



Synteza, analiza zależności struktura-aktywność acetylenowych pochodnych betuliny

Stanisław Boryczka

Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Wydział Farmaceutyczny z
Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach

Ogólnopolskie Sympozjum
„Szkoła Chemii Medycznej”
Wrocław, 17 - 18. 10. 2013 r.



Główne metody leczenia nowotworów

Leczenie – zniszczenie i usunięcie z ustroju komórek nowotworowych

Główne metody:

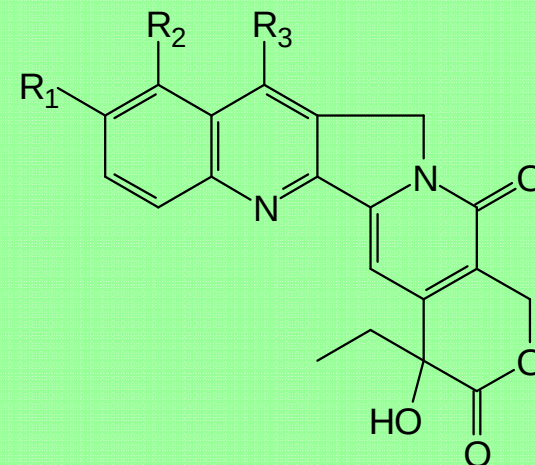
- **chirurgia**
- **radiologia**
- **chemioterapia** (ok. 23 % przypadków), obecnie w Europie Zachodniej i USA stosuje się 155 leków przeciwnowotworowych z tego substancje pochodzenia naturalnego stanowią 60-67 %

Neidle S. (Ed.) Cancer Drugs Design and Discovery, 2008, Elsevier, Amsterdam.

Wiat Ch., Lead Compounds from Medicinal Plants for the Treatment of Cancer, 2013, Elsevier, Amsterdam.

©Kazuo Yamasaki

Inhibitory topoizomerazy I



Kamptoteczyna: $R_1 = R_2 = R_3 = H$

Topotecan: $R_1 = OH$, $R_2 = CH_2CH_2NMe_2$, $R_3 = H$

Irinotecan: $R_1 = OCON(CH_2)_4N(CH_2)_4$ x HCl

$R_2 = H$, $R_3 = Et$

(Exatecan, belotecan, elomotecan, diflomotecan)

(Rak odbytnicy, piersi, jajnika, żołądka, wątroby, nerki)

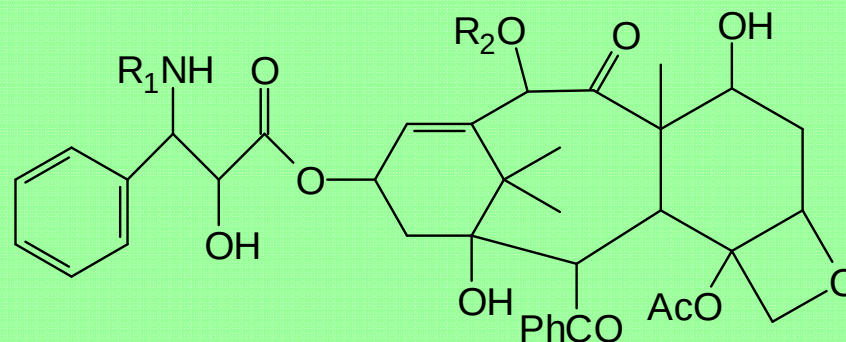
Camptotheca acuminata
(Xi shu)

Wall M.E., Wani M.C., Cooke C.E., *J.Am.Chem.Soc.* 88, 1966, 3888.
Avendano C., Menendez J.C., *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, 2008, Elsevier, Amsterdam.



Taxus brevifolia

Związki o działaniu antymitotycznym



Paklitaksel (taksol) $R_1 = \text{COPh}$, $R_2 = \text{Ac}$

Docetaksel $R_1 = \text{COO}(\text{CH}_3)_3$, $R_2 = \text{H}$

(Rak jajników, piersi, płuc)

Zawartość taksolu w korze drzewa: 100 – 150 mg/kg

100 letnie drzewo = 3 kg kory = ok. 300 mg taksolu

1 kg taksolu = 10 000 kg kory = 3000 drzew = ok. 500 pacjentów

Wani M. C., Taylor H. L., Wall M. E., Coggen P., McPhail A. T.,
J. Am. Chem. Soc., 1971, 93, 2325.

Brzoza źródłem substancji o właściwościach leczniczych



Brzoza brodawkowata
(*Betula verrucosa*)

Brzoza:

- występuje w umiarkowanej strefie półkuli północnej
- uznawana jest jako drzewo narodowe Rosji
- Krzysztof Kluka, *Dykcyonarz roślinny*, 1787 (pierwsza wzmianka o budowie i wykorzystaniu leczniczym brzozy)
- w lecznictwie stosuje się: liście brzozy, pączki brzozy, sok brzozowy, korę brzozy, dziegieć.

W medycynie ludowej korę brzozy stosowano:

- przy przeziębieniach i chorobach skóry,
- w leczeniu dolegliwości przewodu pokarmowego (biegunka, czerwotka bakteryjna),
- do sterylizacji ran (Wheeler, 1899).

Triterpeny występujące w korze brzozy brodawkowatej (*Betula pendula*) i brzozie omszonej (*Betula pubescens*)



Składniki	Brzoza brodawkowata (<i>Betula pendula</i>)	Brzoza omszona (<i>Betula pubescens</i>)
Triterpeny		
Betulina	1,8-14%	0,36-44%
Aldehyd betulinowy	0,032%	0,024%
Kwas betulinowy	0,021%	0,019%
Lupeol	0,2%	-
Kwas acetyloleanowy	0,01%	0,011%
Kwasy oleanowy i ursulowy	0,4%	0,054%
Garbniki	4-15%	2,3%
Olejki eteryczne	0,052%	0,052%

Izolacja betuliny

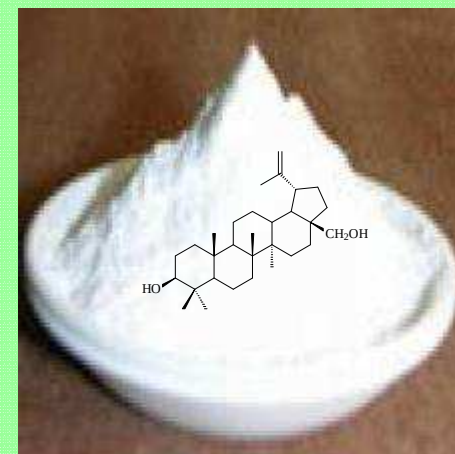


Brzoza brodawkowata
(*Betula verrucosa*)



sublimacja

200 °C, 3,3 kPa



**Pierwsza izolacja betuliny na drodze
sublimacji – 1788 r.**
Johann Tobias Lowitz (ur. *Gottingen*,
25.04.1757, zm. *St. Petersburg*, 17.11.1804)

Lowitz J.T., *Crell's Chem. Ann.* 1788, 1, 312.

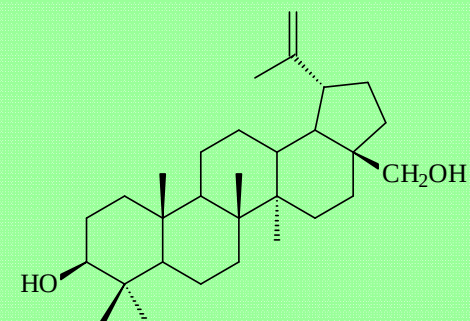


Izolacja betuliny



Brzoza brodawkowata
(*Betula verrucosa*)

ekstrakcja → krystalizacja →

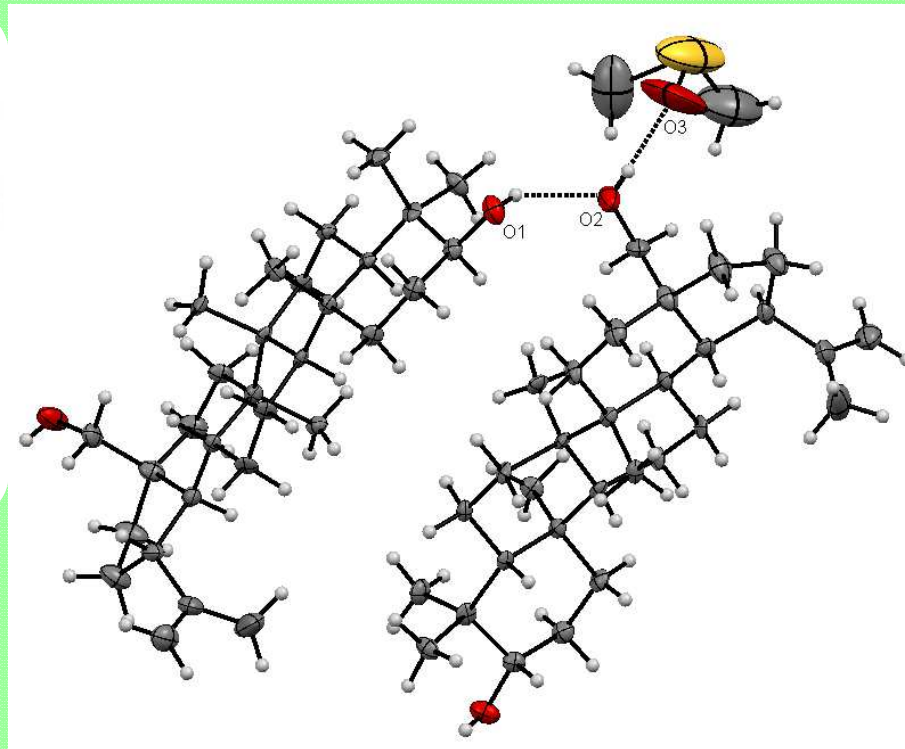
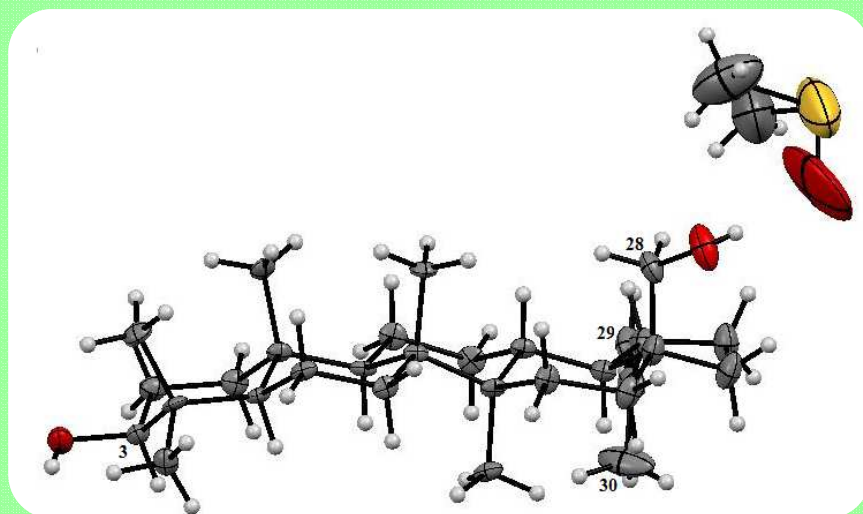


betulina

Przy stopniu rozdrobnienia kory 0,15-1,5 mm proces ekstrakcji nie zależy od rodzaju rozpuszczalnika, natomiast przy rozdrobnieniu 0,8-4,0 mm wpływ rozpuszczalnika układa się w następującym porządku: dichlorometan < izopropanol < 2-butanol = aceton < metanol < etanol

Tolstikov G. A., Flekhter O. B., Shultz E.E., Baltina L. A., Tolstikov A. G., *Chem. Sustain. Develop.*, 2005, 13, 1-29.

Struktura krystaliczna solwatu betulina-DMSO (1 : 1)



Kąt torsyjny C29-C20-C19-C21 (°): -96,8

Kąt torsyjny C29-C20-C19-C21 (°): 88,6

Wiązania wodorowe (A): O1 – H1....O2 2,16;

O2 – H2....O3 1,85

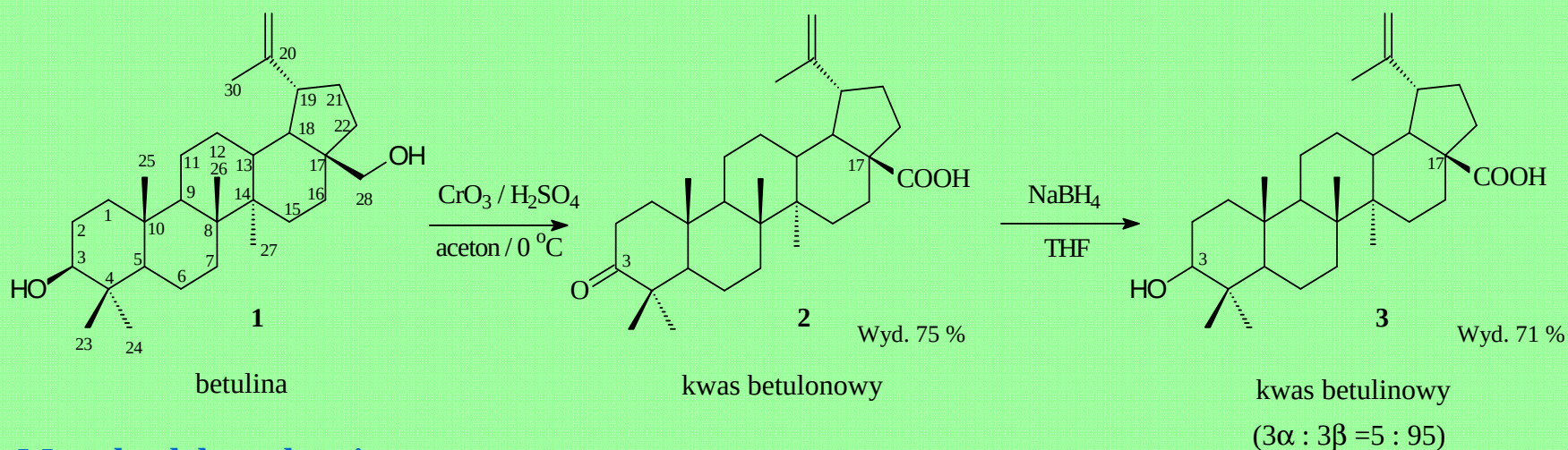
Boryczka S., Michalik E., Jastrzębska M., Kusz J., Zubko M., Bębenek E., *J.Chem.Crystallogr.* 2011; (42): 345-351.

*Solwat betulina-etanol

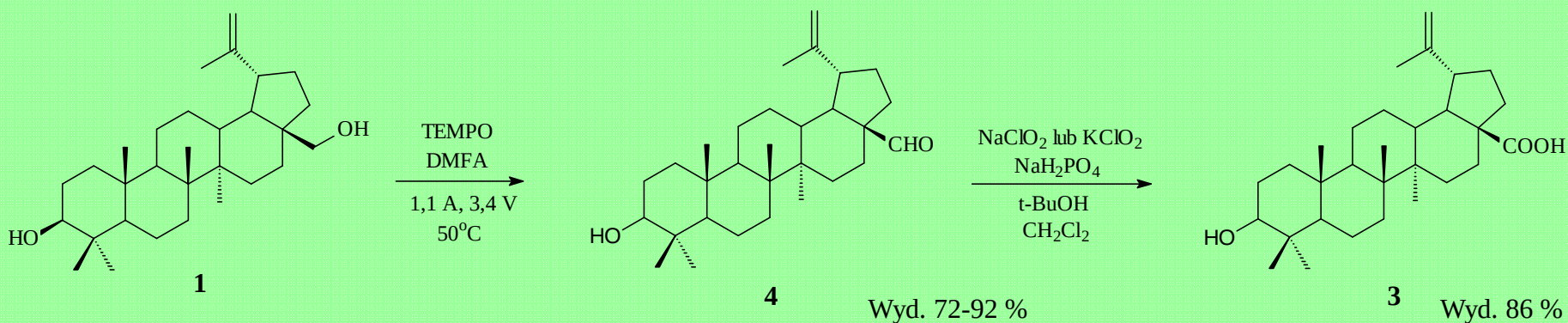
Drebushchak T., Mikhailenko M., Brezgunowa M., Shakhtshneider T., Kuznetsova S., *J.Struct.Chem.* 2010; (51): 798-801.

Otrzymywanie kwasu betulinowego z betuliny

Metoda chemiczna



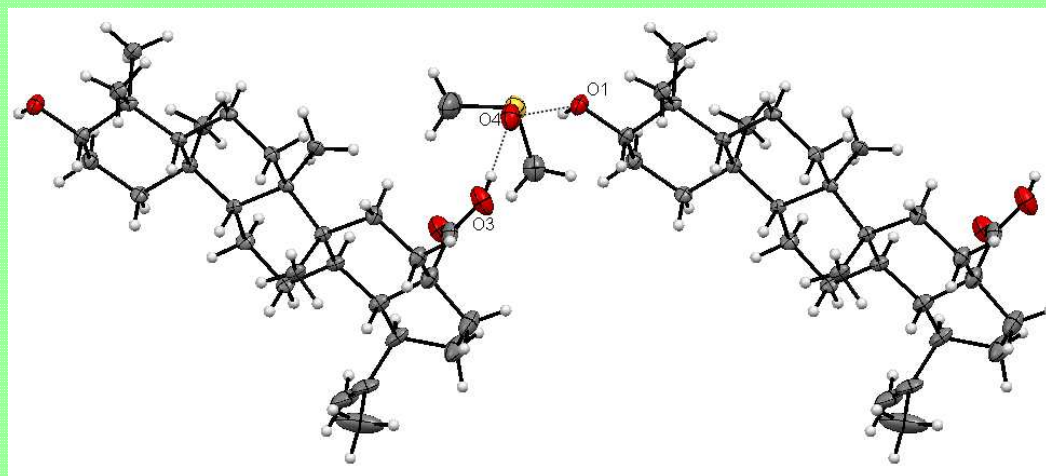
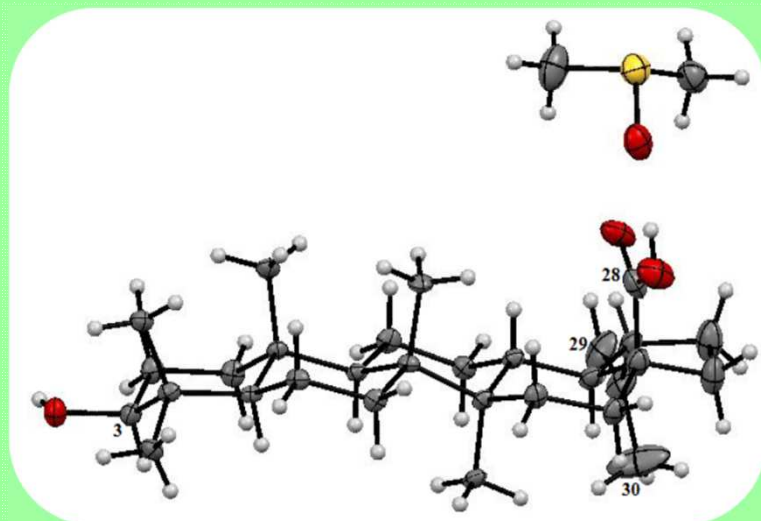
Metoda elektrochemiczna



Kim D.S.H.L., Chen Z., Nguyen V.T., Pezzuto, Qiu S., Lu Z.Z., *Synthetic Comm.* 1997; 27 (9): 1607-1612

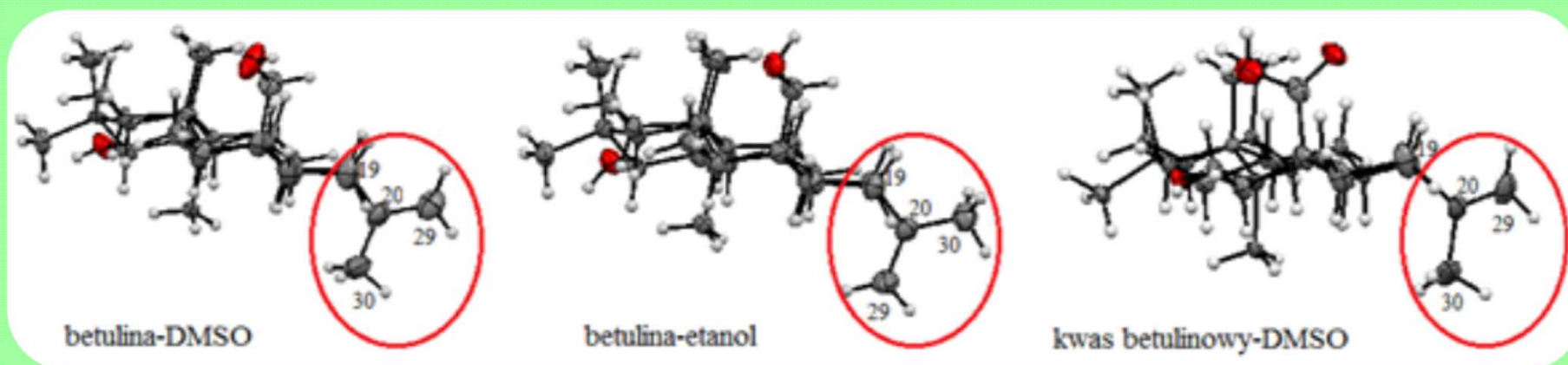
Menard H., Cirtiu C.M., Lalancette J-M., Ruest L., Kaljaca Z., PCT 2006, 1063464A1: Chem. Abs. 2006, 604456

Struktura krystaliczna solwatu kwasu betulinowego-DMSO (1 : 1)



Wiązania wodorowe (A): O1 – H1...O4 2,02; O3 – H3...O4 1,82

Orientacja grupy izopropenylowej w solwatach: betulina-DMSO, betulina-EtOH, kwas betulinowy- DMSO



Kąt torsyjny opisujący

ułożenie grupy izopropenylowej

C29-C20-C19-C21 (°): **-96,8**

88,6 *

-112,2

Boryczka S., Bębenek E., Jastrzębska M., Kusz J., Zubko M., *Z.Kristallogr.* 2012; 227, 379-384.

* Drebuschak T., Mikhailenko M., Brezgunowa M., Shakhtshneider T., Kuznetsova S.,
J.Struct.Chem. 2010; (51): 798-801

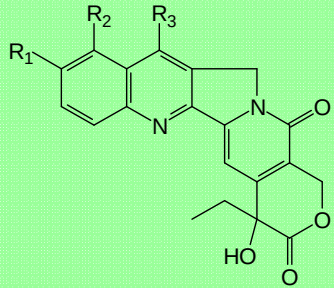
Aktywność przeciwnowotworowa kwasu betulinowego

Początek zainteresowania kwasem betulinowym – rok 1995 od publikacji Pisha i wsp.*

- wysoka selektywność działania
- brak toksyczności w odniesieniu do komórek zdrowych w dawkach do 540 mg/kg m.c.
- mechanizm działania
 - indukcja procesu apoptozy
 - hamowanie aktywności topoizomerazy I
 - hamowanie procesu angiogenezy
- wysoka aktywność wobec komórek linii opornych na inne leki (np. doksorubicynę)
- synergistyczne działanie z innymi lekami (np. z winkrystyną, doksorubicyną, etopozydem, paklitakselem)

*Pisha E., Chai H., Lee I.S., Chogwedera T.E., Fransworth N.R., Cordell G.A., Beecher C.W.W., Fong H.H.S., Kinghorn A.D., Brown D.M., **Wani M.C., Wall M.E.**, Hieken T.J., Das Gupta T.K., Pezzuto J.M., *Nature Med.* 1995; (1): 1046–1051

Odkrywcy taksolu i kamptotecyny

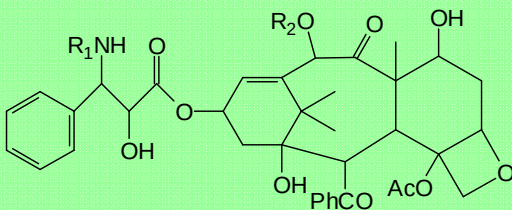


Dr Mansukh Wani

Dr Monroe Wall

Taksol
Kamptotecyna
Kwas betulinowy

Taksol
Kamptotecyna
Kwas betulinowy
Harringtonina
Homoharringtonina



Aktywność przeciwnowotworowa betuliny

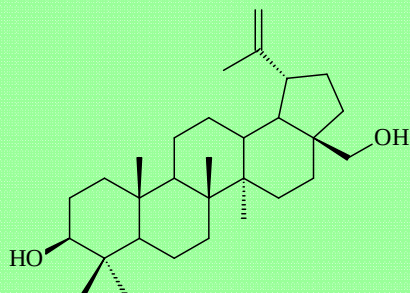
Betulina posiada słabsze działanie przeciwnowotworowe niż kwas betulinowy (wobec takich komórek: czerniak, nerwiak niedojrzały, białaczki HL60, K526)

Zalety:

- brak toksyczności w odniesieniu do komórek zdrowych w dawkach do 500 mg/kg m.c.
- mechanizm działania
 - indukcja procesu apoptozy
 - hamowanie aktywności topoizomerazy II
- synergistyczne działanie z innymi substancjami (np. z cholesterolem)
- łatwa dostępność w dużych ilościach bez większych nakładów finansowych

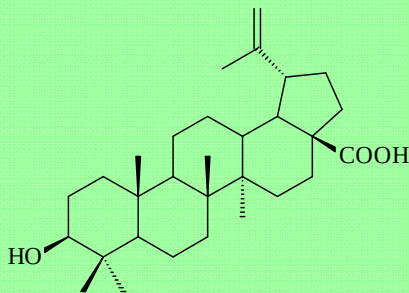
Nie jest do końca wyjaśnione czy aktywność betuliny wynika z jej właściwości, czy ulega ona utlenieniu w układzie biologicznym do kwasu betulinowego

Zależność struktura- aktywność przeciwnowotworowa pochodnych betuliny wobec komórek ludzkiego czerniaka MEL-2



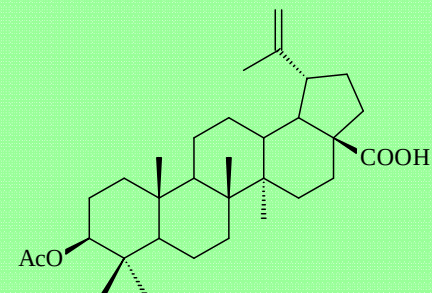
betulina

ED₅₀ > 20 µg/ml



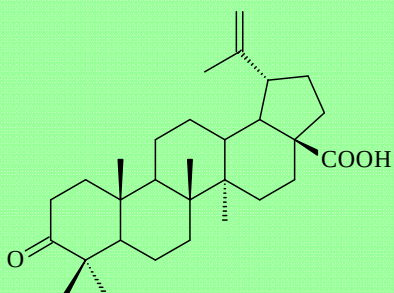
kwas betulinowy

ED₅₀ = 1,2 µg/ml



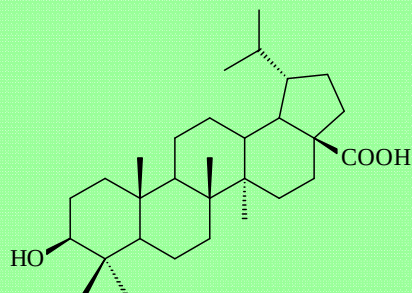
kwas 3-acetylobetulinowy

ED₅₀ = 6,9 µg/ml



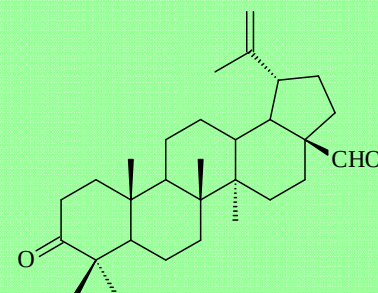
kwas betulonowy

ED₅₀ = 0,9 µg/ml



kwas dihydrobetulonowy

ED₅₀ = 0,7 µg/ml



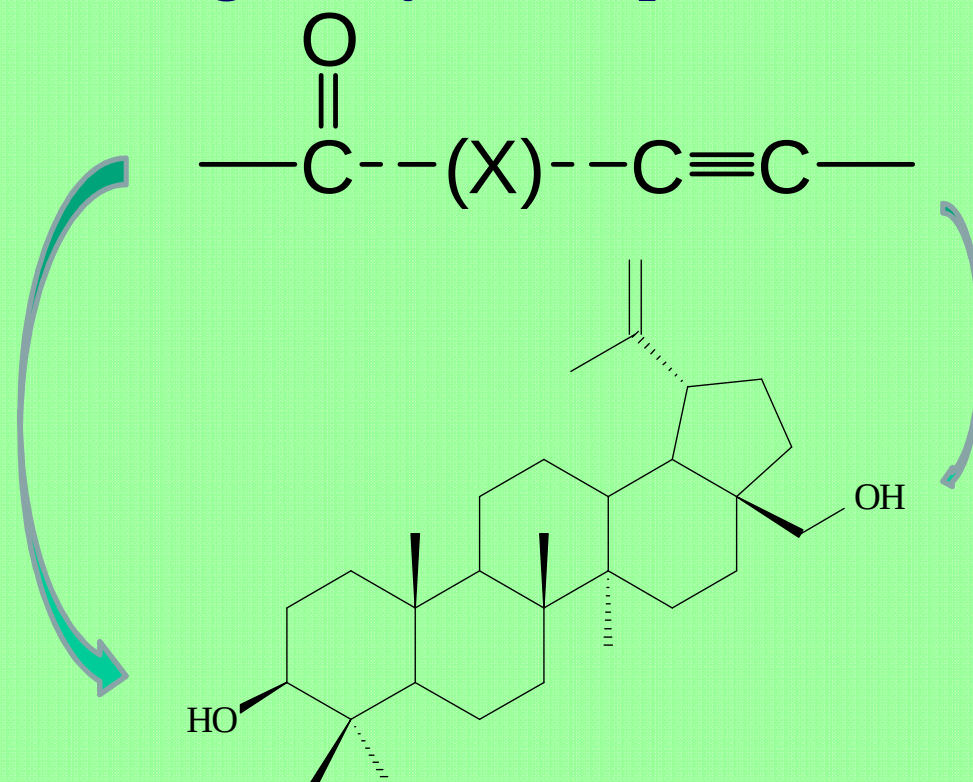
aldehyd betulonowy

ED₅₀ = 7,4 µg/ml

Cichewicz R., Kouzi S.A., *Med.Res.Rev.*, 2004; (24): 90-114.

Kim D.S.H.L., Pezzuto J.M., Pisha E., *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, 1998; (8): 1707-1712.

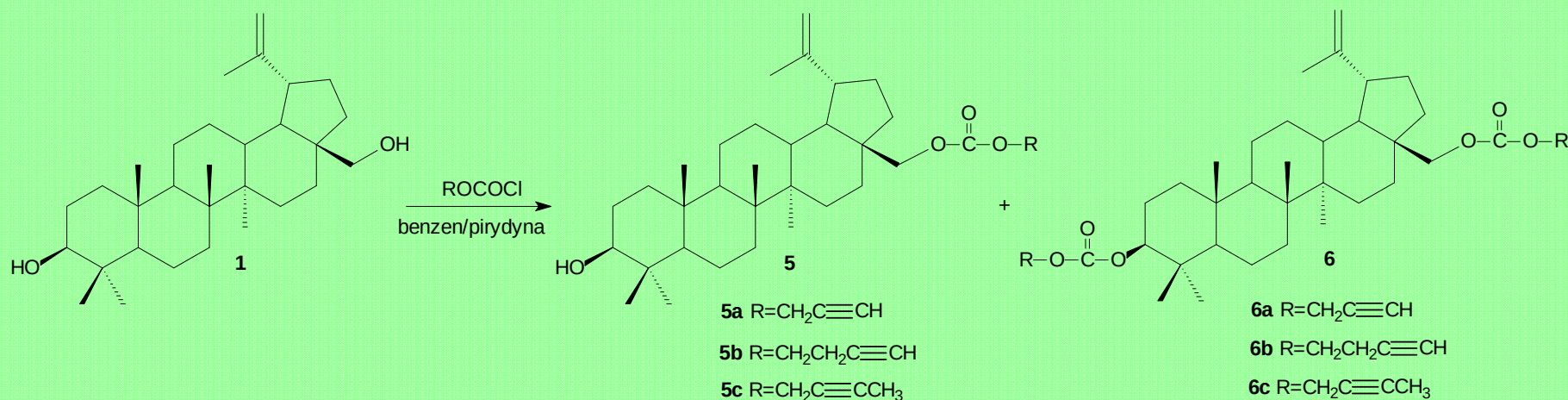
Dlaczego acetylenowe pochodne betuliny ?



Ugrupowanie acetylenowe

- zaliczane jest do jednej z ważniejszych grup funkcyjnych w chemii organicznej i chemii medycznej
- występuje w wielu związkach pochodzenia naturalnego
- powoduje zwiększenie aktywności biologicznej
- zwiększa lipofilowość związku organicznego
- poprawia przenikanie związku przez błony komórkowe
- umożliwia dalszą modyfikację chemiczną

Reakcje betuliny z chloromrówczanami acetylenowymi



Nr związku	Wydajność [%]	Linia komórkowa (IC ₅₀ w µg/ml)				
		CCRF/CEM	T47D	SW707	P388	Balb3T3
5a	69	3,2±0,4	7,2±1,7	9,2±7,1	2,9±0,2	3,9±2,8
5b	64	5,2±1,4	6,9±2,3	22,6±11,9	3,6±1,3	19,5±13,9
5c	54	6,8±2,9	20,1±5,3	36,9±6,3	5,5±2,8	28,4±17,6
6a	27	Neg	Neg	Neg	33,4±1,7	Neg
6b	23	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
6c	28	Neg	Neg	Neg	50,40±31,1	Neg
kwas betulinowy		8,7±2,6	5,4±1,1	13,2±12,0	6,6±3,9	26,5±3,7
betulina		10,9±5,5	32,4±10,7	22,9±15,4	5,5 ±3,3	47,3±7,9
cisplatyna		2,0±0,5	3,1±1,0	2,2±0,5	0,5± 0,3	2,7±0,3

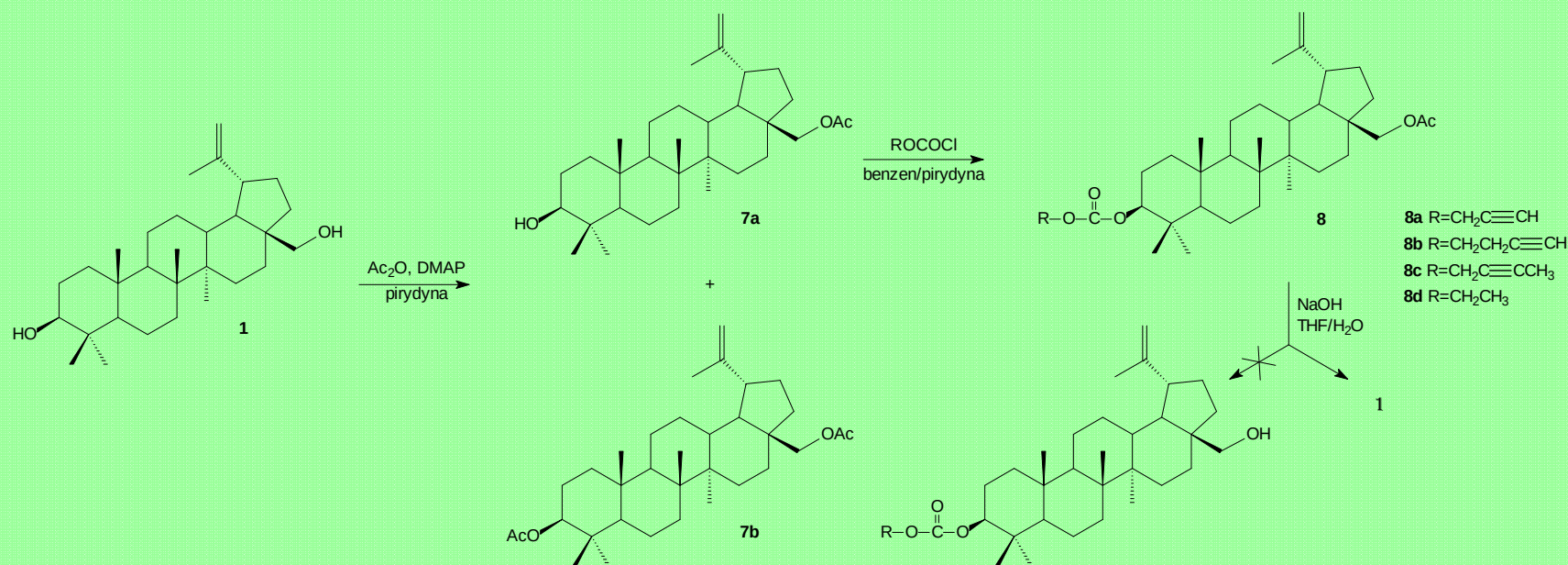
Tabela 1. Aktywność cytotoksyczna pochodnych 5 i 6 w testach *in vitro* wobec linii komórek nowotworowych ludzkiej białaczki limfocytarnej (CCRF/CEM), raka piersi (T47D), raka jelita grubego (SW707), mysiej białaczki (P388) oraz mysich prawidłowych fibroblastów (Balb3T3)

Neg- brak aktywności w zastosowanym zakresie stężeń

Boryczka S., Bębenek E., Wietrzyk J., Nasulewicz-Goldeman A., Kempńska K., Zgł. Pat. UP RP, Nr P-390998 (2010); Biul. Urz. Pat., 22 (987) 2011.

Boryczka S., Bębenek E., Wietrzyk J., Kempńska K., Jastrzębska M., Kusz J., Nowak M. *Molecules* 2013; 18: 4526-4543.

Otrzymywanie 3-acetylenowych pochodnych betuliny

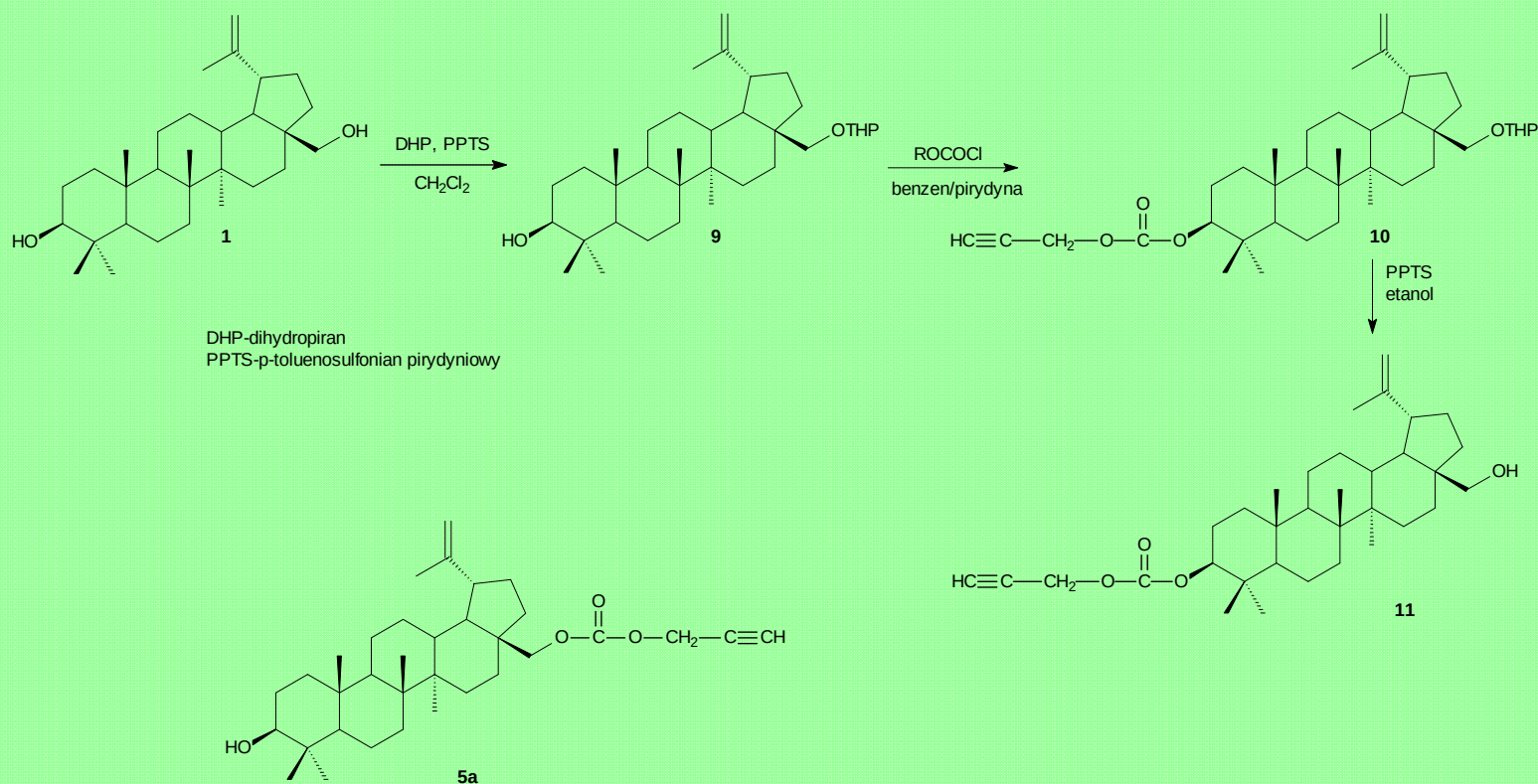


Nr związku	Wydajność [%]	Linia komórkowa (IC ₅₀ w µg/ml)				
		CCRF/CEM	T47D	SW707	P388	Balb3T3
7a	71	3,4±0,3	4,9±0,6	5,1±2,5	12,5±14,7	29,7±35,8
7b	18	34,1±6,4	Neg	Neg	40,2±5,0	Neg
8a	89	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
8b	63	Neg	Neg	Neg	46,7±16,2	Neg
8c	67	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
8d	84	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
kwas betulinowy		8,7±2,6	5,4±1,1	13,2±12,0	6,6±3,9	26,5±3,7
betulina		10,9±5,5	32,4±10,7	22,9±15,4	5,5 ±3,3	47,3±7,9
cisplatyna		2,0±0,5	3,1±1,0	2,2±0,5	0,5± 0,3	2,7±0,3

Tabela 2. Aktywność cytotoksyczna pochodnych 7 i 8 w testach *in vitro* wobec linii komórek nowotworowych ludzkiej białaczki limfocytarnej (CCRF/CEM), raka piersi (T47D), raka jelita grubego (SW707), mysiej białaczki (P388) oraz mysich prawidłowych fibroblastów (Balb3T3)

Neg- brak aktywności w zastosowanym zakresie stężeń

Otrzymywanie 3-acetylenowych pochodnych betuliny

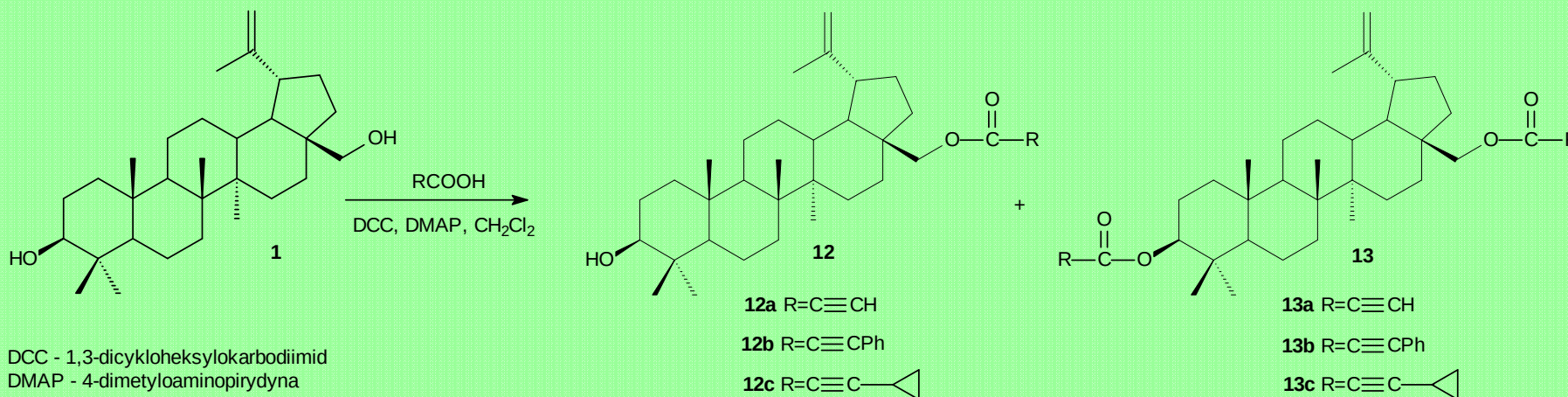


Nr związku	Wydajność [%]	Linia komórkowa (IC ₅₀ w µg/ml)				
		CCRF/CEM	T47D	SW707	P388	Balb3T3
10	82	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
11	74	9,2±2,0	12,2±3,3	61,5±16,5	5,9±2,3	Neg
5a	69	3,2±0,4	7,2±1,7	9,2±7,1	2,9±0,2	3,9±2,8
kwas betulinowy		8,7±2,6	5,4±1,1	13,2±12,0	6,6±3,9	26,5±3,7
betulina		10,9±5,5	32,4±10,7	22,9±15,4	5,5 ±3,3	47,3±7,9
cisplatyna		2,0±0,5	3,1±1,0	2,2±0,5	0,5± 0,3	2,7±0,3

Tabela 3. Aktywność cytotoksyczna pochodnych **10-11** w testach *in vitro* wobec linii komórek nowotworowych ludzkiej białaczki limfocytarnej (CCRF/CEM), raka piersi (T47D), raka jelita grubego (SW707), mysiej białaczki (P388) oraz mysich prawidłowych fibroblastów (Balb3T3)

Neg- brak aktywności w zastosowanym zakresie stężeń

Reakcje betuliny z kwasami acetylenokarboksylowymi



Nr związku	Wydajność [%]	Linia komórkowa (IC ₅₀ w µg/ml)				
		CCRF/CEM	T47D	SW707	P388	Balb3T3
12a	60	0,02±0,001	9,1±1,9	14,9±3,3	0,4±0,1	0,3±0,05
12b	70	49,0±9,8	Neg	Neg	Neg	Neg
12c	80	19,6±9,5	33,6±6,3	-	8,4±2,8	47,7±8,2
13a	12	9,9±7,0	16,2±4,3	9,5±1,9	31,9±1,4	21,1±2,6
13b	27	66,0±2,8	Neg	Neg	Neg	Neg
kwas betulinowy		8,7±2,6	5,4±1,1	13,2±12,0	6,6±3,9	26,5±3,7
betulina		10,9±5,5	32,4±10,7	22,9±15,4	5,5 ±3,3	47,3±7,9
cisplatyna		2,0±0,5	3,1±1,0	2,2±0,5	0,5± 0,3	2,7±0,3

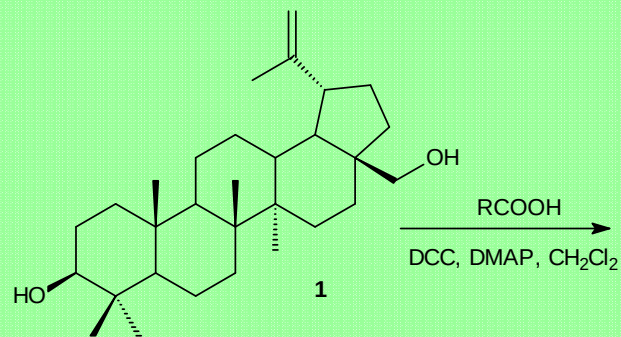
Tabela 4. Aktywność cytotoksyczna pochodnych 12 i 13 w testach *in vitro* wobec linii komórek nowotworowych ludzkiej białaczki limfocytarnej (CCRF/CEM), raka piersi (T47D), raka jelita grubego (SW707), mysiej białaczki (P388) oraz prawidłowych mysich fibroblastów (Balb3T3)

Neg- brak aktywności w zastosowanym zakresie stężeń

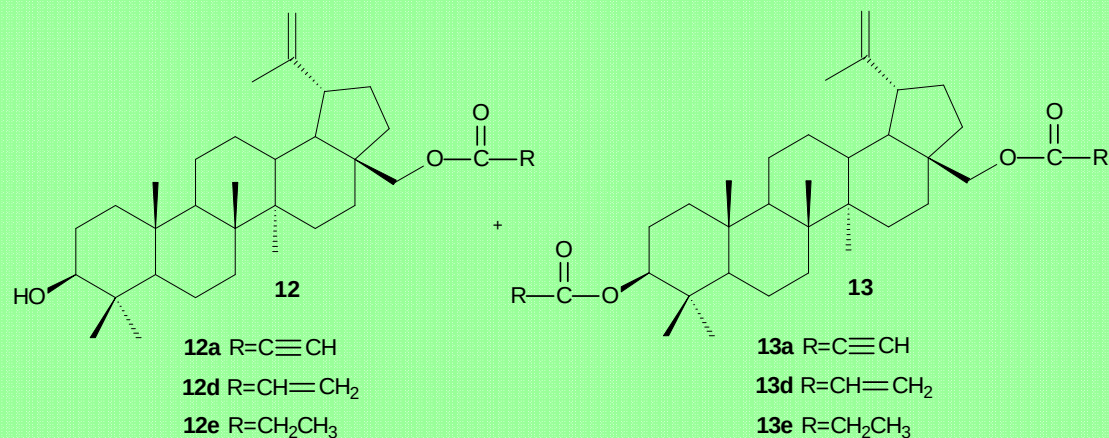
Boryczka S., Bębenek E., Wietrzyk J., Nasulewicz-Goldeman A., Kempieńska K., Zgł. Pat. UP RP, Nr P-390998 (2010); Biul. Urz. Pat., 22 (987) 2011.

Boryczka S., Bębenek E., Wietrzyk J., Kempieńska K., Jastrzębska M., Kusz J., Nowak M. *Molecules* 2013; 18: 4526-4543.

Reakcje betuliny z kwasami acetylenokarboksylowymi



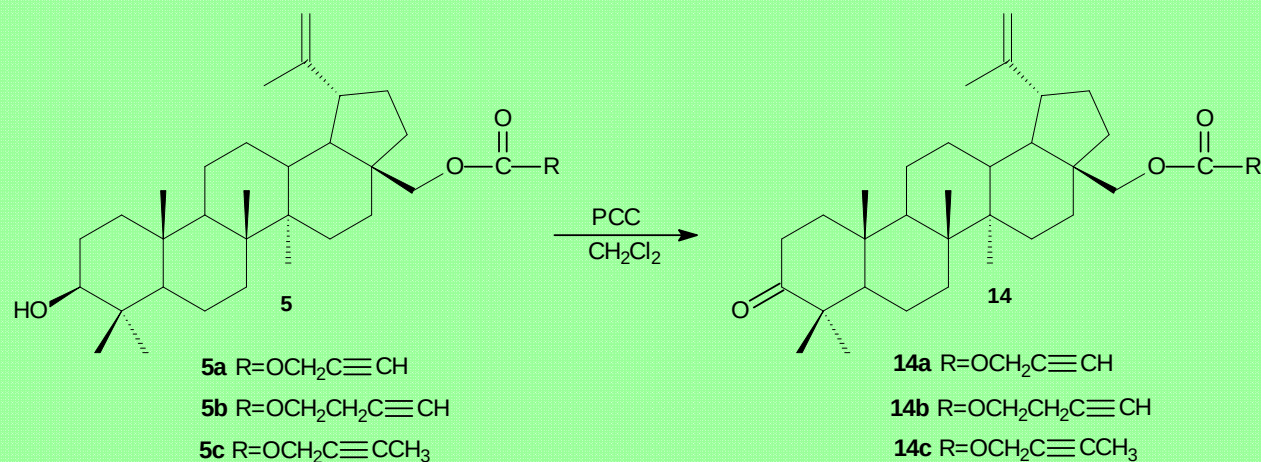
DCC - 1,3-dicykloheksylokarbodiimid
DMAP - 4-dimetyloaminopirydyna



Nr związku	Wydajność [%]	Linia komórkowa (IC ₅₀ w µg/ml)				
		CCRF/CEM	T47D	SW707	P388	Balb3T3
12a	60	0,02±0,001	9,1±1,9	14,9±3,3	0,4±0,1	0,3±0,05
12d	74	13,6±2,1	7,1±2,7	29,6±4,2	9,9±5,8	24,2±6,9
12e	86	8,1±0,9	12,1±4,4	29,2±24,4	3,3±0,8	32,3±23,0
kwas betulinowy		8,7±2,6	5,4±1,1	13,2±12,0	6,6±3,9	26,5±3,7
betulina		10,9±5,5	32,4±10,7	22,9±15,4	5,5 ±3,3	47,3±7,9
cisplatyna		2,0±0,5	3,1±1,0	2,2±0,5	0,5± 0,3	2,7±0,3

Tabela 5. Aktywność cytotoksyczna pochodnych 12 i 13 w testach *in vitro* wobec linii komórek nowotworowych ludzkiej białaczki limfocytarnej (CCRF/CEM), raka piersi (T47D), raka jelita grubego (SW707), mysiej białaczki (P388) oraz prawidłowych mysich fibroblastów (Balb3T3)

Otrzymywanie acetylenowych pochodnych alkoholu betulonowego



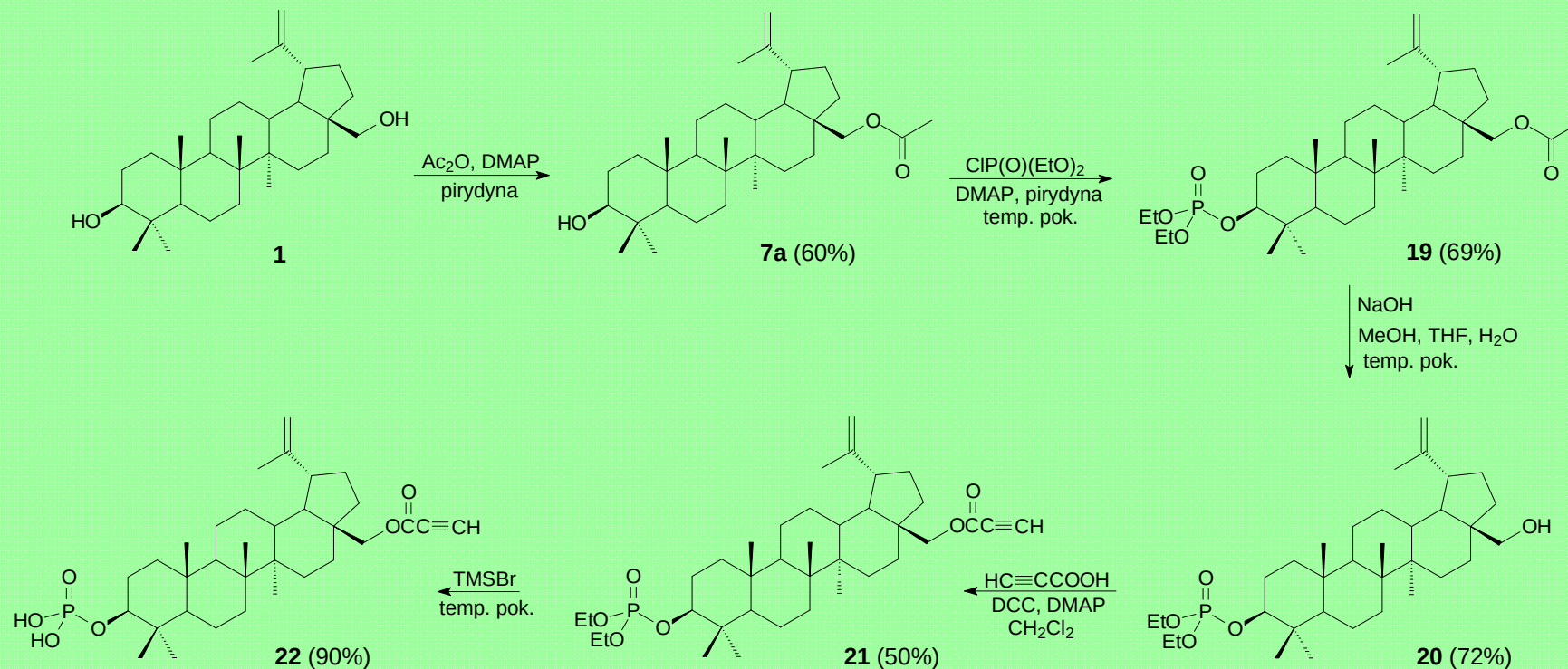
PCC-chlorochromian
pirydyniowy

Nr związku	Wydajność [%]	Linia komórkowa (IC ₅₀ w µg/ml)			
		CCRF/CEM	T47D	SW707	P388
14a	94	18,7±6,6	23,3±3,5	Neg	30,3±11,8
5a	69	3,2±0,4	7,2±1,7	9,2±7,1	2,9±0,2
14b	57	25,2±4,6	29,8±10,7	Neg	3,8±1,9
5b	64	5,2±1,4	6,9±2,3	22,6±11,9	3,6±1,3
14c	94	47,6±5,7	79,2±5,2	Neg	18,3±13,0
5c	54	6,8±2,9	20,1±5,3	36,9±6,3	28,4±17,6
kwasy betulonowe		8,7±2,6	5,4±1,1	13,2±12,0	6,6±3,9
betulina		10,9±5,5	32,4±10,7	22,9±15,4	5,5 ±3,3
cisplatyna		2,0±0,5	3,1±1,0	2,2±0,5	0,5± 0,3

Tabela 7. Aktywność cytotoksyczna pochodnych **14** w testach *in vitro* wobec linii komórek nowotworowych ludzkiej białaczki limfocytarnej (CCRF/CEM), raka piersi (T47D), raka jelita grubego (SW707) oraz mysiej białaczki (P388)

Neg- brak aktywności w zastosowanym zakresie stężeń

Pochodne fosforanowe betuliny



Nr związku	Linia komórkowa (IC ₅₀ w µg/ml)			
	CCRF/CEM	T47D	P388	Balb3T3
7a	3,4±0,3	4,9±0,6	12,5±14,7	29,7±35,8
21	0,5±0,1	2,4±0,1	0,5±0,2	2,5±1,2
22	3,9±0,1	30,3±1,5	3,1±0,2	7,2±4,5
12a	0,02±0,001	9,1±1,9	0,4±0,1	0,3±0,05
betulina	27,8±6,1	28,3±9,3	10,4±3,5	43,0±7,8
cisplatyna	0,6±0,3	2,7±0,8	0,4±0,2	1,8±0,8

Tabela 9. Aktywność cytotoksyczna pochodnych 21 i 22 w testach *in vitro* wobec linii komórek nowotworowych ludzkiej białaczki limfocytarnej (CCRF/CEM), raka piersi (T47D), mysiej białaczki (P388) oraz prawidłowych mysich fibroblastów (Balb3T3)

Współwykonawcy:

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN,
Zakład Onkologii Doświadczalnej, Wrocław

dr hab. Joanna Wietrzyk
dr Katarzyna Kempieńska
mgr Beata Filip-Psurska
mgr Joanna Sadowska

Instytut Fizyki, Uniwersytet Śląski w Katowicach
dr hab. Maria Jastrzębska, prof. US
dr hab. Joachim Kusz, prof. US

Katedra i Zakład Chemii Organicznej,
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej,
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
dr Ewa Bębenek
dr Elwira Chrobak



Dziękuję za uwagę