

Протипухлинна активність 6-заміщених похідних 4-алкіламінохіназоліну

В. М. Сапелкін, І. Є. Маковенко, С. С. Лукашов, Г. Г. Дубініна, С. М. Ярмолук

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна
E. mail: sergivy@yarmoluk.org.ua

Синтезовано та протестовано на протипухлинну активність in vitro 13 похідних 6-R-4-алкіламінохіназолінів. За результатами тестування на 56 лініях ракових клітин людини знайдено, що чотири сполуки: 4.1, 4.9—4.11 пригнічують ріст ракових клітин у мікромолярних концентраціях. Для 1-фенілетил(4-хіназоліл)аміну (4.1) знайдено: $GI_{50} = 2,29$ мкМ; $LC_{50} = 46,7$ мкМ (клітинна лінія SK-MEL-5 (меланома)); для 6-бромо-4-хіназоліл(трет-бутил)аміну (4.10): $GI_{50} = 3,82$ мкМ; $LC_{50} = 43,7$ мкМ (клітинна лінія SK-MEL-5 (меланома)) та $GI_{50} = 2,64$ мкМ; $LC_{50} = 44,2$ мкМ (клітинна лінія CAKI-1 (рак нирок)).

Вступ. Відомо, що похідні хіназоліну є інгібіторами як серин-треонінових, так і тирозинових протеїнкіназ та виявляють протипухлинний ефект *in vivo* [1—4]. Декілька похідних 4-анілінохіназоліну проходять III фазу клінічного випробування як протиракові препарати (рис. 1) [5—8].

Проте протипухлинну активність 4-алкіламінохіназолінів досліджено недостатньо. Метою цієї роботи є пошук сполук з протираковою активністю серед 6-заміщених похідних 4-алкіламінохіназоліну, схему синтезу яких наведено нижче.

Матеріали і методи. Синтез 6-R-4-алкіламінохіназолінів 4.1—4.13. М е т о д А. 10 ммоль відповідного 4-хлорохіназоліну 3.1—3.3 розчиняли у 50 мл хлороформу, додавали 10,5 ммоль аміну та 10,5 ммоль триетиламіну і кип'ятили протягом 24 год. Реакційну суміш охолоджували та обробляли 2 н розчином NaOH до pH 8—9, далі відділяли органічну фазу. Хлороформ випаровували у вакуумі, залишок перекристалізували із спирту або бензолу. Вихід сполук 4.1, 4.7—4.13 56—95 %.

М е т о д Б (одержання гідрохлоридів 4-алкіламінохіназолінів). До розчину 10 ммоль 4-хлорохіназоліну 3.1 у 3 мл диметилформаміду додавали 10,5 ммоль відповідного аміну і кип'ятили упродовж 5—10 хв, охолоджували, відфільтровували осад, промивали невеликою кількістю ацето-

ну. Перекристалізовані із спирту сполуки 4.2—4.6 одержували у вигляді гідрохлоридів з виходом 62—84 %. Замісники R і R1 сполук 4.1—4.13 наведено у табл. 1.

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

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

На першому етапі здійснено прескринінг сполук на трьох лініях ракових клітин (рак молочної залози, рак легенів, рак центральної нервової системи) при одній стандартній концентрації речовини 100 мкМ (табл. 1).

Антипроліферативну дію речовини на клітинну лінію розраховували відповідно до одного з наведених виразів:

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

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

де: $\{OD_0\}$ — середнє значення вимірів оптичної густини (OD) одразу після додавання речовини; $\{OD_{\text{test}}\}$ — середнє значення вимірів OD після 48-год інкубації клітин, оброблених речовиною, що

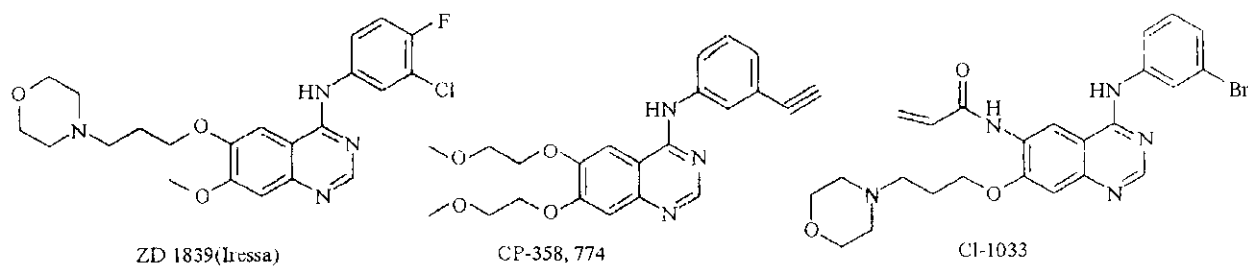


Рис. 1. Структура сполук, що проходять клінічне випробування як протиракові препарати

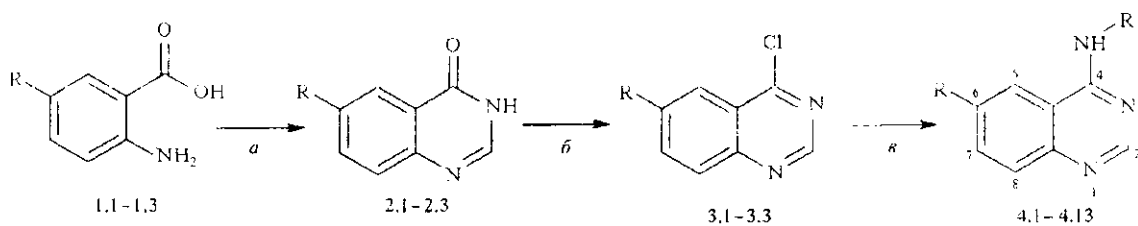


Схема синтезу 6-R-4-алкіламінохіназолінів

R = H; CH₃; Br. Умови реакцій: a — HCONH₂, 150 °C; b — POCl₃, PCl₅, кип'ятіння; c — R₁NH₂, CHCl₃ (Et₃N), кип'ятіння (метод А); R₁NH₂, ДМФА, кип'ятіння (метод Б).

Таблиця 1

Результати прескринінгу 6-R-4-алкіламінохіназолінів 4.1—4.13 на наявність протипухлинної активності

№ сполуки	Замісник		Метод синтезу	Мітотична активність порівняно з контролем, %			Висновок
	R	R1		Рак молочної залози	Рак легенів	Рак центральної нервової системи	
4.1	H	1-Фенілетил	A	32	76	75	Активна
4.2	H	2-Метоксіетил	Б	57	92	115	Неактивна
4.3	H	3-Діетиламінопропіл	Б	50	97	119	Неактивна
4.4	H	Ізобутил	Б	41	92	108	Неактивна
4.5	H	2-Фурфурил	Б	45	96	114	Неактивна
4.6	H	2-Диметиламіноетил	Б	87	101	116	Неактивна
4.7	Br	Циклогексил	A	46	96	113	Неактивна
4.8	Br	Ізобутил	A	37	85	108	Неактивна
4.9	Br	Ізопропіл	A	25	53	57	Активна
4.10	Br	Трет-бутил	A	26	71	86	Активна
4.11	Me	Циклогексил	A	24	62	111	Активна
4.12	Me	Ізопропіл	A	37	82	105	Неактивна
4.13	Me	Аліл	A	45	89	103	Неактивна

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. Синтезовано та тестовано на протипухлинну активність *in vitro* 13 похідних 6-R-4-алкіламінохіназолінів 4.1—4.13. За результатами прескринінгу із 13 тестованих сполук відібрано чотири: 4.1, 4.9—4.11. Під дією цих

Таблиця 2

Перелік ліній пухлинних клітин, використаних для біологічного тестування сполук 4.1, 4.9—4.11*

Лейкемія	Рак легенів	Рак товстої кишки	Рак центральної нервової системи	Меланома	Рак яєчників	Рак нирок	Рак передміхурової залози	Рак молочної залози
CCRF-CEM	A549/ATCC	COLO 205	SF-268	LOX IMVI	IGROV-1	786-0	PC-3	MCF-7
HL-60(TB)	EKVX	HCT-116	SF-295	MALME-3M	OVCAR-3	ACHN	DU-145	NCI/ADR-RES
K-562	HOP-62	HCT-15	SF-539	M14	OVCAR-4	CAKI-1	—	MDA-MB-231/ATCC
MOLT-4	HOP-92	HT29	SNB-19	SK-MEL-2	OVCAR-5	RXF 393	—	HS 578T
PRMI-8226	NCI-H226	KM12	SNB-75	SK-MEL-28	OVCAR-8	SN12C	—	MDA-MB-435
SR	NCI-H23	SW-620	U251	SK-MEL-5	SK-OV-3	TK-10	—	T-47D
—	NCI-H322M	—	—	UACC-257	—	UO-31	—	—
—	NCI-H460	—	—	UACC-62	—	—	—	—
—	NCI-H522	—	—	—	—	—	—	—

*Сполуку 4.11 не було тестовано на пухлинних клітинах лейкемії та HOP-92 (рак легенів).

Таблиця 3

Результати тестування сполук 4.1, 4.9—4.11 на 56 лініях пухлинних клітин людини (наведено результати досліджень з $LC_{50} < 83$ мкМ)*

№ сполуки	Ракова клітинна лінія	GI_{50} , мкМ	TGI, мкМ	LC_{50} , мкМ
4.1	SK-MEL-5 (меланома)	2,29	16	46,7
4.9	SK-MEL-5 (меланома)	8,28	27,2	75,8
4.10	DU-145 (рак передміхурової залози)	16,1	36,6	83,0
4.10	MDA-MB-435 (рак молочної залози)	4,60	19,7	74,7
4.10	SF-539 (рак центральної нервової системи)	17,0	35,7	75,1
4.10	MALME-3M (меланома)	20,0	38,6	74,5
4.10	UACC-62 (меланома)	13,2	30,2	69,0
4.10	M-14 (меланома)	15,4	32,7	69,4
4.10	786-0 (рак нирок)	18,8	35,1	65,5
4.10	ACHN (рак нирок)	11,4	27,3	65,5
4.10	NCI/ADR-RES (рак молочної залози)	13,3	28,5	61,0
4.10	NCI-H522 (рак легенів)	3,02	17,3	56,9
4.10	OVCAR-3 (рак яєчників)	10,7	24,4	55,8
4.10	HCT-116 (рак товстої кишки)	10,3	22,5	49,1
4.10	CAKI-1 (рак нирок)	2,64	18,1	44,2
4.10	SK-MEL-5 (меланома)	3,82	16,7	43,7
4.11	COLO 205 (рак товстої кишки)	17,1	37,1	80,4
4.11	SK-MEL-5 (меланома)	7,85	24,0	63,2

* GI_{50} — концентрація досліджуваної речовини (мкМ), за якої ріст ракових клітин зменшується вдвічі порівняно з контролем; TGI — концентрація, за якої ріст ракових клітин не спостерігається (стадія ремісії); LC_{50} — концентрація, за якої половина ракових клітин гине.

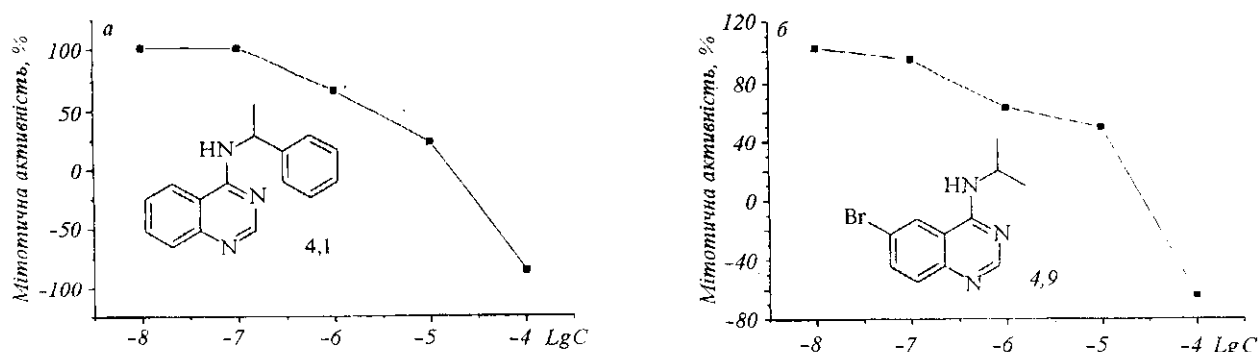


Рис. 2. Графіки залежності мітотичної активності від логарифма концентрації сполук 4.1 (а) ($LC_{50} = 46,7$ мкМ) та 4.9 (б) ($LC_{50} = 75,8$ мкМ) для клітинної лінії SK-MEL-5 (меланома)

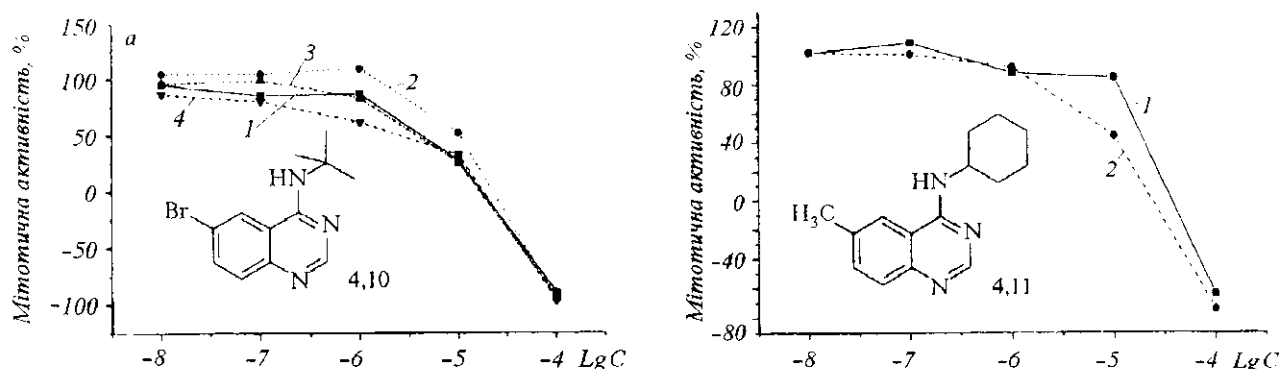


Рис. 3. Графіки залежності мітотичної активності від логарифма концентрації: а — сполуки 4.10 та б — сполуки 4.11 для різних клітинних ліній пухлин (а: 1 — NCI-H23, рак легенів, $LC_{50} = 46,8$ мкМ; 2 — HCT-116, рак товстої кишки, $LC_{50} = 49,1$ мкМ; 3 — SK-MEL-5, меланома, $LC_{50} = 43,7$ мкМ; 4 — SKI-1, рак нирок, $LC_{50} = 44,2$ мкМ; б: 1 — COLO205, рак товстої кишки, $LC_{50} = 80,4$ мкМ; 2 — SK-MEL-5, меланома, $LC_{50} = 63,2$ мкМ)

сполук у концентрації 100 мкМ мітотична активність ракових клітин пригнічувалася і становила менше за 32 % порівняно з контрольним дослідом хоча б для однієї з трьох ліній пухлинних клітин. Для них проведено тестування на 56 лініях пухлинних клітин людини, перелік яких наведено у табл. 2, а найвагоміші результати дослідження — представлені у табл. 3 та на рис. 2, 3. Сполуки 4.4, 4.8, 4.12 мали близький до активних сполук рівень пригнічення мітотичної активності.

Графіки залежності мітотичної активності від логарифма концентрації активних сполук 4.1, 4.9—4.11 для різних клітинних ліній наведено на рис. 2, 3.

Серед тестованих сполук 4.1—4.13 активними виявилися ті, в яких атом азоту замісника у положенні 4 хіназоліну зв'язаний з розгалуженим гідрофобним вуглецевим ланцюгом R_1 . Зазначений атом азоту зв'язаний із вторинним (активні сполуки 4.1, 4.9, 4.11) та з третинним вуглецем (активна

сполука 4.10). Наявність у заміснику R_1 електронегативних атомів кисню та азоту, які підвищують гідрофільність (сполуки 4.2, 4.3, 4.5, 4.6), призводить до втрати активності. Значне зростання активності спостерігається при заміні атома бром у положенні 6 хіназолінового ядра сполуки 4.7 ($R = Br$; $R_1 =$ циклогексил) на метильну групу (сполука 4.11).

Найкращі результати, тобто найменше значення LC_{50} , для всіх активних сполук 4.1, 4.9—4.11 спостерігалися для однієї клітинної лінії — SK-MEL-5 (меланома) (табл. 3). Самою активною виявилася сполука 4.10, яка пригнічує ріст багатьох клітинних ліній пухлин у нижчих порівняно з іншими активними сполуками концентраціях (табл. 3, рис. 3).

Для 1-фенілетил(4-хіназоліл)аміну (4.1) знайдено: $GI_{50} = 2,29$ мкМ; $LC_{50} = 46,7$ мкМ (клітинна лінія SK-MEL-5 (меланома)); для 6-бромо-4-хіназоліл(трет-бутил)аміну (4.10): $GI_{50} = 3,82$ мкМ;

$IC_{50} = 43,7$ мкМ (клітинна лінія SK-MEL-5 (меланома)) та $GI_{50} = 2,64$ мкМ; $IC_{50} = 44,2$ мкМ (клітинна лінія CAKI-1).

Висновки. Таким чином, серед 13 синтезованих та тестованих на протипухлинну активність *in vitro* похідних 6-R-4-алкіламінохіназолінів чотири сполуки (4.1 і 4.9—4.11) виявилися здатними при низьких мікромольних концентраціях пригнічувати ріст ракових клітин, а в середніх мікромольних концентраціях діяти на них токсично, що робить перспективним подальший пошук активних протипухлинних речовин серед даного класу сполук.

V. M. Sapelkin, I. E. Makovenko, S. S. Lukashov, G. G. Dubinina, S. M. Yarmoluk

Antitumor activity of 6-substituted derivatives of 4-alkylaminoquinazolines

Summary

13 derivatives of 6-R-4-alkylaminoquinazoline were synthesized and tested for antitumor activity (in vitro). According to the results of testing with 56 human tumor cell lines four compounds 4.1, 4.9-4.11 were shown to inhibit the proliferation of cancer cells at low micromolar concentrations. 1-phenylethyl(4-quinazolinyl)amine (4.1) exhibits antitumor activity: GI_{50} 2.29 μ M; LC_{50} 46.7 μ M (cell line SK-MEL-5 (Melanoma)); the 6-bromo-4-quinazolinyl(tert-butyl)amine (4.10): GI_{50} 3.82 μ M; LC_{50} 43.7 μ M (cell line SK-MEL-5 (Melanoma)) and GI_{50} 2.64 μ M; LC_{50} 44.2 μ M (cell line CAKI-1 (Renal Cancer)).

В. М. Сапелкін, І. Е. Маковенко, С. С. Лукашов, Г. Г. Дубинина, С. М. Ярмолук

Противоопухолевая активность 6-замещенных производных 4-алкиламинохиназолина

Резюме

Синтезированы и тестированы на противоопухолевую активность (in vitro) 13 производных 6-R-4-алкиламинохиназолинов. По результатам тестирования на 56 линиях раковых клеток человека найдено, что четыре соединения 4.1, 4.9—4.11 способны уснетить рост раковых клеток в микромолярных концентрациях. Для 1-фенилэтил(4-хиназолил)амин (4.1) найдено: $GI_{50} = 2,29$ мкМ; $LC_{50} = 46,7$ мкМ (клеточная линия SK-MEL-5 (меланома)); для 6-бromo-4-хиназолил(трет-бутил)амин (4.10): $GI_{50} = 3,82$ мкМ; $LC_{50} = 43,7$ мкМ (клеточная линия SK-MEL-5 (меланома)) и $GI_{50} = 2,64$ мкМ; $LC_{50} = 44,2$ мкМ (клеточная линия CAKI-1 (рак почки)).

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Sielecki T. M., Boylan J. F., Brufield P. A., Trainor G. L. Cyclin-dependent kinase inhibitors: useful targets in cell cycle regulation // J. Med. Chem.—2000.—43, N 1.—P. 1—18.
2. Small J. B., Palmer B. D., Rewcastle G. W., Denny W. A., McNamara D. J., Dobrasin E. M., Bridges A. J., Zhou H., Showalter H. D., Winters R. T., Leopold W. R., Fry D. W., Nelson J. M., Sliantak V., Elliot W. L., Roberts B. J., Vincent P. W., Patmore S. J. Tyrosine kinase inhibitors. 15. 4-(Phenylamino)quinazoline and 4-(phenylamino)-pyrido[4,1-pyrimidine] acrylamides as irreversible inhibitors of the ATP binding site of the epidermal growth factor receptor // J. Med. Chem. 1999. 42, N 1. P. 1803—1815.
3. Wakeling A. E., Barker A. G., Davies D. H., Brown D. S., Green I. R., Carlidge S. A., Woodburn J. R. Specific inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by 4-anilinoquinazolines // Breast cancer Res. Treat.—1996.—38.—P. 67—73.
4. Liu Xin-Guang, Liang Nian-Ci. Inhibitory effect and kinetic analysis of tyrphostin AG 1478 on recombinant human protein kinase CK2 holoenzyme // Acta pharmacol Sin. 2002. 23, N 6.—P. 556—561.
5. Tamura T. Molecular target-based cancer therapy: epidermal growth factor receptor inhibitors // Nippon Geka Gakkai Zaasshi.—2002.—103, N 2.—P. 233—236.
6. Ciardiello F., Caputo R., Bianko R., Damiano U., Pomato G., De Placido S., Tortora G. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD 1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor // Clin. Cancer. —2000.—6, N 5.—P. 2053—2063.
7. Wissner A., Brawner F. M., Rabindran S., Nilakantan R., Greenberger L., Shen R., Wang Y., Tsou H. Syntheses and EGFR and HER-2 kinase inhibitory activities of 4-anilinoquinoline-3-carbonitriles: analogues of three important 4-anilinoquinazolines currently undergoing clinical evaluation as therapeutic antitumor agents // Bioorg. Med. Chem. Lett.—2002.—12, N 20. P. 2893—2898.
8. Slichenmyer W. J., Fry D. W. Anticancer therapy targeting the erbB family of receptor tyrosine kinase // Semin. Oncol.—2001.—28.—P. 67—79.
9. Титце Л., Айхер Т. Препаративная органическая химия.—М.: Мир, 1999.—704 с.
10. Жуигиету Г. И., Рехтер М. А. Изатин и его производные.—Кишинев: Штиинца, 1977.—229 с.
11. Amarego W. L. F. Preparation of phthalazine and quinazoline // J. Appl. Chem.—1961.—N 11.—P. 70—72.

УДК 576.385.5

Надійшло до редакції 29.07.02