

УДК 616.006

*Н.А. Мешкова, О.В. Мищенко, С.И. Пенделюк\*, Н.И. Шарыкина**ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМНУ», г. Киев**\*Киевский городской клинический онкологический центр*

## ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ $\alpha_1$ -АДРЕНОБЛОКАТОРОВ – ПРОИЗВОДНЫХ ХИНАЗОЛИНА

При изучении новых производных хиназолина получено два соединения (3105, 2156), которые на линии немелкоклеточного рака легкого человека (A549) превышают или близки по активности к тест-стандарту – препарату Эрлотиниб (Тарцева), который используется для лечения немелкоклеточного рака легкого в клинической практике.

**Ключевые слова:** производные хиназолина, докинг-анализ, противоопухолевая активность *in vitro*, линия немелкоклеточного рака легкого человека (A549).

В настоящее время значительную часть арсенала противоопухолевых средств составляют таргетные (молекулярно направленные) препараты, которые воздействуют на конкретную мишень сигнальных путей злокачественно измененной клетки [1, 2].

Среди таргетных препаратов существенное место занимают ингибиторы передачи митогенных сигналов, а именно ингибиторы активности тирозинкиназ как основной внутриклеточной части рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) [3–5].

В начале XXI ст. появились первые препараты этой направленности действия (Эрлотиниб, Гефитиниб и др.), активные при немелкоклеточном раке легких [6, 7]. В настоящее время число таких препаратов растет, и они проявляют активность при различных формах злокачественного роста.

Оказалось, что Эрлотиниб и Гефитиниб являются производными хиназолина, способными конкурентно блокировать фосфорилирование рецептора эпидермального фактора роста, препятствуя передаче митогенных сигналов [8]. В то же время производные хиназолина являются  $\alpha_1$ -адреноблокаторами – блокаторами рецептора биогенных аминов, относящегося к семейству рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCR).

Сигнальные пути EGFR и GPCR имеют способность к трансактивации (cross-talking) [9].

Таким образом, производные хиназолина, являясь  $\alpha_1$ -адреноблокаторами, могут тор-

мозить активность сигнального пути эпидермального фактора роста [10].

Поиск ингибиторов сигнальной трансдукции был начат в Институте фармакологии и токсикологии НАМНУ в 1993 г. Показана противоопухолевая активность производного хиназолина Празозина [11]. Исследования в этом направлении продолжаются. Проведены виртуальный скрининг, докинг-анализ и синтез перспективных по прогнозированию новых веществ – производных хиназолина. Результаты докинг-анализа и изучения их активности при экспериментальном опухолевом росте *in vitro* представлены в настоящей работе.

**Материал и методы.** Проведены конструирование и виртуальный скрининг новых производных хиназолина с последующим докинг-анализом [12, 13] на модельных тирозинкиназах из банка данных белков (1M17, 2ITY, 2GS2) с целью прогнозирования возможности ингибирования их активности производными хиназолина. Соединения прогнозируются как обладающие противоопухолевой активностью, когда величина энергии комплексов белков с производными хиназолина выше критерия значимости ( $\Delta E > |20|$  ккал/моль).

Цитотоксическое действие производных хиназолина изучали на культуре опухолевых клеток A549 с экспрессивной активностью рецепторов эпидермального фактора роста.

A549 – клеточная линия немелкоклеточного рака легких человека, полученная в

1972 г. D.J. Giard et al. путем культивирования эксплантов карциноматозной ткани легкого человека. Это гипотриплоидная клеточная линия с модальным числом хромосом 66, которая наблюдается в 24 % клеток [14].

Исследования были проведены на клетках немелкоклеточного рака легких человека A549, которые культивировались в питательной среде RPMI-1640 (HyClone, США) с добавлением 10%-ной эмбриональной сыворотки теленка (HyClone, США) в увлажненной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> и 95 % воздуха (стандартные условия).

Клетки были высеяны в 96-луночный планшет в концентрации 2000 клеток на лунку и культивировались при стандартных условиях в течение 5 суток (до достижения уровня конfluence 90 %).

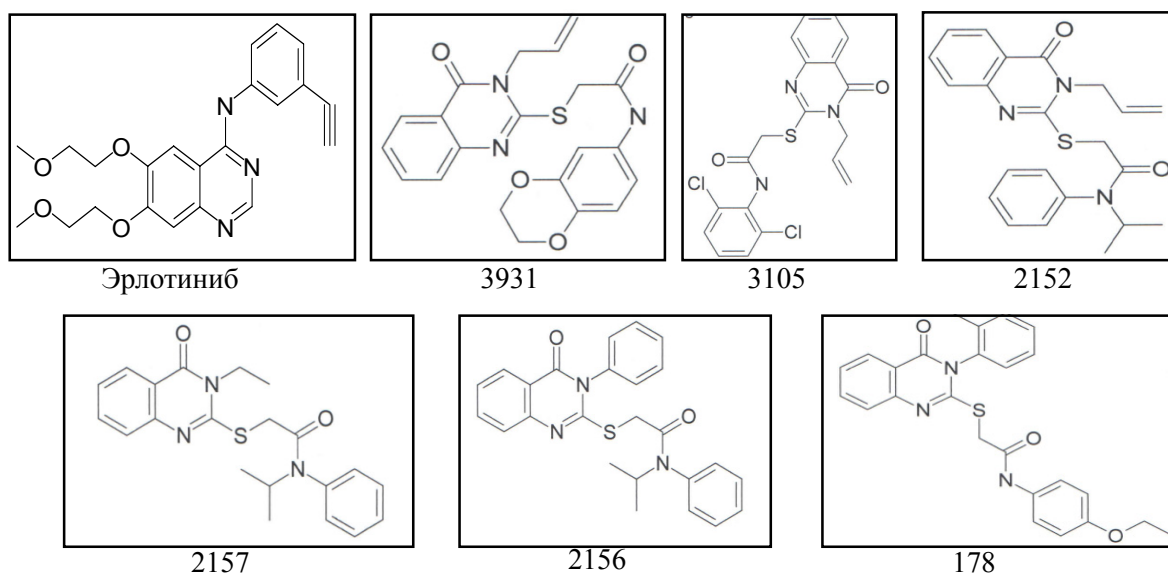
Определяли цитотоксическое действие каждого из исследуемых веществ в шести концентрациях. Для этого по 10 мг полученных веществ растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) и вносили в соответствующие лунки микротитровального планшета, содержащие клетки и питательную среду, в концентрации, при которой содержание растворителя не превышало 0,5 %. Полученные растворы разбавляли двукратными разведениями и культивировали в течение 24 часов. В планшете оставляли лунки с интактными клетками, которые служили контролем жизнеспособности клеток.

Цитотоксическую активность веществ на клетках немелкоклеточного рака легких че-

ловека A549 оценивали в колориметрическом тесте с использованием желтого красителя (3-(4,5 диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) (Applichem, Германия), который в живых клетках превращается в пурпурный формазан. После окончания экспозиции исследуемых соединений из лунок удаляли культуральную среду и вносили по 20 мкл раствора МТТ с 100 мкл свежей питательной среды и инкубировали в течение 4 часов в темноте при стандартных условиях. После этого содержимое лунок удаляли и растворяли МТТ-формазановые кристаллы, добавляя 50 мкл ДМСО в каждую лунку. Оптическую плотность окрашенных клеток измеряли на спектрофотометре для микропланшетов (АКИЦ-01, Россия) при длине волны возбуждения 490 нм. Полученные результаты статистически обрабатывали.

Цитотоксическое и антипролиферативное действие определяли с помощью показателя «ингибирующая концентрация 50» (IC<sub>50</sub> – концентрация исследуемого вещества, при которой гибнет 50 % клеток), который вычислялся по программе Origin 6.1 (OriginLab Co, США).

**Результаты.** Получены данные по докинг-анализу новых производных хиназолина, у которых величины энергий комплексов тирозинкиназ с производными хиназолина находятся в пределах [20] ккал/моль, что указывает на вероятность их ингибиторных свойств в отношении определенных тирозинкиназ – внутриклеточных отделов рецепторов EGFR (рисунок, табл. 1).



Структурные формулы Эрлотиниба и новых производных хиназолина

Таблиця 1. Результати молекулярної докінг-енергії межмолекулярного комплексу EGFR–інгібітор

Інгібітор	DeltaG_1M17	DeltaG_2GS2	DeltaG_2ITY
3913	-20.69	-23.51	-44.02
3105	-22.35	-18.03	-21.88
2152	-32.03	-8.73	-19.39
2157	-29.96	-16.72	-9.61
2156	-17.63	-30.59	-29.29
178	-16.53	-19.82	-24.16
Ерлотиніб	-39.677	-27.282	-24.651

Препаратом-стандартом служив Ерлотиніб, який застосовується в онкологічній практиці для лікування немелкоклеточного раку легких.

Отримані сполуки були синтезовані та досліджені на предмет наявності у них протипухлинної активності *in vitro* на лінії немелкоклеточного раку легкого людини (A549).

Відповідно до методичних підходів речовина вважається цитотоксично активною при  $IC_{50} \leq 10^{-4}$  М ( $\log(IC_{50}) \leq -4$ ), табл. 2.

Таблиця 2. Показатели  $IC_{50}$  досліджуваних сполук на клітинній лінії немелкоклеточного раку легкого людини A549

Шифр сполуки, назва препарату	$IC_{50}$ , моль/л	$\log(IC_{50})$
3105	$5,4 \cdot 10^{-5}$	-4,3
178	$3,5 \cdot 10^{-3}$	-2,5
2157	$5,4 \cdot 10^{-4}$	-3,2
2152	$1,1 \cdot 10^{-3}$	-2,9
3913	$5,2 \cdot 10^{-3}$	-2,3
2156	$1,2 \cdot 10^{-4}$	-3,9
Ерлотиніб	$3,8 \cdot 10^{-5}$	-4,4

Два сполуки мають  $IC_{50}$  вище (3105) або ближче (2156) до Ерлотинібу, решта –

вступають за препаратом-стандартом. Перші два сполуки представляють інтерес для подальшого глибокого дослідження.

### Висновки

1. Знайдено два сполуки (3105, 2156), які за здатності затримувати пухлинний ріст лінії немелкоклеточного раку легкого (A549) перевищують або наближаються до стандарту – Ерлотинібу.

2. Зазначені сполуки представляють інтерес для подальшого глибокого дослідження.

в якості потенційних протипухлинних засобів.

### Література

1. Giuseppe Giaccone. Targeted. Therapies in oncology / Giuseppe Giaccone, Jean-Charles Soria. – CRC Press, 2007. – 424 p.
2. Kurzrock R. Targeted Cancer Therapy / R. Kurzrock, M. Markman. – Humana Press Inc., 2010. – 458 p.
3. Haley J.D. EGFR Signaling networks in cancer therapy / J.D. Haley W.J. Gullick. – New York: Humana Press, 2009. – 395 p.
4. Hynes N.E. ErbB receptors and signaling pathways in cancer / N.E. Hynes, G. MacDonald // Curr. Opin. Cell Biol. – 2009. – Vol. 21, № 2. – P. 177–184.
5. Tyrosine kinase inhibitors / C. Natoli, B. Perrucci, F. Perrotti, et al. // Curr. Cancer Drug Targets. – 2010. – Vol. 10, № 5. – P. 462–483.
6. Steins M. Erlotinib / M. Steins, M. Thomas, M. Geißler // Recent Results Cancer Res. – 2014. – № 201. – P. 109–123.
7. Rahman A.F. Gefitinib / A.F. Rahman, H.M. Korashy, M.G. Kassem // Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol. – 2014. – № 39. – P. 239–264.

8. Zhang J. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors / J. Zhang, P.L. Yang, N.S. Gray // Nat. Rev. Cancer. – 2009. – Vol. 9, № 1. – P. 28–39.
9. Lowes V.L. Integration of signals from receptor tyrosine kinases and G protein-coupled receptors / V.L. Lowes, N.Y. Ip, Y.H. Wong // NeuroSignals – 2002. – № 11. – P. 5–9.
10. Hui H. The alpha1-adrenergic receptor antagonist doxazosin inhibits EGFR and NF-kappaB signalling to induce breast cancer cell apoptosis / H. Hui, M.A. Fernando, A.P. Heaney // Eur. J. Cancer. – 2008. – Vol. 44, № 1. – P. 160–166.
11. Вплив стану нейромедіаторних систем на пухлинний ріст і ефективність протипухлинних та антиметастазних засобів / Н.І. Шарикіна, В.М. Овруцький, Л.О. Громов та ін. // Біологія. – 1995. – № 5. – С. 513.
12. Taylor R.D. Essex FDS: flexible ligand and receptor docking with a continuum solvent model and soft-core energy function / R.D. Taylor, P.J. Jewsbury, J.W. Essex // J. Comput. Chem. – 2003. – Vol. 24, № 13. – P. 1637–1656.
13. Cai W. Protein-ligand recognition using spherical harmonic molecular surfaces: towards a fast and efficient filter for large virtual through putscreening / W. Cai, X. Shao, B. Maigret // J. Mol. Graph. Model. – 2002. – Vol. 20, № 4. – P. 313–328.
14. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors / D.J. Giard, S.A. Aaronson, G.J. Todaro // J. Natl. Cancer Inst. – 1973. – Vol. 51, № 5. – P. 1417–1423.

**Н.О. Мешкова, О.В. Міщенко, С.І. Пенделюк, Н.І. Шарикіна**

**ПРОТИПУХЛИННА АКТИВНІСТЬ  $\alpha_1$ -АДРЕНОБЛОКАТОРІВ – ПОХІДНИХ ХІНАЗОЛІНУ**

При вивченні нових похідних хіназоліну отримано дві сполуки (3105, 2156), які на лінії недрібноклітинного раку легенів людини (A549) перевищують або близькі за активністю до тест-стандарту – препарату Ерлотиніб (Тарцева), який використовується для лікування недрібноклітинного раку легенів у клінічній практиці.

**Ключові слова:** похідні хіназоліну, протипухлинна активність, лінія недрібноклітинного раку легенів людини (A549).

**N.A. Meshkova, O.V. Mischenko, S.J. Pendeluk, N.J. Sharykina**

**ANTICANCER ACTIVITY OF QUINAZOLINE-DERIVED  $\alpha_1$ -ADRENORECEPTOR ANTAGONISTS**

Two new synthesized quinazoline derivatives (3105 and 2156), investigated for anticancer activity against A549 human lung cancer cell line, showed higher or similar activity to reference drug Erlotinib (Tarceva), used for the treatment of human non-small cell lung cancer.

**Key words:** quinazoline derivatives, anticancer activity, human lung cancer cell line (A549).

Поступила 14.07.15