

Протипухлинна активність похідних 1-бензил-3-хлоро-4-аміно-1*H*-пірол-2,5-діону

С.С. Тарнавський, О.П. Кухаренко, Н.В. Брюховецька,
В.М. Харченко, С.М. Ярмолюк*

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

Резюме. Синтезовано і протестовано на протипухлинну активність *in vitro* 40 похідних 2,5-дигідро-1*H*-піролдіону. За результатами прескринінгу на трьох лініях пухлинних клітин відібрано 15 сполук цього класу для подальшого тестування на 64 лініях ракових клітин людини. Результати тестування показали, що 3-хлоро-1-(4-хлоробензил)-4-[(3-хлорофеніл)аміно]-1*H*-пірол-2,5-діон і 3-хлоро-1-(4-хлоробензил)-4-[(3-трифторометил)феніл]аміно)-1*H*-пірол-2,5-діон пригнічують ріст ракових клітин зі значенням GI_{50} $1 \cdot 10^{-8}$ – $4,4 \cdot 10^{-6}$ М на всіх лініях клітин. Для активних сполук цього класу досліджено взаємозв'язок «структура—активність».

Ключові слова: похідні малеїміду, лінії пухлинних клітин, протипухлинна активність.

Вступ. Однією з головних проблем сучасної медицини є онкологічні захворювання. Важливим напрямом у розробці нових протиракових ліків є створення високоселективних препаратів на основі інгібіторів тирозинкіназ [1, 2]. Перспективними сполуками для розробки таких лікарських засобів є похідні малеїміду. Відомо, що 3-хлоро-1-(4-хлоробензил)-4-(трифторометиламіно)-1*H*-пірол-2,5-діон (МІ-1) здатний зв'язуватися з АТФ-акцепторним сайтом низки тирозинкіназ та ефективно пригнічувати їхню активність [3, 4]. Завдяки цитостатичній дії на трансформовані клітини людини [5] МІ-1 є потенційною сполукою для застосування в клінічній практиці [6]. Ученими також досліджено, що сполука МІ-1 здатна пригнічувати проліферативну та функціональну активність клітин слизової оболонки товстої кишки щурів [7]. У своїх попередніх роботах ми показали, що синтезовані нами по-

хідні малеїміду теж мають протипухлинну активність, зокрема, такий ефект спостерігався на трьох клітинних лініях: рак яєчників, молочної залози та легенів [8, 9].

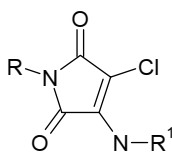
Метою цієї роботи є цілеспрямований синтез нових похідних 2,5-дигідро-1*H*-піролдіону, зокрема, *N*-заміщених з різними замісниками у 1 і 4 положеннях циклу, та тестування їх на протипухлинну активність.

Матеріали і методи. Усі похідні 2,5-дигідро-1*H*-піролдіону синтезували за методиками і схемами, описаними в роботі [9].

Контроль за перебігом реакції та чистотою одержаних сполук проводили методом ТШХ на пластинках Kieselgel 60 F (Merck). Структуру синтезованих сполук доведено за допомогою ПМР-спектрів, записаних у DMSO- d_6 на приладі Varian Mercury VRX-400 з робочою частотою 400 МГц і внутрішнім стандартом ТМС.

Біологічне тестування виконували спільно з Американським національним інститутом раку (Nation Cancer Institute, <http://dtp.nci.nih.gov/index.html>). Синтезовані речовини тестували на 64 лініях ракових клітин людини за п'яти

* Corresponding author.
Tel./fax: +38044-5222458
E-mail address: yarmoluksm@gmail.com

Результати прескринінгу похідних 1-бензил-3-хлоро-4-аміно-1H-пірол-2,5-діону **1-15** на наявність протиракової активності

№ сполуки	R	R ¹	Мітотична активність у порівнянні з контролем, %		
			Рак молочної залози	Рак легенів	Рак ЦНС
1	CH ₂ C ₆ H ₄ COOCH ₃ -p	3-Cl-4-CH ₃ OC ₆ H ₃	13	29	54
2	CH ₂ C ₆ H ₅	3-OH-4-CH ₃ C ₆ H ₃	1	0	2
3	CH ₂ C ₆ H ₅	2-OH-5-CH ₃ C ₆ H ₃	62	29	48
4	CH ₂ C ₆ H ₅	2-OHC ₆ H ₄	0	5	13
5	CH ₂ C ₆ H ₅	2-OH-5-ClC ₆ H ₃	5	0	0
6	CH ₂ C ₆ H ₄ Cl-p	3-OH-4-CH ₃ C ₆ H ₃	0	0	1
7	CH ₂ C ₆ H ₅	2-CH ₃ -3-ClC ₆ H ₃	39	2	6
8	CH ₂ C ₆ H ₅	3-ClC ₆ H ₄	12	0	2
9	CH ₂ C ₆ H ₄ Cl-p	3-CH ₃ C ₆ H ₄	8	0	5
10	CH ₂ C ₆ H ₅	3-Cl-4-CH ₃ C ₆ H ₃	25	1	20
11	CH ₂ C ₆ H ₄ Cl-p	3-OHC ₆ H ₄	1	0	1
12	CH ₂ C ₆ H ₄ Cl-p	3-OCH ₃ C ₆ H ₄	32	4	8
13	CH ₂ C ₆ H ₄ Cl-p	3-FC ₆ H ₄	12	1	5
14	CH ₂ C ₆ H ₄ Cl-p	3-ClC ₆ H ₄	8	0	5
15	CH ₂ C ₆ H ₄ Cl-p	3-CF ₃ C ₆ H ₄	8	0	2

різних концентрацій речовини в діапазоні 10⁻⁴-10⁻⁸ М з метою визначення концентрації, що пригнічує ріст ракових клітин на 50 % (GI₅₀). На першому етапі проведено прескринінг сполук на трьох лініях ракових клітин (рак молочної залози, рак легенів, рак ЦНС) за концентрації 10⁻⁴ М. Ефективність дії речовини на

клітинну лінію розраховували за допомогою рівнянь, які наведено в статті [8].

Результати й обговорення. Синтезовано і протестовано на протипухлинну активність *in vitro* 40 похідних 2,5-дигідро-1H-піролдіону. Результати прескринінгу найбільш активних 15 сполук і хімічні структури замісників R, R¹

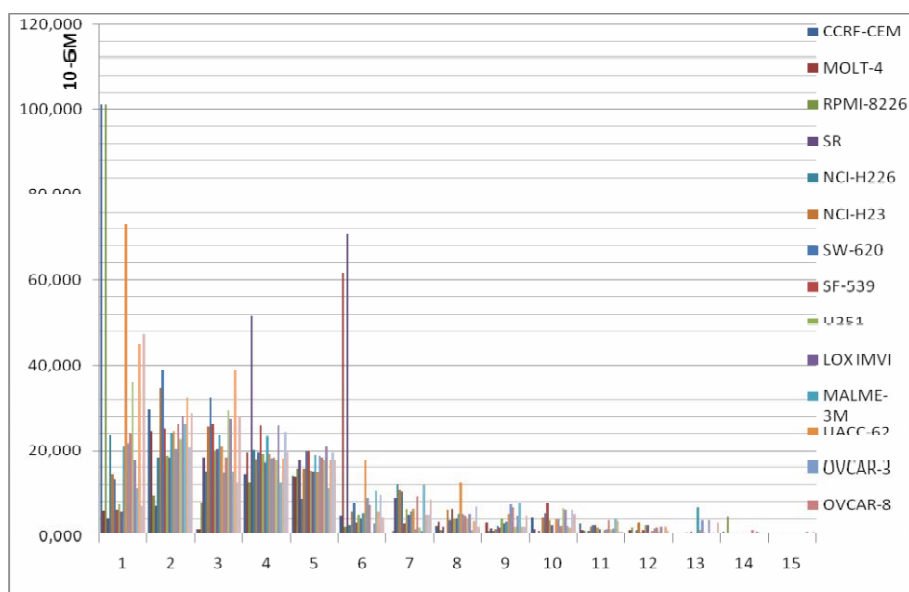


Рис. 1. Загальна діаграма зміни протипухлинної активності сполук **1-15**.

Результати тестування 1-бензил-3-хлоро-4-аміно-1H-пірол-2,5-діону **1-15** на лінійях ракових клітин людини (GI_{50} , μM)

Вид раку	Лінія клітин	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Лейкемія	CCRF-CEM	101,110	29,512	1,549	14,500	14,000	4,677	0,390	2,390	0,214	4,266	2,951	0,010	0,081	0,977	0,145
	МOLT-4	5,830	24,547	1,548	19,600	13,800	61,660	0,392	3,380	3,162	1,698	1,349	1,445	0,079	0,692	0,145
	RPMI-8226	101,111	9,333	7,762	12,500	15,800	2,042	1,250	1,370	1,072	0,457	1,072	1,862	0,479	4,365	0,010
Рак легенів	SR	4,080	6,918	18,197	51,700	16,800	70,795	8,870	2,190	1,778	1,202	0,355	0,363	0,102	0,245	0,048
	NCI-H226	23,002	18,197	15,136	20,100	8,660	2,570	12,100	10,512	1,202	0,145	1,202	1,445	0,010	0,093	0,017
Рак товстої кишки	NCI-H23	14,404	34,674	25,704	17,901	15,800	5,623	10,800	5,940	1,622	4,169	2,188	3,162	0,832	0,380	0,240
	SW-620	13,315	38,905	32,359	19,600	19,900	7,762	10,400	3,560	2,239	5,129	2,570	0,832	0,575	0,229	0,240
Рак ЦНС	SF-539	6,000	25,119	26,303	26,013	20,001	3,090	3,014	6,280	2,089	7,586	2,630	1,445	1,023	0,078	0,129
	U251	7,260	18,621	19,953	19,200	15,300	4,898	6,240	3,980	4,074	3,715	1,862	2,455	0,209	0,316	0,034
Меланома	LOX IMVI	5,660	18,197	20,417	16,500	15,136	4,074	4,830	4,000	2,884	2,512	1,479	2,455	0,331	0,372	0,363
	MALME-3M	20,893	23,988	22,909	22,800	18,900	5,248	5,623	5,120	3,236	0,603	0,468	0,661	6,607	0,065	0,240
	UACC-62	73,200	24,547	20,893	19,000	15,043	17,378	6,150	12,400	4,898	3,890	1,259	1,230	1,288	0,263	0,457
Рак яєчників	OVCAR-3	21,600	20,417	14,791	18,015	18,600	8,913	1,470	5,002	7,244	3,802	1,445	1,660	3,715	0,437	0,501
	OVCAR-8	23,800	26,303	18,197	18,300	18,300	7,079	9,230	4,630	6,457	2,344	3,631	1,862	0,676	1,259	0,457
Рак нирок	786-0	36,200	22,387	29,512	16,800	17,200	0,759	1,900	3,850	2,138	6,457	1,622	1,023	0,398	0,071	0,105
	CAKI-1	17,300	28,184	27,542	26,025	21,010	2,818	1,110	5,060	4,571	5,888	1,738	2,042	3,631	1,023	0,380
	RXF 393	11,200	26,303	15,136	12,500	11,200	10,471	12,014	1,360	7,762	2,344	3,981	0,525	0,646	0,776	0,955
Рак передміхурової залози	PC-3	44,300	32,359	38,905	18,001	17,300	5,495	4,850	3,520	2,089	1,995	3,467	2,042	0,692	0,550	0,562
Рак молочної залози	MDA-MB-231	7,140	20,893	12,589	24,600	19,800	9,772	5,032	6,870	2,291	6,166	1,096	1,318	0,240	0,178	0,209
	MDA-MB-435	47,400	28,840	28,184	19,700	17,200	4,467	8,550	2,260	4,786	5,248	1,202	0,178	3,236	0,170	1,122

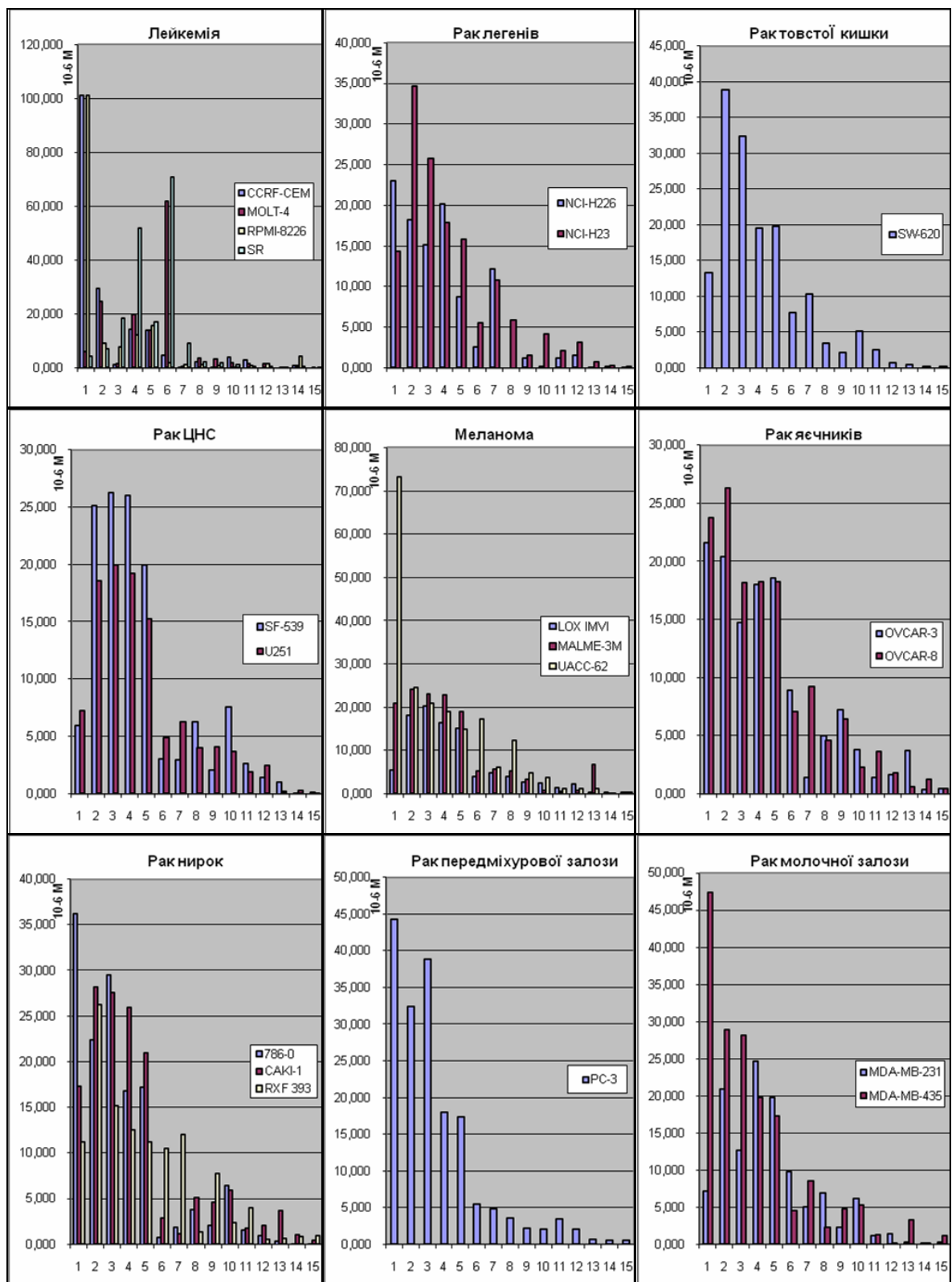


Рис. 2. Результати тестування сполук 1-15 на лініях пухлинних клітин людини.

подано в табл. 1. Сполуки 1-15 успішно пройшли етап прескринінгу, для них тотальна мітотична активність ракових клітин пригнічувалася і становила менше 32 % порівняно з контролем хоча б для однієї з трьох ліній пух-

линних клітин. Для цих сполук було проведено тестування на 64 лініях пухлинних клітин людини.

Найвищу активність досліджуваних сполук виявлено по відношенню до 20 таких ліній. Ре-

зультати тестування наведено в табл. 2 та на рис. 1 і 2.

Для тестованого ряду 15 похідних 2,5-дигідро-1H-піролдіону можна зробити деякі висновки щодо залежності активності речовини від її хімічної структури.

Найбільш активними виявилися сполуки **9**, **11-15** із замісником R, у пара-положенні бензильного кільця якого міститься хлор. У всіх інших сполук атом хлору в цій позиції відсутній. У найменш активної сполуки **1** замість хлору в цьому положенні знаходиться складноэфірна група.

Замісник R¹ у сполуках **9**, **11-15** містить у мета-положенні бензольного кільця метильну, гідроксильну, метокси-групи, фтор, хлор і замісник трифторометил, що значно підвищує активність цих сполук у порівнянні з орто-положенням **4**.

У структурах **7** та **10** присутні два замісники — метил і хлор. Більш вигідною для інгібувальної активності є така комбінація, коли хлор знаходиться у мета-положенні, а метил — у пара-положенні **10**, ніж коли метильна група міститься в орто-положенні **7**. При заміні хлору в мета-положенні сполуки **10** на гідроксильну групу спостерігається значне зниження активності **2**.

У сполук **3** і **6**, що містять як замісники гідроксильну та метильну групи, протипухлинна дія підвищується, коли гідроксильна група знаходиться у мета-положенні, а метильна — у пара-положенні **6**, ніж коли гідроксильна група в орто-положенні, а метильна — у мета-положенні **3**. У сполуці **5**, на відміну від сполуки **3**, замість метильної групи міститься замісник хлор, що значно підвищує її активність. У найменш активної сполуки **1** у мета-положенні знаходиться замісник хлор, а в пара-положенні — метокси-група.

Метил 4-((3-хлоро-4-((3-хлоро-4-метоксифеніл)аміно)-2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-іл)метил)бензоат 1: вихід 83 %, T_{пл} 191-192 °C. ЯМР ¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ, м.ч.: 3,86 с (3H, OCH₃), 3,87 с (3H, OCH₃), 4,71 с (2H, CH₂), 7,03-7,10 м (2H), 7,20 д (1H), 7,41 д (2H, J=8,3 Hz), 7,92 д (2H, J=8,3 Hz), 9,76 с (1H, NH).

1-бензил-3-хлоро-4-((3-гідрокси-4-метилфеніл)аміно)-1H-пірол-2,5-діон 2: вихід 68 %, T_{пл} 185-186 °C. ЯМР ¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ,

м.ч.: 2,10 с (3H, CH₃), 4,62 с (2H, CH₂), 6,47 дд (1H), 6,58 д (1H), 6,93 д (1H), 7,23-7,33 м (5H), 9,25 с (1H, OH), 9,58 с (1H, NH).

1-бензил-3-хлоро-4-((2-гідрокси-5-метилфеніл)аміно)-1H-пірол-2,5-діон 3: вихід 67 %, T_{пл} 180-181 °C. ЯМР ¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ, м.ч.: 2,22 с (3H, CH₃), 4,61 с (2H, CH₂), 6,70-6,72 м (1H), 6,82-6,84 м (1H), 7,25-7,34 м (5H), 8,88 с (1H, OH) 9,25 с (1H, NH).

1-бензил-3-хлоро-4-((2-гідрокси-феніл)аміно)-1H-пірол-2,5-діон 4: вихід 66 %, T_{пл} 180-181 °C. ЯМР ¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ, м.ч.: 4,61 с (2H, CH₂), 6,74 т (1H), 6,84 д (1H), 7,02-7,06 м (2H), 7,23-7,34 м (5H), 8,94 с (1H, OH), 9,52 с (1H, NH).

1-бензил-3-хлоро-4-((5-хлоро-2-гідрокси-феніл)аміно)-1H-пірол-2,5-діон 5: вихід 73 %, T_{пл} 177-178 °C. ЯМР ¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ, м.ч.: 4,62 с (2H, CH₂), 6,82-6,84 м (1H), 7,01-7,06 м (2H), 7,23-7,34 м (5H), 9,08 с (1H, OH), 9,81 с (1H, NH).

3-хлоро-1-(4-хлоробензил)-4-((3-гідрокси-4-метилфеніл)аміно)-1H-пірол-2,5-діон 6: вихід 72 %, T_{пл} 224-225 °C. ЯМР ¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ, м.ч.: 2,10 с (3H, CH₃), 4,61 с (2H, CH₂), 6,47 д (1H), 6,58 с (1H), 6,93 д (1H), 7,29 д (2H, J=8,3 Hz), 7,33 д (2H, J=8,3 Hz), 9,24 с (1H, OH), 9,59 с (1H, NH).

1-бензил-3-хлоро-4-((3-хлоро-2-метилфеніл)аміно)-1H-пірол-2,5-діон 7: вихід 81 %, T_{пл} 157-158 °C. ЯМР ¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ, м.ч.: 2,26 с (3H, CH₃), 4,62 с (2H, CH₂), 7,09 д (1H), 7,17 т (1H), 7,24-7,34 м (5H), 9,62 с (1H, NH).

1-бензил-3-хлоро-4-((3-хлорофеніл)аміно)-1H-пірол-2,5-діон 8: вихід 88 %, T_{пл} 125-126 °C. ЯМР ¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ, м.ч.: 4,64 с (2H, CH₂), 7,07-7,15 м (3H), 7,24-7,34 м (5H), 9,90 с (1H, NH).

3-хлоро-1-(4-хлоробензил)-4-((3-метилфеніл)аміно)-1H-пірол-2,5-діон 9: вихід 86 %, T_{пл} 119-120 °C. ЯМР ¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ, м.ч.: 2,33 с (3H, CH₃), 4,62 с (2H, CH₂), 6,93-6,95 м (3H), 7,17 т (1H), 7,30 д (2H, J=8,5 Hz), 7,33 д (2H, J=8,5 Hz), 9,74 с (1H, NH).

1-бензил-3-хлоро-4-((3-хлоро-4-метилфеніл)аміно)-1H-пірол-2,5-діон 10: вихід 89 %, T_{пл} 168-169 °C. ЯМР ¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ, м.ч.: 2,32 с (3H, CH₃), 4,64 с (2H, CH₂), 6,99 дд (1H), 7,15 д (1H), 7,22-7,33 м (6H), 9,82 с (1H, NH).

3-хлоро-1-(4-хлоробензил)-4-[(3-гідрокси-феніл)аміно]-1H-пірол-2,5-діон 11: вихід 77 %, $T_{\text{пл}}$ 139-140 °С. ЯМР ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 4,62 с (2H, CH_2), 6,53-6,56 м (3H), 7,05 т (1H), 7,30 д (2H, $J=9$ Hz), 7,33 д (2H, $J=9$ Hz), 9,32 с (1H, OH), 9,65 с (1H, NH).

3-хлоро-1-(4-хлоробензил)-4-[(3-метокси-феніл)аміно]-1H-пірол-2,5-діон 12: вихід 89 %, $T_{\text{пл}}$ 127-128 °С. ЯМР ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 3,76 с (3H, OCH_3), 4,63 с (2H, CH_2), 6,67-6,72 м (3H), 7,18 т (1H), 7,30 д (2H, $J=9$ Hz), 7,33 д (2H, $J=9$ Hz), 9,75 с (1H, NH).

3-хлоро-1-(4-хлоробензил)-4-[(3-фторо-феніл)аміно]-1H-пірол-2,5-діон 13: вихід 87 %, $T_{\text{пл}}$ 136-137 °С. ЯМР ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 4,63 с (2H, CH_2), 6,86-6,96 м (3H), 7,28-7,34 м (5H), 9,91 с (1H, NH).

3-хлоро-1-(4-хлоробензил)-4-[(3-хлоро-феніл)аміно]-1H-пірол-2,5-діон 14: вихід 92 %, $T_{\text{пл}}$ 131-132 °С. ЯМР ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 4,63 с (2H, CH_2), 4,07-4,15 м (3H), 7,28-7,34 м (5H), 9,91 с (1H, NH).

3-хлоро-1-(4-хлоробензил)-4-[(3-трифторометил)феніл)аміно]-1H-пірол-2,5-діон 15: вихід 91 %, $T_{\text{пл}}$ 134-135 °С. ЯМР ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ , м.ч.: 4,64 с (2H, CH_2), 7,31 д (2H, $J=9$ Hz), 7,33 д (2H, $J=9$ Hz), 7,39-7,31 м (3H), 7,52 т (1H), 10,03 с (1H, NH).

Висновки. Одержаний ряд похідних малеїміду суттєво пригнічує ріст ракових клітин і потребує детального вивчення шляхом оптимізації та синтезу нових комбінаторних бібліотек.

Надійшла в редакцію 22.12.2009 р.

Antitumor activity of 1-benzyl-3-chloro-4-amino-1H-pyrrole-2,5-dione derivatives

S.S. Tarnavskiy, O.P. Kukhareno, N.V. Briukhovetska, V.M. Kharchenko, S.M. Yarmoluk

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Zabolotnogo Str., Kyiv, 03680, Ukraine

Summary. Forty derivatives of the 1-benzyl-4-anilino-2,5-dihydro-1H-2,5-pyrroledione were synthesized and tested for antitumor activity *in vitro*. According to the results of pre-screening included three human tumor cell lines fifteen compounds were shown to inhibit proliferation of cancer cells. These compounds were proceeded to testing on 64 human tumor cell lines. The 3-chloro-1-(4-chlorobenzyl)-4-[(3-chlorophenyl)amino]-1H-pyrrole-2,5-dione and 3-chloro-1-(4-chlorobenzyl)-4-[(3-trifluoromethyl)phenylamino]-1H-pyrrole-2,5-dione inhibited the growth of tumor cells ($\text{GI}_{50}=1\cdot 10^{-8}$ - $4,4\cdot 10^{-6}$ M).

Keywords: maleimide derivatives, human tumor cell lines, antitumor activity.

Перелік літератури

1. Novak K. Conference Report-Protein kinase inhibitors in cancer treatment: mixing and matching? // *Med. Gen. Med.* — 2004. — Vol. 6, No. 2. — P. 25.
2. Blume-Jensen P., Hunter T. Oncogenic kinase signaling // *Nature.* — 2001. — Vol. 411. — P. 355-365.
3. Jaye M.C., Krawiec J. A., Campobasso N. Discovery of substituted maleimides as live X receptor agonists and determination of a ligand-bound crystal structure // *J. Med. Chem.* — 2005. — Vol. 48. — P. 5419-5422.
4. Pat. 22204 (UA) Compound of 1,4-disubstituted 5-amino-1,2-dihydropyrrole-3-one having anticancer activity: Dubinina G.G., Volovenko Yu.M. — 21.02.2006. Appl. U20061855. 25.04.2007.
5. Yablonska S., Filinska O., Ostrovska G. et al. Antiproliferative properties and low hepatotoxicity of new cytostatic maleimide derivate // *Biochemistry of cell regulation 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference.* — Athens, Greece, 2008a. — P. 348.
6. Yablonska S. et al. Evaluation of hepatotoxicity of new cytostatic maleimide derivate // *Annales universitatis mariane curie-skłodowska Lublin-Polonia.* — 2008b. — Vol. XXI, No. 2 (55). — P. 227-279.
7. Lynchak O.V., Kharchuk I.V., Karpezo N.O., Ostrovska G.V., Rybalchenko V.K. The influence of derivative maleimide from cytostatic properties on the state of the rat's mucous membrane of large intestine // *Reports of morphology.* — 2010. — Vol. 16, No. 1. — P. 10-13.
8. Тарнавський С.С., Дубініна Г.Г., Головач С.М., Ярмолук С.М. Пошук протипухлинної активності серед похідних 2,5-дигідропірол-2,5-діону // *Біополімери і клітина.* — 2003. — Т. 19, № 3. — С. 287-291.
9. Тарнавський С.С., Дубініна Г.Г., Головач С.М., Ярмолук С.М. Взаємозв'язок протипухлинної активності зі структурою 3-хлоро-4-(3-гідроксианіліно)-2,5-дигідро-1H-2,5-піролдіону // *Біополімери і клітина.* — 2003. — Т. 19, № 6. — С. 548-552.