

NOWE POCHODNE KWASÓW TRITERPENOWYCH, BADANIE LIPOFILOWOŚCI I PROGNOZA PROFILU ADME

EWA BEBENEK^{1*}, BEATA FILIP-PSURSKA², JOANNA WIETRZYK², ELWIRA CHROBAK¹

¹Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec

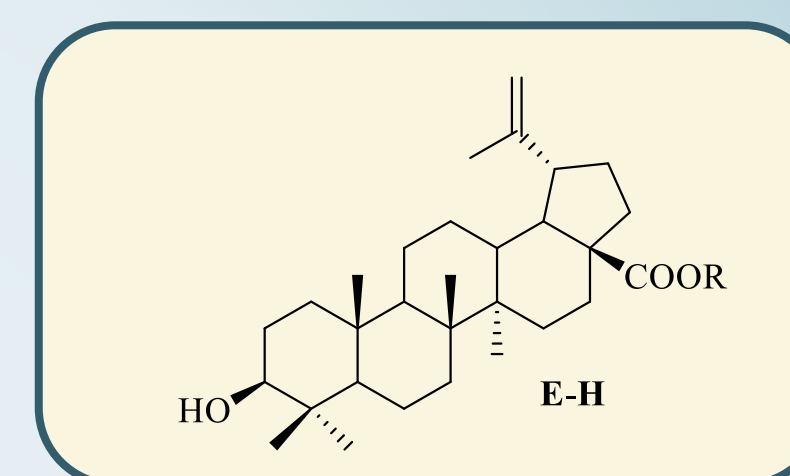
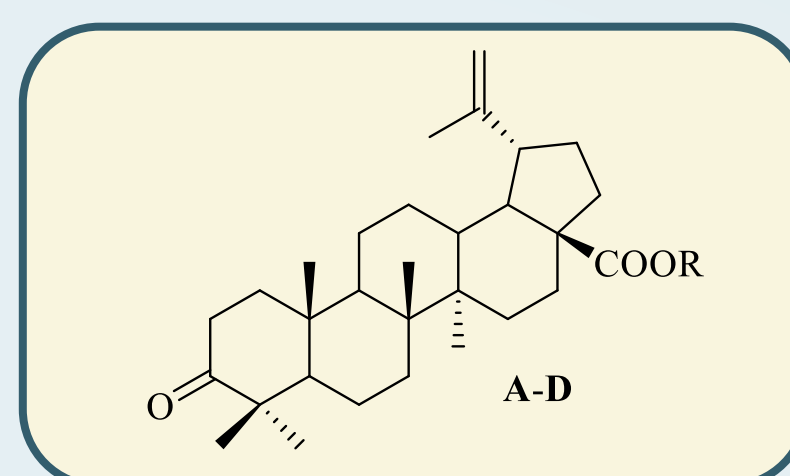
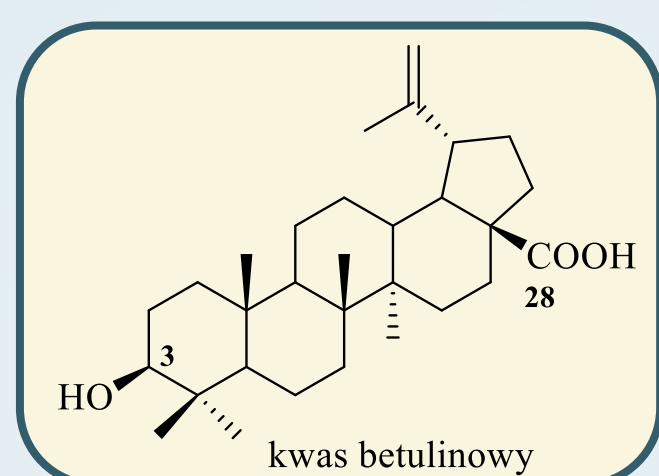
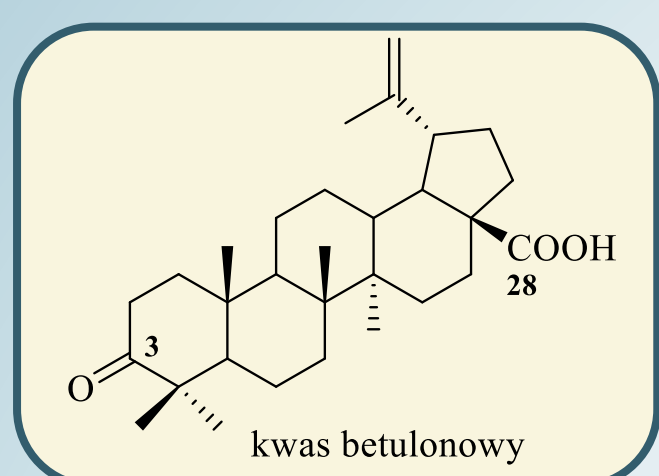
²Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław

WPROWADZENIE

Triterpenoidy stanowią jedną z ważniejszych grup substancji szeroko rozpowszechnionych w środowisku naturalnym. Do triterpenów pentacyklicznego typu lupanu należą bioaktywne metabolity wtórne takie jak kwas betulinowy i betulonowy, występujące między innymi w korze brzoza. Modyfikacje chemiczne obu tych kwasów najczęściej przeprowadzane w pozycji C3 i/lub C28 umożliwiają otrzymanie ich pochodnych o obiecującym działaniu przeciwnowotworowym, przeciwzapalnym, hepatoprotekcyjnym, przeciwbakteryjnym, przeciwwirusowym, przeciwcukrzycowym i przeciwmalarycznym [1,2]. Istotnym parametrem fizykochemicznym stosowanym do określenia możliwości przenikania cząsteczek przez błony biologiczne jest lipofilowość. Parametr ten związany jest z procesami wchłaniania, dystrybucji oraz wydalania związku w organizmie, a także wpływa na oddziaływanie z receptorem. Dlatego też, ocena lipofilowości jest niezbędna na wczesnym etapie procesu projektowania nowych leków [3,4].

CEL PRACY

Celem przeprowadzonych badań było wyznaczenie wartości parametru $\log P_{TLC}$ alkinylowych pochodnych kwasów triterpenowych metodą chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz (RP-TLC). Ponadto, obliczone za pomocą programów komputerowych wartości teoretyczne $\log P$ badanych związków porównano między sobą i z wartościami $\log P_{TLC}$. Z wykorzystaniem metody *in silico* wyznaczono parametry fizykochemiczne i ADME dla badanych triterpenoidów. Ostatni etap badań polegał na określeniu zależności pomiędzy aktywnością przeciwnowotworową badanych substancji a eksperymentalnymi i teoretycznymi wartościami parametru lipofilowości.



WYZNACZENIE RÓWNANIA KRZYWEJ WZORCOWEJ

Dla substancji wzorcowych o znanej wartości $\log P$ wykonano analizę chromatograficzną metodą RP-TLC. Z uzyskanych chromatogramów wyznaczono wartość współczynnika opóźnienia (R_f) na podstawie wzoru: $R_f = a / b$ (a - długość drogi migracji środka plamki badanej substancji, b - długość drogi czoła fazy ruchomej). W oparciu o zależność: $R_M = \log(1/R_f - 1)$ obliczono wartości współczynników retencji R_M . Współczynnik R_M koreluje liniowo ze stężeniem składnika organicznego fazy ruchomej, co obrazuje równanie: $R_M = R_{M0} + bC$ (C - stężenie modyfikatora organicznego w fazie ruchomej, b - nachylenie linii regresji). Wartość R_{M0} dla każdego z wzorców wyznaczono na drodze ekstrapolacji do zerowego stężenia modyfikatora organicznego w fazie ruchomej (Tabela 1).

Tabela 1. Eksperymentalne wartości R_{M0} oraz literaturowe wartości $\log P_{lit}$ substancji wzorcowych.

Wzorec	Nazwa chemiczna	R_{M0}	$\log P_{lit}$
1	acetanilid	0,53	1,21
2	prednizon	0,62	1,62
3	4-bromoacetofenon	1,86	2,43
4	benzofenon	2,30	3,18
5	antracen	3,47	4,45
6	dibenzyl	3,62	4,79
7	DDT	4,80	6,38

W oparciu o powyższe dane wyznaczono równanie krzywej wzorcowej:

$$\log P_{TLC} = 1,1572 R_{M0} + 0,5938 \quad (R = 0,993)$$

EKSPERYMENTALNE WYZNACZENIE PARAMETRÓW LIPOFILOWOŚCI

Parametr lipofilowości ($\log P_{TLC}$) kwasu betulinowego, kwasu betulonowego oraz alkinylowych pochodnych A-H wyznaczono za pomocą metody RP-TLC. W przeprowadzonych badaniach mieszaninę aceton / 0,2 molowy wodny roztwór buforu Tris zastosowano jako fazę ruchomą w następujących proporcjach objętościowych: 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35 i 60:40. W oparciu o procedurę wykorzystaną dla wzorców obliczono wartości R_{M0} dla pochodnych A-H (Tabela 2).

Tabela 2. Wartości parametrów lipofilowości (R_{M0} , $\log P_{TLC}$) oraz współczynnika korelacji dla badanych związków.

Związek	R_{M0}	R	$\log P_{TLC}$
kwas betulonowy	5,02	0,994	6,41
kwas betulinowy	4,85	0,999	6,21
A	5,31	0,994	6,74
B	5,63	0,997	7,11
C	5,17	0,996	6,57
D	6,12	0,998	7,68
E	5,70	0,997	7,19
F	5,49	0,999	6,94
G	4,62	0,995	5,94
H	5,54	0,998	7,01

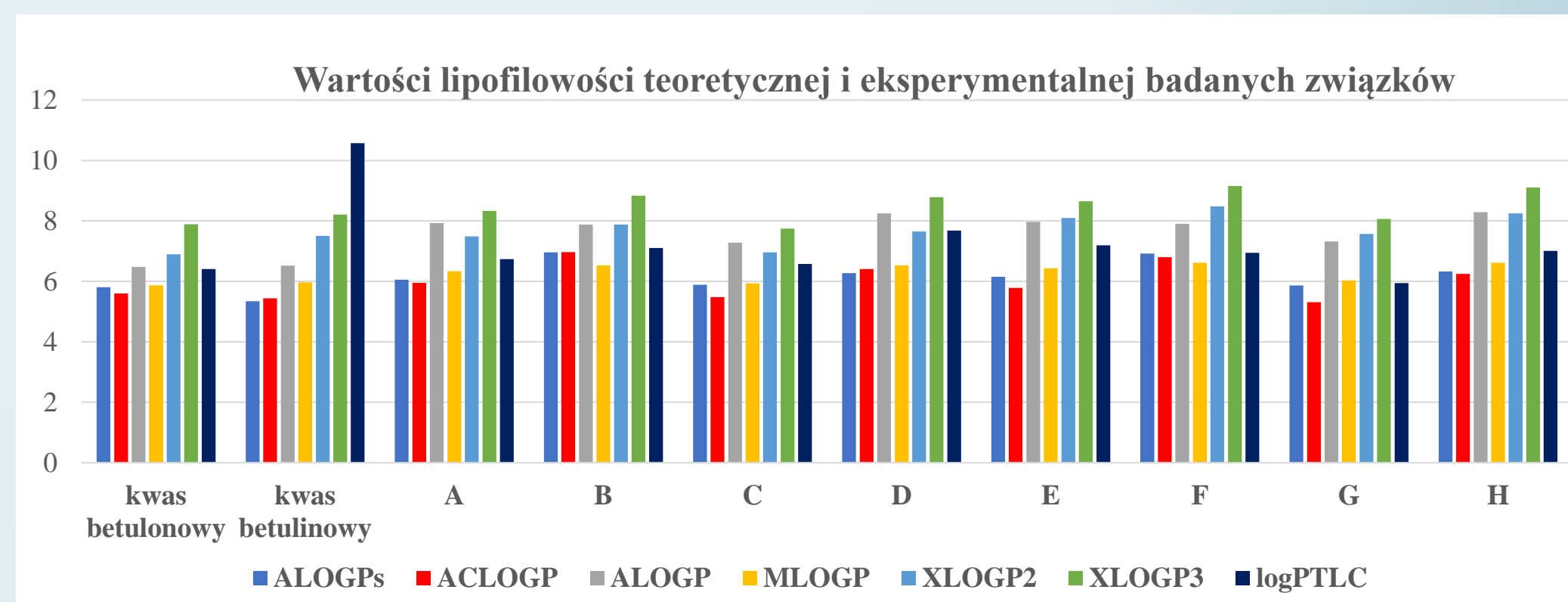
WYZNACZENIE TEORETYCZNYCH PARAMETRÓW LIPOFILOWOŚCI

Obliczenia przeprowadzono z wykorzystaniem sześciu programów komputerowych ALOGPs, AClogP, ALOGP, MLOGP, XLOGP2 i XLOGP3 (Tabela 3).

Tabela 3. Wartości teoretyczne parametrów lipofilowości badanych triterpenoidów uzyskane metodami obliczeniowymi.

Związek	ALOGPs	AClogP	ALOGP	MLOGP	XLOGP2	XLOGP3
kwas betulonowy	5,81	5,60	6,48	5,87	6,90	7,89
kwas betulinowy	5,34	5,44	6,52	5,97	7,51	8,21
A	6,06	5,95	7,93	6,34	7,49	8,33
B	6,96	6,97	7,88	6,53	7,88	8,84
C	5,89	5,48	7,28	5,94	6,96	7,75
D	6,27	6,41	8,25	6,53	7,65	8,79
E	6,15	5,78	7,97	6,43	8,1	8,65
F	6,92	6,80	7,91	6,62	8,48	9,16
G	5,86	5,31	7,32	6,03	7,57	8,07
H	6,33	6,25	8,29	6,62	8,25	9,11

PORÓWNANIE UZYSKANYCH WARTOŚCI EKSPERYMENTALNYCH LIPOFILOWOŚCI Z WARTOŚCIAMI TEORETYCZNYMI



PORÓWNANIE WARTOŚCI $\log P_{TLC}$ Z PARAMETRAMI FIZYKOCHEMICZNYMI I AKTYWNOŚCIĄ PRZECIWNOWOTWOROWĄ

Dla badanych triterpenoidów wyznaczono (SwissADME) parametry takie jak: M-masa cząsteczkowa, HA- ilość miejsc o charakterze akceptorowym dla wiązań wodorowych, HD-ilość miejsc o charakterze donorowym dla wiązań wodorowych, ROT-liczba wiązań rotacyjnych, TPSA-topologiczna powierzchnia polarna cząsteczki oraz przepuszczalność przez Caco-2 (Perm Caco-2). Wartość IC_{50} dla badanych związków wobec komórek T47D, CCRF/CEM i SW707 oznaczono w Instytucie Terapii i Immunologii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

Tabela 4. Wartości współczynników korelacji pomiędzy $\log P_{TLC}$ a wybranymi parametrami fizykochemicznymi i ADME oraz aktywnością przeciwnowotworową.

$\log P_{TLC}$	Aktywność przeciwnowotworowa IC_{50} [$\mu g/ml$]			M	HA	HD	ROT	TPSA	Caco-2
	T47D	CCRF/CEM	SW707						
0,87	0,50	0,73	0,57	0,78	0,71	0,54	0,68	0,74	

LITERATURA

- [1] Sousa, J.L.C. et al. *Molecules* **2019**, *24*, 355.
- [2] Ledej, I. et al. *Molecules* **2015**, *20*, 22691-22702.
- [3] Ciura K. et al. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1520*, 9-22.
- [4] Ciura K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *176*, 1-9.