

ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ ГИПОМЕТИЛИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ В РЯДУ НУКЛЕОЗИДНЫХ АНАЛОГОВ АЗАЦИТОЗИНА

Божок Т.С., Голубева М.Б., Калиниченко Е.Н., Кузьмицкий Б.Б.

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси
220141, ул. Академика В.Ф.Купревича, 5/2, г. Минск, Республика Беларусь*

Изучение эпигенетической регуляции экспрессии генов в последние годы привело к большим успехам в понимании механизмов канцерогенеза, в том числе и механизмов возникновения и развития злокачественных заболеваний крови. Разработки в этой области позволили создать новое направление в лечении рака – эпигенетическую терапию [1]. Под эпигенетической терапией понимается способ регуляции экспрессии генов, не затрагивающий нуклеотидной последовательности ДНК. Известно, что в каждой клетке активны около 300 из 40 000 генов, однако это не означает нарушение структуры «молчащих генов». Патологическим примером может служить «молчание» генов-супрессоров опухолевого роста и кодируемых ими белков, которое предотвращает запрограммированную клеточную гибель и приводит к неконтролируемой пролиферации. Одним из механизмов, объясняющих эпигенетически обусловленное «молчание» экспрессии генов, является аномальное метилирование ДНК. Нарушения метилирования при развитии злокачественных новообразований возникают, как правило, на ранних стадиях. Общий низкий уровень метилирования цитозина (гипометилирование) при этом сочетается с обратным процессом – гиперметилированием CpG участков в промоторах генов-супрессоров опухоли. Причиной тотального гипометилирования ДНК в злокачественных клетках является образование определенных изоформ фермента ДНК-метилтрансферазы типа DNMT3B, что приводит к активному метилированию и подавлению экспрессии генов-супрессоров опухоли.

Понимание процесса гиперметилирования генов привело к широкому внедрению ингибиторов ДНК-метилтрансфераз [2]. Наиболее известными из этих препаратов являются 5-азациитидин (азациитидин, Видаза) и 2'-дезоксидецитабин (децитабин, Дакоген). Встраиваясь в цепочку ДНК или РНК вместо цитозина, они образуют прочную ковалентную связь с ДНК-метилтрансферазами, препятствуя таким образом метилированию и снимая блок с репрессированного ранее гена. В результате достигается гипометилирование «молчащих» генов с восстановлением их функций. Гипометилирующий эффект препаратов достигается при их применении в относительно низких дозах. Высокие дозы могут вызывать структурную нестабильность и повреждение ДНК, нарушение синтеза «новой» ДНК с последующей клеточной смертью и утратой гипометилирующих свойств, т.е. выступать в качестве химиопрепаратов с цитотоксическим эффектом. Активность децитабина *in vitro* до 10 раз выше, чем азациитидина. Видаза является первым гипометилирующим препаратом, который был одобрен Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA) в 2004 году к применению в терапии миелодиспластического синдрома (МДС), а в 2006 году было получено одобрение на использование Дакогена. Результаты клинических исследований позволили сделать вывод об эффективности и целесообразности применения данных препаратов для лечения больных МДС.

Задачи исследования. В рамках государственной программы РБ «Импортозамещающая фармпродукция» на 2010-2014 годы лабораторией химии нуклеотидов и полинуклеотидов совместно с НПЦ «Химфармсинтез» разработаны противолейкозные препараты Азациитидин и Децитабин, по качеству не уступающие зарубежным аналогам. Получено разрешение на клинические испытания отечественных препаратов.

Целью данной работы является поиск новых эффективных гипометилирующих препаратов в ряду нуклеозидных аналогов 5-азацитозина, которые включают биоизостерическую замену в углеводном фрагменте.

Материалы и методы. Синтез 2'(3')-фторсодержащих нуклеозидных аналогов 5-азацитозина осуществляли методом конденсации 4,6-(бис)триметилсилильного производного 5-азацитозина с соответствующими фторпроизводными сахаров. Деблокирование промежуточных нуклеозидов давало целевые 2'-дезоксид-2'-фтор-5-азацитидин (2'F-ара-АЦ) и 3'-дезоксид-3'-фтор-5-азацитидин (3'F-рибо-АЦ) с высокими выходами. Структура полученных соединений доказана совокупностью физико-химических методов исследования [3].

Противолейкозную активность синтезированных соединений исследовали *in vitro* на клеточных линиях опухолей человека из банка клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург: KG-1 (клетки острой миелогенной лейкемии), ТРН-1 (клетки острой моноцитарной лейкемии), HL-60 (клетки острой промиелоцитарной лейкемии), К-562 (клетки хронического миелогенного лейкоза) и MOLT-3 (клетки острого Т-лимфобластного лейкоза). Цитотоксическую активность соединений тестировали в концентрациях 0,01-50,0 мкМ. Препаратом сравнения являлась фармацевтическая субстанция азацитидина, полученная по разработанному соавторами методу. По результатам теста рассчитывали степень подавления роста опухолевых клеток в процентах к контрольному росту и строили графики зависимости степени подавления роста клеток от lg концентрации. Для активных соединений графически определяли величину средней эффективной концентрации, приводящей к подавлению жизнеспособности 50% лейкозных клеток (EC₅₀).

Результаты и обсуждение. Нежелательным фактором для использования в медицинской практике азацитидина и децитабина является высокая общая токсичность. Одним из подходов, используемых медицинскими химиками для создания более эффективных и безопасных лекарств, является биоизостерическая замена [4]. Синтезированные нами нуклеозидные аналоги включают замену атома водорода на атом фтора во 2'- или 3'-положениях дезоксифуранозного цикла.

В ходе исследования установлено, что нуклеозидный аналог 2'F-ара-АЦ в модельных системах роста клеток трех линий острого миелогенного лейкоза человека проявил существенно более высокую степень ингибирования жизнеспособности лейкозных клеток по сравнению с активностью азацитидина и 3'F-рибо-АЦ. Нуклеозидный аналог 2'F-ара-АЦ, как и препарат сравнения азацитидин, дозозависимо избирательно подавляет жизнеспособность клеток острого миелогенного лейкоза линии KG-1, острого моноцитарного лейкоза ТРН-1 и острого промиелоцитарного лейкоза HL-60. Клетки хронического миелогенного лейкоза К-562 обнаруживают низкую чувствительность к нуклеозиду 2'F-ара-АЦ, тогда как азацитидин в тест-системе роста лейкозных клеток К-562 проявил практически такую же цитотоксическую активность как и в отношении клеток трех линий острого миелогенного лейкоза. Клетки острого Т-лимфобластного лейкоза MOLT-3 оказались абсолютно резистентны и к новому нуклеозидному аналогу и к азацитидину.

Величины EC₅₀, отражающие концентрацию нуклеозида, которая обеспечивает 50% ингибирования жизнеспособности лейкозных клеток по сравнению с контролем, составили 0,40 мкМ (KG-1), 0,50 мкМ (ТРН-1), 0,63 мкМ (HL-60) для нуклеозида 2'F-ара-АЦ и 3,75 мкМ (KG-1), 4,0 мкМ (ТРН-1), 5,3 мкМ (HL-60) для азацитидина, что указывает на 9-10 кратное усиление специфического цитотоксического эффекта нового аналога азацитидина по сравнению с контрольным препаратом.

В настоящее время проводятся испытания *in vivo* острой токсичности нового нуклеозидного аналога 2'F-ара-АЦ в сравнении с азацитидином и децитабином.

Заключение. Таким образом, результаты отборочного эксперимента позволяют говорить о возможности использования нового 2'-фторсодержащего нуклеозидного аналога азацитозина в фармации и медицине в качестве биологически активной субстанции противолейкозного средства.

Литература

1. Ширин А.Д. Возможности лечения миелодиспластических синдромов и роль эпигенетической терапии // Клиническая онкогематология. – 2008. – Т.1, №1, С.21-33.
2. Christman J. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy // Oncogene. – 2002. – V.21, № 35, P.5483-5495.
3. Божок Т.С., Калиниченко Е.Н. Синтез фторсодержащих аналогов 5-азациитидина // Известия НАН Беларуси. Серия хим. наук. – 2014. – №3, С.60-65.
4. Зефирова О.Н., Зефилов Н.С. Об истории возникновения и развития концепции биоизостеризма // Вестник Моск. ун-та. – 2002. – Т.43, № 4, С.251-256.

THE SEARCH FOR EFFECTIVE HYPOMETHYLATING AGENTS AMONG NUCLEOSIDE ANALOGUES OF AZACYTOSINE

Bozhok T.S., Golubeva M.B., Kalinichenko E.N., Kuzmitsky B.B.

Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences, Belarus

The methods for synthesis of new 2'(3')-fluoro-deoxy nucleoside analogues of 5-azacytosine were developed. Cytotoxic activity of the synthesized compounds was investigated *in vitro*. It was found that one of the obtained compounds exhibited the high cytotoxic effect against acute myeloid leukemia cells.