



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2007148014/15, 21.12.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.12.2007

(43) Дата публикации заявки: 27.06.2009

(45) Опубликовано: 20.11.2009 Бюл. № 32

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: SEGURA-AGUILAR J. et all. "The cytotoxic effects of 5-OH-1,4-naphthoquinone and 5,8-diOH-1,4-naphthoquinone on doxorubicin-resistant human leukemia cells (HK-60)". Leuk. Res., 1992, vol.16, No 6-7, p. 631-637. SU 1088346 A1, 30.12.1986. ПОЛОНИК С.Г. и др. Синтез и цитостатическая активность 2-бром-3-алкилглюонов и родственных тиоглюкозидов на их (см. прод.)

Адрес для переписки:

690022, г.Владивосток, пр-кт 100-летия
Владивостока, 159, Тихоокеанский институт
биоорганической химии ДВО РАН,
патентный отдел, Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

Федоров Сергей Николаевич (RU),
Полоник Сергей Георгиевич (RU),
Шубина Лариса Кимовна (RU),
Капустина Ирина Ивановна (RU),
Стоник Валентин Аронович (RU),
Шастина Валерия Владимировна (RU),
Квак Янг Йонг (KR),
Парк Джу Ин (KR),
Джин Джун О (KR),
Квон Янг Хии (KR)

(73) Патентообладатель(и):

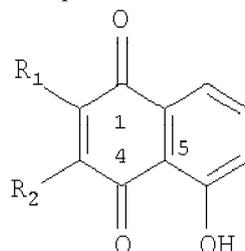
Тихоокеанский институт биоорганической
химии Дальневосточного отделения
Российской академии наук (ТИБОХ ДВО
РАН) (RU)

**(54) СРЕДСТВО, СТИМУЛИРУЮЩЕЕ АПОПТОЗ КЛЕТОК ЛЕЙКЕМИИ ЧЕЛОВЕКА
(ВАРИАНТЫ)**

(57) Реферат:

Изобретение относится к лекарственным средствам и касается применения производных О- и S-гликозидов 5-гидрокси-1,4-нафтохинона (юглона) формулы 1, где R₁ и R₂ имеют указанные в описании значения, в качестве средства, стимулирующего апоптоз клеток лейкемии человека. Предложенные соединения избирательно стимулируют апоптоз клеток лейкоза человека по сравнению с прототипом юглоном без воздействия на нормальные клетки иммунной системы человека (нейтрофилы). Изобретение позволяет расширить арсенал

средств, способных избирательно
стимулировать апоптоз лейкемических клеток. 4
н.п. ф-лы, 13 ил., 5 табл.



Формула 1

(56) (продолжение):

основе. Химико-фармацевтический журнал, 1995, №10, с.9-11. STN on the Web БД СА POLONIK.SG. at all. " Acetylated hydroxyjuglone glycosides: synthesis and study of their antifungal activity " Khimiko-

Farmatsevticheski Zhurnal, 1992, vol.26, No.6, 31-32. POLONIK.SG. at. all. "Antitumor and immunostimulating activity of 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (Juglone) O- and S-acetylglycosides" Pharmaceutical Chemistry Journal, 2003, vol.37, No.8, 397-398. WO 2008103470 A2, 28.08.2008.

R U 2 3 7 2 9 1 9 C 2

R U 2 3 7 2 9 1 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
A61K 31/7028 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2007148014/15, 21.12.2007**

(24) Effective date for property rights:
21.12.2007

(43) Application published: **27.06.2009**

(45) Date of publication: **20.11.2009 Bull. 32**

Mail address:

**690022, g. Vladivostok, pr-kt 100-letija
Vladivostoka, 159, Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoj khimii DVO RAN, patentnyj
otdel, N.I. Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Fedorov Sergej Nikolaevich (RU),
Polonik Sergej Georgievich (RU),
Shubina Larisa Kimovna (RU),
Kapustina Irina Ivanovna (RU),
Stonik Valentin Aronovich (RU),
Shastina Valerija Vladimirovna (RU),
Kvak Jang Jong (KR),
Park Dzhu In (KR),
Dzhin Dzhun O (KR),
Kvon Jang Khii (KR)**

(73) Proprietor(s):

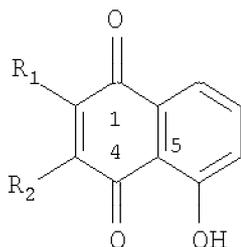
**Tikhookeanskij institut biorganicheskoj khimii
Dal'nevostochnogo otdelenija Rossijskoj akademii
nauk (TIBOKh DVO RAN) (RU)**

(54) **AGENT STIMULATING HUMAN LEUKAEMIA CELL APOPTOSIS (VERSIONS)**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention concerns medical products and covers applications of O- and S-glycosides 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (judlone) derivatives of formula 1 as



an agent that stimulates human leukaemia cell apoptosis. Disclosed compounds selectively stimulate human leukemia cell apoptosis as compared with a prototype juglone without affecting normal cells of human immune system (neutrophils).

EFFECT: invention allows extending range of products selectively stimulating leukaemia cell apoptosis.

4 cl, 13 dwg, 5 tbl, 14 ex

Изобретение относится к медицине и касается средств, обладающих способностью стимулировать апоптоз клеток лейкемии человека.

Лейкозы представляют собой опухоли, диффузно поражающие гемопоэтическую ткань костного мозга. Уровень заболеваемости лейкозами в разных странах мира колеблется в широком диапазоне: от 3 до 10 человек на 100000 населения. При этом мужчины болеют различными формами лейкоза примерно в 1,5 раза чаще, чем женщины. Максимальный уровень заболеваемости хроническими лейкозами наблюдается у людей старше 40-50 лет, а острыми - в возрасте до 10-18 лет.

Для лейкозов характерны:

- безграничный рост, неконтролируемое размножение клеток - гиперплазия;
- морфологическая анаплазия - потеря способности клетки к дифференцировке, созреванию, незрелость;

- угнетение нормального кроветворения за счет быстрого разрастания опухолевых элементов, «вытеснения» ими нормальных ростков кроветворения (метаплазия).

Основным методом лечения лейкозов является химиотерапия [В.И.Махолкин, С.И.Овчаренко. Внутренние болезни. М., Медицина, 1999]. В качестве лекарственных средств используют как препараты, полученные химическим синтезом, так и выделенные из природных источников. По механизму действия на опухолевый процесс их можно условно разделить на две основные группы; а) антиметаболиты - вещества нарушающие метаболизм основных биохимических процессов, протекающих в быстроделяющейся клетке (опухолевой), б) цитостатики - вещества, воздействующие непосредственно на процесс деления клеток.

К первым относятся такие лекарственные средства как метотрексат, меркаптопурин, тиогуанин, цитарабин, флударабин, гидроксимочевина, ко вторым - митосантрон, винкристин, винбластин, тенипозид, рубомицин, доксорубомицин и другие [М.Д.Машковский. Лекарственные средства. Т 2, Изд. 14, М. ООО «Новая Волна». 2001. С.407].

К сожалению, химиотерапия, как правило, имеет ряд сильно выраженных побочных эффектов. Вследствие слабой избирательности цитостатические препараты воздействуют как на больные, так и на здоровые клетки крови, что приводит к быстрой гибели значительного их числа и развитию почти полной цитопении - угнетению роста всех кровяных клеток (лейкоцитов, тромбоцитов и эритроцитов).

Наиболее опасным при этом является развитие лейкопении, так как лейкоциты представляют собой один из главных компонентов естественной защиты организма против инфекции. Степень и длительность лейкоцитопении, развивающейся после химиотерапии, в значительной степени определяет количество жизнеопасных инфекционных осложнений.

Тромбоцитопения также представляет клиническую проблему, обуславливая геморрагические осложнения, нередко фатальные, особенно при наличии сопутствующей инфекции.

Тяжелым осложнением применения химиотерапии при лечении лейкозов является угнетение роста нейтрофилов - нейтропения, которая приводит к инфекционным осложнениям. Учитывая высокую вероятность развития и потенциальную тяжесть инфекционных осложнений в условиях нейтропении, проводятся меры направленные на ограничение попадания возбудителей инфекции в организм пациентов извне с воздухом, пищей и водой, а также меры по борьбе с микроорганизмами,

колонизирующими организм. Последний подход включает профилактическое назначение антибиотиков и противогрибковых препаратов.

Острые лейкозы при своевременной диагностике излечиваются в 80-90% случаев. Хронические лейкозы излечиваются всего лишь в 20-40% случаев; больные лечатся годами, длительное время им необходим тщательный врачебный уход и применение разнообразных лекарственных средств, вследствие сравнительно быстрого привыкания опухолевых клеток к действию одного препарата [В.И.Махолкин, С.И.Овчаренко. Внутренние болезни. М., Медицина, 1999].

Все это свидетельствует о необходимости поиска новых препаратов для лечения лейкозов, основанных на подходах, отличных от вышеупомянутых.

В начале 70-х годов XX века биологами было введено в научный оборот новое представление - апоптоз, описывающее систему клеточной смерти, отличающуюся от некроза отсутствием воспалительных реакций и токсического отравления организма, характерного для некротического варианта распада клеток, наблюдающегося при применении традиционных противоопухолевых препаратов [Schutze-Osthoff K., Ferrari D., Los M. et al Apoptosis signaling by death receptors. Eur. J. Biochem. 1998, Vol.254. P.439-459; Blatt N.B., Glick G.D. Signaling pathways and effector mechanisms preprogrammed cell death. Bioorg. Med. Chem. 2001. Vol 9, P.1371-1384].

В ходе апоптоза клетки подвергаются характерным морфологическим изменениям, включающим конденсацию и фрагментацию ядра, сжатие цитоплазмы и образование так называемых апоптотических тел, которые содержат фрагменты ядра, окруженные цитоплазмой и клеточной мембраной. Апоптотические клетки быстро всасываются макрофагами.

Позже было осознано, что апоптоз происходит во всех тканях организма, как часть нормального круговорота клеток. Например, апоптоз протекает в ходе эмбриогенеза в котором отдельные клетки (части тела) «приговариваются» к смерти в ходе развития организма.

Апоптоз можно условно разделить на три этапа. На первом этапе клетка получает апоптотический сигнал. Большое число внутренних и внешних стимулов воздействия на клетку может активировать в ней апоптотическую последовательность реакций. Эти стимулы включают связывание с клеточными рецепторами на ее поверхности, удаление важнейших факторов роста или воздействие на нее различных химических агентов. Кроме того, окислительный стресс, облучение клетки УФ-светом либо ионизирующей радиацией, нагревание или изменение осмотического давления также являются факторами индуцирующими апоптоз.

На следующей ступени развития апоптоза клетка интегрирует поступающие отовсюду сигналы и может перейти (а может и не перейти) к процессу апоптоза, в ходе которого активируются ферментные системы, включается синтез вторичных мессенджеров липидного обмена, изменяется экспрессия генов и активируются специализированные протеазы (каспазы). Окончательное "решение" клетки на переход к апоптозу зависит от многих факторов. На финальном этапе апоптоза общий сигнальный механизм деградации одномоментно активируется таким образом, что клетка разом приобретает характерные морфологические особенности присущие апоптозу.

Одним из возможных подходов к уничтожению раковых лейкозных клеток может стать принудительная стимуляция (индукция) лейкозных клеток к апоптозу путем

воздействия на них подходящими биологически активными природными соединениями [S.-Y.Sun, N.Hail, R.Lotan. Apoptosis as a novel target for cancer. *J. Natl. Cancer Inst*, 2004, V.96, No 9, P.662-672]. Анализ литературных данных показал, что перспективной группой природных соединений, способных вызывать апоптоз

5 клеток, являются хиноны [Kim H.J., Mun J.Y., Chun Y.J., et al. Effects of a naphthoquinone analog on tumor growth and apoptosis induction *Arch. Pharm. Res.* 2003 Vol.26, No 5, P.405-410., Hussain H., Krohn K., Ahmad V.U., et al. *Lapachole: an overview. Arkivoc* 2007 (ii), P. 145-147].

10 Хиноидная структура широко распространена в природе. Согласно данным из природных источников выделено около 1500 соединений с хиноидным ядром [Thomson R.H., *Naturally Occurring Quinones III*, Chapman & Hall, London-New-York, 1987]. Хиноны являются важным классом природных и синтетических

15 соединений с большим разнообразием функций. Хорошо известна их роль в биохимии живых клеток, например в переносе электронов по дыхательной цепи (убихинон Q), или в механизме свертывания крови (витамин K).

Многие хиноны, например 5-гидрокси-1,4-нафтохинон (юглон) и его 2-метилгомолог плюмбагин, выделенные из различных высших растений,

20 ингибируют рост бактерий и грибов и используются растениями как защитные вещества [Жунгиету Г.И., Влад Л.А. Юглон и родственные 1,4-нафтохиноны, Штиинца, Кишинев, 1978]. Хиноидное ядро входит в структуру различных практически важных противоопухолевых препаратов (антрациклиновых

25 цитостатиков и гетероциклических хинонов). К настоящему времени принято считать, что цитотоксический эффект хинонов обусловлен: а) их способностью продуцировать кислородсодержащие свободные радикалы, б) электрофильностью хиноидного ядра, легко образующего аддукты с различными бионуклеофилами [Ashe C. *Antitumor quinones Mini Rev. Med. Chem*, 2005, Vol.5, No

30 5, P.449-467].

Способность хинонов продуцировать свободные кислородные радикалы и присоединять нуклеофилы в значительной степени зависит от количества и природы заместителей присоединенных к хиноидному ядру, что открывает путь к получению

35 новых соединений, путем модификации известных природных хинонов с уже установленной биологической активностью [Ollinger K., Brunmark A, Effect of hydroxy substituent position on 1,4-naphthoquinone toxicity to rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 1991. Vol.256, No 32, P.21496-21503].

Наиболее близким к заявляемому средству является 5-гидрокси-1,4-нафтохинон (юглон) - нафтохиноидный природный пигмент, содержащийся в корнях, листьях,

40 коре, древесине и коже орехов [Жунгиету Г.И., Влад Л.А. Юглон и родственные 1,4-нафтохиноны, Штиинца, Кишинев, 1978]. Это соединение проявляет разнообразную и высокую физиологическую активность. Юглон и его 2-метилгомолог плюмбагин, выделенные из различных высших растений,

45 ингибируют рост бактерий и грибов и используются растениями как защитные вещества.

Известно, что юглон проявляет противоопухолевую активность, в том числе в отношении клеток лейкоза человека. Противоопухолевые свойства юглона изучались

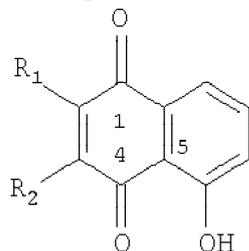
50 различными группами исследователей. В отчете Национального института рака США сообщалось, что юглон в дозах 4.0-10 мг/кг продлевал жизнь экспериментальных мышей с карциносаркомой Уокера-256 и саркомой-180 на 73 и 43% соответственно [J.S.Driscoll, G.F.Hazard, H.B.Wood, et al. *Structure-Antitumor*

Activity Relationships Among Quinone Derivatives. 1974, Cancer Chemother. Repts. Part 2, Vol.4, No 2, P.1-35]. Юглон также проявлял цитотоксический эффект в отношении асцитных клеток карциномы Эрлиха, препятствуя вступлению опухолевых клеток в фазу митоза [Okada T.A., Roberts E., Brodie A.F. Mitotic abnormalities produced by juglone in Erlich ascities tumor cells. Proc. Soc. Exp. Biol Med, 1967, Vol.126, P.583-588].

Положительной стороной противоопухолевого действия юглона является его способность стимулировать опухолевые клетки к апоптозу, причем этот эффект сохраняется и для клеток, устойчивых к действию других противоопухолевых препаратов [Segura-Aguilar J., Junsson K., Tidifelt U., et al. The cytotoxic effects of 5-OH-1,4-naphthoquinone and 5,8-diOH-1,4-naphthoquinone on doxorubicin-resistant human leukemia cells (HK-60). Leuk. Res., 1992, Vol.16, No 6-7, P.631-637].

Задача изобретения - расширение арсенала средств, способных избирательно стимулировать апоптоз лейкемических клеток.

Задача решена применением производных О-гликозидов 5-гидрокси-1,4-нафтохинона (юглона) формулы 1,



Формула 1,

где один из радикалов R_1 или R_2 является пер-О-ацетилированным О-монозидным или О-биозидным углеводным радикалом с 1,2-трансконфигурацией О-гликозидной связи, а второй радикал является Н, в качестве средства, стимулирующего апоптоз клеток лейкемии человека.

Во втором варианте выполнения изобретения задача решена применением производных О-гликозидов 5-гидрокси-1,4-нафтохинона (юглона) формулы 1, где оба радикала R_1 и R_2 одновременно являются пер-О-ацетилированными О-монозидными или О-биозидными углеводными радикалами с 1,2-трансконфигурацией О-гликозидной связи, в качестве средства, стимулирующего апоптоз клеток лейкемии человека.

В третьем варианте выполнения изобретения задача решена применением производных S-гликозидов 5-гидрокси-1,4-нафтохинона (юглона) или их алкилзамещенных производных формулы 1, где один из радикалов R_1 или R_2 является пер-О-ацетилированным S-монозидным или S-биозидным углеводным радикалом с 1,2-трансконфигурацией S-гликозидной связи, а второй является Н либо линейным алкильным радикалом с углеводородной цепью с 1-8 атомами углерода, в качестве средства, стимулирующего апоптоз клеток лейкемии человека.

В четвертом варианте выполнения изобретения задача решена применением производных S-гликозидов 5-гидрокси-1,4-нафтохинона (юглона) или их алкилзамещенных производных формулы 1, где оба радикала одновременно являются пер-О-ацетилированными S-монозидными или S-биозидными углеводными радикалами с 1,2-трансконфигурацией S-гликозидной связи, в качестве средства, стимулирующего апоптоз клеток лейкемии человека.

Производные О-гликозидов 5-гидрокси-1,4-нафтохинона (юглона) формулы 1, где

R_1 является О-монозидным (О-биозидным) пер-О-ацетилированным радикалом, а $R_2 = H$, либо $R_1 = H$, а R_2 является О-монозидным (О-биозидным) пер-О-ацетилированным радикалом, получают путем автокаталитической
 5 конденсации эквимольных количеств 1,2-ортоэфиров D-глюкозы и мальтозы с соответствующими 2,5-дигидрокси- и 3,5-дигидрокси-1,4-нафтохинонами согласно патенту [SU 1088346 A1, 30.12.1986].

Соединения формулы 1, где оба R_1 и R_2 являются О-монозидным (О-биозидным) пер-О-ацетилированным радикалом, получают аналогично, путем конденсации
 10 2,3,5-тригидрокси-1,4-нафтохинона с 2 молями 1,2-ортоэфиров D-глюкозы или мальтозы [Примеры 1,2]

Производные S-гликозидов формулы 1, в которых один из радикалов R_1 или R_2 , является S-монозидным (S-биозидным) пер-О-ацетилированным радикалом, а другой
 15 водородом, либо линейным алкильным радикалом с углеводородной цепью с 1-8 атомами углерода, либо оба радикала R_1 , R_2 являются S-монозидными (S-биозидными) пер-О-ацетилированными радикалами получают путем конденсации пер-О-ацетилированных 1-меркаптосахаров с соответствующими 2,3-замещенными
 20 галогеналкилюглонами (2,3-дигалогенюглонами) [Полоник С.Г., Толкач А.М., Шенцова Е.Б., Уварова Н.И. Синтез и цитостатическая активность 2-бром-3-алкилюглонов и родственных тиоглюкозидов на их основе. Хим.-фарм. журнал. 1995, №10, с.9-10. Примеры 3-6].

Соединения формулы 1, в которых $R_1 = H$, а R_2 является S-монозидным (S-биозидным) пер-О-ацетилированным радикалом, также могут быть получены
 25 региоизбирательным присоединением пер-О-ацетилированного 1-меркаптомонозида (1-меркаптобиозида) к $C=C-C=O$ системе связей юглона, с последующим окислением образующегося интермедиата кислородом воздуха [Отчет о НИР ТИБОХ ДВО РАН. 2001-2005 гг., тема: «Изучение новых морских природных соединений. Выделение, структуры, биосинтез и биологическая активность. Всеросс. научно-техн. информ. центр (ВНТИЦ), инв. №022006 06359. Пример 7].

Сведения, подтверждающие возможность получения гликозидов формулы 1.

Пример 1.

2,3-Бис(2',3',4',6'-тетра-О-ацетил- β -D-глюкопиранозилокси)-
 5-гидрокси-1,4-нафтохинон, 2,3,5-Тригидрокси-1,4-нафтохинон, 103 мг (0.5 ммоль),
 3,4,6-три-О-ацетил-1,2-О-(1-третбутоксипропилиден)- α -D-глюкопираноза, 404 мг (1.0 ммоль) и 10 мл абс. хлорбензола кипятили 1 час в колбе с обратным холодильником,
 40 защищенным хлоркальциевой трубкой. Растворитель упарили в вакууме, из остатка препаративной тонкослойной хроматографией (ПТСХ) на стеклянной пластине размерами 20×20 см на незакрепленном слое SiO_2 в системе растворителей гексан-бензол-ацетон (2:1:1 v/v), двухкратное проявление, выделили кристаллический
 45 продукт реакции желтого света с $R_f=0.41$. После перекристаллизации из смеси бензол-MeOH получили желтые иглы с т.пл. 163-164°C. Вес 176 мг (40%). Спектр ЯМР 1H (300 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 2.01, 2.03, 2.04(2), 2.05(2), 2.09, 2.10 (8 × AcO), 3.83 м. (2H, 2H⁵), 4.12 м, (2H, 2H⁶), 4.28 м, (2H, 2H⁶), 5.20-5.35 м, (6H, 2H², 2H³, 2H⁴),
 50 5.76 д,

(1H, H¹, J=7.4 Гц), 5.91 д, (1H, H¹, J=7.2 Гц), 7.29 м, (1H, H⁶), 7.62 (м, 2H, H⁸ и H⁷, 11.75 с, (1 H, C⁵-OH). ИК-спектр ($CHCl_3$, ν , cm^{-1}): 1756 (CH_3COOR), 1668 (C=O), 1637

(C=O), 1458, 1370, 1249, 1191, 1089, 1041. Найдено, %: С 52.56; Н 5.03. $C_{38}H_{42}O_{23}$.

Вычислено, %: С 52.66; Н 4.88.

Пример 2.

5 2,3-Бис-[2',3',6'-три-О-ацетил-4'-О-(2'',3'',4'',6''-тетра-О-ацетил- α -D-глюкопиранозил)- β -D-глюкопиранозилокси)]-
5-гидрокси-1,4-нафтохинон. 2,3,5-Тригидрокси-1,4-нафтохинон, 42 мг (0.2 ммоль),
3,6-ди-О-ацетил-1,2-О-(1-метокси-этилиден)-4-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил- α -D-глюкопиранозил)- α -D-глюкопиранозу, 260 мг (0.4
10 ммоль) и 6 мл абс. хлорбензола кипятили 1 час в колбе с обратным холодильником,
защищенным хлоркальциевой трубкой. Растворитель упарили в вакууме, из остатка
ПТСХ на стеклянной пластине размерами 20×20 см на незакрепленном слое SiO_2 в
системе растворителей гексан-бензол-ацетон (2:1:1 v/v), двукратное проявление,
15 выделили продукт реакции с $R_f=0.21$, светло желтый аморфный порошок, вес 212
г (86%), Спектр 1H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д., J/Гц): 2.01(2), 2.02(3), 2.06(7),
2.11(2), все с, 3H (14 × OAc); 3.82 м, (2H, углеводные протоны), 3.94-4.13 м, (6H,
углеводные протоны), 4.19-4.31 м, (4H, углеводные протоны), 4.50 м, (2H,
20 углеводные протоны), 4.87 м, (2H, углеводные протоны), 5.03-5.17 м, (4H,
углеводные протоны), 5.23-5.40 мд, (4H, углеводные протоны), 5.43 д, (1H, $H^{1''}$,
 $J_{1'',2''}=3.7$ Гц), 5.44 д, (1H, $H^{1''}$, $J_{1'',2''}=3.8$ Гц), 5.65 д, (1H, $H^{1'}$, $J_{1',2'}=6.9$ Гц), 5.81 д, (1H,
 $H^{1'}$, $J_{1',2'}=6.9$ Гц), 7.29 м, (1H, H^6), 7.62 м, (2H, H^8 и H^7), 11.74 с, (1H, C^5 -ОН).
25 ИК-спектр ($CHCl_3$), ν/cm^{-1} : 1754(COOR), 1672(C=O). 1456. Найдено (%): С, 51.87; Н,
5.12. $C_{62}H_{74}O_{39}$. Вычислено (%): С, 51.60; Н, 5.17.

Пример 3.

30 3-(Тetra-О-ацетил- β -D-глюкопиранозил-1-тио)-2-этил-5-гидрокси-1,4-нафтохинон. К
смеси 2-этил-3-бром-5-гидрокси-1,4-нафтохинона 120 мг (0.42 ммоль),
тетра-О-ацетил-1-тио- β -D-глюкопиранозы, 153 мг (0.42 ммоль), в 5 мл сухого
ацетонитрила прибавляли 140 мг (1.0 ммоль) тонкорастертого K_2CO_3 и
перемешивали 40 мин при 25°C, контролируя ход реакции ТСХ. Неорганические
35 соли отфильтровали, осадок промыли толуолом, фильтрат упарили. Остаток
кристаллизовали из смеси бензол - абс. MeOH и получили светло-коричневые иглы с
т.пл. 189-191°C. Вес 143 мг (61%). Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д.): 1.87 т (3H,
 CH_2CH_3 , $J=7.5$ Гц), 1.87, 2.02, 2.03, 2.12 (4 × AcO), 2.89 кв, (2H, CH_2CH_3), 3.67 дд,
40 (1H, $H^{5'}$, $J_{4',5'}=9.8$ Гц, $J_{5',6a'}=1.9$ Гц, $J_{5',6b'}=5.0$ Гц), 4.04 дд, (1H, $H^{6'}$, $J_{6a',6b'}=12.0$ Гц),
4.12 дд. (2H, $2H^{6'}$), 5.08 т, (1H, $H^{4'}$, $J_{3',4'}=9.2$ Гц), 5.12 т (1H, $H^{2'}$, $J_{2',3'}=9.2$ Гц), 5.27 т,
(1H, $H^{3'}$), 5.46 д. (1H, $H^{1'}$, $J_{1',2'}=10.0$ Гц), 7.60 д, (1H, H^6 , $J_{6,7}=7.7$ Гц), 7.66 м, (2H, H^8 и
45 H^7), 11.97 с, (1H, C^5 -ОН). ИК-спектр ($CHCl_3$, ν , cm^{-1}): 1755 (CH_3COOR), 1660 (C=O),
1633. Найдено, %: С 55.21; Н 5.03; S 5.62. $C_{26}H_{28}O_{12}S$. Вычислено, %: С 55.31; Н 5.00;
S 5.68.

Пример 4.

50 2-[2',3',6'-Три-О-ацетил-4'-О-(2'',3'',4'',6''-тетра-О-ацетил- α -D-глюкопиранозил)- β -D-глюкопиранозил-1'-тио)]-
3-метил-5-гидрокси-1,4-нафтохинон. К суспензии 90 мг (0.33 ммоль)
2-бром-3-метил-5-гидрокси-1,4-нафто-хинона, 217 мг (0.33 ммоль)

2',3',6'-три-О-ацетил-4'-О-(2'',3'',4'',6''-тетра-О-ацетил- α -D-глюкопиранозил)-
 1-тио- β -D-глюкопиранозы в 5 мл сухого ацетона прибавляли 47 мг (0.33 ммоль)
 тонкорастертого K_2CO_3 и перемешивали 1 час при 25°C. Неорганические соли
 5 отфильтровали, осадок промыли ацетоном, фильтрат упарили. Остаток
 кристаллизовали из абс. MeOH и получили желтые кристаллы. Вес 206 мг (75%). Т.
 пл. 185-187°C. Спектр 1H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д., J/Гц): 1.94, 2.00, 2.01, 2.02,
 2.05, 2.06, 2.01 (7 \times OAc), 2.32 с, (3H, ArCH₃), 3.92 дцд, (1H, H^{5''}, J_{4'',5''}=9.2.0 Гц,
 10 J_{5'',6''}=2.4 Гц, J_{5'',6''}=2.0 Гц), 3.69 ддд, (1H, H^{5'}, J_{4',5'}=10.0 Гц, J_{5',6'}=4.0 Гц, J_{5',6'}=5.0 Гц,
 3.96 т (1H, H^{4''}, J_{3'',4''}=5.3 Гц), 4.03 дд, (1H, H^{6''}, J_{6'',6''}=10.7 Гц), 4.11 дд, (1H H^{6'},
 J_{6',6'}=12.5), 4.24 дд, (1H, H^{6'}, J=9.7 Гц, J=8.7 Гц); 4.35 дд, (1H, H^{6''}), 4.85 д.д, (1H, H^{2''},
 15 J_{2'',3''}=10.5 Гц), 4.97 дд, (H^{2'}, J_{2',3'}=10.5 Гц), 5.04 т, (1H, H^{4'}, J_{3',4'}=9.0 Гц), 5.31 дд, (1H,
 H^{3'}), 5.33 д, (1H, H^{3''}), 5.39 д (1H, H^{1''}, J_{1'',2''}=4.2 Гц), 5.62 д (1H, H^{1'}, J_{1',2'}=10.0 Гц),
 7.25 дд, (1H, H^{6'}, J_{6',7'}=7.5 Гц, J_{6',8'}=2.0 Гц), 7.51 т (1H⁸, J_{7,8}=7.5 Гц), 7.65 дд, (1H⁷); 12.05
 с, (1H, C⁵-ОН). ИК-спектр ($CHCl_3$), ν/cm^{-1} : 1755 (COOR), 1667(CO), 1635, 1593, 1457,
 20 1368, 1274, 1248, 1044. Найдено (%): С, 53.95; Н, 4.90; S, 4.01. C₃₇H₄₁O₁₉S.
 Вычислено (%): С, 54.08; Н, 5.03; S, 3.90.

Пример 5.

2,3-Бис(2',3',4'-три-О-ацетил- β -D-ксилопиранозил-1-тио)-5-гидрокси-1,4-нафтохинон.
 25 К суспензии 243 мг (1.0 ммоль) 2,3-дихлор-5-гидрокси-1,4-нафтохинона, 582 мг (2
 ммоль) три-О-ацетил-1-тио- β -D-ксилопиранозы в 20 мл сухого ацетона
 прибавляли 420 мг (3 ммоль) тонкорастертого K_2CO_3 и перемешивали 0.5 час при
 25°C, контролируя ход реакции ТСХ. Неорганические соли отфильтровали, осадок
 30 промыли ацетоном, фильтрат упарили. Остаток кристаллизовали из смеси бензол -
 абс. MeOH и получили светло-коричневые иглы с т.пл. 138-140°C. Вес 540 мг (72%),
 Спектр 1H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д., J/Гц): 2.04, 2.06, 2.08, 2.09, 2.11 (2) (6 \times
 OAc), 3.45 д.д, (1H, H^{5a'}, J_{4',5a'}=7.8 Гц, J_{5a',5b'}=11.9 Гц), 3.47 д.д, (1 H, H^{5a'}, J_{4',5a'}=7.38
 35 Гц, J_{5a',5b'}=11.9 Гц), 4.19 д.д, (1H, H^{5b'}, J_{4',5b'}=4.9 Гц), 4.27 д.д, (1H, H^{5b'}, J_{4',5b'}=4.4 Гц),
 4.95 м, (2H, 2H^{4'}); 5.07 т, (1H, H^{2'}, J_{1',2'}=8.1 Гц; J_{2',3'}=7.9 Гц), 5.09 т, (1H, H^{2'}, J_{1',2'}=7.0 Гц, J
 2',3'=7.9 Гц), 5.19 т,
 40 (1H, H^{3'}), 5.22 т, (1H, H^{3'}); 5.69 д, (1H, H^{1'} J_{1',2'}=7.0 Гц); 5.89 д, (1H, H^{1'} J_{1',2'}=8.1 Гц),
 7.29 м, (1H, H^{6'}), 7.62 м, (2H, H⁸ и H⁷), 11.83 с, (1H, C⁵-ОН). ИК-спектр ($CHCl_3$),
 ν/cm^{-1} : 1753 (COOR), 1670 (CO), 1594 (C-C), 1558. Найдено (%): С, 51.10; Н, 4.72; S,
 8.61. C₃₂H₃₄O₁₇S₂. Вычислено (%): С, 50.93; Н, 4.54; S, 8.50.

Пример 6.

2,3-Бис-[2',3',6'-три-О-ацетил-4'-О-
 (2'',3'',4'',6''-тетра-О-ацетил- α -D-глюкопиранозил)- β -D-глюкопиранозил-1-тио)]-
 5-гидрокси-1,4-нафтохинон. К суспензии 24 мг (0.1 ммоль)
 50 2,3-дихлор-5-гидрокси-1,4-нафтохинона, 130 мг (0.2 ммоль) 2',3',6'-три-О-ацетил-4'-О-
 (2'',3'',4'',6''-тетра-О-ацетил- α -D-глюкопиранозил)-1-тио- β -D-глюкопиранозы в 5 мл
 сухого ацетонитрила прибавляли 25 мг (0.2 ммоль) тонкорастертого K_2CO_3 и
 перемешивали 40 мин при 25°C, контролируя ход реакции ТСХ. Неорганические

соли отфильтровали, осадок промыли толуолом, фильтрат упарили в вакууме, из остатка ПТСХ на стеклянной пластине размерами 20×20 см на незакрепленном слое SiO₂ в системе растворителей гексан-бензол-ацетон (2:1:1 v/v), двукратное проявление, выделили продукт реакции с R_f=0.15, желтый аморфный порошок, вес 102 мг (69%). Спектр ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃, δ, м.д., J/Гц): 2.01(2), 2.02(3), 2.06(7), 2.11(2), все с, 3H (14 × OAc); 3.73 м, (2 H, углеводные протоны), 3.89-4.15 м, (6H, углеводные протоны), 4.25 м, (4H, углеводные протоны), 4.87 м, (3H, углеводные протоны), 5.15 м, (3H, углеводные протоны), 5.24-5.46 м, (6H, углеводные протоны), 5.52 д, (1H, H^{1''}, J_{1'',2''}=4.1 Гц), 5.55 д, (1H, H^{1''}, J_{1'',2''}=3.1 Гц), 5.60 д, (1H, H^{1'}, J_{1',2'}=10.1 Гц), 5.85 д, (1H, H^{1'}, J_{1',2'}=10.1 Гц), 7.29 м, (1H, H⁶), 7.64 м, (2H, H⁸ и H⁷), 11.84 с, (1 H, C⁵-ОН). ИК-спектр (CHCl₃), ν/см⁻¹: 1755(COOR), 1670(C=O), 1632, 1454. Найдено (%): C, 50.50; H, 4.92; S, 4.56. C₆₂H₇₄O₃₇S₂. Вычислено (%): C, 50.47; H, 5.06; S, 4.35

Пример 7.

3-(2',3',4',6'-Тетра-О-ацетил-β-D-галактопиранозил-1'-тио)-5-гидрокси-1,4-нафтохинон. К раствору 364 мг (1.0 ммоль) тетра-О-ацетил-1-тио-β-D-галактопиранозы в 40 мл теплого (40-45°C) спирта добавили 174 мг (1.0 ммоль) тонкорастертого юглона и перемешивали в открытой колбе. Наблюдали быстрое изменение цвета реакционной смеси от светло-желтой до темно-коричневой. Спустя 15-20 мин началось выпадение желтого осадка 3-ацетилтиогалактозида юглона. Реакционную смесь перемешивали 4 час в открытом сосуде для окисления промежуточно образующегося гидрохинонового интермедиата, выдерживали ночь в открытом сосуде при комнатной температуре, выпавший осадок отфильтровали, промыли холодным этанолом и получили 3-ацетилтиогалактозид юглона. Выход 414 мг (79%). Т.пл. 226-228°C. Спектр ¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃, δ, м.д., У/Гц): 2.01, 2.08, 2.12, 2.24 (4 × OAc); 3.85 м, (1H, H⁵), 4.01 м, (1H, H⁶), 4.20 д.д, (1H⁶, J_{5',6a'}=4.5 Гц; J_{6a',5b'}=11.3 Гц), 4.88 д. (1H, H^{1'}, J_{1',2'}=10.0 Гц). 14 д.д, (1H, H^{3'}, J_{3',4'}=3.3 Гц, J_{2',3'}=9.9 Гц), 5.52 д, (1H, H^{4'}), 5.56 т, (1H, H²), 7.06 с, (1H, H²), 7.25 д.д, (1H, H⁶, J_{6,7}=8.1 Гц, J_{6,8}=1.5 Гц), 7.61 д.д, (1H⁸, J_{7,8}=7.5 Гц), 7.65 т, (1H⁷); 11.56 с, (1H, C⁵-ОН). ИК-спектр (CHCl₃), ν/см⁻¹: 1754 (COOR), 1655, 1634 (CO), 1567 (C=C), 1456, 1370, 1270. Найдено (%): C, 52.51; H, 4.53; S, 6.05. C₂₃H₂₄O₁₂S. Вычислено (%): C, 52.67; H, 4.61; S, 6.11.

Полученные вышеописанными способами, исследованные и заявляемые по новому назначению ацетилированные О- и S-гликозиды ряда 5-гидрокси-1,4-нафтохинона (юглона) сведены в таблицу 1.

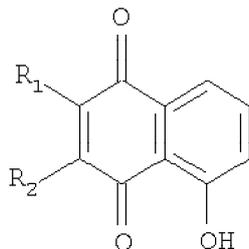
45

Исследованные О- и S-гликозиды ряда 5-гидрокси-1,4-нафтохинона (юглона)

Таблица 1

50

5



10

15

20

25

30

35

40

45

№ соединения	Заместители	Структуры заместителей
1	$R_1=R_2=H$ (юглон)	$AcOCH_2$
2	$R_1=Ac_4GlcO$; $R_2=H$	$Ac_4GlcX=$
3	$R_1=H$; $R_2=Ac_4GlcO$	
4	$R_1=R_2=Ac_4GlcO$	$X=O$ or S $AcOCH_2$
5	$R_1=Ac_7MaltO$; $R_2=H$	$Ac_4GalS=$
6	$R_1=H$; $R_2=Ac_7MaltO$	
7	$R_1=Ac_4GlcS$; $R_2=H$	$Ac_3XylS=$
8	$R_1=H$; $R_2=Ac_4GlcS$	
9	$R_1=R_2=Ac_4GlcS$	
10	$R_1=Ac_4GlcS$; $R_2=Me$	$Ac_3AraS=$
11	$R_1=H$; $R_2=Ac_4GalS$	
12	$R_1=H$; $R_2=Ac_4ManS$	$Ac_4ManS=$
13	$R_1=H$; $R_2=Ac_3XylS$	
14	$R_1=H$; $R_2=Ac_3-L-AraS$	$Ac_7MaltX=$
15	$R_1=H$; $R_2=Ac_7MaltS$	 $X=O$ or S

50

Известно, что ацелированные О-гликозиды юглона обладают антигрибковой активностью [Полоник С.Г., Толкач А.М., Стехова С.И. и др. Синтез и изучение противогрибковой активности ацелированных гликозидов гидроксиглонов. Хим.-фарм. журнал. 1992, №6, с.31-32]. Для этих соединений и ацелированных

S-гликозидов юглона также характерна противоопухолевая и иммуностимулирующая активность [Полоник С.Г., Прокофьева Н.Г., Агафонова И.Г. и др. Противоопухолевая и иммуностимулирующая активность O- и S-гликозидов 5-гидрокси-14-нафтохинона (юглона). Хим.-фарм. журн., 2003, Т. 37, №8, с.3-4].

Однако новое назначение ацетилированных O- и S-гликозидов ряда 5-гидрокси-1,4-нафтохинона (юглона) в качестве средства, обладающего способностью избирательно стимулировать апоптоз клеток лейкемии человека, не вытекает с очевидностью из их известных свойств и обнаружено авторами впервые.

Технический результат заключается в более выраженной способности (в 2-3 раза более высокая активность и меньший временной промежуток, необходимый для стимуляции апоптоза) ацетилированных O- или S-гликозидов юглона избирательно стимулировать апоптоз клеток лейкоза человека по сравнению с прототипом юглоном без воздействия на нормальные клетки иммунной системы человека (нейтрофилы). Это снижает риск возникновения нейтропении, сопровождающей лечение лейкемии традиционными противораковыми препаратами. Изобретение расширяет арсенал средств, стимулирующих апоптоз клеток лейкемии человека.

На фиг.1 представлена цитотоксическая активность гликозидов юглона 2-15 в отношении клеток лейкемии человека HL-60, определенная методом микроскопии - цифровой фотографии. Представлен один из трех независимых экспериментов.

На фиг.2 представлен дозозависимый цитотоксический эффект юглона 1 (Juglone) и его гликозидов 3 (U-112) и 11 (TU-299) в отношении клеток лейкемии человека HL-60, определенный методом МТТ после 24 часов инкубирования клеток с веществами. Каждая точка на графике соответствует усредненному числу живых клеток, выраженному в процентах \pm SD (стандартное отклонение от среднего), полученному из трех независимых опытов, по три образца на каждую концентрацию вещества в каждом из опытов.

На фиг.3 представлен дозозависимый цитотоксический эффект O-гликозида юглона 3 (U-112) в отношении различных видов клеток лейкемии, полученный методом МТТ после 24 часов инкубирования клеток с веществами. Каждая точка на графике соответствует усредненному числу живых клеток, выраженному в процентах \pm SD (стандартное отклонение от среднего), полученному из трех независимых опытов, по три образца на каждую концентрацию вещества в каждом из опытов.

На фиг.4 представлен эффект индукции апоптоза юглоном 1 (Juglone) и его гликозидами 3 (U-112) и 11 (TU-299), взятыми в концентрации 1 μ M, через 24 часа инкубирования с клетками лейкемии HL-60, полученный методом проточной цитометрии с окрашиванием апоптотических клеток флуоресцентными красителями Annexin V-FITC и PI. Эффект представлен в виде числа апоптотических клеток, выраженного в процентах (правый нижний квадрант - ранний апоптоз; правый верхний квадрант - поздний апоптоз). Представлен один из трех независимых экспериментов.

На фиг.5 представлено влияние юглона 1 (Juglone) и его гликозидов 3 (U-112) и 11 (TU-299), взятыми в концентрации 1 μ M на величину самопроизвольного апоптоза нейтрофилов крови человека, полученное методом проточной цитометрии через 24 часа инкубирования клеток с веществами. Каждый "столбик" соответствует усредненному количеству апоптотических клеток, выраженному в процентах \pm SD (стандартное отклонение от среднего), полученному из трех независимых опытов.

На фиг.6 представлен эффект индукции апоптоза юглоном 1 (Juglone) и его

гликозидами 3 (U-112) и 11 (TU-299), взятыми в концентрации 1 μM , в лейкемических клетках различных типов, определенный методом проточной цитометрии через 24 часа инкубирования клеток с веществами. Каждый "столбик" соответствует усредненному количеству апоптотических клеток в процентах \pm SD (стандартное отклонение от среднего), полученному из трех независимых опытов.

На фиг.7 представлена дозозависимая индукция апоптоза юглоном 1 и его гликозидами 3 и 11 в клетках лейкемии HL-60, определенная методом проточной цитометрии через 24 часа инкубирования веществ с клетками. Каждая точка на графике соответствует усредненному количеству апоптотических клеток в процентах \pm SD (стандартное отклонение от среднего), полученному из трех независимых экспериментов.

На фиг.8 представлена времязависимая индукция апоптоза юглоном 1 и его гликозидами 3 и 11, взятыми в концентрации 1 μM , в клетках лейкемии HL-60, определенная методом проточной цитометрии. Каждая точка на графике соответствует усредненному количеству апоптотических клеток в процентах \pm SD (стандартное отклонение от среднего), полученному из трех независимых экспериментов.

На фиг.9 представлен эффект юглона 1 (Juglone) и его гликозидов 3 (U-112) и 11 (TU-299), взятых в концентрации 1 μM , на клеточный цикл клеток лейкемии HL-60, определенный методом проточной цитометрии через 24 часа инкубирования клеток с веществами. Эффект представлен в виде числа клеток, находящихся в той или иной фазе клеточного цикла, выраженного в процентах. Наличие клеток в фазе Sub-G₁ является характерным признаком апоптоза. Представлен один из трех независимых экспериментов.

На фиг.10 представлен тест TUNEL на индукцию апоптоза в клетках лейкемии HL-60, обработанных юглоном 1 (Juglone) и его гликозидами 3 (U-112) и 11 (TU-299) в концентрации 1 μM . Представлен один из трех независимых экспериментов.

На фиг.11 представлено влияние юглона 1 (Juglone) и гликозидов юглона 3 (U-112) и 11 (TU-299), взятых в концентрации 1 μM , на уровень глутатиона в клетках лейкемии HL-60. Концентрация глутатиона выражена в $\mu\text{M}/10^6$ клеток. Каждый "столбик" соответствует усредненному значению концентрации глутатиона \pm SD (стандартное отклонение от среднего), полученному из трех независимых опытов.

На фиг.12 представлены эффекты юглона 1 (Juglone) и гликозидов юглона 3 (U-112) и 11 (TU-299), взятых в концентрации 1 μM , а также глутатиона, ацетилцистеина (NAC) и дифенилениодоний хлорида (DPI) - ингибитора флавинсодержащей NADPH-оксидазы на проницаемость митохондриальных мембран в клетках HL-60. Представлен один из трех независимых экспериментов.

На Фиг.13 представлен эффект 1 μM концентрации гликозидов 3 (U-112) и 11 (TU-299), а также юглона 1 (Juglone) на внутриклеточные уровни прокаспаз-3, -8 и -9 в клетках HL-60. Представлен один из трех независимых экспериментов.

Исследование биологической активности

I. Материалы и методы.

1. Принятые сокращения.

U-112- гликозид юглона, соединение 3 (см. таблицу 1); TU-299- гликозид юглона, соединение 11 (см. таблицу 1); mM - миллимоль/литр; μM - микромоль/литр; μl - микролитр; SD - стандартное отклонение от среднего; МТТ - метод определения цитотоксичности веществ (см. пункт.4. Определение цитотоксичности); Annexin V-FITC - флуоресцентный краситель; PI - пропидиум иодид, флуоресцентный

краситель; TUNEL - метод определения апоптоза (см. пункт. 6. Анализ методом TUNEL); Sub-G₁ - одна из фаз клеточного цикла, характерная для клеток, находящихся в апоптозе; PBS - фосфатно-солевой буферный раствор; FBS - сыворотка крови бычьих эмбрионов; ДМСО - диметилсульфоксид; GSH-глутатион, GSSG-диглутатион, дисульфид глутатиона; ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота.

2. Культивирование клеток.

HL-60, THP-1, NB4 или K562 клетки из коллекции ATTC (American Type Tissue Culture Collection, Rockville, MD) культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, в атмосфере, содержащей 5% CO₂, при 37°C, и пересеивали каждые 2 дня.

Нейтрофилы, клетки иммунной системы человека, выделяли из свежей человеческой крови.

3. Приготовление растворов веществ.

Базовые (стоковые) растворы гликозидов с концентрацией вещества 20 mM готовили в диметилсульфоксиде (ДМСО) (Fisher, USA), из которого получали растворы нужной концентрации разбавлением в культуральной среде. Содержание ДМСО в разбавленных растворах не превышало 0,5% во всех опытах.

4. Определение цитотоксичности веществ методом цифровой фотографии - микроскопии.

Цитотоксические свойства гликозидов 5-гидрокси-1,4-нафтохинонов изучались на опухолевых клетках человека с использованием метода микроскопии - цифровой фотографии. В работе использовали микроскоп Axiovert 200 (Zeiss, Germany), снабженный цифровым фотоаппаратом Hamamatsu Orca ER C4742-95 (Hamamatsu Photonics K.K., Japan). Клетки лейкоза человека HL-60 (3×10⁵ клеток на лунку) выращивали в 6-луночной планшете в течение 24 час в 3 мл среды 10% FBS/RPMI. В лунку с клетками добавляли рассчитанное количество разбавленного раствора гликозида и инкубировали планшет в течение 24 час. Обработанные клетки фотографировали и сравнивали их фотографии с фотографией необработанных контрольных клеток. Цитотоксический эффект гликозидов проявлялся в характерных морфологических изменениях клеток (округление клетки, сморщивание и нарушение целостности мембраны, распад клетки на апоптотические тела). Концентрация исследуемого вещества считалась цитотоксической при наличии более 50% клеток, имеющих характерные морфологические изменения.

5. МТТ колориметрический тест оценки жизнеспособности клеток и цитотоксичности веществ.

3-(4,5-этилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромид (МТТ) (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) был использован для определения цитотоксичности веществ. Клетки лейкемии HL-60 (NB4, THP-1, K562) были высеваны в 96-луночный планшет (1×10⁴ клеток на лунку в 50 мкл среды) и затем обработаны растворами (в 50 мкл среды) юглона 1 или его гликозидов 3 или 11 различной концентрации. Затем раствор МТТ (5 мг/мл) был добавлен в каждую лунку и клетки инкубировали при 37 С и 5% CO₂ в течение 4 часов. Клеточную суспензию центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин и клетки в каждой лунке экстрагировали затем 100 мкл диметилсульфоксида. Затем определяли оптическую плотность растворов в каждой лунке на планшетном ридере-спектрофотометре (Bio-Teck Instruments. Inc., США) при 550 нм. Процентное содержание живых клеток затем вычисляли по формуле (ОП

$\frac{ОП_{\text{эксп}}}{ОП_{\text{ктрл}}}) \times 100$, где

$ОП_{\text{эксп}}$ - оптическая плотность экспериментальной лунки, $ОП_{\text{ктрл}}$ - оптическая плотность контрольной лунки.

5 6. Тест на апоптоз с использованием цитометрического анализа.

Клетки (1×10^6) обрабатывали юглоном или гликозидами в указанных концентрациях, инкубировали в течение указанного промежутка времени, затем промывали фосфатным буфером (PBS) путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 5 мин. Затем клетки обрабатывали для обнаружения раннего и позднего апоптоза флуоресцентными красителями Annexin V-FITC и пропидиум иодид (PI) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Клетки (1×10^5 - 5×10^5) ресуспендировали в 500 μ л связывающего буфера (Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit. Medical & Biological Laboratories), добавляли 5 μ л Annexin V-FITC и 5 μ л PI и инкубировали в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. Затем клетки (1×10^4) анализировали на проточном цитометре производства США (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) для обнаружения раннего и позднего апоптоза.

7. Изучение клеточного цикла.

20 Клетки (1×10^6) обрабатывали юглоном или гликозидами в указанных концентрациях, инкубировали в течение 24 часов, затем промывали фосфатным буфером (PBS) путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 5 мин. После этого клетки были суспендированы в PBS и зафиксированы холодным 70% этанолом в течение 3 часов. Фиксированные клетки были прокрашены 50 μ г/мл PI (пропидиум-иодида), содержащим 50 μ г/мл РНКазы А, при 37°C в течение 30 мин. ДНК клеток (10,000 клеток на экспериментальную группу) была затем проанализирована с помощью клеточного цитометра с использованием лизирующего буфера Lysis II и программного обеспечения CELL-FIT (BD).

30 8. Наблюдение апоптоза методом TUNEL. Клетки HL-60 (1×10^4 клеток на лунку) были высеяны в 96-луночный планшет и обработаны растворами юглона 1 или гликозидов 3 (U-112) или 11 (TU-299) в указанных концентрациях в течение 6 часов. Затем клетки были отмыты PBS методом центрифугирования и зафиксированы в 100 μ л на каждую лунку свежеприготовленного 4% формальдегида в PBS (pH 7.4) в течение 10 мин. Полученные слайды были проинкубированы в течение 5 мин с 0.1% Тритон X-100, промыты дважды PBS и высушены. Набор реагентов TUNEL (Roche, Basel, Switzerland) был использован для обнаружения апоптоза в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

40 Клетки были инкубированы в течение 60 мин при 37°C с реакционной смесью (50 μ л на каждый слайд), содержащей флуоресцеин-12-dUTP, в присутствии терминальной дезоксирибонуклеотидил трансферазы (TdT), при этом зеленая флуоресцентная метка присоединялась по свободным 3'-ОН группам фрагментированной ДНК. Затем образцы были промыты три раза PBS, обработали 500 μ л буферного раствора, содержащего PI, в течение 15 мин, и проанализировали с помощью флуоресцентного микроскопа (Carl Zeiss, LSM 510) при длине волны возбуждения 450-500 нм и длине волны обнаружения 515-565 нм.

50 9. Методика изучения влияния производных юглона на ред/окс цикл глутатиона (GSSG/GSH recycling assay)

Уровень общего глутатиона (GSSG) и восстановленной формы (GSH) в клетках HL-60 определяли с использованием колориметрического GSSG/ GSH ред/окс теста. Клетки (0.5 - 1.0×10^6 клеток/опыт в чашке Петри, диаметром 10 см)

обрабатывали раствором указанной концентрации юглона 1 или гликозида юглона 3 (U-112) или 11 (TU-299) в 10 мл среды, собирали центрифугированием, помещали в 1 М раствор хлорной кислоты, содержащей 2 мМ ЭДТА, центрифуговали, нейтрализовали 4 М раствором KOH, содержащим 0.6 М МОПС, снова центрифугировали. Общий уровень глутатиона GSSG и восстановленной формы GSH в супернатанте определяли спектрофотометрически с использованием теста глутатион-редуктаза / 5.5'-дителиобис-(2-нитробензойной кислота). Количественные измерения глутатиона в клетках проводили по калибровкам, построенным для заведомых концентраций GSSG.

10. Методика изучения проницаемости митохондриальной мембраны. Клетки HL-60 (1×10^6 клеток/опыт в чашке Петри, диаметром 10 см) обрабатывали раствором 1 μ М концентрации юглона 1 или гликозида юглона 3 (U-112) или 11 (TU-299) в 10 мл среды, собирали и отмывали в PBS методом центрифугирования. Затем клетки (1×10^6 клеток/мл) инкубировали с 40 μ М раствором флуоресцентного зонда 3,30-дигексилоксакарбодиамина иодидом (DiOC₆(3), Molecular probes) в течение 30 мин при 37°C, отмывали фосфатно-солевым буфером и измеряли их флуоресценцию методом проточной цитометрии.

11. Вестерн-блоттинг анализ.

HL-60 клетки (1×10^7 клеток в чашке Петри, 10 см диаметром) инкубировали с 1 μ М растворами юглона 1 или гликозида юглона 3 (U-112) или 11 (TU-299) в 10 мл среды RPMI - 1640, содержащей 10% FBS, в течение 24 час. Затем клетки промыли холодным PBS (2 \times 10 мл), суспендировали в лизирующем буфере, содержащем 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 1.0% Triton X-100, 50 mM NaF, 2,5 mM Na₃VO₄ и ингибиторы протеаз (1 mM PMSF, 20 ед/мл апротинина). Лизаты (25 μ г) подвергли электрофорезу на 10% додецилсульфат-полиакриламидном геле, перенесли на нитроцеллюлозную мембрану, которую блокировали в течение 1 час при 25°C в блокирующем буфере (10 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,1% азида натрия и 5% обезжиренного молока) и инкубировали в течение ночи при 4°C с соответствующими первичными антителами в разбавлении (1:1000). Затем мембраны инкубировали с вторичными антителами против IgG, в разбавлении 1:5000 в апоптоз блокирующем буфере. Сигналы комплексов белок - антитело регистрировали по хемилюминесцентному свечению.

II Результаты исследования биологической активности производных О- и S-гликозидов 5-гидрокси-1,4-нафтохинона (юглона)

Соединения 2-15 проявили стимулирующую активность на нескольких линиях клеток лейкемии человека, что подтверждается данными по исследованию цитотоксичности, изучению апоптоза методами TUNEL и проточной цитометрии, изучению влияния производных юглона на ред/окс цикл глутатиона, изучению проницаемости митохондриальной мембраны, по воздействию на клеточный цикл и экспериментам по активации прокаспаз-3, -8 или -9 методом вестерн иммуноблоттинга. Для экспериментов были выбраны соединения 2-15 представленные в Табл. 1. Было обнаружено, что соединения 2-15 индуцируют апоптоз клеток лейкемии человека при оптимальных концентрациях 0.5-5 μ М. Оптимальное время воздействия на опухолевые клетки - 24 часа. Апоптотические изменения (ранний и поздний апоптоз) в клетках измерялись с использованием флуоресцентных красителей Аннексин V-FITC и пропиридиум-иодид (PI). При этом также наблюдалось значительное увеличение числа клеток, находящихся в фазе

клеточного цикла Sub-G₁, что характерно именно для клеток, находящихся в состоянии апоптоза. В клетках, подвергшихся обработке соединениями 2-15, также регистрировалась характерные для апоптоза фрагментация ДНК и увеличение проницаемости митохондриальной мембраны. Обработка соединениями 2-15 приводила к уменьшению внутриклеточного уровня глутатиона. Соединения 2-15 также изменяли проницаемость митохондриальной мембраны клеток лейкемии, и это изменение в свою очередь блокировалось глутатионом. Исследованные гликозиды вызывали апоптоз в различных линиях лекемических клеток, включая HL-60 (острая промиелоцитарная лейкемия), NB4 (острая промиелоцитарная лейкемия), ТНР-1 (острая моноцитарная лейкемия), K562 (хроническая миелогенная лейкемия).

1. Результаты по цитотоксичности.

Гликозиды 2-15 показали цитотоксические свойства на клетках опухолей человека. Цитотоксический эффект оценивали на клетках HL-60 методом микроскопии - цифровой фотографии по наличию характерных для апоптоза морфологических изменений клеток. На фиг.1 представлены фотографии клеток HL-60, обработанных растворами гликозидов 2-15 различной концентрации. Для большинства гликозидов представлены фотографии эффекта двух концентраций: первая, при которой цитотоксическое действие данного гликозида не выявлено после 24 часов инкубации с клетками; вторая, при которой уже явно виден цитотоксический эффект гликозида, проявляющийся в характерных морфологических изменениях клеток (округление клетки, сморщивание и нарушение целостности мембраны, распад клетки на апоптотические тела). Приведенные данные показывают, что цитотоксическая активность гликозидов юглона 2-15 в отношении клеток лейкемии HL-60 зависит от химической структуры веществ, и действующие концентрации для большинства из них находятся в пределах 0.5-1 мМ.

В таблице 2 приведены сводные данные по влиянию гликозидов 2-15 на жизнеспособность клеток лейкемии HL-60, полученные на основе анализа фотографий на Фиг.1.

Таблица 2				
Цитотоксические свойства О- и S-гликозидов юглона 2-15, полученные методом микроскопии - цифровой фотографии на клетках лейкемии HL-60				
№ гликозидов	Концентрация гликозида, мМ			
	0.5 мМ	1.0 мМ	2.5 мМ	5.0 мМ
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	-	-	+	+
5	-	+	+	+
6	-	+	+	+
7	-	-	+	+
8	-	+	+	+
9	-	-	-	+
10	+	+	+	+
11	-	+	+	+
12	-	+	+	+
13	-	+	+	+
14	-	+	+	+
15	-	+	+	+
«+» положительный цитотоксический эффект				
«-» цитотоксический эффект отсутствует				

Основываясь на данных, представленных в таблице 2, можно сделать следующие

заклучения относительно влияния структуры на проявление активности в ряду гликозидов 2-15:

1) Гликозиды с метильной группой в положении 3 существенно более токсичны, чем соединения несущие в положении 3 водород или вторую углеводную цепь.

5 Например, гликозид 10 был намного более активен, чем гликозиды 7 и 9.

2) O-Гликозиды более активны, чем S-гликозиды. Например, гликозид 2 более активен, чем 7, а гликозид 3 более активен, чем 8.

3) Гликозиды с моносахаридным радикалом являются более активными, чем 10 гомологичные им гликозиды с дисахаридным радикалом. Например, гликозиды 2 и 3 более активны, чем гликозиды 5 и 6.

4) Пары O-гликозидов, например, 2 и 3 или 5 и 6, изомерные по положению сахаридного радикала, не различаются по проявлению биологической активности.

5) В группе изомерных S-гликозидов, с различными моносахаридными 15 радикалами, природа радикала не оказывает влияния на проявление биологической активности. Например, S-гликозиды D-галактозы 11, D-маннозы 12, D-ксилозы 13 и L-арабинозы 14 проявляют одинаковую активность.

Для двух структурно-родственных гликозидов юглона, 3-O-ацетилгликозида 3 (U- 20 112) и 3-3-ацетилгалактозида 11 (TU-299), в сравнении с прототипом юглоном 1, цитотоксичность была изучена более точным методом МТТ (см. п.5 Материалы и методы,) на тех же клетках HL-60. Как видно из результатов, представленных на фиг.2, гликозиды 3 (U-112) и 11 (TU-299), также как и юглоном 1 (Juglone), после 24 25 часов инкубирования проявляют дозозависимый цитотоксический эффект в отношении HL-60 клеток. Приведенные данные свидетельствуют также о том, что в пределах действующих концентраций 1-2 мкМ цитотоксический эффект юглона в 6-8 раз слабее, чем эффекты гликозидов 3 и 11. А в концентрации 0.5 мкМ, при которой гликозиды 3 и 11 способствуют гибели около 40-50% опухолевых клеток, юглоном не 30 проявляет цитотоксического эффекта.

Для выяснения спектра действия этой группы соединений методом МТТ было изучено сравнительное действие наиболее активного 3-O- ацетилгликозида 3 (U-112) на клетки нескольких типов острых и хронических лейкозов человека (HL-60, NB4, ТНР-1, K562). Результаты представлены на фиг.3. Установлено, что 3 (U-112) 35 проявляет дозозависимое цитотоксическое действие на все вышеупомянутые клеточные линии, причем действует на них столь же эффективно, как и на клетки острого лейкоза HL-60. Так, приведенные данные свидетельствуют о том, что гликозид 3 в концентрациях 0.5-2 мкМ способствует гибели 50-95% клеток лейкемии HL-60, ТНР-1, NB4 или K562 после 24 часов инкубирования с клетками. 40

2. Оценка апоптоза с использованием метода проточной цитометрии

Углубленное исследование причины цитотоксических изменений, вызываемых гликозидами 2-15 в лейкемических клетках, проводили на примере структурно-родственных 3-O-ацетилгликозида юглона 3 и 3-S-ацетилгалактозида 11 45 с использованием метода проточной цитометрии (см. п.6 Материалы и методы). На фиг.4 показаны сравнительные эффекты гликозидов 3 и 11, а также юглона 1, взятых в концентрации 1 мкМ, на величину апоптоза клеток лейкемии HL-60, полученные через 24 часа инкубирования методом проточной цитометрии с окрашиванием 50 лейкемических клеток флуоресцентными красителями Annexin-V-FITC/пропидиум-йодидом (PI). В этом методе апоптотические изменения клеток, наступающие под воздействием веществ, приводят к выходу фосфатидилсерина с внутренней на внешнюю поверхность мембраны лейкемических

клеток. Краситель Annexin-V-FITC избирательно связывается с фосфатидилсерином. Появление среди клеток обработанных производными юглона популяции клеток несущих зеленую флуоресцентную метку Annexin-V-FITC (фиг.4), правый нижний квадрант), является свидетельством вхождения клеток в фазу раннего апоптоза.

5 Спустя 24 час клетки претерпевают более глубокие изменения, приводящие к проникновению второго красителя PI внутрь клеток и окрашиванию компонентов ядра в красный цвет (правый верхний квадрант- клетки вступившие в фазу позднего апоптоза). Цифры в квадратах отражают процентное соотношение популяций

10 клеток, находящихся на различных стадиях апоптоза. Как видно из представленных результатов, гликозиды значительно (в 2.5-3 раза) превосходят юглон по способности индуцировать апоптоз в клетках лейкемии HL-60. фиг.6 показывает результаты аналогичных опытов по индукции апоптоза, полученные на других типах лейкемических клеток. Из них также видно, что гликозиды (U-112, TU-299) способны

15 более эффективно вызывать апоптоз, в сравнении с прототипом юглоном (Juglone). При исследовании влияния концентрации (Dose) на способность соединений 1, 3 и 11 вызывать апоптоз в клетках лейкемии HL-60 (фиг.7) также установлено, что в диапазоне эффективных концентраций 0.5-2 μM , проапоптотическое действие гликозидов 3 и 11, оцениваемое по количеству клеток, перешедших в апоптоз,

20 превосходит действие юглона в 2-6 раз. В таблице 3 представлены также результаты экспериментов по дозозависимой индукции апоптоза гликозидами 3 и 11 в другом типе лейкемических клеток - ТНР-1. Показано, что при концентрации 1 μM , через 24 часа инкубирования, 3 вызывает апоптоз 78%, а 11 - 64% ТНР-1 клеток. Эти данные

25 являются результатом трех независимых экспериментов, по 2 опыта на каждую концентрацию. На фиг.8 представлена времязависимая индукция апоптоза юглоном 1 и его гликозидами 3 и 11, взятыми в концентрации 1 μM , в клетках лейкемии HL-60, определенная методом проточной цитометрии. Приведенные

30 данные также свидетельствуют о том, что гликозиды 3 (U-112) и 11 (TU-299) являются более эффективными стимуляторами апоптоза, чем юглон. Так, уже через 6 часов гликозиды 3 и 11 вызывают апоптоз около 40% HL-60 клеток, в то время как юглон в той же концентрации достигает такого же эффекта только через 24 часа инкубирования с клетками. Таким образом, нами показано, что индукция апоптоза в

35 клетках лейкемии человека зависит от концентрации и от времени воздействия гликозидов 3 и 11 на клетки. Эти данные свидетельствуют, что антиопухолевая активность гликозидов 3 и 11 в отношении клеток лейкемии в значительной мере обусловлена апоптозом.

40

Таблица 3				
Влияние концентрации гликозидов 3 и 11 на величину общего (тотального) апоптоза в клетках лейкемии ТНР-1, определенное методом проточной цитометрии				
Тип клеточной культуры	№ гликозида	Концентрация гликозида, μM		
		Количество апоптотических клеток, %*		
		0.0 μM	0.2 μM	1.0 μM
ТНР-1	3	5.7 \pm 2.2%	31.6 \pm 5.2%	78.1 \pm 11.1%
	11	5.7 \pm 1.9%	27.5 \pm 4.8%	63.7 \pm 14.5%

* Значения в таблице представляют собой % от общего (тотального) апоптоза.

50 Важнейшей характеристикой веществ является избирательность их противоопухолёвого действия. Для оценки этой характеристики методом проточной цитометрии было изучено действие гликозидов 3 и 11, а также прототипа юглона 1 на нормальные клетки человеческой иммунной системы - нейтрофилы.

Нейтрофилы - неделящиеся, короткоживущие (2-3 суток) клетки с сегментированным ядром и набором гранул, высвобождаются костным мозгом со скоростью около 7 млн/мин. В норме около 60% высвобожденных нейтрофилов подвергаются спонтанному апоптозу. Дисфункции или недостаток нейтрофилов в организме приводят к тяжелым формам подверженности бактериальным инфекциям, что подчеркивает ключевую роль нейтрофилов в обеспечении врожденной формы иммунитета. С другой стороны, гиперактивация нейтрофилов также приводит к патологиям. Нейтрофилы обеспечивают основную защиту организма от грамотрицательных бактерий. Нейтрофилы сосредоточены главным образом в крови, за исключением случаев их локализации в очагах острого воспаления. Основная функция этих клеток - фагоцитоз. Нейтрофилы фагоцитируют бактерии и продукты распада тканей и разрушают их своими лизосомными ферментами. Как видно из данных, представленных на фиг.5, гликозиды юглона 3 и 11, так же как и сам юглон 1, в концентрациях 1 μM не оказывают существенного влияния на процесс спонтанного апоптоза нейтрофилов, но в то же время и в той же концентрации, как следует из данных, представленных на фиг.6 и 7, индуцируют апоптоз 50-90% клеток лейкемии K562, NB4, ТНР-1 и HL-60, что свидетельствует об избирательном апоптоз-стимулирующем действии гликозидов юглона на клетки лейкемии человека

3. Исследование клеточного цикла методом проточной цитометрии.

Результаты анализа методом проточной цитометрии (см. п.7 Материалы и методы) клеточного цикла клеток HL-60, обработанных растворами юглона 1 (Juglone) и гликозидов юглона 3 (U-112) и 11 (TU-299), взятых в концентрации 1 μM , представлены на фиг.9 и в таблице 4. Эффект представлен в виде числа клеток, находящихся в той или иной фазе клеточного цикла, выраженного в процентах. Показано, что через 24 часа инкубирования клеток с веществами, значительно увеличивается количество клеток, находящихся в фазе Sub-G₁, что является характерным признаком апоптоза. Приведенные данные свидетельствуют о том, что количество клеток, перешедших в фазу Sub-G₁ (22.3% и 22.6%) после воздействия гликозидов 3 и 11, в два раза больше количества клеток (12.0%), которые перешли в фазу Sub-G₁ под воздействием юглона. Эти данные также свидетельствуют о том, что гликозиды юглона являются более эффективными индукторами апоптоза по сравнению с юглоном.

Таблица 4				
Влияние гликозидов 3 и 11 в концентрации 1 μM на клеточный цикл клеток лейкемии HL-60, определенное методом проточной цитометрии				
Вещество	Фаза клеточного цикла			
	G1	S	G2/M	Sub-G ₁
Контроль	47.8±3.5*	36.0±6.5	12.2±1.2	4.6±1.6
1 (юглон)	43.2±2.6	32.4±4.2	11.9±4.3	12.0±3.6
3 (U-112)	40.5±7.6	29.4±2.5	7.8±2.6	22.3±6.9
11 (TU-299)	39.9±3.9	30.6±1.9	7.1±3.1	22.6±7.5

* Процентное распределение клеток по фазам клеточного цикла. Результат 3-х измерений.

4. Наблюдение апоптоза методом TUNEL.

Углубленное исследование причины цитотоксических изменений, вызываемых гликозидами 2-15 в лейкоцитарных клетках, проводили на примере структурно-родственных гликозидов юглона 3 и 11 с использованием метода TUNEL (см п.8. Материалы и методы). В этом методе фрагментированная ДНК, которая

появляется в клетке в ходе апоптотических превращений, окрашивается флуоресцентным красителем FITC по методу TUNEL и дает зеленую флуоресценцию, а геномная ДНК окрашивается другим флуоресцентным красителем, пропиридиум иодидом (PI) в красный цвет. Клетки лейкемии HL-60 обрабатывали юглоном 1 (Juglone) и его гликозидами 3 (U-112) и 11 (TU-299) в концентрации 1 μM . Полученные результаты свидетельствуют о том, что действие гликозидов 3 (U-112) и 11 (TU-299) на HL-60 клетки обусловлено индукцией апоптоза, что доказано окрашиванием фрагментированной ДНК обработанных клеток красителем FITC в зеленый цвет. Контрольные, необработанные клетки (None), в которых нет фрагментированной ДНК, а также клетки, обработанные юглоном, не включили зеленую флуоресцентную метку, а имеющаяся геномная ДНК в них окрашена пропиридиум-иодидом (PI) в красный цвет (см. фиг.10). Таким образом, согласно результатам, полученным методом TUNEL, антиопухолевое действие гликозидов 3 и 11 заключается в стимуляции (индукции) апоптоза в опухолевых клетках. В тех же условиях клетки, обработанные юглоном, не давали окрашивания красителем FITC, что свидетельствует об отсутствии апоптоза.

5. Изучение влияния производных юглона на ред/окс цикл глутатиона.

Влияние гликозидов 3 или 11 и юглона (1) на уровень общего глутатиона (GSSG) и восстановленной формы (GSH) в клетках HL-60 определяли с использованием колориметрического GSSG/ GSH ред/окс теста (см п.9. Материалы и методы). Как видно из данных, представленных на фиг.11, предварительная обработка клеток лейкемии HL-60 гликозидами юглона 3 (U-112) и 11 (TU-299) в концентрации 1 μM приводит к резкому (на 90%) снижению уровня глутатиона. Это свидетельствует о том, что гликозиды 5-гидрокси-14-нафтохинона в клетках лейкемии HL-60 вовлекаются во внутриклеточные окислительно-восстановительные процессы, в ходе которых генерируются свободные радикалы, которые в свою очередь, быстро окисляют глутатион в глутатион-дисульфид (S. Ache. // *Antitumor quinones. // Mini-Reviews In Medicinal Chemistry.* 2005, 5, 449-467). Воздействие юглона в тех же условиях и в той же концентрации 1 μM лишь немного увеличивает уровень глутатиона в клетках. Так как окислительный стресс является одним из факторов, приводящих к апоптотическим изменениям клетки, наблюдаемое резкое снижение уровня глутатиона является свидетельством того, что гликозиды 3 и 11, генерируя свободные радикалы, способны эффективно, в отличие от юглона, стимулировать апоптоз в клетках лейкемии HL-60 путем создания в них окислительного стресса.

6. Влияние производных юглона на проницаемость митохондриальной мембраны клеток лейкемии HL-60.

Влияние гликозидов 3 и 11, а также юглона на проницаемость митохондриальной мембраны клеток лейкемии HL-60 изучали методом, описанным в п.10. (Материалы и методы). На Фиг.12 представлены эффекты юглона 1 (Juglone) и гликозидов юглона 3 (U-112) и 11 (TU-299), взятых в концентрации 1 μM , а также различных антиоксидантов на проницаемость митохондриальных мембран в клетках HL-60. Показано, что гликозиды 3 и 11, в отличие от юглона, значительно (на 40-45%) изменяют мембранную проницаемость митохондрий, что впоследствии может привести к выходу цитохрома C из митохондрий и образованию апоптосомы в цитоплазме, которая в свою очередь активирует каспазу-9 и запускает таким образом механизм клеточного апоптоза. Наблюдаемое изменение мембранной проводимости блокируется только одним из четырех исследованных антиоксидантов, а именно глутатионом, что подтверждает результаты

экспериментов по влиянию гликозидов 3 и 11 на внутриклеточный уровень глутатиона (Фиг.11).

7. Влияние гликозидов 3 (U-112) и 11 (TU-299), а также юглона 1 (Juglone) на внутриклеточные уровни прокаспаз-3, -8 и -9, измеренное методом вестерн иммуноблоттинга.

На поздних стадиях апоптоза в клетках происходит активация набора внутриклеточных белков - ферментов, каспаз, вызывающих расщепление внутриклеточных биополимеров. В нормальных клетках эти белки находятся в неактивной форме, в виде предшественников - прокаспаз. В экспериментах по вестерн-блоттингу (см п.11 Материалы и методы), проведенных на клетках лейкемии HL-60, установлено, что гликозиды 3 и 11, в отличие от юглона, снижают уровень прокаспаз-3, -8, -9 в клетках (Фиг.13). Мы полагаем, что снижение уровня прокаспаз связано с их превращением в активную форму, при обработке клеток гликозидами юглона. Для обоснования этого вывода были проведены опыты по индукции апоптоза в клетках HL-60 и ТНР-1, предварительно обработанных ингибиторами прокаспаз (панкаспазы, каспазы-3, каспазы-8) при концентрациях ингибиторов 25 μM . Полученные данные представлены в таблице 5. Значительное, в 2-4 раза, снижение уровня апоптоза в клетках, обработанных ингибиторами прокаспаз, указывает на то, что индуцируемый гликозидами 3 и 11 апоптоз в лейкемических клетках человека является каспазозависимым.

Влияние гликозидов 3 и 11 на величину общего (тотального) апоптоза клеток лейкемии HL-60 и ТНР-1, предварительно обработанных ингибиторами прокаспаз в концентрации 25 μM , определенное методом проточной цитометрии					
Тип клеточной культуры	№ гликозида	Наименование ингибитора (объект ингибирования) Количество апоптотических клеток в процентах			
		Контроль**	zVAD-fmk (панкаспаз)	zDEVD-fmk (каспаза-3)	zIETD-fmk (каспаза-8)
HL-60	3*	85.0 \pm 5.5	65.7	59.7	55.2
	11*	83.4 \pm 11.8	49.7	45.1	42.4
ТНР-1	3*	78.1 \pm 11.1	27.2	28.9	26.5
	11*	63.7 \pm 14.5	13.2	31.8	26.6

* Концентрация гликозидов 1 μM .
 ** Представленные данные являются результатом трех независимых экспериментов.

Сопоставляя представленные результаты, полученные при изучении способности юглона и его О- и S-гликозидов индуцировать апоптотические изменения в клетках различных типов человеческой лейкемии, можно видеть, что в действии заявляемых гликозидов юглона и их прототипа (юглона) имеются существенные отличия.

Юглон, как и его гликозидные производные, способен вызывать гибель клеток лейкемии человека HL-60, ТНР-1, NB4 и K562. Однако исследованные гликозиды юглона превосходят прототип (юглон) в качестве индукторов апоптоза по эффективности в 2-3 раза (например, при концентрации 1 μM) (см. фиг.4, 6, 7).

Другим важным преимуществом заявляемых веществ является их способность индуцировать апоптоз в более короткие сроки. Так, если среди опухолевых клеток лейкемии HL-60 спустя 6 часов после их обработки гликозидами 40% клеток вступают в апоптоз, то прототип юглон способен индуцировать апоптоз всего в 8% клеток (см. фиг.8). Эксперименты с применением вестерн-иммуноблоттинга, показывают, что действие юглона на лейкозные клетки не вызывает активирования каспаз-3, 8, 9 (см. фиг.13), являющихся ключевыми внутриклеточными маркерами апоптоза.

Наличие фрагментированной ДНК (важный и существенный признак апоптоза) в

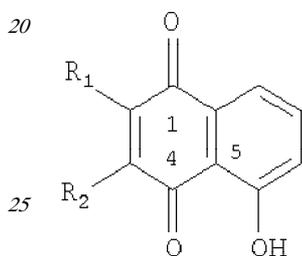
клетках, подвергшихся действию гликозидов юглона, в отличие от клеток, подвергшихся действию юглона (см. фиг.10), также указывает на то, что при воздействии гликозидов лейкозные клетки подвергаются апоптозу, в то время как гибель клеток под действием юглона протекает по иному механизму (маршруту).

Если апоптоз, вызываемый гликозидами юглона в различных типах клеток лейкемии человека, подтвержден тремя различными методами, то природа гибели клеток, вызываемой юглоном, остается во многом невыясненной, поскольку их апоптоз не подтверждается двумя методами из трех использованных в эксперименте.

Установленный нами факт различных механизмов действия исследованных нами веществ и прототипа - юглона на лейкозные клетки, в свою очередь, свидетельствует о том, что и потенциальные области применения этих веществ и юглона, например в качестве индуктора апоптоза при исследованиях в молекулярной биологии или в качестве средств для лечения лейкоза, могут быть совершенно различными.

Формула изобретения

1. Применение производных О-гликозидов 5-гидрокси-1,4-нафтохинона (юглона) формулы 1, где один из радикалов R_1 или R_2 является



Формула 1

пер-О-ацетилированным О-монозидным или О-биозидным углеводным радикалом с 1,2-трансконфигурацией О-гликозидной связи, а второй радикал является Н в качестве средства, стимулирующего апоптоз клеток лейкемии человека.

2. Применение производных О-гликозидов 5-гидрокси-1,4-нафтохинона (юглона) формулы 1, где оба радикала R_1 и R_2 одновременно являются

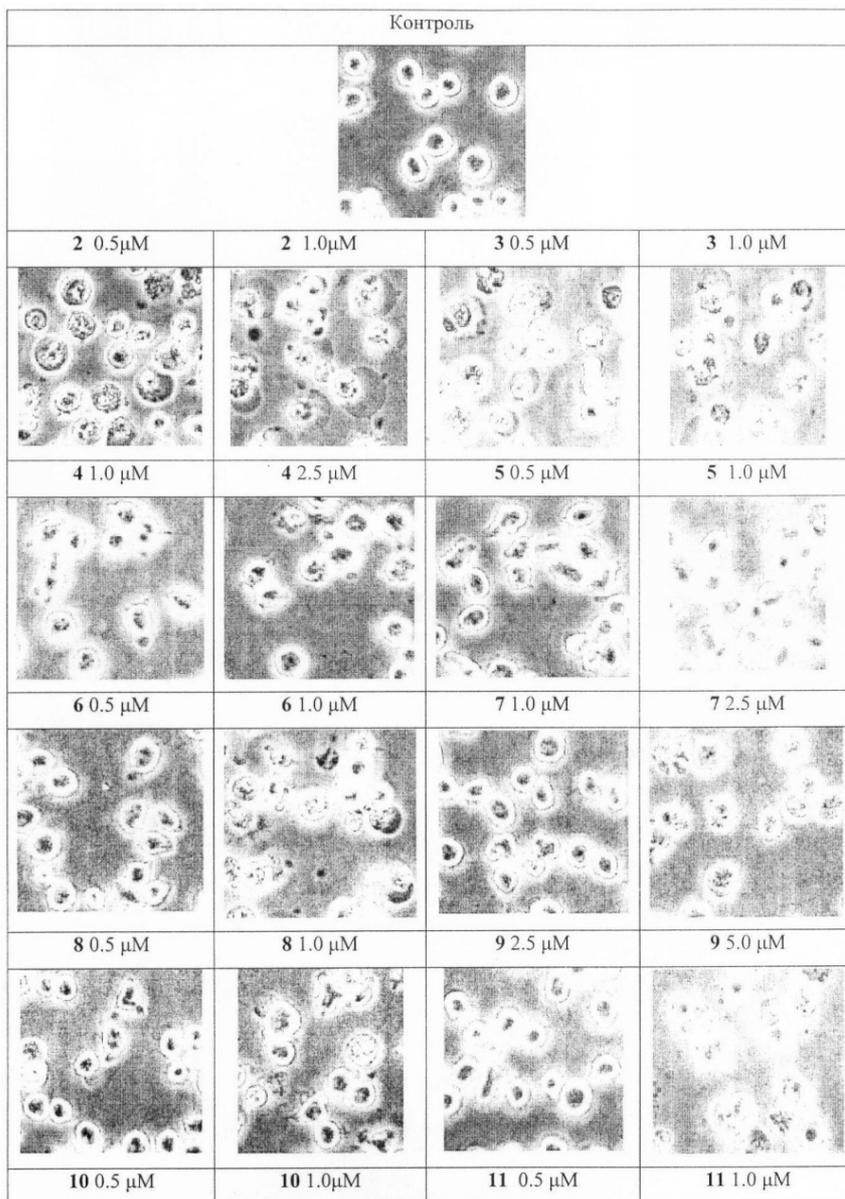
пер-О-ацетилированными О-монозидными или О-биозидными углеводными радикалами с 1,2-трансконфигурацией О-гликозидной связи в качестве средства, стимулирующего апоптоз клеток лейкемии человека.

3. Применение производных S-гликозидов 5-гидрокси-1,4-нафтохинона (юглона) и их алкилзамещенных производных формулы 1, где один из радикалов R_1 или R_2

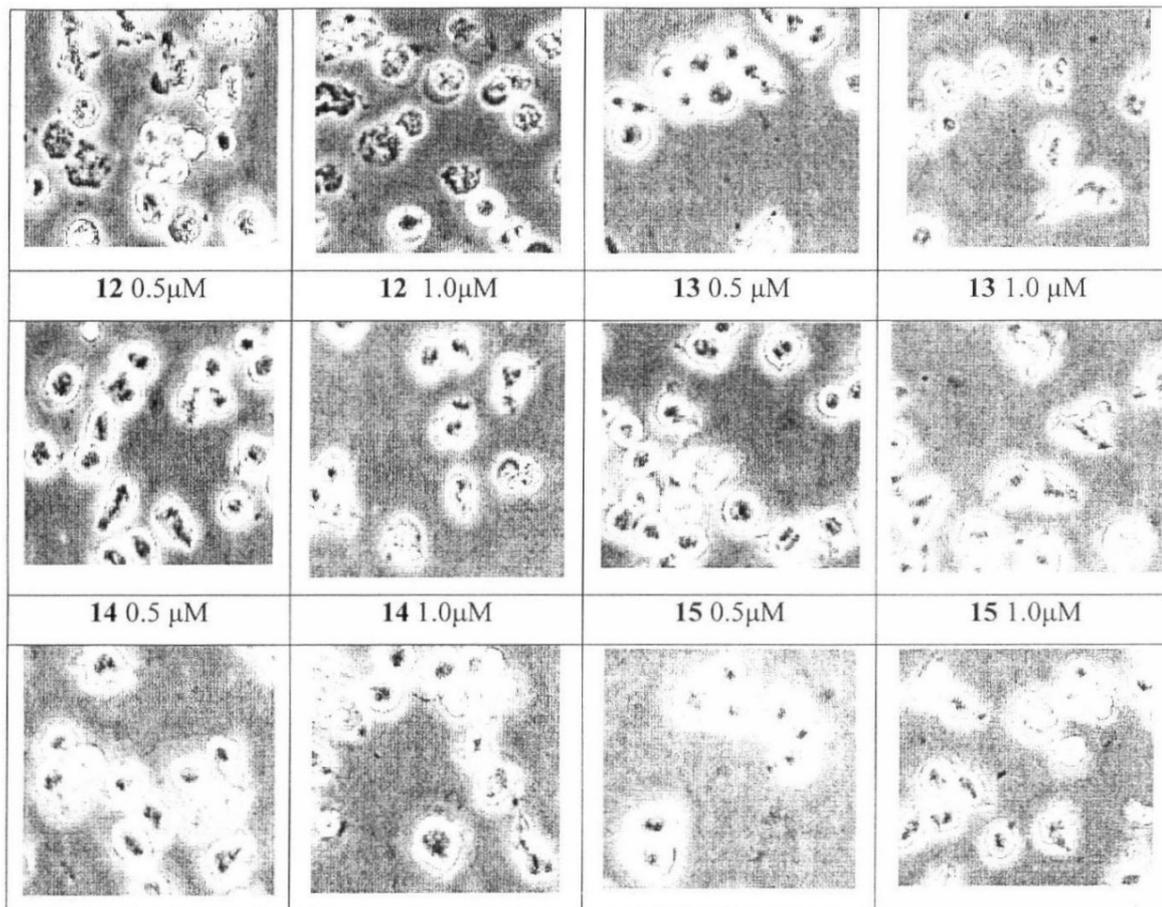
является пер-О-ацетилированным S-монозидным или S-биозидным углеводным радикалом с 1,2-трансконфигурацией S-гликозидной связи, а второй радикал является Н, либо линейным алкильным радикалом с углеводородной цепью с 1-8 атомами углерода в качестве средства, стимулирующего апоптоз клеток лейкемии человека.

4. Применение производных S-гликозидов 5-гидрокси-1,4-нафтохинона (юглона) и их алкилзамещенных производных формулы 1, где оба радикала R_1 и R_2

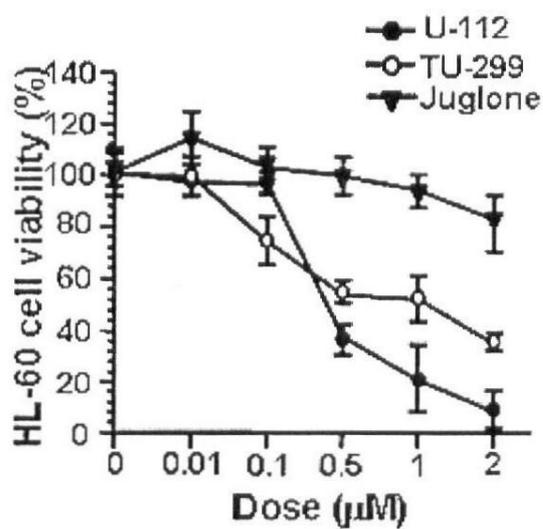
одновременно являются пер-О-ацетилированными S-монозидными или S-биозидными углеводными радикалами с 1,2-трансконфигурацией S-гликозидной связи в качестве средства, стимулирующего апоптоз клеток лейкемии человека.



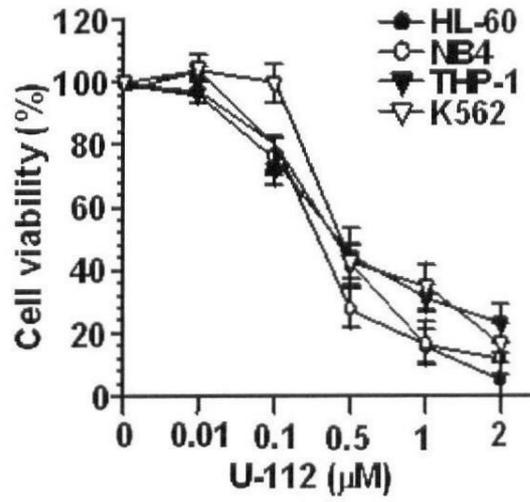
Фиг.1



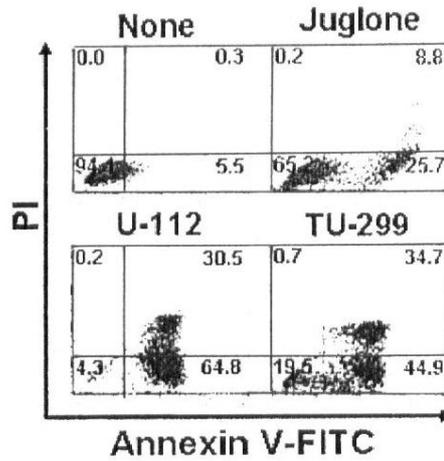
Фиг.1 (продолжение)



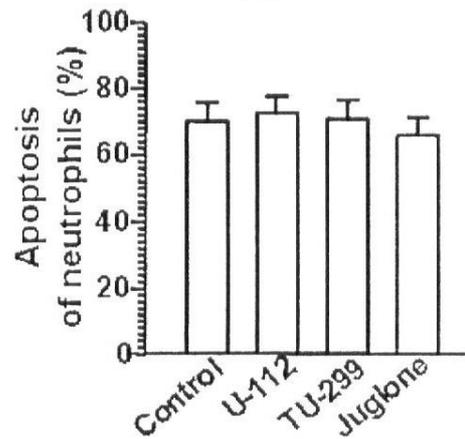
Фиг. 2



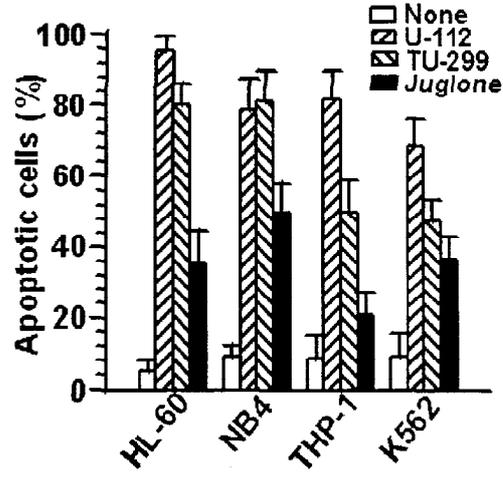
Фиг. 3



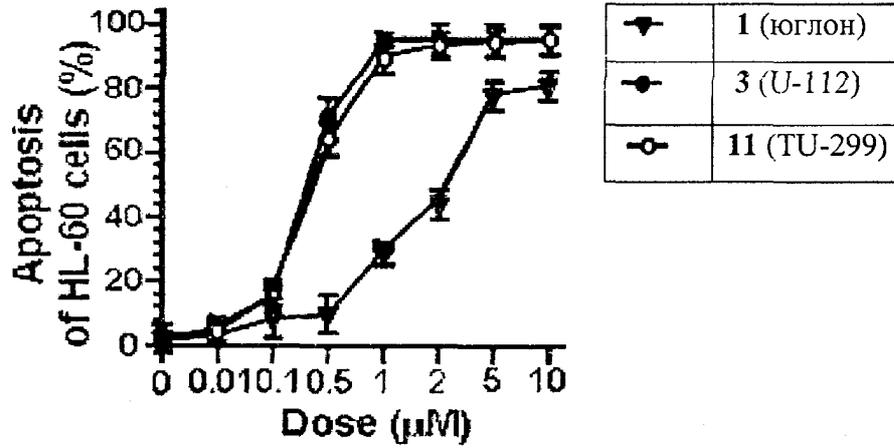
Фиг. 4



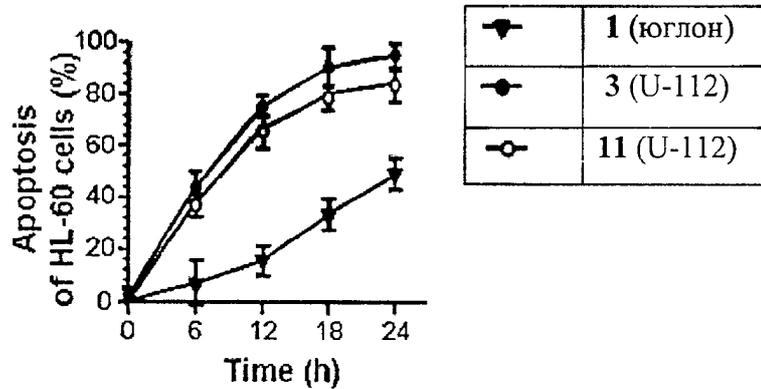
Фиг. 5



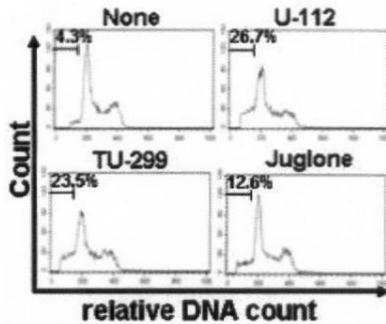
Фиг. 6



Фиг. 7

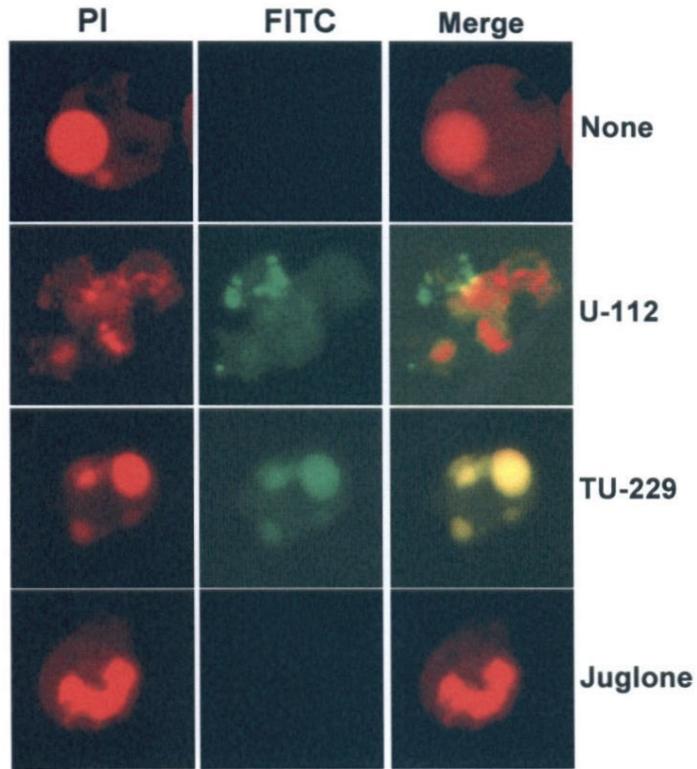


Фиг. 8

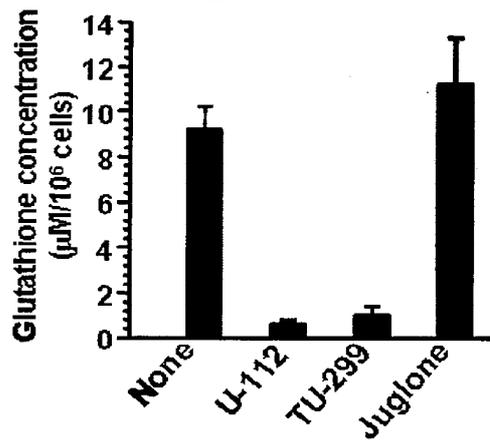


	G1	S	G2/M	sub.G1
Control	47.8±3.5	36.0±6.5	12.2±1.2	4.6±1.6
U-112	40.5±7.6	29.4±2.5	7.0±2.6	22.3±6.9
TU-299	39.9±3.9	30.6±1.9	7.1±3.1	22.6±7.5
Juglone	43.2±2.6	32.4±4.2	11.9±4.3	12.0±3.6

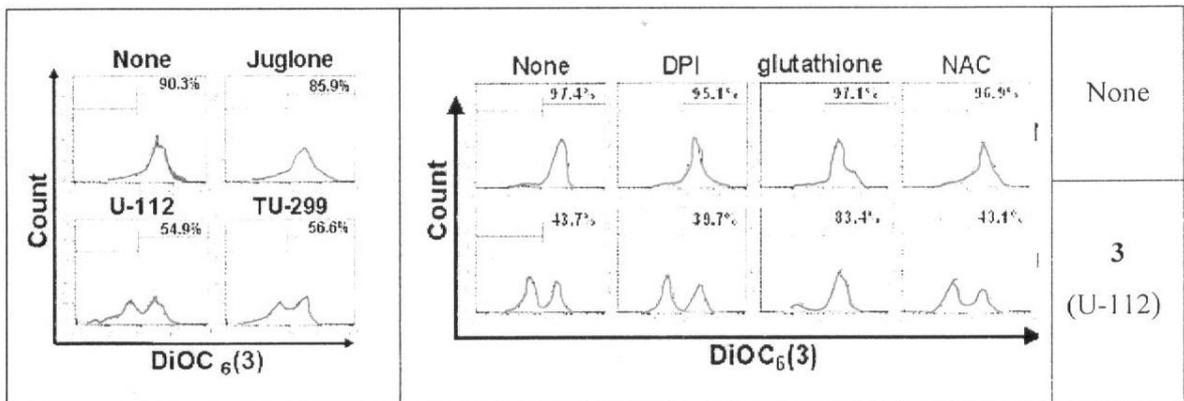
Фиг. 9



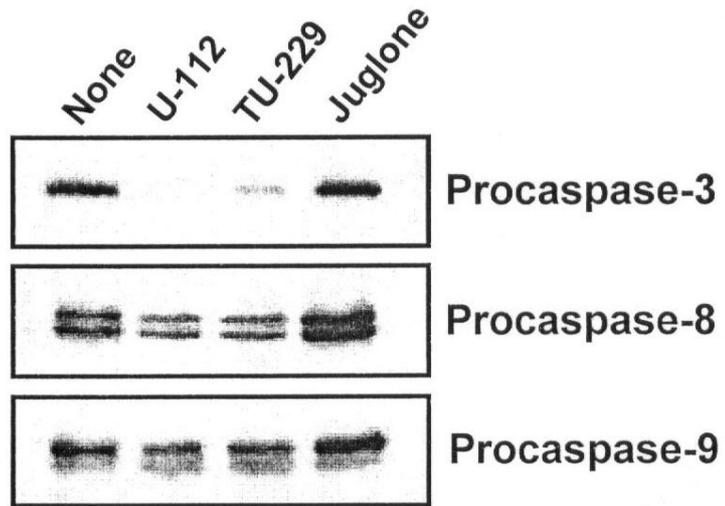
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13