

**UNIVERSITATEA DE MEDICINA SI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE FARMACIE
DEPARTMENT II**

MIOC MARIUS-NICOLAE



REZUMAT

**DESIGNUL, SINTEZA SI EVALUAREA
ACTIVITATII BIOLOGICE A UNOR NOI
DERIVATI TRITERPENICI HETEROCICLICI, CU
POTENTIAL EFECT ANTITUMORAL**

Coordonator stiintific

PROF. UNIV. DR. ȘOICA CODRUȚA

**Timișoara
2023**

TABLE OF CONTENTS

LIST OF PUBLISHED SCIENTIFIC PAPERS	VI
ARTICLES INCLUDED IN THE PHD THESIS	VI
COMPLEMENTARY ARTICLES	VII
LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	VIII
LIST OF FIGURES	XII
LIST OF TABLES	XV
ACKNOWLEDGEMENTS	XVI
INTRODUCTION	XVII
GENERAL PART	1
1. PATHOLOGY OF MALIGNANT DISEASES	1
1.1. GENERAL CONSIDERATIONS	1
1.2. THE PARADIGM SHIFT IN THE DEVELOPMENT OF NEW ANTICANCER THERAPIES: THE TRANSITION FROM SYNTHETIC MOLECULES TO NATURAL COMPOUNDS	3
2. ANTITUMOR EFFECTIVE PENTACYCLIC TRITERPENES	7
2.1. GENERAL CONSIDERATIONS	7
2.2. TRITERPENIC ACIDS	10
2.3. THE MECHANISM OF ACTION INVOLVED IN THE ANTIPROLIFERATIVE EFFECT INDUCED BY TRITERPENIC ACIDS	12
3. HETEROCYCLES USED IN THE SYNTHESIS OF ANTI-TUMOR EFFICIENT TRITERPENE DERIVATIVES	19
3.1. TRIAZOLES	19
3.2. BENZOTRIAZOLE	22
3.3. TRIAZOLE DERIVATIVES OF PENTACYCLIC TRITERPENES	24
4. GOLD NANOPARTICLES - DELIVERY SYSTEMS FOR NATURAL COMPOUNDS WITH ANTI-PROLIFERATIVE EFFECT	29
4.1. GENERAL CONSIDERATIONS	29
4.2. ANTIPROLIFERATIVE ACTIVE TRITERPENES FORMULATED AS GOLD NANOPARTICLE BIOCONJUGATES	31
EXPERIMENTAL PART	35
5. SYNTHESIS AND PHYSICO-CHEMICAL ASSESSMENT OF TRITERPENIC ACID-TRIAZOLE DERIVATIVES AND TRITERPENIC ACID- TRIAZOLE DERIVATIVES FORMULATED AS GOLD NANOPARTICLE BIOCONJUGATES	35
5.1. INTRODUCTION	35

IV

5.2.	MATERIALS AND METHODS	36
5.2.1.	CHEMICALS AND INSTRUMENTATION	36
5.2.2.	GENERAL PROCEDURE FOR THE SYNTHESIS OF BEZOTRIAZOLYL ESTERS OF BA, OA, AND UA	38
5.2.3.	GENERAL PROCEDURE FOR THE SYNTHESIS OF GOLD NANOPARTICLE CONJUGATED TRITERPENIC ACID BEZOTRIAZOLYL ESTERS	41
5.3.	RESULTS AND DISCUSSIONS	41
5.3.1.	SYNTHESIS OF TRITERPENIC ACID – BENZOTRIAZOLE ESTERS	41
5.3.2.	SYNTHESIS OF GOLD NANOPARTICLE CONJUGATED TRITERPENIC ACID BEZOTRIAZOLYL ESTERS	47
6.	BIOLOGICAL ANTI-MELANOMA ASSESSMENT OF TRITERPENIC ACID-TRIAZOLE DERIVATIVES AND TRITERPENIC ACID-TRIAZOLE DERIVATIVES FORMULATED AS GOLD NANOPARTICLE BIOCONJUGATES	57
6.1.	INTRODUCTION	57
6.2.	MATERIALS AND METHODS	57
6.2.1.	CELL CULTURE	57
6.2.2.	CELL VIABILITY ASSESSMENT	58
6.2.3.	IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY - MORPHOLOGICAL ASSESSMENT OF APOPTOTIC CELLS	58
6.2.4.	HIGH-RESOLUTION RESPIROMETRY	59
6.2.5.	QUANTITATIVE REAL-TIME PCR	60
6.3.	RESULTS AND DISCUSSIONS	61
6.3.1.	THE CYTOTOXIC EFFECT OF TRITERPENIC ACID- BENZOTRIAZOLE ESTERS AND THEIR SUBSEQUENT GNP CONJUGATES ON HACAT AND A375 CELL VIABILITY	61
6.3.2.	THE EFFECT OF TRITERPENIC ACID-BENZOTRIAZOLE ESTERS AND THEIR SUBSEQUENT GNP CONJUGATES ON THE CELL MORPHOLOGY OF HACAT AND A375 CELLS	65
6.3.3.	THE EFFECT OF TRITERPENIC ACID-BENZOTRIAZOLE ESTERS AND THEIR SUBSEQUENT GNP CONJUGATES ON THE EXPRESSION LEVELS OF BCL-2 AND BAX GENES.	73
6.3.4.	HIGH-RESOLUTION RESPIROMETRY STUDIES	75
7.	IN SILICO EVALUATION OF THE TRITERPENIC ACID-TRIAZOLE DERIVATIVES BY MOLECULAR DOCKING	83
7.1.	INTRODUCTION	83
7.2.	MATERIALS AND METHODS	83

7.3. RESULTS AND DISCUSSIONS	84
CONCLUSIONS.....	87
BIBLIOGRAPHY	90
<i>IN EXTENSO</i> PUBLISHED ARTICLES	II

REZUMAT

Numeroase specii de plante conțin metaboliți secundari cunoscuți sub numele de triterpene pentaclice, care conțin de obicei lupan, oleanan sau ursan ca structura de baza. Proprietățile antiinflamatorii, anticancerigene și imunomodulatoare ale acizilor betulinic, oleanolic și ursolic au fost intens studiate. Pentru a elimina inconveniente precum solubilitatea slabă în apă și biodisponibilitatea orală scăzută, un număr mare de derivați semisintetici au fost dezvoltati pentru a elimina aceste dezavantaje. În consecință, triterpenele pentaclice pot fi utilizate ca platforme pentru sinteza derivaților semisintetici printr-o varietate de procese chimice.

În ceea ce privește triterpenele pentaclice, acizii betulinic (BA), ursolic (UA) și oleanolic (OA) au fost identificați ca agenți anticancerigeni eficienți și selectivi cu mecanisme de acțiune bine studiate. Acizii triterpenici prezintă solubilitate foarte scăzută în apă, care a fost corelată cu biodisponibilitatea lor orală slabă; în plus față de diferite abordări tehnice pentru a aborda această problemă, cum ar fi complexarea ciclodextrinei sau nanoformulațiile, au fost efectuate diverse modificări chimice asupra moleculelor compușilor, ceea ce a dus la sinteza și evaluarea a numeroși derivați semisintetici.

Pe parcursul prezentei cercetări doctorale, propunem sinteza și evaluarea biologică a derivaților de BA, OA și UA care conțin cicluri de triazol, împotriva melanomului uman. Obiectivul secundar este de a obține o nanoformulare pe bază de nanoparticule de aur (GNP) a derivaților triazolo-triterpenici sintetizați și de a evalua potențialul lor citotoxic împotriva melanomului pentru a determina dacă aceste formulări sporesc activitatea biologică a celor trei derivați triterpenici. În plus, acest studiu încearcă să evidențieze un posibil mecanism de acțiune al compușilor nou sintetizați și a formulărilor pe bază de GNP în raport cu efectul lor antiproliferativ. Studiile computaționale vor fi, de asemenea, utilizate pentru a evalua dacă modificările chimice au un impact pozitiv față de afinitatea de legare a acestor acizi triterpenici față de proteinele lor țintă.

În primul studiu al acestei cercetări doctorale, propunem sinteza și evaluarea fizico-chimică a esterilor 1-hidroxibenzotriazol BA, OA și UA. În plus, având în vedere că acești ester, ca și moleculele lor mamă, sunt structuri foarte lipofile, care pot împiedica potențialul antiproliferativ al moleculei și având în vedere că nanoparticulele de aur nu au efecte citotoxice, sunt ușor accesibile și pot lega diferiți liganzi, cum ar fi inelele triazol (găsite în structura esterilor noștri), un alt scop al acestei cercetări a fost formularea eterilor de acid benzotriazol-triterpenic obținuți ca conjugați GNP.

Cei trei compuși (BA-HOBt, OA-HOBt și UA-HOBt) au fost sintetizați prin esterificarea cu HOBt asistată de DCC a BA, OA și UA. Calea de sinteză este prezentată în Figura 1.

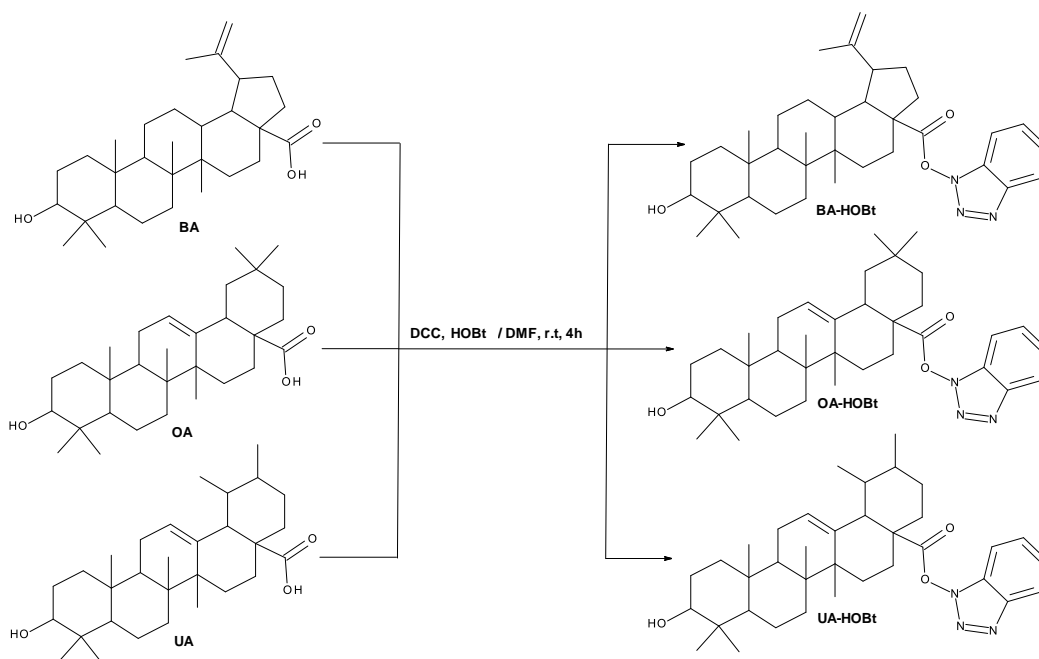


Figura 1. Calea de sinteză pentru esterii benzotriazolil-triterpenici (BA-HOBt, OA-HOBt și UA-HOBt).

Identitatea celor trei compuși formați a fost validată prin analiza FTIR, LC-MS și RMN. Spectrele FTIR ale esterilor benzotriazolului prezintă atât semnale caracteristice ale acizilor triterpenici (O-H în jurul valorii de 3440 cm^{-1} , C-H două semnale în jurul valorii de 2930 și 2870 cm^{-1} și C = O valorii de 1800 cm^{-1}) și benzotriazol, de asemenea (semnalul = C-N în jurul valorii de 1240 cm^{-1}). Analiza LC-MS a confirmat masele tuturor celor trei compuși sintetizați.

Cu toate acestea, cea mai precisă analiză efectuată pentru validarea identității tuturor compușilor a fost spectroscopia RMN. Spectrele ^1H -RMN a tuturor compușii sintetizați arată absența protonului din gruparea carboxil, dezvăluind în același timp schimbările chimice ale protonilor carbociclici din fenil în regiunea 8.5-7.5 ppm. În același timp, în spectrele ^{13}C RMN, în afară de deplasărilor chimice corespunzătoare carbonilor de bază triterpenici, schimbările chimice ale celor șase carboni din nucleul de fenil sunt observabile și în regiunea 145-120 ppm.

Pentru sinteza GNP, citratul trisodic a fost utilizat pentru a reduce acidul clorauric. Funcționalizarea GNP acoperite cu citrat cu esterii acizilor triterpenici BA-HOBt, OA-HOBt și UA-HOBt a fost ușor de realizat prin dispersia asistată cu ultrasunete a derivatului acidului triterpenic în nanosuspensia de GNP, ceea ce a permis 1,2,3-triazolului să se atașeze la suprafața GNP. Figura 2 descrie tehnica de sinteză utilizată pentru sinteza GNP simple și funcționalizate cu triterpene.

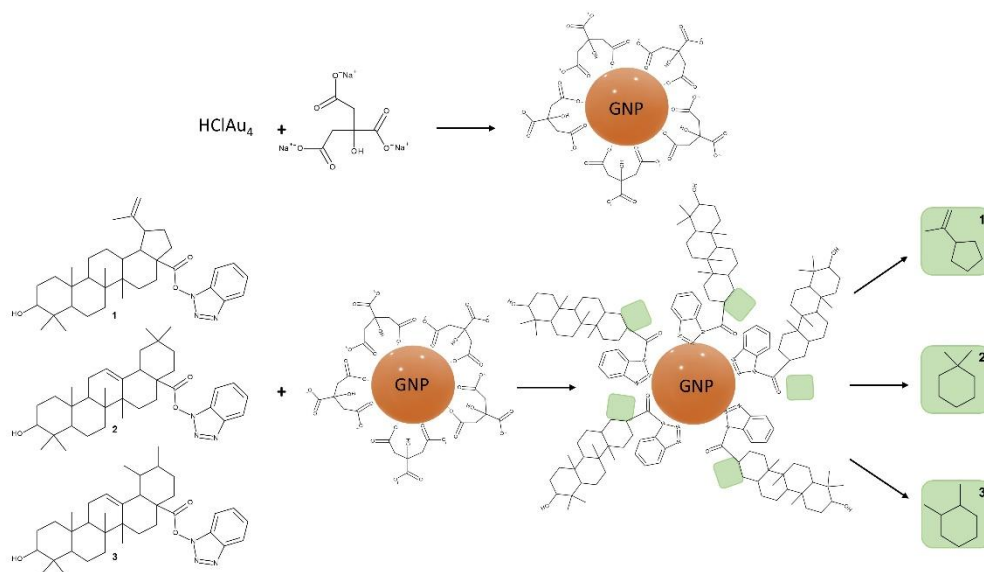


Figura 2. Sinteza GNP acoperit cu citrat, BA-HOBt GNP (1), OA-HOBt GNP (2) și UA-HOBt GNP (3); condiții: i. H₂O, fierbere; ii. Dispersie asistată cu ultrasunete, 1 oră.

Spectroscopia UV-VIS a fost utilizată pentru a observa sinteza și funcționalizarea GNP. Analiza a validat sinteza GNP prin tehnica de reducere a citratului. Funcționalizarea GNP cu derivații triterpenici a fost confirmată cu ajutorul spectroscopiei FTIR. Spectrele FTIR ale GNP sunt comparabile cu rezultatele recente privind GNP acoperite cu citrat și prezintă cele două peakuri distincte de vibrații simetrice și anti-simetrice ale carboxilatului din citrat (1593 și 1402 cm^{-1}) în plus față de vibrațiile de întindere O-H la 3439 cm^{-1} . În fiecare caz, spectrele FTIR demonstrează că GNP au fost funcționalizate cu succes de derivatul acidului triterpenic.

Examinarea TEM a evidențiat nanoparticule sferice GNP stabile cu diametre cuprinse între 13 și 25 nm; funcționalizarea GNP cu triterpene nu a afectat forma sau diametrul nanoparticulelor funcționalizate. Cu toate acestea, studiile de tip DLS (dinamic light scattering) au arătat că BA-HOBt GNP, OA-HOBt GNP și UA-HOBt GNP au crescut în dimensiunea hidrodinamică și au avut un indice de polidispersitate ușor mai mare (PDI).

În cel de-al doilea studiu, esterii triterpeno-benzotriazolici și conjugății lor cu GNP au fost testați împotriva celulelor melanomului în acest context. În această secțiune, pe lângă evaluarea activității citotoxice împotriva melanomului a probelor obținute, am explorat și un potențial mecanism de acțiune asociat activității antiproliferative.

Folosind testul Alamar Blue, efectele BA-HOBt (1), OA-HOBt (2) și UA-HOBt (3), și a acizilor lor corespunzători (BA, OA și UA) respectiv conjugății cu GNP (BA-HOBt GNP, OA-HOBt GNP și UA-HOBt GNP) asupra viabilității keratinocitelor umane sănătoase HaCaT și a celulelor A375 de melanom uman au fost determinate după o perioadă de tratament de 24 de ore.

Derivații triterpenici și conjugății lor cu GNP au prezentat o citotoxicitate dependentă de doză semnificativ mai mare împotriva liniei celulare de melanom A375 decât compușii precursori. Probele examinate au avut efecte citotoxice minime sau inexistente asupra celulelor necanceroase (HaCaT).

Toate probele au afectat morfologia celulelor într-un mod compatibil cu apoptoza. Acest lucru a fost observat în primul rând în linia celulară canceroasă examinată, în timp ce celulele normale supuse acestei analize au prezentat semne de apoptoza numai la cele mai mari concentrații testate și numai la cazuri rare.

Rezultatele PCR au relevat o scădere a expresiei relative a genei Bcl-2 antiapoptotice și o creștere a expresiei genelor Bax pro-apoptotice, în celulele canceroase tratate cu compușii de testare și conjugății GNP, confirmând ipoteza efectului pro-apoptotic.

Derivații triterpenici și conjugății lor cu GNP sunt inhibitori selectivi ai funcției mitocondriale în celulele melanomului A735, determinate de respirometria de înaltă rezoluție, unde celulele normale tratate cu aceleași substanțe nu au prezentat semne de afectare mitocondrială.

În ultimul studiu al lucrării curente, având în vedere datele biologice obținute pentru cei trei derivați triterpenici, am folosit andocarea moleculară pentru a evalua potențialul acestor esteri de a inhiba proteina anti-apoptotică Bcl-2. De asemenea, au fost andocate structurile precursorilor, BA, OA și, respectiv, UA, pentru a evalua comparativ dacă există o creștere a afinității teoretice față de Bcl-2 din cauza modificărilor structurale utilizate. În comparație cu compușii lor părinte respectivi BA, OA și UA, compușii 1-3 prezintă o scădere notabilă a energiei de legare și o creștere a afinității pentru Bcl-2, după cum reiese din rezultatele de andocare. Putem observa, de asemenea, că aceiași compuși 1-3 au scoruri de andocare care sunt relativ apropiate de cele ale ligandului nativ (NL). Acest aspect este strâns asociat cu transformarea structurală care a avut loc și interacțiunile dintre acești compuși și situsul activ al Bcl-2.

Compusul 1 se aseamănă cel mai mult cu NL în ceea ce privește interacțiunile cu reziduurile de aminoacizi (Asp70, Phe71 și Met74), inelul benzotriazolului acționând similar cu inelul de tetrahidrochinolină din structura NL (Figura 3). În timp ce compusul 3 formează, de asemenea, interacțiuni hidrofobe cu Ala108 și Arg105 și are o

orientare opusă față de conformația compusului 1 (Figura 3), compusul 2 se comportă oarecum diferit. În acest caz, inelul benzotriazolului interacționează cu Arg105 prin mai multe legături de hidrogen (HB), iar structura interacționează, de asemenea, cu Asp70 la polul opus, ancorând ferm molecula în buzunarul de legare (Figura 3). Cu toate acestea, inelul benzotriazolului ar putea fi o opțiune utilă în proiectarea inhibitorilor Bcl-2 pe bază de triterpene.

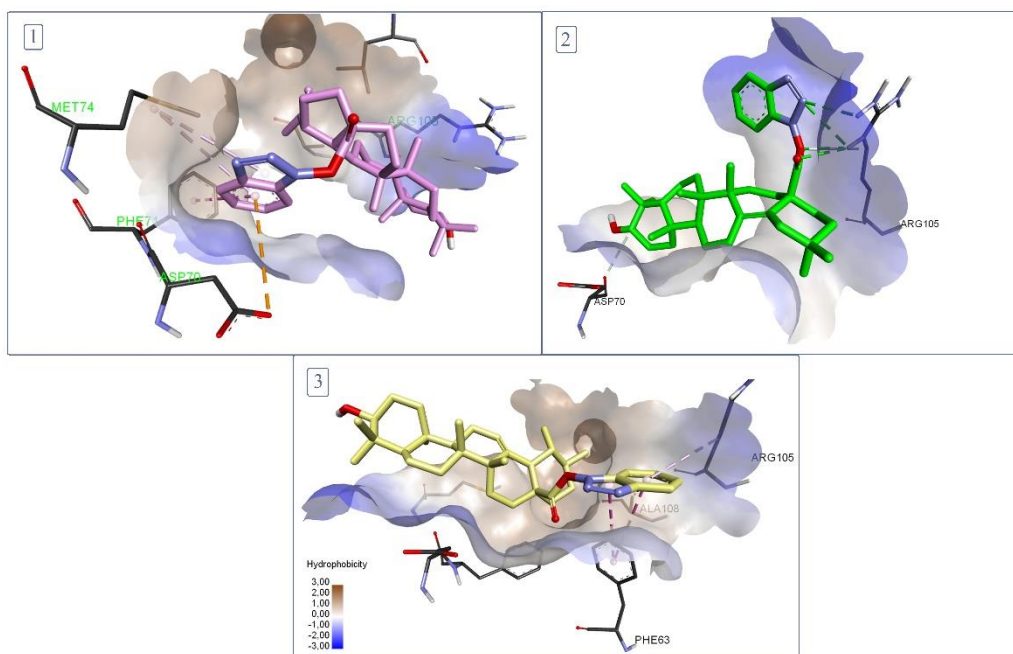


Figura 3. Bcl-2 (2W3L) în complex cu compușii 1 (roz), 2 (verde) și 3 (galben); Interacțiunile HB sunt reprezentate de linii punctate verzi, interacțiuni hidrofobe prin linii punctate violet și interacțiuni electrostatice prin linii punctate portocalii; aminoacizii care interacționează sunt prezentați ca bastonașe gri închis

Astfel putem concluziona că esterificarea cu hidroxi-benzotriazol este o abordare practică care crește efectul apoptotic al acizilor triterpenici în melanom și poate fi utilizată ca un instrument valoros în dezvoltarea viitorilor compuși semisintetici triterpenoizi cu potențial anticancerigen.

Efectul antiproliferativ al esterilor acizilor triterpenici cu benzotriazol poate fi îmbunătățit în continuare prin formularea cu GNP. Cu toate acestea, sunt necesare cercetări suplimentare pentru a vedea dacă funcționalizarea altor derivați triterpenici purtători de triazol cu GNP crește, de asemenea, efectele lor citotoxice împotriva melanomului. Este posibil ca acest lucru să deschidă calea pentru o modalitate inedită și eficientă de dezvoltare a livrării de compuși triterpenoidici asistată de GNP și, de asemenea, să adauge informații valoroase la literatura restrânsă cu privire la utilizarea GNP ca sistem de livrare versatil pentru triterpene pentaciclice.