

УДК 547.745:576.385.5

Цитотоксична активність у ряду похідних 1-бензил-3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону

С.С. Тарнавський¹, О.В. Остринська¹, Г.П. Волинець¹, К.В. Коцаренко¹,
Ю.А. Старосила², М.В. Протопопов¹, В.Г. Бджола¹, С.М. Ярмолюк^{1*}

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

² Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»
проспект Перемоги, 37, Київ, 03056, Україна

Резюме. Синтезовано й протестовано на цитотоксичну активність 20 похідних 1-бензил-3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону з варіацією замісників у фенільному й аніліновому кільцях. Сполуки тестували на пухлинних клітинних лініях HCT-15, MSF7, Hs683, U-373MG, LoVo та A549. Встановлено, що п'ять сполук пригнічують ріст пухлинних клітин людини із $IC_{50} > 5 \times 10^{-6}$ М.

Ключові слова: 1-бензил-3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіон, МТТ-тест, протипухлинна активність.

Вступ. Одним із напрямів сучасної проти-пухлинної терапії є застосування високоселективних лікарських препаратів на основі інгібіторів протеїнази [1]. Перспективними сполуками для розробки таких лікарських засобів є похідні малеїміду. Переважну більшість робіт із хімії малеїмідів за останні десятиріччя було присвячено синтезу стауроспорину та його аналогів — індолізмалеїмідних похідних, що в багатьох випадках продемонстрували вищі за стауроспорин специфічність інгібування та протипухлинну активність [2].

Дослідження стауроспорину, який уперше було виділено зі стрептоміцетів (*Streptomyces Staurosporus*), показали, що в низьких концентраціях він пригнічує більшість відомих протеїназ (як серин-треонінових, так і ти-

розинових) та виявляє протипухлинну активність *in vivo* [3, 4].

У своїх попередніх роботах ми показали, що синтезовані нами похідні малеїміду теж мають протипухлинну активність, зокрема, такий ефект спостерігали на трьох клітинних лініях: раку яєчників, молочної залози та легень [5-7].

Саме тому ми продовжили хімічну оптимізацію базової активної структури малеїміду шляхом варіювання замісників у фенільному й аніліновому кільцях 1-бензил-3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону.

Мета цієї роботи полягала в тестуванні похідних 1-бензил-3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону на протипухлинну активність і виборі найбільш цитотоксично активних сполук.

Методи і матеріали.

Хімічний синтез. Усі похідні 1-бензил-3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону синтезували за методиками і схемами, описаними в попередніх роботах [5-8].

* Corresponding author.

Tel.: +38044-5260759

E-mail address: yarmolyuksm@gmail.com

Температури плавлення синтезованих сполук вимірювали на приладі Кофлера. Спектри ЯМР ^1H записано на спектрометрі «Varian VXR 400» при 400 МГц. Хімічні зсуви наведено як частки на мільйон (ppm) від внутрішнього стандарту ТМС (тетраметилсилану). Спінову мультиплетність подано як с (сінглет), шс (розширений сінглет), д (дублет), dd (дублет дублетів), т (триплет), кв (квадруплет) ск (секстет) і м (мультиплет). Усі сполуки мали чистоту $\geq 90\%$. Усі очищені синтетичні інтермедіати мали чистоту $\geq 95\%$.

1-(4-Фторбензил)-3-хлоро-4-(3-бромобеніл)аміно-1H-пірол-2,5-діон (1). Вихід 79 %, кристалічна речовина жовтого кольору. $T_{\text{пл}}$ 136 °С. ЯМР ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 4,65 с (2H, CH_2), 7,18 м (3H, C_6H_5 , 7,12-7,25), 7,36 м (5H, C_6H_5 , 7,29-7,46), 9,94 шс (1H, NH).

1-(4-Фторбензил)-3-хлоро-4-(3-гідроксифеніл)аміно-1H-пірол-2,5-діон (2). Вихід 75 %, кристалічна речовина жовтого кольору. $T_{\text{пл}}$ 151 °С. ЯМР ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 4,64 с (2H, CH_2), 6,61 м (3H, C_6H_5 , 6,55-6,67), 7,18 м (3H, C_6H_5 , 7,11-7,26), 7,35 м (2H, C_6H_5 , 7,28-7,44), 9,55 шс (1H, OH), 9,75 шс (1H, NH).

1-(4-Фторбензил)-3-хлоро-4-(3-хлорофеніл)аміно-1H-пірол-2,5-діон (3). Вихід 79 %, кристалічна речовина жовтого кольору. $T_{\text{пл}}$ 158 °С. ЯМР ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 4,66 с (2H, CH_2), 7,19 м (5H, C_6H_5 , 7,11-7,26), 7,36 м (3H, C_6H_5 , 7,28-7,44), 9,97 шс (1H, NH).

1-(4-Фторбензил)-3-хлоро-4-(3-гідрокси-4-метилфеніл)аміно-1H-пірол-2,5-діон (4). Вихід 79 %, кристалічна речовина жовтого кольору. $T_{\text{пл}}$ 151 °С. ЯМР ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 2,06 с (3H, CH_3), 4,63 с (2H, CH_2), 6,56 д (1H, C_6H_5 , J=7,4), 6,63 с (1H, C_6H_5), 6,04 д (1H, C_6H_5 , J=7,8), 7,19 т (2H, C_6H_5 , J=8,5), 7,32 м (2H, C_6H_5 , 7,27-7,37), 9,55 шс (1H, OH), 9,75 шс (1H, NH).

1-(4-Фторбензил)-3-хлоро-4-(3-флуорофеніл)аміно-1H-пірол-2,5-діон (5). Вихід 79 %, кристалічна речовина жовтого кольору. $T_{\text{пл}}$ 137 °С. ЯМР ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 4,75 с (2H, CH_2), 7,12 м (3H, C_6H_5 , 7,08-7,16), 7,29 т (2H, C_6H_5 , J=8,5), 7,46 м (3H, C_6H_5 , 7,41-7,52), 10,01 шс (1H, NH).

1-(4-Фторбензил)-3-хлоро-4-(3-етоксифеніл)аміно-1H-пірол-2,5-діон (6). Вихід 79 %, кристалічна речовина жовтого кольору. $T_{\text{пл}}$

143 °С. ЯМР ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 1,32 т (3H, C_6H_5 , J=6,3), 4,11 кв (2H, C_6H_5 , J=7,1), 4,61 с (2H, CH_2), 6,77 м (3H, C_6H_5 , 6,71-6,82), 7,23 м (3H, C_6H_5 , 7,18-7,28), 7,60 м (2H, C_6H_5 , 7,55-7,65), 9,73 шс (1H, NH).

1-(4-Фторбензил)-3-хлоро-4-(3-йодофеніл)аміно-1H-пірол-2,5-діон (7). Вихід 79 %, кристалічна речовина жовтого кольору. $T_{\text{пл}}$ 143 °С. ЯМР ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 4,65 с (2H, CH_2), 7,19 м (4H, C_6H_5 , 7,11-7,27), 7,36 т (2H, C_6H_5 , J=8,5), 7,55 м (2H, C_6H_5 , 7,50-7,60), 9,92 шс (1H, NH).

1-(4-Фторбензил)-3-хлоро-4-(4-етоксифеніл)аміно-1H-пірол-2,5-діон (8). Вихід 79 %, кристалічна речовина жовтого кольору. $T_{\text{пл}}$ 158 °С. ЯМР ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 1,32 т (3H, C_6H_5 , J=6,3), 4,11 кв (2H, C_6H_5 , J=7,1), 4,62 с (2H, CH_2), 6,90 д (2H, C_6H_5 , J=7,4), 7,12 д (2H, C_6H_5 , J=8,2), 7,06 т (2H, C_6H_5 , J=8,5), 7,33 м (2H, C_6H_5 , 7,26-7,40), 9,71 шс (1H, NH).

Метил-4-(3-хлоро-4-(3-гідроксифеніл)аміно-2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)-метилбензоат (9). Вихід 79 %, кристалічна речовина жовтого кольору. $T_{\text{пл}}$ 213 °С. ЯМР ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 3,86 с (3H, OCH_3), 4,71 с (2H, CH_2), 6,55 м (3H, C_6H_5), 7,06 т (1H, C_6H_5 , J=8,2), 7,41 д (2H, C_6H_5 , J=7,9), 7,93 д (2H, C_6H_5 , J=7,9), 9,32 шс (1H, OH), 9,68 шс (1H, NH).

Метил-4-(3-хлоро-4-(3-гідрокси-4-метилфеніл)аміно-2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)-метилбензоат (10). Вихід 79 %, кристалічна речовина жовтого кольору. $T_{\text{пл}}$ 214 °С. ЯМР ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 2,11 с (3H, CH_3), 3,86 с (3H, OCH_3), 4,70 с (2H, CH_2), 6,48 д (1H, C_6H_5 , J=7,4), 6,60 с (1H, C_6H_5), 6,94 д (1H, C_6H_5 , J=7,8), 7,41 д (2H, C_6H_5 , J=8,2), 7,93 д (2H, C_6H_5 , J=8,2), 9,26 шс (1H, OH), 9,63 шс (1H, NH).

Метил-4-(3-хлоро-4-(3-хлорофеніламіно)-2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)-метилбензоат (11). Вихід 79 %, кристалічна речовина жовтого кольору. $T_{\text{пл}}$ 185 °С. ЯМР ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 3,86 с (3H, OCH_3), 4,73 с (2H, CH_2), 7,08 д (1H, C_6H_5 , J=8,2), 7,13 д (1H, C_6H_5 , J=8,2), 7,06 с (1H, C_6H_5), 7,41 д (2H, C_6H_5 , J=8,2), 7,93 д (2H, C_6H_5 , J=8,2), 9,45 шс (1H, NH).

Метил-4-(3-хлоро-4-(2-гідрокси-5-хлорофеніл)аміно-2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)-метилбензоат (12). Вихід 79 %, кристалічна речовина жовтого кольору. $T_{\text{пл}}$

кристалічна речовина жовтого кольору. $T_{пл}$ 197 °С. ЯМР 1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 3,86 с (3H, OCH₃), 4,70 с (2H, CH₂), 6,84 д (1H, C₆H₅, J=8,8), 7,03 д (1H, C₆H₅, J=8,6), 6,60 с (1H, C₆H₅), 6,94 д (1H, C₆H₅, J=7,8), 7,41 д (2H, C₆H₅, J=8,2), 7,93 д (2H, C₆H₅, J=8,2), 9,14 шс (1H, OH), 9,82 шс (1H, NH).

Метил-4-({3-хлоро-4-(2-метил-5-хлорофеніл)аміно-2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл}метил)бензоат (**13**). Вихід 79 %, кристалічна речовина жовтого кольору. $T_{пл}$ 113 °С. ЯМР 1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 2,21 с (3H, CH₃), 3,83 с (3H, OCH₃), 4,72 с (2H, CH₂), 7,28 м (3H, C₆H₅, 7,23-7,33), 7,49 д (2H, C₆H₅, J=7,8), 7,94 д (2H, C₆H₅, J=8,2), 9,70 шс (1H, NH).

Метил-4-({3-хлоро-4-(3,5-дихлорофеніл)аміно-2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл}метил)бензоат (**14**). Вихід 79 %, кристалічна речовина жовтого кольору. $T_{пл}$ 217 °С. ЯМР 1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 3,72 с (3H, OCH₃), 4,72 с (2H, CH₂), 7,20 с (2H, C₆H₅), 7,33 с (2H, C₆H₅), 7,45 д (1H, C₆H₅, J=7,8), 7,90 д (1H, C₆H₅, J=8,2), 1 0,01 шс (1H, NH).

Метил-4-({3-хлоро-4-(2-гідрокси-5-метилфеніл)аміно-2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл}метил)бензоат (**15**). Вихід 79 %, кристалічна речовина жовтого кольору. $T_{пл}$ 179 °С. ЯМР 1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 2,20 с (3H, CH₃), 3,85 с (3H, OCH₃), 4,71 с (2H, CH₂), 6,76 д (1H, C₆H₅, J=7,8), 6,91 м (3H, C₆H₅, 6,86-6,96), 7,41 д (2H, C₆H₅, J=7,8), 7,94 д (2H, C₆H₅, J=8,2), 9,21 шс (1H, OH), 9,42 шс (1H, NH).

1-(4-Метоксибензил)-3-хлоро-4-(3-гідрокси-4-метилфеніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (**16**). Вихід 79 %, кристалічна речовина жовтого кольору. $T_{пл}$ 182 °С. ЯМР 1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 2,06 с (3H, CH₃), 3,92 с (3H, OCH₃), 4,56 с (2H, CH₂), 6,55 д (1H, C₆H₅, J=7,4), 6,62 с (1H, C₆H₅), 6,91 д (2H, C₆H₅, J=7,8), 7,19 д (2H, C₆H₅, J=8,2), 9,45 шс (1H, OH), 9,67 шс (1H, NH).

1-(4-Метоксибензил)-3-хлоро-4-(3-йодофеніл)аміно-1H-пірол-2,5-діон (**17**). Вихід 79 %, кристалічна речовина жовтого кольору. $T_{пл}$ 127 °С. ЯМР 1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 4,57 с (2H, CH₂), 6,91 д (2H, C₆H₅, J=7,8), 7,10 м (2H, C₆H₅, 7,05-7,15), 7,20 д (2H, C₆H₅, J=8,2), 7,51 м (2H, C₆H₅, 7,47-7,55), 9,86 шс (1H, NH).

Пропіл-4-({3-хлоро-4-(3-гідроксифеніл)аміно-2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл}метил)бензоат (**18**). Вихід 79 %, кристалічна речовина жовтого кольору. $T_{пл}$ 174 °С. ЯМР 1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 1,01 т (3H, CH₃, J=7,2), 1,75 ск (2H, CH₂, J=6,7), 4,22 т (2H, CH₂, J=6,7), 4,71 с (2H, CH₂), 6,55 м (3H, C₆H₅), 7,06 т (1H, C₆H₅, J=7,8), 7,41 д (2H, C₆H₅, J=8,2), 7,93 д (2H, C₆H₅, J=8,2), 9,34 шс (1H, OH), 9,70 шс (1H, NH).

1,1'-[1,3-Фенілденді(метилен)]біс{3-хлоро-4-[(3-бромофеніл)аміно]-1H-пірол-2,5-діон} (**19**). Вихід 79 %, кристалічна речовина жовтого кольору. $T_{пл}$ 154 °С. ЯМР 1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 4,66 с (4H, CH₂), 6,91 м (6H, C₆H₅, 6,84-7,07), 7,29 м (6H, C₆H₅, 7,16-7,40), 9,95 шс (1H, NH).

1,1'-[1,3-Фенілденді(метилен)]біс{3-хлоро-4-[(3-флуорофеніл)аміно]-1H-пірол-2,5-діон} (**20**). Вихід 79 %, кристалічна речовина жовтого кольору. $T_{пл}$ 154 °С. ЯМР 1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 4,68 с (4H, CH₂), 6,93 м (6H, C₆H₅, 6,86-7,09), 7,31 м (6H, C₆H₅, 7,18-7,43), 9,97 шс (1H, NH).

Тестування на клітинних лініях. Біологічне тестування синтезованих сполук виконували у співробітництві з лабораторією Унібіоскрін, Бельгія (Unibioscreen S.A., Belgium) з використанням МТТ-тесту. Останній є непрямим методом визначення впливу досліджуваних речовин на загальну життєздатність клітинних ліній.

Для досліджень було обрано 6 пухлинних клітинних ліній людини, які належать до різних видів тканин: Hs683 та 373MG — пухлини мозку, HCT-15 та LoVo — рак кишечника, A549 — рак легень, MCF-7 — рак молочної залози. Клітини висівали на 96-лункові планшети в об'ємі 100 мкл клітинної суспензії на лунку в кількості 1×10^3 і 5×10^3 клітин на лунку, залежно від типу клітин. Після 24-годинної інкубації при 37 °С культуральне середовище змінювали на 100 мкл свіжого середовища, в якому тестовані речовини розчиняли в різних концентраціях — від 10^{-5} до 10^{-9} М.

Після 72 год інкубації при 37 °С зі сполукою (експериментальні умови) чи без сполуки (контрольний варіант) середовище змінювали на 100 мкл МТТ, розчиненого в культуральному середовищі в концентрації 1 мг/мл. Інку-

бація тривала 3 год при 37 °С, потім планшет центрифугували 10 хв при 400 g.

Неперетворений МТТ видаляли, а кристали формагану, які були сформовані живими клітинами, розчиняли й ресуспендували 5 хв у 100 мкл ДМСО. Оптичне поглинання визначали на спектрофотометрі при довжинах хвиль 570 нм (довжина хвилі, при якій відбувається максимальне поглинання формагану) і 630 нм (довжина хвилі фонового забруднення). Кожен експеримент повторювали шестиразово.

Біохімічні тести in vitro. Тестування сполук на протеїнкіназах проводили за методикою, описаною С.Д. Hastie з колегами [8].

Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і складався з буфера, субстрату, рекомбінантного білка протеїнкінази та дистильованої води. Аліквоти реакційної суміші (19 мкл/пробу) поміщали в епендорфи об'ємом 1,5 мл і додавали по 1 мкл розчину інгібітора (розчиненого в ДМСО) потрібної концентрації.

Для ініціації реакції до кожного зразка додавали попередньо приготовану суміш, яка складалася з 10 мкл 150 μМ АТФ і [γ-³²P]АТФ, з радіоактивністю 0,1-0,2 мСі на 30 мл суміші. Кінцева концентрація АТФ у реакційній суміші становила 50 μМ. Після інкубації при 30 °С реакцію зупиняли додаванням 10 мкл 5% розчину ортофосфорної кислоти. Отриману реакційну суміш наносили на диск фосфоцелюлозного паперу р31 (Whatman) із діаметром 20 мм. Диски відмивали тричі з використанням 1% розчину ортофосфорної кислоти та просушували в термостаті при 45 °С.

Рівень радіоактивного сигналу визначали в сцинтиляційній рідині у флаконах, використовуючи сцинтиляційний лічильник «Tricarb 2800 TR» (Perkin Elmer, США). Як негативний контроль замість розчину інгібітора додавали 1 мкл ДМСО (3,3 %). Ступінь інгібування СК2 визначали за співвідношенням включення [γ-³²P]АТФ у субстратний пептид при додаванні інгібітора та при додаванні ДМСО.

Для різних протеїнкіназ відрізнявся склад реакційної суміші і час інкубації проб, які добирали відповідно до рекомендацій фірм-постачальників рекомбінантних білків протеїнкіназ (New England Biolabs, Великобританія, Millipore, США).

Визначення ступеня інгібування актив-

ності протеїнкінази СК2. Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 3 мкл 10x буфера для СК2 (200 мМ Тріс-НCl, рН 7,5; 500 мМ КCl; 100 мМ MgCl₂); 4 мкл синтетичного пептидного субстрату RRRD-DDSDDD (New England Biolabs, Великобританія); 0,02 мкл (10 одиниць, 20 нг очищеного рекомбінантного білка протеїнкінази СК2 (гетеротетрамерний холоензим, продукований в *E. coli*, #P6010L, New England Biolabs, Великобританія)); 13 мкл дистильованої води. Час інкубації становив 25 хв при 30 °С.

Визначення ступеня інгібування активності протеїнкінази ASK1. Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 6 мкл 5x реакційного буфера для ASK1 (25 мМ МОПС, рН 7,2, 2,5 мМ ЕГТА, 2,5 мМ ЕДТА, 0,5 мМ ДТТ (1,4-дигіотреїтол), 0,25 мг/мл БСА, 20 мМβ-гліцерофосфат), 3 мкл розчину субстрату МВР (5 мг/мл (природний основний білок мієліну, отриманий з бика, #13-104, Millipore, США)), 0,3 мкл розчину протеїнкінази ASK1 (0,1 мкг/мл (#314-606M, Millipore, США)), 10,7 мкл дистильованої води. Час інкубації становив 25 хв при 30 °С.

Визначення ступеня інгібування активності протеїнкінази JNK3. Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 6 мкл 10x реакційного буфера для JNK3 (25 мМ Тріс-НCl; рН 7,5, 5 мМ ЕГТА, 1% β-меркаптоетанол), 0,7 мкл розчину пептидного субстрату ATF2 (5 мг/мл, амінокислотні залишки 19-96 (#12-367, Millipore, США)), 0,3 мкл розчину протеїнкінази JNK3 (1 мкг/мл (#14-501, Millipore, США)), 13 мкл води. Час інкубації становив 25 хв при 30 °С.

Визначення ступеня інгібування активності протеїнкінази Aurora A. Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 6 мкл 5x реакційного буфера для Aurora A (75 мМ МОПС; рН 7,1, 1,25 мМ ЕДТА, 0,5 мг/мл БСА, 0,05% β-меркаптоетанол, 0,015% Брідж 35 (поліоксietenлауриновий ефір)), 3 мкл розчину пептидного субстрату Kemptide (1,4 мг/мл (LRRASLG, #12-257, Millipore, США)), 0,0225 мкл розчину протеїнкінази Aurora A (0,2 мкг/мл, (#14-511, Millipore, США)), 11 мкл води. Час інкубації становив 20 хв при 30 °С.

Визначення ступеня інгібування актив-

ності протеїнкінази ROCK1. Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 6 мкл 5х реакційного буфера для ROCK1 (40 мМ МОПС; рН 7,0, 1 мМ ЕДТА), 1,4 мкл розчину пептидного субстрату Long S6 Kinasesubstrate (1,96 мг/мл (синтетичний, 36 С-кінцевих амінокислот, #12-420, Millipore, США)), 0,3 мкл розчину протеїнкінази ROCK1 (1 мкг/мл (#14-601, Millipore, США)), 12,3 мкл води. Час інкубації становив 30 хв при 30 °С.

Визначення ступеня інгібування активності протеїнкінази FGFR1. Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 6 мкл 5х реакційного буфера для FGFR1 (50 мМ МОПС; рН 7,1, 1 мМ ЕДТА, 1 мг/мл БСА, 0,1% β-меркаптоетанол, 0,01% Брідж 35, 0,5 мМ Na₃VO₄), 2,5 мкл розчину пептидного субстрату IGR-IRtide (4 мг/мл (#12-527, Millipore, США)), 0,01 мкл розчину протеїнкінази FGFR1 (0,2 мкг/мл (#14-582, Millipore, США)), 11,5 мкл води. Час інкубації становив 25 хв при 30 °С.

Визначення ступеня інгібування активності протеїнкінази с-MET. Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 6 мкл 5х реакційного буфера для с-MET (50 мМ МОПС; рН 7,1, 0,6 мМ ЕДТА, 0,5 мг/мл БСА, 1 мМ Na₃VO₄, 25 мМ β-гліцерофосфат, 0,05 % β-меркаптоетанол), 3 мкл розчину пептидного субстрату KKKSPGEYVNIIEFG (4 мг/мл (#12-527, Millipore, США)), 0,3 мкл розчину протеїнкінази с-MET (1 мкг/мл (#14-526, Millipore, США)), 10,7 мкл води. Час інкубації становив 30 хв при 30 °С.

Визначення ступеня інгібування активності протеїнкінази Tie2. Об'єм реакційної суміші на одну пробу становив 20 мкл і включав: 5 мкл 5х реакційного буфера для Tie2 (50 мМ МОПС/NaOH; рН 7,0, 1 мМ ЕДТА), 2,5 мкл розчину пептидного субстрату Poly(Glu₄-Tyr) (1 мг/мл (#12-440, Millipore, США)), 1,25 мкл 10 мМ MnCl₂, 2,5 мкл розчину протеїнкінази Tie2 (35,8-71,5 нг (#14-540, Millipore, США)), 10 мкл дистильованої води. Час інкубації становив 10 хв при 30 °С.

Визначення показника IC₅₀. Показник IC₅₀ інгібіторів визначали шляхом встановлення активності ензиму за різних концентрацій сполуки. Діапазон концентрації сполуки (титрування) для визначення показника IC₅₀ обирали

та корегували повторними експериментами, що дали змогу отримати титрувальну криву з верхньою і нижньою асимптотами.

Інгібітор перевіряли при 10-16 концентраціях, отриманих шляхом двократного розведення у трьох повторях. Титрувальні криві будували в координатах активності ензиму в CPS (counts per second, рахунок за секунду) (по осі ординат) і десяткового логарифма концентрації інгібітора (lg[I]) (по осі абсцис). Для середнього значення (значення концентрації інгібітора в точці, що відповідає середині відрізка між верхньою та нижньою асимптотами) знаходили обернений логарифм концентрації, який дорівнював значенню IC₅₀.

Результати й обговорення.

Раніше нами було виявлено, що сполука 1-бензил-3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-1H-2,5-піролдіон має потенційну протипухлинну активність [7, 9]. Ми припустили, що ця речовина може бути використана як основа для розробки нових протипухлинних лікарських засобів, механізм дії яких полягав би в пригніченні активності низки тирозинкіназ.

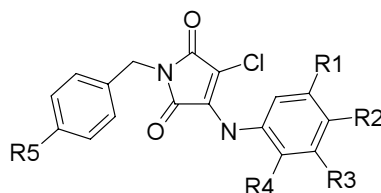
Для оптимізації структури цієї сполуки синтезували низку похідних 1-бензил-3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-1H-2,5-піролдіону з різними замісниками (R1-R5) у фенільному й аніліновому кільцях (табл. 1).

Біологічну активність отриманих 20 похідних тестували на 6 пухлинних лініях клітин людини в діапазоні концентрацій від 10⁻⁵ до 10⁻⁹ М. Варто зазначити, що дія кожної тестованої сполуки на життєздатність різних пухлинних ліній мала однонаправлений характер: деякі з цих сполук викликали пригнічення росту клітин та їх загибель, інші, навпаки, стимулювали проліферацію клітин. Усереднені дані з впливу тестованих сполук на всі 6 клітинних ліній наведено в табл. 2.

Серед 20 протестованих сполук виявлено 8, які проявляли високу цитотоксичну активність на лініях пухлинних клітин людини. Це сполуки **1, 2, 3, 5, 7, 9, 13** і **18** (табл. 2). З них чотири сполуки (**18, 1, 3** та **5**) знижували загальну життєздатність клітин на 50 % у діапазоні концентрацій від 10⁻⁵ до 5х10⁻⁶ М (рис. 1).

Варто зазначити, що токсичність деяких сполук проявлялася також і в найнижчих із досліджуваних концентрацій — 10⁻⁹ М. До них

Похідні 1-бензил-3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-1H-2,5-піролдіону



Сполука	R1	R2	R3	R4	R5
1	Br	H	H	H	F
2	OH	H	H	H	F
3	Cl	H	H	H	F
4	OH	CH ₃	H	H	F
5	F	H	H	H	F
6	OEt	H	H	H	F
7	I	H	H	H	F
8	H	OEt	H	H	F
9	OH	H	H	H	COOCH ₃
10	OH	CH ₃	H	H	COOCH ₃
11	Cl	H	H	H	COOCH ₃
12	Cl	H	H	OH	COOCH ₃
13	Cl	H	H	CH ₃	COOCH ₃
14	Cl	H	Cl	H	COOCH ₃
15	CH ₃	H	H	OH	COOCH ₃
16	OH	CH ₃	H	H	OCH ₃
17	I	H	H	H	OCH ₃
18	OH	H	H	H	COOPr
19	Br	H	H	H	
20	F	H	H	H	

належать, знову ж таки, сполуки **1**, **3** та **5**, а також сполука **2** (рис. 1). Це говорить про те, що ці речовини можуть бути перспективними для подальшого використання в медичній практиці як протипухлинні агенти. І, що найголовніше, терапевтична дія досягатиметься, можливо, навіть за низьких концентрацій обраних сполук.

З хімічної точки зору отримані результати вказують на те, що атоми галогенів (Бром,

Хлор, Фтор) як замісник R1 та атом Фтору як замісник R5 найкраще сприяють прояву цитотоксичних властивостей похідних 1-бензил-3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-1H-2,5-піролдіону. З іншого боку, відсутність замісника в положенні R3 та приєднання оксиетильної групи як замісника R2 призводить до втрати активності (сполука **8**).

Заміна замісника R5 з фтору на ацетилєнову групу і приєднання гідроксильної групи

Таблиця 2
Загальна цитотоксична активність похідних 1-бензил-3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-1H-2,5-піролідіону в пухлинних клітинах людини

Сполука	Концентрації (M)										IC ₅₀ (M)
	10 ⁻⁵	5x10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	5x10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	5x10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	5x10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	
1	33,8±2,6	54,7±3,7	93,2±6,4	90,4±6,0	98,2±4,3	90,9±4,2	96,1±5,4	91,5±5,4	64,8±2,8	10 ⁻⁵ , 5x10 ⁻⁶	
2	51,2±6,8	71,3±5,5	86,0±1,6	80,7±5,8	81,0±4,6	75,5±5,7	73,1±6,5	72,1±9,7	57,1±8,8	>10 ⁻⁵	
3	38,6±2,3	67,7±5,4	100,2±6,0	102,3±8,3	98,6±5,4	99,7±4,8	109,5±6,8	97,0±3,8	92,8±14,1	10 ⁻⁵ , 5x10 ⁻⁶	
4	81,0±5,4	87,8±9,0	96,0±5,5	95,5±7,3	92,6±5,8	83,6±5,3	83,8±6,5	84,2±3,6	67,9±4,6	>10 ⁻⁵	
5	31,2±5,6	55,4±7,2	94,1±8,1	94,9±10,4	83,5±10,5	92,2±3,5	96,6±10,0	90,5±5,7	83,6±11,0	10 ⁻⁵ , 5*10 ⁻⁶	
6	94,6±9,5	95,2±8,8	103,0±9,1	101,3±10,5	104,5±9,4	114,8±10,7	118,5±9,8	116,2±9,2	102,7±12,0	>10 ⁻⁵	
7	52,7±7,6	84,6±11,2	112,2±8,0	122,4±8,8	122,9±7,9	117,2±9,0	114,9±7,2	103,4±5,7	104,6±10,1	>10 ⁻⁵	
8	115,2±6,3	121,6±6,6	135,4±7,8	133,3±8,2	120,4±7,7	119,8±9,1	119,0±14,3	95,9±8,1	98,7±7,3	>10 ⁻⁵	
9	53,4±9,4	71,6±12,2	138,5±9,2	125,2±9,1	130,7±8,6	124,9±10,9	124,9±11,1	105,6±8,2	91,3±10,5	>10 ⁻⁵	
10	116,9±11,0	114,5±8,4	122,3±9,3	110,5±11,8	116,8±6,4	116,8±7,9	103,7±8,8	95,3±4,8	82,4±8,4	>10 ⁻⁵	
11	99,4±7,2	109,4±8,9	118,4±8,3	119,1±9,1	116,2±6,7	120,5±11,1	118,3±6,3	101,0±6,0	88,1±5,9	>10 ⁻⁵	
12	123,2±6,2	114,7±4,8	116,1±4,6	116,2±4,1	112,6±2,8	111,2±3,0	118,3±3,6	111,2±5,8	116,7±5,9	>10 ⁻⁵	
13	50,8±9,0	76,8±12,0	123,5±4,3	118,0±4,7	124,5±3,9	115,0±2,4	118,6±5,5	114,1±5,0	108,0±3,0	>10 ⁻⁵	
14	106,8±1,9	116,2±3,4	116,3±5,3	123,1±5,7	126,2±7,2	128,2±5,7	120,2±5,9	116,9±4,4	117,1±6,6	>10 ⁻⁵	
15	120,7±4,3	114,1±5,3	127,0±4,8	119,5±6,9	118,7±6,5	109,5±4,7	110,0±7,0	109,5±3,9	108,1±6,3	>10 ⁻⁵	
16	85,5±4,4	105,4±6,9	118,8±4,1	120,2±4,8	119,2±3,2	123,1±4,1	118,2±3,4	124,4±3,8	118,7±6,7	>10 ⁻⁵	
17	58,4±7,4	89,9±5,5	113,0±3,8	113,7±6,5	108,9±5,3	106,9±8,4	115,0±5,1	112,6±7,8	111,6±4,6	>10 ⁻⁵	
18	46,9±10,5	57,6±12,9	83,2±11,7	101,2±4,6	112,7±3,4	110,6±2,2	110,5±3,7	113,9±5,3	113,6±6,7	10 ⁻⁵ , 5x10 ⁻⁶	
19	94,2±7,8	110,8±13,9	105,2±20,6	91,2±12,4	94,5±12,1	94,0±11,0	95,3±12,1	94,5±8,4	93,3±9,1	>10 ⁻⁵	
20	85,3±8,1	94,3±10,0	97,6±8,1	96,4±6,2	88,8±7,5	102,7±6,6	106,3±8,7	97,5±6,6	74,2±7,8	>10 ⁻⁵	

Примітка: дані таблиці представляють % живих клітин відносно контролю; IC₅₀ — концентрація, за якої відбувається загибель половини клітин; жовтим кольором позначено сполуки **1, 2, 3, 5, 7, 9, 13, 18**, які мають цитотоксичну активність, блакитним — сполуки **8, 10, 12, 14, 15**, які стимулюють проліферацію клітин.

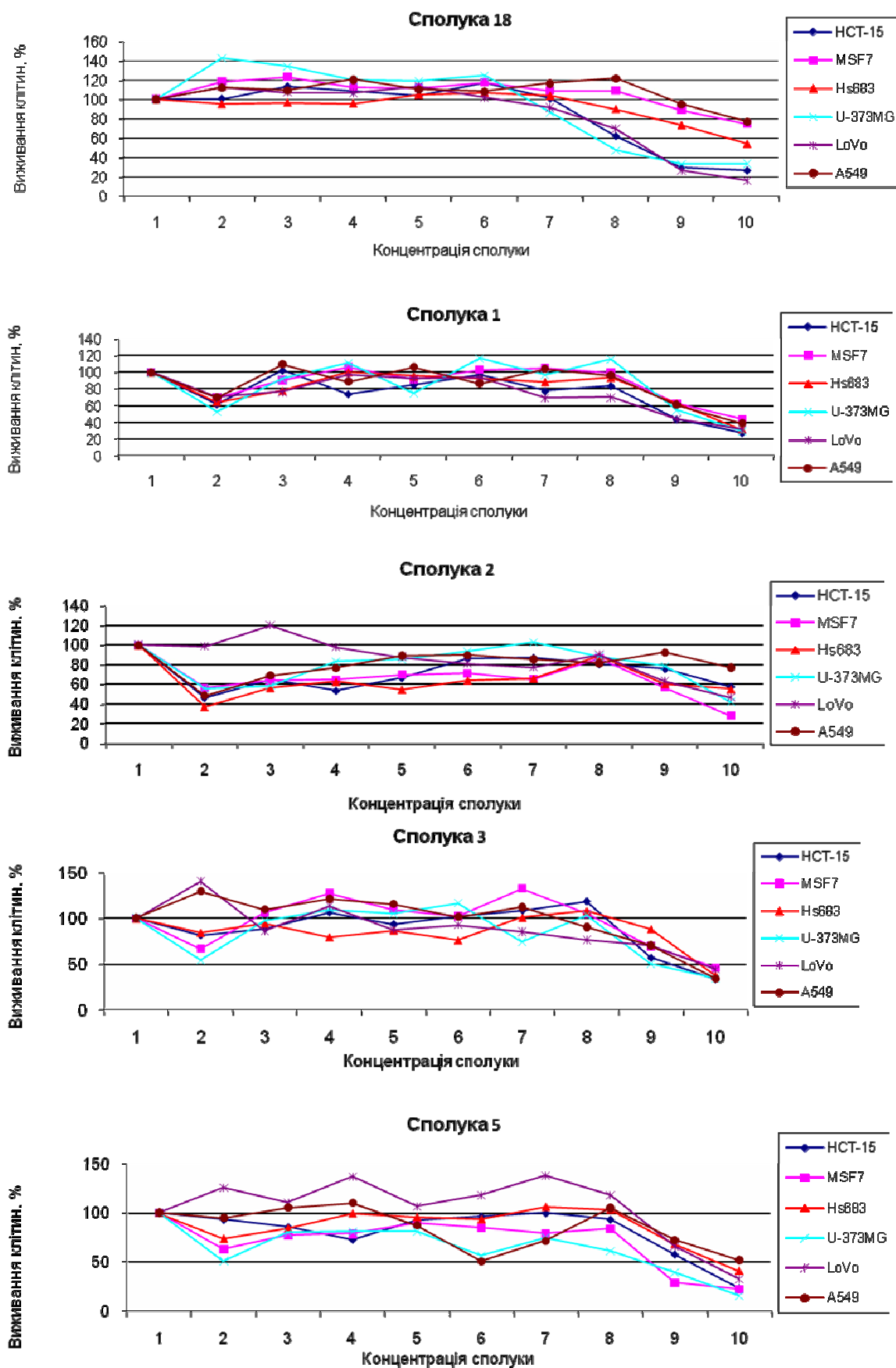


Рис. 1. Результати тестування найбільш цитотоксично активних сполук, похідних 1-бензил-3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-1H-2,5-піролідіону, на пухлинних клітинних лініях HCT-15, MSF7, Hs683, U-373MG, LoVo та A549. Концентрації сполук: (1) 0 М – контроль, (2) 10^{-9} М, (3) 5×10^{-9} М, (4) 10^{-8} М, (5) 5×10^{-8} М, (6) 10^{-7} М, (7) 5×10^{-7} М, (8) 10^{-6} М, (9) 5×10^{-6} М, (10) 10^{-5} М

Залишкова активність протеїнкіназ (%) при концентрації інгібіторів 10 μ M

Інгібітор	Група протеїнкіназ							
	Серин-треонінові протеїнкінази					Тирозинові протеїнкінази		
	CK2	ASK1	Jnk3	Aurora A	Rock1	FGFR1	c-Met	Tie2
13	21	110	101,9	39,2	101	80	42,9	81,5
18	47	117	86,3	7,8	97	83,4	30,3	6,3

як замісника R1 та метильної групи як замісника R2 (сполука **10**) зменшує цитотоксичну активність сполуки. Ацетильна група як замісник R5, атом Хлору чи метильна група як замісник R1 (сполуки **12**, **14**, **15**), атом Хлору як замісник R3 (сполука **14**) і гідроксильна група як замісник R4 (сполуки **12**, **15**) також призводили до втрати цитотоксичної активності сполук.

Серед сполук із вираженою цитотоксичною дією найбільш цікавою є сполука **1**, що має атом Брому в положенні R1 та атом Фтору в позиції R5. У концентрації 10^{-5} M вона інгібувала ріст пухлинних клітин майже на 66 %, у концентрації 5×10^{-6} M — на 45 %. Менші концентрації цієї сполуки були малотоксичними, за винятком концентрації 10^{-9} M, коли відбувалося пригнічення росту клітин майже на 35 %.

Подібний низькодозовий ефект мали також сполуки **3**, **5** та **2**, але з меншою ефективністю. Ці результати не суперечать уже відомим даним літератури, де показано, що стауроспорин, хімічні аналоги якого ми досліджуємо, у низьких концентраціях також проявляє антипроліферативний ефект [9]. Саме тому ми плануємо продовжувати наші дослідження в напрямку підвищення цитотоксичної дії похідних 1-бензил-3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-1H-2,5-піролдіону в низьких концентраціях.

На завершальному етапі наших досліджень дві сполуки було протестовано на панелі з восьми протеїнкіназ (табл. 3).

Як видно з представлених результатів, сполука **18** пригнічує активність більшої кількості протеїнкіназ, на відміну від сполуки **13**. Як ми зазначали раніше, похідні малеїміду

здатні зв'язуватися з АТФ-акцепторним сайтом низки тирозинкіназ та ефективно пригнічувати їхню активність.

У нашому випадку сполука **18** продемонструвала здатність пригнічувати активність не лише Tie2 ($IC_{50}=5,6 \mu$ M), що належить до родини тирозинових протеїнкіназ, а й серин-треонінової протеїнкінази Aurora A ($IC_{50}=6,3 \mu$ M). Варто зауважити, що Tie2 причетна до розвитку раку шлунку, грудей, гліоми і лейкемії [11], тоді як Aurora A задіяна в процесах пухлиноутворення в молочних залозах, яєчниках, кишечнику, простаті та мозку [12].

Отже, сполука **18** знижує загальну життєздатність клітин на 50 % у діапазоні концентрацій від 10^{-5} до 5×10^{-6} M на трьох пухлинних лініях людини (легень, мозку і кишечника) (рис. 1). У таких же концентраціях вона пригнічує активність протеїнкіназ Tie2 та Aurora A, які, за літературними даними, причетні до виникнення пухлин цих самих органів. Тому похідні малеїміду можуть бути перспективними засобами для лікування онкологічних захворювань не лише за рахунок цитотоксичного ефекту, а й завдяки їх здатності пригнічувати активність тих чи інших протеїнкіназ. Інгібувальна активність синтезованих нами сполук потребує подальших досліджень.

Висновки. Шляхом хімічної оптимізації активної структури 1-бензил-3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-1H-2,5-піролдіону, зокрема варіюванням замісників в аніліновому й бензольному кільцях, синтезовано і тестовано 20 сполук. Сполуки **18**, **1**, **2**, **3** та **5** обрано для подальшого дослідження як високоактивні протипухлинні агенти.

Надійшла в редакцію 17.10.2015 р.

Cytotoxicity of 1-benzyl-3-chloro-4-anilino-2,5-dihydropyrrole-2,5-dione derivatives

S.S. Tarnavskiy¹, O.V. Ostrynska¹, G.P. Volynets¹, K.V. Kotsarenko¹,
Yu.A. Starosyla², M.V. Protopopov¹, V.G. Bdzholia¹, S.M. Yarmoluk¹¹Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Zabolotnoho Str., Kyiv, 03680, Ukraine²National Technical University of Ukraine «Kyiv Polytechnic Institute»
37, Peremohy Ave., Kyiv, 03056, Ukraine

Summary. Twenty derivatives of the 1-benzyl-3-chloro-4-anilino-2,5-dihydro-1*H*-2,5-pirolidion with different substituents at aniline and benzene rings were synthesized and tested for cytotoxic activity. Compounds were tested on cancer cell lines HCT-15, MSF7, Hs683, U-373MG, LoVo and A549. Five compounds were shown to inhibit the proliferation of cancer cells with $IC_{50} > 5 \times 10^{-6}$ M.

Keywords: 1-benzyl-3-chloro-4-anilino-2,5-dihydro-1*H*-2,5-pirolidion, MTT test, antitumoractivity.

Перелік літератури

1. Czarnecka A.M., Solarek W., Kornakiewicz A., Szczylik C. Tyrosine kinase inhibitors target cancer stem cells in renal cell cancer // *OncolRep.* = 2015. doi: 10.3892/or.2015.4514.
2. Ye Q., Shen Y., Zhou Y., Lv D., Gao J., Li J., Hu Y. Design, synthesis and evaluation of 7-azaindazolyl-indolyl-maleimides as glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) inhibitors // *Eur J MedChem.* — 2013. — Vol. 68. — P. 361-371.
3. Chae H.J., Kang J.S., Byun J.O., Han K.S., Kim D.U., Oh S.M., Kim H.M., Chae S.W., Kim H.R. Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts // *Pharmacological Research.* — 2000. — Vol. 42, No. 4. — P. 373-381.
4. Mukthavaram R., Jiang P., Saklecha R., Simberly D., Bharati I., Nomura N., Chao Y., Pastorino S. High-efficiency liposomal encapsulation of a tyrosine kinase inhibitor leads to improved *in vivo* toxicity and tumor response profile // *International Journal of Nanomedicine.* — 2013. — V. 8, No. 1. — P. 3991-4006.
5. Тарнавський С.С., Дубініна Г.Г., Головач С.М., Ярмолюк С.М. Пошук протипухлинної активності серед похідних 2,5-дигідропірол-2,5-діону // *Біополімери і клітина.* — 2003. — Т. 19, № 3. — С. 287-291.
6. Тарнавський С.С., Дубініна Г.Г., Головач С.М., Ярмолюк С.М. Взаємозв'язок протипухлинної активності зі структурою 3-хлоро-4-(3-гідроксианіліно)-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону // *Біополімери і клітина.* — 2003. — Т. 19, № 6. — С. 548-552.
7. Тарнавський С.С., Кухаренко О.П., Брюховецька Н.В., Харченко В.М., Ярмолюк С.М. Протипухлинна активність похідних 1-бензил-3-хлоро-4-аміно-1*H*-пірол-2,5-діону // *Ukr. Bioorg. Acta.* — 2010. — Т. 8, № 1. — С. 51-56.
8. Hastie C.J., McLauchlan H.J., Cohen P. Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol // *Nat. Protoc.* — 2006. — Vol. 1. — P. 968-971.
9. Деклараційний патент на винахід 61626 А від 2005 року. Структури активних сполук, що мають протипухлинну активність в ряду похідних 1-бензил-3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону.
10. Takahashi N., Shimizu T., Takeda K. Low-dose staurosporine suppresses proliferation and induces neurites in human prostatic cancer TSU-Pr1 cells // *Prostate.* — 2000. — Vol. 44, No. 4. — P. 328-33.
11. Martin V., Liu D., Fueyo J., Gomez-Manzano C. Tie2: a journey from normal angiogenesis to cancer and beyond // *Histol. Histopathol.* — 2008. — Vol. 23, No. 6. — P. 773-780.
12. Fu J., Bian M., Jiang Q., Zhang C. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis // *Mol. Cancer. Res.* — 2007. — Vol. 5, No. 1. — P. 1-10.