

СИНТЕЗ И ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ 1,5,6,7-ТЕТРАГИДРОИНДОЛ-4-ОНА И ЕГО ТИОАНАЛОГА

© 2024 г. В. А. Сорокина¹, Д. О. Цыпышев¹, А. В. Ковальская¹, В. А. Вахитов²,
И. П. Цыпышева^{1,*}

¹ Уфимский институт химии, Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук,
Уфа, 450054 Россия

² Институт биохимии и генетики, Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук,
Уфа, 450054 Россия

*e-mail: tsypysheva.ip@gmail.com

Поступило в редакцию 7 июля 2024 г.

После доработки 5 августа 2024 г.

Принято к печати 8 августа 2024 г.

Синтезированы производные 1,5,6,7-тетрагидроиндол-4-она и его тиааналога. Изучена их цитотоксичность *in vitro* в отношении клеток НЕК293, Jurkat и MCF-7. Выявлено соединение-хит – 6,6-диметил-1-(2-метилфенил)-2-фенил-1,5,6,7-тетрагидро-4*H*-индол-4-он, ингибирующее метаболическую активность клеток лимфобластного лейкоза (Jurkat) с $IC_{50} = 14.8$ мкМ и нормальных клеток эмбриональных клеток почки человека (НЕК293) с $IC_{50} = 93.63$ мкМ. *In silico* показано, что механизм цитотоксического действия наиболее активного соединения, предположительно, может реализовываться за счет его взаимодействия с сайтом циклин-зависимой киназы CDK9.

Ключевые слова: 1,5,6,7-тетрагидроиндол-4-он, реагент Лавессона, цитотоксичность, молекулярный докинг, CDKs

DOI: 10.31857/S0044460X24050053, **EDN:** FKIEGC

ВВЕДЕНИЕ

Одним из ценных источников новых биологически активных веществ являются азотсодержащие гетероциклические соединения, в том числе индольного ряда, что обусловлено высоким синтетическим потенциалом самого индольного фрагмента и возможностью синтеза на его основе библиотек разнообразных производных [1–6]. Фармакологический профиль разрешенных для клинического применения лекарственных препаратов, содержащих в своей структуре индольную субъединицу, исключительно широк – это антимикробные, противовирусные, обезболивающие, противовоспалительные, антипсихотические, гипотензивные, противодиабетические, противо-

опухолевые и др. средства [7]. Причем последний тип активности присущ как сложным по своей структуре индольным алкалоидам, например винбластину, винкристину (*Catharanthus roseus*) или эвodiaмину (*Evodiae fructus*) [8–10], так и самым простым производным индола [11–19]. В последние два десятилетия опубликовано несколько работ, посвященных направленному созданию ингибиторов циклин-зависимых киназ (CDKs) – ферментов, регулирующих жизненный цикл опухолевых клеток, на основе индольной [20–22] или тетрагидроиндолоновой матриц [23–26]. Кроме того, наши собственные исследования [27] *in silico* показали потенциальную возможность взаимодействия ряда 6,6-диметил-1,2-дизамещенных-1,5,6,7-тетрагидро-4*H*-индол-4-онов с активным сайтом

CDK9, что стимулировало продолжение поиска новых цитотоксических агентов среди производных аналогичных структурных групп.

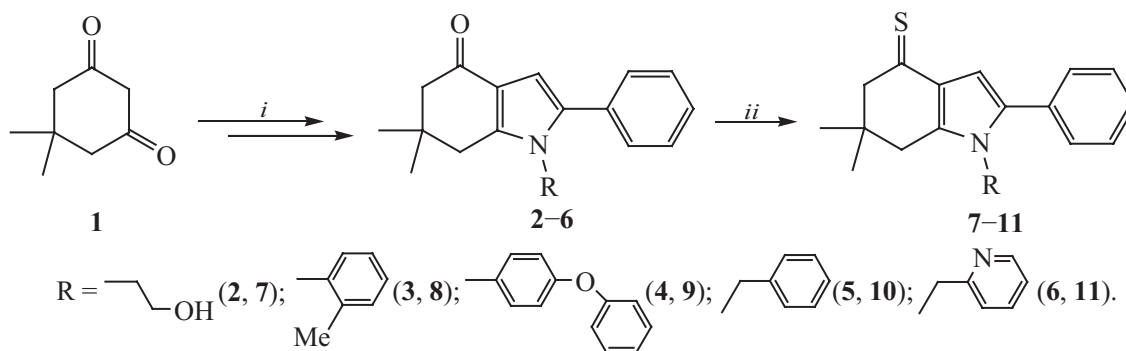
Таким образом, целью настоящей работы является синтез производных тетрагидроиндол-4-она и тетрагидроиндол-4-тиона, *in vitro* определение их цитотоксических свойств в отношении условно-нормальных клеток НЕК293 (линия эмбриональной почки человека) и опухолевого происхождения – Jurkat (линия лимфобластного лейкоза человека) и MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека) с параллельной *in silico* оценкой способности вы-

явленных соединений-хитов взаимодействовать с активными сайтами CDK2, CDK5 и CDK9 [28–31].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез исходных тетрагидроиндолонов **2–6** (схема 1) осуществлен согласно литературным методикам [27, 32–34] реакцией димедона **1** с бромацетофеноном и далее с 3-хлор-, 2-метил-, 4-феноксанилинами и бензиламином. Следующую стадию, позволяющую получить тетрагидроиндол-тионы **7–11**, осуществляли кипячением индолонов **2–6** с эквимольным количеством реагента Лавес-

Схема 1.



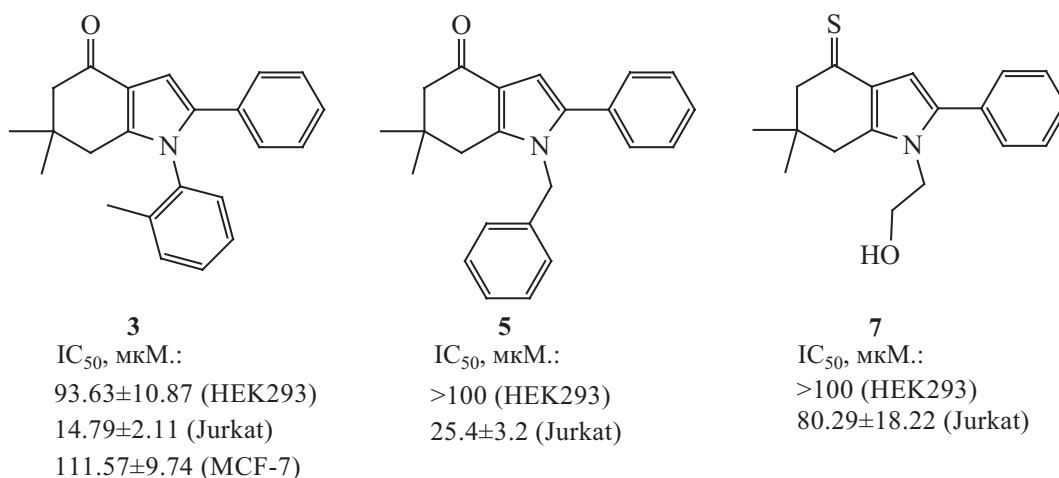
Условия реакции: *i*, бромацетофенон, CHCl_3 , затем RNH_2 , AcOH , кипячение; *ii*, реагент Лавессона, толуол, 110°C .

Таблица 1. Влияние соединений **2–11** на метаболическую активность клеток НЕК293, Jurkat и MCF-7.

Соединение	IC_{50} , мкМ. ^a		
	НЕК293	Jurkat	MCF-7
2	>100	>100	>100
3	93.63±10.87	14.79±2.11	111.57±9.74
4	>100	>100	>100
5	>100	25.4±3.2	>100
6	>100	>100	>100
7	>100	80.29±18.22	>100
8	>100	>100	>100
9	>100	>100	>100
10	>100	>100	>100
11	>100	>100	>100

^a Значения IC_{50} получены при оценке активности соединений с помощью красителя PrestoBlue® Cell Viability Reagent. Данные представлены в виде среднего значения трех измерений (два независимых эксперимента) для каждой концентрации ± стандартное отклонение, по отношению к значениям контроля (0.1% ДМСО), принятого за 100%.

Схема 2.



сона согласно работе [35]; тионы **7–11** получены с выходами 91–96%.

Цитотоксическую активность производных **2–11** оценивали в отношении клеток линий HEK293 (нормальные эмбриональные клетки почки человека), Jurkat (клеточная линия лимфобластного лейкоза) и MCF-7 (клетки аденокарциномы молочной железы). Результаты проведенного исследования представлены в табл. 1. Установлено, что соединения **5** и **7** ингибировали метаболическую активность клеток Jurkat со значениями IC₅₀ = 25.4±3.2 и 80.29±18.22 мкМ. соответственно. Соединение **3** оказалось активным в отношении двух клеточных линий опухолевого происхождения – Jurkat с IC₅₀ = 14.79±2.11 и MCF-7 с IC₅₀ = 111.57±9.74 мкМ., а также в отношении условно-нормальных клеток HEK293 (IC₅₀ = 93.63±10.87 мкМ., схема 2).

С целью изучения механизма цитотоксического действия наиболее активного соединения **3** проведен анализ его влияния на прогрессию клеточного цикла. Показано, что в клетках линии Jurkat соединение **3** в течение всего эксперимента (через 24, 48, 72 ч) вызывает увеличение количества апоптотических клеток, о чем судили по их накоплению в популяции subG1, сопровождающееся незначительным снижением содержания клеток в фазах G1 и S, что свидетельствует об индукции апоптоза, без влияния на параметры клеточного цикла. В клетках линии аденокарциномы молоч-

ной железы MCF-7 инкубация с соединением **3** в течение 24 ч приводит к повышению содержания клеток в S фазе и снижению количества клеток в фазе G2/M (рис. 1а); через 48 ч инкубации наблюдается снижение количества клеток в G1 и накопление клеток в S-фазе (рис. 1б). Данный эффект соединения **3** в отношении клеточной линии MCF-7 сохраняется в течение 72 ч, что сопровождается одновременно накоплением апоптотических клеток (рис. 1в). Таким образом, снижение жизнеспособности клеток линии MCF-7 при действии **3** может быть обусловлено цитостатическим действием вследствие ареста S фазы цикла и подавления клеточной пролиферации. В совокупности полученные результаты свидетельствуют о различном, зависимом от клеточной линии, действии соединения **3**: в клетках линии Jurkat соединение индуцирует апоптоз, не оказывая влияния на прогрессию клеточного цикла (цитотоксическое действие), тогда как антипролиферативный эффект соединения в клетках MCF-7 реализуется за счет ареста S-фазы клеточного цикла.

В дополнение к оценке цитотоксических свойств синтезированных соединений и с целью определения возможных молекулярных мишеней соединения-хита **3**, связанных с его цитотоксическим действием (рис. 1), *in silico* была осуществлена процедура молекулярного докинга **3** в активные центры циклинзависимых

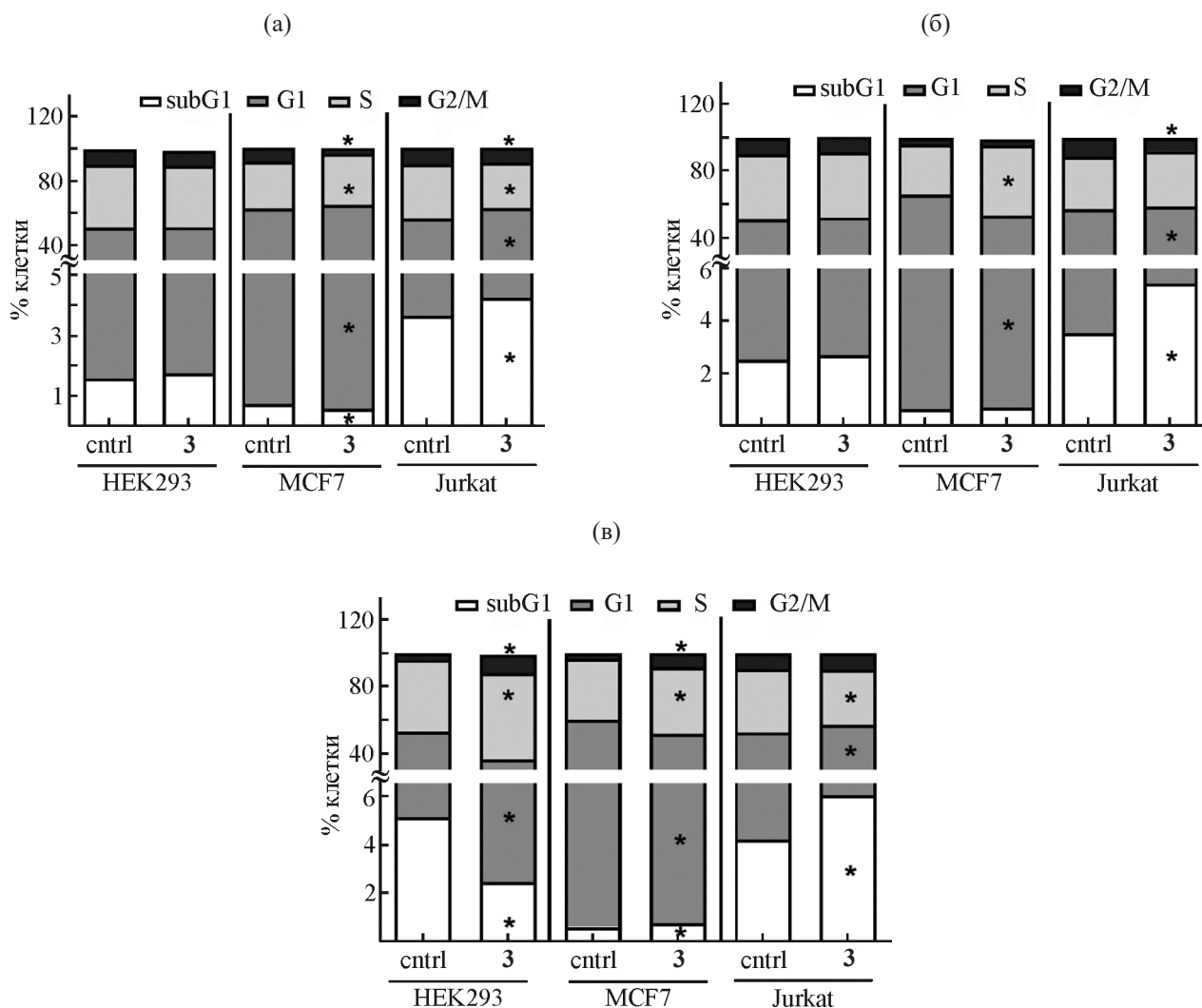


Рис. 1. Оценка влияния соединения **3** на прогрессию клеточного цикла клеток HEK293, MCF-7, и Jurkat. Клетки с тестируемым соединением в концентрации IC_{50} , определенной для каждой клеточной линии, инкубировали в течение 24 (а), 48 (б), 72 ч (в). Данные, полученные в двух независимых экспериментах ($N = 2$, $n = 6$), представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение; * – $p < 0.05$ (t-критерий Уилкоксона).

киназ CDK2, CDK5 и CDK9 (PDB коды: 4GCI, 3O0G, и 3LQ5 [28–31]. В качестве оценочных критериев использовали рассчитанные значения ΔG_{bind} (энергия связывания лиганда и белка в лиганд-белковый комплекс), а также количество совпадающих для соединения **3** и референсных лигандов взаимодействий с аминокислотами. Согласно результатам выполненных расчетов (табл. 2) значения ΔG_{bind} соединения **3** и референсного лиганда S-CR8 (схема 3) оказались наиболее близки в случае CDK9 (–58.84 и –59.64 ккал/моль соответственно).

Кроме того, соединение **3** и лиганд S-CR8 образуют по две водородные связи с аминокислотной последовательностью активного сайта (лиганд S-CR8 с GLN27 и CYS106, а соединение **3** с ASP167, PHE168, табл. 2). Докинг-позы референсного лиганда S-CR8 и тетрагидроиндолона **3** внутри 3LQ5 сайта связывания CDK9, представлены на рис. 2. Все вышесказанное в совокупности с полученными ранее результатами [27] позволяет предположить, что CDK9 может являться подходящей молекулярной мишенью для направленного синтеза ее ингибиторов на основе тетрагидроиндол-4-оновой системы.

Таблица 2. Результаты докинга соединения-хита **3** в 4GCJ, 3O0G и 3LQ5 сайты связывания циклин-зависимых киназ CDK2, CDK5 и CDK9.

PDB	Лиганд	Н-связи	Другие взаимодействия	ΔG MM-GBSA
4GCJ	CDK2 (RMSD = 0.215 Å)			
	RC-3-89	GLU81, LEU83, ASP86	солевой мостик: ASP145	–69.43
	3	LEU 83	–	–52.47
3O0G	CDK5 (3O0G) (RMSD = 0.335 Å)			
	АТФ-аналог	LYS33, GLU81, CYS83	солевой мостик: LYS33	–67.57
	3	–	π -катионное: LYS89	–53.35
3LQ5	CDK9 (3LQ5) (RMSD = 0.803 Å)			
	S-CR8	GLN27, CYS106	–	–59.64
	3	ASP167, PHE168	–	–58.84

Схема 3.

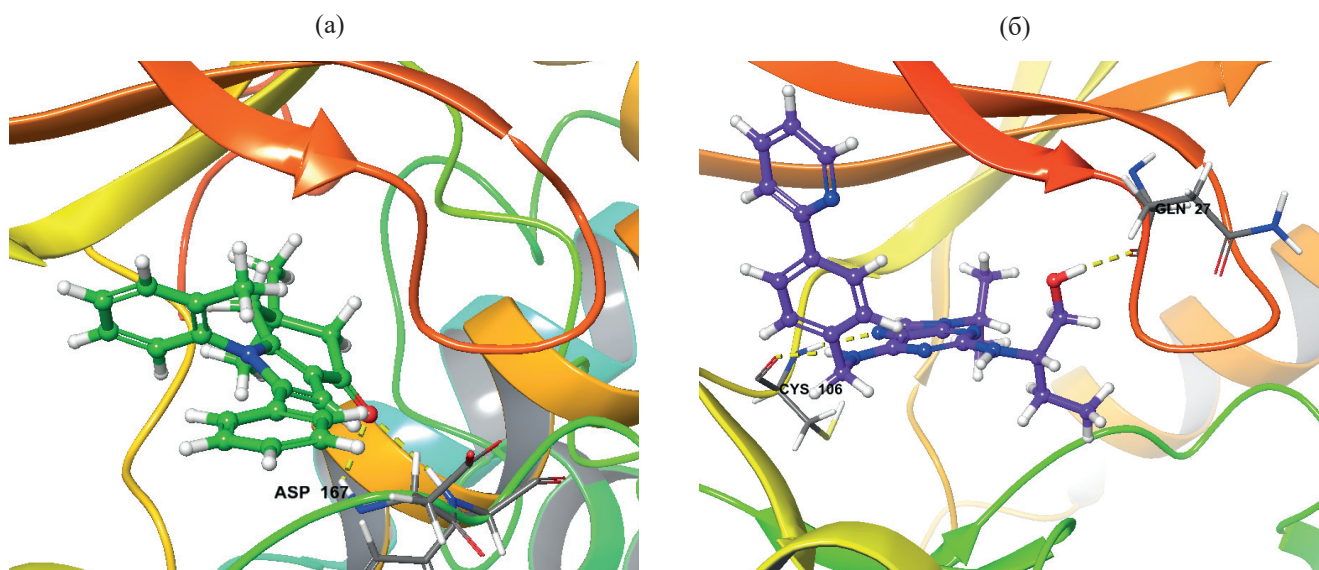
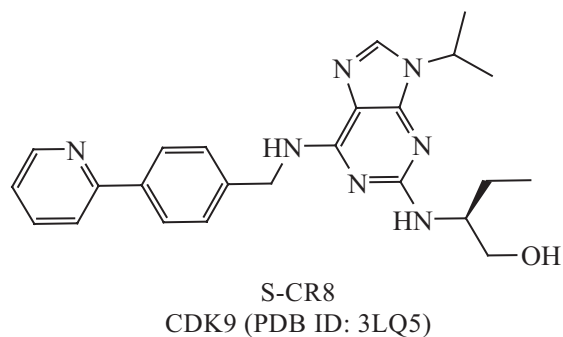


Рис. 2. Докинг-позы производного **3** (а) и референсного лиганда S-CR8 (б) в 3LQ5 сайте связывания CDK9; водородные связи обозначены пунктирными линиями.

ВЫВОДЫ

Таким образом, синтезирована серия новых производных тетрагидроиндол-4-она и их тиоаналогов. Проведена оценка цитотоксической активности полученных соединений в отношении клеточных линий НЕК293, Jurkat и MCF-7, в результате которой обнаружено соединение-хит – 6,6-диметил-1-(2-метилфенил)-2-фенил-1,5,6,7-тетрагидро-4*H*-индол-4-он **3** – с цитотоксической активностью в отношении клеток линии Jurkat ($IC_{50} = 14.79 \pm 2.11$ мкМ.) и клеток MCF-7 ($IC_{50} = 111.57 \pm 9.74$ мкМ.). *In silico* показано, что механизм цитотоксического действия соединения **3**, предположительно, может реализовываться за счет его взаимодействия с активным сайтом циклин-зависимой киназы CDK9 (PDB код – 3LQ5).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Контроль за ходом реакций осуществляли методом ТСХ на пластинах ALUGRAM®. Колоночную хроматографию выполняли на силикагеле (0.05–0.1 мм, MACHEREY-NAGEL, Германия). Спектры ЯМР 1H , ^{15}N и ^{13}C записывали на импульсном спектрометре Bruker Avance III с рабочей частотой 500.13 (1H), 50.67 (^{15}N) и 125.47 МГц (^{13}C). Элементный анализ выполняли на CHNS анализаторе Euro 3000 (Hekatech).

Физико-химические константы соединений **2–6, 11** соответствовали литературным [27, 32–34].

Общая методика синтеза тетрагидроиндолтионов 7–10. К суспензии 1 ммоль соответствующего тетрагидроиндола в 5 мл толуола добавляли 0.5 ммоль реагента Лавессона. Полученную смесь кипятили в течение 30 мин. По окончании реакции (контроль по ТСХ) реакционную массу концентрировали, остаток хроматографировали на SiO_2 (элюент – бензол).

1-(2-Гидроксиэтил)-6,6-диметил-2-фенил-1,5,6,7-тетрагидро-4*H*-индол-4-тион (7) получали из 0.20 г (0.84 ммоль) тетрагидроиндола **2**. Выход 0.23 г (91%), аморфное вещество. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$), δ , м. д. (*J*, Гц): 1.12 с (6*H*, $H^{8(9)}$), 2.73 с (2*H*, H^7), 2.88 с (2*H*, H^5), 3.62 т (2*H*, H^2 , *J* 5.7), 4.05 т (2*H*, H^1 , *J* 5.7), 6.80 с (1*H*, H^3), 7.36 т (1*H*, $H^{пара-Ph}$, *J* 7.8), 7.39 д. д (2*H*, $H^{мета-Ph}$, *J* 7.8, 7.4), 7.42 д (2*H*, $H^{орто-Ph}$, *J* 7.4). Спектр ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$), δ_C , м. д.:

28.15 ($C^{8(9)}$), 36.14 (C^6), 37.28 (C^7), 46.34 (C^1), 60.79 (C^5), 61.61 ($C^{2'}$), 108.56 (C^3), 128.19 ($C^{пара-Ph}$), 128.70 ($C^{орто-Ph}$), 129.36 ($C^{мета-Ph}$), 131.10 (C^{3a}), 132.02 ($C-Ph$), 137.47 (C^2), 140.02 (C^{7a}), 225.40 (C^4). Спектр ЯМР ^{15}N ($CDCl_3$), δ_N , м. д.: 159.67 (N^1). Найдено, %: С 72.18; Н 7.08; N 4.65; S 10.69. $C_{18}H_{21}NOS$. Вычислено, %: С 72.20; Н 7.07; N 4.68; S 10.71.

6,6-Диметил-1-(2-метилфенил)-2-фенил-1,5,6,7-тетрагидро-4*H*-инден-4-тион (8) получали из 0.20 г (0.61 ммоль) тетрагидроиндола **3**. Выход 0.19 г (95%), аморфное вещество. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$), δ , м. д. (*J*, Гц): 1.05 с (3*H*, H^8), 1.09 с (3*H*, H^9), 1.88 с (3*H*, $CH_3^{2'}$), 2.16 д (1*H*, H_A^7 , *J* 16.9), 2.45 д (1*H*, H_B^7 , *J* 6.9), 2.90 д (1*H*, H_A^5 , *J* 16.8), 2.97 д (1*H*, H_B^5 , *J* 16.8), 7.07 с (1*H*, H^3), 7.11 д (2*H*, $H^{орто-Ph}$, *J* 7.9), 7.14–7.15 м (3*H*, $H^{мета-Ph}$, $H^{пара-Ph}$), 7.24 д. д (1*H*, $H^{6'}$, *J* 7.4, *J* 1.5), 7.25 д. д (1*H*, $H^{3'}$, *J* 7.4, *J* 1.7), 7.31 т. д (1*H*, $H^{5'}$, *J* 7.4, *J* 7.4, *J* 1.7), 7.36 т. д (1*H*, $H^{4'}$, *J* 7.4, *J* 7.4, *J* 1.5). Спектр ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$), δ_C , м. д.: 17.44 ($CH_3^{2'}$), 27.17 (C^8), 28.73 (C^9), 36.19 (C^6), 37.22 (C^7), 61.04 (C^5), 107.43 (C^3), 127.04 ($C^{5'}$), 127.19 ($C^{пара-Ph}$), 127.46 ($C^{орто-Ph}$), 128.21 ($C^{мета-Ph}$), 128.47 ($C^{6'}$), 129.38 ($C^{4'}$), 131.31 ($C^{3'}$), 131.36 (C^{3a}), 131.63 ($C-Ph$), 135.97 ($C^{2'}$), 136.61 (C^1), 137.89 (C^2), 140.18 (C^{7a}), 226.00 (C^4). Спектр ЯМР ^{15}N ($CDCl_3$), δ_N , м. д.: 171.39 (N^1). Найдено, %: С 79.97; Н 6.70; N 4.06; S 9.29. $C_{23}H_{23}NS$. Вычислено, %: С 79.96; Н 6.71; N 4.05; S 9.28.

6,6-Диметил-1-(4-феноксифенил)-2-фенил-1,5,6,7-тетрагидро-4*H*-инден-4-тион (9) получали из 0.20 г (0.49 ммоль) тетрагидроиндола **4**. Выход 0.20 г (96%), аморфное вещество. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$), δ , м. д. (*J*, Гц): 1.08 с (6*H*, $H^{8(9)}$), 2.50 с (2*H*, H^7), 2.93 с (2*H*, H^5), 6.99 д (2*H*, $H^{2'(6')}$, *J* 8.8), 7.01 с (1*H*, H^3), 7.05 д (2*H*, $H^{2''(6'')}$, *J* 7.7), 7.07 д (2*H*, $H^{3'(5')}$, *J* 8.8), 7.11 д (2*H*, $H^{орто-Ph}$, *J* 7.9), 7.17–7.19 м (4*H*, $H^{4''}$, $H^{пара-Ph}$, $H^{мета-Ph}$), 7.38 т (2*H*, $H^{3''(5'')}$, *J* 7.7, *J* 7.7). Спектр ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$), δ_C , м. д.: 28.03 ($C^{8(9)}$), 36.16 (C^6), 37.64 (C^7), 61.00 (C^5), 107.94 (C^3), 118.70 ($C^{2'(6')}$), 119.63 ($C^{2''(6'')}$), 124.27 ($C^{4''}$), 127.19 ($C^{пара-Ph}$), 128.18 ($C^{мета-Ph}$), 128.24 ($C^{орто-Ph}$), 128.90 ($C^{3'(5')}$), 130.00 ($C^{3''(5'')}$), 131.34 (C^{3a}), 131.52 ($C-Ph$), 131.95 (C^1), 137.83 (C^2), 140.04 (C^{7a}), 156.04 ($C^{1''}$), 157.59 ($C^{4'}$), 226.13 (C^4). Спектр ЯМР ^{15}N ($CDCl_3$), δ_N , м. д.: 171.97 (N^1). Найдено, %: С 79.39; Н 5.96; N 3.33; S 7.54. $C_{28}H_{25}NOS$. Вычислено, %: С 79.40; Н 5.95; N 3.31; S 7.57.

1-Бензил-6,6-диметил-2-фенил-1,5,6,7-тетрагидро-4H-инден-4-тион (10) получали из 0.20 г (0.61 ммоль) тетрагидроиндола **5**. Выход 0.19 г (92%), аморфное вещество. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д. (J , Гц): 1.04 с (6H, $\text{H}^{8(9)}$), 2.47 с (2H, H^7), 2.90 с (2H, H^5), 5.10 с (2H, $\text{H}^{1'}$), 6.91 с (1H, H^3), 6.93 д (2H, $\text{H}^{2''(6'')}$, J 7.4), 7.25–7.33 м (8H, $\text{H}^{3''(5'')}$, $\text{H}^{\text{орто-Ph}}$, $\text{H}^{\text{пара-Ph}}$, $\text{H}^{\text{мета-Ph}}$ $\text{H}^{4''}$). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ_{C} , м. д.: 27.99 ($\text{C}^{8(9)}$), 36.18 (C^6), 36.82 (C^7), 47.96 ($\text{C}^{1'}$), 60.88 (C^5), 107.91 (C^3), 125.61 ($\text{C}^{2''(6'')}$), 127.67 ($\text{C}^{4''}$), 128.07 ($\text{C}^{\text{пара-Ph}}$), 128.58 ($\text{C}^{\text{мета-Ph}}$), 128.99 ($\text{C}^{3''(5'')}$), 129.00 ($\text{C}^{\text{орто-Ph}}$), 131.36 (C^{3a}), 131.66 (C-Ph), 136.85 ($\text{C}^{1''}$), 138.28 (C^2), 139.34 (C^{7a}), 225.73 (C^4). Спектр ЯМР ^{15}N (CDCl_3), δ_{N} , м. д.: 160.62 (N^1). Найдено, %: C 79.95; H 6.73; N 4.04; S 9.30. $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{NS}$. Вычислено, %: C 79.96; H 6.71; N 4.05; S 9.28.

Цитотоксические свойства соединений в отношении условно-нормальных (HEK293) и клеток опухолевого происхождения (Jurkat, MCF-7) оценивали с использованием красителя PrestoBlue® Cell Viability Reagent (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу изготовителя. Для этого клетки линии HEK293 и MCF-7 культивировали в среде DMEM (Биолот, Россия), клетки линии Jurkat – в среде RPMI (Биолот, Россия) в присутствии 10%-ной эмбриональной бычьей сыворотки, 2 мМ. L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицина сульфата. После 24 ч культивирования в каждую лунку вносили исследуемые соединения в конечных концентрациях 1, 10, 100 мкМ. (в 0.1%-ном растворе ДМСО) и инкубировали в течение 48 ч, после чего добавляли PrestoBlue® Cell Viability Reagent в количестве, рекомендованном производителем (1:9). Флуоресценцию красителя (степень редукции красителя) измеряли при длине волны 590 нм, используя мультипланшетный анализатор 2300 EnSpire® Multimode Plate Reader (PerkinElmer, США). Метаболическую активность клеток рассчитывали по отношению к контролю (0.1% ДМСО), который принимали за 100%. Значение концентрации соединения, вызывающее 50%-ное подавление жизнеспособности клеток (IC_{50}), определяли на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения GraphPadPrism v.5.02 (GraphPad Software Inc., США). Данные, полученные в 2 независимых экспериментах, выражали в виде среднего значения трех измерений для каждой концентрации $\pm$ стандартное отклонение, по

отношению к значениям контроля (0.1% ДМСО), принятого за 100%.

Анализ клеточного цикла. Клетки рассаживали в 6-луночные планшеты в питательной среде DMEM или RPMI, содержащей 10%-ную эмбриональную бычью сыворотку, 2 мМ. L-глутамин. Через 24 ч клетки промывали PBS (2 раза) и меняли среду на DMEM/RPMI, содержащую 2 мМ. L- глутамин и инкубировали в течение 24, 48, 72 ч. По истечении времени инкубации клетки трипсинизировали, отмывали PBS и фиксировали 70%-ным этанолом в течение >24 ч при -20°C . Анализ клеточного цикла осуществляли методом проточной цитофлуориметрии после окрашивания клеток пропидиййодидом (PI). Для этого зафиксированные клетки отмывали от этанола 2 раза PBS (3 мин, при 1000g), инкубировали с РНКазой А (100 мкг/мл) 5 мин при комнатной температуре и затем с PI (25 мкг/мл) дополнительные 15 мин (при комнатной температуре, в темноте). Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла проводили на проточном цитофлуориметре Novocyte® 2060 (ACEA Bioscience Inc., США). Численную обработку гистограмм флуоресценции и определение процента клеток, соответствующих по количеству ДНК фазам клеточного цикла, проводили с помощью модуля для оценки клеточного цикла программы NovoExpress 1.2.5 (ACEA Bioscience Inc., США). Эксперименты проводили в 2 биологических повторностях. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли в рамках стандартного пакета методов статистического анализа Statistica 6.0 для Windows (StatSoft, США), GraphPad Prism 5.0. (GraphPad Software, США).

Молекулярный докинг синтезированных соединений в активные сайты циклин-зависимых киназ CDK-2, CDK-5 и CDK-9 был проведен с помощью модулей программного комплекса Schrödinger Suites 2018-1 [36]. Соответствующие перечисленным циклин-зависимым киназам PDB-коды 4GCJ, 3O0G и 3LQ5, были загружены из базы данных RCSB PDB [28], в качестве референсных лигандов использованы соединения RC-3-89, АТФ-аналог и S-CR8 [29–31]. Для подготовки соединения **3** и референсных лигандов был применен модуль LigPrep, геометрическая оптимизация силовым

полем OPLS3e [37] для подготовки протеинов 4GCJ, 3O0G и 3LQ5 – модули Protein Preparation Wizard [38] и Prime [39, 40]. Процедуру докинга проводили сначала в режиме Glide (протокол Extra Precision) в соответствующие 4GCJ, 3O0G и 3LQ5 сайты, вкпе с соответствующими референсными лигандами [41–43], затем в режиме Induced Fit Docking. После чего «улучшенные» позы лигандов были подвергнуты оценке ММ-GBSA (в модуле Prime) для расчета значений ΔG_{bind} ; на этом этапе оценки применяли модель сольватации VSGB (OPLS3e), все аминокислотные остатки в радиусе 3 Å от лигандов рассматривали как «гибкие». Отметим, что рассчитанные в процессе выполнения ре-докинга референсных лигандов RC-3-89, АТФ-аналога и S-CR8 значения RMSD оказались приемлемыми и составили 0.215, 0.335 и 0.803 Å соответственно (табл. 1), что свидетельствует о корректности воспроизведения их поз внутри активных сайтов и соответствии кристаллографическим данным [29–31] в процессе моделирования.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Сорокина Валерия Андреевна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5311-9580>

Цыпышев Дмитрий Олегович, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4551-0226>

Ковальская Алёна Витальевна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7772-2894>

Цыпышева Инна Петровна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5025-8742>

Вахитов Венер Абсаттарович, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8805-9872>

БЛАГОДАРНОСТЬ

Все эксперименты выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования «Химия» Уфимского института химии Уфимского исследовательского центра РАН и Регионального центра коллективного пользования «Агидель» Уфимского исследовательского центра РАН.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания Уфимского института химии Уфимского федерального исследовательского центра

Российской академии наук (№ 122031400260-7) и государственного задания Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (№ 122041400169-2).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gomtsyan A. // Chem. Heterocycl. Compd. 2012. Vol. 48. P. 7. doi 10.1007/s10593-012-0960-z
2. Sperry J.B., Wright D.L. // Curr. Opin. Drug. Discov. Devel. 2005. Vol. 8. P. 723
3. Shiro T, Fukaya T, Tobe M. // Eur. J. Med. Chem. 2015. Vol. 97. P. 397. doi 10.1016/j.ejmech.2014.12.004
4. Huigens R.W. 3rd, Brummel B.R., Tenneti S., Garrison A.T., Xiao T. // Molecules. 2022. Vol. 27. P. 1112. doi 10.3390/molecules27031112
5. Raffa D, Maggio B., Raimondi M.V., Cascioferro S., Plescia F., Cancemi G., Daidone G. // Eur. J. Med. Chem. 2015. Vol. 97. P. 732. doi 10.1016/j.ejmech.2014.12.023
6. Afzal O., Kumar S., Haider M.R., Ali M.R., Kumar R., Jaggi M., Bawa S. // Eur. J. Med. Chem. 2015. Vol. 97. P. 871. doi 10.1016/j.ejmech.2014.07.044
7. Машиковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2021. 1216 с.
8. Almagro L., Fernández-Pérez F., Pedreño M.A. // Molecules. 2015. Vol. 20. P. 2973. doi 10.3390/molecules20022973
9. Fernández-Pérez F., Almagro L., Pedreño M.A., Gómez Ros L.V. // Pharm. Biol. 2013. Vol. 51. P. 304. doi 10.3109/13880209.2012.722646
10. Yu H., Jin H., Gong W., Wang Z., Liang H. // Molecules. 2013. Vol. 18. P. 1826. doi 10.3390/molecules18021826
11. Sachdeva H., Mathur J., Guleria A. // J. Chil. Chem. Soc. 2020. Vol. 65. P. 4900. doi 10.4067/s0717-97072020000204900
12. Sibel S. // Curr. Org. Chem. 2017. Vol. 21. P. 2068. doi 10.2174/1385272821666170809143233
13. Aggarwal B.B., Ichikawa H. // Cell Cycle. 2005. Vol. 4. P. 1201. doi 10.4161/cc.4.9.1993
14. Jia Y., Wen X., Gong Y., Wang X. // Eur. J. Med. Chem. 2020. Vol. 200. P. 112359. doi 10.1016/j.ejmech.2020.112359
15. Hong Y., Zhu Y.Y., He Q., Gu S.X. // Bioorg. Med. Chem. 2022. Vol. 55. P. 116597. doi 10.1016/j.bmc.2021.116597
16. Kaur B., Venugopal S., Verma A., Sahu S.K., Wadhwa P., Kumar D., Sharma A. // Curr. Org. Synth. 2023. Vol. 20. P. 376. doi 10.2174/1570179419666220509215722

17. Wan Y., Li Y., Yan C., Yan M., Tang Z. // *Eur. J. Med. Chem.* 2019. Vol. 183. P. 111691. doi 10.1016/j.ej-mech.2019.111691
18. Asati V., Bhupal R., Bhattacharya S., Kaur K., Gupta G.D., Pathak A., Mahapatra D.K. // *Anticancer Agents Med. Chem.* 2023. Vol. 23. P. 404. doi 10.2174/1871520622666220607143040
19. Badopra A.H. // *J. Appl. Chem.* 2018. Vol. 7. P. 299.
20. Choi S.J., Lee J.E., Jeong S.Y., Im I., Lee S.D., Lee E.J., Lee S.K., Kwon S.M., Ahn S.G., Yoon J.H., Han S.Y., Kim J.I., Kim Y.C. // *J. Med. Chem.* 2010. Vol. 53. P. 3696. doi 10.1021/jm100080z
21. Jacquemard U., Dias N., Lansiaux A., Bailly C., Logé C., Robert J.M., Lozach O., Meijer L., Mérour J.Y., Routier S. // *Bioorg. Med. Chem.* 2008. Vol. 16. P. 4932. doi 10.1016/j.bmc.2008.03.034
22. Choi S.J., Lee J.E., Jeong S.Y., Im I., Lee S.D., Lee E.J., Lee S.K., Kwon S.M., Ahn S.G., Yoon J.H., Han S.Y., Kim J.I., Kim Y.C. // *J. Med. Chem.* 2010. Vol. 53. P. 3696. doi 10.1021/jm100080z
23. Martínez R., Avila-Zarraga G., Ramirez M.T., Perez A. // *Arkivoc.* 2003. N 11. P. 48. doi 10.3998/ark.5550190.0004.b06
24. Martínez R., Avila J.G., Ramírez M.T., Pérez A., Martínez A. // *Bioorg. Med. Chem.* 2006. Vol. 14. P. 4007. doi 10.1016/j.bmc.2006.02.012
25. Martínez R., Clara-Sosa A., Ramírez Apan M.T. // *Bioorg. Med. Chem.* 2007. Vol. 15. P. 3912. doi 10.1016/j.bmc.2006.12.018
26. Martínez R., Arzate M.M., Ramírez-Apan M.T. // *Bioorg. Med. Chem.* 2009. Vol. 17. P. 1849. doi 10.1016/j.bmc.2009.01.056
27. Сорокина В.А., Цыпышев Д.О., Ковальская А.В., Цыпышева И.П. // *Вестн. Башкирск. унив.* 2021. Т. 26. С. 304. doi 10.33184/bulletin-bsu-2021.2.6
28. RCSB Protein Data Bank. <https://www.rcsb.org>
29. Schonbrunn E., Betzi S., Alam R., Martin M.P., Becker A., Han H., Francis R., Chakrasali R., Jakkaraj S., Kazi A., Sebt S.M., Cubitt C.L., Gebhard A.W., Hazlehurst L.A., Tash J.S., Georg G.I. // *J. Med. Chem.* 2013. Vol. 56. P. 3768. doi 10.1021/jm301234k
30. Ahn J.S., Radhakrishnan M.L., Mapelli M., Choi S., Tidor B., Cuny G.D., Musacchio A., Yeh L.A., Kosik K.S. // *Chem. Biol.* 2005. Vol. 12. P. 811. doi 10.1016/j.chem-biol.2005.05.011
31. Bettayeb K., Baunbæk D., Delehouze C., Loaec N., Hole A.J., Baumli S., Endicott J.A., Douc-Rasy S., Bénard J., Oumata N., Galons H., Meijer L. // *Genes Cancer.* 2010. Vol. 1. P. 369. doi 10.1177/1947601910369817
32. Положенцева И.А., Ковальская А.В., Цыпышев Д.О., Лобов А.Н., Назаров А.М., Данилко К.В., Катаев В.А. // *Баш. хим. ж.* 2018. Том 25. С. 59. doi 10.17122/bcj-2018-1-59-66
33. Ramadas S.R., Padmanabhan S. // *J. Prakt. Chem.* 1978. Vol. 320. P. 863. doi 10.1002/prac.19783200520
34. Khalafy J., Badparvar F., Marjani A.P. // *J. Chil. Chem. Soc.* 2016. Vol. 61. P. 3112. doi 10.4067/s0717-97072016000300021
35. Koval'skaya A.V., Petrova P.R., Tsypyshev D.O., Lobov A.N., Tsypysheva I.P. // *Nat. Prod. Res.* 2022. Vol. 36. P. 3538. doi 10.1080/14786419.2020.1868460
36. Schrödinger Release 2018-1: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, 2018 (демо-версия от 03.03.2021 для ФГБУ «Институт фармакологии им. А.В. Закусова», Москва)
37. Harder E., Damm W., Maple J., Wu C., Reboul M., Xiang J.Y., Wang L., Lupyán D., Dahlgren M.K., Knight J.L., Kaus J.W., Cerutti D.S., Krilov G., Jorgensen W.L., Abel R., Friesner R.A. // *J. Chem. Theory. Comput.* 2016. Vol. 12. P. 281. doi 10.1021/acs.jctc.5b00864
38. Sastry G.M., Adzhigirey M., Day T., Annabhimoju R., Sherman W. // *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2013. Vol. 27. P. 221. doi 10.1007/s10822-013-9644-8
39. Jacobson M.P., Pincus D.L., Rapp C.S., Day T.J., Honig B., Shaw D.E., Friesner R.A. // *Proteins.* 2004. Vol. 55. P. 351. doi 10.1002/prot.10613
40. Jacobson M.P., Friesner R.A., Xiang Z., Honig B. // *J. Mol. Biol.* 2002. Vol. 320. P. 597. doi 10.1016/s0022-2836(02)00470-9
41. Friesner R.A., Murphy R.B., Repasky M.P., Frye L.L., Greenwood J.R., Halgren T.A., Sanschagrin P.C., Mainz D.T. // *J. Med. Chem.* 2006. Vol. 49. P. 6177. doi 10.1021/jm051256o
42. Halgren T.A., Murphy R.B., Friesner R.A., Beard H.S., Frye L.L., Pollard W.T., Banks J.L. // *J. Med. Chem.* 2004. Vol. 47. P. 1750. doi 10.1021/jm030644s
43. Friesner R.A., Banks J.L., Murphy R.B., Halgren T.A., Klicic J.J., Mainz D.T., Repasky M.P., Knoll E.H., Shelly M., Perry J.K., Shaw D.E., Francis P., Shenkin P.S. // *J. Med. Chem.* 2004. Vol. 47. P. 1739. doi 10.1021/jm0306430

Synthesis and Cytotoxic Activity of 1,5,6,7-Tetrahydroindol-4-one Derivatives and Its Thio Analogue

V. A. Sorokina¹, D. O. Tsypyshev¹, A. V. Koval'skaya¹, V. A. Vakhitov², and I. P. Tsypysheva^{1,*}

¹ Ufa Institute of Chemistry, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences,
Ufa, 450054 Russia

² Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences,
Ufa, 450054 Russia

*e-mail: tsypysheva.ip@gmail.com

Received July 7, 2024; revised August 5, 2024; accepted August 8, 2024

Derivatives of 1,5,6,7-tetrahydroindol-4-one and its thio analogue were synthesized and their cytotoxicity against HEK293, Jurkat and MCF-7 cells was investigated *in vitro*. The hit compound, 6,6-dimethyl-1-(2-methylphenyl)-2-phenyl-1,5,6,7-tetrahydro-4*H*-indol-4-one, was found to inhibit the metabolic activity of lymphoblastic leukemia cells (Jurkat) with $IC_{50} = 14.8 \mu M$ and normal human embryonic kidney cells (HEK293) with $IC_{50} = 93.63 \mu M$. The proposed mechanism of cytotoxic action of the most active compound was shown *in silico* to be mediated by interaction with the cyclin-dependent kinase CDK9 site.

Keywords: 1,5,6,7-tetrahydroindol-4-one, Lawesson reagent, cytotoxicity, molecular docking, CDKs