

УДК 547.94:834.2

DOI: 10.31040/2222-8349-2019-0-4-54-59

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ НОВЫХ ПРОТИВОГРИППОЗНЫХ АГЕНТОВ – АДДУКТОВ ДИЛЬСА-АЛЬДЕРА 3-*N*-ЗАМЕЩЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ (–)-ЦИТИЗИНА С ИМИДАМИ МАЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

© А.В. Ковальская, П.Р. Петрова, Т.В. Иванова, И.П. Цыпышева

Синтез библиотек химических соединений с последующим *in vitro* и/или *in vivo* скринингом их биологической активности представляют собой традиционную стратегию поиска новых биологически активных веществ. Использование природных соединений для разработки новых фармакологических агентов имеет определенные преимущества, так как часто биологическая активность предшественника уже известна, а некоторые природные соединения доступны в энантиомерно чистом виде, что особенно важно для создания селективных «мишень специфичных» лекарственных средств.

Хинолизидиновый алкалоид (–)-цитизин – мажорный метаболит растений семейства бобовых (*Fabaceae*), и многочисленные его синтетические производные обладают широким фармакологическим профилем; они проявляют антидиабетическую, гипотензивную, противоопухолевую, противопаразитарную и противовирусную активность. Среди производных (–)-цитизина с мочевиными, амидными и имидными фрагментами найдены соединения, эффективно ингибирующие репродукцию вируса гриппа А (H1N1) и вируса парагриппа НРIV3.

В настоящей работе представлены результаты скрининга цитотоксических свойств ряда аддуктов Дильса-Альдера 3-*N*-замещенных производных (–)-цитизина с имидами малеиновой кислоты в отношении условно-нормальных клеток человека НЕК293, что в совокупности с результатами изучения их противогриппозных свойств может служить критерием оценки селективности их действия.

Ключевые слова: хинолизидиновые алкалоиды, (–)-цитизин, аддукты Дильса-Альдера, цитотоксичность, НЕК293.

Введение. В основе традиционной стратегии поиска и создания новых биологически активных веществ (БАВ), направленной на выявление и отбор перспективных молекул, лежат два основных этапа – это синтез библиотек химических соединений и последующий *in vitro* и/или *in vivo* скрининг их биологических/фармакологических свойств. Залогом успеха этого подхода являются адекватный выбор исходного соединения и эффективность методов его химических трансформаций – простых, надежных, если необходимо стереоселективных, и, по возможности, технологичных. Выбор в качестве стартовых синтетических блоков природных соединений имеет ряд преимуществ.

Так, если биологическая активность природного соединения известна, то направление поиска становится более очевидным. Кроме того, природные соединения являются великолепными источниками хиральности, а это особенно важно для возможного в перспективе создания селективных «мишень специфичных» терапевтических агентов.

Представитель трициклических хинолизидиновых алкалоидов – (–)-цитизин **1** (рис. 1), выделяемый из растений семейства бобовых (*Fabaceae*), обладает уникальным фармакологическим потенциалом; ему свойственна высокая нейрофармакологическая активность (он является лигандом $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 7$ подтипов

КОВАЛЬСКАЯ Алена Витальевна – к.х.н., Уфимский Институт химии УФИЦ РАН,

e-mail: tsipisheva@anrb.ru

ПЕТРОВА Полина Радиковна, Уфимский Институт химии УФИЦ РАН,

e-mail: tsipisheva@anrb.ru

ИВАНОВА Татьяна Викторовна, Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: tsipisheva@anrb.ru

ЦЫПЫШЕВА Инна Петровна – к.х.н., Уфимский Институт химии УФИЦ РАН,

e-mail: tsipisheva@anrb.ru

никотинового ацетилхолинового рецептора), до настоящего времени (–)-цитизин остается основным средством для лечения никотиновой зависимости [1], а препарат Цититон (гидрохлорид (–)-цитизина) применяется в медицинской практике в качестве дыхательного analeptika [2].

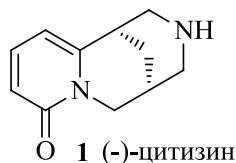


Рис. 1. Хинолизидиновый алкалоид (–)-цитизин 1

Кроме того, (–)-цитизин *in vivo* модулирует локомоторную активность [3], проявляет антидепрессантные, анальгетические и ноотропные свойства [4], предотвращает гибель допамиnergических нейронов при воздействии нейротоксина МФТП [5]. В последние два десятилетия (–)-цитизин стал популярной исходной матрицей для синтеза на его основе веществ с биологическими свойствами иной направленности – антидиабетическими, гипотензивными, противоопухолевыми, противопаразитарными, противовирусными [4, 6–8]. Среди производных (–)-цитизина с мочевиными, амидными и имидными фрагментами найдены соединения, эффективно ингибирующие репродукцию вируса гриппа А (H1N1) и вируса парагриппа НРIV3 [8].

В то же время известно, что параллельная оценка цитотоксических свойств новых БАВ по отношению к условно-нормальным клеткам НЕК293 (эмбриональные клетки почки человека) играет важнейшую роль в оценке селективности их действия. Например, в случае с противовирусной активностью, соединение должно эффективно ингибировать репродукцию вируса, но не должно отрицательно влиять на здоровые клетки человеческого организма. С целью определения цитотоксических свойств новых производных (–)-цитизина с доказанными противогриппозными свойствами нами проведено дополнительное исследование их влияния на метаболическую активность клеток линии НЕК293 в условиях МТТ-теста.

Результаты и их обсуждение. Исходные 3-*N*-замещенные производные (–)-цитизина **2-6** были получены в соответствии с известными литературными методами [9]; синтез аддуктов **14a,b – 24a,b** из соединений **2-6** и коммерчески доступных диенофилов – имидов **7-13**, описан

нами ранее [10, 11, 7]. Все 3aS,4R,12aR,12bS («α-эндо») и 3aR,4S,12aS,12bR («β-эндо») аддукты **14a,b – 24a,b** (рис. 2) были выделены в индивидуальном виде методом колоночной хроматографии на SiO₂. Строение и стереохимия **14a,b – 24a,b** подтверждены методами ЯМР спектроскопии; алгоритм отнесения аддукта к «α-эндо» или «β-эндо» ряду подробно описаны нами в [10].

Согласно полученным ранее данным все аддукты «α-эндо» ряда проявили высокую противогриппозную активность (штамм вируса гриппа А (H1N1)pdm09); причем соединения **14a, 15a, 16a, 23a и 24a** являлись лидирующими по значениям IC₅₀ (31, 14, 5, 8 и 4 μМ соответственно) [7] (рис. 3).

Цитотоксические свойства синтезированных соединений **14a,b – 24a,b** в отношении клеточной линии НЕК293 были оценены на основе результатов МТТ-теста. В основе этого метода лежит способность живых клеток восстанавливать желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) в пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формазана, а цитотоксичность веществ оценивается путем инструментально регистрируемого уменьшения оптической плотности тестовых проб по сравнению с контрольными. В эксперименте использовали клетки линии НЕК293, полученные из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург) и витальный краситель PrestoBlue® (Invitrogen, США). Степень редукции красителя измеряли с помощью мультипланшетного анализатора 2300 EnSpire® Multimode Plate Readers («Perkin Elmer», США). Клетки НЕК293 высаживали по 25×10³ клеток на лунку в 96-луночные планшеты в 100 μл среды (DMEM, 10% FBS, 2 mM L-Glu, 50 мкг/мл гентамицин). Далее после образования монослоя (~24 часа) добавляли тестируемые вещества в концентрациях 1; 10; 100 μМ (0.1% ДМСО) и инкубировали 48 часов при 37°C, 5% CO₂. По окончании инкубации проводили смену среды и к клеткам добавляли МТТ-реагент в соответствии с рекомендациями производителя. Флуоресценцию красителя измеряли при длине волны 590 нм, процент метаболической активности клеток рассчитывали по отношению к контролю, который принимали за 100%, где клетки инкубировали в отсутствие соединений, но в присутствии растворителя ДМСО (0.1%). Вычисление значения IC₅₀, характеризующего параметры цитотоксичности

(концентрация соединения, необходимая для 50% ингибирования жизнеспособности клеток *in vitro*), построение графиков зависимости logC от % ингибирования и статистическую обработку данных проводили в программах Excel и GraphPad Prism v.5.0 [12].

Результаты проведенного скрининга цитотоксических свойств аддуктов **14a,b** – **24a,b** представлены в табл. и на рис. 4.

Как оказалось, практически все синтезированные аддукты **14a,b** – **24a,b** не проявляют цитотоксических свойств (табл.). Лишь соединения **15a** и **15b** угнетают жизнеспособность клеток НЕК293 с $IC_{50} = 207.6$ и $IC_{50} = 191.0$ μM соответственно (табл., рис. 4А и 4В).

В то же время « β -эндо» диастереомер **16b** (рис. 3) проявляет цитотоксические свойства по отношению к клеткам НЕК293 со значением $IC_{50} = 59.9$ μM (рис. 4С), но для лидирующего по противогриппозной активности « α -эндо» ад-

дукта **16a** цитотоксические свойства не были обнаружены.

Заключение. Таким образом, полученные в результате проведенного скрининга данные об отсутствии цитотоксических свойств у лидирующих (по выявленным противогриппозным свойствам) аддуктов Дильса-Альдера 3-*N*-замещенных производных (-)-цитизина с имидами малеиновой кислоты, подтверждают перспективность выбранных химических трансформаций в направлении к новым и эффективным противогриппозным агентам, одновременно являясь критерием оценки селективности их вирус-ингибирующего действия.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 18-33-00877_мол_а (ППР, КАВ), государственного задания УФИХ УФИЦ РАН № АААА-А17117011910025-6 (ЦИП) и ИБГ УФИЦ РАН № АААА-А16-116020350033-8 (ИТВ).

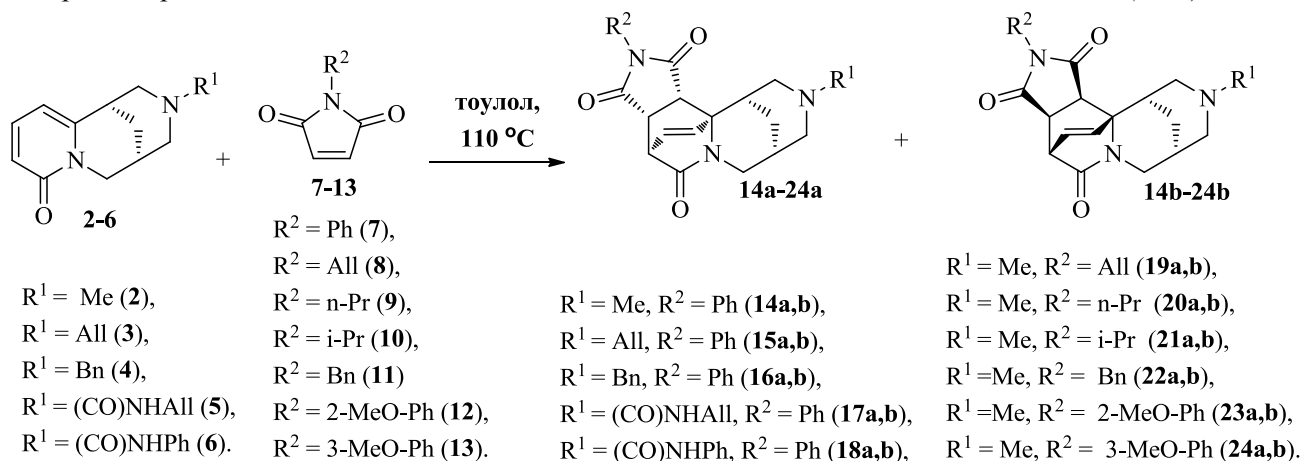


Рис. 2. Производные (-)-цитизина 2-42

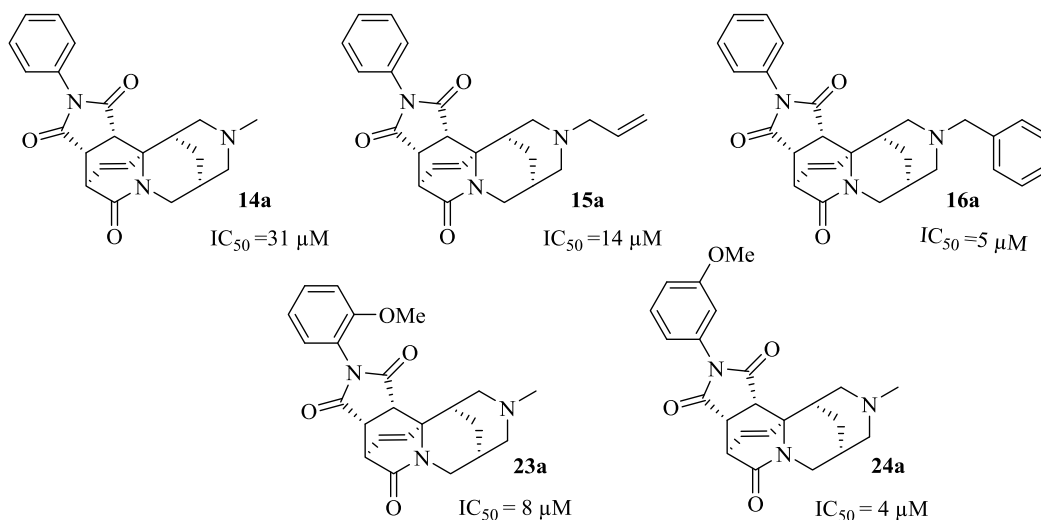
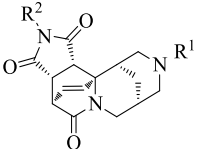
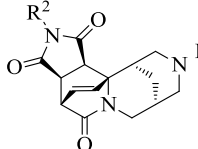


Рис. 3. Аддукты **14a–16a**, **23a** и **24a** с высокой противогриппозной активностью

Цитотоксичность **14a,b** – **24a,b** по отношению к клеткам HEK293

|  «α-эндо» аддукты | | | |  «β-эндо» аддукты | | | |
|--|----------------|-----------------|------------------------------------|---|----------------|-----------------|------------------------------------|
| No | R ¹ | R ² | IC ₅₀ , μM ^a | No | R ¹ | R ² | IC ₅₀ , μM ^a |
| 14a | Me | Ph | > 1 mM | 14b | Me | Ph | 59.9 |
| 15a | All | Ph | 207.6 | 15b | All | Ph | 191.0 |
| 16a | Bn | Ph | > 1 mM | 16b | Bn | Ph | > 1 mM |
| 17a | (CO)NHA1 | Ph | > 1 mM | 17b | (CO)NHA1 | Ph | > 1 mM |
| 18a | (CO)NHPh | Ph | > 1 mM | 18b | (CO)NHPh | Ph | > 1 mM |
| 19a | Me | All | > 1 mM | 19b | Me | All | > 1 mM |
| 20a | Me | Pr | > 1 mM | 20b | Me | Pr | > 1 mM |
| 21a | Me | Pr ⁱ | > 1 mM | 21b | Me | Pr ⁱ | > 1 mM |
| 22a | Me | Bn | > 1 mM | 22b | Me | Bn | > 1 mM |
| 23a | Me | 2-MeOPh | > 1 mM | 23b | Me | 2-MeOPh | > 1 mM |
| 24a | Me | 3-MeOPh | > 1 mM | 24b | Me | 3-MeOPh | > 1 mM |

Примечание. ^a В результате МТТ-теста; время инкубации клеток с соединениями – 48 часов.

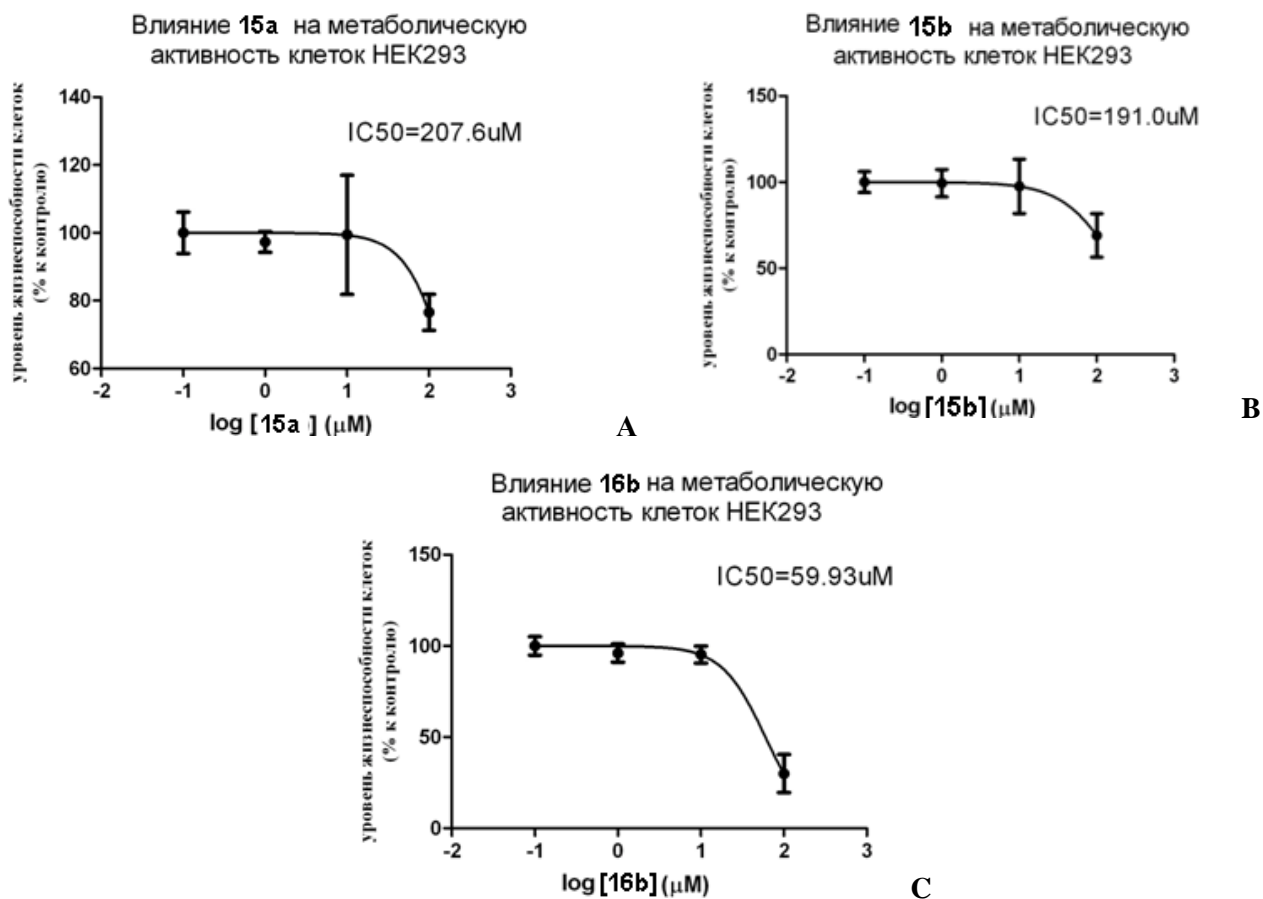


Рис. 4. Влияние соединений **15a**, **15b** **16b** на метаболическую активность клеток HEK293

Литература

1. Tutka P., Zatonski W. Cytisine for the treatment of nicotine addiction: from a molecule to therapeutic efficacy // *Pharmacol. Rep.* 2005. V. 58. P. 777–798.
2. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна. 2007. 1200 с.
3. Reavill C., Stolerman I.P. Locomotor activity in rats after administration of nicotinic agonists intracerebrally // *Br. J. Pharmacol.* 1990. V. 99. P. 273–278.
4. Rouden J., Lasne M.-C., Blanchet J., Baudoux J. (–)-Cytisine and Derivatives: Synthesis, Reactivity, and Applications // *Chem. Rev.* 2014. V. 114. P. 712–778.
5. Ferger B., Spratt C., Teismann P., Seitz G., Kuschinsky K. Effects of cytisine on hydroxyl radicals in vitro and MPTP-induced dopamine depletion *in vivo* // *Eur. J. Pharmacology.* 1998. V. 360. P. 155–163.
6. Tsyppsheva I.P., Kovalskaya A.V., Lobov A.N., Zarubaev V.V., Karpinskaya L.A., Petrenko I.A., Nikolaeva E.A., Shtro A.A., Yunusov M.S. Search for compounds with antiviral activity among synthetic (–)-cytisine derivatives // *Chem. Nat. Compd.* 2013. V. 48. P. 1042–1046.
7. Tsyppsheva I., Kovalskaya A., Petrova P., Lobov A., Borisevich S., Tsyppshev D., Fedorova V., Gorbunova E., Galochkina A., Zarubaev V. Diels-Alder adducts of 3-*N*-substituted derivatives of (–)-cytisine as influenza A/H1N1 virus inhibitors; stereodifferentiation of antiviral properties and preliminary assessment of action mechanism // *Tetrahedron.* 2019. V. 75. P. 2933–2943.
8. Fedorova V.A., Kadyrova R.A., Slita A.V., Muryleva A.A., Petrova P.R., Kovalskaya A.V., Lobov A.N., Tsyppsheva I.P., Zarubaev V.V. Antiviral activity of amides and carboxamides of quinolizidine alkaloid (–)-cytisine against human flu virus A(H1N1) and parainfluenza virus type 3 // *Nat. Prod. Res.* 2019. In press.
9. Boido C.C., Sparatore F. Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of some cytisine derivatives // *Farmacol.* 1999. V. 54. P. 438–451.
10. Tsyppsheva I.P., Lobov A.N., Kovalskaya A.V., Vinogradov V.I., Suponitsky K.Yu., Khursan S.L., Yunusov M.S. Synthesis of Diels–Alder adducts of the quinolizidine alkaloids *N*-methylcytisine,(–)-leontidine, and (–)-thermopsine with *N*-phenylmaleimide // *Tetrahedron: Asymmetry.* 2013. V. 24. P. 1318–1323.
11. Tsyppsheva I.P., Borisevich S.S., Lobov A.N., Kovalskaya A.V., Shamukaev V.V., Safiullin R.L., Khursan S.L. Inversion of diastereoselectivity under high pressure conditions: Diels–Alder reactions of 12-*N*-substituted derivatives of (–)-cytisine with *N*-phenylmaleimide // *Tetrahedron: Asymmetry.* 2015. V. 26. P. 732–737.
12. Miller J.R., GraphPad Prism Version 4.0. Step-by-Step Examples. GraphPad Software Inc., San Diego CA, 2003.

References

1. Tutka P., Zatonski W. Cytisine for the treatment of nicotine addiction: From a molecule to therapeutic efficacy. *Pharmacol. Rep.*, 2005, vol. 58, pp. 777–798.
2. Mashkovsky M.D. Medicinal agents. Moscow, Novaya volna, 2007. 1200 p.
3. Reavill C., Stolerman I.P. Locomotor activity in rats after administration of nicotinic agonists intracerebrally. *Br. J. Pharmacol.*, 1990, vol. 99, pp. 273–278.
4. Rouden J., Lasne M.-C., Blanchet J., Baudoux J. (–)-Cytisine and Derivatives: Synthesis, Reactivity, and Applications. *Chem. Rev.*, 2014, vol. 114, pp. 712–778.
5. Ferger B., Spratt C., Teismann P., Seitz G., Kuschinsky K. Effects of cytisine on hydroxyl radicals in vitro and MPTP-induced dopamine depletion *in vivo*. *Eur. J. Pharmacology*, 1998, vol. 360, pp. 155–163.
6. Tsyppsheva I.P., Kovalskaya A.V., Lobov A.N., Zarubaev V.V., Karpinskaya L.A., Petrenko I.A., Nikolaeva E.A., Shtro A.A., Yunusov M.S. Search for compounds with antiviral activity among synthetic (–)-cytisine derivatives. *Chem. Nat. Compd.*, 2013, vol. 48, pp. 1042–1046.
7. Tsyppsheva I., Kovalskaya A., Petrova P., Lobov A., Borisevich S., Tsyppshev D., Fedorova V., Gorbunova E., Galochkina A., Zarubaev V. Diels-Alder adducts of 3-*N*-substituted derivatives of (–)-cytisine as influenza A/H1N1 virus inhibitors; stereodifferentiation of antiviral properties and preliminary assessment of action mechanism. *Tetrahedron*, 2019, vol. 75, pp. 2933–2943.
8. Fedorova V.A., Kadyrova R.A., Slita A.V., Muryleva A.A., Petrova P.R., Kovalskaya A.V., Lobov A.N., Tsyppsheva I.P., Zarubaev V.V. Antiviral activity of amides and carboxamides of quinolizidine alkaloid (–)-cytisine against human flu virus A(H1N1) and parainfluenza virus type 3. *Nat. Prod. Res.*, 2019. In press.
9. Boido C.C., Sparatore F. Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of some cytisine derivatives. *Farmacol.* 1999, vol. 54, pp. 438–451.
10. Tsyppsheva I.P., Lobov A.N., Kovalskaya A.V., Vinogradova V.I., Suponitsky K.Yu., Khursan S.L., Yunusov M.S. Synthesis of Diels–Alder adducts of the quinolizidine alkaloids *N*-methylcytisine,(–)-leontidine, and (–)-thermopsine with *N*-phenylmaleimide. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2013, vol 24, pp. 1318–1323.
11. Tsyppsheva I.P., Borisevich S.S., Lobov A.N., Kovalskaya A.V., Shamukaev V.V., Safiullin R.L., Khursan S.L. Inversion of diastereoselectivity under high pressure conditions: Diels–Alder reactions of 12-*N*-substituted derivatives of (–)-cytisine with *N*-phenylmaleimide. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2015, vol. 26, pp. 732–737.
12. Miller J.R., GraphPad prism version 4.0. Step-by-step examples. GraphPad Software Inc., San Diego CA, 2003.



**CYTOTOXICITY OF NOVEL ANTI-INFLUENZA AGENTS–DIELS-ALDER ADDUCTS
OF 3-*N*-SUBSTITUTED DERIVATIVES OF (–)-CYTISINE
WITH IMIDES OF MALEINIC ACID**

© A.V. Kovalskaya¹, P.R. Petrova¹, N.V. Ivanova¹, I.P. Tsypysheva²

¹Ufa Institute of Chemistry – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences,
69, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

²Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences,
71, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

Synthesis of libraries of chemical compounds followed by *in vitro* and/or *in vivo* screening of their biological activity is a traditional strategy of the search for new biologically active compounds. The use of natural compounds for the development of novel pharmacological agents has certain advantages, since often the biological activity of the starting natural matrix is already determined, and, moreover, some natural compounds are available in enantiomeric pure form – this is especially important for the creation of selective ‘target specific’ drugs.

Quinolizidine alkaloid (–)-cytisine – the major metabolite of legume plants (*Fabaceae*), and its numerous synthetic derivatives have a broad pharmacological profile; its exhibit antidiabetic, hypotensive, antitumor, antiparasitic and antiviral activity. Compounds that effectively inhibit reproduction of A (H1N1) influenza virus and HPIV3 parainfluenza virus were found among derivatives of (–)-cytisine with urea, amide and imide fragments.

The results of the screening of cytotoxic properties of Diels-Alder adducts of 3-*N*-substituted derivatives of (–)-cytisine with maleimides against human cells HEK293 are presented in this work. These data, together with the results of the study of their anti-influenza properties, can be a criterion for assessing the selectivity of their virus-inhibitory action.

Key words: quinolizidine alkaloids, (–)-cytisine, Diels-Alder adducts, cytotoxicity, HEK293.