

## СИНТЕЗА И IN VITRO БИОЛОШКА ЕВАЛУАЦИЈА НА НОВИ ФЛАВОНОИДНИ АНАЛОЗИ КАКО ИНХИБИТОРИ НА p56<sup>lck</sup> ПРОТЕИН ТИРОЗИН КИНАЗА

**Ж. Николовска-Чолеска, Љ. Шутуркова, К. Доревски**

*Институт за фармацевтска хемија, Фармацевтски факултет, Универзитет “Св. Кирил и Методиј”, Скопје, Република Македонија*

**Љ. Клисарова, Е. Поповски**

*Институт за хемија, Природно-математички факултет, Универзитет “Св. Кирил и Методиј”, Скопје, Република Македонија*

**Апстракт:** Протеин тирозин киназите (ПТК) имаат важна улога во преносот на клеточните сигнали и постоењето зависност помеѓу зголемената ПТК експресија и пролиферативните заболувања, предизвикува интерес за соединенијата кои ја модулираат нивната активност. Со цел за понатамошно разјаснување на молекуларните карактеристики на флавоноидите, неопходни за ПТК инхибиторната активност, синтетизирани се нови флавоноидни аналози и in vitro е извршена нивна биолошка евалуација како инхибитори на ензимот p56<sup>lck</sup>. Резултатите покажуваат дека 4' позицијата е важна за инхибиторната активност, а зголемување на активноста се забележува кај аналозите кои имаат ОН групи во хромонскиот дел од молекулот. Добиените сознанија овозможуваат понатамошно проучување на молекуларните структурни карактеристики на флавоноидите, неопходни за инхибиторна активност врз ензимот p56<sup>lck</sup>.

**Клучни зборови:** флавоноиди, p56<sup>lck</sup>, инхибиторна активност

### 1. Вовед

Протеин тирозин киназите (ПТК) (Е.С.2.7.1.112) претставуваат класа на ензими кои се важни медијатори во нормалниот пренос на клеточните сигнали како и важни интраклеточни ефектори на голем број рецептори [1]. Со откривањето на активни ПТК како продукти на доминантна вирусна трансформација на гени т.н. онкогени, за прв пат е воспоставена врска помеѓу фосфорилацијата на протеин-тирозинот и клеточната трансформација [2]. Овие сознанија овозможуваат нов пристап во дизајнирањето нови активни соединенија како потенцијални хемотерапевтски агенси во терапијата на малигни заболувања и инхибитори на оваа класа ензими [3].

Протеин тирозин киназата p56<sup>lck</sup> претставува лимфоцитен специфичен тирозин киназа кој својата активност ја покажува во лимфоцитните клетки, и тоа примарно во Т-клетките и природните клетки убијци. Во Т-клетките, ензимот се врзува за глукопротеините CD4 и CD8 на клеточната површина и учествува во клеточната активација, митогенезата и Т-посредуваниот имун одговор [4]. Постоењето корелација помеѓу зголемената активност на ензимот p56<sup>lck</sup> и лимфоидните пролиферативни процеси укажува на улогата и значењето на овој ензим во малигните трансформации на овие клетки.

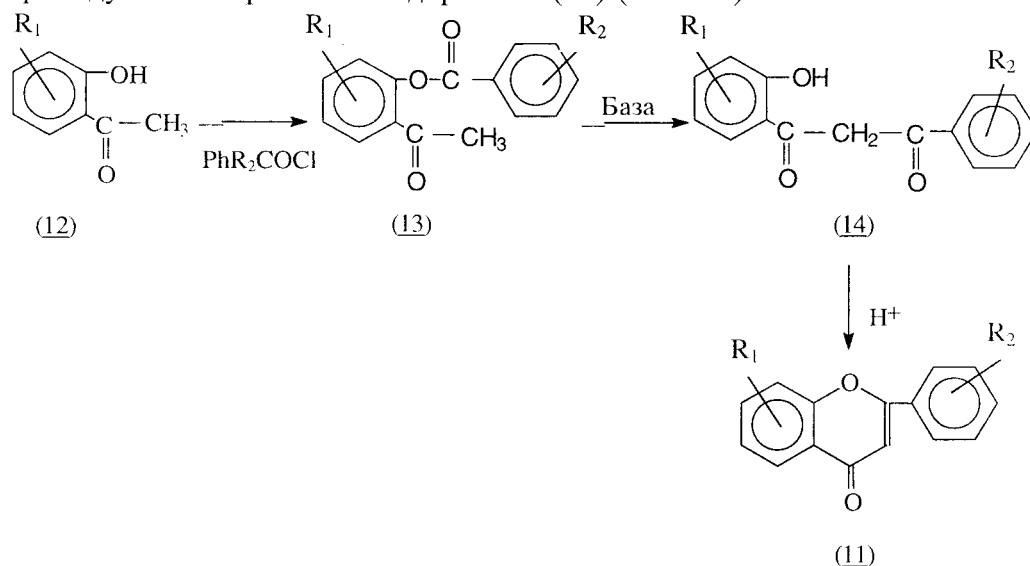
Голем број природни и синтетички флавоноиди покажуваат инхибиторна активност кон различни протеин тирозин кинази, а дејствуваат преку компетитивен механизам во однос на нуклеотидот АТФ [5]. Со цел за понатамошно разјаснување и разбирање на молекуларните карактеристики на флавоноидите, неопходни за ПТК инхибиторна активност, синтетизирани се нови флавоноидни аналози и *in vitro* е извршена нивна биолошка евалуација како инхибитори на ензимот p56<sup>lck</sup>.

## 2. Експериментален дел

### 2.1. Синтеза на нови флавоноидни деривати

За синтеза на новите флавоноидни аналози е применет Baker-Venkatarman-овиот метод кој вклучува киселокатализирана циклодехидратација на супституирани 1-(2-хидроксифенил)-3-фенилпропан-1,3-диони.

Методот се состои во реакција на *o*-хидроксиацетофенони (12) со бензоилхлориди при што се добиваат *o*-бензоилоксиацетофенони (13), кои со базно катализирана интрамолекуларна Claisen-ова кондензација се преведуваат во 1,3 дикетони (14), аа тие во кисела средина, со циклодехидратација, се преведуваат во флавоноски деривати (11) (шема 1).



Шема 1

### 2.2. Биолошка евалуација на флавоноидните деривати како p56<sup>lck</sup> инхибитори

Протеин тирозин киназната активност е определена со радиоактивен *in vitro* метод, преку следење на фосфорилацијата на егзоген супстрат, пептидот RR-SRC.

## 3. Резултати и дискусија

Во оваа студија се синтетизирани, изолирани и идентификувани повеќе различни соединенија: бензоат естри на различни 2-хидроксиацетофенони; различни пропан-1,3-диони; бензоат естри на флавоноиди; хидрокси флавоноиди; 4'

(ацетаминометил) флавор (1); 7-бензоилокси, 4' (ацетаминометил) флавор (2); 6-бензоилокси, 4' (ацетаминометил) флавор (3); 4' - (метоксикарбонил) флавор (4); 7-хидрокси, 4' (ацетаминометил) флавор (5); 6-хидрокси, 4' (ацетаминометил) флавор (6).

Супституираните бензоил хлориди користени како појдовни реагенси за добивање на новите флавоноидни аналози, се синтетизирани од 4-(аминометил) бензоева киселина и монометил естер на терефталната киселина, во реакција со тионил хлорид. Поради присуството на реактивната амино група, претходно е извршено нејзино блокирање со анхидрид на оцетната киселина. Добиените киселински хлориди не се доволно стабилни и веднаш се употребуваат во следната синтетичка фаза, реакција на естерификација со различно супституирани 2-хидрокси-ацетофенони. Процентот на искористеност на оваа реакција е релативно висок и се движи од 82 до 99%.

Следната фаза е реакцијата на Baker-Venkatarman-овото преместување на естрите, при што се добиваат соодветни 1,3 дикетони. Кај естрите кои содржат повеќе од една естерска врска, неопходно е преместувањето да се изведува во присуство на зголемена количина од базата (оптималниот молски сооднос помеѓу калиум хидроксидот и супституираните 2-бензоилокси-ацетофенони изнесува 3,2 : 1), а реакцијата се продолжува до 1 час, во средина на пиридин. Добиените 1,3 дикетони имаат задоволителна чистота за да се користат во следната реакциона фаза, а приносот се движи од 50 до 98%.

Киселинската катализирана циклизација на добиените дикетони се врши во присуство на концентрирана сулфурна киселина и глацијална оцетна киселина, на температура од 100°C, при што се добиваат соодветни флавори. Процентот на искористување е задоволителен и се движи од 62 до 91%. Соодветни хидрокси флавори се добиваат со последователна базна хидролиза.

Идентификацијата на синтетизираните меѓупродукти и флавори е направена врз основа на спектроскопските податоци (UV, IR и NMR) (табела 1).

Резултатите добиени од *in vitro* биолошката евалуација на новите флавоноидни аналози како потенцијални p56<sup>lck</sup> протеин тирозин киназа инхибитори покажуваат дека флавоноидите кои во својата структура не содржат слободни електрондонорски групи не покажуваат инхибиторна активност во испитуваните концентрации. Со воведувањето на слободна хидроксилна група се забележува зголемување на инхибиторната активност, додека постоењето на полихидроксилен систем доведува до понатамошно подобрување на инхибиторната активност (кверцетин IC<sub>50</sub> = 15 µM/mL). Важноста на фенилниот прстен и неговиот удел во интеракциите со ензимот, посебно електронските интеракции, се гледа преку високата инхибиторна активност на флавоноидниот аналог 6-хидрокси, 4'-амино флавор (IC<sub>50</sub> = 2,8 µM/mL).

#### 4. Заклучок

Сознанијата кои произлегуваат од новите синтетизирани флавоноидни деривати и нивната биолошка евалуација овозможуваат понатамошно проучување на молекуларните структурни карактеристики на флавоноидите неопходни за нивната инхибиторна активност врз ензимот p56<sup>lck</sup>.

**Табела 1: Синтетички податоци на новите синтетизирани флавоноидни аналози**

Флавоноид	$\nu_{\text{max}}^a$ (nm)	$\text{IR}^b$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$^1\text{H NMR}^c$ (ppm)
1	252.95; 299.98	3277 (NH); 3070 (CH, arom.); 1651 (Amid I); 1551 (Amid II);	2.11 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.49 (d, J = 6.1 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 6.34 (s, 1H, NH), 6.67 (s, 1H, H <sub>3</sub> ), 7.39 (d, J = 8.5 Hz, 2H, phe), 7.43 (td, J = 7.6, 1.1 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.71 (td, J = 7.8, 1.6, 1H), 7.82 (d, J = 8.5 Hz, 2H, phe), 8.20 (dd, J = 8.1, 1.6 Hz, 1H)*
2	249.71; 303.94	3281 (NH); 3065 (CH, arom.); 1737 (ester); 1639 (Amid I); 1564 (Amid II);	1.89 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 1.91 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.33 (d, J = 5.6 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 4.37 (d, J = 6.0 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 7.08 (s, 1H, H <sub>3</sub> ), 7.46 (d, J = 7.7 Hz, 2H, phe), 7.49 (d, J = 7.7 Hz, 2H, phe), 8.10 (d, J = 7.7 Hz, 2H, phe)
3	253.95; 300.91	3282 (NH); 3072 (CH, arom.); 1738 (ester); 1646 (Amid I); 1545 (Amid II);	1.91 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 1.92 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.36 (d, J = 6.7 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 4.38 (d, J = 6.7 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 7.08 (s, 1H, H <sub>3</sub> ), 7.46 (d, J = 7.7 Hz, 2H, phe), 7.49 (d, J = 7.7 Hz, 2H, phe), 7.81 (dd, J = 9.2, 2.7 Hz, 1H, H <sub>7</sub> ), 7.90 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H <sub>5</sub> ), 7.94 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H <sub>8</sub> ), 8.10 (d, J = 7.7 Hz, 2H, phe), 8.13 (d, J = 7.7 Hz, 2H, phe), 8.47 (t, J = 6.0 Hz, 1H, NH), 8.50 (t, J = 6.0 Hz, 1H, NH)
4	261.13; 297.72	3072 (CH, arom.); 1731 (ester); 1663 (CO)	3.91 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 7.16 (s, 1H, H <sub>3</sub> ), 7.53 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.85 (m, 2H), 8.07 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.11 (d, J = 8.2 Hz, 2H, phe), 8.26 (d, J = 8.2 Hz, 2H, phe)
5	254.04; 310.61	3422 (OH); 3286 (NH); 3089 (CH, arom.); 1632 (Amid I); 1586 (Amid II);	1.91 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.34 (d, J = 6.1 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 6.88 (s, 1H, H <sub>3</sub> ), 6.93 (dd, J = 8.7, 2.3 Hz, 1H, H <sub>6</sub> ), 7.01 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H <sub>8</sub> ), 7.43 (d, J = 8.5 Hz, 2H, phe), 7.89 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H <sub>5</sub> ), 8.02 (d, J = 8.5 Hz, 2H, phe), 8.45 (t, J = 6.1 Hz, 1H, NH), 10.82 (s, 1H, OH)
6	270.92; 307.26	3423 (OH); 3276 (NH); 1619 (Amid I); 1578 (Amid II);	1.91 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.34 (d, J = 6.0 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 6.94 (s, 1H, H <sub>3</sub> ), 7.27 (dd, J = 8.8, 3.0 Hz, 1H, H <sub>7</sub> ), 7.33 (d, J = 3.0 Hz, 1H, H <sub>5</sub> ), 7.44 (d, J = 8.6 Hz, 2H, phe), 7.66 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H <sub>8</sub> ), 8.04 (d, J = 8.6 Hz, 2H, phe), 8.47 (t, J = 6.0 Hz, 1H, NH)

<sup>a</sup>Метанолен раствор <sup>b</sup>KBr таблети <sup>c</sup>Спектри добиени на 300 MHz користејќи DMSO како растворувач <sup>\*</sup>Спектри добиени на 300 MHz користејќи CDCl<sub>3</sub> како растворувач

## Литература

[1] White M.F. Structure and function of tyrosine kinase receptors. *J. Bioenerg. Biomembrane* 1991, **23**, 63-82; [2] Cantley C. L., Auger R. K., Carpenter C., Duckworth B., Graziani A., Kapeller R., Soltoff, Oncogenes and Signal Transduction, *Cell*, 1991, **64**, 281-302; [3] Powis G., Signalling targets for anticancer drug development, *Trends Pharmacol Sci*, 1991, **12**, 188-194; [4] Roitt L., Brostoff J., Male D. Immunology, Fifth Edition, Mosby International Ltd., London, 1998; [5] Groundwater W. P., Solomons H. R. K., Drewe A. J., Ali Munawar M., Protein Tyrosine Kinase Inhibitors, *Progress in Medicinal Chemistry*, 1996, **33**, 233-329.

**Abstract:** Protein tyrosine kinases (PTKs) play a critical role in cellular signal transduction and the association of aberrant PTK expression with proliferative disorders makes substances, which modulate the activity of PTKs attractive therapeutic agents. To further understand the molecular requirements for the PTK inhibitory activity of flavonoids, the aim of this study was to prepare a series of new flavonoid analogues and evaluate their p56<sup>lck</sup> protein tyrosine kinase inhibitory activity. The biological evaluation of synthetic flavonoids as p56<sup>lck</sup> PTK inhibitors indicated that the 4' position is important for inhibitory activity, while an increase in potency was observed with the addition of the hydroxy group in a chromone moiety of flavonoid molecule. The results obtained are important for the further understanding of the molecular requirements in the flavonoid series, that leads to inhibitory activity of p56<sup>lck</sup> protein tyrosine kinase.