DOI: 10.15643/swipc-2023-18

Синтез и исследование цитотоксического действия конъюгата фенотиазина с митохондриально-направленным катионным соединением F16

Д. А. Недопекина*, Э. В. Давлетшин, Р. Р. Халитова,
А. Ю. Спивак

Институт нефтехимии и катализа УФИЦ РАН
Россия, Республика Башкортостан, 450075 г. Уфа, проспект Октября, 141.

*Email: rawbe2007@mail.ru

Проводимые в последние годы исследования по синтезу и биологическому скринингу различных соединений фенотиазиновой структуры (10H-дибензо-[b,e]-1,4-тиазин) выявили важные биологические эффекты, среди которых большой интерес вызывает их противоопухолевое действие. В этой работе сообщается о синтезе нового N-замещенного аналога фенотиазина, несущего в своей структуре митохондриально-направленную катионную группу (E)-4-(1*H*-индол-3-илвинил)-пиридиния (F16), связанную с атомом азота фенотиазинового ядра бутановым мостиком. Фрагмент липофильного катионного соединения F16 использован в качестве средства для усиления трансмембранного переноса и селективной доставки гибридной молекулы в митохондрии раковых клеток. В испытаниях на клеточной линии рака молочной железы человека BT474 гибрид «фенотиазин-F16» продемонстрировал значительную цитотоксическую активность.

Ключевые слова: фенотиазин, конъюгаты, митохондрии, делокализованные липофильные катионы, F16, противораковая активность.

Разработка новых лекарств или кандидатов в лекарства на основе фенотиазинов (10H-дибензо-[b,e]-1,4-тиазин) является многообещающим подходом из-за разнообразной биологической активности этой трициклической системы, которая присутствует в традиционных лекарственных средствах с антипсихотропным, антигистаминным и антимускариновым действием [1, 2]. В практической медицине эти лекарственные препараты используются в качестве антагонистов дофаминовых и других нейромедиаторных рецепторов для лечения шизофрении и биполярных расстройств [3].

Проводимые в последние годы исследования по синтезу и биологическому скринингу различных фенотиазиновых молекулярных гибридов выявили другие интересные фармакологические свойства этих гибридных соединений, такие как антибактериальные, противогрибковые, антималярийные и, что наиболее важно, противоопухолевые эффекты [4]. Показано, что производные фенотиазина могут инициировать апоптоз, блокировать ангиогенез и ингибировать мультилекарственную резистентность раковых клеток [5]. В настоящее время в качестве успешного подхода для повышения эффективности и специфичности действия противоопухолевых лекарственных средств рассматривается гибридизация цитотоксических молекул с липофильными катионными митохондриально-направленными молекулами. Эти катионные молекулы с малым молекулярным весом могут облегчить перенос функциональных соединений через клеточные мембраны и усилить их селективную направленность в митохондрии опухолевых клеток [6, 7]. Вместе с тем, к настоящему времени гибридные производные фенотиазинов, конъюгированные с липофильными катионными группами, описаны всего в двух работах [8, 9]

В этом сообщении представлены результаты синтеза нового N-замещенного аналога фенотиазина, несущего в своей структуре митохондриально-направленную катионную группу (E)-4-(1*H*-индол-3-илвинил)-пиридиния (**F16**), связанную с атомом азота фенотиазинового ядра алкильным мостиком. Соединение проявило высокую цитотоксическую активность *in vitro* (IC_{50} 3.3 μM) по отношению к карциноме молочной железы человека **BT-474**. В экспериментах на изолированных митохондриях печени крыс было выявлено его значительное влияние на снижение мембранного потенциала митохондрий.

Нейтральный предшественник **F16** (E)-4-(1*H*-индол-3-илвинил)-N-метилпиридин **1** был синтезирован нами с выходом 64% взаимодействием грамина и пиридинкарбоксальдегида, в присутствии трибутилфосфина по методу [10]. Коммерчески доступный фенотиазин **2**, трансформировали в бромалкильное производное **3** взаимодействием с гидридом натрия в сухом DMF с последовательным добавлением к раствору двухмольного избытка 1,4-дибромбутана (Схема 1).

Затем взаимодействием бромида **3** с (E)-4-(1*H*-индол-3-илвинил)пиридином при кипячении в CH_3CN или в ДМФА и последующей очисткой полученного продукта методом колоночной хроматографии на SiO_2 получили целевое соединение **4** с выходом 71%. (Схема 1).

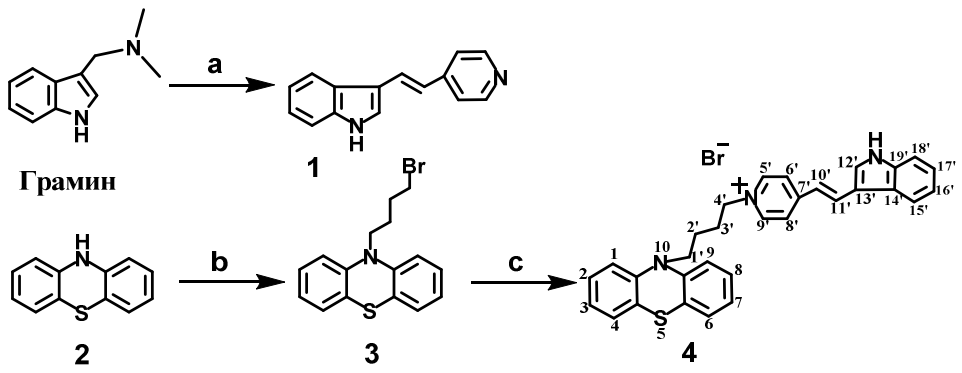

Схема 1. Синтез конъюгата **4**: **a** пиридинкарбальдегид, трибутилфосфин, CH_3CN, 60 °C; **b** 1,4-дибромбутан, NaH, 0 °C; **c 1**, ДМФА или CH_3CN, 85 °C.

Влияние соединения **4** на жизнеспособность клеток аденокарциномы молочной железы человека **BT-474** исследовано в тесте с кристаллическим фиолетовым. Из приведенного графика (*рис*. 1) видно, что цитотоксическое действие соединения **4** проявилось при концентрации 5 μM и далее дозозависимо возрастало, приводя к полной гибели опухолевых клеток при концентрации 50 μM.

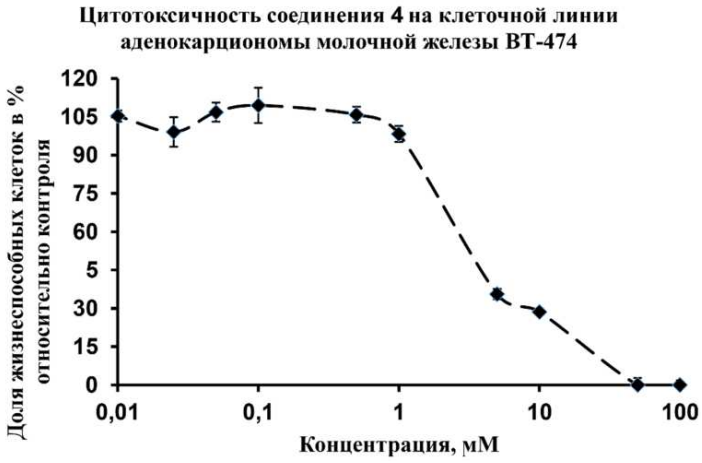

Рис. 1. Влияние соединения 4 на жизнеспособность клеток линии **BT-474**. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего (*n*=4).

Соединение **4** обнаружило заметную митохондриальную направленность. В экспериментах на изолированных митохондриях печени крыс тестируемый агент уже в концентрации 5 μM существенно снижал мембранный потенциал органелл, энергизованных сукцинатом. Увеличение концентрации соединения **4** до 20 μM привело к практически полному снижению потенциала (*рис*. 2).

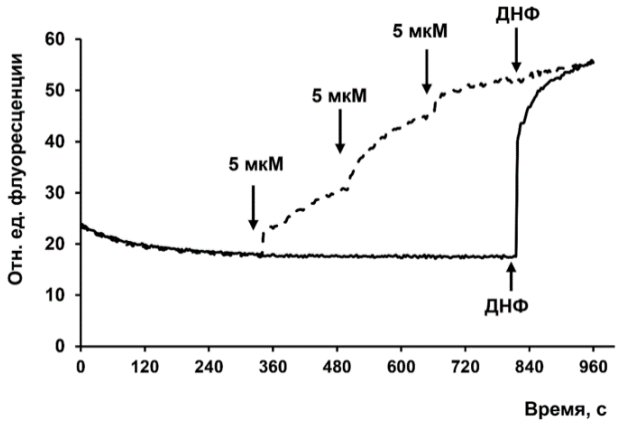

Рис. 2. Влияние последовательного добавления соединения **4** (5 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ) на мембранный потенциал митохондрий печени крыс, энергизованных сукцинатом. Сплошная линия (контроль) получена в отсутствие тестируемого соединения. **ДНФ** – 2,4-динитрофенол.

В конце каждого эксперимента к суспензии инкубируемых митохондрий добавлен протонофорный разобщитель 2,4-динитрофенол (**ДНФ**), чтобы вызвать максимальное снижение мембранного потенциала. На рисунке 2 показаны типичные кривые, полученные на одном и том же препарате митохондрий в ходе одного эксперимента. Аналогичные результаты были получены в двух других независимых экспериментах.

Таким образом, получено новое гибридное соединение фенотиазиновой структуры связыванием фенотиазинового фрагмента с липофильной делокализованной молекулой **F16**. Гибрид проявил высокую цитотоксическую активность (IC_{50}= 3.3 μM) по отношению к карциноме молочной железы человека **BT-474**.

Исследования проводились в соответствии с федеральной программой №FMRS-2022-0081.

Литература

1. Ohlow M. J., Moosmann B. Phenothiazine: the seven lives of pharmacology's first lead structure // Drug Discov. Today. 2011. V. 16. P. 119–131.
2. Posso M. C., Domingues F. C., Ferreira S., Silvestre S. Development of Phenothiazine Hybrids with Potential Medicinal Interest: A Review // Molecules. 2022. V. 27. P. 276–308.
3. Wu C.-H., Bai L.-Y., Tsai M.-H., Chu P.-C., Chiu C.-F., Chen M. Y., Chiu S.-J., Chian J.-H., Weng J.-R. Pharmacological exploitation of the phenothiazine antipsychotics to develop novel antitumor agents–A drug repurposing strategy // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 27540.
4. Spengler G., Csonka Á., Molnar J., Amaral L. The Anticancer Activity of the Old Neuroleptic Phenothiazine-type Drug Thioridazine // Anticancer Res. 2016. V. 36. P. 5701–5706.

5. Gutierrez A., Pan L., Groen R. W. J., Baleydier F., Kentsis A., Marineau J., Grebliunaite R., Kozakewich E., Reed C., Pflumio F., Poglio S., Uzan B., Clemons P., VerPlank L., An F., Burbank J., Norton S., Tolliday N., Steen H., Weng A. P., Yuan H., Bradner J. E., Mitsiades C., Look A. T., Aster J. C. Phenothiazines induce PP2A-mediated apoptosis in T cell acute lymphoblastic leukemia // J. Clin. Invest. 2014. V. 124. P. 644–655.

6. Smith R., Hartley R. C., Cochemé H. M., Murphy M. P. Mitochondrial pharmacology // Trends Pharmacol. Sci. 2012. V. 33. P. 341–352.

7. Zielonka J., Sikora A., Hardy M., Ouari O., Vasquez-Vivar J., Cheng G., Lopez M., Kalyanaraman B. Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications // Chem. Rev. 2017. V. 117. P. 10043–10120.

8. Gao T., Wang R., Sun S., Wang G., Hu C. Preparation method and application of thiazine fluorescent derivative // Patent 2020. CN110804049A.

9. Dunn E. A., Roxburgh M., Larsen L., Smith R. A. J., McLellan A. D., Heikal A., Murphy M. P., Cook G. M. Incorporation of triphenylphosphonium functionality improves the inhibitory properties of phenothiazine derivatives in Mycobacterium tuberculosis // Bioorg. Med. Chem. 2014. V. 22. P. 5320–5328.

10. Fantin V. R., Berardi M. J., Scorrano L., Korsmeyer S. J., Leder P. A novel mitochondriotoxic small molecule that selectively inhibits tumor cell growth // Cancer cell. 2002. V. 2. P. 29–42.

Synthesis and study of the cytotoxic effect of a phenothiazine conjugate with a mitochondria-targeting cationic compound F16

D. A. Nedopekina*, E. V. Davletshin, R. R. Khalitova, A. Yu. Spivak

Institute of Petrochemistry and Catalysis, Russian Academy of Sciences
141 Prospekt Oktyabrya, 450075 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

*Email: rawbe2007@mail.ru

This work reports the synthesis of a novel N-substituted phenothiazine analog bearing a mitochondria-directed cationic group (E)-4-(1*H*-indol-3-ylvinyl)-pyridinium (F16) linked to the nitrogen atom of the phenothiazine core by a butane bridge. The lipophilic cationic F16 fragment was used as a means to enhance transmembrane

transport and selective delivery of the hybrid molecule into the mitochondria of cancer cells. In tests on the BT474 breast cancer cell line, the phenothiazine-F16 hybrid demonstrated significant cytotoxic activity. The cytotoxic effect of the compound was noticeable at a concentration of 5 μM and further increased dose-dependently, leading to complete tumor cell death at a concentration of 50 μM (IC_{50} 3.3 μM).

Keywords: phenothiazine, conjugates, mitochondria, delocalized lypophilic cations, F16, anti-cancer activity.