



УДК 547.964

СИНТЕЗ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ КОНЬЮГАТОВ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДНОГО ФРАГМЕНТА PHE-D-TRP-LYS-THR СОМАТОСТАТИНА

© 2019 г. Д. В. Авдеев*, **, #, М. В. Сидорова*, М. В. Овчинников*, Н. И. Моисеева***,
В. Н. Осипов***, ****, А. Н. Балаев****, Д. С. Хачатрян*****

*НМИЦ кардиологии Минздрава России, Россия, 121552, Москва, 3-я Черепковская, 15А

**Высший химический колледж РАН, Россия, 125047, Москва, Миусская площадь, 9

***НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 23

****АО Фарм-синтез, Россия, 121357, Москва, Верейская 29, стр. 134

*****НИЦ “Курчатовский институт” – ИРЕА, Россия, 107076, Москва, Богородский вал, 3

Поступила в редакцию 19.11.2018 г.

После доработки 14.01.2019 г.

Принята к публикации 12.02.2019 г.

Синтезированы новые аналоги соматостатина, содержащие фрагменты адамантана, кумарина, тетрагидрокарбазола и пальмитиновой кислоты, общей формулой R-Phe-D-Trp-Lys(Вос)-Thr-ОМе. Конъюгаты сочетают в структуре пептидный фрагмент, обладающий сродством к соматостатиновым рецепторам (sstr), и непептидный фрагмент, потенциально обладающий противоопухолевой активностью. Предположительно, синтезированные соединения являются агонистамиsstr. Для создания амидной связи между пептидным и непептидным фрагментом применяли карбодиимидный метод и метод активированных эфиров. Структура полученных конъюгатов подтверждена методами масс-спектрометрии (ESI+) и ¹Н-ЯМР-спектроскопии. Противоопухолевая активность полученных конъюгатов была исследована с помощью МТТ-теста на линиях клеток аденокарциномы легкого человека (А549), простаты человека (РС3), толстого кишечника человека (НСТ-116), молочной железы человека (МСF7) и острого Т-клеточного лейкоза человека (Jurkat). Выявлены соединения, селективно ингибирующие рост клеток А549.

Ключевые слова: соматостатин, аналоги, пептиды, синтез, химерные молекулы, противоопухолевая активность

DOI: 10.1134/S0132342319040031

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время используется несколько лекарств на основе фрагментов гормона соматостатина, ингибирующего множество физиологических функций в гипоталамусе, передней доле гипофиза, желудочно-кишечном тракте и поджелудочной железе [1–6]. Это такие препараты как Октреотид (торговое название “Sandostatin”), Ланреотид (“Somatuline”), Вапреотид (“Sanvar”) и Пасиреотид (“Signifor”). Действие всех этих препаратов обусловлено их связыванием с рецеп-

торами соматостатина, гиперэкспрессия которых наблюдается в различных опухолевых клетках [2–4]. Создано много аналогов соматостатина и ведутся исследования по поиску новых соединений [5, 6]. Современные исследования посвящены разработке аналогов с улучшенными свойствами: повышенной метаболической устойчивостью, селективностью действия и увеличенным противоопухолевым эффектом, например за счет включения в молекулу известных цитостатических препаратов: доксорубицина, метотрексата, камптотецина, цис-платина [7]. Одним из современных подходов является конструирование химерных молекул, сочетающих пептидный и непептидный фрагменты. Пептидный фрагмент обеспечивает высокую селективность действия конъюгата за счет связывания с рецепторами, а непептидный — усиливает противоопухолевую активность. Кроме того, наличие пептидного фрагмента в молекуле снижает токсичность препарата [8]. Настоя-

Сокращения: Вос — трет-бутилоксикарбонил; DCC — N,N'-дициклогексилкарбодиимид; DMEM — Dulbecco's Modified Eagle's Medium; ESI — электрораспылительная химическая ионизация при атмосферном давлении; HOBt — 1-гидроксисбензотриазол; TFA — трифторуксусная кислота; NMM — N-метилморфолин; ФЭЧ — трансформированные фибробласты эмбриона человека.

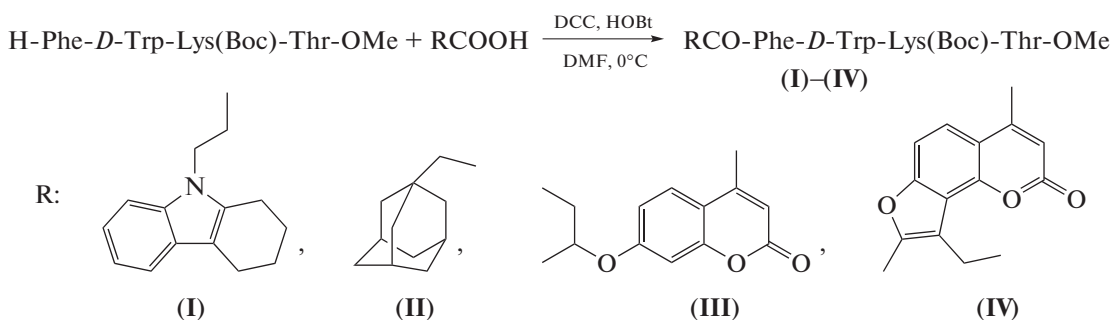
Автор для связи: (тел.: +7 (915) 230-37-53; эл. почта: mityaavdeev93@mail.ru).

шая работа является продолжением исследований по синтезу и изучению цитостатической активности аналогов соматостатина, содержащих фрагменты адамантана и нафталина, некоторые из которых показали высокий цитостатический эффект на линиях опухолевых клеток MCF-7, PC3, HCT-116 [9, 10]. В этих исследованиях в качестве пептидного компонента выбрана тетрапептидная последовательность -Phe-*D*-Trp-Lys-Thr-, являющаяся фармакофорной в соматостатине [11].

Данная работа посвящена синтезу и изучению противоопухолевой активности новых аналогов соматостатина на основе последовательности Phe-*D*-Trp-Lys-Thr. В отличие от предыдущих исследований, в которых конъюгация осуществлялась через карбоксильную группу треонина, в нашей работе непептидный фрагмент конъюгировали с пептидом за счет образования амидной связи с его концевой α-аминогруппой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтетический этап работы был посвящен получению химерных молекул путем конденсации защищенного тетрапептида H-Phe-*D*-Trp-Lys(Boc)-Thr-OMe и непептидного компонента по α-аминогруппе остатка фенилаланина (схема 1). Предполагается, что введение защитных групп в последовательность -Phe-*D*-Trp-Lys-Thr- и замена остатка *L*-Trp- на *D*-Trp должны увеличить метаболическую устойчивость тетрапептида. В качестве непептидного фрагмента были выбраны органические остатки, потенциально обладающие противоопухолевой активностью, перспективные при разработке противоопухолевых препаратов: производное карбазола (3-(1,2,3,4-тетрагидро-9*H*-карбазол-9-ил) пропановая кислота) [12], производное адамантана и аналоги кумарина.



Общая схема синтеза конъюгатов.

Ранее показано, что конъюгаты адамантана с защищенным по аминогруппе дипептидом Boc-Trp-*D*-Trp-OH обладают высокой противоопухолевой активностью на клетках линий HCT-116 [13], причем удаление Boc-защиты приводило к снижению активности полученных соединений [13]. Для производных кумарина известен ряд соединений, ингибирующих рост линий опухолевых клеток HCT-116, A-549, MCF-7 [14–16], кроме того, имеются данные о сравнимой с известными онкологическими препаратами 5-фторурацилом [16] и энтиностагом противоопухолевой активности кумаринамидов [17]. Также нами была предпринята попытка увеличения противоопухолевой активности H-Phe-*D*-Trp-Lys(Boc)-Thr-OMe за счет его конъюгирования с пальмитиновой кислотой [18].

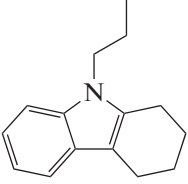
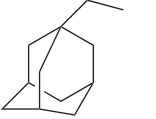
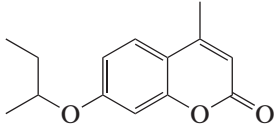
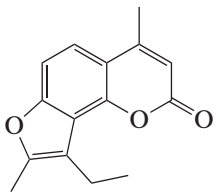
Пептид H-Phe-*D*-Trp-Lys(Boc)-Thr-OMe в настоящей работе синтезировали по ранее описанной методике [19]. При получении соединений (I)–(IV) для создания амидной связи применяли карбодимидный метод. Для синтеза соединения (V) использовали *N*-гидроксисукцинимидный эфир пальмитиновой кислоты, который получали с помощью трансэтерифицирующего реагента – *N*-три-

фторацетоксисукцинимид, поскольку карбодимидный метод зачастую оказывался непригодным для получения высоколипофильных производных пептидов с жирными кислотами в органических растворителях [20]. Все соединения были получены с высокими выходами. Их структура подтверждена методами масс-спектрометрии (ESI⁺) и ¹H-ЯМР-спектроскопии (см. экспериментальную часть).

Противоопухолевую активность полученных соединений (I)–(V) определяли с помощью МТТ-теста на клеточных линиях опухолей человека, экспрессирующих рецепторы соматостатина: аденокарциноме легкого (A549), простаты (PC3), колоректального рака (HCT-116) и молочной железы (MCF7), а также острого Т-клеточного лейкоза человека (Jurkat) (табл. 1). В качестве контрольных псевдонормальных клеток использовали трансформированные фибробласты эмбриона человека (ФЭЧ).

Стоит отметить, что исходный пептид H-Phe-*D*-Trp-Lys(Boc)-Thr-OMe не демонстрировал противоопухолевой активности на вышеперечисленных линиях клеток, а показал лишь незначи-

Таблица 1. Противоопухолевая активность (IC_{50} , мкМ) для конъюгатов общей формулы RCO-Phe-D-Trp-Lys(Boc)-Thr-OMe

Соединение	R	Раковые клетки					ФЭЧ	$IC_{50}(\text{ФЭЧ})/IC_{50}(\text{A-549})$
		HCT-116	PC3	MCF-7	A-549	Jurkat		
(I)		12	11	11	10	47	13	1.18
(II)		10	8.4	65	8.2	8.4	17	2.07
(III)		16	17	25	5	16	46	9.2
(IV)		75	72	>100	11	71	>100	9.09
(V)	$CH_3(CH_2)_{14}$	50	>100	>100	>100	87	90	0.9

ФЭЧ – трансформированные фибробласты эмбриона человека.

тельную цитотоксичность на клетках рака молочной железы MCF-7 ($IC_{50} = 75$ мкМ).

Согласно результатам исследований противоопухолевой активности соединений (I)–(V), конъюгат (V), содержащий пальмитиновую кислоту, оказывает довольно слабое цитостатическое действие по сравнению с другими аналогами. Соединение (I) показало высокий противоопухолевый эффект практически на всех клеточных линиях, кроме Jurkat, однако его селективность ($IC_{50}(\text{ФЭЧ})/IC_{50}(\text{опухолевая клетка})$) близка к 1, что свидетельствует о потенциальной токсичности этого конъюгата. Наилучшие результаты показали соединения (II)–(IV), особенно при ингибировании роста клеток аденокарциномы легкого человека (A549). Кроме того, соединения (III), (IV) проявляют почти на порядок большую эффективность действия на опухолевые клетки (A549), чем на контрольные ($IC_{50}(\text{ФЭЧ})/IC_{50}(\text{A549}) > 9$). По значениям IC_{50} соединений (III) и (IV) сравнимы с известным противоопухолевым препаратом 5-фторурацилом (11.13 мкМ) на линии клеток A549 [16]. Известно, что 5-фторурацил обладает высокой токсичностью, обусловленной низкой селективностью действия, что не отмечено для соединений (III), (IV). Соединение (III) показало так-

же высокое цитотоксическое действие против первичной глиобластомы (IC_{50} 13.5 мкМ), одной из самых агрессивных опухолей.

В результате проведенных исследований получены новые аналоги соматостатина, содержащие фрагменты адаманта, кумарина, тетрагидрокарбазола и пальмитиновой кислоты. Выявлены соединения, обладающие *in vitro*-цитотоксической активностью и выраженной селективностью действия по отношению к аденокарциноме легкого человека (A549).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовались производные *L/D*-аминокислот DMF, DCC, NMM, HOBT, дихлорметан, метанол (Fluka, Швейцария). Спектры $^1\text{H-NMR}^1$ регистрировали на спектрометре “AVANCE III NanoBay” в $\text{DMSO-}d_6$ при 300 МГц и 300 Кс использованием в качестве внутренних стандар-

¹ При описании спектров использовали следующие сокращения для обозначения остатков в соединениях: Crb – 3-(1,2,3,4-тетрагидро-9H-карбазол-9-ил), Pgr – пропаноил, Adm – адамантил, Chr – (4-метил-2-оксо-2H-хромен-7-ил) окси), FuroChr – (9-этил-4-метил-2-оксо-2H-фуоро[2,3-h] хромен), Palm – пальмитоил.

тов DMSO- d_6 ($\delta = 2.500$); концентрация соединений составляла 2–3 мг/мл. Приведены значения химических сдвигов (δ , м.д.) и константы спин-спинового взаимодействия (J , Гц). Масс-спектры регистрировали на приборе “AmazonBruker” методом электрораспылительной ионизации (ESI) в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов (напряжение на капилляре – 3500 В). Диапазон сканирования масс – m/z – 70–2200. Применяли шприцевой ввод образца, растворенного в метаноле либо в ацетонитриле. Газ-распылитель – азот, температура интерфейса – 100°C. Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе “Shimadzu” (Япония), использовали колонки Reprosil – PurBasic C18 (5 мкм), 4.6×240 мм, подвижная фаза: буфер А – 0.1% TFA в воде, буфер Б – 0.1% TFA в ацетонитриле, элюирование градиентом концентрации буфера Б в буфере А от 5 до 100% за 30 мин; скорость потока 1 мл/мин, детекция при 220 нм.

Общая методика получения соединений (I)–(IV)

В 10 мл DMF последовательно растворяли 0.69 г (1 ммоль) Н-Phe-*D*-Trp-Lys(Вос)-Thr-ОМе, 1.03 ммоль соответствующей органической кислоты (см. схему) и 0.14 г (1.033 ммоль) НОВt. К охлажденной до 0°C реакционной смеси добавляли по каплям раствор 0.21 г (1 ммоль) DCC в 1.67 мл DMF, перемешивали 2 ч при 0°C, затем еще 12 ч при комнатной температуре. Выпавший осадок дициклогексил мочевины отфильтровывали, промывали 2 мл DMF. К объединенному фильтрату добавляли 100 мл 5% раствора лимонной кислоты. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой (2 \times 20 мл), 5% раствором бикарбоната калия (10 мл), водой (2 \times 20 мл), переосаждали из смеси C₂H₅ОН–H₂O, 0.5 : 1 (1 \times 10 мл), осадок промывали смесью C₂H₅ОН–H₂O, 1 : 1 (1 \times 10 мл), высушивали на воздухе до постоянного веса.

N^α-[3-(1,2,3,4-Тетрагидро-9*H*-карбазол-9-ил)пропаноил]-Phe-*D*-Trp-Lys(Вос)-Thr-ОМе (I) синтезировали из 0.25 г (1.03 ммоль) 3-(1,2,3,4-тетрагидро-9*H*-карбазол-9-ил)пропановой кислоты. Получили 0.9 г (0.98 ммоль, 97.8%) белого порошка. Масс-спектр ESI, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 920.6 (100) [M]⁺, 820.5(5) [M -Вос]⁺, 410.8 (2) [(M -Вос)/2]⁺. Чистота (ВЭЖХ): 92.47%. Спектр ¹H-ЯМР: 1.06 (д, 3H, J 6.3, γ CH₃, Thr), 1.10–1.32 (м, 4H, γ CH₂, δ CH₂, Lys), 1.35 (с, 9H, -Вос), 1.4–1.67 (м, 2H, β CH₂, Lys), 1.68–1.87 (м, 4H, (CH₂)₂, Crb), 2.24–2.46 (м, 2H, -NCH₂CH₂, Prp), 2.51–3.28 (м, 10H, β CH₂, *D*-Trp; (CH₂)₂, Crb; ϵ CH₂, Lys; β CH₂, Phe), 3.60 (с, 3H, -OCH₃, Thr(ОМе)), 4.01–4.13 (м, 3H, -NCH₂CH₂(O), Prp; α CH, Phe), 4.25 (дд, 1H, J 8.2, 3.4, β CH, Thr), 4.37 (кв, 1H, J 7.5, α CH, Lys), 4.57 (дт, 1H, J 13.1, 6.6, α CH, *D*Trp), 4.95 (д, 1H, J 5.7, -

ОН, Thr), 6.66–6.81 (м, 2H, H_{Ar}, Phe; ϵ NH, Lys), 6.85–7.12 (м, 8H, H_{Ar}, Phe; H_{Ar}, *D*Trp), 7.16 (д, 1H, J 2.3, H_{Ar}, Crb), 7.20–7.38 (м, 3H, H_{Ar}, Crb), 7.69 (д, 1H, J 7.7, H_{Ar}, *D*Trp), 7.97 (т, 2H, J 8.1, α NH, Lys; α NH, *D*Trp), 8.21 (д, 1H, J 8.1, α NH, Phe), 8.38 (д, 1H, J 8.2, α NH, Thr), 10.77 (с, 1H, NH, *D*-Trp).

N^α-[2-((3*S*,5*S*,7*S*)-Адамантан-1-ил)ацетил]-Phe-*D*-Trp-Lys(Вос)-Thr-ОМе (II) синтезировали из 0.20 г (1.03 ммоль) 2-((3*S*,5*S*,7*S*)-адамантан-1-ил)уксусной кислоты. Получили 0.70 г (0.92 ммоль, 89.5%) белого порошка. Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 893.7 (100) [M + Na]⁺, 909.62(45) [M + K]⁺. Чистота (ВЭЖХ): 89.84%. Спектр ¹H-ЯМР: 1.07 (д, 3H, J 6.4, γ CH₃, Thr), 1.13–1.27 (м, 4H, γ CH₂, δ CH₂, Lys), 1.35 (с, 9H, -Вос), 1.40–1.86 (м, 17H, β CH₂, Lys; CH₁₅, Adm), 1.86–2.08 (м, 2H, CH₂, Ac_{Adm}), 2.65–2.74 (м, 1H, β' -CH₂, Phe), 2.75–3.00 (м, 4H, β CH₂, *D*-Trp; ϵ CH₂, Lys), 3.12 (дд, 1H, J 14.6, 5.0, β'' -CH₂, Phe), 3.61 (с, 3H, -OCH₃, Thr(ОМе)), 4.10 (д, 1H, J 7.0, α CH, Thr), 4.25–4.36 (м, 2H, α CH, *D*Trp; α CH, Lys), 4.46–4.62 (м, 2H, α CH, Phe; β CH, Thr), 5.17 (с, 1H, -ОН, Thr), 6.72 (т, 1H, J 5.7, ϵ NH, Lys), 7.21–6.91 (м, 8H, H_{Ar}, Phe; H_{Ar}, *D*-Trp), 7.29 (д, 1H, J 7.9, H_{Ar}, *D*-Trp), 7.63 (д, 1H, J 7.8, H_{Ar}, *D*-Trp), 7.79 (д, 1H, J 8.3, α NH, Lys), 8.09 (д, 1H, J 8.3, α NH, *D*-Trp), 8.27 (д, 1H, J 8.3, α NH, Phe), 8.39 (д, 1H, J 8.4, α NH, Thr), 10.80 (с, 1H, -NH, *D*-Trp).

N^α-2-((4-Метил-2-оксо-2*H*-хромен-7-ил)окси)бутаноил-Phe-*D*-Trp-Lys(Вос)-Thr-ОМе (III) синтезировали из 0.271 г (1.03 ммоль) 2-((4-метил-2-оксо-2*H*-хромен-7-ил)окси)бутановой кислоты. Получили 0.85 г (0.92 ммоль, 91.8%) белого порошка. Масс-спектр ESI, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 939.5 (100) [M]⁺, 839.5(3) [M -Вос]⁺. Чистота (ВЭЖХ): 92.83%. Спектр ¹H-ЯМР (DMSO- d_6): 0.77 (кв, 3H, J 7.4, -CH₃CH₂(Chr)), 1.03 (д, 3H, J 6.4, γ CH₃, Thr), 1.07–1.31 (м, 4H, γ CH₂, δ CH₂, Lys), 1.35 (с, 9H, -Вос), 1.38–1.77 (м, 4H, β CH₂, Lys; -CH₃CH₂(Chr)), 2.37 (д, 3H, J 8.6, -CH₃(Chr)), 2.71 (д, 1H, J 11.6, β' -CH₂, Phe), 2.77–2.98 (м, 4H, β CH₂, *D*-Trp; ϵ CH₂, Lys), 3.07 (д, 1H, J 14.7, β'' -CH₂, Phe), 3.60 (с, 3H, -OCH₃, Thr(ОМе)), 3.98–4.11 (м, 1H, α CH, Thr), 4.18–4.27 (м, 1H, β CH, Thr), 4.31–4.41 (м, 1H, α CH, Lys), 4.45–4.76 (м, 2H, α CH, *D*Trp; α CH, Phe), 4.98 (с, 1H, -ОН, Thr), 6.21 (д, 1H, J 8.9, ³H, (Chr)), 6.57–7.19 (м, 11H, H_{Ar}, Phe; H_{Ar}, *D*-Trp; ϵ NH, Lys; H_{Ar}, Chr), 7.29 (д, 1H, J 8.2, H_{Ar}, *D*-Trp), 7.55 (дд, 1H, H_{Ar}(Chr)), 7.68 (д, 1H, J 7.7, H_{Ar}, *D*-Trp), 8.00 (д, 1H, J 8.4, α NH, Lys), 8.19–8.40 (м, 2H, α NH, Phe; α NH, Thr), 10.78 (с, 1H, NH, *D*-Trp).

N^α-(9-Этил-4-метил-2-оксо-2*H*-фуоро[2,3-*h*]хромен-8-карбонил)-Phe-*D*-Trp-Lys(Вос)-Thr-ОМе (IV) синтезировали из 0.05 г (0.18 ммоль) 9-этил-4-метил-2-оксо-2*H*-фуоро[2,3-*h*] хромен-

8-карбоновой кислоты. Получили 0.11 г (0.11 ммоль, 62.5%) белого порошка. Масс-спектр ESI, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 949.9 (100) $[M]^+$, 242.6(3) $[M/4 + 5H]^+$, 397.5 (2.2) $[M/3 + \text{DMSO} + 2H]^+$. Чистота (ВЭЖХ): 90.12%. Спектр ЯМР ^1H (DMSO- d_6): 0.98–1.23 (м, 8H, γCH_3 , Thr; $-\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{FuroChr})$, γCH_2 , Lys), 1.26–1.8 (м, 12H, δCH_2 , Lys; $-\text{Boc}$; βCH_2 , Lys), 2.7–3.02 (м, 8H, βCH_2 , Phe; βCH_2 , D-Trp; ϵCH_2 , Lys; $-\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{FuroChr})$, 3.09–3.23 (м, 1H, αCH , Phe), 3.58 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$, Thr(OMe)), 4.01–4.15 (м, 1H, αCH , Thr), 4.23 (дд, 1H, J 8.0, 3.5, βCH , Thr), 4.31–4.44 (м, 1H, αCH , Lys), 4.58–4.86 (м, 1H, αCH , D-Trp), 4.94 (д, 1H, J 5.7, $-\text{OH}$, Thr), 6.41 (с, 1H, $^3\text{H}(\text{FuroChr})$), 6.70 (с, 1H, ϵNH , Lys), 6.87–7.23 (м, 8H, H_{Ar} , Phe; H_{Ar} , D-Trp), 7.3 (д, 1H, J 7.9, H_{Ar} , D-Trp), 7.59 (д, 1H, J 7.7, $\text{H}_{\text{Ar}}(\text{FuroChr})$), 7.71 (д, 1H, J 7.7, H_{Ar} , D-Trp), 7.82 (д, 1H, J 8.8, $\text{H}_{\text{Ar}}(\text{FuroChr})$), 7.98 (д, 1H, J 8.1, αNH , Lys), 8.13 (д, 1H, J 8.1, αNH , D-Trp), 8.26 (д, 1H, J 8.0, αNH , Phe), 8.56 (д, 1H, J 8.1, αNH , Thr), 10.80 (с, 1H, $-\text{NH}$, D-Trp).

N^{α} -Пальмитоил-Phe-D-Trp-Lys(Boc)-Thr-OMe (V).

В круглодонной колбе на 150 мл растворяли 2.0 г (17.4 ммоль) *N*-гидроксисукцинимид в 5 мл (26 ммоль) трифторуксусного ангидрида. Через 15 мин полученный раствор упаривали досуха, промывали гексаном, растворитель декантировали. Остаток высушивали в вакууме. Получили 3.6 г (17 ммоль, 98%) бесцветных кристаллов *N*-трифторацетоксисукцинимид (TFS), к которому прибавляли раствор 4 г (15 ммоль) пальмитиновой кислоты в 15 мл хлористого метилена и 2 мл пиридина. Реакционную массу перемешивали 40 мин при комнатной температуре. Растворитель удаляли в вакууме (40°C 15 мм. рт. ст.), к остатку добавляли 100 мл воды. Выпавший осадок отфильтровали, промывали водой (2 × 10 мл), 5% раствором бикарбоната натрия (10 мл), смесью $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 1/1 (1 × 10 мл), высушивали на воздухе до постоянного веса. Получили 5 г (14.14 ммоль, 94.2%) белого порошка *N*-гидроксисукцинимидного эфира пальмитиновой кислоты (Palm-ONSu).

К раствору 0.50 г (0.72 ммоль) H-Phe-D-Trp-Lys(Boc)-Thr-OMe в 5.00 мл DMF добавляли 120 мкл NMM до pH 8, затем 0.26 г (0.69 ммоль) Palm-ONSu и перемешивали при комнатной температуре 18 часов. В реакционную смесь добавляли 70 мл 2% раствора лимонной кислоты. Выпавший осадок отфильтровали, промывали водой (2 × 20 мл), 5% раствором бикарбоната натрия (10 мл), переосаждали из смеси $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 0.5/1 (1 × 10 мл), осадок промывали смесью $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 1/1 (1 × 10 мл), высушивали на воздухе до постоянного веса. Получили 0.40 г (0.43 ммоль, 59.5%) белого порошка. $R_f = 0.6$ (хлороформ–метанол–уксусная кислота, 9 : 1 : 0.5). Масс-спектр ESI, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 955.87(100) $[M + \text{Na}]^+$, 971.79 (14) $[M + \text{K}]^+$. Спектр ЯМР ^1H

(DMSO- d_6): 0.85 (т, 3H, J 6.5, $-\text{CH}_3(\text{Palm})$), 0.95–1.54 (м, 42H, γCH_3 , Thr; γCH_2 , δCH_2 , Lys; $-\text{Boc}$; $-\text{CH}_2(\text{Palm})$), 1.54–1.71 (м, 2H, βCH_2 , Lys), 1.88–2.05 (м, 2H, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})(\text{Palm})$), 2.68 (д, 1H, J 10.5, β' - CH_2 , Phe), 2.76–2.99 (м, 4H, βCH_2 , D-Trp; ϵCH_2 , Lys), 3.12 (дд, 1H, J 14.6, 5.0, β'' - CH_2 , Phe), 3.61 (с, 3H, OCH_3 , Thr(OMe)), 4.02–4.17 (м, 1H, αCH , Thr), 4.26 (дд, 1H, J 8.3, 3.5, βCH , Thr), 4.3–4.4 (м, 1H, αCH , Lys), 4.44–4.66 (м, 2H, αCH , D-Trp; αCH , Phe), 5.0 (д, 1H, J 5.4, $-\text{OH}$, Thr), 6.70 (т, 1H, J 5.7, ϵNH , Lys), 6.9–7.19 (м, 8H, H_{Ar} , Phe; H_{Ar} , D-Trp), 7.29 (д, 1H, J 7.9, H_{Ar} , D-Trp), 7.66 (д, 1H, J 7.7, H_{Ar} , D-Trp), 7.83 (д, 1H, J 8.2, αNH , Lys), 7.99 (д, 1H, J 8.2, αNH , D-Trp), 8.18 (д, 1H, J 8.0, αNH , Phe), 8.33 (д, 1H, J 8.2, αNH , Thr), 10.78 (с, 1H, NH , D-Trp).

Противоопухолевая активность новых аналогов соматостатина исследовалась с помощью МТТ-теста на линиях клеток аденокарциномы легкого человека (A549), аденокарциномы простаты человека (PC3), колоректального рака человека (HCT-116), аденокарциномы молочной железы человека (MCF7), первичной культуре глиобластомы, любезно предоставленной Е.Ю.Рыбалкиной, и острого Т-клеточного лейкоза человека (Jurkat). В качестве контрольных клеток использовались трансформированные фибробласты эмбриона человека (ФЭЧ). Клетки A549, MCF-7, клетки первичной глиобластомы и ФЭЧ культивировались на среде DMEM (ПанЭко, Россия), а клетки HCT-116, PC3 и Jurkat на среде RPMI1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США) и гентамицина 40 мкг/мл.

Адгезивные культуры опухолевых клеток рассевались на 96-луночное плато в количестве 5×10^3 клеток на лунку, клетки Jurkat – в количестве 15×10^3 . На следующий день к клеткам добавляли исследуемые вещества в конечных концентрациях от 100 до 5 мкМ. После инкубации в течение 72 часов в лунки вносили МТТ-реагент в концентрации 5 мг/мл по 20 мкл в лунку. После инкубации 3–4 часа полученные кристаллы формазана растворяли 60 мкл DMSO и определяли оптическую плотность раствора на спектрофотометре MultiSkanFC (ThermoScientific, США) при длине волны 540 нм.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Guillemin R., Gerich J.E. // *Annu. Rev. Med.* 1976. V. 27. P. 379–388.
2. Patel Y.C. // *Front Neuroendocrinol.* 1999. V. 20. P. 157–198.
3. Lamberts S.W., van der Lely A.J., Hofland L.J. // *European Journal of Endocrinology.* 2002. V. 146. P. 701–705.
4. Barnett P. // *Endocrine.* 2003. V. 20. P. 255–264.
5. Janecka A., Zubrzycka M., Janecki T. // *J. Peptide Res.* 2001. V. 58. P. 91–107.
6. Weckbecker G., Lewis I., Albert R., Herbert A. Schmid, Hoyer D., Bruns C. // *Nature Reviews.* 2003. V. 2. P. 999–1017.
7. Novohradsky V., Zamoria A.M., Gandioso A., Brabec V., Ruiz J., Marchan V. // *Chem. Commun.* 2017. V. 53. P. 5523–5526.
8. Srinivasarao M., Chris V. Galliford, Philip S. Low // *Nature Reviews.* 2015. V. 14. P. 203–219.
9. Балаев А.Н., Осипов В.Н., Охманович К.А., Ручко Е.А., Барышников М.А., Хачатрян Д.С. // *Известия Академии наук. Серия химическая.* 2016. Т. 11. С. 2766–2769.
10. Балаев А.Н., Осипов В.Н., Охманович К.А., Ручко Е.А., Барышников М.А., Хачатрян Д.С. // *Известия Академии наук. Серия химическая.* 2016. Т. 12. С. 2948–2951.
11. Modlin I.M., Pavel M., Kidd M., Gustafsson B.I. // *Aliment Pharmacol. Ther.* 2010. V. 31. P. 169–188.
12. Sambasivarao K., Mohammad Saifuddin, Vikas R. Aswar // *Org. Biomol. Chem.* 2016. V. 14. P. 9868–9873.
13. Kuriyama I., Miyazaki A., Tsuda Y. // *Anticancer Res.* 2010. V. 30. P. 4841–4849.
14. Nathaniel Edward Bennett Saidu, Sergio Valente, Emilie Bana, Gilbert Kirsch, Denyse Bagrel, Mathias Montenarh // *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2012. V. 20. P. 1584–1593.
15. Fatma A. El-Samahy, Hayam A. Abd El Salam, Naglaa F. El-Sayed, Elsayed M. Shalaby, Mahmoud F. Dondeti // *Z. Naturforsch.* 2017. V. 72. P. 705–716.
16. Rina Soni, Shweta Umar, Nirav N. Shah, Suresh Balkrishnan, Shubhangi S. Somana // *J. Heterocyclic Chem.* 2017. V. 49. P. 3232–2510.
17. Tooba Abdizadeh, Mohammad Reza Kalani, Khalil Abnous, Zahra Tayarani-Najaran, Bibi Zahra Khashyaranesh, Rahman Abdizadeh, Razieh Ghodsi, Farzin Hadizadeh // *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2017. V. 132. P. 42–62.
18. Veronika Mäde, Sylvia Els-Heindl, Annette G. Beck-Sickinger // *Beilstein J. Org. Chem.* 2014. V. 10. P. 1197–1212.
19. Балаев А.Н., Осипов В.Н., Охманович К.А., Федоров В.Е., Решетников Е.В. // *Российский биотерапевтический журнал.* 2011. Т. 4. С. 43–46.
20. Андреев С.М., Сидорова М.В., Ракова О.А., Цветков Д.Е., Фоница Л.А. // *Биоорганическая химия.* 1987. Т. 13. С. 696–700.

Synthesis and Antitumor Activity of Conjugates Based on Peptide Fragment Phe-D-Trp-Lys-Thr of Somatostatin

D. V. Avdeev*, **, #, M. V. Sidorova*, M. V. Ovchinnikov*, N. I. Moiseeva***, V. N. Osipov****, *****, A. N. Balaev****, and D. S. Khachatryan*****

*Phone: +7 (495) 414-67-16; fax: +7 (495) 414-67-86; e-mail: mityaavdeev93@mail.ru

*National Medical Research Center for Cardiology, 3rd Cherepkovskaya Str., 15A, Moscow, 121552 Russia

**Higher Chemical College RAS, Miusskayasqr., 9, Moscow, 125047 Russia

***"Blokhin RCRC" RAMS, Kashirskoe highway, 23, Moscow, 115478 Russia

****Farm-Synthesis JSC, Vereyskaya 29, building 134, Moscow, 121357 Russia

*****NRC "Kurchatov Institute" – IREA, Bogorodskyval 3, Moscow, 107076, Russia

New somatostatin analogs containing adamantane, coumarin, tetrahydrocarbazole and palmitic acid fragments were synthesized with the general formula R-Phe-D-Trp-Lys(Boc)-Thr-OMe. Conjugates combine in structure a peptide fragment having affinity for somatostatin receptors (sstr) and a non-peptide fragment potentially possessing antitumor activity. Presumably, the synthesized compounds are sstr antagonists. To create an amide bond between the peptide and the non-peptide fragment, the carbodiimide method and the activated ester method were used. The structure of the obtained conjugates was confirmed by mass spectrometry (ESI⁺) and ¹H NMR spectroscopy. The antitumor activity of the resulting conjugates was investigated using the MTT-assay on human lung adenocarcinoma cell lines, human prostate, human large intestine, human mammary gland and acute human T-cell leukemia. Compounds that selectively inhibit the growth of A549 cells were detected.

Keywords: somatostatin analogs, peptide synthesis, chimeric molecules, antitumor activity