

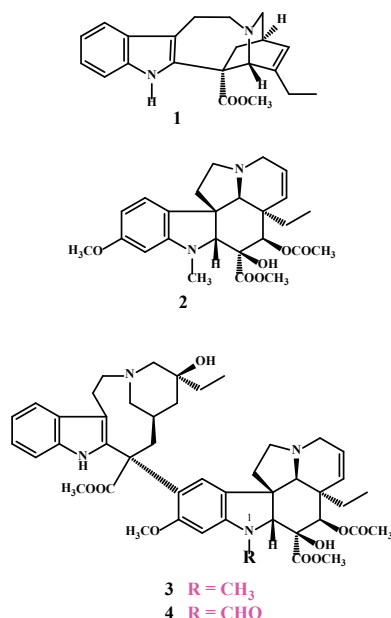
Daganatellenes hatású *Vinca* alkaloidszármazékok szintézise*

KEGLEVICH András, KEGLEVICH Péter, HAZAI László

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Szerves Kémia és Technológia Tanszék,
Szt. Gellért tér 4., 1111 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A bemutatott kutatási tevékenység a BME Szerves Kémia és Technológia Tanszékének Alkaloidkémiai Kutatócsoportjában történt, ahol elsősorban daganatellenes hatású szerves anyagok szintézisével foglalkozunk. Munkánk egy természetes vegyületcsalád, a rózsás meténg (*Catharanthus roseus*) nevű növényből izolálható, indolvas *Vinca* alkaloidok¹⁻² köré csoportosult (1. ábra). A természetes képviselők (1-4) közül csak a komplex szerkezetű vinblasztin (3) és vinkrisztin (4) rendelkezik antiproliferatív hatással, azonban súlyos mellékhatásaik vannak. Utóbbi dimerek katarantin (1) és vindolin (2) alegységekből épülnek fel, összetett struktúrájukban csupán egyetlen funkciócsoport (N^1) eltérése jelenti a különbséget. Az alkaloidcsalád természetes (3 és 4) és félszintetikus dimer képviselői a mai napig használatosak a rákterápiában, különösen különböző limfómák és leukémia esetén.



1. ábra. A *Vinca* alkaloidok közé tartozó katarantin (1) és vindolin (2), illetve belőlük felépülő vinblasztin (3) és vinkrisztin (4) szerkezete.

Általában kombinációs kezelések (gyógyszerkombók) részeként, intravénás infúzióban, szulfát-sóik formájában alkalmazzák őket.

A *Vinca* alkaloidok rákellenes hatásukat a mikrotubulusok működésének akadályozásán keresztül, a sejtosztódás mitotikus (M) fázisának gátlásával fejtik ki^{3,4}. A mitotikus orsó képződéséhez szükséges tubulin molekulákhoz kötődve blokkolják a mikrotubulusok dinamikáját, így végső soron megakasztják a mitózist, ami sejthalálhoz vezet.

Munkánk során a *Vinca* alkaloidok fejlesztésével és új származékok előállításával foglalkoztunk. A feladat a rák, mint komoly betegség gyógyítására irányult, ugyanakkor kihívást is jelentett, mivel a *Vinca* alkaloidokkal kapcsolatos munka egy kémiai nehezen művelhető terület.

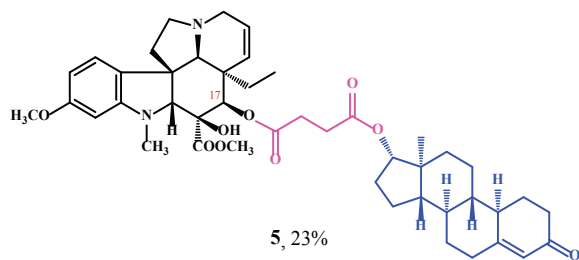
Legfontosabb célkitűzésünk természetes és szintetikus farmakofórokkal kapcsolt *Vinca* alkaloidok előállítása volt gyógyszerkémiai hibridizációval. A hibridek előállítása a modern gyógyszerkutatásban is elterjedt eljárás, habár sok esetben vita tárgyát képezi, hogy milyen komplex struktúrák tekinthetők valóban hibridnek. Az általános cél a hatékonyság növelése és/vagy a mellékhatások redukálása azáltal, hogy kettő, vagy több farmakofór egységet alakítunk ki egy molekulán belül, így a kapott vegyületek akár többféle receptorral is interakcióba léphetnek, vagyis több előnyös biológiai hatásuk lehet⁵⁻⁷.

2. Eredmények

2.1. Gyógyszerkémiai hibridizáció szteroidokkal

Először a szteroidokkal történő gyógyszerkémiai hibridizáció lehetőségét vizsgáltuk a Szegedi Tudományegyetem Szerves Kémiai Tanszékével együttműködve. Feltételeztük, hogy a kapott hibridekben majd a citotoxikus rész (*Vinca* alkaloid egység) lesz felelős a tumorellenes aktivitásért, míg a szteroid vektor segítheti a hibrid szerkezetű hatóanyag internalizációját (bejutását a sejtbe). Sikeresen állítottunk elő többek között egy 19-nortesztozteron-hemiszukcinátból és 17-dezacetilvindolinból⁸ (7) kialakult szteroid-vindolin típusú hibridmolekulát (5, 2. ábra), az ún. vegyesanhidrides módszerrel. Ennek lényege az volt, hogy trietil-amin (TEA) jelenlétében a reagensként alkalmazott izobutil-kloroformát aktiválta a kiindulási szteroid hemiszukcinát szerkezeti egységét, amely ezután már közvetlenül képes volt kapcsolódni a vindolin-egységhez.

* Tel.: +36-1-463-2208; e-mail: hazai@mail.bme.hu

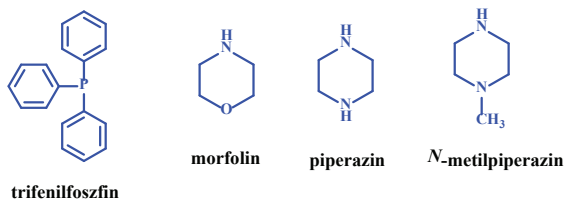


2. ábra. A 19-norteszteszteron-hemiszukcinát és 17-dezacetilvindolin (7) alegységekből felépülő hibridmolekula (5) szerkezete.

Az 5 biológiai vizsgálatait során (*National Institutes of Health*, NIH – USA) kiderült, hogy nemcsak a vindolinnál (2), hanem számos sejtvonalon a vinblasztin-szulfátnál (3) is aktívabb daganatellenes hatással rendelkezik (ld. még később: 1. táblázat).

2.2. Gyógyszerkémiai hibridizáció szintetikus farmakofórokkal

A 19-norteszteszteron-hemiszukcináttal történő kapcsolást követően elsősorban szintetikus farmakofórok (trifenilfoszfín, morfolin, piperazin, illetve *N*-metilpiperazin) hatását vizsgáltuk kutatócsoportunkban (3. ábra).



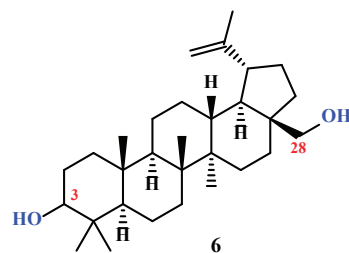
3. ábra. A molekuláris hibridizációhoz kiválasztott szintetikus farmakofor egységek.

2.2.1. Gyógyszerkémiai hibridizáció trifenilfoszfínnal

Kutatócsoportunk tervbe vette foszfortartalmú strukturális egységek kipróbálását is, mint lehetséges farmakofórokat. A választás elsősorban egy ismert, sokoldalú, szerves kémiában használatos reagensre, a trifenilfoszfínnra (TPP) esett. A TPP-től azt reméltük, hogy lipofil karaktere révén, hibrid formában javíthatja a sejtmembrán-permeabilitást, illetve elősegítheti a *Vinca* alkaloidok akkumulációját a sejtben belül.

Tsepaeva és munkatársai a természetes eredetű betulin (6, 4. ábra) TPP-származékainak sorozatát szintetizálták és vizsgálták azok tumorellenes hatását⁹. Kísérleteikben a TPP-t különböző lánc hosszúságú, brómkarbonsavakból létrehozott acil-linkereken keresztül kapcsolták a betulinhoz (6). A szintetizált betulinszármazékok *in vitro* citotoxikus aktivitását vizsgálva több esetben fokozott antiproliferatív hatást tapasztaltak⁹.

Kutatócsoportunk ezen biztató eredmények és egyéb irodalmi analógiák hatására szintén komoly lehetőséget látott a *Vinca* alkaloidok TPP⁺ kationnal történő konjugációjában.

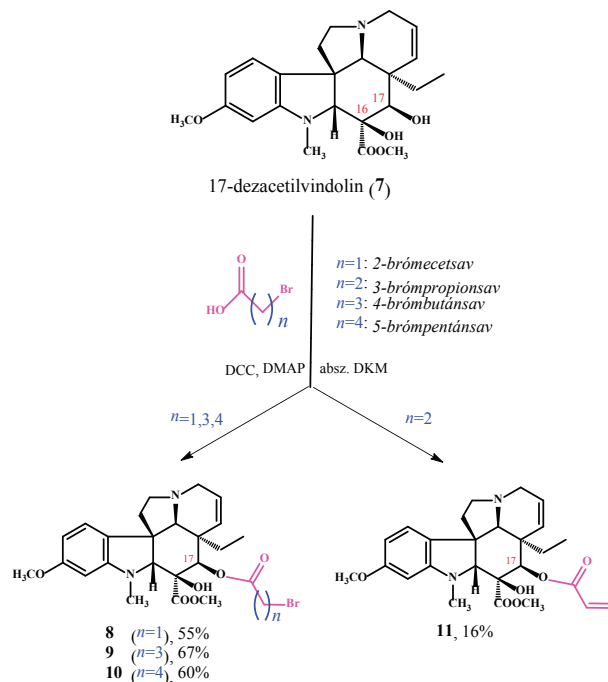


4. ábra. A nyírfafélék (*Betulaceae*) kérgéből izolálható betulin (6) szerkezete.

A hibridek szintézise során továbbra is a vindolinnál (2) indultunk ki. Ennek a monomernek előnye, hogy a dimer alkaloidoknál (pl. 3 és 4) egyszerűbb szerkezetű és stabil, ugyanakkor önmagában nincs daganatellenes hatása. Feltételeztük, hogy az elvégzendő modellreakciók információt adhatnak majd a dimer alkaloidok (3 és 4) várható kémiai viselkedéséről, valamint azt is terveztük megerősíteni, hogy a vindolinnak (2) hibrid formában rákellenes hatása is lehet.

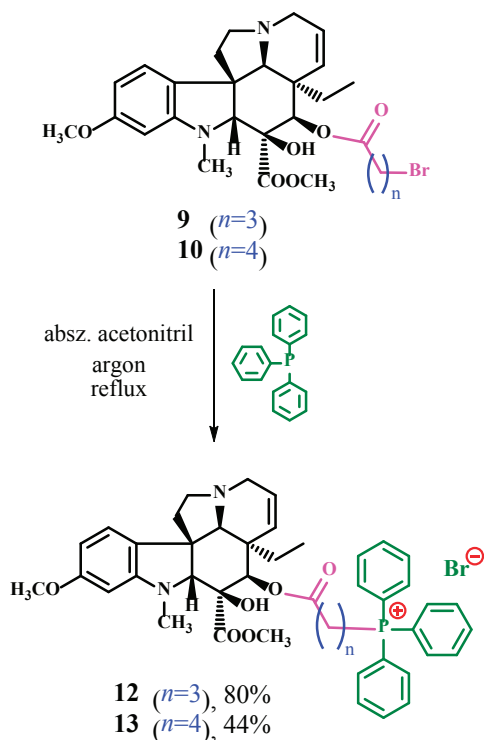
A tervünk az volt, hogy a szintetikus farmakofórok kapcsolását linkerrel keresztül, a vindolin (2) 17-es pozíciójában, 17-dezacetilvindolinból⁸ (7) kiindulva végezzük el. Ez a kiindulási anyag a vindolinnál (2) egy lépésben, egyszerű lúgos hidrolízissel (metanolos közegben forralva, nátrium-karbonáttal), jó termeléssel előállítható⁸.

Következő lépésben a 17-dezacetilvindolint⁸ (7) különböző lánc hosszúságú brómkarbonsavakkal kapcsoltuk (5. ábra). A négy vizsgált esetből háromban a várt konjugátumhoz jutottunk (8-10), míg a 3-brómpropionsavas kapcsolási kísérletben a várt termék telítetlen analogonját (11) kaptuk.



5. ábra. A 17-dezacetilvindolin (7) és a különböző lánc hosszúságú brómkarbonsavak reakciója során kapott termékek (8-11). DCC: *N,N'*-diciklohexil-karbodiimid. DMAP: 4-dimetilaminopiridin.

A *Steglich-féle észterestési reakcióval*¹⁰ kapott vindolinszármazékok két képviselőjét (**9** és **10**) már közvetlenül tudtuk kapcsolni trifenilfoszfínnal (**12** és **13**, **6. ábra**). A kiindulási vegyületeket (**9** és **10**) absz. acetonitrilben oldottuk, majd a nagy feleslegű TPP-t (8 ekvivalens) fokozatosan, a reakció lefutását követve adagoltuk a reakcióelegyhez. Megállapítottuk, hogy a TPP felesleg szignifikánsan javította a hozamokat.



6. ábra. A 17-es helyzetben linkerrel ellátott vindolinszármazékokból (**9** és **10**) szintetizált foszfóniumsó szerkezete (**12** és **13**).

2.2.2. Gyógyszerkémiai hibridizáció *N*-heterociklusokkal

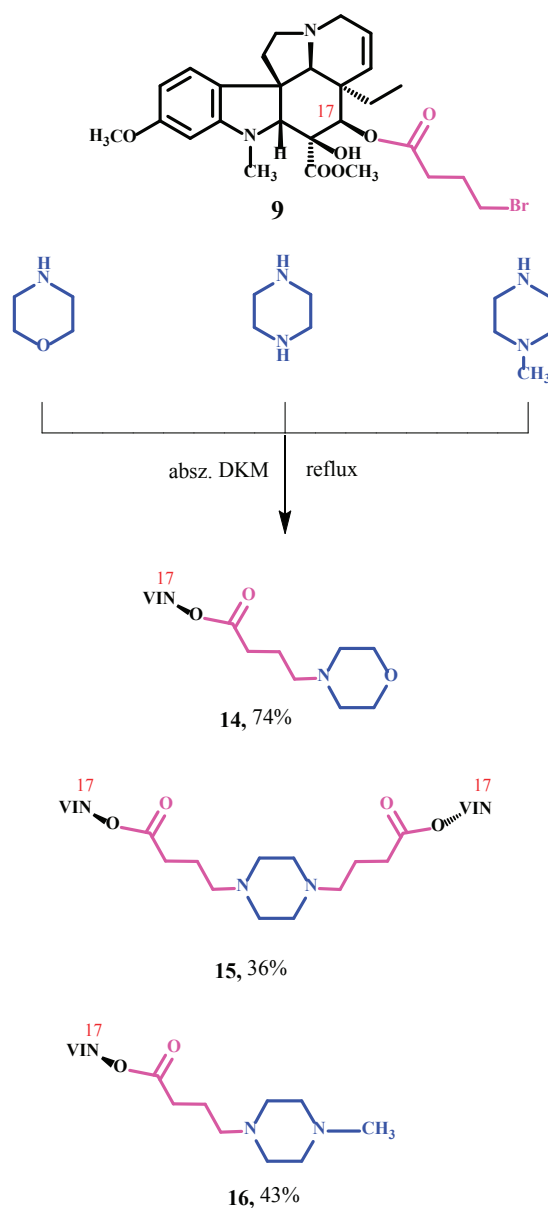
A heterociklusos szerves vegyületek legalább egy, szénatomtól és hidrogénatomtól eltérő atomot tartalmaznak, ezek leggyakrabban *N*, *O* és *S* heteroatomok. Számos képviselőjük gyógyászati szempontból is jelentős, különösen a különböző *N*-heterociklusok. A legjellegzetesebb képviselők közé tartozik a triazol, a morfolin, a piperazin, illetve az *N*-metilpiperazin is. Ezek a strukturális egységek jelentős múltra tekintenek vissza a gyógyszerkutatás területén, származékaik számos terápiás területen hatékonynak bizonyultak.

Az *N*-heterociklusos farmakofórokat (**3. ábra**) széleskörű biológiai aktivitásuk okán szintén érdemesnek tartottuk kipróbálni a *Vinca* alkaloidokkal végrehajtott hibridizációs kísérletekben is.

Elsőként a **morfolinnal** történő kapcsolásokat vizsgáltuk. A reakcióban a modellvegyületként alkalmazott, linkerrel ellátott vindolinszármazékot (**9**) absz. diklórmétánban oldottuk, majd argon atmoszféra alatt beadagoltuk a morfolint, és

a reakcióelegyet 11 órán keresztül forraltuk. Feldolgozás és tisztítás után sikeresen kaptuk a várt hibridet (**14**, **7. ábra**). A **piperazinnal** történő kapcsolás esetében egy olyan dimer termékhez (**15**) jutottunk, ahol a piperazin mindkét nitrogénatomjához hozzákapcsolódott egy-egy linkerrel ellátott vindolin-egység (**7. ábra**). Kísérletet tettünk a csak a piperazin egyik oldalán funkcionáliszt hibrid előállítására, így elvégeztük a reakciót *N*-metilpiperazinnal kiindulva is, ekkor sikeresen jutottunk a várt termékhez (**16**, **7. ábra**).

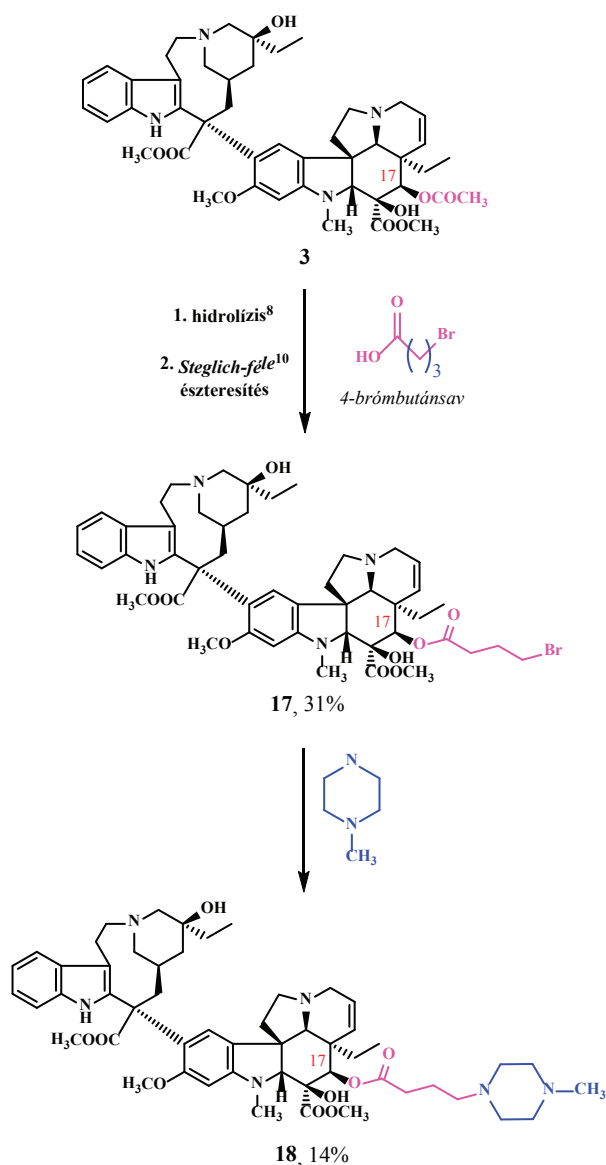
A biológiai vizsgálatok során (NIH, USA) a három, *N*-heterociklussal kapcsolt hibridmolekula (**14-16**) közül a piperazinnal kapcsolt vindolin-dimer (**15**) volt a leghatékonyabb. Ez a származék (**15**) az ötödízis vizsgálatok során is tesztlésre került (ld. **2.4.** fejezet).



7. ábra. A **9** vindolinszármazék és a morfolin, piperazin, illetve *N*-metilpiperazin kapcsolásával kapott hibridek szerkezete (**14-16**). VIN = 17-dezacetilvindolin-egység.

2.3. Gyógyszerkémiai hibridizáció vinblasztinnal (3)

Végül a hibridizációs kísérleteket a természetes dimer alkaloid vinblasztinra (3) is kiterjesztettük, és előállítottunk egy 4-brómbutánsavval észtereszített vinblasztinszármazékot (17), amelyet következő lépésben sikeresen kapcsoltunk *N*-metilpiperazinnal (18) (8. ábra).



8. ábra. A vinblasztin (3) kapcsolási kísérlete *N*-metilpiperazinnal a várt hibridmolekulához (18) vezetett.

2.4. Biológiai eredmények

Munkánk során vizsgáltuk az előállított hibridek *in vitro* daganatellenes hatását is. A tesztelt vindolinszármazékok közül a *National Institutes of Health* (NIH, USA) **egyed- zisú vizsgálatai**¹¹⁻¹⁴ (9 gyakori ráktípus összesen 60 sejtvonal) alapján a legígéretesebb antiproliferatív aktivitással az 5 vindolin-szteroid típusú hibrid, a 12 és 13 foszfóniumsók, illetve a 15 piperazinnal kapcsolt vindolin-dimer rendelkezett, ezért ezeket a NIH ötdózisú vizsgálatoknak is alávetettük

(szintén 60 sejtvonalon). Ez utóbbi tesztelések többek között GI₅₀ értékeket (sejtnövekedést és szaporodást 50%-ban gátló koncentrációk) szolgáltattak. Az ötdózisú mérések¹¹⁻¹⁴ alapján a tesztelt vindolinszármazékok közül a 12 foszfóniumsó volt a leghatékonyabb. A többi vindolinszármazékkal összehasonlítva nemcsak a legalacsonyabb GI₅₀ értéket szolgáltatta a teljes NCI-60 panelen (6,55*10⁻⁸ M a HOP-92 nem-kissejtes tüdőrák sejtvonalon), hanem számos sejtvonalon a referenciaként használt vinblasztin-szulfátnál (3) is nagyobb aktivitást mutatott (1. táblázat).

	3	5	12	13	15
GI ₅₀ értékek (μM)					
Nem-kissejtes tüdőrák					
EKVX	11,4	1,70	0,470	0,586	1,44
NCI-H226	25,6	2,07	2,04	1,93	1,73
Melanóma					
SK-MEL-2	0,0223	1,24	0,322	0,279	1,88
SK-MEL-28	11,1	2,17	0,261	0,532	1,40
UACC-257	20,5	2,65	0,240	0,215	1,96
Petefészekrák					
SK-OV-3	4,94	2,04	0,894	0,725	2,07
Veserák					
TK-10	7,15	1,91	1,48	2,82	1,30
UO-31	0,0287	0,997	10,8	12,2	1,10
Mellrák					
T-47D	8,59	1,79	0,192	0,303	1,60

3: vinblasztin-szulfát (referencia)

5: 19-nortesztozsteron-vindolin hibridmolekula

12: trifenilfoszfínnal kapcsolt vindolinszármazék (*n*=3)

13: trifenilfoszfínnal kapcsolt vindolinszármazék (*n*=4)

15: piperazinnal kapcsolt vindolin-dimer

1. táblázat. Az ötdózisú vizsgálatok során kapott GI₅₀ értékek néhány kiemelt sejtvonalon.

Különösen szembetűnő, hogy a 12 a feltüntetett nem-kissejtes tüdőrák (EKVX és NCI-H226), két melanóma (SK-MEL-28 és UACC-257) és egy mellrák (T-47D) sejtvonalon – a 13 foszfóniumsóval együtt – kb. egy nagyságrenddel alacsonyabb GI₅₀ értékeket szolgáltattott, mint a klinikumban is használatos vinblasztin-szulfát (3). Az 5 vindolin-szteroid típusú hibrid, illetve a piperazinnal kapcsolt vindolin-dimer (15) a 12 és 13 vegyületet megközelítő, szintén kiemelkedő daganatellenes aktivitással rendelkezett. Ezek a vegyületek (5 és 15) is számos sejtvonalon (EKVX, NCI-H226, SK-MEL-28, UACC-257, SK-OV-3, TK-10 és T-47D) aktívab- bak voltak a vinblasztin-szulfátnál (3).

3. Összefoglalás

Kísérleteinkkel elsősorban azt a tényt terveztük megerősíteni, hogy a vindolin (2) antiproliferatív hatása molekuláris hibridizációval promotálható, illetve feltételeztük, hogy

hibrid formában a monomer (2) akár a klinikumban használt, de súlyos mellékhatásokkal rendelkező vinblasztin (3) alternatívája is lehet. A biológiai vizsgálatok megerősítettek, hogy megfelelő farmakofór egységekkel kapcsolva (ld. 5, 12 és 13, illetve 15 vegyületek) vindolintartalmú hibridek is viselkedhetnek daganatellenes szerként. Mindez azt sugallja, hogy gyógyszerkémiai hibridizációval lehetőségessé válhat a vindolin (2) bevezetése a rákellenes terápiába.

4. Kísérleti rész

A szintetikus munka során preparatív szerves kémiai módszereket alkalmaztunk. A reakciók előrehaladását vékonyréteg-kromatográfiával követtük. Az anyagok tisztítására preparatív vékonyréteg-kromatográfiát, alkalmaztunk. Az anyagok tisztaságának ellenőrzésére vékonyréteg-kromatográfiát és olvadáspontmérést használtunk. Az előállított vegyületek szerkezetét IR, ¹H és ¹³C NMR, valamint tömegspektrometriai módszerekkel igazoltuk. Az NMR és MS spektrumok felvételét és értékelését a Richter Gedeon Nyrt. Szerkezetkutató Osztályának munkatársai végezték. Az előállított vegyületek szintézisét és fizikai jellemzőit korábban már közöltük¹⁵⁻¹⁹.

Hivatkozások

- Noble, R.L.; Beer, C.T.; Cutts, J.H. Role of chance observations in chemotherapy: Vinca rosea. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1958**, *76*, 882-894. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1958.tb54906.x>
- Almagro, L.; Fernández-Perez, F.; Pedreno, M.A. Indole alkaloids from *Catharanthus roseus*: bioproduction and their effect on human health. *Molecules*, **2015**, *20*, 2973-3000. <https://doi.org/10.3390/molecules20022973>
- Himes, R.H. Interactions of the catharanthus (Vinca) alkaloids with tubulin and microtubules. *Pharmacol. Ther.* **1991**, *51*, 257-267. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(91\)90081-V](https://doi.org/10.1016/0163-7258(91)90081-V)
- Mukhtar, E.; Adhami, V.M.; Mukhtar, H. Targeting Microtubules by Natural Agents for Cancer Therapy. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, *13*, 275-284. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0791>
- Meunier, B. Hybrid molecules with a dual mode of action: dream or reality? *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 69-77. <https://doi.org/10.1021/ar7000843>
- Nepali, K.; Sharma, S.; Sharma, M.; Bedi, P.M.S.; Dhar, K.L. Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *77*, 422-487. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.018>
- Choudhary, S.; Singh, P.K.; Verma, H.; Singh, H.; Silakari, O. Success stories of natural product-based hybrid molecules for multi-factorial diseases. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *151*, 62-97. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.057>
- Passarella, D.; Giardini, A.; Peretto, B.; Fontana, G.; Sacchetti, A.; Silvani, A.; Ronchi, C.; Cappelletti, G.; Cartelli, D.; Borlak, J.; Danieli, B. Inhibitors of tubulin polymerization: Synthesis and biological evaluation of hybrids of vindoline, anhydrovinblastine and vinorelbine with thiocolchicine, podophyllotoxin and baccatin III. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 6269-6285. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.04.025>
- Tsepaveva, O.V.; Nemtarev, A.V.; Abdullin, T.I.; Grigor'eva, L.R.; Kuznetsova, E.V.; Akhmadishina, R.A.; Ziganshina, L.E.; Cong H.H.; Mironov, V.F. Design, Synthesis, and Cancer Cell Growth Inhibitory Activity of Triphenylphosphonium Derivatives of the Triterpenoid Betulin. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2232-2239. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00105>
- Neises, B.; Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 522-524. <https://doi.org/10.1002/anie.197805221>
- Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.H.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *J. Nat. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 757-766. <https://doi.org/10.1093/jnci/83.11.757>
- Alley, M.C.; Scudiero, D.A.; Monks, A.; Hursey, M.L.; Czerwinski, M.J.; Fine, D.L.; Abbott, B.J.; Mayo, J.G.; Shoemaker, R.H.; Boyd, M.R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 589-601. **PMID:3335022** <https://cancerres.aacrjournals.org/content/48/3/589>
- Shoemaker, R.H.; Monks, A.; Alley, M.C.; Scudiero, D.A.; Fine, D.L.; McLemore, T.L.; Abbott, B.J.; Paull, K.D.; Mayo, J.G.; Boyd, M.R. Development of human tumor cell line panels for use in disease-oriented drug screening. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1988**, *276*, 265-286. **PMID:3051021** <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3051021/>
- National Institutes of Health, National Cancer Institute, Division of Cancer Treatment & Diagnosis, Developmental Therapeutics Program, **2020**. https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/methodology.htm https://dtp.cancer.gov/databases_tools/docs/compare/compare_methodology.htm
- Keglevich, A.**; Szigetvári, Á.; Dékány, M.; Szántay, Cs. Jr.; Keglevich, P.; Hazai, L. Synthesis of vinca alkaloid-triphenylphosphine derivatives having potential antitumor effect. *Phosphorus, Sulfur, Silicon Relat. Elem.* **2019**, *194*, 606-609. Issue 4-6: Proceedings of the 2018 International Conference on Phosphorus Chemistry, ICPC-22. <https://doi.org/10.1080/10426507.2018.1550780>
- Keglevich, A.**; Szigetvári, Á.; Dékány, M.; Szántay, Cs. Jr.; Keglevich, P.; Hazai, L. Synthesis and in vitro Antitumor Effect of New Vindoline Derivatives Coupled with Triphenylphosphine. *Curr. Org. Chem.* **2019**, *23*, 852-858. <https://doi.org/10.2174/1385272823666190524083236>
- Keglevich, A.**; Zsiros, V.; Keglevich, P.; Szigetvári, Á.; Dékány, M.; Szántay, Cs. Jr.; Mernyák, E.; Wölfling, J.; Hazai, L. Synthesis and in vitro Antitumor Effect of New Vindoline-Steroid Hybrids. *Curr. Org. Chem.* **2019**, *23*, 959-967. <https://doi.org/10.2174/1385272823666190614113218>
- Keglevich, A.**; Dányi, L.; Rieder, A.; Horváth, D.; Szigetvári, Á.; Dékány, M.; Szántay, Jr. Cs.; Latif, A.D.; Hunyadi, A.; Zupkó, I.; Keglevich, P.; Hazai, L. Synthesis and Cytotoxic Activity of New Vindoline Derivatives Coupled to Natural and Synthetic Pharmacophores. *Molecules*, **2020**, *25*, 1010. <https://doi.org/10.3390/molecules25041010>
- Keglevich, A.** Meténg és rákkutatás. *Élet és Tudomány* LXXIV. évf. ■ 30. szám ■ 2019. július 26. ■ 934-936.

SYNTHESIS OF *VINCA* ALKALOID DERIVATIVES WITH ANTITUMOR ACTIVITY

Our work was focused on the famous *Vinca* alkaloid family¹⁻² (**Fig. 1**). These naturally occurring compounds have an indole-skeleton and they can be isolated from the leaves of *Catharanthus roseus*. From the natural representatives (**1-4**) only vinblastine (**3**) and vincristine (**4**) have antiproliferative effect, however, these molecules have complex structure and serious side effects, too. Their structures differs with only a single functional group (*N*¹). The two subunits of these dimeric alkaloids are catharanthine (**1**) and vindoline (**2**). Representatives of the natural (**3** and **4**) and semisynthetic dimers of the alkaloid family are still being used in cancer therapy, especially in various lymphomas and leukemia.

Vinca alkaloids exert their anticancer activity by inhibiting the function of microtubules and thus restraining the mitotic (*M*) phase of cell division^{3,4}. These drugs can bind to the tubulin molecules required for the formation of the mitotic spindle, thereby block the dynamics of the microtubules that ultimately inhibits mitosis and leads to cell death.

The demonstrated research project was carried out in the Alkaloid Chemistry Research Group of the Department of Organic Chemistry and Technology, where we were involved in the development of *Vinca* alkaloids and the production of new derivatives. The naturally occurring (**3** and **4**) and semisynthetic dimer derivatives of the *Vinca* family are still being used in the treatment of cancer despite their serious side effects.

In the course of the synthetic work, we used preparative organic chemical methods with due regard for safety considerations. The progress of the reactions and the purity of the products were checked by thin layer chromatography. Purification of the crude products was carried out by preparative thin layer chromatography. Structure identification was achieved by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and mass spectrometry (MS). The recording and evaluation of the NMR and MS spectra were performed by the staff of the Spectroscopic Research Department of Gedeon Richter Plc.

We aimed primarily to perform pharmacophore hybridization experiments. The general goal of synthesizing hybrid molecules⁵⁻⁷

was to increase the efficacy (antitumor activity) and / or reduce the side effects by incorporating two or more pharmacophore units into one single molecule.

As a start, we prepared a 19-nortestosterone hemisuccinate – 17-desacetylvindoline hybrid molecule¹⁷ (**5**, **Fig. 2**), which was more active against several tumor cell lines than vinblastine sulfate (**3**) *in vitro* (our cooperation partner was the *National Institutes of Health*, NIH – USA¹¹⁻¹⁴) (**Table 1**).

Henceforward, we studied the molecular hybridization of vindoline (**2**) and synthetic pharmacophores, such as triphenylphosphine, morpholine, piperazine and *N*-methylpiperazine (**Fig. 3**).

First of all, *Steglich-esterification*¹⁰ reactions between bromocarboxylic acids with different alkyl chain lengths and 17-desacetylvindoline⁸ (**7**) resulted in *O*-acylated vindoline derivatives^{15,16} (**8-11**) (**Fig. 5**). Two of these linker-containing bromoalkyl esters (**9** and **10**) could be coupled with triphenylphosphine (**12** and **13**) (**Fig. 6**). The obtained phosphonium salts^{15,16} (**12** and **13**) showed outstanding *in vitro* antitumor activity, even more significant than vinblastine sulfate (**3**) against several cell lines (**Table 1**).

Eventually, we synthesized vindoline hybrid molecules containing different *N*-heterocycles¹⁸ (morpholine, piperazine, and *N*-methylpiperazine) (**Fig. 7**). Among them, the piperazine-linked vindoline-dimer (**15**) was surprisingly more efficient than vinblastine sulfate (**3**) against several cell lines (**Table 1**).

As a summary, we presumed a significant antitumor effect by coupling steroids and synthetic pharmacophores to vindoline (**2**). Several hybrid molecules (**5**, **12** and **13**, **15**) demonstrated promising antitumor effect, and may be considered as promising leads, particularly against certain types of non-small cell lung cancer and melanoma. The results of the *in vitro* biological studies (NIH, USA) confirmed that the antitumor activity of vindoline (**2**) can be promoted and suggest that it is possible to induce vindoline (**2**) to become a real anticancer drug by conjugating it with suitable pharmacophores.