

## Пошук протипухлинної активності серед похідних 2,5-дигідропірол-2,5-діону

С. С. Тарнавський, Г. Г. Дубініна, С. М. Головач, С. М. Ярмолюк

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

E-mail: sergiy@yarmoluk.org.ua

Синтезовано та тестовано на протипухлинну активність (*in vitro*) 39 похідних 2,5-дигідропірол-2,5-діону. 1-Бензил-3-хлоро-4-(3-гідроксіаніліно)-2,5-дигідро-1H-2,5-піролдіон після прескринінгу відібрано і тестовано на 56 ліній ракових клітин людини. Для цієї сполуки знайдено:  $GI_{50}$  2,68 мкМ,  $LC_{50}$  31,7 мкМ (клітинна лінія MDA-MB-435 (рак молочної залози));  $GI_{50}$  3,35 мкМ,  $LC_{50}$  37,6 мкМ (клітинна лінія OVCAR-3 (рак яєчників));  $GI_{50}$  6,75 мкМ, 44,5 мкМ (клітинна лінія NCI-H23 (рак легень)).

Вступ. У 1977 р. із стрептоміцетів (*Streptomyces staurosporeus*) було виділено стауроспорин (1) (рис. 1) [1], структуру якого пізніше доведено за допомогою рентгеноструктурного аналізу [2, 3]. Дослідження стауроспорину показали, що в низьких концентраціях він пригнічує більшість відомих протеїназ (як серин-треонінових, так і тирозінових) та виявляє протиракову активність (*in vivo*) [4]. Саме це і зумовило підвищений інтерес хіміків-синтетиків до синтезу аналогів стауроспорину.

Переважну більшість робіт з хімії малеїмідів за останні десятиріччя було присвячено синтезу стауроспорину та його аналогів — 3,4-біс-індолілмалеїмідних похідних, що в багатьох випадках виявили вищі за стауроспорин специфічність інгібування та протипухлинну активність. Важливим фармакофорним фрагментом цих сполук є N-H-група малеїмідного циклу.

Синтетично одержані 7-гідроксистауроспорин 2 (UCN-01) та сполука 3 (NB-506) (рис. 1) використовують у клінічній практиці як антиракові препарати, що діють як інгібітори відповідно циклін-залежних кіназ (CDK<sub>2</sub>) та топоізомерази I [5, 6].

Відомо, що деякі 3-заміщені N-арил- та N-алкіл-4-хлор-2,5-дигідро-1H-2,5-піролдіони мають антибактеріальну активність (*Staphylococcus*, *Escherichia coli*) [7], але на протипухлинну активність їх не перевіряли.

Мета нашої роботи полягала в синтезі похідних 2,5-дигідропірол-2,5-діону (малеїмиду) як N-H-, так і N-заміщених з варіюванням замісників в 3-му і 4-му положеннях циклу та тестуванні їх на протипухлинну активність. Фактично, це спроба відійти від вже добре дослідженої 3,4-біс-індолілмалеїмідної структури та дослідити інші малеїмідні похідні — як уже раніше синтезовані, так і нові.

Матеріали і методи. Проходження реакції та чистоту синтезованих сполук контролювали хроматографічно на пластинках «Silufol UV-254» («Kavalier», Чехія), елюент: хлороформ:метанол (9:1). Структуру одержаних сполук доведено за допомогою ПМР, ІЧ спектрів та елементного аналізу. ІЧ спектри записували на приладах UR-20, Specord 75-IR («Carl Zeiss», ФРГ) та Pye Unicam («Philips», Нідерланди) в області 4000—400 см<sup>-1</sup> в таблетках KBr. Спектри ПМР записано в DMSO-d<sub>6</sub> на приладі фірми «Varian» (США) з робочою частотою 300 МГц і внутрішнім стандартом тетраметилсиланом. Величини хімічних зсувів визначали з точністю до 0,001 м. ч.

Загальна методика синтезу 1-R-3-NHR<sub>1</sub>-4-хлоро-2,5-дигідро-1H-2,5-піролдіонів 5.1—5.24. До розчину 0,01 моль відповідного дихлормалеїмиду 4 у 50 мл ізопропілового спирту додавали 0,021 моль відповідного аміну і кип'ятили протягом 2 год, охолоджували, відфільтровували та промивали невеликою кількістю ізопропілового спирту і водою. Одержані продукти хроматографічно чисті, при

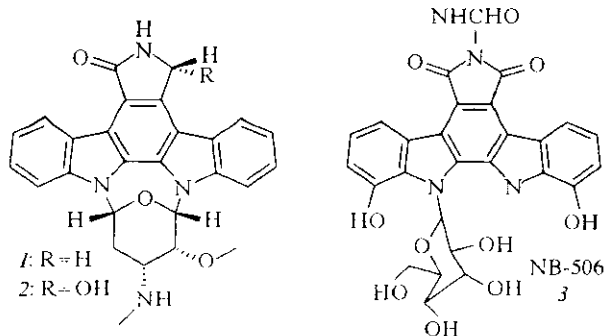


Рис. 1. Стауроспорин (1) та його синтетичні похідні: UCN-01 (2) та NB-506 (3)

необхідності можуть бути перекристалізовані з ізопропілового або етилового спирту. Виходи сполук 5.1—5.24 складають 70—95 %.

Сполуки 7.1, 8.7 [8] та 8.1—8.6, 9.1—9.2 [9] були синтезовані нами раніше.

Біологічне тестування виконували у співробітництві з Американським Національним Інститутом раку (National Cancer Institute) (<http://dtp.nci.nih.gov/index.html>).

Синтезовані речовини тестували на 56 ліній ракових клітин людини при п'яти різних концентраціях речовини ( $10^{-8}$ — $10^{-4}$  М) для з'ясування найефективнішої концентрації.

На першому етапі робили прескринінг сполук на трьох лініях ракових клітин (рак молочної залози, рак легенів, ЦНС) при одній стандартній концентрації  $10^{-4}$  М.

Ефективність дії речовини на клітинну лінію розраховували відповідно до одного з наведених виразів:

$$1) \text{ коли } (\{OD_{test}\} - \{OD_0\}) \geq 0, \text{ то } PG = 100 \cdot (\{OD_{test}\} - \{OD_0\}) / (\{OD_{ctrl}\} - \{OD_0\});$$

$$2) \text{ Коли } (\{OD_{test}\} - \{OD_0\}) < 0, \text{ то } PG = 100 \cdot (\{OD_{test}\} - \{OD_0\}) / \{OD_0\},$$

де:  $\{OD_0\}$  — середнє значення вимірів оптичної густини (OD) одразу після додавання речовини;  $\{OD_{test}\}$  — середнє значення вимірів OD після 48-год інкубації клітин, оброблених речовиною, що тестується;  $\{OD_{ctrl}\}$  — середнє значення вимірів OD після 48-год інкубації клітин без додавання речовини (контроль); PG — Percentage Growth — рівень мітотичної активності клітинної лінії після обробки речовиною порівняно з контролем.

Результати і обговорення. Нами синтезовано і тестовано на протипухлинну активність 39 похідних 2,5-дигідропірол-2,5-діону (малеїміду) 5.1—

9.2. Схему синтезу проілюстровано нижче. Результати прескринінгу, хімічні структури (або назви) замісників R; R<sub>1</sub>; R<sub>2</sub>; R<sub>3</sub>; R<sub>4</sub> сполук 5.1—9.2 наведено в табл. 1 та на схемі.

Сполука 5.2 успішно пройшла етап прескринінгу, для неї тотальна мітотична активність усіх трьох культур клітин склала менше 32 % порівняно з контролем. Дану сполуку відібрано для подальшого тестування на 56 ліній пухлинних клітин людини (табл. 2, 3).

Результати тестування сполуки 5.2 на 56 ліній пухлинних клітин представлено в табл. 3 та на рис. 2.

Для тестованого ряду 39 похідних 2,5-дигідропірол-2,5-діону (малеїміду) можна зробити деякі висновки стосовно залежності протипухлинної активності від структури сполуки. Якщо в третьому положенні малеїмідного циклу сполуки 5.2 (рис. 3) замість *m*-гідроксіанілінового фрагмента знаходиться залишок первинного або вторинного аліфатичного аміну (сполуки 5.1, 5.10—5.14, 5.18), то активність відсутня. Заміна -OH (гідроксильної) групи в структурі 5.2 на -OCH<sub>3</sub> (метокси-групу) (сполука 5.4) спричинює втрату активності. Наявність -OCH<sub>3</sub> у положенні 4' (сполука 5.5) або в положенні 2' (сполука 5.3) також веде до втрати активності. 2',4'-Диметокси- (сполука 5.7) та 2',5'-диметоксипохідні (сполука 5.8) теж не мають активності. Для сполуки 5.6 (N-CH<sub>2</sub>Ph; 2'-OCH<sub>3</sub>-5'-Cl) мітотична активність на клітинах раку легенів становить 39 %, тобто мітотична активність порівняно з контролем пригнічується на 61 %. Сполука 6.1, у якій відсутній бензильний замісник в положенні 1 малеїмідного циклу, а в положенні 3, як і

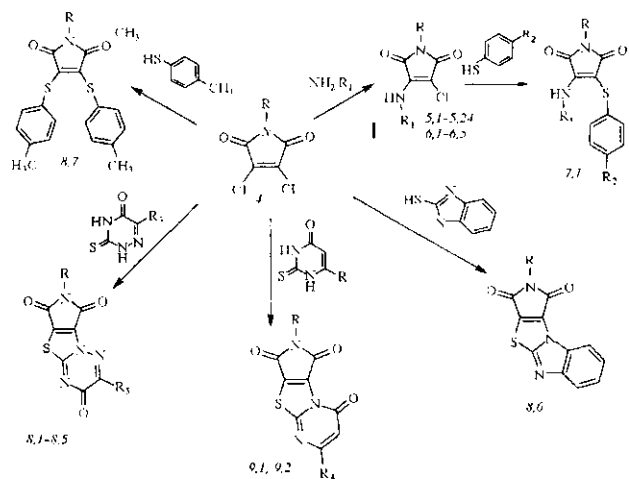


Схема синтезу

Таблиця 1  
Результати прескринінгу сполук 5.1—9.2 на протиракову активність

Номер структури	Замісник	Мітолічна активність порівняно з контролем, %			Висновок
		Рак молочної залози	Рак товстої кишки	Рак ШНС	
5.1	R = CH <sub>2</sub> Ph; R <sub>1</sub> = циклогексил	125	119	113	Неактивна
5.2	R = CH <sub>2</sub> Ph; R <sub>1</sub> = (3'-OH)Ph	1	4	18	Активна
5.3	R = CH <sub>2</sub> Ph; R <sub>1</sub> = (2'-OCH <sub>3</sub> )Ph	114	119	115	Неактивна
5.4	R = CH <sub>2</sub> Ph; R <sub>1</sub> = (3'-OCH <sub>3</sub> )Ph	130	114	118	Неактивна
5.5	R = CH <sub>2</sub> Ph; R <sub>1</sub> = (4'-OCH <sub>3</sub> )Ph	137	114	126	Неактивна
5.6	R = CH <sub>2</sub> Ph; R <sub>1</sub> = (2'-OCH <sub>3</sub> -5'-Cl)Ph	49	39	63	Неактивна
5.7	R = CH <sub>2</sub> Ph; R <sub>1</sub> = (2', 4'-(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )Ph	117	118	120	Неактивна
5.8	R = CH <sub>2</sub> Ph; R <sub>1</sub> = (2', 5'-(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )Ph	94	109	105	Неактивна
5.9	R = CH <sub>2</sub> Ph; NHR <sub>1</sub> = N-(OCH <sub>3</sub> )Ph	131	119	122	Неактивна
5.10	R = CH <sub>2</sub> Ph; R <sub>1</sub> = тетрагідрофурфурил	116	111	114	Неактивна
5.11	R = CH <sub>2</sub> Ph; NHR <sub>1</sub> = піперидин	94	97	106	Неактивна
5.12	R = CH <sub>2</sub> Ph; NHR <sub>1</sub> = (4'-N-CH <sub>3</sub> )-піперазин	93	101	102	Неактивна
5.13	R = CH <sub>2</sub> Ph; R <sub>1</sub> = CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	99	101	102	Неактивна
5.14	R = CH <sub>2</sub> Ph; R <sub>1</sub> = CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (3', 4'-(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )Ph	96	91	120	Неактивна
5.15	R = CH <sub>2</sub> Ph; R <sub>1</sub> = (2'-COOH)Ph	131	114	114	Неактивна
5.16	R = CH <sub>2</sub> Ph; R <sub>1</sub> = (3'-COOEt)Ph	126	111	117	Неактивна
5.17	R = CH <sub>2</sub> Ph; R <sub>1</sub> = 1', 5'-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -3'-оксо-2'-Ph-2',3'-дигідро-1H-4'-піразоліл	125	115	120	Неактивна
5.18	R = CH <sub>2</sub> Ph; NHR <sub>1</sub> = (4'-N-CH <sub>2</sub> Ph)-піперазин	115	109	132	Неактивна
5.19	R = CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Ph; R <sub>1</sub> = (2'-OH)Ph	85	111	140	Неактивна
5.20	R = CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Ph; R <sub>1</sub> = (3'-Cl- 4'-CH <sub>3</sub> )Ph	94	109	140	Неактивна
5.21	R = CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Ph; R <sub>1</sub> = 3'-морфолінопропіл	105	110	140	Неактивна
5.22	R = CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Ph; R <sub>1</sub> = тетрагідрофурфурил	107	104	126	Неактивна
5.23	R = CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Ph; R <sub>1</sub> = піридилметил	103	98	113	Неактивна
5.24	R = Ph; R <sub>1</sub> = 4'-(N-(4''-OCH <sub>3</sub> Ph))бензамід	123	117	115	Неактивна
6.1	R = H; R <sub>1</sub> = (3'-OH)Ph	63	61	73	Неактивна
6.2	R = H; R <sub>1</sub> = (4'-OPh)Ph	64	67	76	Неактивна
6.3	R = H; NHR <sub>1</sub> = тетрагідроізохінолін	127	100	129	Неактивна
6.4	R = H; R <sub>1</sub> = 4'-бензенсульфонамід	109	103	138	Неактивна
6.5	R = H; NHR <sub>1</sub> = (4'-N-CH <sub>2</sub> Ph)-піперазин	123	100	144	Неактивна
7.1	R = H; R <sub>1</sub> = (3', 4'-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )Ph; R <sub>2</sub> = CH <sub>3</sub>	117	93	128	Неактивна
8.1	R = CH <sub>2</sub> Ph; R <sub>3</sub> = 2'-тіофен	77	99	92	Неактивна
8.2	R = Ph; R <sub>3</sub> = H	89	105	103	Неактивна
8.3	R = (3'-Cl- 4'-CH <sub>3</sub> )Ph; R <sub>3</sub> = CH <sub>3</sub>	111	99	131	Неактивна
8.4	R = Ph; R <sub>3</sub> = Ph	118	107	118	Неактивна
8.5	R = Ph; R <sub>3</sub> = 2'-тіофен	106	109	138	Неактивна
8.6	R = 4'-OCH <sub>3</sub> )Ph	121	111	142	Неактивна
8.7	R = H	62	88	44	Неактивна
9.1	R = CH <sub>2</sub> Ph; R <sub>4</sub> = H	100	105	106	Неактивна
9.2	R = CH <sub>2</sub> Ph; R <sub>4</sub> = CH <sub>3</sub>	124	117	115	Неактивна

Таблиця 2

Перелік ракових клітин, використаних у біологічних тестах для сполуки 5.2

Клітини								
Лейкемія	Рак легенів	Рак товстої кишки	Рак ЦНС	Меланома	Рак яєчників	Рак нирок	Рак передміхурової залози	Рак молочної залози
CCRF-CEM	A549/ATCC	COLO205	SF-268	MALME-3M	IGROV1	786-0	PC-3	MCF7
HL-60 (ГВ)	EKVX	HCT-15	SF-295	M14	OVCAR-3	ACHN	DU-145	NCI/ADR-RES
K-562	HOP-62	HCT-116	SF-539	SK-MEL-2	OVCAR-4	CAKI-1	—	MDA-MB-231/ATCC
MOLT-4	HOP-92	HT29	SNB-19	SK-MEL-28	OVCAR-5	RXF393	—	HS578T
RPMI-8226	NCI-H226	KM12	SNB-75	SK-MEL-5	SK-OV-3	SN12C	—	MDA-MB-435
SR	NCI-H23	SW-620	U251	UACC-257	OVCAR-8	TK-10	—	T-47D
—	NCI-H322M	—	—	LOXIMVI	—	UO-31	—	—
—	NCI-H460	—	—	UACC-62	—	—	—	—

Таблиця 3

Результати тестування сполуки 5.2 на 56 ліній ракових клітин людини (наведено результати досліджень з  $LC_{50} < 60$  мкМ)

Клітинна лінія пухлин	$GI_{50}$ , мкМ	TGI, мкМ	$LC_{50}$ , мкМ
KM12 (рак товстої кишки)	10.8	25.3	59.3
LOX IMVI (меланома)	11.2	25.7	59.0
OVCAR-5 (рак яєчників)	17.4	32.0	58.9
SNB-19 (рак ЦНС)	11.8	26.3	58.6
SN12C (рак нирок)	13.2	27.5	57.2
MALME-3M (меланома)	18.3	32.6	58.1
HCT-116 (рак товстої кишки)	6.54	21.8	55.6
DU-145 (рак передміхурової залози)	14.9	28.1	53.0
UACC062 (меланома)	11.3	24.3	52.4
HOP-62 (рак легенів)	12.6	25.7	52.1
SF-539 (рак ЦНС)	12.6	25.4	51.3
SK-MEL-5 (меланома)	8.67	21.4	47.5
NCI-H23 (рак легенів)	6.75	19.8	44.5
OVCAR-3 (рак яєчників)	3.35	12.1	37.6
MDA-MB-435 (рак молочної залози)	2.68	8.37	31.7

Примітка. \* $GI_{50}$  — концентрація досліджуваної речовини, за якої ріст ракових клітин зменшується вдвічі порівняно з контролем; TGI — концентрація, за якої росту ракових клітин не спостерігається;  $LC_{50}$  — концентрація, при якій половина ракових клітин гине.

в структурі 5.2, знаходиться залишок *m*-гідроксіаніліну, лише незначно пригнічує мітотичну активність, тому є підстави вважати, що *N*-бензильний замісник малеїмідного циклу є критичним.

Продукти анелювання гетероциклічних систем по грані [с] малеїмідного циклу (сполуки 8.1—8.6, 9.1, 9.2) не мають протипухлинного ефекту.

Отже, біологічне тестування на протипухлинну активність 39 похідних 2,5-дигідропірол 2,5-діону (малеїмід) показало, що 1-бензил-3-хлоро-4-(3-гідроксіаніліно)-2,5-дигідро-1H-2,5-піролдіон 5.2 виявляє протипухлинну активність у мікромольній концентрації. Для сполуки 5.2 знайдено:  $GI_{50}$  2,68 мкМ,  $LC_{50}$  31,7 мкМ (клітинна лінія MDA-MB-

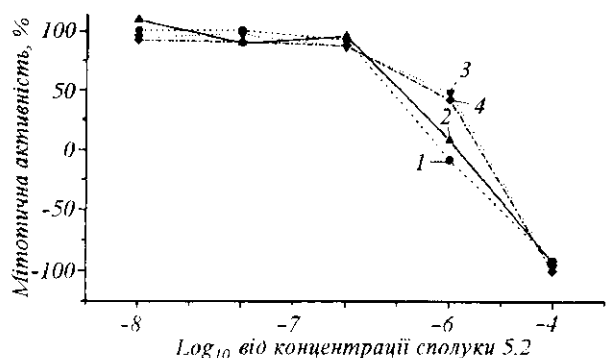


Рис. 2. Графік залежності мітотичної активності від концентрації сполуки 5.2 для різних клітинних ліній пухлин: 1 — MDA-MB-435 (рак молочної залози),  $GI_{50}$  2,68 мкМ,  $LC_{50}$  31,7 мкМ; 2 — OVCAR-3 (рак яєчників),  $GI_{50}$  3,35 мкМ,  $LC_{50}$  37,6 мкМ; 3 — SK-MEL-5 (меланома),  $GI_{50}$  8,67 мкМ,  $LC_{50}$  47,5 мкМ; 4 — NCI-H23 (рак легенів),  $GI_{50}$  6,75 мкМ,  $LC_{50}$  44,5 мкМ

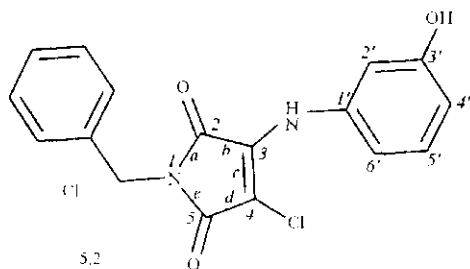


Рис. 3. Структура активної сполуки 5.2 — 1-бензил-3-хлоро-4-(3-гідроксіаніліно)-2,5-дигідро-1H-2,5-піролдіону

435 (рак молочної залози));  $GI_{50}$  3,35 мкМ,  $LC_{50}$  37,6 мкМ (клітинна лінія OVCAR-3 (рак яєчників));  $GI_{50}$  6,75 мкМ, 44,5 мкМ (клітинна лінія NCI-H23 (рак легенів)).

Таким чином, одержані дані свідчать про те, що серед даного класу сполук — 3-заміщених N-арил- та N-алкіл-4-хлор-2,5-дигідро-1H-2,5-піролдіонів — варто продовжувати пошук протипухлинного ефекту на основі оптимізації активної структури 5.2.

S. S. Tarnavskiy, G. G. Dubinina, S. M. Golovach, S. M. Yarmoluk

Search for antitumor activity among derivatives of the 2,5-dihydropyrrole-2,5-dione

#### Summary

39 derivatives of the 2,5-dihydropyrrole-2,5-dione were synthesized and tested on antitumor activity. The 1-benzyl-3-chloro-4-(3-hydroxyanilino)-2,5-dihydro-1H-2,5-pyrroledione (5.2) was selected after pre-screening and tested on 56 cell lines of human tumors. The compound 5.2 exhibits antitumor activity:  $GI_{50}$  2.68  $\mu$ M,  $LC_{50}$  31.7

$\mu$ M (cell line MDA-MB-435 (Breast Cancer));  $GI_{50}$  3.35  $\mu$ M,  $LC_{50}$  37.6  $\mu$ M (cell line OVCAR-3 (Ovarian Cancer));  $GI_{50}$  6.75  $\mu$ M,  $LC_{50}$  44.5  $\mu$ M (cell line NCI-H23 (Non-small Cell Lung Cancer)).

S. S. Tarnavskiy, G. G. Dubinina, S. M. Golovach, S. M. Yarmoluk

Поиск противоопухолевой активности в ряду производных 2,5-дигидропиррол-2,5-диона

#### Резюме

Синтезированы и тестированы на противоопухолевую активность 39 производных 2,5-дигидропиррол-2,5-диона. 1-Бензил-3-хлоро-4-(3-гидроксианилино)-2,5-дигидро-1H-2,5-пирролдион после прескрининга отобран и тестирован на 56 линиях раковых клеток человека. Для этого соединения найдено:  $GI_{50}$  2,68 мкМ,  $LC_{50}$  31,7 мкМ (клеточная линия MDA-MB-435 (рак молочной железы));  $GI_{50}$  3,35 мкМ,  $LC_{50}$  37,6 мкМ (клеточная линия OVCAR-3 (рак яичников));  $GI_{50}$  6,75 мкМ, 44,5 мкМ (клеточная линия NCI-H23 (рак легких)).

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Omura S., Iwai Y., Hirano A., Nakayawa A., Awaya J., Tsuchiya T., Takahashi Y., Masuma R. A new alkaloid AM-2282 of streptomycetes origin taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization // J. Antibiot.—1977.—30.—P. 275—282.
- Furusaki A., Hashiba N., Matsumoto T. X-ray crystal structure of staurosporine: a new alkaloid from a streptomycetes strain // J. Chem. Soc., Chem. Commun.—1978.—N 18.—P. 800—801.
- Furusaki A., Hashiba N., Matsumoto T., Hirano A., Iwai Y., Omura S. The crystal and molecular structure of staurosporine, a new alkaloid from a streptomycetes strain // Bull. Chem. Soc. Jap.—1982.—55.—P. 3681—3685.
- Fisher P. M., Lane D. P. Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anti-cancer therapeutics // Curr. Med. Chem.—2000.—7.—P. 1213—1245.
- Senderowicz A. M. The cell cycle as a target for cancer therapy: basic and clinical findings with the small molecule inhibitors flavopiridol and UCN-01 // Oncologist.—2002.—12.—P. 12—19.
- Bailly C., Qu X., Chaires J. B., Colson P., Houssier C., Ohkubo M., Nishimura S., Yoshinari T. Substitution at the F-Ring N-Imide of the indolocarbazole antitumor drug NB-506 increases the cytotoxicity, DNA binding, and topoisomerase I inhibition activities // J. Med. Chem.—1999.—42.—P. 2927—2935.
- Andricopulo A. D., Yunes R. A., Nunes R. J., Savi A. O. S., Correa R., Cruz A. B., Filho V. C. Synthesis and antibacterial activity of cyclic imides: 3,4-dichloromaleimides and 4-substituted 3-chloromaleimides // Quim. Nova.—1998.—21, N 5.—P. 573—577.
- Дубініна Г. Г., Тарнавський С. С., Головач С. М., Ярмолук С. М. Взаємодія 3,4-дихлормалеїмідів з N- та S-нуклеофілами // Укр. хім. журн.—2002.—68, № 8.—С. 47—51.
- Dubinina G. G., Volovenko Yu. M., Shishkina S. V., Shishkin O. V., Yarmoluk S. M. Reaction of N-substituted 3,4-dichloromaleimides with  $\alpha$ -mercaptoazaheterocycles // Heterocycles.—2001.—55, N 11.—P. 2189—2198.

УДК 547.745:576.385.5  
Надійшла до редакції 20.05.02