

УДК 547.728.23

DOI: 10.15372/ChUR2023519

EDN: YPLKKK

## Синтез новых производных усниновой кислоты и изучение их ингибирующей активности в отношении тирозил-ДНК-фосфодиэстераз 1 и 2

А. С. ФИЛИМОНОВ<sup>1</sup>, А. А. ЧЕПАНОВА<sup>2</sup>, М. А. МИХАЙЛОВА<sup>2</sup>, О. А. ЛУЗИНА<sup>1</sup>, А. Л. ЗАХАРЕНКО<sup>2</sup>, Н. Ф. САЛАХУТДИНОВ<sup>1</sup>, О. И. ЛАВРИК<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск (Россия)

E-mail: alfil@nioch.nsc.ru

<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск (Россия)

### Аннотация

Тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 и 2 (Tdp1 и Tdp2) – ферменты репарации ДНК, которые рассматриваются как потенциальные мишени для вспомогательной противоопухолевой терапии в комбинации с ингибиторами топоизомераз. Наиболее эффективные ингибиторы Tdp1 были обнаружены среди производных вторичного метаболита лишайников усниновой кислоты, сенсibiliзирующее действие которых в сочетании с ингибитором топоизомеразы 1 топотеканом подтверждено в экспериментах на культурах клеток и на животных моделях. Описаны новые производные усниновой кислоты, синтезированные на основе ранее полученных ингибиторов Tdp1 путем введения аннелированного с кольцом С дибензофуранового остова пиразольного цикла, что позволяет снизить собственную токсичность получаемых соединений. Найдены новые дуальные ингибиторы Tdp1 и Tdp2 в микромолярном диапазоне концентраций.

**Ключевые слова:** усниновая кислота, производные усниновой кислоты, ингибиторы Tdp1 и Tdp2, противоопухолевые свойства, топотекан

### ВВЕДЕНИЕ

Разработка ингибиторов важных ферментов и факторов репарации ДНК относится к перспективным направлениям современной фармакологии и является одним из путей создания эффективной терапии онкологических заболеваний, особенно для борьбы с лекарственно-устойчивыми опухолями. Ингибирование ключевых ферментов репарации ДНК в модельных системах существенно усиливает эффективность традиционных методов лечения.

Тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 и 2 (Tdp1 и Tdp2) – относительно недавно открытые ферменты репарации ДНК, которые рассматриваются как потенциальные мишени для вспомога-

тельной терапии в комбинации с ингибиторами топоизомераз. К используемым в клинической практике ингибиторам топоизомераз относятся: топотекан (Tpc) и иринотекан – ингибиторы топоизомеразы 1 (Top1), наносимые ими повреждения ДНК устраняются Tdp1 [1]; этопозид и доксорубин – ингибиторы топоизомеразы 2 (Top2), наносимые ими повреждения ДНК устраняются Tdp2 [1]. Ингибиторы топоизомераз действуют как стабилизаторы ковалентных комплексов топоизомеразы/ДНК, что приводит к накоплению разрывов ДНК и клеточной гибели. Репарация ДНК с такими ковалентными аддуктами – сложный процесс, который проходит с участием тирозил-ДНК-фосфодиэстераз на ключевых стадиях и играет существенную роль

в развитии лекарственной устойчивости [2]. Также была обнаружена способность Tdp1 и Tdp2 брать на себя функции друг друга, хотя и с меньшей эффективностью [3–5], что определяет перспективность как совместного применения селективных ингибиторов этих двух ферментов, так и создания агентов, способных одновременно ингибировать Tdp1 и Tdp2. Следует отметить, что значительные различия в строении активных центров ферментов Tdp1 и Tdp2 делают задачу создания дуальных ингибиторов крайне нетривиальной.

Спектр описанных в литературе ингибиторов Tdp1 широк [6–9], но наиболее эффективные ингибиторы Tdp1 были обнаружены среди производных вторичного метаболита лишайников (усниновой кислоты **1**) – соединения **2–4** (рис. 1), сенсibiliзирующее действие которых в сочетании с ингибитором Top1 Trc подтверждено в экспериментах на культурах клеток и на животных моделях [6, 9]. Среди всех известных на сегодня синтетических, природных и полусинтетических ингибиторов Tdp1 гидразонотиазольное производное **4a** позиционируется как наиболее эффективный ингибитор Tdp1 с подтвержденной *in vivo* способностью сенсibiliзировать противоопухолевое действие Trc [6]. Однако собственная цитотоксичность этого соединения достаточно высока в отношении опухолевых клеток линий HeLa, HCT-116, A-549, MCF-7 (3–50 мкмоль/л) [6] и неопухолевых клеток MRC-5 и HEK293A (5 и 3 мкмоль/л соответственно, не-

опубликованные данные), что делает актуальным поиск его аналогов с более безопасным профилем цитотоксичности.

Список известных ингибиторов Tdp2 существенно ограничен [10–13] и представлен в основном деазафлавионами [14–18], производными хинолинов [19–21] и изохинолинов [22–24]. Но и среди производных усниновой кислоты, полученных дериватизацией азотистыми гетероциклами (соединения **5a–c**, см. рис. 1), нашим коллективом были обнаружены мягкие ингибиторы Tdp2 [25], подавляющие активность Tdp2 на 40–70 % в концентрации 1 ммоль/л.

Из литературных данных по цитотоксичности и способности сенсibiliзировать противоопухолевое действие Trc для производных усниновой кислоты можно предположить, что гидразонотиазольный фрагмент определенно является важным (фармакофорным) как для проявления ингибирующих свойств в отношении Tdp1, так и для усиления действия топотекана *in vitro* и *in vivo*. Также, согласно литературным данным, собственная цитотоксичность производных усниновой кислоты существенно снижается или даже полностью отсутствует при введении в кольцо С остова усниновой кислоты фенилпиразольного фрагмента. Например, соединение **6** не влияет на выживаемость клеток линий MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека) и LMTK (фибробласты мышцы) в концентрации до 100 мкмоль/л, в то время как нативная усниновая кислота проявляет токсич-

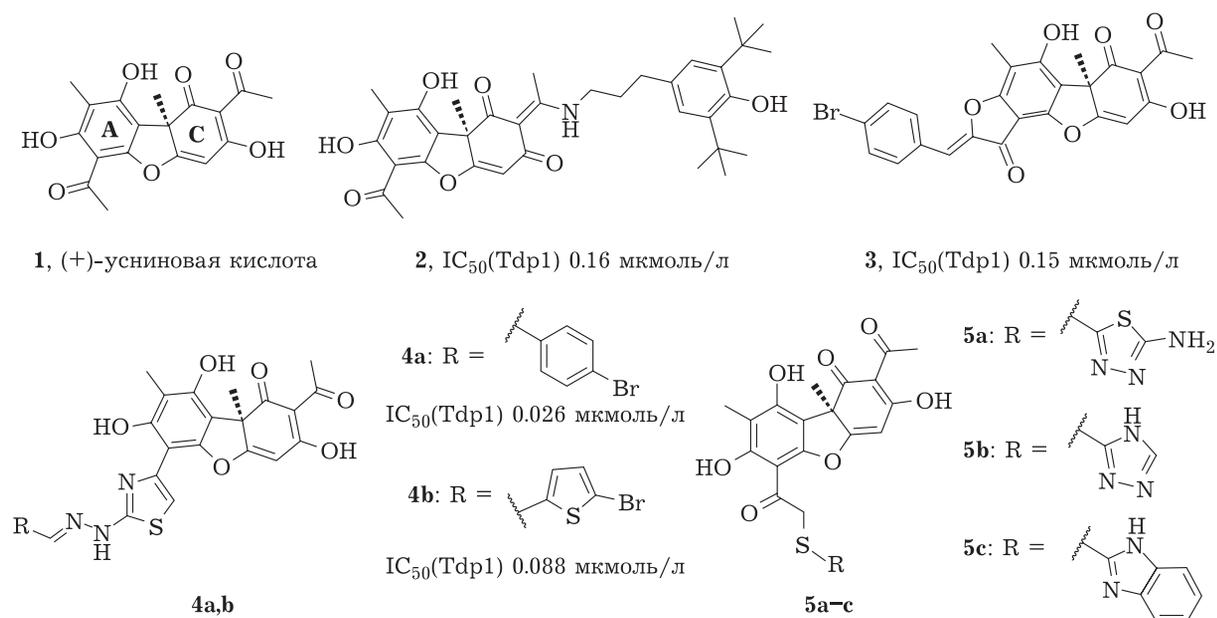
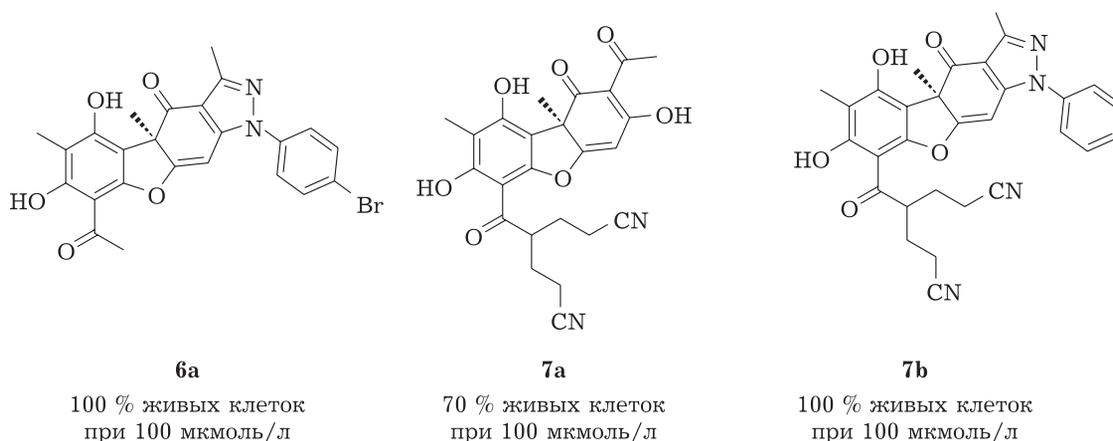


Рис. 1. Производные усниновой кислоты, проявляющие ингибирующую активность в отношении Tdp1 и Tdp2.

Рис. 2. Цитотоксичность производных усниновой кислоты **6a** и **7a,b**.

ность (50%-я цитотоксическая концентрация ( $CC_{50}$ ) равна 99 и 45 мкмоль/л соответственно), а соединение **7b** не токсично для клеток MCF-7, в то время как его аналог **7a** без пиразольного фрагмента в концентрации 100 мкмоль/л снижает выживаемость клеток до 70 % (рис. 2) [6]. Отсутствие собственной токсичности для ингибиторов Tdp1/Tdp2, которые предполагается использовать как вспомогательные средства в сочетании с препаратом-ингибитором топоизомеразы, важно с точки зрения минимизации дополнительных побочных эффектов.

Исходя из этих предположений, представляется перспективным синтезировать новые производные усниновой кислоты, комбинирующие данные фрагменты в качестве потенциальных ингибиторов Tdp1. Благодаря наличию азотистого гетероцикла, целевые соединения могут быть потенциальными ингибиторами Tdp2.

Задачи настоящей работы – синтез новых производных усниновой кислоты, сочетающих гидразонотиазольный и пиразольные фрагменты; исследование способности новых соединений подавлять активность очищенных рекомбинантных ферментов Tdp1 и Tdp2 и их собственной цитотоксичности на опухолевых клеточных линиях; исследование *in vitro* способности новых соединений усиливать действие топотекана и этопозида в отношении этих клеточных линий.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы

Использованы синтетические исходные материалы и реагенты производства компании Acros Organics (Бельгия), (+)-усниновая кислота – компании Zhejiang Yixin Pharmaceutical Co., Ltd (Китай).

### Методы исследования

Температуры плавления ( $T_{пл}$ , °C) определяли на столике Кюфлера без коррекции. Спектры ЯМР  $^1H$  и  $^{13}C$  регистрировали с помощью спектрометра Bruker AV-400 (Германия, рабочие частоты 300 или 400 МГц для  $^1H$  и 100 МГц для  $^{13}C$ , растворитель –  $CDCl_3$ ) с использованием остаточного сигнала  $CHCl_3$  в качестве внутреннего стандарта. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали с помощью спектрометра Thermo Electron DFS GC-MS (США, энергия ионизации электронов 70 эВ). Нумерация атомов в соединениях дана для отнесения сигналов в спектрах ЯМР и не всегда совпадает с нумерацией атомов в номенклатурном названии.

Соединения **4a** и **4b** получали по методике [9].

### Синтез соединений **8a,b–9a,b**

Гидрохлориды фенилгидразинов (1.1 ммоль) кипятили в 10 мл спирта с добавлением эквимолярного количества (0.1 мл) пиридина до полного растворения реагента (5 мин). К кипящему раствору добавляли взвесь 1 ммоль соединения **4a** или **4b** в 5 мл этилового спирта и кипятили на водяной бане 2 ч. Охлаждали, добавляли 30 мл дистиллированной воды. Выпадал осадок коричневого цвета. Осадок отфильтровали, промыли водой, сушили на воздухе. Полученный осадок хроматографировали на колонке с силикагелем (60–200 м), элюент – дихлорметан.

(*R,E*)-8-(2-(2-(4-бромбензилиден)гидразинил)тиазол-4-ил)-5,7-дигидрокси-3,4а,6-триметил-1-фенил-1,4а-дигидро-4H-бензофура[3,2-f]индазол-4-он (**8a**). Коричневый аморфный порошок. Выход 33 %.  $T_{разл}$  147–149 °C. Найдено:  $m/z$  653.0721  $[M]^+$ .  $C_{32}H_{24}O_4N_5BrS$ . Вычислено:  $M = 653.0727$ . Спектр ЯМР  $^1H$  ( $CDCl_3$ ,

$\delta$ , м. д., 400 Гц): 1.70 (3H, с, Н-15), 2.18 (3H, с, Н-10), 2.60 (3H, с, Н-12), 6.07 (1H, с, Н-4), 7.04 (1H, с, Н-14), 7.17 (1H, с, Н-17), 7.23 (2H, АВ-сист.,  $J_{AB} = 8.6$  Гц, Н-19), 7.29 (2H, АВ-сист.,  $J_{AB} = 8.6$  Гц, Н-20), 7.40–7.60 (5H, м, Н-23, Н-24 и Н-25), 9.06 (1H, с, NH), 10.37 (1H, с, OH-9), 12.49 (1H, шс, OH-7). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м. д.): 8.4 (C-10), 13.2 (C-12), 30.5 (C-15), 60.5 (C-9b), 88.0 (C-4), 97.4 (C-6), 103.6 (C-9a), 104.2 (C-14), 107.8 (C-8), 110.6 (C-2), 123.5 (C-21), 123.8 (C-23), 127.8 (C-19), 128.4 (C-25), 129.5 (C-24), 131.5 (C-20), 132.3 (C-22), 137.9 (C-18), 140.9 (C-17), 143.7 (C-13), 148.3 (C-11), 151.1 (C-3 и C-5a), 152.4 (C-9), 155.8 (C-7), 166.0 (C-16), 173.6 (C-4a), 196.4 (C-1).

**(R,E)-8-(2-(2-(4-бромбензилиден)гидразинил)тиазол-4-ил)-1-(4-бромофенил)-5,7-дигидрокси-3,4a,6-триметил-1,4a-дигидро-4H-бензофуоро[3,2-f]индазол-4-он (8b).** Коричневый аморфный порошок. Выход 34 %.  $T_{\text{разл}}$  153–155 °С. Найдено:  $m/z$  715.9579  $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ .  $\text{C}_{31}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{N}_5\text{Br}_2\text{S}$ . Вычислено:  $M = 715.9597$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м. д., 400 Гц): 1.69 (3H, с, Н-15), 2.17 (3H, с, Н-10), 2.58 (3H, с, Н-12), 6.04 (1H, с, Н-4), 7.03 (1H, с, Н-14), 7.17 (1H, с, Н-17), 7.23 (2H, АВ-сист.,  $J_{AB} = 8.6$  Гц, Н-19), 7.29 (2H, АВ-сист.,  $J_{AB} = 8.6$  Гц, Н-20), 7.46 (2H, АВ-сист.,  $J_{AB} = 8.7$  Гц, Н-23), 7.65 (2H, АВ-сист.,  $J_{AB} = 8.7$  Гц, Н-24), 8.97 (1H, с, NH), 10.28 (1H, с, OH-9), 12.48 (1H, шс, OH-7). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м. д.): 8.3 (C-10), 13.2 (C-12), 30.4 (C-15), 60.5 (C-9b), 87.7 (C-4), 97.3 (C-6), 103.5 (C-9a), 104.3 (C-14), 107.8 (C-8), 110.7 (C-2), 122.1 (C-21), 123.5 (C-25), 125.2 (C-23), 127.7 (C-19), 131.4 (C-20), 132.6 (C-24), 132.2 (C-18), 136.9 (C-22), 140.8 (C-17), 143.7 (C-13), 148.3 (C-11), 151.1 (C-3), 151.4 (C-5a), 152.3 (C-9), 155.8 (C-7), 165.9 (C-16), 173.9 (C-4a), 196.1 (C-1).

**(R,E)-8-(2-(2-((5-бромтиофен-2-ил)метилен)гидразинил)тиазол-4-ил)-5,7-дигидрокси-3,4a,6-триметил-1-фенил-1,4a-дигидро-4H-бензофуоро[3,2-f]индазол-4-он (9a).** Коричневый аморфный порошок. Выход 40 %.  $T_{\text{разл}}$  148–150 °С. Найдено:  $m/z$  659.0279  $[\text{M}]^+$ .  $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{N}_5\text{BrS}_2$ . Вычислено:  $M = 659.0291$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м. д., 400 Гц): 1.72 (3H, с, Н-15), 2.19 (3H, с, Н-10), 2.59 (3H, с, Н-12), 6.15 (1H, с, Н-4), 6.63 (2H, АВ-сист.,  $J_{AB} = 3.8$  Гц, Н-19), 6.71 (2H, АВ-сист.,  $J_{AB} = 3.8$  Гц, Н-20), 7.07 (1H, с, Н-14), 7.24 (1H, с, Н-17), 7.44–7.60 (5H, м, Н-23, Н-24, Н-25), 8.75 (1H, с, NH), 10.34 (1H, с, OH-9), 12.30 (1H, шс, OH-7). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м. д.): 8.3 (C-10), 13.2 (C-12), 30.5 (C-15), 60.4 (C-9b), 88.05 (C-4), 97.4 (C-6), 103.6 (C-9a), 104.4 (C-14), 107.6 (C-8), 110.6 (C-2), 114.62 (C-21), 123.7 (C-23), 128.4 (C-25), 128.5 (C-19), 129.5 (C-24), 130.0 (C-20), 135.6 (C-17),

137.8 (C-22), 139.8 (C-18), 143.5 (C-13), 148.4 (C-11), 151.0 (C-3), 151.1 (C-5a), 152.3 (C-9), 155.7 (C-7), 165.6 (C-16), 173.7 (C-4a), 196.2 (C-1).

**(R,E)-1-(4-бромфенил)-8-(2-(2-((5-бромтиофен-2-ил)метилен)гидразинил)тиазол-4-ил)-5,7-дигидрокси-3,4a,6-триметил-1,4a-дигидро-4H-бензофуоро[3,2-f]индазол-4-он (9b).** Коричневый аморфный порошок. Выход 38 %.  $T_{\text{разл}}$  157–159 °С. Найдено:  $m/z$  736.9402  $[\text{M}]^+$ .  $\text{C}_{30}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{N}_5\text{S}_2\text{Br}_2$ . Вычислено:  $M = 736.9396$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м. д., 300 Гц): 1.70 (3H, с, Н-15), 2.17 (3H, с, Н-10), 2.58 (3H, с, Н-12), 6.12 (1H, с, Н-4), 6.63 (2H, АВ-сист.,  $J_{AB} = 3.8$  Гц, Н-19), 6.71 (2H, АВ-сист.,  $J_{AB} = 3.8$  Гц, Н-20), 7.05 (1H, с, Н-14), 7.25 (1H, с, Н-17), 7.45 (2H, АВ-сист.,  $J_{AB} = 8.6$  Гц, Н-23), 7.66 (2H, АВ-сист.,  $J_{AB} = 8.6$  Гц, Н-24), 8.83 (1H, с, NH), 10.26 (1H, с, OH-9), 11.97 (1H, шс, OH-7). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м. д.): 8.4 (C-10), 13.2 (C-12), 30.5 (C-15), 60.6 (C-9b), 87.85 (C-4), 97.5 (C-6), 103.6 (C-9a), 104.5 (C-14), 107.9 (C-8), 110.9 (C-2), 114.8 (C-21), 122.16 (C-25), 125.2 (C-23), 128.7 (C-19), 130.2 (C-20), 132.6 (C-24), 135.8 (C-17), 137.05 (C-22), 139.9 (C-18), 143.7 (C-13), 148.5 (C-11), 151.1 (C-3), 151.2 (C-5a), 152.4 (C-9), 155.9 (C-7), 165.8 (C-16), 174.2 (C-4a), 196.2 (C-1).

#### Исследование влияния соединений на активность Tdp1 и Tdp2

Ингибирующие свойства соединений по отношению к ферменту Tdp1 изучали с использованием методики, разработанной ранее группой [26]. В качестве биосенсора использовали 16-мерный одноцепочечный олигонуклеотид, несущий флуорофор (FAM) на 5'-конце и тушитель (BHQ1) на 3'-конце. При инкубации такой ДНК с ферментом тушитель удалялся за счет активности Tdp1, что приводило к флуоресценции. Реакцию проводили при разных концентрациях ингибиторов (1.5 % ДМСО, Sigma, США, в контрольных образцах). Реакционные смеси содержали буфер Tdp1 (50 ммоль/л Tris-HCl pH 8.0, 50 ммоль/л NaCl и 7 ммоль/л  $\beta$ -меркаптоэтанола), 50 нмоль/л биосенсора и испытуемый ингибитор. Ферментом Tdp1 (1.5 нмоль/л) запускали реакцию. Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью флуориметра POLARstar OPTIMA (BMG LABTECH, GmbH, Германия). Значения концентраций полумаксимального ингибирования  $\text{IC}_{50}$  определяли как минимум в трех независимых экспериментах и рассчитывали с использованием встроенного программного обеспечения MARS Data Analysis 2.0 (BMG LABTECH, GmbH, Германия).

Активность Tdp2 измеряли аналогично [25]: использовали 16-мерный олигонуклеотид, несущий остаток тирозина на 5'-конце и краситель (FAM) на 3'-конце. При инкубации ДНК с ферментом тирозин отщеплялся, что приводило к изменению электрофоретической подвижности олигонуклеотида. Реакцию проводили при разных концентрациях ингибитора, контрольные образцы содержали 10 % ДМСО. Реакционные смеси содержали буфер Tdp2 (50 ммоль/л Tris-HCl pH 8.0, 50 ммоль/л NaCl, 8 ммоль/л MgCl<sub>2</sub> и 7 ммоль/л β-меркаптоэтанола), 100 нмоль/л биосенсора и испытуемый ингибитор. Tdp2 (200 нмоль/л) запускали реакцию. Реакцию останавливали через 15 мин путем добавления буфера для нанесения на полиакриламидный гель (ПААГ) и прогревания до 90 °С в течение 7 мин. Электрофорез проводили в 20%-м денатурирующем ПААГ. Продукты реакции анализировали с помощью сканера Typhoon FLA 9500 phosphorimager (GE Healthcare), количественную обработку проводили с использованием программного обеспечения QuantityOne 4.6.7.

**Исследование собственной цитотоксичности соединений и их влияния на цитотоксический эффект топотекана и этопозида**

Цитотоксичность соединений в отношении клеточных линий HeLa (рак шейки матки человека), HCT-116 (колоректальная карцинома человека), MRC-5 (фибробласты легких человека) и HEK293A (эмбриональная почка человека) исследовали с использованием МТТ-теста путем колориметрического измерения количества

формазана, превращенного из 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2H-тетразолия бромидом (МТТ) клетками, подвергшимися воздействию соединений. Клетки выращивали в среде DMEM с 50 МЕ/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (MP Biomedicals, США) и 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (ООО "БиолоТ", Россия) в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. После достижения 30–50 % конfluenceности в среду добавляли испытуемые соединения. Объем добавляемых реагентов составлял 1/100 от общего объема культуральной среды, а количество ДМСО – 1 % от конечного объема. С каждым ингибитором проводили не менее двух независимых испытаний. Для оценки влияния ингибиторов на цитотоксический эффект топотекана (Selleck Chemicals, США) и этопозида (Фармахеми Б.В., Нидерланды) варьировали концентрации топотекана или этопозида в присутствии или в отсутствие 10 мкмоль/л ингибиторов Tdp1. Было проведено не менее двух независимых испытаний с каждым ингибитором в сочетании с топотеканом или этопозидом.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

В качестве базовых соединений для синтеза были выбраны гидразонотиазольные производные **4a,b**, методика получения которых отработана нами ранее [9]. На втором этапе проводили конденсацию с соответствующими фенилгидразидами (схема 1). Выбор гидразинов для синтеза осуществлялся на основании литературных данных о региоселективности реакции [27], выходах и цитотоксичности соответствующих продуктов

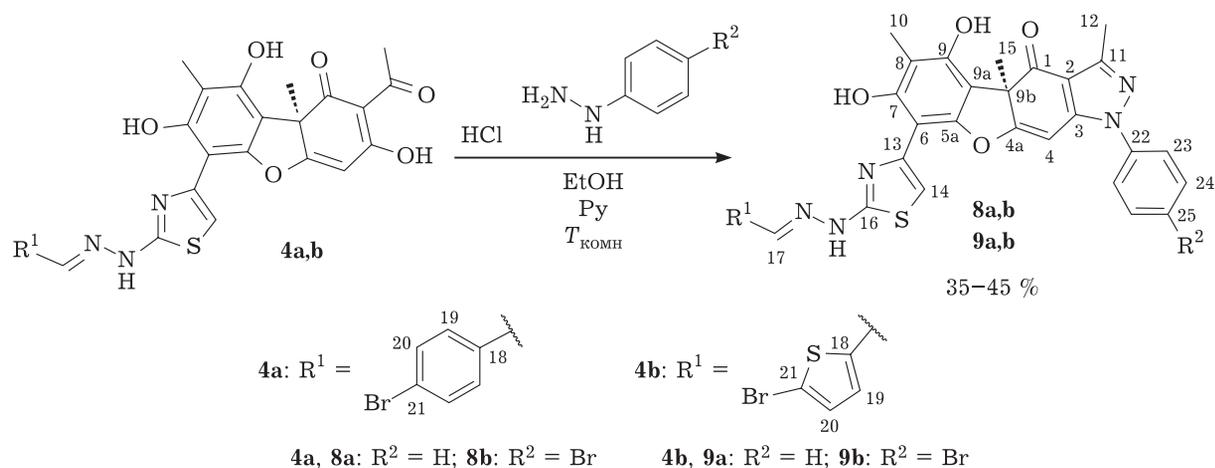


Схема 1.

реакции усниновой кислоты с фенилгидразинами [28–34], а также принимая во внимание предположение, что *para*-галогенфенильный фрагмент является фармакофором по отношению к Tdp1 [6].

Реакцию соединений **4a,b** с фенилгидразинами проводили в условиях, разработанных нами ранее для реакции усниновой кислоты с фенилгидразинами [28]. Однако выходы пиразольных соединений **8a,b–9a,b** оказались невысокими (33–40 %), в отличие от аналогичных реакций фенилгидразонов с усниновой кислотой (80–90 %). Замена растворителя на метанол и снижение температуры проведения реакции привели к увеличению времени реакции, но не к повышению выхода целевых соединений. Вклад в снижение выхода также внесла необходимость очистки продукта колоночной хроматографией.

Таким образом, реакцией гидразонотиазольных производных усниновой кислоты с фенилгидразинами были получены новые соединения **8a,b–9a,b**, содержащие пиразольные циклы, аннелированные с кольцом С усниновой кислоты.

Все изученные соединения ингибировали Tdp1 в субмикромольном диапазоне концентраций (табл. 1). По эффективности ингибирования Tdp1 бидериватизированные соединения **8a,b–9a,b** занимают промежуточную позицию между пиразольным производным усниновой кислоты **7b** ( $IC_{50} = 2.9$  мкмоль/л) и гидразонотиазолами **4a,b** ( $IC_{50} = 0.026$  и  $0.088$  мкмоль/л соответственно) [6, 9].

Полученные соединения проявили активность в отношении Tdp2, подавляя активность Tdp2 на 80–20 % в концентрации 500 мкмоль/л (см. табл. 1). При этом более активными оказались соединения, содержащие 4-бромфенильный заместитель в пиразольном цикле (**8b**, **9b**). Эффективность ингибирования Tdp2 этими соединениями существенно превосходит эффективность опубликованных ранее производных усниновой кислоты **6a–c** (40–70 % в концентрации 1 ммоль/л) [25].

Бидериватизированные производные усниновой кислоты оказались нетоксичны для всех изученных клеточных линий, а именно: для двух опухолевых (HeLa, карцинома шейки матки; HCT-116, колоректальная карцинома) и двух нераковых (MRC-5, фибробласты легких; HEK293A, почки эмбриона человека) (рис. 3). Более того, соединения в высоких концентрациях стимули-

ТАБЛИЦА 1

Влияние соединений на активность Tdp1 и Tdp2

Соединение	$IC_{50}$ , мкмоль/л Tdp1	Остаточная активность Tdp2, % (концентрация ингибитора 500 мкмоль/л)
<b>8a</b>	$0.34 \pm 0.01$	$80 \pm 20$
<b>8b</b>	$0.5 \pm 0.3$	$20 \pm 10$
<b>9a</b>	$0.34 \pm 0.1$	$80 \pm 30$
<b>9b</b>	$0.3 \pm 0.2$	$20 \pm 10$

ровали метаболическую активность клеток. Так, согласно данным МТТ-теста, соединение **9b** стимулировало рост клеток в 1.5–2 раза в концентрации 100 мкмоль/л; наименее выраженным стимулирующим эффектом обладало соединение **8a** (см. рис. 3).

Следует отметить, что другое бидериватизированное производное усниновой кислоты **7b** (см. рис. 2), содержащее пиразольный фрагмент в кольце С и цианоэтильный вместо гидразонотиазольного фрагмента в кольце А, таким стимулирующим действием в отношении метаболической активности клеток не обладало [6], а производные **4a,b** с гидразонотиазольными заместителями в кольце А проявляли выраженную цитотоксическую активность ( $CC_{50}$  от 3 мкмоль/л для разных типов клеток) [6, 9].

Далее мы исследовали способность соединений сенсibilизировать цитотоксический эффект топотекана и этопозид на клетках различных типов, используя соединения в нетоксичной и не стимулирующей рост клеток концентрации 10 мкмоль/л и топотекан или этопозид в разных концентрациях. Видно (рис. 4), что сенсibilизирующее действие соединений в случае топотекана проявилось только на клетках HeLa. В отношении нераковых клеток HEK293A и MRC-5 ни одно соединение не оказало усиливающего влияния на цитотоксичность топотекана. Более того, соединения до некоторой степени защищают клетки HEK293A (см. рис. 4, а) от действия топотекана. Такой “защитный” эффект в отношении нераковых клеток мы наблюдали ранее [35].

В отношении опухолевых клеток HeLa (см. рис. 4, в), но не HCT-116 (см. рис. 4, г) соединения проявили сенсibilизирующий эффект в сочетании с топотеканом. Наиболее эффективным сенсibilизатором оказалось соединение **8a**, которое также практически не стимулировало метаболическую активность клеток (см. выше), что указывает на безопасность его применения и в совокупности с сенсibilизирующим эффек-

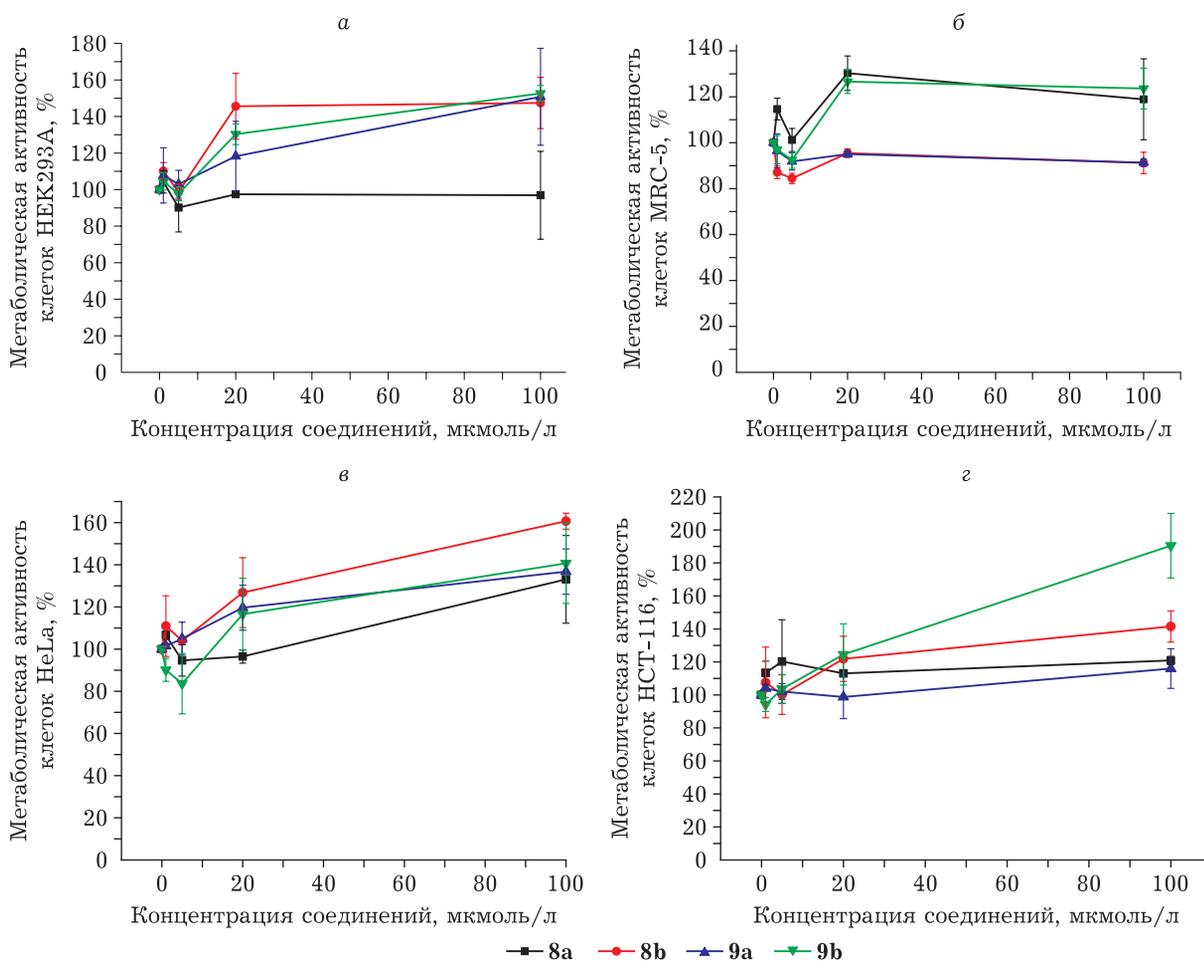


Рис. 3. Влияние соединений **8a,b**–**9a,b** на метаболическую активность клеток HEK293A, MRC-5, HeLa и HCT-116 по данным МТТ-теста.

том позволяет рассматривать его в качестве кандидата для дальнейших исследований.

Влияния на действие этопозида не выявлено ни для одного соединения и в отношении ни одной из изученных линий клеток (данные не приведены). Вероятно, это связано с низкой концентрацией соединений, использованных в комбинации с этопозидом. Поскольку эксперименты по собственной цитотоксичности (см. рис. 3) показали, что в концентрациях 20 и 100 мкмоль/л соединения стимулируют метаболическую активность клеток, мы использовали нестимулирующую концентрацию 10 мкмоль/л. Для ингибирования Tdp2 требуются более высокие концентрации.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований были синтезированы новые производные усниновой

кислоты, содержащие пиразольные циклы, аннелированные с кольцом С, обладающие ингибирующим действием в отношении ферментов репарации ДНК человека Tdp1 и Tdp2. Выявлено влияние структуры заместителя в пиразольном цикле на ингибирующую активность в отношении Tdp2, более активными ингибиторами оказались соединения, содержащие 4-бромфенильный заместитель. Показано, что новые соединения не проявляют цитотоксичность в дозах до 100 мкмоль/л, более того, некоторые соединения в высоких концентрациях стимулируют метаболическую активность клеток. Отсутствие цитотоксичности является благоприятным фактором с точки зрения собственных токсических эффектов при применении данных соединений в качестве компонента противоопухолевой терапии. При этом при выборе соединений и доз следует иметь в виду способность соединений стимулировать выживаемость клеток.

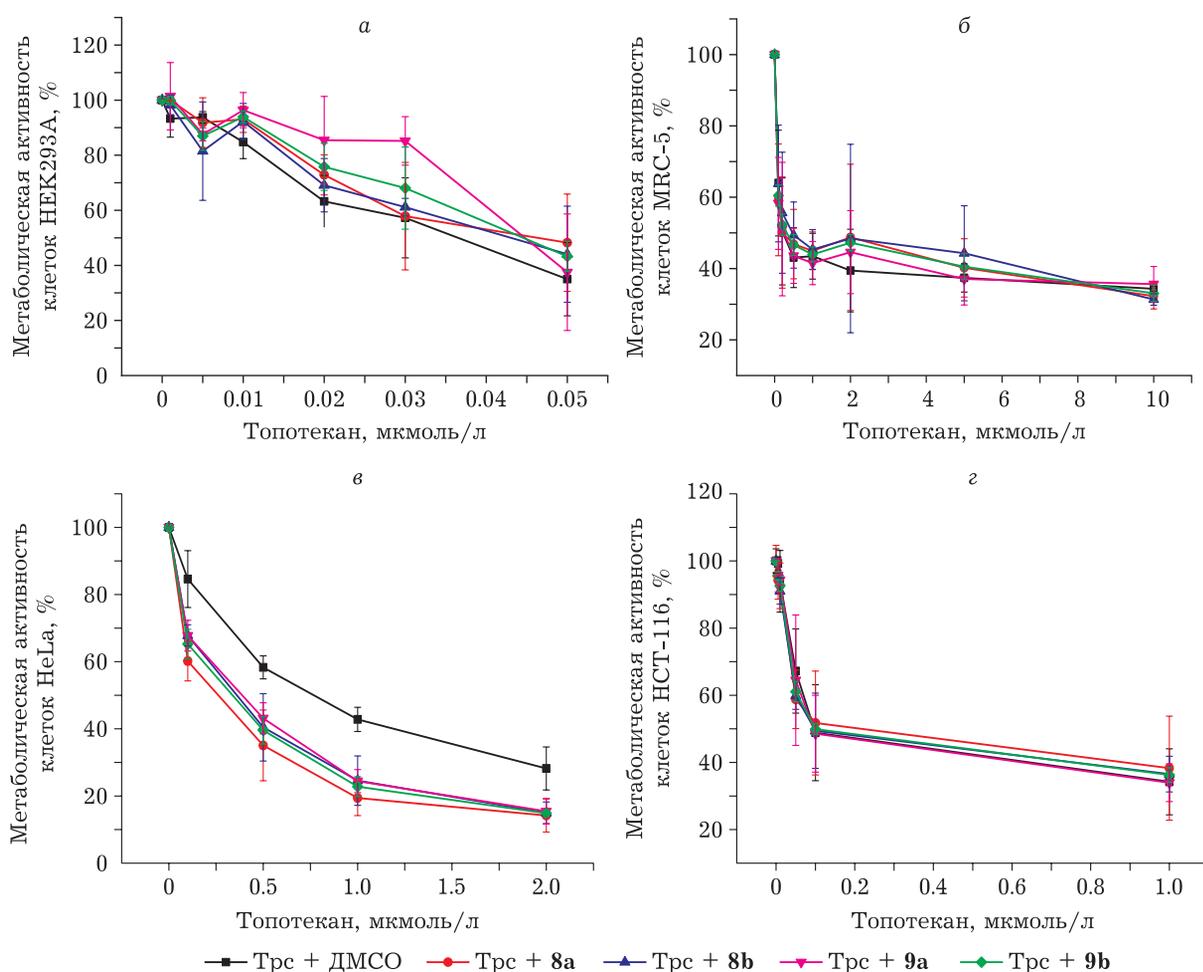


Рис. 4. Влияние соединений 8a,b-9a,b на цитотоксический эффект топотекана в отношении клеток HEK293A, MRC-5, HeLa и HCT-116 по данным МТТ-теста.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 21-14-00105.

Авторы выражают благодарность Химическому исследовательскому центру коллективного пользования СО РАН (Новосибирск) за проведение спектральных и аналитических измерений.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pommier Y., Leo E., Zhang H., Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs // *Chem. Biol.* 2010. Vol. 28, No. 17(5). P. 421–433.
- Pommier Y., Huang S. Y., Gao R., Das B. B., Murai J., Marchand C. Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2) // *DNA Repair.* 2014. Vol. 19. P. 114–129.
- Murai J., Huang S. Y., Das B. B., Dexheimer T. S., Takeda S., Pommier Y. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1) repairs DNA damage induced by topoisomerases I and II and base alkylation in vertebrate cells // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 13, No. 287(16). P. 12848–12857.

- Zeng Zh., Sharma A., Ju L., Murai J., Umans L., Vermeire L., Pommier Y., Takeda Sh., Huylebroeck D., Caldecott K. W., El-Khamisy Sh. F. TDP2 promotes repair of topoisomerase I-mediated DNA damage in the absence of TDP1 // *Nucleic Acids Research.* 2012. Vol. 40, No. 17. P. 8371–8380.
- Maede Y., Shimizu H., Fukushima T., Kogame T., Nakamura T., Miki T., Takeda S., Pommier Y., Murai J. Differential and common DNA repair pathways for topoisomerase I- and II-targeted drugs in a genetic DT40 repair cell screen panel // *Mol. Cancer Ther.* 2014. Vol. 13, No. 1. P. 214–220.
- Zakharenko A. L., Luzina O. A., Chepanova A. A., Dyrkheeva N. S., Salakhutdinov N. F., Lavrik O. I. Natural products and their derivatives as inhibitors of the DNA repair enzyme tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 17, No. 24(6). Art. 5781.
- Dexheimer T. S., Antony S., Marchand C., Pommier Y. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase as a target for anticancer therapy // *Anticancer Agents Med. Chem.* 2008. Vol. 8, No. 4. P. 381–389.
- Kawale A. S., Povirk L. F. Tyrosyl-DNA phosphodiesterases: rescuing the genome from the risks of relaxation // *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 46, No. 2. P. 520–537.

- 9 Filimonov A. S., Chepanova A. A., Luzina O. A., Zakharenko A. L., Zakharova O. D., Ilina E. S., Dyrkeeva N. S., Kuprushkin M. S., Kolotaev A. V., Khachatryan D. S., Patel J., Leung I. K. H., Chand R., Ayine-Tora D. M., Reynisson J., Volcho K., Salakhutdinov N. F., Lavrik O. I. New hydrazinotriazole derivatives of usnic acid as potent Tdp1 inhibitors // *Molecules*. 2019. Vol. 24. Art. 3711.
- 10 Zhang Y., Yang H., Wang F. T., Peng X., Liu H. Y., Li Q. J., An L. K. Discovery, enantioselective synthesis of myrtilcommulone E analogues as tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 inhibitors and their biological activities // *Eur. J. Med. Chem.* 2022. Vol. 238. Art. 114445.
- 11 Zhang Y., He X. Z., Yang H., Liu H. Y., An L. K. Robust adial A and B from *Eucalyptus globulus* Labill. and their anticancer activity as selective tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 inhibitors // *Phytother. Res.* 2021. Vol. 35, No. 9. P. 5282–5289.
- 12 Ribeiro C. J. A., Kankanala J., Xie J., Williams J., Aihara H., Wang Z. Triazolopyrimidine and triazolopyridine scaffolds as TDP2 inhibitors // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2019. Vol. 29. No. 2. P. 257–261.
- 13 Hornyak P., Askwith T., Walker S., Komulainen E., Paradowski M., Pennicott L. E., Bartlett E. J., Brissett N. C., Raoof A., Watson M., Jordan A. M., Ogilvie D. J., Ward S. E., Atack J. R., Pearl L. H., Caldecott K. W., Oliver A. W. Mode of action of DNA-competitive small molecule inhibitors of tyrosyl DNA phosphodiesterase 2 // *Biochem. J.* 2016. Vol. 473, No. 13. P. 1869–1879.
- 14 Marchand C., Abdelmalak M., Kankanala J., Huang S. Y., Kiselev E., Fesen K., Kurahashi K., Sasanuma H., Takeda S., Aihara H., Wang Z., Pommier Y. Deazaflavin inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (TDP2) specific for the human enzyme and active against cellular TDP2 // *ACS Chem. Biol.* 2016. Vol. 11, No. 7. P. 1925–1933.
- 15 Kankanala J., Ribeiro C. J. A., Kiselev E., Ravji A., Williams J., Xie J., Aihara H., Pommier Y., Wang Z. Novel deazaflavin analogues potently inhibited tyrosyl DNA phosphodiesterase 2 (TDP2) and strongly sensitized cancer cells toward treatment with topoisomerase II (TOP2) poison etoposide // *J. Med. Chem.* 2019. Vol. 9, No. 62(9). P. 4669–4682.
- 16 Raoof A., Depledge P., Hamilton N. M., Hamilton N. S., Hitchin J. R., Hopkins G. V., Jordan A. M., Maguire L. A., McGonagle A. E., Mould D. P., Rushbrooke M., Small H. F., Smith K. M., Thomson G. J., Turlais F., Waddell I. D., Waszkowycz B., Watson A. J., Ogilvie D. J. Toxoflavins and deazaflavins as the first reported selective small molecule inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase II // *J. Med. Chem.* 2013. Vol. 56, No. 16. P. 6352–6370.
- 17 Komulainen E., Pennicott L., Le Grand D., Caldecott K. W. Deazaflavin inhibitors of TDP2 with cellular activity can affect etoposide influx and/or efflux // *ACS Chem. Biol.* 2019. Vol. 14, No. 6. P. 1110–1114.
- 18 Kiselev E., Ravji A., Kankanala J., Xie J., Wang Z., Pommier Y. Novel deazaflavin tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (TDP2) inhibitors // *DNA Repair*. 2020. Vol. 85. Art. 102747.
- 19 Yu L. M., Hu Z., Chen Y., Ravji A., Lopez S., Plescia C. B., Yu Q., Yang H., Abdelmalak M., Saha S., Agama K., Kiselev E., Marchand C., Pommier Y., An L. K. Synthesis and structure-activity relationship of furoquinolinediones as inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (TDP2) // *Eur. J. Med. Chem.* 2018. Vol. 10, No. 151. P. 777–796.
- 20 Kont Y. S., Dutta A., Mallisetty A., Mathew J., Minas T., Kraus C., Dhopeswarkar P., Kallakury B., Mitra S., Üren A., Adhikari S. Depletion of tyrosyl DNA phosphodiesterase 2 activity enhances etoposide-mediated double-strand break formation and cell killing // *DNA Repair*. 2016. Vol. 43. P. 38–47.
- 21 Yang H., Zhu X. Q., Wang W., Chen Y., Hu Z., Zhang Y., Hu D. X., Yu L. M., Agama K., Pommier Y., An L. K. The synthesis of furoquinolinedione and isoxazoloquinolinedione derivatives as selective tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (TDP2) inhibitors // *Bioorg. Chem.* 2021. Vol. 111. Art. 104881.
- 22 Senaweera S., He T., Cui H., Aihara H., Wang Z. 4-benzylideneisoquinoline-1,3(2*H*,4*H*)-diones as tyrosyl DNA phosphodiesterase 2 (TDP2) inhibitors // *Med. Chem. Res.* 2021. Vol. 30. P. 371–386.
- 23 Wang P., Elsayed M. S. A., Plescia C. B., Ravji A., Redon C. E., Kiselev E., Marchand C., Zeleznik O., Agama K., Pommier Y., Cushman M. Synthesis and biological evaluation of the first triple inhibitors of human topoisomerase 1, tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (Tdp1), and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (Tdp2) // *J. Med. Chem.* 2017. Vol. 60, No. 8. P. 3275–3288.
- 24 Kankanala J., Marchand C., Abdelmalak M., Aihara H., Pommier Y., Wang Z. Isoquinoline-1,3-diones as selective inhibitors of tyrosyl DNA phosphodiesterase II (TDP2) // *J. Med. Chem.* 2016. Vol. 59, No. 6. P. 2734–2746.
- 25 Dyrkheeva N. S., Filimonov A. S., Luzina O. A., Orlova K. A., Chernyshova I. A., Kornienko T. E., Malakhova A. A., Medvedev S. P., Zakharenko A. L., Ilina E. S., Anarbaev R. O., Naumenko K. N., Klabenkova K. V., Burakova E. A., Steetsenko D. A., Zakian S. M., Salakhutdinov N. F., Lavrik O. I. New hybrid compounds combining fragments of usnic acid and thioether are inhibitors of human enzymes TDP1, TDP2 and PARP1 // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 20, No. 22(21). Art. 11336.
- 26 Zakharenko A., Khomenko T., Zhukova S., Koval O., Zakharova O., Anarbaev R., Lebedeva N., Korchagina D., Komarova N., Vasiliev V., Reynisson J., Volcho K., Salakhutdinov N. Synthesis and biological evaluation of novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors with a benzopentathiepine moiety // *Bioorg. Med. Chem.* 2015, Vol. 23, No. 9. P. 2044–2052.
- 27 Gunawan G. A., Gimla M., Gardiner M. G., Herman-Antosiewicz A., Reekie T. A. Divergent reactivity of usnic acid and evaluation of its derivatives for antiproliferative activity against cancer cells // *Bioorg. Med. Chem.* 2023. Vol. 79. Art. 117157.
- 28 Лузина О. А., Половинка М. П., Салахутдинов Н. Ф., Толстиков Г. А. Химическая модификация усниновой кислоты. III. Реакции (+)-усниновой кислоты с замещенными фенилгидразинами // *Журн. орган. химии*. 2009. Т. 45, № 12. С. 1790–1795.
- 29 Захаренко А. Л., Лузина О. А., Соколов Д. Н., Захарова О. Д., Рахманова М. Е., Чепанова А. А., Дырхеева Н. С., Лаврик О. И., Салахутдинов Н. Ф. Производные усниновой кислоты как эффективные ингибиторы тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 // *Биоорганическая химия*. 2017. Т. 43, № 1. С. 97–104.
- 30 Kutney J. P., Sanchez I. H., Yee T. Studies in the usnic acid series. III. The base catalyzed usnic acid-isousnic acid rearrangement. The synthesis of (+)-isousnic acid // *Can. J. Chem.* 1976. Vol. 54, No. 23. P. 3721–3731.
- 31 Susithra E., Meena R., Chamundeeswari D., Rajasekhar Ch., Naveena Lavanya Latha J., Basaveswara Rao M. V. Low molecular weight non-peptidyl antimalarial leads: Lichen metabolite, usnic acid and its analogues // *Polycyclic Aromat. Compd.* 2021. Vol. 42, No. 8. P. 5020–5028.
- 32 Guo H.-Y., Jin Ch. M., Zhang H.-M., Jin Ch.-M., Shen Q.-K., Quan Zh.-Sh. Synthesis and biological evaluation of (+)-usnic acid derivatives as potential anti-toxoplasma gondii

- agents // *J. Agric. Food Chem.* 2019. Vol. 67, No. 34. P. 9630–9642.
- 33 Pyrczak-Felczykowska A., Narlawar R., Pawlik A., Guzow-Krzemińska B., Artymiuk D., Hać A., Rys K., Rendina L. M., Reekie T. A., Herman-Antosiewicz A., Kassiou M. Synthesis of usnic acid derivatives and evaluation of their anti-proliferative activity against cancer cells // *J. Nat. Prod.* 2019. Vol. 82, No. 7. P. 1768–1778.
- 34 Shi C.-J., Peng W., Zhao J.-H., Yang H.-L., Qu L.-L., Wang Ch., Kong L.-Y., Wang X. B. Usnic acid derivatives as tau-aggregation and neuroinflammation inhibitors // *Eur. J. Med. Chem.* 2020. Vol. 187. Art. 111961.
- 35 Ivankin D. I., Kornienko T. E., Mikhailova M. A., Dyrkheeva N. S., Zakharenko A. L., Achara C., Reynisson J., Golyshchev V. M., Luzina O. A., Volcho K. P., Salakhutdinov N. F., Lavrik O. I. Novel TDP1 inhibitors: Disubstituted thiazolidine-2,4-diones containing monoterpene moieties // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 14, No. 24(4). Art. 3834.