

Синтез фуразано- и тиadiaзолопиразиновых стероидов и их антипролиферативная активность

Светлана К. Воронцова¹, Александр М. Щербаков^{2,3}, Михаил Е. Миняев¹, Леонид Г. Менчиков¹, Игорь В. Заварзин^{1*}

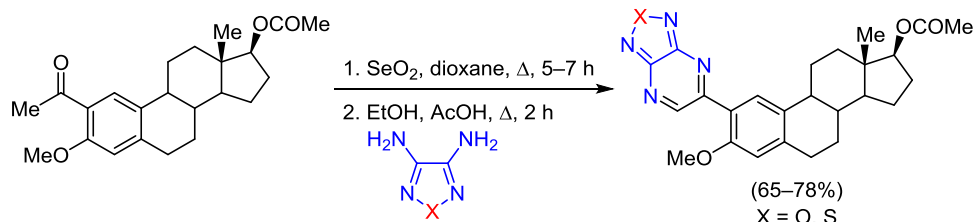
¹ Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Ленинский пр., 47, Москва 119991, Россия; e-mail: zavi@ioc.ac.ru

² Отдел экспериментальной биологии опухолей, Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина Минздрава России, Каширское шоссе, д. 24, стр. 15, Москва 115522, Россия e-mail: alex.scherbakov@gmail.com

³ Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, ул. Большая Пироговская, д. 11, стр. 1, Москва 119021, Россия

Поступило 14.03.2024

Принято после доработки 8.05.2024



Разработан эффективный метод синтеза гетероциклических стероидов с [1,2,5]оксадиазоло[3,4-*b*]пиразиновым и [1,2,5]-тиадиазоло[3,4-*b*]пиразиновым фрагментами, структура которых подтверждена данными РСА. Полученные соединения показали высокую антипролиферативную активность, которая не уступала цисплатину и ацетату абиратерона, на клетках рака молочной (MCF7) и предстательной (22Rv1) желез.

Ключевые слова: 17β-ацетокси-3-метоксиэстра-1,3,5(10)-триен, [1,2,5]оксадиазоло[3,4-*b*]пиразин, стероид, [1,2,5]тиадиазоло[3,4-*b*]пиразин, рак молочной железы, рак предстательной железы.

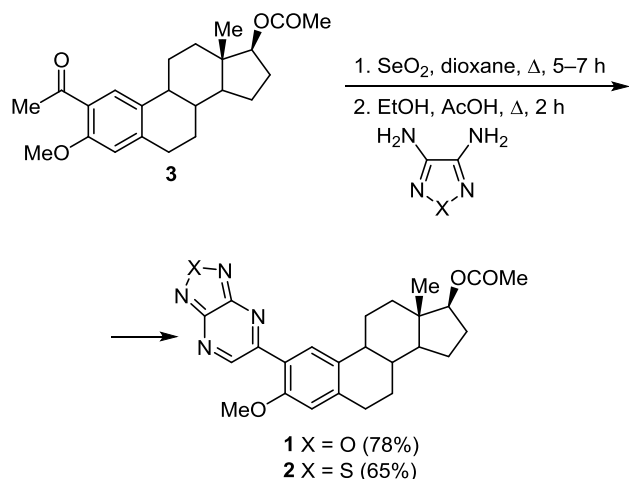
Гетероциклические стероиды сочетают в себе свойства как стероидов, так и гетероциклов и привлекают повышенное внимание в качестве биологически активных веществ, а также строительных блоков в супрамолекулярной химии и нанотехнологиях.^{1–4} В последнее время активно изучаются гетероциклические производные по циклу А стероида.^{5,6} Такие соединения имеют широкий спектр биологической активности, поэтому расширение круга гетероциклов для модификации стероидов является актуальным. В частности, заслуживают внимания [1,2,5]оксадиазоло[3,4-*b*]пиразины^{7–10} и [1,2,5]тиадиазоло[3,4-*b*]пиразины.^{11–16} Они обладают высокой антипролиферативной активностью среди гетероциклов, конденсированных с пиразиновым циклом,^{17–19} поэтому для стероидов с такими заместителями можно ожидать высокой активности в отношении гормонозависимых видов рака.

В настоящей работе были получены первые представители гетероциклических стероидов, содержащие фуразанопиразиновый и тиadiaзолопиразиновый фрагменты, и изучена их антипролиферативная активность в отношении двух линий гормонозависимых злокачественных клеток (клеток рака молочной (MCF7) и предстательной (22Rv1) желез).

Целевые стероиды **1** и **2** с [1,2,5]оксадиазоло- и [1,2,5]тиадиазоло[3,4-*b*]пиразиновыми фрагментами соответственно получали реакцией 2-ацетилзамещенного стероида **3** с SeO₂ с последующим взаимодействием с 3,4-диаминофуразаном или 1,2,5-тиадиазол-3,4-диамином (схема 1).

Данный метод ранее был использован для построения фуразанопиразинового фрагмента с ароматическими заместителями из замещенных ацетофенонов.²⁰ При этом на первой стадии образуются

Схема 1. Синтез стероидов 1 и 2



арилглиоксали, которые широко используют в синтезе различных арилзамещенных гетероциклов, в том числе с пиазиновым фрагментом.^{21,22}

Строение полученных стероидов 1 и 2 установлено методом PCA (рис. 1). Абсолютная конфигурация в обоих случаях подтверждена данными аномального рассеяния. Строение соединений 1 и 2 было также подтверждено методами спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C и масс-спектрометрии высокого разрешения.

Полученные соединения 1 и 2 были исследованы на антипролиферативную активность на клетках рака молочной железы линии MCF7 и клетках рака предстательной железы линии 22Rv1 (табл. 1). Химиотерапевтический препарат цисплатин и гормональный пре-

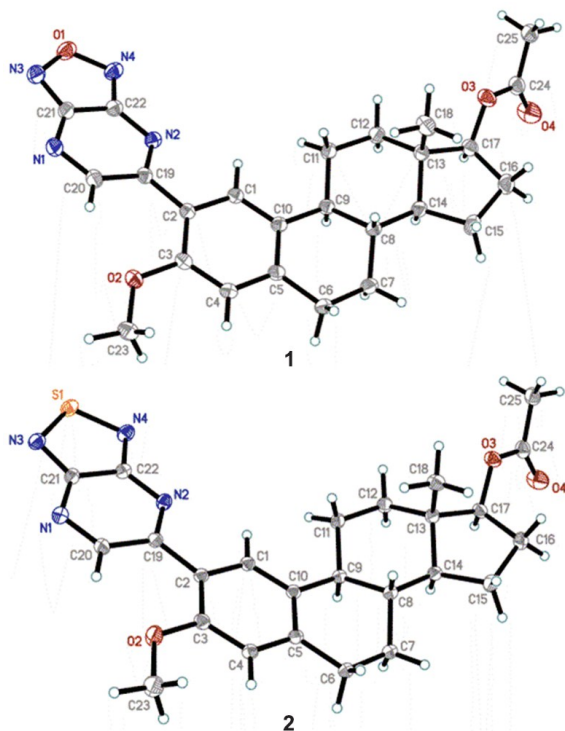


Рисунок 1. Молекулярная структура стероидов 1 и 2 в представлении атомов эллипсоидами тепловых колебаний с 50% вероятностью.

Таблица 1. Антипролиферативная активность (IC_{50} ,* мкМ) соединений 1, 2, цисплатина и ацетата абиратерона на клетках линий MCF7 и 22Rv1

Соединение	Линия раковых клеток	
	MCF7	22Rv1
1	7.0 ± 0.6	9.3 ± 0.9
2	9.5 ± 0.8	9.9 ± 1.0
Цисплатин	6.1 ± 0.6	9.7 ± 0.9
Ацетат абиратерона	12.9 ± 1.0	7.6 ± 0.9

* Указаны значения концентрации полумаксимального ингибирования роста клеток (IC_{50}) ± стандартное отклонение.

парат ацетат абиратерона использовали как препараты сравнения. Соединения 1 и 2 показали значительную антипролиферативную активность. Для клеток рака молочной железы MCF7 их значения IC_{50} не превышали 10 мкМ. Ацетат абиратерона незначительно уступал по активности синтезированным соединениям. Активность цисплатина была сравнима с активностью стероидов 1 и 2. Схожие эффекты обнаружены на клетках рака предстательной железы линии 22Rv1. Полумаксимальное ингибирование роста достигалось при обработке клеток соединениями 1 и 2 в концентрации около 10 мкМ. Действие стероидов 1 и 2 на клетки линии 22Rv1 были сравнимы с действием как химиопрепарата (цисплатина), так и гормонального препарата (ацетата абиратерона). В целом обнаруженная высокая антипролиферативная активность свидетельствует о перспективности расширенных доклинических исследований полученных гетероциклических стероидов, а также использования их в качестве соединений-лидеров при разработке новых противоопухолевых соединений.

Таким образом, нами разработан удобный подход к синтезу новых стероидов с фуранопиразиновым и тиадиазолопиразиновым фрагментами в цикле А. Полученные соединения показали высокую антипролиферативную активность, которая не уступала цисплатину и ацетату абиратерона, в отношении эстрогенозависимых опухолевых клеток (линии MCF7 и 22Rv1) и являются перспективными для дальнейших расширенных доклинических исследований.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C (300 и 75 МГц соответственно) записаны на спектрометре Bruker AM-300 в CDCl_3 . Внутренний стандарт – остаточные сигналы растворителя (7.27 м. д. для ядер ^1H и 77.0 м. д. для ядер ^{13}C). Масс-спектры высокого разрешения зарегистрированы на масс-спектрометре Bruker MicroTOF, ионизация электрораспылением с использованием Q-TOF-детектирования. Температуры плавления определены на приборе Кофлера и не исправлены. ТСХ проведена с использованием пластин Silicagel 60 F₂₅₄. Хроматограммы визуализированы с помощью УФ лампы (254 нм) и проявляющего раствора ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2/\text{H}_2\text{SO}_4$). Колоночная хроматография проведена на силикагеле 60 (0.063–0.200 мм, Merck).

Коммерческие реагенты использованы без дополнительной очистки. Стероид **3** получен по известной методике.²³

2-(13-Метил-3-метокси[1,2,5]оксадиазоло[3,4-*b*]-пирозин-5-ил)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[*a*]фенантрен-17-илацетат (1). К раствору 30 мг (0.08 ммоль) стероида **3** в 30 мл диоксана добавляют 0.18 г (1.6 ммоль) SeO₂ и кипятят в течение 5–7 ч (контроль окончания реакции методом ТСХ), выпавший селен отфильтровывают, раствор промывают H₂O, растворитель упаривают. Далее к полученному остатку добавляют 0.78 ммоль 1,2,5-оксадиазол-3,4-диамина, 5 мл EtOH и 5 мл AcOH, смесь кипятят в течение 2 ч (контроль методом ТСХ, элюент петролейный эфир – EtOAc, 1:1). По окончании реакции смесь выливают в 100 мл H₂O, выпавший осадок отфильтровывают. Перекристаллизовывают из MeCN. Выход 27 мг (78%), светло-оранжевые кристаллы, т. пл. 156–158°C. Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (*J*, Гц): 0.87 (3H, с, CH₃); 1.26–1.67 (7H, м, CH₂, CH); 1.76–1.79 (1H, м, CH₂, CH); 1.91–1.98 (2H, м, CH₂, CH); 2.08 (3H, с, CH₃); 2.22–2.28 (2H, м, CH₂, CH); 2.37–2.40 (1H, м, CH₂, CH); 2.95–2.96 (2H, д, *J* = 8.0, CH₂, CH); 3.94 (3H, с, CH₃); 4.70 (1H, м, CH₂, CH); 6.76 (1H, с, H Ar); 7.84 (1H, с, H Ar); 9.36 (1H, с, H Ar). Спектр ЯМР ¹³C, δ, м. д.: 12.1; 21.2; 23.3; 26.1; 26.9; 27.6; 30.2; 36.7; 38.3; 42.9; 43.6; 49.8; 55.8; 82.6; 111.9; 121.6; 129.3; 134.4; 144.5; 150.8; 152.3; 156.0; 156.9; 161.0; 171.1. Найдено, *m/z*: 449.2179 [M+H]⁺. C₂₅H₂₈N₄O₄. Вычислено, *m/z*: 449.2183.

2-(13-Метил-3-метокси[1,2,5]тиадиазоло[3,4-*b*]-пирозин-5-ил)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[*a*]фенантрен-17-илацетат (2) получают аналогично методике получения стероида **1** из 1,2,5-тиадиазол-3,4-диамина. Выход 19 мг (65%), светло-оранжевые кристаллы, т. пл. 145–147°C. Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д.: 0.85 (3H, с, CH₃); 1.26–1.62 (7H, м, CH₂, CH); 1.75–1.78 (1H, м, CH₂, CH); 1.89–1.97 (2H, м, CH₂, CH); 2.06 (3H, с, CH₃); 2.24–2.27 (2H, м, CH₂, CH); 2.41–2.45 (1H, м, CH₂, CH); 2.96–2.99 (2H, м, CH₂, CH); 3.93 (3H, с, CH₃); 4.70–4.74 (1H, м, CH₂, CH); 6.78 (1H, с, H Ar); 7.92 (1H, с, H Ar); 9.54 (1H, с, H Ar). Спектр ЯМР ¹³C, δ, м. д.: 12.1; 21.2; 23.2; 26.2; 27.0; 27.6; 30.1; 36.7; 38.4; 42.9; 43.7; 49.7; 55.7; 82.6; 111.8; 122.1; 129.3; 134.0; 142.9; 152.6; 152.8; 154.7; 155.7; 157.6; 171.2. Найдено, *m/z*: 465.1946 [M+H]⁺. C₂₅H₂₈N₄O₃S. Вычислено, *m/z*: 465.1955.

Рентгеноструктурное исследование соединений 1, 2 выполнено на монокристалльном дифрактометре Bruker Quest D8, оснащенный детектором Photon-III (метод беззатворного φ-/ω-сканирования), с использованием монохроматизированного MoKα-излучения. Структура расшифрована прямым методом и уточнена полноматричным анизотропным МНК по *F*² для всех неводородных атомов.²⁴ Положения всех неводородных атомов уточнены в анизотропном приближении. Положения всех атомов водорода рассчитаны геометрически и уточнены с помощью модели жестких сфер с относительными изотропными параметрами смещения. Полные рентгеноструктурные данные депонированы в Кембриджском банке структурных данных

(депоненты CCDC 2335159 (стероид **1**) и CCDC 2335160 (стероид **2**)).

Исследование антипролиферативной активности полученных соединений 1 и 2 на линиях злокачественных клеток. Для биологических испытаний синтезированные соединения растворяют в ДМСО (Applichem) в концентрации 10 мМ, полученные растворы хранят при –20°C. Клетки рака молочной железы человека линии MCF7 и рака предстательной железы линии 22Rv1 получены из коллекций ATCC. Клетки MCF7 культивируют в среде DMEM (Gibco), клетки 22Rv1 – в среде RPMI-1640 (Gibco), содержащей 0.11 мг/мл пирувата натрия. Среды содержат 10% эмбриональную сыворотку телят (HyClone), 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (PanEco). Инкубацию проводят при 37°C, 5% CO₂ и относительной влажности 80–90% в инкубаторе NU-5840E (NuAire). Для определения количества выживших клеток используют МТТ-тест, основанный на превращении реагента МТТ (бромид 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия) в кристаллы формазана, с модификациями как описано ранее.^{25,26} Клетки засевают на 24-луночные планшеты (Corning) в расчете 40000 (линия MCF7) или 100000 (линия 22Rv1) клеток на одну лунку. Через 24 ч добавляют синтезированные соединения, к контрольным клеткам добавляют соответствующее количество растворителя (ДМСО). Концентрации соединений в среде для культивирования варьируются от 1.0 до 50 мкМ, при этом содержание органического растворителя в среде не превышает 0.5%. Химиотерапевтический препарат цисплатин (Тева) и гормональный препарат ацетат абиратерона (Caupan Chemical) используют как препараты сравнения. Через 72 ч роста с соединениями среду удаляют и добавляют к клеткам МТТ-реагент (AppliChem) на 2 ч. После окончания инкубации клетки лизируют в ДМСО и легким встряхиванием планшета растворяют накопленный клетками формазан. Оптическую плотность полученных растворов анализируют на спектрофотометре MultiSkan FC (Thermo Fisher Scientific Inc.) при 571 нм, длина волны 630 нм использована как референсная. За 100% принимают выживаемость клеток, обработанных растворителем; значения IC₅₀ рассчитывают как концентрацию соединения, снижающую поглощающую способность раствора на 50% по сравнению с контрольным образцом. Расчеты выполнены с помощью программного обеспечения GraphPad 7.0.

Файл сопроводительных материалов, содержащий спектры ЯМР ¹H и ¹³C, масс-спектры высокого разрешения и данные PCA соединений **1, 2**, доступен на сайте журнала <http://hgs.osi.lv>.

Список литературы

1. Farhan, A. M.; Alshamusi, Q. K.; Jebur, M. H. *J. Phys.: Conf. Ser.* **2021**, 1853, 012057.
2. Malykh, A. G.; Pavlov, A. R.; Komkov, A. V.; Volkova, Yu. A.; Menchikov, L. G.; Zavarzin, I. V. *Mendeleev Commun.* **2021**, 31, 667.

3. Elattar, K. M.; El-Mekabaty, A. *J. Heterocycl. Chem.* **2021**, 58, 389.
4. Tantawy, M. A.; Nafie, M. S.; Elmegeed, G. A.; Ali, I. A. I. *Bioorg. Chem.* **2017**, 73, 128.
5. Volkova, Y. A.; Antonov, Y. S.; Komkov, A. V.; Scherbakov, A. M.; Shashkov, A. S.; Menchikov, L. G.; Chernoburova, E. I.; Zavarzin, I. V. *RSC Adv.* **2016**, 6, 42863.
6. Sukhanova, A. A.; Prezent, M. A.; Fakhrutdinov, A. N.; Zavarzin, I. V. *Russ. Chem. Bull.* **2023**, 72, 1855.
7. Catrow, J. L.; Zhang, Y.; Zhang, M.; Ji, H. *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 4678.
8. Childress, E. S.; Salamoun, J. M.; Hargett, S. R.; Alexopoulos, S. J.; Chen, S.-Y.; Shah, D. P.; Santiago-Rivera, J.; Garcia, C. J.; Dai, Y.; Tucker, S. P.; Hoehn, K. L.; Santos, W. L. *J. Med. Chem.* **2020**, 63, 2511.
9. Salamoun, J. M.; Garcia, C. J.; Hargett, S. R.; Murray, J. H.; Chen, S.-Y.; Beretta, M.; Alexopoulos, S. J.; Shah, D. P.; Olzomer, E. M.; Tucker, S. P.; Hoehn, K. L.; Santos, W. L. *J. Med. Chem.* **2020**, 63, 6203.
10. Dutta, S.; Liu, N.; Gao, Y.; Beck, L.; Wang, X. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2022**, 72, 128878.
11. Wen, R. Y.; Komin, A. P.; Street, R. W.; Carmack, M. *J. Org. Chem.* **1975**, 40, 2743.
12. Komin, A. P.; Carmack, M. *J. Heterocycl. Chem.* **1976**, 13, 13.
13. Yudin, I. L.; Aronova, S. M.; Sheremetev, A. B.; Averkiev, B. B.; Antipin, M. Yu. *Mendeleev Commun.* **2001**, 11, 152.
14. Mikhailov, M. S.; Hamdoush, M.; Islyaikin, M. K.; Koifman, O. I.; Stuzhin, P. A. *ARKIVOC* **2017**, (iii), 130.
15. Verbitskiy, E. V.; le Poul, P.; Bureš, F.; Achelle, S.; Barsella, A.; Kvashnin, Y. A.; Rusinov, G. L.; Charushin, V. N. *Molecules* **2022**, 27, 4250.
16. Kvashnin, Y. A.; Krynina, E. M.; Medvedeva, M. V.; Svalova, T. S.; Kozitsina, A. N.; Eltsov, O. S.; Rusinov, G. L.; Verbitskiy, E. V.; Charushin, V. N. *Russ. Chem. Bull.* **2023**, 72, 939.
17. Miniyar, B. P.; Murumkar, R. P.; Patil, S. P.; Barmade, A. M.; Bothara, G. K. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2013**, 13, 1607.
18. Hou, W.; Dai, W.; Huang, H.; Liu, S.-L.; Liu, J.; Huang, L.-J.; Huang, X.-H.; Zeng, J.-L.; Gan, Z.-W.; Zhang, Z.-Y.; Lan, J.-X. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, 258, 115544.
19. Sahu, R.; Shah, K.; Gautam, Y.; Sahu, K. *Curr. Org. Chem.* **2023**, 27, 821.
20. Eremeev, A. V.; Andrianov, V. G.; Piskunova, I. P. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1978**, 14, 500.
21. Eftekhari-Sis, B.; Zirak, M.; Akbari, A. *Chem. Rev.* **2013**, 113, 2958.
22. Chaudhary, A. *Curr. Org. Chem.* **2019**, 23, 1945.
23. Bubert, C.; Leese, M. P.; Mahon, M. F.; Ferrandis, E.; Regis-Lydi, S.; Kasprzyk, P. G.; Newman, S. P.; Ho, Y. T.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V. L. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 4431.
24. Sheldrick, G. *Acta Crystallogr. Sect. A: Found. Crystallogr.* **2008**, A64, 112.
25. Ilovaisky, A. I.; Merkulova, V. M.; Chernoburova, E. I.; Shchetinina, M. A.; Salnikova, D. I.; Scherbakov, A. M.; Zavarzin, I. V.; Terent'ev, A. O. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2021**, 214, 106000.
26. Komkov, A. V.; Menchikov, L. G.; Dmitrenok, A. S.; Scherbakov, A. M.; Salnikova, D. I.; Levina, I. S.; Zavarzin, I. V. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2023**, 59, 554.