

## СИНТЕЗ НОВОГО СЕЛЕКТИВНОГО АГОНИСТА ГЛЮКОКОРТИКОИДНОГО РЕЦЕПТОРА И ОЦЕНКА ЕГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ НА МОДЕЛИ ГЕМОБЛАСТОЗОВ *IN VITRO*

Тилова Л.Р.<sup>1</sup>, Савинкова А.В.<sup>1</sup>, Бочаров А.К.<sup>2</sup>, Кузин К.А.<sup>1</sup>, Борисова О.И.<sup>1</sup>, Жидкова Е.М.<sup>1,3</sup>, Кирсанов К.И.<sup>1</sup>, Белицкий Г.А.<sup>1</sup>, Якубовская М.Г.<sup>1</sup>, Яминова Л.В.<sup>4,5</sup>, Ширинян В.З.<sup>4</sup>, Лесовая Е.А.<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО МГУ, Москва;

<sup>4</sup>ФГБУН ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва;

<sup>5</sup>ФГБОУ ВО РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва;

<sup>6</sup>ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, e-mail: lesovenok@yandex.ru

Глюкокортикоиды являются важным компонентом химиотерапии гемобластозов. Терапевтическое действие глюкокортикоидов реализуется посредством активации глюкокортикоидного рецептора по механизму транс-репрессии, развитие побочных эффектов связано с транс-активацией. Ранее нами было показано, что соединение класса селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора, CpdA, селективно запускает транс-реессию в клетках лейкозов. CpdA является нестабильной молекулой, распадающейся в водном растворе до производного азиридина. Целью данной работы было синтезировать новые селективные агонисты глюкокортикоидного рецептора на основании химической модификации CpdA путем введения в молекулу заместителей различного рода по нескольким положениям. Для одного полученного соединения было проведено определение аффинности к глюкокортикоидному рецептору и сравнительный анализ противоопухолевых эффектов *in vitro*. Было показано, что соединение CpdA-01, аналог Синефрина, конкурентно связывается с глюкокортикоидным рецептором на уровне известных лигандов рецептора, CpdA и глюкокортикоида дексаметазона, а также проявляет более выраженный антипролиферативный и проапоптотический эффекты. Таким образом, CpdA-01 является перспективным кандидатом для дальнейших исследований.

Ключевые слова: глюкокортикоиды, селективные агонисты, CpdA, аналоги CpdA, гемобластозы, связывание, пролиферация, апоптоз.

## SYNTHESIS OF NOVEL SELECTIVE GLUCOCORTICOID RECEPTOR AGONIST AND EVALUATION OF ITS ANTI-CANCER ACTIVITY IN THE MODEL OF HEMATOLOGIC MALIGNANCIES *IN VITRO*

Tilova L.R.<sup>1</sup>, Savinkova A.V.<sup>1</sup>, Bocharov A.K.<sup>2</sup>, Kuzin K.A.<sup>1</sup>, Borisova O.I.<sup>1</sup>, Zhidkova E.M.<sup>1,3</sup>, Kirsanov K.I.<sup>1</sup>, Belitsky G.A.<sup>1</sup>, Yakubovskaya M.G.<sup>1</sup>, Yaminova L.V.<sup>4,5</sup>, Shirinyan V.Z.<sup>4</sup>, Lesovaya E.A.<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health, Moscow;

<sup>2</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow;

<sup>3</sup>Moscow Technological University, Moscow;

<sup>4</sup>Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Science, Moscow;

<sup>5</sup>Mendeleev University of Chemical Technology, Moscow;

<sup>6</sup>Pavlov Ryazan Medical State University, Ryazan, e-mail: lesovenok@yandex.ru

Glucocorticoids are the important components of chemotherapy of hematologic malignancies. Therapeutic effect of glucocorticoids is realized via glucocorticoid receptor activation through the transrepression mechanism, and the development of side effects is associated with transactivation. Earlier we demonstrated that the compound from the group of selective glucocorticoid receptor agonists, CpdA, selectively induced transrepression in leukemia cells. CpdA is unstable molecule degrading in water solution to the aziridine derivative. The main aim of present study was to synthesize new selective glucocorticoid receptor agonists based on the chemical CpdA modification with different substitutes by several positions. For newly synthesized compound, we performed the evaluation to affinity to glucocorticoid receptor and comparative analysis of anti-cancer effects *in vitro*. We demonstrated that CpdA-01, analogue of Synephrine, competed for the binding with the glucocorticoid receptor with known glucocorticoid receptor ligands, CpdA and glucocorticoid Dexamethasone, and revealed more pronounced antiproliferative and proapoptotic effects. Thus, CpdA-02 is

### **the perspective candidate molecule for further investigations.**

Keywords: glucocorticoids, selective agonists, CpdA, CpdA analogues, hematologic malignancies, binding, proliferation, apoptosis.

Глюкокортикоиды (GC) широко применяются при терапии лейкозов и лимфом как самостоятельный цитостатический препарат [7]. Биологические эффекты GC реализуются посредством активации глюкокортикоидного рецептора (GR) – фактора транскрипции, который регулирует экспрессию генов по двум различным механизмам. Терапевтическое действие GC реализуется через транс-репрессию – белок-белковое взаимодействие GR с факторами транскрипции, что приводит к снижению жизнеспособности опухолевых клеток. Развитие метаболических осложнений связано с запуском транс-активации, требующей связывания GR с респонсивными элементами в промоторных областях антиапоптотических генов [2, 4, 10].

За последнее десятилетие было предложено большое количество подходов по увеличению активности GC и снижению побочных эффектов от их применения. В частности, были описаны селективные агонисты глюкокортикоидного рецептора (SEGRA), которые не приводят к образованию гомодимера GR и, соответственно, запускают лишь транс-репрессорные механизмы [3, 8]. К классу SEGRA относится соединение растительного происхождения 2-(4-ацетоксифенил)-2-хлор-N-метилэтиламмоний хлорид, или CpdA. Ранее нами был продемонстрирован GR-зависимый противоопухолевый эффект CpdA *in vitro* и *in vivo* на моделях гемобластозов [1, 6]. Однако также было показано, что CpdA является нестабильной молекулой, распадающейся в водном растворе до производного азиридина, относящегося по классификации к канцерогенам класса 2Б [5, 9]. Аналоги CpdA с более стабильной структурой в литературе не описаны.

Таким образом, разработка путей химической модификации селективного модулятора GR, соединения растительного происхождения CpdA с целью увеличения стабильности и биологической активности данной молекулы, а также оценка биологических эффектов полученных соединений на модельной системе лейкозов и лимфом [1, 6] является актуальной задачей современной молекулярной биологии и экспериментальной онкологии.

### **Цель исследования**

Целью данного исследования являлся синтез химического производного CpdA (аналога Синефрина), исследование его связывания с GR и оценка его GR-зависимых антипролиферативных и проапоптотических эффектов на модельной системе гемобластозов *in vitro* в сравнении с CpdA и дексаметазоном (Dex).

### **Материалы и методы исследования**

**Синтез СрдА-01.** Синтез СрдА-01 был проведен по схеме, указанной на рис. 1.

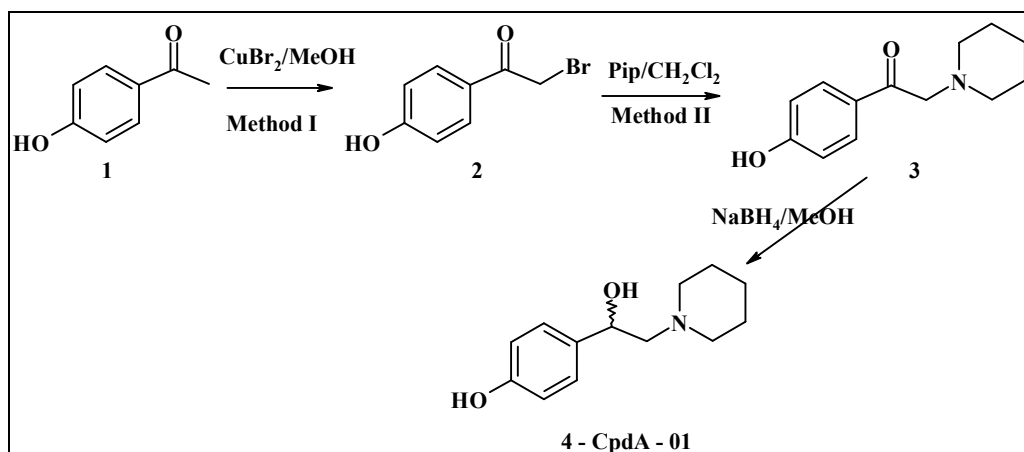


Рис. 1. Схема получения СрдА-01

Смесь ацетофенона 1 (3.00 ммоль) и бромида меди (II) (7.50 ммоль) в метаноле (15 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, затем кипятили до полного исчезновения в реакционной массе исходного кетона, вылили в ледяную воду (200 мл), экстрагировали хлористым метиленом ( $3 \times 60$  мл), объединённые органические фазы промыли водой ( $3 \times 40$  мл), профильтровали через слой (1 см) силикагеля, упарили и остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (элюент петрол. эфир/этилацетат 6:1). Полученный твердый остаток (соединение 2) перекристаллизовали из смеси петролейный эфир-этилацетат. Далее смесь бромкетона 2 (0.26 ммоль), пиперидина (0.55 ммоль) в абс. хлористом метиле (8 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч, затем – кипятили до полного исчезновения исходного бромкетона (ТСХ-контроль), вылили в ледяную воду (60 мл) и экстрагировали хлористым метиленом ( $3 \times 20$  мл). Объединённые органические фазы промыли водой ( $2 \times 30$  мл), высушили над сульфатом магния, упарили, остаток очистили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (элюент петрол. эфир / этилацетат/ $\text{Et}_3\text{N}$  3:1;0.05). Твердый остаток (соединение 3) перекристаллизовали из смеси петролейный этанола. Далее к охлажденному до  $10^\circ\text{C}$  раствору аминокетона 3 (3.0 ммоль) в абс. метаноле (30 мл) порциями добавили боргидрид натрия (30 ммоль) и перемешивали раствор при комнатной температуре в течение 5 часов. Реакционную смесь вылили в воду (150 мл), экстрагировали этилацетатом ( $3 \times 30$  мл), экстракт промыли водой (50 мл) и упарили. Остаток очистили хроматографически (элюент петролейный эфир / этилацетат/ $\text{Et}_3\text{N}$  1:1:0,05), диастереомеры не были разделены. Остаток перекристаллизовали из смеси хлористый метилен-гептан. Получали 4-(1-гидрокси-2-пиперидин-1-илэтил) фенол 4. Выход 68 %.  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ) 1.26-1.40 (m, 2H); 1.40-1.59 (m, 4H); 2.14-2.53

(m, 6H); 4.47-4.60 (m, 1H); 6.67 (d, 2H, J = 6.60 Гц); 7.10 (d, 2H, J = 6.60 Гц); Масс-спектр (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 221.

**Клеточные линии и обработка клеток.** В работе использовали клетки острого лимфобластного лейкоза линии СЕМ и клетки мантийноклеточной лимфомы Granta, стабильные клеточные линии Granta-shGR и СЕМ-shGR с подавленной экспрессией GR, полученные нами ранее путем трансдукции в клетки указанных линий лентивирусных конструкций, экспрессирующий короткую шпилечную РНК к гену GR [6]. Клетки культивировали в стандартной среде RPMI-1640, содержащей 5 %-ную эмбриональную сыворотку телят и гентамицин (все реактивы «ПанЭко», Россия) (50 ед/мл) при 37 °С и в 5 %-ном CO<sub>2</sub>. Клетки обрабатывали CpdA, CpdA-01 и Dex («Sigma-Aldrich», США).

**Конкурентное связывание.** Анализ связывания CpdA, CpdA-01 и Dex проводили с использованием набора для PolarScreen™ Glucocorticoid Receptor Competitor Assay (Invitrogen, США) по протоколу производителя. Вкратце, в 96-луночном черном планшете смешивали буферный раствор, содержащий рекомбинантный GR в концентрации 4 нМ, буферный раствор, содержащий 2,5 нМ флуоресцентно-меченого лиганда GR Fluormone GS1, а также водные растворы исследуемых соединений в конечных концентрациях 0,1 нМ-0,1 мМ. Далее пробы инкубировали в защищенном от света месте при комнатной температуре 4 ч. Поляризацию флуоресценции измеряли на микропланшетном ридере Infinite F500 Tecan (Tecan, Австрия) (волна возбуждения 485 нм, эмиссии – 535 нм). За концентрацию тестируемого соединения, при которой наблюдалось 50 % ингибирование связывания Fluormone GS1 (IC<sub>50</sub>), принимали ту концентрацию соединения, при которой наблюдалось уменьшение поляризации комплекса GR с Fluormone GS1 в 2 раза.

**Определение антипролиферативного эффекта.** Антипролиферативный эффект определяли путем прямого подсчета живых клеток. Клетки культивировали в 24-луночном планшете в присутствии исследуемых соединений или растворителя (0,1 %-ного этанола или ДМСО) с плотностью посева 50 тыс. клеток в лунке. Для дифференцировки мертвых и живых клеток использовали окрашивание трипановым синим, подсчет клеток проводили через 24 ч после обработки.

**Определение уровня апоптоза.** Уровень апоптоза определяли с помощью метода проточной цитофлуориметрии после окраски йодистым пропидием (PI), для чего клетки центрифугировали, осадок суспендировали в 1 мл раствора, содержавшего 5 мкг/мл PI, 0,1 % цитрата натрия и 0,3% NP-40. Полученные образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur.

**Статистическая обработка данных.** Все эксперименты были повторены трижды. Средние значения и среднеквадратичное отклонение рассчитывали с помощью пакета

программ Microsoft Excel и сравнивали с парным двухвыборочным t-тестом Стьюдента для средних. Во всех случаях статистические критерии считали достоверными при  $P < 0,05$ .

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Химическое производное CpдA-01 (аналог Синефрина) является более стабильным и инертным соединением, не способным образовывать производное азиридина из-за отсутствия протона при атоме азота. Выбор стратегии синтеза (введение циклического вторичного амина взамен первичного амина) был обусловлен двумя факторами: первый из них, как было отмечено выше, связан с необходимостью исключить возможности образования азиридина [10]. Вторая причина обусловлена тем, что CpдA при гидролизе легко может давать производное Синефрина, обладающее собственным противоопухолевым эффектом.

### **Анализ связывания CpдA-01 с глюкокортикоидным рецептором**

При исследовании связывания CpдA-01 было показано, что концентрация, при которой наблюдалось уменьшение поляризации комплекса GR с флуоресцентно-меченым лигандом Fluormone GS1 в 2 раза относительно максимума (825 mP), составило 1,1 мкМ. Концентрации лигандов GR, CpдA и Dex, при которых наблюдалось 50 % ингибирование связывания Fluormone GS1, составили 0,52 мкМ и 0,67 мкМ. Таким образом, было показано, что CpдA-01 является лигандом GR и связывается с GR с аффинностью, сходной с CpдA и Dex.

### **Оценка противоопухолевого эффекта CpдA-01 *in vitro***

Антипролиферативные и проапоптотические эффекты препарата на клетки линии конкретной нозологической формы злокачественного новообразования в настоящее время определяют как противоопухолевое действие препарата *in vitro*. Нами были исследованы способность CpдA-01 подавлять пролиферацию клеток гемобластозов, а также индуцировать апоптоз. При изучении биологических эффектов CpдA-01 в первую очередь нами был проведен подбор его оптимальных концентраций для обработки клеток. Соединение исследовали в диапазоне концентраций 1 нм – 1 мМ. Было показано, что рабочие концентрации CpдA-01 лежат в диапазоне 1–5 мкМ, что сравнимо с рабочей концентрацией дексаметазона и CpдA. В дальнейших экспериментах были использованы Dex, CpдA и CpдA-01 в концентрациях 1 мкМ. При определении антипролиферативного эффекта CpдA-01 было показано, это соединение обладает способностью подавлять пролиферацию клеток на уровне, сравнимом с Dex и CpдA. При инкубации клеток Grantac CpдA-01 в концентрации 1 мкМ доля жизнеспособных клеток составила  $63,7 \pm 15,8$  % после 24 ч, что сравнимо с  $67,8 \pm 8,4$  % живых клеток после обработки CpдA и  $63,7 \pm 9,4$  % – после инкубации с Dex (рис. 2), и согласуется с результатами предыдущих исследований [1, 6]. При исследовании клеток СЕМ

число живых клеток после инкубации с CpдA-01 составил  $65,4 \pm 3,7$  % (рис. 3). Наблюдаемые для CpдA-01 эффекты были GR-зависимыми, поскольку данное соединение вызывало гибель клеток, в которых экспрессия GR была подавлена (Granta-shGR и CEM-shGR, рис. 2 и 3), в количестве, статистически незначимо отличимом от контроля.

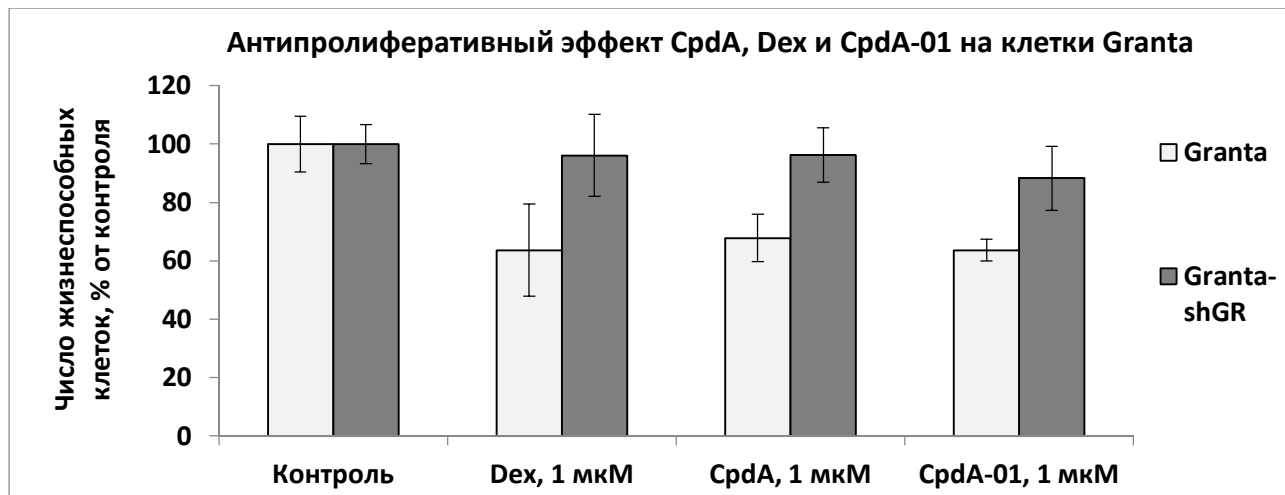


Рис. 2. Антипролиферативный эффект CpдA-01, CpдA и Dex на клетки Granta

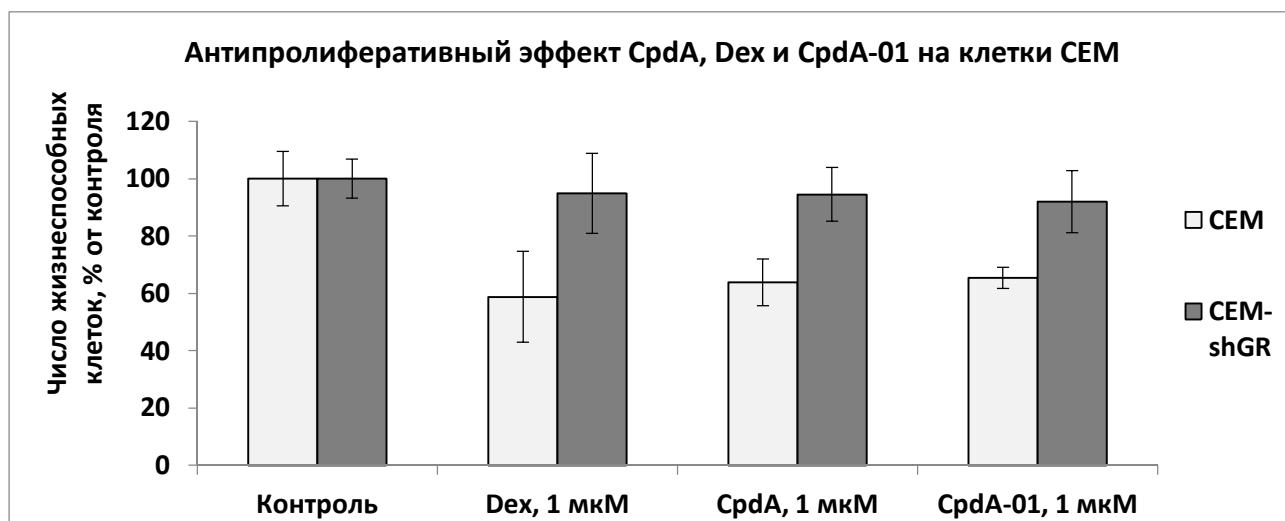


Рис. 3. Антипролиферативный эффект CpдA-01, CpдA и Dex на клетки CEM

Индукция апоптоза после обработки CpдA-01 наблюдалась в обеих клеточных линиях (табл. 1) и была сопоставима с уровнем апоптоза в данных клетках после обработки дексаметазоном и CpдA.

Таблица 1

Проапоптотический эффект энантиомеров CpдA в клетках CEM и Granta

Соединение, концентрация, время обработки	% апоптотических клеток, клетки Granta	% апоптотических клеток, клетки СЕМ
Контроль, 48 ч	3,5±0,6	6,7±1,4
Dex, 1 мкМ, 48 ч	18,9±3,7	19,4±4,3
СрdА, 1 мкМ, 48 ч	15,4±4,2	17,6±3,8
СрdА-01, 1 мкМ, 48 ч	13,7±3,9	18,2±4,4

Таким образом, можно сделать вывод о том, что антипролиферативный эффект СрdА-01 связан с запуском апоптоза, причем СрdА-01 обладает эффектом на пролиферацию клеток лейкоза и лимфомы, сравнимым с эффектами исходной молекулы СрdА и Dex.

### **Заключение**

В ходе данной работы было показано, что в клетках гемобластозов СЕМ и Granta производное СрdА-01 проявляет GR-зависимый антипролиферативный эффект, связанный с индукцией апоптоза в данных клетках. Таким образом, СрdА-01 является перспективным кандидатом для дальнейших исследований.

*Работа выполнена при частичной поддержке грантов РФФИ №15-04-04006, 15-04-09216, 16-04-01410, а также гранта фонда Династия.*

### **Список литературы**

1. Лесовая Е.А. Противоопухолевое действие нестероидного лиганда глюкокортикоидного рецептора, СрdА, на клетки линий Т-клеточного лейкоза / Е.А. Лесовая, А.Ю. Емельянов, К.И. Кирсанов, М.Г. Якубовская и др. // Биохимия (Москва). – 2011. – Т. 76, № 11. – С. 1242-1252.
2. Adcock I.M. Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions // PulmPharmacolTher. – 2000. – Vol. 3, № 3. – P. 115-126.3
3. Bosscher de K. A fully dissociated compound of plant origin for inflammatory gene repression / K. De Bosscher W VandenBerghe, IM Beck, W Van Molle et al // Proc Natl AcadSci U S A. – 2005. – Vol. 102, № 44. – P. 15827-15832.6
4. Chebotaev D. The tumor suppressor effect of the glucocorticoid receptor in skin is mediated via its effect on follicular epithelial stem cells / D. Chebotaev, A.Yemelyanov, L. Zhu, R.M. Lavker, I. Budunova // Oncogene. – 2007. – Vol. 26, № 21. – P. 3060-3068. 4
5. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man / IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. – 1999. – Vol. 71. – P. 928.9

6. Lesovaya E. Combination of a selective activator of the glucocorticoid receptor Compound A with a proteasome inhibitor as a novel strategy for chemotherapy of hematologic malignancies / E. Lesovaya, A. Yemelyanov, K. Kirsanov, A. Popa et al // Cell Cycle. – 2013. – Vol. 12, № 1. – P. 133-144.8.
7. Herr I. Glucocorticoid use in prostate cancer and other solid tumours: implications for effectiveness of cytotoxic treatment and metastases / I. Herr, J. Pfitzenmaier // Lancet Oncol. – 2006. – Vol. 7, № 5. – P. 425-430.2.
8. Miner J.N. New and improved glucocorticoid receptor ligands / J.N. Miner, M.H. Hong, A. Negro-Vilar // Expert Opin Investig Drugs. – 2005. – V. 14, № 12. – P. 1527-1545.7.
9. Swart P. Biological activities of the shrub *Salsola tuberculiformis* Botsch: contraceptive or stress alleviator? / P. Swart, A.C. Swart, A. Louw, K.J. van der Merwe // Bioessays. – 2003. – Vol. 25, № 6. – P. 612-619.10.
10. Yemelyanov A. Compound A, a novel phyto-modulator of steroid hormone receptors, as a candidate for prostate cancer therapy / A. Yemelyanov, J. Czernog, L. Gera, S. Joshi et al // Cancer Research. – 2008. – Vol. 68, № 12. – P. 4763-4773.5.