

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ ЦИФЕТРИЛИНА (СООБЩЕНИЕ I)

В.Н. Осипов, Л.П. Сушинина, С.В. Устинкина, Л.И. Смирнова, З.С. Шпрах
ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Василий Николаевич Осипов ovn65@yandex.ru

Введение. Препарат цифетрилин, аналог гипоталамического гормона соматостатина, разработан в ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В основу настоящей работы положена идея об использовании цифетрилина в качестве специфического носителя цитотоксических групп.

Цель исследования — синтез цитотоксических аналогов цифетрилина с целью изучения влияния наличия цитотоксических фрагментов на его противоопухолевую активность.

Результаты. Классическими методами пептидной химии синтезированы 5 новых аналогов цифетрилина, модифицированных цитотоксическими агентами. Соединения получены присоединением к цифетрилину по N-группе цистеина или по N-группе лизина хлорфенацила или гидролизованного цифелина (цитотоксического препарата). Очистку полученных пептидов проводили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле. Чистота соединений подтверждена элементным анализом, тонкослойной хроматографией, углом оптического вращения и данными высокоэффективной жидкостной хроматографии. Проведены предварительные исследования их противоопухолевой активности на перевиваемых опухолях мышей — аденокарциноме молочной железы Ca 755 и меланоме B16.

Заключение. Синтезированы новые пептиды — аналоги цифетрилина, содержащие цитотоксические фрагменты, подтверждены их строение и чистота.

Ключевые слова: аналог соматостатина, противоопухолевая активность, синтетический пептид

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-85-88

CYPHETRYLIN CYTOTOXIC ANALOGUES (REPORT I)

V.N. Osipov, L.P. Sushinina, S.V. Ustinkina, L.I. Smirnova, Z.S. Shprakh

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center at the Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe Sh., Moscow, 115478, Russia

Background. The drug cyphetrylin, hypothalamic hormone somatostatin analogue, was developed in N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center at the Ministry of Health of Russia. The basis of this work is the idea of using cyphetrylin as a specific carrier of cytotoxic groups.

Objective. Synthesis of cytotoxic cyphetrylin analogues in order to study the effect of the presence of cytotoxic agents on its antitumor activity.

Results. The classical methods of peptide chemistry were used for 5 the new cyphetrylin analogues synthesis. The compounds have been obtained by the addition to the cyphetrylin Na-group of the cysteine or lysine N α -group chlorophenacyl or hydrolyzed cyphelin (cytotoxic agent). Purification of the peptides was performed by column chromatography on silica gel. The purity of the obtained compounds was confirmed by elemental analysis, TLC, optical rotation angle data and HPLC. Preliminary studies of anti-tumor activity were performed in mice transplanted tumors: adenocarcinoma Ca 755 breast and melanoma B16.

Conclusions. New peptides — analogues cyphetrylin containing cytotoxic fragment have been synthesized, their structure and purity have been confirmed.

Key words: somatostatin analogue, antitumor activity, synthetic peptide

Введение

Препарат цифетрилин, аналог гипоталамического гормона соматостатина, разработан в ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [1].

Механизм противоопухолевой активности цифетрилина и других аналогов соматостатина определяется

2 возможными путями реализации их ингибирующего действия — прямого и опосредованного. Прямой цитотоксический эффект обусловлен связыванием этих соединений с рецепторами к соматостатину на поверхности опухолевых клеток. Опосредованный антипролиферативный эффект соматостатина обусловлен торможением секреции ряда гормонов и факторов

роста опухолей (инсулиноподобного фактора роста, гастрин, глюкагона, вазоактивного интестинального пептида, инсулина, холецистокинина, мотилина, серотонина и др.) [2, 3].

Синтезирован большой ряд аналогов соматостатина, и показана их противоопухолевая активность [2, 4–9].

В основу настоящей работы положена идея об использовании цифетрилина в качестве специфического носителя цитотоксических групп с целью возможного увеличения прямого цитотоксического эффекта. В литературе имеются сведения о подобных исследованиях, направленных на поиск потенциальных противоопухолевых соединений в ряду цитотоксических аналогов гипоталамических гормонов. Адресная доставка цитотоксических агентов к опухолям с помощью специфических носителей в некоторых случаях приводила к положительным результатам [10, 11].

Цифетрилин, аналог гипоталамического гормона соматостатина, представляет собой защищенный по функциональным группам пентапептид (метилловый эфир N^α-трет-бутилоксикарбонил-S-тетрагидропиранил-L-цистеинил-L-фенилаланил-D-триптофил-N^ε-карбобензоксид-L-лизил-L-треонина).

В статье представлен синтез 5 цитотоксических производных цифетрилина. Метилловый эфир N^α-п-ди-(2-хлорэтил)-аминофенилацетил-S-тетрагидропиранил-цистеинилфенилаланил-D-триптофил-N^ε-карбобензоксид-лизилтреонина (ClPhe-Cys(Thp)-Phe-D-Trp-Lys(Z)-Thr-OMe) (1) и метилловый эфир N^α-ацетил-п-ди-(2-хлорэтил)-аминофенилаланилвалил-S-тетрагидропиранил-цистеинил-фенилаланил-D-триптофил-N^ε-карбобензоксид-лизилтреонина (AcSarVal-Cys(Thp)-Phe-D-Trp-Lys(Z)-Thr-OMe) (2) получены присоединением к цифетрилину по N^α-аминогруппе цистеина цитотоксических фрагментов: п-ди-(2-хлорэтил)-амино-фенилуксусной кислоты (ClPhe, хлорфенацила) и N^α-ацетил-п-ди-(2-хлорэтил)-аминофенилаланилвалина (AcSarVal, гидролизованного цифелина) соответственно. Метилловый эфир N^α-трет-бутил-оксикарбонил-S-тетрагидропиранил-цистеинилфенилаланил-D-триптофил-N^ε-п-ди-(2-хлорэтил)-аминофенилацетил-лизилтреонина (Boc-Cys(Thp)-Phe-D-Trp-Lys(ClPhe)-Thr-OMe) (3) и метилловый эфир N^α-трет-бутилоксикарбонил-S-тетрагидропиранил-цистеинилфенилаланил-D-триптофил-N^ε-(N^α-ацетил-п-ди-(2-хлорэтил)-аминофенилаланилвалил)лизилтреонина (Boc-Cys(Thp)-Phe-D-Trp-Lys(AcSarVal)-Thr-OMe) (4) получены присоединением к цифетрилину по N^ε-группе лизина хлорфенацила и гидролизованного цифелина соответственно. Тетрапептид — метилловый эфир N^α-трет-бутилоксикарбонилфенил-аланил-D-триптофил-N^ε-(N^α-ацетил-п-ди-(2-хлорэтил)-

аминофенилаланилвалил)-лизилтреонина (Boc-Phe-D-Trp-Lys(AcSarVal)-Thr-OMe) (5) представляет собой промежуточный цитотоксический аналог в синтезе пентапептида 4.

Материалы и методы

Синтез осуществляли классическими методами пептидной химии. При реализации намеченной схемы синтеза реакции конденсации проводили в условиях, сводящих к минимуму возможность рацемизации отдельных аминокислот. При синтезе фрагментов использовали методы смешанных ангидридов и активированных эфиров.

Выбор защитных групп определяли требованием сведения к минимуму нежелательных побочных реакций при удалении N^α-защитных группировок на промежуточных стадиях синтеза.

Для защиты α-аминогрупп на всех стадиях синтеза применяли трет-бутилоксикарбонильную группу (Boc). Карбоксильную группу C-концевого аминокислотного остатка треонина защищали этерификацией (метилловый эфир). Для защиты реакционноспособной группы лизина в боковой цепи использовали бензилоксикарбонильную защиту (Z), для защиты боковой группы цистеина применяли тетрагидропиранильную защиту (Thp).

Удельное вращение измеряли на поляриметре Unipol L (Германия). Для очистки защищенного пентапептида 1 использовали колоночную хроматографию на силикагеле Kieselgel 40/63 (Merck, Германия). Для тонкослойной хроматографии применяли пластинки Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ (Россия) с тонким слоем силикагеля, в качестве растворителя использовали хлороформ и метанол в соотношении 9:1. Вещества обнаруживали на хроматограммах при обработке парами йода, а также при проявлении 0,5 % раствором нингидрина в этаноле. Чистоту полученных соединений и содержание примесей определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе Shimadzu. Колонка Reprosil-Pur Basic C18, 5 мкм, 250 × 4,6 мм. Условия: линейный градиент АВ — 5 % В (0 мин) — 100 % В (20 мин). А — 0,01 % трифторуксусная кислота в воде, В — 0,01 % трифторуксусная кислота в ацетонитриле.

Противоопухолевую активность цитотоксических аналогов цифетрилина исследовали на перевиваемых штаммах опухолей мышей.

Результаты и обсуждение

Синтез цитотоксических аналогов цифетрилина 1 и 2 осуществляли по схеме 1 (рис. 1).

Для получения цифетрилина (соединение 13) синтез осуществляли постепенным наращиванием пептидной цепи, начиная с C-концевой аминокислоты

треонина [7]. После снятия трет-бутилоксикарбонильной защитной группы с N^α-цистеина трифторуксусной кислотой соединение 14 конденсировали методом активированных эфиров с п-ди-(2-хлорэтил) аминофенилуксусной кислотой. В результате хроматографической очистки получали соединение 1. C₅₉H₇₄N₈O₁₁SCl₂. Вычислено, %: Cl 6,04; S 2,72. Найдено, %: Cl 5,92; S 2,74; R_f 0,79 (хлороформ: метанол – 9:1); [α]_D –20° (C = 1, диметилформамид); содержание основного вещества – 97,0 % (ВЭЖХ).

Соединение 2 получали конденсацией соединения 14 с N^α-ацетил-п-ди-(2-хлорэтил)-аминофенилаланилвалином, полученным щелочным гидролизом цифелина. C₆₇H₈₈N₁₀O₁₃SCl₂. Вычислено, %: Cl 5,28; S 2,38. Найдено, %: Cl 5,44; S 2,65; R_f 0,51 (хлороформ: метанол – 9:1); [α]_D –7° (C = 1, диметилсульфоксид); содержание основного вещества – 96,0 % (ВЭЖХ).

Синтез цитотоксических аналогов цифетрилина 3 и 4 осуществляли по схеме 2 (рис. 2).

Соединение 4: C₆₄H₉₁N₁₀O₁₃SCl₂. Вычислено, %: Cl 5,41; S 2,44. Найдено, %: Cl 5,4; S 2,55; R_f 0,48 (хлороформ: метанол – 9:1); [α]_D +12° (C = 1, диметилформамид).

В ходе синтеза был выделен цитотоксический тетрапептид Boc-Phe-D-Trp-Lys (Ac-Sar-Val)-Thr-OMe 5. C₅₆H₇₇N₉O₁₁Cl₂. Вычислено, %: Cl 6,32. Найдено, %: Cl 6,08, %; R_f 0,49 (хлороформ: метанол – 9:1); [α]_D –5° (C = 1, диметилформамид).

Синтезированные цитотоксические аналоги цифетрилина (соединения 1–4) и промежуточный цитотоксический тетрапептид 5 исследовали на противоопухолевую активность в лаборатории экспериментальной химиотерапии.

При предварительном изучении противоопухолевой активности синтезированных аналогов цифетрилина на перевиваемых опухолях мышей (аденокарциноме молочной железы Ca755 и меланоме B16) соединения, содержащие цитотоксические группы по N^α-группе цистеина (соединения 1 и 2), не проявили активности. Соединения с цитотоксической группой по N^ε-группе лизина 3, 4 и 5 проявили статистически значимый противоопухолевый эффект, что позволяет продолжить их изучение. Результаты изучения противоопухолевой активности цитотоксических аналогов цифетрилина и анализ полученных данных будут представлены в следующем сообщении.

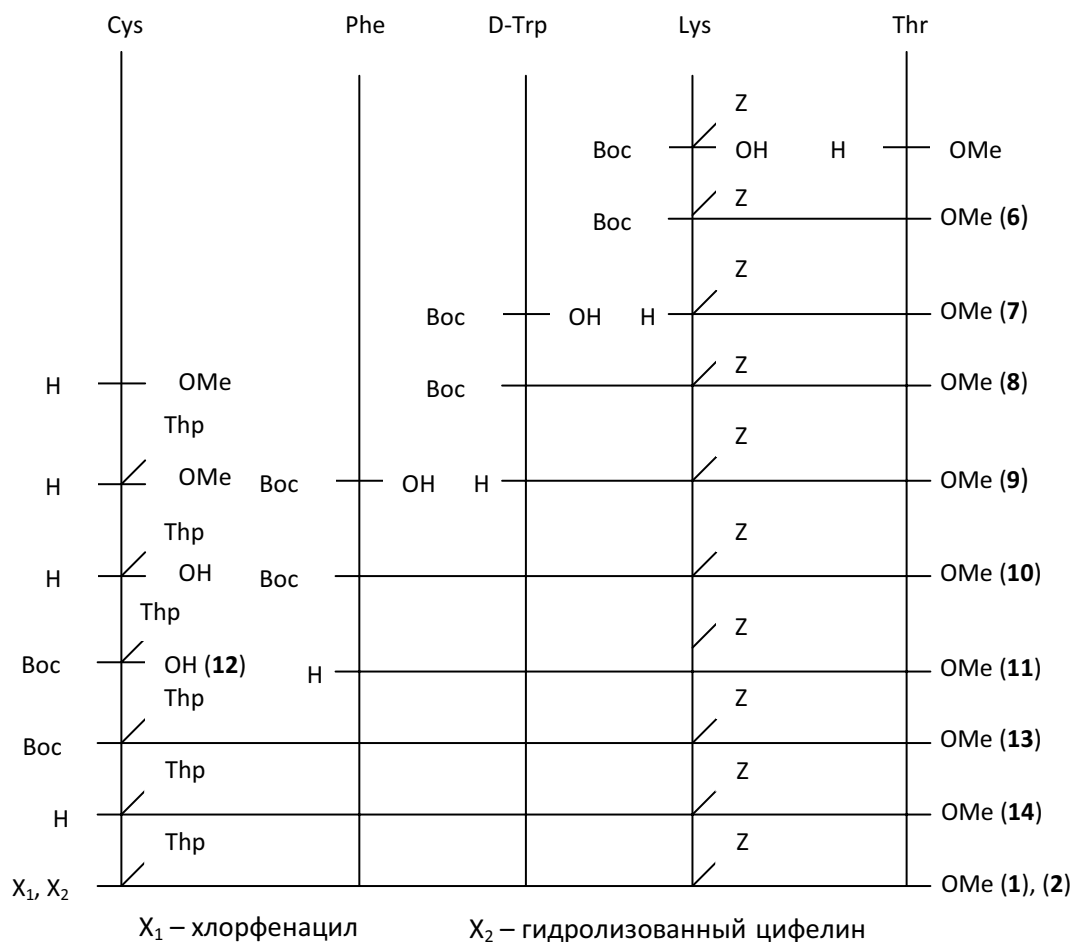


Рис. 1. Синтез цитотоксических аналогов цифетрилина 1 и 2

Cys	Phe	D-Trp	Lys	Thr	
			Z		
	Boc				OMe (10)
			H		
	Boc				OMe (15)
			X ₁ , X ₂ *		
	Boc				OMe (16), (5)
			X ₁ , X ₂ *		
Thp					
OH (12)	H				OMe (17), (18)
Thp					
			X ₁ , X ₂ *		OMe (3), (4)

X₁ – хлорфенацилX₂ – гидролизированный цифелин

Рис. 2. Синтез цитотоксических аналогов цифетрилина 3 и 4

Заключение

Классическими методами пептидной химии синтезированы 5 новых аналогов цифетрилина, модифицированных цитотоксическими агентами. Соединения получены присоединением хлорфенацила или гидролизованного цифелина к цифетрилину по N^α-группе цистеина (соединения 1, 2) и по N^ε-группе лизина (соединения 3, 4 и соединение 5, тетрапептид, содержащий гидролизированный цифелин по N^ε-группе лизина).

Очистку полученных пептидов проводили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле.

Проведено предварительное исследование противоопухолевой активности полученных соединений на перевиваемых опухолях мышей (аденокарциноме молочной железы Ca755 и меланоме B16). Результаты исследования позволяют продолжить изучение соединений с цитотоксической группой по N^ε-группе лизина (соединения 3, 4 и тетрапептид 5).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Смирнова Л.И., Устинкина С.В., Смирнова А.П. и др. Средство, обладающее противоопухолевым действием. Патент РФ № 2254139.
- Schally A.V., Comary-Schally A.M., Nagy A. et al. Hypothalamic hormones and cancer. *Front Neuroendocrinol* 2001;22:248–91. DOI: 10.1006/frne.2001.0217. PMID: 11587553.
- Susini C., Buscail L. Rationale for the use of somatostatin analogs as antitumor agents. *Annals of Oncology* 2006;17(12):1733–42. DOI: 10.1093/annonc/mdl105. PMID: 16801334.
- Балаев А.Н., Осипов В.Н., Хачатрян Д.С. Синтетические пептидные аналоги соматостатина: стратегии синтеза и перспективы поиска новых противоопухолевых препаратов. *Химико-фармацевтический журнал* 2015;49(6):3–9.
- Балаев А.Н., Осипов В.Н., Федоров В.Е. и др. Синтез и изучение цитотоксической активности аналогов гипоталамического гормона соматостатина. *Российский биотерапевтический журнал* 2012;11(4):47–53.
- Балаев А.Н., Осипов В.Н., Федоров В.Е. и др. Влияние синтетических пептидных агонистов соматостатина на рост перевиваемых опухолей мышей. *Российский биотерапевтический журнал* 2013;12(3):57–60.
- Кубасова И.Ю., Борисова Л.М., Киселева М.П. и др. Поиск потенциальных противоопухолевых соединений среди аналогов гипоталамического гормона соматостатина. *Российский биотерапевтический журнал* 2006;3:123–7.
- Шпрах З.С., Ярцева И.В., Игнатьева Е.В. и др. Синтез и химико-фармацевтические характеристики аналога соматостатина, обладающего противоопухолевой активностью. *Химико-фармацевтический журнал* 2014;48(3):19–22.
- Smirnova L.I., Smirnova A.P., Ustinkina S.V. et al. Synthesis and antitumor activity of modified somatostatin analogues. Flegel M., Fridkin M., Gilon C., Slaninova J. (Ed.) *Peptides 2004 Proceedings of the Third International and Twenty-Eighth European Peptide Symposium*, September 5–10. Prague, Czech Republic, 2004. P. 946–947.
- Смирнова Л.И., Смирнова З.С., Устинкина С.В. Синтез и противоопухолевая активность гормона гипоталамуса меланостатина и его аналогов. *Экспериментальная онкология на рубеже веков. Под ред. М.И. Давыдова, А.Ю. Барышникова. М., 2003. С. 261–280.*
- Nagy A., Schally A.V. Targeting cytotoxic conjugates of somatostatin, luteinizing hormone-releasing hormone and bombesin to cancer expressing their receptors: a “smarter” chemotherapy. *Current Pharmaceutical Design* 2005;11(9):1167–80. PMID: 15853664.