

**„VICTOR BABEȘ” UNIVERSITY OF MEDICINE  
AND PHARMACY FROM TIMIȘOARA  
FACULTY OF PHARMACY  
DEPARTMENT II**

**NISTOR GABRIELA**



# **REZUMAT**

**SINTEZA ȘI EVALUAREA BIOLOGICĂ A UNOR  
BIOCONJUGAȚI TRIAZOLO-TRITERPENICI CU  
POTENȚIAL EFECT ANTICANCEROS**

Coordonatori științifici

**PROF. UNIV. DR. ȘOICA CODRUȚA**

**PROF. UNIV. DR. DEHELEAN CRISTINA**

**Timișoara  
2023**



## TABLE OF CONTENTS

LIST OF PUBLISHED SCIENTIFIC PAPERS .....	V
ARTICLES INCLUDED IN THE PHD THESIS .....	V
COMPLEMENTARY ARTICLES.....	V
LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS .....	VI
LIST OF FIGURES .....	VIII
ACKNOWLEDGEMENTS.....	XIII
INTRODUCTION .....	XV
GENERAL PART.....	1
1.    CANCER .....	1
2.    PENTACYCLIC TRITERPENES .....	3
2.1.    BETULINIC ACID.....	5
2.2. HETEROCYCLIC AND NITROGEN BEARING DERIVATIVES OF BETULINIC ACID.....	8
3.    1,2,4-TRIAZOLES AND THEIR DERIVATIVES .....	12
4.    BETULINIC ACID TRIAZOLE DERIVATIVES .....	15
EXPERIMENTAL PART.....	23
5.    SYNTHESIS AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF BETULINIC ACID DERIVATIVES.....	23
5.1.    MATERIALS AND METHODS.....	24
5.1.1. CHEMICAL REAGENTS.....	24
5.1.2. SYNTHESIS OF 1H-1,2,4-TRIAZOL-3-THIOL (TZ1) .....	24
5.1.3. SYNTHESIS OF 5-SUBSTITUTED-1H-1,2,4-TRIAZOLE-3-THIOL.....	25
5.1.4. SYNTHESIS OF 3 $\beta$ -O-ACETYL-30-BROMOBETULINIC ACID (BrBA) .....	25
5.1.5. SYNTHESIS OF 30-TRIAZOLE SUBSTITUTED BETULINIC ACID 26	26
5.2.    INSTRUMENTS.....	26
5.2.1. NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY .....	26
5.2.2. FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY .....	27
5.2.3. LIQUID CROMATOGRAPHY – MASS SPECTROSCOPY ANALISYS.....	27
5.2.4. MELTING POINT .....	27
5.2.5. THIN-LAYER CROMATOGRAPHY .....	27
5.3.    RESULTS .....	28

#### IV

5.3.1. CHEMISTRY .....	28
5.3.2. SPECTRAL DATA AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES ....	30
5.4. DISCUSSIONS .....	48
6. THE BIOLOGICAL ASSESSMENT OF C30 BA-1,2,4-TRIAZOLE DERIVATIVES .....	51
6.1. INTRODUCTION .....	51
6.2. MATERIAL AND METHODS .....	52
6.2.1. REAGENTS.....	52
6.2.2. CELL LINES AND CELL CULTURE CONDITIONS .....	53
6.2.3. CELLULAR VIABILITY.....	53
6.2.4. IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY .....	54
6.2.5. QUANTITATIVE REAL-TIME PCR.....	54
6.2.6. HIGH-RESOLUTION RESPIROMETRY STUDIES .....	55
6.2.7. EVALUATION OF THE IRRITATION POTENTIAL USING THE HET-CAM ASSAY .....	57
6.2.8. STATISTICAL ANALYSIS.....	58
6.3. RESULTS .....	59
6.3.1. THE EFFECT OF C30 BA-1,2,4-TRIAZOLE DERIVATIVES ON THE VIABILITY OF NORMAL AND VARIOUS CANCER CELL LINES	59
6.3.2. MORPHOLOGICAL EVALUATION WITH DAPI STAINING OF RPMI-7951 CELLS .....	66
6.3.3. C30 BA-1,2,4-TRIAZOLE DERIVATIVES EFFECT ON PRO-/ANTI- APOPTOTIC MARKERS .....	70
6.3.4. MITOCHONDRIAL FUNCTION ASSESSEMENT .....	71
6.3.5. EVALUATION OF C30 BA-1,2,4-TRIAZOLE DERIVATIVES IRRITATIVE POTENTIAL .....	76
6.4. DISCUSSIONS .....	77
CONCLUSIONS.....	87
BIBLIOGRAPHY .....	90
IN EXTENSO PUBLISHED ARTICLES .....	II

## REZUMAT

Cancerul a devenit una dintre cele mai importante probleme de sănătate din societatea modernă, clasându-se ca a doua cauză de deces la nivel mondial. Cancerul afectează țesuturile corpului uman și, în ciuda progreselor în diagnosticul specific și diferențial, rămâne o provocare semnificativă în ceea ce privește eficacitatea tratamentului.

În ciuda progreselor semnificative în tratamentul antineoplazic, selectarea compusului activ potrivit rămâne dificilă, în special pentru obținerea remisiunii complete. Tratamentul anticancerigen actual constă în mai multe combinații de medicamente; cu toate acestea, modificările genomice variază, ceea ce face dificilă vizarea pacienților cu diferite tipuri de tumori. Tratamentele personalizate ar putea fi o strategie promițătoare pentru terapia anticancerigenă viitoare.

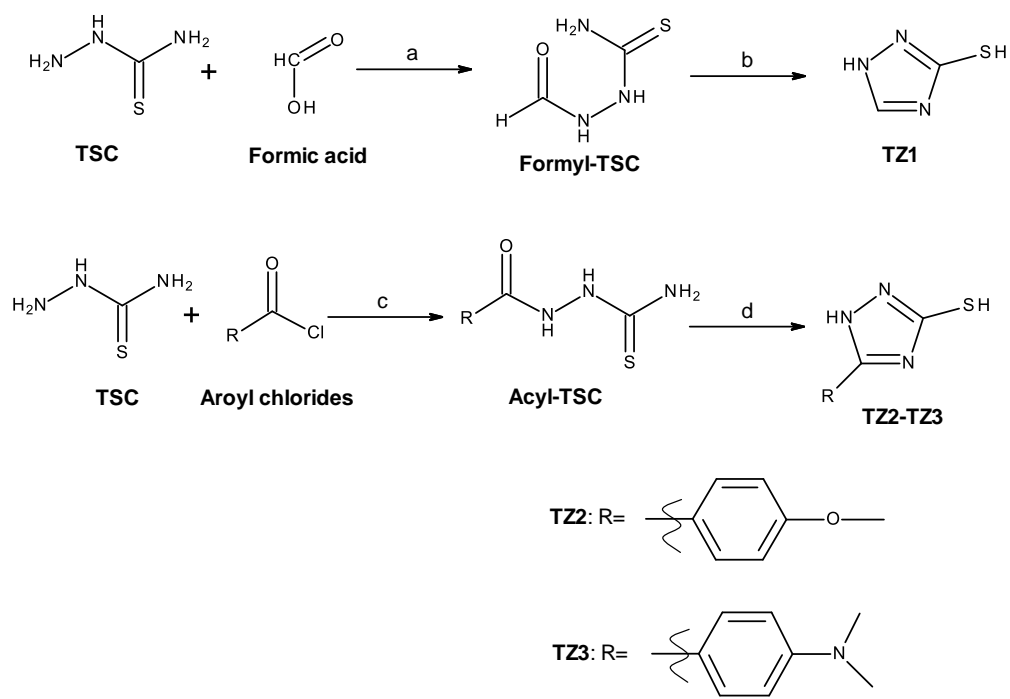
Triterpenele pentaciclice sunt compuși activi naturali care se găsesc într-o mare varietate de produse vegetale. Numărul de cicluri dintr-o structură triterpenică determină clasificarea sa: triterpene monociclice, biciclice, triciclice, pentaciclice și hexaciclice. Triterpenele pentaciclice sunt metaboliți secundari care se găsesc frecvent în scoarță, frunze și coji de diferite plante.

Acidul betulinic, un derivat de lupan, a captivat interesul cercetătorilor nu numai pentru gama sa largă de proprietăți farmacologice, ci și pentru citotoxicitatea sa specifică împotriva celulelor tumorale. În ciuda potențialelor beneficii farmacologice, datele existente din literatura de specialitate au indicat că principalul dezavantaj al acidului betulinic a fost solubilitatea slabă în apă. Pentru a aborda acest neajuns, sinteza derivaților noi a apărut ca o opțiune viabilă. Mai multe poziții importante în structura chimică a acidului betulinic au fost de interes: carboxil (C28), hidroxil (C3), ciclul A și legătura dublă (C20-C29). Modularea chimică din aceste poziții duce la o gamă largă de compuși cu structura triterpenică cu efecte biologice mai puternice decât molecula mamă. În plus, interacțiunea acidului betulinic cu alte molecule farmacologic active duce la bioconjugăți care păstrează caracteristicile ambelor precursori. În chimia

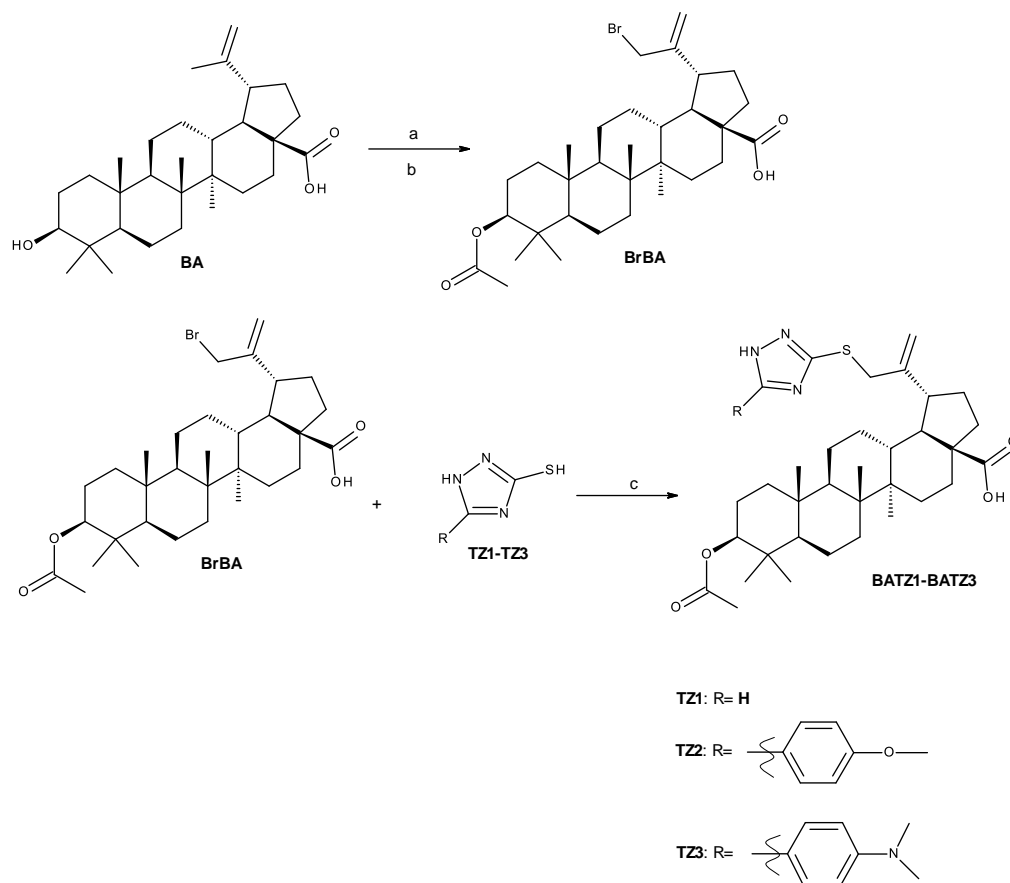
medicinală, compușii heterociclici care conțin azot sunt unul dintre blocurile principale, cuprinzând aproximativ șaiszeci la sută din medicamentele cu molecule mici compilate în diferite baze de date. În cadrul acestor compuși, triazoli sunt radicali cu capacități farmacologice remarcabile; datorită caracteristicilor lor structurale, atât 1,2,3-triazoli, cât și 1,2,4-triazoli pot reacționa cu agenți electrofili și nucleofili, oferind posibilitatea de a crea noi compuși biologic activi. Conjugarea acidului betulinic cu triazoli substituiți la C30 și diferite modificări ale hidroxilului la C3 au fost produși lăsând intactă gruparea carboxil la C28. Radicalii de triazol au fost, de asemenea, utilizați ca linkeri în dezvoltarea de bioconjugări ai acidului betulinic cu azidotimidina la C2 și la C28 prin derivarea grupării carboxil.

Lucrarea de față descrie sinteza și investigațiile biologice menite să descifreze citotoxicitatea a trei derivați BA noi: BATZ1 – 3β-O-Acetil-30-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)-acid betulinic, BATZ2 – 3β-O-Acetil-30-[5-(4-metoxifenil)-1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil]-acid betulinic și BATZ3 – 3β-O-Acetil-30-{5-[4-(dimetilamino)fenil]-1H-1,2,4-triazol-3-il)sulfanyl}-acid betulinic.

Noii compuși sintetizați prezintă în structură derivați ai 1,2,4-triazolului-5-aryl substituit. Heterociclul a fost grefat pe structura triterpenică la C30, în timp ce carboxilul C28 a fost lăsat liber, iar hidroxilul de la C3 a fost acilat. Derivații de 1,2,4-triazol-3-ol au fost sintetizați prin ciclizarea în prezența NaOH a aroil-tiosemicarbazidelor și au fost ulterior utilizați pentru a reacționa cu 30-bromo derivatul al BA. Toți compușii finali și intermediarii au fost evaluați fizico-chimic prin punctul de topire, RMN, FTIR și LC-MS. Calea de sinteză și condițiile de reacție sunt descrise în figurile 1-2. Din câte știm, doar inelul de 1,2,3-triazol a fost utilizat în poziția C30 a moleculei de acid betulinic, în timp ce nicio altă moleculă care conține 1,2,4-triazol sau 5-aryl substituit 1,2,4-triazol în această poziție nu a fost sintetizată anterior.



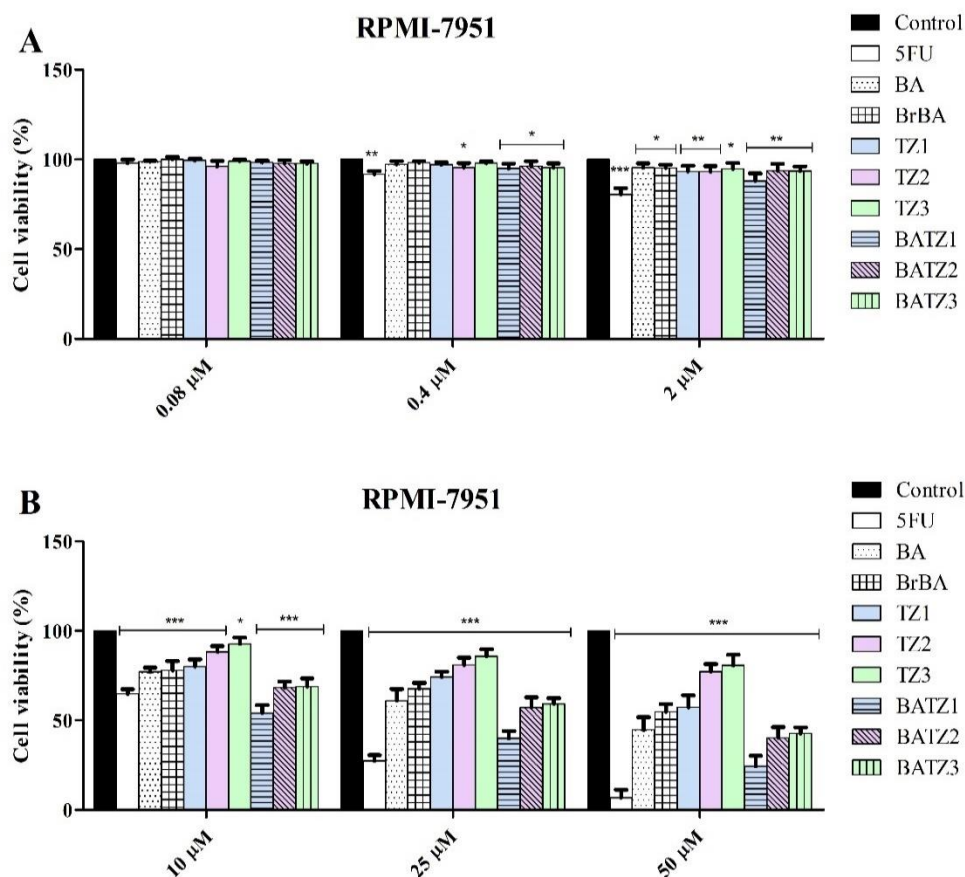
**Figure 1.** Schema de sinteză pentru compușii 1H-1,2,4-triazol-3-tiol (TZ1), 5-(4-metoxifenil)-1H-1,2,4-triazol-3-tiol (TZ2) și 5-[4-(dimetilamino)fenil]-1H-1,2,4-triazol-3-tiol (TZ3); TSC = tiosemicarbazidă, BA = acid betulinic; condiții de reacție: a. reflux, 30 minute; b. H<sub>2</sub>O, NaOH, reflux, 1 oră; c. piridină/DMF, 1 oră, 50 °C; d. H<sub>2</sub>O, NaOH, reflux.



**Figure 2. Sinteza derivaților triayolici de acid betulinic; BA – acid betulinic, BrBA – acid 3β-O-acetil-30-bromobetulinic; TZ1 – 1H-1,2,4-triazol-3-tiol; TZ2 – 5-(4-metoxiphe-nyl)-1H-1,2,4-triazol-3-tiol; TZ3 – 5-[4-(dimetilamino)fenil]-1H-1,2,4-triazol-3-ti-ol; BATZ1 – 3β-O-acetil-30-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)-acid betulinic; BATZ2 – 3β-O-acetil-30-[5-(4-metoxifenil)-1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil]-acid betulinic; BATZ3 – 3β-O-acetil-30-[5-[4-(dimetilamino)-fenil]-1H-1,2,4-triazol-3-il)sulfanyl]-acid betulinic; condiții de reacție: a. anhidridă acetică, piridină, DMAP, r.t, 12 ore; b. BNS, CCl<sub>4</sub>, r.t, 48 ore; c. DMF, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, r.t, 72 ore.**

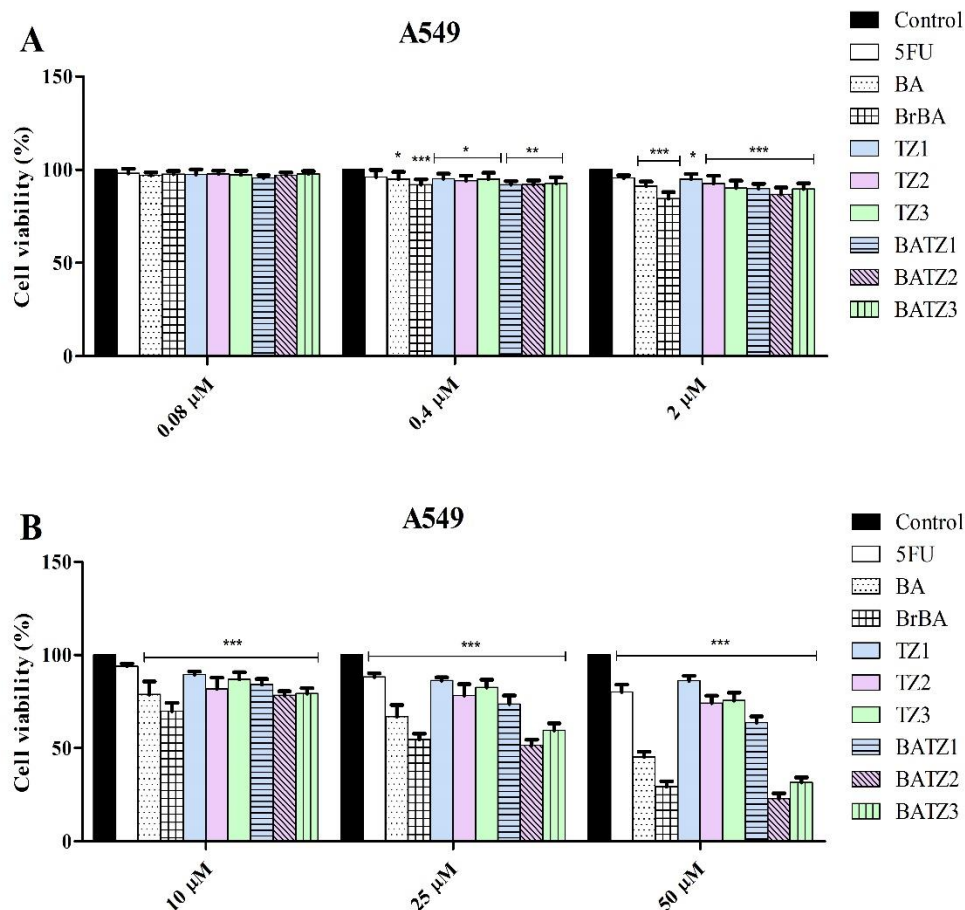


Evaluarea biologică a noilor compuși sintetizați BATZ13, triazolii lor corespunzători (TZ1-3) și precursorii lor (BA și BrBA) a început cu investigarea efectului lor citotoxic asupra keratinocitelor normale HaCaT, linia de melanom uman RPMI-7951, carcinom pulmonar uman A549 și linia celulară de adenocarcinom colorectal uman HT-29. Rezultatele pe melanom, carcinom pulmonar, adenocarcinom colorectal și celulelor normale sugerează că derivații BA nou sintetizați prezintă o activitate citotoxică selectivă la 2  $\mu$ M și la 10  $\mu$ M împotriva tuturor liniilor celulare canceroase testate (Figurile 3-5). În comparație cu BA singur, derivații au evidențiat același nivel de selectivitate antitumorală, în timp ce controlul pozitiv 5-FU, testat la orice concentrație, nu a prezentat nici o selectivitate pe celulele canceroase. Cel mai mare efect citotoxic expus de compușii noi a fost împotriva celulelor melanomului ( $IC_{50}$ : 10,6  $\mu$ M pentru BATZ1, 19,8  $\mu$ M pentru BATZ2 și 20,7  $\mu$ M pentru BATZ3), fiind mai citotoxic activ în comparație cu compușii lor părinți.



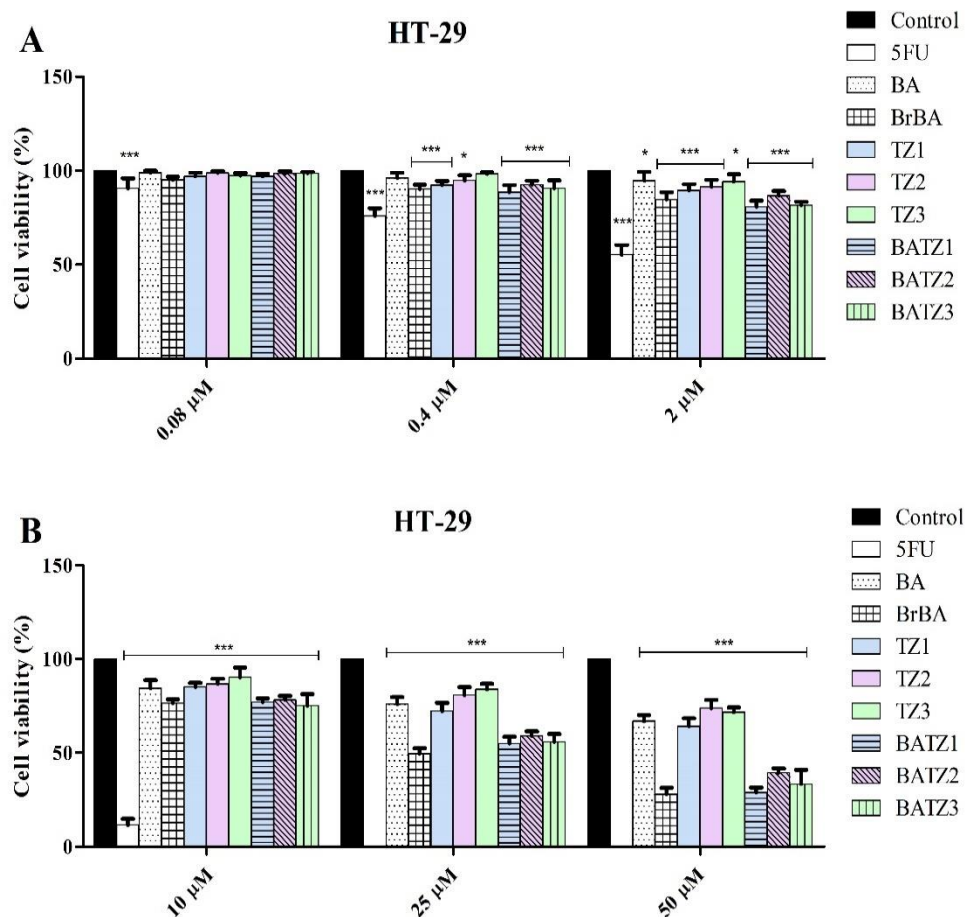
**Figure 3.** Viabilitatea celulară a celulelor RPMI după tratamentul de 48h cu 0,08, 0,4 și 2  $\mu$ M (A) și 10, 25 și 50  $\mu$ M (B) BA, BrBA, TZ1-3 și BATZ1-3, determinată cu ajutorul testului MTT. Rezultatele au fost exprimate ca procent de viabilitate celulară (%) normalizat pentru a controla (100%). Viabilitatea celulară a celulelor RPMI după tratamentul de 48h cu 0,08, 0,4 și 2  $\mu$ M (A) și 10, 25 și 50  $\mu$ M (B) BA, BrBA, TZ1-3 și BATZ1-3, determinată cu ajutorul testului MTT. Rezultatele au fost exprimate ca procent de viabilitate celulară (%) normalizat pentru a controla (100%) și reprezintă valorile medii  $\pm$  deviația standard a trei experimente independente efectuate în trei exemplare. Diferența statistică față de control a fost determinată cu ajutorul analizei ANOVA bidirecțională, urmată de multiplele comparații ale lui Bonferroni după test. Valorile cu  $p < 0,05$  au fost considerate ca având o

diferență semnificativă din punct de vedere statistic și au fost marcate cu \*, după cum urmează: \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  și \*\*\* $p < 0,001$ .



**Figure 1.** Viabilitatea celulară a celulelor A549 după tratamentul cu 48h cu 0,08, 0,4 și 2  $\mu\text{M}$  (A) și 10, 25 și 50  $\mu\text{M}$  (B) BA, BrBA, TZ1-3 și BATZ1-3, determinată cu ajutorul testului MTT. Rezultatele au fost exprimate ca procent de viabilitate celulară (%) normalizat pentru a controla (100%) și reprezintă valorile medii  $\pm$  deviația standard a trei experimente independente efectuate în trei exemplare. Diferența statistică față de control a fost determinată cu ajutorul analizei ANOVA bidirecțională, urmată de multiplele comparații ale lui Bonferroni după test. Valorile cu  $p < 0,05$  au fost considerate ca având o diferență

semnificativă din punct de vedere statistic și au fost marcate cu \*, după cum urmează:  
 \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  și \*\*\* $p < 0,001$ .



**Figure 2.** Viabilitatea celulară a celulelor HT-29 după tratamentul cu 48h cu 0,08, 0,4 și 2  $\mu$ M (A) și 10, 25 și 50  $\mu$ M (B) BA, BrBA, TZ1-3 și BATZ1-3, determinată cu ajutorul testului MTT. Rezultatele au fost exprimate ca procent de viabilitate celulară (%) normalizat pentru a controla (100%) și reprezintă valorile medii  $\pm$  deviația standard a trei experimente independente efectuate în trei exemplare. Diferența statistică față de control a fost determinată cu ajutorul analizei ANOVA bidirecțională, urmată de multiplele comparații ale lui Bonferroni după test. Valorile cu  $p < 0,05$  au fost considerate ca având o diferență

**semnificativă din punct de vedere statistic și au fost marcate cu \*, după cum urmează:  
\* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  și \*\*\* $p < 0,001$ .**

În urma unei evaluări mai aprofundate a mecanismului lor citotoxic, a fost evaluat efectul derivaților BA asupra morfologiei nucleare. Rezultatele au arătat că derivatul BATZ1 a indus legată modificări nucleare corelate cu apoptoza, care au fost mai marcate de creșterea concentrației în celulele melanomului. Mai mult decât atât, modificările nucleare legate de apoptoză au fost observate pentru toți compușii din toate liniile celulare canceroase testate. Având în vedere efectul lor antiproliferativ ridicat împotriva liniilor celulare melanom și capacitatea de a induce modificări nucleare în concordanță cu apoptoza, compușii au fost investigați în continuare pe celulele melanomului pentru a evalua capacitatea lor de a influența expresia genică a proteinelor Bcl-2/BAX, cunoscute a fi implicate în calea apoptotică intrinsecă. Rezultatele au arătat în mod clar că compușii noi, au indus o modificare în expresia genică a raportului Bcl-2/BAX; prin upregularea expresiei genice a BAX și downregularea expresiei genice a Bcl-2, de poate declanșa deschiderea MPTP și duce la moartea celulelor. Adăugarea citocromului c în protocolul de respirometrie de înaltă rezoluție a arătat că compușii pot afecta OMM, susținând astfel declarația anterioară. Mai mult decât atât, la evaluarea funcției mitocondriale a celulelor melanomului, jucătorul-cheie principal în calea apoptotică intrinsecă și metabolismul celulelor canceroase, toți compușii scad eficacitatea sistemului de transport al electronilor și afectează respirația mitocondrială, sugerând că compușii pot duce la o producție inefficientă de ATP și, astfel, pot afecta funcția mitocondrială. În contextul celulelor canceroase, disfuncția/inhibarea mitocondrială poate fi privită ca o strategie de tratament, având în vedere că unele celule canceroase prezintă o dependență crescută de OXPHOS pentru migrație, proliferare, metastayare și chiar rezistență la medicamente. În plus, la evaluarea derivaților triazolici la C30 ai BA toxicitatea și potențialul iritativ s-a arătat că compușii nou sintetizați nu

prezintă nici un potențial de iritare în testul HET-CAM și sunt adecvate pentru utilizarea cutanată și pe mucoase.

Împreună, rezultatele arată că derivații nou sintetizați ai acidului betulinic, și anume sunt compuși cu caracteristici îmbunătățite în ceea ce privește profilul farmacocinetic și efectele farmacologice în comparație cu compusul părinte. În plus, compușii sunt agenți eficienți împotriva melanomului cu o activitate citotoxică selectivă la 2  $\mu\text{M}$  și la 10  $\mu\text{M}$  împotriva tuturor liniilor celulare canceroase testate.