

УДК 615.32.547.918

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ВЕРОЯТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ АЛКАЛОИДОВ ТРИПТАНТРИНА И МОСТОТРИНА

© 2023 г. А. М. Попов^{1,*}, Л. Г. Деженкова², Т. В. Московкина³, Н. Э. Грамматикова²,
А. С. Кузьмич¹, О. В. Черников¹, А. Е. Щекотихин², академик РАН В. А. Стоник¹

Поступило 10.10.2022 г.

После доработки 25.10.2022 г.

Принято к публикации 25.10.2022 г.

Алкалоид триптантрин и его водорастворимое производное мостотрин проявляют высокую противомикробную и противоопухолевую активность. Для разработки более активных и менее токсичных препаратов были выполнены синтезы и произведено тестирование биологических активностей ряда новых и/или малоизученных их аналогов. Показано, что некоторые из них обладают более высокой цитотоксичностью в отношении опухолевых и микробных клеток, чем триптантрин и мостотрин. Так, 8-фтортриптантрин эффективно ингибирует пролиферацию различных линий опухолевых клеток, а именно: К-562/4, НСТ-116 и НСТ-116p53ko в более низких концентрациях, чем триптантрин, а 2,8-диформостотрин проявляет более сильное противомикробное действие против патогенной бактерии *S. aureus* ATCC 29213, чем мостотрин. Установлено, что антипролиферативные свойства 8-фтортриптантрина и 8-формостотрина связаны с их способностью в наномолярных концентрациях ингибировать клеточный цикл опухолевых клеток на стадии перехода с фазы G₁ в S фазу. Полученные данные свидетельствуют о перспективности проведения дальнейших углубленных исследований их противоопухолевых свойств.

Ключевые слова: производные хиназолиновых алкалоидов, синтез, антипролиферативная активность, противомикробное действие, блокирование клеточного цикла

DOI: 10.31857/S2686738922600807, **EDN:** MTHALD

Алкалоид триптантрин (**1a**) был найден в некоторых высших растениях и микроорганизмах [1] и синтезирован несколькими способами [1–3]. Он обладает противовоспалительными, противотуберкулезными, противопаразитарными, противомикробными свойствами [2] и ингибирует репликацию коронавируса [4]. Изучено также противоопухолевое действие этого вещества, а молекулярный механизм такой активности предположительно связан со способностью блокировать прогрессию и дифференциацию опухолевых клеток [5]. В составе экстрактов медицинских

растений **1a** применяется в медицине, например для лечения псориаза [6]. В то же время плохая биодоступность (он плохо растворим в воде и биологических жидкостях), относительно высокая токсичность и иммуносупрессорные свойства тормозят клиническое применение триптантрина. Поэтому проводится поиск его новых природных и синтетических производных и аналогов с улучшенными биологическими свойствами [1, 2].

Для решения этой задачи недавно был синтезирован его водорастворимый аналог, названный мостотрином (**2a**). Было показано, что (**2a**) является менее токсичным соединением, обладает выраженными противоопухолевыми свойствами в опытах *in vivo* в отношении мышинной модели асцитной карциномы Эрлиха, обеспечивая 50% выживание экспериментальных животных при монотерапии, а при сочетанном применении с известным противоопухолевым антибиотиком доксорубицином, эффективность лечебного курса достигает 100% [7].

Мы синтезировали несколько новых или малоизученных производных триптантрина и мостотрина (**1b**, **1в**, **2b**, **2в**), а также аналог мостотрина на

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

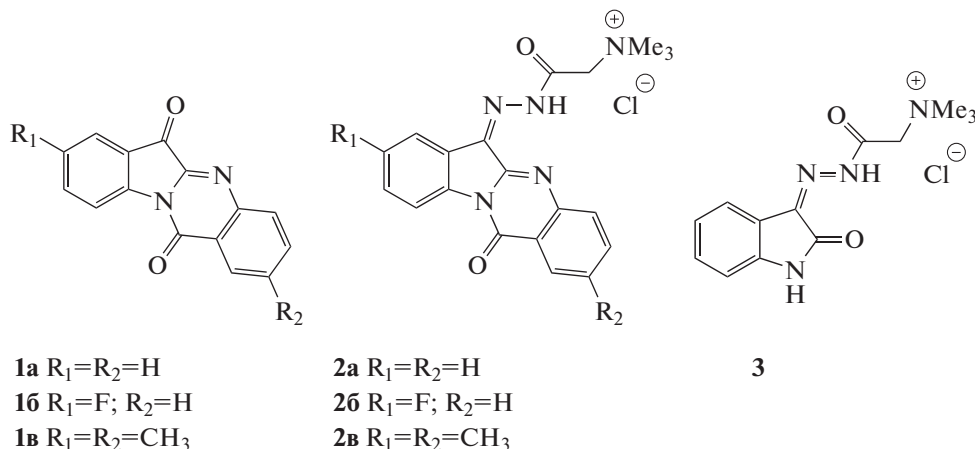
² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, Россия

³ Дальневосточный Федеральный университет, Школа наукоемких технологий и передовых материалов, Русский остров, бухта Аякс, 10, Владивосток, Россия

*e-mail: popovam@piboc.dvo.ru

основе изатина (**3**) и изучили эффективность их ингибирующего действия с использованием раз-

личных культур опухолевых клеток и патогенных микроорганизмов *in vitro*.



Ранее известные замещенные триптантрины (**1b** и **1в**) были получены реакцией 5-фторизатина с изатовым ангидридом при катализе триметиламином [8] и соответственно окислением 5-метилизатина $KMnO_4$, как описано в работе [3], а идентифицированы сравнением их температур плавления и ЯМР спектров с литературными данными. Новые производные мостотрина **2b**, выход 55%, т.пл. $>250^\circ C$ (с разл.) и **2в**, выход 62%, т.пл. $>255^\circ C$ (с разл.) синтезированы по модифицированной методике, ранее использованной нами для получения мостотрина [7]. Строение **2b** и **2в** было подтверждено ИК, масс-спектрами и 1H ЯМР спектрами. Так, в ИК спектре **2b** (Vertex 70, KBr) имелись полосы поглощения, подтверждающие присутствие CO (1690 см^{-1}), NH ($\sim 3480\text{ см}^{-1}$) и C=N групп ($\sim 1610\text{ см}^{-1}$). В масс-спектре **2b**, полученном ВЭЖХ-МС с регистрацией катионов на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 6510, колонка Eclipse XDB-C18, система AcCN– H_2O (7:3), имелся пик M–Cl $^-$ иона с m/z 380.1533 (ВУ 14.7 мин), рассчитано для $C_{20}H_{19}FN_5O_2$ 380.1500. В его DEPT ЯМР спектре (D_2O) присутствовали сигналы 7 ароматических CH, из них три – в виде дублетов из-за ^{13}C – ^{19}F спин-спинового взаимодействия [9], и синглет 9 метильных групп в $N(CH_3)_3$ фрагменте при 54.2 м.д. В ИК спектре **2в** имелись полосы поглощения, подтверждающие присутствие CO (1688 см^{-1}), NH (3484 см^{-1}) и C=N групп (1605 см^{-1}). В масс-спектре **2в** имелся пик катиона с m/z 390.1941, рассчитано для $C_{22}H_{24}N_5O_2$ 390.1925. В его DEPT ЯМР спектре (D_2O) присутствовали сигналы 6 ароматических CH при 115.6, 120.9, 125.26, 127, 54, 132.85, 136.4 м.д., двух метильных групп в триптантриновом ядре при 19.85 и 20.28, трех метильных групп в $N(CH_3)_3$ фрагменте при 54.09 м.д. Со-

единение **3**, выход 50%, т. пл. $248\text{--}249^\circ C$ (из этанола) было получено при кипячении спиртового раствора эквимольных количеств изатина и реактива Жирара Т в присутствии ТФУ в течение 3 ч. В его ИК спектре (KBr) имелись полосы поглощения при 1690 см^{-1} (лактамы и амидные карбонилы), 1620 см^{-1} (C=N), 3426 см^{-1} (NH), а полоса, характерная для карбонила в пятичленном цикле исходного изатина (1740 см^{-1}), отсутствовала. (+)ЭРИ МС высокого разрешения (Agilent 1200, колонка Eclipse, система AcCN: H_2O :ТФУ, 4:1: O.1%, ВУ 9.2 мин) показал катион: 261.1357 (M–Cl $^-$) $^+$, вычислено для $C_{13}H_{17}N_4O_2$ 261.1346. В DEPT спектре **2b** имелись сигналы 4 CH групп в изатиновом ядре при 112.31, 121.82, 123.33, 133.45, а также $N(CH_3)_3$ и CH_2 групп в боковой цепи при 54.40 и 62.2 м.д.

Изучение антипролиферативной активности полученных веществ и веществ сравнения (**1a**, **2a**) было выполнено на опухолевых клетках человека различного гистогенеза с использованием МТТ-теста [7, 10]. Скрининговая панель включала следующие линии опухолевых клеток человека: карциномы молочной железы MCF-7, карциномы легкого A-549, миелоидного лимфолейкоза K-562 и его сублинии K-562/4 (с множественной лекарственной устойчивостью, вызванной экспрессией гликопротеина P), аденокарциномы толстой кишки HCT-116 и ее резистентного штамма HCT116p53ko (с делецией гена опухолевого супрессора p53–/–), а также линию неопухолевых, клеток фибробластов человека (ПФЧ) для сравнения жизнеспособности нормальных и опухолевых клеток в стандартных условиях тестирования исследуемых соединений. Все линии клеток дикого типа были приобретены в American Type Culture Collection (ATCC, США). Линии клеток ПФЧ, HCT116p53ko и K-562/4 – любезно предо-

Таблица 1. Антипролиферативная активность производных триптантрина и мостотрина

Соединения	ИК ₅₀ *, мкМ						
	MCF-7	A-549	K-562	K-562/4	HCT-116	HCT-116 p53ko	ПФЧ
Триптантрин (1a)	>50.0	нт**	0.21 ± 0.02	6.0 ± 0.8	>50.0	>50.0	0.30 ± 0.04
8-Фтортриптантрин (1б)	3.5 ± 0.4	6.8 ± 0.4	2.5 ± 0.3	2.2 ± 0.3	2.9 ± 0.3	2.3 ± 0.4	5.1 ± 0.6
2,8-Диметилтриптантрин (1в)	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0
Мостотрин (2a)	11.1 ± 2.1	нт**	1.0 ± 0.10	нт**	5.0 ± 0.7	нт**	нт**
8-Фтормостотрин (2б)	10.8 ± 1.3	16.3 ± 1.9	7.1 ± 0.8	6.8 ± 0.4	6.7 ± 0.2	8.0 ± 1.2	9.0 ± 1.0
2,8-Диметилмостотрин (2в)	15.4 ± 2.1	21.3 ± 2.7	18.5 ± 2.0	> 50.0	25.5 ± 3.3	25.2 ± 2.5	41.2 ± 5.6
Производное 3	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0
Доксорубицин	0.41 ± 0.03	0.52 ± 0.06	0.33 ± 0.03	6.1 ± 0.5	0.40 ± 0.06	1.1 ± 0.1	0.28 ± 0.04

* ИК₅₀, мкМ — концентрация исследуемого вещества, ингибирующая рост клеток на 50%. Результаты представлены как среднее трех независимых экспериментов ± стандартное отклонение ($p < 0.05$).

** нт — соединение не тестировалось.

Таблица 2. Сравнительная противомикробная активность аналогов мостотрина и триптантрина

Соединения	Штаммы микроорганизмов, МПК, мкг/мл				
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. cereus</i> ATCC 10702	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
Триптантрин (1a)	32	8	8	>32	—
8-Фтортриптантрин (1б)	>32	>32	>32	>32	>32
2,8-Диметилтриптантрин (1в)	>32	>32	>32	>32	>32
Мостотрин (2a)	64	128	8	>32	—
8-Фтормостотрин (2б)	16	>32	16	>32	32
2,8-Диметилмостотрин (2в)	8	>32	4	>32	>32
Производное 3	>32	>32	>32	>32	>32

ставлены проф. Штилем А.А. (ФГБУ “НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина”, Москва). В качестве положительного контроля использован противоопухолевый антибиотик доксорубицин (Sigma, USA). Полученные данные представлены в табл. 1.

В проведенных экспериментах наиболее активным по сравнению с триптантрином (**1a**) на всех линиях опухолевых клеток, кроме линии K-562, оказался 8-фтортриптантрин (**1б**). При этом он продемонстрировал на порядок меньшую токсичность для клеток неопухолевой линии ПФЧ. Для мостотрина (**2a**) и 8-фтормостотрина (**2б**) значения ИК₅₀ для большей части использованных в эксперименте линий клеток практически совпадали, однако в отношении клеток линии K-562 мостотрин оказался более активным.

Неактивными для всех линий клеток, на которых проводился эксперимент, оказались диметилированное производное триптантрина (**1в**) и изатинное производное (**3**) (табл. 1). В то же время у диметилированного производного мостотрина (**2в**), аналогичного **1в**, наблюдалось неболь-

шое увеличение антипролиферативной активности практически в отношении всех линий клеток.

Хотя полученные нами соединения (**1б** и **2б**) оказались менее цитотоксичными по сравнению с известным противоопухолевым препаратом доксорубицином для всех протестированных нами опухолевых линий клеток, в то же время для линии незлокачественных фибробластов (ПЧФ) их токсичность оказалась намного ниже.

Противомикробную активность соединений оценивали стандартным методом серийных разведений в 96 луночных планшетах по минимальной подавляющей концентрации (МПК). В работе использовали штаммы микроорганизмов из коллекции ФГБНУ Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 10702, *Candida albicans* ATCC 10231. Бактериальные культуры анализировали в бульоне Mueller-Hinton Broth (“Beckton, Dickinson”, Франция), *Candida albicans* в среде RPMI (SIGMA Lot SLBZ6264, USA). Чув-

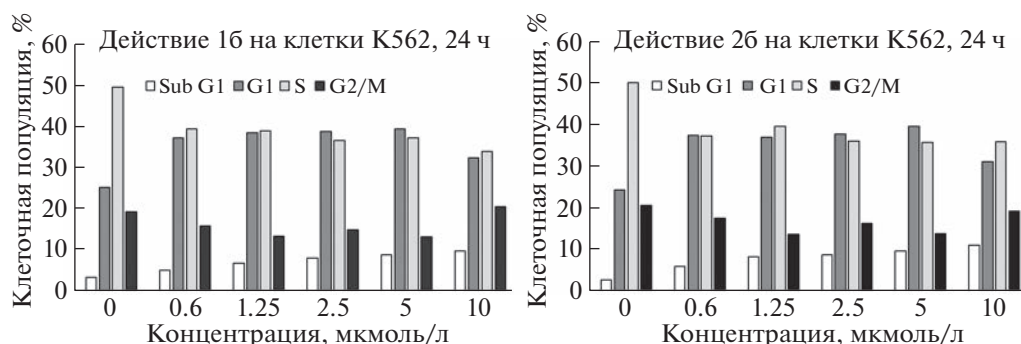


Рис. 1. Действие **16** и **26** на клеточный цикл опухолевых клеток К-562.

ствительность тест-микроорганизмов к аналогам, триптантрину и мостотрину изучали в диапазоне концентраций от 1 до 32 мкг/мл. Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) оценивали по наименьшей концентрации для каждого соединения, подавляющей видимый рост микроорганизмов после инкубации при $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч [10–12].

Результаты тестирования, представленные в табл. 2, указывают на то, что производные триптантрина обладают меньшей противомикробной активностью, чем сам триптантрин (**1a**). В то же время аналоги мостотрина (**2a**) обладают более высокой активностью по сравнению с мостотрином: (соединение **2б**) в отношении *S. aureus* ATCC 29213, а (соединение **2в**) как в отношении *S. aureus* ATCC 29213, так и *B. cereus* ATCC 10702.

Таким образом, наиболее перспективными являются 8-фтортриптантрин (**16**) и 8-формостотрин (**26**), обладающие высокой антипролиферативной активностью в отношении различных линий опухолевых клеток, а также 2,8-диметилмостотрин (**2в**), оказывающий высокое антибактериальное действие в отношении *S. aureus* ATCC 29213. Полученные данные позволили выбрать соединения (**16**, **26** и **2в**) для дальнейших *in vivo* экспериментов на лабораторных животных.

Ранее было показано, что мостотрин (**2a**) может взаимодействовать с бороздками ДНК [7], а триптантрин (**1a**) ингибировать ферменты, связанные с воспалением [13, 14]. Однако особенности молекулярных механизмов действия других синтезированных нами соединений пока не были изучены.

Учитывая этот факт, мы исследовали характер действия различных концентраций 8-фтортриптантрина (**16**) и 8-формостотрина (**26**) на клеточный цикл опухолевых клеток К-562, используя метод проточной цитометрии [15] (рис. 1).

Результаты показали, что соединения **16** и **26** ингибируют переход опухолевых клеток с фазы G1 в фазу S клеточного цикла, где происходит ре-

пликация ДНК. Блокирование клеточного цикла опухолевых клеток часто приводит к их гибели по механизмам апоптоза, что, очевидно, лежит в основе одного из возможных механизмов антипролиферативного действия этих веществ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jahng Y. Progress in the studies on tryptanthrin, an alkaloid of history // Arch. Pharm. Res. 2013. V. 36. № 5. P. 517–535.
2. Kaur R., Manjal S.K., Raval R.K., et al. Recent synthetic and medicinal perspectives of tryptanthrin // Bioorg. Med. Chem. 2017. V. 25. № 17. P. 4533–4552.
3. Moskovkina T.V., Denisenko M.V., Kalinovskiy A.I., et al. Oxidation of isatin and its 5-substituted analogs with potassium permanganate // Russ. J. Org. Chem. 2013. V. 49. P. 1740–1743.
4. Mani J.S., Johnson J.B., Steel J.C., Broszczak D.A., et al. Natural product-derived phytochemicals as potential agents against coronaviruses: a review // Virus Res. 2020. V. 284. P. 197989.
5. Chan H.-L., Yip H.Y., Mak N.-K., et al. Modulatory effects and action mechanism of tryptanthrin on murine leukemia cells // Cell Mol. Immunol. 2009. V. 6. № 5. P. 335–342.
6. Cheng H.M., Wu Y.C., Wang Q., et al. Clinical efficacy and IL-17 targeting mechanism of Indigo naturalis in moderate psoriasis // BCM Complement Altern. Med. 2017. V. 17. № 1. P. 439.
7. Popov A., Klimovich A., Styshova O., et al. Design, synthesis and biomedical evaluation of mostotrin, a new water soluble tryptanthrin derivative // Int. J. Molecular Med. 2020. V. 46. № 4. P. 1335–1346.
8. Lutnaes B.F., Luthe G., Brinkman UAT., et al. Characterization of monofluorinated polycyclic aromatic compounds by ^1H , ^{13}C and ^{19}F NMR spectroscopy // Magn. Reson. Chem. 2005. V. 43. № 7. P. 588–594.
9. Zheng X., Hou B., Wang R., et al. Synthesis of substituted tryptanthrin via aryl halides and amines as antitumor and anti-MRSA agents // Tetrahedron. 2019. V. 75. № 29. P. 130351.
10. Tikhomirov A.S., Tsvetkov V.B., Kaluzhny D.N., et al. Tri-armed ligands of G-quadruplex on heteroarene-fused anthraquinone scaffolds: Design, synthesis and

- pre-screening of biological properties. *Eur. J. Med. Chem.* 2018. V. 159. № 5. P. 59–73.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2015 (M07-A10). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests For bacteria that Grow Aerobically*; Approved Standard, 10th ed.; CLSI: Wayne, PA, USA, 2015.
12. CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing for Yeasts*. 4th ed. CLSI standard M27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
13. *Ishihara T., Ishihara T., Kohno K., Ushio S., et al.* Tryptanthrin inhibits nitric oxide and prostaglandin E(2) synthesis by murine macrophages // *Eur. J. Pharmacol.* 2000. V. 407. № 1–2. P. 197–204.
14. *Pergola C., Jazzar B., Rossi A., et al.* On the inhibition of 5-lipoxygenase product formation by tryptanthrin: mechanistic studies and efficacy in vivo // *Brit. J. Pharm.* 2012. V. 165. № 3. P. 765–776.
15. *Krishan A.J.* Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining // *Cell Biol.* 1975. V. 66. № 1. P. 188.

BIOLOGICAL ACTIVITY AND PROBABLE MECHANISMS OF ACTION OF DERIVATIVES OF TRYPTANTHRIN AND MOSTOTRIN ALKALOIDS

A. M. Popov^{a, #}, L. G. Degenkova^b, T. V. Moskovkina^c, N. E. Grammatikova^b, A. S. Kuzmich^a, O. V. Chernikov^a, A. E. Schekotichin^b, and Academician of the RAS V. A. Stonik^a

^a*G.B. Elyakov Pacific Institute Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Science, Vladivostok, Russian Federation*

^b*Gauze Research Institute for The Search for New Antibiotics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^c*Institute of High Technologies and Advanced Materials, Far East Federal University, Vladivostok, Russian Island, Ayaks Bay, 10, Russian Federation*

[#]*e-mail: popovam@piboc.dvo.ru*

The alkaloid tryptanthrin and its water-soluble derivative mostotrin exhibit high antimicrobial and antitumor activity. To develop more active and less toxic preparations, syntheses and testing of the biological activities of a number of new and/or little-studied analogs were performed. Some of them have been shown to have higher cytotoxicity against tumor and antimicrobial cells than tryptanthrin and mostotrin. Thus, 8-fluorotryptanthrin effectively inhibits the proliferation of various tumor cell lines, namely: K-562/4, HCT-116 and HCT-116p53ko at lower concentrations than tryptanthrin, and 2,8-difluorostotrin exhibits a stronger antimicrobial effect against pathogenic bacteria *S. aureus* ATCC 29213 than mostotrin. It has been established that the antiproliferative properties of 8-fluorotryptanthrin and 8-fluormostotrin are associated with their ability in nanomolar concentrations to inhibit the cell cycle of tumor cells at the stage of transition from the G1 phase to the S phase. The data obtained indicate the prospects for further in-depth studies of their antitumor properties.

Keywords: quinazoline alkaloids derivatives, tumor cells, antimicrobial activity, cell cycle blocking