



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011108924/15, 09.03.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.01.2010

Приоритет(ы):

(62) Номер и дата подачи первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:
2010102266 22.01.2010

(45) Опубликовано: 10.08.2012 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: Жидков М.Е. и др. Синтез

бромфаскаплизинов-цитотоксических
алкалоидов из морских беспозвоночных.
Исследования в области физико-химической
биологии и биотехнологии. Тезисы
докладов II региональной научной
конференции». Владивосток ДВО РАН, 2006,
с.47, 48. US 2006211757 A1, 21.09.2006. KR
20090017928 A, 19.02.2009. RU 2250103 C2,
20.04.2005.

Адрес для переписки:

690022, г.Владивосток, пр-кт 100 лет
Владивостока, 159, Учреждение Российской
академии наук Тихоокеанский институт
биоорганической химии ДВО РАН, зав.
патентным отделом Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

Кузьмич Александра Сергеевна (RU),
Федоров Сергей Николаевич (RU),
Шубина Лариса Кимовна (RU),
Радченко Олег Сергеевич (RU),
Жидков Максим Евгеньевич (RU),
Баланева Надежда Николаевна (RU),
Стоник Валентин Аронович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ, от имени
которой выступает МИНИСТЕРСТВО
ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (RU),
УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК ТИХООКЕАНСКИЙ
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ
ХИМИИ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО
ОТДЕЛЕНИЯ РАН (ТИБОХ ДВО РАН)
(RU)

**(54) СРЕДСТВО, ВОЗДЕЙСТВУЮЩЕЕ НА АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ЯДЕРНЫХ
ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области
клеточной молекулярной биологии и
представляет собой применение 3-
бромфаскаплизина в качестве средства,
ингибирующего активность р53 ядерного
фактора транскрипции и индуцирующего

активность AP-1 ядерного фактора
транскрипции. Изобретение обеспечивает
расширение арсенала средств, ингибирующих
активность р53 ядерного фактора
транскрипции и индуцирующих активность
AP-1 ядерного фактора транскрипции. 2 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 31/407 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2011108924/15, 09.03.2011**

(24) Effective date for property rights:
22.01.2010

Priority:

(62) Number and date of filing of the initial application, from which the given application is allocated: **2010102266 22.01.2010**

(45) Date of publication: **10.08.2012 Bull. 22**

Mail address:

690022, g. Vladivostok, pr-kt 100 let Vladivostoka, 159, Uchrezhdenie Rossijskoj akademii nauk Tikhookeanskij institut bioorganicheskoj khimii DVO RAN, zav. patentnym otdelom N.I. Stadnichenko

(72) Inventor(s):

**Kuz'mich Aleksandra Sergeevna (RU),
Fedorov Sergej Nikolaevich (RU),
Shubina Larisa Kimovna (RU),
Radchenko Oleg Sergeevich (RU),
Zhidkov Maksim Evgen'evich (RU),
Balaneva Nadezhda Nikolaevna (RU),
Stonik Valentin Aronovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**ROSSIJSKAJa FEDERATsIJa, ot imeni kotoroj vystupaet MINISTERSTVO OBRAZOVANIJa I NAUKI ROSSIJSKOJ FEDERATsII (RU),
UChREZhDENIE ROSSIJSKOJ AKADEMII NAUK TIKhOOKEANSKIJ INSTITUT BIOORGANICHESKOJ KhIMII DAL'NEVOSTOChNOGO OTDELENIJa RAN (TIBOKh DVO RAN) (RU)**

(54) MEDICATION INFLUENCING ACTIVITY OF SOME NUCLEAR TRANSCRIPTION FACTORS

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to field of cellular molecular biology and represents application of 3-bromo-fascaplysine as medication which inhibits activity of p53 nuclear transcription factor and

inducing activity of AP-1 nuclear transcription factor.

EFFECT: invention ensures extension of arsenal of medications which inhibit activity of p53 nuclear transcription factor and induce activity of AP-1 nuclear transcription factor.

2 dwg

Изобретение относится к области клеточной молекулярной биологии и касается веществ, обладающих способностью ингибировать активность p53 и индуцировать активность AP-1 ядерных факторов транскрипции.

5 Публикуются данные о все увеличивающемся числе природных веществ, которые стимулируют апоптоз про-раковых и раковых клеток *in vitro* и *in vivo* [Gupta S., Hastak K, Ahmad N, Lewin J.S., Mukhtar H. (2001) Inhibition of prostate carcinogenesis in TRAMP mice by oral infusion of green tea polyphenols. Proc Natl Acad Sci USA 98:10350-10355; Lu
10 Y-P, Lou Y-R, Li X-H, Xie J-G, Brash D., Huang M-T, et al. (2000) Stimulatory effect of oral administration of green tea or caffeine on ultraviolet light-induced increases in epidermal wild-type p53, p21 (WAF1/CIPI), and apoptotic sunburn cells in SKH-1 mice. Cancer Res 60:4785-4791; Lu Y-P, (1997) Inhibitory effect of black tea on the growth of established skin tumors in mice: effects on tumor size, apoptosis, mitosis and bromodeoxyuridine incorporation into
15 DNA. Carcinogenesis 18:2163-2169; Samaha H.S., Kelloff G.J., Steele V., Rao C.V., Reddy B.S. (1997) Modulation of apoptosis by sulindac, curcumin, phenylethyl-3-methylcaffeate and 6-phenylhexyl isothiocyanate apoptotic index as a biomarker in colon cancer chemoprevention and promotion. Cancer Res 57:1301-1305; Yang K, Lamprecht SA, Liu Y, Shinozaki H, Fan K, Leung D, et al. (2000) Chemoprevention studies on the flavonoids quercetin and rutin in
20 normal and azoxymethane-treated mouse colon. Carcinogenesis 21:1655-1660; Tanaka T., Kohno H., Sakata K., Yamada Y., Hirose Y., Sugie S., et al. (2002) Modifying effects of dietary capsaicin and rotenone on 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. Carcinogenesis 23:1361-1367]. Широко известными хемопреventивными веществами, предотвращающими перерождение нормальных клеток в опухолевые и вызывающими
25 их апоптоз, являются полифенолы из зеленого чая, флавоноиды из ягод, ресвератрол из красного винограда, капсаицин из перца, куркумин из тропического растения куркума и многие другие [Lu Y-P, Lou Y-R, Li XH, Xie J-G, Brash D., Huang M-T, et al. (2000) Stimulatory effect of oral administration of green tea or caffeine on ultraviolet light-induced increases in epidermal wild-type p53, p21 (WAF1/CIPI), and apoptotic sunburn cells in SKH-1
30 mice. Cancer Res 60:4785-4791; Samaha H.S., Kelloff G.J., Steele V., Rao C.V., Reddy B.S. (1997) Modulation of apoptosis by sulindac, curcumin, phenylethyl-3-methylcaffeate and 6-phenylhexyl isothiocyanate apoptotic index as a biomarker in colon cancer chemoprevention and promotion. Cancer Res 57:1301-1305; Yang K., Lamprecht S.A., Liu Y., Shinozaki H., Fan K., Leung D., et al. (2000) Chemoprevention studies on the flavonoids quercetin and rutin in
35 normal and azoxymethane-treated mouse colon. Carcinogenesis 21:1655-1660; Tanaka T., Kohno H., Sakata K., Yamada Y., Hirose Y., Sugie S., et al. (2002) Modifying effects of dietary capsaicin and rotenone on 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. Carcinogenesis 23:1361-1367].

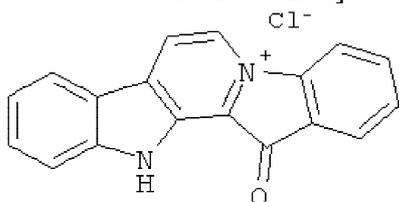
Большое число различных факторов и сигнальных путей могут приводить к организованной гибели (апоптозу) про-раковой или опухолевой клетки в результате воздействия на нее хемопревентивных противоопухолевых препаратов. Один из наиболее важных сигнальных путей проходит через ядерный фактор транскрипции p53, который является регулятором клеточного роста, и принимает самое непосредственное участие в индукции ареста клеточного цикла и апоптоза в ответ на повреждение ДНК клетки [Levine A.J. Cell 1997, 88, 323; Prives C.; Hall, P.A. The Journal of Pathology 1999, 187, 112; Vousden K.H. Cell 2000, 103, 691]. Ядерный фактор p53 участвует в хемопревентивных эффектах многих природных канцер-превентивных соединений [Huang C.; Ma W.Y.; Goranson A.; Dong Z. Carcinogenesis 1999, 20, 237; Qin J.; Chen H.-G.; Yan Q.; Deng, M.; Liu J.; Doerge S.; Ma W.; Dong Z.; Li, D.W. Cancer Res. 2008, 68, 4150; He Z.; Ma, W.-Y.; Hashimoto T.; Bode A.M.; Yang C.S.; Dong Z. Cancer Res. 2003, 63, 4396]. С другой стороны, некоторые хемопревентивные природные вещества, такие как джинджерол, куркумин, дженистеин, а также полипренилированные бензохиноны и гидрохиноны, оказывают канцер-превентивный эффект через ингибирование активности p53 ядерного фактора [Park Y.J.; Wen J.; Bang S.; Park S.W.; Song S.Y. Yonsei Med. J. 2006, 47, 688; Tsvetkov P.; Asher G.; Reiss V.; Shaul Y.; Sachs L.; Lotem J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005, 102, 5535; Lian E; Li Y; Bhuiyan M.; Sarkar F.H. Nutr. Cancer 1999, 33, 125; Fedorov S.N.; Radchenko O.S.; Shubina L.K.; Balaneva N.N.; Bode A.M.; Stonik V.A.; Dong Z. Pharm. Res. 2006, 23, 70]. Известно, что недостаток активного p53 или его мутации происходят во многих видах опухолевых клеток человека. С этой точки зрения, тот факт, что раково-превентивный эффект некоторых хемопревентивных препаратов не зависит от p53 ядерного фактора, является очень интересным и важным. Ведь известно, что раково-превентивные вещества, действующие по механизму, не зависящему от p53, могут преодолевать устойчивость к лекарствам многих линий опухолевых клеток. К примеру, это было показано ранее при исследовании воздействия джинджерола на ВхРС-3 клетки рака поджелудочной железы человека, содержащие мутировавший p53 ядерный фактор [Park Y.J.; Wen J.; Bang S.; Park S.W.; Song S.Y. Yonsei Med J. 2006, 47, 688].

AP-1 ядерный фактор транскрипции также регулирует множество клеточных процессов, включая пролиферацию, дифференциацию и апоптоз. В отличие от p53 ядерный фактор AP-1 сначала рассматривался исключительно как онкогенный [Dong Z.; Birrer M.J.; Watts R.G.; Matrisian L.M.; Colburn N.H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 609; Dong Z.; Watts R.G.; Sun Y.; Colburn N.H. Int. J. Oncol. 1995, 7, 359; Dong Z.; Lavrovsky V.; Colburn, N.H. Carcinogenesis 1995, 16, 749; Young M.R.; Li J.J.; Rincon M.; Flavell R.A.; Sathyanarayana B.K.; Hunziker R.; Colburn N. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 9827]. Однако недавно было показано, что некоторые из белков, входящих в состав AP-1, такие как Jun-B и c-Fos, обладают способностью подавлять развитие опухолей как в опытах *in vitro*, так и *in vivo* [Chiu R.; Angel P; Karin M. Cell 1989, 59, 979; Passegue E.; Jochum W; Schorpp-Kistner, M.; Mohle-Steinlein U.; Wagner E.F. Cell 2001, 104, 21]. Активирование другого белка из состава AP-1, а именно c-Jun, является необходимым условием для индукции апоптоза в опухолевых клетках человека HL-60 и PC-12 [Le-Niculescu H.; Bonfoco, E.; Kasuya Y; Claret F.X.; Green D.R.; Karin M. Mol. Cel. Biol. 1999, 19, 751; Kondo T.; Matsuda T.; Kitano T.; Takahashi A.; Tashima M.; Ishikura H.; Umehara H.; Domae N.; Uchiyama T.; Okazaki T. J. Biol. Chem. 2000, 275, 7668]. Активирование AP-1 и NF-κB ядерных факторов востребовано при апоптозе, индуцированном ДНК-повреждающими веществами, а также церамидами в Т-лимфоцитах и Jurkat Т клетках [Kasibhatla S.; Brunner T.; Genestie L.; Echeverri F.; Mahboubi A.; Green D.R. Mol.

Cell 1998, 1, 543; Manna S.K.; Sah N.K.; Aggarwal B.B. J. Biol. Chem. 2000, 275, 1329]. И, наконец, некоторые широко используемые в медицинской практике противоопухолевые лекарственные препараты, такие как винбластин и винкристин, механизм действия которых основан на ингибировании микротрубочек, также активизируют AP-1 ядерный фактор в опухолевых клетках. Это активирование необходимо для эффективного апоптоза, индуцируемого этими лекарственными препаратами в клетках опухолей [Fan M.; Goodwin M.E.; Birrer M.J.; Chambers T.C. Cancer Res. 2001, 61, 4450; Zhu B.K.; Wang P.; Zhang X.D.; Jiang C.C.; Chen L.H.; Avery-Kiejda K.A.; Watts R.; Hersey P. Anticancer Drugs 2008, 19, 189].

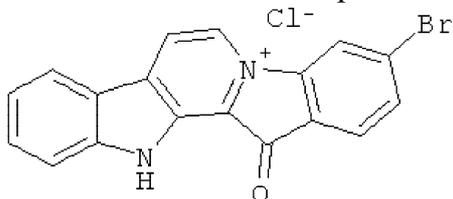
В качестве противоопухолевых препаратов в последнее время все большее внимание привлекают морские природные соединения и их синтетические аналоги и производные, которые способны воздействовать на ядерные факторы транскрипции в клетках и вследствие этого вызывать апоптоз трансформированных и раковых клеток.

Впервые фаскаплизин (1) был выделен в 1988 году из морской губки *Fascaplysinopsis Bergquist sp.*, собранной в южной части Тихого Океана близ островов Фиджи. Было показано, что этот красный пигмент является пентациклическим алкалоидом (1). Его структура, представляющая собой плоскую сопряженную систему, была установлена с помощью спектральных методов и рентгеноструктурного анализа [Hörmann A., Chaudhuri B., Fretz H. DNA binding of the marine sponge pigment fascaplysin. // Bioorg. Med. Chem. 2001. Vol.9. P.917; Roll D.M., Ireland C.M., Lu H.S. M., Clardy J. Fascaplysin, an unusual antimicrobial pigment from the marine sponge *Fascaplysinopsis sp.* // J. Org. Chem. 1988. Vol.53. P.3276-3278].



фаскаплизин (1)

3-Бромфаскаплизин (2) впервые был выделен в 2003 году из асцидии *Didemnum sp.* [Segraves N.L., Lopez S., Johnson T.A., Said S.A., Fu X., Schmitz F.J., Pietraszkiewicz H., Valeriote F.A., Crews P. Structures and cytotoxicities of fascaplysin and related alkaloids from two marine phyla - *Fascaplysinopsis* sponges and *Didemnum* tunicates. // Tetrahedron Lett. 2003. Vol.44. P.3471-3475]. Подобные соединения, как оказалось позже, встречаются довольно часто среди метаболитов морских губок. Так, в 2004 году было сообщено о выделении 12 новых и 7 ранее известных алкалоидов фаскаплизинового типа.



3-бромфаскаплизин (2)

Алкалоиды фаскаплизинового типа обладают разносторонней биологической активностью и, в частности, привлекают внимание ученых своими противоопухолевыми свойствами. Лучше всего изучена биологическая активность фаскаплизина. Выяснилось, что он обладает очень широким спектром действия, включающим противобактериальную (против *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*,

Candida albicans, Saccharomyces cerevisiae и т.д.), противомаларийную, противогрибковую, противовирусную и противоопухолевую активности [Segraves N.L., Lopez S., Johnson T.A., Said S.A., Fu X., Schmitz F., Pietraszkiewicz H., Valeriote F.A., Crews P. Structures and cytotoxicities of fascaplysin and related alkaloids from two marine phyla - Fascaplysinopsis sponges and Didemnum tunicates. // Tetrahedron Lett. 2003. Vol.44. P.3471-3475]. Именно противоопухолевая активность и вызывает наибольший интерес. Так, фаскаплизин проявляет цитотоксические свойства против таких опухолевых клеток, как: MALME-3M (меланома, IC₅₀ 0,03 мкг/мл), МКФ 7 (рак молочной железы, IC₅₀ 0,14 мкг/мл), OVCAR-3 (рак яичников, IC₅₀ 0,16 мкг/мл), A549 (рак легких, IC₅₀ 0,38 мкг/мл), L-1210 (лейкемия, IC₅₀ 0.2 мкг/мл) [Charan R.D., McKee T.C., Gustafson K.R., Pannell L.K., Boyd M.R. Thorectandramine, a novel β -carboline alkaloid from the marine sponge Thorectandra sp. // Tetrahedron Lett. 2002. Vol.43. P.5201-5204].

Механизм действия фаскаплизина на процессы, происходящие в клетке, достаточно хорошо изучен. Было показано, что фаскаплизин является селективным ингибитором циклинзависимой киназы 4 (CDK 4), которая является ключевым ферментом в регуляции перехода между фазами G₀ и G₁ в ходе клеточного цикла [Aubry C., Jenkins P.R., Mahale S., Chaudhuri B., Sutcliffe M.J. New fascaplysin-based CDK4-specific inhibitors: design, synthesis, and biological activity. // Chem. Commun. 2004. P.1696-1697]. Для успешного прохождения этой точки необходимо наличие особых факторов транскрипции, относимых к группе E₂F. Их непрерывному синтезу препятствует белок ретинобластома (pRB). Именно циклинзависимая киназа 4 в комплексе с циклином D₁ проводит фосфорилирование этого белка, что вызывает его дезактивацию и в свою очередь приводит к высвобождению факторов E₂F, прохождению точки G₀/G₁ и в дальнейшем ведет к клеточному делению. В нормальной клетке предусмотрена система регуляции активности CDK 4 природными ингибиторами этого фермента, такими как p16. При мутациях иногда возникает сбой в работе данной системы, клетка начинает бесконтрольно делиться, что приводит к возникновению злокачественной опухоли. Использование низкомолекулярных ингибиторов CDK4 существенно тормозит и даже останавливает рост опухоли. В этой связи фаскаплизин представляет огромный интерес как потенциальное лекарственное средство при лечении злокачественных новообразований.

Изучение действия фаскаплизина на асцитный вариант карциномы Эрлиха в условиях in vivo показало его малую активность против этой разновидности раковых опухолей [Попов А.М., Макарьева Т.Н., Федорев С.А., Стоник В.А. Противоопухолевая и цитостатическая активности низкомолекулярных метаболитов из морских тропических губок. // Химиотерапия опухолей в СССР. 1991. Т.56. С.61-66].

В настоящее время большое внимание уделяется аналогам фаскаплизина. Однако относительно их биологической активности известно гораздо меньше, чем о биологической активности фаскаплизина.

О биологической активности 3-бромфаскаплизина до сих пор было известно немного. Сообщалось лишь, что наряду с другими производными фаскаплизина, 3-бромфаскаплизин был протестирован на цитотоксическую активность методом STS (Solid Tumor Selectivity). В этом исследовании он оказался менее активным, чем фаскаплизин. В экспериментах использовались мышинные опухолевые C38 клетки и опухолевые клетки человека H116 [Segraves N.L., Lopez S., Johnson T.A., Said S.A., Fu X., Schmitz F.J., Pietraszkiewicz H., Valeriote F.A., Crews P. Structures and cytotoxicities of fascaplysin and related alkaloids from two marine phyla - Fascaplysinopsis sponges and Didemnum tunicates. // Tetrahedron Lett. 2003. Vol.44. P.3471-3475]. О молекулярном

механизме цитотоксического действия 3-бромфаскаплизина (2) в литературе сведений нет.

Опубликована также международная заявка, в которой описано получение, установление структуры и применение некоторых производных фаскаплизина в качестве терапевтических противоопухолевых средств [Chaudhuri B., Mahale S. G. Fascaplysin derivatives and their use in the treatment of cancer. PCT Int. App.; WO 2009/022104 A1]. Однако использование 3-бромфаскаплизина (2) в качестве средства, ингибирующего активность p53 и индуцирующего активность AP-1 ядерных факторов транскрипции, не описано.

Авторами в доступной патентной и другой научно-технической литературе не найдено указание на использование экстрактов, содержащих 3-бромфаскаплизин или индивидуального 3-бромфаскаплизина в качестве средства, ингибирующего активность p53 и индуцирующего активность AP-1 ядерных факторов транскрипции.

Задача изобретения - расширение спектра веществ, используемых в области клеточной молекулярной биологии в качестве инструментов исследования ядерных факторов транскрипции p53 и AP-1.

Задача решена применением 3-бромфаскаплизина (2) в качестве средства, ингибирующего активность p53 и индуцирующего активность AP-1 ядерных факторов транскрипции.

Новое назначение 3-бромфаскаплизина в качестве средства, обладающего способностью ингибировать активность p53 и индуцировать активность AP-1 ядерных факторов транскрипции, не вытекает с очевидностью из его известных свойств и обнаружено авторами впервые.

3-бромфаскаплизин (2), использованный для изучения его свойств по ингибированию активности p53 и индуцированию активности AP-1 ядерных факторов транскрипции, был получен нами синтетическим путем [Zhidkov M.E., Baranova O.V., Balaneva N.N., Fedorov S.N., Radchenko O.S., and Dubovitskii S.V. The first syntheses of 3-bromofascaplysin, 10-bromofascaplysin and 3,10-dibromofascaplysin-marine alkaloids from Fascaplysinopsis reticulata and Didemnum sp. by application of a simple and effective approach to the pyrido[1,2-a:3,4-b']diindole system. // Tetrahedron Lett. 2007. V.48. P.7998-8000].

Синтез 3-бромфаскаплизина (2) состоит из 4-х стадий и основан на формировании, исходя из соответствующим образом замещенных фенилуксусной кислоты и триптамина, пиридо[1,2-a:3,4-b']дииндольной системы, которая является скелетной основой алкалоида. Общий выход 3-бромфаскаплизина (2) составляет 43%.

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в способности 3-бромфаскаплизина (2) ингибировать активность p53 и индуцировать активность AP-1 ядерных факторов транскрипции.

Изобретение расширяет спектр веществ, используемых в области клеточной молекулярной биологии в качестве инструментов исследования ядерных факторов транскрипции p53 и AP-1.

На фиг.1 представлено доз-зависимое и время-зависимое ингибирование 3-бромфаскаплизином (2) активности ядерного фактора транскрипции p53 (А) и жизнеспособности JB6 Cl41 p53 клеток (В).

На фиг.2 представлено доз-зависимое и время-зависимое активирование 3-бромфаскаплизином (2) активности ядерного фактора транскрипции AP-1 (А) и ингибирование жизнеспособности JB6 Cl41 AP-1 клеток (В).

Исследование биологической активности 3-бромфаскаплизина (2)

I. Материалы и методы

1. Принятые сокращения

ДМСО - Диметилсульфоксид

ТФУ - Трифторуксусная кислота

АТФ - аденозинтрифосфат

ДТТ - дитиотреитол

EDTA - этилендиаминтетрауксусная кислота

CoA - коэнзим А

FBS - Fetal bovine serum (сыворотка бычьих эмбрионов)

HPLC - High performance liquid chromatography (высокоэффективная жидкостная хроматография)

IC₅₀ - Inhibition concentration 50% (концентрация, вызывающая гибель 50% клеток)

PBS - Phosphate-buffered saline (фосфатно-солевой буфер)

нМ - наномоль/литр

мкМ - микромоль/литр

мМ - миллимоль/литр

М - моль/литр

мкл - микролитр

мл - миллилитр

SD - стандартное отклонение от среднего

PBS - фосфатно-солевой буферный раствор

MEM - питательная среда для культивирования клеток млекопитающих

МТТ - 3-(4,5-диметилтиазолил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (реагент для определения цитотоксичности)

MTS - 5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4,5-диметилтиазолил)-3-(4-сульфлфенил)тетразолиум, внутренняя соль (реагент для определения цитотоксичности)

2. Клеточные культуры

Мышечные эпителиальные клетки JB6 P⁺ C141 и их стабильные трансфектанты JB6 C141 p53, JB6 C141 AP-1 выращивались в инкубаторе Sanyo MCO-15AC в монослое при 37°C и в атмосфере 5% CO₂.

Для клеток линий JB6 P⁺ C141, JB6 C141 p53 и JB6 C141 AP-1 использовалась среда MEM, содержащая 5% FBS, 2 mM раствора L-глутамина и 15 мкг/мл гентамицина.

3. Приготовление растворов веществ

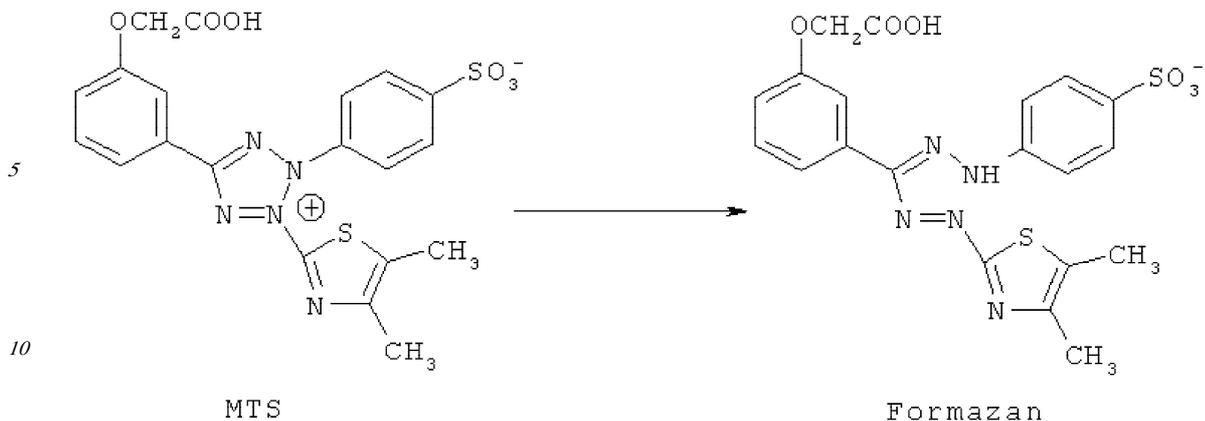
Базовый (стоковый) раствор 3-бромофаскаплизина (2) с концентрацией вещества 20 mM готовили в ДМСО, из которого получали растворы нужной концентрации разбавлением в культуральной среде. Содержание ДМСО в разбавленных растворах не превышало 0,5% во всех опытах.

4. Определение цитотоксической активности MTS методом

Для определения цитотоксической активности исследуемого вещества использовали стандартный MTS-метод (усовершенствованная модификация МТТ-метода) [Barltrop J.A., Owen T.C., Cory A.H., Cory J.G. 5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (МТТ) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1991. №11. P.611-614].

Метод основан на способности живых клеток перерабатывать MTS-реагент (желтая окраска, λ_{\max} 382 нм) в формазан (красная окраска, λ_{\max} =492 нм).

Схема переработки MTS-реагента живыми (метаболически-активными) клетками в формазан.



Описание метода:

15 А. Приготовление планшета с клетками: Из бутылки, в которой выращивали клетки, с помощью пипетки Пастера удаляли клеточную среду, затем клетки промывали 5 мл PBS и добавляли 2 мл 0,25% раствора трипсина в PBS. Затем клетки с раствором трипсина инкубировали в течение 5 минут при 37°C в атмосфере 5% CO₂, после этого

20 осторожно перемешивали с помощью пипетки и к полученной суспензии клеток добавляли 8 мл соответствующей клеточной среды. Открепившиеся в процессе трипсинизации клетки переносили в пробирку и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин. Далее с помощью пипетки Пастера удаляли супернатант и добавляли 5 мл соответствующей среды. После перемешивания считали концентрацию

25 клеток в получившейся суспензии с помощью камеры Горяева.

Далее, путем смешивания необходимых объемов полученной суспензии клеток и соответствующей среды готовили клеточную суспензию с концентрацией - 6×10^4 кл/мл для загрузки в планшет.

30 Далее клетки высевали в 96-луночный планшет в лунки В1-Н12, по 100 мкл клеточной суспензии на 1 лунку. Таким образом, количество клеток на 1 лунку в обоих случаях составляло 6000 клеток. В лунки А1-А12 добавляли соответствующую среду по 100 мкл.

Планшеты инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 1 суток.

35 Б. Приготовление растворов веществ: На аналитических весах брали навеску исследуемого вещества и растворяли ее в необходимом объеме ДМСО так, чтобы концентрация вещества в полученном растворе была 20 мМ. Далее приготавливали растворы вещества соответствующих концентраций в соответствующей питательной среде.

40 В. Загрузка веществ в планшет: Из всех лунок с помощью пипетки Пастера удаляли клеточную среду и в лунки С1-Н12 помещали приготовленные ранее растворы с исследуемым веществом по 100 мкл в каждую лунку, по 3 лунки с одной и той же концентрацией вещества. В лунки В1-В12 и А1-А12 добавляли по 100 мкл

45 соответствующей среды без вещества (эти лунки служат в качестве контрольных).

После этого планшеты инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 1 суток.

Г. Получение результатов: По завершении инкубирования в каждую лунку добавляли по 20 мкл MTS-реактанта. Затем планшеты инкубировали при 37°C в

50 атмосфере 5% CO₂ еще в течение 2 часов. После чего оптическую плотность среды в каждой лунке регистрировали с помощью спектрофотометрического планшетного ридера при 492 нм (интенсивность поглощения, обусловленного наличием формазана)

и 690 нм (результат использовали в качестве фонового показателя). Интенсивность окраски формазана при 492 нм прямо пропорциональна количеству оставшихся живых (метаболически-активных) клеток [Barltrop J.A., Owen T.C., Cory A.H., Cory J.G. 5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1991. №11. P.611-614]. Для определения цитотоксической активности вещества использовали также соответствующие спектрофотометрические показатели контрольных лунок на планшете: лунок с нулевым контролем (A1-A12), в которые не высевали клетки и не добавляли вещества, но добавляли MTS-реагент, и лунок со 100%-ным контролем (B1-B12), в которые высевали клетки в том же количестве, что и в экспериментальные, не добавляли вещества, но также добавляли MTS-реагент.

Д. Обработка результатов: Для вычисления количества живых клеток, оставшихся в экспериментальных лунках:

1. Из значения интенсивности поглощения среды при 492 нм в каждой лунке вычитали значение интенсивности поглощения среды при 690 нм в соответствующей лунке.

2. Находили среднее значение полученных в пункте 1 результатов для лунок с нулевым контролем и вычитали его из значений, полученных в пункте 1 для всех остальных лунок.

3. Вычисляли среднее значение полученных в пункте 2 результатов для лунок со 100%-ным контролем, I_K .

4. Вычисляли количество живых клеток в каждой экспериментальной лунке (N), в процентах по сравнению с контрольными лунками, по формуле:

$$N = (I_3 / I_K) \times 100\%,$$

где I_3 - это интенсивность поглощения среды в каждой экспериментальной лунке, полученная в пункте 2;

I_K - среднее значение полученных в пункте 3 результатов для лунок со 100%-ным контролем.

Для каждой клеточной линии было проведено два независимых эксперимента.

5. Определение p53- и AP-1-зависимой транскрипционной активности в JB6 C141 p53 и JB6 C141 AP-1 клетках

Способность 3-бромофаскаплизина оказывать эффект на p53- или AP-1-зависимую транскрипционную активность в JB6 C141 клетках оценивали с помощью люциферазного метода. JB6 C141 p53 или JB6 C141 AP-1 клетки (6×10^3) в виде суспензии в 100 мкл 5% FBS-MEM были добавлены в каждую лунку 96-луночного планшета. Планшеты инкубировали в течение 12 часов и затем обрабатывали различными концентрациями веществ, растворенных в 100 мкл свежей среды 5% FBS-MEM. После инкубирования с веществами в течение 24 часов удаляли среду из лунок и клетки экстрагировали в течение 1 часа при комнатной температуре с помощью 100 мкл/лунку лизисного буферного раствора (0,1 М калий-фосфатный буферный раствор с pH 7,8; 1% тритон X-100; 1 мМ ДТТ; 2 мМ EDTA). Затем 30 мкл лизата из каждой лунки были перенесены в соответствующие лунки планшета для люминесцентного анализа, и люциферазную активность в них измеряли при добавлении в каждую лунку 100 мкл люциферинового буферного раствора (0,47 мМ D-люциферина; 20 мМ трицина; 1,07 мМ магний карбонат гидроксид пентагидрата ($MgCO_3$) $_4$ \times Mg(OH) $_2$ \times 5H $_2$ O; 2,67 мМ MgSO $_4$ \times 7H $_2$ O; 33,3 мМ ДТТ; 0,53 мМ АТФ; 0,27 мМ СоА; 0,1 мМ EDTA (pH 7,8).

II. Результаты исследования биологической активности 3-бромофаскаплизина и их обсуждение

Цитотоксическая активность

5 Цитотоксическая активность 3-бромофаскаплизина (2) по отношению к JB6 P⁺ C141 p53 и JB6 P⁺ C141 AP-1 нормальным клеткам мыши была изучена MTS-методом. Результаты представлены на фиг.1, В и фиг 2, В в виде количества живых клеток в зависимости от концентрации исследуемого вещества в среде, а также от времени инкубирования 3-бромофаскаплизина (2) с клетками по сравнению с контрольными, 10 необработанными клетками.

Для каждого значения, отражающего процент живых клеток относительно контроля, указано стандартное отклонение от среднего. Астериск (*) указывает на результат, статистически достоверно отличающийся от контроля, $p < 0.05$ (Манн-Уитни 15 U-тест).

Необходимо отметить, что цитотоксическая активность 3-бромофаскаплизина (2) по отношению к JB6 P⁺ C141 p53 и JB6 P⁺ C141 AP-1 нормальным клеткам мыши ранее не изучалась и приводится впервые.

Влияние на транскрипционную активность ядерных факторов p53 и AP-1 20 Эффект, оказываемый 3-бромофаскаплизином (2) на p53- или AP-1 - зависимую транскрипционную активность, был изучен в JB6 C141 p53 или JB6 C141 AP-1 клетках со стабильно экспрессированным люциферазным репортерным геном, контролируемым p53- или AP-1 ДНК-связанной последовательностью.

25 Было показано, что 3-бромофаскаплизин (2) в активных концентрациях 250-500 нМ доз-зависимым и время-зависимым образом ингибировал базовую p53-зависимую транскрипционную активность (фиг.1, А). Данные на фиг.1, А представлены в виде p53-зависимой транскрипционной активности в процентах, в зависимости от 30 концентрации 3-бромофаскаплизина и от времени по сравнению с контрольными, необработанными клетками. Каждая точка на графиках на фиг.1 представляет собой соответствующее значение $\pm SD$, полученное в результате обработки шести образцов из двух независимых экспериментов. Исходя из данных, показанных на фиг.1, 90-95% JB6 C141 p53 клеток были живыми после 6 часовой обработки активными 35 концентрациями 375-500 нМ 3-бромофаскаплизина (2). В данных условиях активность p53 в этих клетках была ингибирована до уровня 30-60% от контрольной. После 24-часовой обработки клеток даже сравнительно низкие концентрации 3-бромофаскаплизина (2) 125-250 нМ вызывали понижение активности p53 на 40-60% по сравнению с контролем (фиг.1, А). Это указывает на возможность использования 3- 40 бромофаскаплизина (2) в качестве ингибитора активности p53 ядерного фактора транскрипции при исследованиях в области клеточной молекулярной биологии.

45 Было также показано, что 3-бромофаскаплизин (2) доз-зависимым и время-зависимым образом индуцировал базовую AP-1-зависимую транскрипционную активность (фиг.2, А). Данные на фиг.2, А представлены в виде AP-1-зависимой транскрипционной активности (А), в процентах, в зависимости от концентрации 3-бромофаскаплизина и от времени по сравнению с контрольными, необработанными клетками. Каждая точка на графиках на фиг.2 представляет собой соответствующее значение $\pm SD$, полученное в результате обработки шести образцов из двух 50 независимых экспериментов. Исходя из данных, показанных на фиг.2, после 6 часовой обработки JB6 C141 AP-1 клеток активными концентрациями 125-500 нМ 3-бромофаскаплизина (2) AP-1 активность увеличивалась в 1,5-2,3 раза по сравнению с контролем. После 24-часовой обработки клеток 125 нМ концентрация 3-

бромфаскаплизина (2) также вызывала двукратное увеличение активности AP-1 по сравнению с контролем (фиг.2, А). Это указывает на возможность использования 3-бромфаскаплизина (2) в качестве индуктора активности AP-1 ядерного фактора транскрипции при исследованиях в области клеточной молекулярной биологии.

5

Формула изобретения

Применение 3-бромфаскаплизина в качестве средства, ингибирующего активность p53 ядерного фактора транскрипции и индуцирующего активность AP-1 ядерного фактора транскрипции.

10

15

20

25

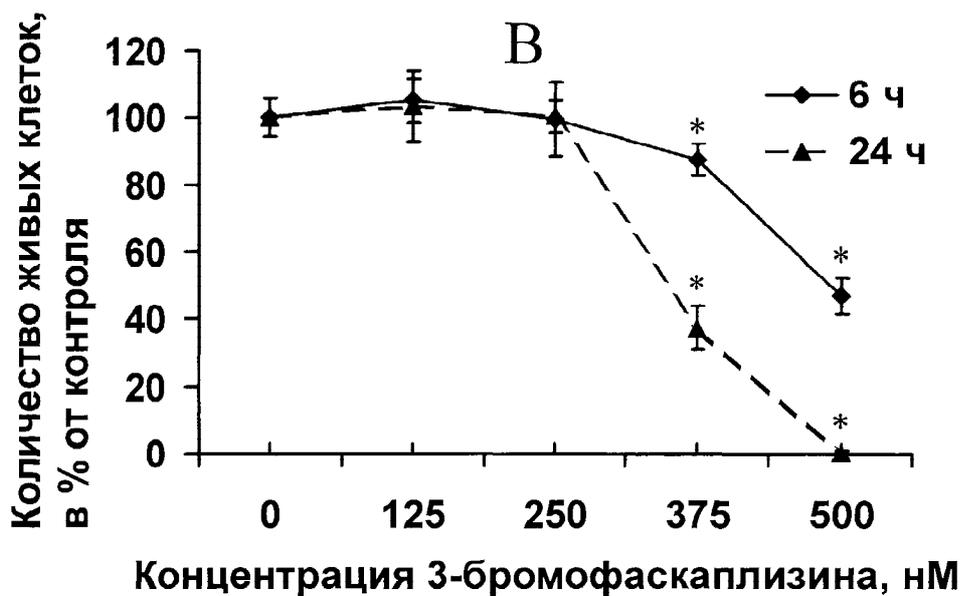
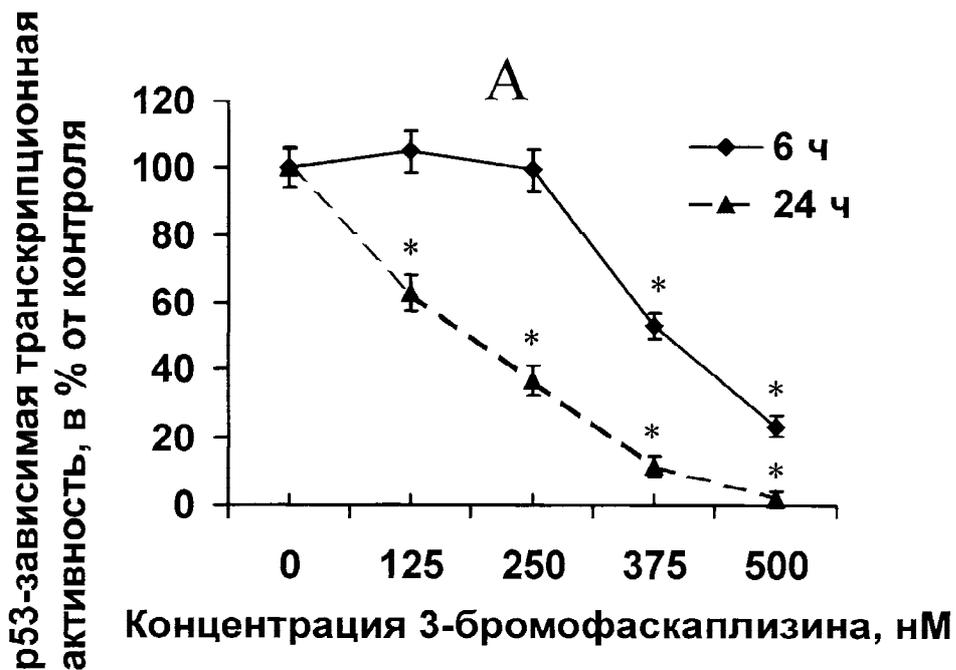
30

35

40

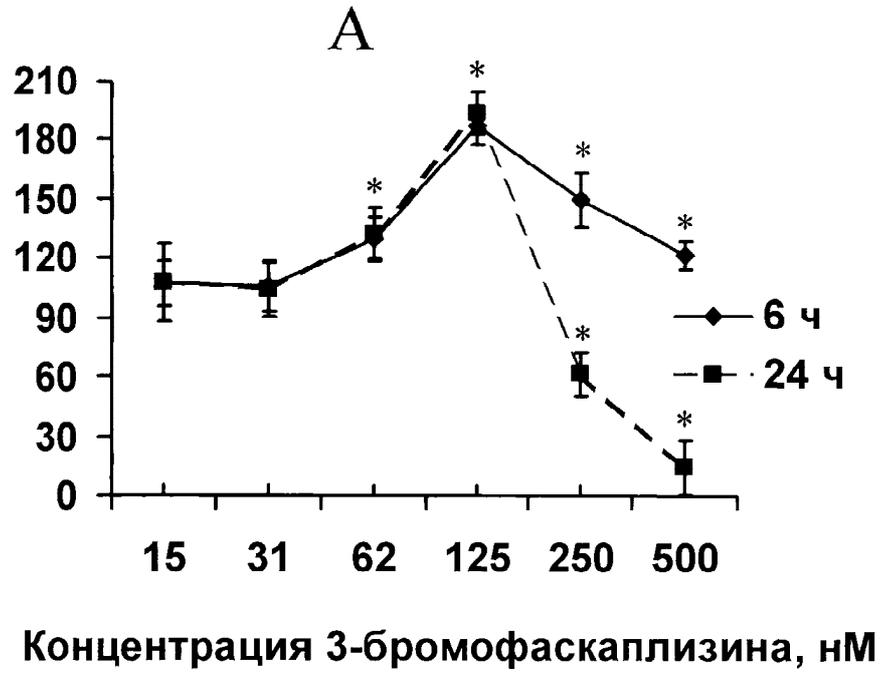
45

50

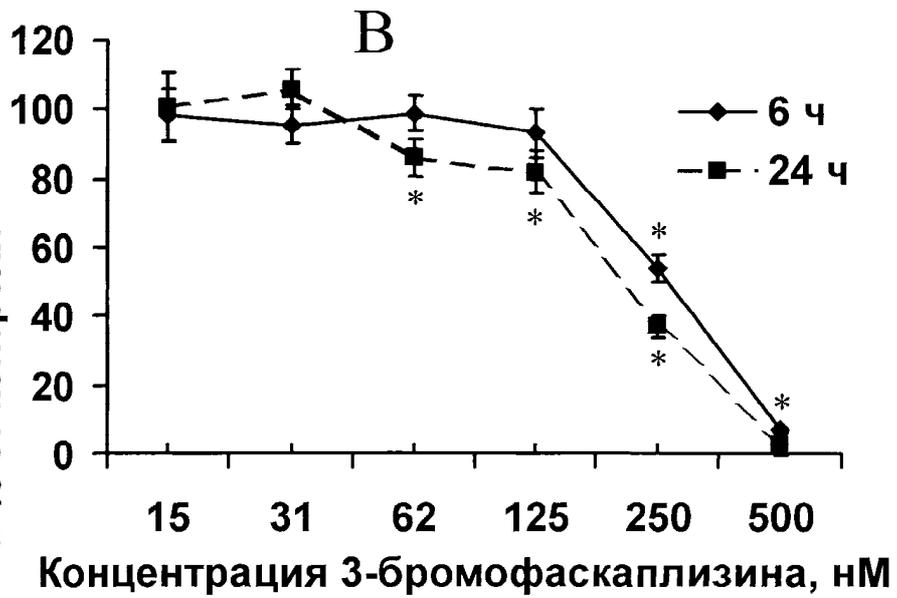


Фиг. 1

AR-1-зависимая транскрипционная
активность, в % от контроля



Количество живых клеток,
в % от контроля



Фиг.2