

Л. В. Аникина, А. В. Семаков, С. В. Афанасьева, С. А. Пухов, С. Г. Клочков

СИНТЕЗ И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ КОНЬЮГАТОВ ДАУНОРУБИЦИНА С СЕСКВИТЕРПЕНОВЫМИ ЛАКТОНАМИ

ФГБУН Институт физиологически активных веществ Российской академии наук, 142432,
Черноголовка Московской обл., Северный проезд, д. 1, тел/факс: 7 (49652) 42 578;
e-mail: klochkov@ipac.ac.ru

Проведена модификация антрациклинового антибиотика даунорубицина сесквитерпеновыми лактонами *Inula helenium* L. — алантолактоном, изоалантолактоном и аллоалантолактоном. Антипролиферативные свойства полученных конъюгатов изучены на опухолевых и нормальных клеточных линиях. Установлено, что конъюгат даунорубицина с алантолактоном на ряде культур опухолевых клеток обладает более выраженными антипролиферативными свойствами, чем даунорубицин, без увеличения токсичности по отношению к нормальным клеткам.

Ключевые слова: даунорубицин; сесквитерпеновые лактоны; цитотоксичность *in vitro*; МТТ-тест.

Неотъемлемой частью химиотерапии онкологических заболеваний в настоящее время продолжает оставаться применение широкого спектра противоопухолевых антибиотиков [1]. Антрациклины являются группой противоопухолевых антибиотиков с очень высокой антимитотической активностью. Их механизм действия основан на ингибировании синтеза нуклеиновых кислот за счет интеркаляции между парами азотистых оснований и связывания с топоизомеразой II, а также на взаимодействии с липидами клеточных мембран, что нарушает транспорт ионов и целый ряд других функций клетки [2]. Такой механизм цитотоксичности приводит к высокой противоопухолевой активности и низкой избирательности действия антрациклиновых антибиотиков. Для них характерна необратимая кумулятивная дозозависимая кардиотоксичность, а также иммунодепрессивное, эмбриотоксическое, мутагенное и тератогенное действие [3].

Целью настоящего исследования была модификация антрациклинового антибиотика даунорубицина (DNR) сесквитерпеновыми лактонами — изоалантолактоном (I), алантолактоном (II) и аллоалантолактоном (III), полученными из *Inula helenium* L., и оценка их антипролиферативных свойств на опухолевых и нормальных клеточных линиях. Пятичленные циклы сесквитерпеновых лактонов структурно родственны шестичленным лактонным циклам камптотецина, топотекана, иринотекана и других известных ингибиторов топоизомеразы I. Кроме того, сесквитерпеновые лактоны обладают антиоксидантным действием, механизм которого включает хелатирующие и антирадикальные свойства [4]. Предполагалось, что присоединение природных сесквитерпеновых лактонов к DNR повысит цитотоксичность последнего по отношению к опухолевым клеткам за счет дополнительного действия на новые биохимические мишени и снизит токсичность конъюгатов за счет собственного антиоксидантного действия сесквитерпеновых лактонов [5, 6].

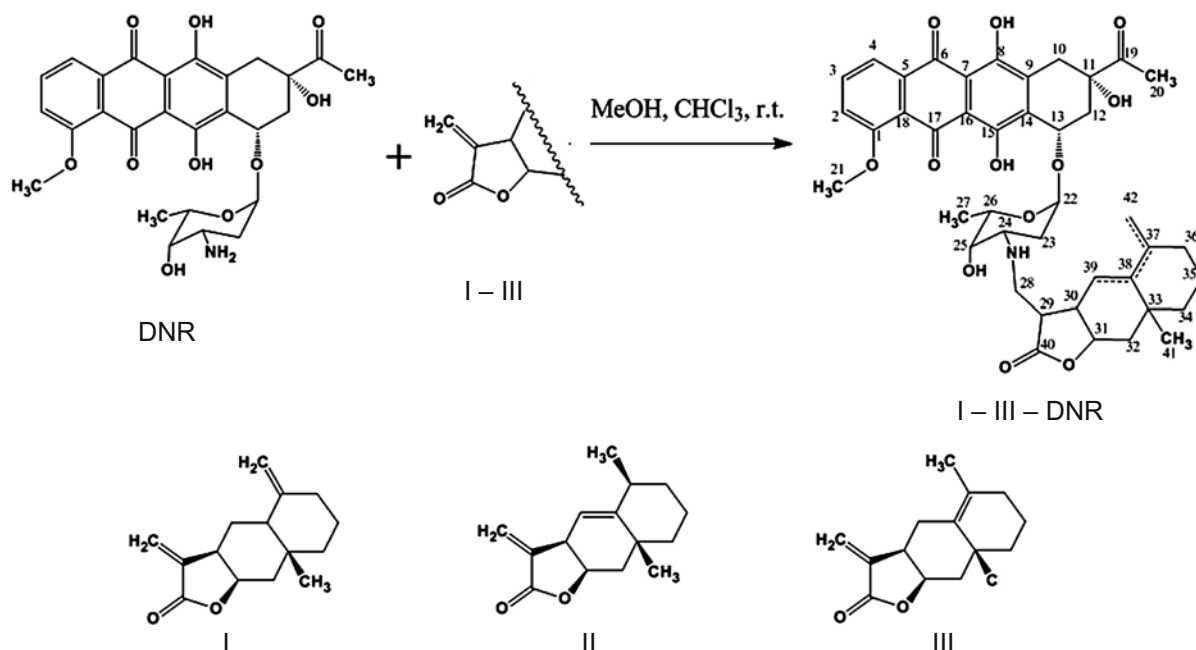
Лактоны I и II являются известными противоопухолевыми агентами, активно исследуемыми в последнее время и обладающими как противоопухолевыми свойствами, так и иными видами активности. Минорный компонент корней *Inula helenium* L. лактон III может быть получен в препаративных количествах изомеризацией из I в кислотных условиях. Эти лактоны содержат реакционноспособную экзометиленовую группу и легко присоединяют различные нуклеофилы по типу реакции Михаэля. В качестве такого нуклеофила может выступать DNR, содержащий первичную аминогруппу. Конъюгаты DNR с сесквитерпеновыми лактонами получали по схеме.

Экспериментальная химическая часть

Масс-спектры высокого разрешения зарегистрированы на масс-спектрометре Thermo Fisher Exactive, масс-анализатор ORBITRAP с ортогональным вводом ионов, источник ионизации — электрораспыление. Для ионизации были взяты растворы в ацетонитриле с концентрацией $\sim 10^{-5}$ М, полученные значения m/z соответствуют пику протонированного молекулярного иона. Спектры ЯМР ^1H получены на приборах Bruker AVANCE III и Bruker DPX-200 с рабочими частотами 500,13 и 200 МГц с использованием TMS в качестве внутреннего стандарта, в расшифровке спектра символы « α » и « β » обозначают неэквивалентные протоны при одном атоме углерода. В работе использовано оборудование ЦКП ИФВ РАН (Соглашение № 14.621.21.0008, идентификатор RFMEFI62114X0008).

Даунорубицин в виде основания. В делительной воронке растворяют 1 г гидрохлорида даунорубицина в 200 мл воды, прибавляют 100 мл хлороформа и добавляют NaHCO_3 до перехода основной части окрашенного антрациклина в органический слой. Нижний слой сливают и упаривают, экстрагируют оставшийся DNR из водной фазы еще 3 раза по 50 мл хлороформа. Растворители упаривают.

Схема



Аллоалантолактон (III). К раствору 1 г лактона I в 20 мл хлороформа прибавляют 4,5 мл трифторуксусной кислоты и оставляют на 18 ч в темноте при комнатной температуре. Затем реакционную смесь выливают в воду, прибавляют карбонат натрия до конца выделения газа. Экстрагируют трижды хлороформом, растворитель упаривают и пропускают через короткую колонку с силикагелем, элюируя хлороформом. Получают практически чистый лактон III в виде бесцветного масла с количественным выходом. Дополнительно очищают хроматографией на 30 г силикагеля с импрегнированным 10 % нитратом серебра. Элюируют последовательно петролейным эфиром, его смесью с бензолом 1:1, чистым бензолом. Фракции, содержащие лактон III, упаривают и тщательно вакуумируют, получая бесцветные легкоплавкие кристаллы $T_{пл}$ 31–32 °С. Спектральные характеристики соответствуют литературным данным [7, 8].

Общая методика получения конъюгатов даунорубицина. В смеси 1,5 мл метанола и 1,5 мл хлороформа растворяют 100 мг соответствующего лактона

(I–III), затем добавляют 250 мг DNR в виде свободного основания. Оставляют при комнатной температуре на 7 сут. Ход реакции контролируют методом ТСХ на пластинках Силуфол в системе CHCl₃:MeOH = 4:1. Реакционную смесь упаривают при пониженном давлении, промывают осадок метанолом, очищают колоночной хроматографией на 15 г силикагеля, промывая сначала CHCl₃, затем смесью с добавлением 20 % MeOH, при этом продукт элюируется с колонки узкой зоной.

Конъюгат даунорубицина с изоалантолактоном (I-DNR). Выход 222 мг (69 %, 0,293 ммоль). Красные пластинчатые кристаллы, $T_{пл}$ 152–160 °С. Найдено: m/z 760,3237 [M + H]⁺. C₄₂H₄₉NO₁₂. Вычислено: [M + H]⁺ = 760,3328. Спектр ¹H ЯМР (CDCl₃), δ, м.д.: 0,77 (с, 3H, H-41), 1,13–1,25 (м, 2H, H-34α + H-39α), 1,36 (д, 3H, J 6,6 Гц, H-27), 1,41–1,53 (м, 3H, H-34β + H-39β + H-32α), 1,53–1,59 (м, 2H, H-35), 1,68–1,78 (м, 3H, H-23 + H-38), 1,94 (тд, 1H, J₁ 11,9 Гц, J₂ 6,1 Гц, H-36α), 2,10 (дд, 1H, J₁ 14,7 Гц, J₂ 4,1 Гц, H-12α), 2,13 (дд, 1H, J₁ 15,7 Гц, J₂ 1,7 Гц, H-32β), 2,28 (дт, 1H, J₁

Цитотоксичность *in vitro* конъюгатов даунорубицина с сесквитерпеновыми лактонами

Соединение	IC ₅₀ , мкМ					
	A549	HCT116	RD	MCF7	HEK293	MDCK-M
I	32,04 ± 3,24	11,31 ± 0,27	10,37 ± 0,79	17,51 ± 0,60	74,03 ± 0,51	66,44 ± 1,69
I-DNR	1,38 ± 0,09	0,41 ± 0,00	1,16 ± 0,02	4,13 ± 0,01	6,72 ± 0,06	0,74 ± 0,08
II	36,73 ± 1,43	10,57 ± 0,04	5,48 ± 0,20	13,15 ± 0,93	36,47 ± 0,07	33,44 ± 0,97
II-DNR	0,75 ± 0,07	0,04 ± 0,00	0,73 ± 0,01	2,48 ± 0,02	12,17 ± 0,73	1,50 ± 0,01
III	23,12 ± 1,18	34,52 ± 3,51	8,82 ± 0,14	17,92 ± 0,68	35,87 ± 0,48	37,95 ± 1,01
III-DNR	2,24 ± 0,08	1,89 ± 0,02	0,76 ± 0,06	0,59 ± 0,37	8,26 ± 0,28	0,50 ± 0,08
DNR	0,51 ± 0,01	0,21 ± 0,00	2,45 ± 0,07	1,44 ± 0,31	11,17 ± 0,19	0,32 ± 0,00

11,9 Гц, J₂ 3,4 Гц, H-36β), 2,37 (дт, 1Н, J₁ 14,7 Гц, J₂ 1,8 Гц, H-12β), 2,42 (с, 3Н, H-20), 2,41 – 2,48 (м, 1Н, H-30), 2,74 (дд, 1Н, J₁ 11,9 Гц, J₂ 6,9 Гц, H-28α), 2,81 (кв, 1Н, J 6,6 Гц, H-29), 2,88 (ддд, 1Н, J₁ 11,6 Гц, J₂ 5,0 Гц, J₃ 2,6 Гц, H-24), 2,96 (д, 1Н, J 18,9 Гц, H-10α), 3,00 (дд, 1Н, J₁ 12,4 Гц, J₂ 6,9 Гц, H-28β), 3,22 (дд, 1Н, J₁ 18,9 Гц, J₂ 1,8 Гц, H-10β), 3,66 (уш.с, 1Н, H-25), 4,07 (с, 3Н, H-21), 4,01 – 4,10 (м, 1Н, H-26), 4,41 (уш.с, 1Н, H-42α), 4,45 (тд, 1Н, J₁ 4,0 Гц, J₂ 1,5 Гц, H-31), 4,72 (уш.с, 1Н, H-42β), 5,29 (дд, 1Н, J₁ 4,1 Гц, J₂ 1,8 Гц, H-13), 5,51 (д, 1Н, J 3,1 Гц, H-22), 7,38 (д, 1Н, J 8,1 Гц, H-2), 7,77 (т, 1Н, J 8,1 Гц, H-3), 8,02 (д, 1Н, J 8,1 Гц, H-4).

Конъюгат даунорубина с алантолактоном (II-DNR). Выход 157 мг (48 %, 0,207 ммоль). Красные пластинчатые кристаллы, T_{пл} 152 – 158 °С. Найдено: m/z 760,3290 [M + H]⁺. C₄₂H₄₉NO₁₂. Вычислено: [M + H]⁺ = 760,3328. Спектр ¹H ЯМР (CDCl₃), δ, м.д.: 1,07 (д, 3Н, J 8,4 Гц, H-42), 1,10 (м, 1Н, H-34α), 1,19 (с, 3Н, H-41), 1,36 (д, 3Н, J 6,6 Гц, H-27), 1,41 (м, 1Н, H-35α), 1,46 (уш.с, 1Н, H-32α), 1,49 (уш.т, 2Н, H-36), 1,57 (д, 1Н, J 11,7 Гц, H-34β), 1,74 (м, 3Н, H-23 + H-35β), 2,09 (тд, 2Н, J₁ 14,4 Гц, J₂ 3,7 Гц, H-32β + H-12α), 2,37 (дт, 1Н, J₁ 14,8 Гц, J₂ 1,8 Гц, H-12β), 2,42 (м, 4Н, H-20 + H-37), 2,77 (м, 1Н, H-28α), 2,90 (м, 3Н, H-24 + H-28β + H-29), 2,94 (д, 1Н, J 18,8 Гц, H-10α), 3,08 (ддд, 1Н, J₁ 8,2 Гц, J₂ 5,6 Гц, J₃ 3,1 Гц, H-30), 3,21 (дд, 1Н, J₁ 18,8 Гц, J₂ 1,8 Гц, H-10β), 3,65 (уш.с, 1Н, H-25), 4,07 (м, 4Н, H-21 + H-26), 4,70 (дт, 1Н, J₁ 5,6 Гц, J₂ 2,5 Гц, H-31), 5,04 (д, 1Н, J 3,1 Гц, H-39), 5,28 (дд, 1Н, J₁ 3,7 Гц, J₂ 1,8 Гц, H-13), 5,51 (д, 1Н, J 3,2 Гц, H-22), 7,38 (д, 1Н, J 8,1 Гц, H-2), 7,77 (т, 1Н, J 8,1 Гц, H-3), 8,01 (д, 1Н, J 8,1 Гц, H-4).

Конъюгат даунорубина с аллоалантолактоном (III-DNR). Выход 178 мг (54 %, 0,235 ммоль). Красные пластинчатые кристаллы, T_{пл} 134 – 140 °С. Найдено: m/z 760,3240 [M + H]⁺. C₄₂H₄₉NO₁₂. Вычислено: [M + H]⁺ = 760,3328. Спектр ¹H ЯМР (200 МГц), (CDCl₃), δ, м.д.: 1,06 (с, 3Н, H-41), 1,36 (д, 3Н, J 6,5 Гц, H-27), 1,44 – 1,51 (м, 2Н, H-34), 1,51 – 1,65 (м, 2Н, H-35), 1,57 (с, 3Н, H-42), 1,65 – 1,82 (м, 4Н, H-23 + H-32), 1,82 – 1,95 (м, 3Н, H-36 + H-39α), 2,06 (уш.д, 1Н, J 1,8 Гц, H-12α), 2,13 (уш.д, 1Н, J 3,3 Гц, H-39β), 2,33 (уш.с, 1Н, H-12β), 2,42 (с, 3Н, H-20), 2,65 – 3,05 (м, 6Н, H-10α + H-28 + H-24 + H-29 + H-30), 3,23 (д, 1Н, J 19,0 Гц, H-10β), 3,67 (уш.с, 1Н, H-25), 4,08 (с, 3Н, H-21), 4,00 – 4,15 (м, 1Н, H-26), 4,45 (уш.с, 1Н, H-31), 5,30 (уш.с, 1Н, H-13), 5,54 (уш.с, 1Н, H-22), 7,39 (д, 1Н, J 8,1 Гц, H-2), 7,78 (т, 1Н, J 8,1 Гц, H-3), 8,03 (д, 1Н, J 8,1 Гц, H-4).

Экспериментальная фармакологическая часть

Антипролиферативную активность полученных конъюгатов и исходных соединений определяли *in vitro* на культурах опухолевых клеток человека A549 (карцинома легкого, ATCC® CCL-185™), HCT116 (карцинома кишечника, ATCC® CCL-247™), MCF7 (аденокарцинома молочной железы, ATCC®

HTB-22™), RD (рабдомиосаркома, ATCC® CCL-136™), а также на линии нормальных клеток эмбрионального почечного эпителия человека HEK293 (ATCC® CRL-1573™) и собаки MDCK-M (ATCC® CCL-34™).

Культуры клеток A549, HCT116, RD и HEK293 выращивали в среде DMEM, культуру клеток MCF7 выращивали в среде EMEM, культура клеток MDCK-M — в среде DMEM/F12 (все среды ООО НПП “ПанЭко”). В культуральные среды добавляли 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone®, Thermo Scientific), 2 mM L-глутамин (ООО НПП “ПанЭко”) и 1 % гентамицина (ОАО “Биохимик”) в качестве антибиотика. Культивирование происходило при 37 °С и 5 % CO₂ во влажной атмосфере.

Цитотоксичность полученных конъюгатов, исходных сесквитерпеновых лактонов и DNR определена по МТТ-тесту [9]. Клетки посеяны в концентрации 10⁴ клеток/200 мкл в 96-луночный планшет и культивировались при 37 °С во влажной атмосфере с 5 % CO₂. После 24 ч инкубации к культурам клеток добавляли тестируемые соединения в различных концентрациях (от 100 до 1,56 мкМ) и далее клетки культивировали в тех же условиях 72 ч. Каждая концентрация веществ выполнена в 3 повторностях. Все вещества растворяли в диметилсульфоксиде (DMCO) (Panreac Química S. L. U.), конечная концентрация DMCO в лунке не превышала 0,1 % и не была токсична для клеток. Контрольными лунками выступали лунки, в которые добавляли растворитель в конечной концентрации 0,1 %. После инкубации в каждую лунку добавляли 20 мкл МТТ (бромид 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия, 5 мг/мл, Sigma-Aldrich) и планшеты инкубировали еще 2 ч. Далее из планшетов удаляли среду и в каждую лунку добавляли 100 мкл DMCO для растворения образовавшихся кристаллов формазана. С помощью планшетного анализатора (Victor3, PerkinElmer) определяли оптическую плотность при 530 нм за вычетом измеренного фонового поглощения при 620 нм. Значение концентрации, вызывающее 50 % ингибирование роста популяции клеток (IC₅₀), определено на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения OriginPro 9.0.

Результаты исследования представлены в таблице.

Согласно полученным данным, по отношению к линии клеток A549 ни один конъюгат не достиг антипролиферативного эффекта DNR, хотя конъюгат с алантолактоном **II-DNR** обладает близкой к DNR цитотоксичностью. Линия клеток HCT116 оказалась более чувствительной к действию тестируемых соединений. Конъюгат с **II-DNR** проявил в 5 раз большую цитотоксичность, чем DNR. На линии клеток RD все конъюгаты оказались активнее DNR в 2 – 3 раза. В отношении линии MCF7 более цитотоксичным оказался конъюгат **III-DNR**, в 2,5 раза сильнее ингибируя пролиферацию клеток, чем DNR.

Сами лактоны обладают выраженным антипролиферативным действием, например, в отношении ли-

нии RD лактон **II** всего в 2 раза менее токсичен, чем DNR.

С целью оценить бóльшую селективность полученных соединений к опухолевым линиям клеток исследована цитотоксичность конъюгатов по отношению к нормальным линиям клеток почечного эпителия 2 видов млекопитающих — собаки и человека. Установлено, что по отношению к почечному эпителию собаки MDCK-M все конъюгаты менее токсичны, чем DNR. Клетки нормального почечного эпителия человека HEK293 оказались менее чувствительны к действию цитотоксических агентов, однако конъюгаты с **I** и **III** проявили себя более токсичными, чем DNR. Цитотоксичность конъюгата II-DNR аналогична цитотоксичности DNR.

В целом из синтезированных соединений наибольший интерес представляет конъюгат **II-DNR**, так как он проявляет на ряде культур более выраженные антипролиферативные свойства, чем DNR, без увеличения токсичности по отношению к нормальным клеткам.

Полученные данные позволяют говорить о перспективности исследования новых конъюгатов сесквитер-

пеновых лактонов с антрациклиновыми антибиотиками с целью поиска более активных и безопасных соединений.

Работа выполнена при поддержке Гранта РФФИ № 15-04-0394015.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. С. Северин, А. В. Родина, *Успехи биол. химии*, **46**, 43 – 64 (2006).
2. F. Guano, P. Pourquier, S. Tinelli, et al., *Mol. Pharmacol.*, **56**, 77 – 84 (1999).
3. G. N. Hortobgyi, *Drugs*, **54**, Suppl. 4, 1 – 7 (1997).
4. М. Е. Неганова, С. В. Афанасьева, С. Г. Клочков, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.*, **152**(6), 720 – 722 (2012).
5. A. Rasul, J. Di, F. M. Millimouno, et al., *Molecules*, **18**, 9382 – 9396 (2013).
6. С. Г. Клочков, С. В. Афанасьева, Ю. Н. Булычев и др., *Известия Академии наук. Сер. химическая*, № 2, 407 – 412 (2012).
7. S. G. Klochkov, S. V. Afanas'eva, A. N. Pushin, *Chem. Natural Compounds*, **42**(4), 400 – 406 (2006).
8. P. Bhandary, R. P. Rastogi, *Indian J. Chem., Sec. B*, **22**, 286 (1983).
9. T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, **65**(1 – 2), 55 – 63 (1983).

Поступила 21.12.15

SYNTHESIS AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF DAUNORUBICIN CONJUGATE WITH SESQUITERPENE LACTONES

L. V. Anikina, A. V. Semakov, S. V. Afanas'eva, S. A. Pukhov, and S. G. Klochkov*

Institute of Physiologically Active Compounds, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow oblast, 142432 Russia;

* e-mail: klochkov@ipac.ac.ru

Modification of anthracycline antibiotic daunorubicin with sesquiterpene lactones of *Inula helenium* L. including alantolactone, isoalantolactone and alloalantolactone was carried out. Antiproliferative properties of the obtained conjugates with respect to tumor and normal cell lines were assessed. It was found that the conjugate of daunorubicin with alantolactone against several tumor cell lines exhibited greater antiproliferative activity in comparison to daunorubicin, without increasing toxicity to normal cells.

Keywords: daunorubicin; sesquiterpene lactones; cytotoxicity *in vitro*; MTT-test.