

А. О. Поздеев¹, Е. Н. Расакина¹, А. А. Бурим¹, В. В. Князев², М. П. Коротеев¹,
А. И. Матюшин², А. М. Коротеев¹, А. В. Семейкин², Н. Л. Шимановский²

СИНТЕЗ И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ АЦИЛПРОИЗВОДНЫХ КАТЕХИНА

¹ Институт биологии и химии МПГУ, Россия, 119021, Москва, Несвижский пер., 3;
e-mail: chemdept@mail.ru

² РНИМУ им. Пирогова, Россия, 119435, Москва, Большая Пироговская ул., 9А, с. 1;
e-mail: knyzyk@mail.ru

Впервые синтезированы перацильные производные природного флавоноида (\pm)-катехина. Показано, что ацильные остатки карбоновых кислот усиливают в различной степени цитотоксическую активность перацилпроизводных катехина в отношении клеток линии HeLa. Строение полученных соединений подтверждено спектроскопией ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C и элементным анализом. Проведен сопоставительный анализ соединений катехина с ранее изученными аналогичными производными на основе дигидрокверцетина.

Ключевые слова: цитотоксическая активность; ацилирование; катехин; ЯМР ^1H , ^{13}C .

Ранее установлено, что при тотальном ацилировании флавоноидов, в частности дигидрокверцетина, существенно расширяется диапазон их биологического действия, в том числе появляется антипролиферативная активность в отношении опухолевых клеток [1, 2]. Флавоноиды дигидрокверцетин (ДГК) и катехин (I) являются ближайшими структурными аналогами и отличаются наличием кетогруппы у атома 4 углерода ДГК. В связи с этим можно предположить, что ацилированные производные катехина могут проявлять цитотоксическую активность. Нами были впервые синтезированы ацилпроизводные (\pm)-катехина, содержащие остатки ароматических гетероциклических карбоновых кислот, и изучено их влияние на жизнеспособность опухолевых клеток линии HeLa.

В качестве ацилирующих веществ использованы хлорангидриды хлорникотиновой (II), фурановой (III), тиофеновой (IV) и никотиновой (V) кислот. Синтез перацилпроизводных катехина (получен из чайных листьев с чистотой 99 %) представлен на схеме 1.

Полное ацилирование флавоноида осуществляли в аналогичных условиях, разработанных для этерификации ближайшего аналога I — ДГК [1]. В этом случае целевые продукты (сложные эфиры) получены с более высокими выходами. Это связано, по-видимому, с отсутствием кетогруппы в I, которая образует прочные водородные связи с соседними гидроксилами в ДГК. Ацетилсалициловый эфир I — [3,5-бис-[(2-ацетоксибензоил)окси]-2-[3,4-бис[(2-ацетоксибензоил)окси]фенил]-хроман-7-ил]-2-ацетоксибензоат (VI) — синтезирован по известной методике [3].

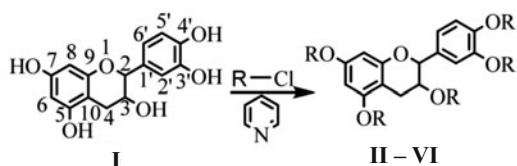
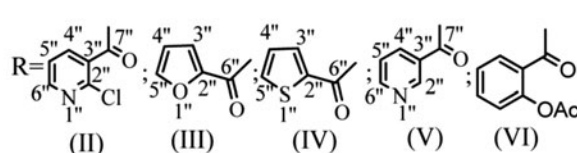


Схема 1. Синтез перацилпроизводных катехина

Экспериментальная химическая часть

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали на приборе “JEOL”JNM-ECX 400 МГц для ^1H и 100,5 МГц для ^{13}C , внешний стандарт ТМС, в качестве растворителей для ЯМР-спектроскопии использовали полностью дейтерированные хлороформ (CDCl_3) и диметилсульфоксид (d-DMCO). Элементный анализ проводили на СНН-анализаторе “Eager 300”. Данные элементного анализа соответствуют вычисленным значениям. Для ТСХ применялись пластины Silufor UV-254. Проявление хроматограмм проводили в йодной камере или прокаливанием. Адсорбционное хроматографирование проведено на силикагеле L 40/60 мкм (“Merck”). Все эксперименты проведены в обезвоженных растворителях, очищенных по стандартным методикам [4].

Общая методика синтеза II, III, IV, V. К раствору 0,3712 г (1,28 ммоль) I в 15 мл диоксана при интенсивном перемешивании прибавляют 7,04 ммоль хлорангидрида карбоновой кислоты и 1 мл пиридина. Реакционную смесь перемешивают в течение 4 ч без нагревания и оставляют на 2 сут. За ходом реакции наблюдают при помощи метода ТСХ (в системе бензол — диоксан, 3:1). Окончание реакции определяют исчезновением исходного реагента и образованием нового соединения. Смесь отфильтровывают на фильтре Шота от гидрохлорида пиридина, фильтрат концентрируют в вакууме водоструйного насоса (60 °С, 15 мм рт. ст.). Маслянистое вещество промывают холодной водой (10 °С), закристаллизовавшийся продукт отфильтровывают на стеклянном фильтре и сушат в вакууме (1 мм рт. ст.) до постоянной массы.



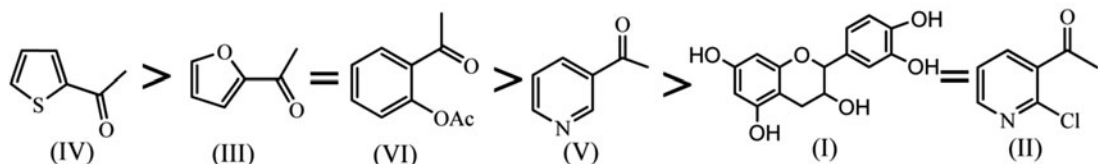


Схема 2. Степень влияния нативного катехина и его производных на жизнеспособность культивируемых клеток (опухолевые клетки, линия HeLa).

[2-[3,4-бис[(2-хлорпиридин-3-карбонил)окси]фенил]-3,5-бис[(2-хлорпиридин-3-карбонил)окси]хроман-7-ил]-2-хлорпиридин-3-карбоксилат (II). Тёмно-кремовый порошок, выход 0,9103 г (84,9 %); т. пл. 119 °С; R_f 0,47; ЯМР-спектр ^1H (CDCl_3), δ , м.д.: (J, Гц): 5,6 – 5,66 (м, 2H, 4-H, ^3J 2,35 Гц, ^4J 1,04 Гц), 6,94 (д 1H, 8-H, ^4J 0,92 Гц), 6,96 (д, 1H, 6-H, ^4J 0,92 Гц), 7,3 – 7,36 (м, 1H, 2-H, ^3J 1,28 Гц, ^4J 1,04 Гц, ^4J 0,61 Гц), 7,39 – 7,44м (1H, 3-H, ^3J 2,35 Гц, ^3J 1,28 Гц), 7,45 – 7,51м (5H, 5''-H, ^3J 3,21 Гц, ^3J 3,44 Гц), 7,95д (1H, 3'-H, ^3J 0,72 Гц), 7,98 (д, 1H, 6'-H, ^4J 0,68 Гц), 8,29 – 8,38 (м, 5H, 4''-H, ^3J 3,21 Гц, ^4J 2,07 Гц), 8,47 – 8,5 (м, 1H, 2'-H, ^3J 0,72 Гц, ^4J 0,68 Гц, ^4J 0,51 Гц), 8,51 – 8,6 (м, 5H, 6''-H, ^3J 3,44 Гц, ^4J 2,07 Гц); ЯМР-спектр (CDCl_3) ^{13}C , δ , м.д.: 24,2 (4-C), 67,2 (3-C), 70,1 (2-C), 108,2 (8-C), 109 (6-C), 110,8 (10-C), 122,5 (3''-C, 4''-C), 125,4 (3'-C, 6'-C), 126,3 (2'-C), 136,8 (1'-C), 120,8 (5''-C), 142,1 (4'-C), 149,8 (5'-C), 150,7 (2''-C), 150,8 (5-C), 152,4 (7-C), 153,1 (6''-C), 154,7 (9-C), 163,7 (7''-C). $\text{C}_{45}\text{H}_{24}\text{Cl}_5\text{N}_5\text{O}_{11}$.

[2-[3,4-бис(фуран-2-карбонилокси)фенил]-3,5-бис(фуран-2-карбонилокси)хроман-7-ил] фуран-2-карбоксилат (III). Тёмно-бежевый порошок; выход 0,7703 г (80,2 %); т. пл. 108 °С; R_f 0,82. ЯМР-спектр ^1H (d -ДМСО), δ , м.д.: (J, Гц): 2,85 – 3,0 (м, 2H, 4-H, ^3J 2,2 Гц, ^4J 0,71 Гц), 5,50 – 5,59 (м, 2H, 2-H, ^3J 1,98 Гц, ^4J 0,71 Гц, ^4J 0,52 Гц, ^3H , ^3J 1,98 Гц, ^3J 2,2 Гц), 6,64 (д, 1H, 8-H, ^4J 1,36 Гц), 6,73 (д, 1H, 6-H, ^4J 1,36 Гц), 6,91 – 6,98 (м, 1H, 2'-H, ^3J 0,96 Гц, ^4J 0,52 Гц), 7,42 – 7,57 (м, 5H, 4''-H, ^3J 2,01 Гц, ^3J 1,92 Гц), 7,84 (д, 1H, 6'-H, ^4J 0,64 Гц), 7,88 (д, 1H, 3'-H, ^3J 0,96 Гц), 7,90 – 7,97 (м, 5H, 3''-H, ^3J 2,01 Гц, ^4J 0,98 Гц), 7,98 – 8,03 (м, 5H, 5''-H, ^3J 1,92 Гц, ^4J 0,98 Гц). ЯМР-спектр ^{13}C (d -ДМСО), δ , м.д.: 24,4 (4-C), 68,3 (3-C), 77,3 (2-C), 111,5 (10-C), 112,7 (6-C, 8-C), 113 (4'''-C), 113,3 (4''-C), 121,1 (2'-C), 127,5 (3'-C, 6'-C), 136,9 (1'-C), 141,8 (4'-C), 142,5 (5'-C), 143 (3''-C), 145,3 (7-C), 146 (5-C), 147,6 (2''-C), 147,6 (9-C), 149,6 (5''-C), 155,5 (9-C), 177,1 (6''-C). $\text{C}_{40}\text{H}_{24}\text{O}_{16}$.

[2-[3,4-бис(тиофен-2-карбонилокси)фенил]-3,5-бис(тиофен-2-карбонилокси)хроман-7-ил] тиофен-2-карбоксилат (IV). Масло, выход 0,4062 г (63,7 %); R_f 0,56; ЯМР-спектр ^1H (d -ДМСО), δ , м.д.: (J, Гц): 2,56 – 3,05 (м, 2H, 4-H, ^3J 2,39 Гц, ^4J 1,10 Гц), 4,83 – 4,98 (м, 1H, 2-H, ^3J 3,01 Гц, ^4J 1,10 Гц), 5,45 – 5,56 (с, 1H, 3-H, ^3J 3,01 Гц, ^3J 2,39 Гц) 6,86 (д, 1H, 8-H, ^4J 2,32 Гц), 6,92 (д, 1H, 6-H, ^4J 2,32 Гц), 7,12 – 7,19 (м, 5H, 4''-H, ^3J 4,27 Гц, ^3J 4,03 Гц), 7,24 – 7,32 (м, 1H, 2'-H, ^3J 3,98 Гц, ^4J 2,07 Гц, ^4J 1,19 Гц), 7,5 (д, 1H, 6'-H, ^4J 2,07 Гц), 7,69 (д, 1H, 3'-H, ^3J 3,2 Гц), 7,82 – 7,89 (м, 5H, 3''-H, ^3J 4,27 Гц, ^4J 2,63), 7,94 – 8,06 (м, 5H, 5''-H, ^3J 4,03 Гц, ^4J 2,63 Гц). ЯМР-спектр (d -ДМСО) ^{13}C , δ , м.д.: 25,0 (4-C), 69,1 (3-C), 77,5 (2-C), 110 (8-C), 111,5 (6-C), 125,9 (10-C),

129,3 (3'-C, 6'-C), 131,1 (2'-C), 133,8 (4''-C), 135,2 (5''-C), 136 (3''-C), 136,4 (2''-C), 136,9 (1'-C), 141,8 (4'-C), 142,2 (5'-C), 149,5 (7-C), 149,9 (5-C), 154 (9-C), 163,5 (6''-C). $\text{C}_{40}\text{H}_{24}\text{O}_{11}\text{S}_5$.

[2-[3,4-бис(пиридин-3-карбонилокси)фенил]-3,5-бис(пиридин-3-карбонилокси)хроман-7-ил] пиридин-3-карбоксилат (V). К раствору 0,34 г (1,1724 ммоль) I в 14 мл пиридина при интенсивном помешивании прибавляют 1,2338 г (6,9315 ммоль) никотиноилхлорида гидрохлорида. Реакционную смесь перемешивают в течение 6 ч, при нагревании в течение 1 ч до 60 °С, и оставляют на 3 сут. За ходом реакции наблюдают при помощи метода ТСХ (в системе бензол — диоксан, 1:1). Окончание реакции определяют исчезновением исходного реагента и образованием нового соединения с $R_f = 0,58$. Смесь отфильтровывают на фильтре Шота от гидрохлорида пиридина. Фильтрат концентрируют на водоструйном насосе (80 °С, 15 мм рт. ст.) Маслянистое вещество промывают холодной водой (10 °С), образовавшийся порошок отфильтровывают на стеклянном фильтре и сушат в вакууме (1 мм рт. ст.) до постоянной массы.

Порошок, выход 0,857 г (89,6 %), R_f 0,58, т. пл. 124 °С. ЯМР-спектр ^1H (d -ДМСО), δ , м.д.: (J, Гц): 2,98 – 3,18 (м, 2H, 4-H, ^3J 6,40 Гц, ^4J 2,56 Гц), 5,58 – 5,69 (м, 2H, 2-H, ^3J 5,34 Гц, ^4J 2,56 Гц, ^4J 3,01 Гц, ^4J 3,12 Гц, ^3H , ^3J 5,34 Гц, ^3J 6,40 Гц), 7,09 (д, 1H, 8-H, ^4J 2,32 Гц, 6-H, ^4J 2,32 Гц), 7,46 – 7,53 (м, 1H, 6'-H, ^4J 4,14 Гц, ^4J 3,12 Гц, 6J 0,3 Гц), 7,56 – 7,58 (м, 5H, 5''-H, ^3J 6,7 Гц, ^3J 7,11 Гц, 6J 2,96 Гц), 7,71 – 7,75 (м, 1H, 3'-H, ^3J 1,2 Гц, 6J 0,3 Гц), 8,21 – 8,3 (м, 5H, 4''-H, ^3J 6,7 Гц, ^4J 3,07 Гц, ^4J 3,51 Гц), 8,41 – 8,49 (м, 1H, 2'-H, ^3J 1,2 Гц, ^4J 4,14 Гц, ^4J 3,01 Гц), 8,73 – 8,8 (м, 5H, 6''-H, ^3J 6,7 Гц, ^4J 3,07 Гц, ^4J 3,79 Гц), 8,96 – 9,05 (м, 5H, 2''-H, ^4J 3,79 Гц, ^4J 3,51 Гц, 6J 2,96 Гц). ЯМР-спектр ^{13}C (d -ДМСО), δ , м.д.: 25,0 (4-C), 68,3 (3-C), 82,1 (2-C), 107,4 (8-C), 108,1 (6-C), 112,9 (10-C), 122,1 (3'-C, 6'-C), 123,8 (5''-C), 124,2 (2'-C), 125,4 (3''-C), 134,7 (1'-C), 138,2 (4''-C), 143,4 (4'-C), 145,8 (5'-C), 149,6 (7-C), 150,1 (5-C), 151 (2''-C), 152,6 (6''-C), 155,3 (9-C), 163,8 (7''-C). $\text{C}_{45}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_{11}$.

Экспериментальная фармакологическая часть

Влияние исследуемых соединений на жизнеспособность культивируемых клеток определяли микроколориметрическим методом при помощи МТТ-теста, который является стандартным для оценки антипролиферативной активности соединений в культуре клеток [5]. МТТ-тест основан на ферментном восстановлении окрашенной соли тетразолия (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид, МТТ, ПанЭко, Россия) в живых метаболически активных клетках с образованием голубых кристаллов формазана.

Концентрация катехина (I) и его производных, мкМ	Жизнеспособность, % по отношению к контролю					
	I	II	III	IV	V	VI
1	89,3 ± 3,1*	90,7 ± 3,5*	65,4 ± 3,7*#	60,2 ± 5,2*#	71,3 ± 2,4*#	68,1 ± 1,2*#
10	85,9 ± 2,7*	88,7 ± 4,2*	63,4 ± 2,8*#	57,4 ± 4,2*#	69,9 ± 3,6*#	64,7 ± 1,6*#
100	78,3 ± 2,3*	78,2 ± 2,4*	61,9 ± 3,1*#	52,2 ± 3,4*#	67,8 ± 1,7*#	61,3 ± 1,9*#

Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок среднего ($M \pm s.e.m.$).

* Различия с контролем статистически значимы ($p < 0,05$);

различия с I статистически значимы ($p < 0,05$).

Исследуемые соединения растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО), максимальная концентрация ДМСО в среде составила 0,1 % и достоверно не влияла на жизнеспособность клеток. Клетки инкубировали в течение 24 ч в среде ДМЕМ (ПанЭко, Россия) содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ПанЭко, Россия) и 40 мкг/мл антибиотика гентамицина (ПанЭко, Россия) при температуре 37 °C, 5 % CO₂, pH 7,2. Жизнеспособность клеток без исследуемых соединений (контроль) принимали за 100 %.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы GraphPad Prism 6. Результаты экспериментов представлены в таблице.

В ходе исследования жизнеспособности культивированных клеток линии HeLa методом МТТ-теста выявлено, что структура флавоноидной матрицы оказывает существенное влияние на антипролиферативную активность изучаемых соединений. Ацилированные производные III, IV, V, VI проявили более высокую антипролиферативную активность, чем исходный I (таблица). Наиболее выраженной активностью обладал тритиофен-2-карбоксилат IV. Ранее нами показано, что пента-О-тиофениловый и пента-О-фурановый эфиры ДГК также проявляют достаточно высокую ингибирующую активность по отношению к опухолевым клеткам линии HeLa при той же концентрации (100 мкМ). В цифровом выражении процент жизнеспособности для них составляет ($47,0 \pm 2$) и ($57,0 \pm 2$) % соответственно [1]. Таким образом, катехиновый эфир IV в концентрации 100 мкМ (таблица) по уровню антипролиферативной активности не отличается от сложноэфирных производных на основе ДГК с одинаковыми остатками гетероциклических кислот. В то же время при более низкой концентрации (1 мкМ) жизнеспособность клеток HeLa в присутст-

вии дигидрокверцетиновых эфиров тиофеновой и фурановой кислот составляет ($80,0 \pm 7$) и ($95,0 \pm 2$) % соответственно [1], что значительно меньше, чем у катехиновых производных III, IV, V, VI (таблица). Стоит отметить, что степень ингибирования жизнеспособности уменьшается у всех исследуемых веществ при понижении концентрации.

Порядок степени ингибирования жизнеспособности клеток линии HeLa ацильными производными катехинами (слева направо) представлен на схеме 2.

По итогам биологических испытаний можно сделать вывод о том, что ацильные остатки карбоновых кислот усиливают в различной степени антипролиферативную активность перацилпроизводных I в отношении клеток линии HeLa. Исходя из результатов исследования, целесообразно продолжить поиск новых производных I, содержащих ацильные остатки карбоновых кислот, с целью увеличения их антипролиферативного действия на опухолевые клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (государственное задание) и РФФИ (грант 12-03-00362-а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Э. Е. Нифантьев, А. М. Коротеев, А. О. Поздеев и др., *Хим.-фарм. журн.*, **49**(2), 8 – 11 (2015); *Pharm. Chem. J.*, **49**(2), 78 – 81 (2015).
2. М. П. Коротеев, А. О. Поздеев, А. М. Коротеев и др., *Буллер. сообщ.*, **39**(10), 94 – 120 (2014)
3. Э. Е. Нифантьев, С. Е. Мосюров, Т. С. Кухарева и др., *Доклады АН*, **468**(1), 44 – 47 (2016).
4. А. Гордон, Р. Форд, *Спутник химика*, Мир, Москва (1976), сс. 437 – 444.
5. А. Н. Миронов (ред.), *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Гриф и К, Москва (2012).

Поступила 30.06.16

SYNTHESIS OF NEW PERACYL DERIVATIVES OF CATECHIN AND THEIR ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY

A. O. Pozdeev^{1*}, E. N. Rasadkina¹, A. A. Burim¹, V. V. Knyazev², M. P. Koroteev¹, A. I. Matyushin², A. M. Koroteev¹, A. V. Semeikin², and N. L. Shimanovskii²

¹ Institute of Biology and Chemistry, Department of Organic Chemistry, Moscow State Pedagogical University, Moscow, 119021 Russia

² Medico-Biological Department, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 119435 Russia

* e-mail: Chemdept@mail.ru

Peracyl derivatives of natural flavonoid (+)-catechin have been synthesized for the first time. It is shown that the acyl residues of carboxylic acids increase to variable degrees the cytotoxic activity of catechin peracyl derivatives with respect to HeLa cell line. The structures of obtained compounds were confirmed by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy and elemental analysis. Comparative analysis of the properties of catechin derivatives and previously studied analogous derivatives of dihydroquercetin is performed.

Keywords: cytotoxic activity; acylation; catechin; ¹H NMR; ¹³C NMR.