok alapján számítottuk ki, többféle matematikai módszert (Benessi-Hildebrandt, Stern-Volmer, Lehrer) alkalmazva. A bekövetkező spektrális változások, illetve a számolt kötődési állandók értékei alapján a kurkuminoidok albuminnal való kölcsönhatása jól jellemezhető, az észlelt kötődés másodlagos kölcsönhatásokon alapszik.⁴²

Az UV-Vis spektrofotometria az egyik leggyakrabban alkalmazott technika kismolekulák DNS-hez történő kötődé-

sének vizsgálatához. A DNS-t és a vizsgált vegyületet is tartalmazó oldat UV-Vis spektrumában bekövetkező – a DNS, illetve a vegyület UV-Vis spektrumához viszonyított – esetleges eltolódások, intenzitásbeli különbségek, interakció kialakulására utalnak.



5. Ábra. Szérum albumin (BSA) fluoreszcencia-spektruma növekvő kurkuminoid-koncentráció (12, $R^1=Cl$, $X=N$, $R^2=(CH_2)_2-CO-NH-C_6H_5$) jelenlétében.

Az előzőekben bemutatott 4'-hidroxikalkon, illetve 3',5'-(dialkilamino)metilén származéka DNS kölcsönhatásának vizsgálata során az UV-spektrumokban bekövetkező eltolódások gyenge kölcsönhatások jelenlétére utalnak.⁴³ A spektrofotometriás titrálás eredményeként, a Benesi-Hildebrand egyenlet segítségével számolt kötődési állandók értékei ($3,1 \times 10^4 - 1,0 \times 10^5 M^{-1}$) megerősítik a feltételezett kölcsönhatás jelenlétét. Az értékek egy-két nagyságrenddel kisebbek az interkalátorok esetén meghatározott értékeknél, összhangban állnak az irodalomban leírt, néhány ciklikus kalkonszármazék és DNS kölcsönhatása esetén meghatározott kötődési állandó értékekkel.⁴⁴ Az értékek jól korrelálnak azon vegyületek DNS kötődési állandóinak értékeivel, amelyek bizonyítottan a DNS kettős spiráljának felszínéhez, a kis ill. nagy árokhoz kötődnek. A kötődés spontán, nem-kovalens jellegű.

2.6. A kalkonszármazékok és kurkuminoidok *in vitro* daganatsejt citotoxicitás vizsgálata

Az intézetben szintetizált kalkonszármazékok és kurkuminoidok számos daganatsejttel szemben mutatott citotoxicitása került meghatározásra különböző hazai és nemzetközi kooperációs vizsgálatok keretében. A karbociklusos gyűrűs kalkonanalógok ráegcsáló és humán daganatos sejteken mutatott citotoxicitási vizsgálatai alapján a hétagú gyűrűs analógok 4'- OCH_3 - és 4'- $N(CH_3)_2$ -származékai bizonyultak a leghatékonyabb vegyületeknek. A 4'- CH_3 - és 4'- OCH_3 -származékok Jurkat T sejtekkel végzett összehasonlító áramlásos citometriai vizsgálata jellegzetes eltéréseket mutatott. A 4'- OCH_3 -származék G2/M fázisú blokkot eredményezett, ami később apoptikus és hiperdiploid sejtek képződéséhez vezetett. E kísérleti tapasztalatok alapján feltételezzük, hogy a vegyületek potenciális tubulin-aktív szerek.⁴⁵

A vegyületek sejtciklusra gyakorolt hatását a Kassai Egyetem Farmakológiai Intézetével kialakított kooperáció keretében tovább vizsgáltuk. A vizsgálatok többek között a 4-hidroxi-kalkon és a héttagú gyűrűs (**4**) 4-OCH₃-szubsztituált gyűrűs származék angiogenezis-gátló hatását igazolták.⁴⁶⁻⁴⁹

A héttagú karbociklusos kalkonszármazékok (**3**) oxigén-analógjainak (**5**) legtöbb képviselője a karbociklusos származékoknál hatékonyabb citotoxikus hatásúnak bizonyult humán Molt 4/C8 és CEM T-limfocitákkal, valamint L1210 limfoid leukémia sejtekkel szemben.⁵⁰ Az analóg kéntartalmú heterociklusos származékok (**6**) között számos vegyület antituberkulikus hatást mutatott.⁵¹

A C5-kurkuminoidok ciklohexanon (X=CH₂) és piperidinon gyűrűt (X=N-R²) magában foglaló analógjai (**12**) közül az (*E,E*)-2,5-bisz(4'-nitrobenzilidén)-4-piperidinon származék bizonyult a leghatékonyabb vegyületnek MCF-7 és Jurkat T-sejtekkel szemben.¹⁰ A szerkezeti rokonságban álló származékok összehasonlító citotoxicitási vizsgálatai alapján a központi gyűrű 4-es helyzetű szubsztituense (R²) a vegyületek második farmakofór csoportját képezi. Ezt a feltételezést a 4-OH-ciklohexanon (X=CH-OH) molekularészt magában foglaló származékok hasonló, humán A2780, C33A és MDA-MB-231 daganatos sejtvonalakkal szemben mért citotoxicitási adatai is alátámasztották.¹¹

A két vegyületcsalád további származékai tervezésének, szintézisének és biológiai vizsgálatainak egyik célkitűzése központi idegrendszeri daganattellenes hatású vegyületek kimunkálása volt. Az e területen folytatott vizsgálatok során eddig N-szubsztituált-4-piperidinon származékokat (**12**; X=N-R²) vizsgáltunk. A szintetizált vegyületek leg többjének humán neuroblasztóma (SH-SY5Y) és humán IV. fázisú asztrocitóma (CCF-STTG1) sejtekkel szemben mutatott IC₅₀ értéke a nM és a pM tartományba (IC₅₀=7,483-0,139 nM) esik.⁵²

3. Összefoglalás

A közlemény a PTE Gyógyszerészi Kémiai Intézetben folyó, különböző struktúrájú, enon szerkezeti elemet hordozó vegyületek (kalkonok, gyűrűs kalkonanalógok, gyűrűs C5-kurkuminoidok) szerkezet-reaktivitás és szerkezet-hatás vizsgálatainak néhány fontosabb eredményét mutatja be. A vegyületek IR és ¹³C adatai alapján megállapítottuk, hogy az aromás szubsztituenshatások tovaterjedésének hatékonysága az **1** és **2** sorozatban a legnagyobb. A vegyületek tiolreaktivitásának vizsgálata azt mutatta, hogy a konjugált addíciós reakciók sztereo-kémiáját mind a reakcióközeg savassága, mind a vegyületek gyűrűtagszáma befolyásolja. Kalkonok (**1**) és gyűrűs kalkonszármazékok (**2-4**) glutationnal (GSH) lejátszódó reakcióiban a benzilidén molekularész aromás szubsztitúciója is az addíció sebességét és sztereo-kémiáját befolyásoló tényezőnek bizonyult.

A vegyületek kovalens reaktivitásának vizsgálata mellett, nemkovalens kölcsönhatásaik is fontos szerepet játszhatnak biológiai hatásaik kialakulásában. A szisztematikus szerkezeti módosításokkal bíró vegyületek lipofilitásának (logP_{TLC}) kísérletes vizsgálata adatokat szolgáltatott a szerkezet-lipofilitás, valamint szerkezet-biológiai hatás összefüggések megismeréséhez mindhárom vegyületcsalád körében. Celluláris makromolekulákkal (BSA, HSA, DNS) kialakított kölcsönhatásuk vizsgálata alapján összefüggéseket találtunk a szerkezet és a kölcsönhatás kialakulása, illetve elmaradása között. A kialakult kölcsönhatások gyenge, nemkovalens természetűek.

A szintetizált vegyületek legtöbbje különféle humán és rágcsáló daganatos sejtkultúrákon *in vitro* tesztelésre került. A meghatározott IC₅₀ értékek alapján szerkezet-hatás összefüggéseket állapítottunk meg a vizsgált fizikai-kémiai paraméterek (pl. logP, béta-szenatom ¹³C NMR eltolódás) és a biológiai hatások között.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönik a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal EFOP-3.6.1.-16-2016-00004 azonosító számú projekt anyagi támogatását.

Hivatkozások

1. Rozmer, Zs.; Perjési, P. *Phytochem. Rev.* **2016**, 15, 87-120. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9387-8>
2. Dimmock, J. R.; Kandepu, N. M.; Nazarali, A. J.; Kowalchuk, T. P.; Motaganahalli, N.; Quail, J. W.; Mykytiuk, P.; Audette, G. F.; Prasad, L.; Perjési, P.; Allen, T. M.; Santos, C. L.; Szydłowski, J.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 1358-1366. <https://doi.org/10.1021/jm9806695>
3. Dimmock, J. R.; Zello, G. A.; Oloo, E. O.; Quail, J. W.; Kraatz, H. B.; Perjési, P.; Aradi, F.; Takács-Novák, K.; Allen, T. M.; Santos, C. L.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Stables, J. P. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 3103-3111. <https://doi.org/10.1021/jm010559p>
4. Perjési, P.; Noda Pérez, C.; Kulcsár, G. In: *Chalcones and their synthetic analogs*. Perjési, P. Ed. Nova Science Publishers: New York (NY), **2020**, Chapter 1, pp. 3-37. ISBN 978-1-53618-709-0
5. Valkonen, A.; Laihia, K.; Kolehmainen, E.; Kauppinen, R.; Perjési, P. *Struct. Chem.* **2012**, 23, 209-217. <https://doi.org/10.1007/s11224-011-9860-6>
6. Perjési, P.; Nusser, T.; Tarczay, Gy.; Sohár, P. *J. Mol. Struct.* **1999**, 479, 13-19. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(98\)00805-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(98)00805-9)
7. Sohár, P.; Perjési, P.; Törnroos, K. W.; Husebye, S.; Vértes, A.; Vankó, Gy.; Bozak, R. E. *J. Mol. Struct.* **2000**, 524, 297-304. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(00\)00380-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(00)00380-X)
8. Huber, I. In: *Chalcones and their synthetic analogs*. Perjési, P. Ed. Nova Science Publishers: New York (NY), **2020**, Chapter 8, pp.285-333. ISBN 978-1-53618-709-0
9. Huber, I.; Zupko, I.; Kovács, I. J.; Minorics, R.; Gulyás-Fekete, G.; Maász, G.; Perjési, P. *Monatsh. Chem.* **2015**, 146, 973-981. <https://doi.org/10.1007/s00706-015-1426-7>

10. Huber, I.; Rozmer, Zs.; Gyöngyi, Z.; Budán, F.; Horváth, P.; Kiss, E.; Perjési, P. *J. Mol. Struct.* **2020**, 1206, 127661. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127661>
11. Huber, I.; Zupkó, I.; Gyovai, A.; Horváth, P.; Kiss, E.; Gulyás-Fekete, G.; Schmidt, J.; Perjési, P. *Res. Chem. Intermed.* **2019**, 45, 4711–4735. <https://doi.org/10.1007/s11164-019-03859-4>
12. Gomes, M. N.; Muratov, E. N.; Pereira, M.; Peixoto, J. C.; Rosseto, L. P.; Cravo, P. V. L.; Andrade, C. H.; Neves, B. J. *Molecules* **2017**, 22, 1210. <https://doi.org/10.3390/molecules22081210>
13. Zhou, B. *Med. Chem.* **2015**, 5, 388–404. doi: <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000291>
14. Mahapatra, D. K.; Bharti, S. K.; Asati, V. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, 17, 3146–3169. <https://doi.org/10.2174/1568026617666170914160446>
15. Perjessy, A.; Loos, D.; Perjési, P.; Lacova, M. *Acta F. R. N. Univ. Comen. - Chimia* **1992**, 40, 33–53.
16. Perjési, P.; Perjessy, A.; Kolehmainen, E.; Ösz, E.; Samalikova, M.; Virtanen, E. *J. Mol. Struct.* **2004**, 697, 41–471. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.02.006>
17. Perjési, P.; Linnanto, J.; Kolehmainen, E.; Ösz, E.; Virtanen, E. *E. J. Mol. Struct.* **2005**, 740, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.10.013>
18. Reichardt, C. *Chem. Rev.* **1994**, 94, 2319–2358. <https://doi.org/10.1021/cr00032a005>
19. Tomečková, V.; Veliká, B.; Malhotra, S.; Revická, M.; Perjési, P. *Spectr. Letters* **2015**, 48, 317–323. <https://doi.org/10.1080/00387010.2014.881378>
20. Perjési, P.; Szabó, D.; Batta, Gy.; Földesi, A. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 571–572. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)95784-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)95784-8)
21. Perjési, P.; Sohár, P. *Monatsh. Chem.* **1991**, 122, 1047–1054. <https://doi.org/10.1007/BF00811113>
22. Perjési, P.; Batta, Gy.; Földesi, A. *Monatsh. Chem.* **1994**, 125, 433–499. <https://doi.org/10.1007/BF00811861>
23. Perjési P, Földesi A, Batta G. *MOJ Biorg. Org. Chem.* **2018**, 2, 00046. <https://doi.org/10.15406/mojboc.2018.02.00046>
24. Rücker, H.; Al-Rifai, N.; Rascle, A.; Gottfried, E.; Brodziak-Jaros, L.; Gerhauser, C.; P.Dick, T.; Amslinger, S. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 3040–3047. <https://doi.org/10.1039/C4OB02301C>
25. Silva, M. F.; Pruccoli, L.; Morroni, F.; Sita, G.; Seghetti, F.; Viegas Jr, C.; Tasrozzi, A. *Molecules* **2018**, 23, 1803. <https://doi.org/10.3390/molecules23071803>
26. Liargkova, T.; Eleftheriadis, N.; Dekker, F.; Voulgari, E.; Avgoustakis, C.; Sagnou, M.; Mavroidi, B.; Pelecanou, M.; Hadjipavlou-Litina, D. *Molecules* **2019**, 24, 199. <https://doi.org/10.3390/molecules24010199>
27. d'Oliveira, G. D. C.; Custodio, J. M. F.; Moura, A. F.; Napolitano, H. B.; Pérez, C. N.; Moraes, M. O.; Prókai, L.; Perjési, P. *Med. Chem. Res.* **2019**, 28, 1448–1460. <https://doi.org/10.1007/s00044-019-02384-8>
28. Bernardes, A.; D'Oliveira, G. D. C.; Silezin, A.; Kuzma, M.; Molnar, Sz.; Noda Perez, C.; Perjesi, P. *Arch. Pharm.* **2018**, 351, 1700386. <https://doi.org/10.1002/ardp.201700386>
29. Kenari, F.; Molnár, Sz.; Perjési, P. *Molecules* **2021**, 26, 4332. <https://doi.org/10.3390/molecules26144332>
30. Kenari, F.; Bernardes, A.; Noda, P. C.; Molnár, S.; Kulcsár, G.; Perjési, P. *Acta Pharm. Hung.* **2020**, 90, 123–124.
31. Bayach, I.; D'Aleó, A.; Trouillas, P. *Phys. Chem. A*, **2019**, 123, 194–201. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.8b08529>
32. Kozurkova, M.; Tomeckova, V. In: *Chalcones and their synthetic analogs*. Perjési, P. Ed. Nova Science Publishers: New York (NY), **2020**, Chapter 4, pp. 95–133. ISBN 978-1-53618-709-0
33. Takács-Novák, K. *Acta Pharm. Hung.* **1997**, 67, 179–191.
34. Kujawski, J.; Popielarska, H.; Myka, A.; Drabińska, B.; Bernard, M. K. *Comput. Meth. Sci. Technol.* **2012**, 18, 81–88. <https://doi.org/10.12921/cmst.2012.18.02.81-88>
35. Völgyi, G.; Deaák, K.; Vámos, M.; Valkó, K.; Takács-Novák, K. *J. Planar Chrom. - Modern TLC* **2008**, 21, 143–149. <https://doi.org/10.1556/JPC.21.2008.2.12>
36. Takács-Novák, K.; Perjési, P.; Vámos, J. *J. Planar Chrom. - Modern TLC* **2001**, 14, 42–46.
37. Perjési, P.; Takács, M.; Ösz, E.; Pintér, Z.; Vámos, J.; Takács-Novák, K. *J. Chromatogr. Sci.* **2005**, 43, 289–295. <https://doi.org/10.1093/chromsci/43.6.289>
38. Rozmer, Zs.; Perjési, P.; Takács-Novák, K. *J. Planar Chrom.-Modern TLC* **2006**, 19, 124–128. <https://doi.org/10.1556/JPC.19.2006.2.7>
39. Perjési P.; Takács-Novák K.; Rozmer Zs.; Sohár P.; Bozak R. E.; Allen T. M. *Centr. Eur. J. Chem.* **2012**, 10, 1500–1505. <https://doi.org/10.2478/s11532-012-0088-0>
40. Velika, B.; Tomeckova, V.; Fodor, K.; Kron, I.; Perjési, P. *Spectr. Anal. Rev.* **2015**, 3, 1–8. <https://doi.org/10.4236/sar.2015.31001>
41. Rozmer, Zs.; Perjési, P. *J. Pharm. Biopharm. Res.* **2020**, 2, 118–125. <https://doi.org/10.25082/JPBR.2020.01.003>
42. Tyukodi, L. XIV. Clauder Ottó Emlékverseny 2021. Budapest, **2021**. november 11–12.
43. Rozmer, Zs.; Bernardes, A.; Pérez, C. N.; Perjési, P. *The Open Med. Chem. J.* **2020**, 14, 122–131. <https://doi.org/10.2174/1874104502014010122>
44. Rozmer, Zs.; Marton, E.; Perjési, P. *Med. Chem. Res.* **2017**, 26, 2172–2179. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-1924-8>
45. Rozmer, Zs.; Berki, T.; Perjési, P. *Toxicol. in Vitro* **2006**, 20, 1354–1362. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.05.006>
46. Drutovic, D.; Chripkova, M.; Pilatova, M.; Kruzliak, P.; Perjési, P.; Sarissky, M.; Lupi, M.; Damia, G.; Broggin, M.; Mojzis, J. *Tumor Biol.* **2014**, 35, 9967–9975. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2289-y>
47. Pilatova, M.; Varinska, L.; Perjési, P.; Sarissky, M.; Mirossay, L.; Solar, P.; Ostro, A.; Mojzis, J. *Toxicol. in Vitro* **2010**, 24, 1347–1355. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.04.013>
48. Varinska, L.; van Wijhe, M.; Belleri, M.; Mitola, S.; Perjési, P.; Presta, M.; Koolwijk, P.; Ivanova, L.; Mojzis, J. *Eur. J. Pharmacol.* **2012**, 691, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.06.017>
49. Kello, M.; Drutovic, D.; Pilatova, M. B.; Tischlerova, V.; Perjési, P.; Mojzis, J. *Life Sci.* **2016**, 150, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.073>
50. Perjési, P.; Das, U.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Kawase, M.; Sakagami, H.; Stables, J. P.; Loran, T.; Rozmer, Zs.; Dimmock, J. R. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, 43, 839–845. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.06.017>
51. Das, U.; Loránd, T.; Dimmock, S. G.; Perjési, P.; Dimmock, J. R. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2015**, 30, 259–263. <https://doi.org/10.3109/14756366.2014.913036>
52. Huber, I.; Pandur, E.; Sipos, K.; Barna, L.; Harazin, A.; Deli, M.; Tyukodi, L.; Gulyás-Fekete, G.; Kulcsár, G.; Rozmer, Z. *Eur. J. Pharm. Sci.* (közlésre beküldve)

Excerpts from research results at the Institute of Pharmaceutical Chemistry of University of Pécs I. Structure-reactivity and structure-activity studies

The Institute of Pharmaceutical Chemistry was established on January 1, 2002, as one of the Pharmacy-specialist institutes of the pharmacy training started in Pécs in 2000. The institute is currently conducting research in two closely related but thematically different areas - structure-reactivity and structure-activity studies and *in vitro* and *in vivo* drug metabolism studies. This communication presents excerpts from research results in the former area.

The research on chalcones and cyclic chalcone analogs is an integral continuation of the work started by the founding professor of the institute at the Institute of Medical Chemistry of the University of Pécs in the early 1990s. As a result, a large number of five-, six-, and seven-membered carbocyclic (**2-4**), heterocyclic (**5,6**), and ferrocene analogs (**7-11**) of chalcone (**1**) have been synthesized. The synthetic activity has been supplemented in recent years by synthesizing cyclic analogs of C5-curcuminoids (**12**).

The biological effects of the compounds are based on covalent and non-covalent interactions. The covalent and non-covalent interactions are affected by polarity (polarizability), spatial structure (primarily the relative space of the two aromatic rings), and reactivity of the compounds to nucleophilic reagents. To study the combined effect of these three physicochemical properties, investigation of transmission of the aromatic substituent effects was performed by spectroscopic methods. It was found that the propagation of the electronic effects of the 4- and 4'-substituents of the compounds was the most effective for the open-chain (**1**) and five-membered ring analogs (**2**).

Studies with chalcones and cyclic chalcone derivatives have shown that thiol reactivity may play a role in the development of some of their biological effects (e.g., anti-inflammatory, tumor cell cytotoxic effects). Based on these observations, we investigated the kinetics and stereochemistry of the reaction of some chalcone derivatives (**1-4**) with different ring sizes and substituents on their aromatic rings with reduced glutathione (GSH) and N-acetylcysteine (NAC). Unexpected diastereoselectivity was observed by HPLC-UV analysis of the reaction of 4'-hydroxy-4-chlorochalcone with 3',5'-bis(dimethylamino)methylene substitution in acidic medium (pH 3.2). However, the reaction of the 4-methyl-substituted analog (**1**) with NAC showed higher diastereoselectivity in the strongly acidic medium than the derivative with the A-ring substitutions. Similar investigations with the cyclic analogs (**2-4**) are underway.

Another essential mechanism for the biological effects of the chalcones (**1-4**) and the curcuminoids (**12**) is related to non-covalent interactions of the compounds with biological macromolecules. The conformation, polarity, polarizability, physico-chemical properties of the substituents, and lipophilicity of the compounds are essential characteristics in developing the interactions. Lipophilicity of about 60 chalcone and 80 cyclic C5-curcuminoid analogs have been determined by a validated reverse-phase thin-layer chromatographic method. The studied compounds are rather lipophilic. Their $\log P$ values are in a wide range ($\log P_{\text{TLC}}=2-7$), depending on the structure of the ring and the nature and position of the aromatic substituents.

To investigate further mechanisms underlying the biological activity of the compounds, we examined the interaction of cyclic chalcone analogs and curcuminoids with cellular macromolecules. The compounds were tested for BSA-, HSA, and DNA-binding by UV-Vis and fluorescence spectroscopic methods. Based on the results, a spontaneous, non-covalent interaction occurs between the compounds and the protein molecules. In the study of the DNA interaction of selected chalcones (**1-4**), the shifts in the UV spectra indicate the presence of weak interactions. The values correlate well with the DNA binding constants of the compounds bound at the surface of the DNA double helix.

The cytotoxicity of the chalcone derivatives (**1-11**) and curcuminoids (**12**) against a number of tumor cells was determined in various domestic and international cooperative studies. Based on cytotoxicity studies of carbocyclic ring chalcone analogs (**1-4**) in rodent and human tumor cells, the 4'-OCH₃ and 4'-N(CH₃)₂ derivatives of the seven-membered ring analogs were the most effective. The six-membered heterocyclic chalcone derivatives **5** were more cytotoxic than the respective carbocyclic (**3**) derivatives against human Molt 4/C8 and CEM T lymphocytes and L1210 lymphocytic leukemia cells. Several compounds showed antitubercular activity among the analogous sulfur-containing heterocyclic derivatives (**6**). Among the cyclic C5-curcuminoid analogs (**12**) containing a cyclohexanone (X=CH₂) and piperidinone ring (X=N-R²), the (*E,E*)-2,5-bis(4'-nitrobenzylidene)-4-piperidinone proved to be the most effective derivative against MCF-7 and Jurkat T cells. Based on comparative cytotoxicity studies of structurally related **12** derivatives, the 4-position substituent (R²) of the central cyclic moiety seems to be a second pharmacophore group of the compounds. Several 4-piperidinone C5-curcuminoid analogs have IC₅₀ values in the nM and pM range (IC₅₀=7.483-0.139 nM) against human neuroblastoma (SH-SY5Y) and human phase IV. astrocytoma (CCF-STTG1) cells.