

УДК 547.244; 547.963.4; 541.49; 542.422

БОРИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ПРОТОГЕМИНА IX И L-АМИНОКИСЛОТ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ

А.Н. Савченко, В.А. Ольшевская, В.Н. Калинин, А.А. Штиль*

(Институт элементорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва;
e-mail: olshevsk@ineos.ac.ru)

Впервые получены конъюгаты протогемина IX с анионным 1-карба-кклозо-додекаборатным полиэдром с L-аминокислотами, в которых аминокислоты L-ряда связаны порфириновым макроциклом амидной или сложноэфирной связью. Показана высокая противоопухолевая активность новых водорастворимых аминокислотных производных борированного протогемина IX на культурах опухолевых клеток человека.

Способность порфиринов селективно накапливаться и долгое время сохраняться в опухолевых клетках обусловила интерес к синтезу борированных производных природных и синтетических аналогов порфиринов для исследования их в борнейтронозахватной терапии рака (БНЗТ) [1]. БНЗТ является одним из перспективных методов лечения злокачественных опухолей человека. В основе метода лежит ядерная реакция взаимодействия стабильного изотопа ^{10}B с тепловыми нейтронами. Образующиеся в результате реакции частицы ядра гелия ^{10}B (n, α) и ядра отдачи ^7Li обладают высокой энергией и небольшим суммарным пробегом, сопоставимым с диаметром клетки (10 мкм), что приводит к избирательному радиационному эффекту на клеточном уровне [2].

Несмотря на высокую эффективность ряда синтезированных карборанилпорфиринов вопрос о снижении их токсичности оставался открытым, поскольку большинство из разработанных препаратов при введении их в организм способствовали проявлению нежелательных эффектов, вызывая образование тромбов в крови и понижение концентрации эритроцитов еще до того, как достигалась необходимая терапевтическая концентрация бора в опухоли [3].

Требования, предъявляемые к препаратам, следующие: растворимость в воде, низкая темновая токсичность для неопухолевых клеток, химическая стабильность *in vivo* и преимущественное накопление в опухоли (градиенты концентраций опухоль:мозг и опухоль:кровь должны составлять > 4:1). Мы предпо-

ложили, что всем трем условиям будет отвечать основная химическая модификация: конъюгаты природного протогемина IX с анионным 1-карба-кклозо-додекаборатом (монокарбораном) и природными аминокислотами, расположенными на периферии макроцикла. Введение аминокислоты должно оптимизировать селективность накопления соединения в быстро пролиферирующих клетках и увеличить его растворимость в воде. Ранее были получены борированные порфирины с нейтральными и анионными борными полиэдрами. Среди синтезированных соединений водорастворимый 1,3,5,8-тетраметил-2,4-дивинил-6(7)-[2-(кклозо-монокарборан-1''-ил) метилоксикарбонил-этил]-7(6)-(2'-карбоксиил) порфиринат железа (III) (**1**) оказался нетоксичным в диапазоне 100 мг/кг и активным фототоксическим агентом *in vivo* [4]. Исследования внутриклеточного распределения соединения **1** показало, что оно накапливается в цитоплазме и не связывается с двухцепочечной ДНК.

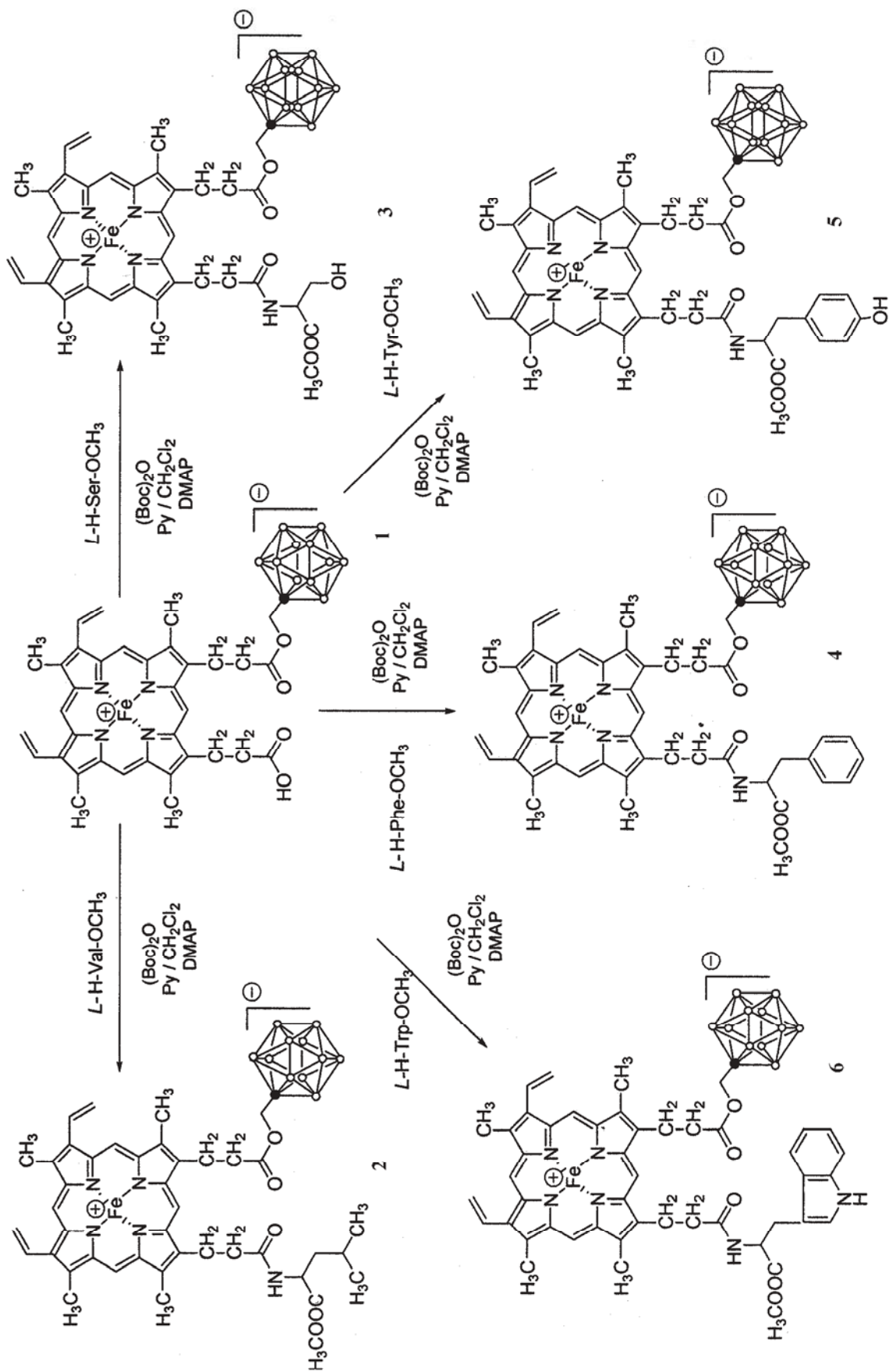
С целью оптимизации противоопухолевых характеристик соединения **1** были разработаны методы конъюгирования аминокислот L-ряда с карбоксильной группой борированного порфирина **1** – соединения, проявившего биологическую активность *in vivo*.

Были получены два типа аминокислотных производных на основе порфирина **1**. В первом типе аминокислоты L-ряда связаны со свободной карбоксильной группой монокарборанилпорфирина **1** амидной связью, во втором – сложноэфирной.

Производные первого типа получали с помощью реакции метиловых эфиров серина, валина, фенилаланина, тирозина и триптофана. Активацию карбоксиль-

* Российский онкологический научный центр им. М.М. Блохина РАМН, Москва).

Схема 1



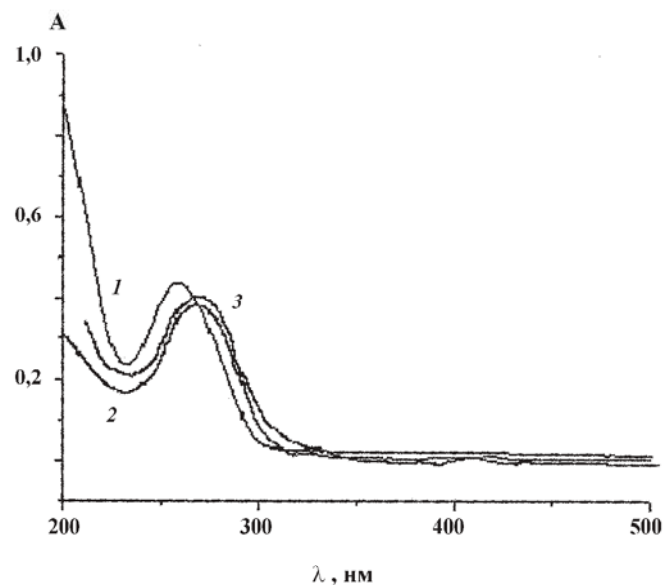
ной группы проводили с помощью Vos_2O (схема 1). Полученные соединения представляют собой кристаллы темно-красного цвета, растворимые в CH_2Cl_2 , CHCl_3 , MeOH и ТГФ.

Следующий тип веществ получали в результате реакции монокарборанилпорфирина с оксоазоборолединовыми производными L-серина (7) и L-треонина (8), имеющими свободную гидроксильную группу (схема 2). Активацию проводили способом, аналогичным представленному на схеме 1. Промежуточные соединения не выделяли, так как они легко гидролизуются водой, образуя конечные продукты. Эти порфирины интересны тем, что содержат в аминокислотном фрагменте свободные амино- и гидроксильную группы, что увеличивает гидрофильность этих соединений. Полученные соединения представляют собой кристаллы темно-красного цвета, растворимые в CH_2Cl_2 , CHCl_3 , MeOH , ТГФ. Их строение было подтверждено методами электронной, ИК- и масс-спектрометрии.

Далее был проведен ряд биологических исследований на противоопухолевую активность. С помощью спектрофотометрического метода было установлено наличие взаимодействия между ДНК и соединениями 2 и 3, тогда как исходный монокарборанилпорфирин 1 не связывался с ДНК. Об образовании молекулярного комплекса судили по изменениям характера спектра вещества (рисунок) после добавления к нему ДНК. Чтобы исключить вклад поглощения ДНК, при регистрации спектра реакционной смеси в качестве раствора сравнения использовали водный раствор ДНК такой же концентрации.

Затем провели сравнение активности полученных соединений по отношению к опухолевым клеткам линии K562 (лейкемия). Клетки инкубировали с 0–50 μM каждого агента в течение 72 ч с последующим восстановлением клетками 1-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-3,5-дифенилформазана (МТТ-тест). Результаты показали, что серинсодержащее производное 3 было наиболее токсичным ($\text{IC}_{50} \sim 5 \mu\text{M}$). Аналогичное валинсодержащее производное 2 было значительно менее активным ($\text{IC}_{50} \sim 35 \mu\text{M}$), а карборанилпорфирины с ароматическими аминокислотами (4–6) инертны. Такую же активность серинового карборанилпорфирина обнаружили по отношению к клеткам линии MCF-7 (карцинома молочной железы), SaOv (карцинома яичника) и HCT116 (аденокарцинома толстой кишки).

Сравнение цитотоксичности монокарбакарборанилпорфирина 1 и его серинового производного 3 показало,

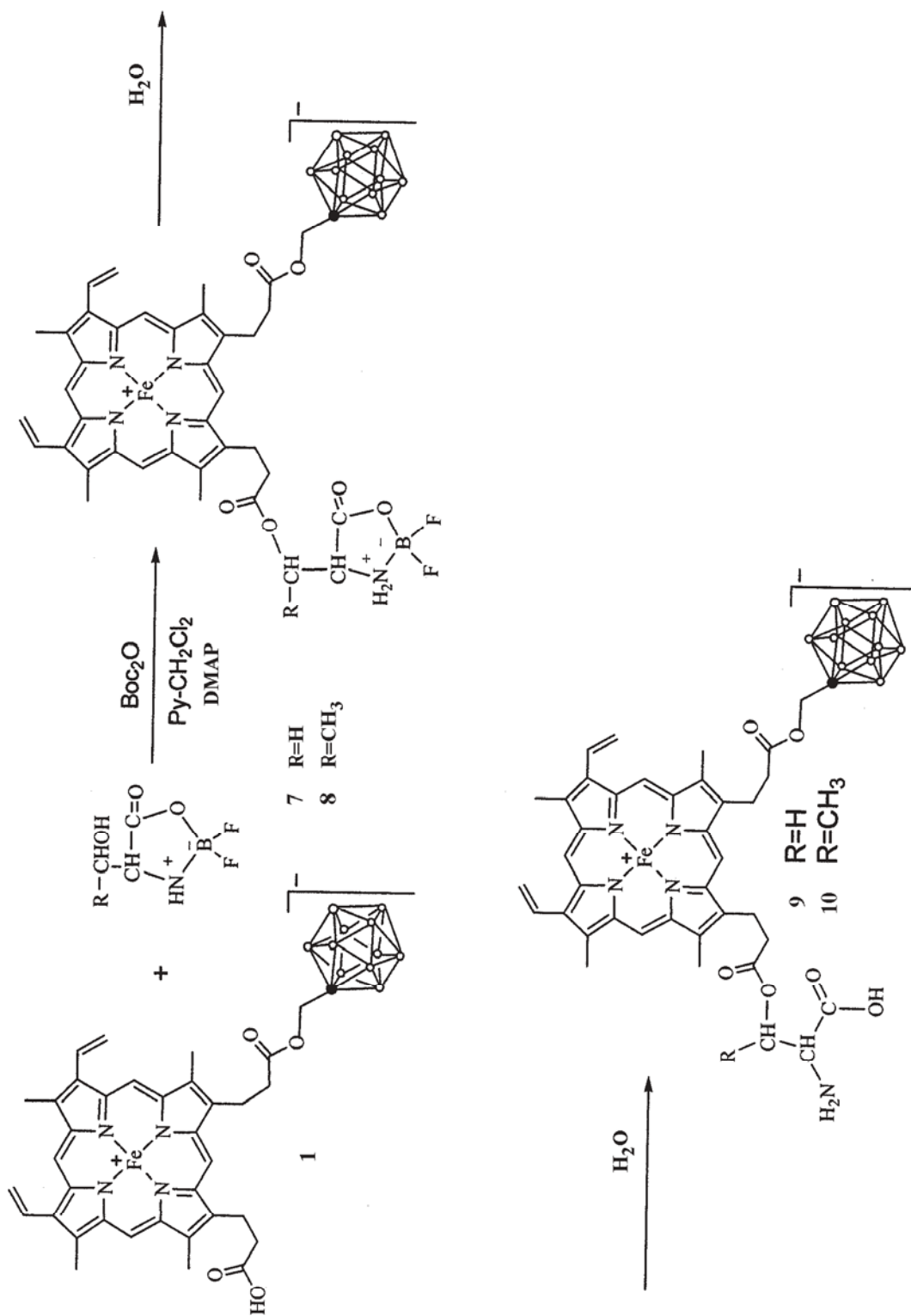


Спектры поглощения водных растворов: 1 – ДНК, 2 – ДНК, инкубированной с порфирином 2, 3 – ДНК, инкубированной с порфирином 3

до, что именно введение серина делает комплексы цитотоксичными.

На основе полученных данных мы исследовали способность серинсодержащего карборанилпорфирина преодолевать множественную лекарственную устойчивость различных опухолевых клеточных линий. Использовали две молекулярные детерминанты, а именно трансмембранный белок Р-гликопротеин и делецию проапоптотического белка р53. Эти данные показали, что новые аминокислотные производные борированного порфирина не транспортируются Р-гликопротеином. Кроме того, серинсодержащий карборанилпорфирин вызывал гибель клеток рака толстой кишки человека (HCT116) с интактным (диким типом) р53 в тех же концентрациях, что и в случае изогенных клеток с делецией обоих аллелей (HCT116p53). Соединение 3 было активно даже при низких микромолярных концентрациях. Чтобы выявить механизмы цитотоксичности серинового карборанилпорфирина, мы проверили, инициирует ли это соединение выработку свободных форм кислорода. В качестве хелатора свободных радикалов кислорода использовали N-ацетилцистеин (NAC). Однако присутствие NAC не влияло на токсичность серинсодержащего карборанилпорфирина. Мы сделали вывод, что радикалы кислорода не участвуют в клеточной гибели под действием серинсодержащего карборанилпорфирина. Эти данные позволяют предположить, что клетки, устойчивые к “кислородному взрыву”, ока-

Схема 2



жуются чувствительны к серинсодержащему карборанилпорфиру.

Фрагментация геномной ДНК является важным признаком апоптоза. Нас интересовало, связана ли клеточная смерть с фрагментацией ДНК при действии серинсодержащего карборанилпорфирина. Клетки K562, обработанные серинсодержащим карборанилпорфирином, лизировали в буфере, содержащем иодид пропидия для связывания этого флуорохрома с ДНК, и подвергли анализу на проточном цитометре. Количество разрушенной ДНК зависело от дозы и времени. Уже через 24 ч воздействия на клетки 10 мкМ серинового карборанилпорфирина было разрушено более чем 40% ДНК, а через 48 ч – более 60%. Эти результаты показали, что сериновый карборанилпорфирин может вызывать гибель клеток по механизму апоптоза, сопровождающемуся нарушением целостности ДНК.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что аминокислотные производные борированного протогемина, содержащие водорастворимый монокарбакарборан, обладают свойствами, необходимыми для создания как самостоятельных противоопухолевых препаратов, так и средств для БНЗТ.

Экспериментальная часть

Индивидуальность соединений контролировали с помощью ТСХ. Для ТСХ использовали пластинки *Silufol* (Чехия) в системе хлороформ:метанол (9:1). ИК-спектры получали в таблетках ГБХ (гексафторбутадие), регистрировали на ИК-спектрометре «*Specord M-82*» («*Carl Zeiss*»). Очистку веществ проводили колоночной хроматографией на силикагеле *Merk L* (0,040–0,08). В качестве элюента использовали смесь хлороформ:метанол (9:1).

Общая методика синтеза конъюгатов монокарборанилпорфирина 3, в которых аминокислоты L-ряда связаны с монокарборанилпорфирином амидной связью. К суспензии 0,195 ммоль гидрохлорида метилового эфира соответствующей L-аминокислоты в 2 мл CH_2Cl_2 прибавляли 0,015 мл Et_3N и перемешивали 1 ч при комнатной температуре. Растворители удаляли в вакууме. К остатку прибавляли безводный эфир, $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$ отделяли фильтрованием. Эфир отгоняли в вакууме.

К раствору 50 мг (0,065 ммоль) порфирина **1** в смеси 4 мл хлористого метилена и 4 мл пиридина, охлажденному до 0°C, прибавляли 60 мг (0,275 ммоль) ди-*трет*-бутилпирокарбоната и перемешивали при

этой температуре 15 мин. Затем прибавляли раствор L-аминокислоты метилового эфира в 2 мл хлористого метилена, еще через 5 мин добавляли 10 мг N,N'-диметиламинопиридина и перемешивали 2 ч при 20°C. Растворители удаляли в вакууме. Продукт очищали колоночной хроматографией.

1,3,5,8-Тетраметил-2,4-дивинил-6(7)-[2'-(клозо-монокарборан-1-ил) метилоксикарбонилэтил]-7(6)-[2-N^α(O^α-метил-L-валино)карбонилэтил] порфирилат железа (III) (2). В качестве аминокислотной компоненты использовали 33 мг гидрохлорида метилового эфира L-валина. Выход 34 мг (59%), $R_f = 0,69$. Электронный спектр (CH_2Cl_2), $\lambda_{\text{макс}}$, нм ($\epsilon \cdot 10^{-3}$): 385,8(38,30); 511,0(4,09); 542,2(3,77); 643,2(1,83). ИК-спектр (ν , см^{-1}): 3383 (NH), 2970 (CH), 2545 (BH), 1719 (CO сл. эфира), 1657(CONH), 1623 (C=C), 1554 (амид II). Масс-спектр, m/z: 884 [M^+].

1,3,5,8-Тетраметил-2,4-дивинил-6(7)-[2'-(клозо-монокарборан-1-ил) метилоксикарбонилэтил]-7(6)-[2-N^α(O^α-метил-L-серино)карбонилэтил] порфирилат железа (III) (3). В качестве аминокислотной компоненты использовали 30 мг гидрохлорида метилового эфира L-серина. Выход 26 мг (46%), $R_f = 0,67$. Электронный спектр (CHCl_3), $\lambda_{\text{макс}}$, нм ($\epsilon \cdot 10^{-3}$): 397,8(48,4); 511,0(5,29); 542,0(4,68); 644,0(2,01). ИК-спектр (ν , см^{-1}): 3338 (NH, OH), 2947 (CH), 2540 (BH), 1742 (CO сл. эфира), 1658 (CONH), 1623 (C=C), 1553 (амид II). Масс-спектр, m/z: 872 [M^+].

1,3,5,8-Тетраметил-2,4-дивинил-6(7)-[2'-(клозо-монокарборан-1-ил) метилоксикарбонилэтил]-7(6)-[2-N^α(O^α-метил-L-фенилаланино)карбонилэтил] порфирилат железа (III) (4). В качестве аминокислотной компоненты использовали 42 мг гидрохлорида метилового эфира L-фенилаланина. Выход 34 мг (59%), $R_f = 0,61$. Электронный спектр (CH_2Cl_2), $\lambda_{\text{макс}}$, нм ($\epsilon \cdot 10^{-3}$): 395,6(43,8); 511,1 (5,62); 542,3(4,25); 643,4 (2,64). ИК-спектр (ν , см^{-1}): 3389(NH), 2930(CH), 2540(BH), 1725 (CO сл. эфира), 1674(CONH), 1625 (C=C), 1550 (амид II). Масс-спектр, m/z: 932 [M^+].

1,3,5,8-Тетраметил-2,4-дивинил-6(7)-[2'-(клозо-монокарборан-1-ил) метилоксикарбонилэтил]-7(6)-[2-N^α(O^α-метил-L-тирозино)карбонилэтил] порфирилат железа (III) (5). В качестве аминокислотной компоненты использовали 30 мг гидрохлорида метилового эфира L-серина. Выход 37 мг (60%), $R_f = 0,70$. Электронный спектр (CHCl_3), $\lambda_{\text{макс}}$, нм ($\epsilon \cdot 10^{-3}$): 387,9(45,4); 510,0(5,27); 542,2(4,66); 643,6(2,21). ИК-спектр (ν , см^{-1}): 3368 (NH, OH), 2935 (CH), 2545

(ВН), 1732 (СО сл. эфира), 1668 (CONH), 1623 (C=C), 1552 (амид II). Масс-спектр, m/z : 948 $[M^+]$.

1,3,5,8-Тетраметил-2,4-дивинил-6(7)-[2'-(клозо-монокарборан-1-ил) метилоксикарбонилэтил]-7(6)-[2-N^α(O^α-метил-L-треонино)карбонилэтил] порфирилат железа (III) (6). В качестве аминокислотной компоненты использовали 42 мг гидрохлорида метилового эфира L-фенилаланина. Выход 41 мг (64,9%), $R_f = 0,55$. Электронный спектр (CH_2Cl_2), $\lambda_{\text{макс}}$, нм ($\epsilon \cdot 10^{-3}$): 393,3(44,1); 511,1 (5,62); 541,3(4,23); 642,7 (2,71). ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 3387(NH), 2915(CH), 2537(ВН), 1728 (СО сл. эфира), 1667(CONH), 16351 (C=C), 1552 (амид II). Масс-спектр, m/z : 971 $[M^+]$.

Общая методика синтеза конъюгатов монозамещенного карборанилпорфирина с аминокислотами (9, 10). Литиевую соль серина или натриевую соль треонина в количестве 0,45 ммоль суспендировали в 3 мл безводного ТГФ, к раствору добавляли 0,27 мл $BF_3 \cdot Et_2O$. Реакционную смесь перемешивали 6 ч при комнатной температуре и 2 ч при 40–45°C. Раствор упаривали в вакууме. К охлажденному до 0°C раствору 50 мг (0,065 ммоль) порфирина **3** в смеси 4 мл хлористого метилена и 4 мл пиридина прибавляли 60 мг (0,275 ммоль) ди-*трет*-бутилпирокрбоната, перемешивали при этой температуре 15 мин и прибавляли эту смесь к L-аминокислоте. Через 5 мин добавляли 10 мг N,N'-диметиламинопиридина и перемешивали 2 ч при 20°C. Затем к реакционной смеси прибавляли 5 мл воды и перемешивали 1 ч в случае серина и 10 ч в случае треонина. Водный слой отделяли. Растворители удаляли в вакууме. Продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии.

1,3,5,8-Тетраметил-2,4-дивинил-6(7)-[2'-(клозо-монокарборан-1-ил) метилоксикарбонилэтил]-7(6)-[2-O^α-L-серино]карбонилэтил] порфирилат железа (III) (9). В качестве аминокислотной компоненты использовали 66 мг литиевой соли L-серина. Выход 33 мг (59%), $R_f = 0,17$. Электронный спектр ($CHCl_3$), $\lambda_{\text{макс}}$, нм ($\epsilon \cdot 10^{-3}$): 363,2(43,79); 511,4(4,20); 542,0(2,95); 621,2(1,02). ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 3700 – 3100 (ОН), 3315 (NH), 2936(CH), 2540(ВН), 1725(СО сл. эфира), 1623 (C=C). Масс-спектр, m/z : 858 $[M^+]$.

1,3,5,8-Тетраметил-2,4-дивинил-6(7)-[2'-(клозо-монокарборан-1-ил) метилоксикарбонилэтил]-7(6)-[2-O^α-L-треонино]карбонилэтил] порфирилат железа (III) (10). В качестве аминокислотной компоненты использовали 63 мг натриевой соли L-треонина. Выход 30 мг (53%), $R_f = 0,69$. Электронный спектр (CH_2Cl_2), $\lambda_{\text{макс}}$, нм ($\epsilon \cdot 10^{-3}$): 406,4(53,32);

538,0(7,16); 641,2(2,32). ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 3700–3100 (ОН), 3321 (NH), 2925(CH), 2540 (ВН), 1730 (СО сл. эфира), 1623 (C=C). Масс-спектр, m/z : 872 $[M^+]$.

Определение цитотоксической активности производных протогемина IX для опухолевых клеток хронического миелолейкоза человека K562, растущих в условиях *in vitro*. Клетки культивировали в полной питательной среде, содержащей RPMI-1640+DMEM (1:1) ("ПАНАЭКО", Россия) и 5% FCS (Flow, Англия), с добавлением 2 mM глутамин.

Клетки, растущие в логарифмической фазе, снимали с подложки версеном-трипсином, тщательно пипетировали до образования одноклеточной суспензии, вносили 50 мкл суспензии в 450 мкл буфера (физиологического раствора), пипетировали и считали в камере Горяева (число клеток в 25 больших квадратах разделили на 5, умножили на 2500 и умножили на разведение, размерность – количество клеток/мл). В новую пробирку вносили клетки и среду так, что концентрация клеток составляла 15 000 клеток в мл. В лунки 96-луночного планшета вносили 190 мкл клеточной взвеси. Приготавливали серийные разведения: 250 мкМ (из исходного 1 mM брали 10 микролитра и вносили в 90 мкл среды). Из этого раствора брали 25 мкл и вносили в 75 мкл среды с получением 62,5 мкМ раствора. Из этого раствора брали 25 мкл и вносили в 75 мкл среды с получением 15,6 мкМ раствора. Затем из каждого разведения вносили по 5 и 10 мкл в лунки. В этих случаях объемами растворителя и изменением общего объема среды в лунке можно пренебречь. Инкубацию проводили 72 ч при 37°C.

Затем вносили в лунки 20 мкл водного раствора МТТ (5 мг/мл). Инкубировали 1 ч до развития интенсивной темно-фиолетовой окраски внутри клеток (формазан). Отбирали среду, не трогая клетки. К клеткам добавляли 100 мкл ДМСО, пипетировали до гомогенности и встряхивали на шейкере 2 мин. Оптическую плотность измеряли при 540 нм и построили кривые выживаемости. При этом за 100% принимали OD_{540} контрольных лунок, к которой отнесли OD лунок с той или иной концентрацией исследуемого препарата.

Спектрофотометрическое изучение взаимодействия карборанилпорфиринов 1,2,3 с ДНК. Спектры регистрировали на спектрофотометре М-40 ("Carl Zeiss"). В кварцевую кювету толщиной 1 см помещали 3 мл дистиллированной воды и 3 мкл

ДНК (конечная концентрация ДНК 10 мкг/мл). Готовили раствор лиофилизированной двухцепочечной ДНК из тканей теленка (10 мг/мл в дистиллированной воде), и растворы исследуемых веществ (10 мМ в ДМСО).

В кювету вносили 3 мл дистиллированной воды и 3 мкл раствора ДНК, конечная концентрация которого составляла 10 мкг/мл). Поглощение измеряли на спектрофотометре при длине волны 200–900 нм. Затем в новую кювету вносили 3 мкл исследуемого порфирина **1** (конечная концентрация 10 мкМ) и из-

меряли поглощение на спектрофлуориметре. В кювету с раствором ДНК добавляли 3 мкл раствора исследуемого порфирина **1** и измеряли поглощение относительно водного раствора ДНК такой же концентрации. О связывании с ДНК судили по изменению спектра в области 260 нм (максимум поглощения, характерный для ДНК) после вычитания. Аналогичные измерения проводили и с порфиринами **2** и **3**.

Контроль связывания ДНК проводили с помощью классического интеркалятора – противоопухолевого антибиотика доксорубина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Soloway A.H., Tjarks W., Barnum B.A. et al. // Chem. Rev. 1998. **98**, P. 1515.
2. Davis M.A., Little J.B. // Radiation Res. 1970. **43**, P. 534.
3. Miura M., Joel D.D., Nawrocky M.M., Micca P.L., Fisher C.D., Heinrichs J.C., Rising C.E., Walker W., Slatkin D.N. // Advances in Neutron Capture Therapy. Amsterdam, 1997. Vol. 2. P. 56.
4. Ольшевская В.А., Никитина Р.Г., Зайцев А.В., Гюльма-лиева М. А., Лузгина В.Н., Кононова Е.Г., Морозова Т.Г., Дрожжина В.В., Каплан М.А., Калинин В.Н., Штиль А.А. // Докл. РАН. 2004. **399**, С. 783.

Поступила в редакцию 09.04.07

BORONATED DERIVATIVES OF PROTOHEMIN IX AND L-AMINO ACIDS AS POTENTIAL ANTICANCER AGENTS

A.N. Savchenko V.A. Ol'shevskaya, V.N. Kalinin, A.A. Shtil*

(N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds Russian Academy of Sciences,
*N. N. Blokhin Cancer Center)

We synthesized a series of novel water soluble conjugates of protohemin IX with anionic 1-carba-closo-dodecaborate and L-amino acids. In these compounds the amino acid residues are bound to the porphyrin macrocycle via the amide or ester bonds. The antitumor activity of novel compounds demonstrated their high potency in killing a variety of human tumor cell lines, including those that expressed molecular determinants of altered anticancer drug response.